

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Fremdstoffmetabolismus	1
1.2. Die Glutathion S-Transferasen	2
1.2.1. Die Katalysereaktion der Glutathion S-Transferasen	2
1.2.2. Einteilung der GST	6
1.3. Die Glutathion S-Transferase Klasse θ	6
1.4. Die GSTT1	7
1.4.1. Die erythrozytäre GSTT1	8
1.5. Metabolismus des Halothans	9
1.6. Aufgabenstellung	12
2. Material und Methoden	13
2.1. Allgemeines	13
2.2. Instrumentelle Analytik	13
2.3. Synthesen	15
2.3.1. Synthese der Glutathionkonjugate	16
2.3.2. Synthese der Cysteinikonjugate	19
2.3.3. Synthese der Mercaptursäuren	22
2.4. Mutagenitätstests nach Ames	26
2.4.1. Geräte	26
2.4.2. Lösungen, Medien und Agarplatten	27
2.4.3. Autoklavierbedingungen	28
2.4.4. Bestimmung der Proteinkonzentration der Leber- und Nierenfraktionen	28
2.4.5. Anzucht und Selektion der Stammkulturen	28
2.4.6. Überprüfung der Teststämme	28
2.4.7. Versuchsdurchführung	29
2.4.8. Bestimmung der Überlebensrate	30
2.5. Untersuchung der enzymatischen Glutathionkonjugat-Bildung verschiedener Haloalkene	30
2.5.1. Herstellung der Erythrozytenlysat- und Lebercytosol-Proben	30
2.5.1.1. Herstellung von Erythrozytenlysat	30

2.5.1.2.	Humanlebercytosol	31
2.5.1.3.	Herstellung von Ratten- bzw. Mauslebercytosol	31
2.5.2.	Bestimmung der Genotypen der Spender der Humanlebercytosol- und Blut-Proben	31
2.5.3.	Bestimmung der Proteinkonzentration der Cytosol-Proben	31
2.5.4.	Inkubationen	31
2.5.4.1.	Lebercytosol-Inkubationen	31
2.5.4.2.	Erythrozytenlysat-Inkubationen	32
2.5.5.	Kalibrierungen von <i>S</i> -(1,2-Dichlor-3,3,3-trifluor-1-propenyl)glutathion (DCTFGP, 21) und <i>S</i> -(2,2-Dichlor-1-fluorvinyl)glutathion (DCFVG, 23) in verschiedenen Matrices	33
2.5.6.	HPLC-Messungen und Auswertung	33
2.5.7.	Glutathionkonjugat-Messungen mittels ¹⁹ F-NMR-Spektroskopie	34
2.5.7.1.	¹⁹ F-NMR-Messungen von inkubiertem Mauslebercytosol	34
2.5.7.2.	Empfindlichkeitsbestimmung	35
2.5.7.3.	¹⁹ F-NMR-Messungen von inkubierten Erythrozytenlysat-Proben	35
2.6.	Untersuchungen des Haliothanmetaboliten <i>N</i>-Acetyl-<i>S</i>-(2-chlor-1-fluor-vinyl)-L-cystein (<i>N</i>-Ac-CFVC, 20) in menschlichem Urin	35
2.6.1.	Patientenproben	35
2.6.1.1.	Urin-Proben	36
2.6.1.2.	Serumproben	36
2.6.1.3.	DNA-Isolierung	36
2.6.2.	Bestimmung des Urin-Kreatiningehaltes	36
2.6.3.	Bestimmung des Bromid-Gehaltes der Serumproben	36
2.6.4.	Bestimmung des Genotyps der Patienten	36
2.6.5.	Bestimmung von <i>N</i> -Acetyl- <i>S</i> -(2-chlor-1-fluor-vinyl)-L-cystein (<i>N</i> -Ac-CFVC, 20) in menschlichem Urin	37
2.6.5.1.	Kalibrierung von <i>N</i> -Acetyl- <i>S</i> -(2-chlor-1-fluor-vinyl)-L-cystein (<i>N</i> -Ac-CFVC, 20) in menschlichem Urin	37
2.6.5.2.	Behandlung der Patienten-Urinproben	37
2.6.5.3.	HPLC/ESI/MS-Messungen	37
3. Ergebnisse		39
3.1. Synthesen		39
3.1.1.	Synthese der Glutathionkonjugate	39
3.1.2.	Synthese der Cysteinkonjugate	41
3.1.3.	Synthese der Merkaptursäuren	44

3.2.	Mutagenitätstestung nach Ames	46
3.2.1.	Positivkontrollen	46
3.2.1.1.	S-(1,2,2-Trichlorvinyl)glutathion	46
3.2.1.1.1.	Vorversuche	46
3.2.1.1.2.	Ames-Test	48
3.2.1.2.	S-(1,2,2-Trichlorvinyl)-L-cystein	48
3.2.2.	Mutagenitätstestung der Glutathionkonjugate	50
3.2.3.	Mutagenitätstestung der Cysteinkonjugate	51
3.3.	Untersuchung der enzymatischen Glutathionkonjugat-Bildung verschiedener Haloalkene	56
3.3.1.	Kalibrierungen von S-(1,2-Dichlor-3,3,3-trifluor-1-propenyl)- glutathion (DCTFPG, 21) und S-(2,2-Dichlor-1-fluorvinyl)glutathion (DCFVG, 23) in verschiedenen Matrices	56
3.3.1.1.	Kalibrierungen in 50%igem Methanol, Ratten- und Maus-Lebercytosol- Proben	56
3.3.1.2.	Kalibrierungen in Anwesenheit von Erythrozytenlysat	58
3.3.2.	Inkubationen in Human-, Ratten- und Maus-Lebercytosol-Proben	60
3.3.2.1.	Inkubationen mit 1,1,2-Trichlor-3,3,3-trifluor-1-propen (34) und Trichlor- fluorethen (36)	60
3.3.2.2.	Inkubationen von Human-Lebercytosol mit Trichlorethen (35) und Tetra- chlorethen (37)	65
3.3.3.	¹⁹ F-NMR-Messungen von Maus- und Ratten-Lebercytosol-Inkubationen mit 1,1,2-Trichlor-3,3,3-trifluor-1-propen (TCTFP, 34)	65
3.3.4.	Inkubationen mit Erythrozytenlysat	67
3.3.4.1.	Vorversuche	67
3.3.4.2.	Inkubationen mit Erythrozytenlysat GSTT1-positiver und -negativer Personen und 1,1,2-Trichlor-3,3,3-trifluor-1-propen (TCTFP, 34)	69
3.3.5.	¹⁹ F-NMR-Messungen von Erythrozytenlysat-Inkubationen am Beispiel des 1,1,2-Trichlor-3,3,3-trifluor-1-propen (TCTFP, 34)	71
3.3.5.1.	Empfindlichkeitsmessungen	71
3.3.5.2.	¹⁹ F-NMR-Messungen von inkubierten Erythrozytenlysat-Lösungen	71
3.4.	Untersuchungen des Halothanmetaboliten N-Acetyl-S-(2-chlor- 1-fluor-vinyl)-L-cystein (N-Ac-CFVC, 20) in menschlichem Urin	72
3.4.1.	Patientendaten	72
3.4.2.	Urin-Kreatininwerte	72
3.4.3.	Serum-Bromidwerte	73
3.4.4.	GSTT1- und GSTM1-Genotyp der Patienten	73
3.4.5.	Bestimmung von N-Acetyl-S-(2-chlor-1-fluor-vinyl)-L-cystein (N-Ac-CFVC, 20) in menschlichem Urin	75

3.4.5.1.	Entwicklung der Extraktions- und der HPLC/ESI/MS-Methode	75
3.4.5.2.	Kalibrierung von <i>N</i> -Acetyl-S-(2-chlor-1-fluor-vinyl)-L-cystein (<i>N</i> -Ac-CFVC, 20) in menschlichem Urin	76
3.4.5.3.	Messung der Patienten-Urinproben	77
4.	Diskussion	82
4.1.	Synthese der Referenzsubstanzen und endogene Biosynthese	83
4.2.	Untersuchungen zur biologischen Bedeutung der Glutathion- und Cystein-Konjugatbildung der fluorierten Haloalkene	85
4.2.1.	Mutagenität der Glutathion- und Cystein-Konjugate	86
4.3.	Cytotoxizität der Cystein-Konjugate an Rattennierenschnitten	88
4.4.	Untersuchung der enzymatischen Glutathionkonjugat-Bildung verschiedener Haloalkene	90
4.5.	Untersuchungen des Halothanmetaboliten 2-Chlor-1,1-difluor ethen (15) im Menschen	94
5.	Zusammenfassung	99
6.	Literaturverzeichnis	103
7.	Anhang: Spektren	113