

Lehrstuhl für Lebensmittelchemie der Technischen Universität München
und
Institut für Toxikologie und Umwelthygiene der Technischen Universität München

Toxikokinetische Studien
zur Bildung von Ethylenoxid aus Ethylen
bei männlichen Sprague-Dawley-
und Fischer-344-Ratten

Eva Erbach

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der
Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat)
genehmigten Dissertation

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. K. Köhler
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. P. Schieberle
2. apl. Prof. Dr. J.G. Filser

Die Dissertation wurde am 30.08.2010 bei der Technischen Universität
München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 10.11.2010
angenommen.

Meinen Eltern.

Diese Dissertation entstand im Zeitraum von April 2003 bis Oktober 2006
unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Johannes Filser,
Institut für Toxikologie, Helmholtz Zentrum, München.

Folgende Veröffentlichungen bzw. Posterbeiträge entstanden
im Rahmen der vorliegenden Arbeit:

Erbach, E., Hutzler, C., Pütz, C., Faller, T.H., Filser, J.G.. Ethylene oxide in blood of ethylene exposed rats. *Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology*, 371, R99 (2005).

Csanády, G.A., Erbach, E., Filser, J.G.. A physiological toxicokinetic model for propylene oxide in rat and human with special emphasis on the nose. *Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology*, 372, 97 (2006).

Erbach, E., Csanády, G.A., Filser, J.G.. Mutual kinetic interactions of ethylene and ethylene oxide in ethylene exposed rats. *Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology*, 375, 74 (2007).

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Zielsetzung der Arbeit	1
1.2	Eigenschaften, Herstellung und Verwendung von Ethylen und Ethylenoxid	2
1.2.1	Ethylen	2
1.2.2	Ethylenoxid	3
1.3	Metabolismus, Toxizität und Toxikokinetik von Ethylen und Ethylenoxid	4
1.3.1	Metabolismus von Ethylen und Ethylenoxid	4
1.3.2	Toxizität, Genotoxizität und Kanzerogenität von Ethylen	5
1.3.3	Toxizität, Genotoxizität und Kanzerogenität von Ethylenoxid	6
1.3.4	Toxikokinetik von Ethylen und Ethylenoxid	8
1.4	Aufgabenstellung	10
2	Material und Methoden	12
2.1	Chemikalien und Reagenzien	12
2.2	Geräte und Verbrauchsmaterial	13
2.3	Versuchstiere	17
2.4	Expositionen	17
2.4.1	Ganzkörperexpositionen gegen Ethylen im geschlossenen Expositionssystem	17
2.4.1.1	Aufbau der Expositionssysteme	17
2.4.1.2	Durchführung der Expositionen	18
2.4.2	Nasenexpositionen gegen konstante Konzentrationen von Ethylen im offenen Expositionssystem	21
2.4.2.1	Aufbau des Expositionssystems	21
2.4.2.2	Durchführung der Expositionen	22
2.4.3	Systemische Exposition gegen Ethylenoxid	23
2.4.3.1	Aufbau des Expositionssystems	23
2.4.3.2	Durchführung der Expositionen	23
2.5	Analytische Methoden	25

2.5.1	Bestimmung von Ethylen und Ethylenoxid in der Gasphase mittels GC/FID	25
2.5.2	Bestimmung von Ethylenoxid mittels GC/MSD	27
2.5.2.1	Bestimmung von exhalierem EO mittels GC/MSD	28
2.5.2.2	Bestimmung von EO im Blut mittels GC/MSD	29
2.5.3	Ermittlung der Aktivität von Cytochrom P450 2E1 durch enzymatische Umsetzung von Chlorzoxazon	32
2.5.3.1	Isolierung von Cytosol und Mikrosomen aus Rattenlebern	32
2.5.3.2	Proteinbestimmung	32
2.5.3.3	Inkubation von Mikrosomen mit Chlorzoxazon	33
2.5.3.4	Messung von 6-Hydroxy-Chlorzoxazon mittels LC-MS/MS; Messbedingungen und Geräteparameter	34
2.5.4	Quantifizierung von S-(2-hydroxyethyl)glutathion in Rattenlebern mittels LC-MS/MS	36
2.5.4.1	Aufarbeitung der Leberproben	36
2.5.4.2	Messbedingungen und Geräteparameter	36
2.5.4.3	Herstellung einer S-(2-hydroxyethyl)glutathionlösung	37
2.5.5	Quantifizierung von reduziertem und oxidiertem Glutathion mittels LC-MS/MS	39
2.5.6	Berechnungen	40
2.5.7	Statistik	41
3	Ergebnisse	43
3.1	Charakterisierung der analytischen Methoden	43
3.1.1	Bestimmung von Ethylen und Ethylenoxid in der Gasphase mittels GC/FID	43
3.1.2	Bestimmung von EO in der Gasphase mittels GC/MSD	46
3.1.3	Bestimmung von Ethylenoxid im Blut mittels GC/MSD	48
3.1.3.1	Wiederfindung, Präzision und Nachweisgrenze	52
3.1.3.2	Quantitative Auswertung	53
3.1.4	Quantifizierung von 6-Hydroxy-Chlorzoxazon durch LC-MS/MS	54
3.1.5	Quantifizierung von S-(2-hydroxyethyl)glutathion durch LC-MS/MS	54
3.1.5.1	Wiederfindung und Präzision	60
3.1.6	Quantifizierung von reduziertem und oxidiertem Glutathion durch LC-MS/MS	61
3.2	Expositionen	65
3.2.1	Expositionen gegen initiale Konzentrationen von Ethylen	65

3.2.2	Ethylenoxid im Blut und S-(2-hydroxyethyl)glutathion in der Leber nach Exposition gegen Ethylenoxid	68
3.2.2.1	Ethylenoxid im Blut	68
3.2.2.2	S-(2-hydroxyethyl)glutathion in den Lebern	69
3.2.3	Ethylenoxid- und S-(2-hydroxyethyl)glutathionbildung bei Exposition gegen Ethylen	69
3.2.3.1	Abatmung von Ethylenoxid	69
3.2.3.2	Ethylenoxid im Blut	72
3.2.3.3	S-(2-hydroxyethyl)glutathion in den Lebern	76
3.2.4	Aktivität von Cytochrom P450 2E1 nach Exposition gegen Ethylen	77
4	Diskussion	81
4.1	Analytische Methoden	81
4.1.1	Bestimmung von Ethylenoxid im Blut mittels GC/MSD	81
4.1.2	Bestimmung von S-(2-hydroxyethyl)glutathion in Rattenlebern .	83
4.1.3	Bestimmung der Aktivität von Cytochrom P450 2E1	83
4.2	Konzentrations-Zeit-Verläufe von Ethylen und Ethylenoxid	85
4.2.1	Konzentrations-Zeit-Verlauf von Ethylen in der Ausatemluft bei Exposition gegen Ethylen	85
4.2.2	Konzentrations-Zeit-Verlauf von Ethylenoxid bei Exposition gegen Ethylen	86
4.3	Mechanismus der Bildung und des Metabolismus von Ethylenoxid . . .	88
4.3.1	Ethylenoxidbelastung als Basis für eine Risikoabschätzung	91
5	Ausblick	92
6	Zusammenfassung	93
7	Abkürzungen	95
	Anhang	97
	Literaturverzeichnis	101

Hinweise zum Sprachgebrauch

Die deutsche Übersetzung üblicher englischer Begriffe wurde in dieser Arbeit der besseren Lesbarkeit und Konsistenz des Textes untergeordnet. Da Englisch als Sprache der internationalen Wissenschaft etabliert ist, wird die maßvolle Verwendung von Anglizismen auch in der vorliegenden Dissertation für tolerierbar gehalten.

1 Einleitung

1.1 Zielsetzung der Arbeit

Ethylen (ET) ist ein ubiquitär vorkommendes Gas. In die Umwelt gelangt die bedeutende Industriechemikalie nicht nur durch industrielle Emissionen, sondern auch als ein Verbrennungsprodukt von organischem Material. Eine weitere wichtige Quelle sind Pflanzen, die ET als ein Reifungshormon produzieren. Auch von Säugern wird es gebildet; bei diesen ist die biologische Bedeutung jedoch unklar. Beim Säuger wird ET durch Cytochrom P450-abhängige Monooxygenasen (CYP) zu Ethylenoxid (EO) metabolisiert, das bei sehr hohen ET-Expositionskonzentrationen in der Ausatemluft und im Blut von Ratten nachgewiesen wurde. EO alkyliert Makromoleküle, ist *in vitro* und *in vivo* mutagen und wirkt bei Maus und Ratte kanzerogen. Deshalb wurde auch für seinen metabolischen Vorläufer ET ein kanzerogenes Potential abgeleitet. Erforderliche Daten zur EO-Belastung bei niedrigen, arbeitsplatzrelevanten ET-Konzentrationen liegen bisher allerdings nicht vor.

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, an der Ratte die EO-Belastung in Abhängigkeit von der ET-Expositionskonzentration zu ermitteln. Hierzu sollten Konzentrationsverläufe von EO in der Ausatemluft und im Blut von Ratten bei Expositionen gegen ET-Konzentrationen zwischen 30 und 10 000 ppm in der Expositionsatmosphäre gemessen werden. Dies erforderte die Entwicklung einer hochempfindlichen GC/MSD-Methode zur Bestimmung von EO im Blut der exponierten Tiere.

Bei Exposition gegen hohe, konstante ET-Konzentrationen war beobachtet worden, dass der Konzentrations-Zeit-Verlauf des metabolisch gebildeten EO in der Ausatemluft zunächst bis zu einem Maximum anstieg, dann jedoch rasch auf eine Plateaukonzentration, die etwa einem Drittel der Maximalkonzentration entsprach, abfiel. Die Ursachen dieses Konzentrations-Zeit-Verlaufs sind nicht geklärt. Deshalb sollten Ursachen für den komplexen Konzentrations-Zeit-Verlauf gesucht werden. Durch Verfolgung des Verlaufs der Aktivität des ET zu EO metabolisierenden Enzyms CYP2E1 in Abhängigkeit von ET-Konzentration und Expositionsdauer sollte untersucht werden, ob und unter welchen Bedingungen dieses Enzyms gehemmt wird. In weiteren Experimenten sollte ein möglicher Einfluss von EO auf die Aktivität der EO-metabolisierenden Enzyme Epoxidhydrolase (EH) und Glutathion-S-Transferase (GST) untersucht werden. Hierzu musste zuerst eine sensitive LC-MS/MS-Methode zur Quanti-

fizierung von S-(2-hydroxyethyl)glutathion (GS-EO), dem Konjugat von EO mit reduziertem Glutathion (GSH), in Rattenlebern entwickelt werden.

1.2 Eigenschaften, Herstellung und Verwendung von Ethylen und Ethylenoxid

1.2.1 Ethylen

Ethylen (CAS Nr. 74-85-1, Ethen, ET) ist ein farbloses, brennbares, ab einer Geruchsschwelle von 17 ppm schwach süßlich riechendes Gas (NLM&NIH, 2007) mit einer molaren Masse von 28,05 g/mol. Sein Siedepunkt liegt bei $-103,7^{\circ}\text{C}$, der Schmelzpunkt bei -169°C ; es ist praktisch unlöslich in Wasser, mäßig löslich in Ethanol, Aceton und Benzol, gut löslich in Diethylether (Lide, 2006) und bildet in Anteilen zwischen 3 und 29 Prozent mit Luft explosionsfähige Gemische (Grantom und Royer, 1987).

ET ist die quantitativ bedeutendste Industriechemikalie. In Westeuropa stieg die Produktionsrate in den vergangenen Jahren kontinuierlich an und erreichte im Jahr 2005 einen Wert von 21,6 Millionen Tonnen pro Jahr. Zusätzlich wurden 300 000 Tonnen aus anderen Ländern importiert (APPE, 2009). Die industrielle Herstellung von Ethylen erfolgt hauptsächlich durch Cracken von Erdöl oder Erdgas. Über 80 Prozent des produzierten ET werden zur Herstellung von Polyethylen, Ethylenoxid (CAS Nr. 75-21-8, EO, 1,2-Epoxyethen, Oxiran), Ethylenglykol, Ethylendichlorid und Vinylchlorid verwendet (IARC, 1994a; Zimmermann und Walzl, 2007). ET ist außerdem ein pflanzliches Hormon, das Keimwachstum und Alterung beeinflusst und Fruchtwachstum bewirkt. Daher wird ET in der Landwirtschaft zur beschleunigten Reifung von Früchten eingesetzt (IARC, 1994a).

ET ist ein ubiquitäres Gas, das sowohl natürlichen als auch anthropogenen Ursprungs ist. Es entsteht bei der Verbrennung von organischem Material und wird nicht nur von Pflanzen, sondern auch vom Säuger endogen gebildet. Die Ursache seiner Entstehung im menschlichen Organismus ist noch unklar; als mögliche Quellen von endogenem ET gelten Lipidperoxidation (Lieberman und Mapson, 1964; Lieberman und Hochstein, 1966; Frank *et al.*, 1980; Sagai und Ichinose, 1980; Törnqvist *et al.*, 1989b; Kautiainen und Törnqvist, 1991), Oxidation von Methionin (Lieberman und Kunishi, 1965; Fu *et al.*, 1979; Kessler und Remmer, 1990), Oxidation von Hämoglobin (Clemens *et al.*, 1983; Kessler, 1987) und der Metabolismus von Darmbakterien (Törnqvist *et al.*, 1989b).

In großstädtischen Ballungszentren wurden Luftkonzentrationen bis zu 700 ppb ET gemessen (Abeles und Heggstad, 1973). Arbeiter der ethylenverarbeitenden oder -herstellenden Industrie sind hauptsächlich bei Unfällen oder Leckagen ET-enthaltender Behältnisse hohen Gaskonzentrationen ausgesetzt. Bei der künstlichen Reifung

von Früchten sind Arbeiter im Mittel gegen eine ET-Konzentration von 0,3 ppm exponiert (Törnqvist *et al.*, 1989a). Es wurde berichtet, dass Feuerwehrleute bei der Brandbekämpfung gegen Konzentrationen von bis zu 46 ppm ET exponiert waren (Jankovic *et al.*, 1991).

Für die Exposition gegen ET gibt es in den meisten Ländern keine Beschränkungen; nur in der Schweiz existiert ein Arbeitsplatzgrenzwert von 10 000 ppm, der auf der Explosivität der Substanz basiert (IARC, 1994a). Die deutsche MAK-Kommission (Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe) stufte ET als Krebsverdachtsstoff in die Gruppe 3B ein. Die IARC (International agency for research on cancer) ordnete ET der Gruppe 3 (*non classifiable as to its carcinogenicity to humans*) zu.

1.2.2 Ethylenoxid

Ethylenoxid (EO) ist bei Raumtemperatur ein farbloses Gas mit einer molaren Masse von 44,06 g/mol. Sein Siedepunkt bei Normaldruck liegt bei 10,8 °C, der Schmelzpunkt bei –111 °C (Lide, 2006). EO ist gut in polaren Lösungsmitteln wie Wasser, Aceton, Ethanol und Diethylether löslich (Lide, 2006). Es wurde früher im Chlorhydrin-Verfahren hergestellt, indem Ethylenchlorhydrin durch Reaktion mit einer Base umgesetzt wurde. Heute erfolgt die industrielle Herstellung wesentlich wirtschaftlicher durch direkte Oxidation von ET mit Sauerstoff an einem Silberkatalysator. Die weltweite jährliche Produktionsrate von EO betrug im Jahr 2000 ca. 15 Millionen Tonnen (Rebsdats und Mayer, 2002).

EO wird hauptsächlich als Ausgangs- und Zwischenprodukt in der chemischen Industrie eingesetzt und außerdem zur Herstellung von Ethylenglykol, Ethanolaminen und Glykolethern verwendet. Im gasförmigen Zustand wird es als Desinfektionsmittel, zur Sterilisation von medizinischen Geräten und als Insektizid eingesetzt. Die früher übliche Kaltentkeimung von Kräutern und Gewürzen durch EO ist in Deutschland seit 1984 verboten, in anderen Ländern wird dieses Verfahren jedoch nach wie vor angewendet (Fowles *et al.*, 2001).

Expositionen gegen EO am Arbeitsplatz geschehen vor allem in Sterilisationsbetrieben, bei Krankenhausbeschäftigten und in der chemischen Industrie (IARC, 1994b). Den höchsten EO-Konzentrationen waren Beschäftigte von Sterilisationsbetrieben und Krankenhäusern ausgesetzt; sie wurden beim Öffnen von Sterilisationskammern kurzzeitig gegen mehrere hundert ppm EO exponiert (Bryant *et al.*, 1989; IARC, 1994b; Hori *et al.*, 2002). Neben der inhalativen kann es auch zur dermalen Aufnahme von EO kommen, das in geringen Mengen auch als Verunreinigung in Kosmetika zu finden ist (Filser *et al.*, 1994; Thier und Bolt, 2000). Nicholls (1986) berichtete von direkter EO Aufnahme ins Blut aus mit EO sterilisiertem Plastikmaterial bei Hämodialysepatienten und dadurch verursachtem anaphylaktischen Schock.

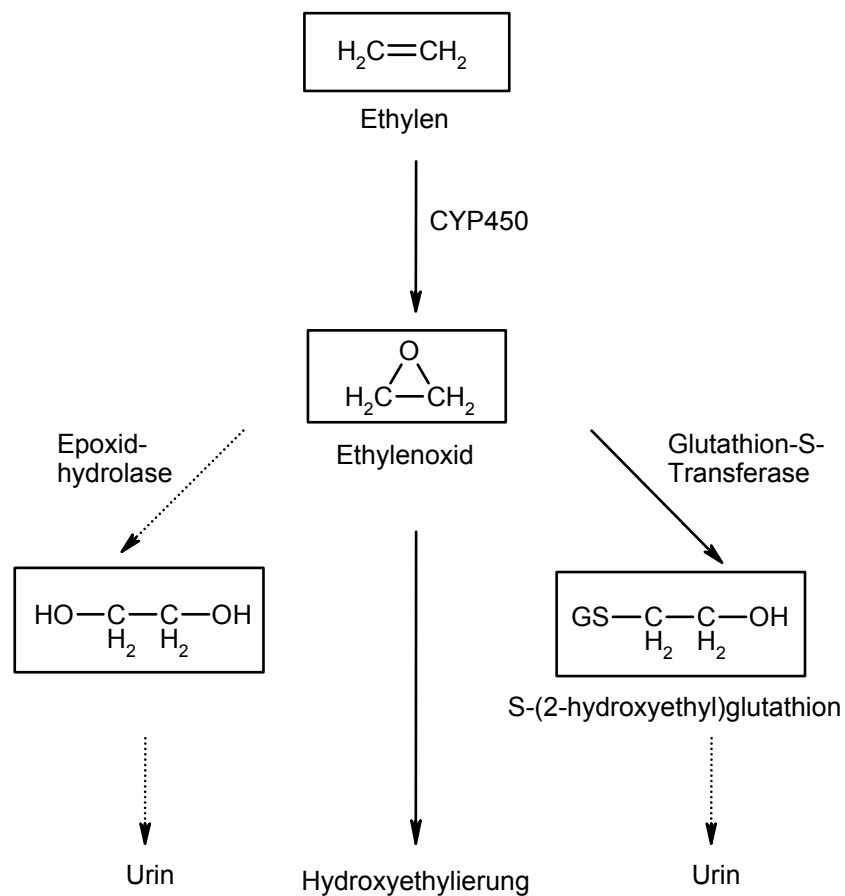


Abbildung 1.1 Ethylenoxid: Enzymatische Bildung aus Ethylen und Elimination. In Anlehnung an Greim und Filser (1994). Der Epoxidhydrolase-abhängige Stoffwechselweg ist gestrichelt dargestellt, da er nur von untergeordneter Bedeutung ist (Li *et al.*, 2009).

EO wurde von der MAK-Kommission in die Kategorie 2 (*krebserzeugend für den Menschen*) eingestuft. Nach den Richtlinien der IARC gehört EO der Gruppe 1 an (*kanzerogen für den Menschen*).

1.3 Metabolismus, Toxizität und Toxikokinetik von Ethylen und Ethylenoxid

1.3.1 Metabolismus von Ethylen und Ethylenoxid

Verschiedene Untersuchungen ergaben, dass ET im Organismus von Ratte, Maus und Mensch durch CYP-Enzyme in EO überführt wird (vgl. Abb. 1.1) wie zuerst von Schmiedel *et al.* (1983) an Rattenlebermikrosomen und von Filser und Bolt (1984) an Ratten gezeigt wurde. Als indirekter Nachweis des gebildeten EO dient die Hydroxyethylierung von Cystein und Histidin und vor allem von N-terminalem Valin im Hä-

moglobin; sie wurde bei Maus, Ratte und Mensch nachgewiesen (Ehrenberg *et al.*, 1977; Calleman *et al.*, 1978; Filser *et al.*, 1992).

Die Elimination von EO erfolgt hauptsächlich durch die durch Glutathion-S-Transferasen (GST) katalysierte Konjugation von EO mit GSH (Brown *et al.*, 1996; Li *et al.*, 2009). Die Stoffwechselprodukte des Glutathionkonjugats finden sich im Urin (Jones und Wells, 1981; Gérin und Tardif, 1986; Koga *et al.*, 1987; Burgaz *et al.*, 1992). Bei Ratte und Maus erfolgt die Elimination von EO nahezu ausschließlich über diesen Weg. Beim Menschen wird EO außerdem durch die Epoxidhydrolase (EH) zu Ethylenglykol hydrolysiert (Li *et al.*, 2009). Dieses wird dann weiter zu Glykolsäure, Glyoxylsäure und Oxalsäure metabolisiert, die mit dem Urin ausgeschieden werden (Carstens, 2003; Upadhyay, 2006). Die Elimination durch Hydrolyse findet bei Ratten und Maus wenn überhaupt nur in untergeordnetem Maße statt (Li *et al.*, 2008).

1.3.2 Toxizität, Genotoxizität und Kanzerogenität von Ethylen

Die Toxizität von ET für den Menschen wurde lange Zeit als äußerst gering eingeschätzt. ET zeigt keine akuten toxischen Wirkungen und wurde lange als inertes Gas angesehen und nur seine, wegen der Verdrängung von Sauerstoff, erstickende Wirkung bei sehr hohen Konzentrationen in der Atemluft wurde als toxische Wirkung in Betracht gezogen (IARC, 1994a).

Bei Ratten zeigte ET weder in einer 90-Tage-Studie mit ET-Konzentrationen bis zu 10 000 ppm (Rhudy *et al.*, 1978) noch in einer Langzeitexposition (6 h/T, 5 T/W, 24 Mon) bei Expositionskonzentrationen bis zu 3000 ppm Effekte (Hamm *et al.*, 1984). In sehr hohen Konzentrationen (10 000 bis 57 000 ppm) wirkte ET bei dieser Spezies nur nach Vorbehandlung mit einem Gemisch polychlorierter Biphenyle (Aroclor 1254), die Induktoren verschiedener CYP-Spezies sind (z. B. Alvares *et al.*, 1973; Hennemann *et al.*, 1994), akut hepatotoxisch (Conolly und Jaeger, 1977; Conolly *et al.*, 1978; Guest *et al.*, 1981).

In Mutagenitätsstudien zeigte ET keine positiven Effekte. In einem *in vitro* Test an *Salmonella typhimurium* TA 100 mit ET-Luftkonzentrationen bis zu 20 % war das Gas mit und ohne metabolisierendes System nicht mutagen (Victorin und Ståhlberg, 1988). Auch Micronucleustests *in vivo* an Knochenmarkszellen von Ratten und Mäusen mit ET-Konzentrationen bis zu 3000 ppm (6 h/T, 5 T/W, 4W) zeigten keine signifikante Häufigkeitszunahme im Vergleich zu Luft-exponierten Kontrollen (Vergnes und Pritts, 1994). Des Weiteren wurde keine Zunahme in der Häufigkeit von HPRT-Mutationen bei Ratten und Mäusen gefunden, die bis zu 4 Wochen lang (6 h/T, 5 T/W) gegen ET-Konzentrationen zwischen 0 und 3000 ppm exponiert wurden (Walker *et al.*, 2000).

ET alkyliert jedoch Proteine und die DNA unter Bildung der gleichen Hydroxyethyladdukte, die auch durch EO gebildet werden. Diese wurden zuerst bei ET- bzw.

EO-exponierten Mäusen im Hämoglobin (Ehrenberg *et al.*, 1977) und danach im Hämoglobin und der DNA verschiedener Organe nachgewiesen (Segerbäck, 1983). In jüngeren Arbeiten wurden die ET-Befunde bestätigt und erweitert: Bei Mäusen und Ratten, die unterschiedlich lange (bis zu 4 Wochen) gegen ET-Konzentrationen zwischen 40 und 3000 ppm exponiert waren, wurden Hydroxyethylierungen am Hämoglobin (Eide *et al.*, 1995; Walker *et al.*, 2000) und in diversen Organen sowie in Lymphozyten N-7-(2-hydroxyethyl)guanin-Addukte gefunden (Eide *et al.*, 1995; Wu *et al.*, 1999a; Rusyn *et al.*, 2005). Bei beiden Spezies strebten die Adduktspiegel ab etwa 1000 ppm gegen Plateaus, ein Hinweis für eine Sättigungskinetik von ET (Walker *et al.*, 2000). Auch beim Menschen wurden ET-bedingte Hydroxyethylierungen am Hämoglobin gemessen (zusammengefasst in z. B. IARC, 1994a; Csanády *et al.*, 2000).

ET wurde in einer Langzeitinhalationsstudie mit ET-Konzentrationen von 0, 300, 1000 und 3000 ppm (6 h/T, 5 T/W, 24 Mon) an männlichen und weiblichen F344-Ratten auf kanzerogene Wirkungen untersucht. Es wurden weder behandlungsbedingte Wirkungen noch eine Tumorzunahme gefunden (Hamm *et al.*, 1984). Belastbare Untersuchungen zur Kanzerogenität von ET beim Menschen liegen derzeit nicht vor.

1.3.3 Toxizität, Genotoxizität und Kanzerogenität von Ethylenoxid

EO, der ET-Metabolit, reagiert als Epoxid direkt mit Nukleophilen, was zu toxischen Wirkungen auf physiologische Strukturen und Prozesse führen kann (Hine *et al.*, 1981). Die durch Reaktion mit dem elektrophilen EO hervorgerufenen Hydroxyethylierungen von Carboxyl-, Amino-, phenolischen Hydroxyl- und Sulfhydrylgruppen in Proteinen (Fraenkel-Conrat, 1944) machen verständlich, dass der Stoff biozid ist, akut toxisch wirken und allergische Reaktionen hervorrufen kann (DFG, 1984, 1995). Akute Vergiftungen durch EO sind bei Mensch und Versuchstier gekennzeichnet durch systemische Wirkungen wie Erbrechen, Diarrhoe, Herzschädigung, Erregungszustände, Benommenheit, Bewusstlosigkeit, durch sensorisch-motorische Neuropathien sowie durch starke Reizerscheinungen an Augen und Schleimhäuten der oberen Luftwege und der Haut, wo es Rötung und Blasenbildung hervorruft (zusammengefasst in z. B. DFG, 1984). Bei vierstündigen Expositionen von Versuchstieren betragen die LC_{50} -Werte (Stoffkonzentration, bei der 50 % der exponierten Tiere versterben) bei der Maus 835 ppm, bei der Ratte 1460 ppm und beim Hund 960 ppm (Jacobson *et al.*, 1956).

Ebenso wie ET hydroxyethyliert EO bei Versuchstier und Mensch Proteine und die DNA (Versuchstiere: Osterman-Golkar *et al.*, 1976, 1983; Ehrenberg *et al.*, 1977; Segerbäck, 1983; Walker *et al.*, 1992b; Potter *et al.*, 1989; Walker *et al.*, 1992a, 1993, 2000; Wu *et al.*, 1999a,b; Rusyn *et al.*, 2005; am Arbeitsplatz gegen EO exponierte Menschen: Hämoglobinaddukte, zusammengefasst in z. B. Csanády *et al.*, 2000; Kolman *et al.*, 2002; Yong *et al.*, 2007; IARC, 2008). In Übereinstimmung mit den Befunden, dass ET beim

Säuger endogen gebildet wird (Ratte bzw. Mensch: Ram Chandra und Spencer, 1963; Conkle *et al.*, 1975; Sagai und Ichinose, 1980; Harrison, 1981; Shen *et al.*, 1989; Filser, 1992), wurden auch Proteinaddukte von endogenem EO gefunden (Filser, 1992).

Die Alkylierung der DNA durch EO wird als die Ursache für die Genotoxizität und Kanzerogenität dieses Stoffes angesehen (Svenberg *et al.*, 1990). Die Genotoxizität von EO wurde an einer Reihe von Testsystemen gezeigt: EO wirkte mutagen (ohne aktivierendes System *in vitro*) bei Mikroorganismen (Pro- und Eukaryonten) und Pflanzen. EO induzierte *unscheduled DNA synthesis* (unplanmäßige DNA Synthese, ein Nachweis von DNA-Schädigung und -Reparatur), DNA-Strangbrüche, Mutationen, Schwester-Chromatid-Austausch und Chromosomen-Aberrationen in kultivierten menschlichen Zellen sowie Mutationen, Mikrokerne, Chromosomen-Aberrationen und Zelltransformationen in Nagetierzellen *in vitro*. Ebenfalls induzierte es Lethalmutationen und vererbare Translokationen bei *Drosophila melanogaster* sowie Schwester-Chromatid-Austausch, Mutationen, Chromosomen-Aberrationen, Mikrokerne, Dominant-Lethalmutationen und vererbare Translokationen bei *in vivo* behandelten Nagern. Es führte zu Chromosomen-Aberrationen und Schwester-Chromatid-Austausch beim Affen. Auch bei EO-exponierten Arbeitern fanden sich in mehreren Studien Schwester-Chromatid-Austausch, Chromosomen-Aberrationen und Mikrokerne (Zusammenfassung und Beurteilung in IARC, 1994b, 2008).

Mit EO wurden an Nagetieren sechs Zweijahresstudien zur Ermittlung einer tumorigenen Wirkung durchgeführt. Nach intragastraler EO-Applikation (7,5 oder 30 mg/kg, zweimal wöchentlich) an CD-Ratten wurde eine dosisabhängige Zunahme von Vormagentumoren (hauptsächlich Plattenepithelkarzinom) gefunden. Bei unbehandelten oder nur Vehikel-behandelten Kontrollen traten solche Tumore nicht auf (Dunkelberg, 1982). Der gleiche Autor (Dunkelberg, 1981) fand auch bei NMRI-Mäusen nach subkutanen EO-Injektionen (0,1, 0,3 und 1,0 mg/Maus, einmal wöchentlich) eine dosisabhängige Tumorzunahme an der Injektionsstelle. Zwei Inhalationsstudien an F344-Ratten (EO-Konzentrationen von 0, 10, 33 und 100 ppm, 6 h/T, 5 T/W, männliche und weibliche Tiere (Snellings *et al.*, 1984), sowie EO-Konzentrationen von 0, 50 und 100 ppm, 7 h/T, 5 T/W, nur männliche Tiere (Lynch *et al.*, 1984)) ergaben in verschiedenen Geweben Zunahmen an malignen Tumoren: peritoneale Mesotheliome (nur bei den männlichen Tieren), monozytäre Leukämien und, am auffallendsten, da sie sehr selten vorkommen, Hirntumore (maligne Gliome). Bei B6C3F1-Mäusen, die gegen 0, 50 und 100 ppm exponiert wurden (6 h/T, 5 T/W), nahm die Inzidenz an Adenomen und Karzinomen in der Lunge dosisabhängig zu (beide Geschlechter). Auch kam es in Drüsengeweben (Hardersche Drüse, Brustdrüse, Uterus) zur dosisabhängigen Zunahme von Karzinomen (NTP, 1987).

Die bisher vorgenommenen epidemiologischen Studien zur kanzerogenen Wirkung von EO am Menschen ergaben kein klares Bild. Während frühe Studien auf erhöhte Risiken für Leukämie (alle Formen) sowie Magen- und Pankreaskrebs deuteten,

wurden diese in späteren Studien nicht bestätigt. Es ergab sich allenfalls ein erhöhtes Brustkrebsrisiko. Die IARC beurteilte EO vorwiegend wegen seiner erwiesenen Genotoxizität und hierauf beruhender Kanzerogenität im Tierversuch als kanzerogen für den Menschen (IARC, 2008).

1.3.4 Toxikokinetik von Ethylen und Ethylenoxid

Bei Ratte und Mensch wurde die Toxikokinetik von ET (Ratte: Andersen *et al.*, 1980; Bolt *et al.*, 1984, Mensch: Shen *et al.*, 1989; Filser, 1992) und EO (Ratte: Filser und Bolt, 1984; Denk, 1990; Krishnan *et al.*, 1992, Mensch: Filser, 1992) mit Studien zur Aufnahme und Abatmung von ET und EO im geschlossenen Expositionssystem untersucht. Die kinetischen Parameter der Aufnahme durch Inhalation, Abatmung und Metabolismus sowie der endogenen Bildung von ET und EO wurden durch Analyse der Konzentrations-Zeit-Verläufe in der Atmosphäre der Expositionskammern mittels eines Zwei-Kompartiment-Modells ermittelt (Bolt *et al.*, 1984; Filser und Bolt, 1984; Bolt und Filser, 1987; Shen *et al.*, 1989; Denk, 1990; Filser, 1992). Entsprechende Untersuchungen in Mäusen wurden noch nicht durchgeführt.

Blutkonzentrationen von EO wurden bei Ratten nach Nasenexpositionen gegen ET berichtet (Maples und Dahl, 1993). Bei Mäusen (Brown *et al.*, 1996, 1998) und Ratten (Brown *et al.*, 1996) wurde EO im Blut während und nach Exposition gegen EO bestimmt. Alle verfügbaren toxikokinetischen Daten wurden mittels eines für ET und EO entwickelten physiologisch-toxikokinetischen Modells analysiert (Csanády *et al.*, 2000). Fennell und Brown (2001) entwickelten ein physiologisches toxikokinetisches Modell nur für EO.

Die toxikokinetischen Analysen für ET bei der Ratte zeigten, dass nur eine kleine Menge des inhalierten ET systemisch verfügbar ist (Ratte: 17 %, Mensch: 5,6 %). Der überwiegende Teil wird wieder ausgeatmet bevor er in den Blutkreislauf gelangt. Wie von Csanady und Filser (2001) gezeigt, liegt dieser Effekt in dem kleinen Blut-zu-Luft-Verteilungskoeffizienten begründet (zwischen 0,11 und 0,48, ermittelt bei 37 °C im Blut verschiedener Spezies Csanády *et al.*, 2000). Wegen seiner hydrophoben Eigenschaften wird aufgenommenes ET vorwiegend im Fettgewebe gespeichert. Es reichert sich allerdings kaum im Organismus an, wie sich aus seinem Verteilungsgleichgewicht Organismus-zu-Atmosphäre von nur 0,7 (Ratte: Bolt *et al.*, 1984) bzw. 0,53 (schlanke Menschen: Filser, 1992) ergibt. Die Geschwindigkeit des ET-Metabolismus verläuft im Bereich niedriger ET-Expositionskonzentrationen unterhalb von etwa 125 ppm bei der Ratte (Csanády *et al.*, 2000) und unterhalb von mindestens 50 ppm beim Menschen (Filser, 1992) nach einer Kinetik erster Ordnung. In diesen Konzentrationsbereichen wird das bioverfügbare ET bei der Ratte (250 g) zu 24 % und beim Menschen (70 kg) zu 36 % metabolisiert; die übrigen 76 bzw. 64 % werden abgeatmet. Somit werden von inhaliertem ET bei der Ratte nur 3,7 % (Csanády *et al.*, 2000) und

beim Menschen nur 2 % verstoffwechselt (Filser, 1992). Bei höheren Konzentrationen wird der ET-Metabolismus gesättigt; bei der Ratte wird die maximale Metabolismusrate von $8,5 \mu\text{mol}/(\text{h}\cdot\text{kg})$ bei ET-Konzentrationen von über 1000 ppm erreicht (Andersen *et al.*, 1980; Bolt *et al.*, 1984; Csanády *et al.*, 2000), 50 % der maximalen Rate bei circa 200 ppm (Andersen *et al.*, 1980; Bolt und Filser, 1987). Csanády *et al.* (2000) analysierten die Daten von Bolt *et al.* (1984) mit einem physiologisch-toxikokinetischen Modell und erhielten eine Konzentration von 125 ppm ET bei 50 % der maximalen Metabolismusrate. Auf eine Sättigung des ET Metabolismus wurde auch aus Messungen von DNA- und Hämoglobin-Addukten als Biomarker für EO nach Exposition von Mäusen und Ratten gegen niedrige (bis 40 ppm) und hohe (über 1000 ppm) Konzentrationen von ET geschlossen (Ehrenberg *et al.*, 1977; Segerbäck, 1983; Walker *et al.*, 2000).

Die endogene Produktion von EO wurde in Abatmungsstudien an Ratten (Shen *et al.*, 1989; Denk, 1990; Filser, 1992) mittels des von Filser (1992) entwickelten Expositionssystems untersucht. Unter Berücksichtigung des toxikokinetischen Verhaltens von ET wurde eine mittlere Produktionsrate von $10,3 \text{ nmol}/(\text{h}\cdot\text{kg})$ berechnet.

Im Gegensatz zu ET ist der Großteil des inhalierten EO aufgrund seines großen Blut-zu-Luft-Verteilungskoeffizienten von 61 (Csanády *et al.*, 2000) systemisch verfügbar. EO ist amphiphil und verteilt sich darum gleichmäßig im gesamten Organismus (Csanády *et al.*, 2000). Der Metabolismus von EO ist schnell und folgt bis zu Konzentrationen von 200 ppm bei Mäusen (Brown *et al.*, 1998) und bis mindestens 300 ppm bei Ratten (Csanády *et al.*, 2000) einer linearen Kinetik. In diesem Konzentrationsbereich wird über 90 % des aufgenommenen EO metabolisch eliminiert (Csanády *et al.*, 2000). Die Nicht-Linearität bei EO-Konzentrationen oberhalb von 200 ppm bei der Maus wurde auf die durch GSH-Depletion verursachte Inhibition des GST-abhängigen Metabolismusweges zurückgeführt (Brown *et al.*, 1998).

Bei Ratten, die gegen hohe, konstante ET-Konzentrationen exponierten wurden, war die EO-Bildung nicht konstant. Die Konzentrations-Zeit-Verläufe von abgeatmetem EO (Filser und Bolt, 1984) und von EO im Blut (Maples und Dahl, 1993; Fennell *et al.*, 2004) waren komplex und zeigten einen raschen Anstieg der EO-Konzentration bis zu einem Maximum mit anschließendem Abfall der Konzentration bis zu einem Plateau, dessen Konzentration bei circa einem Drittel bis zur Hälfte der jeweiligen Maximalkonzentration liegt (siehe Abb. 1.2). Dieser Effekt konnte bisher nicht befriedigend erklärt werden.

Als Grundlage für eine Abschätzung des von ET ausgehenden Risikos für den Menschen ist das Verständnis der Dosis-Wirkungs-Beziehungen von ET und EO unerlässlich. Basierend auf Tierversuchen, in denen Ratten gegen EO exponiert wurden, nahmen Bolt und Filser (1984) für die Ratte eine Abschätzung des von ET ausgehenden Tumorrisikos vor, bei der sie von EO-Belastungen bei sehr hohen ET-Konzentrationen ausgingen und auf für den Menschen relevante niedrige Konzentrationen extrapolierten. Bevor eine solche Extrapolation des Risikos vom Versuchstier auf den Menschen

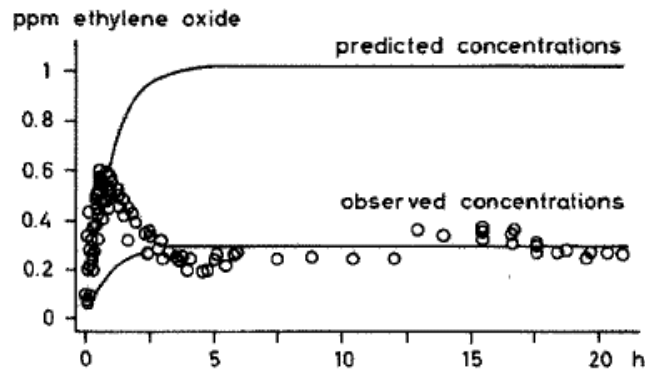


Abbildung 1.2 Vorhergesagter und tatsächlich beobachteter Konzentrations-Zeit-Verlauf von EO nach Exposition von zwei Ratten gegen 1000 ppm ET (aus Filser und Bolt, 1984). Jedes Symbol entspricht einer gemessenen Konzentration; die Werte stammen aus drei unabhängigen Experimenten.

übertragen werden kann, sollte nicht nur der Mechanismus, der zur schädigenden Wirkung führt, sondern auch die ET-bedingte EO-Belastung sowie die kinetischen Parameter von ET und EO bei Versuchstier und Mensch aufgeklärt sein. Bolt und Filser hatten keine Daten aus Tierversuchen zu EO-Konzentrationen nach Expositionen gegen niedrige ET-Konzentrationen zur Verfügung. Ihre Abschätzung muss demnach als vorläufig angesehen werden. Erklärung und anschließende Beschreibung des komplexen Konzentrations-Zeit-Verlaufs von EO durch ein auf experimentellen Daten an Versuchstier und Mensch beruhendes toxikokinetisches Modell für ET und seinen Metaboliten EO ist dringend erforderlich als Basis für eine Neubewertung des von ET-Expositionen ausgehenden Tumorrisikos für den Menschen.

1.4 Aufgabenstellung

Ziel der Arbeit ist es, die Belastung der Ratte durch EO in Abhängigkeit von Konzentration und Dauer der ET-Exposition, insbesondere auch für niedrige ET-Konzentrationen, zu quantifizieren. Außerdem sollen Studien zur Aktivität der ET- und EO-metabolisierenden Enzyme in Abhängigkeit von Höhe und Dauer der ET-Konzentration durchgeführt werden.

Als Basis für die Untersuchungen muss dementsprechend zur Bestimmung von niedrigsten EO-Konzentrationen im Blut (<100 nmol/l) eine hochempfindliche analytische Methode entwickelt werden. Da CYP2E1 in hohem Maße am Metabolismus von Alkenen beteiligt ist, soll die Aktivität dieses Enzyms in Abhängigkeit von Expositionsdauer und -höhe bestimmt werden. Hierzu muss ein in der Literatur beschriebener Assay modifiziert und in der Arbeitsgruppe etabliert werden.

EO wird vorwiegend durch die hepatische Glutathion-S-Transferase (GST) metabolisiert. Zur Untersuchung auf eine Veränderung der GST-Aktivität soll die Konzentra-

tion von GS-EO in der Leber in Abhängigkeit von Höhe und Dauer der ET-Exposition bestimmt werden. Zur Bestimmung von GS-EO muss eine entsprechend empfindliche LC-MS/MS-Methode entwickelt werden.

Nach Entwicklung der analytischen Methoden sollen zur Untersuchung des ET-Metabolismus Expositionen von Ratten durch einmalige ET-Gaben in ein geschlossenes Expositionssystem vorgenommen und die Konzentrations-Zeit-Verläufe von ET und EO verfolgt werden. Es sollen sowohl Expositionen gegen hohe als auch gegen niedrige ET-Konzentrationen bis hinunter zu 1 ppm erfolgen; außerdem soll die Kinetik nach Hemmung des ET-Metabolismus durch den Inhibitor Dithiocarb ermittelt werden. Durch 6-stündige Expositionen gegen konstante ET-Konzentrationen und anschließende Quantifizierung von EO in Blut soll die Korrelation des EO Konzentrations-Zeit-Verlaufs bzw. der EO-Konzentration in Blut mit der Konzentration von ausgeatmetem EO überprüft werden.

Eine mögliche Induktion der EO-metabolisierenden Enzyme soll durch 3-stündige Expositionen gegen konstante EO-Konzentrationen mittels Infusion einer EO-haltigen Lösung und Messung von EO im Blut zu festgelegten Zeitpunkten untersucht werden. Im Anschluss an die EO-Expositionen soll GS-EO in den Lebern der Ratten quantifiziert werden.

Die Inhalationsstudien von Filser und Bolt (1984) wurden mit Sprague-Dawley-Ratten (CD-Ratten) durchgeführt; in der bereits erwähnten Kanzerogenitätsstudie von ET (Hamm *et al.*, 1984) wurden Fischer-344-Ratten (F344-Ratten) verwendet. Da die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse für eine Risikoabschätzung verwendet werden sollen und hierfür im Allgemeinen die gleiche Spezies wie in der Kanzerogenitätsstudie verwendet werden soll, werden die Expositionen in dieser Arbeit mit F344-Ratten durchgeführt. Um herauszufinden, ob es bei beiden Rattenstämmen zu einer vergleichbaren EO-Belastung kommt und um die erhaltenen Daten auch mit denen von Filser und Bolt (1984) vergleichen zu können, werden die Inhalationsexperimente und Enzymaktivitätstests mit beiden Rattenstämmen durchgeführt.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Reagenzien

Acetonitril, LiChrosolv	Merck, Darmstadt
Ammoniumacetat, >99,99 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Atemkalk Drägerorb 800Plus	Dräger Medical AG, Lübeck
Chlorzoxazon, >98 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Deconex	Borer Chemie, Zuchwil, Schweiz
Diethylmaleat, >97 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethylen 3.5, >99.95 %	Linde, Oberschleißheim
Ethylenoxid 3.0, >99.9 %	Linde, Oberschleißheim
d ₄ -Ethylenoxid, 98 Atom % D	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
¹³ C ₂ -Ethylenoxid, 99 Atom % ¹³ C	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
L-Glutathionethylester, >95 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
L-Glutathion, oxidierte Form, 90 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
L-Glutathion, reduzierte Form, 98 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glutathion-S-Transferase aus Pferdeleber (55 U/mg Protein)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Helium 5.0	Linde, Oberschleißheim
6-Hydroxychlorzoxazon, ≥98 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Isoba (Isofluran)	Essex Tierarznei, München
Kaliumchlorid, >99 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Kaliumdihydrogenphosphat, p.a.	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat×3H ₂ O, p.a.	Merck, Darmstadt
Ketamin, 10 % (Ketaminhydrochlorid)	WDT, Garbsen
Laborfett Glisseal	Borer Chemie, Zuchwil, Schweiz
Liquemin N 25000 (Heparin)	Hoffmann-La Roche, Grenzach-Wylen
Luft, synthetisch, Sorte 231	Linde, Oberschleißheim
Magnesiumchlorid×6H ₂ O, ≥99,0 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Methanol, LiChrosolv	Merck, Darmstadt
Methanol, Picograde	LGC Promochem, Wesel
β-NADH, >98 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

β -NADPH, >97 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumchlorid, p.a.	Merck, Darmstadt
Natriumchloridlösung, physiologisch	Braun, Melsungen
Natriumdiethyldithiocarbamat, p.a.	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Protein Standard Set (Rinderserumalbumin in Kochsalzlösung)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Rompun	BayerVital, Leverkusen
Saccharose, 98 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Salzsäure, p.a.	Merck, Darmstadt
Stickstoff 5.0	Linde, Oberschleißheim
Stickstoff, flüssig	Linde, Oberschleißheim
Tris-(hydroxymethyl)-methylamin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Wasserstoff 5.0	Linde, Oberschleißheim

2.2 Geräte und Verbrauchsmaterial

- Analysenwaage Kern 770/GS/GJ (Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern)
- Apparatur zur nose-only Exposition einer Ratte *in vivo* (Patentnr. 424-0685, Filser und Kreuzer) (Kuglstatter, Garching; nach eigener Vorlage)
- Cryogenic Vials (Tieftemperatur-Gefäße), PP (Nalgene, Wiesbaden)
- Edelstahlkanüle 1,00 × 200 mm (Unimed, Lausanne, Schweiz)
- Einmalkanülen (Braun, Melsungen)
 - Nr. 1, 0,9 × 40 mm, 20 G × 1-1/2"
 - Nr. 17, 0,55 × 25 mm, 24 G × 1"
- Einmalspritzen, verschiedene Volumina (Braun, Melsungen)
- Einmalspritze, Volumen 10 ml; Becton Dickinson, Heidelberg
- Expositions-kugel (Kuglstatter, Garching; nach eigener Vorlage)
 - Planflansch Rundkolben, Glas, V = ca. 6,8l mit Planflanschdeckel; Mittelhals mit 24/29 Normschliffhülse, zwei Seitenhalse mit 14/23 Normschliffhülsen
- Exsikkatoren, Glas, verschiedene Volumina (Glaswerk Wertheim, Wertheim)
- Flüssigkeitschromatograph mit MS/MS

- Massenspektrometer API 4000 (Applied Biosystems, Darmstadt)
- HPLC-Pumpe Agilent 1100 binäre Pumpe (Agilent, Waldbronn)
- Agilent 1100 Thermo Autosampler (Agilent, Waldbronn)
- Säulenofen Agilent 1100 (Agilent, Waldbronn)
- Trennsäule Luna 5 μ C18(2), 150 \times 2 mm ID (Phenomenex, Aschaffenburg)
- Vorsäule Security Guard Cartridge Luna C18, 4 \times 2 mm (Phenomenex, Aschaffenburg)
- Workstation Dell PIV
- Gaschromatograph mit MSD (Agilent, Waldbronn)
 - GC Typ 6890A
 - MSD 5973
 - Trennsäule Poraplot U, 25 m \times 0,32 mm ID, 10 μ m Filmdicke (Chrompack, Frankfurt)
 - Injektor Thermal Desorption Cold Trap CP 4010 (Chrompack, Frankfurt)
 - Cold Trap Säule CP Sil CB, 30 cm \times 0,53 mm \times 5 μ m (Varian, Darmstadt)
- Gaschromatograph mit MSD (Hewlett Packard, Waldbronn)
 - GC Typ HP 5890, Serie II
 - MSD HP 5970
 - Trennsäule Poraplot U, 25 m \times 0,32 mm ID, 10 μ m Filmdicke (Chrompack, Frankfurt)
 - Injektor Thermal Desorption Cold Trap CP 4010 (Chrompack, Frankfurt)
 - Cold Trap Säule CP Sil CB, 30 cm \times 0,53 mm \times 5 μ m (Varian, Darmstadt)
- Gaschromatograph GC-8A (Shimadzu, Duisburg) mit
 - Flammenionisationsdetektor
 - Integrator Chromatopac C-R5A
 - Trennsäule Tenax TA 60–80 mesh, 2,5 m \times 1,8"
 - Trennsäule Tenax TA 60–80 mesh, 3,5 m \times 1,8"
 - Trennsäule Porapak Q 50–80 mesh, 2,5 m \times 1,8"
- GC-Injektor-Septen: Injection Rubber Plug (Shimadzu, Duisburg)
- Gasprobenbeutel: Tedlar Gasbeutel, Volumen 0,6 l, mit Septum (Alltech, Worms)

- Glasrohre, ID 4 mm, versch. Längen (K & K Laborbedarf, München)
- Hamiltonspritzen (Hamilton, Darmstadt)
 - Nr. 1010, 10 ml
 - Nr. 1005, 5000 µl
 - Nr. 1750, 500 µl
- Headspace-Gefäße, Borosilikatglas (neoLab, Heidelberg)
 - Injektionsvial, 50 ml, Ø 20 mm, Klarglas
 - Injektionsvial, 25 ml, Ø 20 mm, Braunglas
 - Injektionsvial, 2 ml, Ø 13 mm, Klarglas
 - Headspace Kappe mit Butyl/PTFE
 - Headspace Kappe aus rotem teflonkaschiertem Gummi
- Homogenisator Potter S (Braun, Melsungen)
 - Homogenisatorgefäße, Glas, mit Teflonstempel (50 ml, 15 ml, 5 ml)
- Infusionspumpe Precidor (Infors, Basel, Schweiz)
- Kaltlichtquelle Schott KL 1500 electronic mit Schwanenhals, 2-armig (Schott, Mainz)
- Kleintieroperationstisch, beheizbar (Braun, Tuttlingen)
- Kleintierrasierapparat favorita II GT 104 (Aesculap, Tuttlingen)
- Kodan Tinktur Forte (Schülke & Mayr, Norderstedt)
- Kolbenhubpipetten, verschiedene Volumina (Eppendorf, Hamburg)
- Kulturröhrchen Duran, 12×100 mm (Schott, Mainz)
- Magnetrührer Variomag MONO (H + P Labortechnik, Oberschleißheim)
- Magnetrührstäbe (Bohlender, Lauda)
- Narkosemittelverdampfer Ohmeda Tec3 (GE Health Care, München)
- Papiertücher, Kimwipes Lite 200 (Kimberley-Clark, Mühlheim-Kärlich)
- Pasteurpipetten (Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt)

- Perma-Hand Seide, schwarz, geflochten, RB-1 (Ethicon GmbH, Norderstedt)
- pH-Meter SevenEasy pH (Mettler-Toledo GmbH, Schwarzenbach)
- Präparationsbesteck (Aesculap, Tuttlingen)
- Präzisionsküvette aus Quarzglas Suprasil, Nr. 104B-QS, 10 mm Schichttiefe (Hellma, München)
- Schlauchpumpe Multifix M80 (Alfred Schwinherr, Schw. Gmünd)
 - Schlauchköpfe MINI-Z, MAGNA-Z (Alfred Schwinherr, Schw. Gmünd)
 - Schläuche für Schlauchpumpe, PE (K & K Laborbedarf, München)
- Schlinggazetupfer Askina No. 2 (Braun, Melsungen)
- Schüttelwasserbad GFL 1083 (GFL, Burgwedel)
- Septa CS, Silikon, PTFE-beschichtet, 12,5 mm Ø (SGE, Weiterstadt)
- Spritzenfilter Minisart, Porengröße 0,45 µm (Sartorius, Göttingen)
- Tuberkulinspritze, 1 ml (Braun, Melsungen)
- Ultraschall-Homogenisator Sonoplus HD2070 (Bandelin electronic GmbH, Berlin)
- Ultrazentrifuge Beckmann L8-M mit Rotor 50.2Ti (Beckmann, Palo Alto, USA)
- UV/VIS Spektralphotometer Lambda 5 (Perkin-Elmer, Überlingen)
- Venenverweilkanüle Braun Introcán-W, 24 G × 3/4" (Braun, Melsungen)
- Verschlusskonus Combi, Luer Lock (Braun, Melsungen)
- Vortex VF2 (IKA, Staufen)
- Zentrifuge Hettich EBA 12R (Hettich, Tuttlingen)
- Zentrifuge Sorvall Superspeed RC2-B mit Rotor Sorvall-SS34 (DuPont, Bad Homburg)
- Zentrifuge Sigma 4K 15 mit Rotor Sigma Nr. 11140 und Rotoreinsatz Sigma Nr. 13115 (Sigma, Osterode)
- Zentrifugenröhrchen Nalgene UltraPlus, 26,3 ml, PC/PPO (Nalge, Rochester, USA)
- Zentrifugenröhrchen Sorvall-Tubes, 50 ml, PP (DuPont, Wilmington, USA)

2.3 Versuchstiere

Die Versuche wurden mit männlichen F344-Ratten und männlichen CD-Ratten von 220–350 g Körpergewicht durchgeführt. Insgesamt wurden 146 Tiere exponiert und zusätzlich 120 Kontrolltiere verwendet. Alle Tiere wurden von der Versuchstierzucht Charles River Wiga GmbH, Sulzfeld, bezogen. Sie wurden bis zu ihrer Verwendung allein oder zu zweit in Makrolonkäfigen Typ 3, hoch, in einer Top Flow System IVC-Anlage (Tecniplast, Buguggiate, Italien) bei konstanter Raumtemperatur (23 °C) und konstanter relativer Luftfeuchtigkeit (60 %) in 12-stündigem Hell-Dunkel-Rhythmus (Licht von 7 Uhr bis 19 Uhr) gehalten. Die Luft wurde über Aktivkohlefilter gereinigt. Alle Versuchstiere erhielten eine Standarddiät (Nr. 1320, Fa. Altromin, Lage, Westfalen) und Leitungswasser *ad libitum*.

Der Tierversuch war von der Regierung von Oberbayern genehmigt worden und wurde vom Fachtierarzt für Versuchstierkunde und Tierschutz, Dr. med. vet. Lutz Ruprecht, beaufsichtigt.

2.4 Expositionen

2.4.1 Ganzkörperexpositionen gegen Ethylen im geschlossenen Expositionssystem

Zur Untersuchung der Inhalationskinetik von ET bei gleichzeitiger Quantifizierung des abgeatmeten EO in der Kammeratmosphäre wurden Ratten in einem Exsikkator sowohl gegen initial vorgegebene als auch gegen konstant gehaltene Konzentrationen von ET exponiert. Die Exposition von Ratten gegen konstante Konzentrationen von ET zur anschließenden Bestimmung des gebildeten EO im Blut der Tiere erfolgte in einer Expositionskugel, die für EO ein geschlossenes Expositionssystem darstellte.

2.4.1.1 Aufbau der Expositionssysteme

Die Expositionen von Ratten gegen ET erfolgten nach einer von Filser beschriebenen Methode (Filser, 1992). Die unter einem Abzug aufgebauten Expositionssysteme, die in Abb. 2.1 schematisch dargestellt sind, bestanden aus einem Exsikkator (Volumen 6,3 l) bzw. einer Expositionskugel (Volumen 68 l) (1), in die eine gelochte Metallplatte bzw. ein faltbarer Bodeneinsatz aus PVDF (Polyvinylidenfluorid) als Unterlage für die Tiere eingesetzt war (2). Auf einer weiteren, tiefer angebrachten Metallplatte oder Schale befanden sich ca. 15 g Atemkalk pro Tier zur Absorption des abgeatmeten CO₂ (3). Das absorbierte CO₂ wurde sofort durch die gleiche Menge Sauerstoff ersetzt, die aus einer Gasflasche (4) durch eine kleine Waschflasche mit einer Wassersäule von etwa 1 cm (5) zum Expositionssystem geleitet wurde. Eine große Waschflasche (6) mit

einer Wassersäule von etwa 3 cm diente als Überdruckventil, um überschüssigen Sauerstoff abzuleiten. Ein durch einen Magnetrührer (7) angetriebener Rührstab (8) auf dem Boden des Expositionssystems sorgte für die Durchmischung der Atmosphäre. Die Entnahme der Luftproben und gegebenenfalls die Zugabe von ET erfolgte durch ein teflonbeschichtetes Septum (9). Während der Probennahme wurde der Zweiweghahn (10) vor dem Septum geschlossen, um ein Nachströmen von Sauerstoff zu vermeiden. Um die Temperatur im Exsikkator konstant zu halten, stand dieser in einem temperierten Wasserbad (23 °C) (11). Die Temperatur im Innern der Expositionssysteme wurde durch ein auf der Ebene des Atemkalks befestigtes Thermometer kontrolliert und betrug während der Expositionen zwischen 23 °C und 26 °C.

2.4.1.2 Durchführung der Expositionen

Die Expositionen im Exsikkator wurden mit je fünf CD-Ratten bzw. je zwei oder fünf F344-Ratten (Tiergewicht zwischen 280 und 350 g, 43 exponierte Tiere und 16 Kontrolltiere) durchgeführt. Nach Zugabe des Atemkalks und Einsetzen der Tiere wurde der Exsikkator dicht verschlossen.

Bei Expositionen zur Bestimmung der Aufnahme von ET wurde zu Beginn eine definierte Menge reines ET, die nach Gl. 2.1 berechnet wurde, mittels einer Einmalspritze in die Exsikkatoratmosphäre gegeben. Die initialen ET-Konzentrationen betrugen zwischen 30 und 10 000 ppm. Während der jeweils 6-stündigen Expositionen wurde die Konzentration von ET in der Gasatmosphäre der Expositionskammer mittels eines Gaschromatographen, der mit einem Flammenionisationsdetektor versehen war (GC/FID) bestimmt.

$$V_I = \frac{c_{erw} \cdot (V_{Exs} - V_R - V_A)}{10^6} \quad (2.1)$$

V_I : zu injizierendes Volumen an ET bzw. EO [ml]

c_{erw} : erwünschte Konzentration von ET bzw. EO im Exsikkator [ppm]

V_{Exs} : Exsikkatorvolumen [ml]

V_R : Summe der Rattenvolumina [ml]

V_A : Volumen des Atemkalks [ml]

10^6 : Faktor zur Umrechnung auf ppm

Zur Messung von abgeatmetem EO wurde die ET-Konzentration konstant gehalten. Hierzu wurde wiederholt ET in die Exsikkatoratmosphäre gegeben, um den metabolismusbedingten Verlust von ET auszugleichen. Die mittleren ET-Konzentrationen betrugen zwischen 1 und 10 000 ppm. Während der jeweils 6 Stunden dauernden Expositionen wurden die Konzentrationen von ET und EO in der Expositionskammer

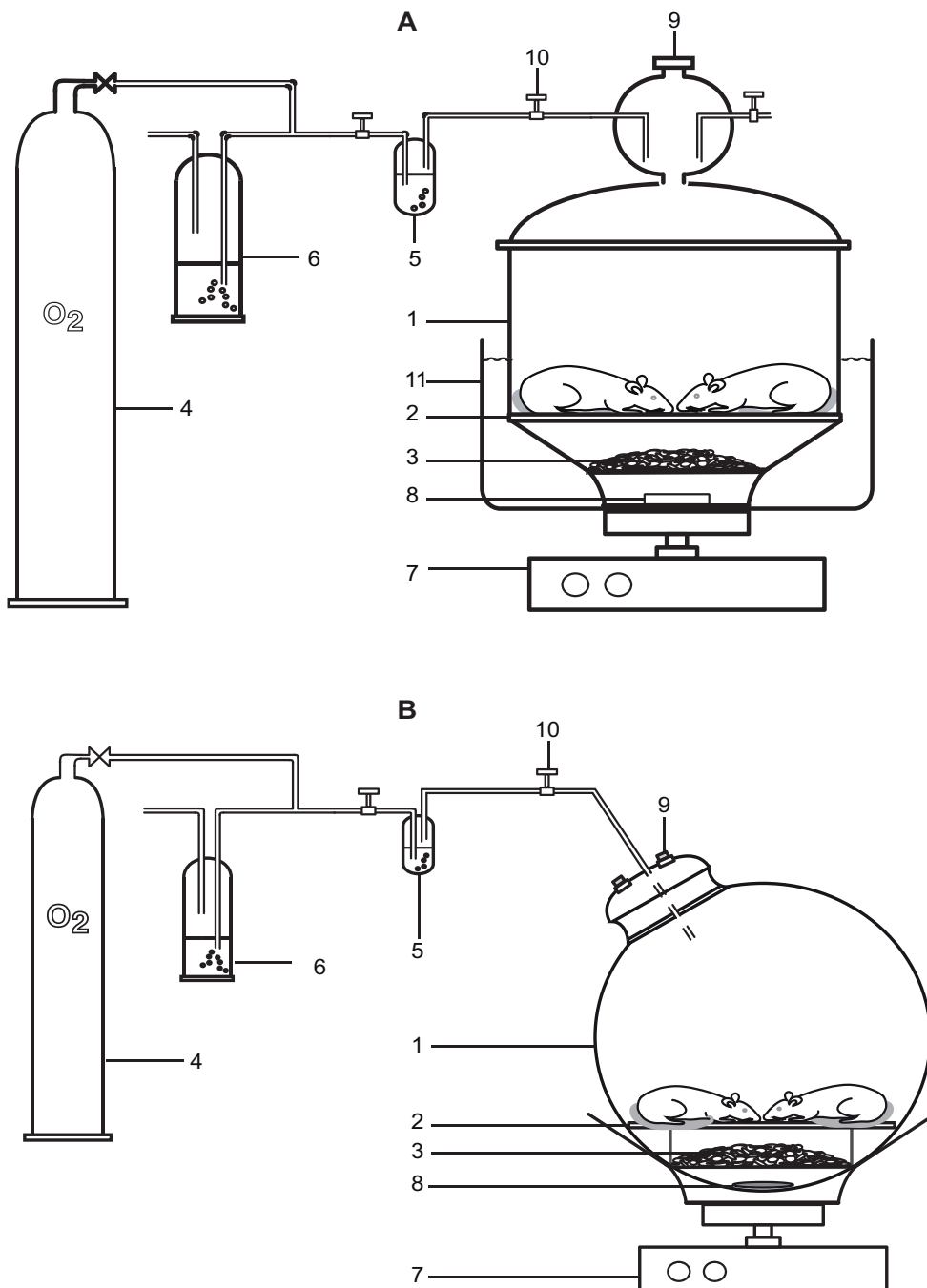


Abbildung 2.1 Expositionssysteme zur inhalativen Ganzkörperexposition von Ratten im geschlossenen Expositionssystem. **A** Exsikkator, Volumen = 6,3 l, **B** Expositionskugel, Volumen = 68 l. **1** Exsikkator bzw. Expositionskugel, **2** Lochplatte, **3** Atemkalk, **4** Sauerstoffflasche, **5** kleine Waschflasche, **6** große Waschflasche, **7** Magnetrührer, **8** Magnetrührstab, **9** Septum, **10** Zweisegehahn, **11** Wasserbad.

mittels GC/FID bzw. mit einem Gaschromatographen, der mit einem massenselektiven Detektor gekoppelt war (GC/MSD), bestimmt (vgl. 2.5.1).

Zur Bestimmung von EO im Blut und zur Quantifizierung des hepatischen GS-EO wurden jeweils 3 – 6 männliche CD- bzw. F344-Ratten (Körpergewicht 240 – 350 g, Gesamtzahl der Tiere: 95 (+ 96 Kontrolltiere)) über Zeiträume zwischen 10 Minuten und 6 Stunden gegen konstante ET-Konzentrationen exponiert. Für diese Expositionen wurde ein Expositionssystem mit sehr großem Luftraum (Volumen 68 l) gewählt, um trotz des während der Exposition notwendigen Öffnens der Kugel eine möglichst konstante ET-Konzentration zu gewährleisten. Die mittleren ET-Konzentrationen betragen zwischen 30 und 1000 ppm. Die Tiere wurden vor Einsetzen in das Expositionssystem gewogen und mit einem wasserfesten Stift individuell markiert. Die Ratten wurden zeitversetzt in einem Abstand von je 30 Minuten eingesetzt, damit sie am Expositionsende nacheinander behandelt werden konnten (Betäubung, Tötung, Organentnahme). Auf diese Weise war gewährleistet, dass alle Tiere für die gleiche Dauer exponiert wurden. Die Expositionsdauer betrug 10 Minuten, 30 Minuten, 1 Stunde, 3 Stunden oder 6 Stunden. Jeweils 30 Minuten vor Ende der Expositionsdauer wurde jeweils ein Tier entnommen und narkotisiert. Hierzu wurden 0,8 ml einer 10%igen Ketaminlösung (WDT, Garbsen) und 1,0 ml einer 2%igen Rompunlösung (BayerVital, Leverkusen) vermischt und hiervon jedem Tier 0,2 ml pro 100 g Körpergewicht intraperitoneal injiziert. Nach der Injektion wurde die Ratte zurück in die Expositionskugel gesetzt und weiter exponiert. 30 Minuten nach Einleiten der Narkose wurde die narkotisierte Ratte aus der Kugel entnommen und sofort getötet, damit kein EO-Verlust durch Abatmung erfolgen konnte. Ratten, die nur 10 Minuten exponiert wurden, wurden 20 Minuten vor Einsetzen in die Expositionskugel narkotisiert.

Unmittelbar nach der Tötung wurde der Bauchraum der Tiere eröffnet, die *vena cava* freigelegt, kurz vor Eintritt in das Herz punktiert und mittels einer heparinisierten Einmalspritze zwischen 5 und 6 ml Blut entnommen. Dies wurde sofort in ein verschlossenes Headspace-Gefäß injiziert und anschließend, wie in 2.5.2.2 beschrieben, die EO-Konzentration im Blut durch GC/MSD-Messung bestimmt. Nach der Blutentnahme wurde die Leber freipräpariert, entnommen, gewogen, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Die entnommenen Lebern dienten sowohl zur Bestimmung von GS-EO (vgl. 2.5.4) als auch zur Aktivitätsbestimmung von CYP2E1 (vgl. 2.5.3). Die Zeitdauer zwischen Entnahme des Tiers aus der Expositionskugel und dem Injizieren des Blutes in das Headspace-Gefäß betrug höchstens 3 Minuten.

Zur Untersuchung der Hemmung des ET-Metabolismus wurde eine Lösung von 50 mg/ml Natriumdiethyldithiocarbamat (Dithiocarb) in isotoner Kochsalzlösung hergestellt und den Ratten 200 mg pro kg Körpergewicht intraperitoneal injiziert. Dithiocarb bewirkt eine Inaktivierung von CYP2E1 (Chang *et al.*, 1994; Spracklin *et al.*, 2003). Die Tiere wurden dann 30 Minuten nach der Behandlung wie oben beschrieben

gegen ET exponiert und die Konzentrationen von ET und EO in der Expositionskammer mittels GC/FID bestimmt.

2.4.2 Nasenexpositionen gegen konstante Konzentrationen von Ethylen im offenen Expositionssystem

Bei der Exposition von Ratten gegen ET im geschlossenen Expositionssystem kommt es zur Abatmung von metabolisch gebildetem EO, welches von den Tieren auch wieder eingeatmet wird. Um zu untersuchen, ob sich die EO-Konzentration im Blut bei Ganzkörperexposition der Ratten im geschlossenen Expositionssystem von der bei alleiniger Nasenexposition im offenen System unterscheidet, wurden Ratten in einer „nose-only-Apparatur“ gegen ET exponiert und unmittelbar anschließend das gebildete EO im Blut quantifiziert.

2.4.2.1 Aufbau des Expositionssystems

Jeweils eine Ratte wurde in einer nose-only-Kammer (Patentnr. 4240685, Filser und Kreuzer) gegen ET-Gas exponiert. Die Kammer war mit einem Pumpensystem zur Generierung einer konstanten ET-Konzentration in der Einatemluft des Tieres verbunden (siehe auch Kreuzer, 1992). Eine schematische Abbildung des Systems zeigt Abb. 2.2.

Die Ratte, deren Nasenspitze in die gläserne Kopfkammer (5) ragte, wurde mit Hilfe eines Teflonschiebers in einem gläsernen, zylinderförmigen Schlitten fixiert. Der Schlitten verfügte über eine ganze Reihe von Perforationen zum Gasaustausch mit der Umgebung. Er war über einen Schliff mit der Kopfkammer verbunden. Auf der Unterseite des Fixierschlittens (6) befanden sich weitere Öffnungen zum Durchlassen von Urin und Kot. Die Kopfkammer war durch eine mit einem Schnellverschluss fixierbare gläserne Verschlusskappe mit Septum abgedichtet. Bei aufgesetzter Verschlusskappe betrug das Volumen der Kopfkammer 840 ml. Die Zu- und Ableitung der ET-haltigen Luft zur bzw. von der Kammer erfolgte über Glasrohre, die durch Silikonschlauchstücke mit der Kammer verbunden waren. Die ET- und EO-haltige Abluft wurde durch eine mit verdünnter Salzsäure gefüllte Waschflasche (8) in den Abzug geleitet und EO so hydrolysiert. An das Pumpensystem war eine ET-Vorratskugel (2) angeschlossen, in der eine bestimmte ET-Konzentration durch wiederholtes Nachdosieren von gasförmigem ET aufrecht erhalten wurde. Die Kugelatmosphäre wurde durch einen mittels Magnetrührer (1) angetriebenen Rührstab durchmischt. Nach Durchmischung mit Raumluft wurde per Schlauchpumpe die gewünschte ET-Konzentration in der Expositionskammer generiert. Durch Septen, die sich vor (4) und nach der Kammer (7) befanden, konnten Gasproben entnommen werden.

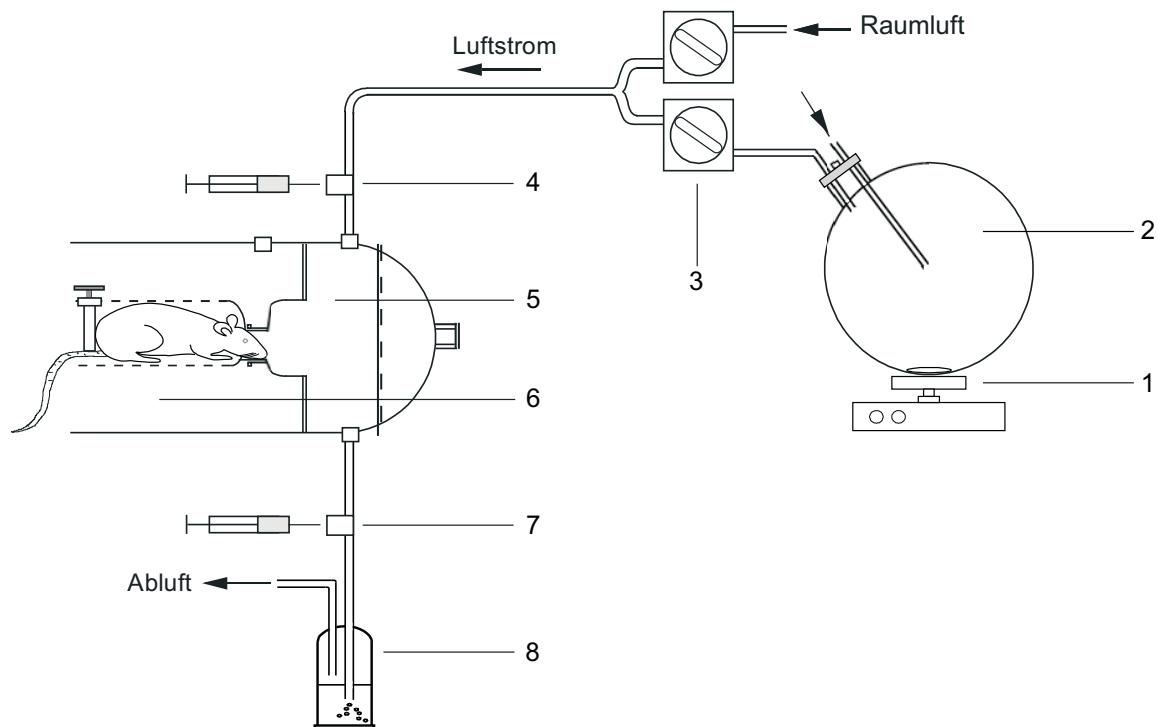


Abbildung 2.2 Apparatur zur inhalativen Nasenexposition im dynamischen System. **1** Magnetrührer, **2** ET-Vorratskugel, **3** Schlauchpumpe, **4** Septum zur Probennahme vor der Kammer, **5** Kopfkammer, **6** offene Glaskammer mit Fixierschlitten, **7** Septum zur Probennahme nach der Kammer, **8** mit verdünnter Salzsäure gefüllte Waschflasche.

2.4.2.2 Durchführung der Expositionen

In der Apparatur wurde jeweils eine männliche F344-Ratte (220–250 g, Gesamtzahl der Tiere: 3 (+ 3 Kontrolltiere)) 6 Stunden lang gegen ET exponiert. Vor Expositionsbeginn wurde in der Vorratskugel eine bestimmte ET-Konzentration generiert. Nach Verschließen der Kopfkammer und Anschalten der an die Kugel angeschlossenen Pumpe wurde im Expositionssystem die gewünschte ET-Konzentration eingestellt. Durch die zweiköpfige Schlauchpumpe wurde Raumluft mit ET-haltiger Luft aus der Vorratskugel vermischt und das Gemisch durch Glasrohre zur Expositionskammer gepumpt. Sobald die gewünschte Expositionskonzentration erreicht war, wurde die Ratte gewogen, anschließend für die Dauer der Fixierung mit Isofluran (3 % in Sauerstoff) betäubt und mit Hilfe eines Teflonschiebers im Schlitten fixiert. Ein Gummiüberzug um die Austrittsöffnung des Schlittens für die Rattennase diente zur Verhinderung von Gasverlust aus der Kopfkammer. Mit dem Einschleiben des Schlittens in die Kopfkammer wurde die Exposition gestartet. Während der Exposition wurde durch regelmäßige Probennahmen sowohl vor, nach und in der Kopfkammer als auch in der Vorratskugel die ET-Konzentration gemessen und gegebenenfalls ET aus der Druckgasflasche in die Vorratskugel nachdosiert.

Nach sechsständiger Exposition wurde das Tier aus der Apparatur entnommen, erneut mit Isofluran betäubt und getötet. Unmittelbar anschließend wurde die tote Ratte auf einem Kleintieroperationstisch fixiert, der Bauchraum eröffnet, die *vena cava* freigelegt, kurz vor Eintritt in das Herz punktiert und mittels einer heparinisierten Einmalspritze zwischen 5 und 6 ml Blut entnommen. Dann wurde sofort die EO-Konzentration im Blut bestimmt (vgl. 2.5.2.2). Zwischen der Entnahme der Ratte aus der Apparatur und dem Einspritzen des Blutes in ein verschlossenes Headspace-Gefäß vergingen höchstens 7,5 Minuten. Nach der Blutentnahme wurde außerdem die Leber des Tieres entnommen, gewogen, sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.4.3 Systemische Exposition gegen Ethylenoxid

Um einen möglichen Einfluss von EO auf die Aktivität der EO-metabolisierenden Enzyme GST und EH zu untersuchen, wurden Ratten kontinuierlich EO-Lösungen konstanter Zusammensetzung infundiert. Während jeder Exposition wurde der Konzentrations-Zeit-Verlauf von EO im Blut ermittelt. Nach Expositionsende wurden die Aktivität von CYP2E1 in Lebermikrosomen und die Konzentration des S-Glutathionaddukts von EO in der Leber quantifiziert.

2.4.3.1 Aufbau des Expositionssystems

Die in einem Exsikkator durch Isofluraninhalation betäubte Ratte wurde auf einem auf Körpertemperatur erwärmten Kleintieroperationstisch (1) fixiert (Abb. 2.3) und bei kontinuierlicher Anästhesie – durch Einatmen eines Gemisches aus 2%igem Isoflurandampf in Atemluft über eine Atemmaske – ein Katheter (Venenverweilkanüle Introcath) in die *vena femoralis* implantiert, der über einen an einen Konus angeschlossenen PVC-Schlauch mit einer Glasspritze verbunden war. Unter Verwendung einer Infusionspumpe (5) wurde dem Tier EO in physiologischer Kochsalzlösung (0,44, 2,53 und $4,54\text{ }\mu\text{mol/h}$) mit einer gleichmäßigen Geschwindigkeit von 1 ml/h 180 Minuten lang infundiert.

2.4.3.2 Durchführung der Expositionen

Vor Expositionsbeginn wurde zunächst die zu applizierende EO-Lösung in physiologischer Kochsalzlösung in der gewünschten Konzentration hergestellt. Dazu wurde in ein mittels Septum verschlossenes 50-ml-Headspacegefäß eine definierte Menge EO-Gas injiziert und die EO-Konzentration in der Gasphase des Gefäßes c_0^{Gas} mittels GC/FID-Messung bestimmt. Anschließend wurden mit einer Einmalspritze 8 ml einer physiologischen Kochsalzlösung durch das Septum injiziert und das Gefäß im

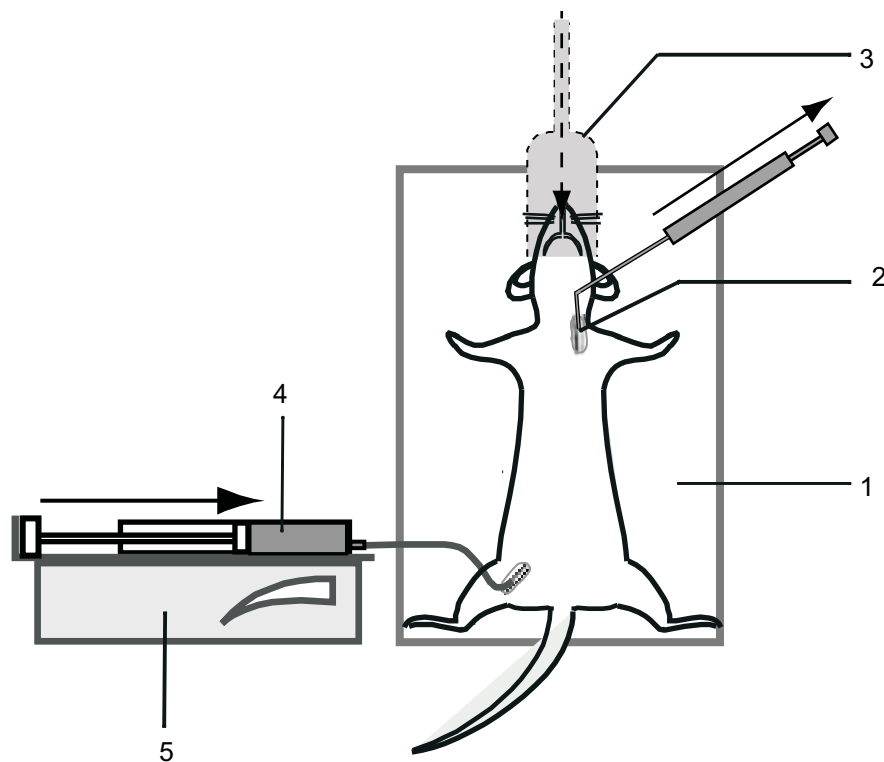


Abbildung 2.3 Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Infusion einer EO-Lösung in die *vena femoralis* einer Ratte. **1** beheizter OP-Tisch, **2** Stelle der Blutentnahme (Venenwinkel), **3** Maske zur Inhalation von Narkotikum, **4** EO-Lösung, **5** Infusionspumpe.

Schüttelwasserbad bei 25 °C für 20 Minuten inkubiert. Nach beendeter Inkubation wurde die Konzentration von EO in der Gasphase c_{∞}^{Gas} gemessen und nach Gl. 2.2 die EO-Konzentration in Lösung c_{∞}^{Lsg} bestimmt.

$$c_{\infty}^{\text{Lsg}} = \frac{c_0^{\text{Gas}} \cdot V_V - c_{\infty}^{\text{Gas}} \cdot V_{\text{Gas}}}{V_{\text{Lsg}} \cdot 25130} \quad (2.2)$$

- c_{∞}^{Lsg} : Konzentration von EO in Kochsalzlösung
bei eingestelltem Verteilungsgleichgewicht [$\mu\text{mol/ml}$]
- c_0^{Gas} : Anfangskonzentration von EO in der Gasphase [ppm]
- V_V : Volumen des Headspacegefäßes [ml]
- c_{∞}^{Gas} : Konzentration von EO in der Gasphase nach Inkubation [ppm]
- V_{Gas} : Volumen der Gasphase des Headspacegefäßes [ml]
- V_{Lsg} : Volumen der Kochsalzlösung [ml]
- 25130: Umrechnungsfaktor von ppm in $\mu\text{mol/ml}$ bei 25 °C

Es wurde jeweils eine männliche F344-Ratte (Tiergewicht zwischen 255 und 270 g, 5 exponierte Tiere und 5 Kontrolltiere) exponiert. Zu Beginn der Exposition wurde

die Ratte gewogen und mit Isofluran betäubt. Während der gesamten Operations- und Expositionszeit befand sich das Tier unter Isofluran-Inhalationsnarkose. Nach Fixierung auf einem beheizten Kleintieroperationstisch (Temperatur 36 °C bis 40 °C) wurde der Ratte ein Katheter in die *vena femoralis* des rechten Hinterbeins implantiert. Hierzu wurde das Beinfell entfernt, die Haut an der Innenseite des Beins eröffnet und die Vene freigelegt. Nach der Implantation wurde die Kanüle über einen Konus mit einem Schlauch verbunden, durch den mittels Glasspritze und angeschlossener Infusionspumpe anschließend die EO-haltige physiologische Kochsalzlösung geleitet wurde. 30 Sekunden nach Aufstecken des Konus und Starten der Infusionspumpe (Fließgeschwindigkeit 1 ml/h) wurde die Expositionszeit gestartet. Nach dieser Zeit hatte die EO-haltige Lösung den Schlauch vollständig gefüllt und die Spitze des Katheters erreicht.

Die Kontrolltiere wurden analog behandelt, ihnen wurde jedoch eine physiologische Kochsalzlösung statt einer EO-haltigen Lösung infundiert.

Während der Exposition wurden der Ratte zu festgelegten Zeitpunkten je 0,5 ml Blut entnommen. Die Blutentnahme erfolgte unter Verwendung von heparinisierten Tuberkulinspritzen abwechselnd aus dem rechten und linken Venenwinkel (*angulus venosus*). Zur finalen Blutentnahme nach 3 Stunden wurde eine Herzpunktion durchgeführt. Unmittelbar nach jeder Blutentnahme wurde die Konzentration von EO im Blut bestimmt (vgl. 2.5.2.2). Nach der finalen Blutentnahme wurde das betäubte Tier durch Eröffnung von Bauch- und Brustraum getötet. Die Leber wurde entfernt, gewogen, sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei –80 °C gelagert. In der Leber wurde das gebildete GS-EO quantifiziert (vgl. 2.5.4).

2.5 Analytische Methoden

2.5.1 Bestimmung von Ethylen und Ethylenoxid in der Gasphase mittels GC/FID

Während der Exposition der Ratten gegen ET erfolgten die quantitativen Bestimmungen von ET und EO in der Gasphase des Expositions- bzw. des Vorratssystems mittels GC/FID in Anlehnung an Filser *et al.* (1992) und Csanády *et al.* (2000). Die Gasproben wurden mit einer gasdichten Hamiltonspritze (ET bzw. EO, Methode A) bzw. mit einer 10-ml-Einmalspritze (EO, Methode B) aus der zu untersuchenden Atmosphäre entnommen. Sie wurden direkt über ein Septum (ET bzw. EO, Methode A) bzw. über eine Probenschleife (EO, Methode B) in einen Gaschromatographen mit Flammenionisationsdetektor (Shimadzu GC-8A) injiziert. Die Auftrennung erfolgte isotherm auf einer mit Tenax gepackten Edelstahlsäule. Die gaschromatographischen Konditionen zur Bestimmung von ET und EO sind in Tab. 2.2 zusammengefasst. Als Brenngase

Tabelle 2.2 GC-FID-Konditionen zur Bestimmung von ET und EO.

	ET	EO Methode A	EO Methode B
GC	GC-8A	GC-8A	GC-8A
Detektor	FID	FID	FID
Trennsäule	Tenax TA, 60–80 mesh 2,5 m × 1/8"	Tenax TA, 60–80 mesh 3,5 m × 1/8"	Tenax TA, 60–80 mesh 2,5 m × 1/8"
Säulentemp.	50 °C	130 °C	90 °C
Injektionsart	direkt	direkt	Schleife
Probenvolumen	200 µl	500 µl	5 ml
Injektortemp.	150 °C	200 °C	150 °C
Retentionszeit	ca. 1 min	ca. 4,7 min	ca. 7,5 min
N ₂ , Vordruck	2,0 kg/cm ²	2,0 kg/cm ²	2,5 kg/cm ²
H ₂ , Vordruck	0,6 kg/cm ²	0,6 kg/cm ²	0,6 kg/cm ²
Luft, Vordruck	0,6 kg/cm ²	0,6 kg/cm ²	0,6 kg/cm ²
Integrator	Chromatopac C-R5A	Chromatopac C-R5A	Chromatopac C-R5A

dienten Wasserstoff und synthetische Luft, als Trägergas Stickstoff. Die Integration der Signale erfolgte automatisch durch den Integrator C-R5A. Bei nicht automatisch integrierbaren Signalen wurde die Peakhöhe mittels Lineal ausgemessen.

Zunächst wurde für jede Methode die Proportionalität der ET- bzw. EO-Konzentration zum Detektorsignal in den für die Expositionen relevanten Konzentrationsbereichen bestimmt, für ET von 1 ppm bis 10 000 ppm, für EO von 0,1 bis 5 ppm (vgl. 3.1.1). Zur Herstellung einer definierten ET- bzw. EO-Konzentration in einem Exsikkator wurde nach Gl. 2.3 das benötigte Gasvolumen an reinem ET bzw. EO berechnet. Bei der Herstellung von niedrigeren Gaskonzentrationen wurde zunächst ein Vorratsexsikkator nach Gl. 2.3 hergestellt und das Gasmisch nach Gl. 2.4 verdünnt.

$$V_{VI} = \frac{c_{Verw} \cdot V_{VExs}}{10^6} \quad (2.3)$$

V_{VI} : in den Vorratsexsikkator zu injizierendes Volumen an reinem gasförmigem ET bzw. EO [ml] bei Raumtemperatur

c_{Verw} : erwünschte Konzentration von ET bzw. EO im Vorratsexsikkator [ppm]

V_{VExs} : Volumen des Vorratsexsikkators [ml]

10^6 : Faktor zur Umrechnung auf ppm

$$V_I = \frac{c_{\text{erw}} \cdot V_{\text{Exs}}}{c_{\text{Vorrat}}} \quad (2.4)$$

V_I : in den Exsikkator zu injizierendes Volumen an ET bzw. EO [ml]

c_{erw} : erwünschte Konzentration von ET bzw. EO im Exsikkator [ppm]

V_{Exs} : Volumen des Exsikkators [ml]

c_{Vorrat} : Konzentration von ET bzw. EO im Vorratsexsikkator [ppm]

Das berechnete Volumen an gasförmigem ET bzw. EO wurde mit einer Einmalspritze aus einer Druckgasflasche entnommen und nach Druckausgleich über ein teflonbeschichtetes Buthylgummiseptum in einen gasdicht verschlossenen Exsikkator eingespritzt. Um eine homogene Verteilung zu erreichen, wurde die Atmosphäre des Exsikkators ca. 10 Minuten mit einem Magnetprüher durchmischt. Mit einer gasdichten 500- μl -Hamiltonspritze bzw. einer 10-ml-Einmalspritze wurden nach zweimaligem Spülen der Spritzen jeweils drei Gasproben entnommen und in den Gaschromatographen injiziert. Die erhaltenen Signalflächen wurden integriert und gegen die Konzentrationen aufgetragen.

Vor jeder Exposition wurde eine Einpunktkalibrierung im Bereich der beabsichtigten Expositionskonzentration vorgenommen. Dazu wurde mindestens sechsmal eine Probe aus einem Kalibrierexsikkator analysiert. Aus den erhaltenen Signalflächen wurde ein Mittelwert gebildet und nach Gl. 2.5 der Eichfaktor $f_{\text{Fläche}}$ bestimmt. Mithilfe des Eichfaktors wurde dann nach Gl. 2.6 die ET- bzw. EO-Konzentration aus der Peakfläche berechnet.

$$f_{\text{Fläche}} = \frac{c_{\text{Vorrat}}}{\text{Mittelwert der Peakflächen}} \quad (2.5)$$

$f_{\text{Fläche}}$: Eichfaktor

c_{Vorrat} : Konzentration von ET bzw. EO im Vorratsexsikkator [ppm]

$$c = f_{\text{Fläche}} \cdot \text{Peakfläche} \quad (2.6)$$

c : ET- bzw. EO-Konzentration in der Atmosphäre der Expositionskammer [ppm]

$f_{\text{Fläche}}$: Eichfaktor

2.5.2 Bestimmung von Ethylenoxid mittels GC/MSD

Während einer ET-Exposition wurde exhalierendes EO direkt bzw. EO im Blut über ein Headspace-Verfahren mit GC/MSD-Systemen analysiert. Die Injektion von Gaspro-

ben (2, 5 oder 2 · 10 ml) erfolgte jeweils mit einer gasdichten Spritze über einen Thermal Desorption Cold Trap Injektor (TCT), Modell CP 4010, der mit einer Säule CP Sil CB, 30 cm x 0,53 mm (Filmdicke 5,0 µm), bestückt war. Die während der Injektion bei –150 °C ausgefrorene Gasprobe wurde anschließend im Injektor durch Aufheizen auf 200 °C verdampft und durch das Trägergas auf die Säule des GC transportiert. Die Injektorbedingungen für beide Verfahren waren identisch und sind in Tab. 2.3 aufgelistet. Vor Beginn der GC/MSD-Messungen wurde unter Verwendung der Funktion AUTOTUNE eine Kalibrierung der Massenachsen mit Perfluortributylamin (PFTBA) als Kalibrierstandard durchgeführt.

2.5.2.1 Bestimmung von exhalierem Ethylenoxid mittels GC/MSD

Während der Exposition von Ratten gegen ET erfolgte die quantitative Bestimmung von EO in der Atmosphäre sowohl mittels GC/FID (vgl. 2.5.1) als auch mittels GC/MSD. Bei der Bestimmung mittels GC/MSD wurden 5 ml der Gasproben mit einer gasdichten 5-ml-Spritze in das GC/MSD-System injiziert.

Die Bestimmung von EO in der Exsikkatoratmosphäre wurde mit einem Gaschromatographen Typ HP 5890 (Serie II) durchgeführt, der mit dem massenselektiven Detektor HP 5970 gekoppelt war. Die Injektion erfolgte über einen Thermal Desorption Cold Trap Injektor (TCT), Modell CP 4010. Die Integration der Chromatogramme erfolgte mittels der HP Chemstation Software (Hewlett Packard, Waldbronn). Die GC/MSD-Konditionen sind in Tab. 2.4 zusammengefasst.

Die Linearität der Detektorantwort wurde im niedrigen ppb-Bereich (10 bis 30 ppb) getestet (vgl. 3.1.2). Hierzu wurden wie in 2.5.1 beschrieben Exsikkatoren mit den entsprechenden EO-Konzentrationen hergestellt und jeweils eine 5-ml-Gasprobe in das GC/MSD injiziert. Vor jedem Versuch wurde eine Einpunktkalibrierung im Bereich der erwarteten EO-Konzentration durchgeführt.

Tabelle 2.3 Parameter des Thermal Cold Trap Injektors zur Bestimmung von exhalierem EO und EO im Blut.

Parameter	Einstellung
Laufzeit	25 min
Vorkühltemperatur	–150 °C
Vorkühlzeit	2 min
Desorbiertemperatur	200 °C
Desorbierzeit	5 min
Injektionstemperatur	200 °C
Rückspültemperatur	220 °C
Rückspülzeit	5 min

Tabelle 2.4 Informationen zu den GC/MSD-Konditionen zur Bestimmung von exhalierem EO und EO im Blut.

Gaschromatograph	
Trennsäule	Kapillarsäule Poraplot U, 25 m × 0,32 mm ID, 10 µm Filmdicke
Temperaturprogramm	Starttemperatur 70 °C für 1 min Heizrate 8 °C/min bis 140 °C 140 °C für 1 min Heizrate 20 °C/min bis 170 °C 170 °C für 10 min Gesamtlaufzeit 22,75 min
Trägergas	Helium
Trägergasfluss	1,9 ml/min bei 70 °C (berechnet)
Transfer Line	280 °C(exhalierem EO) bzw. 300 °C(EO im Blut)
Massenselektiver Detektor	
Ionisationsart	Elektronenstoßionisation (EI), 70 eV
Tune	Autotune
Quellentemperatur	230 °C
Quadrupoltemperatur	150 °C
Lösungsmittelausblendung	bis 5,00 min
Massendetektion (SIM)	Bestimmung von exhalierem EO: EO: m/z 29 (Quantifier), 44 (Qualifier) Bestimmung von EO im Blut: EO: m/z 15 (Quantifier), 29 (Qualifier), (44) ¹ d ₄ -EO: m/z (18) ¹ , 30 (Qualifier), 48 (Quantifier)
Dwellzeit	100 msec pro Fragment
Detektorabschaltung	nach 8,00 min

[1] Die Ionen m/z 44 (EO) und m/z 18 (d₄-EO) wurden bei der Methode zur Quantifizierung von EO im Blut zwar aufgezeichnet, jedoch aufgrund des teilweise sehr hohen Hintergrundrauschens durch H₂O (M=18 g/mol) bzw. CO₂ (M=44 g/mol) nicht als Qualifier oder Quantifier verwendet.

2.5.2.2 Bestimmung von Ethylenoxid im Blut mittels GC/MSD

Unmittelbar nach der Exposition der Ratten gegen konstante Konzentrationen von ET bzw. EO und anschließender Tötung der Tiere wurde ihnen Blut abgenommen (vgl. 2.4.1, 2.4.2 und 2.4.3.2) und darin die EO-Konzentration bestimmt. Zur Quantifizierung von EO wurde d₄-EO als interner Standard verwendet. Vor Beginn der Blutentnahme wurde in einem Exsikkator eine d₄-EO-Konzentration von 5 ppm hergestellt. In die Headspace-Gefäße (Volumen 25 ml bei Exposition gegen ET bzw. 2 ml bei iv-Exposition gegen EO) wurden zur Hemmung der GST je 20 bzw. 10 µl Diethylmaleat (DEM) gegeben (Boyland und Chasseaud, 1970), die Gefäße gasdicht verschlossen und gewogen. Während der Blutentnahme wurden aus den 25-ml-Headspace-Gefäßen mit einer 10-ml-Einmalspritze ca. 10 ml Luft entnommen und danach mit einer 2-ml-Einmalspritze 2 ml d₄-EO aus dem Vorratsexsikkator zugegeben. Bei Verwendung von 2-ml-Gefäßen wurde aus den verschlossenen Headspace-Gefäßen ca. 2 ml Luft mit einer 2-ml-Einmalspritze entfernt und danach mit einer 1-ml-Einmalspritze

0,2 ml d_4 -EO aus dem Vorratsexsikkator zugegeben.

Unmittelbar nach der Entnahme wurden die Blutproben (ca. 4–5 ml Blut bei Inhalationsversuchen bzw. 0,5 ml bei Infusionsversuchen) in die Headspace-Gefäße eingespritzt. Die Gefäße wurden kräftig geschüttelt, gewogen und anschließend in einem Schüttelwasserbad bei 37 °C inkubiert. Die Inkubation wurde nach 15 Minuten beendet, nachdem sich ein Gleichgewicht von EO und d_4 -EO zwischen Gasphase und wässriger Phase eingestellt hatte. Zur Entnahme einer Gasprobe wurde eine 20 cm lange Edelstahlkanüle bzw. eine Einmalkanüle (0,9 × 40 mm) mit einem Verschlusskonus verschlossen und so durch das Septum des Headspace-Gefäßes gestochen, dass die Spitze der Kanüle in das Blut tauchte. Mit einer gasdichten Spritze wurden nun zweimal 10 ml (Inhalationsversuche) bzw. einmal 2 ml (Infusionsversuche) Probe aus dem Gasraum entnommen. Während der Probennahme wurde der Verschlusskonus von der Kanüle entfernt, Luft von außen durch das Blut gezogen und damit weiteres EO und d_4 -EO aus der wässrigen Phase in die Gasphase überführt.

Die Gasproben von 2 ml wurden ohne weitere Behandlung in den GC/MSD injiziert, wohingegen die Gasproben von 20 ml sofort durch ein Septum in einen Tedlar-Gasprobenbeutel injiziert wurden, aus dem zuvor mit einer 20-ml-Einmalspritze die Luft vollständig entfernt worden war. Nach beendeter Probennahme wurde der Beutel für 20 Minuten bei -80 °C gelagert, um das enthaltene Wasser auszufrieren. Danach wurden zweimal Gasproben von je 10 ml aus dem Beutel entnommen und mittels GC/MSD analysiert (vgl. 2.5.2.2). Eine schematische Darstellung des Verfahrens zur Behandlung der Blutproben ist in Abb. 2.4 gezeigt.

Gaschromatographische Bedingungen

Die Bestimmung von EO im Blut wurde mit einem Gaschromatographen Typ 6890A durchgeführt, der mit dem massenselektiven Detektor MSD 5973 ausgestattet war. Weitere Informationen zu den GC/MSD-Konditionen sind in Tab. 2.4 zusammengefasst.

Mittels einer gasdichten Spritze wurden die Gasproben in den Injektor injiziert. Die während der Injektion bei -150 °C ausgefrorene Gasprobe wurde anschließend im Injektor durch Aufheizen auf 200 °C verdampft und durch das Trägergas auf die Säule des GC transportiert. Nach gaschromatographischer Auftrennung der Substanzen auf einer Poraplot U Kapillarsäule wurde das Chromatogramm von dem massenselektiven Detektor im EI-Modus aufgezeichnet. Zur Detektion von EO wurden im SIM-Modus die charakteristischen Ionen m/z 15 und 29 detektiert, für d_4 -EO die Ionen m/z 30 und 48 (Einzelheiten zur Auswahl und Charakterisierung der Ionen vgl. 3.1.3). Zur Quantifizierung von EO wurde das Ion m/z 15 verwendet. Das Ion m/z 29 wurde als Qualifier eingesetzt und diente so durch Vergleich der Retentionszeiten und durch Bestimmung des Verhältnisses m/z 29 zu m/z 15 zur sicheren Identifizierung von EO.

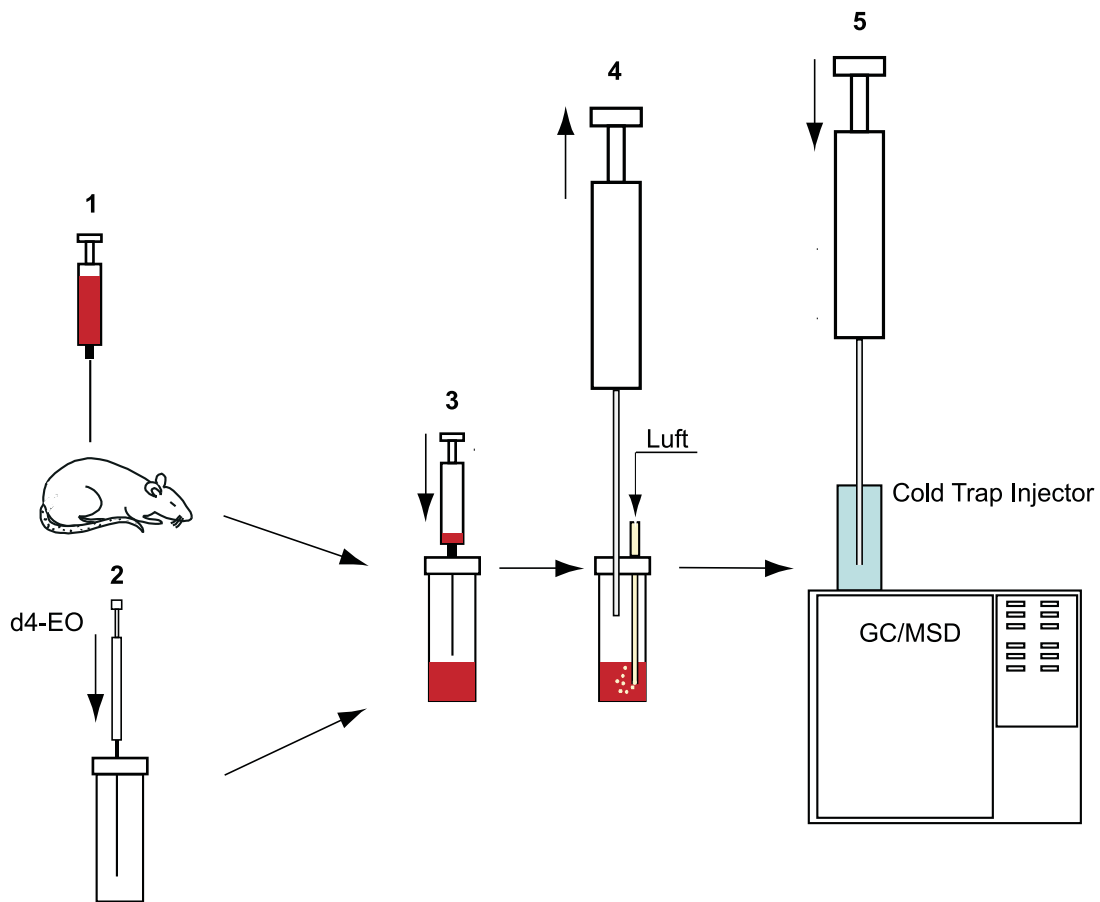


Abbildung 2.4 Schematische Darstellung des Verfahrens zur Analyse von EO im Blut mittels GC/MSD. **1** Blutentnahme, **2** Zugabe des internen Standards in das Headspace-Gefäß, **3** Zugabe des Blutes in das Headspace-Gefäß, **4** Entnahme der Gasprobe, **5** Injektion der Gasprobe in das GC/MSD.

Zur Quantifizierung von d_4 -EO wurde das Ion m/z 48, also das geladene unfragmentierte Molekülion verwendet, als Qualifier diente das Ion m/z 30. Die Quantifizierung der Proben erfolgte über das Verhältnis der Peakflächen EO zu d_4 -EO (vgl. 2.5.6). Vor Beginn der Messungen wurde mit der Funktion AUTOTUNE eine Kalibrierung der Massenachsen mit PFTBA als Kalibrierstandard durchgeführt.¹

¹Aufgrund von Nichtverfügbarkeit des internen Standards d_4 -EO wurde bei einigen Messungen von EO im Blut von F344-Ratten (jeweils 60- und 180-minütige Expositionen bei 30, 300 und 1000 ppm) $^{13}\text{C}_2$ -EO als interner Standard verwendet. Die MS-Messung wurde im positiven CI-Modus mit Methan als Reaktandgas durchgeführt und die $M - \text{H}^+$ -Ionen m/z 45 (EO) und m/z 47 ($^{13}\text{C}_2$ -EO) zur Quantifizierung aufgezeichnet.

2.5.3 Ermittlung der Aktivität von Cytochrom P450 2E1 durch enzymatische Umsetzung von Chlorzoxazon

2.5.3.1 Isolierung von Cytosol und Mikrosomen aus Rattenlebern

Die Isolierung von Cytosol und Mikrosomen erfolgte in Anlehnung an Remmer *et al.* (1966) und Guengerich (1977). Nach der Entnahme der Rattenlebern wurden diese in Tieftemperatur-Gefäßen bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Alle weiteren Schritte der Mikrosomenherstellung erfolgten bei ca. 4°C im Kühlraum. Die gefrorenen Lebern wurden nach Zugabe der vierfachen Gewichtsmenge einer Saccharoselösung ($0,25\text{ mol/l}$) mit einer Schere zerkleinert und in einem 60 ml Pottergefäß unter Eiskühlung homogenisiert. Anschließend wurde das Homogenat 30 Minuten bei 0°C und $10\,000\times g$ mit der Zentrifuge Sorvall Superspeed RC2-B zentrifugiert. Vom Überstand wurde die Lipidschicht vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgesaugt. Der aus Rückstand wurde verworfen und der Überstand 70 Minuten bei 0°C und $100\,000\times g$ mit der Ultrazentrifuge Beckmann L8-M zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde abermals die Lipidschicht abgetrennt, die cytosolische Fraktion dekantiert und der Rückstand in 7 ml einer Kaliumchloridlösung ($0,15\text{ mol/l}$) resuspendiert. Die Suspension wurde unter Eiskühlung homogenisiert und nochmals 70 Minuten bei 0°C und $100\,000\times g$ zentrifugiert. Der verbleibende Überstand wurde verworfen und der Niederschlag in eiskaltem Puffer resuspendiert. Der Puffer bestand aus $0,005\text{ mol/l}$ Tris(hydroxymethyl)aminomethan und $0,25\text{ mol/l}$ Saccharose und war mit HCl auf einen pH von 7,4 eingestellt worden. Durch leichtes Schütteln konnte die mikrosomale Fraktion von der Wand des Zentrifugenröhrchens abgelöst werden. Diese Suspension wurde unter Eiskühlung homogenisiert, in Reaktionsgefäße abgefüllt und mit flüssigem Stickstoff eingefroren. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Gefäße bei -80°C gelagert.

2.5.3.2 Proteinbestimmung

Zur Bestimmung des Proteingehalts der Mikrosomensuspension wurde eine modifizierte Biuret-Methode nach Gornall *et al.* (1948) angewendet. Zu 1 ml der basischen Biuret-Lösung (16 mmol/l Kaliumnatriumtartrat Tetrahydrat, 15 mmol/l Kaliumiodid, 6 mmol/l Kupfersulfat Pentahydrat, $0,1\text{ mol/l}$ Natriumhydroxid), die einen blauen Kupfertartratkomplex enthielt, wurden $20\text{ }\mu\text{l}$ der Mikrosomensuspension gegeben. Daraufhin bildete sich ein violetter Protein-Kupfer-Komplex, der nach 30-minütiger Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur bei 546 nm mit dem UV/VIS-Spektrophotometer photometrisch bestimmt wurde. Durch Zugabe von $50\text{ }\mu\text{l}$ Kaliumcyanidlösung (6 mol/l) wurde der stabilere Kupfercyanidkomplex gebildet und somit die Suspension entfärbt. Die Extinktion der farblosen Suspension wurde als Nullwert bestimmt. Zur Kalibrierung wurden statt der Mikrosomenlösungen Lösungen von Rin-

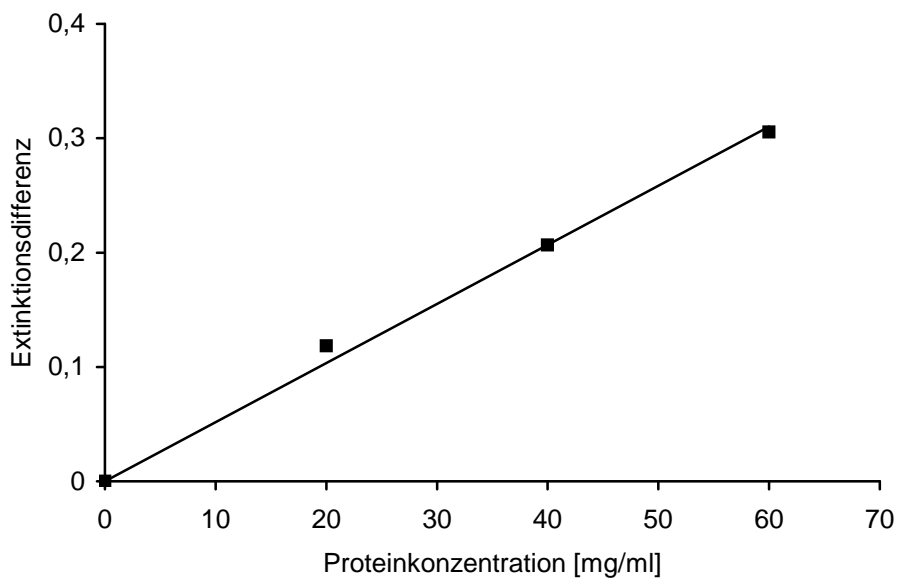


Abbildung 2.5 Kalibriergerade zur Bestimmung des Proteingehalts in biologischen Proben nach einer modifizierten Biuret-Methode. Messbedingungen: $\lambda = 546 \text{ nm}$, Küvettschichtdicke = 1,0 cm. Jeder Punkt setzt sich aus drei Einzelmessungen zusammen. Die Standardabweichungen sind zu gering, um graphisch dargestellt werden zu können. Die Geradengleichung lautet $y = 0,005 x$; $r^2 = 0,9951$.

derserumalbumin mit einem Proteingehalt von 20, 40 und 60 mg/ml verwendet (Protein Standard Set, Sigma). Ein Leerwert wurde durch Zugabe von destilliertem Wasser anstelle der proteinhaltigen Lösungen hergestellt. Alle Lösungen wurden analog zu dem oben beschriebenen Vorgehen bei 546 nm jeweils vor und nach Kaliumcyanidzugabe vermessen. Es wurde dreimal die Extinktionsdifferenz des Leerwertes vor und nach der Kaliumcyanidzugabe bestimmt und aus den Ergebnissen ein Mittelwert gebildet. Dieser wurde dann jeweils von der Extinktion der vermessenen Standardlösung vor und nach dem Kaliumcyanidzusatz subtrahiert. Diese Nettoextinktionswerte wurden gegen die Proteinkonzentrationen aufgetragen (siehe Abb. 2.5) und die Regressionsgerade durch den Nullpunkt ermittelt, mit deren Steigung die Proteinkonzentration der Mikrosomenlösungen berechnet wurden.

2.5.3.3 Inkubation von Mikrosomen mit Chlorzoxazon

Die Aktivität von CYP2E1 wurde in Anlehnung an Walsky und Obach (2004) und Anari *et al.* (2003) durch die für CYP2E1 spezifische enzymatische Umsetzung von Chlorzoxazon (CZZ) zu 6-Hydroxy-Chlorzoxazon (6-OH-CZZ) bestimmt. Nach beendeter Inkubation wurde das gebildete 6-OH-CZZ durch LC-MS/MS-Messung quantifiziert (vgl. 2.5.3.4).

Die Messung der Enzymaktivität wurde mit Mikrosomen durchgeführt, die aus den Lebern von gegen ET exponierten Ratten gewonnen worden waren. Die nach 2.5.3.1 hergestellten Mikrosomen wurden zunächst auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden

durch Verdünnen mit Kaliumphosphatpuffer (100 mmol Phosphat/l, pH 7,4) Mikrosomensuspensionen mit einem Proteingehalt von 4 mg Protein/ml hergestellt. In die Reaktionsgefäße wurden 1370 µl Kaliumphosphatpuffer und je 100 µl frisch hergestellte Magnesiumchlorid- (100 mmol/l), NADH- (9,4 mmol/l) und NADPH-Lösung (10,0 mmol/l) gegeben und die Lösungen 20 Sekunden durchmischt. Dann erfolgte die Zugabe von 100 µl der hergestellten Mikrosomensuspension in die Reaktionsgefäße, die anschließend 1,5 bis 3 Minuten bei 37 °C im Schüttelwasserbad vorinkubiert wurden. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 60 µl CZZ-Lösung (30,7 mmol/l) gestartet.

Nach 10 Minuten Inkubation bei 37 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von 2,0 ml eiskaltem Acetonitril gestoppt. Die Gefäße wurden anschließend 15 bis 45 Minuten auf Eis gestellt und dann in einer Sigma 4K 15 Kühlzentrifuge 10 Minuten bei 4 °C und 4044×g zentrifugiert. Danach wurde der Überstand mit Ammoniumacetatpuffer (5 µmol/l, pH 7) / MeOH (50/50 (v/v)) 1 : 20 verdünnt und mittels LC-MS/MS analysiert. Die Herstellung der Kalibrierproben erfolgte analog: Nach Durchmischen einer Lösung aus 1370 µl Kaliumphosphatpuffer (100 mmol Phosphat/l, pH 7,4) und je 100 µl MgCl₂ (100 mmol/l), NADH- (9,4 mmol/l) und NADPH-Lösung (10,0 mmol/l) wurden 100 µl Mikrosomensuspension und 2,0 ml kaltes Acetonitril zur Inaktivierung der mikrosomalen Aktivität zugegeben. Anschließend erfolgte die Zugabe von 60 µl einer OH-CZZ-Lösung (Stammlösung (500 µmol/l) und drei Verdünnungen (ca. 4, 20 und 500 µmol/l)). Die Reaktionsgefäße wurden ca. 15 Minuten auf Eis gestellt und anschließend 10 Minuten bei 4 °C und 4044×g zentrifugiert. Danach wurde der Überstand mit Ammoniumacetatpuffer (5 µmol/l, pH 7) / MeOH (50/50 (v/v)) 1 : 20 verdünnt und mittels LC-MS/MS vermessen.

2.5.3.4 Messung von 6-Hydroxy-Chlorzoxazon mittels LC-MS/MS; Messbedingungen und Geräteparameter

Das zur Messung verwendete HPLC-System Agilent 1100 bestand aus binärer Pumpe, kühlbarem Autosampler und einem Säulenofen. Zur Auftrennung der Substanzen wurde eine Luna C18(2)-Säule benutzt. Die mobile Phase setzte sich aus Ammoniumacetatpuffer (5 mmol/l, pH 7) und Methanol (50/50 (v/v)) zusammen; die Fließgeschwindigkeit betrug 250 µl/min. Der Ammoniumacetatpuffer wurde mit entionisiertem Wasser hergestellt, das mit einem Aktivkohlefilter in einem Milli-Q-Plus-System (Millipore, Eschborn) gereinigt wurde. Durch den Autosampler wurden jeweils 5 µl Probe injiziert. Die Retentionszeit der Analyten betrug unter obigen Bedingungen ca. 2,7 min.

Das verwendete Massenspektrometer API 4000 wurde mit einer TurboIonSpray-Quelle im negativen Modus betrieben. Als Nebulizer- und Curtain-Gas wurde Stickstoff verwendet. Die Messung wurde im MRM-Modus (*multiple reaction monitoring*)

Tabelle 2.5 Informationen zur Bestimmung von OH-CZZ am LC-MS/MS.

Massenspektrometer	API 4000
Gaseinstellungen	
CUR	10 psi
Gas 1	20 psi
Gas 2	40 psi
Temperatur	700 °C
IS	−3700 V
CAD	11
Autosampler	Agilent 1100 Thermo Autosampler
Spritzenvolumen	100 µl
Injektionsvolumen	5 µl
Aufziehggeschwindigkeit	200 µl/min
Injektionsgeschwindigkeit	200 µl/min
Nadellevel	0.00 mm
Temperatur	8 °C
HPLC-Pumpe	Agilent 1100 binäre LC-Pumpe
Maximaldruck	400 bar
Totvolumen	40 µl
Laufzeit	7,50 min
Laufmittel	A (50 %): Methanol B (50 %): H ₂ O (Millipore) mit NH ₄ OAc, 5 mmol/l, pH 7
Flussrate	300 µl/min
Säule	Phenomenex Luna 5 µ C18(2), 150 × 2 mm
Vorsäule	Security Guard Cartridge, Phenomenex Luna C18, 4 × 2 mm
Säulenofen	Agilent 1100 Säulenofen
Temperatur	24 °C
Temperaturtoleranz	1 °C

CUR Curtain Gas, IS Ion Spray Voltage, CAD N₂-Druck in Collisionally Activated Dissociation Cell

durchgeführt und nach Kim *et al.* (2005) der Massenübergang 184 → 148 als Qualifizier und der ungefähr dreimal intensivere Massenübergang 184 → 120 als Quantifizier aufgezeichnet. Die Dwellzeit (Verweildauer) pro Übergang betrug 100 msec. Für die Quadrupole Q1 und Q3 wurde jeweils die Auflösung UNIT verwendet.

Zur Steuerung des Gerätes und zur Datenauswertung wurde eine Dell PIV Workstation mit Windows XP und der Software Analyst 1.4.1 (Applied Biosystems, Darmstadt) benutzt. Die oben genannten und alle weiteren Methoden- und Geräteparameter finden sich in Tab. 2.5 und Tab. 2.6.

Tabelle 2.6 Massenübergänge, Fokussierungs- und Beschleunigungsparameter entlang des Ionenpfades am API 4000 zur Bestimmung von OH-CZZ.

Q1-Masse	Q3-Masse	DP [V]	EP [V]	CE [V]	CXP [V]
184	120	-46	-10	-27	-8
184	148	-46	-10	-22	-5

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

2.5.4 Quantifizierung von S-(2-hydroxyethyl)glutathion in Rattenlebern mittels LC-MS/MS

2.5.4.1 Aufarbeitung der Leberproben

Unmittelbar nach Durchführung der Expositionen gegen ET bzw. EO wurden die Tiere getötet, die Lebern entnommen und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur weiteren Verwendung wurden sie bei -80 °C gelagert. Zur Herstellung von Proben für die LC-MS/MS-Messungen wurde ein Stück gefrorene Rattenleber (30-90 mg) nach Zugabe der 1,5-fachen Gewichtsmenge einer Lösung von Glutathionethylester (GSH-EE, vgl. Abb. 2.6 A) als interner Standard und der 2,5-fachen Gewichtsmenge Ammoniumacetatpuffer (5 mmol/l, pH 7) unter Eiskühlung durch Ultraschallbehandlung homogenisiert. Von diesem Homogenat wurden 100 µl entnommen, 200 µl Methanol zugegeben und das Gemisch nach Schütteln für zwei Stunden auf Eis gestellt, um eine vollständige Proteinfällung zu gewährleisten. Danach wurde die Lösung 20 Minuten bei 4 °C und 10 000×g zentrifugiert, 100 µl des Überstands entnommen und direkt ins LC-MS/MS injiziert.

2.5.4.2 Messbedingungen und Geräteparameter

Zur Messung von GS-EO in der Leber von Ratten wurde ebenfalls das in 2.5.3.4 beschriebene LC-MS/MS-System verwendet. Als mobile Phase diente eine Mischung aus Ammoniumacetatpuffer (5 mmol/l, pH 7) und Acetonitril (75/25 (v/v)). Die Fließgeschwindigkeit betrug 400 µl/min. Es wurden jeweils 5 µl Probe injiziert und diese dann auf einer Phenomenex Luna 5 µ C18(2)-Säule aufgetrennt. Die Retentionszeiten von GS-EO und GSH-EE betragen: GS-EO 1,02 min, GSH-EE 1,58 min.

Das verwendete Massenspektrometer API 4000 wurde mit einer TurboIonSpray-Quelle im positiven Modus betrieben. Als Nebulizer- und Curtain-Gas wurde Stickstoff verwendet. Bei der Messung im MRM-Modus wurden die Übergänge 336 → 207 und 352 → 223 als Quantifier und die übrigen in Tab. 2.7 aufgeführten als Qualifier verwendet. Die Dwellzeit betrug pro Übergang jeweils 100 msec. Für die beiden Quadrupole Q1 und Q3 wurde jeweils die Auflösung UNIT verwendet.

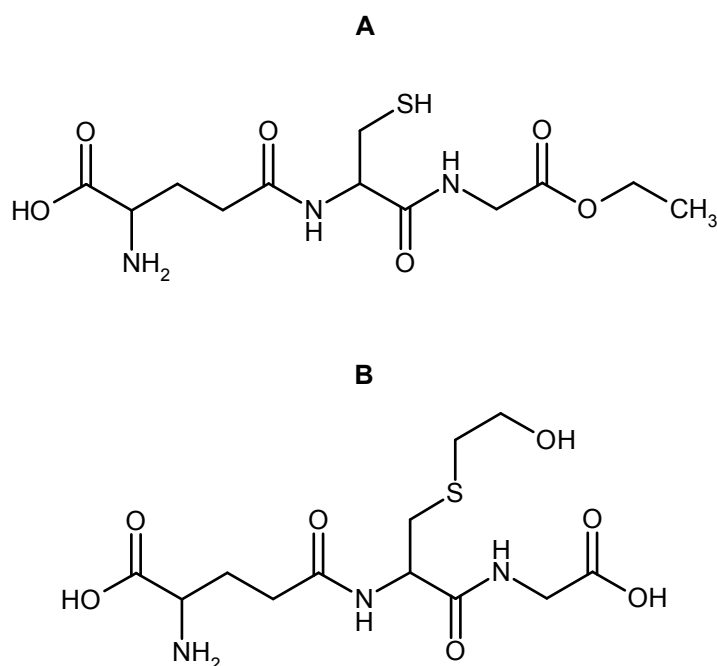


Abbildung 2.6 **A** Glutathionethylester (GSH-EE, MG 335,4), **B** S-(2-hydroxyethyl)glutathion (GS-EO, MG 351,4).

Tabelle 2.7 Massenübergänge, Fokussierungs- und Beschleunigungsparameter entlang des Ionenpfades am API 4000 zur Bestimmung von GS-EO und GSH-EE.

Analyt	Q1-Masse	Q3-Masse	DP [V]	EP [V]	CE [V]	CXP [V]
GS-EO	352	223	51	10	19	14
	352	188	71	10	27	6
	352	206	66	10	23	14
	352	120	66	10	29	10
GSH-EE	336	207	46	10	19	20
	336	104	56	10	31	8

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

Die Steuerung des Gerätes und die Datenauswertung erfolgte über eine Dell PIV Workstation mit Windows XP und der Software Analyst 1.4.1. Alle gewählten Methoden- und Geräteparameter finden sich in Tab. 2.7 und Tab. 2.8.

2.5.4.3 Herstellung einer S-(2-hydroxyethyl)glutathionlösung

Da GS-EO (Abb. 2.6 B) nicht käuflich zu erwerben war, es jedoch im Rahmen der Methodenentwicklung sowohl zur Optimierung der Geräteparameter von HPLC und MS als auch zur Ermittlung eines Faktors für die Quantifizierung benötigt wurde, wurde die Substanz durch Inkubation einer Lösung von GSH und EO hergestellt.

Tabelle 2.8 Informationen zur Bestimmung von GS-EO GSH-EE, GSH und GSSG am LC-MS/MS.

Massenspektrometer	API 4000
Gaseinstellungen	
CUR	10 psi
Gas 1	60 psi
Gas 2	50 psi
Temperatur	500 °C
IS	5300 V
CAD	7
Autosampler	Agilent 1100 Thermo Autosampler
Spritzenvolumen	100 µl
Injektionsvolumen	5 µl
Aufziehggeschwindigkeit	200 µl/min
Injektionsgeschwindigkeit	200 µl/min
Nadellevel	0,00 mm
Temperatur	24 °C
HPLC-Pumpe	Agilent 1100 binäre LC-Pumpe
Maximaldruck	400 bar
Totvolumen	40 µl
Laufzeit	8,0 min
Laufmittel	A (25 %): Acetonitril B (75 %): H ₂ O (Millipore) mit NH ₄ OAc (5mmol/l, pH 7)
Flussrate	400 µl/min
Säule	Phenomenex Luna 5 µ C18(2), 150× 2 mm
Vorsäule	Security Guard Cartridge, Phenomenex Luna C18, 4 × 2 mm
Säulenofen	Agilent 1100 Säulenofen
Temperatur	24 °C
Temperaturtoleranz	1 °C

CUR Curtain Gas, IS Ion Spray Voltage, CAD N₂-Druck in Collisionally Activated Dissociation Cell,

Hierzu wurden in einem 25 ml Headspace-Gefäß zu 3 ml einer 0,61-millimolaren Lösung von GSH in Ammoniumacetatpuffer (5 mmol/l, pH 7) 200 µl einer Lösung von 2,3 mg GST in 1 ml Puffer gegeben. Das Gefäß wurde mit einem Septum gasdicht verschlossen. Anschließend wurden mit einer 10 ml Einmalspritze ca. 5 ml Luft entfernt und 5 ml EO direkt aus der Druckgasflasche entnommen und in das Gefäß injiziert. Das Gefäß wurde 24 Stunden bei 37 °C im Schüttelwasserbad inkubiert.

Um das Verhältnis der Peakflächen von GS-EO und dem als interner Standard verwendeten GSH-EE bei gleicher Konzentration der Analyten zu ermitteln, wurde zu der Inkubationslösung eine definierte Menge GSH-EE in Ammoniumacetatpuffer (5 mmol/l, pH 7) als interner Standard gegeben und dann direkt in das LC-MS/MS injiziert. Zur Quantifizierung von nicht umgesetztem GSH und entstandenem GS-SG in der Inkubationslösung wurden außerdem Standards mehrerer Konzentrationen von GSH bzw. GSSG in Ammoniumacetatpuffer (5 mmol/l, pH 7) hergestellt. Hierzu

Tabelle 2.9 Massenübergänge, Fokussierungs- und Beschleunigungsparameter entlang des Ionenpfades am API 4000 zur Bestimmung von GSH und GSSG.

Analyt	Q1-Masse	Q3-Masse	DP [V]	EP [V]	CE [V]	CXP [V]
GSH	308	179	41	10	19	14
	308	162	46	10	25	16
GSSG	613	355	76	10	33	10
	613	484	51	10	25	20

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

wurden definierte Mengen an GSH bzw. GSSG direkt in Ammoniumacetatpuffer gegeben. Niedriger konzentrierte Lösungen wurden durch Verdünnung der Stammlösungen mit Ammoniumacetatpuffer hergestellt.

Mit den in 2.5.4.2 und 2.5.5 beschriebenen LC-MS/MS-Methoden wurden dann in einer Messreihe am Anfang und Ende der Sequenz jeweils in Doppelbestimmung die GSH- und GSSG-Standards und dazwischen die aus der Inkubationslösung hergestellten Proben gemessen. Durch Kalibrierkurven für GSH und GSSG wurden diese Analyte in den Inkubationsproben quantifiziert. Durch Subtraktion der erhaltenen Mengen von der ursprünglich eingesetzten GSH-Menge wurde die Menge des gebildeten GS-EO ermittelt. Auf diese Konzentration wurde dann die Peakfläche von GSH-EE umgerechnet, um den für die Quantifizierung benötigten Faktor zu erhalten. In Vorversuchen wurde die Linearität der Peakflächen für den Übergang des Quantifiers im relevanten Konzentrationsbereich gezeigt. Diese Berechnung der Peakflächenverhältnisse von GS-EO zu GSH-EE wurde für alle aufgenommenen Übergänge von GS-EO durchgeführt; die Ergebnisse sind in Tab. 3.7, Seite 60 gezeigt.

2.5.5 Quantifizierung von reduziertem und oxidiertem Glutathion mittels LC-MS/MS

Reduziertes (GSH) und oxidiertes (GSSG) Glutathion (vgl. Abb. 2.7) in Inkubationslösungen wurde unter Verwendung der in 2.5.4.2 beschriebenen Methode mittels LC-MS/MS quantifiziert. Im MRM-Modus wurde für GSH der intensivste Massenübergang $308 \rightarrow 179$ als Qualifier und $308 \rightarrow 162$ als Quantifier herangezogen. Für GSSG wurden die Massenübergänge $613 \rightarrow 484$ (Qualifier) und $613 \rightarrow 355$ (Quantifier; vgl. Tab. 2.9) aufgezeichnet. Die Retentionszeiten von GSH und GSSG betragen: GSSG 1,05 min, GSH 1,05 min. Die gewählten Geräteparameter finden sich in Tab. 2.8.

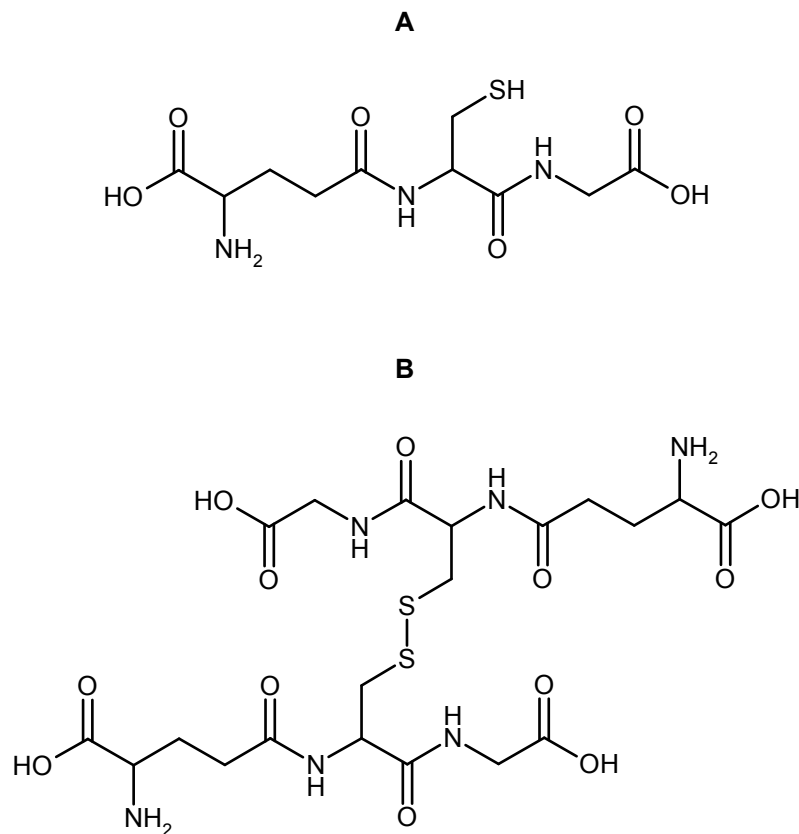


Abbildung 2.7 **A** Reduziertes Glutathion (GSH, MG 307,3), **B** Oxidiertes Glutathion (GSSG, MG 612,6).

2.5.6 Berechnungen

Alle im Blut gemessenen EO-Konzentrationen wurden nach folgendem Verfahren zurückextrapoliert auf den Zeitpunkt der Probengewinnung: Bei Durchführung der Expositionen (2.4.1 und 2.4.2) wurde die benötigte Zeit zwischen der Entnahme des Tiers aus dem Expositionssystem und dem Einspritzen des entnommenen Blutes in das Headspace-Gefäß gestoppt. Diese lag zwischen 1,5 und 3 Minuten beziehungsweise bis zu 7,5 Minuten (vgl. 2.4.2). Unter Berücksichtigung der gestoppten Zeit und der Geschwindigkeitskonstanten des EO-Metabolismus für EO im Blut ($k_{eo} = 6,95 \text{ h}^{-1} = 0,116 \text{ min}^{-1}$, aus Filser und Bolt, 1984) wurde dann nach Gl. 2.7 die EO-Konzentration im Blut zum Zeitpunkt des Expositionsendes c_0 berechnet. Die auf diese Weise erhaltenen Konzentrationen sind in den entsprechenden Abbildungen aufgetragen.

$$c_0 = \frac{c_t}{e^{-k_{eo} \cdot t}} \quad (2.7)$$

c_0 : EO-Konzentration im Blut zum Zeitpunkt des Expositionsendes [$\mu\text{mol/l}$]

c_t : EO-Konzentration im Blut zum Zeitpunkt des Einspritzens in das
Headspace-Gefäß [$\mu\text{mol/l}$]

k_{eo} : Geschwindigkeitskonstante des EO-Metabolismus im Blut ($6,95 \text{ h}^{-1}$)

t : Zeitpunkt zwischen Expositionsende und Einspritzens des Blutes in das
Headspace-Gefäß [min]

Die Ergebnisse der Infusionsexperimente mit EO wurden zur Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten der gesamten EO-Elimination (k_{el}) verwendet. Für die Konzentration von EO im Blut c gilt die Gleichung (Koch und Ritschel, 1986):

$$c = \frac{v_{\text{inf}}}{V_d \cdot k_{el}} \cdot (1 - e^{-k_{el} \cdot t}) \quad (2.8)$$

v_{inf} : Infusionsrate von EO [$\mu\text{mol/h}$]

V_d : Verteilungsvolumen von EO im Organismus [l]

k_{el} : Eliminationskonstante von EO

t : Expositionsdauer [h]

Der Wert des Verteilungsvolumens V_d von EO beträgt 0,84 multipliziert mit dem Volumen der Versuchsratte. Der Proportionalitätsfaktor (0,84) wurde mittels der EO-Verteilungskoeffizienten Organ-zu-Blut bzw. Gewebe-zu-Blut, die in (Csanády *et al.*, 2000) aufgeführt sind, berechnet. Der Wert von k_{el} wurde durch Anpassung der Gl. 2.8 an die bei den EO-Infusionen zeitabhängig gemessenen EO-Blutkonzentrationen erhalten (Anpassungen mittels des Programms Mathematica).

2.5.7 Statistik

In dieser Arbeit wurden der arithmetische Mittelwert MW, die Standardabweichung SD und der Variationskoeffizient CV wie folgt berechnet (Sachs, 2003):

$$\text{MW} = \frac{\sum_{n=1}^i x_i}{n} \quad (2.9)$$

x_i : i -ter Messwert von x

n : Anzahl der Messungen

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (x_i - MW)^2}{n - 1}} \quad (2.10)$$

$$CV = \frac{SD}{MW} \cdot 100 \quad (2.11)$$

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der analytischen Methoden

3.1.1 Bestimmung von Ethylen und Ethylenoxid in der Gasphase mittels GC/FID

Während der Exposition der Ratten gegen ET wurde die Konzentration von ET und EO in der Gasphase des Expositionssystems durch GC/FID-Messungen bestimmt (vgl. 2.5.1). ET und EO wurden auf baugleichen Gaschromatographen, jedoch mit unterschiedlichen Säulen und unter unterschiedlichen Bedingungen quantifiziert (siehe Tab. 2.2, Seite 26). Die Identifizierung der Substanzen erfolgte über die Retentionszeit. Diese betrug für ET ca. 1,0 min und für EO ca. 4,7 min (Methode A) beziehungsweise 7,5 min (Methode B) und war über den Zeitraum einer 6-stündigen Exposition konstant. Bei der Messung von ET traten keinerlei störende Signale auf. Bei der EO-Messung traten zusätzliche Signale auf (z. B. Aceton), jedoch nicht bei den Retentionszeiten von EO. Abb. 3.1 zeigt exemplarisch Chromatogramme von ET bzw. EO.

Wie in 2.5.1 beschrieben, wurde zur Quantifizierung von ET und EO vor jedem Versuch eine Einpunktkalibrierung im relevanten Konzentrationsbereich durchgeführt. Voraussetzung für diese Kalibrierung war Proportionalität des Detektorsignals zur Konzentration des Analyten. Diese wurde in Vorversuchen für ET im Konzentrationsbereich 1 bis 10 000 ppm und für EO im Bereich 0,1 bis 5 ppm überprüft. Wie auch in Abb. 3.2, Abb. 3.3, Abb. 3.4 und Abb. 3.5 zu sehen, zeigte sich in beiden Fällen ein linearer Zusammenhang zwischen Signalfläche und ET- bzw. EO-Konzentration. Die Präzision, ausgedrückt durch den Variationskoeffizienten (siehe Gl. 2.11), von mindestens fünf Messungen der gleichen Konzentration betrug für ET maximal 3,4 % und für EO maximal 4,9 % (Methode A, n=5) bzw. maximal 8 % (Methode B, n=3).

Die Nachweisgrenze (Detektionslimit, LOD), definiert als das dreifache Signal-zu-Rausch-Verhältnis, betrug für EO 300 ppb (Verwendung von Methode A) bzw. 30 ppb (Verwendung von Methode B). Die Bestimmungsgrenze (LOQ), die als fünffaches Signal-zu-Rausch-Verhältnis definiert wird, betrug somit 500 ppb (Verwendung von Methode A) bzw. 50 ppb (Verwendung von Methode B). Die ET-Konzentrationen lagen während der Expositionen stets deutlich über der Nachweisgrenze.

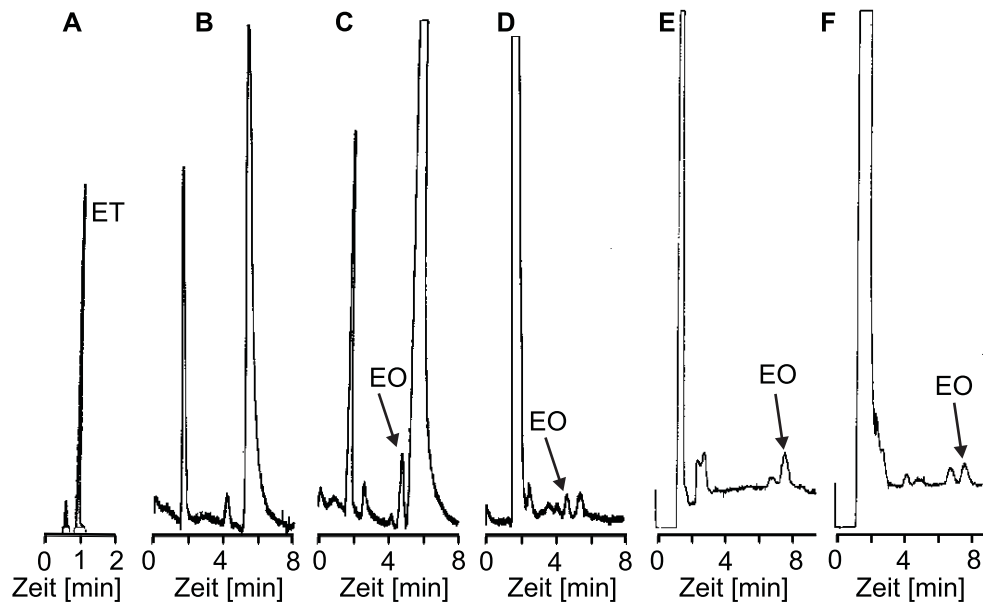


Abbildung 3.1 Typische GC/FID Chromatogramme von ET und EO in der Atmosphäre eines Expositionssystems. **A** Chromatogramm von ET bei einer Expositionskonzentration von 30 ppm. **B** Exsikkator ohne EO (Methode A). **C** Exsikkator mit 1 ppm EO (Methode A). **D** Mit zwei F344-Ratten besetztes Expositionssystem (Volumen 6,3 l), Expositionskonzentration 100 ppm ET, Expositionsdauer 140 min (Methode A). **E** Exsikkator mit 0,1 ppm EO (Methode B). **F** Mit zwei F344-Ratten besetztes Expositionssystem (Volumen 6,3 l), Expositionskonzentration 30 ppm ET, Expositionsdauer 100 min (Methode B). Die Messungen wurden gemäß der Beschreibung in 2.5.1 durchgeführt.

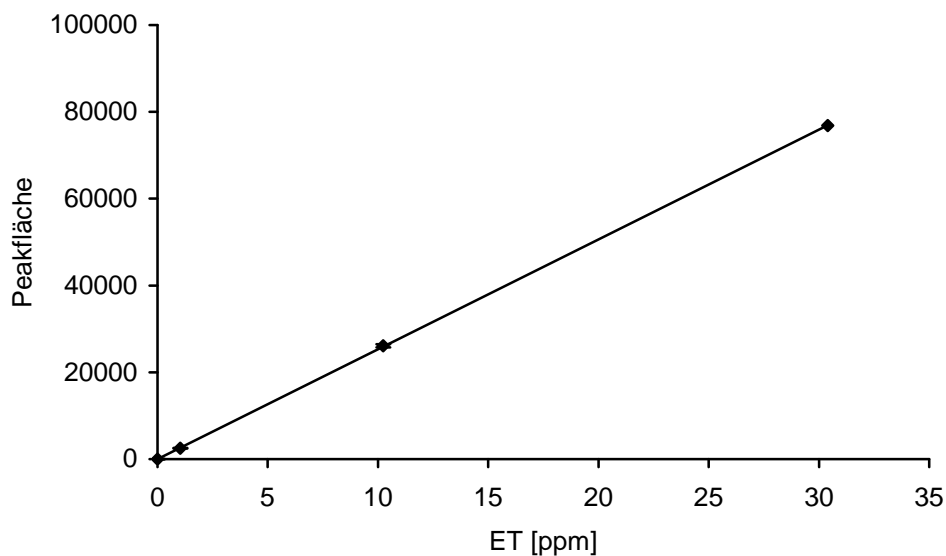


Abbildung 3.2 Linearität der Detektorantwort für ET in der Gasphase am GC/FID im Bereich zwischen 1,03 und 30 ppm. Jeder Punkt entspricht dem Mittelwert \pm SD aus drei Messungen. Die Standardabweichungen sind zu klein, um graphisch dargestellt werden zu können. Die Geradengleichung lautet $y = 2529 x$; $r^2 = 0,999$ (GC-Einstellung: range 1). Die Messungen wurden gemäß der Beschreibung in 2.5.1 durchgeführt.

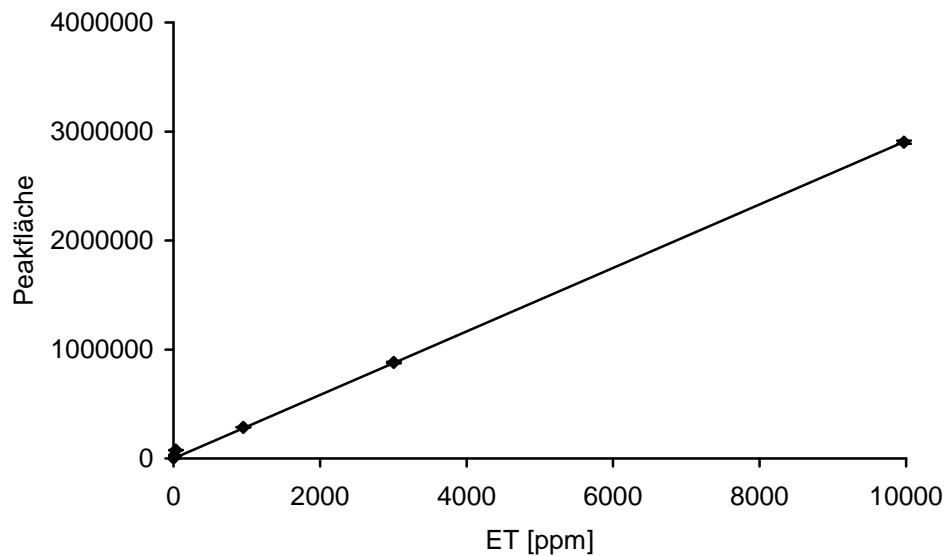


Abbildung 3.3 Linearität der Detektorantwort für ET in der Gasphase am GC/FID im Bereich zwischen 1,03 und 9967,8 ppm. Jeder Punkt entspricht dem Mittelwert \pm SD aus drei Messungen. Die Standardabweichungen sind zu klein, um graphisch dargestellt werden zu können. Die Geradengleichung lautet $y = 291 x$; $r^2 = 0,9992$ (GC-Einstellung: range 10). Die Messungen wurden gemäß der Beschreibung in 2.5.1 durchgeführt.

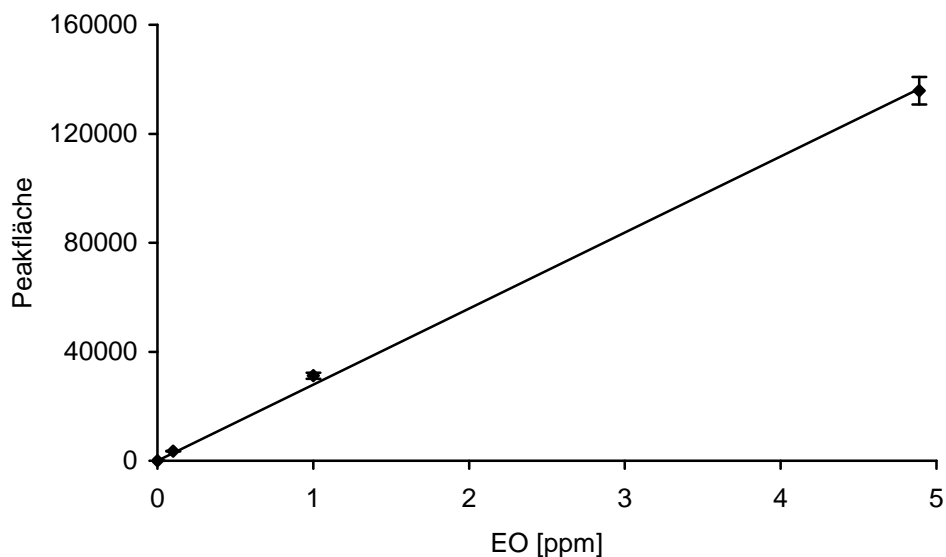


Abbildung 3.4 Linearität der Detektorantwort für EO in der Gasphase am GC/FID im Bereich zwischen 0,1 und 4,9 ppm unter Verwendung von Methode A. Jeder Punkt entspricht dem Mittelwert \pm SD aus drei Messungen. Die Geradengleichung (Peakfläche gegen EO-Konzentration) lautet $y = 27910 x$; $r^2 = 0,999$ (GC-Einstellung: range 1). Die Messungen wurden gemäß der Beschreibung in 2.5.1 durchgeführt.

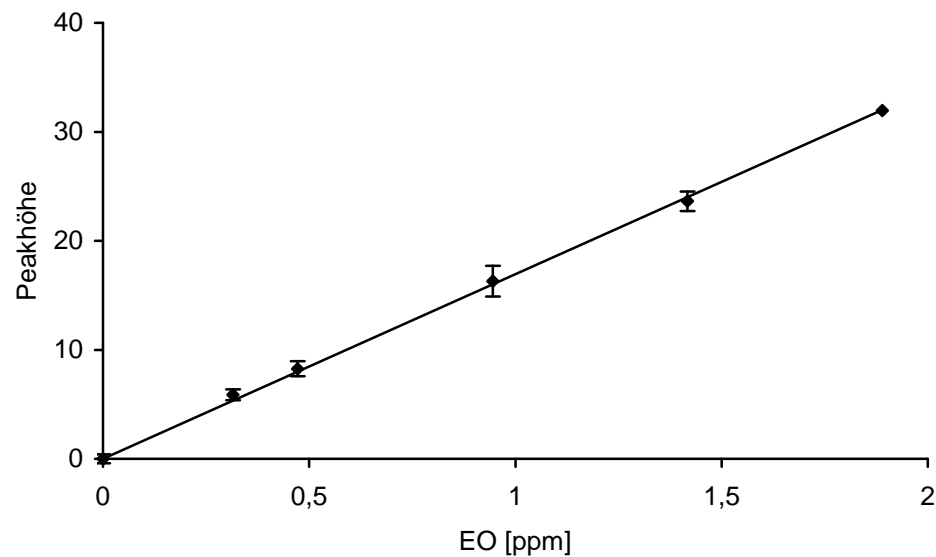


Abbildung 3.5 Linearität der Detektorantwort für EO in der Gasphase am GC/FID im Bereich zwischen 0,3 und 1,9 ppm unter Verwendung von Methode B. Jeder Punkt entspricht dem Mittelwert \pm SD aus drei Messungen. Die Geradengleichung (Peakhöhe gegen EO-Konzentration) lautet $y = 16,9 x$; $r^2 = 0,999$ (GC-Einstellung: range 1). Die Messungen wurden gemäß der Beschreibung in 2.5.1 durchgeführt.

3.1.2 Bestimmung von Ethylenoxid in der Gasphase mittels GC/MSD

Während der Exposition der Ratten gegen ET wurde, wie in 2.5.2.1 beschrieben, die Konzentration von EO in der Gasphase des Expositionssystems außer durch GC/FID (vgl. 3.1.1) auch durch GC/MSD-Messungen bestimmt. Die Identifizierung der Substanzen bei der Verwendung des GC/MSD-Verfahrens erfolgte sowohl über charakteristische Massenfragmente als auch über die Retentionszeit. Diese betrug für EO 6,1 bis 6,6 min, je nach Zustand der Trennsäule. Mit über die Dauer der Exposition zunehmender Feuchtigkeit verkürzte sich die Retentionszeit. Abb. 3.6 zeigt exemplarische Chromatogramme von EO.

Wie in Abb. 3.7 zu erkennen, war die Detektorantwort des GC/MSD linear abhängig von der Konzentration von EO in der Exsikkatoratmosphäre im Bereich von 10 bis 30 ppb.

Die Präzision, bestimmt durch vier Wiederholungsmessungen und ausgedrückt durch den Variationskoeffizienten, betrug ca. 10 %. Die Nachweisgrenze (Detektionslimit, LOD), definiert als das dreifache Signal-zu-Rausch-Verhältnis, betrug 5 ppb. Die Bestimmungsgrenze (LOQ) betrug somit ca. 8 ppb.

Während zwei Expositionen von zwei F344-Ratten gegen 130 bzw. 10 000 ppm Ethylen wurden die atmosphärischen EO-Konzentrationen gleichzeitig sowohl mittels GC/FID (Methode B) als auch mittels GC/MSD bestimmt. Beide Methoden zeigten eine recht gute Übereinstimmung (vgl. Abb. 3.8).

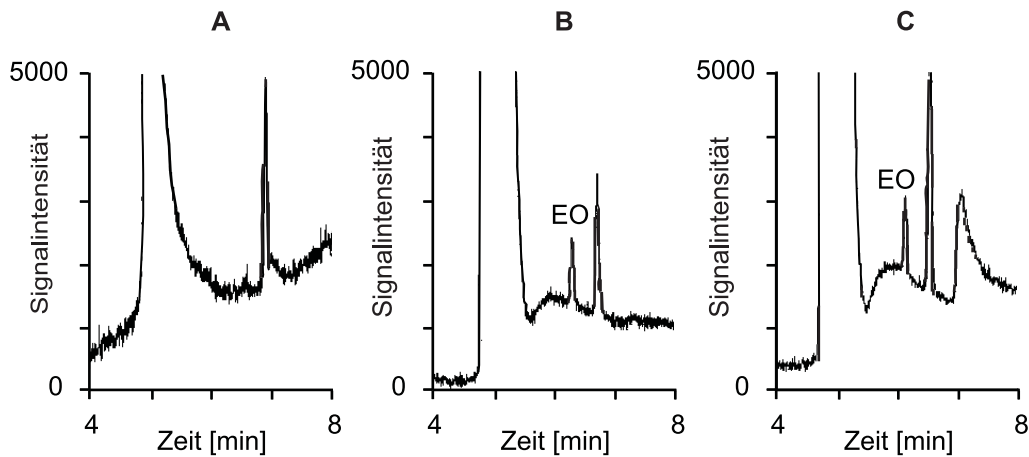


Abbildung 3.6 Typische GC/MSD-Gaschromatogramme von EO (Retentionszeit 6,2 min) in der Atmosphäre eines Expositionssystems. **A** Leeres geschlossenes Expositionssystem (Volumen 6,5 l). **B** EO-Konzentration von 9,9 ppb in einem Exsikkator. **C** Geschlossenes Expositionssystem mit zwei für 80 Minuten gegen 3 ppm ET exponierten Ratten. Die Messungen wurden gemäß der Beschreibung in 2.5.2.1 durchgeführt.

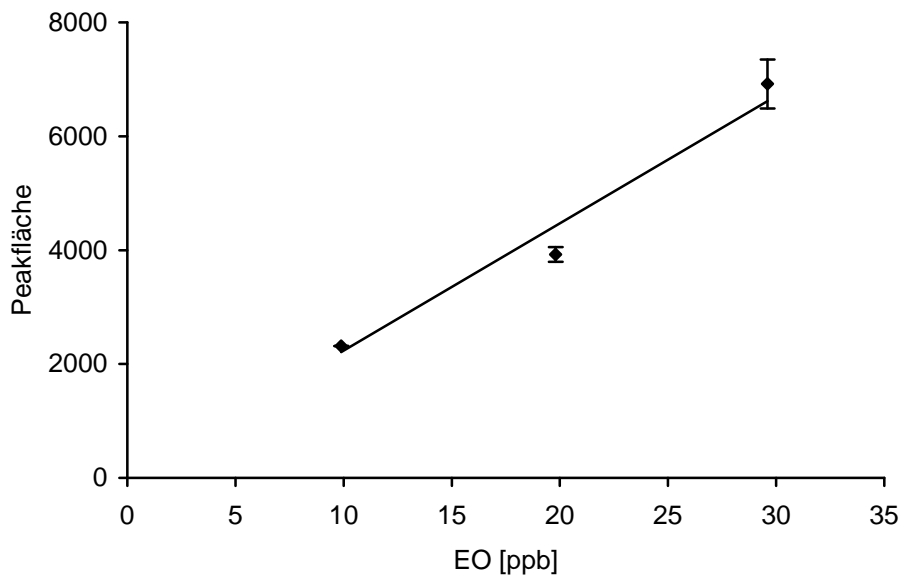


Abbildung 3.7 Linearität der Detektorantwort für EO (m/z 29) in der Gasphase eines Exsikkators am GC/MSD im Bereich zwischen 10 und 30 ppb. Jeder Punkt entspricht dem Mittelwert \pm SD aus drei Messungen. Die Geradengleichung lautet $y = 215 x$; $r^2 = 0,98$. Die Messungen wurden gemäß der Beschreibung in 2.5.2.1 durchgeführt.

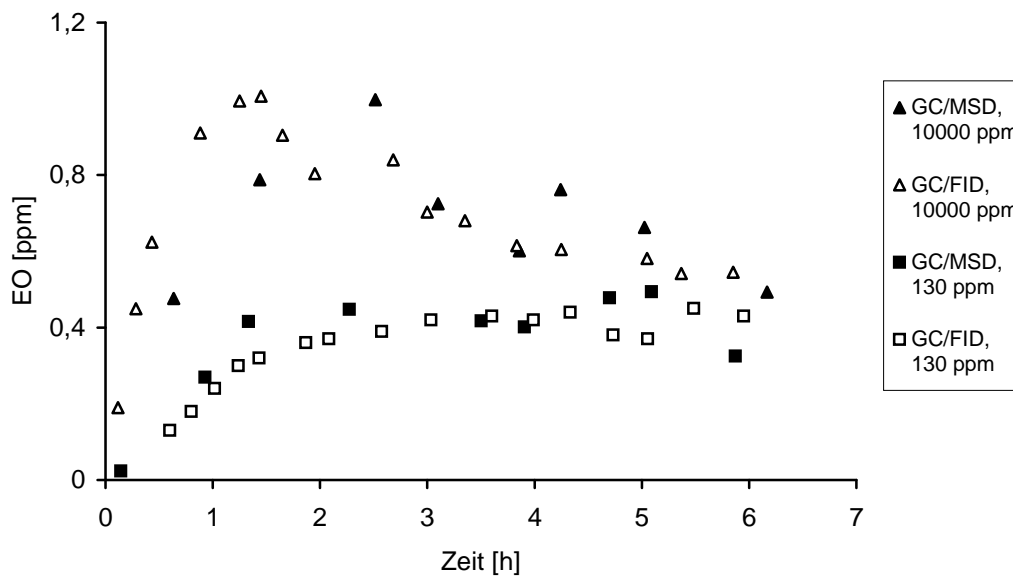


Abbildung 3.8 Vergleich der analytischen Methoden zur Quantifizierung von atmosphärischem EO: Messung von Konzentrations-Zeit-Verläufen von EO während der Exposition von zwei F344-Ratten gegen konstante Konzentrationen von 130 bzw. 10000 ppm ET in einem geschlossenen Expositionssystem (6,3 l). GC/FID: Quantifizierung mittels GC/FID (Methode B, siehe 2.5.1). GCMS: Quantifizierung mittels GC/MSD (siehe 2.5.2.1).

3.1.3 Bestimmung von Ethylenoxid im Blut mittels GC/MSD

Nach Exposition der Ratten und Probenaufarbeitung gemäß 2.5.2.2 wurde die entnommene Gasprobe in einen Gaschromatographen mit massenselektivem Detektor (GC/MSD) injiziert. Eine genaue Beschreibung der Messbedingungen findet sich in Kapitel 2.5.2.2.

Im Rahmen der Methodenentwicklung wurden von EO und von d_4 -EO als internem Standard Massenspektren im SCAN-Modus aufgenommen (siehe Abb. 3.9), die durch Vergleich mit Referenzspektren (siehe z. B. Abb. 3.10) eine eindeutige Identifizierung erlaubten.

Um die Empfindlichkeit zu steigern, wurden zur Quantifizierung im SIM-Modus die charakteristischen Ionen m/z 15 und 29 für EO und die Ionen m/z 30 und m/z 48 für d_4 -EO verwendet (siehe auch Tab. 3.1). Als Quantifier für EO wurde das Ion m/z 15 verwendet. Seine Intensität betrug im Vergleich zu m/z 29 zwar nur ungefähr 20 %, in der Massenspur fanden sich allerdings seltener Störsignale. Das Ion m/z 29 wurde als Qualifier eingesetzt und diente zur sicheren Identifizierung von EO. Als Quantifier für d_4 -EO wurde das Ion m/z 48, also das geladene unfragmentierte Molekülion verwendet, das praktisch die gleiche Intensität wie das als Qualifier verwendete Ion m/z 30 besaß. Als zusätzliche Ionenspuren wurden für EO m/z 44 und für d_4 -EO m/z 18 aufgezeichnet. Durch das durch Wasser ($M = 18$ g/mol) und CO_2 ($M = 44$ g/mol) in den Proben verursachte Hintergrundrauschen in diesen Massenspuren waren die

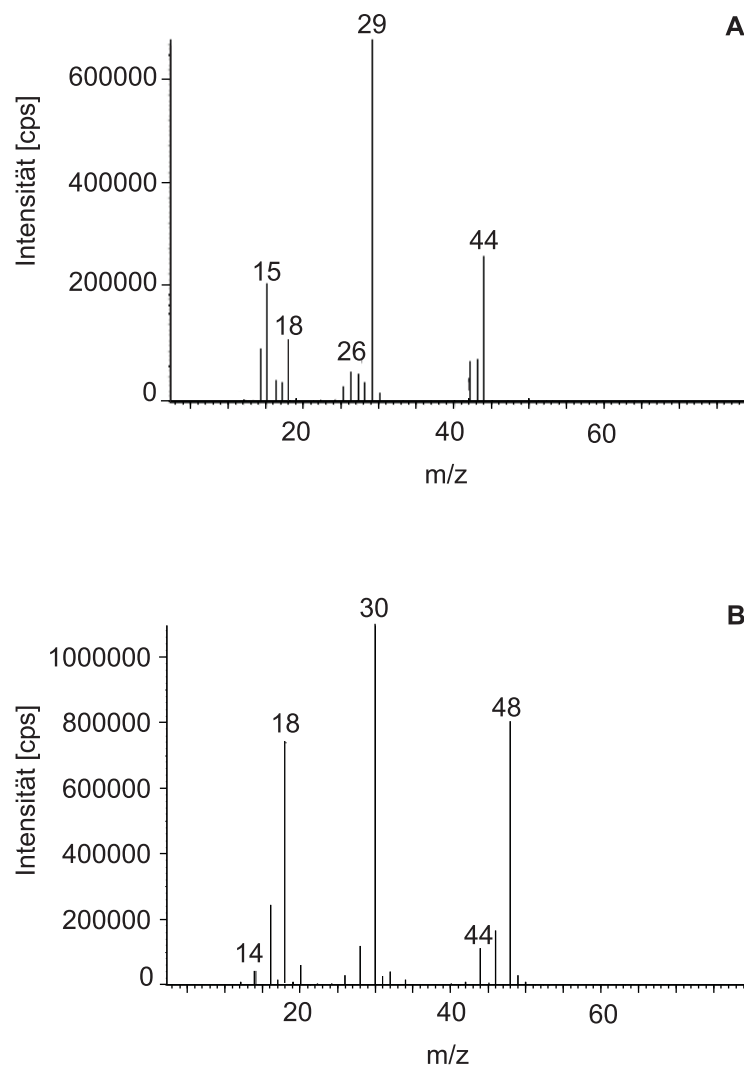


Abbildung 3.9 Im Scan-Modus aufgenommene Massenspektren: **A** Massenspektrum von EO. **B** Massenspektrum von d₄-EO.

aufgezeichneten Signalflächen sehr klein und somit nicht als Quantifier geeignet. Die Quantifizierung der Proben erfolgte über das Verhältnis der Peakflächen EO zu d₄-EO (siehe 2.5.6).

Ein Problem bei der Entwicklung der neuen Methode bestand in der hohen Feuchtigkeit der entnommenen Gasproben. Um ein Einfrieren des ColdTrap-Injektors zu vermeiden, mussten die Proben vor der Injektion getrocknet werden. Zunächst wurden unterschiedliche Chemikalien (u. a. Natriumsulfat und Calciumsulfat) als Trocknungsmittel erprobt. Es kam jedoch zu Substanzverlust durch das Trocknungsmaterial. Deshalb wurden die gasförmigen Proben in Gasprobenbeutel gegeben, 20 Minuten lang bei -80°C gelagert und so das enthaltene Wasser ausgefroren. Wie Vorversuche zeigten, kam es unter diesen Bedingungen zu einem EO-Verlust von höchstens 3 %; es

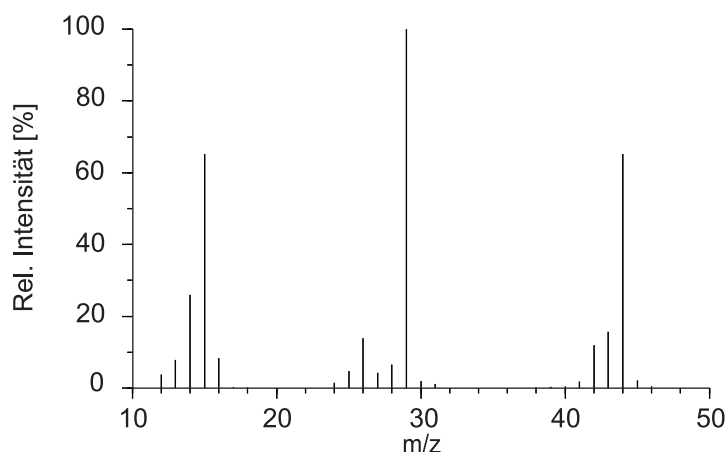


Abbildung 3.10 Referenzmassenspektrum von EO; entnommen aus: NIST Chemistry Webbook (NIST, 2010).

Tabelle 3.1 Beobachtete Fragmentierung von EO und d₄-EO.

Substanz	Ion	Fragment	m/z
EO	M ⁺	C ₂ H ₄ O	44
	[M - CH ₃] ⁺	CHO	29
	[M - CHO] ⁺	CH ₃	15
d ₄ -EO	M ⁺	C ₂ D ₄ O	48
	[M - CD ₃] ⁺	CDO	30
	[M - CDO] ⁺	CD ₃	18

wurde eine ausreichende Trocknung erzielt, um 20 ml Gasprobe problemlos injizieren zu können.

Nach jeder Messung wurde der Gaschromatograph 20 Minuten lang bei 170 °C ausgeheizt, um die Feuchtigkeit von der Kapillarsäule zu entfernen und wieder die optimale Sensitivität zu erreichen. Durch dieses Verfahren konnten bis zu vier Blutproben in Folge analysiert werden. Die Retentionszeiten betragen für EO und d₄-EO 6,7 ± 0,1 min. Aufgrund der sich auf der Säule sammelnden Feuchtigkeit verschoben sich zwar die Retentionszeiten im Verlauf der Exposition leicht, aber durch das eindeutige Massenfragment und die Verwendung eines stabil markierten internen Standards war stets eine eindeutige Identifizierung möglich. In Abb. 3.11 ist ein typisches Chromatogramm von EO und d₄-EO zu sehen. Es wurde nach einer 30-minütigen Exposition gegen 30 ppm ET aufgenommen. Abb. 3.12 zeigt ein im Rahmen des gleichen Versuchs aufgenommenes Chromatogramm der Blutprobe eines Kontrolltiers. Es wurde kein EO im Blut des Kontrolltiers gefunden.

Bei Überprüfung der Linearität der Detektorantwort für die Messung von EO mittels GC/MSD ergab sich ein linearer Zusammenhang zwischen EO-Konzentration

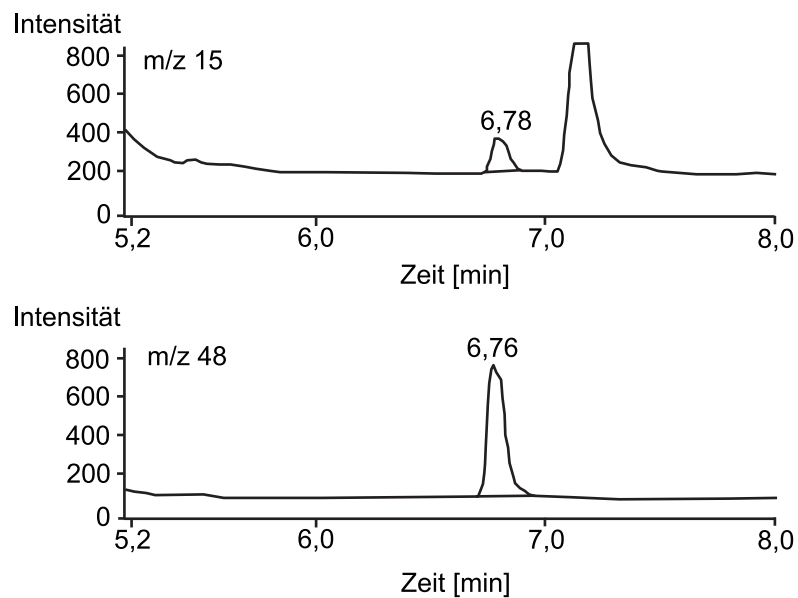


Abbildung 3.11 GC/MSD-Chromatogramme von EO ($t_R = 6,78$ min) und d_4 -EO ($t_R = 6,76$ min) in Rattenblut nach Exposition von CD-Ratten gegen 30 ppm ET über 30 Minuten. $c(\text{EO}) = 0,2 \mu\text{mol/l}$, $c(d_4\text{-EO}) = 0,06 \mu\text{mol/l}$. Die Messungen wurden gemäß der Beschreibung in 2.5.2.2 durchgeführt.

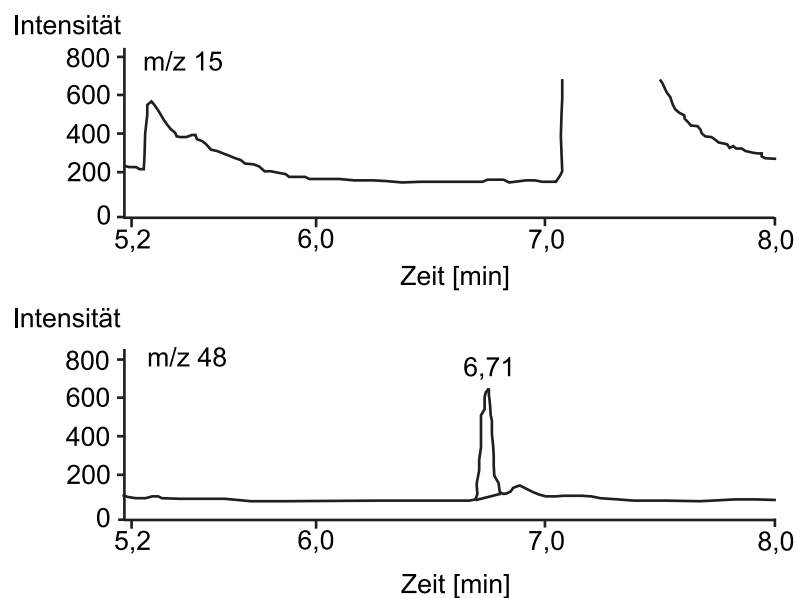


Abbildung 3.12 GC/MSD-Chromatogramme von EO und d_4 -EO ($t_R = 6,71$ min) im Blut eines Kontrolltiers. $c(d_4\text{-EO}) = 0,06 \mu\text{mol/l}$. Die Messungen wurden gemäß der Beschreibung in 2.5.2.2 durchgeführt.

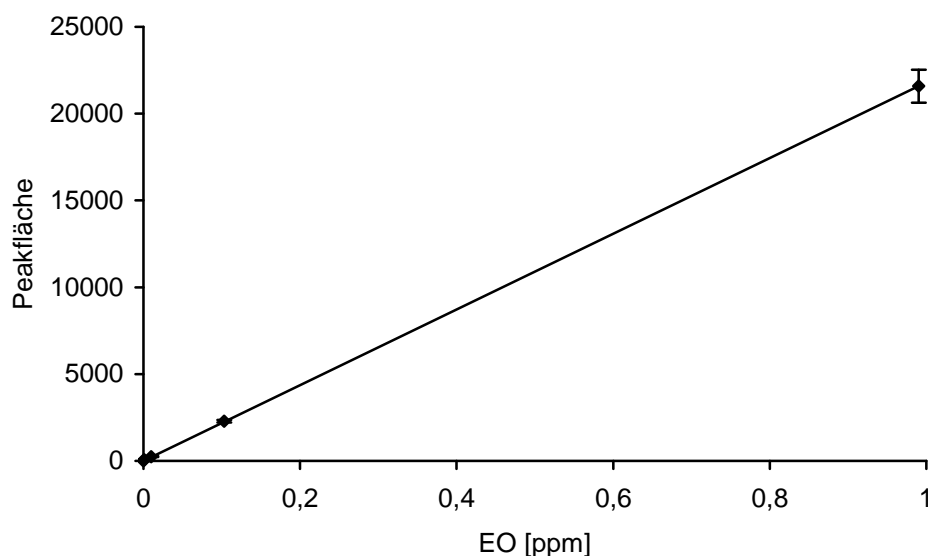


Abbildung 3.13 Linearität der Detektorantwort für EO am GC/MSD im Bereich zwischen 1 ppb und 1 ppm. Jeder Punkt entspricht dem Mittelwert \pm SD aus drei Messungen. Die Standardabweichungen sind zum Teil zu klein, um graphisch dargestellt werden zu können. Die Geradengleichung lautet $y = 21808 x$; $r^2 = 0.9999$. Die Messungen wurden gemäß der Beschreibung in 2.5.2.2 durchgeführt.

und Peakfläche im Konzentrationsbereich zwischen 1 ppb und 1 ppm. Das Ergebnis ist in Abb. 3.13 dargestellt.

3.1.3.1 Wiederfindung, Präzision und Nachweisgrenze

Wiederfindung und Präzision (Reproduzierbarkeit) wurden für jede Art der Probenaufarbeitung bestimmt. Der EO-Konzentrationsbereich in den Experimenten erstreckte sich nach Exposition gegen ET von 0,16 bis 1,98 $\mu\text{mol/l}$ und nach Exposition gegen EO von 0,49 bis 8,1 $\mu\text{mol/l}$. Wiederfindung und Präzision wurden bei einer EO-Konzentration von 0,83 bzw. 2,7 $\mu\text{mol/l}$ ermittelt. Zur Bestimmung der Wiederfindung wurden Blutproben mit einer definierten EO-Konzentration hergestellt. Die theoretisch berechnete EO-Menge wurde als 100 % definiert. Die Wiederfindung ergab sich so aus dem Verhältnis der gefundenen zur theoretisch berechneten Menge an EO.

Zur Bestimmung der Präzision der Methode wurden mehrere (3 bis 4) Proben der gleichen EO-Konzentration hergestellt. Die Proben wurden wie unter 2.5.2.2 beschrieben aufgearbeitet und die EO-Konzentrationen bestimmt. Als Maß für die Präzision wurde der Variationskoeffizient aus dem Mittelwert und der Standardabweichung der Messwerte berechnet (siehe 2.5.7). Die Ergebnisse sind in Tab. 3.2 und Tab. 3.3 zusammengefasst.

Die Nachweisgrenze, definiert als die dreifache Höhe des Hintergrundrauschens, betrug 10 nmol EO pro Liter Blut unter Verwendung von 4–5 ml Blutvolumen und Trocknung von 20 ml Gasprobe in Gasprobenbeuteln. Die Konzentrationen der ge-

Tabelle 3.2 Wiederfindung von EO im Blut. **1** Aufarbeitung nach Verfahren für Inhalationsexperimente. **2** Aufarbeitung nach Verfahren für Infusionsexperimente (vgl. 2.5.2.2).

Aufarb.	EO im Blut [$\mu\text{mol/l}$], theoretisch	EO im Blut [$\mu\text{mol/l}$], gefunden	WF [%]	MW \pm SD [%]
1	0,83	0,683	82,3	86,6 \pm 9,7
	0,83	0,632	76,1	
	0,83	0,740	89,2	
	0,83	0,820	98,8	
2	2,7	2,480	91,9	106 \pm 13,6
	2,7	2,905	108	
	2,7	3,213	119	

WF Wiederfindung, MW Mittelwert, SD Standardabweichung

Tabelle 3.3 Reproduzierbarkeit der Quantifizierung von EO im Blut. **1** Aufarbeitung nach Verfahren für Inhalationsexperimente. **2** Aufarbeitung nach Verfahren für Infusionsexperimente (vgl. 2.5.2.2).

Aufarb.	EO im Blut [$\mu\text{mol/l}$]	MW	SD	CV [%]
1	0,683	0,719	0,08	11,13
	0,632			
	0,740			
	0,820			
2	2,480	2,866	0,199	6,68
	2,905			
	3,213			

MW Mittelwert, SD Standardabweichung, CV Variationskoeffizient

mäß 2.5.2.2 aufgearbeiteten Blutproben von gegen EO exponierten Ratten lagen stets deutlich über der Nachweisgrenze; für diese Methode wurde diese daher nicht bestimmt.

3.1.3.2 Quantitative Auswertung

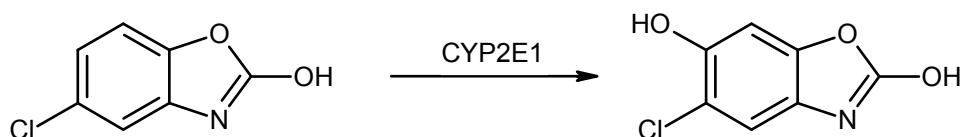
Wie in 2.5.2.2 beschrieben, wurden zur Quantifizierung des EO im Blut d_4 -EO als interner Standard verwendet und die charakteristischen Ionen m/z 15 (EO) und m/z 48 (d_4 -EO) herangezogen. Die Berechnung beruhte auf dem ermittelten Peakflächenverhältnis von 6,4 zu 1 ($6,43 \pm 0,18$; $n = 4$, m/z 48 zu m/z 15) bei gleicher Konzentration von EO und d_4 -EO im Blut. UNter Berücksichtigung der Peakfläche und der bekannten Konzentration des internen Standards d_4 -EO konnte aus der ermittelten Peakfläche von EO die EO-Konzentration berechnet werden.

Tabelle 3.4 Beobachtete Fragmentierung von 6-OH-CZZ.

Massenübergang	Fragment
184 → 148	$[M - \text{HCl}]^-$
184 → 120	$[M - \text{HCl} - \text{CO}]^-$

3.1.4 Quantifizierung von 6-Hydroxy-Chlorzoxazon durch LC-MS/MS

Zur Bestimmung der Aktivität von CYP2E1 wurde die für dieses Isoenzym spezifische enzymatische Umsetzung CZZ zu 6-OH-CZZ genutzt (siehe Abb. 3.14).

**Abbildung 3.14** Enzymatische Umsetzung von CZZ zu 6-OH-CZZ durch CYP2E1.

Das nach Inkubation entstandene 6-OH-CZZ wurde unter den in 2.5.3.4 beschriebenen Bedingungen mittels LC-MS/MS-Messung quantifiziert. Aus der Menge des innerhalb von 10 Minuten gebildeten Reaktionsprodukts konnte dann die Enzymaktivität berechnet werden.

Die Messmethode wurde in Anlehnung an Anari *et al.* (2003), Walsky und Obach (2004) und Kim *et al.* (2005) erstellt. Die Optimierung der Spannungen und Quellenparameter am API 4000 erfolgte wie in 3.1.5 beschrieben.

Zur Quantifizierung von 6-OH-CZZ wurde der intensivste Massenübergang 184 → 120 herangezogen (vgl. Tab. 3.4). Der Übergang 184 → 148 wurde als Qualifier verwendet; seine Intensität betrug etwa ein Drittel der des Quantifiers. Die Quantifizierung erfolgte über eine externe Kalibrierung und durch Vergleich der Peakflächen der Inkubationsproben mit denen der Kalibrierproben. Eine beispielhafte Kalibriergerade ist in Abb. 3.15 gezeigt. Abb. 3.16, zeigt im Rahmen eines Experiments aufgenommene Chromatogramme für 6-OH-CZZ. Die Retentionszeit der 6-OH-CZZ-Signale von $2,65 \pm 0,02$ min war über die gesamte Dauer einer Messreihe stabil.

Die Reproduzierbarkeit der 6-OH-CZZ-Messungen war gut, wie sich aus dem Variationskoeffizient ergab, der zwischen 2 und 5 % lag (siehe Tab. 3.5).

3.1.5 Quantifizierung von S-(2-Hydroxyethyl)glutathion durch LC-MS/MS

Um das entstandene GS-EO zu quantifizieren, wurden alle in den Expositionen gewonnenen Rattenlebern nach 2.5.4 aufgearbeitet. Hierbei musste jedoch auf eine möglichst vollständige Fällung der Proteine geachtet werden, um eine Verstopfung der

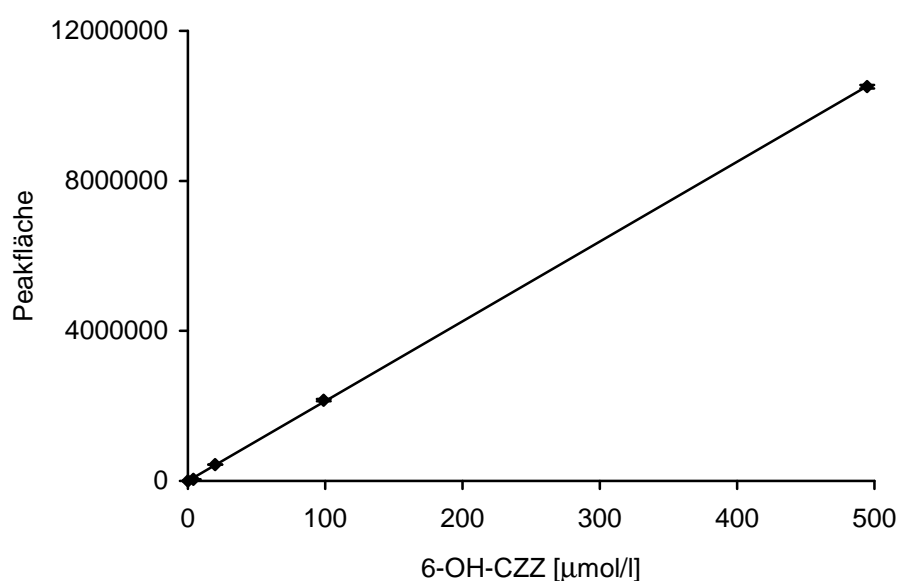


Abbildung 3.15 Kalibriergerade zur Quantifizierung von 6-OH-CZZ im Konzentrationsbereich zwischen 4 und 500 $\mu\text{mol/l}$ für den Massenübergang 184 \rightarrow 120. Symbole: Mittelwert \pm SD ($n=4$). Die Standardabweichungen sind teilweise zu klein, um graphisch dargestellt werden zu können. Die Geradengleichung lautet $y = 3814 x$; $r^2 = 0,995$. Die Messungen wurden gemäß der Beschreibung in 2.5.3.4 durchgeführt.

Tabelle 3.5 Reproduzierbarkeit der Messungen von 6-OH-CZZ in Matrix. Bei jeder Konzentration wurden vier Messungen durchgeführt.

6-OH-CZZ in Matrix [$\mu\text{mol/l}$]	CV [%]
3,96	4,20
19,78	5,10
98,92	2,01
496,60	4,73

CV Variationskoeffizient

HPLC-Säule zu vermeiden. Durch Verwendung eines internen Standards, der zu Beginn der Aufarbeitung der Leberprobe vor der Homogenisation zugegeben wurde, konnte eine sehr genaue Quantifizierung von GS-EO erreicht werden.

Bei der Herstellung der im Rahmen der Methodenentwicklung benötigten GS-EO-Lösung (vgl. 2.5.4.3) wurden gute Ausbeuten erzielt. Nach 24-stündiger Inkubation der Lösungen von GSH, EO und GST wurden stets 98 bis 99 % des eingesetzten GSH zu GS-EO umgesetzt. Dies wurde durch Quantifizierung des GSH vor und nach der Inkubation sowie von GSSG gezeigt. GSSG konnte in keinem der verwendeten Inkubationsansätze nachgewiesen werden.

Im Rahmen der Methodenentwicklung erfolgte die Optimierung der MS-Parameter im ersten Schritt ohne HPLC-Kopplung. Dabei wurden zunächst Lösungen jeder

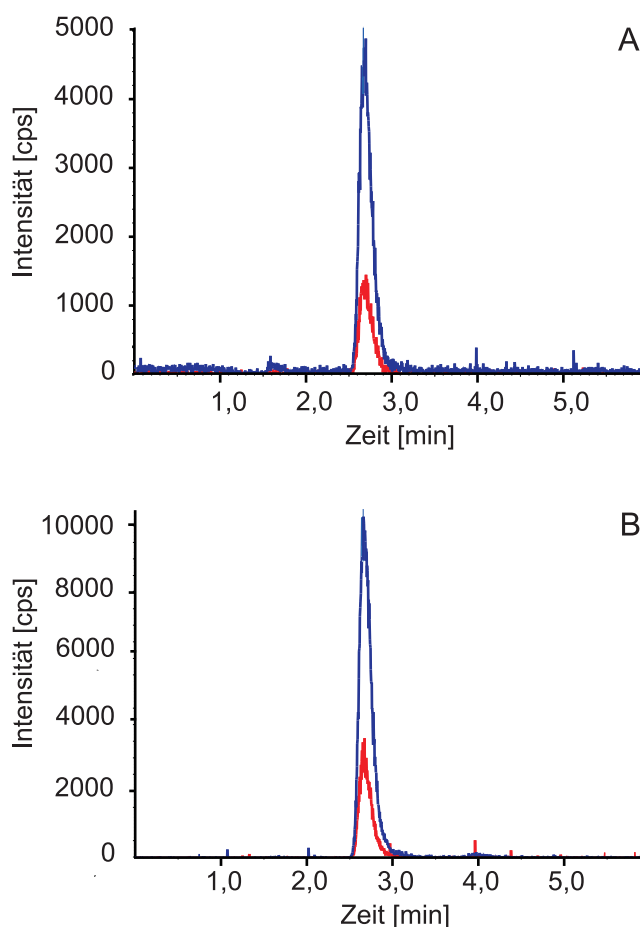


Abbildung 3.16 LC-MS/MS-Chromatogramme von 6-OH-CZZ. **A** Kalibrierprobe, $c(6\text{-OH-CZZ}) = 3,96 \mu\text{mol/l}$, Massenübergänge $184 \rightarrow 120$ (intensiverer) und $184 \rightarrow 148$, $t_R = 2,65 \text{ min}$. **B** Chromatogramm von 6-OH-CZZ in Leberprobe, $c(6\text{-OH-CZZ}) = 7,92 \mu\text{mol/l}$, Massenübergänge $184 \rightarrow 120$ (intensiverer) und $184 \rightarrow 148$, $t_R = 2,65 \text{ min}$; cps: counts per second. Die Messungen wurden gemäß der Beschreibung in 2.5.3.4 durchgeführt.

Substanz mit einer Infusionspumpe bei konstanter Geschwindigkeit in das Massenspektrometer geleitet, die charakteristischen Ionen ermittelt und die MS-Spannungen optimiert (DP, EP, CE, CXP). Anschließend wurden im Modus der *flow injection analysis* (FIA), also der Injektion der Proben durch den Autosampler ohne die Zwischenschaltung einer Säule, die Quellenparameter optimiert (z. B. CUR, CAD, IS, Temperatur). Nachdem diese Schritte für alle Analyten (GS-EO, GSH-EE) durchgeführt worden waren, wurden die ermittelten Parameter in den massenspektrometrischen Teil der Messmethode integriert und anschließend nach Einbau der Säule die flüssigkeitschromatographischen Bedingungen getestet.

Es wurden unterschiedliche Säulen und Laufmittelzusammensetzungen zur Ermittlung der optimalen HPLC-Bedingungen getestet. Als Säule wurde zunächst eine „Synergi Hydro-RP“ (150 x 2 mm, 4 μ) von Phenomenex verwendet, die durch ihr polares „Endcapping“ für gute Retention und Auftrennung sowohl hydrophober als

Tabelle 3.6 Zur Quantifizierung von GS-EO und GSH-EE verwendete Massenübergänge und zugehörige Massenfragmente.

Analyt	Massenübergang	Fragment
GS-EO	352 → 223	[M – Glu] ⁺
	352 → 188	[M – Glu – NH ₃ – H ₂ O] ⁺
	352 → 206	[M – Glu – NH ₃] ⁺
	352 → 120	[M – Glu – Gly – CO] ⁺
GSH-EE	336 → 207	[M – Glu] ⁺
	336 → 104	[M – Glu – Cys] ⁺

Glu Glutaminsäure, *Gly* Glycin, *Cys* Cystein

auch polarer Komponenten sorgen soll. Mit dieser Säule war zwar die Retention des GS-EO zufriedenstellend, bei GSH-EE kam es jedoch zu starkem Tailing. Mit der Luna C18(2)-Säule (150 x 2 mm, 5 µ) und einer Laufmittelzusammensetzung von 25 % Acetonitril und 75 % Ammoniumacetatlösung (5 mmol/l) wurden zufriedenstellende Retentionszeiten und Peakformen für beide Analyten erhalten.

Im MRM-Modus wurden für jede Substanz mindestens zwei Massenübergänge gemessen, die im Rahmen der Methodenentwicklung ermittelt worden waren (siehe Tab. 3.6, Abb. 3.17 sowie 2.5.4.2). Für GSH-EE wurde der intensivere Übergang 336 → 104 als Quantifier und 336 → 207 als Qualifier verwendet. Für S-(2-hydroxyethyl)glutathion wurden stets vier Massenübergänge aufgezeichnet, wobei hier der Übergang 352 → 188 zur Quantifizierung diente. Die Übergänge 352 → 223, 352 → 206 und 352 → 120 dienten als Qualifier zur sicheren Identifizierung des Addukts und konnten im Falle des Auftretens von Störsignalen in der Quantifier-Massenspur ebenfalls zur Quantifizierung genutzt werden. Ein Produktionenspektrum von GS-EO ist in Abb. 3.18 gezeigt, Beispielchromatogramme für die Messung von GS-EO sind in Abb. 3.20 zu sehen.

Die Nachweisgrenze für GS-EO, definiert als die dreifache Höhe des Hintergrundrauschens, betrug 0,08 nmol/g Leber (für die Massenspur 352 → 188). Die eindeutige Identifizierung der Substanzen erfolgte über das Verhältnis der Peakflächen der beiden Massenübergänge und über die Retentionszeit. Die Retentionszeit war innerhalb einer Messreihe sehr stabil und betrug für GS-EO 1,02 ± 0,01 min und für den internen Standard GSH-EE 1,58 ± 0,007 min. Zur Quantifizierung des Addukts von EO an GSH wurde in Vorversuchen (vgl. 2.5.4.3) das Verhältnis der Peakflächen von GSH-EE zu GS-EO bei gleicher Konzentration der Substanzen ermittelt. Über dieses Peakflächenverhältnis konnte dann die Konzentration von GS-EO in der Leberprobe berechnet werden. Die ermittelten und zur Auswertung herangezogenen Peakflächenverhältnisse sind in Tab. 3.7 aufgeführt.

Zur Überprüfung der Linearität der Detektorantwort für GS-EO bei der LC-MS/MS-Messung wurden Lösungen mit sechs unterschiedlichen Konzentrationen von GS-EO

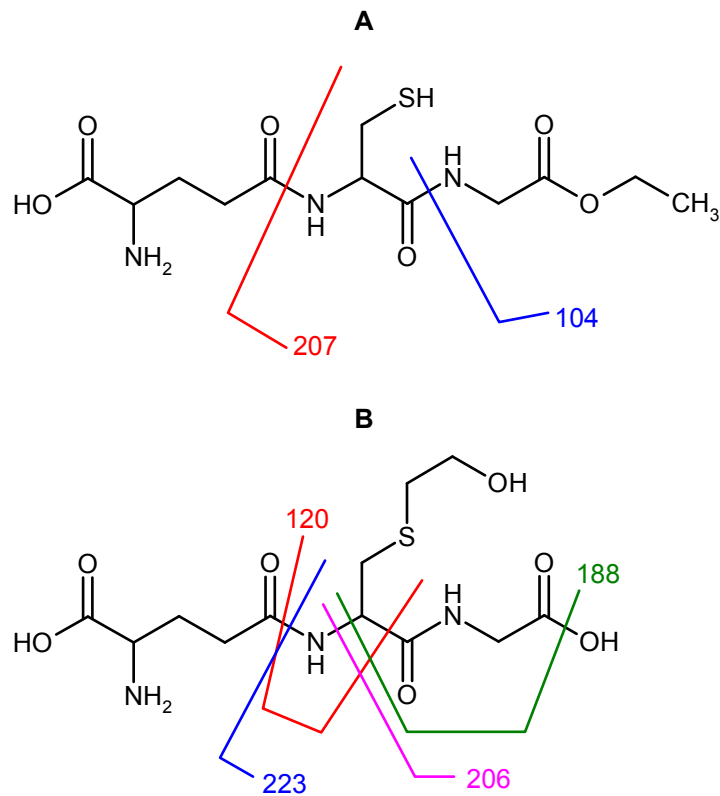


Abbildung 3.17 Beobachtete, zur Quantifizierung verwendete Fragmentierungen von **A** GSH-EE und **B** GS-EO. Die Differenz der Massen der Massenfragmente 104, 207 und 223 zu den in der Abbildung dargestellten Strukturen ergibt sich durch die zusätzliche Addition von Wasserstoff.

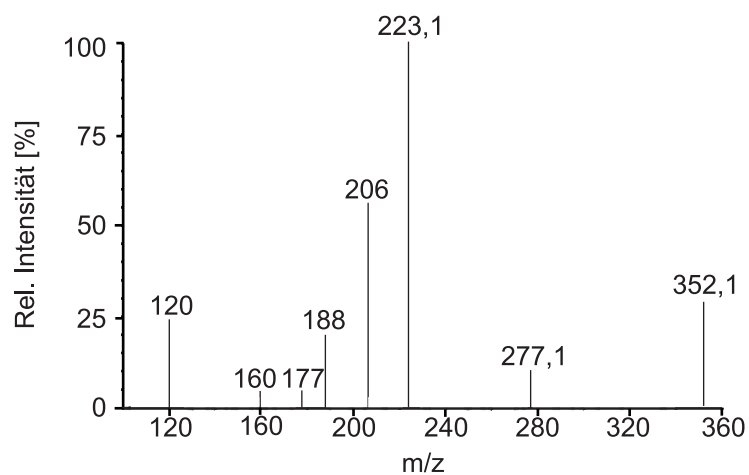


Abbildung 3.18 Produktionenspektrum von GS-EO (Mutterion m/z 352), CE 20 V. Die Messung wurde gemäß der Beschreibung in 2.5.4.2 durchgeführt.

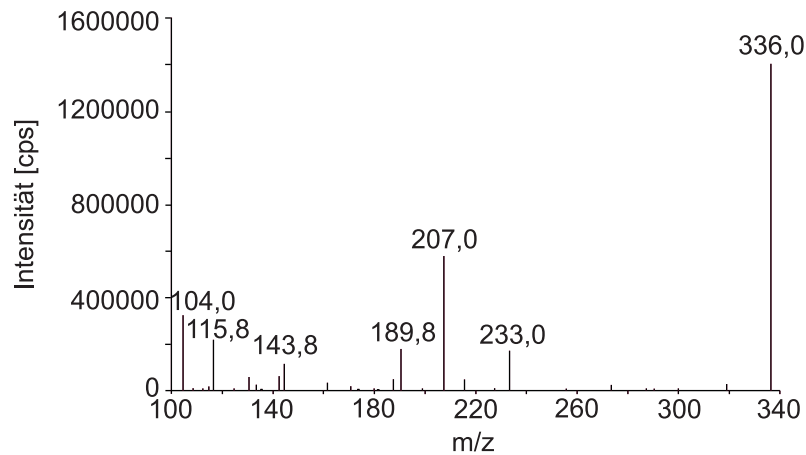


Abbildung 3.19 Produktionenspektrum von GSH-EE (Mutterion m/z 336), CE 20 V. Die Messung wurde gemäß der Beschreibung in 2.5.4.2 durchgeführt.

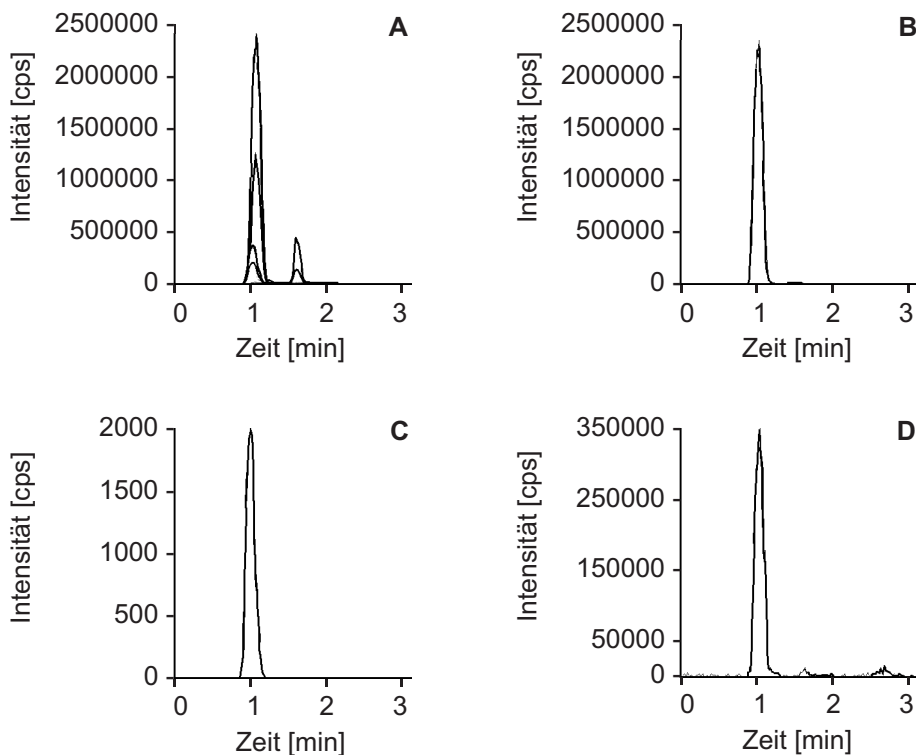


Abbildung 3.20 Typische LC-MS/MS-Chromatogramme von GSH, GSSG und GS-EO aus einer Leberprobe einer über 3 Stunden gegen 4,2 μmol EO / ml Kochsalzlösung exponierten Ratte. **A** Totalionen-chromatogramm (Retentionszeiten: GSH 1,05 min, GSSG 1,05 min, GS-EO 1,02 min, GSH-EE (inter-ner Standard) 1,58 min). Pro Analyt wurden jeweils zwei Massenübergänge aufgezeichnet (s. Tab. 3.6, Tab. 3.9). **B** Massenspur 308 \rightarrow 179 von GSH; **C** Massenspur 613 \rightarrow 355 von GSSG, **D** Massenspur 352 \rightarrow 188 von GS-EO. Die Messungen wurde gemäß der Beschreibung in 2.5.4 bzw. 2.5.5 durchgeführt.

Tabelle 3.7 Peakflächenverhältnisse von GSH-EE zu GS-EO bei gleicher Analytenkonzentration.

Übergang GSH-EE	Übergang GS-EO	Verhältnis GSH-EE / GS-EO
336 → 104	352 → 223	0,43 / 1
336 → 104	352 → 188	1,30 / 1
336 → 104	352 → 206	0,85 / 1
336 → 104	352 → 120	1,75 / 1

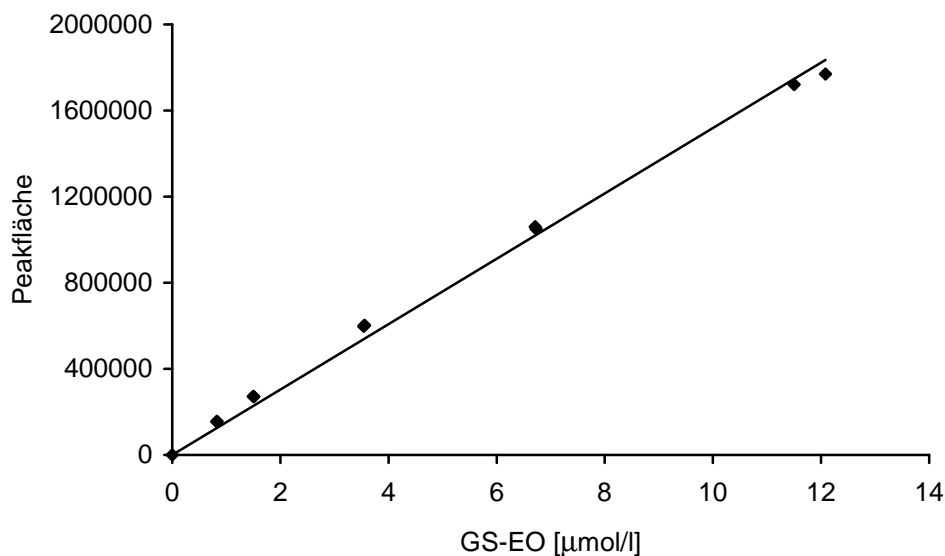


Abbildung 3.21 Linearität der Detektorantwort für GS-EO in Lebermatrix. Die Geradengleichung lautet $y = 151842 x$; $r^2 = 0,995$. Pro Konzentration wurden zwei Proben gemessen, die Unterschiede der Peakflächen sind zu gering, um graphisch dargestellt werden zu können. Die Messungen wurde gemäß der Beschreibung in 2.5.4.2 durchgeführt.

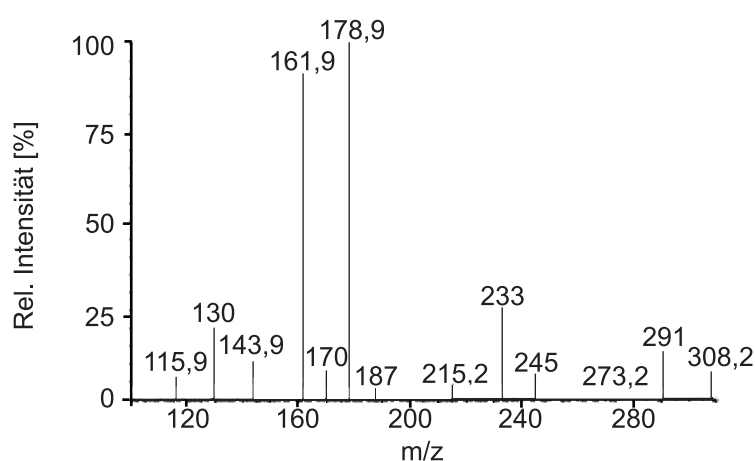
in Leberhomogenat von Kontrolltieren hergestellt und mittels LC-MS/MS vermessen. Es zeigte sich ein linearer Zusammenhang zwischen der GS-EO Konzentration und der erhaltenen Peakfläche (Abb. 3.21). Ohne Zusatz von GS-EO-Lösung konnte im Leberhomogenat der Kontrolltiere kein GS-EO detektiert werden.

3.1.5.1 Wiederfindung und Präzision

Zur Bestimmung der Wiederfindung und Überprüfung eines eventuellen Matrixeinflusses wurde eine Lösung von GS-EO (8,17 bzw. 9,11 $\mu\text{mol/l}$) in Ammoniumacetatlösung (5 mmol/l) hergestellt. Zu einer zweiten Probe wurden statt Ammoniumacetatlösung 850 μl Leberhomogenat von Kontrolltieren gegeben. Beide Proben wurden mittels LC-MS/MS vermessen und das enthaltene GS-EO quantifiziert. Die in Ammoniumacetatlösung gefundene Menge an GS-EO wurde als 100 % definiert. Die Wiederfindung ergibt sich somit aus dem Verhältnis der Konzentration von GS-EO in der Leberprobe zur Konzentration in der Ammoniumacetatprobe und hat einen mittleren

Tabelle 3.8 Wiederfindung (WF) von GS-EO.

GS-EO in Puffer [$\mu\text{mol/l}$]	GS-EO in Homogenat [$\mu\text{mol/l}$]	WF [%]
8,17	6,59	80,7
9,11	6,86	75,3

**Abbildung 3.22** Produktionspektrum von GSH (Mutterion 308), Kollisionsenergie 25 V.

Wert von 78 % (siehe Tab. 3.8).

Zur Bestimmung der Präzision wurden acht Leberstücke eines über 3 Stunden gegen 300 ppm ET exponierten Tiers verwendet und nach 2.5.4.1 aufgearbeitet. Anschließend wurde mittels LC-MS/MS die GS-EO-Konzentration in den Leberproben bestimmt. Als Maß für die Präzision diente der Variationskoeffizient, der aus Mittelwert und Standardabweichung ($c(\text{GS-EO}) = 0,91 \pm 0,06 \mu\text{mol/l}$) berechnet wurde (siehe 2.5.7). Er betrug für die acht Messungen 7 %.

3.1.6 Quantifizierung von reduziertem und oxidiertem Glutathion durch LC-MS/MS

GSH und GSSG wurden wie in 2.5.5 beschrieben quantifiziert. Abb. 3.22 zeigt das bei einer Kollisionsenergie von 25 V aufgenommene Produktionspektrum von GSH, in dem die beiden intensivsten, als Qualifier und Quantifier genutzten Massenübergänge ($308 \rightarrow 179$ und $308 \rightarrow 162$) zu erkennen sind. Abb. 3.23 zeigt das bei einer Kollisionsenergie von 60 V aufgenommene Produktionspektrum von GSSG.

Abb. 3.20 (B, C) zeigt typische Chromatogramme von GSH und GSSG in der Leberprobe einer über 3 Stunden gegen $4,2 \mu\text{mol EO / ml}$ Kochsalzlösung exponierten Ratte. Die Zuordnung der beobachteten Massenfragmente findet sich in Tab. 3.9 und Abb. 3.24.

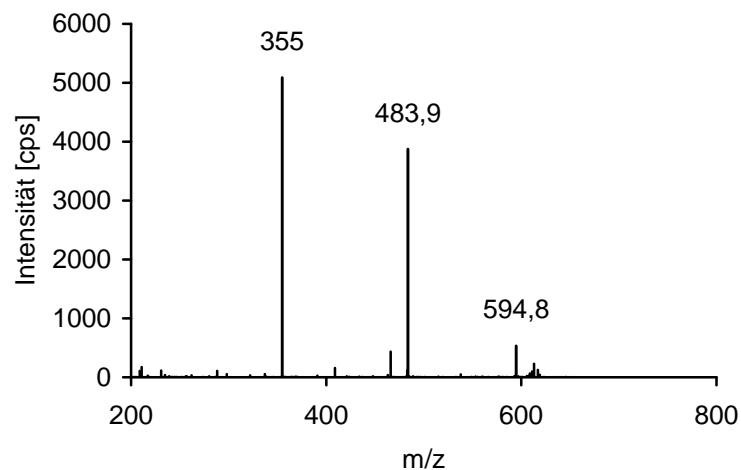


Abbildung 3.23 Produktionenspektrum von GSSG (Mutterion 613), Kollisionsenergie 60 V (Massbank, 2010).

Tabelle 3.9 Zur Quantifizierung von GSH und GSSG verwendete Massenübergänge und zugehörige Massenfragmente.

Analyt	Massenübergang	Fragment
GSH	308 → 179	[M – Glu] ⁺
	308 → 162	[M – Glu – NH ₃] ⁺
GSSG	613 → 355	[M – Glu – γ-Glu] ⁺
	613 → 484	[M – Glu] ⁺

Glu Glutaminsäure

Zur Überprüfung der Linearität der Detektorantwort für GSH und GSSG bei der LC-MS/MS-Messung wurden Lösungen mit jeweils vier unterschiedlichen Konzentrationen von GSH bzw. GSSG in Leberhomogenat (hergestellt nach 2.5.4.1) von Kontrolltieren hergestellt und mittels LC-MS/MS vermessen. Es zeigte sich für beide Analyte ein linearer Zusammenhang zwischen der Konzentration von GSH bzw. GSSG und der erhaltenen Peakfläche (vgl. Abb. 3.25 und Abb. 3.26).

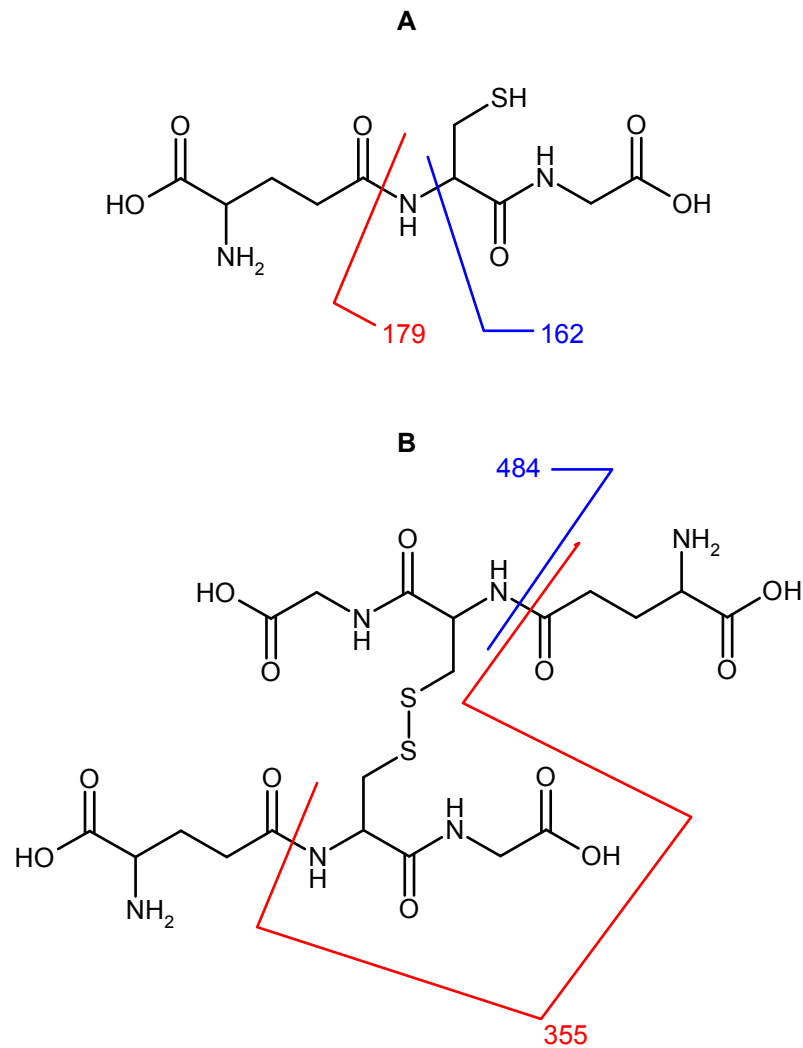


Abbildung 3.24 Beobachtete, zur Quantifizierung verwendete Fragmentierungen von **A** reduziertem und **B** oxidiertem Glutathion. Die Messungen wurde gemäß der Beschreibung in 2.5.5 durchgeführt. Die Differenz der Massen der Massenfragmente 179, 355 und 484 zu den in der Abbildung dargestellten Strukturen ergibt sich durch die zusätzliche Addition von Wasserstoff an die Aminogruppen bei den Fragmentierungsreaktionen.

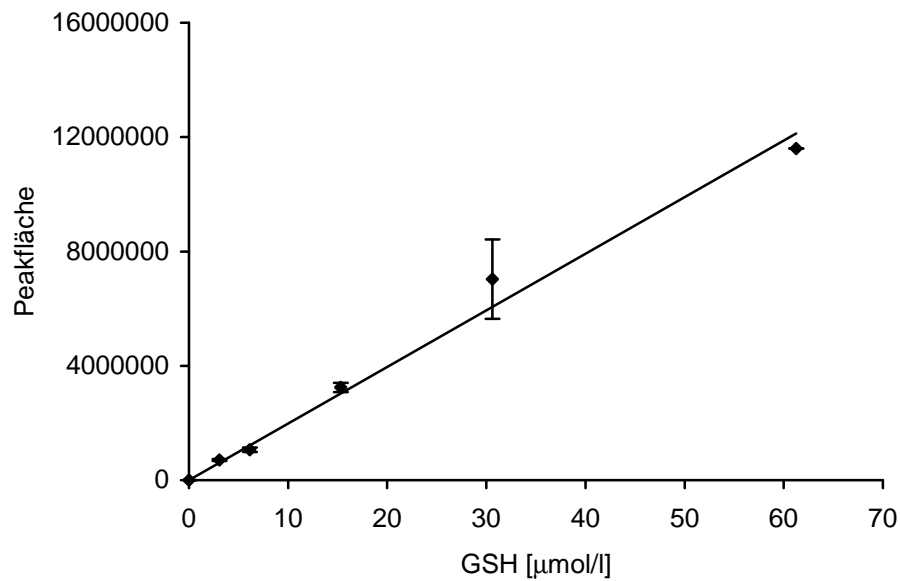


Abbildung 3.25 Linearität der Detektorantwort für GSH in Lebermatrix. Jeder Punkt entspricht dem Mittelwert \pm SD aus zwei Messungen. Die Geradengleichung lautet $y = 198023 x$; $r^2 = 0,9875$. Die Messungen wurden gemäß der Beschreibung in 2.5.5 durchgeführt.

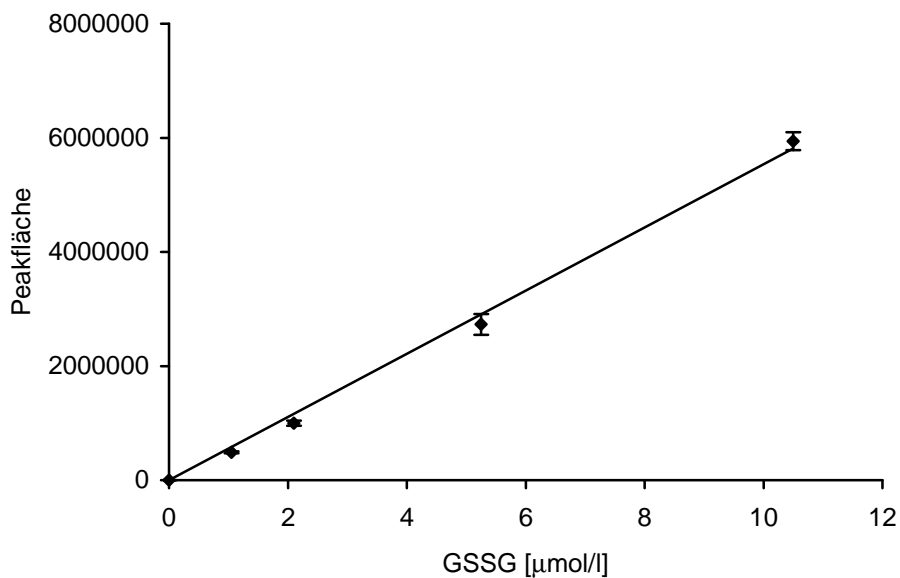


Abbildung 3.26 Linearität der Detektorantwort für GSSG in Lebermatrix. Jeder Punkt entspricht dem Mittelwert \pm SD aus zwei Messungen. Die Geradengleichung lautet $y = 553352 x$; $r^2 = 0,9964$. Die Messungen wurden gemäß der Beschreibung in 2.5.5 durchgeführt.

3.2 Expositionen

3.2.1 Expositionen gegen initiale Konzentrationen von Ethylen

Es wurden jeweils fünf CD-, bzw. zwei oder fünf F344-Ratten in einem geschlossenen Expositionssystem gegen ET exponiert (siehe 2.4.1). Zu Beginn jeder Exposition wurde eine definierte Menge an gasförmigem ET in das Expositionssystem injiziert. Im Anschluss wurden während der jeweiligen Exposition wiederholt die Konzentrationen von ET in der Kammeratmosphäre mittels GC/FID bestimmt. In Abb. 3.27 sind die erhaltenen Konzentrations-Zeit-Verläufe für ET in Abhängigkeit von der jeweiligen Anfangskonzentration von ET semilogarithmisch dargestellt. Die Konzentrations-Zeit-Kurven fallen bis zum Ende der Expositionen nach maximal 6 Stunden linear ab. Die bei gleichen ET-Anfangskonzentrationen unterschiedlichen Steigungen der Kurven für F344- bzw. CD-Ratten ist auf die unterschiedliche Zahl der exponierten Tiere zurückzuführen (fünf CD-Ratten vs. zwei F344-Ratten). Bei beiden Rattenstämmen ist mit steigender ET-Konzentration ein Abflachen der Konzentrations-Zeit-Kurven zu beobachten (Abb. 3.27). Dies ist charakteristisch für eine Sättigungskinetik.

Der Konzentrationsabfall von ET lässt sich eindeutig auf metabolische Elimination des ET durch die exponierten Ratten zurückführen: Wurde eine definierte Menge an ET in einen Exsikkator gegeben, in dem sich keine Tiere befanden, blieb die ET-Konzentration konstant (Daten nicht dargestellt).

Bei linearer Auftragung des ET-Konzentrations-Zeitverlaufes einer 2-stündigen ET-Exposition (Anfangskonzentration 970 ppm ET) von 5 Ratten in einer Expositions-kammer von 6,3 l zeigte sich ein zweiphasiger Kurvenverlauf (Abb. 3.28). Der steile Konzentrationsabfall in der ca. 15 Minuten dauernden anfänglichen Verteilungsphase ist hauptsächlich auf eine Anreicherung von ET im Organismus zurückzuführen. Der danach folgende Konzentrationsabfall liegt in der metabolischen Eliminierung des ET begründet. Dies wird durch Vergleich mit dem in Abb. 3.29 gezeigten Konzentrations-Zeit-Verlauf von ET deutlich, der bei CD-Ratten erhalten wurde, deren CYP-abhängiger Metabolismus durch Vorbehandlung mit einer Dithiocarbamatlösung gehemmt worden war. Nach Abschluss der Verteilungsphase kam es hier zu keinem weiteren Abfall der ET-Konzentration. Während der gesamten Expositionsdauer konnte hier kein EO detektiert werden: Der Metabolismus war vollständig inhibiert. Daraus kann gefolgert werden, dass sowohl der Metabolismus von ET als auch die Bildung von EO CYP-vermittelt ist.

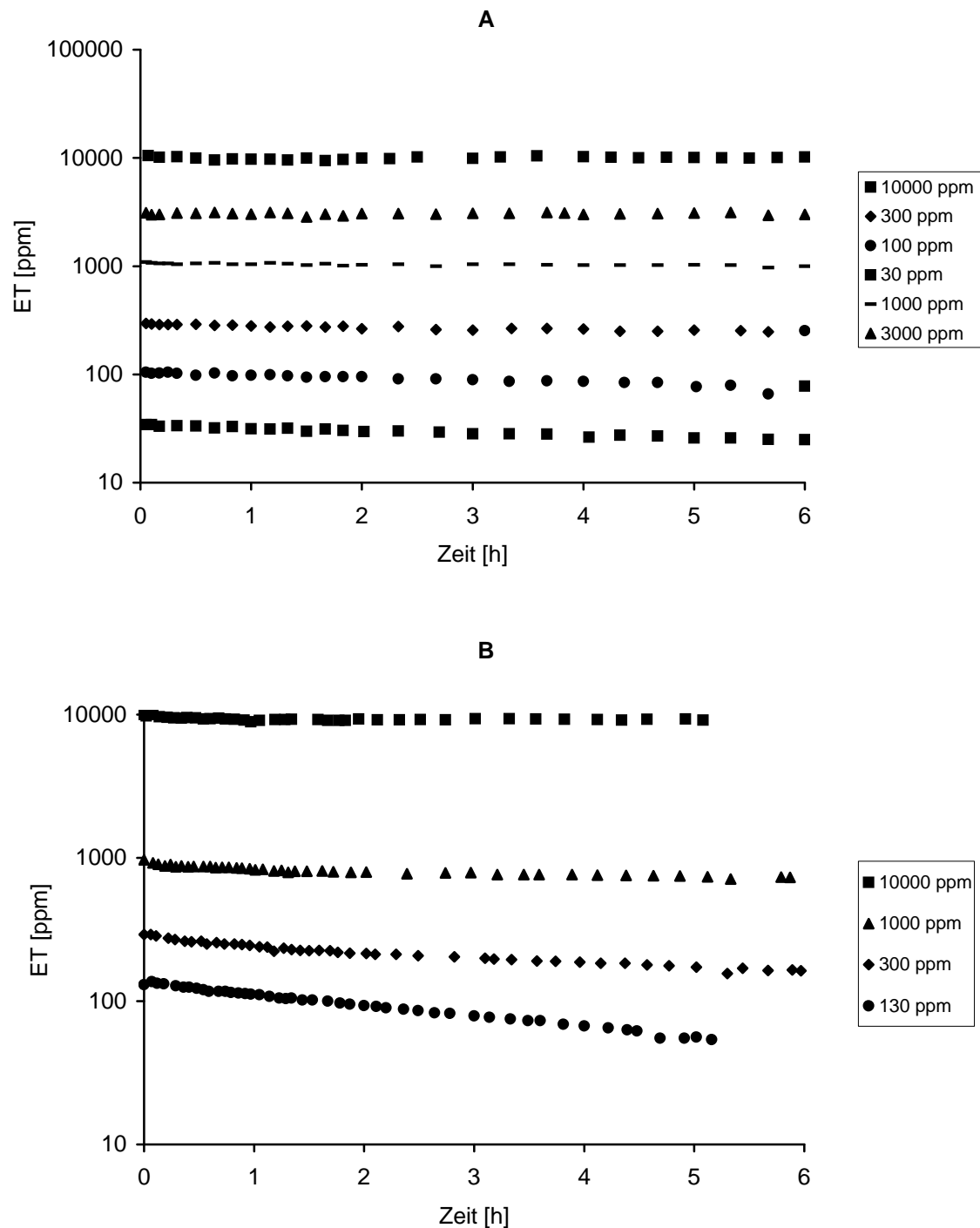


Abbildung 3.27 Konzentrations-Zeit-Verläufe von ET in der Gasphase geschlossener Expositionssysteme (Volumen ca. 6,3 l); semilogarithmische Darstellung. **A** Exposition von jeweils zwei F344-Ratten gegen unterschiedliche Konzentrationen von ET. **B** Exposition von jeweils fünf CD-Ratten gegen unterschiedliche Konzentrationen von ET. Die Messungen wurde gemäß der in 2.5.1 gegebenen Beschreibung durchgeführt.

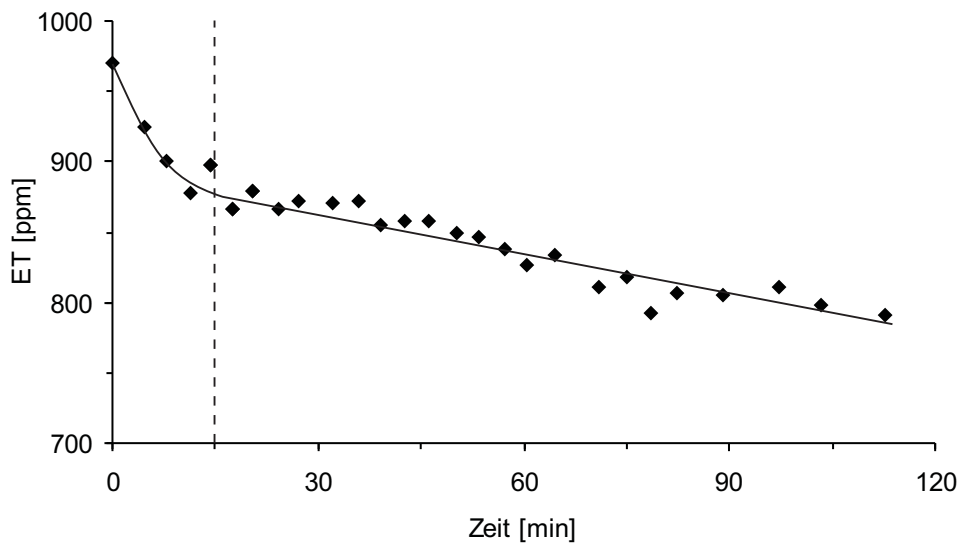


Abbildung 3.28 Konzentrations-Zeit-Verlauf von ET in der Gasphase eines geschlossenen Expositionssystems (Volumen ca. 6,3 l) bei knapp zweistündiger Exposition von fünf CD-Ratten gegen ET (Anfangskonzentration 970 ppm). Symbole: Messwerte; gestrichelte Linie: Ende der Verteilungsphase; durchgezogene Linie: optische Anpassung. Jeder Punkt stellt das Ergebnis einer Messung dar. Die Messungen wurden gemäß der in 2.5.1 gegebenen Beschreibung durchgeführt.

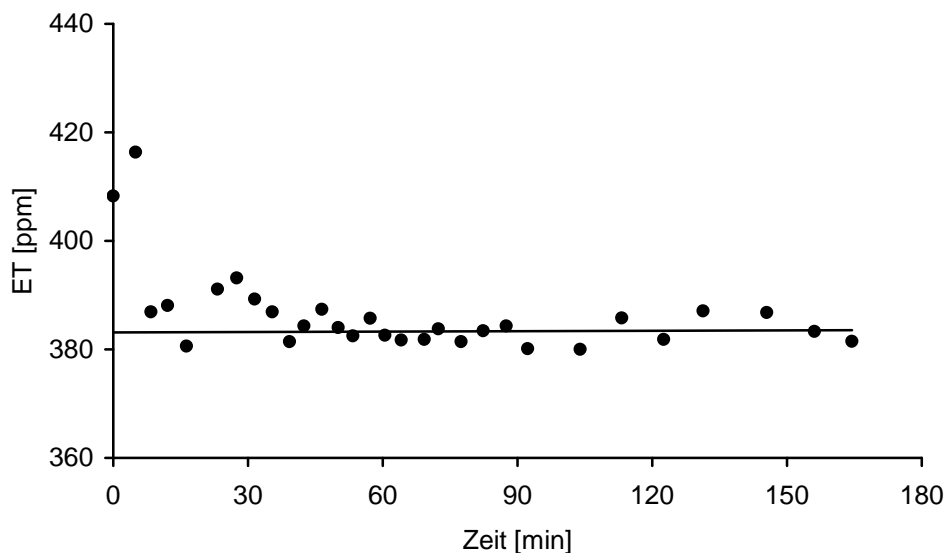


Abbildung 3.29 Konzentrations-Zeit-Verlauf von ET in der Gasphase eines geschlossenen Expositionssystems (Volumen ca. 6,3 l) bei Exposition von fünf CD-Ratten gegen ET (Anfangskonzentration ca. 420 ppm) nach Vorbehandlung mit Dithiocarb. Der initiale Konzentrationsabfall ist bedingt durch Anreicherung im Organismus (siehe oben). Symbole: Messwerte. Linie: berechnete Regressionsgerade zwischen 39 und 164 min (nach Abschluss der Verteilungsphase). Die Messungen wurden gemäß der Beschreibung in 2.5.1 durchgeführt.

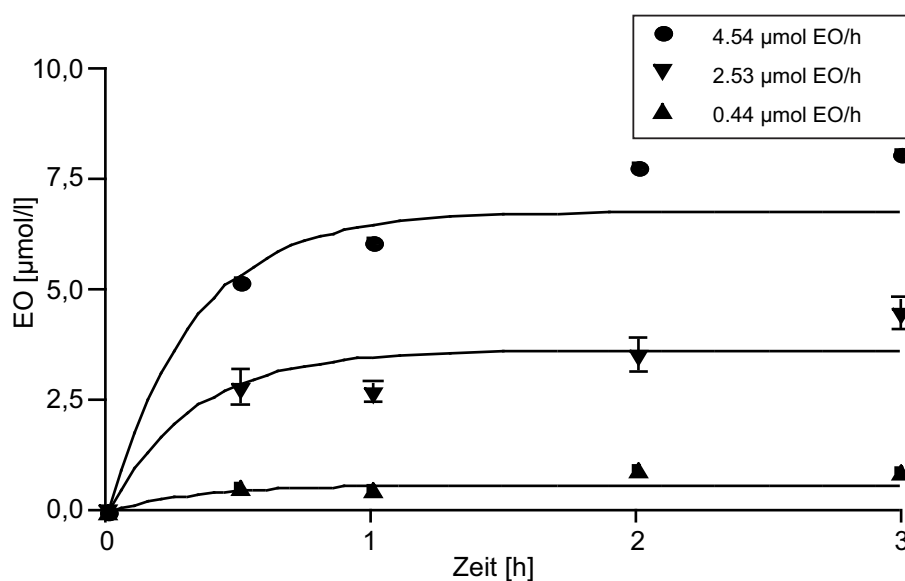


Abbildung 3.30 Konzentrations-Zeit-Verläufe von EO im Blut von F344-Ratten bei Infusionen von EO-Lösungen unterschiedlicher Konzentrationen (0,44, 2,53, 4,54 $\mu\text{mol/ml}$) in physiologischer Kochsalzlösung (pH 6,5) mit konstantem Infusionsfluss (1 ml/h). Jedes Symbol entspricht einem Messwert (untere und obere Kurve) bzw. drei Messwerten (mittlere Kurve, Mittelwert $\pm\text{SD}$). Der Nullwert wurde an 5 Kontrolltieren ermittelt. Die Linien wurden durch Anpassungen von Gl. 2.8 (Seite 41) erhalten. Daraus ergab sich der Wert für die Geschwindigkeitskonstante der gesamten EO-Elimination k_{el} . Die Messungen wurden gemäß der Beschreibung in 2.5.2.2 durchgeführt.

3.2.2 Ethylenoxid im Blut und S-(2-hydroxyethyl)glutathion in der Leber nach Exposition gegen Ethylenoxid

3.2.2.1 Ethylenoxid im Blut

Männlichen F344-Ratten wurden drei Stunden lang Lösungen von EO in physiologischer Kochsalzlösung infundiert (siehe 2.4.3.2). Durch die gewählten Infusionsbedingungen wurden ähnliche EO-Blutkonzentrationen erreicht, wie sie auch bei ET-Expositionen gemessen wurden (vgl. 3.2.3.2).

Die EO-Konzentrationen in den Infusionslösungen betragen 0,44, 2,53 und 4,54 $\mu\text{mol/ml}$, die Infusionsgeschwindigkeit 1 ml/h. Während der Expositionen wurden nach 30 Minuten, einer Stunde, zwei Stunden und drei Stunden jeweils 0,5 ml Blut entnommen und nach 2.5.2.2 die EO-Konzentration im Blut mittels GC/MSD bestimmt. Wie aus Abb. 3.30 ersichtlich, wurde bei allen untersuchten EO-Infusionsraten schnell ein Plateau der EO-Blutkonzentration erreicht. Über die in Abb. 3.30 gezeigten Anpassungen wurde, wie in Kapitel 2.5.6 beschrieben, die Geschwindigkeitskonstante der EO-Elimination $k_{\text{el}} = 3,11 \pm 0,096 \text{ h}^{-1}$ errechnet.

Die beobachteten Konzentrationsplateaus von EO im Blut waren jeweils proportional zur Infusionsrate (Abb. 3.31 A), so dass sich hieraus eine lineare Kinetik, eine konstante Clearance der Elimination und somit kein Hinweis auf eine Induktion der

EO-metabolisierenden Enzyme ergab.

3.2.2.2 S-(2-hydroxyethyl)glutathion in den Lebern

Nach Ende der dreistündigen EO-Expositionen wurden von den exponierten Tiere und von 5 unbehandelten Kontrollratten die Lebern zur GS-EO-Bestimmung entnommen (vgl. 2.5.4). Die EO-Belastung der Leber (gemessen als GS-EO) verhielt sich gleichsinnig wie die EO-Konzentration im Blut (Abb. 3.31). Es wurde nämlich ebenfalls eine lineare Korrelation zwischen der EO-Expositionskonzentration und dem GS-EO Gehalt gefunden (Abb. 3.31 B). Bei den Kontrolltieren war kein GS-EO nachweisbar.

3.2.3 Ethylenoxid- und S-(2-hydroxyethyl)glutathionbildung bei Exposition gegen Ethylen

3.2.3.1 Abatmung von Ethylenoxid

Es wurden jeweils fünf CD- bzw. zwei F344-Ratten etwa 6 Stunden lang in einem geschlossenen Expositionssystem gegen konstante Konzentrationen von ET exponiert (vgl. 2.4.1). Die ET-Konzentration wurde während der gesamten Expositionsdauer mittels GC/FID kontrolliert und gegebenenfalls ET nachdosiert. Abb. 3.32 zeigt die während der Expositionen gegen ET beobachteten Konzentrations-Zeit-Verläufe von EO. Das EO entstand allein durch den Metabolismus von ET; dies wurde dadurch gezeigt, dass kein EO in der Atmosphäre nachgewiesen werden konnte, wenn in einen mit Ratten besetzten Exsikkator kein ET vorhanden war.

Bei Betrachtung der Konzentrations-Zeit-Verläufe von abgeatmetem EO (Abb. 3.32) fällt auf, dass die Kurven bei hohen ET-Konzentrationen anders verlaufen als bei niedrigen. ET-Expositionskonzentrationen von ≤ 130 ppm führten zu kontinuierlichem Ansteigen der EO-Konzentrationen bis zu Plateaus, die nach etwa 100 min erreicht sind. Die maximale Plateaukonzentration von etwa 0,4 ppm EO wird bei einer ET-Expositionskonzentration von 130 ppm ET erreicht (beide Tierstämme). Bei Exposition gegen ET-Konzentrationen von ≥ 300 ppm sind die Konzentrations-Zeit-Verläufe von EO sehr ähnlich. Es ist zunächst ein steiler Anstieg der EO-Konzentration zu beobachten, die nach ungefähr 45 Minuten (CD-Ratten) bis 90 Minuten (F344-Ratten) ein Maximum erreicht. Danach kommt es bei beiden Rattenstämmen zu einem relativ schnellen Abfall der EO-Konzentration, die sich nach 120–150 Minuten einem Wert von 0,4–0,5 ppm annähert. Die EO-Konzentrationen am Maximum betragen ca. 1 ppm bei CD- und F344-Ratten. Die bei beiden Rattenstämmen unterschiedliche Dauer bis zum Erreichen der Maximalkonzentration (t_{\max}) ist auf die unterschiedliche Anzahl der exponierten Tiere und die unterschiedlichen Volumina der Gasräume zurückzu-

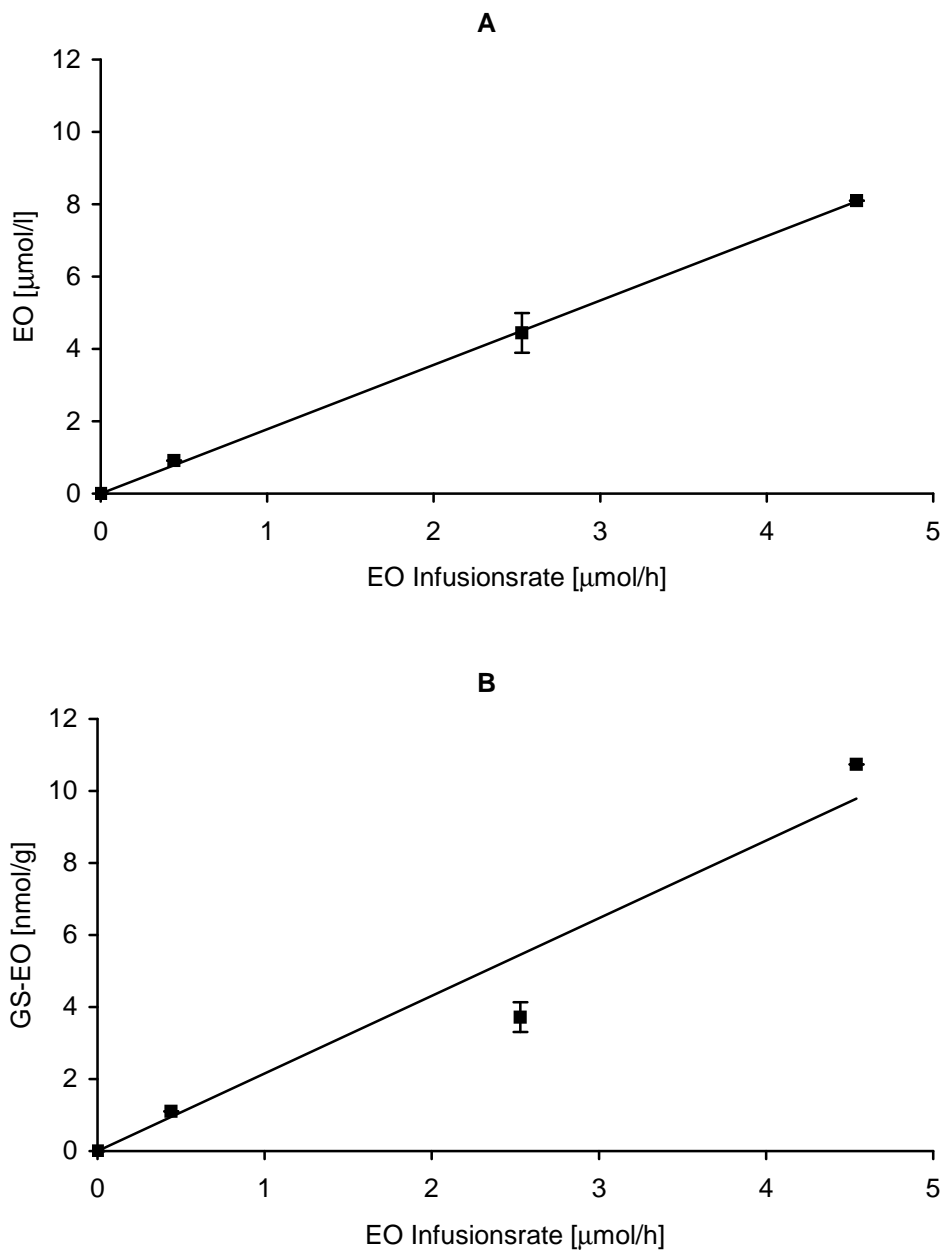


Abbildung 3.31 EO-Konzentrationen im Blut von F344-Ratten (**A**) am Ende 3-stündiger Infusionen von EO-haltigen Kochsalzlösungen und resultierende GS-EO-Gehalte in den Lebern dieser Tiere (**B**) in Abhängigkeit von der EO-Infusionsgeschwindigkeit. Die Messungen bei den Infusionsgeschwindigkeiten von 0,44 und 4,54 $\mu\text{mol/h}$ wurden an jeweils einem Tier und die bei der EO-Infusionsgeschwindigkeit von 2,53 $\mu\text{mol/h}$ an drei Tieren vorgenommen. Der Nullwert wurde an 5 Kontrolltieren ermittelt. Die Balken stellen die Standardabweichungen dar. Die Geraden wurden durch lineare Regression durch den Ursprung erhalten. Die Geradengleichungen lauten: **A** $y = 1,8x$, $r^2 = 0,999$, **B** $y = 2,2x$, $r^2 = 0,94$. Die Messungen wurden gemäß den Beschreibungen in 2.5.2.2 (A) bzw. 2.5.4 (B) vorgenommen.

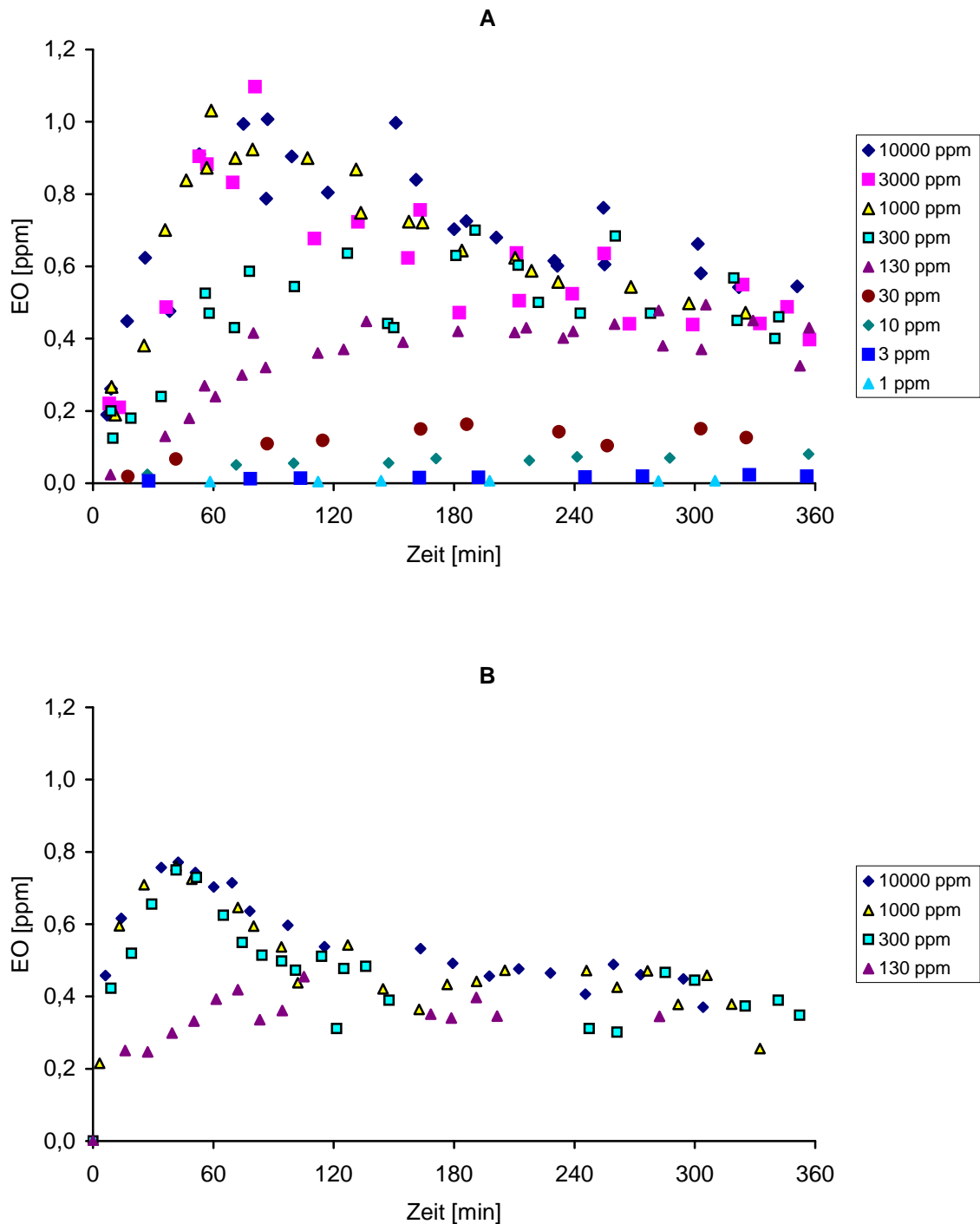


Abbildung 3.32 Konzentrations-Zeit-Verläufe von EO in der Gasphase geschlossener Expositionskammern (Volumen ca. 6,3 l) bei der Exposition von **A** jeweils zwei F344-Ratten, exponiert gegen konstante ET-Konzentrationen zwischen 1 und 10 000 ppm, bzw. von **B** jeweils fünf CD-Ratten, exponiert gegen konstante ET-Konzentrationen zwischen 130 und 10 000 ppm. Jede Farbe symbolisiert ein einziges Expositionsexperiment; jeder Punkt stellt das Ergebnis einer Messung dar. Die Messungen wurden gemäß der Beschreibung in 2.5.1 durchgeführt.

Tabelle 3.10 Mittlere ET-Konzentrationen in der Atmosphäre während der Expositionen von F344-Ratten ($n=3$ für jede Konzentration, über die Zeit gemittelt) gegen ET in der Expositionskugel gemäß der Beschreibung in 2.4.1.2.

ET-Sollkonzentration [ppm]	gemessene ET-Konzentration [ppm] (MW \pm SD)
30	30,3 \pm 1,5
130	129 \pm 8,4
300	297 \pm 18
1000	998 \pm 41

Tabelle 3.11 Vergleich der Fließgleichgewichts-Konzentrationen von EO im Blut von F344- und CD-Ratten nach 6-stündiger Exposition gegen ET; MW \pm SD (aus mindestens drei Messwerten)

ET [ppm]	EO im Blut [μ mol/l]	
	CD-Ratten	F344-Ratten
30	0,28 \pm 0,05	0,29
130	n.b.	0,56 \pm 0,07
300	0,77 \pm 0,11	1,08 \pm 0,07
1000	0,69	1,10 \pm 0,07

n.b. = nicht bestimmt

führen. Bei ET-Konzentrationen von ≥ 1000 ppm unterscheiden sich die Konzentrations-Zeit-Verläufe von EO kaum.

3.2.3.2 Ethylenoxid im Blut

Es wurden männliche CD- und F344-Ratten gegen konstante Konzentrationen von ET über unterschiedlich lange Zeiträume exponiert (gemäß 2.4.1). Während jeder Exposition wurde die ET-Konzentration in der Atmosphäre des Expositionssystems in regelmäßigen Abständen kontrolliert und, wenn nötig, ET nachdosiert (siehe Tab. 3.10 und Abb. 3.33).

Die Expositionskonzentrationen von ET betragen 30, 130 (nur F344-Ratten), 300 und 1000 ppm, die Expositionszeiten 10, 30, 60, 180 und 360 Minuten. Am Ende der Expositionen wurde mit der in 2.5.2.2 beschriebenen neu entwickelten GC/MSD-Methode die Konzentration von EO im Blut der Tiere bestimmt.

Bei gegen ET exponierten F344-Ratten war bei Exposition gegen 30 ppm ET ein Anstieg der EO-Konzentration bis auf eine Plateaukonzentration von ca. 0,4 μ mol/l zu beobachten, die nach 60 Minuten erreicht wurde. Exponierte man F344-Ratten gegen 130 ppm ET kam es ebenfalls zu einem raschen Anstieg der EO-Konzentration auf ca. 0,7 μ mol/l Blut nach spätestens 180 Minuten. Bei der Exposition gegen 300 ppm ET stieg die EO-Konzentration im Blut der F344-Ratten zunächst an und erreichte nach 30 Minuten einen maximalen Wert von 1,97 μ mol/l. Anschließend folgte ein Abfall der

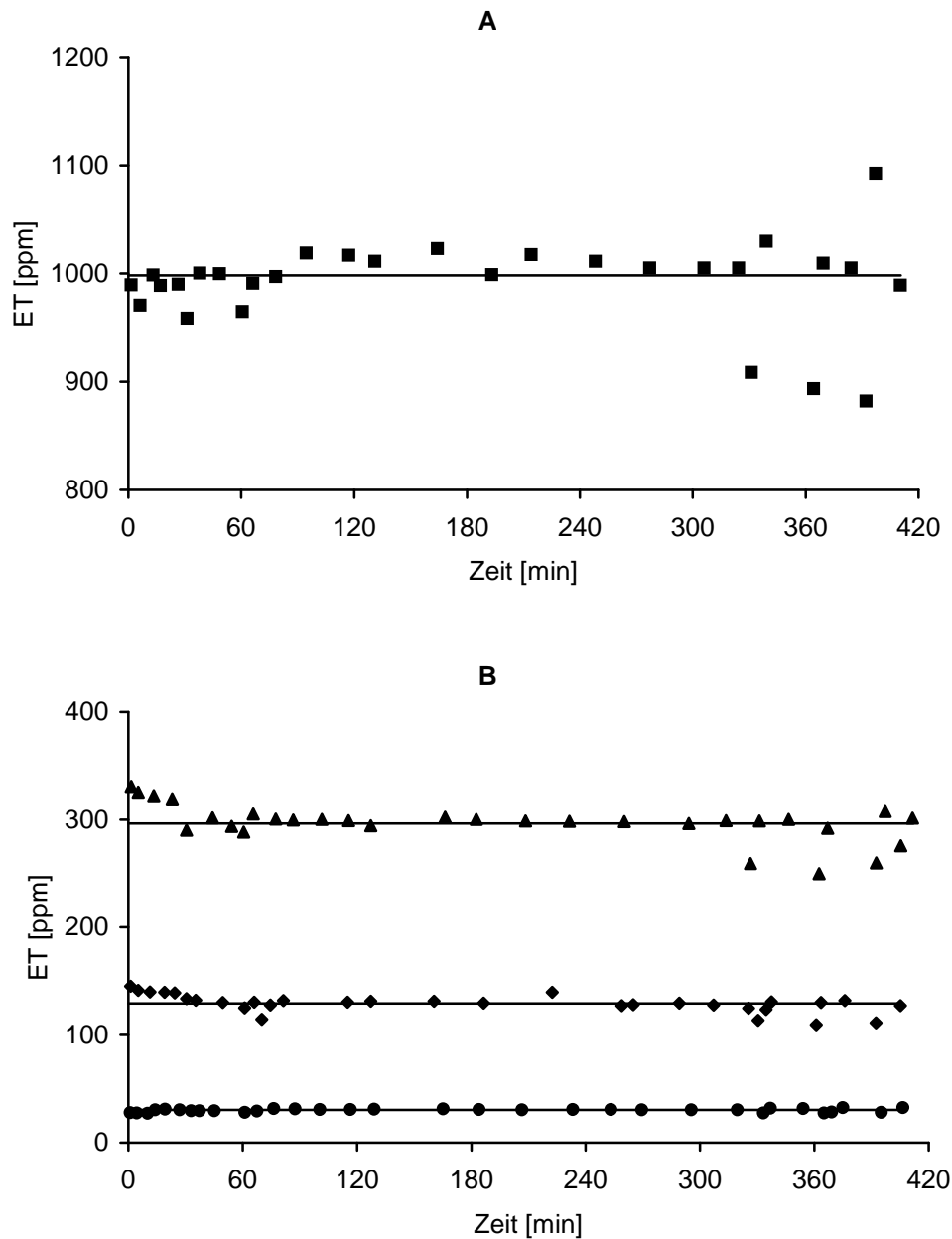


Abbildung 3.33 **A** Konzentration von ET in der Expositions-kammer während der Exposition von 3 F344-Ratten gegen 1000 ppm ET (mittlere ET-Konzentration 998 ppm). **B** Konzentration von ET in der Expositions-kammer während der Exposition von 3 F344-Ratten gegen 30 ppm (Symbol Kreis, mittlere ET-Konzentration 30,3 ppm), 130 ppm (Symbol Raute, mittlere ET-Konzentration 129 ppm) und 300 ppm ET (Symbol Dreieck, mittlere ET-Konzentration 297 ppm). Die Schwankungen ab ca. 330 min sind auf das Öffnen der Kugel zur Entnahme einzelner Ratten zurückzuführen. Symbole: Messwerte; Linie: mittlere ET-Konzentrationen (über die Zeit gemittelt).

EO-Konzentration auf ca. 1,1 $\mu\text{mol/l}$ Blut nach 6-stündiger Exposition. Bei Exposition von F344-Ratten gegen 1000 ppm ET wurde das Maximum der EO-Konzentration von 2,38 $\mu\text{mol/l}$ EO nach 60 Minuten erreicht. Die Konzentration fiel anschließend ab und erreichte nach 6 Stunden einen Wert von 1,1 $\mu\text{mol/l}$ (Abb. 3.34 A).

Bei CD-Ratten zeigten sich vergleichbare Konzentrations-Zeit-Verläufe im Blut: bei einer Expositionskonzentration von 30 ppm ET stieg die EO-Konzentration im Blut bis zu einer Plateaukonzentration von ungefähr 0,3 $\mu\text{mol/l}$ an. Bei Exposition gegen 300 ppm ET wurde ein Anstieg der EO-Konzentration im Blut bis auf 1,31 $\mu\text{mol/l}$ nach 60 Minuten beobachtet. Danach erfolgte ein Abfall der EO-Konzentration auf 0,8 $\mu\text{mol/l}$ nach 180 Minuten. Bei einer ET-Konzentration von 1000 ppm zeigte sich zunächst ein rascher Konzentrationsanstieg von EO im Blut. Nach 30 Minuten war die maximale Blutkonzentration von 1,98 $\mu\text{mol/l}$ erreicht. Es folgte ein steiler Abfall der Konzentration auf 0,63 $\mu\text{mol/l}$ nach 60 Minuten. Danach erfolgte ein geringfügiger Anstieg der EO-Konzentration auf 0,7 $\mu\text{mol/l}$ (Abb. 3.34 B).

Es stellte sich die Frage, ob das metabolisch gebildete EO, das in der geschlossenen Expositionsapparatur nach Abatmung wieder eingeatmet werden konnte, zu einer Erhöhung der EO-Konzentration im Blut führte. Nach Filser *et al.* (2007) sollte dieser Effekt vernachlässigbar sein, da der Verteilungskoeffizient von EO zwischen Blut und Luft einen Wert von über 50 hat. Um die Richtigkeit dieser Behauptung zu überprüfen, wurde in drei Experimenten jeweils eine F344-Ratte im dynamischen Expositionssystem 6 Stunden lang gegen 1000 ppm ET exponiert, unmittelbar anschließend die EO-Konzentration im Blut bestimmt und mit den EO-Blutkonzentrationen von im geschlossenen System exponierten Tieren verglichen (vgl. 2.4.2). Die Ergebnisse zeigen sehr ähnliche Blutkonzentrationen von EO. Bei Exposition gegen jeweils 1000 ppm ET fanden sich EO-Konzentrationen im Blut von $1,10 \pm 0,07 \mu\text{mol/l}$ im geschlossenen System und $1,19 \pm 0,05 \mu\text{mol/l}$ im dynamischen System (jeweils $n=3$).

Generell ähneln bei Exposition gegen ET sowohl bei CD- als auch bei F344-Ratten die Konzentrations-Zeit-Verläufe von EO im Blut denen von EO in der Ausatemluft (vgl. Abb. 3.32 und Abb. 3.34, s. auch Abb. 3.35). Beim quantitativen Vergleich der Gleichgewichtskonzentration von EO im Blut von CD- und F344-Ratten zeigten sich ähnliche Werte für ET-Konzentrationen von 30, 300 und 1000 ppm in beiden Tierstämmen (siehe Tab. 3.11). Bei Auftragung der Plateaukonzentrationen von EO im Blut gegen die entsprechenden in der Luft (Abb. 3.35) ergibt sich für die Steigung der errechneten Regressionsgerade ein Wert von 55,52, der sehr nahe am *in vitro* gemessenen Blut-zu-Luft-Verteilungskoeffizienten von 61 liegt (Csanády *et al.*, 2000). Dies bedeutet, dass bei den Plateaukonzentrationen das Verteilungsgleichgewicht zwischen EO im Blut und EO in der Atemluft der ET-exponierten Tiere erreicht war.

Mit dem ermittelten Faktor von 55,52 wurde aus den gemessenen Plateaukonzentrationen von EO in der Ausatemluft die EO-Belastung im Blut berechnet. Zur Ermittlung der Plateaukonzentrationen von EO in der Ausatemluft wurden das zeitlich ge-

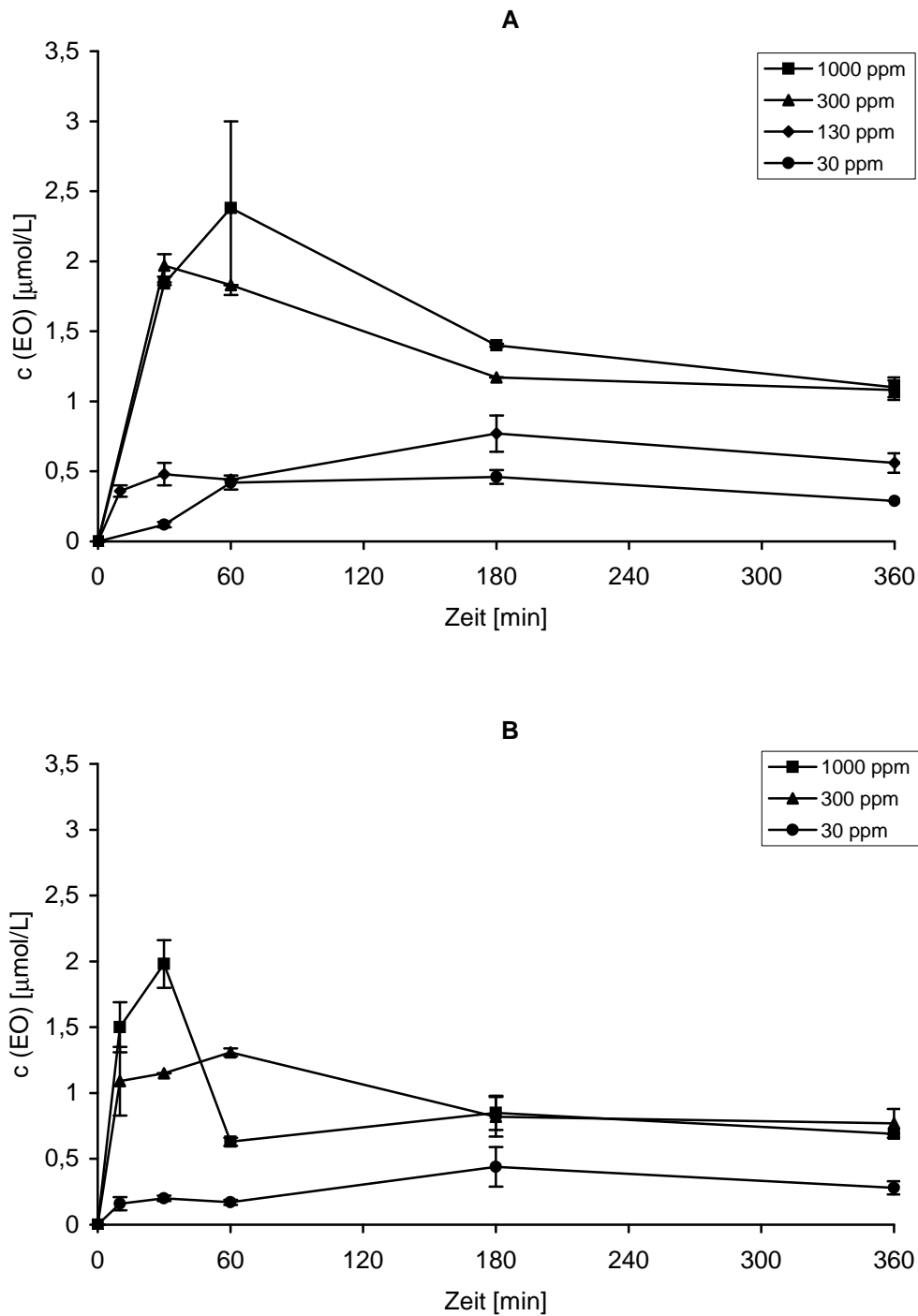


Abbildung 3.34 Konzentrations-Zeit-Verläufe von EO im Blut. **A** Exposition von F344-Ratten gegen ET (n=2 für 30 ppm ET, Zeitpunkt 360 min, 130 ppm ET, Zeitpunkt 60 min, 300 ppm ET, Zeitpunkt 60 min; n=1 für 300 ppm ET, Zeitpunkt 180 min; für alle anderen Zeitpunkte n=3), **B** Exposition von CD-Ratten gegen ET (n=1 für 1000 ppm ET, Zeitpunkt 360 min; n=2 für 300 ppm ET, Zeitpunkt 30 min; n \geq 3 für alle anderen Zeitpunkte). Symbole: Mittelwert \pm SD (falls mindestens drei Messwerte). Alle Messwerte finden sich im Anhang (Tab. A.1 (Seite 97) und Tab. A.2 (Seite 98)). Linien: direkte Verbindungen der Mittelwerte.

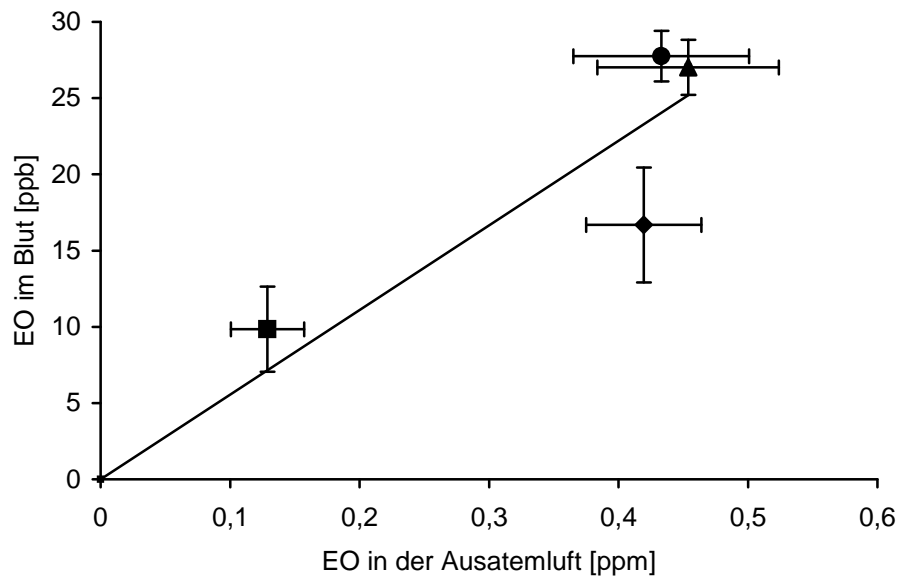


Abbildung 3.35 Auftragung der Plateaukonzentration von EO im Blut gegen die Plateaukonzentration in der Ausatemluft von gegen ET exponierten Ratten (vgl. Abb. 3.32 und Abb. 3.34). Symbole: Quadrat: 30 ppm, Raute: 130 ppm, Dreieck: 300 ppm, Kreis: 1000 ppm, jeweils Mittelwert \pm SD. Die Geradengleichung lautet $y = 55,52 x$; $r^2 = 0,8772$.

wichtete Mittel (für F344-Ratten ab ca. 140–180 min, für CD-Ratten ab ca. 120 min bis Expositionsende) der EO-Konzentrationen berechnet (vgl. Abb. 3.32). Die so ermittelte Konzentration wurde nach der Umrechnung in die Konzentrationseinheit nmol/l mit dem Faktor von 55,52 multipliziert. Die so ermittelte EO-Belastung im Plateau strebt mit zunehmender ET-Expositionskonzentration gegen einen Maximalwert (vgl. Abb. 3.36). Dieses Bild ist mit der Sättigungskinetik von ET in Übereinstimmung.

3.2.3.3 S-(2-hydroxyethyl)glutathion in den Lebern

Nach Expositionen gegen ET wurden die Lebern der exponierten CD- bzw. F344-Ratten und der Kontrolltiere entnommen (gemäß 2.4.1). Ein Leberstück wurde zur Quantifizierung des gebildeten GS-EO verwendet (vgl. 2.5.4), der übrige Teil zur Herstellung von Mikrosomen und anschließender Bestimmung der CYP2E1-Aktivität (vgl. 2.5.3). Die Konzentration von GS-EO in der Rattenleber in Abhängigkeit von ET-Konzentration und Expositionsdauer ist in Abb. 3.37 dargestellt. Auffallend ist die Ähnlichkeit der Konzentrations-Zeit-Verläufe von GS-EO in der Leber zu denen von EO in Blut und Ausatemluft nach Exposition gegen ET (vgl. Abb. 3.32 und Abb. 3.34).

Ein Kurvenverlauf mit Anstreben eines Plateaus, jedoch ohne anfängliches Maximum, war für beide Rattenstämme bei Exposition gegen 30 und 130 ppm (nur F344-Ratten) ET zu beobachten. Bei Exposition gegen 30 ppm ET lag die Plateaukonzentration von GS-EO bei CD-Ratten zwischen 0,3 und 0,5 nmol/g Leber und bei F344-Ratten bei ca. 0,5 nmol/g Leber. Eine GS-EO-Plateaukonzentration von ca. 1,6 nmol/g

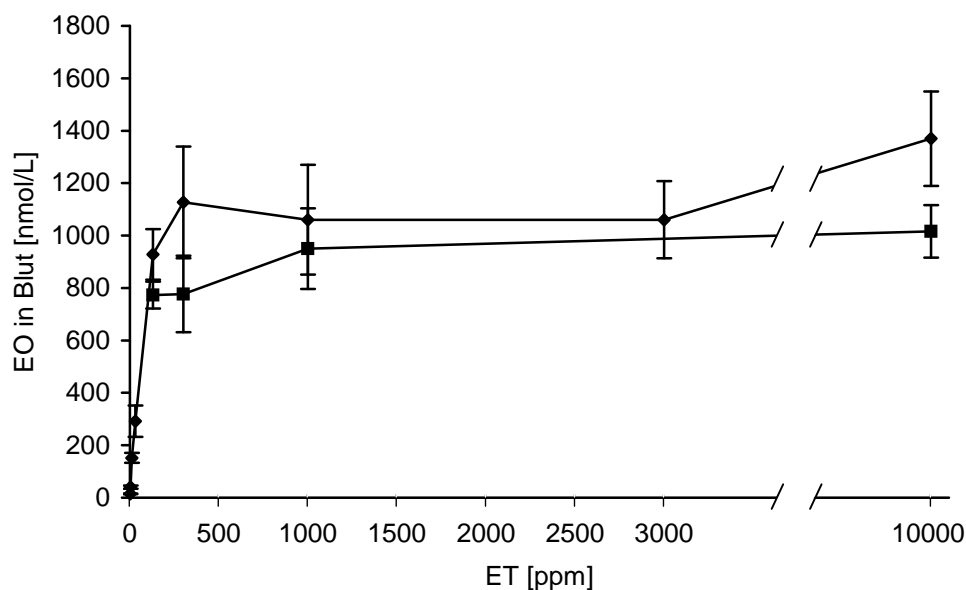


Abbildung 3.36 Auftragung der Expositionskonzentrationen von ET gegen die berechneten Plateaukonzentrationen von EO im Blut (vgl. Abb. 3.32). Symbole: Quadrat: CD-Ratten, Raute: F344-Ratten.

Leber stellte sich bei Exposition von F344-Ratten gegen 130 ppm ET ein. Bei einer ET-Konzentration von 300 ppm wurde nach ca. 30 Minuten ein Maximum der Addukt-konzentration von 2,02 nmol/g (F344-Ratten) erreicht; die Konzentration fiel dann auf eine Plateaukonzentration ab. Bei Exposition von CD-Ratten gegen 300 ppm ET ist im Konzentrations-Zeit-Verlauf des GSH-Addukts kein Maximum zu erkennen (vgl. Abb. 3.37 B). Bei Exposition gegen 1000 ppm wurde bei beiden Rattenstämmen das Auftreten eines anfänglichen Konzentrationsmaximums nach 30 bis 60 Minuten und ein anschließender Konzentrationsabfall beobachtet. Insgesamt sind bezüglich des GSH-Addukts quantitative Unterschiede zwischen den Rattenstämmen zu beobachten, was auf eine niedrigere GST-Aktivität oder eine schnellere Elimination des GS-EO bei CD-Ratten im Vergleich zu F344-Ratten hindeutet.

3.2.4 Aktivität von Cytochrom P450 2E1 nach Exposition gegen Ethylen

Nach der Exposition von Ratten gegen ET im geschlossenen Expositionssystem wurden die Lebern der Tiere entnommen (vgl. 2.4.1). Aus jeweils einem Teil jeder Leber wurden Mikrosomen hergestellt und in Anlehnung an Walsky und Obach (2004) die Aktivität von CYP2E1 durch enzymatische Umsetzung von CZZ zu 6-OH-CZZ bestimmt (vgl. 2.5.3).

Ogleich bei der Enzymaktivität der nicht exponierten Kontrolltiere eine starke Streuung der Werte zu beobachten war, kann nach Exposition gegen 1000 ppm ET sowohl in F344- als auch in CD-Ratten eine Inhibition der hepatischen mikrosomalen CYP2E1-Aktivität festgestellt werden. Nach einer Expositionsdauer von 6 Stunden

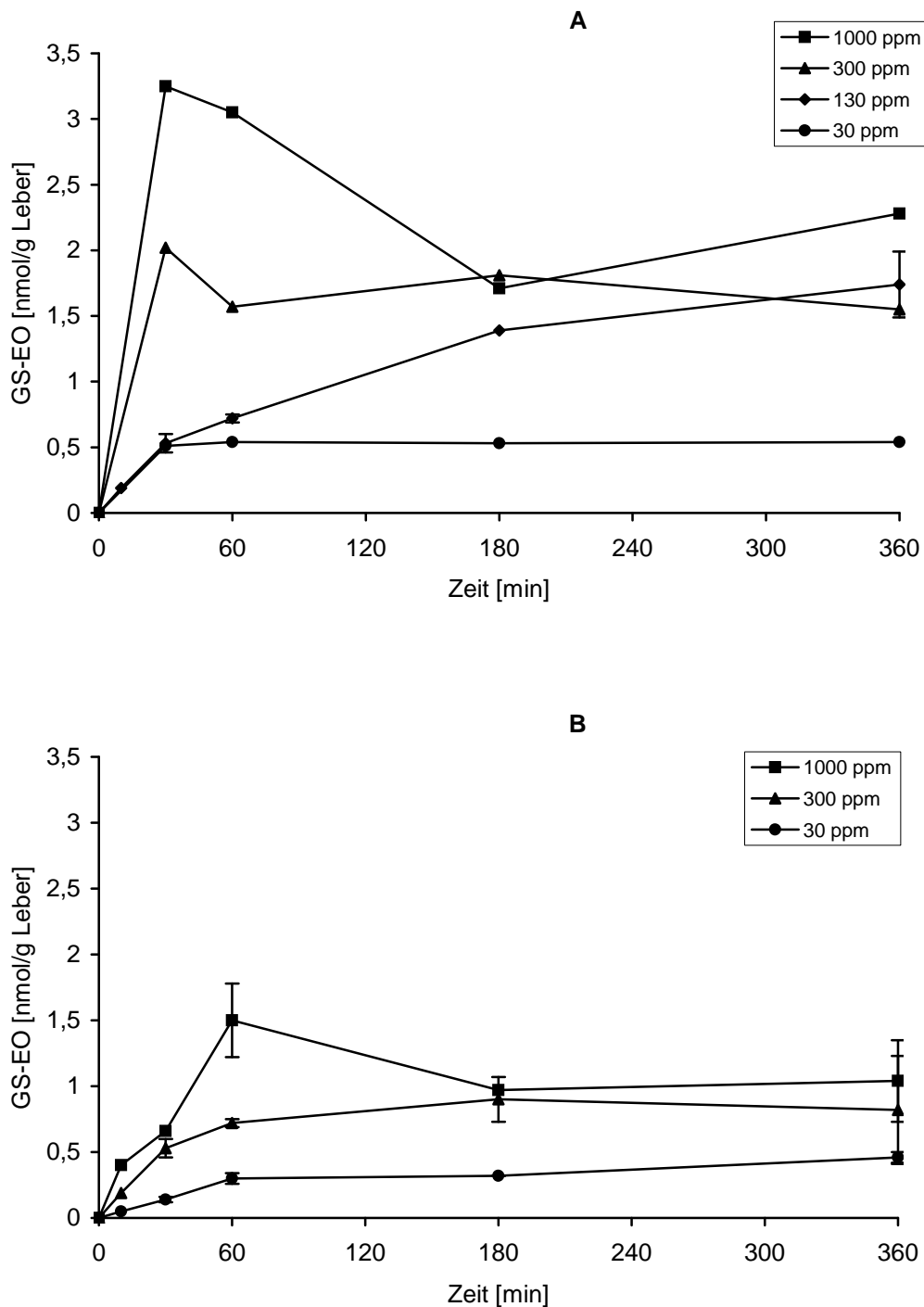


Abbildung 3.37 Konzentrations-Zeit-Verläufe von GS-EO in Rattenlebern während Expositionen von Ratten gegen ET. **A** F344-Ratten (n=3 für 130 ppm ET, Zeitpunkte 30, 60 und 360 min, für alle anderen Zeitpunkte n=1). **B** CD-Ratten (n=3 für 30 ppm ET, Zeitpunkte 60 und 360 min, 300 ppm ET, Zeitpunkte 30, 60, 180 und 360 min, 1000 ppm ET, Zeitpunkte 60 und 360 min; n=2 für 30 ppm ET, Zeitpunkte 30 und 180 min, 1000 ppm ET, Zeitpunkt 30 min; n=1 für 30 ppm ET, Zeitpunkt 10 min, 300 ppm ET, Zeitpunkt 10 min, 1000 ppm ET, Zeitpunkte 10 und 180 min). Symbole: Mittelwert \pm SD (SD wurde ab einer Anzahl von drei Messwerten berechnet). Alle Messwerte finden sich im Anhang (Tab. A.3 (Seite 98) und Tab. A.4 (Seite 99)). Linien: direkte Verbindungen der Mittelwerte.

fand sich ein Abfall der Aktivität von CYP2E1 auf ca. 30 bis 40 % der initialen Werte (beide Rattenstämme). Nach Exposition gegen eine ET-Konzentration von 30 ppm (CD-Ratten) wurde keine Änderung der Enzymaktivität beobachtet. Bei 130 (F344-Ratten) bzw. 300 ppm (CD und F344) kann allenfalls ein Trend zur Abnahme der Enzymaktivität vermutet werden. Vor Expositionsbeginn wurde zum Zeitpunkt 0 bei CD-Ratten ($1,95 \pm 0,27$ nmol/min/mg Protein) im Mittel eine höhere CYP2E1-Aktivität als bei F344-Ratten ($0,85 \pm 0,20$ nmol/min/mg Protein) gemessen (vgl. Tab. 3.12 und Tab. 3.13).

Tabelle 3.12 Enzymaktivität von Cytochrom P450 2E1 nach Exposition von CD-Ratten gegen ET (MW \pm SD, n = Anzahl der Tiere). Die Messungen wurden gemäß der Beschreibung in 2.5.3 durchgeführt.

ET-Konz. [ppm]	Exp.dauer [min]	Enzymaktivität [nmol/mg/min]	Enzymaktivität; Vgl. zu Kontrollen [%]	n
30	0	1,67 \pm 0,43	100	3
	10	2,15 \pm 0,35	129	3
	30	1,75 \pm 0,25	105	3
	60	1,38 \pm 0,25	83	4
	180	1,46 \pm 0,41	87	4
	360	2,20 \pm 0,62	132	3
300	0	1,98 \pm 0,50	100	3
	30	1,78 \pm 0,61	90	2
	60	1,89 \pm 0,12	95	3
	180	1,47 \pm 0,93	91	3
	360	1,16 \pm 0,11	80	3
1000	0	2,21 \pm 0,85	100	3
	10	2,55 \pm 0,66	115	3
	30	2,50 \pm 0,89	113	3
	60	2,01 \pm 0,27	91	3
	180	0,39 \pm 0,13	33	3
	360	0,26 \pm 0,21	40	3

Tabelle 3.13 Enzymaktivität von Cytochrom P450 2E1 nach Exposition von F344-Ratten gegen ET (MW \pm SD, n = Anzahl der Tiere). Die Messungen wurden gemäß der Beschreibung in 2.5.3 durchgeführt.

ET-Konz. [ppm]	Exp.dauer [min]	Enzymaktivität [nmol/mg/min]	Enzymaktivität; Vgl. zu Kontrollen [%]	n
130	0	0,63 \pm 0,01	100	3
	10	0,47 \pm 0,20	74	3
	30	0,50 \pm 0,17	79	3
	60	0,50 \pm 0,01	79	2
	180	0,43 \pm 0,00	69	2
	360	0,28 \pm 0,08	44	4
300	0	0,89 \pm 0,36	100	3
	30	0,77 \pm 0,48	87	2
	360	0,51 \pm 0,26	57	3
1000	0	1,02 \pm 0,40	100	3
	30	1,50 \pm 0,09	147	2
	360	0,29 \pm 0,05	28	3

4 Diskussion

4.1 Analytische Methoden

4.1.1 Bestimmung von Ethylenoxid im Blut mittels GC/MSD

In der Literatur finden sich nur wenige Methoden mit direkter Quantifizierung von EO im Blut. Brugnone *et al.* (1986) beschreiben eine auf GC/FID basierende Methode zur Bestimmung von EO in menschlichem Blut. Sie untersuchten Blut von EO-exponierten Arbeitern eines Sterilisationsbetriebes und verwendeten zur Quantifizierung von EO eine Headspace-Methode. Nach Inkubation der Blutprobe wurde 1 ml der Gasphase in einen GC/FID injiziert. Die gemessenen EO-Konzentrationen lagen zwischen 4,0 und 103,7 $\mu\text{g}/\text{l}$ (entspricht 0,1 bis 2,36 $\mu\text{mol}/\text{l}$), die Nachweisgrenze betrug 0,05 $\mu\text{g}/\text{l}$.

Ebenfalls auf GC/FID und Headspace-Analyse beruht eine von Brown *et al.* (1996) beschriebene Methode zur EO-Bestimmung. Die Autoren exponierten Mäuse und Ratten 4 Stunden lang gegen 100 ppm bzw. 330 ppm EO und quantifizierten EO im Blut der Tiere. Die detektierten Konzentrationen lagen zwischen 0,3 und 3,9 μg EO pro g Blut (6,8 bis 88,6 $\mu\text{mol}/\text{l}$). Diese Methode wurde auch in einer Publikation von Fennell *et al.* (2004) angewandt, die während der Entstehung der vorliegenden Doktorarbeit veröffentlicht wurde; sie befasst sich ebenfalls mit der EO-Bildung bei ET-exponierten Ratten. Die niedrigsten von den Autoren quantifizierten EO-Blutkonzentrationen lagen bei 0,02 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (0,45 $\mu\text{mol}/\text{l}$) im Blut von gegen ET exponierten Ratten quantifizierten.

In zwei Veröffentlichungen wird die Quantifizierung von EO im Blut mittels GC/MSD-Messung beschrieben. Maples und Dahl (1993) exponierten Ratten gegen 600 ppm ET bzw. 5 ppm EO und bestimmten am Ende der Exposition die Konzentration von EO im Blut. Dazu unterzogen sie die entnommenen Blutproben zunächst einer mehrstufigen Gefrierdestillation, um die flüchtigen Komponenten abzutrennen. Nach Erwärmen der flüchtigen Phase auf Raumtemperatur wurde die dann gasförmige Probe direkt in das GC/MSD injiziert. Die niedrigste quantifizierte EO-Konzentration lag bei 0,04 $\mu\text{g}/\text{g}$ Blut (0,9 $\mu\text{mol}/\text{l}$; Maples und Dahl, 1993). Auch Brown *et al.* (1998) nutzten die Detektion mittels MSD zur Quantifizierung von EO nach Exposition von Ratten gegen EO. Nach Inkubation der Blutproben wurden 200 μl der Gasphase direkt in den GC/MSD injiziert (Headspace-Methode). Brown *et al.* verwendeten

d_4 -EO als internen Standard und maßen nach Exposition gegen die niedrigste verwendete EO-Konzentration von 50 ppm eine Blutkonzentration von $0,33 \mu\text{g EO/ml}$ Blut (entspricht $7,5 \mu\text{mol/l}$).

Die zitierten Veröffentlichungen beschreiben hauptsächlich die Quantifizierung von EO nach Exposition gegen EO. Nur Maples und Dahl (1993) sowie Fennell *et al.* (2004) führten auch Expositionen von Ratten gegen ET durch, wobei die niedrigste verwendete ET-Konzentration 300 ppm betrug. Da in der vorliegenden Arbeit EO bei sehr viel niedrigeren ET-Expositionskonzentrationen (bis hinab zu 30 ppm) zu bestimmen war, musste eine sehr empfindliche Methode für die EO-Analytik erarbeitet werden. Wegen der im Allgemeinen höheren Selektivität und Sensitivität von GC/MSD im Vergleich zu GC/FID basierte das in dieser Arbeit entwickelte Detektionsverfahren auf GC/MSD.

Bei einer wie beispielsweise von Brown *et al.* (1996) verwendeten Headspace-Methode wird eine Gasprobe aus dem Luftraum eines geschlossenen Probenraums, in dem sich auch die flüssige Phase befindet, analysiert. Mit Hilfe des vorher ermittelten Verteilungskoeffizienten wird dann die Analytkonzentration in der flüssigen Phase berechnet. Aufgrund der bevorzugten Anreicherung von EO in der Blutphase (Verteilungskoeffizient $\lambda_{\text{Blut/Luft}} = 61$; Csanády *et al.*, 2000) und der folglich erwarteten sehr geringen Konzentration von EO in der Gasphase war ein reines Headspace-Verfahren nicht sensitiv genug.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb eine Extraktionsmethode entwickelt. Hier wurde nicht nur EO aus der Gasphase entnommen, sondern auch Luft durch die Flüssigphase gezogen, wodurch auch im Blut gelöstes EO in die Gasphase überführt wurde, das zusammen mit dem vorher in die Probe applizierten internen Standards d_4 -EO in den GC/MSD injiziert wurde. Durch die Verwendung eines stabil markierten internen Standards und dessen Zugabe in das geschlossene Headspacegefäß unmittelbar nach der Blutentnahme wurden Fehler durch nicht vollständige EO-Extraktion oder Hydrolyse von EO ausgeschlossen. Die Glutathion-S-Transferase-Aktivität war durch Zugabe von Diethylmaleat inhibiert, wodurch der GST-vermittelte metabolischen Abbau von EO verhindert wurde. Durch das entwickelte Verfahren konnten auch sehr geringe Konzentrationen von EO bis zu $0,01 \mu\text{mol/l}$ bei Verwendung von ca. 4 ml Blut noch zuverlässig quantifiziert werden.

Die neu entwickelte Methode ist im Gegensatz zu den von Brugnone *et al.* (1986) und Brown *et al.* (1996) entwickelten, auf GC/FID basierenden Methoden spezifisch und durch die Verwendung eines internen Standards genauer. Außerdem ist das Verfahren erheblich schneller und weniger aufwändig als das von Maples und Dahl (1993) entwickelte. Im Vergleich zu den ebenfalls auf GC/MSD beruhenden Methoden von Brown *et al.* (1998) und Maples und Dahl (1993) wird eine um Faktor 10 niedrigere Nachweis- und Bestimmungsgrenze erreicht.

4.1.2 Bestimmung von S-(2-Hydroxyethyl)glutathion in Rattenlebern

In der Literatur ist keine Methode zur quantitativen Bestimmung von GS-EO beschrieben. Es finden sich jedoch Arbeiten zur Quantifizierung von reduziertem (GSH) und oxidiertem Glutathion (GSSG) in biologischen Proben mittels LC-MS/MS (z. B. (Guan *et al.*, 2003; Steghens *et al.*, 2003)). Steghens *et al.* bestimmten GSH bzw. GSSG in Vollblut; Guan *et al.* quantifizierten GSH, Cystein, Homocystein und die Disulfide dieser Substanzen in biologischen Gewebeproben nach Derivatisierung mit Ellmanns Reagenz (5,5'-Dithio-bis-2-nitrobenzoesäure) und verwendeten als internen Standard den Glutathionethylester (GSH-EE).

Aufgrund der erforderlichen hohen Sensitivität und Selektivität wurde zur Bestimmung von GS-EO in Rattenlebern ebenfalls eine auf LC-MS/MS basierende Methode entwickelt. Im Rahmen der Methodenentwicklung wurden zunächst wie in 3.1.5 beschrieben die Einstellungen des Massenspektrometers optimiert. Da GSH eine Amino- und zwei Carboxygruppen aufweist, wurde die Optimierung sowohl im positiven als auch im negativen Modus durchgeführt. Die höhere Sensitivität wurde im positiven Modus erreicht. Als interner Standard wurde in Anlehnung an Guan *et al.* (2003) das strukturanaloge GSH-EE verwendet. Zur eindeutigen Identifizierung der Analyten wurden unter anderem die für GSH-Addukte charakteristische Abspaltung von γ -Glutaminsäure und weitere charakteristische Fragmente verwendet (Baillie und Davis, 1993; Loughlin *et al.*, 2001; Rubino *et al.*, 2006).

Mit der entwickelten Methode könnte zusätzlich noch oxidiertes und reduziertes Glutathion quantifiziert werden, wobei allerdings die Gefahr der Oxidation von GSH zu GSSG während der Probenaufarbeitung bestünde. In den untersuchten Lebern wurden hohe Konzentrationen an GSSG gefunden, was jedoch nicht an Oxidation während der Aufarbeitung lag, sondern eher auf die zum Teil lange Lagerung der Lebern zurückzuführen ist. Um GSH und GSSG zuverlässig zu quantifizieren, wird deshalb empfohlen, frisch präparierte oder nur kurz tiefgefrorene Lebern zu verwenden.

4.1.3 Bestimmung der Aktivität von Cytochrom P450 2E1

Ein ideales Substrat zur Bestimmung von Enzymaktivitäten zeichnet sich dadurch aus, dass es in einem Metabolismusschritt selektiv durch ein einziges Enzym zu einem empfindlich und einfach nachweisbaren Produkt umgesetzt wird. Der Aktivitätstest sollte möglichst einfach und schnell durchzuführen und das Substrat außerdem kommerziell verfügbar sein.

Zur Bestimmung der Aktivität von CYP2E1 werden in der Literatur hauptsächlich folgende Methoden verwendet: Die Demethylierung von *N,N*-Dimethylnitrosamin mit colorimetrischer Bestimmung des gebildeten Formaldehyds (z. B. Yang *et al.*,

1990), die Hydroxylierung von *p*-Nitrophenol mit photometrischer Quantifizierung des Produkts (z. B. Reinke und Moyer, 1985), die Hydroxylierung von Chlorzoxazon (CZZ, z. B. Amato *et al.*, 1998) und die Hydroxylierung von Laurinsäure (Dodecansäure, z. B. Amet *et al.*, 1994). Amato *et al.* (1998) führten Untersuchungen zur Spezifität verschiedener Assays zur CYP2E1-Aktivitätsbestimmung mit Affenlebermikrosomen durch und verglichen die Substrate Anilin, CZZ, *N,N*-Dimethylnitrosamin und *p*-Nitrophenol. Sie kamen zu der Schlussfolgerung, dass *p*-Nitrophenol und CZZ, deren Umsetzung sich durch CYP2E1-Antikörper um 60 bis 80 Prozent hemmen ließ, die geeignetsten Substrate zur Aktivitätsbestimmung von CYP2E1 sind. Auch die Industrie und Zulassungsbehörden kamen im Jahr 2000 darin überein, CZZ als bevorzugtes Substrat zur Aktivitätsbestimmung von CYP2E1 zu verwenden (Tucker *et al.*, 2001). Als akzeptable Substrate benannten sie Laurinsäure und *p*-Nitrophenol.

Ein kritischer Punkt bei der Verwendung von Enzymaktivitätstests ist die Selektivität des verwendeten Assays. Die Hydroxylierung von Laurinsäure beispielsweise geschieht an der ω -Position durch CYP4A und CYP3A und an der ($\omega-1$)-Position vor allem durch CYP2E1 (Clarke *et al.*, 1994). Außer CYP2E1 sind noch weitere Enzyme an dieser Reaktion beteiligt (Funae und Imaoka, 1993; zitiert in Clarke *et al.*, 1994). Inhibitionsstudien mit dem Substrat *p*-Nitrophenol ergaben die Beteiligung von weiteren Cytochrom-P450-Enzymen zusätzlich zu CYP2E1, zum Beispiel CYP2A6 und CYP2C19 (Monostory *et al.*, 2004) sowie Enzymen aus der Gruppe CYP3A (Zerilli *et al.*, 1997). Da nach Behandlung von Mikrosomen mit Phenobarbital, einem starken Induktor für CYP3A (Forth *et al.*, 1996) und CYP2B (Dekant und Vamvakas, 1994), der Umsatz von *p*-Nitrophenol stark gesteigert wurde, vermuten auch Reinke und Moyer (1985) und Lucas *et al.* (1990) eine Beteiligung weiterer Enzyme neben CYP2E1 an der Umsetzung dieses Substrats.

Bei der enzymatischen Umsetzung von CZZ wird als einziges Produkt 6-OH-CZZ gebildet (Conney und Burns, 1960; Yuan *et al.*, 2002), was den Assay sehr spezifisch macht. An der Reaktion von CZZ zu 6-OH-CZZ ist hauptsächlich CYP2E1 beteiligt. So fanden Peter *et al.* (1990) eine 80%ige Hemmung der Umsetzung durch Antikörper gegen CYP2E1 und eine gute Korrelation der Umsatzrate mit dem Gehalt von immunochemisch detektiertem CYP2E1. Carriere *et al.* (1993) und Yamazaki *et al.* (1995) stellten eine Beteiligung von CYP1A1 fest, welches jedoch vor allem extrahepatisch exprimiert wird und so mit Lebermikrosomen durchgeführte Aktivitätstests nicht beeinflusst. Gorski *et al.* (1997) stellten bei Inhibitionsstudien mit chemischen Inhibitoren und Antikörpern nur eine 50%ige bis 65%ige Hemmung des CZZ-Umsatzes fest und vermuteten eine Beteiligung von CYP3A an der Reaktion. Einen nur geringen Einfluss von CYP3A auf die Umsetzung von CZZ in menschlichen Lebermikrosomen hingegen postulierten Lucas *et al.* (1999), die nach Hemmung von CYP2E1 einen Rückgang der CZZ-Umsetzung um 93 % fanden.

Auch CYP1A2 ist an der Reaktion beteiligt, wie von Ono *et al.* (1995) gezeigt wur-

de. Die Autoren untersuchten außerdem einen Einfluss der Substratkonzentration auf die Selektivität anhand der K_M -Werte der an der Umsetzung beteiligten Enzyme: Bei höheren Substratkonzentrationen (500 $\mu\text{mol/l}$) ist die Umsetzung spezifischer für CYP2E1. Diese höhere Spezifität bei hohen Substratkonzentrationen wurde von Jayyosi *et al.* (1995) und Yuan *et al.* (2002) bestätigt.

Beim Vergleich der Sensitivität der Assays mit den Substraten CZZ und *p*-Nitrophenol ergibt sich eine ungefähr zehnmal höhere Empfindlichkeit bei der Reaktion mit CZZ (Koop, 1992). Außerdem hat die Verwendung von CZZ den Vorteil, dass sowohl Substrat als auch Produkt nicht toxisch oder kanzerogen sind, weshalb der CZZ-Assay auch als nicht-invasiver *in-vivo*-Test für die CYP2E1-Aktivität verwendet werden kann (Peter *et al.*, 1990; Koop, 1992; Orellana *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2006). Aufgrund der höheren Sensitivität und Spezifität des CZZ-Assays und der Möglichkeit, das Substrat auch bei zukünftigen *in-vivo*-Untersuchungen einsetzen zu können, wurde CZZ als Substrat zur Bestimmung der Aktivität von CYP2E1 gewählt.

Zur Quantifizierung des gebildeten 6-OH-CZZ werden in der Literatur verschiedene Verfahren beschrieben. Neben der Verwendung von HPLC mit UV- oder Fluoreszenzdetektion (z. B. Peter *et al.*, 1990; Guengerich *et al.*, 1991) werden auf LC-MS/MS beruhende Methoden beschrieben (z. B. Anari *et al.*, 2003; Walsky und Obach, 2004; Kim *et al.*, 2005). Das gebildete 6-OH-CZZ wurde in der vorliegenden Arbeit in Anlehnung an letztere Methoden quantifiziert, da durch die Verwendung von LC-MS/MS zur Quantifizierung des Reaktionsprodukts im Vergleich zu UV- oder Fluoreszenzdetektion eine sehr viel höhere Selektivität und Sensitivität erreicht werden konnte.

4.2 Konzentrations-Zeit-Verläufe von Ethylen und Ethylenoxid

4.2.1 Konzentrations-Zeit-Verlauf von Ethylen in der Ausatemluft bei Exposition gegen Ethylen

Die Konzentrations-Zeit-Verläufe von ET nach initialer Gabe von ET in den Luftraum eines geschlossenen Expositionssystems (Abb. 3.27) sind nahezu identisch mit denen von Bolt *et al.* (1984) gemessenen. Die mit zunehmender ET-Konzentration flacher werdende Steigung der Konzentrations-Zeit-Kurven bei semilogarithmischer Auftragung weist auf eine Sättigungskinetik hin, wie auch von Andersen *et al.* (1980) und Bolt *et al.* (1984) interpretiert. Eine Sättigungskinetik ergab ebenfalls die Analyse von Csanády *et al.* (2000), welche die Daten von Bolt *et al.* (1984) mittels eines PBPK-Modells untersuchten.

Bei Ratten liegt die maximale Metabolismusgeschwindigkeit bei 8,5 $\mu\text{mol}/(\text{kg}\cdot\text{h})$ (Andersen *et al.*, 1980; Csanády *et al.*, 2000); im Vergleich zu anderen Olefinen

ist dies sehr langsam (V_{\max} Butadien $220 \mu\text{mol}/(\text{kg}\cdot\text{h})$) (Bolt *et al.*, 1984), Propylen $40,4 \mu\text{mol}/(\text{kg}\cdot\text{h})$) (Osterman-Golkar *et al.*, 1984), Styrol $100\text{--}224 \mu\text{mol}/(\text{kg}\cdot\text{h})$) (Andersen *et al.*, 1984; Ramsey und Andersen, 1984; Filser *et al.*, 1993; Csanády *et al.*, 1994). Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente zur Hemmung des ET-Metabolismus durch Dithiocarb sowie die Hemmversuche von Bolt *et al.* (1984) zeigen außerdem, dass sich ET im Organismus kaum anreichert; der Verteilungskoeffizient Blut-zu-Luft beträgt 0,48 für die Ratte und 0,22 für den Menschen (Csanády *et al.*, 2000). Bolt *et al.* (1984) erhielten nach vollständiger Inhibierung des ET-Metabolismus einen Wert von 0,7 für das thermodynamische Verteilungsgleichgewicht Tier-zu-Atmosphäre. Csanády *et al.* (2000) berechneten diesen Koeffizienten als gewichtetes Mittel der jeweiligen Verteilungskoeffizienten Gewebe-zu-Luft unter Berücksichtigung des Gewichts der einzelnen Gewebefractionen und erhielten einen Wert von 0,65. Diese sehr geringe maximal mögliche Anreicherung macht verständlich, dass in der Arbeit von Bolt *et al.* (1984) mit nur zwei Ratten in einem Expositionssystem keine initiale Anreicherungsphase zu beobachten war.

Durch die Exposition von fünf statt zwei Ratten in einem Expositionssystem von 6,31 konnte in der vorliegenden Arbeit die initiale Verteilungsphase gezeigt werden (Abb. 3.27). Diese initiale Phase stellt vermutlich nicht nur die Anreicherung von ET im Gewebe und Metabolismus durch CYP2E1 dar, sondern auch ET-Metabolismus durch eine weitere CYP-Spezies, wie im Folgenden diskutiert wird.

4.2.2 Konzentrations-Zeit-Verlauf von Ethylenoxid bei Exposition gegen Ethylen

Filser und Bolt beschrieben 1984 das Auftreten eines komplexen Konzentrations-Zeit-Verlaufs von EO in der Atmosphäre eines geschlossenen Expositionssystems nach Exposition von CD-Ratten gegen ET-Konzentrationen von über 1000 ppm (siehe Abb. 1.2, Seite 10). Bei diesen hohen ET-Konzentrationen wurde zunächst wie erwartet ein steiler Anstieg der EO-Konzentration beobachtet, es folgte dann aber nach Erreichen eines Maximums ein rascher Abfall, und das Plateau lag bei nur einem Drittel des von den Autoren erwarteten EO-Levels.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Messungen von EO in der Ausatemluft bestätigen die Ergebnisse von Filser und Bolt (1984). Bei Expositionen von CD-Ratten wird bei hohen ET-Konzentrationen eine maximale EO-Konzentration von ca. 0,8 ppm nach etwa 45 Minuten erreicht; Filser und Bolt maßen, ebenfalls mit männlichen CD-Ratten, maximale EO-Peakkonzentrationen von ca. 0,7 ppm. Die in der vorliegenden Arbeit gemessene Konzentration im Fließgleichgewicht lag bei 0,4 ppm und war damit ebenfalls nur geringfügig höher als bei Filser und Bolt, die EO-Konzentrationen von ca. 0,3 ppm fanden. Die EO-Konzentrations-Zeitverläufe bei gleichen

ET-Expositionskonzentrationen (≥ 1000 ppm) waren bei beiden Rattenstämmen sehr ähnlich.

Die vorliegende Arbeit zeigte eine Korrelation der Konzentrations-Zeit-Verläufe von EO in Blut und Ausatemluft. Die geringe zeitliche Verzögerung des EO-Maximums in der Luft im Vergleich zum Blut rührt daher, dass bei der EO-Bestimmung in der Luft nicht im zentralen, sondern in einem peripheren Kompartiment gemessen wurde. Die EO-Blutkonzentrationen im Fließgleichgewicht können aus den EO-Konzentrationen in der Luft unter Verwendung des Verteilungskoeffizienten recht genau vorhergesagt werden. Dies beweist, dass Messungen in der Ausatemluft zur Vorhersage von Stoffkonzentrationen im Blut durchaus geeignet sind.

Den komplexen Konzentrations-Zeit-Verlauf von EO beobachteten auch Maples und Dahl (1993) und Fennell *et al.* (2004) im Blut von F344-Ratten bei Expositionen gegen ET (die Veröffentlichung (Fennell *et al.*, 2004) wurde während der Entstehung der vorliegenden Arbeit publiziert). Bei den Untersuchungen von Maples und Dahl war bei einer ET-Expositionskonzentration von 600 ppm das EO-Maximum von $3 \mu\text{g/g}$ Blut ($68 \mu\text{mol/l}$) bereits nach 8 Minuten erreicht. Die Konzentration fiel dann auf $0,5 \mu\text{g/g}$ nach 12 Minuten ab ($11 \mu\text{mol/l}$) und blieb für den Rest der 60-minütigen Exposition konstant. Fennell *et al.* (2004) beobachteten bei Exposition gegen die niedrigste von ihnen gewählte ET-Expositionskonzentration von 300 ppm kein scharfes EO-Maximum im Blut: Die EO-Konzentration stieg bis auf $0,08 \mu\text{g/ml}$ an ($1,8 \mu\text{mol/l}$) und fiel danach langsam ab. Bei Exposition gegen 600 ppm ET stieg bei Fennell *et al.* die EO-Konzentration rasch bis auf ein Maximum von $0,122 \mu\text{g/ml}$ ($2,77 \mu\text{mol/l}$) nach 60 Minuten an, fiel dann auf $0,08 \mu\text{g/ml}$ ($1,8 \mu\text{mol/l}$) nach 120 Minuten und $0,06 \mu\text{g/ml}$ ($1,36 \mu\text{mol/l}$) nach 360 Minuten ab. Während der Exposition gegen 1000 ppm ET beobachteten Fennell *et al.* kein EO-Maximum, sondern einen kontinuierlichen Anstieg der EO-Konzentration auf ein Plateau (ca. $0,15 \mu\text{g/ml}$ bzw. $3,41 \mu\text{mol/l}$)

Beim Vergleich der hier erhaltenen Ergebnisse mit den Daten von Maples und Dahl (1993) ist prinzipiell ein ähnlicher EO-Verlauf erkennbar. Es zeigen sich jedoch Unterschiede hinsichtlich der EO-Konzentration und des Zeitpunkts des EO-Maximums. Die großen Konzentrationsunterschiede lassen sich eventuell auf die Methodik der EO-Quantifizierung von Maples und Dahl zurückführen, die keinen internen Standard zur Quantifizierung und außerdem ein sehr komplexes Verfahren der Probenaufarbeitung verwendeten. Das sehr frühe Auftreten des EO-Maximums (8 min bei Maples und Dahl vs. 30–60 min in der vorliegenden Arbeit) kann nicht erklärt werden.

Der von Fennell *et al.* beschriebene Kurvenverlauf während der Exposition gegen 300 ppm ET wird durch die hier vorgelegten Ergebnisse bestätigt; Fennell *et al.* messen jedoch geringfügig höhere EO-Konzentrationen. Warum die Autoren nur bei 600 ppm ET, nicht jedoch bei 1000 ppm ein EO-Maximum fanden, ist nicht nachvollziehbar. In der vorliegenden Arbeit wurde nach Exposition gegen 1000 ppm ein klares EO-Ma-

ximum gefunden, was sich auch gut mit den durchgeführten EO-Messungen in der Ausatemluft und den Daten von Filser und Bolt (1984) deckt. Die Unterschiede der hier vorgelegten Ergebnisse zu denen von Fennell *et al.* (2004) können nichts mit dem eingesetzten Rattenstamm zu tun haben, da in dieser Arbeit der gleiche Stamm verwendet wurde. Im Unterschied zu der vorliegenden Arbeit führten Maples und Dahl (1993) sowie Fennell *et al.* (2004) „nose-only“-Expositionen der Ratten in offenen Systemen durch. Diese Differenz in der Methodik hat jedoch ebenfalls keinen Einfluss auf die EO-Konzentration im Blut, wie in der vorliegenden Arbeit experimentell nachgewiesen wurde.

In der vorliegenden Arbeit wurden erstmals Daten zur Blutkonzentration von EO bei Exposition gegen niedrige ET-Konzentrationen (bis 30 ppm ET) erhoben. Aus den Konzentrations-Zeit-Verläufen von EO in Blut und Ausatemluft der Ratte während der Exposition gegen ET wird ersichtlich, dass bei ET-Expositionskonzentrationen unterhalb von 130 ppm die resultierende EO-Belastung für die Ratte relativ niedriger ist als bei ET-Konzentrationen oberhalb von 300 ppm, bei denen kurz nach Expositionsbeginn ein EO-Peak auftritt.

Die an CD- und F344-Ratten erhaltenen Ergebnisse sind sehr ähnlich. Bei F344-Ratten sind etwas höhere Spiegel von EO im Blut und GS-EO in der Leber nach Exposition gegen ET zu erkennen als bei CD-Ratten. Dass quantitative Unterschiede bezüglich des Fremdstoffmetabolismus zwischen CD- und F344-Ratten vorliegen können, wird auch in der Literatur beschrieben. So fanden Dent *et al.* (1980) insbesondere beim Metabolismus von Epoxiden und polyzyklischen Kohlenwasserstoffen quantitative Unterschiede bei *in-vitro*-Untersuchungen mit CD- und F344-Rattenlebermikrosomen. Newton *et al.* (1983) ermittelten in den Lebern von F344-Ratten einen geringfügig höheren CYP-Gehalt als in den Lebern von CD-Ratten. Hissink *et al.* (1997) untersuchten Lebermikrosomen verschiedener Spezies und Rattenstämme und zeigten vergleichbare metabolische Umsetzung bei F344- und Wistarratten, hingegen eine geringere Aktivität für CD-Ratten. Der nur geringfügig unterschiedliche CYP-Gehalt der Rattenstämme reichte nicht aus, um diese Unterschiede zu erklären. Das Metabolitenmuster der verschiedenen Rattenstämme war bei den Untersuchungen von Hissink *et al.* vergleichbar. Auch beim Menschen werden inter-individuelle Unterschiede bezüglich des Metabolismus durch CYP2E1 beschrieben (Bolt *et al.*, 2003).

4.3 Mechanismus der Bildung und des Metabolismus von Ethylenoxid

Wie oben ausführlich dargelegt, zeigte bei hohen ET-Expositionskonzentrationen der Konzentrations-Zeit-Verlauf von EO ein komplexes Muster. Bei Expositionen gegen niedrige Konzentrationen bis ca. 130 ppm ET wird kein initialer EO-Peak beobachtet.

Hier steigen die EO-Konzentrationen jeweils stetig bis zu einem Plateau an, dessen Konzentration proportional zur ET-Konzentration ist.

Prinzipiell kann der Konzentrations-Zeit-Verlauf von EO bei hohen ET-Expositionskonzentrationen über zwei Wege erklärt werden. Zum einen könnte durch EO der CYP-abhängige ET-Metabolismus zu EO gehemmt werden. Auch vorstellbar ist ein vermehrter EO-Abbau bei gleichbleibender EO-Bildung, also eine Induktion der EO-metabolisierenden Enzyme Glutathion-S-Transferase und/oder Epoxid-Hydrolase (EH). Beide Enzyme sind durch Chemikalien induzierbar (Talalay, 2000). Nach einer 4-stündigen Exposition von Wistar-Ratten gegen 1300 ppm EO sahen Katoh *et al.* (1991) eine Zunahme der GST-Aktivität und eine erhöhte Expression der GST-Gene (bestimmt als m-RNA) in der Leber. Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, die bei EO-Infusionen eine lineare Beziehung zwischen der Infusionsrate von EO und der Konzentration von EO im Blut sowie zwischen der Blutkonzentration von EO und der Konzentration des hepatischen GS-EO zeigen, ergeben sich keine Hinweise auf eine veränderte Aktivität von GST oder anderen EO metabolisierenden Enzymen; offensichtlich waren die für ET-Expositionen charakteristischen EO-Belastungen zu niedrig für eine GST-Induktion. Somit musste die Ursache für die reduzierte Bioverfügbarkeit von EO bei hohen ET-Konzentrationen in einer Veränderung der EO-Bildung zu suchen sein.

Ortiz de Montellano *et al.* (1980; 1981) fanden sowohl *in vivo* bei mit Phenobarbital vorbehandelten Ratten als auch *in vitro* in Rattenlebermikrosomen, dass lineare Olefine wie Ethylen eine Inaktivierung von CYP bewirken. Die Autoren beobachteten die Bildung eines grünen Pigments in der Rattenleber und in den Lebermikrosomen. Sie identifizierten es als Hydroxyethyladdukt eines Porphyrins, das aus dem prosthetischen Häm des CYP gebildet wurde. Fennell *et al.* (2004) untersuchten die Enzymaktivität von CYP2E1 bei Exposition gegen ET mit dem Substrat *p*-Nitrophenol. Bei allen ET-Konzentrationen (300, 600 und 1000 ppm) kam es zu einem Absinken der Enzymaktivität ab einer Expositionsdauer von 2 Stunden. In der vorliegenden Arbeit wurde die Aktivität von CYP2E1 mit dem Substrat CZZ untersucht. Die Aktivität von CYP2E1 fiel bei ET-Expositionen von 300 und 1000 ppm im Laufe einiger Stunden auf einen Minimalwert ab. Neueste Ergebnisse von Li *et al.* (2008) aus *in-vitro*-Inkubationen von Leber- und Lungenmikrosomen aus Mäusen und Ratten deuten auf eine sehr schnelle Inaktivierung einer ET-metabolisierenden CYP-Spezies hin.

Aus dem Konzentrations-Zeit-Verlauf von ET nach initialer Gabe von ET ergibt sich kein Hinweis auf eine vom normalen Sättigungsverhalten abweichende Kinetik. Die Ursache dafür, dass die Inaktivierung aus dem Konzentrations-Zeit-Verlauf von ET nicht ersichtlich wird, liegt möglicherweise darin, dass ET über mehrere CYP-Spezies metabolisiert wird. Dass außer CYP2E1 auch andere CYP-Spezies am Metabolismus von Olefinen beteiligt sein können, wurde z.B. an Styrol (Nakajima *et al.*, 1994; Carlson, 2003) und Butadien (Csanády *et al.*, 1992; Duescher und Elfarrá, 1994; El-

farra *et al.*, 1996) gezeigt. Eine der ET zu EO umsetzenden CYP-Spezies wird wahrscheinlich sehr schnell inhibiert werden. Diese Hemmung findet vermutlich während der anfänglichen Verteilungsphase statt. Da die Aufnahme von ET durch Inhalation der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist, lässt sich zu Expositionsbeginn nicht zwischen Metabolismus und Verteilung unterscheiden. Die Inaktivierung von CYPs durch Chemikalien oder Wirkstoffe erfolgt häufig selektiv (Murray, 1997; Hollenberg *et al.*, 2008).

Trotz der allmählichen Hemmung des CYP2E1 wird EO weiter gebildet, was durch die über mehrere Stunden hinweg konstante Plateaukonzentration von EO deutlich wird. Ein möglicher Grund hierfür könnte in einer unvollständigen Hemmung des CYP2E1 liegen. Auch die Neusynthese oder gar eine Induktion von CYP2E1 ist als Ursache für die konstanten EO-Plateaukonzentrationen denkbar. Die Induktion von CYP2E1 kann, in Abhängigkeit des Induktors, auf mehreren Mechanismen beruhen. So wurde für dieses Isoenzym Induktion durch vermehrte Transkription, mRNA-Stabilisierung, Anstieg der Translationsrate und post-translationale Proteinstabilisierung gezeigt (Ionescu und Caira, 2005). Wie unter anderem bei Koop und Tierney (1990) oder Yang *et al.* (1990) beschrieben, induzieren exogene Chemikalien CYP2E1 primär durch Stabilisierung des Proteins. Dadurch wird der Abbau des Proteins bei gleichbleibender Synthese gehemmt und es kommt zu einem Anstieg der Enzymkonzentration. Im Gegensatz zur Enzyminduktion durch Anstieg von Transkription oder Translation wird der Effekt der Proteinstabilisierung schon innerhalb kurzer Zeit sichtbar. Die formale Beschreibung des Metabolismus von ET durch eine Sättigungskinetik könnte also auch durch die Verfügbarkeit von CYP2E1 (niedrige, maximale Umsatzgeschwindigkeit von ET) bei hohen ET-Konzentrationen und die Verfügbarkeit von ET bei niedrigeren ET-Konzentrationen bedingt sein. Der komplexe Konzentrations-Zeit-Verlauf von EO wäre somit erklärbar: Bei hohen ET-Konzentrationen führt eine schnelle initiale ET-Metabolisierung zum beobachteten EO-Peak. Schon nach kurzer Zeit kommt es durch Hemmung einer oder mehrerer CYP-Spezies zu dem gemessenen drastischen Abfall der EO-Belastung, deren Höhe dann im weiteren Zeitverlauf von der Verfügbarkeit von CYP abhängt. Wenn bei niedrigen ET-Konzentrationen der ET-Metabolismus allein von der ET-Verfügbarkeit abhängt, ist (wie ebenfalls beobachtet) auch kein initialer EO-Peak zu erwarten.

Die Hemmung des ET-Metabolismus und der EO-Bildung durch DTC, die auch in dieser Arbeit gezeigt wurde, spricht nicht gegen eine Beteiligung weiterer Enzyme neben CYP2E1, da DTC nicht spezifisch CYP2E1 hemmt, sondern auch CYP-Enzyme der A-Familie (u.a. Eagling *et al.*, 1998; Halpert *et al.*, 1994). Auch die Induktion des ET-Metabolismus durch Aroclor (Conolly und Jaeger, 1977; Guest *et al.*, 1981) spricht keineswegs gegen die Beteiligung weiterer Enzyme, da Aroclor nicht spezifisch CYP2E1 induziert, sondern auch Cytochrome der A-Familie (Dubois *et al.*, 1996; Dostalek *et al.*, 2007).

4.3.1 Ethylenoxidbelastung als Basis für eine Risikoabschätzung

Das von ET ausgehende genotoxische Risiko wurde von Bolt und Filser (1984, 1987) basierend auf der EO-Belastung von Ratten abgeschätzt. Da zu diesem Zeitpunkt noch keine EO-Konzentrationen für ET-Konzentrationen unterhalb von 1000 ppm vorlagen, gingen die Autoren bei ihrer Abschätzung von Expositionen von CD-Ratten gegen hohe ET-Konzentrationen (≥ 1000 ppm) aus und extrapolierten auf den für den Menschen relevanten niedrigen Konzentrationsbereich unter Heranziehung einer Sättigungskinetik für ET. Zieht man jedoch in Betracht, dass der schon von Filser und Bolt (1984) beobachtete EO-Peak zwar bei etwa 1000 ppm ET sein Maximum erreicht, das im Anschluss folgende EO-Plateau sein Maximum aber schon bei ca. 130 ppm ET erlangt und dass bei noch niedrigeren ET-Konzentrationen kein EO-Peak auftritt, so wird offensichtlich, dass die von Bolt und Filser (1984, 1987) für ET vorgenommene Risikoabschätzung dringend einer Überarbeitung bedarf, welche die hier vorgelegten, neuen Ergebnisse berücksichtigt, die auch bei ET-Konzentrationen im arbeitsplatzrelevanten Bereich erhoben wurden.

Die vorliegende Arbeit zeigte eine gute Korrelation zwischen den EO-Werten in Blut und Ausatemluft. Die Blutkonzentrationen von EO im Fließgleichgewicht können aus den EO-Konzentrationen in der Luft unter Verwendung des Verteilungskoeffizienten Blut/Luft gut vorhergesagt werden. Daher kann z. B. beim ET-exponierten Menschen die EO-Belastung sehr wohl aus Messungen in der Ausatemluft ermittelt werden.

5 Ausblick

Zusätzlich zu den in dieser Arbeit durchgeführten Expositionen von Ratten gegen ET und der Messung von EO in Ausatemluft und Blut sollten entsprechende Experimente auch an Mäusen vorgenommen werden, um eventuelle Speziesunterschiede aufzuklären. Dies würde eine Extrapolation auf den Menschen erleichtern.

Zur weiteren Aufklärung des Mechanismus sollte in künftigen Arbeiten insbesondere die Zeitabhängigkeit der CYP-Hemmung durch *in-vitro*- und *in-vivo*-Experimente ermittelt werden. Ob andere Enzyme außer CYP2E1 am ET-Metabolismus beteiligt sind, könnte durch Experimente mit Mäusen, bei denen das Enzym CYP2E1 nicht mehr aktiv ist (sogenannte Knock-out-Mäuse), getestet werden.

Als Basis für eine zuverlässige Risikoabschätzung muss auch am Menschen die ET-bedingte EO-Belastung untersucht werden. Expositionen sollten gegen niedrige ET-Konzentrationen vorgenommen und EO in der Ausatemluft bestimmt werden. Hierzu muss die verwendete GC-MS-Methode unter Umständen weiterentwickelt werden. Eventuell lässt sich durch Umstellung des Ionisierungsverfahrens von Elektronenstoßionisation (EI) auf chemische Ionisation (CI) eine Steigerung der Sensitivität erreichen.

6 Zusammenfassung

Ethylen (ET) ist eine bedeutende Industriechemikalie, die vorwiegend zur Herstellung von Polyethylen verwendet wird. Im Säuger wird ET über mischfunktionelle Cytochrom-P450-abhängige Monooxygenasen (CYP) zu Ethylenoxid (EO) metabolisiert, das *in vitro* und *in vivo* mutagen und bei Maus und Ratte kanzerogen ist. Für ET wurde deshalb ein kanzerogenes Potential abgeleitet.

Bei hoher, konstanter ET-Belastung von Ratten war ein komplexer Konzentrations-Zeit-Verlauf des metabolisch gebildeten EO beobachtet worden, dessen Ursache bislang nicht geklärt werden konnte. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war deshalb die Untersuchung des diesem Befund zugrundeliegenden Mechanismus. Außerdem war die EO-Belastung der Ratte bei niedrigen, humanrelevanten ET-Expositionskonzentrationen unbekannt. Deshalb sollten auch bei solchen ET-Konzentrationen die Zusammenhänge zwischen ET-Exposition und resultierender EO-Belastung bei der Ratte untersucht werden.

Zur quantitativen Bestimmung geringer EO-Konzentrationen im Blut musste eine Methode erarbeitet werden, die auf der gaschromatographischen Analyse mit massenselektiver Detektion (GC/MSD) beruht. Die neue Methode beinhaltet die Extraktion von EO aus Blut mittels Luft, Injektion der EO-haltigen Luft in die Kühlfalle eines GC/MSD und anschließenden massenselektiven Nachweis. Die Nachweisgrenze für EO liegt bei 10 pmol/ml Blut. Als Parameter für die Aktivität der EO-eliminierenden Glutathion-S-Transferase wurde das Konjugat von EO mit Glutathion (GS-EO) in Rattenlebern gewählt. Zur quantitativen GS-EO-Analyse musste ebenfalls ein neues Verfahren entwickelt werden, in dem GS-EO mittels Flüssigkeitschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie (LC-MS/MS) bestimmt wird. Die Nachweisgrenze der Methode liegt bei 0,08 nmol/g Leber.

Nach Etablierung beider Methoden wurden männliche CD- und F344-Ratten gegen einen großen Konzentrationsbereich von ET in geschlossenen Kammern exponiert. Zum einen wurde ET nur anfänglich einmal in die Expositionskammern injiziert, zum anderen wurden die ET-Konzentrationen durch wiederholte Injektionen in die Expositionskammern während der Expositionsdauern konstant gehalten. Die Konzentrations-Zeit-Verläufe von ET und dem metabolisch gebildeten, exhalieren EO wurden mittels bereits vorliegender GC/FID-Verfahren verfolgt. Einige der gegen konstante ET-Konzentrationen exponierten Tiere wurden zu bestimmten Zeitpunkten getötet und EO direkt im Blut sowie GS-EO in den Lebern gemessen. Es wurden zu-

sätzlich Lebermikrosomen gewonnen und die Aktivität des ET metabolisierenden Enzyms CYP2E1 mittels einer bekannten LC-MS/MS-Methode über die Dauer einzelner Versuche ermittelt. Um zu untersuchen, ob die Aktivität der Glutathion-S-Transferase abhängig von Dauer und Höhe der EO-Belastung ist, wurde einzelnen Ratten EO mit konstanten Infusionsraten intravenös verabreicht und EO im Blut quantifiziert; zu Versuchsende wurde GS-EO in den Lebern bestimmt.

Es ergab sich folgendes Bild: Die Metabolismusgeschwindigkeit von Ethylen war konzentrationsabhängig und folgte formal einer Sättigungskinetik. Die anhand von Messungen der EO-Konzentration in der Kammeratmosphäre berechneten EO-Blutkonzentrationen der Tiere stimmten mit direkt im Blut gemessenen Konzentrationen überein. Mit zunehmender ET-Expositionskonzentration änderte sich der Konzentrations-Zeit-Verlauf des metabolisch gebildeten EO: Bei ET-Konzentrationen ≤ 130 ppm stieg die EO-Belastung der Tiere jeweils kontinuierlich bis zu einem Plateau an. Bei höheren ET-Konzentrationen zeigte EO in Atemluft und Blut zunächst schnelle Anstiege bis zu Maximalkonzentrationen, gefolgt von einem Absinken zu einem Plateau, das unabhängig von der ET-Expositionskonzentration jeweils die gleiche Konzentration aufwies wie diejenige, die bei 130 ppm ET erreicht wurde. Die Glutathion-S-Transferase-Aktivität blieb unabhängig von der EO-Belastung konstant. Die Aktivität von CYP2E1 fiel jedoch bei ET-Expositionen von 300 und 1000 ppm im Laufe einiger Stunden auf einen Minimalwert ab.

Aus den Untersuchungsergebnissen wurde gefolgert, dass ET wahrscheinlich von mehreren CYP-Spezies metabolisiert wird, von denen zumindest eine durch den ET-Metabolismus sehr schnell inhibiert wird. Der bei hohen ET-Konzentrationen beobachtete, langsame Aktivitätsverlust von CYP2E1 könnte durch eine Hemmung dieses Enzyms entgegenlaufenden, im Vergleich zu Normalbedingungen verlangsamten Abbau von CYP2E1 hervorgerufen werden.

Schließlich wurde noch auf die Bedeutung der in dieser Arbeit erstmals bei niedrigen ET-Konzentrationen gemessenen EO-Belastungen als Basis für eine Abschätzung des von ET ausgehenden Tumorrisikos eingegangen.

7 Abkürzungen

AD	Außendurchmesser
c	Konzentration
CAD	<i>Collisionally Activated Dissociation</i> Kollisionsinduzierte Dissoziation
CD-Ratte	Sprague Dawley-Ratte
CE	<i>Collision energy</i> Kollisionsenergie [V]
CI	<i>Chemical ionisation</i> chemische Ionisation
cps	<i>Counts per second</i> Signalintensität
CUR	<i>Curtain gas</i> Gasvorhang
CV	Variationskoeffizient
CXP	<i>Cell exit potential</i> Ausgangspotential der Kollisionszelle [V]
CYP2E1	Cytochrom-P450-Monooxygenase des Typs 2E1
CZZ	Chlorzoxazon
DEM	Diethylmaleat
DP	<i>Declustering potential</i> [V]
EH	Epoxidhydrolase
EI	<i>Electron impact</i> Elektronenstoßionisation
ET	Ethylen
EO	Ethylenoxid
EP	<i>Entrance potential</i> Eingangspotential [V]
GC	Gaschromatograph
GC/FID	Gaschromatograph mit Flammenionisationsdetektor
GC/MSD	Gaschromatograph mit massenselektivem Detektor
GSH	Glutathion, reduzierte Form
GSH-EE	Glutathionethylester
GS-EO	S-(2-hydroxyethyl)glutathion
GSSG	Glutathion, oxidierte Form
GST	Glutathion-S-Transferase
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Hochleistungs-Flüssigchromatographie)
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase

IARC	International Agency for Research on Cancer
ID	Innendurchmesser
IS	<i>Ion Spray Voltage</i> Spannung an der Elektrospraynadel [V]
iv	intravenös
k_{el}	Geschwindigkeitskonstante der EO-Elimination
LC	Flüssigkeitschromatographie
LC-MS/MS	Flüssigkeitschromatographie gekoppelt mit Tandem-Massenspektrometrie
LOD	<i>Limit of detection</i> Nachweisgrenze
LOQ	<i>Limit of quantification</i> Bestimmungsgrenze
MeOH	Methanol
MG	Molgewicht [g/mol]
MRM	<i>Multiple Reaction Monitoring</i>
MS	Massenspektrometer oder Massenspektrometrie
MSD	massenselektiver Detektor
MW	Mittelwert
m/z	Verhältnis Masse zu Ladung
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
6-OH-CZZ	6-Hydroxy-Chlorzoxazon
p.a.	<i>pro analysi</i>
PC	Polycarbonat
PFTBA	Perfluortributylamin
PP	Polypropylen
ppb	parts per billion (10^{-9})
ppm	parts per million (10^{-6})
PPO	Polyphenyloxid
PTFE	Polytetrafluorethylen
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Q1	Quadrupol 1
Q3	Quadrupol 3
SD	Standardabweichung
SIM	<i>Single Ion Monitoring</i>
TIC	<i>Total ion chromatogram</i> Totalionenchromatogramm
t_R	Retentionszeit
U	Units
V	Volumen
WF	Wiederfindung

Anhang

Tabelle A.1 EO-Konzentration im Blut von F344-Ratten nach Exposition gegen ET im geschlossenen Expositionssystem, vgl. Abb. 3.34 (Seite 75). Die Messungen wurden gemäß der Beschreibung in 2.5.2.2 durchgeführt.

ET-Konz. [ppm]	Exp.dauer [min]	EO [$\mu\text{mol/l}$]				
		Tier 1	Tier 2	Tier 3	MW	SD
30	30	0,14	0,11	0,11	0,12	0,02
	60	0,47	0,42	0,37	0,42	0,05
	180	0,44	0,52	0,43	0,46	0,05
	360	0,23	0,35		0,29	n.b.
130	10	0,32	0,40	0,37	0,36	0,04
	30	0,39	0,55	0,51	0,48	0,08
	60	0,44	0,43		0,44	n.b.
	180	0,81	0,87	0,63	0,77	0,13
	360	0,48	0,61	0,58	0,56	0,07
300	30	1,94	2,05	1,91	1,97	0,08
	60	1,81	1,85		1,83	n.b.
	180	1,17			1,17	n.b.
	360	1,15	1,06	1,01	1,08	0,07
1000	30	1,85	1,85	1,83	1,84	0,01
	60	3,09	2,08	1,96	2,38	0,62
	180	1,40	1,41	1,40	1,40	0,01
	360	1,10	1,04	1,17	1,10	0,07

n.b. = nicht berechnet

Tabelle A.2 EO-Konzentration im Blut von CD-Ratten nach Exposition gegen ET im geschlossenen Expositionssystem, vgl. Abb. 3.34 (Seite 75). Die Messungen wurden gemäß der Beschreibung in 2.5.2.2 durchgeführt.

ET-Konz. [ppm]	Exp.dauer [min]	EO [$\mu\text{mol/l}$]							
		Tier 1	Tier 2	Tier 3	Tier 4	Tier 5	Tier 6	MW	SD
30	10	0,13	0,22	0,14				0,16	0,05
	30	0,18	0,21	0,21				0,2	0,02
	60	0,18	0,16	0,15	0,13	0,18	0,2	0,17	0,02
	180	0,65	0,46	0,35	0,31			0,44	0,15
	360	0,23	0,28	0,34				0,28	0,05
300	10	0,85	1,04	1,37				1,09	0,26
	30	1,00	1,30					1,15	n.b.
	60	1,27	1,33	1,32				1,31	0,03
	180	0,66	0,96	0,83				0,82	0,15
	360	0,86	0,82	0,64				0,77	0,11
1000	10	1,28	1,63	1,58				1,5	0,19
	30	1,98	2,16	1,81				1,98	0,18
	60	0,61	0,64	0,66				0,63	0,03
	180	1,05	0,98	0,78	0,84	0,74	0,74	0,85	0,13
	360	0,69						0,69	n.b.

n.b. = nicht berechnet

Tabelle A.3 Konzentration von S-(2-hydroxyethyl)glutathion (GS-EO) in Lebern von CD-Ratten nach Exposition gegen ET, vgl. Abb. 3.37 (Seite 78). Die Messungen wurden gemäß der Beschreibung in 2.5.4 durchgeführt.

ET-Konz. [ppm]	Exp.dauer [min]	GS-EO [nmol/g]					
		Tier 1	Tier 2	Tier 3	MW	SD	
30	10	0,05			0,05	n.b.	
	30	0,12	0,15		0,14	n.b.	
	60	0,27	0,29	0,34	0,30	0,04	
	180	0,32	0,32		0,32	n.b.	
	360	0,47	0,42	0,49	0,46	0,04	
300	10	0,19			0,19	n.b.	
	30	0,45	0,54	0,59	0,53	0,07	
	60	0,73	0,74	0,69	0,72	0,03	
	180	0,72	1,05	0,94	0,90	0,17	
	360	1,22	0,41	0,84	0,82	0,41	
1000	10	0,40			0,40	n.b.	
	30	1,98	1,04		1,51	n.b.	
	60	1,24	1,47	1,8	1,5	0,28	
	180	0,97			0,97	n.b.	
	360	1,29	1,14	0,7	1,04	0,31	

n.b. = nicht berechnet

Tabelle A.4 Konzentration von S-(2-hydroxyethyl)glutathion (GS-EO) in Lebern von F344-Ratten nach Exposition gegen ET, vgl. Abb. 3.37 (Seite 78). Die Messungen wurden gemäß der Beschreibung in 2.5.4 durchgeführt.

ET-Konz. [ppm]	Exp.dauer [min]	GS-EO [nmol/g]				
		Tier 1	Tier 2	Tier 3	MW	SD
30	30	0,51			0,51	n.b.
	60	0,54			0,54	n.b.
	180	0,53			0,53	n.b.
	360	0,54			0,54	n.b.
130	10	0,19			0,19	n.b.
	30	0,45	0,54	0,59	0,53	0,07
	60	0,73	0,74	0,69	0,72	0,03
	180	1,39			1,39	n.b.
	360	1,49	1,74	1,99	1,74	0,25
300	30	2,02			2,02	n.b.
	60	1,57			1,57	n.b.
	180	1,81			1,81	n.b.
	360	1,55			1,55	n.b.
1000	30	3,25			3,25	n.b.
	60	3,05			3,05	n.b.
	180	1,71			1,71	n.b.
	360	2,28			2,28	n.b.

n.b. = nicht berechnet

Literaturverzeichnis

- Abeles F., Heggstad H. Ethylene: an urban air pollutant. *J. Air Pollut. Control Assoc.*, 23, 517–521 (1973).
- Alvares A., Bickers D., Kappas A. Polychlorinated biphenyls: A new type of inducer of cytochrome P-448 in the liver. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 70, 1321–1325 (1973).
- Amato G., Longo V., Mazzaccaro A., Gervasi P. Chlorzoxazone 6-hydroxylase and p-nitrophenol hydroxylase as the most suitable activities for assaying cytochrome P450 2E1 in cynomolgus monkey liver. *Drug Metab. Dispos.*, 26, 483–489 (1998).
- Amet Y., Berthou F., Goasduff T., Salaun J., Le Breton L., Menez J. Evidence that cytochrome P450 2E1 is involved in the (omega-1)-hydroxylation of lauric acid in rat liver microsomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 203, 1168–1174 (1994).
- Anari M., Bakhtiar R., Franklin R., Pearson P., Baillie T. Study of the fragmentation mechanism of protonated 6-hydroxychlorzoxazone: application in simultaneous analysis of CYP2E1 activity with major human cytochrome P450s. *Anal. Chem.*, 75, 469–478 (2003).
- Andersen M., Gargas M., Jones R., Jenkins L. Determination of the kinetic constants for metabolism of inhaled toxicants in vivo using gas uptake measurements. *Toxicol. App. Pharmacol.*, 54, 100–116 (1980).
- Andersen M., Gargas M., Ramsey J. Inhalation pharmacokinetics: evaluating systemic extraction, total in vivo metabolism and the time course of enzyme induction for inhaled styrene in rats based on arterial blood: inhaled air concentration ratios. *Toxicol. App. Pharmacol.*, 73, 176–187 (1984).
- APPE. Association of Petrochemical Producers in Europe. <http://www.petrochemistry.net/?HID=98> (Stand 04-2009).
- Baillie T., Davis M. Mass spectrometry in the Analysis of Glutathione Conjugates. *Biol. Mass Spectrom.*, 22, 319–325 (1993).
- Bolt H., Filser J. Olefinic hydrocarbons: a first risk estimate for ethene. *Toxicol. Pathol.*, 12, 101–105 (1984).
- Bolt H., Filser J. Kinetics and disposition in toxicology – example: carcinogenic risk estimate for ethylene. *Arch. Toxicol.*, 60, 73–76 (1987).

- Bolt H., Filser J., Störmer F. Inhalation pharmacokinetics based on gas uptake studies. V. Comparative pharmacokinetics of ethylene and 1,3-butadiene in rats. *Arch. Toxicol.*, 55, 213–218 (1984).
- Bolt H., Roos P., Thier R. The cytochrome P-450 isoenzyme CYP2E1 in the biological processing of industrial chemicals: consequences for occupational and environmental medicine. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 76, 174–185 (2003).
- Boylard E., Chasseaud L. The effect of some carbonyl compounds on rat liver glutathione levels. *Biochem. Pharmacol.*, 19, 1526–1528 (1970).
- Brown C., Asgharian B., Turner M., Fennell T. Ethylene oxide dosimetry in the mouse. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 148, 215–221 (1998).
- Brown C., Wong B., Fennell T. In vivo and in vitro kinetics of ethylene oxide metabolism in rats and mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 136, 8–19 (1996).
- Brugnone F., Perbellini L., Faccini G., Pasini F., Bartolucci G., DeRosa E. Ethylene oxide exposure. Biological monitoring by analysis of alveolar air and blood. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 58, 105–112 (1986).
- Bryant H., Visser N., Yoshida K. Ethylene oxide sterilizer use and short-term symptoms amongst workers. *J. Soc. Occup. Med.*, 39, 101–106 (1989).
- Burgaz S., Rezano R., Kara S., Karakaya A. Thioethers in urine of sterilization personnel exposed to ethylene oxide. *J. clin. Pharm. Ther.*, 17, 169–172 (1992).
- Calleman C., Ehrenberg L., Jansson B., Osterman-Golkar S., Segerbäck D., Svensson K., Wachtmeister C. Monitoring and risk assessment by means of alkyl groups in hemoglobin in persons occupationally exposed to ethylene oxide. *J. Environ. Pathol. Toxicol.*, 2, 427–442 (1978).
- Carlson G. In vitro metabolism of styrene oxide in liver and lung of CYP2E1 knockout mice. *J. Toxicol. Environ. Health*, 66, 861–869 (2003).
- Carriere V., Goasduff T., Ratanasavanh D., Morel F., Gautier J., Guillouzo A., Beaune P., Berthou F. Both cytochromes P450 2E1 and 1A1 are involved in the metabolism of chlorzoxazone. *Chem. Res. Toxicol.*, 6, 852–857 (1993).
- Carstens J. Bestimmung von Ethylenglykol, Glykolsäure und Oxalsäure aus biologischen Proben mittels Gaschromatographie und massenselektiver Detektion – Untersuchungen am Ethylenglykol-exponierten Probanden. Dissertation, Technische Universität München (2003).
- Chang T., Gonzalez F., Waxman D. Evaluation of triacetyloleandomycin, alpha-naphthoflavone and diethyldithiocarbamate as selective chemical probes for inhibition of human cytochromes P450. *Arch. Biochem. Biophys.*, 311, 437–442 (1994).

- Clarke S., Baldwin S., Bloomer J., Ayrton A., Sozio R., Chenery R. Lauric acid as a model substrate for the simultaneous determination of cytochrome P450 2E1 and 4A in hepatic microsomes. *Chem. Res. Toxicol.*, 7, 836–842 (1994).
- Clemens M., Einsele H., Frank H., Remmer H., Waller H. Volatile hydrocarbons from hydrogen peroxide-induced lipid peroxidation of erythrocytes and their cell components. *Biochem. Pharmacol.*, 32, 3877–1878 (1983).
- Conkle J., Camp B., Welch B. Trace composition of human respiratory gas. *Arch. Environ. Health*, 30, 290–295 (1975).
- Conney A., Burns J. Physiological disposition and metabolic fate of chlorzoxazone (paraflex) in man. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 128, 340–343 (1960).
- Conolly R., Jaeger R. Acute hepatotoxicity of ethylene and halogenated ethylenes after PCB pretreatment. *Environ. Health Perspectives*, 21, 131–135 (1977).
- Conolly R., Jaeger R., Szabo S. Acute hepatotoxicity of ethylene, vinyl fluoride, vinyl chloride and vinyl bromide after Aroclor 1254 pretreatment. *Exper. Mol. Pathol.*, 28, 25–33 (1978).
- Csanady G., Filser J. Toxicokinetics of inhaled and endogenous isoprene in mice, rats, and humans. *Chem. Biol. Interact.*, 135-136, 679–685 (2001).
- Csanády G., Denk B., Pütz C., Kreuzer P., Kessler W., Baur C., Gargas M., Filser J. A Physiological Toxicokinetic Model for Exogenous and Endogenous Ethylene and Ethylene Oxide in Rat, Mouse and Human: Formation of 2-Hydroxyethyl Adducts with Hemoglobin and DNA. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 165, 1–26 (2000).
- Csanády G., Guengerich F., Bond J. Comparison of the biotransformation of 1,3-butadiene and its metabolite, butadiene monoepoxide, by hepatic and pulmonary tissues from humans, rats and mice. *Carcinogenesis*, 13, 1143–1153 (1992).
- Csanády G., Mendrala A., Nolan R., Filser J. A physiologic pharmacokinetic model for styrene and styrene-7,8-oxide in mouse, rat and man. *Arch. Toxicol.*, 68, 143–157 (1994).
- Dekant W., Vamvakas S. *Toxikologie für Chemiker und Biologen*. Heidelberg, 1994, 1. Aufl.
- Denk B. Abschätzung des kanzerogenen Risikos von Ethylen und Ethylenoxid für den Menschen durch Speziesextrapolation von der Ratte unter Berücksichtigung der Pharmakokinetik. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München (1990).
- Dent J., Graichen M., Schnell S., Lasker J. Constitutive and Induced Hepatic Microsomal Cytochrome P-450 Monooxygenase Activities in Male Fischer-344 and CD Rats. A Comparative Study. *Toxicol. App. Pharmacol.*, 52, 45–53 (1980).

- DFG D. Ethylenoxid, Allergene Wirkung. In H. Greim (Hg.), *Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe, Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründungen von MAK-Werten*, Wiley VCH, Weinheim, 24.11.1995.
- DFG D. Ethylenoxid. In H. Greim (Hg.), *Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe, Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründungen von MAK-Werten*, Wiley VCH, Weinheim, 29.05.1984.
- Dostalek M., Brooks J., Hardy K., Milne G., Moore M., Sharma S., Morrow J., Guengerich F. In vivo oxidative damage in rats is associated with barbiturate response but not other Cytochrome P450 inducers. *Mol. Pharmacol.*, 72, 1419–1424 (2007).
- Dubois M., De Waziers I., Thome J., Kremers P. P450 induction by Aroclor 1254 and 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl in cultured hepatocytes from rat, quail and man: interspecies comparison. *Comp. Biochem. Physiol. C. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.*, 113, 51–59 (1996).
- Duescher R., Elfarra A. Human liver microsomes are efficient catalysts of 1,3-butadiene oxidation: evidence for major roles by Cytochromes P450 2A6 and 2E1. *Arch. Biochem. Biophys.*, 311, 342–349 (1994).
- Dunkelberg H. [Carcinogenic activity of ethylene oxide and its reaction products 2-chloroethanol, 2-bromoethanol, ethylene glycol and diethylene glycol. I. Carcinogenicity of ethylene oxide in comparison with 1,2-propylene oxide after subcutaneous administration in mice (author's transl)]. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg B*, 175, 383–404 (1981).
- Dunkelberg H. Carcinogenicity of ethylene oxide and 1,2-propylene oxide upon intragastric administration to rats. *Br. J. Cancer*, 46, 924–933 (1982).
- Eagling V., Tjia J., Back D. Differential selectivity of cytochrome P450 inhibitors against probe substrates in human and rat liver microsomes. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 45, 107–114 (1998).
- Ehrenberg L., Osterman-Golkar S., Segerbäck D., Svensson K., Calleman C. Evaluation of genetic risks of alkylating agents. III. Alkylation of haemoglobin after metabolic conversion of ethene to ethene oxide in vivo. *Mutat. Res.*, 45, 175–184 (1977).
- Eide I., Hagemann R., Zahlens K., Tareke E., Törnqvist M., Kumar R. Uptake, distribution and formation of hemoglobin and DNA adducts after inhalation of C2-C8 1=alkenes (olefines) in the rat. *Carcinogenesis*, 16, 1603–1609 (1995).
- Elfarra A., Krause R., Selzer R. Biochemistry of 1,3-butadiene metabolism and its relevance to 1,3-butadiene-induced carcinogenicity. *Toxicology*, 113, 23–30 (1996).
- Fennell T., Brown C. A physiologically based pharmacokinetic model for ethylene oxide in mouse, rat and human. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 173, 161–175 (2001).

- Fennell T., Snyder R., Parkinson C., Murphy J., James R. The effect of ethylene exposure on ethylene oxide in blood and on hepatic cytochrome P450 in Fischer rats. *Toxicol. Sci.*, 81, 7–13 (2004).
- Filser J. The closed chamber technique — uptake, endogenous production, excretion, steady-state kinetics and rates of metabolism of gases and vapors. *Arch. Toxicol.*, 66, 1–10 (1992).
- Filser J., Bolt H. Inhalation pharmacokinetics based on gas uptake studies. VI. Comparative evaluation of ethylene oxide and butadiene monoxide as exhaled reactive metabolites of ethylene and 1,3-butadiene in rats. *Arch. Toxicol.*, 55, 219–223 (1984).
- Filser J., Denk B., Törnqvist M., Kessler W., Ehrenberg L. Pharmacokinetics of ethylene in man; body burden with ethylene oxide and hydroxyethylation of hemoglobin due to endogenous and environmental ethylene. *Arch. Toxicol.*, 66, 157–163 (1992).
- Filser J., Hutzler C., Meischner V., Veereshwarayya V., Csanády G. Metabolism of 1,3-butadiene to toxicologically relevant metabolites in single-exposed mice and rats. *Chem. Biol. Interact.*, 166, 93–103 (2007).
- Filser J., Kreuzer P., Greim H., Bolt H. New scientific arguments for regulation of ethylene oxide residues in skin-care products. *Arch. Toxicol.*, 68, 401–405 (1994).
- Filser J., Schwegler U., Csanady G., Greim H., Kreuzer P., Kessler W. Species-specific pharmacokinetics of styrene in rat and mouse. *Arch. Toxicol.*, 67, 517–530 (1993).
- Forth W., Henschler D., Rummel W., Starke K. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 1996, 7. Aufl.
- Fowles J., Mitchell J., McGrath H. Assessment of cancer risk from ethylene oxide residues in spices imported into New Zealand. *Food Chem. Toxicol.*, 39, 1055–1062 (2001).
- Fraenkel-Conrat H. The action of 1,2-epoxides on proteins. *J. Biol. Chem.*, 154, 227–238 (1944).
- Frank H., Hintze T., Remmer H. Volatile hydrocarbons in breath, an indication for peroxidative degradation of lipids. In B. Kolb (Hg.), *Applied Headspace Gas Chromatography*, London, 1980, 155–164.
- Fu P., Zic V., Ozimy K. Studies of ethylene-forming system in rat liver extract. *Biochim. Biophys. Acta*, 585, 427–434 (1979).
- Funae Y., Imaoka S. Cytochrome P450 in rodents. *Handb. Exp. Pharmacol.*, 105, 221–238 (1993).
- Gornall A., Bardawill C., David M. Determination of serum proteins by means of the Biuret reaction. *J. Biol. Chem.*, 117, 751–766 (1948).

- Gorski J., Jones D., Wrighton S., Hall S. Contribution of human CYP3A subfamily members to the 6-hydroxylation of chlorzoxazone. *Xenobiotica*, 27, 243–256 (1997).
- Grantom R., Royer D. Ethylene. In W. Gerhartz, Y.S. Yamamoto, L. Kaudy, J.F. Rounsaville, G. Schulz (Hg.), *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, 1987, Bd. A10. 5. Aufl.
- Greim H., Filser J. Risikoabschätzung in der Toxikologie. In H.J. Dengler, E. Mutschler (Hg.), *Fremdstoffmetabolismus und Klinische Pharmakologie*, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1994.
- Gérin M., Tardif R. Urinary N-acetyl-S-2-hydroxyethyl-L-cysteine in rats as biological indicator of ethylene oxide exposure. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 7, 419–423 (1986).
- Guan X., Hoffman B., Dwivedi C., Matthees D. A simultaneous liquid chromatography/mass spectrometric assay of glutathione, cysteine, homocysteine and their disulfides in biological samples. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 31, 251–261 (2003).
- Guengerich F. Separation and purification of multiple forms of microsomal cytochrome P-450. Activities of different forms of cytochrome P-450 towards several compounds of environmental interest. *J. Biol. Chem.*, 252, 3970–3979 (1977).
- Guengerich F., Kim D., Iwasaki M. Role of human cytochrome P-450 IIE1 in the oxidation of many low molecular weight cancer suspects. *Chem. Res. Toxicol.*, 4, 168–179 (1991).
- Guest D., Barrow C., Popp J., Dent J. Effects of Aroclor 1254 on disposition and hepatotoxicity of ethylene in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 57, 325–334 (1981).
- Halpert J., Guengerich F., Bend J., Correia M. Selective inhibitors of Cytochromes P450. *Toxicol. App. Pharmacol.*, 125, 163–175 (1994).
- Hamm T., Guest D., Dent J. Chronic toxicity and oncogenicity bioassay of inhaled ethylene in Fischer-344 rats. *Fund. Appl. Toxicol.*, 4, 473–478 (1984).
- Harrison V. Ethylene, an ovulatory hormone? *Lancet*, 1, 438 (1981).
- Hennemann J., Fox S., Lubet R., Ward J., Nims R. Induction of cytochrome P-450 in *Sigmodon hispidus* (cotton rats) exposed to dietary Aroclor 1254. *J. Toxicol. Environ. Health*, 41, 369–386 (1994).
- Hine C., Rowe V., White E., Darmer K., Youngblood G. Epoxy Compounds. In G.D. Clayton, F.E. Clayton (Hg.), *Pattys Industrial Hygiene and Toxicology*, John Wiley and Sons, New York, 1981, Bd. 2A, 5141–2257. 3. Aufl.
- Hissink A., Oudshoorn M., Van Ommen B., Van Bladeren P. Species and Strain Differences in the Hepatic Cytochrome P450-Mediated Biotransformation of 1,4-Dichlorobenzene. *Toxicol. App. Pharmacol.*, 145, 1–9 (1997).

- Hollenberg P., Kent U., Bumpus N. Mechanism-based inactivation of human Cytochromes P450s: Experimental characterization, reactive intermediates, and clinical implications. *Chem. Res. Tox.*, 21, 189–205 (2008).
- Hori H., Yahata K., Fujishiro K., Yoshizumi K., Li D., Goto Y., Higashi T. Personal exposure level and environmental ethylene oxide gas concentration in sterilization facilities of hospitals in Japan. *Appl. Occup. Environ. Hyg.*, 17, 634–639 (2002).
- IARC. Ethylene. In *IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*, IARC, International Agency for Research on Cancer, Lyon, 1994a, Bd. 60, 45–71.
- IARC. Ethylene oxide. In *IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*, IARC, International Agency for Research on Cancer, Lyon, 1994b, Bd. 60, 73–129.
- IARC. 1,3-Butadiene, ethylene oxide and vinyl halides (vinyl fluoride, vinyl chloride and vinyl bromide). In *IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*, IARC, International Agency for Research on Cancer, Lyon, France, 2008, Bd. 97.
- Ionescu C., Caira M. Induction and inhibition of drug-metabolising enzymes. In *Drug Metabolism – Current Concepts*, Springer Netherlands, 2005, 209–242. 1. Aufl.
- Jacobson K., Hackley E., Feinsilver L. The toxicity of inhaled ethylene oxide and propylene oxide vapors. *AMA Arch. Ind. Health*, 13, 237–244 (1956).
- Jankovic J., Jones W., Burkhart J., Noonan G. Environmental study of firefighters. *Ann. Occup. Hyg.*, 35, 581–602 (1991).
- Jayyosi Z., Knoble D., Muc M., Erick J., Thomas P., Kelley M. Cytochrome P-450 2E1 is not the sole catalyst of chlorzoxazone hydroxylation in rat liver microsomes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 273, 1156–1161 (1995).
- Jones A., Wells G. The comparative metabolism of 2-bromoethanol and ethylene oxide in the rat. *Xenobiotica*, 11, 763–770 (1981).
- Katoh T., Ohmori H., Murakami T., Karasaki Y., Higashi K., Muramatsu M. Induction of Glutathione-S-Transferase and heat-shock proteins in rat liver after ethylene oxide exposure. *Biochem. Pharmacol.*, 42, 1247–1254 (1991).
- Kautiainen A., Törnqvist M. Monitoring exposure to simple epoxides and alkenes through gas chromatographic determination of hemoglobin adducts. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 63, 27–31 (1991).
- Kessler W. Untersuchungen zu Aminosäure und Proteinoxidationen in Eisen/Ascorbat- und Eisen/Ascorbat/GSH-Systemen hinsichtlich der Entstehung von Kohlenwasserstoffen sowie Enzymaktivierungen. Dissertation, Universität Tübingen (1987).

- Kessler W., Remmer H. Generation of volatile hydrocarbons from amino acids and proteins by an iron/ascorbate/GSH system. *Biochem. Pharmacol.*, 39, 1347–1351 (1990).
- Kim M., Kim H., Cha I., Park J., Shon J., Liu K., Shin J. High-throughput screening of inhibitory potential of nine cytochrome P450 enzymes in vitro using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 19, 2651–2658 (2005).
- Koch H., Ritschel W. *Synopsis der Biopharmazie und Pharmakokinetik*. ecomed-Verlag, Landsberg, 1986.
- Koga M., Hori H., Tanaka I., Akiyama T., Inoue N. Analysis of urinary metabolites of rats exposed to ethylene oxide. *J. OUOEH (Sangyo Ika Daigaku Zasshi)*, 7, 45–47 (1987).
- Kolman A., Chovanec M., Osterman-Golkar S. Genotoxic effects of ethylene oxide, propylene oxide and epichlorhydrin in humans: update review (1990-2001). *Mutat. Res.*, 512, 173–194 (2002).
- Koop D. Oxidative and reductive metabolism by cytochrome P450 2E1. *FASEB J.*, 6, 724–730 (1992).
- Koop D., Tierney D. Multiple mechanisms in the regulation of ethanol-inducible cytochrome P450IIE1. *Bioessays*, 12, 429–435 (1990).
- Kreuzer P. Kinetik der Permeation von gasförmigem und in verschiedenen Matrices gelöstem Ethylenoxid durch die Haut von Ratte, Meerschweinchen und Mensch. Dissertation, GSF Forschungszentrum (1992).
- Krishnan K., Gargas M., Fennell T., Andersen M. A physiologically based description of ethylene oxide dosimetry in the rat. *Toxicol. Ind. Health*, 8, 121–140 (1992).
- Lee A., Yue J., Tyndale R. In vivo and in vitro characterization of chlorzoxazone metabolism and hepatic CYP2E1 levels in African Green monkeys; induction by chronic nicotine treatment. *Drug Metab. Dispos.*, 34, 1508–1515 (2006).
- Li Q., Csanády G., Artati A., Khan M., Riester M., Filser J. Ethylene inhibits its own metabolism in liver and lung microsomes from male Fischer F344 rats and B6C3F1 mice. *Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology*, 377, 70 (2008).
- Li Q., Csanády G., Stangl M., Klein D., Filser J. Metabolism of ethylene oxide in microsomes and cytosol from livers and lungs of B6C3F1 mice, Fischer 344 rats and humans. *Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology*, 379, 64 (2009).
- Lide D. *CRC Handbook of Chemistry and Physics*. CRC Press, 2005-2006, 86. Aufl.
- Lieberman M., Hochstein P. Ethylene formation in rat liver microsomes. *Science*, 152, 213–214 (1966).

- Lieberman M., Kunishi A. Ethylene production from methionine. *Biochem. J.*, 97, 449–459 (1965).
- Lieberman M., Mapson L. Genesis and biogenesis of ethylene. *Nature*, 204, 343–345 (1964).
- Loughlin A., Skiles G., Alberts D., Schaefer W. An ion exchange liquid chromatography/mass spectrometry method for the determination of reduced and oxidized glutathione and glutathione conjugates in hepatocytes. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 26, 131–142 (2001).
- Lucas D., Berthou F., Dreano Y., Floch H., Menez J. Ethanol-inducible cytochrome P-450: assessment of substrates' specific chemical probes in rat liver microsomes. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 14, 590–594 (1990).
- Lucas D., Ferrara R., Gonzalez E., Bodenez P., Albores A., Manno M., Berthou F. Chlorzoxazone, a selective probe for phenotyping CYP2E1 in humans. *Pharmacogenetics*, 9, 377–388 (1999).
- Lynch D., Lewis T., Moorman W., Burg J., Groth D., Khan A., Ackerman L., Cockrell B. Carcinogenic and toxicologic effects of inhaled ethylene oxide and propylene oxide in F344 rats. *Tox. Appl. Pharmacol.*, 76, 69–84 (1984).
- Maples K., Dahl W. Levels of epoxides in blood during inhalation of alkenes and alkene oxides. *Inhal. Toxicol.*, 5, 43–54 (1993).
- Massbank. High Resolution Mass Spectra Database. <http://www.massbank.jp/jsp/Dispatcher.jsp?type=disp&id=KO008986&site=0> (Stand 07-2010).
- Monostory K., Hazai E., Vereczkey L. Inhibition of cytochrome P450 enzymes participating in p-nitrophenol hydroxylation by drugs known as CYP2E1 inhibitors. *Chem. Biol. Interact.*, 147, 331–340 (2004).
- Ortiz de Montellano P., Beilan H., Kunze K., Mico B. Destruction of Cytochrome P450 by ethylene - structure of the resulting prosthetic heme adduct. *J. Biol. Chem.*, 256, 4395–4399 (1981).
- Ortiz de Montellano P., Mico B. Destruction of Cytochrome P450 by ethylene and other olefins. *Mol. Pharmacol.*, 18, 128–135 (1980).
- Murray M. Drug-mediated inactivation of Cytochrome P450. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 24, 465–470 (1997).
- Nakajima T., Wang R.S., Elovaara E., Gonzalez F., Gelboin H., 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. *Biochem. Pharmacol.*, 48, 637–642 (1994).

- Newton J., Yoshimoto M., Bernstein J., Rush G., Hook J. Acetaminophen Nephrotoxicity in the Rat. I. Strain Differences in Nephrotoxicity and Metabolism. *Toxicol. App. Pharmacol.*, 69, 291–306 (1983).
- Nicholls A. Ethylene oxide and anaphylaxis during haemodialysis. *Br. Med. J.*, 292, 1221–1222 (1986).
- NIST. National Institute of Standards and Technology. <http://webbook.nist.gov/chemistry/> (Stand 04-2010).
- NLM&NIH. U.S. National Library of Medicine / National Institutes of Health. http://hazmap.nlm.nih.gov/cgi-bin/hazmap_generic?tbl=TblAgents&id=1076 (Stand 03-2007).
- NTP. Toxicology and Carcinogenesis Studies of Ethylene Oxide (CAS No. 75-21-8) in B6C3F1 Mice (Inhalation Studies). Technical Report Series No 326. NIH Publication No. 88-2582. (1987).
- Ono S., Hatanaka T., Hotta H., Tsutsui M., Satoh T., Gonzalez F. Chlorzoxazone is metabolized by human CYP1A2 as well as by human CYP2E1. *Pharmacogenetics*, 5, 143–150 (1995).
- Orellana M., Rodrigo R., Varela N., Araya J., Poniachik J., Csendes A., Smok G., Videla L. Relationship between in vivo chlorzoxazone hydroxylation, hepatic cytochrome P450 2E1 content and liver injury in obese non-alcoholic fatty liver disease patients. *Hepatol. Res.* (2005).
- Osterman-Golkar S., Bailey E., Farmer P., Gorf S., Lamb J. Monitoring exposure to propylene oxide through the determination of hemoglobin alkylation. *Scand. J. Work Environ. Health*, 10, 99–102 (1984).
- Osterman-Golkar S., Ehrenberg L., Segerbäck D., Hällström I. Evaluation of genetic risks of alkylating agents II. Haemoglobin as a dose monitor. *Mutat. Res.*, 34, 1–10 (1976).
- Osterman-Golkar S., Farmer B., Segerbäck D., Bailey E., Calleman C., Svensson K., Ehrenberg L. Dosimetry of ethylene oxide in the rat by quantitation of alkylated histidine in hemoglobin. *Teratog. Carcinog. Mutagen.*, 3, 395–405 (1983).
- Peter R., Bocker R., Beaune P., Iwasaki M., Guengerich F., Yang C. Hydroxylation of chlorzoxazone as a specific probe for human liver cytochrome P-450IIE1. *Chem. Res. Toxicol.*, 3, 566–573 (1990).
- Potter D., Blair D., Davies R., Watson W., Wright A. The relationship between alkylation of haemoglobin and DNA in Fischer F344 rats exposed to [14C]ethylene oxide. *Arch. Toxicol.*, 13, 254–257 (1989).

- Ram Chandra G., Spencer M. A micro apparatus for absorption of ethylene and its use in determination of ethylene in exhaled gases from human subjects. *Biochim. Biophys. Acta*, 69, 423–425 (1963).
- Ramsey J., Andersen M. A physiologically based description of the inhalation pharmacokinetics of inhaled styrene in rats and humans. *Toxicol. App. Pharmacol.*, 73, 159–175 (1984).
- Rebsdatt S., Mayer D. Ethylene oxide. In W. Gerhartz, Y.S. Yamamoto, L. Kaudy, J.F. Rounsaville, G. Schulz (Hg.), *Ullmanns Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Wiley-VCH, Weinheim, 2002, Bd. 12. 6. Aufl.
- Reinke L., Moyer M. p-Nitrophenol hydroxylation. A microsomal oxidation which is highly inducible by ethanol. *Drug Metab. Dispos.*, 13, 548–552 (1985).
- Remmer H., Schenkman J., Estabrook R., Sasame H., Gillette J., Narasimhulu S., Cooper D., Rosenthal O. Drug interaction with hepatic microsomal cytochrome. *Mol. Pharmacol.*, 2, 187–190 (1966).
- Rhudy R., Lindberg D., Goode J., Sullivan D., Gralla E. Ninety-day subacute inhalation study with ethylene in albino rats. *Toxicol. App. Pharmacol.*, 45, 285 (1978).
- Rubino F., Pitton M., Brambilla G., Colombi A. A study of the glutathione metaboloma peptides by energy-resolved mass spectrometry as a tool to investigate into the interference of toxic heavy metals with their metabolic processes. *J. Mass Spectrom.*, 41, 1578–1593 (2006).
- Rusyn I., Asakura S., Li Y., Kosyk O., Koc H., Nakamura J., Upton P., Swenberg J. Effects of ethylene oxide and ethylene inhalation on DNA adducts, apurinic/apyrimidinic sites and expression of base excision DNA repair genes in rat brain, spleen and liver. *DNA Repair*, 4, 1099–1110 (2005).
- Sachs L. *Angewandte Statistik - Anwendung statistischer Methoden*, Bd. 11. Springer Verlag, 2003.
- Sagai M., Ichinose T. Age-related changes in lipid peroxidation as measured by ethane, ethylene, butane and pentane in respired gases of rats. *Life Sci.*, 27, 731–738 (1980).
- Schmiedel G., Filser J., Bolt H. Rat liver microsomal transformation of ethene to oxirane in vitro. *Toxicol. Lett.*, 19, 293–297 (1983).
- Segeberäck D. Alkylation of DNA and Hemoglobin in the mouse following exposure to ethene and ethene oxide. *Chem. Biol. Interact.*, 45, 139–151 (1983).
- Shen J., Kessler W., Denk B., Filser J. Metabolism and endogenous production of ethylene in rat and man. *Arch. Toxicol.*, 13, 237–239 (1989).

- Snellings W., Weil C., Maronpot R. A two-year inhalation study of the carcinogenic potential of ethylene oxide in Fischer 344 rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 75, 105–117 (1984).
- Spracklin D., Emery M., Thummel K., Kharasch E. Concordance between trifluoroacetic acid and hepatic protein trifluoroacetylation after disulfiram inhibition of halothane metabolism in rats. *Acta Anaesthesiol. Scand.*, 47, 765–770 (2003).
- Steghens J., Flourie F., Arab K., Collombel C. Fast liquid chromatography-mass spectrometry glutathione measurement in whole blood: micromolar GSSG is a sample preparation artifact. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 798, 343–349 (2003).
- Swenberg J., Fedtke N., Fennell T., Walker V. Relationships between carcinogenic exposure, DNA adducts and carcinogenesis. In D.B. Clayson, I.C. Munro, P. Shubik, J.A. Swenberg (Hg.), *Progress in Predictive Toxicology*, Elsevier Scientific Publications, Amsterdam, 1990, 161–184.
- Talalay P. Chemoprotection against cancer by induction of Phase 2 enzymes. *BioFactors*, 12, 5–11 (2000).
- Thier R., Bolt H. Carcinogenicity and genotoxicity of ethylene oxide: new aspects and recent advances. *Crit. Rev. Toxicol.*, 30, 595–608 (2000).
- Törnqvist M., Almberg J., Bergmark E., Nilsson S., Osterman-Golkar S. Ethylene oxide doses in ethene-exposed fruit store workers. *Scand. J. Work Environ. Health*, 15, 436–438 (1989a).
- Törnqvist M., Gustafsson B., Kautiainen A., Harms-Ringdahl M., Granath F., Ehrenberg L. Unsaturated lipids and intestinal bacteria as sources of endogenous production of ethene and ethylene oxide. *Carcinogenesis*, 10, 39–41 (1989b).
- Tucker G., Houston J., Huang S. Optimizing drug development: strategies to assess drug metabolism/transporter interaction potential—toward a consensus. *Pharm. Res.*, 70, 103–114 (2001).
- Upadhyay S. Bioavailability of ethylene glycol and its metabolites glycolic acid and oxalic acid in volunteers following inhalation and dermal exposure to ethylene glycol. Dissertation, Technische Universität München (2006).
- Vergnes J., Pritts I. Effects of ethylene on micronucleus formation in bone marrow of rats and mice following four weeks of inhalation exposure. *Mutat. Res.*, 324, 87–91 (1994).
- Victorin K., Ståhlberg M. A method for studying the mutagenicity of some gaseous compounds in *Salmonella typhimurium*. *Environ. mol. Mutag.*, 11, 65–77 (1988).

- Walker V., Fennell T., Upton P., MacNeela J., Swenberg J. Molecular Dosimetry of DNA and hemoglobin adducts in mice and rats exposed to ethylene oxide. *Environ. Health Perspectives*, 99, 11–17 (1993).
- Walker V., Fennell T., Upton P., Skopek T., Prevost V., Shuker D., Swenberg J. Molecular dosimetry of ethylene oxide: Formation and persistence of 7-(2-hydroxyethyl)guanine in DNA following repeated exposures of rats and mice. *Cancer Res.*, 52, 4328–4334 (1992a).
- Walker V., MacNeela J., Swenberg J., Turner M.J. J., Fennell T. Molecular dosimetry of ethylene oxide: formation and persistence of N-(2-hydroxyethyl)valine in hemoglobin following repeated exposures of rats and mice. *Cancer Res.*, 52, 4320–4327 (1992b).
- Walker V., Wu K.Y., Upton P., Ranasinghe A., Scheller N., Cho M.H., Vergnes J., Skopek T., Swenberg J. Biomarkers of exposure and effect as indicators of potential carcinogenic risk arising from in vivo metabolism of ethylene to ethylene oxide. *Carcinogenesis*, 21, 1661–1669 (2000).
- Walsky R., Obach R. Validated assays for human cytochrome P450 activities. *Drug Metab. Dispos.*, 32, 647–660 (2004).
- Wu K., Ranasinghe A., Upton P., Walker V., Swenberg J. Molecular dosimetry of endogenous and ethylene oxide-induced N7-(2-hydroxyethyl) guanine formation in tissues of rodents. *Carcinogenesis*, 20, 1787–1792 (1999a).
- Wu K.Y., Scheller N., Ranasinghe A., Yen T.Y., Sangaiah R., Giese R., Swenberg J. A gas chromatography/electron capture/negative chemical ionisation High-Resolution Mass Spectrometry method for analysis of endogenous and exogenous N7-(2-Hydroxyethyl)guanine in rodents and its potential for human biological monitoring. *Chem. Res. Tox.*, 12, 722–729 (1999b).
- Yamazaki H., Guo Z., Guengerich F. Selectivity of cytochrome P4502E1 in chlorzoxazone 6-hydroxylation. *Drug Metab. Dispos.*, 23, 438–440 (1995).
- Yang C., Yoo J., Ishizaki H., Hong J. Cytochrome P450IIE1: roles in nitrosamine metabolism and mechanisms of regulation. *Drug Metab. Rev.*, 22, 147–159 (1990).
- Yong L., Schulte P., Kao C., Giese R., Boeninger M., Strauss G., Petersen M., Wiencke J. DNA adducts in granulocytes of hospital workers exposed to ethylene oxide. *Am. J. Ind. Med.*, 50, 293–302 (2007).
- Yuan R., Madani S., Wei X., Reynolds K., Huang S. Evaluation of cytochrome P450 probe substrates commonly used by the pharmaceutical industry to study in vitro drug interactions. *Drug Metab. Dispos.*, 30, 1311–1319 (2002).

- Zerilli A., Ratanasavanh D., Lucas D., Goasduff T., Dreano Y., Menard C., Picart D., Berthou F. Both cytochromes P450 2E1 and 3A are involved in the O-hydroxylation of p-nitrophenol, a catalytic activity known to be specific for P450 2E1. *Chem. Res. Toxicol.*, 10, 1205–1212 (1997).
- Zimmermann H., Walzl R. Ethylene. In W. Gerhartz, Y.S. Yamamoto, L. Kaudy, J.F. Rounsaville, G. Schulz (Hg.), *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Wiley VCH, Weinheim, 2007.

Danke!

- Herrn Prof. Dr. Johannes G. Filser danke ich besonders für die interessante Aufgabenstellung, die hervorragenden Arbeitsbedingungen und für viele anregende Diskussionen.
- Herrn Prof. Dr. Peter Schieberle danke ich sehr für die Übernahme des Zweitgutachtens und die Bereitschaft für die unkomplizierte Unterstützung meines Promotionsverfahrens an der TU München.
- Ganz herzlich möchte ich den Herren Prof. Dr. György Csanády und Dr. Winfried Kessler für viele wertvolle Hinweise und Diskussionen während der Erstellung der Arbeit und für die kritische Durchsicht des Manuskripts danken.
- Herrn Christian Pütz danke ich besonders herzlich für die hervorragende tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung der Expositionsversuche. Herrn Dr. Lutz Ruprecht danke ich sehr herzlich für die Durchführung der Operationen im Rahmen der EO-Expositionen.
- Bei Frau Brigitte Semder möchte ich mich recht herzlich für die Unterstützung technischer und moralischer Art bei der Anfertigung dieser Arbeit bedanken. Brigitte, die „Flokati-Abbildung“ sei ganz Dir gewidmet ...
- Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe danke ich für die freundschaftliche Atmosphäre und die gute Zusammenarbeit. Besonders sind hier Dr. Christoph Hutzler und Christiana Hofmann hervorzuheben, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen.
- Meinen Kollegen bei Bayer Schering Pharma, insbesondere Prof. Dr. Wilhelm Kuhnz, Dr. Margarete Brudny-Klöppel, Dr. Bernhard Beckermann, Dr. Detlef Stöckigt und Dr. Karsten Denner sei herzlich gedankt für die stete moralische Unterstützung!
- Ganz besonders danke ich Matthias, der immer für mich da war, mich auf vielfältige Weise unterstützt hat und der großen Anteil am Abschluß dieser Arbeit hat!
- Sehr dankbar bin ich schließlich meiner Familie für die uneingeschränkte Unterstützung während all der Jahre! Ohne ihre Hilfe wäre all dies nicht möglich gewesen. Danke!!

Curriculum vitae

Eva Erbach, geboren am 31. Mai 1978 in Saarbrücken.

Seit 10.2006	Wissenschaftliche Mitarbeiterin, Laborleiterin Bioanalytik bei der Bayer Schering Pharma AG, Berlin
04.2003 –	Doktorarbeit unter Anleitung von Prof. Dr. Johannes Filser
03.2003	Abschluß Dipl.-Chem., Universität Würzburg
06.2002 – 03.2003	Diplomarbeit, Institut f. Anorganische Chemie, Universität Würzburg, Prof. Dr. R. Tacke, Thema: Beiträge zur Synthese eines siliciumhaltigen potentiellen CCR1-Rezeptorantagonisten
04.2000–03.2003	Hauptstudium Chemie, Universität Würzburg
03.2000	Vordiplom Chemie, Universität Würzburg
10.1998–03.2000	Grundstudium Chemie, Universität Würzburg
10.1997–09.1998	Grundstudium Chemie, Universität Saarbrücken
1997	Abitur
1989–1997	Gymnasium Marienschule, Saarbrücken
1984–1989	Grundschule am Ordensgut, Saarbrücken