

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Institut für Toxikologie und Umwelthygiene

**Ermittlung der Belastung
durch den Metaboliten 1,2:3,4-Diepoxybutan
bei 1,3-Butadien-exponierten Ratten und Mäusen**

Martin Bernhard Riester

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny
Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. J. G. Filser
2. Univ.-Prof. Dr. M. Göttlicher

Die Dissertation wurde am 27.01.2011 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 14.12.2011 angenommen.

*Meinen Eltern
und Anna*

„Das ist keine Kunst, Doktor und Meister zu werden; (...).

Das ist eine Kunst, wahrhaftig Doktor und Meister zu sein.“

Philipp Aureolus Theophrast Bombast von Hohenheim,

genannt Paracelsus

1493 – 1541

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	6
1 Einleitung	8
1.1 Problemstellung	8
1.2 Eigenschaften von 1,3-Butadien	9
1.2.1 Physikalische und chemische Eigenschaften	9
1.2.2 Verwendung und Exposition	9
1.2.3 Metabolismus	10
1.2.4 Genotoxizität und Kanzerogenität von 1,3-Butadien und seinen Metaboliten	11
1.2.5 Toxikokinetik	14
1.3 Aufgabenstellung	18
2 Material und Methoden	20
2.1 Chemikalien und Geräte	20
2.2 Versuchstiere	24
2.3 Analytische Methoden	25
2.3.1 Bestimmung von atmosphärischem 1,3-Butadien	25
2.3.1.1 Messbedingungen	25
2.3.1.2 Kalibrierung	26
2.3.2 Analyse von 1,2:3,4-Diepoxybutan in Blut	28
2.3.2.1 Probenaufbereitung	28
2.3.2.2 Messung	30
2.3.2.3 Kalibrierung	35
2.4 Inhalative Expositionen von Ratten und Mäusen gegen 1,3-Butadien	39
2.4.1 Expositionssystem	39
2.4.1.1 Versuchsaufbau	39
2.4.1.2 Einstellung und Überwachung der Expositionskonzentration	40
2.4.2 Durchführung der Expositionen	42
2.4.2.1 Vorbereitung der Versuchstiere und Expositionsbeginn	42
2.4.2.2 Betäubung der Ratten	43
2.4.2.3 Tötung der Ratten und Mäuse sowie Entnahme von Blutproben	43

2.4.2.4	Kontrolltiere	44
2.5	Statistik	45
3	Ergebnisse	47
3.1	Expositionsbedingungen	47
3.2	1,2:3,4-Diepoxybutan im Blut	49
3.2.1	1,2:3,4-Diepoxybutan im Blut der Ratten	49
3.2.2	1,2:3,4-Diepoxybutan im Blut der Mäuse	52
4	Diskussion	55
4.1	Analytische Methoden zur Bestimmung von 1,2:3,4-Diepoxybutan in Blut und Perfusat	55
4.2	Vergleich von Daten aus der Literatur mit den hier erarbeiteten Ergebnissen	57
4.3	Mechanismus des speziesspezifischen Metabolismus von 1,3-Butadien	59
5	Ausblick	61
6	Zusammenfassung	62
	Literaturverzeichnis	64
	Danksagung	75
	Lebenslauf	76

Abkürzungsverzeichnis

AD	Außendurchmesser
amu	Atomare Masseneinheit
BD	1,3-Butadien
B-diol	3-Buten-1,2-diol
CAD	Collision Gas
CE	Collision Energy
<i>c_{IS Exp.}</i>	Konzentration an Internem Standard in einer Blutprobe nach Exposition
cps	counts per second
CUR	Curtain Gas
CXP	Cell Exit Potential
CYP	Cytochrom-P450-abhängige Monooxygenase
D	Deuterium
Da	Dalton
DEB	1,2:3,4-Diepoxybutan
DEM	Diethylmaleat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DP	Declustering Potential
EB	1,2-Epoxy-3-buten
EBD	3,4-Epoxy-1,2-butandiol
EH	Epoxidhydrolase
EP	Entrance Potential
FID	Flammenionisationsdetektor
GC	Gaschromatograph, Gaschromatographie
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
GS1	Nebulizer Gas
GS2	Turbo Gas
Hb	Hämoglobin
HbVal	<i>N</i> -(2-hydroxy-3-butenyl)valin
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie

<i>Hprt</i>	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase-Gen
IARC	International Agency for Research on Cancer
ID	Innendurchmesser
ISV	Ionisierungsspannung
LC	Flüssigchromatograph, Flüssigchromatographie
MRM	Multiple-Reaction-Monitoring
MS	Massenspektrometer, Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometer, -Massenspektrometrie
m/z	Masse-zu-Ladung-Verhältnis [amu]
Pa	Pascal
ppb	parts per billion
ppm	parts per million
psi	pound-force per square inch (1 psi = 6895 Pa)
<i>puriss.</i>	purissimum
PyrVal	<i>N,N</i> -(2,3-dihydroxy-1,4-butadiyl)valin
Q	Quadrupol
<i>rac</i> -	racemo-
RP-	Umkehrphasen-
THbVal	<i>N</i> -(2,3,4-trihydroxybutyl)valin
TIS	Turbo-Ion-Spray
TRK	Technische Richtkonzentration
WHO	World Health Organization

1 Einleitung

1.1 Problemstellung

1,3-Butadien (Butadien, BD) ist eine wichtige Industriechemikalie, die in erster Linie bei der Produktion von Kunststoffen Verwendung findet. BD tritt auch ubiquitär in der Umwelt auf, hauptsächlich als Nebenprodukt diverser Verbrennungsprozesse. Die in der Umwelt vorkommenden Konzentrationen sind allerdings um mehrere Größenordnungen geringer als am Arbeitsplatz. In Langzeitinhalationsstudien hat sich BD bei der Maus als starkes, bei der Ratte hingegen als relativ schwaches Kanzerogen erwiesen. Auf Grund vorliegender Daten beurteilt die *International Agency for Research on Cancer (IARC)* der *World Health Organization (WHO)* die Substanz als karzinogen für den Menschen (Gruppe 1).

Die kanzerogene Wirkung von BD wird auf die metabolisch gebildeten reaktiven Epoxide 1,2-Epoxy-3-buten (Epoxybuten, EB), 1,2:3,4-Diepoxybutan (Diepoxybutan, DEB) und 3,4-Epoxy-1,2-butandiol (Epoxybutandiol, EBD) zurückgeführt. Von diesen hat DEB die größte mutagene Potenz. Speziesunterschiede im BD-Metabolismus werden für die unterschiedliche karzinogene Wirksamkeit von BD verantwortlich gemacht.

Um solche Speziesunterschiede zu erfassen, wurde der BD-Stoffwechsel *in vitro* und *in vivo* vielfältig untersucht. Herausragende Relevanz hat die quantitative Ermittlung der *in-vivo*-Belastung durch die reaktiven Metaboliten nach Exposition gegen BD. Ziel der Bemühungen ist eine Abschätzung des Kanzerogenitätsrisikos beim Menschen.

Da BD am Arbeitsplatz in niedrigen Konzentrationsbereichen vorkommt, ist es für eine Risikoabschätzung essentiell, die Belastungen durch seine Epoxidmetaboliten, insbesondere DEB, bei Exposition gegen entsprechende BD-Konzentrationen zu kennen. Deshalb sollen im Rahmen dieser Arbeit die Blutkonzentrationen von DEB speziesvergleichend bei männlichen CD-Ratten und B6C3F1-Mäusen nach Exposition gegen BD in Konzentrationen von 1 bis 100 ppm bestimmt werden.

Zur Abschätzung des karzinogenen Risikos kann auf der Basis solcher und weiterer Untersuchungen vom Versuchstier auf den Menschen extrapoliert werden.

1.2 Eigenschaften von 1,3-Butadien

1.2.1 Physikalische und chemische Eigenschaften

BD ist ein zweifach ungesättigter Kohlenwasserstoff, der bei Raumtemperatur als farbloses Gas vorliegt (Hodgson *et al.*, 1998). Es hat ein Molekulargewicht von 54.09 g/mol, einen Schmelzpunkt von -108.9 °C und einen Siedepunkt von -4.4 °C (Weast, 1970).

BD ist in Ethanol, Diethylether, Benzol und organischen Lösungsmitteln löslich, in Wasser dagegen nicht (Weast, 1970).

Als ein ungesättigter Kohlenwasserstoff polymerisiert BD leicht, insbesondere in Gegenwart von Katalysatoren (IARC, 1999), worauf die industrielle Verwendung gründet. BD ist bereits bei einem Volumenanteil von 2.0 % in Luft explosiv (IARC, 1999).

Eine BD-Konzentration von 1 ppm in Luft entspricht 2.2 mg/m³ bei 25 °C und 101 kPa (IARC, 1999).

1.2.2 Verwendung und Exposition

Es ist nicht bekannt, ob BD natürlich vorkommt (IARC, 1999). Seine Gewinnung erfolgt auf petrochemischer Basis, im Wesentlichen durch Isolierung aus C₄-Steamcrackschnitten, die bei der Herstellung von Ethylen als Nebenprodukt anfallen (Morrow, 1990). Im Jahr 2005 wurden weltweit ca. 9 Mio. t BD verarbeitet (CMAI, 2006). BD findet Verwendung bei der Produktion von Polymeren, Elastomeren und anderen Chemikalien, wobei die Herstellung von Synthesekautschuken, allen voran Styrol-Butadien-Kautschuken, und von thermoplastischen Kunststoffen den Hauptverbrauch an BD ausmacht (EPA, 2002). Im Alltag sind es auf Kunststoff basierende Produkte wie Autoreifen und andere Fahrzeugteile, Haushaltsgeräte, Büromaschinen, Dichtungen, Textilien, Klebstoffe oder Schläuche, zu deren Herstellung BD verwendet wird (EPA, 2002).

In der Luft städtischer Gebiete ist BD – in sehr niedrigen Konzentrationen von weniger als 1 bis zu 10 ppb – nahezu immer zu finden (IARC, 1992). Dies resultiert im Wesentlichen aus den konstant emittierten Abgasen der Fahrzeuge (EPA, 2002). BD kommt aber auch im Tabakrauch, im Rauch bei der Verfeuerung von Biomasse und bei anderen Verbrennungsprozessen vor (EPA, 2002). Des Weiteren trägt die BD-produzierende und -verarbeitende Industrie zur Emission von BD in die Umwelt bei (EPA, 2002). Dort arbeitende Personen können, je nach Arbeitsplatz, gegen deutlich höhere Konzentrationen

exponiert werden. Dennoch gibt es in Deutschland derzeit keinen Arbeitsplatzgrenzwert für BD. Die bis 2004 gültigen Technischen Richtkonzentrationen (TRK) wurden vom Bundesministerium für Wirtschaft und Arbeit ausgesetzt, da sie nicht gesundheitsbasiert waren, sondern sich nur an den technischen Möglichkeiten der Expositionsbegrenzung orientierten. Bis dato lag der allgemeine TRK-Wert bei 5 ppm, für Tätigkeiten im Bereich der Aufarbeitung nach Polymerisation und der Verladung bei 15 ppm (BMAS, 2006). In den USA gilt ein *Threshold Limit Value* (TLV) von 2 ppm (ACGIH, 2008).

1.2.3 Metabolismus

Nach Aufnahme in den Organismus wird BD verstoffwechselt. Die komplexen Metabolismuswege sind in Abb. 1 vereinfacht dargestellt (vgl. IARC, 1999).

Als erster Schritt konnte die Bildung von EB mittels Cytochrom-P450-abhängiger Monooxygenasen (CYP) durch *in-vitro*-Untersuchungen mit Lebermikrosomen der Ratte (Malvoisin *et al.*, 1979) und postmitochondrialem Überstand von Maus, Ratte, Affe und Mensch (Schmidt und Loeser, 1985) nachgewiesen werden. *In-vivo*-Experimente bestätigten dieses Ergebnis: Nach Exposition gegen BD wurde EB sowohl in der Atemluft von Ratten (Filser und Bolt, 1984; Bolt *et al.*, 1983) und Mäusen (Kreiling *et al.*, 1987) als auch im Blut von Ratten (Thornton-Manning *et al.*, 1998; Thornton-Manning *et al.*, 1997; Bechtold *et al.*, 1995; Thornton-Manning *et al.*, 1995b; Thornton-Manning *et al.*, 1995a; Himmelstein *et al.*, 1994) und Mäusen (Thornton-Manning *et al.*, 1997; Bechtold *et al.*, 1995; Thornton-Manning *et al.*, 1995a; Himmelstein *et al.*, 1994) detektiert. EB wird über zwei Wege zu weiteren Epoxiden metabolisiert. Die Oxidation durch CYP führt zum DEB, was *in vitro* (Seaton *et al.*, 1995; Csanady *et al.*, 1992; Malvoisin und Roberfroid, 1982) und *in vivo* (Thornton-Manning *et al.*, 1998; Thornton-Manning *et al.*, 1997; Bechtold *et al.*, 1995; Thornton-Manning *et al.*, 1995b; Thornton-Manning *et al.*, 1995a; Himmelstein *et al.*, 1994) nachgewiesen wurde. Durch katalytische Hydrolyse mittels Epoxidhydrolase (EH) wird EB in 3-Buten-1,2-diol (B-diol) umgewandelt; dieses wurde *in vitro* (Krause *et al.*, 1997; Cheng und Ruth, 1993; Csanady *et al.*, 1992; Kreuzer *et al.*, 1991; Malvoisin und Roberfroid, 1982) und *in vivo* sowohl im Urin (Krause *et al.*, 1997; Nauhaus *et al.*, 1996; Sabourin *et al.*, 1992) als auch im Blut (Filser *et al.*, 2007) gefunden. Oxidation von B-diol mittels CYP bzw. Hydrolyse von DEB mittels EH führen zu EBD (Filser *et al.*, 2010); EBD wurde *in vitro* (Cheng und Ruth, 1993; Malvoisin und Roberfroid, 1982) und *in vivo* (Filser *et al.*, 2007) untersucht.

Durch Konjugation mit Glutathion (GSH) mittels Glutathion-S-Transferase (GST) und Hydrolyse mittels EH können die Epoxide inaktiviert werden (IARC, 1999). Die gebildeten GSH-Addukte werden als Mercaptursäuren über den Urin ausgeschieden (Nauhaus *et al.*, 1996; Sabourin *et al.*, 1992). Aus EBD mit Hilfe von EH gebildetes Erythritol wird wahrscheinlich über den Pentosephosphatweg zu CO₂ abgebaut (Boogaard und Bond, 1996; Nauhaus *et al.*, 1996). CO₂ konnte in der Ausatemluft detektiert werden (Bond *et al.*, 1986).

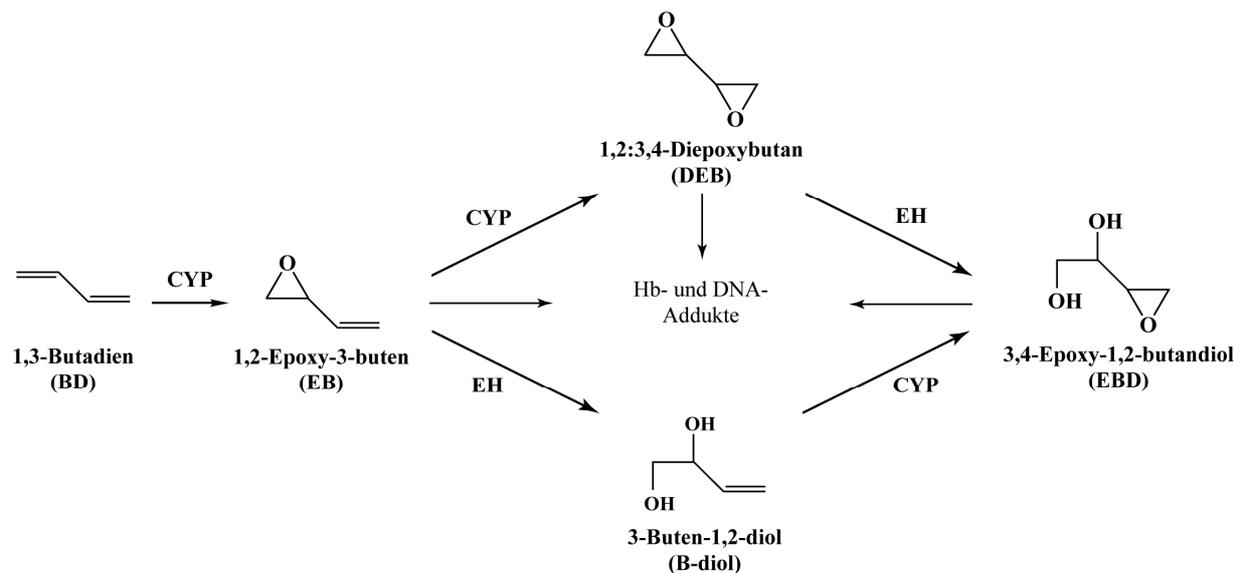


Abb. 1: Vereinfachtes Schema des BD-Metabolismus

Hinsichtlich der Metabolismusgeschwindigkeiten von BD und seinen Epoxidmetaboliten zeigen sich signifikante Speziesunterschiede. Diese werden unter 1.2.5 abgehandelt.

1.2.4 Genotoxizität und Kanzerogenität von 1,3-Butadien und seinen Metaboliten

BD wirkt indirekt mutagen bzw. karzinogen, da erst nach metabolischer Aktivierung entsprechende Effekte in verschiedenen Testsystemen festgestellt wurden (zusammengefasst in IARC, 1999). Die mutagenen und genotoxischen Effekte werden auf die gebildeten reaktiven Epoxide, insbesondere EB und DEB (EPA, 2002; IARC, 1999), aber auch EBD (EPA, 2002), zurückgeführt. Dabei ist die mutagene Aktivität dieser Metaboliten sehr unterschiedlich. Bezüglich der meisten Endpunkte ist das bifunktionelle DEB am wirksamsten (EPA, 2002).

In vitro wirken EB, EBD und DEB mutagen auf menschliche Lymphoblastoidzellen (Cochrane und Skopek, 1994). DEB erwies sich 40- bis 100fach mutagener als die beiden anderen Epoxide (Cochrane und Skopek, 1994), welche eine ähnliche Mutagenität besitzen (Adler *et al.*, 1997; Cochrane und Skopek, 1994). *In vivo* konnten *Hprt*-Mutationen in T-Lymphozyten bei BD-exponierten Ratten und Mäusen gezeigt werden, wobei sich die Mäuse als empfindlicher erwiesen (Meng *et al.*, 2007; Meng *et al.*, 1999). Auch bei BD-exponierten Arbeitern wurde teils eine erhöhte *Hprt*-Mutationsfrequenz in Lymphozyten beobachtet (Ammenheuser *et al.*, 2001; Ward *et al.*, 2001).

DEB verursacht in humanen Lymphozyten *in vitro* chromosomale Aberrationen und Mikronuclei (Murg *et al.*, 1999). *In vivo* wurden bei BD-exponierten Mäusen mit steigender Expositionskonzentration zunehmend Mikronucleus-Frequenzen in Erythrozyten beobachtet (Adler *et al.*, 1994; Autio *et al.*, 1994). Bei Arbeitern konnten nur vereinzelt Korrelationen zytogenetischer Effekte (Chromosomenaberrationen und Schwesterchromatidaustausch in Lymphozyten) mit beruflicher Exposition gegen BD gefunden werden (Albertini *et al.*, 2007; Albertini *et al.*, 2003; Sram *et al.*, 1998).

In Langzeitkanzerogenitätsstudien wurden CD-Ratten (Sprague-Dawley-Ratten) inhalativ gegen 0, 1000 und 8000 ppm BD exponiert (6 h/Tag, 5 Tage/Woche, 105 Wochen weibliche bzw. 111 Wochen männliche Tiere). Dabei fanden sich erhöhte Inzidenzen verschiedener Tumoren: bei den Männchen in der höchsten Dosisgruppe Adenome des exokrinen Pankreas und Leydigzelltumoren der Testes; bei den Weibchen in der höchsten Dosisgruppe Karzinome der Zymbaldrüse und Follikelzelltumoren der Schilddrüse, sowie in beiden Dosisgruppen Uterussarkome und Mammatumoren (Owen *et al.*, 1987).

Bei den Inhalationsstudien im Rahmen des *National Toxicology Program* (NTP) in den USA erfolgten Expositionen männlicher und weiblicher B6C3F1-Mäuse gegen 0, 6.25, 20, 62.5, 200 und 625 ppm BD (6 h/Tag, 5 Tage/Woche, bis zu 104 Wochen) (NTP, 1993; Melnick *et al.*, 1990). In einer ähnlichen Studie mit höheren Expositionskonzentrationen (0, 625 und 1250 ppm, 6 h/Tag, 5 Tage/Woche) hatte sich bereits eine klare Evidenz für die Kanzerogenität von BD bei B6C3F1-Mäusen gezeigt (Huff *et al.*, 1985; NTP, 1984). Allerdings musste diese frühere Studie aufgrund der hohen Inzidenzen letaler Neoplasien vorzeitig abgebrochen werden (Huff *et al.*, 1985; NTP, 1984). Bei der jüngeren Untersuchung (NTP, 1993; Melnick *et al.*, 1990) wurden bei weiblichen und männlichen Tieren weitestgehend dieselben Tumorarten beobachtet, die Weibchen erwiesen sich aber als

empfindlicher: Bei ihnen traten erhöhte Inzidenzen von Lungentumoren bereits bei einer BD-Konzentration von 6.25 ppm auf, bei Männchen erst bei 62.5 ppm. Lebertumoren entwickelten sich bei weiblichen Mäusen schon bei einer Expositionskonzentration von 20 ppm, bei männlichen von 200 ppm. Lymphome wurden bei Weibchen bereits bei BD-Konzentrationen von 20 ppm beobachtet, bei Männchen hingegen ab 62.5 ppm. Ab einer Expositionskonzentration von 62.5 ppm traten bei weiblichen Tieren zusätzlich Tumoren an der Harder'schen Drüse, der Mamma und dem Ovar auf, bei männlichen an der Harder'schen Drüse und am Herzen. Des Weiteren entwickelten sich bei Weibchen ab 200 ppm auch Tumoren an Herz und Vormagen, bei Männchen an Vormagen und Vorhautdrüse (NTP, 1993; Melnick *et al.*, 1990).

Im Rahmen subakuter inhalativer Expositionen gegen 0, 2.5 und 5 ppm einer racemischen DEB-Mischung (6 h/Tag, 5 Tage/Woche, 6 Wochen) wurden bei Sprague-Dawley-Ratten dosisabhängig Neoplasien der Nasenschleimhaut und bei B6C3F1-Mäusen Tumoren verschiedener Gewebe beobachtet, wobei nur die Harder'sche Drüse als einzelnes Organ eine signifikant erhöhte Tumorzahl aufwies (Henderson *et al.*, 2000). Diese Ergebnisse sind jedoch aufgrund der vergleichsweise sehr kurzen Expositionsperioden für eine Kanzerogenitätsbeurteilung nur bedingt heranzuziehen (IARC, 1980). Als karzinogen hatten sich D,L-DEB und *meso*-DEB nach epikutaner Applikation (3 bzw. 10 mg in 100 mg Aceton, 3 Mal/Woche, lebenslang) bei der Maus bereits früher erwiesen (Van Duuren *et al.*, 1965; Van Duuren *et al.*, 1963); nach subkutaner Applikation bei Ratte und Maus induzierte D,L-DEB (0.1 mg in 0.05 ml Tricaprylin, 1 Mal/Woche, länger als 1 Jahr) Fibrosarkome (Van Duuren *et al.*, 1966).

Somit zeigt sich die Ratte zum einen als weniger empfindlich hinsichtlich BD-induzierter Tumorentstehung als die Maus (EPA, 2002), zum anderen unterscheiden sich beide Spezies in den jeweils gebildeten Tumoren: Während sich bei der Maus vor allem Neoplasien des metabolischen (Leber, Lunge) und des lymphatischen Systems sowie des Herzens ausbildeten (Melnick *et al.*, 1990), entstanden bei der Ratte Tumoren, deren Genese schwieriger zu erklären scheint (Owen und Glaister, 1990).

In epidemiologischen Studien an Arbeitern der Styrol-Butadien-Kautschuk-Industrie (15649 Männer, zwischen 1943 und 1991 für mindestens ein Jahr beschäftigt) zeigte sich ein erhöhtes Leukämierisiko (Delzell *et al.*, 1996). Dieses konnte von derselben Arbeitsgruppe im Rahmen erweiterter *follow-up*-Untersuchungen für bestimmte Gruppen von Arbeitern (Langzeit-

Stundenlohnempfänger, insbesondere im Bereich der Polymerisation, Koagulation, Wartungs- und Laborarbeiten) spezifiziert (Sathiakumar *et al.*, 2005) und eine starke Assoziation mit BD gefunden werden (Delzell *et al.*, 2006; Graff *et al.*, 2005). Des Weiteren konnte bei Arbeitern in der BD-Produktion (364 Männer, von denen 277 bei einer während des Zweiten Weltkriegs betriebenen *U.S. Rubber Reserve Plant* beschäftigt waren) eine Assoziation mit Non-Hodgkin-Lymphomen beobachtet werden (Ward *et al.*, 1996; Ward *et al.*, 1995). Divine und Hartman beschrieben für die BD-Produktion (2800 Männer, zwischen 1943 und 1996 für mindestens sechs Monate beschäftigt) einen Zusammenhang zwischen Lymphohämatopoetischen Tumoren und erstmaliger Beschäftigung vor 1950 (Divine und Hartman, 2001). An diesen Arbeitsplätzen herrschten während des Zweiten Weltkrieges vermutlich viel höhere Expositionskonzentrationen als später (EPA, 2002).

Die IARC der WHO beurteilt 1,3-Butadien als karzinogen für den Menschen (Gruppe 1) („*carcinogenic to humans (Group 1)*“), da bei Menschen hinreichend Belege („*sufficient evidence*“) für ein erhöhtes Leukämierisiko vorlägen (Grosse *et al.*, 2007; IARC, 2006). Die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG), Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, kurz MAK-Kommission (Maximale Arbeitsplatzkonzentration), klassifiziert BD seit 1998 als krebserzeugenden Arbeitsstoff (Kategorie 1) (MAK, 1998).

1.2.5 Toxikokinetik

BD wird in erster Linie aus der Luft über das respiratorische System aufgenommen (EPA, 2002). Von Ratten und Mäusen wird das resorbierte BD (bis zu einer Expositionskonzentration von 1000 ppm) überwiegend metabolisiert und nur zum Teil (22 – 30 %) unverändert abgeatmet (Kreiling *et al.*, 1986). Bei Inhalationsstudien mit Sprague-Dawley-Ratten (Bolt *et al.*, 1984) und B6C3F1-Mäusen (Kreiling *et al.*, 1986) konnte der BD-Metabolismus mit einer Sättigungskinetik beschrieben werden. Für BD-Konzentrationen von mehr als etwa 2000 ppm ergab sich für die Ratten eine maximale Metabolismusgeschwindigkeit (V_{\max}) von 220 $\mu\text{mol/h/kg}$ (Bolt *et al.*, 1984) und für die Mäuse von 400 $\mu\text{mol/h/kg}$ (Kreiling *et al.*, 1986). Auch bei niedrigeren BD-Expositionskonzentrationen (unter 1000 ppm) wiesen Mäuse (7.3 l/h/kg) (Kreiling *et al.*, 1986) eine höhere auf Luft bezogene Eliminationsclearance auf als Ratten (4.5 l/h/kg) (Bolt *et al.*, 1984). Messungen des exhalierten EBs bei Expositionen gegen konstante BD-

Konzentrationen über mehrere Stunden resultierten bei Ratten in EB-Plateauwerten, die aufgrund der Sättigungskinetik bei BD-Konzentrationen oberhalb von 2000 ppm nicht weiter anstiegen (Filser *et al.*, 2007; Filser und Bolt, 1984). Bei Mäusen lagen die entsprechenden EB-Plateauwerte deutlich höher und stiegen bei BD-Konzentrationen oberhalb von 2000 ppm nach 4 h Exposition wieder an (Filser *et al.*, 2007; Kreiling *et al.*, 1987); dies wurde auf den Kollaps der GST-vermittelten hepatischen EB-Inaktivierung bei der Maus zurückgeführt (Filser *et al.*, 2007; Johanson und Filser, 1993).

Die Elimination inhalativ aufgenommenen EBs konnte bei Expositionskonzentrationen bis zu etwa 100 ppm durch eine Kinetik erster Ordnung beschrieben werden: Das aufgenommene EB wurde überwiegend metabolisiert (Kreiling *et al.*, 1987). Die auf Luft bezogene Eliminationsclearance war bei B6C3F1-Mäusen (24.9 l/h/kg) (Kreiling *et al.*, 1987) etwa doppelt so hoch wie bei Sprague-Dawley-Ratten (13.4 l/h/kg) (Filser und Bolt, 1984). Valentine *et al.* beobachteten bei Sprague-Dawley-Ratten nach intravenöser Gabe von EB (71 und 143 $\mu\text{mol/kg}$) eine ähnliche Eliminationsclearance (Valentine *et al.*, 1997).

Nach intravenöser Applikation von DEB (523 $\mu\text{mol/kg}$) fand sich bei Sprague-Dawley-Ratten eine Eliminationsclearance aus dem Blut von 4.6 l/h/kg (Valentine *et al.*, 1997). Bei Mäusen wurde die Eliminationskinetik von DEB nicht untersucht.

Die Eliminationskinetik von BD, EB und DEB wurde auch *in vitro* in zahlreichen Arbeiten mit hepatischen und pulmonalen Zellfraktionen untersucht (Krause *et al.*, 1997; Boogaard und Bond, 1996; Csanady *et al.*, 1992; Sharer *et al.*, 1992; Kreuzer *et al.*, 1991).

Auch bei den Blutkonzentrationen der Epoxid-Metaboliten finden sich Speziesunterschiede. Bei Expositionen von Sprague-Dawley-Ratten und B6C3F1-Mäusen gegen BD-Konzentrationen von 62.5 ppm (Thornton-Manning *et al.*, 1995a; Himmelstein *et al.*, 1994), 100 ppm (Bechtold *et al.*, 1995), 625 ppm (Himmelstein *et al.*, 1994) sowie 1250 ppm (Himmelstein *et al.*, 1994) wurden übereinstimmend höhere EB-Blutkonzentrationen bei Mäusen gemessen.

Bei Bestimmung der Blut-Konzentration von DEB im Rahmen von Expositionen gegen ca. 65 ppm BD bei Sprague-Dawley-Ratten (Thornton-Manning *et al.*, 1997) und B6C3F1-Mäusen (Filser *et al.*, 2007; Thornton-Manning *et al.*, 1997) wurden bei Letzteren um mehr als das Zehnfache höhere Konzentrationen gefunden. Außerdem stieg bei Mäusen die Blut-Konzentration von DEB bei Exposition gegen 1270 ppm BD auf das Zehnfache des Wertes bei Exposition gegen 67 ppm BD (Filser *et al.*, 2007). Dagegen waren bei Ratten die DEB-

Konzentrationen im Blut nach Exposition gegen 8000 ppm BD ähnlich denen nach Exposition gegen 62.5 ppm (Thornton-Manning *et al.*, 1998; Thornton-Manning *et al.*, 1997).

Filser *et al.* konnten erstmals die EBD-Konzentration im Blut BD-exponierter Ratten und Mäuse messen; dabei zeigte sich bei den Ratten ein Konzentrationsmaximum von 9.5 µmol/l bei 150 ppm BD und bei den Mäusen von 42 µmol/l bei 300 ppm BD (Filser *et al.*, 2007). Mit weiter steigender Expositionskonzentration fielen die EBD-Konzentrationen wieder ab, wenn auch bei den Mäusen deutlich schwächer (Filser *et al.*, 2007).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass unter denselben Expositionsbedingungen Mäuse BD schneller metabolisieren und auch mehr DEB bilden als Ratten.

Die systemische Belastung durch die Epoxid-Metaboliten kann indirekt über deren Hämoglobin-Addukte abgeschätzt werden (Abb. 1) (z. B. Greim und Deml, 1996). Aus EB entsteht im Blut von Nagern und Menschen *N*-(2-hydroxy-3-butenyl)valin (HbVal); nach Exposition gegen 100 ppm BD (6 h/Tag, 5 Tage/Woche, 4 Wochen) wurde bei männlichen Mäusen eine etwa vierfach höhere Konzentration dieses Addukts als bei Ratten gemessen (Osterman-Golkar *et al.*, 1998).

Das für DEB charakteristische Addukt, *N,N*-(2,3-dihydroxy-1,4-butadiyl)valin (PyrVal), wurde bei weiblichen Mäusen nach Exposition gegen 62.5 ppm BD (6 h/Tag, 5 Tage/Woche, 10 Tage), verglichen mit weiblichen Ratten, in ca. vierfacher Konzentration detektiert; bei einer Expositionskonzentration von 3 ppm stieg dieser Faktor laut Autoren auf das Zwölfwache (Boysen *et al.*, 2004).

Das Addukt *N*-(2,3,4-trihydroxybutyl)valin (THbVal) entsteht bei der Reaktion von Hämoglobin (Hb) mit EBD, kann im Blut aber auch aus DEB oder auf nicht spezifiziertem endogenem Weg gebildet werden (Boysen *et al.*, 2007). Nach Expositionen gegen 1, 5 und 20 ppm BD (6 h/Tag, 5 Tage) (Booth *et al.*, 2004) sowie gegen 3, 62.5 und 1250 ppm BD (6 h/Tag, 5 Tage/Woche, 10 Tage) (Boysen *et al.*, 2004; Swenberg *et al.*, 2001) wurden bei Mäusen, verglichen mit Ratten, etwa die ein- bis dreifachen Konzentrationen dieses Addukts gemessen (Booth *et al.*, 2004; Boysen *et al.*, 2004; Swenberg *et al.*, 2001).

Für die Abschätzung gewebespezifischer Belastungen können die entsprechenden DNA-Addukte der Epoxidmetaboliten herangezogen werden (Abb. 1). Zahlreiche aus EB, DEB und EBD ableitbare DNA-Addukte wurden in unterschiedlichen Geweben BD-exponierter Tiere identifiziert (z. B. Goggin *et al.*, 2008; Boogaard *et al.*, 2004; Boogaard *et al.*, 2001; Koivisto und Peltonen, 2001; Koc *et al.*, 1999; Tretyakova *et al.*, 1998).

Einen Überblick über die Verteilung der Metaboliten auf die verschiedenen Gewebe geben die sogenannten Verteilungskoeffizienten Gewebe/Blut. Die Verteilungskoeffizienten Gewebe/Luft wurden für EB experimentell bestimmt (Johanson und Filser, 1993): Es kann von einer fast gleichmäßigen Verteilung im Körper ausgegangen werden, wobei die erwarteten Gewebskonzentrationen um etwa ein Viertel niedriger liegen als die Blutkonzentration. Einzige Ausnahme davon bildet das Fettgewebe, dessen erwartete EB-Konzentration ca. doppelt so hoch ist wie die des Blutes (Johanson und Filser, 1993).

Für das amphiphile DEB, dem hinsichtlich der Mutagenität eine besondere Rolle zukommt, wurden die Verteilungskoeffizienten Gewebe/Hexan bestimmt (Sweeney *et al.*, 1997): Im Körper kann mit einer nahezu homogenen Verteilung gerechnet werden. Die erwarteten Gewebskonzentrationen liegen um etwa die Hälfte über der des Blutes; die des Fettgewebes beträgt ca. das Doppelte der Blutkonzentration (Sweeney *et al.*, 1997). *In vivo* ergaben sich nach Exposition gegen 62.5 ppm BD dementsprechend konstante Konzentrationsverhältnisse bei Ratte und Maus für mehrere Gewebe (Thornton-Manning *et al.*, 1997).

Auch für das amphiphile EBD kann von einer fast einheitlichen Verteilung ausgegangen werden. Die Verteilungskoeffizienten wurden bisher allerdings nicht bestimmt.

Aufgrund der gleichmäßigen Verteilung und des schnellen Metabolismus ist eine Kumulation der Epoxidmetaboliten nicht zu befürchten.

Auf Basis der vorhandenen *in-vitro*- und *in-vivo*-Daten wurden toxikokinetische Modelle entwickelt (z. B. Kohn und Melnick, 2001; Sweeney *et al.*, 1997; Csanady *et al.*, 1996; Johanson und Filser, 1993). Für verschiedene Expositionsbedingungen wurde mit deren Hilfe die Belastung durch BD und seine Metaboliten berechnet. Allerdings konnten die Modelle in den unteren Expositionsbereichen nicht validiert werden, da die hierfür notwendigen Daten fehlten.

1.3 Aufgabenstellung

Die vorliegende Arbeit ist Teil einer größeren Studie mit dem Ziel, das durch Exposition gegen BD bedingte Kanzerogenitätsrisiko für den Menschen abzuschätzen.

Zu diesem Zweck wurden neben anderen Untersuchungen die Konzentrationen von EB im Blut gegen bis zu 1 ppm BD exponierter Ratten und Mäuse gemessen. Über die Blutkonzentrationen von DEB und EDB wurden bisher nur Daten für Expositionskonzentrationen größer als ca. 60 ppm BD veröffentlicht.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten DEB-Konzentrationen im Blut männlicher CD-Ratten und männlicher B6C3F1-Mäuse nach Exposition gegen BD in niedrigen Konzentrationen bestimmt werden; die erhaltenen Daten sollten hinsichtlich der Unterschiede im BD-Metabolismus beider Spezies verglichen werden:

1. Es sollten je drei Ratten bzw. je zwölf Mäuse über 6 h gegen konstante BD-Konzentrationen von 1, 6, 10, 20, 60 und 100 ppm exponiert werden. Zur Überwachung der atmosphärischen BD-Konzentration im Expositionssystem sollte ein Gaschromatograph mit Flammenionisationsdetektor (GC/FID) verwendet werden. Am Ende jeder Exposition waren die Tiere zu töten und ihnen aus der *Vena cava caudalis* zwischen Nieren und Leber Blut zu entnehmen.
2. Um die DEB-Konzentrationen in den erhaltenen Blutproben massenspektrometrisch zuverlässig messen zu können, war jeder Probe perdeuteriertes DEB (DEB-D6) als Interner Standard zuzugeben, DEB sowie DEB-D6 sollten mit Natrium-Diethyldithiocarbamat derivatisiert und die gebildeten Thioester der Dithiocarbaminsäure mit Chloroform extrahiert werden. Nach Abdampfen der organischen Phase war der Rückstand mit Methanol aufzunehmen.

Die Proben sollten dann durch Umkehrphasen-Hochdruckflüssigkeitschromatographie (RP-HPLC) aufgetrennt und mittels Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) detektiert werden (LC/MS/MS). Zur Ionisierung sollte eine *Turbo-Ion-Spray*-Quelle (TIS) im positiven Modus verwendet werden, der Analysator war im *Multiple-Reaction-Monitoring*-Modus (MRM) zu betreiben.

Die für die Aufbereitung und Messung der Proben verwendete Methodik wurde in der Arbeitsgruppe Toxikokinetik des Instituts für Toxikologie am Helmholtz-Zentrum München von Prof. Dr. Gy. Csanády und Dr. Ch. Hutzler entwickelt.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Geräte

Chemikalien

Aceton, ≥ 99.8 %	Merck, Darmstadt
Ammoniumacetat, ≥ 99.99 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Atemkalk Drägersorb [®] 800 Plus	Drägerwerk, Lübeck
1,3-Butadien, 2.5	Linde, München
Chloroform, ReagentPlus [®] , ≥ 99.8 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
<i>rac</i> -1,2:3,4-Diepoxybutan, 97 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
1,2:3,4-Diepoxybutan-D6, 98 %	Synthon, Augsburg
Diethylmaleat, ≥ 97 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethanol, ≥ 99.9 %	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat, ≥ 99.5 %	Merck, Darmstadt
Di-Kaliumhydrogenphosphat-Trihydrat, ≥ 99 %	Merck, Darmstadt
Ketamin 10 % (Ketaminhydrochlorid)	WDT, Garbsen
Kohlendioxid	Linde, München
Liquemin [®] N 25000 (Heparin-Natrium)	Hoffmann-La Roche, Grenzach-Wyhlen
Luft, synthetisch (kohlenwasserstofffrei)	Linde, München
Methanol Picograde [®] , ≥ 99 %	LGC Standards, Wesel
Natriumchlorid, <i>puriss.</i> , ≥ 99 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumdiethyldithiocarbamat-Trihydrat, <i>puriss.</i> , ≥ 99 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Rompun [®] 2 % (Xylazinhydrochlorid)	Bayer, Leverkusen
Sauerstoff, 4.5	Linde, München
Stickstoff, 5.0	Linde, München
Stickstoff flüssig, 5.0	Linde, München
Wasser, LC-MS Grade	Fisher Scientific, Schwerte
Wasserstoff, 5.0	Linde, München

Der Reinheitsgrad aller Chemikalien war, wenn nicht anders angegeben, *pro analysi* oder besser.

Geräte

Autosampler-Flaschen, Glas, 2 ml, mit Rollrand, 11 mm	WICOM, Heppenheim
Quecksilber-Barometer, Typ 604	Wilh. Lambrecht, Göttingen
Bodenplatte, Polypropylen	Werkstatt Helmholtz-Zentrum, Neuherberg
Bördelkappen, Aluminium, 11 mm, mit Teflon/Silikon-Septen, 1.0 mm	WICOM, Heppenheim
Digital-pH-Meter 646	Knick, Berlin
Einmalinjektionskanülen Nr. 1 (0.90 × 40 mm)	Rose, Trier
Einmalinjektionskanülen Gr. 17 (0.55 × 25 mm)	B. Braun, Melsungen
Einmalspritzen 1 ml, 5 ml, 10 ml	B. Braun, Melsungen
Einmalspritzen 20 ml	Becton Dickinson, Heidelberg
Einmalspritzen 60 ml	HSW, Tuttlingen
Expositionskugel, Glas, 68 l, mit Planflansch-Deckel, Glasaufsatz zur Sauerstoffversorgung	Schott, Mainz bzw. Höhn, Garching
Exsikkatoren, Glas, 6.3 l, 6.4 l, 6.5 l, 6.6 l	Schott, Mainz
Flanschdichtung und -klemme	Schott, Mainz
Gaschromatograph GC-8A mit Flammenionisationsdetektor, Gassampler MGS-4, Probenschleife, 0.3 ml, Trennsäule: Edelstahl, 3.5 m, 2 mm ID, 1/8", gepackt mit Tenax TA, 60 – 80 mesh	Shimadzu, Duisburg Chrompack, Frankfurt/Main
Hochdruckflüssigkeitschromatographie-System Pumpe Agilent 1100 G1312A mit Vakuumentgaser G1379A Probengeber Agilent 1100 G1329A mit Thermostat G1330B Säulenofen Agilent 1100 G1316A Säule Luna 5 µ C18 (2), 150 × 2.0 mm ID	Agilent Technologies, Waldbronn Phenomenex, Aschaffenburg

Vorsäule SecurityGuard Cartridge C18, 4 × 2.0 mm ID	Phenomenex, Aschaffenburg
Integrator C-R5A	Shimadzu, Duisburg
Kabelbinder, 37 × 0.5 cm	Bauhaus, München
Kanülen, Edelstahl, 1 × 200 mm, 1 × 300 mm	Unimed, Lausanne, Schweiz
Kapillarrohr, PEEK, 0.13 mm ID, 1/16" AD	Müller, Fridolfing
Kleintieroperationstisch	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten
Kryoröhrchen, Polypropylen, 5 ml, mit Schraubverschluss und Dichtungsscheibe, Silikon	Simport, Beloeil, Canada
Laborfett glisseal® N	Borer Chemie, Zuchwil, Schweiz
Lochschraubkappen GL 14	Schott, Mainz
Magnetrührmotoren	IKA Werke, Staufen
Metallblockthermostat mit Begasungseinheit Evaporator-Thermobil	Gebr. Liebisch, Bielefeld
Mikro-Einsätze für Autosampler-Flaschen, Glas, 100 µl	Neolab, München
Mikroliterspritzen Hamilton Serie 800 N, 10 µl, 25 µl MicroVolume Syringe, fixed needle, 10 µl	Hamilton, Bonaduz, Schweiz SGE, Griesheim
Mikro-pH-Kombinationselektrode, InLab® 423	Mettler-Toledo, Giessen
Pasteur-Pipetten, Glas	Hirschmann, Eberstadt
Pasteur-Pipetten, Polyethylen	Alphalaboratories, Eastleigh, UK
PC Precision Workstation 360	Dell, Frankfurt/Main
PC iMac, PowerPC G4	Apple Inc., München
Pipetten Eppendorf Research®, variabel 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl Eppendorf Reference®, variabel 10 µl, 100 µl, 1000 µl mit Pipettenspitzen epT.I.P.S. Standard	Eppendorf, Hamburg
Präparationsbesteck	Aesculap, Tuttlingen
Reaktionsgefäße, Kunststoff, 1.5 ml, 2.0 ml	Eppendorf, Hamburg

Septen CS, teflonbeschichtetes Silikon, für Lochschraubkappen GL 14	SGE, Griesheim
Silikonschläuche	Neolab, München
Thermometer	Amarell, Kreuzwertheim
Timer	Oregon Scientific, Neu-Isenburg
Triple-Quadrupol-Massenspektrometer API 4000 LC/MS/MS mit Turbo-Ion-Spray-Ionenquelle	Applied Biosystems, Darmstadt
Universal-Wärmeschrank UM 200	Memmert, Schwabach
Verschlusszange für 11 mm-Bördelkappen	Neolab, München
Vibrationsschüttler	IKA Werke, Staufen
Waage KERN 770-14	Kern, Balingen-Frommern
Waage Sartorius A 210 P	Sartorius, Göttingen
Waage Sartorius PT 6	Sartorius, Göttingen
Waage Sartorius U 3600	Sartorius, Göttingen
Zentrifuge SIGMA 4K10	Sigma, Osterode
Zentrifuge SIGMA 4K15	Sigma, Osterode
Software	
Analyst [®] Software 1.4.2	Applied Biosystems, Darmstadt
GraphPad Prism [®] 5.02	GraphPad Software, La Jolla, California, USA
Microsoft [®] Office Word 2003	Microsoft, Redmond, Washington, USA
Microsoft [®] Office Excel 2003	Microsoft, Redmond, Washington, USA
Adobe [®] Illustrator CS2	Adobe Systems, San José, California, USA

2.2 Versuchstiere

Die Versuche wurden mit männlichen CD-Ratten und männlichen B6C3F1-Mäusen durchgeführt, die bei Versuchsbeginn Körpermassen zwischen 240 und 290 g bzw. 20 und 30 g aufwiesen. Alle verwendeten Tiere stammten aus der Versuchstierzucht *Charles River Wiga GmbH, Sulzfeld*.

Die Ratten und Mäuse wurden bis zu ihrer Verwendung, mindestens aber 3 Tage, bei konstanter Raumtemperatur (22 – 25 °C) und konstanter relativer Luftfeuchtigkeit (50 – 60 %) im 12-stündigen Hell-Dunkel-Rhythmus in Makrolonkäfigen gehalten. Alle Versuchstiere erhielten eine Standarddiät (Nr. 1324, Fa. Altromin, Lage) und Leitungswasser *ad libitum*.

2.3 Analytische Methoden

2.3.1 Bestimmung von atmosphärischem 1,3-Butadien

Die Konzentrationsbestimmung von BD in der Atmosphäre der Exsikkatoren und der Expositionskugel (2.4) erfolgte mittels Gaschromatographie (GC), wobei zur Detektion ein Flammenionisationsdetektor (FID) verwendet wurde. Der Integrator zeichnete die Detektorsignale auf. Aus den Flächen der dabei erhaltenen Peaks konnten die gesuchten Konzentrationen in ppm errechnet werden.

2.3.1.1 Messbedingungen

Die isotherme Chromatographie zur Bestimmung der BD-Konzentrationen erfolgte mittels eines Gaschromatographen GC-8A mit FID von Shimadzu, der mit einer Tenax TA-Trennsäule (60 – 80 mesh, 1/8" × 3.5 m) bestückt war. Die Chromatographie wurde bei einer

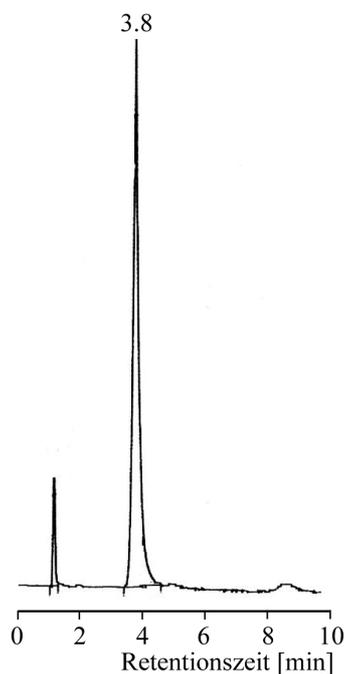


Abb. 2: Gaschromatogramm von BD, exemplarisch von einer Gasprobe aus der Expositionskugel bei Exposition dreier Ratten gegen 10 ppm BD
Retentionszeit von BD: 3.8 min

Temperatur von 110 °C mit Stickstoff (3.75 kg/cm²) als Trägergas durchgeführt. Injektor und Detektor arbeiteten mit einer Betriebstemperatur von 200 °C. Wasserstoff und Luft dienten als Brenngase (je 0.6 kg/cm²). Ein Integrator C-R5A von Shimadzu registrierte die Detektorsignale. Für die Messungen wurden Gasproben von 5 ml mit einer Einmalspritze aus der Mitte eines der Exsikkatoren bzw. der Kugel entnommen und über eine 0.3 ml-Probenschleife in den GC eingespritzt. Zwischen den Injektionen wurde die Schleife mit Stickstoff gespült. Unter den aufgeführten Bedingungen betrug die Retentionszeit von BD 3.8 min (Abb. 2).

2.3.1.2 Kalibrierung

Zur Untersuchung der Proportionalität zwischen BD-Konzentration und Detektorsignal im Bereich von 1.2 bis 110 ppm wurde eine Kalibrierungskurve erstellt (Abb. 3). Um die dafür nötigen, verschiedenen BD-Konzentrationen zu erzeugen, wurden in Exsikkatoren definierte Volumina an BD injiziert. Diese wurden unter Annahme des Verhaltens eines idealen Gases nach den folgenden Gleichungen berechnet:

$$V_{BD} = \frac{C_{BD} \cdot V_{Exsikkator}}{10^6 \text{ ppm}} \quad (1)$$

V_{BD}	benötigtes Volumen an BD [ml]
C_{BD}	gewünschte Konzentration an BD im Exsikkator [ppm]
$V_{Exsikkator}$	Volumen des Exsikkators [ml]

Das BD wurde mithilfe einer Einmalspritze aus der Stahldruckflasche entnommen und dann über ein teflonbeschichtetes Silikonseptum in einen Exsikkator eingespritzt, der zuvor mittels Laborfett abgedichtet worden war. Für kleinere Zielkonzentrationen (ab ca. 50 ppm bei der Proportionalitätsprüfung sowie bei allen Ein-Punkt-Kalibrierungen vor den Expositionen) war ein Verdünnungsschritt notwendig. Bei diesem wurde ein Vorratsexsikkator, der BD in 100- bis 500-facher Konzentration enthielt, gemäß Gleichung (1) erstellt und dann aus diesem mit Hilfe einer Einmalspritze ein nach Gleichung (2) zu ermittelndes Gasvolumen in einen zweiten Exsikkator überführt.

$$V_{verd.} = \frac{C_{BD2} \cdot V_{Exsikkator}}{C_{BD1}} \quad (2)$$

$V_{verd.}$	benötigtes Volumen aus dem Vorratsexsikkator mit BD [ml]
C_{BD2}	gewünschte Konzentration an BD im Exsikkator [ppm]
$V_{Exsikkator}$	Volumen des Exsikkators [ml]
C_{BD1}	BD-Konzentration im Vorratsexsikkator [ppm]

Für eine homogene Verteilung wurde die Exsikkatorenatmosphäre mit einem Magnetrührer durchmischt und mit einer 60 ml-Spritze durch Pumpen umgewälzt. Bei jeder Konzentration wurden dem Exsikkator drei Gasproben entnommen und gemessen (2.3.1.1). Die Flächen der für BD spezifischen Peaks wurden in Abhängigkeit von den errechneten BD-Konzentrationen aufgetragen.

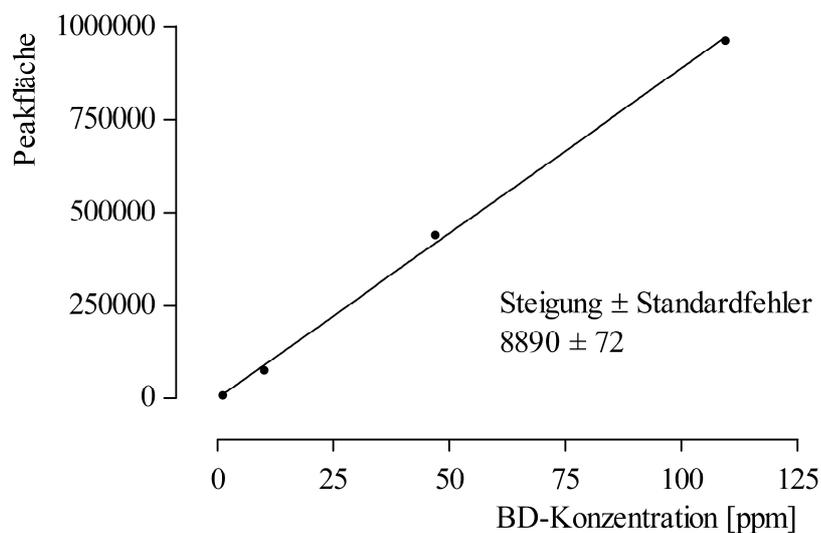


Abb. 3: Kalibrierungsgerade für BD in der Atmosphäre im Bereich von 1.2 bis 110 ppm (je Mittelwert dreier Messungen)

Linie: — Regressionsgerade

Auf der Basis dieser nachgewiesenen Proportionalität wurde vor jedem Expositionsexperiment eine Ein-Punkt-Kalibrierung des GCs bei der beabsichtigten Expositionskonzentration in Triplikaten durchgeführt. Die erhaltenen Peaks wurden über ihre Flächen evaluiert und die Konzentration der Proben mit Hilfe der Steigung der Kalibrierungsgeraden berechnet.

Zur Ermittlung der Reproduzierbarkeit wurde der Variationskoeffizient (2.5) von sechs Messungen derselben BD-Konzentration bestimmt. Dieser lag für alle Expositionskonzentrationen unter 2.7 %.

2.3.2 Analyse von 1,2:3,4-Diepoxybutan in Blut

Zur Bestimmung von DEB im Blut der Ratten und Mäuse (2.4.2) wurde DEB mit N-Diethyldithiocarbamat derivatisiert. Die Proben wurden durch Umkehrphasen-Hochdruckflüssigkeitschromatographie (RP-HPLC) aufgetrennt und mittels Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) detektiert (LC/MS/MS). Die Ermittlung der DEB-Konzentrationen erfolgte mit Hilfe des als Interner Standard dienenden perdeuterierten DEB-D6.

2.3.2.1 Probenaufbereitung

Das heparinisierte Blut wurde, wie in 2.4.2.3 und in 2.4.2.4 beschrieben, in Kryoröhrchen gegeben, in denen bereits im Vorfeld 10 µl einer Lösung aus Diethylmaleat (DEM) und Ethanol (0.97 mol/l) pro ml Blut vorgelegt worden waren. DEM depletiert Glutathion (Plummer *et al.*, 1981).

Dazu wurden im Fall der exponierten Tiere (2.4.2.3) sofort definierte Aliquote einer acetonischen DEB-D6-Lösung gegeben (Ratten: nach Exposition gegen 1 und 6 ppm BD 20 µl (1.4 µmol/l), bei 10 – 100 ppm BD 10 µl (13.6 µmol/l); Mäuse: bei 1 und 6 ppm BD 10 µl (13.7 µmol/l), bei 10 – 100 ppm BD 30 µl (13.7 µmol/l)). Die Lösung war bereits zuvor in 2 ml-Reaktionsgefäßen hergestellt worden. Im Fall der Mäuse erfolgte die Zugabe zwischen der Überführung des Blutes des dritten und vierten Tieres.

Das Blut der Kontrolltiere (2.4.2.4) wurde so aufbereitet, dass damit Vergleichsmessungen mit den Proben der exponierten Tiere durchgeführt werden konnten. Dazu wurden je in das eine der beiden Röhrchen in identischer Weise Interner Standard und abschließend ein

definiertes Aliquot zwischen 5 und 40 μl einer acetonischen DEB-Lösung (1.2 – 153.3 $\mu\text{mol/l}$) gegeben, so, dass Konzentrationen wie die aus den Expositionen zu erwartenden resultierten. Auch diese Lösung war im Voraus in 2 ml-Reaktionsgefäßen hergestellt worden. Die Blutprobe des je anderen Röhrchens diente als Doppelblank, d. h. ihr wurde weder Interner Standard noch DEB hinzugefügt. Soweit möglich wurden sämtliche Arbeitsschritte auf Eis ausgeführt.

Der Inhalt aller Röhrchen wurde je gut vermengt und gewogen sowie die Blutzellen abzentrifugiert (Zentrifuge SIGMA 4K10, 0 °C, 10 min, 4000 g). Mittels einer Pasteur-Pipette aus Glas wurde der Überstand abgenommen, in je ein neues Kryoröhrchen überführt und bei -80 °C eingefroren.

Nach dem Auftauen des Plasmas auf Eis wurden von jeder Probe ca. 0.5 ml in je ein Kryoröhrchen überführt und zur Derivatisierung der DEB- und DEB-D6-Moleküle mit je 1 ml Na-Diethyldithiocarbamat-Lösung (50 mg/ml Phosphatpuffer (50 mmol/l), pH ~ 7.2) versetzt (Abb. 4); die Lösung war zuvor hergestellt worden. Der Inhalt der Kryoröhrchen wurde mit Hilfe eines Vibrationsschüttlers 10 s lang vermengt und das Reaktionsgemisch anschließend für 10 min bei Raumtemperatur sowie dann für 1 h bei 50 °C in einem Wärmeschrank inkubiert.

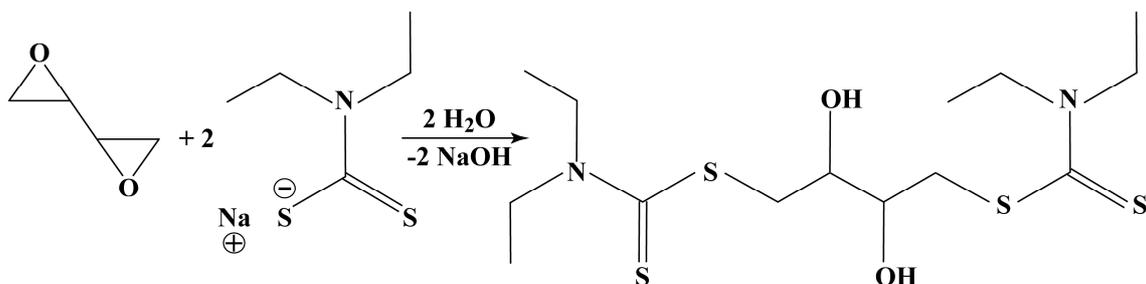


Abb. 4: Reaktionsschema der Derivatisierung von DEB mit Na-Diethyldithiocarbamat

Nach Abkühlung auf Raumtemperatur erfolgte die Zugabe von 2 ml Chloroform zur Extraktion der bei der Derivatisierung entstandenen Thioester der Dithiocarbamidsäure. Dazu wurden die beiden Phasen zunächst mit Hilfe eines Vibrationsschüttlers 1 min lang vermengt und anschließend mittels der Zentrifuge SIGMA 4K15 (0 °C, 5 min, 5300 g) wieder getrennt. Die organische Phase wurde mit Hilfe einer Pasteur-Pipette aus Polyethylen aufgenommen

und in ein weiteres Kryoröhrchen überführt. Anschließend wurde die Extraktion in identischer Weise wiederholt; die organischen Phasen wurden vereinigt.

Zur Aufreinigung wurde in dieses Röhrchen 1 ml NaCl-Lösung (10 %) zugegeben, die zuvor aus NaCl und Wasser hergestellt worden war. Der Inhalt des Röhrchens wurde 30 s lang mittels eines Vibrationsschüttlers vermengt. Anschließend wurde die organische Phase mit Hilfe einer Pasteur-Pipette aus Polyethylen aufgenommen, in ein weiteres Kryoröhrchen überführt und die Flüssigkeit in einem Metallblockthermostaten unter einem Stickstoffstrom vollständig abgedampft.

Zu dem Rückstand in jedem Kryoröhrchen wurden 50 µl Methanol gegeben und der Inhalt jedes Röhrchens von Hand sowie mit Hilfe des Vibrationsschüttlers vermengt. Abschließend wurden die Proben durch kurze Zentrifugation am Röhrchenboden gesammelt und mit Hilfe von Pasteur-Pipetten aus Polyethylen in Autosampler-Flaschen überführt, die mit 100 µl-Mikro-Einsätzen bestückt waren.

Die fertig vorbereiteten Flaschen wurden unter Verwendung einer Verschlusszange mit Bördelkappen versehen, die mit Teflon/Silikon-Septen ausgestattet waren, und möglichst unmittelbar der Messung (2.3.2.2) zugeführt. Im Probengeber der HPLC-Anlage wurden sie bei 8 °C vorgekühlt.

Für die Zugaben des gelösten Internen Standards und des gelösten DEBs wurden Mikroliterspritzen verwendet; die Spritzen wurden jeweils vor und nach Gebrauch mit Aceton gespült. Die übrigen Volumina wurden, wenn nicht anders vermerkt, mit Hilfe von Eppendorf-Pipetten überführt. Bei ungenügender Trennung durch die beschriebenen Zentrifugationen wurde an den entsprechenden Stellen länger zentrifugiert als angegeben. Soweit möglich wurden sämtliche Arbeitsschritte unter dem Abzug ausgeführt.

2.3.2.2 Messung

Die chromatographische Auftrennung der Substanzen erfolgte unter Verwendung eines HPLC-Systems, das aus einer binären Pumpe mit Vakuumentgaser, einem Probengeber mit Thermostat und einer Umkehrphasen-Säule (Luna 5 µ C18 (2), 150 × 2.0 mm ID) in einem thermostatisierten Säulenraum sowie einem Steuermodul zur Bedienung bestand. Die Autosampler-Flaschen (2.3.2.1) wurden auf dem Probenhalter platziert und durch den Probengeber von jeder Probe 5 µl auf die Säule gespritzt. Um Verunreinigungen durch Verschleppung des Analyten auszuschließen, wurden zwischen je zwei Proben 5 µl Methanol

injiziert und die Chromatogramme analysiert. Die mobile Chromatographiephase setzte sich aus in Wasser von LC-MS-Qualität gelöstem Ammoniumacetat (5 mmol/l, pH 7) und Methanol (*Picograde*[®]) zusammen. Unter den vorgegebenen Bedingungen (Tab. 1) betrug die Retentionszeit der Analyten ca. 2.1 min (Abb. 7).

Tab. 1: Einstellungen des HPLC-Systems für die Analyse von DEB

Parameter	Einstellung			
Pumpe	Agilent 1100 LC Binary Pump			
Laufzeit	30.0 min			
Laufmittel		0 – 3 min	8 – 22 min	25 – 30 min
	A: Ammoniumacetat in Wasser	22 %	0 %	22 %
	B: Methanol	78 %	100 %	78 %
Flussrate	300 µl/min			
Probengeber	Agilent 1100 Thermo Autosampler			
Injektionsvolumen	5 µl			
Temperatur	8 °C			
Säule	Phenomenex Luna 5 µ C18 (2), 150 × 2.0 mm ID			
Vorsäule	Phenomenex SecurityGuard Cartridge C18, 4 × 2.0 mm ID			
Säulenofen	Agilent 1100 Column Oven			
Temperatur	30 °C			

Von der Säule führte ein 107 cm langes PEEK-Kapillarrohr zur *Turbo-Ion-Spray*-Quelle (TIS) des *Triple-Quadrupol*-Massenspektrometers, die bei einer Ionisierungsspannung (ISV) von 4.4 kV und einer Temperatur von 470 °C im positiven Modus betrieben wurde. Die in der Quelle bei atmosphärischem Druck gebildeten Ionen traten durch Druckgefälle und elektrische Potentialdifferenz in das Vakuumsystem des LC/MS/MS ein. Als *Nebulizer*- (GS1 = 35 psi), *Turbo*- (GS2 = 45 psi), *Curtain*- (CUR = 10 psi) und *Collision*-Gas (CAD = 7) wurde Stickstoff verwendet.

Zur Auswahl geeigneter Massenübergänge waren im Rahmen der Methodenentwicklung Q1-Spektren (Quadrupol 1) nach Injektion von DEB- und DEB-D6-Dithiocarbamidester-Lösungen aufgezeichnet worden. Abb. 5 zeigt das Spektrum des DEB-Dithioesters. Bei m/z 385.2 war das protonierte Molekülion ($[M-H]^+$) des DEB-Dithioesters zu sehen. Der höchste Peak bei m/z 407.2 entsprach dem Natrium-Addukt des Dithiocarbamidesters, das sich aber aufgrund seiner Stabilität schlecht zur Fragmentierung eignet. Bei der Untersuchung des

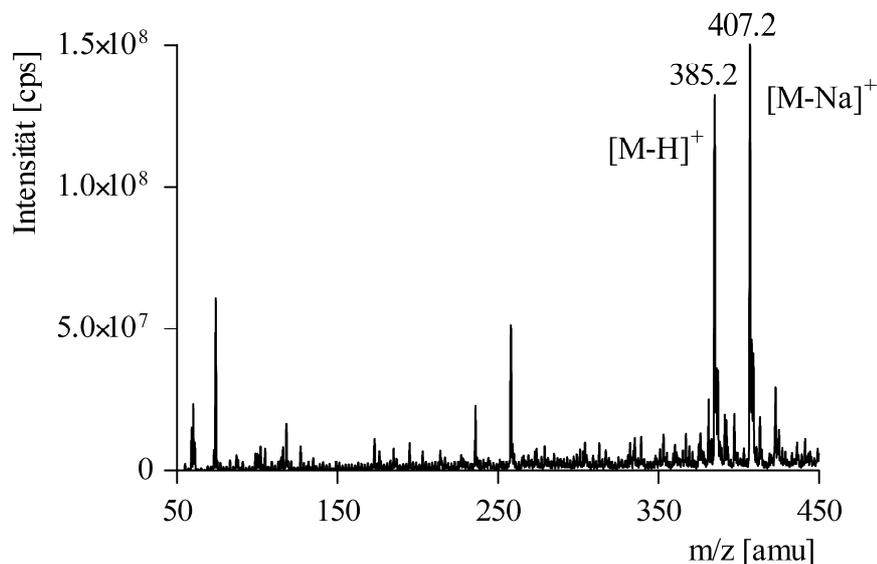


Abb. 5: Q1-Spektrum des DEB-Dithiocarbamidesters

Geräteparameter: ISV 4500 V, GS1 14 psi, CUR 10 psi, DP 50 V, EP 10 V

$[M-H]^+$: protoniertes Molekülion, $[M-Na]^+$: Molekül-Natriumaddukt

DEB-D6-Dithioesters hatte sich das analoge protonierte Molekülion (m/z 391.1) als geeignet erwiesen.

Im Q2 fand die thermisch mittels Stickstoff aktivierte Fragmentierung der Molekülionen statt. Das dabei entstandene Produktionenspektrum zeigt für den DEB-Dithioester Abb. 6. Bei m/z 385.2 lag wiederum das protonierte Molekülion. Das um 18 Da kleinere Molekül (m/z 367.2) ist auf eine vicinale Wasserabspaltung zurückzuführen, die auch im Fall des perdeutერიerten Internen Standards zu beobachten war (m/z 373.1). Durch die Wasserabspaltung bildet sich vermutlich eine 2,3-Epoxy-Verbindung. Ein unspezifisches Fragment mit hoher Intensität konnte für beide Thioester bei m/z 116.2 beobachtet werden.

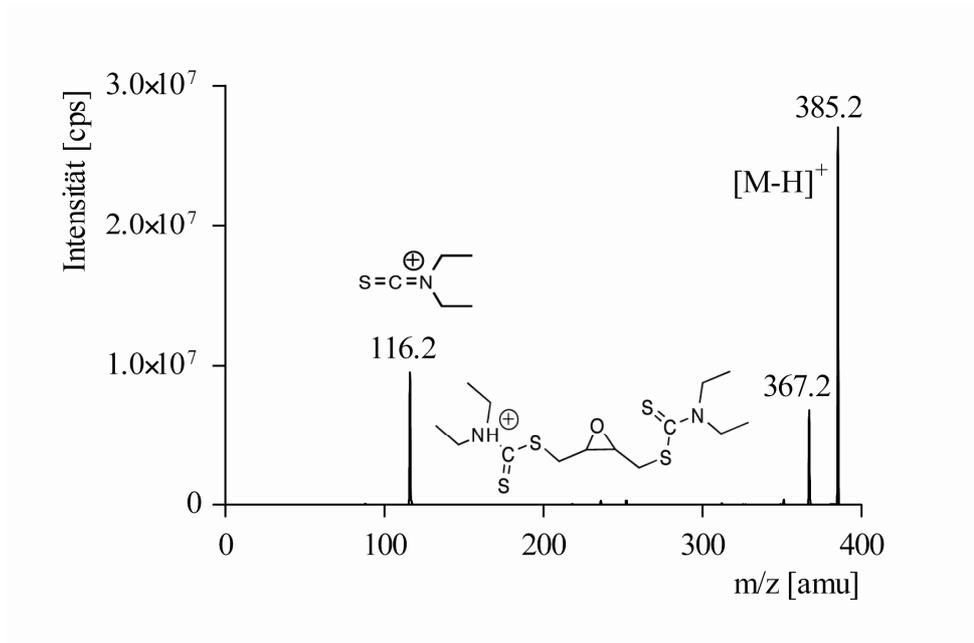


Abb. 6: Produktionenspektrum des DEB-Dithiocarbamidesters (m/z 385.2)

Geräteparameter: ISV 4500 V, GS1 14 psi, CUR 10 psi, CAD 6, DP 50 V,

EP 10 V, CE 13 V, CXP 11 V

[M-H]⁺: protoniertes Moleküllion

Für die Identifizierung und Quantifizierung der Analyten wurden die spezifischen Massenübergänge 385.2 → 367.2 und 391.1 → 373.1 herangezogen. Die unspezifischen Massenübergänge 385.2 → 116.2 und 391.1 → 116.2 eigneten sich nur zur Quantifizierung. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde lediglich bei der Analyse des Blutes nach Exposition von Ratten gegen 1 und 6 ppm BD (3.2.1) der Massenübergang 385.2 → 116.2 verwendet, ansonsten waren die Intensitäten der spezifischen Massenübergänge ausreichend. Abb. 7 zeigt zwei charakteristische, mit Hilfe der MRM-Methode erhaltene Chromatogramme.

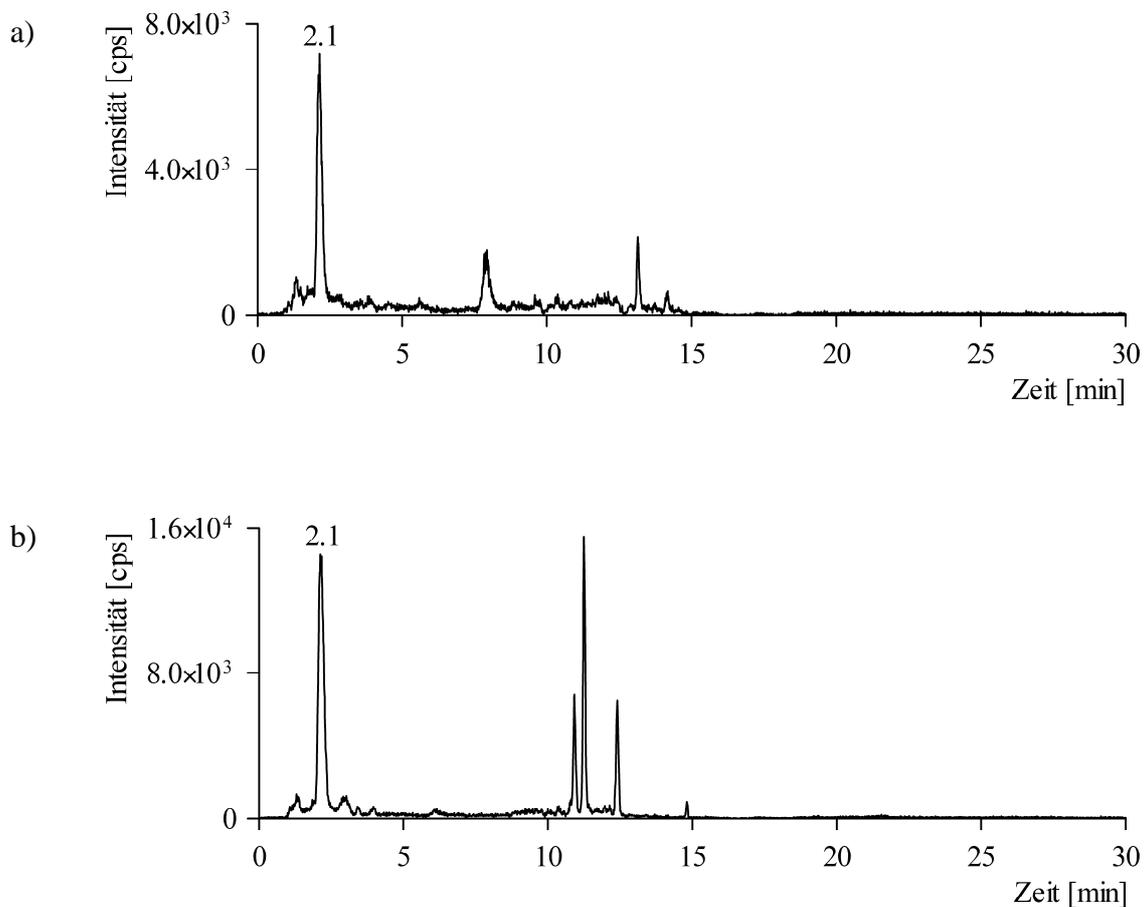


Abb. 7: LC/MS/MS-Chromatogramme a) des DEB-Dithiocarbamidesters (MRM 385.2 → 367.2), b) des DEB-D6-Dithiocarbamidesters (MRM 391.1 → 373.1)
 Exemplarisch von einer Blutprobe von Mäusen nach Exposition gegen 10 ppm BD,
 $c_{IS\ Exp.} = 0.16\ \mu\text{mol/l}$ (vgl. 2.3.2.3)

Retentionszeit: je 2.1 min

HPLC-Bedingungen: Tab. 1, MS-Potentiale: Tab. 2

In Tab. 2 sind die für die MRM-Methode verwendeten Potentiale aufgelistet. Die Messdauer (*Dwell Time*) pro Massenübergang betrug 150 ms. Für Q1 und Q3 wurde jeweils die Auflösung UNIT verwendet.

Tab. 2: Fokussierungs- und Beschleunigungspotentiale entlang des Ionenpfades im *Triple-Quadrupol*-Massenspektrometer für die MRM-Übergänge

Analyt		MRM-Übergang [amu]	Potentiale [V]			
			DP	EP	CE	CXP
DEB	Identifizierung/Quantifizierung	385.2 → 367.2	50	7	17	22
	Quantifizierung	385.2 → 116.2	49	6	19	21
DEB-D6	Identifizierung/Quantifizierung	391.1 → 373.1	50	7	17	22
	Quantifizierung	391.1 → 116.2	49	6	19	21

DP: Declustering Potential, EP: Entrance Potential, CE: Collision Energy, CXP: Cell Exit Potential

Zur Datenerfassung und -auswertung sowie zur Steuerung der HPLC- und der Massenspektrometeranlage wurde die Software *Analyst*[®] 1.4.2, betrieben auf einem Arbeitsplatzcomputer *Precision 360* (Dell), verwendet. Die Einstellungen der Methode waren unter D:\Analyst\Projects\DEB_Dithiocarb\Acquisition Methods\DEB_D6_Thiocarb_HPLC.dam hinterlegt. Die Prinzipien der Berechnung der DEB-Konzentration sind in 2.3.2.3 dargestellt.

2.3.2.3 Kalibrierung

Zur Untersuchung der Proportionalität zwischen DEB-Blutkonzentration und Detektorsignal sowie zur Ermittlung der Konzentration an DEB im Blut der exponierten Ratten und Mäuse wurden für beide Spezies Kalibrierungsreihen in den relevanten Konzentrationsbereichen erstellt.

Hierzu wurden Ratten und Mäuse analog dem Vorgehen in 2.4.2.4 getötet sowie ihnen Blut entnommen. Dieses wurde für jede Spezies gepoolt. Anschließend wurden davon definierte Mengen von 1, 2 oder 4 ml in Kryoröhrchen überführt. Die Vorbereitung der Röhrchen und die Aufbereitung der Proben erfolgten den Schritten in 2.3.2.1 entsprechend, allerdings ohne sie zwischenzeitlich bei -80 °C einzugefrieren. Den Blutproben jeder Kalibrierungsreihe wurden konstante Mengen Internen Standards sowie definierte Aliquote DEB-Lösung verschiedener Konzentrationen zugegeben. Bereits zuvor waren acetonische Verdünnungsreihen für DEB und DEB-D6 hergestellt worden. Für den Konzentrationsbereich, der den Expositionen gegen 1 und 6 ppm BD entsprach, wurde je eine Sechs-Punkt-Kalibrierung durchgeführt, für die Konzentrationen entsprechend den

Expositionen im Bereich von 10 – 100 ppm BD je eine Neun-Punkt-Kalibrierung. Zusätzlich wurde bei jeder Messreihe eine Probe erstellt, der weder Interner Standard noch DEB hinzugefügt wurde.

Die Berechnungen der Konzentrationen des Internen Standards ($c_{IS\ Kal.}$) bzw. des Analyten DEB ($c_{DEB\ Kal.}$) in einer Kalibrierungsprobe erfolgten mittels Gleichung (3) bzw. (4).

$$c_{IS\ Kal.} = \frac{n_{IS\ Kal.\ add.}}{V_{Kal.}} = \frac{c_{IS\ Kal.\ add.} \cdot V_{IS\ Kal.\ add.}}{V_{Blut\ Kal.} + V_{IS\ Kal.\ add.} + V_{DEB\ Kal.\ add.}} \quad (3)$$

$$c_{DEB\ Kal.} = \frac{n_{DEB\ Kal.\ add.}}{V_{Kal.}} = \frac{c_{DEB\ Kal.\ add.} \cdot V_{DEB\ Kal.\ add.}}{V_{Blut\ Kal.} + V_{IS\ Kal.\ add.} + V_{DEB\ Kal.\ add.}} \quad (4)$$

$c_{IS\ Kal.}$ bzw. $c_{DEB\ Kal.}$	Konzentration an Internem Standard bzw. DEB in einer Kalibrierungsprobe [$\mu\text{mol/ml}$]
$n_{IS\ Kal.\ add.}$ bzw. $n_{DEB\ Kal.\ add.}$	Stoffmenge des zu einer Kalibrierungsprobe hinzugefügten Internen Standards bzw. DEBs [μmol]
$V_{Kal.}$	Gesamtvolumen einer Kalibrierungsprobe [ml]
$V_{Blut\ Kal.}$	Volumen des für eine Kalibrierungsprobe verwendeten Bluts [ml]
$V_{IS\ Kal.\ add.}$ bzw. $V_{DEB\ Kal.\ add.}$	Volumen des zu einer Kalibrierungsprobe hinzugefügten Internen Standards bzw. DEBs [ml]
$c_{IS\ Kal.\ add.}$ bzw. $c_{DEB\ Kal.\ add.}$	Konzentration an Internem Standard bzw. DEB in $V_{IS\ Kal.\ add.}$ bzw. $V_{DEB\ Kal.\ add.}$ [$\mu\text{mol/ml}$]

Die Proben wurden entsprechend dem Vorgehen in 2.3.2.2 gemessen. Dabei wurden je die Flächen der für DEB ($A_{DEB\ Kal.}$) und DEB-D6 ($A_{IS\ Kal.}$) spezifischen Peaks (vgl. Abb. 7) durch Integration ermittelt. Zur Erstellung der Kalibrierungskurve wurde das korrigierte

Peakflächenverhältnis $\frac{A_{DEB\ Kal.}}{A_{IS\ Kal.} \cdot (V_{Blut\ Kal.} + V_{IS\ Kal.\ add.} + V_{DEB\ Kal.\ add.})}$ gegen die eingesetzten DEB-

Konzentrationen aufgetragen. Je Messdurchgang bei den Blutproben (3.2) wurde die zugehörige Kalibrierungsreihe mitgemessen. Mit Ausnahme der nach Exposition gegen 1 und 6 ppm BD erhaltenen Rattenblutproben (3.2.1) sowie der zugehörigen Kalibrierungsproben

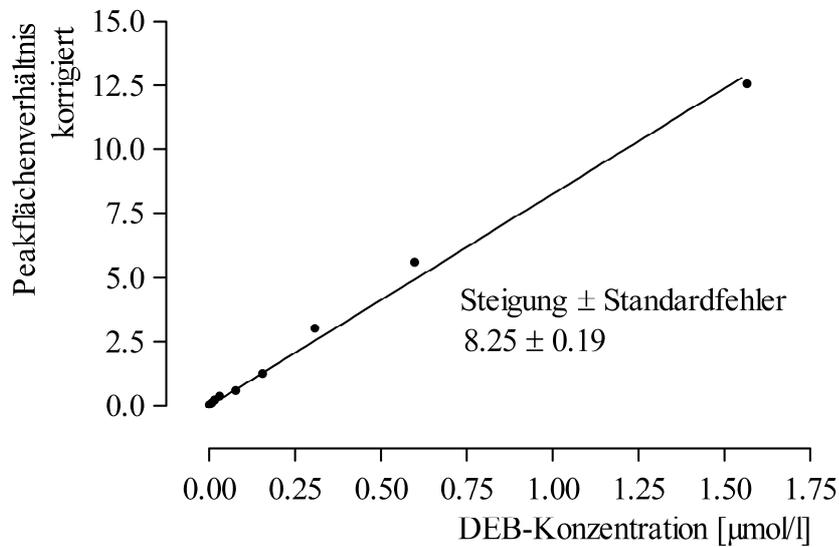


Abb. 8: Kalibrierungsgerade für DEB im Blut von Mäusen (0.00 – 1.57 µmol/l) entsprechend Expositionen gegen BD im Bereich von 10 – 100 ppm (ein Messdurchgang)

Linie: — Regressionsgerade durch den Ursprung

(eine Messung) wurde jede Probe zweimal gemessen. Abb. 8 zeigt exemplarisch eine Kalibrierungsgerade.

Mit Hilfe der jeweiligen Kalibrierungsreihe konnte auf der Basis der bei den Messungen erhaltenen Peakflächen (2.3.2.2) die DEB-Konzentration im Blut der exponierten Ratten und Mäuse (3.2) unter Verwendung folgender Gleichung errechnet werden. Die durch das in den Röhrchen vorgelegte DEM (10 µl/ml Blut) verursachte Verdünnung wurde vernachlässigt.

$$C_{DEB\ Exp.} = \frac{A_{DEB\ Exp.}}{A_{IS\ Exp.} \cdot (V_{Blut\ Exp.} + V_{IS\ Exp.\ add.})} \cdot \frac{n_{IS\ Exp.\ add.}}{n_{IS\ Kal.\ add.}} \cdot \frac{I}{Steigung} \quad (5)$$

$C_{DEB\ Exp.}$	Konzentration an DEB in einer Blutprobe nach Exposition [$\mu\text{mol/ml}$]
$A_{DEB\ Exp.}$ bzw. $A_{IS\ Exp.}$	Integral des für DEB bzw. DEB-D6 spezifischen Peaks bei der Messung einer Probe nach Exposition
$n_{IS\ Exp.\ add.}$ bzw. $n_{IS\ Kal.\ add.}$	Stoffmenge des zu einer Blut- bzw. Kalibrierungsprobe hinzugefügten Internen Standards [μmol]
$V_{Blut\ Exp.}$	Volumen des für eine Probe nach Exposition verwendeten Bluts [ml]
$V_{IS\ Exp.\ add.}$	Volumen des zu einer Probe nach Exposition hinzugefügten Internen Standards [ml]
<i>Steigung</i>	Steigung der Kalibrierungsgeraden

Als Nachweisgrenze wurde die dreifache Höhe des Detektorsignals im Vergleich zum Hintergrundrauschen angesehen. Diese lag bei 0.5 nmol DEB/l Blut. Der Variationskoeffizient (2.5) als Maß für die Reproduzierbarkeit der Messwerte lag bei 3 – 4 %.

2.4 Inhalative Expositionen von Ratten und Mäusen gegen 1,3-Butadien

2.4.1 Expositionssystem

Um die DEB-Konzentrationen im Blut der Ratten und Mäuse in Relation zu den Expositionskonzentrationen von BD setzen zu können, wurden diese konstant gehalten. Dazu mussten die durch den Metabolismus der Tiere entfernten BD-Mengen durch wiederholte Zugaben definierter BD-Dosen ersetzt werden. Da das Expositionssystem somit zwar über einen Zu-, nicht jedoch über einen Ausgang für BD verfügte, handelte es sich, in Anlehnung an Filser, 1992, um ein für BD pseudo-offenes System.

2.4.1.1 Versuchsaufbau

Das Expositionssystem (Abb. 9) (in Anlehnung an Filser *et al.*, 2007) bestand aus einem Rundkolben, der mit einem Planflansch versehen war, und einem Planflansch-Deckel sowie einem drucklos arbeitenden Sauerstoff-Versorgungssystem. Auf dem Deckel befanden sich drei Hälse (einer mit 24/29-Normschliff-Hülse und rechts und links von diesem je einer mit

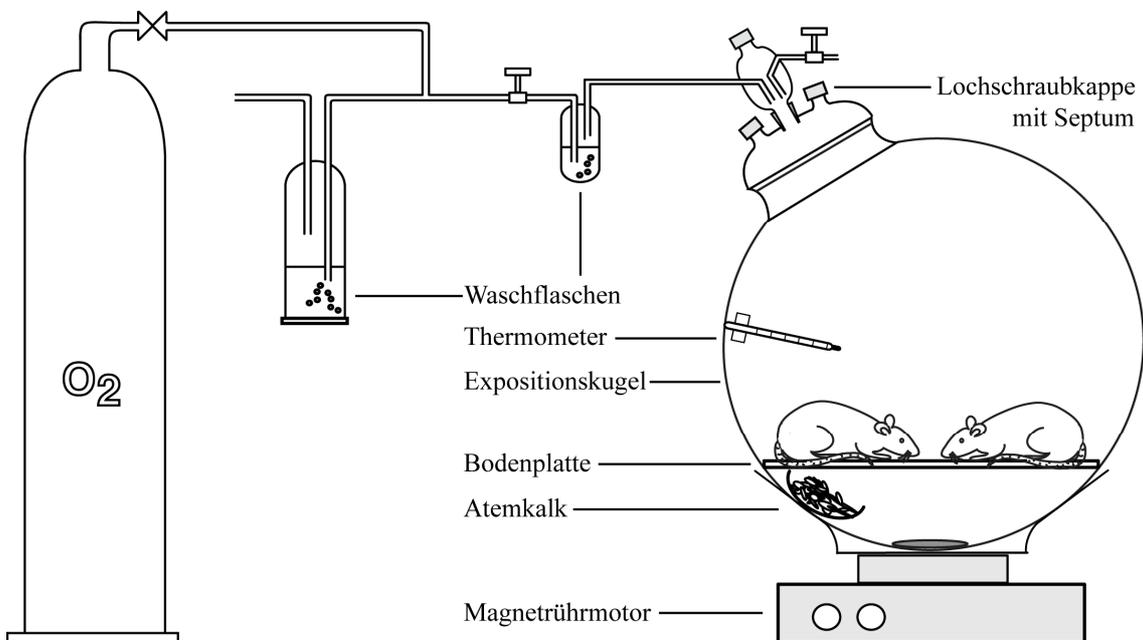


Abb. 9: Schematischer Aufbau des Expositionssystems

Schraubgewinde GL 14 für Lochschraubkappen mit teflonbeschichteten Silikon-Septen). Verbunden mit dem mittleren Hals war ein Glasaufsatz mit einem 24/29-Normschliff-Kern (zur Verbindung mit dem Deckel), einer kleinen Waschflasche, einem Hals mit Schraubgewinde GL 14 (für Lochschraubkappen mit Septum) und zwei Hähnen. Durch die kleine Waschflasche strömte Sauerstoff aus einer Druckflasche. Parallel zu dieser Waschflasche war eine weitere Waschflasche angeschlossen, durch welche der überschüssige Sauerstoff ins Freie gelangte. Von der Druckflasche zu den beiden Waschflaschen führten Silikonschläuche.

An der Wand im unteren Bereich des Kolbens wurde eine aus Alufolie geformte Schale, die bei Exposition von drei Ratten 75 g und bei Exposition von zwölf Mäusen 80 g Atemkalk enthielt, mittels Klebeband fixiert. Der Atemkalk absorbierte das von den Tieren exhalierte Kohlendioxid. Der auf diese Weise entstandene Unterdruck wurde über das Sauerstoff-Versorgungssystem immer durch genau die Menge reinen Sauerstoffs ausgeglichen, die der von den Tieren umgesetzten entsprach. Dadurch wurden eine nahezu konstante Sauerstoffkonzentration und konstante Druckverhältnisse gewährleistet.

Über der Schale mit Atemkalk befand sich die Bodenplatte aus Polypropylen, auf der die Ratten bzw. Mäuse während der Exposition saßen. Des Weiteren war an der Wand im oberen Bereich der Kugel ein Thermometer zur Überwachung der Temperatur in der Kolbenatmosphäre angebracht; die registrierten Werte lagen bei ca. 22 °C. Die Luftdruckmessungen an den Expositionstagen ergaben konstant ca. 967 hPa.

Die Expositionskugel wurde mit einer Flanschdichtung und einer Flanschklemme gasdicht verschlossen.

2.4.1.2 Einstellung und Überwachung der Expositionskonzentration

Vor Versuchsbeginn wurde eine der gewünschten Expositionskonzentration entsprechende Menge BDs über eines der teflonbeschichteten Silikon-Septen (Abb. 9) in den Kolben injiziert. Zur Ermittlung des dafür nötigen Volumens an BD wurde Gleichung (1) herangezogen, wobei für c_{BD} die gewünschte BD-Konzentration und für $V_{Exsikkator}$ das Volumen des Kolbens abzüglich der Massen der Tiere eingesetzt wurden. Die Massen der Ratten bzw. Mäuse können hier näherungsweise mit dem durch sie verdrängten Volumen gleichgesetzt werden. Der Magnetrührer sowie das Durchmischen mit einer 60 ml-Einmalspritze unmittelbar vor jeder Probennahme sorgten für eine homogene Gasverteilung.

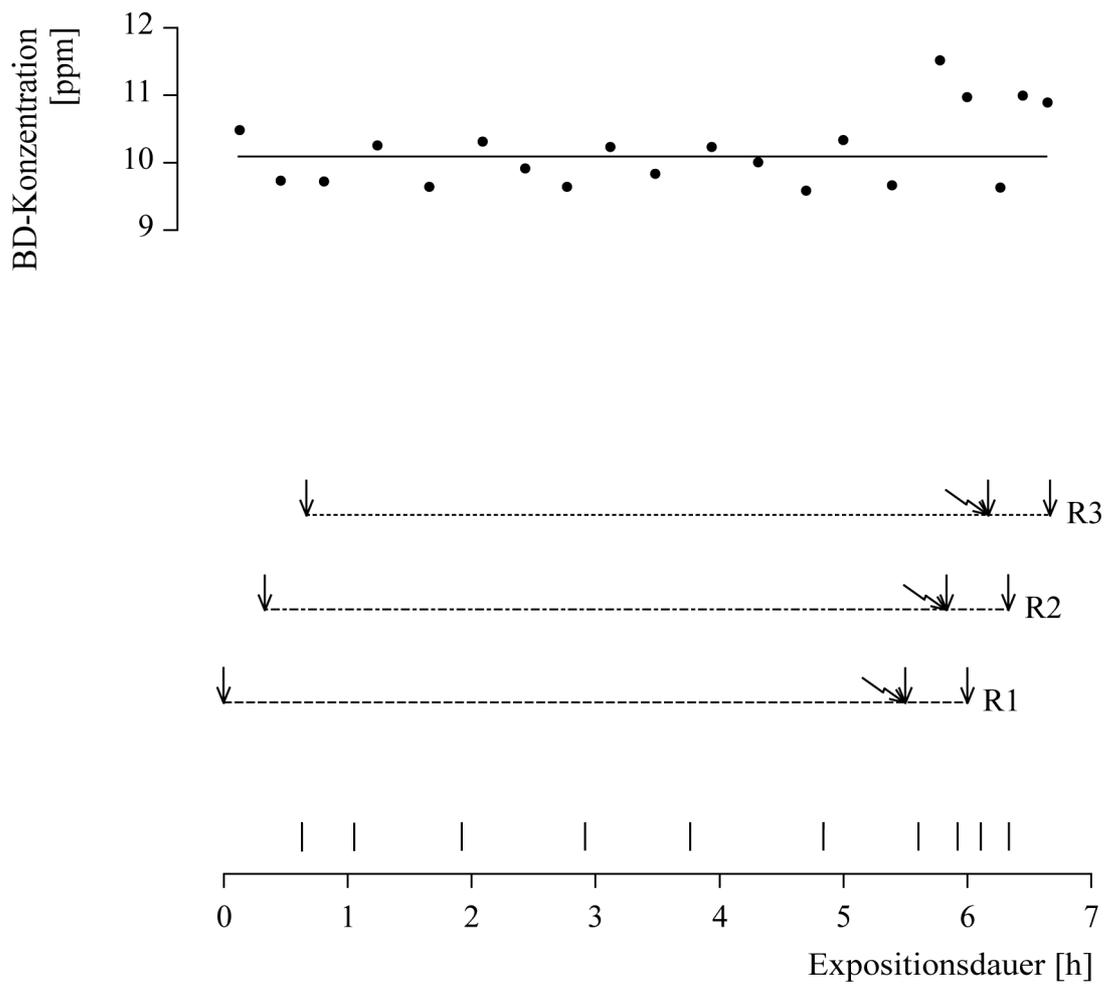


Abb. 10: BD-Konzentrations-Zeit-Verlauf in der Expositions-kugel

Exemplarische Darstellung der Ereignisse bei der Exposition dreier Ratten gegen 10 ppm BD, beginnend mit dem Start der Exposition

- BD-Konzentration in der Kugel (gemessen)
- | Nachdosierung von BD
- ↓ Öffnung der Kugel
- ↘ Betäubung einer Ratte
- durchschnittliche BD-Istkonzentration: 10.1 ppm
- Expositions-dauer der ersten Ratte (R1)
- Expositions-dauer der zweiten Ratte (R2)
- Expositions-dauer der dritten Ratte (R3)

Vor dem Einsetzen der ersten Tiere (2.4.2.1) wurde zur Orientierung die BD-Konzentration gaschromatographisch bestimmt (2.3.1.1) sowie während der gesamten Exposition überwacht (Abb. 10), wobei die Auswertung der Peaks über deren Flächen erfolgte.

Da BD von den Tieren inhalativ aufgenommen und metabolisiert wurde sowie durch das immer wieder notwendige Öffnen der Kugel verlorenging, musste zur Aufrechterhaltung der gewünschten Konzentration regelmäßig BD aus dem Vorratsexsikkator (2.3.1.2) nachdosiert werden (Abb. 10). Das zu injizierende Volumen wurde gemäß Gleichung (2) berechnet, wobei für c_{BD2} die Abweichung von der Sollkonzentration und für $V_{Exsikkator}$ das Volumen des Kolbens abzüglich der Massen der Tiere eingesetzt wurden. Andererseits musste auch eine ggf. zu hoch eingestellte BD-Konzentration durch Öffnen des Kugeldeckels nach unten korrigiert werden.

Während jeglicher invasiver Tätigkeit am Expositionssystem wurde die Sauerstoffzufuhr durch Verschluss des Hahns zwischen Silikonschlauch und Kolben abgeriegelt, um einen Gasaustausch über diesen Weg zu verhindern.

2.4.2 Durchführung der Expositionen

Je drei männliche CD-Ratten bzw. zwölf männliche B6C3F1-Mäuse wurden über 6 h gegen BD-Konzentrationen von 1, 6, 10, 20, 60 und 100 ppm exponiert. Um die nach dieser Zeit im Blut der Tiere herrschenden Fließgleichgewichtskonzentrationen von DEB bestimmen zu können, war es erforderlich, unmittelbar nach Expositionsende die Ratten durch Strangulation bzw. die Mäuse durch zervikale Dislokation zu töten. Dies war deshalb nötig, weil dabei der Verlust von BD oder einem seiner Metaboliten über den Stoffwechsel und die Atmung der Tiere vermieden werden konnte (Lee *et al.*, 2005). Anschließend wurde den Tieren Blut entnommen.

2.4.2.1 Vorbereitung der Versuchstiere und Expositionsbeginn

Unmittelbar vor jedem Experiment wurden die Tiere gewogen. Die Ratten wurden mit wasserfesten Stiften am Schwanz farbig markiert, von den Mäusen wurden je sechs der zwölf durch Rasur einer kleinen Fläche Fells gekennzeichnet. Für den Zeitraum der Exposition wurden ihnen Futter und Wasser entzogen.

Zunächst wurde die zuvor hergestellte BD-Konzentration in der Kugel (2.4.1.2) bestimmt. Im Fall der Exposition von Ratten wurde sodann ein Tier in die Kugel gesetzt – dieser Moment

entsprach dem Start der Exposition. Die zweite Ratte wurde 20 min nach der ersten eingebracht und die dritte weitere 20 min später (Abb. 10). Bei der Exposition von Mäusen wurden zu Beginn sechs Tiere in die Kugel gesetzt und nach 25 min die anderen sechs. Der Grund für dieses Vorgehen liegt darin, dass alle Tiere gleich lange exponiert werden sollten, am Ende ihrer Exposition aber nicht zeitgleich behandelt werden konnten.

2.4.2.2 Betäubung der Ratten

Da es auf Grund der Größe der Ratten nicht möglich war, sie wie die Mäuse durch schmerzfreie zervikale Dislokation zu töten, mussten sie auf weniger schonende Weise stranguliert und deshalb zuvor betäubt werden.

Dazu wurde nach je 5 h 30 min das entsprechende Tier entnommen und die Kugel sofort wieder verschlossen. Jeder Ratte wurden intraperitoneal mit einer Einmalspritze und -kanüle (0.55 × 25 mm) 0.18 ml Narkotikum pro 100 g Körpergewicht appliziert. Anschließend wurde das betäubte Tier wieder in die Kugel gelegt und in der Folgezeit hinsichtlich seiner Atmung beobachtet, da durch die Narkosemittel Atemdepression auftreten kann. Das Narkotikum war bereits im Vorfeld aus Ketamin 10 % und Rompun[®] 2 % im Volumenverhältnis 8 : 10 hergestellt worden. Daraus resultierte eine Dosierung von 8 mg Ketamin und 2 mg Xylazin pro 100 g Körpergewicht. Herstellung und Dosierung erfolgten nach Anweisung des Tierschutzbeauftragten des Helmholtz-Zentrums München.

2.4.2.3 Tötung der Ratten und Mäuse sowie Entnahme von Blutproben

Die betäubten Ratten wurden nach je weiteren 30 min aus der Expositionskugel genommen und unmittelbar darauf mittels eines Plastik-Kabelbinders stranguliert. Dazu war der Kabelbinder bereits zuvor so am Kleintieroperationstisch angebracht worden, dass mit der Strangulation das jeweilige Tier gleich auf dem Tisch fixiert war. Der Bauchraum der Ratte wurde mit einer Schere eröffnet, das Darmkonvolut nach links verlagert und die Leberlappen so abgehalten, dass die *Vena cava caudalis* von der Iliakalgabel bis unter die Leber zugänglich wurde. Aus dieser Vene wurden mit Hilfe einer Einmalspritze, die mit einer Heparinlösung benetzt war, zwischen Mündung der rechten Nierenvene und Leber pro Tier ca. 6 ml Blut entnommen. Punktiert wurde das Gefäß dazu weiter kaudal (Popesko *et al.*, 1992; Olds und Olds, 1984).

Von diesem Blut wurden sofort mittels derselben Spritze ca. 4 ml zur DEB-Analyse in ein Kryoröhrchen überführt. Bereits zuvor war für jedes Tier ein Röhrchen präpariert worden (2.3.2).

Der ganze Vorgang, von der Entnahme der Ratte aus der Kugel bis zur Überführung ihres Blutes in das Röhrchen, dauerte in etwa 1 min.

Nach je 6 h wurden die sechs Mäuse einzeln nacheinander aus der Expositionskugel gehoben, getötet sowie ihnen Blut entnommen. Zur Tötung durch zervikale Dislokation wurde gleichzeitig mit Hilfe eines stumpfen Instrumentes das Genick des Tieres von dorsal gegen die Tischplatte gedrückt und an seinem Körper in kaudaler Richtung gezogen. Anschließend wurde das Tier mit Hilfe von vier Nadeln auf einer Korkplatte fixiert. Der Bauchraum der Maus wurde mit einer Schere eröffnet und das Darmkonvolut so nach links verlagert, dass die *Vena cava caudalis* bis unter die Leber zugänglich wurde. Aus dieser Vene wurden mit Hilfe einer Einmalspritze, die mit einer Heparinlösung benetzt war, zwischen Mündung der rechten Nierenvene und Leber pro Tier ca. 0.5 ml Blut entnommen. Punktiert wurde das Gefäß dazu weiter kaudal (Popesko *et al.*, 1992).

Dieses Blut wurde sofort mittels derselben Spritze zur DEB-Analyse in ein Kryoröhrchen überführt, wobei in einem Röhrchen je das Blut der sechs zeitgleich exponierten Tiere gepoolt wurde. Bereits zuvor waren die Röhrchen präpariert worden (2.3.2).

Der ganze Vorgang, von der Entnahme der ersten Maus aus der Kugel bis zur Überführung des Blutes des sechsten Tieres in das Röhrchen, dauerte in etwa 6 min.

2.4.2.4 Kontrolltiere

Im Rahmen jedes Expositionsexperiments wurden zusätzlich zwei Ratten bzw. zwölf Mäuse getötet, die bis zu diesem Moment in einem Makrolonkäfig gehalten und nicht exponiert worden waren.

Die Ratten wurden ohne Betäubung mittels CO₂ in einem Exsikkator getötet, die Mäuse wie nach der Exposition (2.4.2.3). Den Tieren wurden in identischer Weise dieselben Mengen Blut entnommen wie in 2.4.2.3 beschrieben und ebenso je ca. 4 ml des Blutes einer Ratte in ein Kryoröhrchen überführt bzw. das Blut von je sechs Mäusen in einem Röhrchen gepoolt. Auch diese Kryoröhrchen waren bereits zuvor präpariert worden (2.3.2).

2.5 Statistik

Soweit nicht anders angegeben wurden für die Berechnungen des Mittelwerts, der Standardabweichung und der Kurvenanpassung die Programme *GraphPad Prism*[®] 5.02 und *Microsoft*[®] *Excel* 2003 verwendet.

Die Flächen unter den Konzentrations-Zeit-Kurven (*area under the curve*, AUC) der BD-Expositionen (3.1) wurden mit dem Programm *Microsoft*[®] *Excel* unter Verwendung der Trapez-Regel berechnet und durch die Dauer der Exposition geteilt, um die jeweilige Durchschnittskonzentration zu erhalten. Die Standardabweichungen von dieser Durchschnittskonzentration wurden mittels Gleichung (6) (in Anlehnung an Sachs, 1997) durch Einsetzen der über die Zeit gewichteten Messwerte errechnet.

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n w_i \cdot (z_i - \bar{z})^2}{\sum_{i=1}^n w_i} \cdot \frac{n}{n-1}} \approx \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n w_i \cdot (z_i - \bar{z})^2}{\sum_{i=1}^n w_i}} \approx \sqrt{\sum_{i=1}^{n-1} \left(\frac{y_i + y_{i+1}}{2} - \bar{y}\right)^2 \cdot \frac{x_{i+1} - x_i}{X}} \quad (6)$$

s	Standardabweichung von der Durchschnittskonzentration
z_i	Variable
\bar{z}	Arithmetisches Mittel der Variablen z_i
w_i	Gewicht der Variablen z_i
n	Anzahl der Messwerte (atmosphärische BD-Konzentration)
y_i	BD-Konzentration in der Atmosphäre zum Expositionszeitpunkt x_i
\bar{y}	BD-Durchschnittskonzentration in der Atmosphäre (über die Zeit gewichtet)
x_i	Expositionszeitpunkt
X	Gesamtexpositionsdauer

Die Variationskoeffizienten (*VarK*) wurden, ebenfalls unter Verwendung des Programms *Microsoft*[®] *Excel*, nach Sachs, 1997 gemäß Gleichung (7) ermittelt, wobei SD_x die Standardabweichung und \bar{x} den arithmetischen Mittelwert beschreibt.

$$\text{Var}K(x) = \frac{SD_x}{\bar{x}} \quad (7)$$

Der arithmetische Mittelwert (\bar{x}) wurde nach Gleichung (8) (Sachs, 1997) berechnet; n gibt die Anzahl der Messungen an.

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \quad (8)$$

Die Standardabweichung (SD_x) wurde ebenfalls nach Sachs, 1997 gemäß Gleichung (9) errechnet.

$$SD_x = \sqrt{\frac{n \cdot \sum_{i=1}^n x_i^2 - (\sum_{i=1}^n x_i)^2}{n \cdot (n-1)}} \quad (9)$$

3 Ergebnisse

3.1 Expositionsbedingungen

Die BD-Konzentrationen in der Kugelatmosphäre wurden während der Expositionen in Zeitabständen zwischen 5 und 35 min bestimmt und konstant gehalten (2.4.1.2).

Für die durchgeführten Expositionen sind die gemäß 2.5 berechneten Mittelwerte der BD-Konzentrationen in Tab. 3 aufgelistet. Dabei betrug die mittlere Abweichung vom Sollwert im Fall der Ratten 9.9 % sowie bei den Mäusen 6.9 %. Die im Rahmen einer Exposition aufgetretenen Schwankungen der Expositions-konzentration sind durch die ebenfalls gemäß 2.5 berechnete Standardabweichung vom Mittelwert der gemessenen BD-Konzentrationen charakterisiert. Mit steigenden Expositions-konzentrationen sanken die Schwankungen auf 5 bis 6 %.

Des Weiteren sind in Tab. 3 die mittleren Körpermassen der jeweiligen Versuchstiere aufgeführt, die unmittelbar vor jedem Experiment bestimmt wurden (2.4.2.1).

Tab. 3: Mittelwerte der BD-Expositions-konzentrationen sowie der Körpermassen der Tiere

a) Expositionen der Ratten (6 h)

BD-Sollkonzentration [ppm]	Gemessene BD-Konzentration (Mittelwert \pm Standardabweichung) [ppm]	Anzahl der Tiere	Körpermasse der Tiere (Mittelwert \pm Standardabweichung) [g]
1	1.1 ± 0.15	3	285 ± 3
6	5.5 ± 0.92	3	277 ± 8
10	11.9 ± 1.1	3	249 ± 8
20	21.9 ± 1.1	3	257 ± 5
60	64.4 ± 3.7	3	274 ± 4
100	101 ± 6.0	3	282 ± 11

b) Expositionen der Mäuse (6 h)

BD-Sollkonzentration [ppm]	Gemessene BD-Konzentration (Mittelwert \pm Standardabweichung) [ppm]	Anzahl der Tiere *	Körpermasse der Tiere (Mittelwert \pm Standardabweichung) [g]
1	1.0 ± 0.12	11	25 ± 1
6	6.4 ± 0.45	12	26 ± 1
10	11.2 ± 1.0	12	26 ± 1
20	20.4 ± 1.5	11	26 ± 1
60	63.5 ± 4.9	12	28 ± 1
100	109 ± 5.9	11	22 ± 1

* Je BD-Konzentration wurden 12 Tiere gemeinsam exponiert (2.4.2). Sind nur 11 Mäuse aufgelistet, war bei einem der Tiere die im Anschluss an die Exposition durchgeführte Blutentnahme nicht erfolgreich.

Je Exposition wurden zwei Proben für die DEB-Analyse (3.2.2) hergestellt, indem Blut von je 6 bzw. 5 Mäusen gepoolt wurde (2.4.2.3).

Während der Expositionen konnten keine Auffälligkeiten im Verhalten der Ratten und Mäuse beobachtet werden.

3.2 1,2:3,4-Diepoxybutan im Blut

3.2.1 1,2:3,4-Diepoxybutan im Blut der Ratten

Die unmittelbar nach den Expositionen der Ratten gewonnenen Blutproben (2.4.2.3) wurden, wie in 2.3.2 beschrieben, aufbereitet (Ausnahmen siehe unten) und die Konzentrationen an DEB im Blut der Tiere ermittelt. In Tab. 4 sind die den jeweiligen BD-Expositionskonzentrationen entsprechenden DEB-Konzentrationen aufgelistet.

Die Mittelwerte der DEB-Konzentrationen wurden aus den Werten der LC/MS/MS-Messungen der je verwendeten drei Proben errechnet (eine Messung je Probe bei den BD-Konzentrationen 1.1 und 5.5 ppm; zwei Messungen bei 11.9, 64.4 und 101 ppm BD). Die Standardabweichungen geben die Streuungen der Werte bezogen auf die je drei Ratten wieder.

Tab. 4: Mittelwerte der BD-Expositionskonzentrationen sowie der DEB-Konzentrationen im Blut der Ratten nach sechsständiger Exposition

BD-Expositionskonzentration (Mittelwert \pm Standardabweichung) [ppm]	DEB-Konzentration im Blut (Mittelwert \pm Standardabweichung) [μ mol/l]
1.1 \pm 0.15	0.00060 \pm 0.00019
5.5 \pm 0.92	0.0064 \pm 0.0042
11.9 \pm 1.1	0.020 \pm 0.024
21.9 \pm 1.1	*
64.4 \pm 3.7	0.19 \pm 0.18
101 \pm 6.0	0.17 \pm 0.10

* Die Blutproben der gegen 20 ppm BD exponierten Ratten konnten nicht ausgewertet werden.

Aufgrund der niedrigen Konzentrationen an DEB wurden bei den Blutproben der gegen 1.1 und 5.5 ppm BD exponierten Tiere, abweichend von der in 2.3.2.1 beschriebenen Aufbereitung, zur Derivatisierung 2 ml Plasma mit 2 ml Na-Diethyldithiocarbamat versetzt; die organische Phase wurde zweimal mit 3 ml Chloroform extrahiert. Ebenfalls abweichend vom Standardvorgehen (2.3.2.2) wurde bei den LC/MS/MS-Messungen dieser Blutproben der Massenübergang m/z 385.2 \rightarrow 116.2 als Quantifier für DEB herangezogen. Die Intensität des sonst verwendeten Quantifiers war für eine klare Auswertung nicht ausreichend.

Abb. 11 zeigt die DEB-Konzentrationen im Blut der Ratten in Abhängigkeit von den BD-Expositionskonzentrationen.

Zusätzlich zu den Ergebnissen der Messungen im Rahmen der eigenen Arbeit (Tab. 4, ●) sind in Abb. 11 zum Vergleich zwei Datenpunkte älterer Messungen (nicht veröffentlicht) aus derselben Arbeitsgruppe mit einer anderen Methode eingetragen (□). Hierbei wurden die Ratten über 4 h exponiert, zur Derivatisierung wurde 4-Benzylpiperidin verwendet; die Messungen erfolgten ebenfalls mit einem LC/MS/MS.

Auf der Grundlage aller Datenpunkte wurde eine Regressionsgerade angepasst (2.5), deren Steigung über den gesamten Bereich der Expositionskonzentrationen bei 0.0019 ± 0.0003 ($\mu\text{mol/l}$)/ppm lag.

Die Analyse des Blutes der Kontrolltiere (2.4.2.4), dem kein DEB zugegeben wurde (2.3.2.1), ergab bei den relevanten Massenübergängen keine über den Hintergrund hinausgehenden Signalintensitäten.

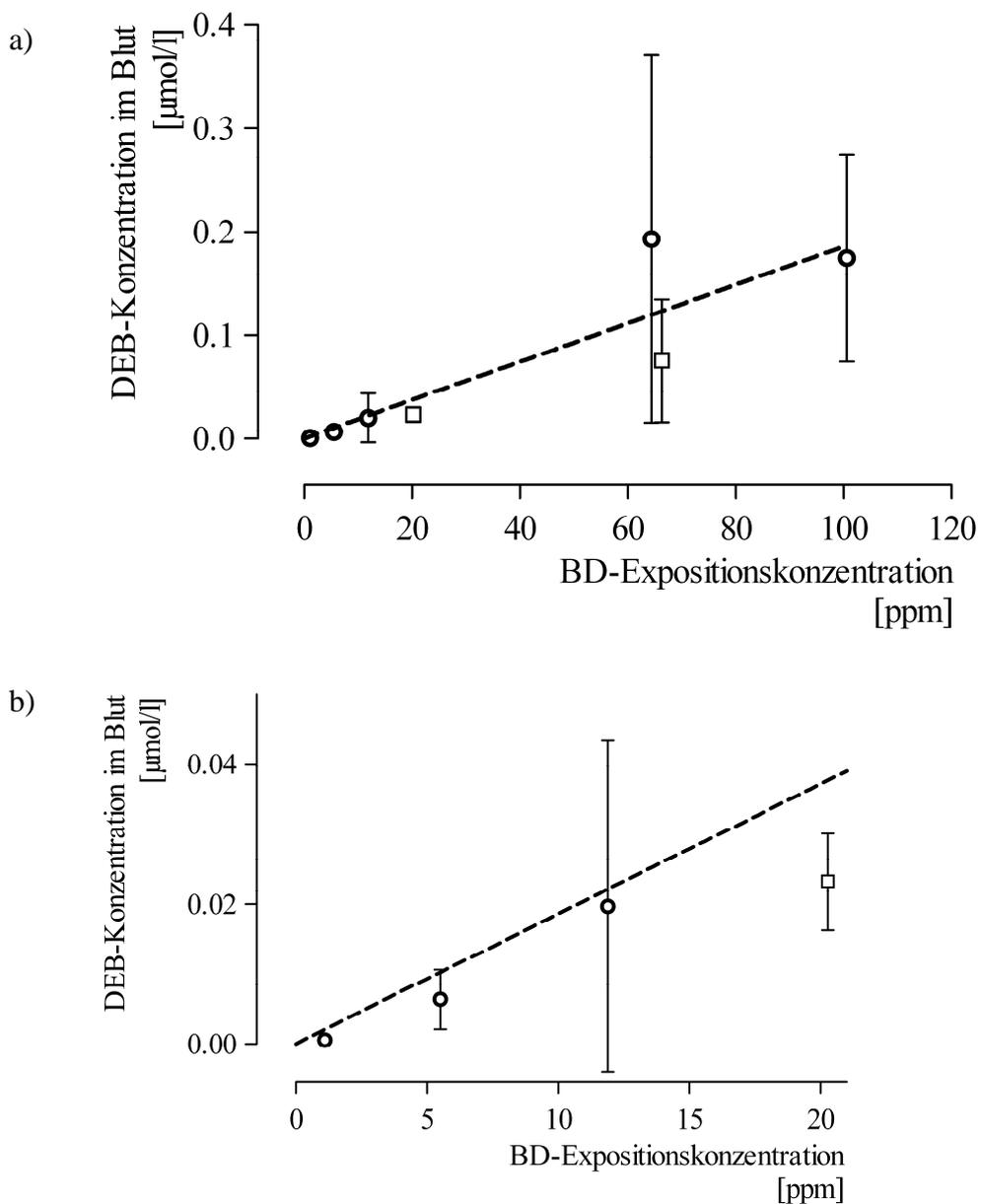


Abb. 11: DEB-Konzentration im Blut von je 3 Ratten in Abhängigkeit von der BD-Expositions-konzentration: a) 0 – 101 ppm BD, b) hervorgehoben 0 – 21 ppm BD
Symbole (je Mittelwert \pm Standardabweichung):
○ nach Exposition über 6 h (im Rahmen der eigenen Arbeit)
□ nach Exposition über 4 h (ältere Ergebnisse)
Linie: --- Regressionsgerade

3.2.2 1,2:3,4-Diepoxybutan im Blut der Mäuse

Unmittelbar nach den Expositionen der Mäuse wurde ihnen Blut entnommen (2.4.2.3). Diese Proben wurden, wie in 2.3.2 beschrieben, aufbereitet (Ausnahmen siehe unten) und die Konzentrationen an DEB im Blut der Tiere ermittelt. Tab. 5 zeigt die den jeweiligen BD-Expositionskonzentrationen entsprechenden DEB-Konzentrationen.

Die angegebenen DEB-Konzentrationen entsprechen dem Mittelwert der zwei je Probe durchgeführten LC/MS/MS-Messungen. Die je BD-Konzentration für die Proben 1 und 2 erhaltenen Werte zeigten eine gute Übereinstimmung; die maximale Abweichung von ihrem gemeinsamen Mittelwert betrug 9 %.

Tab. 5: Mittelwerte der BD-Expositionskonzentrationen sowie der DEB-Konzentrationen im Blut der Mäuse nach sechsständiger Exposition

BD-Expositionskonzentration (Mittelwert \pm Standardabweichung) [ppm]	DEB-Konzentration im Blut [μ mol/l]	
	Probe 1*	Probe 2*
1.0 \pm 0.12	0.010	0.012
6.4 \pm 0.45	0.048	0.046
11.2 \pm 1.0	0.062	0.059
20.4 \pm 1.5	0.12	0.12
63.5 \pm 4.9	0.33	0.29
109 \pm 5.9	0.42	0.38

* Je BD-Konzentration konnte Blut von 12 bzw. 11 gemeinsam exponierten Tieren gewonnen werden (3.1). Daraus wurden zwei Proben hergestellt, indem Blut von je 6 bzw. 5 Mäusen gepoolt wurde (2.4.2.3).

Ähnlich dem Vorgehen bei den Ratten (3.2.1) wurde aufgrund der niedrigeren Konzentrationen an DEB bei den Blutproben der gegen 1.0 und 6.4 ppm BD exponierten Mäuse, abweichend von der in 2.3.2.1 beschriebenen Aufbereitung, zur Derivatisierung 1 ml Plasma mit 1 ml Na-Diethyldithiocarbamat versetzt. Bei der Extraktion und den LC/MS/MS-Messungen gab es dagegen keine Abweichungen vom Standardvorgehen.

In Abb. 12 sind die DEB-Konzentrationen im Blut der Mäuse gegen die entsprechenden BD-Expositionskonzentrationen aufgetragen.

Auch hier sind zusätzlich zu den Ergebnissen der Messungen im Rahmen der eigenen Arbeit (Tab. 5, ●) zum Vergleich Datenpunkte älterer Messungen aus derselben Arbeitsgruppe mit anderen Methoden eingetragen. Zur Erhebung der mit □ wiedergegebenen Messwerte (nicht veröffentlicht) wurden die Mäuse über 4 h exponiert, zur Derivatisierung wurde 4-Benzylpiperidin verwendet; die Messungen erfolgten ebenfalls mittels LC/MS/MS. Die mit ▽ dargestellten Messpunkte (Filser *et al.*, 2007) wurden mit einem GC/MS ermittelt; dieses wurde unter Verwendung von Ammoniak als Reaktantgas im positiven Ionisierungsmodus betrieben. Die Tiere waren zuvor über 6 h exponiert gewesen.

Auf der Grundlage aller Datenpunkte wurden abschnittsweise Regressionsgeraden angepasst (2.5). Die Steigungen der Regressionsgeraden betragen im Bereich von 0 – 20 ppm 0.0062 ± 0.0001 ($\mu\text{mol/l}$)/ppm; zwischen 20 und 66 ppm 0.0041 ± 0.0004 ($\mu\text{mol/l}$)/ppm sowie im Abschnitt von 66 – 109 ppm 0.0020 ± 0.0005 ($\mu\text{mol/l}$)/ppm.

Die Analyse des Blutes der Kontrolltiere (2.4.2.4), dem kein DEB zugegeben wurde (2.3.2.1), ergab bei den relevanten Massenübergängen keine über den Hintergrund hinausgehenden Signalintensitäten.

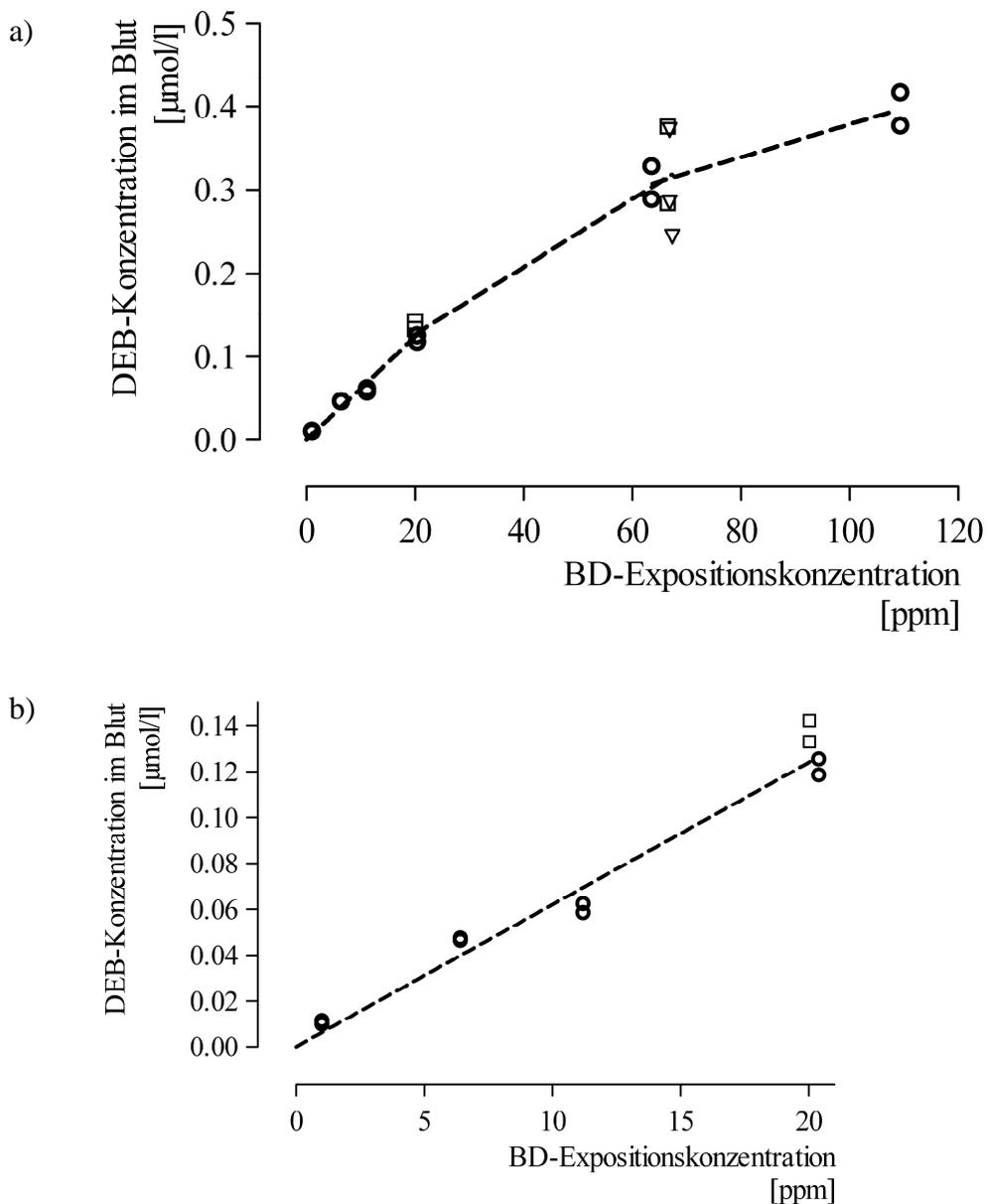


Abb. 12: DEB-Konzentration im Blut von Mäusen in Abhängigkeit von der BD-Expositions-konzentration: a) 0 – 109 ppm BD, b) hervorgehoben 0 – 21 ppm BD

Symbole:

- nach Exposition über 6 h, je gepooltes Blut von 6 bzw. 5 Mäusen (je Mittelwert zweier Messungen) (im Rahmen der eigenen Arbeit)
- nach Exposition über 4 h, je gepooltes Blut von 4 Mäusen (ältere Ergebnisse)
- ▽ nach Exposition über 6 h, je Blut von 3 Mäusen (je Mittelwert der individuellen Messungen) (Filser *et al.*, 2007)

Linie: --- Regressionsgerade

4 Diskussion

4.1 Analytische Methoden zur Bestimmung von 1,2:3,4-Diepoxybutan in Blut und Perfusat

Für die Bestimmung von DEB in Blut und Perfusat existieren mehrere Methoden. In der Arbeitsgruppe von Filser waren bereits vor Entwicklung der in dieser Arbeit verwendeten Methode zwei weitere entstanden (Filser *et al.*, 2010). Beide basieren auf der Extraktion von DEB mittels Dichlormethan. Im Fall der einen Methode erfolgt der Nachweis von DEB mit Hilfe eines GC/MS, das unter Verwendung von Ammoniak als Reaktantgas im positiven Ionisierungsmodus betrieben wird. In dem anderen Fall wird DEB nach der Extraktion mit 4-Benzylpiperidin derivatisiert und anschließend mittels LC/MS/MS detektiert. Dabei sind die Nachweisgrenzen mit 10 nmol/l Blut (GC/MS) (Filser *et al.*, 2007) bzw. 5 nmol/l Perfusat (LC/MS/MS) (Filser *et al.*, 2010) bei beiden Methoden sehr ähnlich. Demnach scheint die Extraktion der für die Nachweisgrenze limitierende Schritt zu sein.

Als amphiphiles Molekül ist DEB, insbesondere in niedrigen Konzentrationsbereichen, schwer zu extrahieren. Ein weiteres Problem im Fall der LC/MS/MS-Methode stellt die Anreicherung von DEB durch Verdampfung des Dichlormethans dar (Filser *et al.*, 2010). Bei sehr niedrigen DEB-Konzentrationen ist ein Verlust kaum zu vermeiden, da DEB bei Zimmertemperatur (25 °C) noch einen erheblichen Dampfdruck von 918 Pa aufweist (IARC, 2008). Deshalb wurden bei der Probenaufbereitung in der vorliegenden Arbeit dem Plasma nach dem Abzentrifugieren der Blutzellen Na-Diethyldithiocarbamat zugegeben und damit DEB sowie DEB-D6 zu nicht-flüchtigen, lipophilen Thioestern derivatisiert, die mittels Chloroform sicher extrahiert werden konnten (2.3.2.1). Dies führte zu einer sehr geringen Nachweisgrenze von 0.5 nmol/l Blut (2.3.2.3). Eine ähnliche Strategie wurde bereits früher zur Bestimmung der in der Chemotherapie eingesetzten 1,2:5,6-Dianhydro-Galactitol und seiner Derivate verwendet (Szókán *et al.*, 1987; Munger *et al.*, 1977).

Die Gruppe um Henderson sowie die Gruppe um Bond führten ebenfalls Experimente zur Quantifizierung von DEB im Blut gegen BD exponierter Ratten und Mäuse durch. Dabei wurden in beiden Gruppen die Epoxidmetaboliten mittels Dichlormethan ohne vorherige Derivatisierung extrahiert und anschließend massenspektrometrisch detektiert (Thornton-

Manning *et al.*, 1995a; Himmelstein *et al.*, 1994). Um die Isolierung der zu bestimmenden Moleküle zu verbessern, erfolgte in der Gruppe um Henderson vor der Extraktion eine kryogene Destillation der Proben (Thornton-Manning *et al.*, 1995a; Dahl *et al.*, 1984). Diese Art der Trennung der Substanzen ist allerdings sehr unspezifisch, da sie lediglich auf den Dampfdruckeigenschaften der zu isolierenden Stoffe beruht. Auch die von Thornton-Manning *et al.* sowie von Himmelstein *et al.* verwendeten massenspektrometrischen Verfahren sind deutlich unspezifischer als die Methode der vorliegenden Arbeit. Zum einen werden die großen Fragmente der nach Derivatisierung entstandenen Thioester spezifischer detektiert als die Moleküle der kleineren DEB bzw. DEB-D6. Zum anderen erzielt der *Multiple-Reaction-Monitoring*-Modus, in dem das *Triple-Quadrupol*-Massenspektrometer betrieben wurde (2.3.2.2), ein viel besseres Signal/Hintergrund-Verhältnis als der *Selected-Ion-Monitoring*-Modus der GC/MS-Methoden, was zu einer höheren Empfindlichkeit führt.

Himmelstein *et al.* gaben für DEB eine Nachweisgrenze von 130 nmol/l Blut an (Himmelstein *et al.*, 1994), während Thornton-Manning *et al.* ein Detektionslimit von 1.6 nmol/l Blut beschrieben (Thornton-Manning *et al.*, 1995a). Vor dem Hintergrund des Vergleichs der Methoden scheint das von Himmelstein *et al.* veröffentlichte Limit plausibel, das von Thornton-Manning *et al.* angegebene fraglich.

4.2 Vergleich von Daten aus der Literatur mit den hier erarbeiteten Ergebnissen

Für Expositionskonzentrationen unterhalb von 60 ppm BD gibt es bisher keine veröffentlichten Daten über Blutkonzentrationen von DEB bei Ratten und Mäusen (1.2.5).

Mit einer Nachweisgrenze von 130 nmol/l Blut war es Himmelstein *et al.* nicht möglich, bei männlichen Ratten nach Exposition gegen bis zu 1200 ppm BD über 6 h DEB im Blut zu detektieren (Himmelstein *et al.*, 1994). Unter Berücksichtigung der in der vorliegenden Arbeit gefundenen relativ breiten Streuung widerspricht dies den hier erhaltenen Ergebnissen nicht, die zeigten, dass die DEB-Konzentration im Blut von Ratten maximal 190 nmol/l erreichte (3.2.1).

Bei männlichen Mäusen lagen nach Expositionen gegen ca. 60 ppm BD die ermittelten DEB-Blutkonzentrationen bei mehreren Autoren in der Größenordnung der eigenen Ergebnisse von 0.33 bzw. 0.29 $\mu\text{mol/l}$ bei Exposition gegen 63.5 ppm BD (3.2.2): Filser *et al.*, 2007 detektierte 0.30 $\mu\text{mol DEB/l}$ Blut bei 67 ppm BD (6 h), von der Gruppe um Bond wurden 0.65 $\mu\text{mol/l}$ bei 71 ppm BD (6 h) bestimmt (Himmelstein *et al.*, 1994) und die Gruppe um Henderson ermittelte 0.204 $\mu\text{mol/l}$ bei 62.5 ppm BD (4 h) (Thornton-Manning *et al.*, 1995a).

Wie in 1.2.5 dargestellt können Hämoglobin-Addukte als Parameter für die systemische Belastung mit DEB herangezogen werden. Hierzu existieren Daten von Experimenten mit Ratten und Mäusen, in deren Blut nach Expositionen (6 h/Tag, 5 Tage/Woche, 10 Tage) gegen 3 und 62.5 ppm BD das für DEB charakteristische Hämoglobin-Addukt *N,N*-(2,3-dihydroxy-1,4-butadiyl)valin (PyrVal) gemessen wurde. Bei beiden Spezies nahmen die PyrVal-Adduktspiegel konzentrationsabhängig zu, wobei bei den Mäusen höhere Spiegel als bei den Ratten gefunden wurden (Boysen *et al.*, 2004). Die Ergebnisse sind in Tab. 6 den hier bei beiden Spezies bestimmten DEB-Blutkonzentrationen (3.2) gegenübergestellt. Die Verhältnisse der Adduktspiegel $\text{PyrVal}_{\text{Maus}}/\text{PyrVal}_{\text{Ratte}}$ und der Konzentrationen $\text{DEB}_{\text{Maus}}/\text{DEB}_{\text{Ratte}}$ sind jeweils ähnlich. Die Übereinstimmung wäre noch etwas besser, wenn die speziesspezifische Lebenszeit des Hämoglobins (Maus 40 Tage, Ratte 60 Tage; Ehrenberg und Törnqvist, 1995) für den Vergleich berücksichtigt würde. Es ist nämlich zu erwarten, dass die Hämoglobin-Addukte bis zum Ende der Hämoglobinlebenszeit zunehmen.

Tab. 6: Verhältnisse der Konzentrationen des für DEB spezifischen Hb-Adduktes PyrVal sowie der DEB-Blutkonzentrationen von Mäusen und Ratten in Abhängigkeit von der BD-Expositions-konzentration

BD-Expositions-konzentration [ppm]	PyrVal-Konzentration* [pmol/g Hb]		Verhältnis der PyrVal-Konzentrationen	Verhältnis der DEB-Blutkonzentrationen**
	PyrVal _{Maus}	PyrVal _{Ratte}	PyrVal _{Maus} /PyrVal _{Ratte}	DEB _{Maus} /DEB _{Ratte}
1				18.3
3	48.7	3.9	12.5	
6				7.3
10				3.0
60				1.6
62.5	130.4	38.3	3.4	
100				2.4

* Boysen *et al.*, 2004

** Daten der Messungen im Rahmen der eigenen Arbeit (3.2)

Im Rahmen einer neueren Untersuchung mit weiblichen und männlichen Tieren veröffentlichte dieselbe Arbeitsgruppe (Swenberg *et al.*, 2007) ein Verhältnis $\text{PyrVal}_{\text{Maus}}/\text{PyrVal}_{\text{Ratte}}$ von ca. 30 für Expositionen gegen 1.0 ppm BD (6 h/Tag, 5 Tage/Woche, 20 Tage). Dieser Wert entspricht dem 1.7-Fachen des hier bei der gleichen BD-Konzentration ermittelten Verhältnisses $\text{DEB}_{\text{Maus}}/\text{DEB}_{\text{Ratte}}$ (Tab. 6). Nach Exposition gegen 1.0, 6.25 und 62.5 ppm BD konnte bei keiner der beiden Spezies ein Geschlechtsunterschied in den PyrVal-Spiegeln gefunden werden (Swenberg *et al.*, 2007).

Aus Bestimmungen der PyrVal-Adduktspiegel im Blut gegen BD exponierter Mäuse, Ratten und Arbeiter schätzten Swenberg *et al.* für am Arbeitsplatz gegen 1 ppm BD exponierte Arbeiter PyrVal-Adduktspiegel ab, die unter einem Drittel derer bei gleich exponierten Ratten und unter einem Hundertstel derer bei Mäusen lägen (Swenberg *et al.*, 2007).

4.3 Mechanismus des speziesspezifischen Metabolismus von 1,3-Butadien

Der Vergleich der DEB-Blutkonzentrationen von Ratten (3.2.1) und Mäusen (3.2.2) nach Exposition gegen gleiche BD-Konzentrationen im Bereich zwischen 1 und 100 ppm ergab für Mäuse stets höhere Werte. Die Verhältnisse der Konzentrationen $DEB_{\text{Maus}}/DEB_{\text{Ratte}}$ lagen zwischen 18 (bei 1 ppm BD) und 2 (bei 100 ppm BD) (Tab. 6).

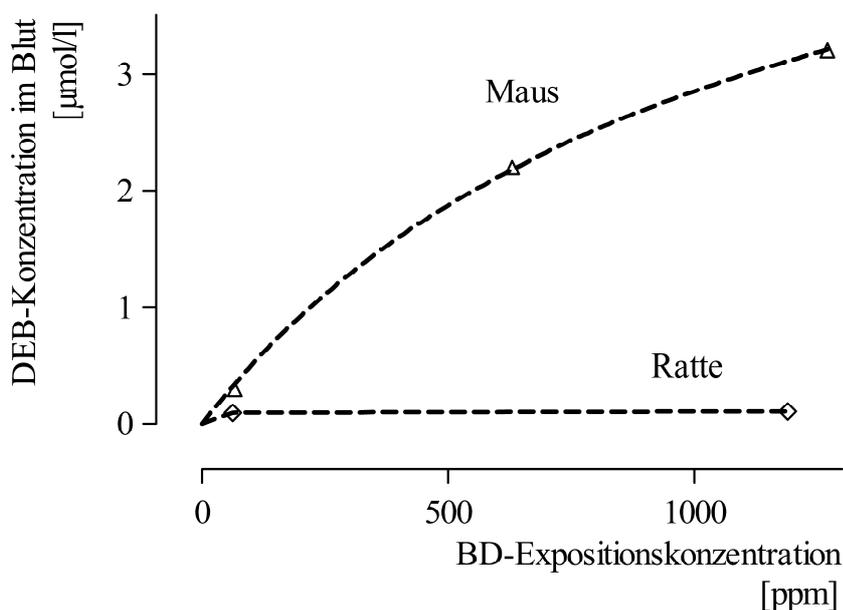


Abb. 13: DEB-Konzentration im Blut von Ratten und Mäusen in Abhängigkeit von der BD-Expositions-konzentration

Symbole:

- ◇ Ratten, Messungen mittels LC/MS/MS (ältere Ergebnisse)
- △ Mäuse, Messungen mittels GC/MS (Filser *et al.*, 2007)

Linien: --- Regressionsfunktionen

Bei Exposition gegen höhere BD-Konzentrationen (67 bis 1270 ppm) stiegen die Konzentrationen an DEB im Blut von Mäusen weiterhin in konkaver Kurve an (Filser *et al.*, 2007) (Abb. 13). Im Blut der Ratten nahm die DEB-Konzentration nur bis zu ca. 100 ppm BD linear zu (3.2.1); bei dieser BD-Konzentration erreichte sie einen Wert von ca. 0.1 µmol/l Blut. Bei höheren Konzentrationen an BD (bis 1190 ppm) zeigte sich keine weitere

DEB-Zunahme (nicht veröffentlichte Daten unserer Arbeitsgruppe). Damit nahm das Konzentrationsverhältnis $DEB_{\text{Maus}}/DEB_{\text{Ratte}}$ im Bereich höherer Expositionskonzentrationen wieder zu und erreichte bei etwa 1200 ppm BD einen Wert von 30.

Die verglichen mit Ratten höhere DEB-Blutkonzentration bei Mäusen kann zunächst mit speziesspezifischen Enzymaktivitäten erklärt werden. Mit BD als Substrat war die hepatische CYP-Aktivität bei der Maus höher als bei der Ratte, wie an Lebermikrosomen gezeigt wurde (Csanady *et al.*, 1992; Filser *et al.*, 1992). Außerdem war die EH-vermittelte EB-Hydrolyse zu B-diol in Mauslebermikrosomen langsamer als in Rattenlebermikrosomen (Csanady *et al.*, 1992; Kreuzer *et al.*, 1991), was darauf schließen lässt, dass der Maus vergleichsweise mehr EB zur Weiteroxidation zur Verfügung steht.

Um die speziesspezifische Produktion von DEB unter Berücksichtigung weiterer BD-Metaboliten aufzuklären, wurden umfangreiche *in-vitro*- und *in-vivo*-Untersuchungen vorgenommen. So wurden alle Epoxide sowie B-diol im Blut gegen BD exponierter Ratten und Mäuse bestimmt (Filser *et al.*, 2007). Außerdem wurden Experimente mit perfundierten Lebern von Ratten und Mäusen durchgeführt (Filser *et al.*, 2010; Filser *et al.*, 2001). Die Ergebnisse zeigten ein sehr komplexes Bild der Metabolitenentstehung. Filser *et al.*, 2007 spekulierte, dass BD bei beiden Spezies die Oxidation von EB zu DEB sowie von B-diol zu EBD mittels CYP kompetitiv inhibieren kann. Ein solcher Mechanismus könnte ursächlich für die Abflachung der Kurven in Abb. 13 sein. Die Unterschiede zwischen beiden Spezies hinsichtlich der BD-bedingten DEB-Belastung wurden zum Teil auf einen bei Ratten viel effektiveren „intrazellulären *first-pass*-Effekt“, der zu sofortiger Hydrolyse des *in situ* gebildeten EBs führe, zurückgeführt, zum Teil auf eine bei Mäusen ausgeprägtere *in-situ*-Oxidation von EB zu DEB (Filser *et al.*, 2010). Diese Vorgänge werden dadurch vorstellbar, dass die im Endoplasmatischen Retikulum vorliegenden Enzyme CYP und EH in unmittelbarer Nähe zueinander lokalisiert sein können (Filser *et al.*, 2001; Friedberg *et al.*, 1994; Etter *et al.*, 1991; Oesch und Daly, 1972).

5 Ausblick

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnisse sollen für die Entwicklung und Validierung eines toxikokinetischen Modells zur Abschätzung der durch Exposition gegen BD bedingten Belastung bei Versuchstier und Mensch verwendet werden. Hierfür werden allerdings noch die EBD-Konzentrationen im Blut gegen BD in niedrigen Konzentrationen exponierter Ratten und Mäuse benötigt. Zur Überprüfung der Modellberechnungen ist es wünschenswert, die *in-vivo*-Belastung durch die Epoxidmetaboliten bei unter Arbeitsplatzbedingungen gegen BD exponierten Menschen zu kennen. Die in dieser Arbeit verwendete Methodik scheint für eine Ermittlung der DEB-Blutkonzentration beim Menschen geeignet. Eine Verbesserung des Detektionslimits mag allerdings erforderlich sein, da hierbei mit deutlich niedrigeren Konzentrationen zu rechnen ist als bei den Tieren.

Für eine Abschätzung des durch Exposition gegen BD bedingten Kanzerogenitätsrisikos ist zusätzlich zur speziesspezifischen Belastung durch die Epoxidmetaboliten auch deren unterschiedliche mutagene Potenz zu berücksichtigen, die bei DEB am größten ist.

6 Zusammenfassung

1,3-Butadien (BD) ist eine wichtige Industriechemikalie, die in erster Linie für die Produktion von Kunststoffen verwendet wird. In Langzeitinhalationsstudien hat sich BD bei der Maus als starkes, bei der Ratte hingegen als schwaches Kanzerogen erwiesen. Auf Grund vorliegender Daten beurteilt die *International Agency for Research on Cancer* (IARC) der *World Health Organization* (WHO) die Substanz als karzinogen für den Menschen (Gruppe 1). Die kanzerogene Wirkung von BD wird auf die metabolisch gebildeten reaktiven Epoxide 1,2-Epoxy-3-buten (EB), 1,2:3,4-Diepoxibutan (DEB) und 3,4-Epoxy-1,2-butandiol (EBD) zurückgeführt. Von diesen hat das bifunktionelle DEB die größte mutagene Potenz. Als Maß für die systemische Belastung eignet sich die Blutkonzentration der Epoxidmetaboliten. Bisher wurden Daten zur Konzentration von DEB im Blut gegen BD exponierter Tiere nur für BD-Konzentrationen größer als ca. 60 ppm veröffentlicht. Deshalb hatte die vorliegende Arbeit zum Ziel, die Blutkonzentrationen von DEB bei Ratten und Mäusen nach Exposition gegen BD in niedrigen Konzentrationen bis hinab zu 1 ppm, wie sie am Arbeitsplatz vorkommen, zu bestimmen.

Es wurden je drei männliche CD-Ratten bzw. zwölf männliche B6C3F1-Mäuse über 6 h gegen konstante atmosphärische BD-Konzentrationen im Bereich von 1 bis 100 ppm exponiert. Zur Überwachung der BD-Konzentration wurde ein Gaschromatograph mit Flammenionisationsdetektor eingesetzt. Am Ende jeder Exposition wurden die Tiere getötet und ihnen Blut entnommen. Das in den Proben enthaltene DEB wurde mit Natrium-Diethyldithiocarbamat derivatisiert und anschließend mit Chloroform extrahiert. Zur Ermittlung der DEB-Konzentrationen wurden die Proben mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie aufgetrennt, die Detektion des Metaboliten erfolgte mittels Tandem-Massenspektrometrie. Durch Verwendung des *Multiple-Reaction-Monitoring*-Modus wurde eine hohe Empfindlichkeit erzielt. Das Detektionslimit lag bei 0.5 nmol/l und war somit deutlich niedriger als bisher veröffentlichte Nachweisgrenzen.

Bei beiden Spezies nahm die Blutkonzentration an DEB mit größer werdenden BD-Konzentrationen zu. Im Fall der Ratten zeigte sich eine lineare Abhängigkeit mit Werten zwischen 0.6 und 170 nmol/l. Bei den Mäusen stieg die DEB-Konzentration supralinear von

11 auf 400 nmol/l an. Nach Exposition gegen gleiche BD-Konzentrationen lagen die Werte der Mäuse stets über denen der Ratten. Diese Ergebnisse korrelieren gut mit den Resultaten aus Bestimmungen des für DEB charakteristischen Hämoglobin-Adduktes *N,N*-(2,3-dihydroxy-1,4-butadiyl)valin, das bisher als Maß für die systemische Belastung mit DEB nach Exposition gegen BD in niedrigen Konzentrationen herangezogen wurde.

Die für Ratte und Maus charakteristischen Belastungen durch DEB lassen sich durch die speziesspezifischen Eigenschaften der BD und seine Metaboliten umsetzenden Enzyme erklären. So ist bei der Maus die Aktivität der EB zu DEB metabolisierenden Cytochrom-P450-abhängigen Monooxygenasen höher als bei der Ratte; bei der Ratte wiederum ist die Epoxidhydrolase-vermittelte EB-Eliminierung schneller als bei der Maus.

Die Ergebnisse sollen für die Entwicklung und Validierung eines toxikokinetischen Modells verwendet werden, mit Hilfe dessen eine Abschätzung des durch Exposition gegen BD bedingten Kanzerogenitätsrisikos für den Menschen vorgenommen werden soll.

Literaturverzeichnis

ACGIH, American Conference of Governmental Industrial Hygienists

1,3-Butadiene: TLV Chemical Substances.

Cincinnati, Ohio, 2008

Adler, I.D., Cao, J., Filser, J.G., Gassner, P., Kessler, W., Kliesch, U., Neuhäuser-Klaus, A., Nüsse, M.

Mutagenicity of 1,3-butadiene inhalation in somatic and germinal cells of mice.

Mutat Res 309 (1994) 307-314

Adler, I.D., Kliesch, U., Nylund, L., Peltonen, K.

In vitro and in vivo mutagenicity of the butadiene metabolites butadiene diolepoxide, butadiene monoepoxide and diepoxybutane.

Mutagenesis 12 (1997) 339-345

Albertini, R.J., Sram, R.J., Vacek, P.M., Lynch, J., Nicklas, J.A., van Sittert, N.J., Boogaard, P.J., Henderson, R.F., Swenberg, J.A., Tates, A.D., Ward, J.B.J., Wright, M., Ammenheuser, M.M., Binkova, B., Blackwell, W., de Zwart, F.A., Krako, D., Krone, J., Megens, H., Musilova, P., Rajaska, G., Ranasinghe, A., Rosenblatt, J.I., Rössner, P., Rubes, J., Sullivan, L., Upton, P., Zwinderman, A.H.

Biomarkers in Czech workers exposed to 1,3-butadiene: a transitional epidemiologic study.

Res Rep Health Eff Inst 116 (2003) 1-141

Albertini, R.J., Sram, R.J., Vacek, P.M., Lynch, J., Rossner, P., Nicklas, J.A., McDonald, J.D., Boysen, G., Georgieva, N., Swenberg, J.A.

Molecular epidemiological studies in 1,3-butadiene exposed Czech workers: female-male comparisons.

Chem Biol Interact 166 (2007) 63-77

Ammenheuser, M.M., Bechtold, W.E., Abdel-Rahman, S.Z., Rosenblatt, J.I., Hastings-Smith, D.A., Ward, J.B.J.

Assessment of 1,3-butadiene exposure in polymer production workers using HPRT mutations in lymphocytes as a biomarker.

Environ Health Perspect 109 (2001) 1249-1255

Autio, K., Renzi, L., Catalan, J., Albrecht, O.E., Sorsa, M.

Induction of micronuclei in peripheral blood and bone marrow erythrocytes of rats and mice exposed to 1,3-butadiene by inhalation.

Mutat Res 309 (1994) 315-320

Bechtold, W.E., Strunk, M.R., Thornton-Manning, J.R., Henderson, R.F.

Analysis of butadiene, butadiene monoxide, and butadiene dioxide in blood by gas chromatography/gas chromatography/mass spectroscopy.

Chem Res Toxicol 8 (1995) 182-187

BMAS, Bundesministerium für Arbeit und Soziales
Bundesarbeitsblatt 10/2006.
Berlin, 2006

Bolt, H.M., Filser, J.G., Störmer, F.
Inhalation pharmacokinetics based on gas uptake studies. V. Comparative pharmacokinetics of ethylene and 1,3-butadiene in rats.
Arch Toxicol 55 (1984) 213-218

Bolt, H.M., Schmiedel, G., Filser, J.G., Rolzhäuser, H.P., Lieser, K., Wistuba, D., Schurig, V.
Biological Activation of 1,3-Butadiene to Vinyl Oxirane by Rat Liver Microsomes and Expiration of the Reactive Metabolite by Exposed Rats.
J Cancer Res Clin Oncol 106 (1983) 112-116

Bond, J.A., Dahl, A.R., Henderson, R.F., Dutcher, J.S., Mauderly, J.L., Birnbaum, L.S.
Species differences in the disposition of inhaled butadiene.
Toxicol Appl Pharmacol 84 (1986) 617-627

Boogaard, P.J., Bond, J.A.
The role of hydrolysis in the detoxification of 1,2:3,4-diepoxbutane by human, rat, and mouse liver and lung in vitro.
Toxicol Appl Pharmacol 141 (1996) 617-627

Boogaard, P.J., De Kloe, K.P., Booth, E.D., Watson, W.P.
DNA adducts in rats and mice following exposure to [4-¹⁴C]-1,2-epoxy-3-butene and to [2,3-¹⁴C]-1,3-butadiene.
Chem Biol Interact 148 (2004) 69-92

Boogaard, P.J., Van Sittert, N.J., Watson, W.P., De Kloe, K.P.
A novel DNA adduct, originating from 1,2-epoxy-3,4-butanediol, is the major DNA adduct after exposure to [2,3-(¹⁴C)]-1,3-butadiene, [4-(¹⁴C)]-1,2-epoxy-3-butene.
Chem Biol Interact 135-136 (2001) 687-693

Booth, E.D., Kilgour, J.D., Watson, W.P.
Dose responses for the formation of hemoglobin adducts and urinary metabolites in rats and mice exposed by inhalation to low concentrations of 1,3-[2,3-(¹⁴C)]-butadiene.
Chem Biol Interact 147 (2004) 213-232

Boysen, G., Georgieva, N.I., Upton, P.B., Jayaraj, K., Li, Y., Walker, V.E., Swenberg, J.A.
Analysis of diepoxide-specific cyclic N-terminal globin adducts in mice and rats after inhalation exposure to 1,3-butadiene.
Cancer Res 64 (2004) 8517-8520

Boysen, G., Georgieva, N.I., Upton, P.B., Walker, V.E., Swenberg, J.A.
N-terminal globin adducts as biomarkers for formation of butadiene derived epoxides.
Chem Biol Interact 166 (2007) 84-92

Cheng, X., Ruth, J.A.
A simplified methodology for quantitation of butadiene metabolites. Application to the study of 1,3-butadiene metabolism by rat liver microsomes.
Drug Metab Dispos 21 (1993) 121-124

CMAI, Chemical Marketing Associates International
Product focus. Butadiene.
Chem Week February 8 (2006) 26

Cochrane, J.E., Skopek, T.R.

Mutagenicity of butadiene and its epoxide metabolites: I. Mutagenic potential of 1,2-epoxybutene, 1,2,3,4-diepoxybutane and 3,4-epoxy-1,2-butanediol in cultured human lymphoblasts.

Carcinogenesis 15 (1994) 713-717

Csanady, G.A., Guengerich, F.P., Bond, J.A.

Comparison of the biotransformation of 1,3-butadiene and its metabolite, butadiene monoepoxide, by hepatic and pulmonary tissues from humans, rats and mice.

Carcinogenesis 13 (1992) 1143-1153

Csanady, G.A., Kreuzer, P.E., Baur, C., Filser, J.G.

A physiological toxicokinetic model for 1,3-butadiene in rodents and man: blood concentrations of 1,3-butadiene, its metabolically formed epoxides, and of haemoglobin adducts--relevance of glutathione depletion.

Toxicology 113 (1996) 300-305

Dahl, A.R., Benson, J.M., Hanson, R.L., Rothenberg, S.J.

The fractionation of environmental samples according to volatility by vacuum line-cryogenic distillation.

Am Ind Hyg Assoc J 45 (1984) 193-198

Delzell, E., Sathiakumar, N., Graff, J., Macaluso, M., Maldonado, G., Matthews, R.

An updated study of mortality among North American synthetic rubber industry workers.

Res Rep Health Eff Inst 132 (2006) 1-63

Delzell, E., Sathiakumar, N., Hovinga, M., Macaluso, M., Julian, J., Larson, R., Cole, P., Muir, D.C.

A follow-up study of synthetic rubber workers.

Toxicology 113 (1996) 182-189

Divine, B.J., Hartman, C.M.

A cohort mortality study among workers at a 1,3 butadiene facility.

Chem Biol Interact 135-136 (2001) 535-553

Ehrenberg, L., Törnqvist, M.

The research background for risk assessment of ethylene oxide: aspects of dose.

Mutat Res 330 (1995) 41-54

EPA, U.S. Environmental Protection Agency

Health Assessment of 1,3-Butadiene, EPA/600/P-98/001F.

National Center for Environmental Assessment, Washington, DC, 2002

Etter, H.U., Richter, C., Ohta, Y., Winterhalter, K.H., Sasabe, H., Kawato, S.

Rotation and interaction with epoxide hydrase of cytochrome P-450 in proteoliposomes.

J Biol Chem 266 (1991) 18600-18605

Filser, J.G.

The closed chamber technique--uptake, endogenous production, excretion, steady-state kinetics and rates of metabolism of gases and vapors.

Arch Toxicol 66 (1992) 1-10

Filser, J.G., Altthaler, B., Welter, H.F., Johanson, G.

Metabolism of 1,3-butadiene in microsomes from livers of mouse, rat and man.

N-S Arch Pharmacol 345 (1992) R31

Filser, J.G., Bhowmik, S., Faller, T.H., Hutzler, C., Kessler, W., Midpanon, S., Pütz, C., Schuster, A., Semder, B., Veereshwarayya, V., Csanády, G.A.

Quantitative investigation on the metabolism of 1,3-butadiene and of its oxidized metabolites in once-through perfused livers of mice and rats.

Toxicol Sci 114 (2010) 25-37

Filser, J.G., Bolt, H.M.

Inhalation pharmacokinetics based on gas uptake studies. VI. Comparative evaluation of ethylene oxide and butadiene monoxide as exhaled reactive metabolites of ethylene and 1,3-butadiene in rats.

Arch Toxicol 55 (1984) 219-223

Filser, J.G., Faller, T.H., Bhowmik, S., Schuster, A., Kessler, W., Pütz, C., Csanády, G.A.

First-pass metabolism of 1,3-butadiene in once-through perfused livers of rats and mice.

Chem Biol Interact 135-136 (2001) 249-265

Filser, J.G., Hutzler, C., Meischner, V., Veereshwarayya, V., Csanady, G.A.

Metabolism of 1,3-butadiene to toxicologically relevant metabolites in single-exposed mice and rats.

Chem Biol Interact 166 (2007) 93-103

Friedberg, T., Löllmann, B., Becker, R., Holler, R., Oesch, F.

The microsomal epoxide hydrolase has a single membrane signal anchor sequence which is dispensable for the catalytic activity of this protein.

Biochem J 303 (1994) 967-972

Goggin, M., Anderson, C., Park, S., Swenberg, J., Walker, V., Tretyakova, N.

Quantitative high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry analysis of the adenine-guanine cross-links of 1,2,3,4-diepoxybutane in tissues of butadiene-exposed B6C3F1 mice.

Chem Res Toxicol 21 (2008) 1163-1170

Graff, J.J., Sathiakumar, N., Macaluso, M., Maldonado, G., Matthews, R., Delzell, E.

Chemical exposures in the synthetic rubber industry and lymphohematopoietic cancer mortality.

J Occup Environ Med 47 (2005) 916-932

Greim, H., Deml, E.

Toxikologie.

Wiley-VCH, Weinheim, 1996

Grosse, Y., Baan, R., Straif, K., Secretan, B., El Ghissassi, F., Bouvard, V., Altieri, A., Coglianò, V.

Carcinogenicity of 1,3-butadiene, ethylene oxide, vinyl chloride, vinyl fluoride, and vinyl bromide.

Lancet Oncol 8 (2007) 679-680

Henderson, R.F., Barr, E.B., Belinsky, S.A., Benson, J.M., Hahn, F.F., Menache, M.G.

1,3-butadiene: cancer, mutations, and adducts. Part I: Carcinogenicity of 1,2,3,4-diepoxybutane.

Res Rep Health Eff Inst 92 (2000) 11-43

Himmelstein, M.W., Turner, M.J., Asgharian, B., Bond, J.A.

Comparison of blood concentrations of 1,3-butadiene and butadiene epoxides in mice and rats exposed to 1,3-butadiene by inhalation.

Carcinogenesis 15 (1994) 1479-1486

Hodgson, E., Mailman, R.B., Chambers, J.E., Dow, R.E. (Hrsg.)

Dictionary of Toxicology.

Macmillan Reference Ltd, London, 1998, 2. Auflage

Huff, J.E., Melnick, R.L., Solleveld, H.A., Haseman, J.K., Powers, M., Miller, R.A.

Multiple organ carcinogenicity of 1,3-butadiene in B6C3F1 mice after 60 weeks of inhalation exposure.

Science 227 (1985) 548-549

IARC, WHO, International Agency for Research on Cancer

Suppl. 2. Long term and short term screening Assays for carcinogens: a critical appraisal.

IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans.

IARC Press, Lyon, 1980

IARC, WHO, International Agency for Research on Cancer

1,3-Butadiene.

In: Occupational Exposures to Mists and Vapours from Strong Inorganic Acids; and other Industrial Chemicals. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans.

IARC Press, Lyon, 1992, Band 54, 237-285

IARC, WHO, International Agency for Research on Cancer

1,3-Butadiene.

In: Re-Evaluation of Some Organic Chemicals, Hydrazine and Hydrogen Peroxide. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans.

IARC Press, Lyon, 1999, Band 71, 109-225

IARC, WHO, International Agency for Research on Cancer (2006)

Preamble to the IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans.

(<http://monographs.iarc.fr/ENG/Preamble/CurrentPreamble.pdf>)

Stand: 02.08.2008

IARC, WHO, International Agency for Research on Cancer
1,3-Butadiene.

In: 1,3-Butadiene, Ethylene Oxide and Vinyl Halides (Vinyl Fluoride, Vinyl Chloride and Vinyl Bromide). IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. WHO Press, Genf, 2008, Band 97, 45-184

Johanson, G., Filser, J.G.

A physiologically based pharmacokinetic model for butadiene and its metabolite butadiene monoxide in rat and mouse and its significance for risk extrapolation.
Arch Toxicol 67 (1993) 151-163

Koc, H., Tretyakova, N.Y., Walker, V.E., Henderson, R.F., Swenberg, J.A.

Molecular dosimetry of N-7 guanine adduct formation in mice and rats exposed to 1,3-butadiene.
Chem Res Toxicol 12 (1999) 566-574

Kohn, M.C., Melnick, R.L.

Physiological modeling of butadiene disposition in mice and rats.
Chem Biol Interact 135-136 (2001) 285-301

Koivisto, P., Peltonen, K.

N7-guanine adducts of the epoxy metabolites of 1,3-butadiene in mice lung.
Chem Biol Interact 135-136 (2001) 363-372

Krause, R.J., Sharer, J.E., Elfarra, A.A.

Epoxide hydrolase-dependent metabolism of butadiene monoxide to 3-butene-1,2-diol in mouse, rat, and human liver.
Drug Metab Dispos 25 (1997) 1013-1015

Kreiling, R., Laib, R.J., Filser, J.G., Bolt, H.M.

Species differences in butadiene metabolism between mice and rats evaluated by inhalation pharmacokinetics.
Arch Toxicol 58 (1986) 235-238

Kreiling, R., Laib, R.J., Filser, J.G., Bolt, H.M.

Inhalation pharmacokinetics of 1,2-epoxybutene-3 reveal species differences between rats and mice sensitive to butadiene-induced carcinogenesis.
Arch Toxicol 61 (1987) 7-11

Kreuzer, P.E., Kessler, W., Welter, H.F., Baur, C., Filser, J.G.

Enzyme specific kinetics of 1,2-epoxybutene-3 in microsomes and cytosol from livers of mouse, rat, and man.
Arch Toxicol 65 (1991) 59-67

Lee, M.S., Faller, T.H., Kreuzer, P.E., Kessler, W., Csanady, G.A., Putz, C., Rios-Blanco, M.N., Pottenger, L.H., Segerback, D., Osterman-Golkar, S., Swenberg, J.A., Filser, J.G.

Propylene oxide in blood and soluble nonprotein thiols in nasal mucosa and other tissues of male Fischer 344/N rats exposed to propylene oxide vapors--relevance of glutathione depletion for propylene oxide-induced rat nasal tumors.
Toxicol Sci 83 (2005) 177-189

MAK, DFG, Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe
Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe - Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründungen von
MAK-Werten.

Wiley-VCH, Weinheim, 1998, 26. Lieferung

Malvoisin, E., Lhoest, G., Poncelet, F., Roberfroid, M., Mercier, M.

Identification and Quantitation of 1,2-epoxybutene-3 as the Primary Metabolite of 1,3-butadiene.

J Chromatogr 178 (1979) 419-425

Malvoisin, E., Roberfroid, M.

Hepatic microsomal metabolism of 1,3-butadiene.

Xenobiotica 12 (1982) 137-144

Melnick, R.L., Huff, J.E., Chou, B.J., Miller, R.A.

Carcinogenicity of 1,3-butadiene in C57BL/6 x C3H F1 mice at low exposure concentrations.

Cancer Res 50 (1990) 6592-6599

Meng, Q., Henderson, R.F., Chen, T., Heflich, R.H., Walker, D.M., Bauer, M.J., Reilly, A.A., Walker, V.E.

Mutagenicity of 1,3-butadiene at the Hprt locus of T-lymphocytes following inhalation exposures of female mice and rats.

Mutat Res 429 (1999) 107-125

Meng, Q., Walker, D.M., McDonald, J.D., Henderson, R.F., Carter, M.M., Cook, D.L.J., McCash, C.L., Torres, S.M., Bauer, M.J., Seilkop, S.K., Upton, P.B., Georgieva, N.I., Boysen, G., Swenberg, J.A., Walker, V.E.

Age-, gender-, and species-dependent mutagenicity in T cells of mice and rats exposed by inhalation to 1,3-butadiene.

Chem Biol Interact 166 (2007) 121-131

Morrow, N.L.

The Industrial Production and Use of 1,3-Butadiene.

Environ Health Perspect 86 (1990) 7-8

Munger, D., Sternson, L.A., Repta, A.J., Higuchi, T.

High-performance liquid chromatographic analysis of dianhydrogalactitol in plasma by derivatization with sodium diethyldithiocarbamate.

J Chromatogr 143 (1977) 375-382

Murg, M.N., Schuler, M., Eastmond, D.A.

Evaluation of micronuclei and chromosomal breakage in the 1cen-q12 region by the butadiene metabolites epoxybutene and diepoxybutane in cultured human lymphocytes.

Mutagenesis 14 (1999) 541-546

Nauhaus, S.K., Fennell, T.R., Asgharian, B., Bond, J.A., Sumner, S.C.

Characterization of urinary metabolites from Sprague-Dawley rats and B6C3F1 mice exposed to [1,2,3,4-¹³C]butadiene.

Chem Res Toxicol 9 (1996) 764-773

- NTP, National Toxicology Program
Toxicology and Carcinogenesis Studies of 1,3-Butadiene (CAS No. 106-99-0) in B6C3F1 Mice (Inhalation Studies).
Natl Toxicol Program Tech Rep Ser 288 (1984) 1-111
- NTP, National Toxicology Program
Toxicology and Carcinogenesis Studies of 1,3-Butadiene (CAS No. 106-99-0) in B6C3F1 Mice (Inhalation Studies).
Natl Toxicol Program Tech Rep Ser 434 (1993) 1-389
- Oesch, F., Daly, J.
Conversion of naphthalene to trans-naphthalene dihydrodiol: evidence for the presence of a coupled aryl monooxygenase-epoxide hydrase system in hepatic microsomes.
Biochem Biophys Res Commun 46 (1972) 1713-1720
- Olds, R.J., Olds, J.R.
Farbatlas der Anatomie der Ratte: Sektionsanleitung.
Schober Verlags-GmbH, Hengersberg, 1984
- Osterman-Golkar, S.M., Moss, O., James, A., Bryant, M.S., Turner, M., Bond, J.A.
Epoxybutene-hemoglobin adducts in rats and mice: dose response for formation and persistence during and following long-term low-level exposure to butadiene.
Toxicol Appl Pharmacol 150 (1998) 166-173
- Owen, P.E., Glaister, J.R.
Inhalation toxicity and carcinogenicity of 1,3-butadiene in Sprague-Dawley rats.
Environ Health Perspect 86 (1990) 19-25
- Owen, P.E., Glaister, J.R., Gaunt, I.F., Pullinger, D.H.
Inhalation toxicity studies with 1,3-butadiene. 3. Two year toxicity/carcinogenicity study in rats.
Am Ind Hyg Assoc J 48 (1987) 407-413
- Plummer, J.L., Smith, B.R., Sies, H., Bend, J.R.
Chemical depletion of glutathione in vivo.
Methods Enzymol 77 (1981) 50-59
- Popesko, P., Rajtová, V., Horák, J.
A colour atlas of the anatomy of small laboratory animals.
Wolfe Publishing Ltd, London, 1992, Band 2
- Sabourin, P.J., Burka, L.T., Bechtold, W.E., Dahl, A.R., Hoover, M.D., Chang, I.Y., Henderson, R.F.
Species differences in urinary butadiene metabolites; identification of 1,2-dihydroxy-4-(N-acetylcysteinyl)butane, a novel metabolite of butadiene.
Carcinogenesis 13 (1992) 1633-1638
- Sachs, L.
Angewandte Statistik - Anwendung statistischer Methoden.
Springer Verlag, Berlin, 1997, 8. Auflage

- Sathiakumar, N., Graff, J., Macaluso, M., Maldonado, G., Matthews, R., Delzell, E.
An updated study of mortality among North American synthetic rubber industry workers.
Occup Environ Med 62 (2005) 822-829
- Schmidt, U., Loeser, E.
Species differences in the formation of butadiene monoxide from 1,3-butadiene.
Arch Toxicol 57 (1985) 222-225
- Seaton, M.J., Follansbee, M.H., Bond, J.A.
Oxidation of 1,2-epoxy-3-butene to 1,2:3,4-diepoxybutane by cDNA-expressed human cytochromes P450 2E1 and 3A4 and human, mouse and rat liver microsomes.
Carcinogenesis 16 (1995) 2287-2293
- Sharer, J.E., Duescher, R.J., Elfarrar, A.A.
Species and tissue differences in the microsomal oxidation of 1,3-butadiene and the glutathione conjugation of butadiene monoxide in mice and rats.
Drug Metab Dispos 20 (1992) 658-664
- Sram, R.J., Rössner, P., Peltonen, K., Podrazilova, K., Mrackova, G., Demopoulos, N.A., Stephanou, G., Vlachodimitropoulos, D., Darroudi, F., Tate, A.D.
Chromosomal aberrations, sister-chromatid exchanges, cells with high frequency of SCE, micronuclei and comet assay parameters in 1, 3-butadiene-exposed workers.
Mutat Res 419 (1998) 145-154
- Sweeney, L.M., Schlosser, P.M., Medinsky, M.A., Bond, J.A.
Physiologically based pharmacokinetic modeling of 1,3-butadiene, 1,2-epoxy-3-butene, and 1,2:3,4-diepoxybutane toxicokinetics in mice and rats.
Carcinogenesis 18 (1997) 611-625
- Swenberg, J.A., Boysen, G., Georgieva, N., Bird, M.G., Lewis, R.J.
Future directions in butadiene risk assessment and the role of cross-species internal dosimetry.
Chem Biol Interact 166 (2007) 78-83
- Swenberg, J.A., Koc, H., Upton, P.B., Georgieva, N., Ranasinghe, A., Walker, V.E., Henderson, R.
Using DNA and hemoglobin adducts to improve the risk assessment of butadiene.
Chem Biol Interact 135-136 (2001) 387-403
- Szókán, G., Elekes, I., Táborhegyi, E., Csanádi, G., Bencze, J.
RP-HPLC assay for 1,2-5,6-dianhydro-3,4-disuccinyl-galactitol and its metabolites in blood plasma and liver.
Chromatographia 24 (1987) 839-841
- Thornton-Manning, J.R., Dahl, A.R., Allen, M.L., Bechtold, W.E., Griffith Jr., W.C., Henderson, R.F.
Disposition of butadiene epoxides in Sprague-Dawley rats following exposures to 8000 ppm 1,3-butadiene: comparisons with tissue epoxide concentrations following low-level exposures.
Toxicol Sci 41 (1998) 167-173

Thornton-Manning, J.R., Dahl, A.R., Bechtold, W.E., Griffith Jr., W.C., Henderson, R.F.
Disposition of butadiene monoepoxide and butadiene diepoxide in various tissues of rats and mice following a low-level inhalation exposure to 1,3-butadiene.
Carcinogenesis 16 (1995a) 1723-1731

Thornton-Manning, J.R., Dahl, A.R., Bechtold, W.E., Griffith Jr., W.C., Henderson, R.F.
Comparison of the disposition of butadiene epoxides in Sprague-Dawley rats and B6C3F1 mice following a single and repeated exposures to 1,3-butadiene via inhalation.
Toxicology 123 (1997) 125-134

Thornton-Manning, J.R., Dahl, A.R., Bechtold, W.E., Griffith Jr., W.C., Pei, L., Henderson, R.F.
Gender differences in the metabolism of 1,3-butadiene in Sprague-Dawley rats following a low level inhalation exposure.
Carcinogenesis 16 (1995b) 2875-2878

Tretyakova, N.Y., Chiang, S.Y., Walker, V.E., Swenberg, J.A.
Quantitative analysis of 1,3-butadiene-induced DNA adducts in vivo and in vitro using liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry.
J Mass Spectrom 33 (1998) 363-376

Valentine, J.L., Boogaard, P.J., Sweeney, L.M., Turner, M.J., Bond, J.A., Medinsky, M.A.
Disposition of butadiene epoxides in Sprague-Dawley rats.
Chem Biol Interact 104 (1997) 103-115

Van Duuren, B.L., Langseth, L., Orris, L., Teebor, G., Nelson, N., Kuschner, M.
Carcinogenicity of epoxides, lactones, and peroxy compounds. IV. Tumor response in epithelial and connective tissue in mice and rats.
J Natl Cancer Inst 37 (1966) 825-838

Van Duuren, B.L., Nelson, N., Orris, L., Palmes, E.D., Schmitt, F.L.
Carcinogenicity of epoxides, lactones, and peroxy compounds.
J Natl Cancer Inst 31 (1963) 41-55

Van Duuren, B.L., Orris, L., Nelson, N.
Carcinogenicity of epoxides, lactones, and peroxy compounds. II.
J Natl Cancer Inst 35 (1965) 707-717

Ward, E.M., Fajen, J.M., Ruder, A.M., Rinsky, R.A., Halperin, W.E., Fessler-Flesch, C.A.
Mortality study of workers in 1,3-butadiene production units identified from a chemical workers cohort.
Environ Health Perspect 103 (1995) 598-603

Ward, E.M., Fajen, J.M., Ruder, A.M., Rinsky, R.A., Halperin, W.E., Fessler-Flesch, C.A.
Mortality study of workers employed in 1,3-butadiene production units identified from a large chemical workers cohort.
Toxicology 113 (1996) 157-168

Ward, J.B.J., Abdel-Rahman, S.Z., Henderson, R.F., Stock, T.H., Morandi, M., Rosenblatt, J.I., Ammenheuser, M.M.

Assessment of butadiene exposure in synthetic rubber manufacturing workers in Texas using frequencies of hprt mutant lymphocytes as a biomarker.

Chem Biol Interact 135-136 (2001) 465-483

Weast, R.C. (Hrsg.)

CRC Handbook of Chemistry and Physics.

The Chemical Rubber Co., Cleveland, Ohio, 1970, 50. Auflage

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. J. G. Filser sehr herzlich für die Aufgabenstellung, die wissenschaftliche Anleitung, die engagierte Unterstützung bei der Auswertung und Diskussion der Ergebnisse sowie die kritische Korrektur bei der Erstellung des Manuskriptes. Explizit möchte ich ihm für die vielen anregenden und anspruchsvollen Gespräche danken.

Ganz besonders bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Gy. A. Csanády, der mich über die gesamte Zeit und in allen Belangen meiner Promotion mit sehr großem Einsatz und auf hervorragende Weise wissenschaftlich betreut und begleitet hat. Ich möchte ihm ausdrücklich für die Begeisterung, die er mir an der exakten Naturwissenschaft vermittelt hat, Dank sagen.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. H. Greim. Als mein Mentor im Programm Erfahrene Wege in die Forschung hat er mich stets gemäß diesem Motto auf meinem Weg begleitet. Ihm verdanke ich den initialen Kontakt zur Arbeitsgruppe Toxikokinetik und damit letztlich meine Doktorandenstelle.

Bei Frau B. Semder, Herrn Ch. Pütz und Frau M. Kaiser bedanke ich mich für die ausgezeichnete technische Unterstützung.

Ihnen und allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Toxikokinetik möchte ich aber ebenso Dank sagen für die angenehme und freundschaftliche Atmosphäre sowie die vielen wissenschaftlichen und nichtwissenschaftlichen Gespräche.

Von ganzem Herzen danke ich meiner Familie, die mir meinen bisherigen Werdegang ermöglicht und mir immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat, sowie meiner Verlobten Anna, die den Weg zu meiner Promotion durch alle Höhen und Tiefen liebevoll, motivierend und stets Zuversicht schenkend mit mir gegangen ist. Ihr sowie meinem Vater und meiner Schwester danke ich zudem für die Durchsicht des Manuskriptes.

Dem *Olefins Panel of the American Chemistry Council* gilt mein Dank für die finanzielle Förderung der Studie.

Lebenslauf

Martin Bernhard Riester

geboren am 12.10.1982 in Lindenberg i. Allgäu

Schulbildung

1989 – 1993 Grundschule Lindenberg

1993 – 2002 Gymnasium Lindenberg, Abitur (Note 1.0)

Zivildienst

2002 – 2003 Rettungsdienst des Bayerischen Roten Kreuzes, Lindenberg

Studium der Humanmedizin

2003 – 2010 Ludwig-Maximilians-Universität und Technische Universität München
Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note 1.5)

Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note 1.5)

2010 Approbation als Arzt

Studium der Philosophie

2005 – 2006 Hochschule für Philosophie, Philosophische Fakultät SJ, München

Promotion

2007 – 2012 Institut für Toxikologie und Umwelthygiene

(Doktorvater Prof. Dr. J. G. Filser)

Technische Universität München, Helmholtz Zentrum München

Stipendien

2003 – 2010 Stipendium der Bayerischen Begabtenförderung

2009 – 2010 Austauschprogramm im Rahmen des Praktischen Jahres

Weill Cornell Medical College, Cornell University, New York, NY, USA

Berufliche Tätigkeit

2011 – heute Assistenzarzt

Abteilung Kinderkardiologie und Pädiatrische Intensivmedizin

(Leiter Prof. Dr. Dr. h.c. H. Netz)

Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München, Campus Großhadern