

**Belastung der isolierten, perfundierten und
ventilierten Lunge von Maus und Ratte mit
Styrol-7,8-oxid bei Exposition gegen
Styroidampf**

Dipl.-Biol. Univ. Christiana Hofmann
aus
Burghausen

2009

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Phytopathologie

Belastung der isolierten, perfundierten und ventilierten Lunge von Maus und Ratte mit Styrol-7,8-oxid bei Exposition gegen Styroidampf

Christiana Hofmann

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum
Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. M. Schemann
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. E. F. Elstner (em.)
2. apl. Prof. Dr. J. G. Filser
3. Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. H. Parlar

Die Dissertation wurde am 06.10.2009 bei der Technischen Universität
München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum
Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 30.06.2010
angenommen.

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von April 2001 bis September 2009 (Elternzeit seit 10/2004) unter Anleitung von Herrn Prof. J.G. Filser im Institut für Toxikologie des Helmholtz Zentrum, Neuherberg.

Teile der Arbeit sind publiziert:

Hofmann C., Pütz C., Semder B., Faller T.H., Csanády G.A., Filser J.G.:
Styrene-7,8-oxide burden in ventilated, perfused lungs of mice and rats
exposed to vaporous styrene
Toxicology Sciences, 90, 39-48 (2006)

Herrn Prof. Dr. J.G. Filser danke ich besonders herzlich für die interessante Aufgabenstellung, das stete Interesse am Fortgang der Arbeit und für viele anregende Diskussionen.

Herrn Prof. Dr. E.F. Elstner danke ich sehr für die Bereitschaft diese Arbeit an der Fakultät für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zu vertreten und für seine große Hilfsbereitschaft bei der Fertigstellung der Arbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. G. Csanády bedanke ich mich für die Unterstützung bei mathematischen Fragestellungen.

Bei Dr. T. Faller und Dr. D. Klein bedanke ich mich ganz herzlich für zahlreiche und fruchtbare Diskussionen.

Bei Herrn C. Pütz möchte ich mich ganz besonders für die sehr hilfreiche technische Unterstützung bei den Perfusionsversuchen bedanken.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe "Toxikokinetik", im Besonderen Brigitte Semder und Eva Erbach, danke ich für die ständige Hilfsbereitschaft und die freundliche Atmosphäre.

Ich möchte meinen Eltern für ihre uneingeschränkte Unterstützung herzlich danken, durch die sie mir mein Studium und auch diese Arbeit ermöglicht haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Mann und meinen beiden Kindern, die mich auf ganz besondere Weise unterstützt haben.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Problemstellung.....	1
1.2	Eigenschaften, Vorkommen, Herstellung, Verwendung und Expositionsbedingungen von Styrol.....	3
1.3	Metabolismus von Styrol.....	5
1.4	Mutagenität und Tumorigenität von Styrol und Styrol-7,8-oxid.....	9
1.5	Überlegungen zum Wirkmechanismus der Tumorigenität von Styrol.....	11
1.6	Aufgabenstellung.....	17
2	Material und Methoden.....	18
2.1	Chemikalien.....	18
2.2	Geräte, Verbrauchsmaterialien und Software.....	19
2.3	Versuchstiere.....	22
2.4	Perfusat.....	23
2.5	Apparaturen für die isolierte, perfundierte und ventilierte Maus- und Rattenlunge.....	23
2.6	Durchführung der Expositionsversuche.....	31
2.6.1	Präparation der Lungen von Maus und Ratte.....	31
2.6.2	Expositionsbedingungen.....	32
2.7	Bestimmung von Styrol-7,8-oxid im Lungengewebe.....	33
2.7.1	Physikalischer Hintergrund.....	33
2.7.2	Verteilungskoeffizient Lunge zu Perfusat von Styrol-7,8-oxid.....	34
2.8	Umrechnung der ex vivo ermittelten Styrol-7,8-oxid-Belastungen auf in vivo vorherrschende Lungenperfusions- und Lungenventilationsbedin gungen.....	38
2.9	Analytische Methoden.....	39
2.9.1	Gaschromatographische Bestimmung von Styrol.....	39
2.9.2	Gaschromatographische Bestimmung von Styrol-7,8-oxid und Phenylpropenoxid.....	42

Inhaltsverzeichnis

2.10	Bestimmung der Lactatdehydrogenaseaktivität.....	47
2.11	Statistik.....	48
3	Ergebnisse.....	50
3.1	Analytische Methoden.....	50
3.1.1	Gaschromatographische Bestimmung von Styrol.....	50
3.1.2	Gaschromatographische Bestimmung von Styrol-7,8-oxid und Phenylpropenoxid.....	52
3.2	Verteilungskoeffizient Lunge zu Perfusat von Styrol-7,8-oxid	55
3.3	Mechanik und Zellintegrität der isolierten, perfundierten und ventilierten Lungen.....	59
3.4	Bestimmung der Styrol-7,8-oxid-Belastung von perfundierten und mit styrolhaltiger Luft ventilierten Maus- und Rattenlungen.....	60
4	Diskussion.....	69
4.1	Die isolierte, perfundierte und ventilierte Lunge.....	69
4.2	Der Verteilungskoeffizient, ein Parameter zur Ermittlung gewebsspezi- fischer Stoffbelastungen	72
4.3	Styrol-7,8-oxid-Belastung der Lunge von Maus und Ratte bei Exposition gegen Styrol.....	74
4.4	Mögliche Ursachen für die durch Styrol bedingte Lungentumorigenität bei der Maus.....	75
4.5	Ausblick.....	77
5	Zusammenfassung.....	78
6	Abkürzungen.....	81
7	Literatur.....	82

1 Einleitung

1.1 Problemstellung

Styrol (ST), nach der IUPAC-Nomenklatur Phenylethen, ist gasförmig in geringen Konzentrationen ubiquitär zu finden, da ST sowohl natürlichen, pflanzlichen Ursprungs ist, als auch bei der Verbrennung organischen Materials entsteht sowie aus Industrieemissionen, Abgasen von Verbrennungsmotoren und aus polystyrolhaltigem Material in die Umwelt gelangt (zusammengefasst in IARC, 1994; Filser et al., 2002; IARC, 2002). Die flüchtige Flüssigkeit ist eine wichtige Industriechemikalie, die vorwiegend zur Produktion von Kunststoffen wie Polystyrol und Kopolymeren mit anderen Kunststoffmonomeren sowie zur Herstellung glasfaserverstärkter Kunststoffe verwendet wird (zusammengefasst in IARC, 1994; 2002).

Wegen seines hohen Dampfdrucks kann ST leicht inhaliert werden. Im Säugerorganismus wird ST, das selbst nicht genotoxisch ist, durch Cytochrom-P450-abhängige Monooxygenasen (CYP450) zu Styrol-7,8-oxid (SO) metabolisiert, einem genotoxischen, DNA und Proteine alkylierenden Epoxid (zusammengefasst in IARC, 1994; 2002), das nach oraler Gabe dosisabhängig Vormagentumoren bei Mäusen (Lijinsky, 1986) und Ratten (Ponomarkov et al., 1984; Conti et al., 1988) induzierte.

Aufgrund dieser Befunde und wegen der vielen Anwendungsbereiche des Arbeitsstoffes ST wurden eine Reihe von Langzeitstudien zu seiner Tumorigenität an Ratten und Mäusen durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass ST unabhängig von der Applikationsart Lungentumoren bei Mäusen hervorrief, wohingegen ST bei Ratten nicht tumorigen war (zusammengefasst u.a. in Cohen et al., 2002; Filser et al., 2002; IARC 2002). Eine Zwei-Jahres-Inhalationsstudie mit ST bei Mäusen ergab schon bei ST-Dampfkonzentrationen von 20 ppm (weibliche Tiere) bzw. 40 ppm (männliche Tiere) eine Zunahme von bronchioalveolaren Tumoren (Cruzan et al., 2001). Die gleichen Autoren fanden hingegen selbst bei 1000 ppm bei Ratten keine

Tumorigenität. Dieser Empfindlichkeitsunterschied kann nicht von der systemischen SO-Belastung herrühren, da die SO-Konzentrationen im systemischen Blutkreislauf von Ratten und Mäusen unterhalb einer ST-Expositionskonzentration von 250 ppm in der Atemluft sehr ähnlich waren (Kessler et al., 1992; auch dargestellt in IARC, 1994). Die systemische Belastung durch diesen ST-Metaboliten hängt in erster Linie von der metabolischen Kapazität der Leber ab (Csanády et al., 1994). Hingegen könnte in der Lunge, dem Eintrittsorgan von gasförmigem ST, die resultierende SO-Belastung größer als die systemische und zudem speziesspezifisch unterschiedlich bei Ratten und Mäusen sein. Es wurde gezeigt, dass sowohl Mäuse- als auch Rattenlungen ST zu SO metabolisieren können (Salmona et al., 1976; Cantoni et al., 1978; Mendrala et al., 1993; Nakajima et al., 1994b; Carlson, 1997; Hynes et al., 1999; Oberste-Frielinghaus et al., 1999). Falls die ST-induzierte Lungentumorigenität bei der Maus durch die Belastung dieses Organs mit SO hervorgerufen wird, muss gefolgert werden, dass bei gleicher ST-Exposition die SO-Konzentrationen in Mäuselungen wesentlich höher als diejenigen in Rattenlungen sind. Diese Folgerung lässt sich unter in-vivo-Bedingungen nicht ohne weiteres überprüfen, da SO-Lungenkonzentrationen nicht genau gemessen werden können. Der Grund hierfür ist die sehr schnelle metabolische SO-Elimination in der Lunge, wie sich aus den in Zellfraktionen von Lungen gemessenen Aktivitäten von Glutathion S-Transferase (GST) und Epoxidhydrolase (EH) gegenüber SO abschätzen lässt (Oberste-Frielinghaus et al., 1999). Mit der isolierten, perfundierten und ventilierten Lunge sind solche Messungen ex vivo unter Fließgleichgewichtsbedingungen möglich.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, die Annahme zu überprüfen, dass die speziesspezifische SO-Lungenbelastung die unterschiedliche Empfindlichkeit von Ratten und Mäusen hinsichtlich der ST-induzierten Lungentumorigenität erklären könne. Hierzu sollten zuerst kommerziell erhaltene Systeme für die isolierte, perfundierte und ventilierte Lunge von Mäusen und Ratten so modifiziert werden, dass die SO-Lungenbelastungen bei verschiedenen, konstanten ST-Dampfkonzentrationen in der Einatemluft

quantitativ ermittelt werden können. Anhand der dann zu erarbeitenden Daten sollte die Ursache für den Speziesunterschied diskutiert werden.

1.2 Eigenschaften, Vorkommen, Herstellung, Verwendung und Expositionsbedingungen von Styrol

ST (CAS-Nr. 100-42-5) ist eine farblose, leichtflüssige, süßlich riechende Flüssigkeit von hoher Flüchtigkeit. Die Substanz hat ein Molekulargewicht von 104,2 g/mol, eine relative Dichte (Wasser=1,0 g/cm³) von 0,91 g/cm³ und bei 20°C einen Dampfdruck von 0,67 kPa. Der Gefrierpunkt liegt bei -30,6°C und der Siedepunkt bei 145°C (IPCS, 1994).

ST ist ubiquitär. Es kommt in Spuren als natürliches Produkt einiger Bäume vor. Es wurde, wahrscheinlich natürlichen Ursprungs, in sehr geringen Konzentrationen in einigen Nahrungsmitteln und Getränken gefunden (IARC, 1994; Tang et al., 2000; IARC, 2002). Außerdem wird es aus Verpackungsmaterial in die Nahrung freigesetzt (Lickly et al., 1995; Tang et al., 2000). In die Umwelt gelangt es vermutlich vorwiegend als Verbrennungsprodukt organischen Materials, als Zerfallsprodukt von Polystyrol, aus Industrieemissionen, aus Autoabgasen und aus Zigarettenrauch (WHO 1983; IARC, 1994, 2002). Für die Umwelt der Allgemeinbevölkerung wurde von Tang et al. (2000) eine durchschnittliche ST-Luftkonzentration von 1-3 µg/m³ abgeschätzt. Dieselben Autoren vermuteten, dass ein Mitglied der Allgemeinbevölkerung täglich 0,2-12 µg ST über die Nahrung aufnehme.

ST ist eine der wichtigsten Industriechemikalien. Weltweit werden jährlich mehr als 20 Millionen Tonnen des Stoffes produziert (Clay, 2004; ISIF, 2006). Die Herstellung verläuft hauptsächlich über die Dehydrierung von Ethylbenzol in einer Wasserdampf-atmosphäre bei 580-650°C mittels eines Kalium-Eisenoxid-Katalysators (PRI, 2002). ST ist Ausgangsstoff für eine ganze Reihe von Kunststoffen mit verschiedenartigsten Eigenschaften (ISIF, 2006;

Plastics Europe, 2009). Rund 50% der weltweiten Produktion werden zu Polystyrol (PS) bzw. geschäumtem PS verarbeitet. PS dient zur Herstellung von Behältnissen und Verpackungsmaterialien zur Aufbewahrung fester und flüssiger Nahrungsmittel, Arzneimittel, stoß- und temperaturempfindlicher Geräte aller Art, von CDs und CD-Hüllen und auch von Spielzeug. Von besonderer Bedeutung ist die Verwendung von geschäumtem PS als Wärmedämmmaterial im Bauwesen. Das Kopolymer Acrylnitril-Butadien-Styrol (ABS) wird zur Herstellung von Geräte- und Telefongehäusen, Koffern, Sporthelmen und Rohrformstücken verwendet. Ein weiteres Kopolymer Styrol-Acrylnitril wird hauptsächlich in der Automobil- und Elektro- bzw. Elektronikindustrie verwendet. Styrol-Butadien-Gummi (SBR; R steht für „rubber“), das Kopolymer mit 1,3-Butadien, lässt sich wie Naturkautschuk verarbeiten und vulkanisieren. Es wird vorwiegend zur Herstellung von Autoreifen, aber auch für Riemenmaterial, Fußbodenbeläge, Kabelisolierungen, Fußbekleidungen und zur Papierbeschichtung benötigt. Styrol-Butadien-Latex wird als Polsterfüllmaterial sowie für Teppichunterlagen verwendet und dient zur Papierbeschichtung (ISIF, 2009; Plastics Europe, 2009). Bei der Herstellung glasfaserverstärkter Kunststoffe, insbesondere beim Laminieren und Aushärten, verdampfen 10-15% des eingesetzten ST. Der übrige Anteil wird bei der Reaktion chemisch gebunden (Lenvik et al., 1999). Glasfaserverstärkte Kunststoffe werden in vielen Bereichen der Industrie eingesetzt. Sie kommen hauptsächlich im Bootsbau, der Automobil- und Elektroindustrie sowie bei der Herstellung sanitärer Einrichtungen zum Einsatz. Heute finden sie auch bei der Herstellung von Weinfässern sowie bei der Produktion von Rotorblättern von Windkraftanlagen Verwendung (ISIF, 2009; Plastics Europe, 2009).

In der ST-produzierenden und -verarbeitenden Industrie können Arbeiter sowohl in Hautkontakt mit der Flüssigkeit kommen als auch ST-Dampf inhalieren. Die transdermale Aufnahme von ST spielt quantitativ keine große Rolle, wohingegen die Einatmung den relevantesten Aufnahmeweg darstellt (Riihimäki und Pfäffli 1978; Brooks et al., 1980). Besonders hohe Konzentrationen von ST in der Atemluft werden an Arbeitsplätzen bei der

Herstellung glasfaserverstärkter Kunststoffe in der Polyesterindustrie gemessen. Typische ST-Luftkonzentrationen an solchen Arbeitsplätzen lagen Ende der 1970er Jahre im Bereich zwischen 20 und 300 ppm (Tossavainen, 1978). Seither sind die ST-Expositionskonzentrationen um etwa eine Größenordnung zurückgegangen. Allerdings dürfte im gleichen Zeitraum die Anzahl der Arbeiter, die weltweit in der industriellen Produktion von glasfaserverstärkten Kunststoffen beschäftigt waren, von etwa 200000 auf 400000 angestiegen sein (Lenvik et al., 1999).

1.3 Metabolismus von Styrol

Nach Aufnahme in den Säugerorganismus wird ST in einem ersten metabolischen Schritt vorwiegend in der Leber über CYP450 in das Epoxid SO überführt (Leibman und Ortiz 1968; Cantoni et al., 1978; Watabe et al., 1978; Belvedere et al., 1984; Foureman et al., 1989; Guengerich et al., 1991; Mendrala et al., 1993; Bogan, 1994; Nakajima et al., 1994a, b; Carlson, 1997). Entsprechend konnte im Blut von gegen ST exponierten Mäusen, Ratten und Menschen SO nachgewiesen werden (Mäuse: Löf et al., 1984; Morgan et al., 1993a, b; Ratten: Cruzan et al., 1998; Mäuse und Ratten: Kessler et al., 1992; Menschen: Korn et al., 1994; Johanson et al., 2000). Auch durch Erythrozyten wird ST zu SO umgewandelt (Tursi et al., 1983; Bitzenhofer, 1993). Des Weiteren wurden im Lungengewebe von Mäusen und Ratten CYP450-Spezies gefunden, die ST zu SO metabolisieren (Salmona et al., 1976; Cantoni et al., 1978; Mendrala et al., 1993; Nakajima et al., 1994b; Carlson, 1997; Oberste-Frielinghaus et al., 1999; Carlson et al., 2001; Green et al., 2001; Carlson, 2003). Nach Carlson (2003) sind bei der metabolischen Aktivierung von ST die CYP450 Isoenzyme CYP2E1 und CYP2F2 besonders involviert, wobei für den ST-Metabolismus in der Lunge wahrscheinlich vor allem CYP2F2 relevant ist. Im Gegensatz zur Nagerlunge besitzt die menschliche Lunge keine bzw. nur eine sehr geringe Kapazität, ST zu SO zu

metabolisieren (Nakajima et al., 1994a; Oberste-Frielinghaus et al., 1999; Carlson et al., 2000).

In der Säugerleber wird SO katalytisch durch die EH zu Styrolglykol hydrolysiert und durch die GST mit Glutathion (GSH) konjugiert (EH: Oesch et al., 1971; Kapitulnik et al., 1977; Cantoni et al., 1978; Romano et al., 1985; Mendrala et al., 1993; Bogan, 1994; Carlson, 1998; Wenker et al., 2000; GST: Ryan und Bend, 1977; Mendrala et al., 1993; Bogan, 1994).

Styrolglykol wird über Mandelsäure zu Phenylglyoxylsäure und Benzoesäure umgewandelt. Diese beiden Abbauprodukte werden mit dem Urin ausgeschieden (zusammengefasst in IARC, 2002). Bei Kaninchen (El Masri et al., 1958) und Ratte (ATSDR, 1992) wird ein Teil der Mandelsäure durch oxidative Decarboxylierung und Kopplung mit Glycin zur Hippursäure umgewandelt und im Urin ausgeschieden. Hauptabbauprodukt aus dem EH-Reaktionsweg sind bei der Ratte Phenylglyoxylsäure (Truchon et al., 1990a, b) und beim Menschen Mandelsäure sowie Phenylglyoxylsäure (Bardodej und Bardodejova, 1970; Caperos et al., 1979; Guillemin und Bauer, 1979). Die GSH-Konjugate werden zu Merkaptursäuren abgebaut, die ebenfalls mit dem Urin ausgeschieden werden. Bei Ratte und Maus stellen sie die Hauptabbauprodukte im Urin dar (Ratte: Seutter-Berlage et al., 1978; Delbressine et al., 1981; Maus: Linhart et al., 2000). Sie wurden auch im Urin von gegen ST exponierten Arbeitern gefunden (Maestri et al., 1997). Die für diese Arbeit relevanten Stoffwechselwege sind in Abb. 1 dargestellt.

Auch in der Lunge von Maus, Ratte und Mensch wurden GST- und EH-Aktivitäten mit SO als Substrat nachgewiesen (GST: Mukthar und Bresnick, 1976; Pacifici et al., 1981; Mendrala et al., 1993; Oberste-Frielinghaus et al., 1999; EH: Salmona et al., 1976; Seidegård et al., 1977; Cantoni et al., 1978; Pacifici et al., 1981; 1988; Mendrala et al., 1993; Carlson, 1998, 2000; Oberste-Frielinghaus et al., 1999). Durch die GST-vermittelte SO-Konjugation mit GSH kann es zu einer Abnahme der GSH-Konzentration in der Lunge kommen. So wurde im Lungengewebe von Mäusen, welche gegen ST-Konzentrationen ≥ 80 ppm exponiert wurden, ein drastischer Abfall der GSH-

Konzentration gezeigt. Bei Ratten, die bis zu ST-Konzentrationen von 300 ppm exponiert worden waren, wurde nur ein geringes Absinken der GSH-Konzentration gefunden (Filser et al., 2002).

Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass noch weitere Metaboliten von ST eine Rolle bei der Depletion von GSH in der Mauslunge spielen. So führte die intraperitoneale Gabe von 4-Vinylphenol (4-VP), einem ST-Metaboliten bei Mäusen (Carlson et al., 2001), der in geringeren Konzentrationen auch im Urin von Ratten (Bakke und Scheline, 1970; Pantorotto et al., 1978; Manini et al., 2002) und Menschen (Pfäffli et al., 1981; Manini et al., 2002) nachgewiesen wurde, zur Abnahme der GSH-Konzentrationen in Mauslungen (Turner et al., 2005).

Einleitung

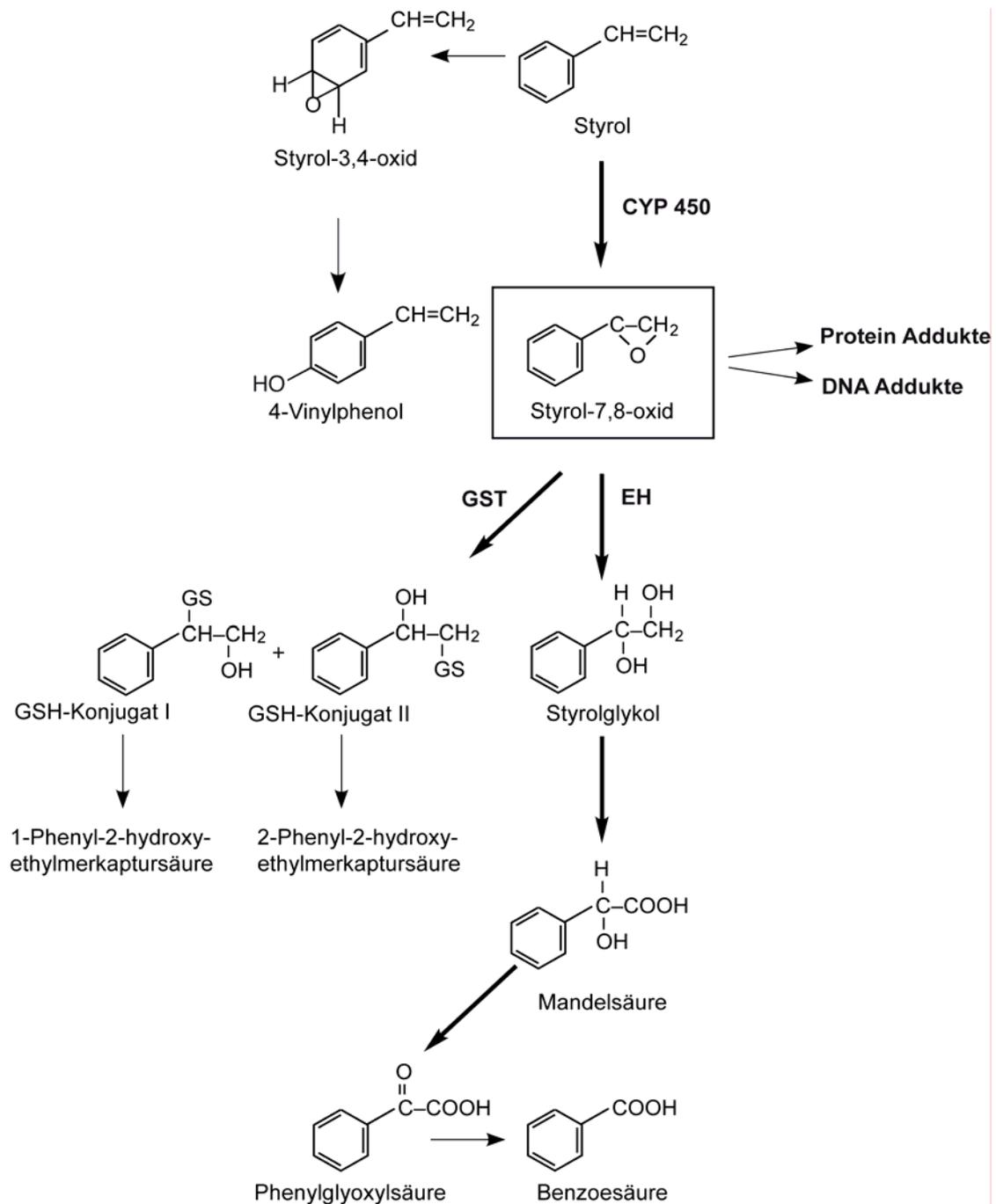


Abb. 1: Auszug aus dem Metabolismus von Styrol. Die Hauptmetabolismuswege sind durch dicke Pfeile dargestellt (nach IARC, 1994); CYP450: Cytochrom-P450-abhängige-Monooxygenase; EH: Epoxidhydrolase; GSH: Glutathion; GST: Glutathion S-Transferase

1.4 Mutagenität und Tumorigenität von Styrol und Styrol-7,8-oxid

ST zeigte in Bakterien ohne Zugabe von S9-Mix (enthält die mikrosomale Fraktion der Leber) keine mutagene Wirkung. Dahingegen wurden mit metabolischer Aktivierung, durch Zugabe des S9-Mix, in einigen Studien mutagene Effekte gefunden (zusammengefasst in IARC, 1994). Die positiven Befunde lassen sich auf die Bildung des reaktiven Metaboliten SO zurückführen. Da im S9-Mix sowohl CYP450 als auch EH, GST und GSH vorhanden sind, wird das gebildete SO auch wieder metabolisch eliminiert. Dies dürfte erklären, weshalb nicht alle Befunde positiv waren. Damit übereinstimmend waren die Ergebnisse der Untersuchungen mit SO in bakteriellen Systemen. Sie waren ohne metabolische Aktivierung vorwiegend positiv und nach Zugabe von S9-Mix meistens negativ (zusammengefasst in IARC, 1994).

SO-Genmutationsstudien mit V79-Zellen des chinesischen Hamsters und mit menschlichen peripheren Blutlymphozyten ergaben eine sehr geringe Mutagenität von SO. Diese wurde auf die ausgeprägte Zytotoxizität von SO bei Konzentrationen oberhalb von 400 µmol/l zurückgeführt (zusammengefasst in Vodicka et al., 2006).

In vivo wurden nach ST-Expositionen bei Maus und Ratte SO-Addukte an Hämoglobin, Plasmaproteinen und DNA gefunden (intraperitoneale Gabe: Pauwels et al., 1996; 1997; Yeowell-O'Connell et al., 1997; inhalative Gabe: Osterman-Golkar et al., 1995; Boogaard et al., 2000; Otteneder et al., 2002). Bei Arbeitern, die gegen ST exponiert waren, wurde eine geringe Alkylierung des Hämoglobins gemessen, die für den Metaboliten SO charakteristisch war (Christakopoulos et al., 1993). Die bei gegen ST exponierten Arbeitern gefundenen erhöhten Albumin- und DNA-Adduktlevel sowie die Zunahme des Schwesterchromatidaustausches wurden vorwiegend auf das aus dem Polymerisationsprozess von ST entstehende SO in der Luft sowie auf SO aus Zigarettenrauch zurückgeführt (Rappaport et al., 1996). Allerdings kann

anhand der oben aufgeführten Studien (Christakopoulos et al., 1993; Osterman-Golkar et al., 1995; Pauwels et al., 1996; Rappaport et al., 1996; Pauwels et al., 1997; Yeowell-O'Connell et al., 1997; Boogaard et al., 2000; Otteneder et al., 2002) keine eindeutige Aussage darüber getroffen werden, ob ST tatsächlich mutagene Effekte beim Menschen bewirkt, wie von Henderson und Speit (2005) ausführlich diskutiert wurde. Die DNA-Adduktbildung nach Exposition gegen ST ist nur ein Beweis dafür, dass ST die Kapazität besitzt DNA-Addukte zu bilden (Henderson und Speit, 2005; Nestmann et al., 2005).

Die Tumorigenität von SO wurde in mehreren Langzeitstudien untersucht. Nach chronischer oraler Applikation von SO wurden bei Ratten und Mäusen hohe Inzidenzen an Papillomen und Karzinomen im Vormagen gefunden (Ponomarkov et al., 1984; Lijinski, 1986; Conti et al., 1988). Abgesehen von einer - allerdings nicht dosisabhängigen - Erhöhung der Spontanrate an Lebertumoren bei männlichen Mäusen (Lijinski, 1986) induzierte die Substanz keine Tumoren. Zwei frühere Studien an Mäusen mit dermalen Applikation von SO ergaben keine Erhöhung der Tumorinzidenz (Van Duuren et al., 1963; Weil et al., 1963). Die Befunde, dass nach oraler Gabe dosisabhängige Zunahmen der Tumorinzidenzen nur am Applikationsort des genotoxischen SO gefunden wurden, könnten mit der schnellen Hydrolyse von SO im sauren Milieu des Magens zusammenhängen. Diese führte wahrscheinlich dazu, dass nur wenig SO systemisch verfügbar war. So fanden Filser et al. (1992) bei niedrigeren pH-Werten im Vergleich zu pH 7,0 eine Abnahme der Halbwertszeit von SO.

Mit ST wurden bislang dreizehn Langzeitstudien - vier mit Mäusen und neun mit Ratten - vorgenommen, die einen deutlichen Speziesunterschied zeigten. Bei Mäusen wurde sowohl nach inhalativer ST-Exposition bis zu 160 ppm (sechs Stunden pro Tag, fünf Tage die Woche über einen Zeitraum von 23-24 Monaten, Cruzan et al., 2001) als auch in den drei Studien nach oraler Gabe (Ponomarkov und Tomatis, 1978; NCI, 1979a, b) eine erhöhte Inzidenz an Lungentumoren gefunden. Nach inhalativer Exposition trat sie bei weiblichen

Tieren schon ab 20 ppm ST, bei männlichen ab 40 ppm auf. In einer Studie (NCI, 1979b) zeigte sich eine vermehrte Bildung von hepatozellulären Adenomen bei den weiblichen Tieren. Im Gegensatz hierzu bewirkte ST in sieben Studien mit Ratten weder nach oraler (Oettel und Schulze, 1962; Ponomarkov und Tomatis, 1978; NCI 1979a, b; Beliles et al., 1985; Conti et al., 1988) noch nach inhalativer Aufnahme (Konzentrationen bis zu 1000 ppm, sechs Stunden pro Tag, fünf Tage die Woche über einen Zeitraum von 24 Monaten; Cruzan et al., 1998) behandlungsbedingte Zunahmen von Tumoren. Lediglich bei zwei weiteren Inhalationsstudien (Jersey et al., 1978; Conti et al., 1988) wurden nicht-dosisabhängige Zunahmen von Mammatumoren gefunden. Beide Studien wurden jedoch hinsichtlich ihrer toxikologischen Relevanz von der amerikanischen Environmental Protection Agency (USEPA) als nicht verwertbar beurteilt (USEPA, 1990). Die International Agency for Research on Cancer (IARC) kritisierte die Studie von Conti et al. (1988) ebenfalls (IARC, 2002). Die nur als Dow-Report vorliegende Arbeit von Jersey et al. (1978) berücksichtigte sie für ihre Beurteilung eines kanzerogenen Risikos durch ST nicht (IARC, 2002). Aus den Ergebnissen der Untersuchungen zur Tumorigenität von ST stellt sich die Frage, worauf die Spezies- und Organspezifität der tumorigenen Wirkung von ST beruht.

1.5 Überlegungen zum Wirkmechanismus der Tumorigenität von Styrol

Ausgehend von den Befunden, dass ST unabhängig von der Applikationsart zwar Lungentumoren bei der Maus nicht jedoch bei der Ratte induzierte, wurden eine Reihe von in-vitro- und in-vivo-Studien durchgeführt, die zum Ziel hatten, die Speziespezifität der durch ST induzierten Lungentumorigenität zu erklären. Hierbei wurde zunächst davon ausgegangen, dass die tumorigene Wirkung auf die Belastung durch den reaktiven Metaboliten SO zurückzuführen sei (Bond, 1989; Gadberry et al., 1996; Cohen et al., 2002;

IARC, 2002). Untersuchungen zur ST-Toxizität in der Lunge hatten gezeigt, dass die terminalen Bronchiolen der Angriffsort der pulmonalen Toxizität von ST sind (Cruzan et al., 2001; 2002). Dieser Befund wurde mit dem CYP450-abhängigen Metabolismus von ST zu SO in Clarazellen erklärt, die sich bei der Maus insbesondere in den terminalen Bronchiolen konzentrieren (zusammengefasst in Gram, 1997). Nach der IARC (2002) könnte das gebildete SO sowohl über seine direkte Genotoxizität (siehe oben) als auch über seine pulmonale Toxizität zur ST induzierten Lungentumorigenität führen. Die pulmonale Toxizität war nach intraperitonealer Gabe hoher Dosen von ST (600-800 mg/kg) bzw. SO (300 mg/kg) über die Bestimmung der intrazellulären Enzyme gamma-Glutamyl-transpeptidase und Laktatdehydrogenase (LDH) in der bronchoalveolaren Flüssigkeit von Mäusen gezeigt worden (Gadberry et al., 1996). Diese Zytotoxizität könnte die nach ST-Expositionen bei Mäusen beobachtete Proliferation von Clarazellen in den terminalen Bronchiolen (Cruzan et al., 1997: 150 und 200 ppm ST, sechs Stunden pro Tag, fünf Tage pro Woche über einen Zeitraum von zwei Wochen; Green et al., 2001: 40 und 160 ppm ST, sechs Stunden pro Tag, fünf Tage pro Woche über einen Zeitraum von zwei Wochen) hervorrufen und schließlich die Bildung von Lungentumoren nach sich ziehen (IARC, 2002). Bei ST exponierten Ratten war allerdings weder Zytotoxizität noch eine erhöhte Zellproliferation gefunden worden (Cruzan et al. 1997: bis zu 1500 ppm ST, sechs Stunden pro Tag, fünf Tage pro Woche über einen Zeitraum von dreizehn Wochen; Green et al. 2001: 500 ppm ST, sechs Stunden pro Tag, fünf Tage pro Woche über einen Zeitraum bis zu dreizehn Wochen).

Um die ST-bedingte, gewebs- und speziesspezifische SO-Belastung bei Maus, Ratte und Mensch zu simulieren, wurden physiologisch-toxikokinetische Modelle (Csanády et al., 1994; Cohen et al., 2002; Sarangapani et al., 2002; Csanády et al., 2003) entwickelt. Die Modelle von Csanády et al. (1994; 2003) simulierten die ST- und SO-Konzentrationen im venösen Blut von Maus, Ratte und Mensch in Übereinstimmung mit gemessenen Daten (Maus und Ratte: Kessler et al., 1992; Mensch: Korn et

al., 1994). Bis zu einer ST-Konzentration von 250 ppm unterschieden sich die SO-Konzentrationen im Fließgleichgewicht zwischen Maus und Ratte kaum. Oberhalb dieser ST-Konzentration blieb die SO-Konzentration im Rattenblut annähernd konstant. Bei der Maus hingegen nahm sie in Abhängigkeit von der ST-Konzentration drastisch und kontinuierlich zu und erreichte 5500 μg SO pro Liter Blut bei 800 ppm ST. Dieser ausgeprägte Speziesunterschied ist nach den physiologischen Modellen von Csanády et al. (1994; 2003) durch unterschiedliche Kinetiken von ST und SO bedingt. Demnach folgt der ST-Metabolismus bei beiden Spezies einer Sättigungskinetik; die maximale Metabolismusgeschwindigkeit wird bei etwa 500 ppm erreicht (in Übereinstimmung mit gemessenen Daten: Filser et al., 1993). Da, dem Modell zufolge, die modellierte metabolische Elimination des gebildeten SO erst bei weit höheren ST-Konzentrationen gesättigt ist, steigt die SO-Belastung bei der Ratte oberhalb von 250 ppm ST nur noch wenig an und erreicht zwischen 350 und 500 ppm ein Plateau (Filser et al., 2002). Für die Mausleber wurde im Gegensatz zur Rattenleber ein vollständiger Verbrauch von GSH modelliert (Csanády et al., 1994; 2003). Nach dem Modell ist er durch die GST-katalysierte GSH-Konjugation von SO und einer relativ zu langsamen GSH-Neusynthese bedingt, weshalb der GSH-Verlust nicht kompensiert werden kann. Die vollständige GSH-Depletion in der Leber von Mäusen, die mindestens sechs Stunden lang gegen ST-Konzentrationen oberhalb von 250 ppm exponiert wurden, wurde nicht nur postuliert (Kessler et al., 1992) und modelliert (Csanády et al., 1994; 2003), sondern auch gemessen (Morgan et al., 1993a, b). Beim Menschen liegen die modellierten und gemessenen SO-Konzentrationen im Blut mit bis zu 4 $\mu\text{g}/\text{l}$ bei ST-Expositionen bis zu 70 ppm erheblich unter denen der Nagetiere (Modellsimulationen: Csanády et al., 1994; Filser et al., 2002; Csanády et al., 2003; in einer Feldstudie gemessen: Korn et al., 1994). Ähnliche Werte wurden auch in einer späteren, experimentellen Arbeit mit freiwillig gegen ST exponierten Menschen gemessen (Johanson et al., 2000). Die drastische Zunahme der SO-Belastung im Blut und damit auch in den metabolisch aktiven Lebern von Mäusen oberhalb von 250 ppm ST könnte die hohe, mit schweren

Leberschäden einhergehende Mortalität unter Mäusen erklären, die sechs Stunden lang täglich, fünf Tage pro Woche über einen Zeitraum von zwei Wochen ST-Konzentrationen von 250 und 500 ppm ST ausgesetzt waren (Cruzan et al., 1997). In der gleichen Arbeit traten bei Ratten, die dreizehn Wochen lang gegen ST-Konzentrationen von bis zu 1500 ppm exponiert worden waren, keine der oben beschriebenen Effekte auf.

Die physiologisch-toxikokinetischen Modelle von Cohen et al. (2002), Sarangapani et al. (2002) und Csanády et al. (2003) basieren auf dem Modell von Csanády et al. (1994). Mit diesem auf einer Vielzahl von in-vivo und in-vitro erhaltenen Messdaten beruhenden Modell können die Konzentrations-Zeitverläufe von ST- und SO im Blut und in verschiedenen Geweben vorhergesagt werden. Die drei neueren Modelle beschreiben die aus ST-Expositionen resultierenden SO-Belastungen der Atemwege von Maus, Ratte und Mensch. Cohen et al. (2002) kritisieren ihr eigenes Modell des Respirationstrakts verglichen mit einer von „Filser et al. (1999)“ bei einem gemeinsamen wissenschaftlichen Treffen vorgestellten Modellierung (veröffentlicht von Csanády et al., 2003) als ungenügend. Im Gegensatz zu dem Modell von Cohen et al. (2002) erlaubten die Modelle von Sarangapani et al. (2002) und Csanády et al. (2003) eine Unterteilung des Atemtraktes in mehrere Kompartimente: eine „conducting zone“, welche die oberen Atemwege einschließlich der Bronchiolen beinhaltet, und eine „alveolar zone“, in welcher der Stoffaustausch zwischen der Gasphase und dem die Lungen durchfließenden Blut stattfindet (Csanády et al. 2003), bzw. obere Atemtraktzone, Trachea plus Bronchien, Bronchiolen und alveolare Region (Sarangapani et al., 2002). Aufgrund der modellierten SO-Bildungsraten aus ST in den Bronchien schlussfolgerten Sarangapani et al. (2002), dass die SO-Belastungen der terminalen Bronchien - bei gleichen ST-Expositionsbedingungen - bei Maus, Ratte und Mensch sehr unterschiedlich seien. Die SO-Belastung wäre demnach bei der Ratte um den Faktor 10 und beim Menschen um den Faktor 100 geringer als in der Mauslunge. Daraus und aus dem Befund, dass sich ST-induzierte Lungentumoren bei der Maus in den terminalen Bronchien manifestierten (Cruzan et al., 2001), schätzten

Sarangapani et al. (2002) für den Menschen ein 100fach geringeres Risiko für ST-bedingte Lungentumoren als bei Mäusen. Im Modell von Csanády et al. (2003) ist der Unterschied in der SO-Belastung zwischen Ratte und Maus wesentlich geringer. So wurde z.B. für eine Exposition gegen 160 ppm ST – die höchste Konzentration in der Langzeitinhalationsstudie mit Mäusen von Cruzan et al. (2001) – für Mäuse nur eine 3fach höhere SO-Konzentration im bronchialen Gewebe und eine 1,6fach höhere in der gesamten Lunge als bei Ratten vorhergesagt (Csanády et al., 2003). Für die SO-Konzentration in der menschlichen Lunge wurde nur ein nahezu 20fach niedrigerer Wert als bei der Maus modelliert. Die Autoren hatten in ihr Lungenmodell kinetische Parameter zum Metabolismus von ST und SO integriert, die von der gleichen Arbeitsgruppe (Oberste-Frielinghaus et al., 1999) eigens zum Zweck der Modellentwicklung in Lungenmikrosomen und -zytosol von Maus, Ratte und Mensch ermittelt worden waren. In menschlichen Lungenzellfraktionen war keine bzw. nur ein Bruchteil der CYP450-Aktivität von Ratte bzw. Maus gefunden worden. Auch waren die menschlichen GST-Aktivitäten viel geringer und die EH-Aktivitäten deutlich höher als in den Lungenzellfraktionen der Nagetiere. Wegen des unterhalb von 160 ppm ST nur geringen Unterschieds in der modellierten SO-Lungenbelastung zwischen Maus und Ratte folgerten Filser et al. (2002), dass die ST-induzierte Lungentumorigenität bei der Maus wahrscheinlich nicht direkt auf SO zurückzuführen sei. Vielmehr sei die in Lungen von ST-exponierten Mäusen gefundene GSH-Depletion (Dhawan-Robl et al., 2000) der wahrscheinliche Auslöser für zytotoxische und zellproliferative Effekte mit nachfolgender Tumorbildung. Damit übereinstimmend waren die in Lungen gemessenen GSH-Spiegel bei der Maus schon bei 80 ppm ST und bei der Ratte erst bei 300 ppm signifikant erniedrigt (Dhawan-Robl et al., 2000; Filser et al., 2002). Aus diesen Daten sagten Csanády et al. (2003) in ihrem physiologisch-toxikokinetischen Modell für die Bronchiolen von männlichen Mäusen eine etwa 50%ige GSH-Depletion bei nur 40 ppm ST voraus. Dies war die niedrigste Konzentration bei der männliche CD-1 Mäuse eine erhöhte Tumorraten gezeigt hatten (Cruzan et al., 2001). Für Ratten, bei den ST nicht tumorigen wirkt, simulierte das Modell von

Csanády et al. (2003) einen GSH-Abfall in den Bronchiolen um lediglich 15% bei 200 ppm ST. Unter der Annahme, dass die Lungentumorigenität von ST eine Zellproliferation erfordert, die auf einer durch die Konjugation von SO mit GSH hervorgerufenen Störung der GSH-Homöostase beruht, folgerten Filser et al. (2002), dass beim Menschen kein Risiko für Lungentumoren bei ST-Exposition bestehe, da in der menschlichen Lunge sowohl die SO-Belastung als auch die GST-Aktivität zu gering seien, als dass es bei ST-Expositionen in diesem Organ zu einer relevanten GSH-Depletion kommen könne.

Es liegen also im Wesentlichen zwei Hypothesen zum Wirkmechanismus vor. Die eine beruht auf der Annahme, dass die vermutete und auch modellierte relativ hohe SO-Belastung der Mauslunge im Vergleich zur Rattenlunge eine wesentliche Voraussetzung für die ST-bedingte Lungentumorigenität bei der Maus sei. Die Lungentumoren werden hier auf die genotoxischen und zytotoxischen Eigenschaften von SO bezogen. Im Gegensatz hierzu fordert die andere Hypothese, in Übereinstimmung mit ebenfalls modellierten Daten, dass sich bei gleicher ST-Exposition (unterhalb von 160 ppm) die SO-Lungenbelastungen beider Spezies nicht sehr unterscheiden sollten. Die ST-bedingte Lungentumorigenität bei der Maus wird hier auf wiederholte, massive Störungen der GSH-Homöostase in der Mauslunge zurückgeführt, was zu Zellproliferation führe. Eine Entscheidung, welcher Wirkmechanismus der wahrscheinlichere ist, erfordert deshalb die Kenntnis der SO-Konzentrationen in Lungen ST-exponierter Ratten und Mäuse. Bisher wurde nur die metabolische Bildung von SO aus ST in Lungengewebe beider Spezies gezeigt (Salmona et al., 1976; Cantoni et al., 1978; Mendrala et al., 1993; Nakajima et al., 1994a, b; Carlson, 1997; Hynes et al., 1999; Oberste-Frielinghaus et al., 1999). Auch wurde SO in Mäuselungen qualitativ nach intraperitonealer Verabreichung von ^{14}C -markiertem ST nachgewiesen (Löf et al., 1984). Es fehlen allerdings die erforderlichen quantitativen Daten. Diese können selbst unmittelbar im Anschluss an in-vivo-Expositionen nicht verlässlich gemessen werden, da SO sehr schnell in der Lunge metabolisch eliminiert wird, wie sich aus GST- und EH-Aktivitäten, die in Lungenzytosol

und -mikrosomen mit SO als Substrat ermittelt worden waren (Oberste-Frielinghaus et al., 1999), folgern lässt. Deshalb sollten in der vorliegenden Arbeit in isolierten, perfundierten und ventilerten Lungen von Ratte und Maus die Belastungen durch SO, das aus inhaliertem ST in der Lunge metabolisch gebildet wird, unter Fließgleichgewichtsbedingungen bestimmt werden.

1.6 Aufgabenstellung

Die Arbeit hatte zum Ziel, SO-Konzentrationen in isolierten, perfundierten und ventilerten Lungen von Maus und Ratte zu quantifizieren, die bei konstanten ST-Konzentrationen in der inhalierten Luft unter Fließgleichgewichtsbedingungen erreicht werden. Als Voraussetzung hierfür sollten zuerst kommerziell erworbene Systeme für die Ventilation und Perfusion von isolierten Ratten- und Mauslungen diesen Anforderungen entsprechend modifiziert werden. In den anschließenden Experimenten sollten die durch Metabolismus von inhaliertem ST (ST-Atemluftkonzentrationen zwischen etwa 40 bis etwa 600 ppm) in den Lungen erzielten SO-Belastungen über Messungen von SO-Konzentrationen im ausfließenden Perfusat ermittelt werden. ST und SO sollten gaschromatographisch mittels Flammenionisationsdetektoren (FID) bestimmt werden. Der eindeutige Nachweis von SO im Perfusat sollte zusätzlich mittels massenselektiver Detektion (MSD) durchgeführt werden. Um einen realitätsnahen Vergleich der SO-Belastungen von Maus- und Rattenlunge nach ST-Inhalation zu ermöglichen, sollten die zu erhaltenden ex-vivo-Daten auf in-vivo-Bedingungen übertragen werden. Anhand der Ergebnisse sollten mögliche Ursachen für die durch Styrol bedingte Lungentumorigenität bei der Maus diskutiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Aceton, p.a.	Merck, Darmstadt
Acetonitril, CHROMASOLV [®] für HPLC	Riedel-de Haën, Seelze
Albumin, bovine serum, $\geq 96\%$, essentially fatty acid free	Sigma-Aldrich, Steinheim
Calciumchloriddihydrat, p.a.	Merck, Darmstadt
D-(+)-Glucose, 99,5%	Sigma-Aldrich, Steinheim
Diethylmaleat, 95%	Merck, Darmstadt
Helium, 5.0	Linde, München
HEPES	Sigma-Aldrich, Steinheim
Isofluran [®] , 100%	Baxter, Unterschleißheim
Kaliumchlorid, p.a.	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat, p.a.	Merck, Darmstadt
Ketamin, 10%	Wirtschaftsgenossenschaft deutscher Tierärzte eG, Garbsen
Kochsalzlösung, 0,9%	Braun, Melsungen
Liquemin [®] N25000 (Heparin-Natrium)	Hoffmann La Roche, Grenzach-Wyhlen
Magnesiumsulfat, wasserfrei	Sigma-Aldrich, Steinheim
Methanol, LICHROSOLV [®]	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid, p.a.	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat, p.a.	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid, 99%	Carl Roth, Karlsruhe
n-Hexan, Picograde	Promochem, Wesel
(1R,2R)-(+)-1-Phenylpropenoxid, 97%	Sigma-Aldrich, Steinheim
Rompun [®] , 2%	Bayer, Leverkusen

Salzsäure, 32 %, technisch	Merck, Darmstadt
Stickstoff, 5.0	Linde, München
Schliff fett, Glisseal®	Borer Chemie, Zuchwil
Styrol, ≥ 99%	Sigma-Aldrich, Steinheim
racemisches Styrol-7,8-oxid, 97%	Sigma-Aldrich, Steinheim
Wasserstoff, 5.0	Linde, München

2.2 Geräte, Verbrauchsmaterialien und Software

Analysenwaage A 210-P	Sartorius, Göttingen
Autosamplervials, Klarglas, 2 ml, Alu- Crimp-Kappen mit Gummi/PTFE- Septum	Wicom, Heppenheim
Barometer, Typ 604	Lambrech, Göttingen
Chirurgisches Operationsbesteck	Braun/Aesculap, Tuttlingen
Einmalkanülen Sterikan, verschiedene Größen	Braun, Melsungen
Einmalspritzen aus Plastik, verschiedene Volumina	Braun, Melsungen
Einmalspritzen Omnifix-F, 1 ml	Braun, Melsungen
Exsikkatoren, verschiedene Volumina	Schott, Mainz
Faltenfilter 595 ¹ / ₂	K&K Laborbedarf, München
Gaschromatograph (GC) Agilent 6090 N, ausgestattet mit: FID und dem Integrator Peak Simple	Agilent, Waldbronn SRI Instruments, Torrance, CA, USA
Gaschromatograph HP 5980 Series II, ausgestattet mit: MSD HP 5710	Agilent, Waldbronn

Temperaturregulierbares split/splitless KaltAufgabeSystem, KAS 3	Gerstel, Mühlheim/Ruhr
PC Vectra XM Series 3,5/90	Agilent, Waldbronn
Software: HP MS ChemStation C.01.05	Agilent, Waldbronn
Gaschromatograph Shimadzu GC 8, ausgestattet mit:	Shimadzu, Duisburg
FID	
Integrator (Shimadzu) C-R5A	
Glasmesspipetten, verschiedene Volumina	Brand, Wertheim
Glasventilhahn	K&K Laborbedarf, München
Haltungsfutter Nr. 1324	Altromin, Lage
Isolierte Perfundierte Lunge Größe 1, Maus (IL-1- Typ 839)	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten
Isolierte Perfundierte Lunge Größe 2, Ratte (IPL-2 Typ 829/2)	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten
Kanüle unimed [®] Stahl, 1,0 x 200 mm	K&K Laborbedarf, München
Kulturröhrchen, Glas, ca. 7 ml, mit Schraubdeckel GI 14 und Teflon-Septen	K&K Laborbedarf, München
Magnetrührmotoren IKAMAG RH	IKA, Staufen
Messkolben, Glas, verschiedene Größen	Hirschmann, Eberstadt
Mikroeinsätze für Autosamplervials, Glas, 30,75 x 6,0 x 0,7 mm	K&K Laborbedarf, München
Mikroliterpipetten 1000 µl, 100 µl	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße 5,0 ml	K&K Laborbedarf, München
Narkosemittelverdampfer, Ohmeda, Tec 3	Bcc Health Care, Yorkshire, England
Pasteurpipetten, Glas	Hirschmann, Eberstadt
pH-Meter 761 Calimatic	Bachofer, Reutlingen
Präzisionsküvetten (optisches Spezialglas, Typ 104B-QS)	Perkin Elmer, Überlingen
Probeentnahmestücke vor und nach der	Glas-Apparatebau Kuglstatler,

Material und Methoden

Lunge mit Schraubstutzen (GI 14), Schraublochkappe und Butyl/Teflon- Septum	Garching
Schlauchpumpe Reglo Analog MS-4/6-100	Hugo Sachs Elektronik, March- Hugstetten
Schüttelwasserbad	Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel
Silkam [®] (Naturseide geflochten)	Braun/Aesculap, Tuttlingen
Socorex-Pipetten Calibra 0,2 – 2 ml Acura 0,5 – 5 ml	Socorex, Lausanne, Schweiz
Software: Excel [®] 2003 Graph Pad Prism [®] 4; 5 Mathematica [®] 5.2 Pulmodyn [®] 1.0.26.9	Microsoft, Redmont, USA Graph Pad Software, San Diego, USA Wolfram Research, Oxfordshire, GB Hugo Sachs Elektronik, March- Hugstetten
Spektrophotometer Lambda 5	Perkin Elmer, Überlingen
Spritzen Hamilton 805 RN, 25 µl mit on column- Nadel, Gauge 32 Hamilton, Serie 701 N, 10 µl Hamilton, Serie 1725 TLL, 100 µl Hamilton, Serie 1710 TLL, 250 µl	Hamilton, Darmstadt
Unimetrics, verschiedene Volumina	Machery-Nagel, Düren
Mikroliterspritze, 10 µl mit on column-Nadel Innendurchmesser: 0,47 mm	Gerstel, Mühlheim/Ruhr
Testkit (LDH IFCC-Methode 37°C) zur in vitro Bestimmung von LDH	Greiner Biochemie, Flacht

Trennsäulen:

am GC/FID:

gepackte Trennsäule: Tenax TA, 60- Shimadzu, Duisburg
80 mesh, 1,5 m x 1/8"

Kapillarsäule: DB-17, 30 m x Agilent, Waldbronn
0,25 mm, Film 0,25 µm, mit einer
Vorsäule, fused silica, deaktiviert 10 m x
0,32 mm

am GC/MSD:

Kapillarsäule: HP-1-MS, 25 m x Agilent, Waldbronn
0,2 mm, Film 0,33 µm, mit einer
Vorsäule, fused silica, deaktiviert,
10 m x 0,53 mm

Top flow System IVC-Anlage Tecniplast, Buguggiate, Italien
T-Stück Werkstatt Helmholtz Zentrum,
München

Tygonschläuche Ismatec, Wertheim, Mondfeld
Innendurchmesser: 2,79 mm bzw.
1,22 mm, Wanddicke: 0,86 mm

Zentrifuge, Sigma 4K15 Sigma, Osterode

Zentrifugengläser, Glas, ca. 23 ml, mit K&K Laborbedarf, München
Schraubdeckel (GI 14)

2.3 Versuchstiere

Die Versuche zur isolierten, perfundierten und ventilerten Lunge wurden mit männlichen Sprague-Dawley Ratten (230-360 g) und männlichen B6C3F1 Mäusen (25-34 g) durchgeführt. Die Tiere wurden von Charles River, Sulzfeld, bezogen und bis zu vier Wochen vor der Durchführung der Versuche am Helmholtz Zentrum München in Makrolonkäfigen Typ III (jeweils 2 Ratten bzw.

5 Mäuse) in einer Top flow System IVC-Anlage im zwölfstündigen Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten und mit gefilterter Raumluft versorgt. Als Standarddiät erhielten alle Tiere Haltungsfutter und Leitungswasser ad libitum.

2.4 Perfusat

Zur Herstellung von 1 l Perfusat wurden 6,9 g NaCl, 0,35 g KCl, 0,163 g KH_2PO_4 , 0,144 g MgSO_4 , 0,277 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1,09 g NaHCO_3 , 1,1 g Glucose, 3,0 g HEPES und 20 g Albumin in Aqua dest. (ca. 800 ml) unter Rühren gelöst und dann auf 1 l aufgefüllt. Das Perfusat wurde anschließend filtriert und der pH mit 1 NaOH (1 mol/l) auf einen Wert von 7,4 eingestellt. Die Aufbewahrung erfolgte bei 4°C. Unmittelbar vor Gebrauch wurde der pH-Wert nochmals überprüft und wenn nötig auf den oben angegebenen Bereich korrigiert.

2.5 Apparaturen für die isolierte, perfundierte und ventilierte Maus- und Rattenlunge

Die Apparaturen zur Perfusion und Ventilation von Maus- und Rattenlungen waren ursprünglich nicht für eine inhalative Exposition vorgesehen. Deshalb mussten die Apparaturen (Maus: von von Bethmann et al., 1997; 1998; Ratte: Uhlig, 1992; Uhlig und Wollin, 1994; Uhlig und Heiny, 1995) modifiziert werden, um die Inhalation von konstanten ST-Konzentrationen in der Atemluft zu ermöglichen. Hierfür waren zahlreiche, zeitaufwendige Vorversuche notwendig, die im Folgenden kurz skizziert werden. Zunächst wurde getestet, welche Art von Pumpe - eine Membran- oder Rollenpumpe - am Besten für die inhalative ST-Exposition der isolierten, perfundierten und ventilierten Maus- und Rattenlunge geeignet ist. Die Pumpe, die klassischerweise zur

Förderung von Gasen eingesetzt wird, ist die Membranpumpe. Bei ST-Expositionsversuchen, die unter Verwendung dieser Pumpe durchgeführt wurden, konnte allerdings aufgrund des Diffundierens von ST in die Pumpe keine konstante ST-Konzentration in der Inhalationsluft der isolierten, perfundierten und ventilierten Maus- und Rattenlunge erreicht werden. Außerdem wurde die Atemtätigkeit der Nagetierlunge aufgrund der Vibration der Pumpe negativ beeinflusst, so dass es sehr schnell zu einer Ödembildung kam. Somit war diese Art von Pumpe für die Zufuhr von ST in die Inhalationsluft der isolierten, perfundierten Maus- und Rattenlunge nicht geeignet. Eine vibrationsarme Alternative zur Membranpumpe ist die Rollenpumpe. Allerdings ergab sich auch hier das Problem der Gasdichtigkeit des aus Rollenpumpe und Tygonschläuchen bestehenden Systems, da ST über das Schlauchmaterial in die Außenluft diffundierte. Um die Dichtigkeit des Systems zu erhöhen wurde durch den Einbau von gasdichten Glasrohren der Einsatz von Tygonschläuchen auf ein Minimum reduziert. Die Verbindungen von Tygonschlauch und Glasrohren wurden mit Kabelbindern abgedichtet. Die Tygonschläuche wurden vor jedem Versuch so lange mit der entsprechenden ST-Konzentration gespült bis eine Sättigung eintrat und eine konstante ST-Konzentration in der Inhalationsluft der isolierten, perfundierten und ventilierten Maus- und Rattenlunge gewährleistet war. Weitere zeitaufwendige Vorversuche resultierten letztlich in den Modifikationen, die bei der Apparatur für die isolierte, perfundierte und ventilierte Rattenlunge (Abb. 2) und Mauslunge (Abb. 3) durchgeführt wurden, um die Inhalation einer konstanten Konzentration von ST zu gewährleisten und dessen Metaboliten SO im ausfließenden Perfusat bestimmen zu können. Diese Modifikationen werden im Folgenden beschrieben.

Zu Abb.2: Isolierte, perfundierte und ventilierte Rattenlunge

Es wurde ein T-Stück aus Messing (17) gefertigt und gasdicht an das obere Ende des Pneumotachometers geschweißt. Eine horizontale Öffnung des T-Stücks wurde über einen Tygonschlauch an den ST-Vorratsexsikkator angeschlossen. Ausgehend von diesem wurde mit Hilfe einer Rollenpumpe III

($\varnothing_{\text{Aussen}}$ 0,37 cm, $\varnothing_{\text{Innen}}$ 0,28 cm) ein konstanter ST-Gasfluss (15 ml/min) durch den horizontalen Teil des T-Stücks erzeugt. Durch die Atemtätigkeit gelangte die ST-haltige Luft über das T-Stück und das Pneumotachometer (7) in die Lunge.

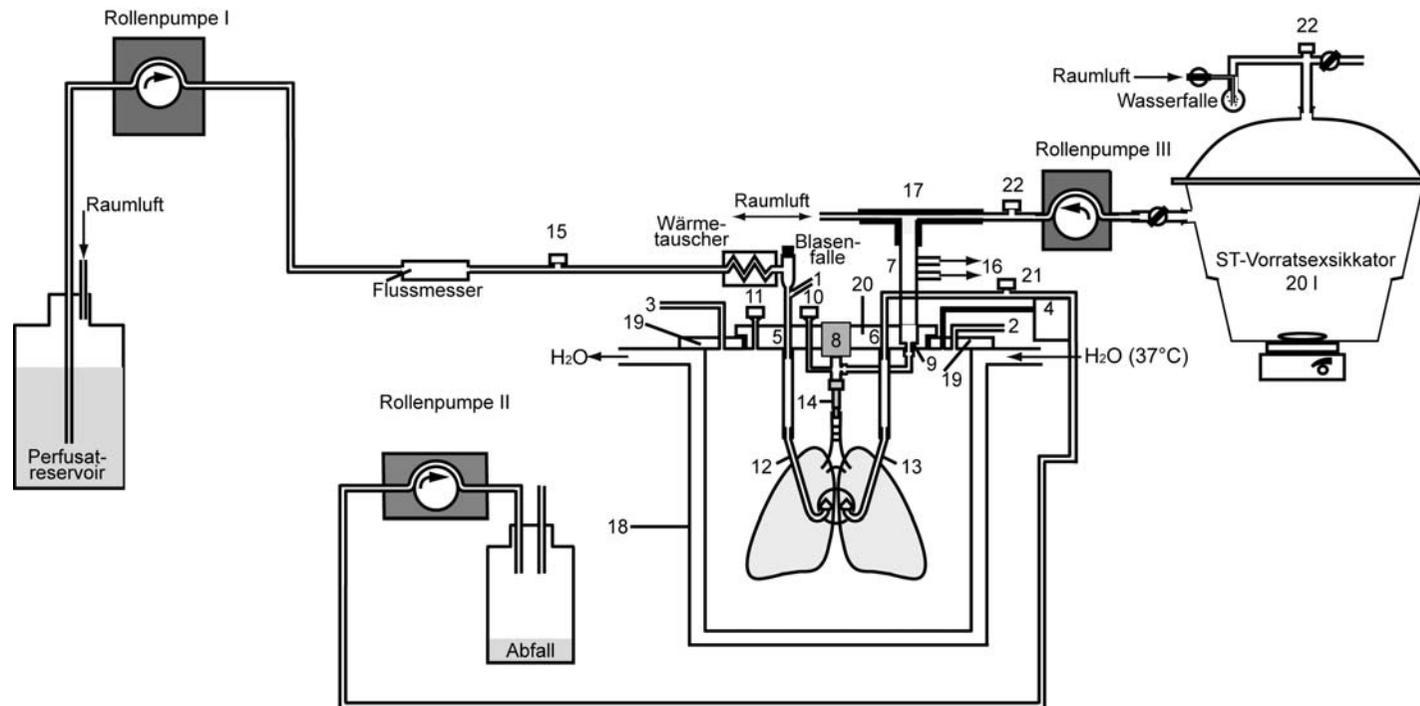
Die Bestimmung der tatsächlich inhalierten ST-Konzentration direkt in der Trachea erfolgte über eine mit Teflon Luer Lock ausgestattete und mit einer Kappe verschlossenen, speziell angefertigten Stahlkanüle (10). Diese wurde gasdicht in eine der Rohrleitungen im unteren Teil des Deckels eingeführt und mündete seitlich gasdicht über ein PTFE- und Silikonrohr in die Befestigung der Luftröhre. Die Gasproben wurden mit einer Hamilton Glasspritze mit Luer Lock Anschluss gezogen und mittels eines mit einem FID ausgestatteten Gaschromatographen (GC/FID) analysiert. Zur Bestimmung der ST-Konzentration in der Kammer wurde an den Metallanschluss einer weiteren Rohrleitung ein Probeentnahmestück mit Schraubstutzen (GL14) und einer Schraublochkappe mit Septum (11) befestigt.

Zu Abb. 3: Isolierte, perfundierte und ventilierte Mauslunge

In den Teflonverschlussstopfen des Luftbefeuchters (5) der Einatemluft wurde ein Loch gebohrt, in das ein Teflonschlauch eingeführt und über eine Rollenpumpe II (11,3 ml/min) mit dem ST-Vorratsbehälter verbunden wurde. Zur GC/FID-Bestimmung der über den modifizierten Luftbefeuchter und das Pneumotachometer inhalierten ST-Konzentration wurde eine 51 mm lange Nadel einer Hamiltonspritze durch die in die Raumluft mündende Öffnung des Luftbefeuchters bis in die Trachea eingeführt.

In Abb. 2 und Abb. 3 sind die endgültigen Versuchsanordnungen zur Exposition der Maus- bzw. Rattenlungen gegen bestimmte ST-Konzentrationen gezeigt.

Material und Methoden



- 1 Verbindung zum Differenzdruckaufnehmer (Perfusatdruck)
- 2 Verbindung zur Venturidüse
- 3 Verbindung zum Differenzdruckaufnehmer (Kammerdruck)
- 4 Druckausgleichsgefäß
- 5 Metallrohr für den Perfusateinfluss
- 6 Metallrohr für den Perfusatausfluss
- 7 Pneumotachometer
- 8 Organhalter
- 9 Verbindung von Pneumotachometer und Organhalter
- 10 Probeentnahme (gasförmiges ST) in der Trachea

- 11 Probeentnahme (gasförmiges ST) in der Kammer
- 12 Kanüle für die Arteria Pulmonalis
- 13 Kanüle für den linken Aurikel
- 14 Tracheal-Kanüle
- 15 Probeentnahmestück (einfließendes Perfusat) mit Schraubstutzen (GL14) und Schraublochkappe mit Butyl/Teflon-Septum
- 16 Differenzdruckaufnehmer zur Luftflussbestimmung
- 17 T-Stück
- 18 Künstlicher Lungenthorax (37°C)

- 19 unterer Teil des Deckels
- 20 oberer Teil des Deckels mit Verbindung zur PLUGSYS-Einheit und zum VCM
- 21 Probeentnahmestück (ausfließendes Perfusat) mit Schraubstutzen (GL14) und Schraublochkappe mit Butyl/Teflon-Septum
- 22 Probeentnahmestück (gasförmiges ST) mit Schraubstutzen (GL14) und Schraublochkappe mit Butyl/Teflon-Septum

Abb. 2: Schema der Apparatur für die isolierte, perfundierte und ventilierte Rattenlunge zur Inhalation von gasförmigem Styrol (ST) und zur gasdichten Probennahme von Styrol-7,8-oxid (SO) aus dem Perfusat

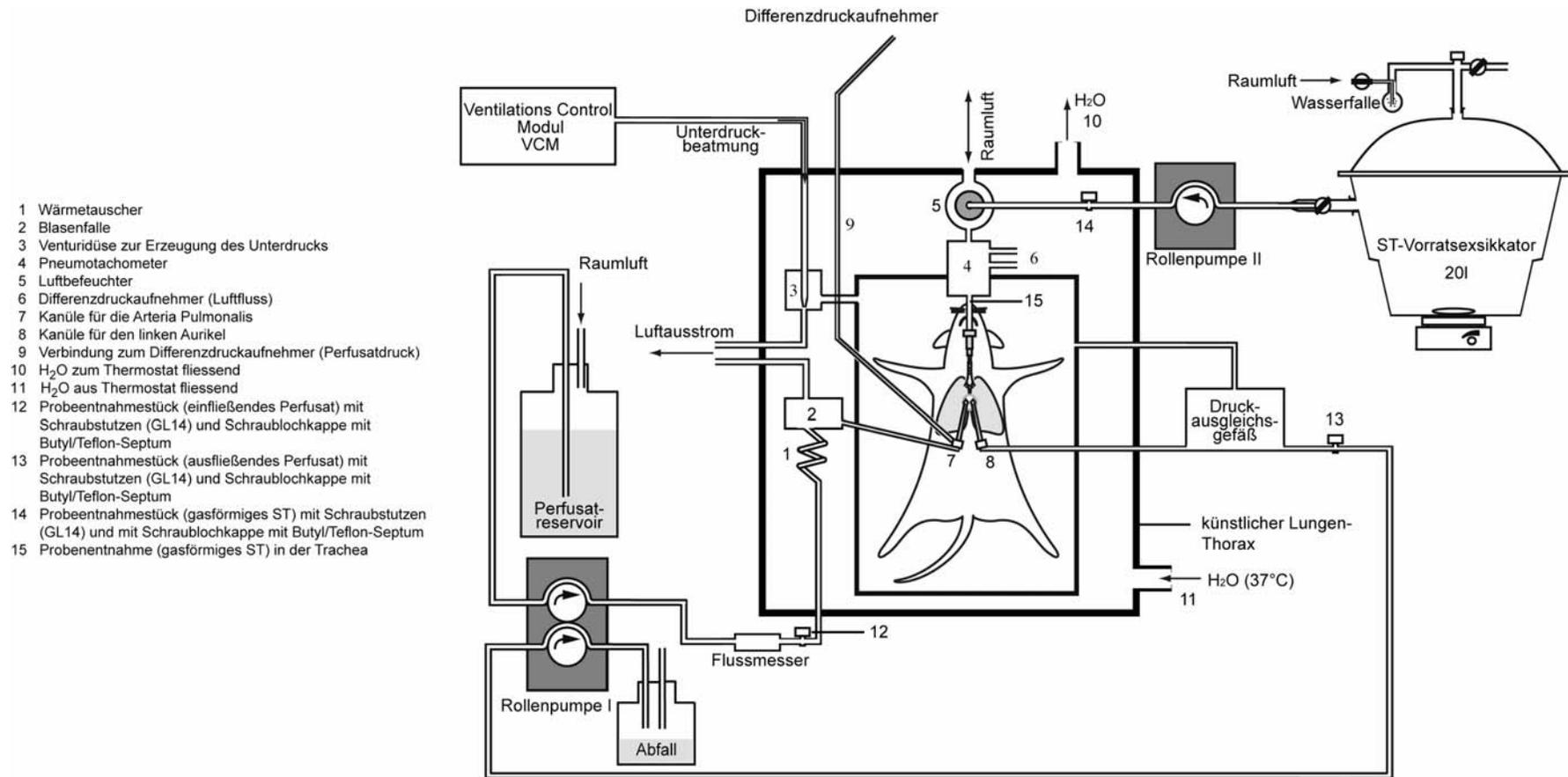


Abb. 3: Schema der Apparatur für die isolierte, perfundierte und ventilierte Mauslunge zur Inhalation von gasförmigem Styrol (ST) und zur gasdichten Probennahme von Styrol-7,8-oxid (SO) aus dem Perfusat

Um die aus dem ST-Metabolismus in der Lunge resultierende SO-Konzentration im Perfusat bestimmen zu können, wurde in dieser Arbeit bei beiden Tierarten anstelle der von Uhlig und Wollin (1994) verwendeten rezirkulierenden Perfusionstechnik das nicht-rezirkulierende Perfusionsverfahren eingesetzt (hierbei passierte das Perfusat die Lunge nur einmal). Weiterhin wurde das Perfusat anstatt mit konstantem Druck mit konstantem Fluss durch die Lunge gepumpt, da diese Methode schonender für das Organ ist.

Als Perfusatreservoir diente eine Glasflasche (Ratte: 1000 ml; Maus: 500 ml), die mit einer Schraublochkappe und einem Septum verschlossen war. In dieses Gefäß wurde eine Kanüle zum Druckausgleich und ein Teflonschlauch (Ratte: $\varnothing_{\text{Aussen}}$ 0,6 cm, $\varnothing_{\text{Innen}}$ 0,4 cm; Maus: $\varnothing_{\text{Aussen}}$ 0,4 cm, $\varnothing_{\text{Innen}}$ 0,3 cm), der mit einem Tygonschlauch (Ratte: $\varnothing_{\text{Aussen}}$ 0,45 cm, $\varnothing_{\text{Innen}}$ 0,28 cm; Maus: $\varnothing_{\text{Aussen}}$ 0,23 cm, $\varnothing_{\text{Innen}}$ 0,051cm) verbunden war, eingeführt. Dieser Schlauch führte über die Rollpumpe I, die den konstanten Fluss des Perfusats durch die Lunge regulierte. Mit dem eingebauten Flussmesser konnte die genaue Flussrate des Perfusats bestimmt werden. Bevor das Perfusat die Lungenkammer erreichte, war in den Tygonschlauch ein Probeentnahmestück mit Schraubstutzen (GL 14) und einer Schraublochkappe mit Septum zur Entnahme von Proben vor der Lunge im einfließenden Perfusat eingebaut (Ratte: 15; Maus: 12). Über einen Wärmetauscher wurde das einfließende Perfusat auf 37°C erwärmt, und eine Blasenfalle sorgte dafür, dass das Perfusat luftblasenfrei durch die Lunge gepumpt wurde. Um den Perfusionsdruck bestimmen zu können, war der Ausgang der Blasenfalle mit einem Differenzdruckaufnehmer verbunden. Das Perfusat wurde weiter mittels einer Kanüle über die Arteria pulmonalis in die Lunge geführt. Von dort gelangte es zum linken Vorhof, passierte das Druckausgleichsgefäß und wurde über einen zweiten Kanal der Rollpumpe I (Maus) bzw. der Rollpumpe II (Ratte) in einen Abfallbehälter gepumpt. Vor diesen Pumpen war ein Probeentnahmestück mit Schraubstutzen (GL 14) und einer

Schraublochkappe mit Septum, das zur Entnahme von Proben im ausfließenden Perfusat (Ratte: 21, Maus: 13) diente, eingebaut. Der Perfusionsfluss betrug $1,0 \pm 0,24$ ml/min bei der Maus und $18 \pm 1,4$ ml/min bei der Rattenlunge.

Die Lungenkammer für die isolierte, perfundierte und ventilierte Rattenlunge (siehe Abb. 2) bestand aus einem gläsernen, künstlichen Thorax (18) und einem zentrisch zweigeteilten Plexiglasdeckel (19, 20). Der untere Teil des Deckels (19) diente als Organhalter und war zum Präparieren abnehmbar. In diesen waren folgende Teile integriert: zwei Metallrohre für den Anschluss der Perfusateinfluss- (12) bzw. der Perfusatausflusskanüle (13); der Organhalter (8) und die Verbindung zwischen Pneumotachometer und dem Organhalter (9). An die zwei in den künstlichen Thorax mündenden Metallrohre (5, 6) wurden die Kanüle für die Arteria pulmonalis (einfließendes Perfusat, 12) und die Kanüle für den linken Aurikel (ausfließendes Perfusat, 13) über Silikonschläuche ($\varnothing_{\text{Aussen}} 0,4$ cm; $\varnothing_{\text{Innen}} 0,3$ cm) angeschlossen. Die Kanülen bestanden aus gebogenen Stahlrohren. Um den Verschluss der Gefäße nach der Präparation zu verhindern, waren jeweils an einem Ende dieser Stahlrohre drei dünne Stahldrähte befestigt, die zu einer Spitze zusammengeführt wurden. Der obere Teil des Deckels (20) war verbunden mit der PLUGSYS-Einheit und dem Ventilation Control Modul (VCM), über das die Überdruck-/Positivbeatmung (d.h. Luft wird durch externen Überdruck in die Lunge gepresst) erfolgte. Für die Unterdruck-/Negativbeatmung (d.h. Erzeugung eines Unterdrucks in der Lungenkammer) wurde das VCM über eine Rohrleitung im Plexiglasgehäuse mit der Venturidüse (2) verbunden. Diese wurde von der PLUGSYS-Einheit rhythmisch mit Druckluft versorgt. Dadurch, dass die Kammer mit dem Druckausgleichsgefäß und mit der Außenluft verbunden war, konnte in der Lungenkammer ein der Ein- und Ausatmung entsprechendes Druckintervall generiert werden. Zur Bestimmung des Kammerdrucks wurde ein Silikonschlauch ($\varnothing_{\text{Aussen}} 0,35$ cm, $\varnothing_{\text{Innen}} 0,25$ cm) eingefügt (3), der mit dem Differenzdruckaufnehmer verbunden war.

Der künstliche Thorax (18) bestand aus einem doppelwandigen, thermostatisierbaren, zylindrischen Glasgefäß. Die Temperatur des zirkulierenden Wassers wurde während des Versuches auf 37°C eingestellt, um die Atmosphäre in der Lungenkammer zu erwärmen. Für die Dauer des Experiments wurde der künstliche Thorax mittels zweier Metallklammern am Deckel befestigt. Während der Präparation wurde die Lunge, die mit der Tracheal-Kanüle (14) verbunden war, an den Organhalter (8) angeschlossen. Das an der Seite des Organhalters fixierte abgewinkelte Silikonrohr (9) diente als Verbindungsstück zum Pneumotachometer (7). Über diesen konnte der Luftfluss der Atmung mittels eines Differenzdruckaufnehmers (16) gemessen werden.

Der künstliche Thorax bei der Apparatur für die isolierte, perfundierte und ventilierte Mauslunge (siehe Abb. 3) bestand aus einer doppelwandigen, flachen Plexiglaswanne mit ebenfalls doppelwandigem Plexiglasdeckel. Die Kammer war ihrerseits in ein doppelwandiges Plexiglasgehäuse eingebettet in das alle notwendigen Anschlüsse und Rohrleitungen für die Perfusion und Beatmung und die Verbindung zur PLUGSYS-Einheit eingebaut waren. Die Hohlräume der Wände waren mit Wasser befüllt, das mit einem Thermostat auf 37°C temperiert wurde. Sowohl die Unterdruck- als auch die Überdruckbeatmung der Lunge erfolgte über das VCM. Mittels eines Ventilhahns konnte manuell zwischen Über- und Unterdruckbeatmung umgeschaltet werden. Im Gegensatz zur Überdruckbeatmung wurde das VCM bei der Unterdruckbeatmung über eine Rohrleitung im Plexiglasgehäuse mit der Venturidüse (3) verbunden. Die Erzeugung eines der Ein- und Ausatmung entsprechenden Druckintervalls in der Kammer erfolgte nach dem gleichen Prinzip wie bei der isolierten, perfundierten und ventilierten Rattenlunge (siehe oben). Der Luftfluss der Atmung wurde mit Hilfe des Pneumotachometers (4) über einen Differenzdruckaufnehmer (6) aufgezeichnet.

2.6 Durchführung der Expositionsversuche

2.6.1 Präparation der Lungen von Maus und Ratte

Die Präparation der Lungen erfolgte nach den von Uhlig und Wollin (1994) und Uhlig und Heiny (1995) - für die Ratten - bzw. von von Bethmann et al. (1998) - für die Mäuse - beschriebenen Methoden mit den Unterschieden, dass zum einen die Tiere erst durch Inhalation von Isofluran betäubt wurden und zum anderen den Tieren dann anstatt Pentobarbital Natrium eine Mischung aus Ketamin und Rompun[®] intraperitoneal injiziert wurde (Ratte: 0,8 ml/kg Ketamin und 1 ml/kg Rompun[®]; Maus: 1,4 ml/kg Ketamin, 0,4 ml/kg Rompun[®] in 6,3 ml einer 0,9%igen Kochsalzlösung). Nach Eintreten der Narkose wurden die Tiere intubiert und mit Überdruck beatmet. Im Anschluss an den Bauchschnitt wurde das Diaphragma entfernt und den Tieren Liquemin[®] (Ratte: 0,1 ml, Maus: 0,05 ml) in den rechten Ventrikel injiziert. Durch einen Schnitt in die Vena cava inferior wurden die Tiere ausgeblutet. Nach dem Einführen der Perfusateinfluss-Kanüle in die Pulmonararterie wurde die zuvor gelegte Ligatur um Pulmonararterie und Aorta festgezogen. Dadurch wurde die Perfusateinfluss-Kanüle fixiert und die Aorta geschlossen. Danach wurde sofort die Herzspitze mit einer Schere abgeschnitten, die Perfusatausfluss-Kanüle in den linken Ventrikel eingeführt und mit einer Ligatur fixiert. Rattenherz und -lunge wurden vorsichtig isoliert und über die Trachealkanüle am Organhalter der Lungenkammer befestigt. Nach Anklebmen des künstlichen Thorax an den Deckel wurden die Lungen sofort mit Unterdruck beatmet. Die Präparation der Mauslungen erfolgte in der geöffneten Lungenkammer ohne Herz und Lunge aus dem Körper zu separieren. Nach Entfernen des Abdomens wurde der Deckel der Lungenkammer geschlossen und die Unterdruckbeatmung gestartet.

2.6.2 Expositionsbedingungen

Ähnlich wie von Uhlig und Wollin (1994) und Uhlig und Heiny (1995) - für die Ratten - bzw. von von Bethman et al. (1998) - für die Mäuse - beschrieben, wurden die Lungen mittels Unterdruck ventiliert, mit dem Unterschied, dass die Einatemluft nicht befeuchtet wurde. Alle Expositionen wurden unter dem Abzug durchgeführt. Vor jedem Expositionsversuch wurde die Hintergrundbelastung (= Leerwert, LW) von SO im ein- und ausfließenden Perfusat bestimmt. Anschließend wurde die perfundierte Lunge mit definierten ST-Konzentrationen in der Atemluft ventiliert. Die Bestimmung der SO-Konzentrationen erfolgte aus dem ausfließenden Perfusat in einem Intervall von 5 bis 10 min beginnend 5 min nach Start der Exposition.

Vor dem Start jedes Expositionsversuchs wurde in einem Exsikkator (20 l) eine definierte ST-Dampfkonzentration erzeugt. Um die Schlauchverbindungen mit ST-haltiger Luft zu spülen, wurde nach gleichmäßiger Verteilung des Gases im Exsikkator der Glashahn geöffnet und die Rollenpumpe (III: Ratte, Abb. 2 und II: Maus, Abb. 3) angeschaltet. Zur Vermeidung eines Unterdrucks im Exsikkator wurde der Glasventilhahn der Wasserfalle geöffnet.

Zur Überwachung der Lungenmechanik wurden die Parameter Atemzugvolumen, Atemwegswiderstand und die dynamische Compliance mit der Software Pulmodyn[®] kontrolliert (Parameter siehe Tab. 8). Die hierfür benötigten Daten lieferte die PLUGSYS-Einheit, die den Perfusionsdruck, Luftfluss, Kammerdruck und Perfusionsfluss über die gesamte Versuchsdauer aufzeichnete.

Zusätzlich zu den an der PLUGSYS-Einheit manuell festgesetzten Atemzügen (Ratte: 80 min⁻¹; Maus: 90 min⁻¹) wurde alle 5 min ein tiefer Atemzug gesetzt, um die Entstehung einer Atelektase (Zustand verminderten bis fehlenden Luftgehalts in den Lungenalveolen mit entsprechend mangelhafter bis fehlender Entfaltung des entsprechenden Lungenbereichs) zu vermeiden (siehe Uhlig und Wollin, 1994). Die Dauer der ST-Expositionsversuche mit den isolierten, perfundierten und ventilierten Maus- und Rattenlungen war

abhängig von der Lungenmechanik und der Zellintegrität. Die Versuche wurden beendet, sobald sich Anzeichen eines möglichen Lungenödems ergaben. Zeichen für ein Lungenödem war der Verlust der homogenen weißen Färbung der Lungenoberfläche bzw. ein Abweichen der mechanischen Parameter (Atemzugvolumen, dynamische Compliance, Atemwegswiderstand) von den im jeweiligen Versuch kontinuierlich gemessenen Werten. Die dynamische Compliance ist ein Maß für die Dehnbarkeit der Lunge (Silbernagel und Despopoulos, 1991). Sie ist druck- und volumenabhängig und wird bestimmt, wenn der Luftfluss gleich null ist, d.h. bei vollständiger Ein- bzw. Ausatmung. Der Atemwegswiderstand beschreibt den Widerstand der Atemwege gegen den Luftfluss. Er ist abhängig vom Durchmesser und der Länge der Atemwege. Er kann über das Verhältnis von transpulmonalem Druck und der Geschwindigkeit des Luftflusses berechnet werden (Uhlig, 1992).

Zur Überprüfung der Zellintegrität wurde die Abgabe von LDH in das Perfusat mit einem Testkit bestimmt. Die Probennahme erfolgte unmittelbar vor der Exposition gegen ST und dann in Intervallen von 10 min beginnend 5 min nach Start der Exposition.

2.7 Bestimmung von Styrol-7,8-oxid im Lungengewebe

2.7.1 Physikalischer Hintergrund

Aufgrund des schnellen Metabolismus von SO im Lungengewebe war eine direkte Bestimmung der SO-Konzentration in den Lungen von ST inhalierenden Ratten und Mäusen nicht möglich. Daher wurde der Verteilungskoeffizient von SO zwischen Lunge und Perfusat ($P_{L/P}$) bestimmt, um die SO-Konzentration im Lungengewebe berechnen zu können.

Wenn die SO-Konzentration im ausfließenden Perfusat (c_{1tG}) im thermodynamischen Gleichgewicht mit der SO-Konzentration im

Lungengewebe (c_{2tG}) ist, kann diese über Gleichung (1) mit der Kenntnis des $P_{L/P}$ berechnet werden:

$$(1) \quad c_{2tG} = P_{L/P} \cdot c_{1tG}$$

Das thermodynamische Gleichgewicht wurde experimentell erreicht, sobald die SO-Konzentration im Perfusat konstant war. Unter diesen Bedingungen war die Bildungsgeschwindigkeit von SO aus ST gleich der SO-Metabolisierung in der Lunge.

2.7.2 Verteilungskoeffizient Lunge zu Perfusat von Styrol-7,8-oxid

Der $P_{L/P}$ wurde in Anlehnung an die von Filser et al. (1992) beschriebene Methode mit Rattenlungen in drei voneinander unabhängigen Experimenten bestimmt.

Eine Voraussetzung zur Bestimmung des $P_{L/P}$ war, dass SO in der Lunge nicht metabolisiert wird. Deshalb wurden die zwei Hauptmetabolismuswege von SO in der Lunge gehemmt. SO wird in diesem Organ hauptsächlich über die EH und die GST-vermittelte GSH-Konjugation metabolisiert. Die Hemmung des GST-abhängigen Metabolismus erfolgte indirekt durch Depletion von GSH (Plummer et al., 1981). Hierzu wurde den Tieren ca. 30 min vor Beginn der Präparation der Lunge Diethylmaleat (DEM, 0,6 ml/kg Körpergewicht) intraperitoneal injiziert. Anschließend wurden die Tiere dann, wie in Kapitel 2.6.1 beschrieben, narkotisiert, mit Überdruck beatmet und, um das Blut vollständig aus den Lungen zu entfernen, für 10 min mit Perfusat bei einem Fluß von 20 ml/min perfundiert. Anschließend wurden die Lungen aus der Ratte herauspräpariert, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80°C gelagert. Nach dem Auftauen der Lungen wurden diese mit einem Skalpell halbiert. Jede Hälfte wurde in ein Becherglas (10 ml) überführt, das mit physiologischer Kochsalzlösung befüllt wurde bis die Lungenhälften vollständig bedeckt waren. Zur Denaturierung

der EH wurden die Lungenhälften für 5 min in einem Wasserbad auf ca. 100°C erhitzt. Im Anschluss daran wurden die Lungenhälften vorsichtig mit einem Papiertuch abgetupft und ihr Gewicht bestimmt. Mittels eines Skalpells wurde jede Lungehälfte in kleine Streifen geschnitten und in ein Glaskulturröhrchen (7 ml) überführt. Zu jedem Röhrchen wurde 1 ml Perfusat (pH 7,4) mit einer definierten SO-Konzentration (1 $\mu\text{mol/l}$ oder 10 $\mu\text{mol/l}$) gegeben. Die Glaskulturröhrchen wurden sofort verschlossen und bei 37°C in einem Wasserbad unter Schütteln inkubiert. Um die spontane Hydrolyse von SO im Perfusat zu bestimmen, wurden zeitgleich Inkubationsansätze mit SO im Perfusat ohne Lungengewebe durchgeführt. Zu definierten Zeitpunkten (5 bis 6 Datenpunkte über einen Versuchszeitraum von 240 min) wurden Probenaliquote von 0,5 ml Perfusat aus den Inkubationsansätzen mit und ohne Lungengewebe entnommen und nach sofortiger Zugabe des internen Standards PPO wurde die SO-Konzentration mittels GC/MSD, wie in Kapitel 2.9.2 beschrieben, bestimmt.

Der $P_{L/P}$ wurde auf der Basis des Zwei-Kompartimentmodells (Abb. 4) bestimmt. Das Zwei-Kompartimentmodell beschreibt die Verteilung von SO zwischen Kompartiment 1 (Perfusat) und Kompartiment 2 (Lunge) und die durch die spontane Hydrolyse bedingte Elimination von SO in Kompartiment 1.

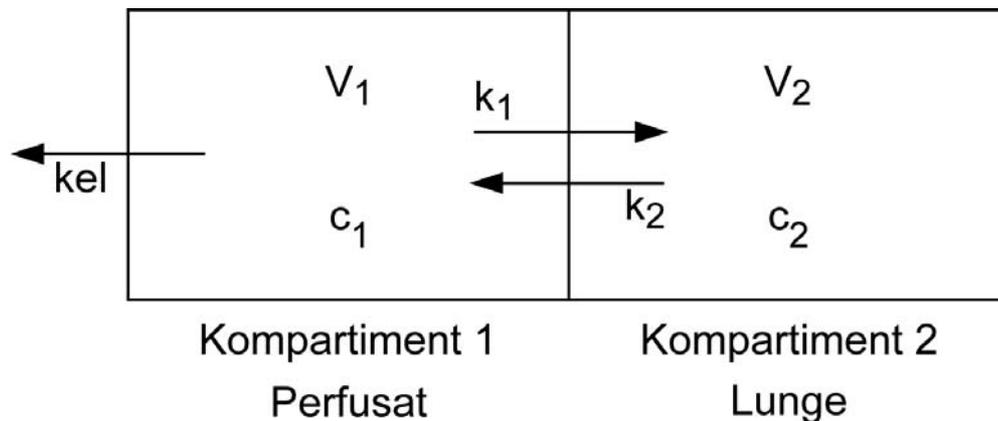


Abb. 4: Zwei-Kompartimentmodell für die Bestimmung des Verteilungskoeffizienten Lunge zu Perfusat von Styrol-7,8-oxid

- V_1 Perfusatvolumen (immer 1 ml)
- V_2 Lungengewicht [g]
- k_1, k_2 Geschwindigkeitskonstanten, die den Transport zwischen beiden Kompartimenten beschreiben
- k_{el} Geschwindigkeitskonstante der spontanen Hydrolyse von SO in Kompartiment 1
- c_1 SO-Konzentration in Kompartiment 1 (Perfusat)
- c_2 SO-Konzentration in Kompartiment 2 (Lunge)

Für den Verteilungskoeffizienten $P_{L/P}$ gilt:

$$(2) \quad P_{L/P} = \frac{k_1 \cdot V_1}{k_2 \cdot V_2}$$

Für die zeitabhängige Mengenänderung von SO im Perfusat (Kompartiment 1) gilt:

$$(3) \quad \frac{dc_1}{dt} \cdot V_1 = -(k_{el} + k_1) \cdot V_1 \cdot c_1 + k_2 \cdot V_2 \cdot c_2$$

Für die zeitabhängige Mengenänderung von SO in der Lunge (Kompartiment 2) gilt:

$$(4) \quad \frac{dc_2}{dt} \cdot V_2 = -k_2 \cdot V_2 \cdot c_2 + k_1 \cdot V_1 \cdot c_1$$

Nach Kombination von Gleichung (3) und (4) ergibt sich als Lösung der erhaltenen Differentialgleichung für die SO-Konzentration im Perfusat:

$$(5) \quad c_1 = C_1 \cdot e^{\alpha \cdot t} + C_2 \cdot e^{\beta \cdot t}$$

C_1, C_2 Initialkonzentrationen der beiden Teilfunktionen in Gleichung (5)

α, β Geschwindigkeitskonstanten der Funktion

Die Geschwindigkeitskonstante der spontanen Hydrolyse k_{el} wurde durch „curve fitting“ aus Inkubationen mit SO im Perfusat ohne Lungengewebe (d.h. ohne Kompartiment 2) bestimmt. Für die zeitabhängige Konzentration von SO gilt:

$$(6) \quad \frac{dc_1}{dt} = -k_{el} \cdot c_1$$

Hieraus ergibt sich die Funktion:

$$(7) \quad c_1 = C \cdot e^{-k_{el} \cdot t}$$

C SO-Konzentration im Perfusat ohne Lungengewebe zum Zeitpunkt $t=0$

Für die Geschwindigkeitskonstanten k_1 und k_2 ergeben sich folgende Beziehungen:

$$(8a) \quad k_1 = -k_{el} - \frac{\alpha \cdot C_1 + \beta \cdot C_2}{C_1 + C_2}$$

$$(8b) \quad k_2 = \frac{-C_1 \cdot C_2 \cdot (\alpha - \beta)^2}{(C_1 + C_2) \cdot [C_1 \cdot (k_{el} + \alpha) + C_2 \cdot (k_{el} + \beta)]}$$

Um die für die Berechnung von k_1 und k_2 benötigten Werte für k_{el} , C_1 , C_2 , α und β zu erhalten, wurde mit dem Programm Graph Pad Prism 4[®] eine Anpassung der Konzentrationszeitverläufe, die aus den SO-Inkubationen des Perfusats mit und ohne Lungengewebe resultierten, durchgeführt. Nach Berechnung von k_1 und k_2 konnte dann über Gleichung (2) der $P_{L/P}$ berechnet werden.

2.8 Umrechnung der ex vivo ermittelten Styrol-7,8-oxid-Belastungen auf in vivo vorherrschende Lungenperfu-sions- und Lungenventilationsbedingungen

Für einen Vergleich der SO-Belastungen von Maus- und Rattenlungen unter in vivo vorherrschenden Perfusions- und Ventilationsbedingungen mussten die mit den isolierten Lungen erhaltenen SO-Belastungen umgerechnet werden. Hierzu wurde folgende Gleichung verwendet:

$$(9) \quad c_{\text{SO}_{\text{Liv}}} = P_{\text{L/P}} \cdot c_{\text{1tG}} \cdot (Q_{\text{aiv}}/Q_{\text{aev}}) \cdot (Q_{\text{Lev}}/Q_{\text{Liv}})$$

- $c_{\text{SO}_{\text{Liv}}}$ SO-Konzentration in der Lunge in vivo [nmol/g]
- c_{1tG} SO-Konzentration im ausfließenden Perfusat ex vivo im thermodynamischen Gleichgewicht [nmol/ml]
- Q_{aiv} alveolares Minutenvolumen in vivo (Maus: 25 ml/min, Ratte: 117 ml/min; aus Arms und Travis, 1988)
- Q_{aev} experimentelle alveolare Ventilation ex vivo [ml/min] (berechnet aus dem Produkt von aktuellem Atemzugvolumen und festgesetzter Atemfrequenz (Maus: 90 min⁻¹, Ratte: 80 min⁻¹) multipliziert mit 2/3 für die Umrechnung von pulmonaler zu alveolarer Atmung (Arms und Travis, 1988))
- Q_{Liv} Lungenperfusion in vivo (Maus: 17 ml/min, Ratte: 83 ml/min, aus Arms und Travis, 1988)
- Q_{Lev} Lungenperfusion ex-vivo [ml/min]

2.9 Analytische Methoden

2.9.1 Gaschromatographische Bestimmung von Styrol

Die gaschromatographische Charakterisierung von ST in den Expositionsversuchen mit isolierten, perfundierten und ventilierten Maus- und Rattenlungen erfolgte über die Retentionszeit in Anlehnung an die von Filser et al. (1993) beschriebene Methode mittels eines Shimadzu 8 GC/FID von ST. Die quantitative Bestimmung von ST erfolgte über die Peakfläche.

Es wurden jeweils 50 µl gasförmigen ST mit Hilfe einer gasdichten 100 µl Hamiltonspritze direkt auf die Trennsäule (on-column) aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte isotherm auf einer Tenax TA Säule. Als Trägergas wurde N₂ und als Brenngase H₂ und synthetische Luft eingesetzt. Die

Geräteparameter zur Bestimmung von ST in der Gasphase sind in Tab.1 zusammengefasst.

Tab. 1: GC/FID-Bedingungen für die Analyse von Styrol (ST) in der Gasphase

Parameter	Bedingungen
Injektor:	
Injektortemperatur	300°C
Aufgabevolumen	50 µl
Gaschromatograph:	
Säulentemperatur	200°C
Trägergas, Stickstoff, Fluss	50 ml/min
Brenngas, Wasserstoff, Druck	50 kPa
Brenngas, Luft, Druck	60 kPa
FID:	
Detektortemperatur	300°C

Zur Überprüfung der Proportionalität zwischen der Peakfläche von ST und der ST-Konzentration wurden in Exsikkatoren durch Verdampfen von flüssigem ST bei Raumtemperatur ST-Dampfkonzentrationen im Bereich von 10 bis 1000 ppm dreimal generiert und je dreimal gaschromatographisch bestimmt. Das für eine bestimmte ST-Dampfkonzentration benötigte Volumen an flüssigem ST wurde unter der Annahme berechnet, dass sich das verdampfte ST wie ein ideales Gas verhält. Demnach nimmt nach dem Boyle-Mariotteschen Gesetz 1 mol verdampftes ST bei einem atmosphärischen Druck von 760 Torr und einer Temperatur von 273,15 K ein Volumen von 22,40 l ein. Das erforderliche Volumen an flüssigem ST, das zum Erreichen einer gewünschten Gaskonzentration im Luftraum des geschlossenen Exsikkators benötigt wird, wurde nach folgender Gleichung berechnet:

$$(10) \quad V_{\text{fl ST}} = \frac{c_{\text{gew}} \cdot V_{\text{Ex}} \cdot \text{MG}_{\text{ST}}}{\rho \cdot V_{\text{m}} \cdot 10^3}$$

- $V_{\text{fl ST}}$ erforderliches Injektionsvolumen an flüssigem ST [μl]
 c_{gew} gewünschte ST-Konzentration im Exsikkator [ppm]
 V_{Ex} Volumen des Exsikkators [ml]
 MG_{ST} Molekulargewicht von ST (104,2 g/mol)
 ρ Dichte von ST (0,91 g/ml)
 V_{m} Molvolumen [ml/mol] bei aktueller Raumtemperatur und aktuellem Tagesluftdruck

V_{m} wurde mittels des Boyle-Mariotteschen Gesetz für ideale Gase ermittelt:

$$(11) \quad V_{\text{m}} = \frac{R \cdot T}{p}$$

- R allgemeine Gaskonstante, $R = 62,367 \cdot 10^3 \left[\frac{\text{ml} \cdot \text{Torr}}{\text{K} \cdot \text{mol}} \right]$
 T aktuelle Temperatur [K]
 p Tagesluftdruck [Torr]

Die erforderliche Menge an flüssigem ST wurde mittels einer Unimetrics Spritze aus der ST-Vorratsflasche entnommen und durch ein teflonbeschichtetes Gummiseptum in den Exsikkator gespritzt. Die Gasatmosphäre des Exsikkators wurde mit einem Magnetrührer durchmischt. Bei den Expositionsexperimenten mit isolierten, perfundierten und ventilierten Maus- und Rattenlungen wurde zur Bestimmung der ST-Konzentration in der Gasphase für jeden Versuch eine Einpunkt-Kalibrierung des GC/FID durchgeführt. Hierzu wurde eine bestimmte ST-Dampfkonzentration in einem Exsikkator hergestellt und mindestens zweifach analysiert.

2.9.2 Gaschromatographische Bestimmung von Styrol-7,8-oxid und Phenylpropenoxid

Die Bestimmung von SO und PPO (interner Standard) aus den Perfusatproben erfolgte sowohl mittels GC/FID als auch GC/MSD.

a) Bestimmung mittels GC/FID

Die Charakterisierung von SO und PPO mittels GC/FID erfolgte anhand der Retentionszeit. Die Quantifizierung erfolgte über das Flächenverhältnis von SO zu PPO. Die gaschromatographische Trennung von SO und PPO mittels der Kapillarsäule DB-17 und die Detektion mit einem FID wurde in Anlehnung an die von Kessler et al. (1990) beschriebene Methode durchgeführt. Hierbei wurde ein Probenaliquot (25 µl) des aufkonzentrierten Hexanextraktes (siehe Probenaufbereitung) über eine Vorsäule direkt mit einer Hamilton 805 RN-Spritze mit on-column-Nadel auf die Kapillarsäule injiziert. Als Trägergas diente Helium. Als Brenngase wurden H₂ und synthetische Luft verwendet. Die GC/FID-Bedingungen zur Bestimmung von SO und PPO sind in Tab. 2 zusammengefasst.

Tab. 2: GC/FID-Bedingungen für die Analyse von Styrol-7,8-oxid (SO) und Phenylpropenoxid (PPO)

Parameter	Bedingungen
Injektor:	
Injektortemperatur	Starttemperatur: 100°C für 0 min Heizrate: 20°C/min Endtemperatur: 200°C für 1,0 min Abkühlen auf Starttemperatur
Injektionsvolumen	25 µl
GC:	
Säulentemperatur	Starttemperatur: 70°C für 2,5 min Heizrate 1: 2,0°C/min Endtemperatur 1: 90°C für 0 min Heizrate 2: 8,0°C/min Endtemperatur 2: 220°C für 1,0 min Abkühlen auf Starttemperatur
Trärgas Helium, Fluss	1,5 ml/min
Make up Gas Stickstoff, Fluss	35 ml/min
Brenngas Wasserstoff, Fluss	30 ml/min
Brenngas Luft, Fluss	350 ml/min
FID:	
Detektortemperatur	300°C

b) Bestimmung mittels GC/MSD

Die Charakterisierung von SO und PPO mittels GC/MSD erfolgte über die substanzspezifischen Ionen (m/z) 119 für SO und 133 für PPO und die gemeinsame m/z 89 (vgl. Bitzenhofer et al., 1993). Für die Quantifizierung wurden die Peakflächen von SO und PPO zunächst mit der manuellen Integrationsfunktion (RT-Integrator) der Software ChemStation über die gemeinsame Masse m/z 89 (Langvardt und Nolan, 1991) integriert und dann das Verhältnis der Peakflächen beider Substanzen gebildet.

Die gaschromatographische Trennung von SO und PPO mittels der Kapillarsäule HP-1-MS und die Detektion mit einem MSD erfolgte in

Anlehnung an Bitzenhofer et al. (1993) wie in Hofmann et al. (2005) beschrieben (Bedingungen siehe Tab. 3).

Die Aufzeichnung der Chromatogramme zur Bestimmung von SO und PPO erfolgte im Single Ion Modus (SIM). Vor jeder Messreihe wurde eine Justierung der Massenachsen des MSD (=Tunen) mittels Perfluortributylamin als Kalibrierstandard vorgenommen. Durch die Auswahl der Usertune-Funktion der Software konnte die Empfindlichkeit des Detektors für drei Ionen des Massenspektrums der Kalibriersubstanz maximiert werden.

Tab. 3: GC/MSD-Bedingungen für die Analyse von Styrol-7,8-oxid (SO) und Phenylpropenoxid (PPO)

Parameter	Bedingungen
Injektor:	
KAS 3-Injektortemperatur	Starttemperatur: 70°C für 2,0 min Heizrate: 10°C/min Endtemperatur: 250°C für 5,0 min
Probenaufgabe Injektionsvolumen	splitlos für 0,5 min 1 µl
GC:	
Säulentemperatur	Starttemperatur: 40°C für 0,5 min Heizrate 1: 10°C/min bis 100°C Heizrate 2: 30°C/min bis 220°C Endtemperatur: 220°C für 1,0 min Abkühlen auf Starttemperatur
Trärgas, Helium, Fluss	0,8 ml/min
MSD:	
Ionisation	Elektroneneinfang, 70 eV; Elektronenvervielfacher 2000 V
Detektortemperatur	250°C
Chromatogrammlaufzeit	9,0 min

Eichung

Zunächst wurde die Proportionalität des Detektorsignals von GC/FID und GC/MSD über einen Konzentrationsbereich von 0,1 bis 10 µmol/l SO überprüft. Dazu wurden sechs Eichproben mit verschiedenen SO-Konzentrationen im Perfusat hergestellt. Die Konzentration des internen Standards PPO betrug immer 0,5 µmol/l. Die Eichlösungen wurden analog zu den Perfusatproben aus den Versuchen (siehe Probenaufbereitung) aufgearbeitet und jede SO-Konzentration zweimal gaschromatographisch mittels FID und MSD vermessen. Zur Erstellung einer Eichgeraden wurde jeweils das Verhältnis der Peakfläche von SO zur Peakfläche von PPO gebildet. Dieses Verhältnis wurde dann gegen die SO-Konzentration in der Perfusatprobe aufgetragen und die Steigung der Eichgeraden mittels linearer Regression durch den Nullpunkt ermittelt.

Wiederfindung

Die Wiederfindung dient zur Überprüfung, ob bei der Extraktion ein Teil der Substanz (SO, PPO) verloren geht. In Anlehnung an die von Kessler et al. (1990) beschriebene Methode wurden die Wiederfindungen für SO und PPO, die mit n-Hexan aus Perfusat extrahiert wurden, bestimmt. Hierfür wurden Lösungen mit verschiedenen SO-Konzentrationen (0,5-10 µmol/l) und einer PPO-Konzentration (10 µmol/l) sowohl in Hexan als auch in Perfusat hergestellt. Diese Perfusatlösungen wurden wie unten beschrieben mit n-Hexan extrahiert und anschließend aufkonzentriert. Danach wurden alle Lösungen mittels GC/MSD analysiert. Die damit in den Hexanproben bestimmten Peakflächen von SO- und PPO wurden als 100% definiert. Die prozentuale Wiederfindung im Perfusat ergibt sich dann aus dem jeweiligen Verhältnis Peakfläche SO bzw. PPO aus den Perfusatproben zu Peakfläche von SO bzw. PPO aus den Hexanproben (Gleichung 12).

$$(12) \quad \text{Wiederfindung [\%]} = \frac{\text{Peakfläche}_{\text{Perfusat}}}{\text{Peakfläche}_{\text{Hexan}}} \cdot 100$$

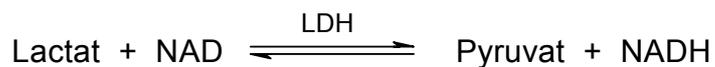
Probenaufbereitung

Um die SO-Konzentration aus den Perfusatproben der Versuche (ST-Exposition, Wiederfindung von SO und PPO, Bestimmung des $P_{L/P}$) mittels GC/FID und GC/MSD bestimmen zu können, wurden die Perfusatproben erst, wie unten beschrieben, in Anlehnung an die von Kessler et al. (1990) entwickelte Methode aufbereitet.

Zunächst wurde eine Perfusatsprobe (ST-Exposition und Wiederfindung von SO und PPO) von 2,5 ml (Ratte) bzw. 1 ml (Maus) in ein Glaskulturröhrchen (Ratte: 24 ml bzw. Maus: 7 ml) gegeben. Hierzu wurden 5 μ l einer methanolischen PPO-Lösung (250 μ mol/l) zu dem Rattenperfusat und 1 μ l einer methanolischen PPO-Lösung (500 μ mol/l) zu dem Mausperfusat pipettiert. Dies resultierte jeweils in einer 0,5 μ mol/l PPO-Lösung im Perfusat. Nach Fällung der Proteine mit Acetonitril (Ratte: 2,5 ml; Maus: 1 ml) wurde die Suspension durch zweiminütiges Schütteln von Hand mit n-Hexan (Ratte: 4,5 ml; Maus: 2 ml) extrahiert. Nach Zentrifugation (5 min; 5°C; 5000 x g) wurde der klare Hexanüberstand in ein Reaktionsgefäß überführt, und die verbleibende wässrige Phase wie oben beschrieben ein zweites Mal mit n-Hexan extrahiert. Die vereinigten Hexanphasen wurden im N_2 -Strom auf ein Volumen von 2,5 ml (Ratte) bzw. 0,5 ml (Maus) reduziert und jeweils in ein Autosamplervial mit Mikroinsert überführt. Das Vial wurde gasdicht verschlossen und die Proben bei 4°C für längstens 2 Tage gelagert. Die Stabilitäten von SO und PPO in Hexan sind unter diesen Bedingungen gewährleistet (siehe Kessler et al., 1990). Die Perfusatproben zur Bestimmung des $P_{L/P}$ wurden wie oben beschrieben mit folgenden Unterschieden aufbereitet: Perfusatvolumen 0,5 ml, PPO-Lösung im Perfusat 10 μ mol/l, Zugabe von 0,5 ml Acetonitril und 1 ml Hexan und Reduzierung der vereinigten Hexanphasen auf 0,5 ml.

2.10 Bestimmung der Lactatdehydrogenaseaktivität

Die LDH-Aktivität, als ein Marker für die Zellintegrität, wurde unter Verwendung eines Testkits (siehe Material und Methoden) photometrisch gemessen. Das Prinzip der Methode beruht auf der folgenden von LDH katalysierten reversiblen Reaktion.



NAD: Nicotinamid Adenin Dinukleotid

NADH: reduziertes Nicotinamid Adenin Dinukleotid

LDH katalysiert die Oxidation von Lactat zu Pyruvat mit gleichzeitiger Reduktion von Nicotinamid Adenin Dinukleotid (NAD). Die Bildung von reduziertem Nicotinamid Adenin Dinukleotid (NADH) resultiert in einer Zunahme der Absorption bei einer Wellenlänge von 340 nm. Die Zunahme in der Absorption bei 340 nm ist direkt proportional zur LDH-Aktivität in der Probe. Die Perfusatproben zur Messung der LDH-Aktivität und die Proben zur Bestimmung der SO-Konzentration im ein- und ausfließenden Perfusat wurden zeitgleich entnommen. Nach Zentrifugation (10 min, 1000 x g, 20°C) der Perfusatproben (1 ml) wurde ein Probenaliquot von 0,02 ml in Präzisionsküvetten aus optischem Spezialglas pipettiert. Hierzu wurden 0,5 ml Laktat (Reagenz 1) addiert und für 3 min bei 37°C vorinkubiert. Nach Zugabe von 0,125 ml NAD (Reagenz 2) und leichtem Schütteln von Hand wurde die Präzisionsküvette in das Spektrophotometer (Wellenlänge: 340 nm) gestellt. Danach wurde sofort die Absorptionsänderung in Intervallen von 30 Sekunden über einen Zeitraum von 5 Minuten bestimmt. Entsprechend wurden für jede Messreihe zwei Leerwerte (d.h. Wasserproben) gemessen. Die Berechnung der LDH-Aktivität ($\text{LDH}_{\text{Aktivität}}$) erfolgte nach Gleichung (13). Für die Bestimmung des Proportionalitätsfaktors wurden Proben mit LDH-Aktivitäten von 0 bis 76 U/l, wie oben beschrieben, gemessen und gegen die jeweiligen Absorptionsänderungen pro Minute aufgetragen.

$$(13) \quad \text{LDH}_{\text{Aktivität}} = (\Delta A/\text{min}_{\text{Probe}} - \Delta A/\text{min}_{\text{Leerwert}}) \cdot \text{Proportionalitätsfaktor}$$

Proportionalitätsfaktor	5189 (experimentell bestimmt)
$\Delta A/\text{min}_{\text{Probe}}$	Absorptionsänderung der Probe pro Minute [1/min]
$\Delta A/\text{min}_{\text{Leerwert}}$	Absorptionsänderung des Leerwerts (je zweimal mit Wasser bestimmt) pro Minute [1/min]

Die Absorptionsänderungen der Proben und der Leerwert pro Minute ($\Delta A/\text{min}_{\text{sample}}$) ergaben sich aus Gleichung (14):

$$(14) \quad \Delta A/\text{min}_{\text{Probe}} = (A_{\text{end}} - A_{\text{beg}})/\text{TR}$$

A_{end}	Absorption zu Ende des gewählten Zeitfensters
A_{beg}	Absorption zu Beginn des gewählten Zeitfensters
TR	gewähltes Zeitfenster (5 min)

2.11 Statistik

Die Kalibriergeraden wurden mittels linearer Regression durch den Nullpunkt mit dem Programm Excel[®] berechnet. Die Mittelwerte \pm SD der Messdaten sowie der statistische Vergleich der Mittelwerte der Daten mittels dem ungepaarten zweiseitigen t-Test wurden mit dem Programm Graph Pad Prism[®] 4 berechnet.

Um zu demonstrieren, dass an Hand der gemessenen Werte zur SO-Belastung nach Inhalation von ST eine fundierte Aussage über die gezeigte Abhängigkeit der SO-Belastungen von der ST-Konzentration in der Inhalationsluft der Maus- und Rattenlunge (siehe Abb. 13) getroffen werden kann, wurden die SO-Belastungen auf die ST-Exposition (1 ppm) normiert und dann dem parameterfreien, zweiseitigen Mann-Whitney-Test unterzogen (durchgeführt mit dem Programm Graph Pad Prism[®] 5). Mit Hilfe dieses Tests

werden zwei unabhängige Verteilungen miteinander verglichen. Als Ergebnis ergibt sich ein sogenannter P-Wert, der eine Aussage darüber liefert, ob die zwei Verteilungen einen gemeinsamen Median besitzen. Ergibt der Test einen hohen P-Wert besitzen die beiden Verteilungen einen gemeinsamen Median, wohingegen ein niedriger P-Wert besagt, dass die Mediane der beiden Verteilungen signifikant verschieden sind.

3 Ergebnisse

3.1 Analytische Methoden

3.1.1 Gaschromatographische Bestimmung von Styrol

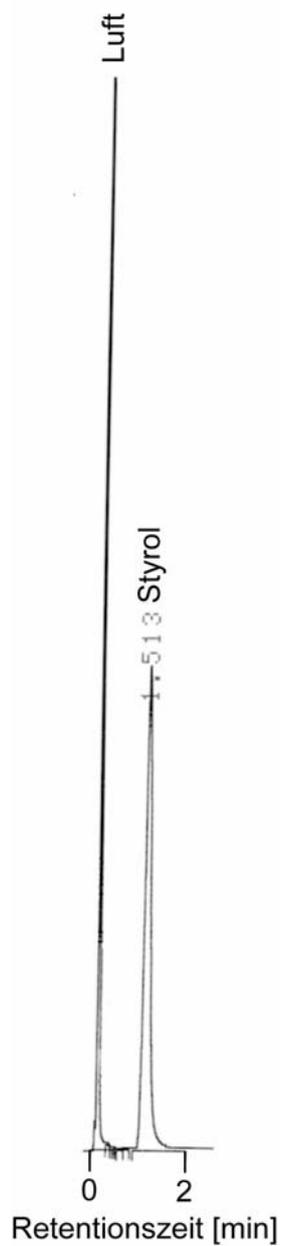


Abb. 5: GC/FID-Chromatogramm von Styrol (ST, 273 ppm) in der Gasphase; Detektorsignal gemessen als elektrische Spannung

Mit den hier verwendeten GC-Bedingungen (siehe Kapitel 2.9.1) ergab sich das in Abb. 5 dargestellte typische Chromatogramm von ST aus einem Expositionsversuch. Die Retentionszeit von ST lag bei 1,5 min.

Die Überprüfung der Proportionalität zwischen der Peakfläche und der ST-Konzentration ergab im Konzentrationsbereich von 11 bis 1000 ppm ST eine lineare Beziehung durch den Nullpunkt mit einem Bestimmtheitsmaß (R^2) von 0,9835 (Abb. 6).

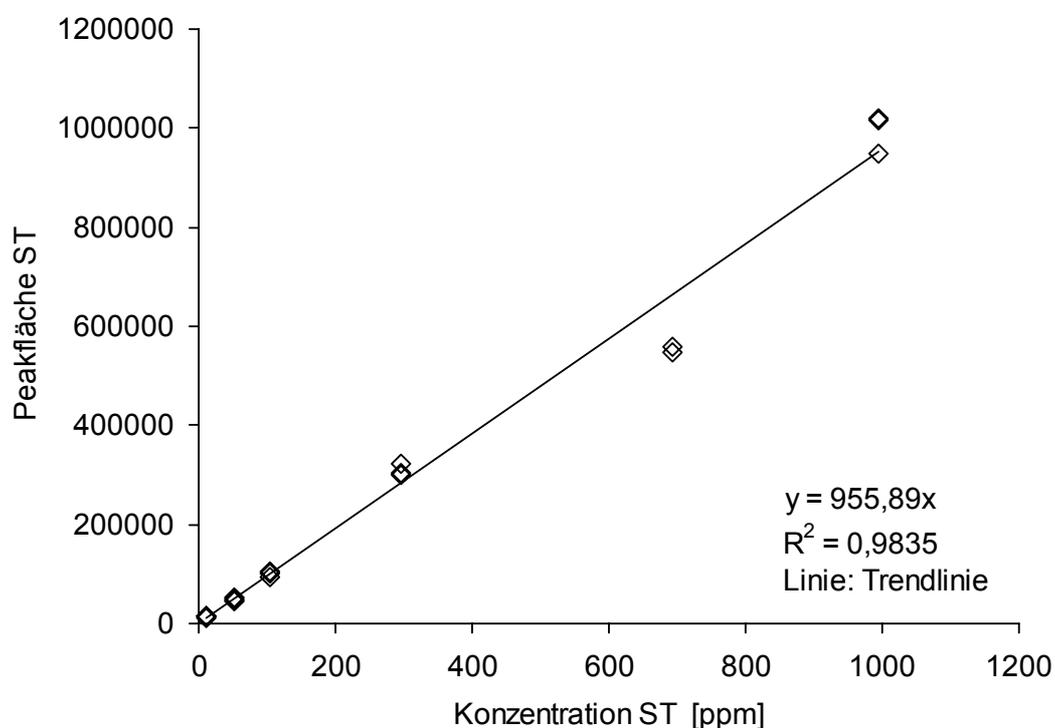


Abb. 6: Linearität der Detektorantwort für Styrol (ST) in der Gasphase am GC/FID im Bereich zwischen 11 und 1000 ppm (alle Konzentrationen wurden mindestens zweimal vermessen)

3.1.2 Gaschromatographische Bestimmung von Styrol-7,8-oxid und Phenylpropenoxid

a) Bestimmung mit GC/FID

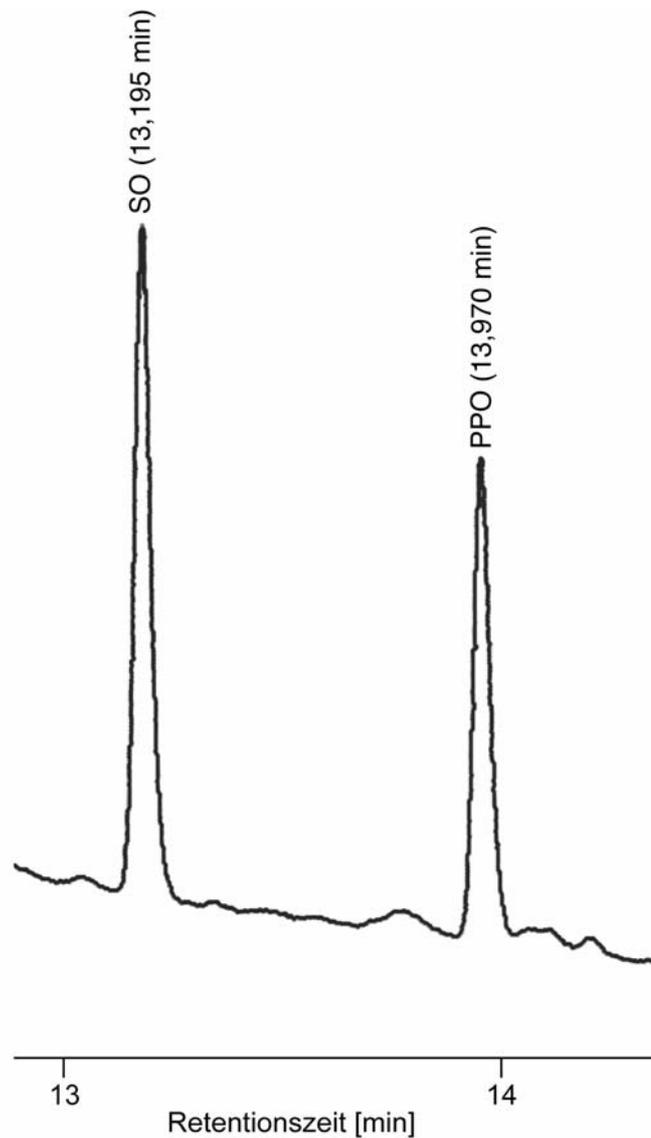


Abb.7: GC/FID-Chromatogramm von Styrol-7,8-oxid (SO) und Phenylpropenoxid (PPO) gemessen aus Perfusat; SO-Konzentration: 0,85 $\mu\text{mol/l}$; PPO-Konzentration: 0,5 $\mu\text{mol/l}$; GC/FID- Bedingungen siehe Tab. 2; Detektorsignal gemessen als elektrische Spannung

Aus den in Kapitel 2.9.2 beschriebenen Bedingungen für die GC/FID-Bestimmung von SO und PPO ergaben sich Retentionszeiten von etwa 13,2 min (SO) und 14,0 min (PPO). In Abb. 7 ist ein typisches Chromatogramm für die gaschromatographische Bestimmung von SO und PPO aus dem Perfusat mittels FID wiedergegeben.

Bei einem Injektionsvolumen von 25 μl und einem Signal/Rausch-Verhältnis von 3:1 wurde 30 nmol/l als Nachweis- und Quantifizierungsgrenze für SO im Perfusat ermittelt.

b) Bestimmung mit GC/MSD

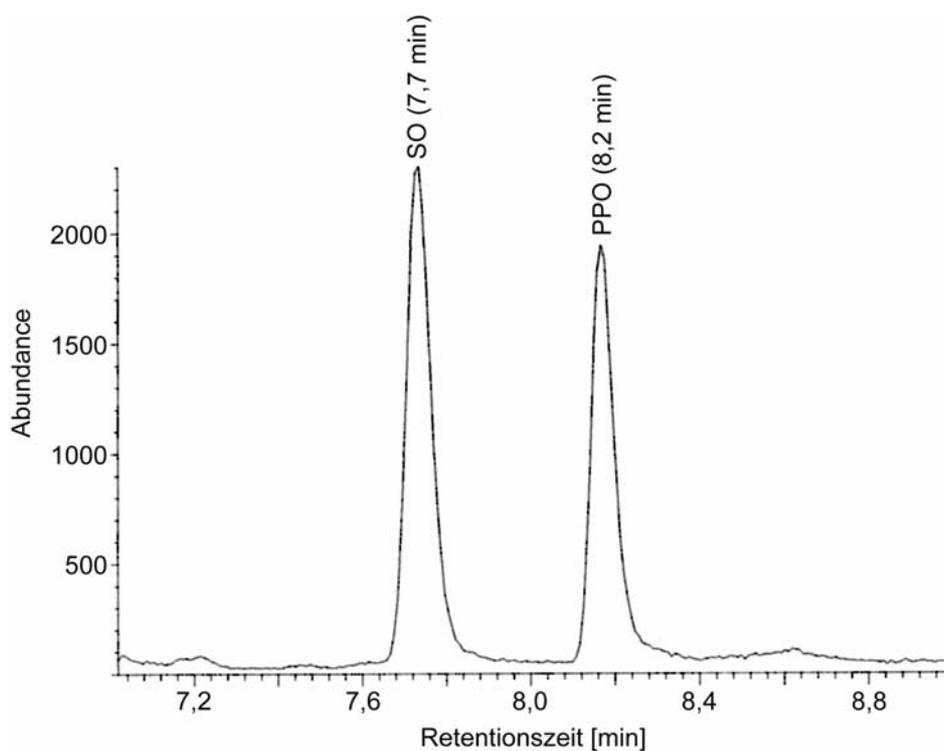


Abb. 8: GC/MSD-Chromatogramm der Masse m/z 89 von Styrol-7,8-oxid (SO: 0,78 $\mu\text{mol/l}$) und Phenylpropenoxid (PPO: 0,50 $\mu\text{mol/l}$), gemessen aus Perfusat

Abb. 8 zeigt ein typisches Chromatogramm der im SIM-Modus mittels GC/MSD gemessenen Proben. Die Retentionszeiten lagen bei etwa 7,7 min (SO) und 8,2 min (PPO). Als Nachweis- und Quantifizierungsgrenze wurde für SO 15 nmol/l bei einem Injektionsvolumen von 1 µl und einem Signal/Rausch-Verhältnis von 3:1 bestimmt.

Die nach der Beschreibung in Kapitel 2.9.2 ermittelten Eichgeraden ergaben ein Bestimmtheitsmaß von mindestens 0,998 (für GC/FID und GC/MSD; siehe Abb. 9). Vor jeder Messreihe wurde eine Dreipunkt-Eichung mit SO-Konzentrationen, die den zu erwartenden Konzentrationsbereich abdeckten, erstellt.

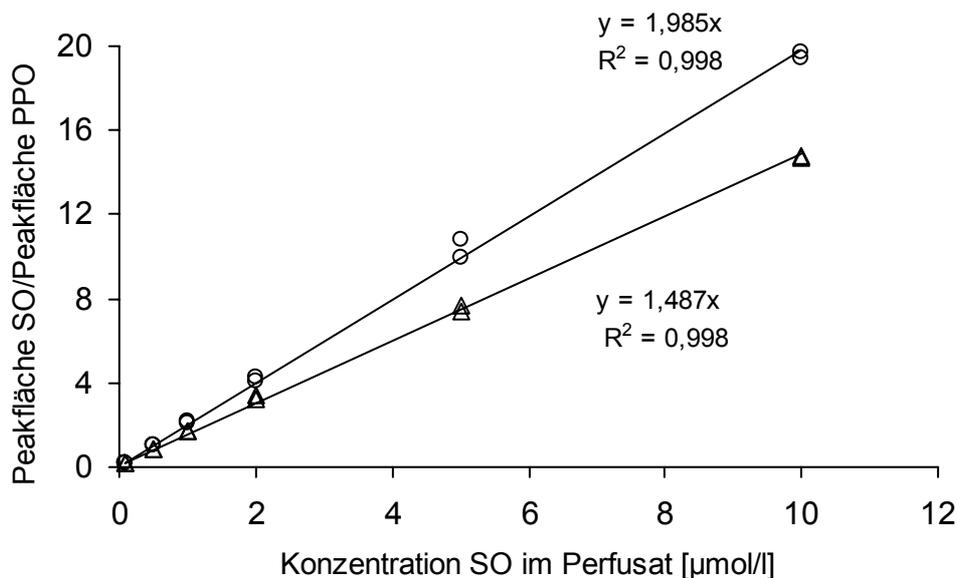


Abb. 9: Linearität der Detektorantwort für das Verhältnis Peakfläche Styrol-7,8-oxid (SO) / Peakfläche Phenylpropenoxid (PPO) im Perfusat bestimmt mittels GC/FID (Dreiecke) und GC/MSD (Kreise) im Bereich zwischen 0,1 und 10 µmol/l SO (Konzentration des internen Standards PPO: 0,5 µmol/l); alle Konzentrationen wurden zweimal gemessen; Linien: Trendlinien

In Tab. 4 sind die Ergebnisse der Versuche zur Bestimmung der Wiederfindungen von SO und PPO aus den Perfusatproben bezogen auf die Bestimmung aus Hexan (100%) zusammenfassend dargestellt. Für die Wiederfindung im Perfusat ergab sich für SO ein MW \pm SD von $56 \pm 9\%$ (n=4) und für PPO $64 \pm 5\%$ (n=5).

Tab. 4: Wiederfindung von Styrol-7,8-oxid (SO) und Phenylpropenoxid (PPO) aus Perfusat bezogen auf die Bestimmung aus Hexan (100%)

Substanz	Konzentration [$\mu\text{mol/l}$]	Wiederfindung [%]
SO	0,5	60,85
	1,0	59,31
	5,0	62,1
	10,0	43,2
PPO	10,0	$64 \pm 5^*$ (n=5)

*Mittelwert \pm SD

3.2 Verteilungskoeffizient Lunge zu Perfusat von Styrol-7,8-oxid

Die Kenntnis des $P_{L/P}$ von SO ist Voraussetzung für die Bestimmung der SO-Konzentration in der Lunge. Der $P_{L/P}$ wurde, wie in Kapitel 2.7.1 beschrieben, mit Hilfe des Zwei-Kompartimentmodells über die Abnahme von SO im Perfusat bei Inkubation mit und ohne Lungengewebe bestimmt.

Abb. 10 zeigt die Konzentrations-Zeitverläufe, die sich aus den Versuchen zur Bestimmung des $P_{L/P}$ mit und ohne Lungengewebe ergaben.

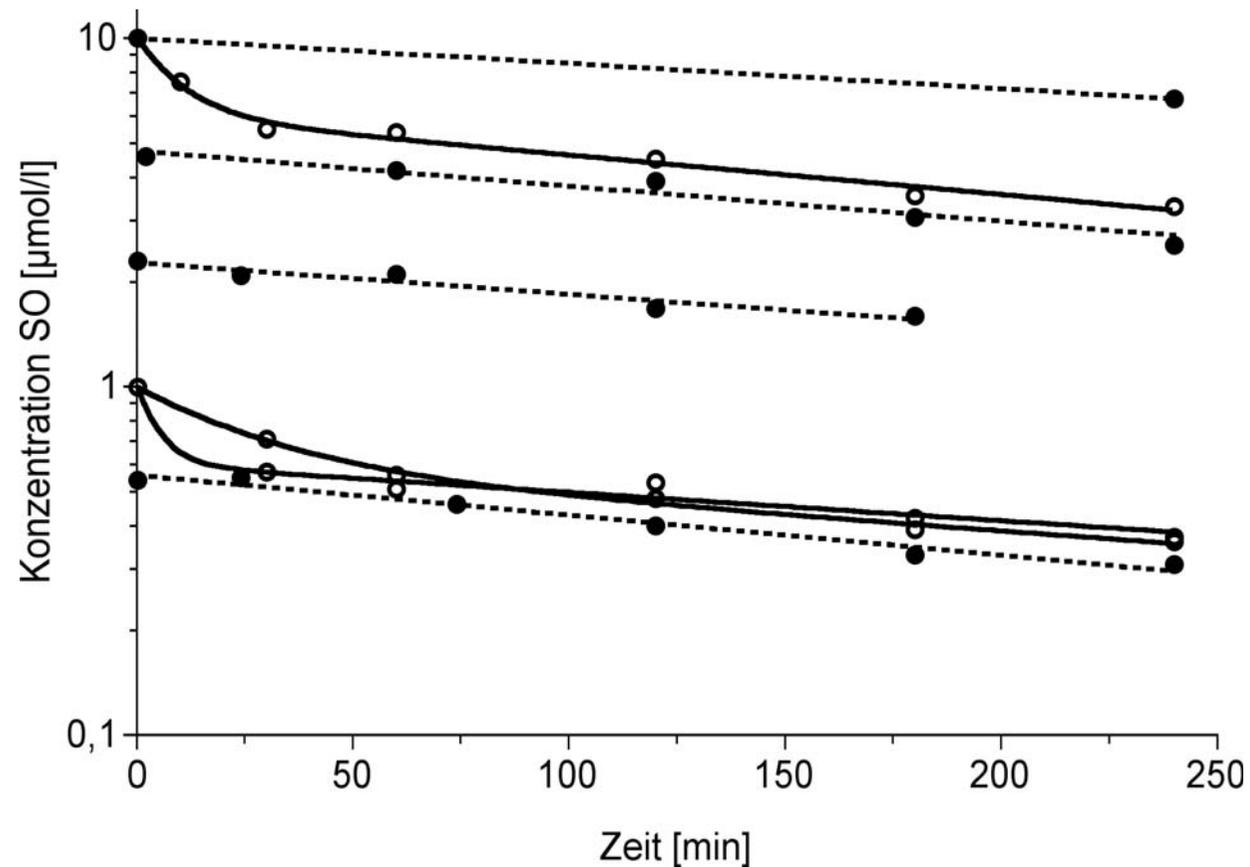


Abb. 10: Konzentrations-Zeitverläufe von Styrol-7,8-oxid (SO) im Perfusat mit (offene Symbole) und ohne (geschlossene Symbole) Lungengewebe; gestrichelte Linie : Anpassung ($c_1=C \cdot e^{-k_{el} \cdot t}$) an Werte ($n=2-6$) erhalten aus den vier Versuchen ohne Lungengewebe, Anfangskonzentrationen SO: 10, 4,8, 2,3 und 0,55 $\mu\text{mol/l}$; durchgezogene Linie: Anpassung ($c_1=C_1 \cdot e^{-\alpha \cdot t} + C_2 \cdot e^{-\beta \cdot t}$) an Werte ($n=6-7$) erhalten aus den drei Versuchen mit Lungengewebe (Inkubate), Anfangskonzentrationen SO: 10 bzw. 1,0 $\mu\text{mol/l}$

Bei den Inkubationen mit Lungengewebe lassen sich die Kurvenverläufe in zwei Abschnitte einteilen. Ein rascher Abfall zu Beginn kennzeichnet die Phase von SO, die überwiegend durch die Anreicherung von SO in der Lunge bestimmt wird. Diese Anreicherungsphase ist nach ca. 50 bis 70 min beendet. Danach nimmt die SO-Konzentration konstant nach einer Kinetik erster Ordnung ab. Dieser Abfall wird durch die spontane Hydrolyse von SO im Perfusat bedingt. Diese wurde auch separat in Versuchen ohne Lungengewebe ermittelt (Abb. 10, geschlossene Symbole). Die Kurvenverläufe der spontanen Hydrolyse folgen von Beginn an einer Kinetik erster Ordnung.

Mit Hilfe des in Kapitel 2.7.1 beschriebenen Zwei-Kompartimentmodells wurden die Parameter, die die Kurvenverläufe aus Abb. 10 charakterisieren, ermittelt (Tab. 5 und Tab. 6).

Tab. 5: Parameter, die die Konzentrations-Zeitverläufe von Styrol-7,8-oxid für die spontane Hydrolyse (siehe Abb. 10) beschreiben (Funktion: $c_1=C \cdot e^{-k_{el} \cdot t}$)

Funktionsparameter	
C [μmol/l]	k_{el} [min⁻¹]
10,00	0,0022
4,83	0,0025
2,27	0,0021
0,55	0,0025

Unabhängig von der SO-Ausgangskonzentration waren die Werte für k_{el} annähernd gleich. Die spontane Hydrolyse von SO ist demnach nicht konzentrationsabhängig. Der Mittelwert \pm SD für k_{el} betrug $0,0023 \pm 0,0002 \text{ min}^{-1}$ (n=4). Aus jedem einzelnen k_{el} wurde die Halbwertszeit über $\ln 2/k_{el}$ berechnet. Hieraus ergab sich dann bei einem pH-Wert von 7,4 eine mittlere Halbwertszeit für die spontane Hydrolyse von SO im Perfusat

von 298 ± 27 min. Diese zeigt eine gute Übereinstimmung mit der von Filser et al. (1992) bestimmten Halbwertszeit von 306 min in Kaliumphosphatpuffer (pH-Wert: 7,0).

Tab. 6: Parameter, die die Konzentrations-Zeitverläufe von Styrol-7,8-oxid für die Inkubate (siehe Abb. 10) beschreiben (Funktion: $c_1=C_1 \cdot e^{\alpha \cdot t} + C_2 \cdot e^{\beta \cdot t}$)

Anfangskonzentration [$\mu\text{mol/l}$]	Funktionsparameter			
	C_1 [$\mu\text{mol/l}$]	C_2 [$\mu\text{mol/l}$]	α [min^{-1}]	β [min^{-1}]
10	4,03	6,00	-0,096	-0,0026
1,0	0,42	0,59	-0,033	-0,0021
1,0	0,40	0,60	-0,188	-0,0019

Die Summen aus C_1 und C_2 entsprechen im Idealfall den eingesetzten Anfangskonzentrationen. Die zum Teil großen Unterschiede in den Werten für α dürften auf unterschiedlich schnell ablaufende Verteilungsprozesse zurückzuführen sein. Die große Ähnlichkeit der β -Werte rührt daher, dass die eingesetzten Lungengewichte nahezu gleich waren (Tab. 7) und ausschließlich spontane Hydrolyse stattfand.

Die in Tab. 7 dargestellten Werte für $P_{L/P}$ wurden mittels Gleichung (2) aus den oben gezeigten Parametern (Tab. 5 und Tab. 6) und aus den Lungengewichten berechnet.

Tab. 7: Werte für den Verteilungskoeffizienten Rattenlunge zu Perfusat von Styrol-7,8-oxid ($P_{L/P}$)

Lungengewicht [g]	$P_{L/P}$
0,51	1,34
0,53	1,30
0,53	1,24

Aus Tab. 7 ergibt sich ein Mittelwert (\pm SD) für $P_{L/P}$ von $1,29 \pm 0,05$ (n=3).

3.3 Mechanik und Zellintegrität der isolierten, perfundierten und ventilierten Lungen

In Abhängigkeit von der Lungenmechanik und der Zellintegrität der Maus- und Rattenlungen ergaben sich für die Dauer der ST-Expositionsversuche bei der Ratte 32 bis 43 min und bei der Maus 55 bis 68 min. In Tab. 8 sind die Mittelwerte \pm SD der Parameter der Lungenmechanik (Atemzugvolumen, Atemwegswiderstand und dynamische Compliance) aus den 24 ST-Expositionsversuchen zusammengestellt.

Die hohe SD beim Atemzugvolumen der Ratte zeigt, dass die intraspezifischen Atemzugvolumina im Mittel einer Abweichung von 59% unterlagen. Dementsprechend hoch ist bei der Ratte auch die SD bei der volumenabhängigen dynamischen Compliance. Bei der Maus hingegen beträgt die intraspezifische Abweichung der Atemzugvolumina im Mittel 21%. Somit ist auch die SD bei der dynamischen Compliance verglichen mit der der Ratte relativ gering. Der Atemwegswiderstand der Mauslunge konnte nicht bestimmt werden. Vermutlich wurde die Messung des Luftflusses durch die Art der Luftprobennahme (zur ST-Bestimmung), die direkt aus der Trachea erfolgte, gestört.

Tab. 8: Mittelwerte \pm SD der Parameter der Lungenmechanik bei Styrol-Expositionsversuchen mit isolierten, perfundierten und ventilerten Maus- (n=12) und Rattenlungen (n=12)

Parameter der Lungenmechanik	Ratte	Maus
Atemzugvolumen [ml]	2,2 \pm 1,30	0,21 \pm 0,045
Atemwegswiderstand [cm H ₂ O·s/ml]	0,46 \pm 0,14	n.b. *
dynamische Compliance [ml/cm H ₂ O]	0,20 \pm 1,30	0,027 \pm 0,005

* nicht bestimmbar

Die zur Überprüfung der Zellintegrität bestimmten durchschnittlichen LDH-Aktivitäten (\pm SD) lagen im einfließenden Perfusat (Hintergrundkontrollen) bei 7,1 \pm 4,3 U/l (n=25) und im ausfließenden Perfusat bei 6,7 \pm 4,3 U/l (n=93). Da die LDH-Aktivitäten im ein- und ausfließenden Perfusat annähernd gleich waren (Maximalwert 17, 6 U/l), wurden die Lungen als biochemisch intakt betrachtet.

3.4 Bestimmung der Styrol-7,8-oxid-Belastung von perfundierten und mit styrolhaltiger Luft ventilerten Maus- und Rattenlungen

Um die SO-Belastung von isolierten, perfundierten und mit ST-haltiger Luft ventilerten Maus- und Rattenlungen überhaupt messen zu können bedurfte es zahlreicher Vorversuche als deren Ergebnisse sich letztlich die weiterentwickelten Apparaturen für die isolierte, perfundierte und ventilierte Maus- und Rattenlunge (siehe Abb.2 und Abb.3) ergaben. Erst mit den

durchgeführten Modifikationen an den Apparaturen zur Perfusion und Ventilation von isolierten Maus- und Rattenlungen, die aufgrund der besseren Verständlichkeit bereits detailliert in Kapitel 2.5 (Seite 23-29) beschrieben wurden, war es möglich die Nagetierlunge ST-haltige Luft inhalieren zu lassen und die tatsächlich eingeatmete ST-Konzentration sowie den kurzlebigen Metaboliten SO im ausfließenden Perfusat exakt bestimmen zu können.

Abb. 11 und Abb. 12 zeigen exemplarisch für die 24 durchgeführten Expositionsversuche typische ST-Konzentrations-Zeitverläufe in der Trachea von drei Ratten- bzw. vier Mauslungen zusammen mit den resultierenden SO-Konzentrations-Zeitverläufen im ausfließenden Lungenperfusat. Die ST-Konzentrationen wurden mittels GC/FID, die SO-Konzentrationen mittels GC/FID und GC/MSD gemessen.

Der Leerwert (Hintergrundkonzentration) von SO lag bei allen Versuchen unterhalb der Nachweisgrenze. Somit entspricht die im ausfließenden Perfusat gemessene SO-Konzentration der aus ST metabolisch gebildeten SO-Konzentration in der Lunge.

Die ST-Konzentrationen in der Trachealluft der Tierlungen und die Konzentrationen des aus dem ausfließenden Perfusat bestimmten Metaboliten SO waren ab 5 min nach Start der Experimente bis zum Versuchsende bei beiden Spezies nahezu konstant. Dies ist darauf zurückzuführen, dass sich ein thermodynamisches Gleichgewicht der SO-Konzentration zwischen der Lunge und dem ausfließenden Perfusat eingestellt hatte.

Ergebnisse

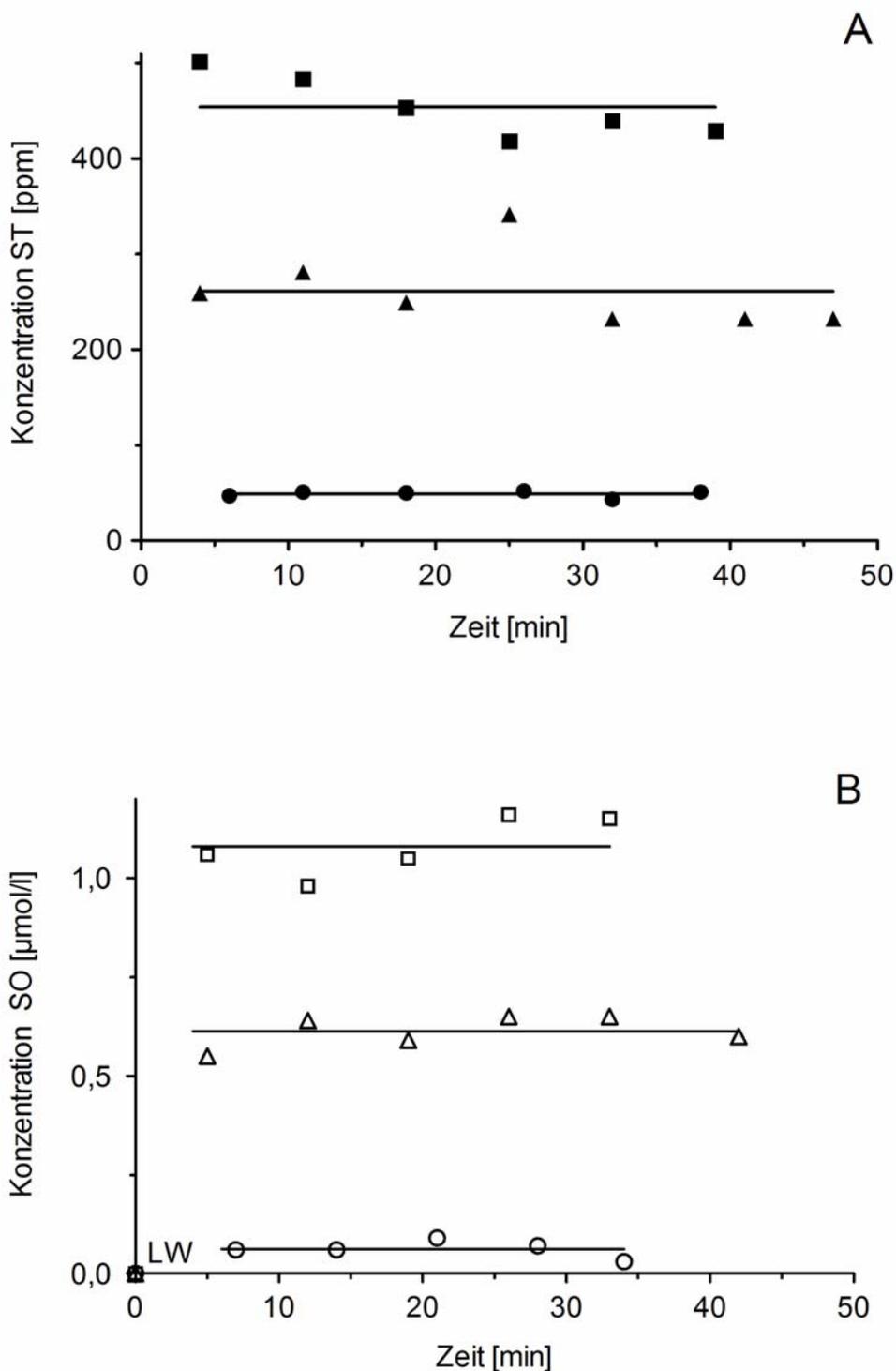


Abb.11: Exemplarische Konzentrations-Zeitverläufe von Styrol (ST; A) und von Styrol-7,8-oxid (SO; B) in drei isolierten, perfundierten und ventilerten Rattenlungen bei verschiedenen ST-Konzentrationen in der Trachealluft; verschiedene Symbole kennzeichnen verschiedene Versuche; LW: Leerwert (Hintergrundkonzentration); Linien: Mittelwerte (n=5-7) aus den jeweiligen Versuchen

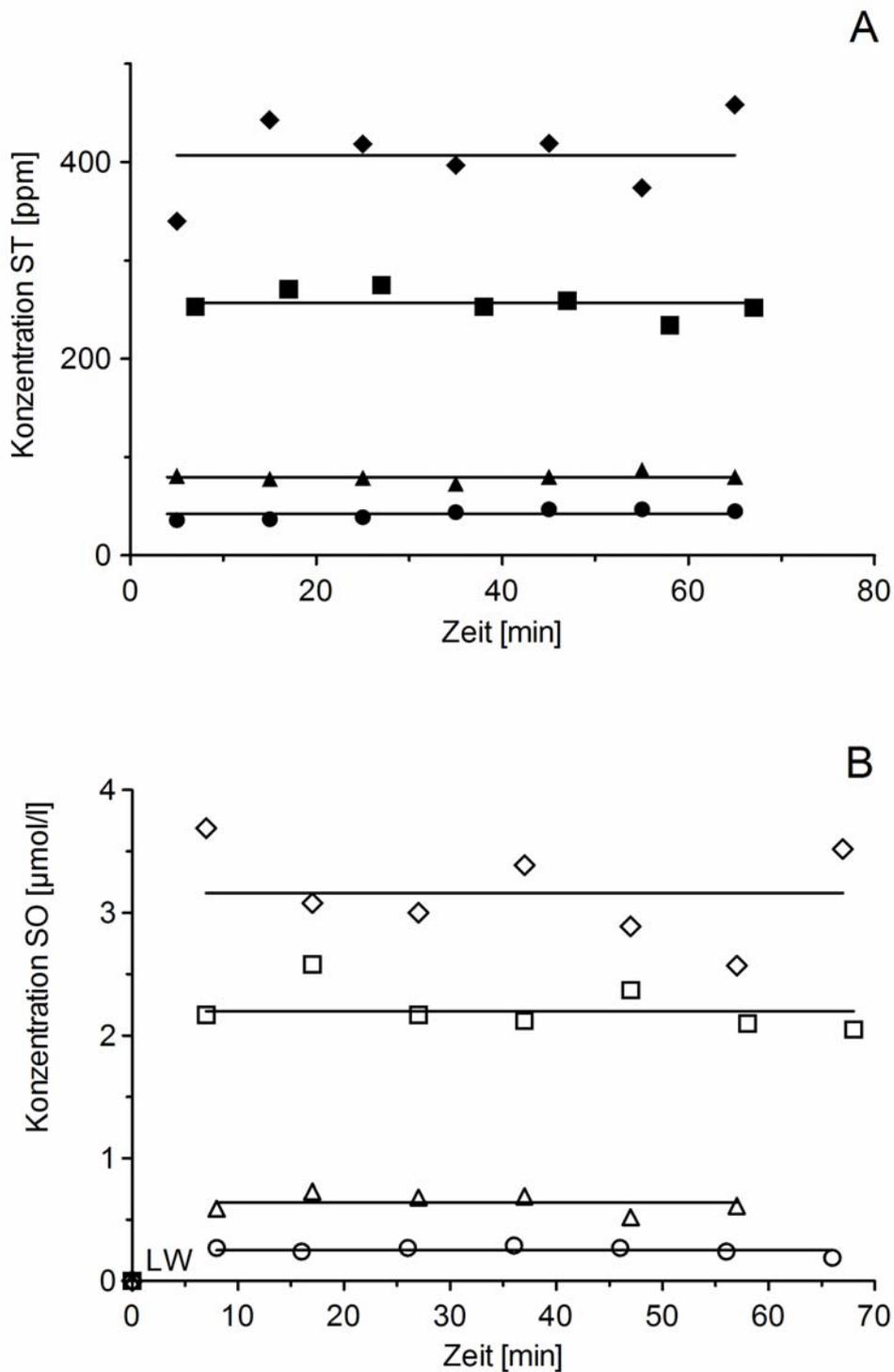


Abb.12: Exemplarische Konzentrations-Zeitverläufe von Styrol (ST; A) und von Styrol-7,8-oxid (SO; B) in vier isolierten, perfundierten und ventilerten Mauslungen bei verschiedenen ST-Konzentrationen in der Trachealluft; verschiedene Symbole kennzeichnen verschiedene Versuche; LW: Leerwert (Hintergrundkonzentration); Linien: Mittelwerte (n=6-7) aus den jeweiligen Versuchen

Ergebnisse

In den Tab. 9 und 10 sind alle aus den unterschiedlichen ST-Konzentrationen in der Trachealluft resultierenden SO-Konzentrationen im ausfließenden Perfusat, das Atemzugvolumen und der Perfusionsfluss der einzelnen Expositionsversuche (n=24) mit isolierten, perfundierten und ventilierten Maus- und Rattenlungen zusammengefasst.

Tab. 9: Mittelwerte aus 5–7 Messungen \pm SD der Styrol-Konzentration in der Trachealluft und der Styrol-7,8-oxid-Konzentration im ausfließenden Perfusat sowie Atemzugvolumen und Perfusionsfluss aus den Expositionsversuchen mit isolierten, perfundierten und ventilierten Rattenlungen (n=12)

Styrol in der Trachealluft [ppm]	Styrol-7,8-oxid im ausfließenden Perfusat [μ mol/l]	Atemzugvolumen [ml]	Perfusionsfluss [ml/min]
49 \pm 3*	0,063 \pm 0,021*	1,0	18
113 \pm 10	0,11 \pm 0,028	1,2	19
160 \pm 16	0,50 \pm 0,046	3,2	17
167 \pm 14	0,44 \pm 0,11	2,4	19
261 \pm 40*	0,61 \pm 0,040*	3,7	19
265 \pm 49	0,26 \pm 0,058	0,95	18
335 \pm 52	0,48 \pm 0,10	1,2	18
378 \pm 48	0,29 \pm 0,017	0,76	18
454 \pm 32*	1,10 \pm 0,10*	3,5	19
494 \pm 67	0,69 \pm 0,091	2,2	20
477 \pm 52	1,40 \pm 0,11	2,9	15
631 \pm 85	0,78 \pm 0,054	1,9	18

* Werte in Abb. 11

Ergebnisse

Tab. 10: Mittelwerte aus 6-7 Messungen \pm SD der Styrol-Konzentration in der Trachealluft und der Styrol-7,8-oxid-Konzentration im ausfließenden Perfusat sowie Atemzugvolumen und Perfusionsfluss aus den Expositionsversuchen mit isolierten, perfundierten und ventilierten Mauslungen (n=12)

Styrol in der Trachealluft [ppm]	Styrol-7,8-oxid im ausfließenden Perfusat [μ mol/l]	Atemzugvolumen [ml]	Perfusionsfluss [ml/min]
39 \pm 5	0,26 \pm 0,044	0,19	1,0
42 \pm 5*	0,25 \pm 0,033*	0,19	1,2
80 \pm 4*	0,64 \pm 0,077*	0,26	1,0
158 \pm 10	2,66 \pm 0,53	0,21	0,50
169 \pm 19	1,00 \pm 0,28	0,20	1,0
172 \pm 15	1,23 \pm 0,08	0,21	1,0
202 \pm 16	2,42 \pm 0,18	0,28	1,3
255 \pm 28	1,27 \pm 0,31	0,15	1,2
257 \pm 14*	2,22 \pm 0,19*	0,18	1,1
271 \pm 21	1,30 \pm 0,25	0,20	1,5
374 \pm 19	2,66 \pm 0,33	0,21	1,0
407 \pm 41*	3,16 \pm 0,39*	0,21	0,80

* Werte in Abb. 12

Die Perfusionsraten bei den isolierten, perfundierten und ventilierten Lungen waren bei der Ratte um 76 bis 82% und bei der Maus um 91 bis 97% geringer als die in vivo vorherrschenden Perfusionsbedingungen (Ratte: 83 ml/min, Maus: 17 ml/min; aus Arms und Travis, 1988). Die Reduzierung der Perfusionsflüsse war notwendig, um der Bildung von Ödemen vorzubeugen. Die aus den Atemzugvolumina berechneten Q_{aev} -Werte (vgl. Gleichung 9) betragen (Mittelwert \pm SD) für die Rattelunge 123 \pm 71 (n=12) ml/min bzw. 12 \pm 3 ml/min (n=12) für die Mauslunge. Im Mittel lagen sie bei 105% (Ratte)

bzw. 48% (Maus) der von Arms und Travis (1988) für in-vivo-Bedingungen angegebenen Werte (Q_{aiv}) von 117 ml/min (Ratte) bzw. 25 ml/min (Maus).

Abb. 13 zeigt die aus den 24 ex-vivo Versuchen mittels Gleichung 9 für in-vivo vorherrschende Lungenperfusions- und Lungenventilationsbedingungen berechneten SO-Konzentrationen in Lungen von Maus und Ratte ($c_{SO_{LIV}}$) in Abhängigkeit von der ST-Konzentration in der Atemluft. Die Kurvenanpassungen erfolgten optisch. Demnach ist bei vergleichbaren ST-Konzentrationen in der Trachealluft die SO-Belastung der Maus unter Fließgleichgewichtsbedingungen etwa doppelt so hoch wie die der Ratte. Dieser Speziesunterschied ist ausschließlich auf die aus der Lunge resultierende metabolische Bildung von SO aus ST zurückzuführen.

Beide SO-Konzentrationskurven sind gekennzeichnet durch einen Anstieg bis ca. 300 ppm ST. Im weiteren Verlauf wird entsprechend einer Sättigungskinetik ein Plateau erreicht. Dies stimmt gut mit der beobachteten in-vivo Sättigungskinetik des ST-Metabolismus überein. Der ST-Metabolismus ist bei beiden Spezies ab ca. 350 ppm gesättigt (Filser et al., 2002).

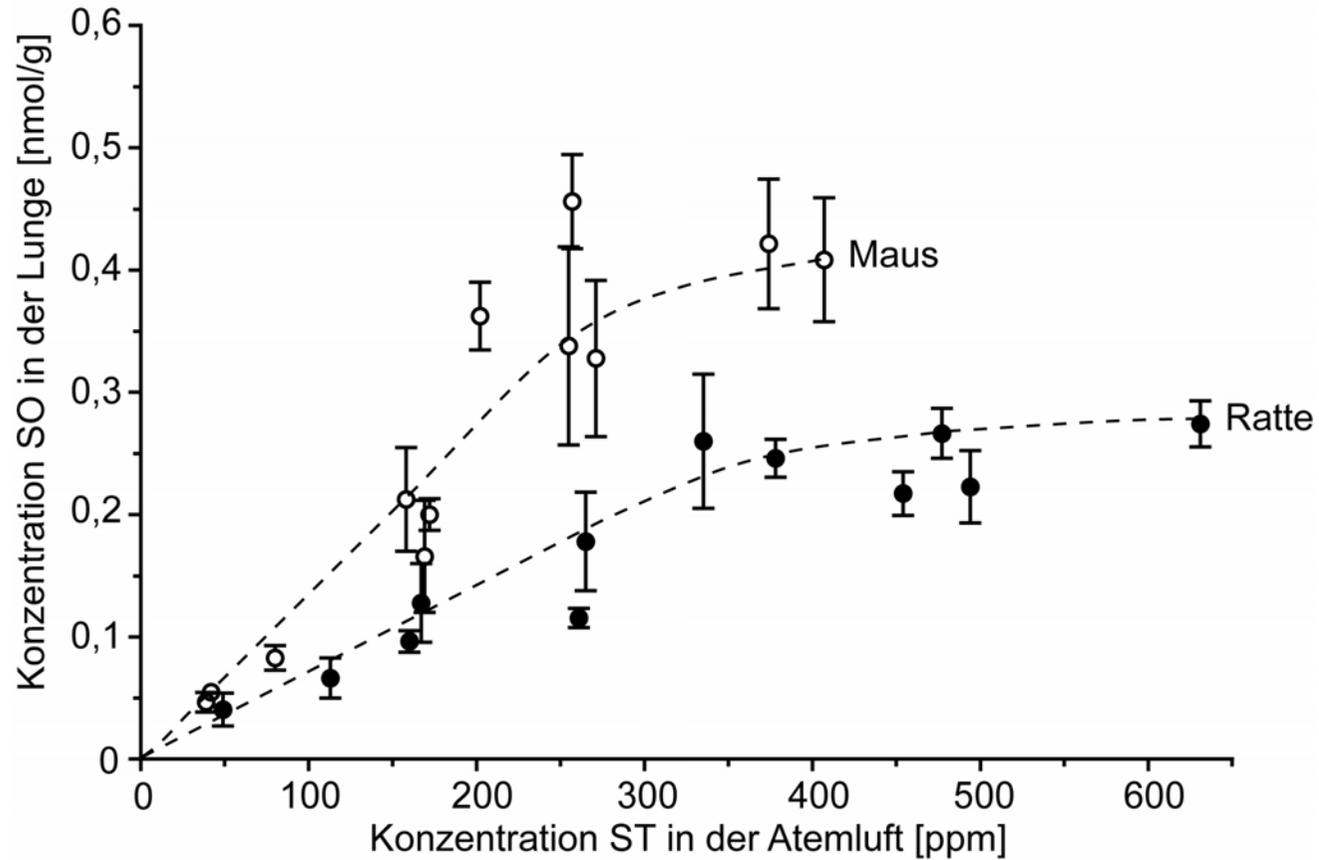


Abb. 13: Styrol-7,8-oxid (SO)-Konzentrationen für in-vivo vorherrschende Lungenperfusions- und Lungenventilationsbedingungen der Maus- (offene Symbole; n=12) und Rattenlunge (geschlossene Symbole; n=12), berechnet aus den ex-vivo Versuchen mittels Gleichung 9; Symbole \pm Fehlerbalken: Mittelwerte aus 5-7 Messungen \pm SD; gestrichelte Linien: optische Kurvenanpassungen

Die in Abb. 13 dargestellten Werte für die SO-Belastungen wurden wie in Kapitel 2.11 beschrieben dem Mann-Whitney-Test unterzogen. Hieraus resultieren die in Abb. 14 gezeigten Mediane und interquartilen Bereiche. Die Mediane sind hochsignifikant verschieden ($p < 0,0001$). Die normierten Mittelwerte (nicht dargestellt) sind nahezu identisch mit den Medianen und zeigen, dass die SO-Belastung der Mauslunge im Mittel zweifach höher ist als diejenige der gleich exponierten Rattenlunge. Aufgründdessen ist davon auszugehen, dass sich die in Abb. 13 gezeigte Abhängigkeit der SO-Belastung von der ST-Konzentration in der Inhalationsluft auch durch zusätzliche Messungen nicht wesentlich ändern würde.

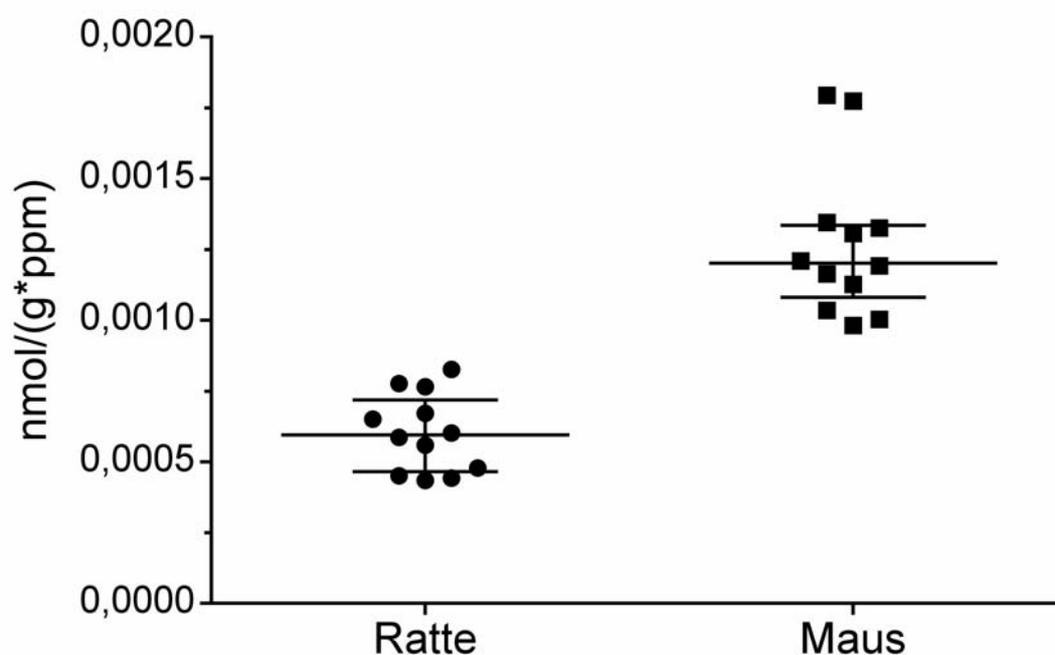


Abb. 14 Gemessene, auf 1 ppm Styrol (ST) normierte Styrol-7,8-oxid (SO)-Belastungen (nmol SO pro g Lunge pro ppm ST) von gegen ST-Konzentrationen im Bereich zwischen 39 und 631 ppm exponierten Maus- (Kreise; $n=12$) und Rattenlungen (Rechtecke; $n=12$); Symbole (Kreise, Rechtecke): Messwerte; Linien: Mediane und interquartile Bereiche (Berechnungen mit dem parameterfreien, zweiseitigen Mann-Whitney-Test, durchgeführt mit dem Programm Graph Pad Prism[®] 5)

4 Diskussion

4.1 Die isolierte, perfundierte und ventilierte Lunge

Die isolierte, perfundierte und ventilierte Lunge von Versuchstieren wird seit Jahrzehnten als ein wichtiges Modell zum Studium biochemischer Prozesse unter normalen und veränderten physiologischen Bedingungen eingesetzt. Zunächst wurden noch die Lungen von Hunden benötigt (Berry und De Burgh Daly, 1931). Mit zunehmender Verfeinerung der Methodik konnten kleinere Spezies und schließlich sogar Mäuse verwendet werden (Katze: Nisell, 1948; Kaninchen: Niemeier und Bingham, 1972; Ratte: Dalbey, 1973 zitiert in Niemeier, 1984; Meerschweinchen: Dalbey und Bingham, 1978; Maus: Skelly und Shertzer, 1983). Es werden im Wesentlichen zwei Verfahren angewendet: das etwas einfachere mit positiver Ventilation (O'Neil und Tierney, 1974; Rhoades, 1976; 1984) und das komplexere mit negativer Ventilation (Berry und De Burgh Daly, 1931; Niemeier und Bingham, 1972). Eine Weiterentwicklung des Systems von Dalbey und Bingham (1978), die es erlaubt, Untersuchungen an Lungen von Ratten und Mäusen mit negativer Ventilation vorzunehmen, fand in der vorliegenden Arbeit Anwendung (Ratte: Uhlig und Wollin, 1994; Maus: von Bethmann et al., 1998). Dieses System ist naturnäher als frühere, und die Gefahr der Ödembildung (z.B. Dalbey und Bingham, 1978) ist gering.

In einer Reihe von Arbeiten wurde mittels der isolierten, perfundierten und ventilierten Lunge auch der Fremdstoffmetabolismus in diesem Organ untersucht. Hierzu wurde der Stoff zumeist über das Perfusat verabreicht, in einigen Studien intratracheal und nur in wenigen Fällen gasförmig oder als Aerosol über die inhalierte Luft (Zusammenfassungen in: Mehendale et al., 1981; Niemeier, 1984; Rhoades, 1984; Sakagami, 2006; neuere Arbeiten mit perfundierten, ventilierten Ratten- und Mauslungen, welche Fremdstoffe inhalierten: Inhalation von NO: Weimann et al., 1999; Raveh et al., 2002; Klein et al., 2007; Benzolinhalation: Powley und Carlson, 2002; Dieselruß: Gerde et

al., 2004; Benz(a)pyren: Ewing et al., 2006). Vor allem in den früheren Arbeiten wurde rezirkulierend perfundiert. Hierdurch wurde erreicht, dass sowohl der inhalierte Stoff als auch der untersuchte Metabolit während der Expositionsdauer im Perfusat gegen einen Plateauwert anstieg, und somit die Messempfindlichkeit nicht so hoch sein musste wie in einem nicht-rezirkulierenden Verfahren. Allerdings hat die Methode der rezirkulierenden Perfusion den Nachteil, dass die unmittelbare Belastung des Perfusats durch den Metaboliten bei der Stoffpassage durch die Lunge nicht direkt aus der Messung zugänglich ist. Dies kann leicht zu einer Fehlinterpretation der gemessenen Daten führen, weil, im Gegensatz zur in-vivo-Situation, die Stoff- bzw. Metabolitenkonzentration im rückfließenden Perfusat nicht durch Weitermetabolisierung in der Leber und durch Elimination in der Niere verringert wird. In einigen Arbeiten wurde dieses Problem berücksichtigt, indem entweder ein Lunge-plus-Leber-System (Mollière et al., 1987) verwendet wurde, oder die Lunge an den Blutkreislauf des lebenden Spendertieres angeschlossen wurde (z.B. Jirsch, 1971). In der vorliegenden Arbeit existierten derartige Probleme nicht, da durch die gewählte nicht-rezirkulierende Perfusion nur diejenige Metabolitenbelastung im Perfusat bestimmt wurde, welche auf die „first-pass“-Metabolisierung zurückzuführen war. Außerdem ist es zum ersten Mal gelungen, die Belastung der Lunge durch einen sehr kurzlebigen Metaboliten (hier SO) direkt während des Expositionsexperiments durch Messung aus dem Perfusat zu ermitteln. Dass der direkte Nachweis eines so kurzlebigen Metaboliten bislang nicht gelang, könnte dadurch bedingt sein, dass in den meisten der bisherigen Metabolismusstudien mit der isolierten, perfundierten und ventilierten Lunge von Kleintieren das ausfließende Perfusat zuerst in der Lungenkammer (dem künstlichen Thorax) gesammelt und erst danach im Ausfluss bestimmt wurde. Im Gegensatz hierzu wurde in der hier verwendeten Apparatur das Perfusat ohne zeitliche Verzögerung direkt von der Pulmonalvene im linken Vorhof zur unmittelbaren Metabolitenbestimmung weitergeleitet. Hierdurch wurde auch ein möglicher Verlust von flüchtigen Metaboliten durch Verdampfen in die Lungenkammer vermieden.

Trotz der weiten Verbreitung und der vielseitigen Möglichkeiten des Lungenperfusionssystems zum Studium von lungenspezifischen Prozessen hat das System den Nachteil, dass die Perfusionsrate deutlich geringer gehalten werden muss als unter in-vivo-Bedingungen, da sonst die Gefahr der Bildung von Lungenödemen und des Zusammenbruchs der Perfusion sehr groß ist (Fisher et al., 1980; Niemeier, 1984). In der isolierten, perfundierten und ventilerten Mauslunge sind die Ventilations- und Perfusionsbedingungen noch erheblich weiter von der in-vivo-Situation entfernt als es bei der Rattenlunge der Fall ist. Die im Perfusat gemessenen Stoff- bzw. Metabolitenkonzentrationen sind abhängig von der alveolaren Ventilation und dem Perfusatfluss durch die Lunge. Ein Speziesvergleich wurde deshalb nicht unmittelbar mit den direkt erhaltenen Messwerten durchgeführt, sondern erst nach Umrechnung auf in-vivo-Bedingungen.

Die in diesen Versuchen gemessenen Atemzugvolumina und die Werte für die dynamische Compliance (siehe Tab. 8) zeigen eine gute Übereinstimmung mit den von Uhlig (1992) für die Rattenlunge ($1,60 \pm 0,16$) und von von Bethman (1997) für die Mauslunge ($0,20 \pm 0,16$) erhaltenen Werten. Die Ursache für den etwas höheren Wert (siehe Tab. 8) im Vergleich zu dem von Uhlig (1992) erhaltenen Atemwiderstandswert für die Ratte ($0,28 \pm 0,01$) ist unklar. Der im Vergleich mit der Maus höhere intraspezifische Unterschied der Atemzugvolumina der Ratte (vgl. Tab. 8) spielt beim Speziesvergleich keine Rolle, da dieser erst nach Umrechnung auf die in-vivo-Bedingungen erfolgt (s.o.).

4.2 Der Verteilungskoeffizient, ein Parameter zur Ermittlung gewebsspezifischer Stoffbelastungen

Verteilungskoeffizienten von Chemikalien sind wichtige Parameter physiologisch-toxikokinetischer Modelle (siehe z.B. die in unserer Arbeitsgruppe entwickelten Modelle für ST und seinen Metaboliten SO: Csanády et al., 1994; 2003). Solche Modelle liefern Informationen zur Verteilung der Stoffe und ihrer toxikologisch relevanten Metaboliten in verschiedenen Körperkompartimenten des Säugerorganismus in Abhängigkeit von der Expositionskonzentration. Sie dienen unter anderem als Grundlage zur Abschätzung des Risikos für den Menschen, das von Expositionen gegen Fremdstoffe in der Umwelt und am Arbeitsplatz ausgeht. Mittels physiologisch-toxikokinetischen Modellen abgeschätzte Risiken finden auch Verwendung bei der Festlegung der Maximalen Arbeitsplatz-Konzentration (MAK-Wert) eines Stoffes.

Der Verteilungskoeffizient beruht auf dem Henryschen Gesetz, welches das Löslichkeitsverhalten von (flüchtigen) Stoffen in Wasser beschreibt. Es besagt daß der Partialdruck des gelösten Stoffes über Wasser bei niedrigen Konzentrationen proportional zu seiner Konzentration im Wasser ist. Die Proportionalitätskonstante, die Henry-Konstante, ist bei konstantem Atmosphärendruck dimensionslos und stellt das Verhältnis der Konzentration eines Stoffes in der Gasphase zu seiner Konzentration im Wasser dar. Der häufig verwendete Ostwaldsche Verteilungskoeffizient ist der Kehrwert der Henry-Konstante und definiert somit die Gleichgewichtskonzentration eines Stoffes im Wasser zu der in der Gasphase (z.B. Kortüm, 1966). In Analogie hierzu werden Verteilungskoeffizienten Blut-zu-Luft bzw. Körpergewebe-zu-Luft definiert, mittels derer Verteilungskoeffizienten Blut-zu-Körpergewebe berechnet werden. Die Bestimmung der Verteilungskoeffizienten Blut-zu-Luft bzw. Körpergewebe-zu-Luft werden häufig mit Hilfe der Head-Space-Analyse vorgenommen (z.B. Sato und Nakajima, 1979; Fiserova-Bergerova und Diaz, 1986; Gargas et al., 1989). Sie beruht darauf, dass sich in einem gasdicht

verschlossenen Gefäß, welches ein definiertes Flüssigkeits- und Gasvolumen enthält, bei konstanter Temperatur ein Gleichgewicht zwischen den beiden Phasen einstellt. Nach Einstellung dieses Gleichgewichts kann der Verteilungskoeffizient aus der Abnahme der Stoffmenge in der Gasphase berechnet werden. Für den Fall, dass sich kein Gleichgewicht einstellt, sondern ein kontinuierlicher Konzentrationsabfall erfolgt, muss der Verteilungskoeffizient anhand gemessener Konzentrations-Zeitverläufe über ein kinetisches Modell, mindestens ein Zwei-Kompartimentmodell, ermittelt werden (Filser et al., 1992). Für schwerflüchtige Stoffe wie z.B. SO ist die Ermittlung des Verteilungskoeffizienten Gewebe-zu-Blut über die Verteilungskoeffizienten Gewebe-zu-Luft und Blut-zu-Luft problematisch. Für solche Fälle wurde das hier vorgestellte Verfahren entwickelt, das es erlaubt, den Verteilungskoeffizienten Gewebe-zu-Blut bzw. Perfusat aus gemessenen Konzentrations-Zeitverläufen in der flüssigen Phase zu bestimmen (Filser et al., 2002). Die Gültigkeit dieses Verfahrens wurde von Filser et al. (2002) am Verteilungskoeffizienten Fett-zu-Blut von SO bestätigt.

Der in der vorliegenden Arbeit experimentell ermittelte P_{LP} -Wert (Verteilungskoeffizient Lunge-zu-Perfusat) von 1,29 ist in guter Übereinstimmung mit dem von Csanády et al. (2003) abgeschätzten Verteilungskoeffizienten Lunge-zu-Blut von SO (1,9).

4.3 Styrol-7,8-oxid-Belastung der Lunge von Maus und Ratte bei Exposition gegen Styrol

Bei gleichen ST-Expositionskonzentrationen in der Atmosphäre (≤ 250 ppm) sind die SO-Konzentrationen in Maus- und Rattenlungen, die allein aus dem ST-Metabolismus in diesem Organ resultieren (Abb. 13) fünf- (Maus) bzw. zehnfach (Ratte) geringer als die von Kessler et al. (1992) im Blut von Mäusen und Ratten gemessenen SO-Konzentrationen. Werden die in vivo gemessenen SO-Konzentrationen im Blut mit dem Verteilungskoeffizienten Lunge-zu-Blut von SO (1,9; Csanády et al., 2003) multipliziert, ergeben sich bei ST-Expositionen gegen 160 ppm unter Fließgleichgewichtsbedingungen SO-Belastungen der Maus- und Rattenlunge von maximal 2,4 nmol/g. Dieser Wert berücksichtigt nicht die metabolische Bildung von SO aus ST sowie die Elimination von SO in der Lunge. Unter Berücksichtigung des Metabolismus von ST und SO in der Lunge wurden mittels des Modells von Csanády et al. (2003) für gleiche ST-Expositionskonzentrationen eine sehr ähnliche SO-Lungenbelastung von 1,5 nmol/g (Ratte) und 2,5 nmol/g (Maus) abgeschätzt. Hieraus war zu erwarten, dass bei beiden Spezies die aus dem ST-Metabolismus in der Lunge resultierenden SO-Konzentrationen gering seien im Vergleich zur SO-Lungenbelastung über das Blut. Dies wurde durch die in dieser Arbeit vorgelegten Daten experimentell bestätigt.

Somit gilt für ST-Exposition von Maus und Ratte, dass die SO-Belastung der Lunge hauptsächlich von der SO-Konzentration im Blut bestimmt wird und der pulmonale ST-Metabolismus, verglichen mit dem ST-Gesamtmetabolismus, nur von untergeordneter Bedeutung im Hinblick auf die SO-Lungenbelastung ist. Aus dieser Erkenntnis und unter Einbeziehung der Daten von Kessler et al. (1992) zu den SO-Blutkonzentrationen nach ST-Inhalation kann gefolgert werden, dass unterhalb von 250 ppm ST die SO-Lungenbelastungen bei Maus und Ratte nahezu gleich sind. Somit ist der von Sarangapami et al. (2002) abgeschätzte große Unterschied in der SO-Belastung der terminalen Bronchiolen von Maus und Ratte widerlegt. Eine Abschätzung des ST-

bedingten Tumorrisikos auf der Basis der SO-Belastung - wie von Sarangapani et al. (2002) vorgenommen - ist deshalb nicht sinnvoll.

4.4 Mögliche Ursachen für die durch Styrol bedingte Lungentumorigenität bei der Maus

Der geringe Speziesunterschied zwischen Maus und Ratte in der SO-Belastung der gesamten Lunge und der terminalen Bronchiolen bei Exposition gegen $ST \leq 250$ ppm ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus DNA-Bindungsstudien nach Exposition gegen ^{14}C -markiertes ST (Boogard et al., 2000). Die Autoren fanden nahezu gleiche, extrem niedrige DNA-Adduktlevel (ungefähr ein *N*7-(hydroxyphenylethyl)guanin-Addukt pro 10^8 Nukleotide) im Lungengewebe beider Spezies und den Clarazellen von Mäusen. Ein ähnlicher Guanin-Adduktlevel von 1,3 Addukten/ 10^8 Nukleotiden wurde auch bei Versuchen mit Mäusen, die sechs Stunden lang gegen ca. 170 ppm ST exponiert wurden, gefunden (Vodicka et al., 2001). Boogaard et al. (2000) berechneten auch kovalente DNA-Bindungsindizes in Lebern und Lungen der gegen ^{14}C -markiertes ST exponierten Ratten und Mäuse. Diese waren bei beiden Spezies nahezu gleich und sehr klein im Vergleich zu denjenigen, die für mutagene Chemikalien beschrieben sind (Lutz, 1979). Daraus ist abzuleiten, dass die Tumorigenität von ST nicht allein auf DNA-Adduktbildung bzw. Genotoxizität von SO zurückgeführt werden kann.

Offensichtlich müssen zusätzlich nicht-genotoxische Wirkmechanismen für die Tumorigenität von ST in Betrachtung gezogen werden. Eine wesentliche Rolle dürfte eine gesteigerte Zellproliferation spielen. Es ist allerdings unwahrscheinlich, dass diese durch die pulmonale Toxizität von SO ausgelöst wird, wie von der IARC (2002) spekuliert wurde. Sonst sollte in der kaum weniger SO-belasteten Rattenlunge ebenfalls erhöhte Zellproliferation gefunden werden. Wie eingangs ausgeführt, wird diese vermutlich durch die wiederholte Depletion von GSH in den Maus-Clarazellen ausgelöst, die mittels

physiologisch-toxikokinetischen Modellierens auf die Konjugation von GSH mit SO zurückgeführt wurde (Csanády et al., 2003). Es gibt eine Reihe von Hinweisen, dass drastische Veränderungen der GSH-Homeostase zu Zytotoxizität und Zellproliferation führen können (z.B. Rahman et al., 1999).

Damit übereinstimmend wurde nach wiederholter Exposition von Mäusen gegen ST Depletion von GSH in Mauslungenhomogenaten, Clarazelltoxizität und vermehrte Zellteilung in den Bronchiolen gefunden (Gamer et al., 2004). Neuere Daten zeigen, dass außer SO auch der ST-Metabolit 4-VP GSH-Depletion hervorrufen kann (Turner et al., 2005). 4-VP wirkt darüber hinaus zytotoxisch in Lungen und Lebern von Mäusen (Carlson et al., 2002). Nach intraperitonealer Applikation an Mäusen induzierten SO und 4-VP GSH-Depletion im bronchiolären Epithel und, insbesondere in den terminalen Bronchiolen, Zellproliferation (Kaufmann et al., 2005).

Die Rolle der GSH-Depletion bei der Entstehung von Lungentumoren bei der Maus wird auch durch Befunde gestützt, wonach andere lungentumorigene Stoffe wie z.B. Naphthalin und Kumarin, die toxisch auf Maus-Clarazellen wirken und über GSH-Konjugation metabolisiert werden (zusammengefasst in Vassallo et al., 2004), GSH-Depletion verursachen (Plopper et al., 2001; Lake, 1999). Erhöhte Zellproliferation wurde für Naphthalin in der Lunge (Oliver et al., 2009) und für Kumarin bislang nur in der Leber (Lake, 1999) nachgewiesen.

Zusammenfassend ergibt sich folgende Hypothese zur Erklärung der Entstehung von Lungentumoren bei gegen ST exponierten Mäusen: Bedingt durch den Metabolismus von ST zu SO und 4-VP kommt es durch GSH-Konjugation von SO und 4-VP und nicht ausreichend schneller Neusynthese von GSH ab einer Konzentration von 40 ppm ST zu Störungen der GSH-Homöostase in Clarazellen, was Zytotoxizität und Clarazellproliferation zur Folge hat. Obwohl die Genotoxizität von SO sehr gering ist, führt die Proliferation genetisch veränderter Clarazellen schließlich zu Lungentumorigenität.

Bei der Ratte wirkt ST nicht lungentumorigen, da der durch ST induzierte GSH-Verlust zu gering ist, um erhöhte Zellproliferation zu bewirken.

4.5 Ausblick

Um den postulierten speziesspezifischen Zusammenhang zwischen GSH-Depletion und Proliferation von Clarazellen bei ST-Exposition zu überprüfen, sollen Mäuse und Ratten wiederholt gegen verschiedene ST-Konzentrationen exponiert und in den Clarazellen verschiedener Lungenabschnitte GSH-Spiegel und Zellproliferation mittels neu zu entwickelnder mikroskopischer Verfahren bestimmt werden. Die obige Hypothese zum Wirkmechanismus wird als bestätigt angesehen werden können, wenn es sich zeigen sollte, dass bei tumorigenen ST-Konzentrationen in den terminalen Bronchiolen der Maus GSH-Depletion in Clarazellen und erhöhte Clarazellproliferation gemeinsam auftreten, bei Ratten hingegen keine derartigen Effekte gefunden werden.

5 Zusammenfassung

Als wichtige Industriechemikalie findet Styrol (ST) in der Kunststoffherstellung und -verarbeitung Einsatz. Besonders hohen ST-Konzentrationen in der Atemluft sind Arbeiter bei der Herstellung glasfaserverstärkter Kunststoffe ausgesetzt. Aufgrund des ubiquitären Vorkommens von ST ist auch die Allgemeinbevölkerung exponiert. Die Aufnahme erfolgt hauptsächlich inhalativ z.B. aus Abgasen von Verbrennungsmotoren und Industrieemissionen aber auch in geringen Mengen oral über Nahrungsmittel, die in styrolhaltigem Material verpackt waren. In Langzeitinhalationsstudien induzierte ST Lungentumoren bei der Maus, bei Ratten hingegen wurden keine tumorigenen Wirkungen gefunden. Es wurde vermutet, dass die Tumorigenität auf den genotoxischen Metaboliten Styrol-7,8-oxid (SO) zurückzuführen sei und dass bei gleicher ST-Konzentration die Mauslunge höher mit SO belastet sei als die Rattenlunge. Untersuchungen in vivo hatten allerdings ergeben, dass bei tumorigenen ST-Expositionskonzentrationen sich die SO-Konzentrationen im Blut von Ratten und Mäusen nicht sehr unterschieden. Deshalb wurde angenommen, dass die Lungen beider Spezies große Unterschiede im ST-Metabolismus aufwiesen und es dadurch zu entsprechenden Unterschieden in der SO-Lungenbelastung komme. Dementsprechend hatte die vorliegende Arbeit zum Ziel, an isolierten, perfundierten und ventilierten Ratten- und Mauslungen, die SO-Belastungen bei verschiedenen ST-Konzentrationen in der Einatemluft zu ermitteln.

Für die Experimente mit isolierten Maus- und Rattenlungen wurden käuflich erworbene, spezielle Systeme zur Perfusion und Ventilation von Lungen dieser Spezies verwendet, die so modifiziert wurden, dass die Lungen für einen Zeitraum von etwa 70 min konstante ST-Luftkonzentrationen über die Trachea einatmen konnten. Frisch operativ isolierte Lungen von Ratten und Mäusen wurden unter Unterdruck beatmet und mit einem modifizierten Krebs-Henseleit-Puffer bei 37°C perfundiert. Die mittleren ST-Konzentrationen in der Atemluft lagen zwischen etwa 40 und 410 ppm in den Experimenten mit

Lungen von Mäusen und zwischen 50 und 630 ppm ST in denjenigen mit Lungen von Ratten. ST-Atemluftkonzentrationen und die aus dem ST-Metabolismus resultierenden SO-Konzentrationen im ausfließenden Perfusat wurden während jeder Exposition wiederholt gaschromatographisch mittels Flammenionisations-Detektion und massenselektiver Detektion bestimmt. Eichkurven für beide Stoffe verliefen linear über den gesamten Bereich der experimentellen ST- und SO-Konzentrationen. Die Mechanik und Zellintegrität der Lungen wurde ebenfalls über die gesamte Versuchsdauer überprüft. Als ein Maß für die Zellintegrität der Lunge wurde die LDH-Aktivität im einfließenden Perfusat (Hintergrundkontrollen) und im ausfließenden Perfusat gemessen. Die Maximalwerte für die LDH-Aktivitäten im ein- und ausfließenden Perfusat waren identisch, daher wurden die Lungen als biochemisch intakt betrachtet. Zur Kontrolle der Lungenmechanik wurden das Atemzugvolumen, die dynamische Compliance und der pulmonale Widerstand mittels eines elektronischen Steuergerätes gemessen. Die für diese Parameter erhaltenen Werte zeigen eine gute Übereinstimmung mit entsprechenden Werten aus der Literatur. Die Berechnung der SO-Lungenbelastung erfolgte im thermodynamischen Gleichgewicht (nach Erreichen einer konstanten SO-Konzentration im ausfließenden Perfusat) über den Verteilungskoeffizienten Lungengewebe-zu-Perfusat von SO, der in getrennten Experimenten mit Lungegewebeproben in Perfusat bei 37°C bestimmt wurde. Da die Untersuchungen an isolierten, ventilierten und perfundierten Lungen zwecks Vermeidung von Lungenödemem nur mit Ventilationsraten und Perfusionsflüssen durchgeführt werden konnten, die erheblich kleiner waren als in vivo, wurden die experimentell ermittelten SO-Lungenbelastungen auf in-vivo-Ventilationen und -Lungenperfusionen umgerechnet. Erst dann wurden die durch ST-Inhalation erzielten SO-Lungenbelastungen beider Spezies verglichen.

Der zur Berechnung der SO-Lungenbelastung aus der gemessenen SO-Konzentration im Perfusat benötigte Verteilungskoeffizient Lungengewebe-zu-Perfusat betrug 1,29. Dies bedeutet, dass die SO-Löslichkeit im wässrigen Perfusat und dem fettarmen Lungengewebe nahezu gleich ist.

Die Lungen beider Spezies metabolisierten ST zu SO. Die auf in-vivo-Perfusions- und Ventilationsbedingungen bezogenen SO-Konzentrationen im Lungengewebe (SO-Belastungen) nahmen in Abhängigkeit von der ST-Expositionskonzentration bis etwa 250 ppm ST (Maus) bzw. 350 ppm ST (Ratte) linear zu, wobei die Steigung der Kurve, welche die SO-Belastung der Mauslunge reflektierte, etwa 1,9mal steiler war als die der entsprechenden Rattenlungenkurve. Oberhalb dieser Konzentrationen flachten die SO-Kurven ab und strebten gegen Plateaus, die in Mauslungen bei 0,4 und in Rattenlungen bei 0,25 nmol SO pro g Lungengewicht lagen. Die Kurvenverläufe sind charakteristisch für die Sättigungskinetik des ST-Metabolismus, der bei beiden Spezies oberhalb von 350 ppm gesättigt ist, wie aus in-vivo-Studien bekannt ist. Die Mauslungen waren bei gleichen ST-Konzentrationen etwas höher mit SO belastet als die Rattenlungen und zwar etwa 1,9fach bis zu 250 ppm ST und 1,6fach oberhalb von 350 ppm ST.

Aus diesen Ergebnissen wurde gefolgert, dass der Unterschied in der SO-Lungenbelastung zwischen Maus und Ratte zu gering sei, als dass die allein bei der Maus gefundene Lungentumorigenität von ST ausschließlich auf das genotoxische Potential von SO zurückgeführt werden könne. Als Erklärung für die speziesspezifische Lungentumorigenität wurde ein nicht-genotoxischer Mechanismus diskutiert.

6 Abkürzungen

ABS	Acrylnitril-Butadien Styrol
CYP450	Cytochrom-P450-abhängige Monooxygenase
DEM	Diethylmaleat
EH	Epoxidhydrolase
FID	Flammenionisationsdetektor
GC	Gaschromatograph
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
HSE	Hugo Sachs Elektronik
K_{ow}	Octanol/Wasser Verteilungskoeffizient
KAS	Kaltaufgabesystem
LDH	Lactatdehydrogenase
LW	Leerwert
m/z	Verhältnis Masse/Ladung eines Ions im Spektrum
MSD	massenselektiver Detektor
MW	Mittelwert
NAD	Nikotinamid Adenin Dinukleotid
NADH	reduziertes Nicotinamid Adenin Dinukleotid
$P_{L/P}$	Verteilungskoeffizient Lunge zu Perfusat von SO
ppm	parts per million
PPO	Phenylpropenoxid
PS	Polystyrol
SD	Standardabweichung
SBR	Styrol-Butadien-„rubber“
SIM	Single Ion Modus
SO	Styrol-7,8-oxid
ST	Styrol
VCM	Ventilation Control Modul
4-VP	4-Vinylphenol

7 Literatur

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR)
Toxicological Profile for Styrene; U.S. Department of Health and Human
Services, Public Health Service, Atlanta, GA, 140 pp **(1992)**

Arms A.D., Travis C.C.:
Reference physiological parameters in pharmacokinetic modeling
USEPA/6600/6-88/004, US Environmental Protection Agency **(1988)**

Bakke O.M., Scheline R.R.:
Hydroxylation of aromatic hydrocarbons in the rat
Toxicology and Applied Pharmacology, 16, 691-700 **(1970)**

Bardodej Z., Bardodejova E.:
Biotransformation of ethylbenzene, styrene and alpha-methylstyrene in man
American Industrial Hygiene Association Journal, 31, 206-209 **(1970)**

Belilies R.P., Butala J.H., Stack C.R., Makris S.:
Chronic toxicity and three-generation reproduction study of styrene monomer
in the drinking water of rats
Fundamental and Applied Toxicology, 5, 855-868 **(1985)**

Belvedere G., Elovaara E., Vainio H.:
Activation of styrene to styrene oxide in hepatocytes and subcellular fractions
of rat liver
Toxicology Letters, 23, 157-162 **(1984)**

Berry J.L., De Burgh Daly I.:
The Relation between the Pulmonary and Bronchial Vascular Systems
Proceedings of the Royal Society of London B, 109, 319-336 **(1931)**

Bitzenhofer U.N.:
Entwicklung einer gasdichten Apparatur zur Untersuchung von flüchtigen
Fremdstoffen mit der isoliert perfundierten Rattenleber - Kinetik von Styrol und
seinem Metaboliten Styrol-7,8-oxid
GSF-Bericht 24/93, GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit,
GmbH (Editor), Ingolstädter-Landstraße 1, D-85764 Neuherberg, Germany,
ISSN 0721 - 1694 **(1993)**

Bogan R.:
Kinetik des Metabolismus von Styrol und Styrol-7,8-oxid bei Hepatozyten von
Ratte, Maus und Mensch sowie Untersuchungen zur kanzerogenen
Wirksamkeit von Styrol und Bremsstrahlung an der Ratte
GSF, Neuherberg, GSF-Bericht **1994**

Bond J.A.:

Review of the toxicology of styrene

Critical Reviews in Toxicology, 19, 227-249 (1989)

Boogaard P.J., de Kloe K.P., Wong B.A., Sumner S.C., Watson W.P., van Sittert N.J.:

Quantification of DNA Adducts formed in liver, lungs, and isolated lung cells of rats and mice exposed to styrene by nose-only inhalation

Toxicology Sciences, 57, 203-216 (2000)

Brooks S.M., Anderson L., Emmett E., Carson A., Tsay J.-Y., Elia V., Buncher R., Karbowsky R.:

The effects of protective equipment on styrene exposure in workers in the reinforced plastic industry

Archives of Environmental Health, 35, 287-294 (1980)

Cantoni L., Salmona M., Facchinetti M., Pantarotto C., Belvedere G.:

Hepatic and extrahepatic formation and hydration of styrene oxide in vitro in animals of different species and sex

Toxicology Letters, 2, 179-186 (1978)

Caperos J.R., Humbert B., Droz P.O.:

Styrene exposure II. Percentage studies of absorption, excretion, and metabolism by human subjects

International Archives of Occupational and Environmental Health, 42, 223-230 (1979)

Carlson G.P.:

Effects of inducers and inhibitors on the microsomal metabolism of styrene oxide in mice

Journal of Environmental Health, 59, 591-595 (1997)

Carlson G.P.:

Metabolism of styrene oxide to styrene glycol by mouse liver and lung

Journal of Toxicology and Environmental Health A., 53, 19-27 (1998)

Carlson G.P., Hynes D.E., Mantick N.A.:

Effects of inhibitors of CYP1A and CYP2B on styrene metabolism in mouse liver and lung microsomes

Toxicology Letters, 98, 131-137 (1998)

Carlson G.P.:

Metabolism of styrene oxide to styrene glycol in enriched mouse clara cell preparations

Journal of Toxicology and Environmental Health A., 61, 709-717 (2000)

Carlson G.P., Mantick N.A., Powley M.W.:

Metabolism of styrene by human liver and lung

Journal of Toxicology and Environmental Health A., 59, 591-595 (2000)

Carlson G.P., Perez Rivera A.A., Mantick N.A.:
Metabolism of the styrene metabolite 4-vinylphenol by rat and mouse liver and lung
Journal of Toxicology and Environmental Health A., 63, 541-551 (2001)

Carlson G.P., Ullman M., Mantick N.A., Snyder P.W.:
4-Vinylphenol-induced pneumotoxicity and hepatotoxicity in mice
Toxicologic Pathology, 30, 565-569 (2002)

Carlson G.P.:
In vitro metabolism of styrene to styrene oxide in liver and lung of Cyp2E1 knockout mice
Journal of Toxicology and Environmental Health A., 66, 861-869 (2003)

Carlson G.P.:
Comparison of the susceptibility of wild-type and CYP2E1 knockout mice to the hepatotoxicity and pneumotoxic effects of styrene and styrene oxide
Toxicology Letters, 150, 335-339 (2004)

Christakopoulos A., Bergmark E., Zorcec V., Norppa H., Maki-Paakkanen J., Osterman-Golkar S.:
Monitoring occupational exposure to styrene from hemoglobin adducts and metabolites in blood
Scandinavian Journal of Work and Environmental Health, 19, 255-263 (1993)

Clay P.:
Styrene monomer does not induce unscheduled DNA synthesis in the mouse liver following inhalation exposure
Mutagenesis, 19, 489-492 (2004)

Cohen J.T., Carlson G., Charnley G., Coggon D., Delzell E., Graham J.D., Greim H., Krewski D., Medinnsky M., Monson R., Paustenbach D., Petersen D., Rappaport S., Rhomberg L., Ryan P.B., Thomson K.:
A comprehensive evaluation of the potential health risks associated with occupational and environmental exposure to styrene
Journal of Toxicology and Environmental Health, 5, 1-265 (2002)

Conti B., Maltoni C., Perino G., Ciliberti A.:
Longterm carcinogenicity bioassays on styrene administered by inhalation ingestion and injection and styrene oxide administered by ingestion in Sprague-Dawley rats, and paramethylstyrene administered by ingestion in Sprague-Dawley rats and mice
Annals of the New York Academy of Sciences, 534, 203-234 (1988)

Cruzan G., Carlson G.P., Johnson K.A., Andrews L.S., Banton M.I., Bevan C., Cushman J.R.:

Styrene respiratory tract toxicity and mouse lung tumors are mediated by CYP2F-generated metabolites

Regulatory Toxicology and Pharmacology, 35, 308-319 **(2002)**

Cruzan G., Cushman J.R., Andrews L.S., Granville G.C., Johnson K.A., Bevan C., Hardy C.J., Coombs D.W., Mullins P.A., Brown W.R.:

Chronic toxicity/oncogenicity study of styrene in CD-1 mice by inhalation exposure for 104 weeks

Journal of Applied Toxicology, 21, 185-198 **(2001)**

Cruzan G., Cushman J.R., Andrews L.S., Granville G.C., Johnson K.A., Hardy C.J., Coombs D.W., Mullins P.A., Brown W.R.:

Chronic toxicity/oncogenicity study of styrene in CD rats by inhalation exposure for 104 weeks

Toxicological Sciences, 46, 266-281 **(1998)**

Cruzan G., Cushman J.R., Andrews L.S., Granville G.C., Miller R.R., Hardy C.J., Coombs D.W., Mullins P.A.:

Subchronic inhalation studies of styrene in CD rats and CD-1 mice

Fundamental and Applied Toxicology, 35, 152-165 **(1997)**

Csanády G.A., Kessler W., Hoffmann H.D., Filser J.G.:

A toxicokinetic model for styrene and its metabolite styrene-7,8-oxide in mouse, rat and human with special emphasis on the lung

Toxicology Letters, 183, 75-102 **(2003)**

Csanády G.A., Mendrala A.L., Nolan R.J., Filser J.G.:

A physiologic pharmacokinetic model for styrene and styrene-7,8-oxide in mouse, rat and man

Archives of Toxicology, 68, 143-157 **(1994)**

Dalbey W.:

Metabolism of trichlorethylene by perfused lungs of rats and guinea pigs

Ph.D. Thesis, University of Cincinnati, OH **(1973)**

Dalbey W., Bingham E.:

Metabolism of trichlorethylene by the isolated perfused lung

Toxicology and Applied Pharmacology, 43, 267-277 **(1978)**

Delbressine L.P., Van Bladeren P.J., Smeets F.L., Seutter-Berlage F.:

Stereoselective oxidation of styrene to styrene oxide in rats as measured by mercapturic acid excretion

Xenobiotica, 11, 589-594 **(1981)**

Dhawan-Robl M., Oberste-Frielinghaus H.R., Csanády G.A., Filser J.G.:

- Depletion of pulmonary glutathione in mouse and rat caused by inhalation of styrene
Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology Suppl., 361, R139 **(2000)**
- El Masri A.M., Smith J.N., Williams R.T.:
Studies in detoxication 73. The metabolism of alkylbenzenes:
phenylacetylene and phenylethylene (styrene)
The Biochemical Journal, 68, 199-204 **(1958)**
- Ewing P., Blomgren B., Ryrfeldt A., Gerde P.:
Increasing Exposure Levels Cause an Abrupt Change in the
Absorption and Metabolism of Acutely Inhaled Benzo(a)pyrene in the
Isolated, Ventilated, and Perfused Lung of the Rat
Toxicology Sciences, 91, 332-340 **(2006)**
- Filser J.G., Kessler W., Csanády G.A.:
Estimation of a possible tumorigenic risk of styrene from daily intake via food
and ambient air
Toxicology Letters, 126, 1-18 **(2002)**
- Filser J.G., Kessler W., Schwegler U.:
Studies on toxicokinetics and macromolecular binding of styrene
Studies on the kinetics of styrene and styrene oxide in rats and mice
ECETOC, Special Report No. 3, Vol 1 **(1992)**
- Filser J.G., Schwegler U., Csanády G.A., Greim H., Kreuzer P.E., Kessler W.:
Species-specific pharmacokinetics of styrene in rat and mouse
Archives of Toxicology, 67, 517-530 **(1993)**
- Fiserova-Bergerova V., Diaz M.L.:
Determination and prediction of tissue-gas partition coefficients
International Archives of Occupational and Environmental Health, 58, 75-87
(1986)
- Fisher A., Dodia C., Linask J.:
Perfusate composition and edema formation in isolated rat lungs
Experimental Lung Research, 1, 13-21 **(1980)**
- Foureman G.L., Harris C., Guengerich F.P., Bend J.R.:
Stereoselectivity of styrene oxidation in microsomes and purified cytochrome
P-450 enzymes from rat liver
The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 248, 492-497
(1989)
- Gadberry M.G., DeNicola D.B., Carlson G.P.:
Pneumotoxicity and hepatotoxicity of styrene and styrene oxide
Journal of Toxicology and Environmental Health, 48, 273-294 **(1996)**

Gamer A.O., Leibold E., Deckardt K., Kittel B., Kaufmann W., Tennekes H.A., van Ravenzwaay B.:

The effects of styrene on lung cells in female mice and rats
Food and Chemical Toxicology, 42, 1655-1667 (2004)

Gerde P., Ewing P., Lastbom L., Ryrfeldt A., Waher J., Liden G.:
A novel method to aerosolize powder for short inhalation exposures at high concentrations: isolated rat lungs exposed to respirable diesel soot
Inhalation Toxicology, 16, 45-52 (2004)

Gram T.E.:
Chemically reactive intermediates and pulmonary xenobiotic toxicity
Pharmacological reviews, 49, 297-341 (1997)

Green T., Toghil A., Foster J.R.:
The role of cytochromes P-450 in styrene induced pulmonary toxicity and carcinogenicity
Toxicology, 169, 107-117 (2001)

Guengerich F.P., Kim D.H., Iwasaki M.:
Role of human cytochrome P-450 IIE1 in the oxidation of many low molecular weight cancer suspects
Chemical Research in Toxicology, 4, 168-179 (1991)

Guillemin M.P., Bauer D.:
Human exposure to styrene. III. Elimination kinetics of urinary mandelic and phenylglyoxylic acids after single experimental exposure
International Archives of Occupational and Environmental Health, 44, 249-263 (1979)

Henderson L.M., Speit G.:
Review of the genotoxicity of styrene in humans
Mutation Research, 589, 158-191 (2005)

Hofmann C., Pütz C., Semder B., Faller T.H., Csanády G.A., Filser J.G.:
Styrene-7,8-oxide burden in ventilated, perfused lungs of mice and rats exposed to vaporous styrene
Toxicology Sciences, 90, 39-48 (2006)

Hynes D.E., DeNicola D.B., Carlson G.P.:
Metabolism of styrene by mouse and rat isolated lung cells
Toxicology Sciences, 51, 195-201 (1999)

IARC, International Agency for Research on Cancer
Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans
Some industrial chemicals, Volume 60 (1994)

IARC, International Agency for Research on Cancer
Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans
Some Traditional Herbal Medicines, Some Mycotoxins, Naphtalene and
Styrene, Volume 82 **(2002)**

IPCS, International Programme on Chemical Safety
am 30.05.2009 heruntergeladen von
www.cdc.gov/niosh/ipcsneng/neng0073.html **(1994)**

ISIF, International Styrene Industry Forum
am 25.05.2009 heruntergeladen von
[http:// www.styreneforum.org](http://www.styreneforum.org) **(2006)**

Jersey G.C., Balmer M.F., Quast J.F.:
Two-year chronic inhalation toxicity and carcinogenicity study on monomeric
styrene in rats
Dow Chemical Study for the Chemical Manufacturing Association **(1978)**

Jirsch D.W., Fisk R.L., Boeme G., Modry D., Cecil M.:
Tweleve Hour Perfusion of Isolated Pulmonary Lobes
Chest, 60, 44-48 **(1971)**

Johanson G., Ernstgard I., Gullstrand E., Löf A., Osterman-Golkar S., Williams
C.C., Sumner S.C.J.:
Styrene oxide in blood, hemoglobin adducts, and urinary metabolites in
human volunteers exposed to ¹³C₈-styrene vapors
Toxicology and Applied Pharmacology, 168, 36-49 **(2000)**

Kapitulnik J., Levin W., Morecki R., Dansette P.M., Jerina D.M., Conney A.H.:
Hydration of arene and alkene oxides by epoxide hydrase in human liver
microsomes
Clinical Pharmacology and Therapeutics, 21, 158-165 **(1977)**

Kaufmann W., Mellert W., van Ravenzwaay B., Landsiedel R., Poole A.:
Effects of styrene and its metabolites on different lung compartments of the
mouse-cell proliferation and histomorphology
Regulatory Toxicology and Pharmacology, 42, 24-36 **(2005)**

Kessler W., Jiang X., Filser J.G.:
Direct determination of styrene-7,8-oxide in blood by gas chromatography with
flame ionization detection
Journal of Chromatography, 534, 67-75 **(1990)**

Kessler W., Jiang X., Filser J.G.:
Pharmacokinetik von Styrol-7,8-oxid bei Maus und Ratte. In: Kreutz R. &
Piekarski C., eds, 32nd Annual Meeting of the German Society of Occupational
Medicine, Köln, Stuttgart, Gentner Verlag, 622-626 **(1992)**

Klein A., Zils U., Bopp C., Gries A., Martin E., Gust R.:
Low-Dose Phosphodiesterase Inhibition Improves Responsiveness to Inhaled Nitric oxide in isolated lungs from endotoxemic rats
Journal of Surgical Research, 138, 224-230 (2007)

Korn M., Gröferer W., Filser J.G., Kessler W.:
Styrene-7,8-oxide in blood of workers exposed to styrene
Archives of Toxicology, 55, 59-63 (1994)

Kortüm G.:
Einführung in die chemische Thermodynamik.
Verlag Chemie Weinheim , 5. Auflage (1966)

Lake B.G.:
Coumarin metabolism, toxicity and carcinogenicity: relevance for human risk assessment
Food and Chemical Toxicology, 37, 423-453 (1999)

Langvardt W., Nolan R.J.:
Determination of styrene-7,8-oxide in whole blood by gas chromatography-mass spectrometry
Journal of Chromatography, 567, 93-103 (1991)

Leibmann K.C., Ortiz E.:
Oxidation of indene in liver microsomes
Molecular Pharmacology, 4, 201-207 (1968)

Lenvik K., Osvoll P.O., Woldbaek T.:
Occupational exposure to styrene in Norway, 1992-1996
Applied Occupational and Environmental Hygiene, 14, 165-170 (1999)

Lickly T.D., Breder C.V., Rainey M.L.:
A model for estimating the daily dietary intake of a substance from food-contact articles: Styrene from polystyrene food-contact polymers
Regulatory Toxicology and Pharmacology, 21, 406-417 (1995)

Lijinsky W.:
Rat and mouse forestomach tumors induced by chronic oral administration of styrene oxide
Journal of National Cancer Institute, 77, 471-476 (1986)

Linhart I., Gut I., Smejkal J., Novák J.:
Biotransformation of styrene in mice. Stereochemical aspects
Chemical Research in Toxicology, 13, 36-44 (2000)

Löf A., Gullstrand E., Lundgren E., Nordqvist M.B.:
Occurrence of styrene-7,8-oxide and styrene glycol in mouse after the

administration of styrene

Scandinavian Journal of Work, Environment & Health, 10, 179-187 (1984)

Lutz W.K.:

In vivo covalent binding of organic chemicals to DNA as a quantitative indicator in the process of chemical carcinogenesis

Mutation Research, 65, 289-356 (1979)

Maestri L., Ghittori S., Imbriani M.:

Determination of specific mercapturic acids as an index of exposure to environmental benzene, toluene, and styrene

Industrial Health, 35, 489-501 (1997)

Manini P., Andreoli R., Poli D., De Paula G., Mutti A., Niessen W.M.:

Liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry characterization of styrene metabolism in man and in rat

Rapid Communications in Mass Spectrometry, 16, 2239-2248 (2002)

Mannsville Chemical Products Corp.

Chemical Products Synopsis: Styrene, Cortland, NY (1987)

Mehendale H.M., Angevine L.S., Ohmiya Y.:

The isolated perfused lung - a critical evaluation

Toxicology, 21, 1-36 (1981)

Mendrala A.L., Langvardt P.W., Nitschke K.D., Quast J.F., Nolan R.J.:

In vitro kinetics of styrene and styrene oxide metabolism in rat, mouse, and human

Archives of Toxicology, 67, 18-27 (1993)

Mollière M., Foth H., Kahl R., Kahl G.F.:

Metabolism of Benzo[a]pyrene in the combined rat liver-lung perfusion system

Toxicology, 45, 143-154 (1987)

Morgan D.L., Mahler J.F., Dill J.A., Price H.C. Jr., O'Connor R.W., Adkins B. Jr.:

Styrene inhalation toxicity studies in mice. II. Sex differences in susceptibility of B6C3F1 mice

Fundamental and Applied Toxicology, 21, 317-325 (1993b)

Morgan D.L., Mahler J.F., O'Connor R.W., Price H.C. Jr., Adkins B. Jr.:

Styrene inhalation toxicity studies in mice. I. Hepatotoxicity in B6C3F1 mice

Fundamental and Applied Toxicology, 20, 325-335 (1993a)

Mukthar H., Bresnick E.:

Mouse liver and lung glutathione S-epoxide transferase: effects of phenobarbital and 3-methylcholantrene administration

Chemico-Biological Interactions, 15, 59-67 **(1976)**

Nakajima T., Elovaara E., Gonzalez F.J., Gelboin H.V., Raunio H., Pelkonen O., Vainio H., Aoyama T.:

Styrene metabolism by cDNA-expressed human hepatic and pulmonary cytochromes P450

Chemical Research in Toxicology, 7, 891-896 **(1994b)**

Nakajima T., Wang R.-S., Elovaara E., Gonzalez F.J., Gelboin H.V., Vainio H., Aoyama T.:

CYP2C11 and CYP2B1 are major cytochrome P450 forms involved in styrene oxidation in liver and lung microsomes from untreated rats, respectively

Biochemical Pharmacology, 48, 637-642 **(1994a)**

NCI, National Cancer Institute:

Bioassay for styrene for possible carcinogenicity (CAS No. 100-42-5) (Tech. Rep. Ser. No. 185; DHEW Publ. No. NIH 79-1741)

US Governmental Printing Office, Washington DC **(1979b)**

NCI, National Cancer Institute:

Bioassay of a solution of β -nitrostyrene and styrene for possible carcinogenicity (CAS No. 102-96-5, CAS No. 100-42-5) (Tech. Rep. Ser. No. 170; DHEW Publ. No. NIH 79-1726)

US Governmental Printing Office, Washington DC **(1979a)**

Nestmann E.R., Lynch B.S., Ratpan F.:

Perspectives on the genotoxic risk of styrene

Journal of Toxicology and Environmental Health B, 8, 95-107 **(2005)**

Niemeier R.W.:

The isolated perfused lung

Environmental Health Perspectives, 56, 35-41 **(1984)**

Niemeier R.W., Bingham E.:

An isolated perfused lung preparation for metabolic studies

Life Science, 11, 807-820 **(1972)**

Nisell O.:

Effects of oxygen and carbon dioxide on the circulation of isolated and perfused lungs of the cat

Acta Physiologica Scandinavica, 16, 121-127 **(1948)**

Biochimica et Biophysica Acta, 227, 685-691 **(1971)**

Oberste-Frielinghaus H., Dhawan-Robl M., Pütz C., Csanády G.A., Baur C., Filser J.G.:

Metabolism of styrene and racemic styrene-7,8-oxide in microsomes and cytosol of lung obtained from mouse, rat and human

Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology Suppl. 359, R157 (1999)

Oesch E., Jerina D.M., Daly J.:

A radiometric assay for hepatic epoxide hydrase activity with [7-3H]styrene oxide

Biochimica et Biophysica Acta, 3, 685-691 (1971)

Oettel H.E., Schulze E.:

Report on the effects of long-term administration of styrene and polystyrene to rats

Bericht der Med.-Biol. Forschungslaboratorien der BASF, Ludwigshafen (1962)

Oliver J.R., Kushwah R., Wu J., Cutz E., Yeger H., Waddell T.K., Hu J.:

Gender differences in pulmonary regenerative response to naphthalene-induced bronchiolar epithelial cell injury

Cell Proliferation, 42, 672-87 (2009)

O'Neil J.J., Tierney D.F.:

Rat lung metabolism: glucose utilization by isolated perfused lungs and tissue slices

American Journal of Physiology, 226, 867-873 (1974)

Osterman-Golkar S., Christakopoulos A., Zorec V., Svenson K.:

Dosimetry of styrene-7,8-oxide in styrene and styrene-oxide-exposed mice and rats by quantification of haemoglobin adducts

Chemico-Biological Interactions, 95, 79-87 (1995)

Otteneder M., Eder E., Lutz W.K.:

³²P-Postlabeling analysis of DNA adducts of styrene-7,8-oxide at the O⁶-position of guanine

Chemical Research in Toxicology, 12, 93-99 (1999)

Otteneder M., Lutz U., Lutz W.K.:

DNA adducts of styrene-7,8-oxide in target and non-target organs for tumor induction in rat and mouse after repeated inhalation exposure to styrene

Mutation Research, 500, 111-116 (2002)

Pacifici G.M., Boobis A.R., Brodie M.J., McManus M.E., Davies D.S.:

Tissue and species differences in enzymes of epoxide metabolism

Xenobiotica, 18, 849-856 (1981)

Pacifici G.M., Franchi M., Bencini C., Repetti F., Di Lascio N., Muraro G.B.:

Tissue distribution of drug-metabolizing enzymes in humans

Xenobiotica, 18, 849-856 (1988)

Pantarotto C., Fanelli R., Bidoli F., Morazzoni B., Salmona M., Szcawinska K.:

Arene oxides in styrene metabolism, a new perspective in styrene toxicity?

Scandinavian Journal of Work, Environment & Health, 4, 67-77 **(1978)**

Pauwels W., Farmer P.B., Osterman-Golkar S., Severi M., Cordero R., Bailey E., Veulemans H.:

Ring test for the determination of N-terminal valine adducts of styrene 7,8-oxide with haemoglobin by the modified Edman degradation technique
Journal of Chromatography, Biomedical Sciences and Applications, 21, 77-83 **(1997)**

Pauwels W., Vodicka P., Severi M., Plna K., Veulemans H., Hemminki K.:
Adduct formation on DNA and haemoglobin in mice intraperitoneally administered with styrene
Carcinogenesis, 17, 2673-2680 **(1996)**

Pfäffli P., Hesso A., Vainio H., Hyonen M.:
S-Vinylphenol excretion suggestive of arene oxide formation in workers occupationally exposed to styrene
Toxicology and Applied Pharmacology, 60, 85-90 **(1981)**

Plastics Europe, Association of plastics Manufacturers
am 30.05.2009 heruntergeladen von
<http://www.plasticseurope.org/Content/Default.asp?PageID=1169> **(2009)**

Plopper C.G., Van Winkle L.S., Fanucchi M.V., Malburg S.R.C., Nishio S.J., Chang A., Buckpitt A.R.:
Early events in naphthalene-induced acute Clara cell toxicity II. Comparison of glutathione depletion and histopathology by airway location
American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology, 24, 272-281 **(2001)**

Plummer J., Smith B.R., Sies H., Bend J.R.:
Chemical depletion of glutathione in-vivo
Methods in Enzymology, 77, 50-59 **(1981)**

Ponomarkov V., Cabral J.R., Wahrendorf J., Galendo D.:
A carcinogenicity study of styrene-7,8-oxide in rats
Cancer Letters, 24, 95-101 **(1984)**

Ponomarkov V., Tomatis L.:
Effects of long-term oral administration of styrene to mice and rats
Scandinavian Journal of Work, Environment & Health, 4, 35-46 **(1978)**

Powley M.W., Carlson G.P.:
Benzene Metabolism by the isolated perfused lung
Inhalation Toxicology, 14, 569-584 **(2002)**

Preston R.J., Abernethy D.J.:

Studies of the induction of chromosomal aberration and sister chromatid exchange in rats exposed to styrene by inhalation: In: Sorsa M., Peltonen K., Vainio H., Hemminki K., eds, *Butadiene and Styrene: Assessment of Health Hazards* (IARC Scientific Publications No. 127), Lyon, IARC Press, 225-233 **(1993)**

PRI

Max-Planck-Gesellschaft Presseinformation
Nanozwiebeln bringen Styrol-Synthese auf Trab
am 31.05.2009 heruntergeladen von
<http://www.mpg.de/bilderBerichteDokumente/dokumentation/pressemitteilung/en/2002/pri0299.htm> **(2002)**

Rahman I., MacNee W.:

Oxidative stress and regulation of glutathione in lung inflammation
The European Respiratory Journal, 16, 534-554 **(2000)**

Rahman Q., Abidi P., Afaq F., Schiffmann D., Mossman B.T., Kamp D.W., Athar M.:

Glutathione redox system in oxidative lung injury
Critical Reviews in Toxicology, 29, 543-568 **(1999)**

Rappaport S.M., Yeowell-O'Connell K., Bodell W., Yager J.W., Symanski E.:
An investigation of multiple biomarkers among workers exposed to styrene and styrene-7,8-oxide
Cancer Research, 56, 5410-5416 **(1996)**

Raveh Y., Ichinose F., Orbach P., Bloch K.D., Zapol W.M.:
Radical Scavengers Protect Murine Lungs from Endotoxin induced Hyporesponsiveness to Inhaled Nitric Oxide
Anesthesiology, 96, 926-933 **(2002)**

Rhoades R.A.:

Isolated Perfused Lung Preparation for Studying Altered Gaseous Environments
Environmental Health Perspectives, 56, 43-50 **(1984)**

Rhoades R.A.:

Perfused Lung Preparation for Studying Altered Gaseous Environments
Environmental Health Perspectives, 16, 73-75 **(1976)**

Riihimäki V., Pfäffli P.:

Percutaneous absorption of solvent vapors in man
Scandinavian Journal of Work, Environment & Health, 4, 73-85 **(1978)**

Romano M., Garattini E., Salmona M.:

Perinatal development of cytochrome P-450, cytochrome C reductase, aryl hydrocarbon hydroxylase, styrene monooxygenase, and styrene epoxide hydrolase in rabbit liver microsomes and nuclei
Developmental Pharmacology and Therapeutics, 8, 232-242 **(1985)**

Ryan A.J., Bend J.R.:
The metabolism of styrene oxide in the isolated perfused rat liver
Identification and quantitation of major metabolites
Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals, 5, 363-367 **(1977)**

Sakagami M.:
In-vivo , in vitro and ex-vivo models to assess pulmonary absorption and disposition of inhaled therapeutics for systemic delivery.
Advanced Drug Delivery Reviews, 58, 1030-1060 **(2006)**

Salmona M., Pachecka J., Cantoni L., Belvedere G., Mussini E., Garattini S.:
Microsomal styrene mono-oxygenase and styrene epoxide hydrase activities in rats
Xenobiotica, 6, 585-591 **(1976)**

Sarangapani R., Teeguarden J.C., Cruzan G., Clewell H.J., Andersen M.E.:
Physiologically based pharmacokinetic modeling of styrene and styrene oxide respiratory-tract dosimetry in rodents and humans
Inhalation Toxicology, 14, 789-834 **(2002)**

Sato A., Nakajima T.:
Partition coefficients of some aromatic hydrocarbons and ketones in water, blood and oil
British Journal of Industrial Medicine, 36, 231-234 **(1979)**

Seidegård J., DePierre J.W., Moron M.S., Johannesen K.A., Ernster L.:
Characterization of rat lung epoxide (styrene oxide) hydrase with a modified radioactive assay of improved sensitivity
Cancer Research, 37, 1075-1082 **(1977)**

Seutter-Berlage F., Delbressine L.P., Smeets F.L., Ketelaars H.C.:
Identification of three sulphur-containing urinary metabolites of styrene in the rat
Xenobiotica, 8, 413-418 **(1978)**

Silbernagel S., Despopoulos A.:
Taschenatlas der Physiologie
Thieme Verlag, Stuttgart, 4. Auflage **(1991)**

Skelly M.F., Shertzer H.G.:
Benzo(a)pyrene metabolism in the isolated perfused mouse lung

Experimental Lung Research, 5, 259-268 **(1983)**

Tang W., Hemm I., Eisenbrand G.:
Estimation of human exposure to styrene and ethylbenzene
Toxicology, 144, 39-50 **(2000)**

Tossavainen A.:
Styrene use and occupational exposure in the plastic industry
Scandinavian Journal of Work, Environment & Health, 2, 7-13 **(1978)**

Truchon G., Brodeur J., Gerin M.:
Simultaneous determination of urinary mandelic, phenylglyoxylic, and mercapturic acids of styrene by high-performance liquid chromatography
Journal of Analytical Toxicology, 14, 227-230 **(1990b)**

Truchon G., Gerin M., Brodeur J.:
Urinary excretion of mandelic, phenylglyoxylic, and specific mercapturic acids in rats exposed repeatedly by inhalation to various concentrations of styrene vapors
Canadian Journal of Physiology and Pharmacology, 68, 556-561 **(1990a)**

Turner M., Mantick N.A., Carlson G.P.:
Comparison of the depletion of glutathione in mouse liver and lung following administration of styrene and its metabolites styrene oxide and 4-vinylphenol
Toxicology, 206, 383-388 **(2005)**

Tursi F., Samaia M., Salmona M., Belvedere G.:
Styrene oxidation to styrene oxide in human erythrocytes is catalyzed by oxyhemoglobin
Experientia, 39, 593-594 **(1983)**

Uhlig S.:
The isolated perfused rat lung challenged with endotoxin
Dissertation at the university of Konstanz, Germany, ISBN 3-89191-570-5 **(1992)**

Uhlig S., Heiny O.:
Measuring the weight of the isolated perfused rat lung during negative pressure ventilation
Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, 33, 147-152 **(1995)**

Uhlig S., Wollin L.:
An improved setup for the isolated perfused rat lung
Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, 31, 85-94 **(1994)**

USEPA, Environmental Protection Agency
Integrated Risk Information System

am 29.07.2008 heruntergeladen von
<http://www.epa.gov/iris/subst/0104.htm> (1990)

van Duuren B.L., Nelson N., Orris L., Palmes E.D., Schmitt F.L.:
Carcinogenicity of epoxides, lactones and peroxy compounds
Journal of the National Cancer Institute, 31, 41-55 (1963)

Vassallo J.D., Hicks S.M., Born S.L., Daston G.P.:
Roles for epoxidation and detoxification of coumarin in determining species
differences in clara cell toxicity
Toxicology Sciences, 82, 26-33 (2004)

von Bethmann A.N.:
The isolated perfused and ventilated mouse lung - studies on the effect of
endotoxin and hyperventilation
Dissertation at the University of Konstanz, Germany, ISBN 3-89649-294-7
(1997)

Vodicka P., Koskinen M., Naccarati A., Oesch-Bartlomowicz B., Vodickova L.,
Hemminiki K., Oesch F.:
Styrene metabolism, genotoxicity, and potential carcinogenicity
Drug Metabolism Reviews, 38, 805-853 (2006)

Vodicka P., Koskinen M., Vodickova L., Stetina R., Smerak P., Barta I.,
Hemminiki K.:
DNA adducts, strand breaks and micronuclei in mice exposed to styrene by
inhalation
Chemico-biological Interactions, 137, 213-227 (2001)

von Bethmann A.N., Brasch F., Nusing R., Vogt K., Volk H.D., Müller K.M.,
Wendel A., Uhlig S.:
Hyperventilation induces release of cytokines from perfused mouse lung
American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 157, 263-272
(1998)

Watabe T., Isobe M., Sawahata T., Yoshikawa K., Yamada S., Takabatake E.:
Metabolism and mutagenicity of styrene
Scandinavian Journal of Work, and Environment & Health, 4, 142-155 (1978)

Weil C.S., Condra N., Huhn C., Striegel J.A.:
Experimental carcinogenicity and acute toxicity of representative epoxides
American Industrial Hygiene Association Journal, 24, 305-325 (1963)

Weimann J., Bloch K.D., Masao Takata M., Steudel W., Zapol W.M.:
Congenital NOS2 Deficiency Protects Mice from LPS induced
Hyporesponsiveness to Inhaled Nitric Oxide
Anesthesiology, 91, 1744-1753 (1999)

Wenker M.A., Kezic S., Monster A.C., Wolff F.A.:
Metabolism of styrene-7,8-oxide in human liver in vitro: Interindividual
variation and stereochemistry
Toxicology of Applied Pharmacology, 169, 52-58 **(2000)**

WHO, World Health Organization
Guidelines for Drinking-water Quality, 2nd Ed., Vol. 1, Geneva, 67 **(1983)**

Yeowell-O'Connell K., Pauwels W., Severi M., Jin Z., Walker M.R., Rappaport
S.M., Veulemans H.:
Comparison of styrene-7,8-oxide adducts formed via reaction with cysteine,
N-terminal valine and carboxylic acid residues in human, mouse and rat
haemoglobin
Chemico-Biological Interactions, 106, 67-85 **(1997)**

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Christiana Hofmann
Geburtsdatum	18.12.1975
Geburtsort	Burghausen
Nationalität	deutsch
Familienstand	verheiratet mit Dr. Matthias Hofmann, ein Sohn und eine Tochter

Schulbildung

09/1982-08/1986	Grundschule Burgkirchen a. d. Alz
09/1986-06/1995	Aventinus-Gymnasium Burghausen Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife

Hochschulbildung

10/1995-03/2001	Studium Diplom Biologie an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg Abschluss: Dipl. Biol. Univ.
01/2000-10/2000	Diplomarbeit an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg in der Arbeitsgruppe Prof. Dr. U. Zimmermann, Biotechnologie: <i>„Elektrische Feldeffekte auf tierische Zellen: In vitro Untersuchungen an humanen Osteoblasten“</i>
seit 04/2001	Promotion an der Technischen Universität München am Lehrstuhl für Phytopathologie, Prof. Dr. E. F. Elstner; durchgeführt im Institut für Toxikologie des Helmholtz Zentrums München unter Anleitung von Prof. Dr. J.G. Filser
10/2004 bis dato	Elternzeit