

# TOXIKOLOGISCHE BEWERTUNGEN

**ISBN 0937-4248**

# TOXIKOLOGISCHE BEWERTUNG

Ausgabe 06/00

ISSN 0937-4248

# Isopren

Nr. **105**

CAS-Nr. 78-79-5



**BG Chemie**  
Berufsgenossenschaft der  
chemischen Industrie

ISSN 0937-4248

Die Erstellung der TOXIKOLOGISCHEN BEWERTUNGEN ist nach bestmöglicher Sorgfalt erfolgt, jedoch ist eine Haftung bei fehlerhaften Angaben oder Bewertungen ausgeschlossen.

© Berufsgenossenschaft der chemischen Industrie, Heidelberg

Alle Rechte, insbesondere die der Übersetzung, vorbehalten. Nachdrucke - auch auszugsweise - nur mit ausdrücklicher Genehmigung der Berufsgenossenschaft der chemischen Industrie.

Berufsgenossenschaft der chemischen Industrie  
Postfach 10 14 80, 69004 Heidelberg  
Telefon: 06221 523 (0) 400  
E-Mail: [praevention@bgchemie.de](mailto:praevention@bgchemie.de)  
Internet: [www.bgchemie.de](http://www.bgchemie.de)

# Isopren

Isoprene

## 1 Zusammenfassung und Bewertung

Isopren wird nach inhalativer Applikation mit steigender Konzentration zu immer geringeren Dosisanteilen im Körper bzw. in den Ausscheidungen nachgewiesen. Dies bedeutet, daß mit steigender Konzentration immer geringere Dosisanteile resorbiert und/oder immer größere Anteile unmetabolisiert ausgeschieden werden (Ratte bei einmaliger Inhalation bis zu 95,5 %, Maus bis zu 97,7 %). Es ist gezeigt worden, daß bei der Aktivität der Epoxidhydrolase große Speziesunterschiede existieren, mit geringsten Werten bei der Maus, die mit großer Wahrscheinlichkeit die Ursache für die speziesunterschiedliche Toxizität der Verbindung ist. Bei Mäusen werden nach Inhalation innerhalb von 15 bis 30 Minuten Gleichgewichtsblutspiegel erreicht. Nach Inhalation von radioaktiv markiertem Isopren werden von Ratten und Mäusen 52 bis 75 % der Metaboliten-assoziierten Radioaktivität über den Harn, 6 bis 37 % über die Faeces und 2 bis 20 % über die Expirationsluft ausgeschieden. Nach einmaliger intraperitonealer Applikation von  $^{14}\text{C}$ -Isopren werden von Ratten und Mäusen 47 bis 50 % der applizierten Radioaktivität abgeatmet, über den Urin 29 bis 33 %, über die Faeces 0,3 bis 7,2 % und als  $\text{CO}_2$  1,4 bis 1,9 % ausgeschieden. Unmetabolisiertes Isopren stellt bei Mäusen 94 % der abgeatmeten Radioaktivität dar. Unmetabolisiertes Isopren sowie Metaboliten-assoziierte Radioaktivität sind bei Ratten nach Inhalation von radioaktiv markierter Substanz vorwiegend in der Leber, im Blut und im Fettgewebe nachweisbar. Nach intraperitonealer Injektion von  $^{14}\text{C}$ -Isopren finden sich bei Ratten und Mäusen die höchsten Gewebekonzentrationen in Nieren und Harnblase. Die in vivo entstehenden Metaboliten sind bisher noch nicht abschließend charakterisiert worden. In neueren Untersuchungen sind im Urin von Ratten und Mäusen nach intraperitonealer Injektion von  $^{14}\text{C}$ -Isopren als Hauptmetaboliten 2-Hydroxy-2-methyl-3-butensäure, trans-3-Methyl-2-buten-3,4-diol, das Glukuronsäurekonjugat von trans-3-Methyl-1-buten-3,4-diol sowie ein nicht näher charakterisierter Metabolit nachgewiesen worden. In vitro werden in mikrosomalen Präparationen aus Lebern von Mäusen, Ratten, Syrischen Hamstern, Kaninchen und Mensch als Hauptmetaboliten 3,4-Epoxy-3-methyl-1-

buten sowie in geringerem Umfang 3,4-Epoxy-2-methyl-1-buten nachgewiesen, die durch Epoxidhydrolase zu trans-3-Methyl-1-buten-3,4-diol und trans-2-Methyl-1-buten-3,4-diol hydrolysiert bzw. durch Cytochrom P-450 zum Diepoxid 2-Methyl-1,2,3,4-diepoxybutan oxidiert werden.

Isopren erweist sich nach akuter oraler, dermalen und inhalativer Applikation als gering toxisch ( $LD_{50}$  Ratte oral 2125 mg/kg Körpergewicht;  $LD_{50}$  Ratte dermal > 681 mg/kg Körpergewicht;  $LC_{50}$  Ratte (4 Stunden) > 101000 mg/m<sup>3</sup> (männliche Tiere) bzw. > 98000 mg/m<sup>3</sup> (weibliche Tiere);  $LC_{50}$  Maus (4 Stunden) > 31500 mg/m<sup>3</sup>). Als  $LD_{50}$ -Wert nach intraperitonealer Applikation werden für Ratten 1390 mg/kg Körpergewicht ermittelt. An Symptomen werden Sedation und Atmungsstörungen beobachtet. Eine kumulative Wirkung kann nach 5tägiger oraler Gabe an Ratten nicht nachgewiesen werden. In im Rahmen des US National Toxicology Program (NTP) durchgeführten Vorstudien für subchronische Studien an Ratten und Mäusen hat die Inhalation von Isopren als Dampf über 14 Tage bei männlichen und weiblichen Ratten bis zur höchsten geprüften Konzentration von 7000 ppm (entsprechend 19530 mg/m<sup>3</sup>) zu keinen substanzbedingten Veränderungen geführt. Bei Mäusen ist es nach 14tägiger Inhalation von Isopren als Dampf bei männlichen Tieren in der höchsten Konzentration (7000 ppm) zu einer Beeinträchtigung der Körpergewichtsentwicklung und Veränderungen von Organengewichten (Erhöhung der Lebergewichte, Erniedrigung der Thymus-, Milz- und Hodengewichte) und hämatologischen Parametern (Erniedrigung von Erythrozytenzahl, Hämoglobin-Konzentration und Erythrozyteneinzelvolumen) gekommen. Mikroskopisch sind bei männlichen Mäusen bei 7000 ppm Thymus- und Hodenatrophie und ab 1750 ppm (entsprechend 4883 mg/m<sup>3</sup>) eine Degeneration des olfaktorischen Epithels in den Nasenhöhlen festgestellt worden. In allen untersuchten Konzentrationen (438 bis 7000 ppm) ist bei männlichen und weiblichen Mäusen eine Hyperplasie des Vormagenepithels zu verzeichnen.

An der Kaninchenhaut wirkt Isopren leicht reizend.

Die als Vorstudien für Kanzerogenitätsstudien vom NTP durchgeführte 13wöchige Exposition von Ratten und Mäusen gegenüber Isopren als Dampf in Konzentrationen von 0 (Kontrollen), 70, 220, 700, 2200 oder 7000 ppm (entsprechend 0, 195, 614, 1953, 6138 oder 19530 mg/m<sup>3</sup>) hat bei Ratten zu keinen behandlungsbedingten Veränderungen geführt. Bei weiblichen Mäusen ist es in allen Konzentrationen zu einer Beeinträchti-

gung der Körpergewichtsentwicklung gekommen. Ab 220 ppm ist bei beiden Geschlechtern eine makrozytäre Anämie festgestellt worden. Organ- gewichtsveränderungen sind bei Testes (Erniedrigung ab 2200 ppm), Le- ber (Erhöhung bei männlichen und weiblichen Mäusen bei 7000 ppm), Milz (Erniedrigung ab 220 ppm bei männlichen Mäusen und ab 700 ppm bei weiblichen Mäusen) und Nieren (Erhöhung ab 220 ppm bei weiblichen Mäusen) beobachtet worden. Mikroskopisch sind Veränderungen im Vor- magen (epitheliale Hyperplasie ab 700 ppm), in der Nasenhöhle (Degene- ration des olfaktorischen Epithels bei männlichen Mäusen bei 7000 ppm), in der Leber (hepatozelluläre Hypertrophie ab 2200 ppm) und in den Te- stes (Atrophie der Samenkanälchen bei 7000 ppm) festgestellt worden (Er- gebnisse zur Spermienmotilität und Vaginalzytologie siehe zusammenfas- senden Absatz zur Reproduktionstoxizität).

Im Salmonella/Mikrosomen-Test erweisen sich Isopren sowie die beiden Metaboliten 3,4-Epoxy-3-methyl-1-buten und 3,4-Epoxy-2-methyl-1-buten als negativ, das Diepoxid 2-Methyl-1,2,3,4-diepoxybutan dagegen als posi- tiv. In CHO-Zellen induziert Isopren weder mit noch ohne metabolische Ak- tivierung eine erhöhte Schwester-Chromatid-Austauschrage noch eine er- höhte Inzidenz an Chromosomenaberrationen. In vivo hat Isopren nach wiederholter inhalativer Applikation (12-Tage-Versuch) bei Mäusen einen signifikanten Anstieg der Schwester-Chromatid-Austauschrage im Kno- chenmark gezeigt. Nach wiederholter inhalativer Applikation (12 Tage bis 80 Wochen) ist bei Mäusen in mehreren Studien im peripheren Blut eine erhöhte Anzahl an mikrokernhaltigen Erythrozyten beobachtet worden. An- zeichen einer chromosomenaberrativen Wirkung im Knochenmark haben sich bei Mäusen nach wiederholter 12tägiger Exposition gegenüber Iso- pren nicht ergeben. In Lungenfibroblasten von Ratten sind dagegen nach 4wöchiger inhalativer Applikation keine erhöhten Mikrokernraten festge- stellt worden. In aus Neoplasmen der Harderschen Drüse von Mäusen am- plifizierter DNA ist eine erhöhte Frequenz von Mutationen der K- und H-ras Protoonkogene beobachtet worden. Die Mäuse sind 26 Monate lang ge- genüber Isopren exponiert gewesen. Somit wirkt die Substanz gentoxisch.

Die im Rahmen des NTP durchgeführte 26wöchige Exposition von männli- chen Ratten gegenüber 0 (Kontrollen), 70, 220, 700, 2200 oder 7000 ppm Isopren (entsprechend 0, 195, 614, 1953, 6138 oder 19530 mg/m<sup>3</sup>) hat bei den männlichen Ratten zu signifikanten, aber reversiblen Organgewichts- veränderungen (Leber bei 7000 ppm und Nieren ab 70 ppm erhöht) ge-

führt. In den Testes ist ab 700 ppm am Ende der 26wöchigen Expositionszeit eine erhöhte Inzidenz an Hyperplasien der interstitiellen Zellen beobachtet worden, am Ende einer 26wöchigen Nachbeobachtungsperiode ab 700 ppm eine erhöhte Inzidenz an Adenomen der interstitiellen Zellen. In einer 2-Jahres-Studie an Ratten mit Exposition gegenüber Isopren in Konzentrationen von 0 (Kontrollen), 220, 700 oder 7000 ppm (entsprechend 0, 614, 1953 oder 19530 mg/m<sup>3</sup>) sind bei männlichen Ratten ab 700 ppm erhöhte Inzidenzen an Adenomen der interstitiellen Zellen in den Hoden, an Adenomen und Hyperplasien in den Nierentubuli und an Fibrosen in der Milz sowie in der hohen Konzentration eine erhöhte Inzidenz an Fibroadenomen der Brustdrüse und an Hyperplasien in den Nebenschilddrüsen festgestellt worden. Bei weiblichen Ratten ist ab der untersten geprüften Konzentration von 220 ppm die Inzidenz an Fibroadenomen der Brustdrüse erhöht gewesen. Einige im Gehirn der weiblichen Ratten diagnostizierte Neoplasien, die bei historischen Kontrollen sehr selten oder nie beobachtet worden sind, sind als möglicherweise behandlungsbedingt bewertet worden. Bei männlichen Mäusen hat die 26wöchige Exposition gegenüber Isopren in Konzentrationen von 0 (Kontrollen), 70, 220, 700, 2200 oder 7000 ppm (entsprechend 0, 195, 614, 1953, 6138 oder 19530 mg/m<sup>3</sup>) in der höchsten Konzentration eine Beeinträchtigung der Körpergewichtsentwicklung sowie abnormale Haltung und Paralyse der Hinterextremitäten bewirkt (Ergebnisse zu weitergehenden neurotoxischen Untersuchungen siehe zusammenfassenden Abschnitt zur Neurotoxizität), die reversibel gewesen sind. Ab 2200 ppm ist die Mortalität konzentrationsabhängig erhöht gewesen. Ab 700 ppm sind makrozytäre Anämie und Organgewichtsveränderungen (Erhöhung bei Leber, reversible Erniedrigung bei Testes, irreversible beim Gehirn) festgestellt worden. Am Ende einer 26wöchigen Nachbeobachtungszeit sind bei den Mäusen signifikant erhöhte Tumorinzidenzen in Leber (ab 700 ppm), Lunge (ab 2200 ppm), Vormagen (bei 7000 ppm) und Harderscher Drüse (ab 700 ppm) beobachtet worden. In einer weiteren inhalativen Kanzerogenitätsstudie an weiblichen und männlichen Mäusen mit Isopren-Konzentrationen von 0 (Kontrollen), 10, 70, 140, 280, 700 oder 2200 ppm (entsprechend 0, 28, 195, 391, 781, 1953 oder 6138 mg/m<sup>3</sup>) über 20, 40 oder 80 Wochen sind die Inzidenzen an Adenomen der Harderschen Drüse ab 70 ppm, an hepatozellulären Adenomen ab 140 ppm und an primären alveolären Adenomen und Karzinomen ab 700 ppm signifikant erhöht gewesen. Eine nicht konzentrationsabhängige erhöhte Inzidenz an histiozytären Sarkomen ist ab einer Konzentration von 280 ppm

beobachtet worden. Leicht, aber statistisch nicht signifikant erhöhte Inzidenzen an Plattenepithelzellkarzinomen des Vormagens sowie an Hämangiosarkomen der Milz und des Herzens sind ebenfalls festgestellt worden. Eine Metaplasie des olfaktorischen Epithels ist ab einer Expositionskonzentration von 70 ppm festgestellt worden. Für männliche Ratten und für Mäuse hat sich Isopren somit als eindeutig kanzerogen erwiesen. Bei weiblichen Ratten zeigen sich Hinweise auf eine kanzerogene Wirkung von Isopren.

Bei Exposition trächtiger Ratten an den Tagen 6 bis 19 der Trächtigkeit erweist sich Isopren bis zur höchsten geprüften Konzentration von 7000 ppm (entsprechend 19530 mg/m<sup>3</sup>) weder als maternal- und fetotoxisch noch als teratogen. Bei gegenüber Isopren an den Gestationstagen 6 bis 17 exponierten Mäusen sind ab 1400 ppm maternaltoxische und ab 280 ppm fetotoxische Effekte aufgetreten. Teratogene Effekte sind bis zur höchsten geprüften Dosis von 7000 ppm nicht beobachtet worden. Bei männlichen Mäusen hat die 13wöchige Exposition (siehe 13-Wochen-Studie des NTP) gegenüber 0 (Kontrollen), 70, 700 bzw. 7000 ppm (entsprechend 0, 195, 1953 bzw. 19530 mg/m<sup>3</sup>) ab 700 ppm zu erniedrigten Testes- und Epididymidesgewichten und Atrophie der Samenkanälchen bei 7000 ppm geführt. Spermienkopfzahl, -konzentration sowie -motilität sind ab 700 ppm erniedrigt gewesen. Bei weiblichen Mäusen ist bei 7000 ppm ein signifikant verlängerter Östruszyklus festgestellt worden. Nach 30tägiger intraperitonealer Applikation an Mäuse hat sich Isopren (500 mg/kg Körpergewicht/Tag) als toxisch für die Ovarien erwiesen.

Nach 26wöchiger Exposition (siehe Kanzerogenitätsstudie des NTP) männlicher Mäuse gegenüber Isopren-Konzentrationen von 0 (Kontrollen), 70, 220, 700, 2200 bzw. 7000 ppm (entsprechend 0, 195, 614, 1953, 6138 bzw. 19530 mg/m<sup>3</sup>) hat die Griffstärke von Vorder- und Hinterextremitäten ab einer Konzentration von 220 ppm signifikant unter der der Kontrollen gelegen, ein Befund, der während der 26wöchigen Nachbeobachtungsperiode reversibel gewesen ist. Histopathologisch sind am Ende der Expositionsperiode ab einer Konzentration von 2200 ppm geringgradige degenerative Veränderungen der weißen Substanz des Rückenmarks und bei 7000 ppm des Ischiasnervs beobachtet worden. Am Ende der Nachbeobachtungszeit haben sich in allen Expositionsgruppen eine signifikant erhöhte Inzidenz an degenerativen Veränderungen im Rückenmark gezeigt so-

wie ab 700 ppm gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erniedrigte relative Gehirngewichte.

Isopren bildet bei Ratten und Mäusen nach intraperitonealer bzw. inhalativer Applikation Hämoglobin-Addukte.

Beim Menschen bewirkt die Inhalation von Isopren Schleimhautreizungen. Die Geruchsschwelle wird mit  $10 \text{ mg/m}^3$  angegeben. Isopren ist beim Menschen in einer Vielzahl von Studien als endogen entstehende Substanz nachgewiesen worden, die in der Atemluft abgeatmet worden ist.

## Summary and assessment

*On inhalation administration of increasing concentrations of isoprene, the detectable percentages of dose in the body and the excrements decrease continuously. This means that as the dose increases, less and less of it is absorbed and/or increasing proportions of it are excreted without undergoing biotransformation (rat, on single inhalation: up to 95.5%, mouse: up to 97.7%). It has been demonstrated that there are great interspecies differences with respect to epoxide hydrolase activity, the lowest values being found in the mouse. These differences are very likely to be the underlying reason for the species-related differential toxicity of isoprene. In mice, steady-state blood levels are reached within 15 to 30 minutes of inhalation exposure. On inhalation of radioactively labelled isoprene by rats and mice, between 52 and 75% of metabolite-associated radioactivity is excreted in the urine and between 6 and 37% in the faeces, while 2 to 20% is eliminated in the exhaled air. Upon single intraperitoneal administration of <sup>14</sup>C-labelled isoprene to rats and mice, elimination of the administered radioactivity is as follows: 47 to 50% in the exhaled air, 29 to 33% in the urine, 0.3 to 7.2% in the faeces and 1.4 to 1.9% in the form of CO<sub>2</sub>. In mice, unchanged isoprene accounts for 94% of the exhaled radioactivity. On inhalation of the radioactively labelled chemical by rats, unchanged isoprene as well as metabolite-associated radioactivity are predominantly found in the liver, blood and adipose tissue. In rats and mice, the highest tissue concentrations following intraperitoneal injection of <sup>14</sup>C-labelled isoprene are present in the kidneys and the urinary bladder. The metabolites formed in vivo have not yet been fully characterised. In more recent studies in rats and mice, the major urinary metabolites of isoprene found after intraperitoneal injection of <sup>14</sup>C-labelled isoprene have been identified as 2-hydroxy-2-methyl-3-butenic acid, trans-3-methyl-2-butene-3,4-diol, the glucuronide conjugate of trans-3-methyl-1-butene-3,4-diol and a metabolite which was not further characterised. In vitro the major metabolites to have been identified in microsomal preparations from mouse, rat, Syrian hamster, rabbit and human liver are 3,4-epoxy-3-methyl-1-butene and to a lesser extent 3,4-epoxy-2-methyl-1-butene, which are hydrolysed by the enzyme, epoxide hydrolase, to trans-3-methyl-1-butene-3,4-diol and trans-2-methyl-1-butene-3,4-diol, or oxidised by cytochrome P-450 to form the diepoxide, 2-methyl-1,2,3,4-diepoxabutane.*

*Isoprene has been shown to be of low toxicity following acute oral administration, dermal application and inhalation exposure (LD<sub>50</sub> rat oral 2125 mg/kg body weight; LD<sub>50</sub> rat dermal > 681 mg/kg body weight; LC<sub>50</sub> rat (4 hours) > 101000 mg/m<sup>3</sup> (males) and > 98000 mg/m<sup>3</sup> (females); LC<sub>50</sub> mouse (4 hours) > 31500 mg/m<sup>3</sup>). The LD<sub>50</sub> value determined in rats after intraperitoneal administration is 1390 mg/kg body weight. The clinical signs of toxicity observed include sedation and impaired breathing. No cumulative effect is detectable after 5-day oral administration to rats. In the preliminary studies to subchronic toxicity studies in rats and mice conducted as part of the U.S. National Toxicology Program (NTP), inhalation by male and female rats of vaporous isoprene for 14 days did not result in any substance-related changes up to the highest test concentration of 7000 ppm (equivalent to 19530 mg/m<sup>3</sup>). Male mice subjected to 14-day inhalation of vaporous isoprene showed retarded body weight development and changes in organ weights (increase in liver weights, decreases in thymus, spleen and testicular weights) and haematology parameters (decreases in red blood cell count, haemoglobin concentration and erythrocyte mean corpuscular volume) at the highest concentration (7000 ppm). Microscopic findings in male mice exposed to 7000 ppm included thymic and testicular atrophy, and at levels of 1750 ppm (equivalent to 4883 mg/m<sup>3</sup>) or higher, olfactory epithelial degeneration in the nasal cavities was detected. At all test concentrations (438 to 7000 ppm), epithelial hyperplasia of the forestomach was seen in male and female mice alike.*

*Isoprene has a mildly irritating effect on the skin of the rabbit.*

*In the preliminary studies to the carcinogenicity studies conducted within the NTP framework, 13-week exposure of rats and mice to isoprene vapour at concentrations of 0 (controls), 70, 220, 700, 2200 and 7000 ppm (equivalent to 0, 195, 614, 1953, 6138 and 19530 mg/m<sup>3</sup>) did not lead to treatment-related changes in rats. The female mice exhibited impairment of body weight gain at all concentrations. At levels of 220 ppm or higher, macrocytic anaemia was found in both sexes. Changes in organ weight were observed in the testes (decrease, from 2200 ppm), the liver (increase in male and female mice at 7000 ppm), the spleen (decrease, from 220 ppm in male mice and from 700 ppm in female mice) and the kidneys (increase, from 220 ppm in female mice). Microscopic examination revealed changes in the forestomach (epithelial hyperplasia, from 700 ppm), in the nasal cavity (olfactory epithelial degeneration in male mice at 7000 ppm), the liver (hepa-*

tocellular hypertrophy, from 2200 ppm) and the testes (seminiferous tubule atrophy at 7000 ppm). (The results on sperm motility and vaginal cytology are summarised below in the paragraph on reproductive toxicity.)

In the Salmonella/microsome assay, isoprene and its two metabolites, 3,4-epoxy-3-methyl-1-butene and 3,4-epoxy-2-methyl-1-butene, gave negative results, whereas the diepoxide, 2-methyl-1,2,3,4-diepoxbutane, tested positive. In CHO cells isoprene induces no increase in either the frequency of sister chromatid exchange or the incidence of chromosome aberrations, either in the absence or the presence of metabolic activation. In vivo, repeated inhalation administration of isoprene (12-day study) has been shown to cause a significant increase in the frequency of sister chromatid exchange in the bone marrow of mice. On repeated inhalation exposure of mice (12 days to 80 weeks) in several studies, increased counts of micronucleated erythrocytes have been observed in peripheral blood. Following repeated 12-day exposure to isoprene, no indications have been found of any potential to produce chromosome aberrations in the bone marrow of mice. In rats, no increased frequency of micronuclei in lung fibroblasts was detected after 4 weeks of inhalation administration. In amplified DNA from Harderian gland neoplasms of mice, an increase in the frequency of K-ras and H-ras proto-oncogene mutations has been observed. The mice were exposed to isoprene for 26 months. Hence, the chemical is genotoxic.

In the 26-week NTP study, exposure of male rats to isoprene at levels of 0 (controls), 70, 220, 700, 2200 and 7000 ppm (equivalent to 0, 195, 614, 1953, 6138 and 19530 mg/m<sup>3</sup>) resulted in significant, but reversible, changes in organ weight (liver at 7000 ppm and kidneys from 70 ppm). At the end of the 26-week exposure period an increased incidence of interstitial cell hyperplasia of the testes was observed at levels of 700 ppm and above, and after a 26-week post-exposure observation period the incidence of interstitial cell adenomas was increased at 700 ppm and higher. In a 2-year study in rats exposed to isoprene concentrations of 0 (controls), 220, 700 and 7000 ppm (equivalent to 0, 614, 1953 and 19530 mg/m<sup>3</sup>), the male rats showed increased incidences of interstitial cell adenomas of the testes, of renal tubule adenomas and renal tubule hyperplasia, and of splenic fibrosis at 700 ppm and higher; at the top concentration, increased incidences of mammary gland fibroadenoma and of hyperplasia of the parathyroid gland were seen. In female rats all test concentrations, 220 ppm and higher, were

associated with an increased incidence of mammary gland fibroadenomas. In the brains of the female rats a number of neoplasms, which were very rarely or never seen in historical controls, were diagnosed and assessed as being possibly related to treatment. In male mice, the 26-week exposure to isoprene levels of 0 (controls), 70, 220, 700, 2200 and 7000 ppm (equivalent to 0, 195, 614, 1953, 6138 and 19530 mg/m<sup>3</sup>) affected body weight gain at the highest concentration as well as causing abnormal posture and hindlimb paralysis, both of which were reversible. (A more detailed summary is given below in the paragraph on neurotoxicity studies.) Mortality was concentration-dependently increased from 2200 ppm. At levels of 700 ppm and above, macrocytic anaemia and changes in organ weights (increased liver weights, reversibly decreased testicular weights, irreversibly decreased brain weights) were observed. At the end of a 26-week observation period, the mice were observed to have significantly increased incidences of tumours of the liver (from 700 ppm), the lung (from 2200 ppm), the forestomach (at 7000 ppm) and the Harderian gland (from 700 ppm). In a further inhalation carcinogenicity study in female and male mice exposed to isoprene concentrations of 0 (controls), 10, 70, 140, 280, 700 2200 ppm (equivalent to 0, 28, 195, 391, 781, 1953 and 6138 mg/m<sup>3</sup>) for 20, 40 or 80 weeks, significant increases were seen in incidences of Harderian gland adenomas at 70 ppm and higher, hepatocellular adenomas at 140 ppm and higher, and primary alveolar adenomas and carcinomas at 700 ppm and higher. A concentration-independent increase in the incidence of histiocytic sarcoma was observed at a concentration of 280 ppm and higher. Slight, but not statistically significant, increases in the incidences of squamous cell carcinoma of the forestomach as well as of haemangiosarcomas in the spleen and heart have also been detected. Metaplasia of the olfactory epithelium has been observed at exposure levels of 70 ppm and above. In male rats and mice, isoprene has thus unequivocally been demonstrated to be a carcinogen. In female rats, there is evidence to suggest that isoprene has a carcinogenic potential.

In pregnant rats, exposure to isoprene on days 6 to 19 of gestation has not been found to cause maternal toxicity, foetotoxicity and teratogenicity up to the highest test concentration of 7000 ppm (equivalent to 19530 mg/m<sup>3</sup>). Mice exposed to isoprene on days 6 to 17 of gestation have shown toxicity in the mothers and foetuses from 1400 ppm and 280 ppm, respectively. Teratogenic effects have not been observed up to and including the highest

test dose of 7000 ppm. In male mice, 13-week exposure (see 13-week NTP study) to 0 (controls), 70, 700 and 7000 ppm (equivalent to 0, 195, 1953 and 19530 mg/m<sup>3</sup>) resulted in decreased testicular and epididymal weights at 700 ppm and higher and caused atrophy of the seminiferous tubules at 7000 ppm. Sperm head count, sperm concentration as well as sperm motility were decreased at levels of 700 ppm and above. Female mice exposed to 7000 ppm exhibited a significant increase in oestrous cycle length. Following 30-day intraperitoneal administration to mice, isoprene (500 mg/kg body weight/day) proved to be toxic to the ovaries.

Following 26-week exposure (see NTP carcinogenicity study) of male mice to isoprene concentrations of 0 (controls), 70, 220, 700, 2200 and 7000 ppm (equivalent to 0, 195, 614, 1953, 6138 and 19530 mg/m<sup>3</sup>), forelimb and hindlimb grip strengths of animals exposed to levels of 220 ppm and above was significantly less than those of the control group, a finding which was reversible within the 26-week post-exposure observation period. Histopathology at the end of the exposure period revealed low-grade degenerative changes in the white matter of the spinal cord at concentrations of 2200 ppm and higher, and of the sciatic nerve at 7000 ppm. At the end of the observation period, all exposure groups exhibited a significantly increased incidence of spinal cord degeneration, and at 700 ppm and higher, relative brain weights were significantly decreased as compared with the control group.

In rats and mice, isoprene forms haemoglobin adducts following intraperitoneal and inhalation administration.

In humans, inhalation of isoprene causes mucous membrane irritation. The odour threshold concentration is given as 10 mg/m<sup>3</sup>. Numerous studies in humans have identified isoprene as a substance which is formed endogenously and subsequently eliminated in the exhaled air.

## 2 Stoffname

|     |               |                       |
|-----|---------------|-----------------------|
| 2.1 | Gebrauchsname | Isopren               |
| 2.2 | IUPAC-Name    | 2-Methyl-1,3-butadien |
| 2.3 | CAS-Nr.       | 78-79-5               |
| 2.4 | EINECS-Nr.    | 201-143-3             |

## 3 Synonyme, Trivial- und Handelsnamen

1,3-Butadiene, 2-methyl-  
Hemiterpene  
Isopentadiene  
Isoprene  
 $\beta$ -Methylbivinyll  
 $\beta$ -Methyl bivinyll  
2-Methyl bivinyll  
Methylbutadien-1,3  
2-Methylbutadiene  
2-Methyl-1,3-butadiene  
2-Methylbuta-1,3-diene  
2-Methyldivinyll  
2-Methylethene

## 4 Struktur- und Summenformel



|     |              |                        |
|-----|--------------|------------------------|
| 4.2 | Summenformel | $\text{C}_5\text{H}_8$ |
|-----|--------------|------------------------|

## 5 Physikalisch-chemische Eigenschaften

|     |                       |          |                             |
|-----|-----------------------|----------|-----------------------------|
| 5.1 | Molekularmasse, g/mol | 68,12    |                             |
| 5.2 | Schmelzpunkt, °C      | - 146    | (EC, 1996)                  |
|     |                       | - 145,9  | (Lide und Frederikse, 1996) |
|     |                       | - 145,96 | (Weitz und Löser, 1989)     |

|     |  |  |
|-----|--|--|
| 5.3 | Siedepunkt, °C                         | 34 (bei 1013 hPa) (EC, 1996)<br>34,0 (bei 1013 hPa) (Lide und Frederikse, 1996)<br>34,059 (bei 1013 hPa) (Weitz und Löser, 1989)   |
| 5.4 | Dampfdruck, hPa                        | 98 (bei - 20 °C) (Weitz und Löser, 1989)<br>133 (bei - 16 °C) (EC, 1996)<br>264 (bei 0 °C) (Lide und Frederikse, 1996; Weitz und Löser, 1989)<br>405 (bei 10 °C) (Hoechst, 1995)<br>533 (bei 15,4 °C) (EC, 1996)<br>607 (bei 20 °C) (Weitz und Löser, 1989)<br>618 (bei 21 °C) (Hoechst, 1995)<br>734 (bei 25 °C) (Lide und Frederikse, 1996)<br>793 (bei 21 °C) (EC, 1996)<br>1013 (bei 34,059 °C) (Weitz und Löser, 1989)<br>1238 (bei 40 °C) (Weitz und Löser, 1989)<br>1621 (bei 49 °C) (Hoechst, 1995)<br>2291 (bei 60 °C) (Weitz und Löser, 1989)<br>3921 (bei 80 °C) (Weitz und Löser, 1989)<br>6295 (bei 100 °C) (Weitz und Löser, 1989) |
| 5.5 | Dichte, g/cm <sup>3</sup>              | 0,681 (bei 20 °C) (EC, 1996)<br>0,679 (bei 20 °C) (Lide und Frederikse, 1996)<br>0,68095 (Weitz und Löser, 1989)<br>0,69 (bei 20 °C) (Hoechst, 1995)   |
| 5.6 | Löslichkeit in Wasser                  | 0,3 g/l (bei 20 °C) (Shell, 1993; Hoechst, 1995)<br>0,38 g/l (bei 20 °C) (EC, 1996)<br>0,029 mol% (0,29 mol/l; bei 20 °C) (Weitz und Löser, 1989)  |
| 5.7 | Löslichkeit in organischen Lösemitteln | in jedem Verhältnis mischbar mit Ethanol, Diethylether, Aceton, Benzol (Weitz und Löser, 1989; Lide und Frederikse, 1996)  |

|      |                     |   |
|------|---------------------|---|
| 5.8  | Löslichkeit in Fett | Verteilungskoeffizient n-Octanol/Wasser<br>log P <sub>ow</sub> : 3,2 - 4,5 (bei 20 ° C; gemessen)<br>(EC, 1996)<br>log P <sub>ow</sub> : 2,35 (Hoechst, 1995)                             |
| 5.9  | pH-Wert             | -   |
| 5.10 | Umrechnungsfaktor   | 1 ml/m <sup>3</sup> (ppm) $\underline{\underline{=}}$ 2,79 mg/m <sup>3</sup><br>1 mg/m <sup>3</sup> $\underline{\underline{=}}$ 0,358 ml/m <sup>3</sup> (ppm)<br>(bei 1013 hPa und 25 °C) |

## 6 Herstellung, Produktionsmenge und Verwendung

### 6.1 Herstellung

Synthese aus Isobuten (BG-Nr. 104) und Formaldehyd, Methanol oder Kohlenmonoxid, z. B. Prins-Reaktion; Codimerisierung von Ethylen und Propen in Gegenwart von Triethylaluminium zu 2-Methyl-1-buten, das zu Isopren dehydriert wird; Dimerisierung von Propen zu 2-Methyl-1-penten mit anschließender Isomerisierung zu 2-Methyl-1-penten, das zu Methan und Isopren aufgespalten wird; eine Buten-Fraktion mit 2-Buten und Isobuten ergibt Propen und 2-Methyl-2-buten, das zu Isopren dehydriert wird; Dehydrierung von Isopentan oder Methylbutenen; Gewinnung aus C<sub>5</sub>-Crack-Fractionen (Weitz und Löser, 1989).

### 6.2 Hergestellte oder eingeführte Menge

> 1000 t/Jahr (VCI, 1988).

### 6.3 Verwendung

Zur Synthese von Poly(cis-1,4-isopren) (isoprene rubber, IR, Autoreifenproduktion); zur Herstellung von Styrol-Isopren-Styrol- (SIS) Blockcopolymeren und Butylgummi (isobutene-isoprene rubber, IIR, Copolymerisat mit Isobuten); zur Herstellung von Kohlenwasserstoffharzen (Erdölharzen); zur Synthese von Terpenen (Weitz und Löser, 1989).

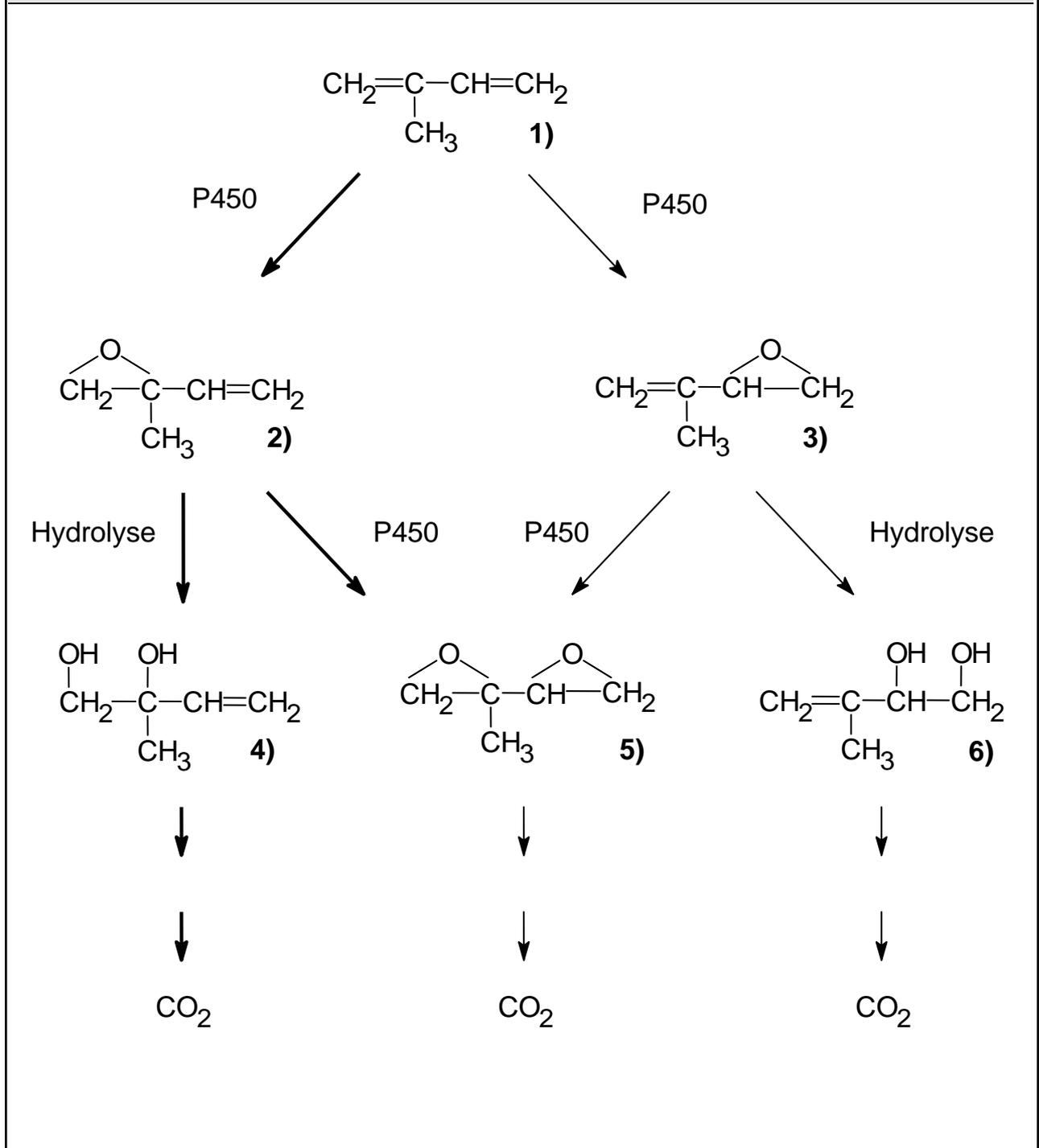
## 7 Experimentelle Befunde

### 7.1 Toxikokinetik und Metabolismus

#### *In vitro*

Mikrosomale Präparationen aus Lebern männlicher Swiss-Mäuse (100 mg Phenobarbital/kg Körpergewicht intraperitoneal an 3 aufeinanderfolgenden Tagen oder 80 mg 3-Methylcholanthren einmalig intraperitoneal 48 Stunden vor der Präparation), Wistar-Ratten, Syrischer Hamster und Neuseeland-Kaninchen (0,1 % Phenobarbital im Trinkwasser über 7 Tage) wurden mit 100 µl einer 0,5 M methanolischen Lösung von Isopren bei 37 °C inkubiert. Die Bestimmung der entstehenden Metaboliten erfolgte gaschromatographisch. Die mikrosomalen Monooxygenasen metabolisierten Isopren zu den entsprechenden Monoepoxiden (siehe Abbildung 1). Die Reaktion war NADPH- und O<sub>2</sub>-abhängig und wurde durch Inhibitoren von Cytochrom P-450, wie Kohlenmonoxid, SKF 525-A und Metapyron, gehemmt. Bereits einige Minuten nach Inkubationsbeginn konnte als Hauptmetabolit 3,4-Epoxy-3-methyl-1-buten nachgewiesen werden, das weiter zu trans-3-Methyl-1-buten-3,4-diol hydrolysiert wurde. In geringerem Umfang entstand 3,4-Epoxy-2-methyl-1-buten (Ratte 25 %, Maus 20 %, Hamster 17 %, Kaninchen 14 % der Menge an 3,4-Epoxy-3-methyl-1-buten), das weiter zu trans-2-Methyl-1-buten-3,4-diol hydrolysiert wurde. Zudem konnte nachgewiesen werden, daß aus 3,4-Epoxy-2-methyl-1-buten auch das mutagene Diepoxid 2-Methyl-1,2,3,4-diepoxibutan (siehe Kapitel 7.6.1; Gervasi et al., 1985) entstehen kann. Die Epoxidierungen folgten der Michaelis-Menten-Kinetik. Die Enzyminduktion bei Maus und Kaninchen durch Phenobarbital oder 3-Methylcholanthren hatte keinen Einfluß auf die kinetischen Parameter (Del Monte et al., 1985; Longo et al., 1985; Gervasi und Longo, 1990).

Abbildung 1. Metabolismus von Isopren



1) Isopren

2) 3,4-Epoxy-3-methyl-1-buten

3) 3,4-Epoxy-2-methyl-1-buten

→ primäre Verstoffwechslung

4) trans-3-Methyl-1-buten-3,4-diol

5) 2-Methyl-1,2,3,4-diepoxybutan

6) trans-2-Methyl-1-buten,3,4-diol

→ sekundäre Verstoffwechslung

Weiterhin wurde der Metabolismus von Isopren (Reinheitsgrad 99 %) in vitro in Inkubationsansätzen mit Mikrosomen aus transfizierten Zelllinien (AHH-1 TK+/-Humanlymphoblastoid-Zelllinien), die die humanen Cytochrome P-450, 1A1, 1A2, 2A6, 2B6, 2C9, 2D6, 2E1 oder 3A4 exprimieren und keine nachweisbare Epoxidhydrolase-Aktivität aufweisen, und in Mikrosomen aus Human-, Maus- und Rattenleber untersucht. Die Bildung der Monoepoxide 3,4-Epoxy-3-methyl-1-buten und 3,4-Epoxy-2-methyl-1-buten und des Diepoxids 2-Methyl-1,2,3,4-diepoxybutan wurde gaschromatographisch nachgewiesen. Jeweils 600 µM Isopren oder Monoepoxid wurden mit mikrosomalen Proteinkonzentrationen von ca. 1 mg/ml ( $V_{max}$ -Bedingungen) bei 37 °C 15 Minuten lang inkubiert. Cytochrom P-450 2E1 zeigte die höchste Bildungsrate für 3,4-Epoxy-3-methyl-1-buten und 3,4-Epoxy-2-methyl-1-buten (259 bzw. 30 pmol/Minute x mg mikrosomales Protein), gefolgt von Cytochrom P-450 2B6 (75 bzw. < 14 µmol/Minute x mg mikrosomales Protein). Die Bildungsrate von 3,4-Epoxy-3-methyl-1-buten war somit 5- bis 8mal höher als die von 3,4-Epoxy-2-methyl-1-buten. Cytochrom P-450 2E1 war das einzige der Enzyme, das eine nachweisbare Bildung des Diepoxids zeigte. Beide Monoepoxide wurden durch Cytochrom P-450 2E1 mit ähnlichen Raten zum Diepoxid oxidiert (178 bzw. 107 pmol/Minute x mg mikrosomales Protein). Um die Rolle von Cytochrom P-450 2E1 im Lebermetabolismus zu untersuchen, wurden Isopren sowie die beiden Monoepoxide mit Humanlebermikrosomen inkubiert. In den Humanlebermikrosomen war die Bildungsrate des 3,4-Epoxy-3-methyl-1-butens ca. 4mal höher als die Bildungsrate des 3,4-Epoxy-2-methyl-1-butens. Beide Monoepoxide zeigten ähnliche Raten für die Bildung von 2-Methyl-1,2,3,4-diepoxybutan. Die Bildungsraten der Monoepoxide und des Diepoxids waren signifikant mit der Aktivität des Cytochrom P-450 2E1 korreliert. In Anwesenheit eines Epoxidhydrolase-Inhibitors (Cyclohexenoxid) wurden in Maus- (CD-1, B6C3F1), Ratten- (Wistar) und Humanlebermikrosomen sehr ähnliche Monoepoxid-Mengen analysiert, wobei die Menge an 3,4-Epoxy-3-methyl-1-buten 2,2- (Ratte) bis 3,3mal (Mensch) höher lag als an 3,4-Epoxy-2-methyl-1-buten. Ohne Epoxidhydrolase-Inhibitor ergaben sich jedoch auffallende Unterschiede zwischen den Spezies. Während in den Mäuselebermikrosomen ähnliche Monoepoxid-Mengen nachgewiesen wurden wie in Anwesenheit des Inhibitors, ergaben sich bei Ratten- und besonders Humanlebermikrosomen viel geringere Mengen an 3,4-Epoxy-3-methyl-1-buten und 3,4-Epoxy-2-methyl-1-buten (ca. 50 bzw. 4 % und ca. 70 bzw. 25 % der in Anwesenheit des Inhibitors analysierten Monoepoxide). Die nachge-

wiesenen Monoepoxid-Mengen waren bei den Mäuselebermikrosomen doppelt so hoch wie bei den Rattenlebermikrosomen und 15mal höher als bei den Humanlebermikrosomen. In den Ansätzen mit den Maus-, Ratten- und Humanlebermikrosomen wurden aus beiden Monoepoxiden ähnliche Diepoxid-Mengen gebildet (CD-1-Maus 1210 bzw. 886, B6C3F1-Maus 806 bzw. 967, Wistar-Ratte 1150 bzw. 1360, Mensch 780 bzw. 666 pmol/Minute x nmol P-450). In dieser Arbeit wurde nachgewiesen, daß auch 3,4-Epoxy-3-methyl-1-buten weiter zum Diepoxid oxidiert werden kann. Es wurde außerdem gezeigt, daß bei der die Epoxide hydrolysierenden Epoxidhydrolyase große Speziesunterschiede zu verzeichnen sind, die mit großer Wahrscheinlichkeit die Ursache für die speziesunterschiedliche Toxizität der Verbindung ist. Nach den Autoren fehlen bei Mäusen ausreichende Mengen an Epoxidhydrolyase, um die Monoepoxide schnell abzubauen (Bogaards et al., 1996, 1997).

In in vitro-Untersuchungen zur Stereoselektivität des Isopren-Metabolismus mit Lebermikrosomen von männlichen F344-Ratten und B6C3F1-Mäusen wurde oben beschriebenes Metabolismusschema bestätigt. Isopren wurde durch Cytochrom P-450 zu den isomeren Monoepoxiden 3,4-Epoxy-2-methyl-1-buten und 3,4-Epoxy-3-methyl-1-buten mit leichter, aber unterschiedlicher Produktenantioselektivität epoxidiert. Nur in den Versuchen mit Mäuselebermikrosomen wurde eine deutliche Regioselektivität beobachtet. Beide Monoepoxide wurden weiter zu 2-Methyl-1,2,3,4-diepoxybutan mit Substratenantioselektivität, Produktdiastereoselektivität und Produktenantioselektivität epoxidiert. Die Epoxidhydrolyase-katalysierte Hydrolyse durch Ratten- und Mäuselebermikrosomen erfolgte mit Substratenantioselektivität. Während (R)-3,4-Epoxy-2-methyl-1-buten bevorzugt mit Glutathion konjugierte, katalysiert durch die Glutathion-S-Transferase, fand bei 3,4-Epoxy-3-methyl-1-buten keine enantiomerendifferenzierte Konjugation statt (Wistuba et al., 1994).

In einer weiteren Untersuchung zur Stereochemie des Isopren-Metabolismus wurden die Lebermikrosomen verschiedener Spezies (männliche und weibliche Sprague-Dawley-Ratten, männliche Wistar-Ratten, männliche B6C3F1-Mäuse, männliche Neuseeland-Kaninchen, weibliche Beagle-Hunde, Affen, männliche und weibliche Humanspender) mit 0,30 mmol Isopren (entsprechend 20 mg) 30 Minuten lang bei 37 °C inkubiert. Um erhöhte Cytochrom P-450 2E1-, 1A1- oder 2B-Konzentrationen zu erhalten, wurden auch Lebermikrosomen von mit Pyrazol,  $\beta$ -Naphthoflavon oder Phenobar-

bital induzierten männlichen Wistar-Ratten eingesetzt. Kontrollinkubationsansätze wurden ohne NADPH (Nicotinamidadenindinucleotidphosphat), mit durch Hitze inaktivierten Lebermikrosomen, ohne Mikrosomen oder ohne Zugabe der Testsubstanz durchgeführt. Um die enzymatische Hydrolyse der Monoepoxide durch die Epoxidhydrolase zu hemmen, wurde 1,1,1-Trichlorpropylenoxid zugegeben. Nach der Inkubation wurden die entstehenden Monoepoxid-Isomeren mit Hilfe der Headspace- (Dampfraum) Gaschromatographie bestimmt. In allen mikrosomalen Inkubationen war das Isomer 3,4-Epoxy-3-methyl-1-buten der Hauptmetabolit. Aufgrund seiner geringen Flüchtigkeit war es nicht möglich, 2-Methyl-1,2,3,4-diepoxybutan mit der Headspace-Technik nachzuweisen. Die Analyse der von den Lebermikrosomen männlicher Wistar-Ratten erzeugten Monoepoxide zeigte, daß das S-Enantiomer von 3,4-Epoxy-3-methyl-1-buten überwog mit einem R : S-Enantiomeren-Verhältnis von 45 : 55. In den anderen Inkubationsansätzen konnte das Enantiomeren-Verhältnis von 3,4-Epoxy-3-methyl-1-buten aufgrund technischer Probleme nicht genauer definiert werden. Die größte Menge an 3,4-Epoxy-2-methyl-1-buten entstand in den Lebermikrosomen männlicher Wistar-Ratten (siehe Tabelle 1). Die Verhältnisse des R- und S-Enantiomers von 3,4-Epoxy-2-methyl-1-buten bei den verschiedenen Spezies sind in Tabelle 1 dargestellt.

Anfang Tabelle 1

| <b>Tabelle 1. Verhältnis (R : S) und Mengen (R + S) von 3,4-Epoxy-2-methyl-1-buten in Inkubationsansätzen mit Lebermikrosomen verschiedener Spezies</b> |                    |                        |
|---|--------------------|------------------------|
| Spezies (Stamm, Geschlecht)   | Verhältnis (R : S) | relative Menge (R + S) |
| Ratte (Wistar, männlich)  | 33 : 67 (n = 6)    | 100*                   |
| Ratte (Wistar, männlich, Cytochrom P-450 2E1-induziert)   | 35 : 65 (n = 2)    | 64                     |
| Ratte (Wistar, männlich, Cytochrom P-450 2B-induziert)  | 40 : 60 (n = 2)    | 86                     |
| Ratte (Wistar, männlich, Cytochrom P-450 1A1-induziert)   | 33 : 67 (n = 2)    | 36                     |
| Ratte (Sprague-Dawley, weiblich)  | 50 : 50 (n = 4)    | 18                     |
| Ratte (Sprague-Dawley, männlich)  | 36 : 64 (n = 4)    | 58                     |
| Maus (B6C3F1, männlich)   | 50 : 50 (n = 3)    | 67                     |
| Kaninchen (Neuseeland, männlich)  | 50 : 50 (n = 4)    | 37                     |

| <b>Tabelle 1. Verhältnis (R : S) und Mengen (R + S) von 3,4-Epoxy-2-methyl-1-buten in Inkubationsansätzen mit Lebermikrosomen verschiedener Spezies</b> |                    |                        |
|---|--------------------|------------------------|
| Spezies (Stamm, Geschlecht)   | Verhältnis (R : S) | relative Menge (R + S) |
| Hund (Beagle, weiblich)   | 57 : 43 (n = 4)    | 76                     |
| Affe (männlich)   | 57 : 43 (n = 4)    | 46                     |
| Mensch (männlich, ein Spender)  | 55 : 45 (n = 2)    | 19                     |
| Mensch (männlich, 7 Spender gepoolt)  | 54 : 46 (n = 2)    | 38                     |
| Mensch (weiblich, 7 Spender gepoolt)  | 50 : 50 (n = 2)    | 27                     |
| * entspricht 4,2 nmol/mg Protein/Minute   |                    |                        |

Ende Tabelle 1

Die Verhältnisse der R- und S-Enantiomeren von 3,4-Epoxy-2-methyl-1-buten unterschieden sich bei Ratte und Maus sowie bei den beiden Geschlechtern bei Ratten signifikant. So zeigten die Lebermikrosomen von B6C3F1-Mäusen und von weiblichen Sprague-Dawley-Ratten keine stereochemische Präferenz, während bei den männlichen Sprague-Dawley-Ratten mit einem R : S-Verhältnis von 36 : 64 (siehe Tabelle 1) eine Präferenz des S-Enantiomers zu erkennen war. Ähnliche Verhältnisse zeigten sich bei den Mikrosomen der männlichen Wistar-Ratten. Die Induktion der verschiedenen Cytochrom P-450-Isoenzyme hatte keinen Einfluß auf das Enantiomeren-Verhältnis. Auch bei den Kaninchen zeigte sich keine bevorzugte Entstehung eines Enantiomers. Beim Hund und beim Affen überwog das R-Enantiomer (57 : 43) leicht. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich in den Versuchsansätzen mit den Humanlebermikrosomen. Nach den Autoren ist die Relevanz dieser Ergebnisse für die Toxikologie von Isopren noch nicht bekannt (Small et al., 1997).

Die Verteilungskoeffizienten für Isopren (Reinheitsgrad > 98 %) zwischen physiologischer Kochsalzlösung, Olivenöl, Blut und Homogenaten von Fett-, Leber- und Muskelgewebe männlicher Sprague-Dawley-Ratten (200 bis 300 g schwer) und Luft wurden dampfraumgaschromatographisch ermittelt. Die Testsubstanzkonzentrationen zu Versuchsbeginn betragen ca. 200 bis 400 ppm (keine weiteren Angaben). Die Inkubation der Gefäße erfolgte bei 37 °C 1 oder 3 Stunden lang (keine weiteren Angaben). Es wurden die folgenden Verteilungskoeffizienten ermittelt: physiologische Kochsalzlösung : Luft  $0,21 \pm 0,02$ ; Olivenöl : Luft  $8,81 \pm 0,15$ ; Blut : Luft  $1,87 \pm 0,10$ ;

Fett : Luft  $72,0 \pm 2,4$ ; Leber : Luft  $3,12 \pm 0,87$ ; Muskel : Luft  $2,04 \pm 0,27$  (Gargas et al., 1989).

Weiterhin wurden die Verteilungskoeffizienten von 99 % reinem Isopren mit Blut von Maus, Ratte und Mensch und Gewebeproben männlicher Sprague-Dawley-Ratten (Fett, Muskel, Leber, Nieren) mit Hilfe der Headspace-Technik bei 37 °C ermittelt. Der Verteilungskoeffizient Blut : Luft betrug bei Mäusen  $2,4 \pm 0,47$  (n = 6), bei Ratten  $2,33 \pm 0,64$  (n = 5) und beim Menschen  $0,75 \pm 0,08$  (n = 8). Für die Gewebe von Ratten wurden folgende Verteilungskoeffizienten ermittelt: Fett : Luft  $61,5 \pm 15,4$  (n = 3), Muskel : Luft  $1,48 \pm 0,05$  (n = 3), Leber : Luft  $1,93 \pm 0,79$  (n = 3) und Niere : Luft  $1,07 \pm 2,43$  (n = 2). Die Unterschiede der Verteilungskoeffizienten Blut : Luft bei Nagetieren und Menschen beruhen nach den Autoren auf unterschiedlichen Affinitäten von Blutproteinen zu flüchtigen lipophilen organischen Substanzen (Filser et al., 1996). Zum Einfluß der Blutfette wurden keine Aussagen gemacht.

### ***In vivo***

Je 30 männliche F344-Ratten (11 bis 13 Wochen alt, 190 bis 250 g schwer) wurden gegenüber  $^{14}\text{C}$ -Isopren (Reinheitsgrad > 99 %) in Konzentrationen von 8, 266, 1480 und 8200 ppm 6 Stunden lang (bei 8200 ppm nur 5,5 Stunden lang; entsprechend 22, 742, 4129 bzw. 22878 mg/m<sup>3</sup>) Kopf-Nasen-exponiert. Bei 5 Tieren/Gruppe wurden in einem Plethysmographen Atemminutenvolumen, Atemzugvolumen und Atemfrequenz bestimmt. Nach Expositionsende wurden die Tiere getötet und der  $^{14}\text{C}$ -Gehalt im Körper bestimmt. Bei 4 Tieren/Gruppe wurden der Gehalt an  $^{14}\text{C}$  in Harn und Faeces 9, 18, 24, 30, 42, 54 und 66 Stunden nach Expositionsende, in der Expirationsluft 9, 18, 36 und 54 Stunden nach Expositionsende bestimmt. Am Ende der 66stündigen Nachbeobachtungsperiode wurde die restliche Radioaktivität im Körper ermittelt. Während der Exposition wurden je 3 Tiere/Gruppe nach 20, 120 oder 360 (bzw. 330) Minuten getötet und das Blut mit Hilfe der Vakuumkryodestillation (vacuum line-cryogenic distillation) hinsichtlich entstandener Metaboliten untersucht. Dieses Verfahren ermöglicht, Verbindungen aufgrund ihres Siedepunktes zu fraktionieren. Die Metaboliten im Gewebe (Nasenraum, Lunge, Leber, Nieren, Unterhautfettgewebe, Blut) wurden bei je 4 Tieren/Gruppe, die gegenüber 1480 ppm exponiert waren, 20 Minuten, 2 und 6 Stunden nach Expositionsbeginn so-

wie nach einer 18stündigen Recovery-Phase ebenfalls mit Hilfe der Vakuumkryodestillation bestimmt. Der Prozentsatz an inhaliertem  $^{14}\text{C}$ , das in Form von Metaboliten am Ende der 6stündigen Expositionsdauer retiniert war, fiel mit steigender Isopren-Konzentration. Bis zu 95,5 % wurden inhalativ nicht resorbiert und/oder unmetabolisiert wieder ausgeschieden (siehe Tabelle 2).

| <b>Tabelle 2. Retention von <math>^{14}\text{C}</math>-markiertem Isopren nach Inhalation bei Ratten (5 Tiere/Gruppe)</b> |                            |   |                        |  |  |  |
|---|----------------------------|---|------------------------|--|--|--|
| Isopren-Konzentration (ppm)   | Expositionsdauer (Stunden) | Spezifische Aktivität (nCi/ $\mu\text{mol}$ ) | Atemminutenvolumen (l) | Gesamtmenge an inhaliertem Isopren ( $\mu\text{mol}$ ) | Gesamtmenge an retiniertem $^{14}\text{C}$ am Ende der Expositionszeit ( $\mu\text{mol}$ ) | Retiniertes $^{14}\text{C}$ /inhaliertes $^{14}\text{C}$ (%) |
| 8   | 6                          | 254   | 0,185 ± 0,044          | 18   | 3,5 ± 0,4  | 19,0 ± 3   |
| 266   | 6                          | 10,4  | 0,230 ± 0,052          | 736  | 67,1 ± 8,1   | 9,1 ± 0,8  |
| 1480  | 6                          | 11,5  | 0,207 ± 0,065          | 3650   | 211,0 ± 12   | 5,8 ± 0,9  |
| 8200  | 5,5                        | 1,6   | 0,157 ± 0,013          | 14200  | 641,0 ± 61   | 4,5 ± 0,7  |

Bei niedrigeren Konzentrationen wurde ein höherer Prozentsatz an inhaliertem Isopren metabolisiert als bei höheren Konzentrationen (8 ppm: 25,3 ± 0,7 %; 266 ppm: 12,0 ± 1,1 %; 1480 ppm: 4,7 ± 0,8 %; 8200 ppm: 3,6 ± 0,7 %; siehe Tabelle 3). In allen Konzentrationsgruppen wurden mehr als 75 % der Metaboliten-assoziierten Radioaktivität innerhalb von 66 Stunden über den Harn ausgeschieden. Die Halbwertszeit für die Ausscheidung im Harn betrug 10,2 ± 1 Stunde. Faeces und exhalierendes  $^{14}\text{CO}_2$  zusammen ergaben eine  $^{14}\text{C}$ -Ausscheidung von 3 bis 20 %. Ein signifikanter Anstieg der fäkalen Elimination trat bei der 8200 ppm-Gruppe auf (siehe Tabelle 3).

| <b>Tabelle 3. Gesamtexkretion von Isopren-Metaboliten bei Ratten 66 Stunden nach Exposition</b> |                       |                     |                       |                     |                       |                     |                       |                     |
|---|-----------------------|---------------------|-----------------------|---------------------|-----------------------|---------------------|-----------------------|---------------------|
| Isopren-Konzentration (ppm)   | Harn                  |                     | Faeces                |                     | CO <sub>2</sub>       |                     | Körper                |                     |
|   | % inhaliertes Isopren | % Gesamtmetaboliten |
| 8   | 19,4                  | 76,7                | 0,6                   | 2,4                 | 0,7                   | 2,8                 | 4,6                   | 18,2                |
| 266   | 9,4                   | 78,3                | 0,4                   | 3,3                 | 0,4                   | 3,3                 | 1,8                   | 15,0                |
| 1480  | 3,8                   | 81,3                | 0,08                  | 1,7                 | 0,09                  | 1,9                 | 0,8                   | 16,6                |
| 8200  | 2,7                   | 73,3                | 0,5                   | 13,4*               | 0,2                   | 5,3                 | 0,3                   | 8,0*                |

\* signifikant unterschiedlich zu der 8 ppm-Gruppe

Die Menge an Metaboliten, die im Blut gefunden wurden, stieg mit Dauer der Exposition und mit steigender Konzentration an (siehe Tabelle 4).

| <b>Tabelle 4. <sup>14</sup>C-Isopren und <sup>14</sup>C-Isopren-Metaboliten im Blut von Ratten (3 Tiere/Gruppe) nach inhalativer Applikation</b> |  |                               |         |          |          |
|--|--|-------------------------------|---------|----------|----------|
| Expositions-dauer*<br>(Minuten)  | Vorläufig charakterisierte Metaboliten | % der Gesamtaktivität im Blut |         |          |          |
|  |  | 8 ppm                         | 266 ppm | 1480 ppm | 8200 ppm |
| 20   | Konjugate, Tetrole                     | 98,7                          | 96,7    | 91,7     | 95,6     |
|  | Diepoxide, Dirole                      | 0,8                           | 2,5     | 5,5      | 1,7      |
|  | Monoepoxide                            | n.n.                          | n.n.    | n.n.     | 0,5      |
|  | unmetabolisiertes Isopren              | n.n.                          | n.n.    | 1,8      | 0,7      |
|  | CO <sub>2</sub>                        | 0,5                           | 0,8     | 0,9      | 1,5      |
| 120  | Konjugate, Tetrole                     | 98,8                          | 97,3    | 97,2     | 95,9     |
|  | Diepoxide, Dirole                      | 1,0                           | 2,4     | 2,4      | 0,9      |
|  | Monoepoxide                            | n.n.                          | n.n.    | 0,1      | 0,1      |
|  | unmetabolisiertes Isopren              | n.n.                          | n.n.    | n.n.     | 3,7      |
|  | CO <sub>2</sub>                        | 0,2                           | 0,3     | 0,3      | 0,3      |
| 360  | Konjugate, Tetrole                     | 93,7                          | 94,8    | 92,7     | 86,8     |
|  | Diepoxide, Dirole                      | 5,8                           | 4,7     | 3,8      | 4,2      |
|  | Monoepoxide                            | n.n.                          | n.n.    | 0,1      | 1,1      |
|  | unmetabolisiertes Isopren              | n.n.                          | n.n.    | 0,1      | 6,3      |
|  | CO <sub>2</sub>                        | 0,5                           | 0,5     | 3,3      | 1,6      |
| n.n. nicht nachgewiesen  |  | * bei 8200 ppm 330 Minuten    |         |          |          |

Der größte Prozentsatz an Radioaktivität war mit Konjugaten der Isopren-Metaboliten (nicht genauer spezifiziert) assoziiert. Epoxide und freies Isopren wurden nur in den beiden höchsten Konzentrationen nachgewiesen. Die Verteilung von <sup>14</sup>C-Isopren und <sup>14</sup>C-Isopren-Metaboliten am Expositionsende in den untersuchten Geweben ist in Tabelle 5 dargestellt.

**Tabelle 5. Verteilung von <sup>14</sup>C-Isopren und <sup>14</sup>C-Isopren-Metaboliten im Gewebe von Ratten (4 Tiere/Gruppe) während und nach Inhalation von 1480 ppm <sup>14</sup>C-Isopren**

| Vorläufig charakterisierte Metaboliten            | nmol im Gesamtgewebe |             |             |             |             |             |
|---|----------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
|   | Nasenraum            | Lunge       | Leber       | Nieren      | Fettgewebe  | Blut        |
| nach 20 Minuten Exposition                        |                      |             |             |             |             |             |
| Konjugate, Tetrole                                | 72,5 ± 6,8           | 26,5 ± 1,7  | 493 ± 23    | 107 ± 1     | 293 ± 121   | 379 ± 55    |
| Diepoxide, Dirole                                 | 45,5 ± 25,8          | 30,9 ± 6,0  | 49,9 ± 20,8 | 3,29 ± 2,04 | 466 ± 231   | 22,8 ± 3,0  |
| Monoepoxide                                       | 1,45 ± 0,51          | 0,53 ± 0,18 | 0,39 ± 0,18 | 0,68 ± 0,46 | 67,8 ± 15,4 | 0,20 ± 0,20 |
| unmetabolisiertes Isopren                         | n.n.                 | 6,78 ± 6,74 | 1,94 ± 0,15 | 22,4 ± 10,0 | 193 ± 136   | 7,30 ± 2,70 |
| CO <sub>2</sub>                                   | 2,0 ± 0,38           | 1,42 ± 0,12 | 1,87 ± 0,66 | 0,47 ± 0,25 | 481 ± 381   | 3,70 ± 1,0  |
| nach 2 Stunden Exposition                         |                      |             |             |             |             |             |
| Konjugate, Tetrole                                | 360 ± 14             | 228 ± 14    | 3410 ± 210  | 666 ± 46    | 4500 ± 1200 | 1520 ± 65   |
| Diepoxide, Dirole                                 | 12,2 ± 2,7           | 13,7 ± 1,6  | 82,7 ± 10,9 | 41,6 ± 16,3 | 823 ± 327   | 37,2 ± 14,1 |
| Monoepoxide                                       | 0,97 ± 0,58          | 0,50 ± 0,39 | 2,24 ± 0,03 | 0,45 ± 0,27 | 89,7 ± 54   | 1,50 ± 0,30 |
| unmetabolisiertes Isopren                         | n.n.                 | n.n.        | n.n.        | 4,60 ± 4,60 | 51,2 ± 51,2 | 0,20 ± 0,20 |
| CO <sub>2</sub>                                   | 3,12 ± 0,91          | 0,70 ± 0,55 | 3,72 ± 0,97 | 2,45 ± 2,45 | 29,6 ± 14,6 | 4,20 ± 0,40 |
| nach 6 Stunden Exposition                         |                      |             |             |             |             |             |
| Konjugate, Tetrole                                | 737 ± 62             | 391 ± 17    | 5520 ± 125  | 1500 ± 50   | 37700±4120  | 5590 ± 470  |
| Diepoxide, Dirole                                 | 27,6 ± 15,7          | 27,1 ± 13,2 | 235 ± 47    | 64,7 ± 15,9 | 2890 ± 1750 | 230 ± 96    |
| Monoepoxide                                       | 3,99 ± 1,53          | 0,24 ± 0    | 0,50 ± 0,15 | 4,55 ± 2,53 | 72,4 ± 41,2 | 3,90 ± 0,60 |
| unmetabolisiertes Isopren                         | 44,5 ± 5,5           | n.n.        | 0,08 ± 0,03 | 9,91 ± 5,52 | 556 ± 458   | 5,10 ± 1,80 |
| CO <sub>2</sub>                                   | 2,77 ± 0,62          | 1,07 ± 0,23 | 15,6 ± 1,4  | 12,6 ± 7,9  | 597 ± 392   | 201 ± 183   |
| nach 6 Stunden Exposition und 18 Stunden Recovery |                      |             |             |             |             |             |
| Konjugate, Tetrole                                | 171 ± 49             | 105 ± 18    | 870 ± 86    | 337 ± 41    | 2250 ± 150  | 464 ± 145   |
| Diepoxide, Dirole                                 | 6,30 ± 3,80          | 1,20 ± 0,59 | 7,19 ± 2,88 | 3,26 ± 0,45 | 201 ± 132   | 1,67 ± 0,92 |
| Monoepoxide                                       | 0,58 ± 0,19          | 0,43 ± 0,43 | 1,62 ± 0,45 | 0,42 ± 0,08 | 9,62 ± 3,08 | 0,43 ± 0,44 |
| unmetabolisiertes Isopren                         | n.n.                 | n.n.        | n.n.        | n.n.        | n.n.        | n.n.        |
| CO <sub>2</sub>                                   | 2,13 ± 0,09          | 2,42 ± 0,80 | 1,86 ± 0,01 | 1,36 ± 0,33 | 54,3 ± 0,4  | 1,51 ± 1,35 |
| n.n. nicht nachgewiesen                           |                      |             |             |             |             |             |

Leber, Blut und speziell das Fettgewebe enthielten zu allen Untersuchungszeitpunkten während der Exposition die meiste Radioaktivität. 18 Stunden nach Expositionsende waren die Metabolitenspiegel in allen unter-

suchten Geweben gefallen und freies Isopren wurde in keinem der Gewebe mehr nachgewiesen (Dahl et al., 1986, 1987, 1990).

Männliche B6C3F1-Mäuse (ca. 28 g schwer, 12 bis 13 Wochen alt) wurden gegenüber 0 (Kontrollen), 20, 200 oder 2000 ppm Isopren (entsprechend 0, 46, 460 oder 4600 mg/m<sup>3</sup>) 6 Stunden lang exponiert. Bei je 3 Tieren wurden 15, 30, 45 und 60 Minuten sowie 2, 4 und 6 Stunden nach Expositionsbeginn die Blutspiegel von Isopren mit Hilfe der Headspace-Gaschromatographie bestimmt. Die Gleichgewichtsspiegel wurden rasch innerhalb von 15 bis 30 Minuten erreicht. Die gemessenen Isopren-Konzentrationen im Blut waren bei den Tieren, die gegenüber 20 ppm exponiert waren, bis zu 30 Minuten nahe der Nachweisgrenze (ca. 15 ng/ml Blut). Die durchschnittlichen Gleichgewichtsspiegel zwischen 30 Minuten und 6 Stunden nach Expositionsende betrugen bei 20, 200 bzw. 2000 ppm 24,8 ± 3, 830 ± 51 bzw. 6800 ± 400 ng Isopren/ml Blut und erwiesen sich in den beiden höheren Konzentrationen somit nahezu proportional zur Konzentration (Bond et al., 1991).

Je 4 männliche B6C3F1-Mäuse (ca. 28 g schwer, 12 bis 13 Wochen alt) wurden gegenüber nominalen Konzentrationen von 20, 200 oder 2000 ppm <sup>14</sup>C-Isopren (entsprechend 46, 460 oder 4600 mg/m<sup>3</sup>) 6 Stunden lang exponiert (nose-only). Unmittelbar nach Expositionsende wurden die Tiere in Metabolismuskäfige verbracht und Harn und Faeces nach 3, 6, 9, 18, 24, 36, 42, 54 und 64 Stunden hinsichtlich Radioaktivität untersucht. Die Radioaktivität in der Expirationsluft wurde nach 1, 2, 3, 6, 9, 18, 24, 36, 42, 54 und 64 Stunden gemessen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 dargestellt. Es wurde angenommen, daß alles <sup>14</sup>C in Form von Metaboliten vorlag.

| <b>Tabelle 6. Ausscheidung von Isopren-Metaboliten bei B6C3F1-Mäusen innerhalb von 64 Stunden</b> |                            |         |         |          |
|---|----------------------------|---------|---------|----------|
|   |                            | Isopren |         |          |
|   |                            | 20 ppm  | 200 ppm | 2000 ppm |
| Harn  | % des inhalierten Isoprens | 2,5     | 4,8     | 1,7      |
|   | % der Gesamtmetaboliten    | 52,4    | 56,3    | 73,4     |
| Faeces  | % des inhalierten Isoprens | 1,6     | 1,2     | 0,13     |
|   | % der Gesamtmetaboliten    | 36,6    | 19,3    | 5,5      |
| CO <sub>2</sub>   | % des inhalierten Isoprens | 0,1     | 1,2     | 0,41     |
|   | % der Gesamtmetaboliten    | 2,1     | 18,4    | 8,0      |
| Restkörper  | % des inhalierten Isoprens | 0,4     | 0,3     | 0,07     |
|   | % der Gesamtmetaboliten    | 8,9     | 6,0     | 3,1      |

Abhängig von der Expositionskonzentration wurden 52 % (bei 20 ppm) bis 73 % (bei 2000 ppm) der Metaboliten-assoziierten Radioaktivität innerhalb von 64 Stunden über den Harn und bei den beiden niedrigeren Konzentrationen 37 bis 19 % über die Faeces ausgeschieden. Als  $^{14}\text{CO}_2$  wurden am Expositionsende 2 % (bei 20 ppm) bis 18 % (bei 200 und 2000 ppm) abgeatmet. Der überwiegende Teil des inhalierten Isoprens wurde nicht resorbiert und/oder unmetabolisiert wieder ausgeschieden (Bond et al., 1991).

Je 4 männliche Sprague-Dawley-Ratten und 4 männliche B6C3F1-Mäuse erhielten einmalig  $10 \mu\text{mol } ^{14}\text{C}$ -Isopren/kg Körpergewicht intraperitoneal. Unmittelbar nach der Injektion wurden die Tiere für 24 Stunden in Stoffwechsellkäfige verbracht und die Abatmung von  $^{14}\text{C}$  sowie die Ausscheidung von  $^{14}\text{C}$  über den Harn bestimmt. Zudem wurde die Bildung von Hämoglobin-Addukten als Prozent der applizierten Dosis berechnet unter der Annahme, daß das gesamte Blutvolumen bei Mäusen und Ratten 6 % des Körpergewichtes beträgt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 dargestellt (Sun et al., 1989).

| <b>Tabelle 7. Ausscheidung von <math>^{14}\text{C}</math> bei Mäusen und Ratten innerhalb von 24 Stunden nach intraperitonealer Applikation von <math>10 \mu\text{mol } ^{14}\text{C}</math>-Isopren/kg Körpergewicht (Sun et al., 1989)</b> |                            |                      |              |                    |
|--|----------------------------|----------------------|--------------|--------------------|
|  | % der verabreichten Dosis  |                      |              |                    |
|  | exhalier-tes $\text{CO}_2$ | exhalier-tes Isopren | Harn         | Hämoglobin-Addukte |
| Mäuse  | $10 \pm 0,4$               | $46 \pm 8$           | $43 \pm 0,3$ | $0,08 \pm 0,02$    |
| Ratten   | $3 \pm 0,1$                | $19 \pm 4$           | $52 \pm 5$   | $0,06 \pm 0,02$    |

Männliche F344-Ratten (3 bzw. 5 Tiere/Gruppe) erhielten in 3 Versuchsansätzen einmal  $66,6$  (Studie 1),  $66,2$  (Studie 2) bzw.  $66,4$  (Studie 3)  $\text{mg } ^{14}\text{C}$ -Isopren/kg Körpergewicht (entsprechend  $26,5$ ,  $27,2$  bzw.  $15,1 \mu\text{Ci}$ ), formuliert in Maiskeimöl, intraperitoneal verabreicht. Nach 3, 6, 12, 24 und 48 Stunden (Studie 1), 6 und 24 Stunden (Studie 2) und 6, 12 und 24 Stunden (Studie 3) wurden jeweils Urin und Faeces gesammelt und die Radioaktivität bestimmt. Die Expirationsluft wurde nach 6, 12, 24 und 48 Stunden (Studie 1), nach 3, 6 und 24 Stunden (Studie 2) und nach 6, 12 und 24 Stunden (Studie 3) hinsichtlich ihres Gehaltes an Radioaktivität untersucht. 24 bzw. 48 Stunden nach der Applikation wurde die Radioaktivität in Blut,

Leber, Lungen, Nieren, Fett- und Muskelgewebe, Haut, Gehirn, Herz, Testes und Harnblase sowie im Restkörper bestimmt. Ca. 50 % der applizierten Radioaktivität wurden als flüchtige Substanzen abgeatmet. Mit dem Urin wurden 29 %, als CO<sub>2</sub> 1,4 % und mit den Faeces 0,3 % der verabreichten Radioaktivität ausgeschieden. Die Ausscheidung insgesamt erfolgte rasch mit 51 % innerhalb von 6 Stunden und 29 % zwischen 6 und 24 Stunden nach der Applikation. In der Karkasse und den Gewebeproben wurden nur 3 % der applizierten Radioaktivität wiedergefunden. Konsistent mit der Ausscheidung überwiegend im Urin zeigten die Nieren die höchste Gewebekonzentration (6,5 µg-Äquiv./g), gefolgt von der Harnblase (3,5 µg-Äquiv./g). Die Konzentrationen in den übrigen untersuchten Geweben ähnelten sich mit 1 µg-Äquiv./g (Fettgewebe und Gehirn) bis 2,8 µg-Äquiv./g (Blut und Leber). Die Analyse des Urins mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) zeigte, daß kein unmetabolisiertes Isopren ausgeschieden wurde. Zu allen Sammelzeitpunkten waren 4 Hauptmetaboliten nachzuweisen, die polarer als Isopren waren. Isopren wurde hauptsächlich als 2-Hydroxy-2-methyl-3-butensäure, als trans-3-Methyl-1-buten-3,4-diol und als Glukuronsäurekonjugat von trans-3-Methyl-1-buten-3,4-diol ausgeschieden. Der 4. Metabolit konnte nicht identifiziert werden, enthielt jedoch keine Mercaptursäurederivate. Der Anteil dieses Metaboliten blieb über den gesamten Sammelzeitraum mit 7 bis 8 % der Gesamtradioaktivität im Urin etwa gleich. Die Konzentration der 2-Hydroxy-2-methyl-3-butensäure stieg über den gesamten Sammelzeitraum von ca. 28 auf 63 %, während die Konzentrationen von trans-3-Methyl-1-buten-3,4-diol und des Glukuronsäurekonjugates von trans-3-Methyl-1-buten-3,4-diol von ca. 48 auf 15 % bzw. von ca. 21 auf ca. 9 % fielen (NTP, 1994).

Ein ähnlicher Versuch wurde auch mit männlichen B6C3F1-Mäusen (4 Tiere/Gruppe) durchgeführt. Den Tieren wurden 68,4 mg <sup>14</sup>C-Isopren/kg Körpergewicht (entsprechend 10,2 µCi) einmal intraperitoneal verabreicht. Urin, Faeces und Expirationsluft wurden nach 6, 12 und 24 Stunden gesammelt und die Radioaktivität bestimmt. Die Radioaktivität in den Geweben und im Restkörper wurde nach 24 Stunden gemessen. Wie bei den Ratten wurde die größte Fraktion der Radioaktivität (ca. 47 %) in Form flüchtiger Stoffe abgeatmet. Eine HPLC-Analyse zeigte, daß 94 % der abgeatmeten Radioaktivität unmetabolisiertes <sup>14</sup>C-Isopren darstellten. Die Exkretion über den Urin betrug ca. 33 %, über die Faeces 7,2 % und in Form von CO<sub>2</sub> 1,9 % der applizierten Radioaktivität. Ähnlich wie bei den Ratten

erfolgte die Ausscheidung rasch mit durchschnittlich 50 % innerhalb von 6 Stunden und weiteren 39 % zwischen 6 und 24 Stunden nach der Applikation. Im Restkörper und in den Geweben fanden sich 24 Stunden nach der Verabreichung 2 % der applizierten Radioaktivität. Auch hier fanden sich die höchsten Gewebekonzentrationen in den Nieren und in der Harnblase (2,2 µg-Äquiv./g). Die Konzentrationen in den übrigen untersuchten Geweben lagen zwischen 0,5 (Fettgewebe) und 1,8 bzw. 2,0 µg-Äquiv./g (Leber und Testes). Wie schon bei den Ratten wurde im Urin kein unmetabolisiertes Isopren nachgewiesen. Zu allen Sammelzeitpunkten waren 4 Hauptmetaboliten nachweisbar. Einer dieser Hauptmetaboliten konnte nicht identifiziert werden, enthielt aber keine Mercaptursäurederivate (siehe oben). Die Konzentration dieses Metaboliten blieb über die gesamte 24-Stunden-Sammelperiode in etwa gleich (ca. 7 %). Als weitere Metaboliten wurden mit über den gesamten Sammelzeitraum steigender Konzentration 2-Hydroxy-2-methyl-3-butensäure (ca. 27 bis 63 %) sowie mit abnehmender Konzentration trans-3-Methyl-1-buten-3,4-diol (ca. 47 bis 15 %) und das Glukuronsäurekonjugat von trans-3-Methyl-1-buten-3,4-diol (ca. 21 bis 9 %) bestimmt. Im Urin der Mäuse wurden weitere Metaboliten in geringen Konzentrationen nachgewiesen, die jedoch nicht identifiziert werden konnten (NTP, 1994).

Je 2 männliche Wistar-Ratten und 5 B6C3F1-Mäuse wurden in einem geschlossenen System gegenüber Isopren-Anfangskonzentrationen von 5 bis 4000 ppm (14 bis 11160 mg/m<sup>3</sup>) bis zu 10 Stunden lang exponiert und der zeitliche Verlauf der Abnahme der Konzentration gaschromatographisch verfolgt. Unterhalb von Konzentrationen von ca. 300 ppm (entsprechend ca. 840 mg/m<sup>3</sup>) war die Metabolisierungsrate bei beiden Spezies direkt proportional der Konzentration. Bei höheren Konzentrationen zeigte sich eine Sättigungskinetik, wobei die Metabolisierungsraten ein geschätztes Maximum von 130 µmol/(Stunde x kg) bei Ratten ab 1500 ppm (entsprechend 4185 mg/m<sup>3</sup>) und von 400 µmol/(Stunde x kg) bei Mäusen ab 2000 ppm (entsprechend 5580 mg/m<sup>3</sup>) erreichten. Ein Vergleich der Clearance von Aufnahme und Metabolisierung zeigte, daß bei Ratten bei der Konzentration von 250 ppm (entsprechend 698 mg/m<sup>3</sup>) ca. 15 % und bei Mäusen bei einer Konzentration von 300 ppm (entsprechend 840 mg/m<sup>3</sup>) ca. 25 % unverändert abgeatmet wurden. Bei höheren Konzentrationen nahm der prozentuale Anteil des mit der Atemluft ausgeschiedenen unmetabolisierten Isoprens konzentrationsabhängig zu. Bei hohen Konzentrationen, wenn die

metabolisierenden Enzyme gesättigt waren, wurde die Akkumulation im Körper von den Ein- und Ausatemraten sowie vom Verteilungskoeffizient („thermodynamic partition coefficient“) bestimmt. Für die Ratte ließ sich ein Verteilungskoeffizient (Körper/Luft) von  $7,8 \pm 3$  und für die Maus von  $7,0 \pm 2$  errechnen. Die Halbwertszeit für die Sättigung betrug bei Ratten 6,8 Minuten und bei Mäusen 4,4 Minuten. Ebenfalls im geschlossenen System bestimmt wurde die Menge an endogen entstehendem Isopren bei nicht exponierten Tieren. Die berechnete Menge betrug bei Ratten  $1,9 \mu\text{mol}/(\text{Stunde} \times \text{kg})$  und bei Mäusen  $0,4 \mu\text{mol}/(\text{Stunde} \times \text{kg})$ . Ein kleinerer Teil des endogen entstehenden Isoprens wurde von den Tieren exhaliiert, ein größerer jedoch metabolisiert. Die Metabolisierungsrate für Isopren bei Ratten wurde mit  $1,6 \mu\text{mol}/(\text{Stunde} \times \text{kg})$  und bei Mäusen mit  $0,3 \mu\text{mol}/(\text{Stunde} \times \text{kg})$  berechnet (Peter et al., 1987, 1990).

Die von Peter et al. (1987, 1990) publizierten in vivo-Toxikokinetikdaten der gegenüber Isopren exponierten Ratten und Mäuse wurden zusammen mit unveröffentlichten Daten aus Versuchen an Ratten und Mäusen, die mit Dithiocarb (200 mg/kg Körpergewicht) vorbehandelt wurden (keine weiteren Angaben), mittels eines Zweikompartment-Modells von Filser et al. (1996) neu berechnet. Die maximale Metabolisierungsrate betrug danach bei Ratten und Mäusen 26,5 bzw. 10,2  $\mu\text{mol}/\text{Stunde}/\text{Tier}$  und die Werte der apparenten Michaelis-Konstante ( $K_{\text{mapp}}$  = hypothetische mittlere Isopren-Konzentration im Tier bei einer metabolischen Umsatzrate von  $V_{\text{max}}/2$ ) betragen 0,026 bzw. 0,060 mmol/l. Diese Parameter wurden von einem Zweikompartment-Modell auf ein physiologisch-toxikokinetisches Modell übertragen, das aus den Kompartimenten Luft, Lunge, reichlich durchblutetes Gewebe (z. B. Gehirn, Darm, Niere, Milz), Fett, Muskel und Leber besteht. Aus publizierten Werten von Cytochrom P-450-Gehalten und -Aktivitäten wurde geschätzt, daß etwa 10 % der Gesamtaktivität der gemischt-funktionellen Monooxygenasen außerhalb der Leber lokalisiert sind. Daher wurde die maximale Metabolisierungsrate aus dem Zweikompartment-Modell in  $V_{\text{maxmo1}}$  (90 % in Leber) und  $V_{\text{maxmo2}}$  (10 % in reich durchbluteten Geweben) aufgesplittet. Für die Michaelis-Konstante  $K_{\text{mmo}}$  wurde im venösen Blut von Leber und von reichlich durchbluteten Geweben der gleiche Wert angenommen. Die neu berechneten Werte für die Ratte (Körpergewicht 250 g) und die Maus (Körpergewicht 25 g) sind in Tabelle 8 dargestellt.

| <b>Tabelle 8. Metabolische Parameter von Isopren bei Ratten und Mäusen nach einem physiologisch-toxikokinetischen Modell</b> |       |       |
|--|-------|-------|
|  | Ratte | Maus  |
| $V_{\max mo1}$ ( $\mu\text{mol/Stunde/Tier}$ )   | 24,8  | 9,18  |
| $V_{\max mo2}$ ( $\mu\text{mol/Stunde/Tier}$ )   | 2,75  | 1,02  |
| $K_{mmo}$ (mmol/l)   | 0,002 | 0,004 |

Mit der von Peter et al. (1987) bei nicht exponierten Tieren eingesetzten chromatographischen Methode konnte nicht zwischen endogen entstehendem Aceton und Isopren unterschieden werden. Mit einer verbesserten Methode wurden bei Wistar-Ratten weit geringere Mengen an endogen entstehendem Isopren (im Bereich von einigen ppb; keine weiteren Angaben) nachgewiesen. Die Daten bei nicht gegenüber Isopren exponierten Tieren wurden daher nicht nochmals analysiert (Filser et al., 1996).

In einer nur unzureichend dokumentierten Studie zur Verteilung von Isopren im Gewebe von Ratten ergaben sich nach Inhalation von etwa 180000 mg Isopren/m<sup>3</sup> über 4 Stunden (Konzentration, die etwa dem in dieser Studie ermittelten LC<sub>50</sub>-Wert entsprach) die in Tabelle 9 dargestellten Gewebekonzentrationen.

| <b>Tabelle 9. Verteilung von Isopren im Gewebe von Ratten nach Inhalation</b> |   |          |
|---|---|----------|
| Organ   | Isopren-Konzentration (mg/100 g Gewebe) |          |
| Gehirn  | 39,5                                    | (n = 10) |
| Leber   | 43,3                                    | (n = 10) |
| Niere   | 39,6                                    | (n = 7)  |
| Milz  | 28,0                                    | (n = 7)  |
| Nierenkapselfett  | 257,7                                   | (n = 7)  |
| subkutanes Fett   | 178,4                                   | (n = 7)  |

Nach Angaben der Autoren bestand eine Korrelation zwischen der im Gehirn gemessenen Isopren-Konzentration und dem narkotisierenden Effekt (keine weiteren Angaben; Shugaev, 1968, 1969).

Narkotisierte Mischlingshunde beiderlei Geschlechts (8 bis 22 kg schwer) inhalierten Isopren als Dampf über eine Maske oder einen endotrachealen Tubus, wobei die Expirationsluft gesammelt und gaschromatographisch

auf den Gehalt an Isopren untersucht wurde. Die eingeatmeten Konzentrationen lagen, soweit nicht anders angegeben, zwischen 0,40 und 0,60 µg/ml (entsprechend zwischen 143200 und 214800 ppm). Die Isopren-Aufnahme wurde von der Ventilationsrate nicht beeinflusst. So betrug die Gesamtretention in der Lunge 63,8 bis 67,4 % bei Ventilationsraten von 6 bis 30. Wenn nur der untere Atemtrakt durch den endotrachealen Tubus exponiert war, wurde unabhängig von der Ventilationsrate eine Retention von 71 % ermittelt. Die Retention im oberen Atemtrakt wurde mit ca. 75 % festgestellt. Es wurde auch der Einfluß der Konzentration auf die Retention untersucht. Bei einer Konzentration von 0,36 µg/ml betrug die Retention 63,9 %, bei 0,51 µg/ml 72 %, bei 0,72 µg/ml 69 % und bei 0,96 µg/ml 39,5 %. Das Atemzugvolumen hatte ebenfalls keinen Einfluß auf die Retention von Isopren in der Lunge. Bei Atemzugvolumina von 112 bis 218 ml wurden 74 bis 76 % des eingeatmeten Isoprens retiniert (Egle und Gochberg, 1975).

## **7.2 Akute und subakute Toxizität**

### ***Akute Toxizität***

#### **• Orale Applikation**

Je 15 männliche Wistar-Ratten (Gewicht 160 bis 210 g) erhielten einmalig oral Isopren, in Pflanzenöl formuliert, per Schlundsonde in Dosierungen von 250 bis 2500 mg/kg Körpergewicht. Die Nachbeobachtungszeit betrug 14 Tage. Die LD<sub>50</sub> wurde mit 2125 (2403 bis 2210) mg/kg Körpergewicht ermittelt. An Symptomen wurden innerhalb einer Stunde Sedation und Atmungsstörungen beobachtet, die bis zu 7 Tage nach der Applikation anhielten. Der Tod trat innerhalb von 24 Stunden ein (Bayer, 1972).

#### **• Dermale Applikation**

Zur Ermittlung der LD<sub>50</sub> nach einmaliger dermaler Applikation erhielten jeweils 5 männliche Wistar-Ratten 1000 µl Isopren/kg Körpergewicht auf die am Vortag rasierte Rückenhaut. Die Testsubstanz wurde während 7 Tagen von der Haut nicht entfernt. Vergiftungserscheinungen und Todesfälle konnten während der 14tägigen Nachbeobachtungszeit nicht festgestellt

werden. Somit ergab sich ein LD<sub>50</sub>-Wert von > 1000 µl/kg Körpergewicht (entsprechend > 681 mg/kg Körpergewicht; Bayer, 1972).

### • Inhalative Applikation

Je 20 männliche Wistar-Ratten (Gewicht 160 bis 210 g; 20 pro Gruppe) wurden 4 Stunden lang gegenüber Isopren-Dampfkonzentrationen von 27600 bis 100900 mg/m<sup>3</sup> Luft exponiert bzw. eine Stunde lang gegenüber einer Konzentration von 51500 mg/m<sup>3</sup>. Je 20 weibliche Wistar-Ratten wurden 4 Stunden lang gegenüber Konzentrationen von 29500 bis 98100 mg/m<sup>3</sup> Luft exponiert. Als LC<sub>50</sub> ergab sich für die männlichen Ratten ein Wert von > 100900 mg/m<sup>3</sup> Luft nach 4stündiger Exposition bzw. von > 51500 mg/m<sup>3</sup> nach 1stündiger Exposition und für die weiblichen Ratten von > 98100 mg/m<sup>3</sup> Luft. Nur in den höchsten Konzentrationen zeigten die Tiere vorübergehend eine Herabsetzung des Allgemeinbefindens (Bayer, 1972).

Nach 4stündiger Exposition gegenüber Isopren wurde für Ratten ein LC<sub>50</sub>-Wert von 180000 mg/m<sup>3</sup> berichtet (keine weiteren Angaben; Shugaev, 1968, 1969).

Je 20 männliche NMRI-Mäuse (Gewicht 18 bis 22 g) wurden 4 Stunden lang gegenüber Isopren-Dämpfen in Konzentrationen von 14100 bzw. 31500 mg/m<sup>3</sup> Luft exponiert. Keines der Tiere starb. Der LC<sub>50</sub>-Wert betrug > 31500 mg/m<sup>3</sup> (Bayer, 1972).

Mäuse (10 Tiere/Gruppe) wurden gegenüber analytisch bestimmten Isopren-Konzentrationen von 50000 bis 150000 mg/m<sup>3</sup> 2 Stunden lang exponiert. Als LC<sub>50</sub> wurden 150000 mg/m<sup>3</sup> angegeben. Die Nachbeobachtungszeit betrug 21 Tage. An Symptomen traten Schleimhautreizungen in den oberen Atemwegen, Koordinationsstörungen, Seitenlage und Narkose auf. Bei der Sektion wurde eine starke Hyperämie der inneren Organe und des Gehirns festgestellt (Korbakova und Fedorova, 1964).

Weitere LC<sub>50</sub>-Werte wurden nach 2stündiger Exposition für männliche Mäuse mit 139000 mg/m<sup>3</sup> und für weibliche Mäuse mit 148000 mg/m<sup>3</sup> (Gostinskii, 1965) bzw. mit 157000 mg/m<sup>3</sup> (keine Angabe zum Geschlecht; Shugaev, 1968, 1969) berichtet. Die Substanz wirkte reizend und narkotisierend. Makroskopisch wurden vergrößerte Lungen sowie Kongestion der

Lungen beobachtet. Nach mehreren 2stündigen Expositionen gegenüber Isopren betrug die Konzentration, bei der 50 % der exponierten Mäuse narkotisiert waren, 109000 mg/m<sup>3</sup> (keine weiteren Angaben; Gostinskii, 1965).

Es wurde berichtet, daß Konzentrationen von 100000 bis 120000 mg/m<sup>3</sup> bei Mäusen tiefe Narkose hervorriefen und daß 140000 mg/m<sup>3</sup> tödlich wirkten (keine weiteren Angaben; von Oettingen, 1940).

Bei 6 Kaninchen führten 4100 mg Isopren/m<sup>3</sup> bei 40minütiger Expositionszeit zu einem abgeschwächten, aber schneller einsetzenden Beugemuskelreflex. Die Atemfrequenz war ab etwa 190 mg/m<sup>3</sup> um 16,3 bis 40 % erhöht (Gostinskii, 1965).

Um bei den in Kapitel 7.1 beschriebenen Toxikokinetikstudien die Gesamtmenge von inhaliertem <sup>14</sup>C-Isopren bestimmen zu können, wurde die Atmung von je 5 männlichen B6C3F1-Mäusen (ca. 28 g, 12 bis 13 Wochen alt) in einem Plethysmographen untersucht. Bestimmt wurden Atemfrequenz, Atemzugvolumen und Minutenvolumen in 1minütigen Abständen während einer 6stündigen Expositionszeit gegenüber 0 (Kontrollen), 20, 200 und 2000 ppm Isopren (entsprechend 0, 46, 460 und 4600 mg/m<sup>3</sup>). Die Ergebnisse sind in Tabelle 10 dargestellt.

| <b>Tabelle 10. Effekt einer Exposition gegenüber Isopren auf die Atmung bei Mäusen</b> |                                |                             |                            |
|--|--------------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| Isopren-Konzentration (ppm)  | Atemfrequenz (Atemzüge/Minute) | Atemzugvolumen (ml/Atemzug) | Minutenvolumen (ml/Minute) |
| 0  | 347 ± 6                        | 0,204 ± 0,023               | 70,7 ± 7,6                 |
| 20   | 262 ± 9*                       | 0,346 ± 0,028*              | 89,8 ± 5,4                 |
| 200  | 307 ± 16                       | 0,220 ± 0,017               | 68,2 ± 8,5                 |
| 2000   | 244 ± 29*                      | 0,227 ± 0,022               | 54,6 ± 6,2*                |
| * signifikant unterschiedlich zu den Kontrollen  |                                |                             |                            |

Die Atemfrequenz war in allen drei Konzentrationen erniedrigt, signifikant bei 20 und 2000 ppm. In der hohen Konzentration wurde das Minutenvolumen signifikant vermindert, was bei Ratten, die gegenüber bis zu 8200 ppm exponiert waren, nicht beobachtet wurde (siehe Kapitel 7.1; Dahl et al., 1987; Bond et al., 1991).

## • Parenterale Applikation

Je 15 männlichen Wistar-Ratten (Gewicht 160 bis 210 g) wurde Isopren, formuliert in Pflanzenöl, einmalig intraperitoneal in Dosen von 100 bis 1750 mg/kg Körpergewicht appliziert. Als LD<sub>50</sub>-Wert wurden 1390 (1310 bis 1470) mg/kg Körpergewicht ermittelt. An Symptomen wurden, wie nach oraler Gabe, Sedation und Atmungsstörungen beobachtet (Bayer, 1972).

Es wurde berichtet, daß die subkutane Injektion von 1 ml Isopren bei Kaninchen keinen Effekt auf die Anzahl der Erythrozyten hatte, aber eine Leukozytose verursachte. Nach dem Autor zeigten sich Zeichen einer Reizwirkung und „Anämie“ im Knochenmark. Im Urin wurden Spuren von Albumin sowie Urobilinogen gefunden (keine weiteren Angaben; von Oettingen, 1940).

## ***Subakute Toxizität***

Je 30 männliche Wistar-Ratten wurden im modifizierten Lim-Test (Lim et al., Arch. Int. Pharmacodyn., 130, 336 (1961)) hinsichtlich einer kumulativen Wirkung von Isopren geprüft. In diesem Versuch erhielten 30 Ratten am ersten Versuchstag 200 mg Isopren/kg Körpergewicht oral verabreicht. An den nächstfolgenden 4 Tagen wurde diese Dosis um den Faktor 1,5 erhöht. Die Nachbeobachtungszeit betrug 7 Tage. Keines der Tiere starb. In diesem Test konnte eine kumulative Wirkung von Isopren bei männlichen Ratten nicht nachgewiesen werden (keine weiteren Angaben; Bayer, 1972).

Je 10 männliche und weibliche Wistar-Ratten (Gewicht 160 bis 210 g) wurden gegenüber Isopren-Dämpfen 4 Stunden täglich an 5 Tagen in Konzentrationen von 12700 bzw. 57300 mg/m<sup>3</sup> exponiert. Unabhängig vom Geschlecht wurde die hohe Konzentration schädigungslos vertragen (keine weiteren Angaben; Bayer, 1972).

Die 6mal 6stündige Exposition gegenüber Isopren als Dampf in einer Konzentration von 6000 ppm (entsprechend 16740 mg/m<sup>3</sup>) wurde von 2 männlichen und 2 weiblichen Alderley-Park-Ratten (ca. 200 g schwer) ohne klinische Symptome vertragen. Die Sektion ergab eine leichte Kongestion der Lungen. Histopathologisch waren die untersuchten Organe ohne Befund. Auch die 15mal 6stündige Exposition gegenüber 1670 ppm (entsprechend

4659 mg/m<sup>3</sup>) ergab bei den eingesetzten 2 männlichen und 2 weiblichen Ratten keine klinischen Symptome. Die Sektion war ohne Befund (keine weiteren Angaben; Gage, 1970).

Je 20 männliche und 20 weibliche F344-Ratten und B6C3F1-Mäuse inhalierten Isopren als Dampf (Reinheitsgrad > 99 %) in Konzentrationen von 0 (Kontrollen), 438, 875, 1750, 3500 bzw. 7000 ppm (entsprechend 0, 1222, 2441, 4883, 9765 bzw. 19530 mg/m<sup>3</sup>) 6 Stunden/Tag an 5 Tagen/Woche 2 Wochen lang. Nach 4 bzw. 5 Tagen wurden bei je 10 Ratten bzw. Mäusen hämatologische sowie klinisch-chemische Parameter bestimmt. Bei den Ratten wurden keine Todesfälle, Beeinträchtigungen der Körpergewichtsentwicklung, klinischen Symptome, Veränderungen hämatologischer oder klinisch-chemischer Parameter oder makroskopischen und mikroskopischen Veränderungen gesehen. Bei den Mäusen waren ebenfalls keine Todesfälle zu verzeichnen. Die Körpergewichtsentwicklung der männlichen Mäuse war in der höchsten Konzentration beeinträchtigt. Behandlungsbedingt wurde ein leichter Anstieg der Lebergewichte, erniedrigte Thymus-, Milz- und Hodengewichte sowie Veränderungen hämatologischer Parameter (erniedrigte Erythrozytenzahl, erniedrigte Hämoglobin-Konzentration und erniedrigtes Erythrozyteneinzelvolumen (MCV)) beobachtet. Mikroskopisch wurden bei den männlichen Tieren Thymus- und Hodenatrophie (bei 7000 ppm) und Degeneration des olfaktorischen Epithels in den Nasenhöhlen (ab 1750 ppm) sowie bei beiden Geschlechtern eine Hyperplasie des Vormagenepithels (bei allen Konzentrationen) festgestellt (Melnick et al., 1990; NTP, 1995).

Es wurde berichtet, daß bei Mäusen 20 2stündige Expositionen gegenüber einer Isopren-Konzentration von 60000 mg/m<sup>3</sup> keine narkotischen Effekte hervorriefen. Bei der Sektion zeigten die Tiere Reizungen der Bronchien und einige Tiere Lungenemphysem. Es wurde eine Hyperplasie des Knochenmarks festgestellt, aber auch Anzeichen für einen Zerfall von roten Blutkörperchen in der Milz (Pigmentation, Makrophagen; keine weiteren Angaben; von Oettingen, 1940).

### **7.3 Haut- und Schleimhautverträglichkeit**

Je ein Ohrlöffel von 2 weißen Neuseeland-Kaninchen (Gewicht 2,8 bis 3,8 kg) wurde an 5 aufeinanderfolgenden Tagen täglich zweimal mit Isopren

bepinselt. Es kam dadurch nur zu kurzzeitig anhaltenden Rötungen der Haut, was von den Autoren als eine nur geringe hautschädigende Eigenschaft gewertet wurde (Bayer, 1972).

Die Applikation von 0,5 ml Isopren auf die geschorene Haut eines Kaninchens verursachte ausgeprägte Hyperämie, Ödembildung und anschließende Schuppung (keine weiteren Angaben; Korbakova und Fedorova, 1964).

Mäusen wurde die Haut der Schwänze mit Isopren befeuchtet. Im Verlauf von 2 Stunden trat eine ausgeprägte Hyperämie der Haut auf, an den darauffolgenden Tagen eine Nekrose der Schwanzenden (keine weiteren Angaben; Korbakova und Fedorova, 1964).

#### **7.4 Sensibilisierende Wirkung**

Keine Information vorhanden.

#### **7.5 Subchronische und chronische Toxizität**

10 männliche und 10 weibliche F344-Ratten und B6C3F1-Mäuse (Alter zu Versuchsbeginn 6 bis 8 Wochen) inhalierten 13 Wochen lang Isopren (Reinheitsgrad > 99 %) als Dampf in Konzentrationen von 0 (Kontrollen), 70, 220, 700, 2200 oder 7000 ppm (entsprechend 0, 195, 614, 1953, 6138 oder 19530 mg/m<sup>3</sup>) für 6 Stunden (plus 12 Minuten zur Erreichung von 90 % der Zielkonzentration)/Tag an 5 Tagen/Woche (Ganzkörperexposition). Je 10 zusätzliche Tiere/Gruppe wurden für hämatologische und klinisch-chemische Untersuchungen an den Tagen 4 und 24 eingesetzt und je 5 Tiere in den Kontroll-, 70, 700 und 7000 ppm-Gruppen, bei denen nach einem Tag und nach 12 Wochen Exposition die Glutathion- und die Gesamt-Sulfhydryl-Konzentration in Leber, Lunge, Nieren und Thymus bestimmt wurden. Während der 12. Versuchswoche wurde bei den Ratten der Harn gesammelt und der Gehalt an Glukose, Kreatinin und die Aktivitäten der alkalischen Phosphatase und der Aspartataminotransferase bestimmt. Bei den Ratten und Mäusen, die gegenüber 70, 700 oder 7000 ppm exponiert waren, wurden zu Versuchsende Spermienmotilität bzw. Vaginalzytologie untersucht (siehe auch Kapitel 7.8). Eine Untersuchung des Knochenmarks erfolgte nach 24 bzw. 90 Tagen. Zu Versuchsende wurden alle Tiere

makroskopisch sowie die Kontroll- und die Tiere der 7000 ppm-Gruppen mikroskopisch untersucht. Bei den Ratten wurden keine behandlungsbedingten Veränderungen bei Überlebenszeit, Körpergewichtsentwicklung, hämatologischen, klinisch-chemischen und Harnparametern, Organgewichten sowie der makroskopischen und mikroskopischen Untersuchung beobachtet. Die Glutathion-Konzentration in den untersuchten Organen der exponierten Ratten unterschied sich nicht von der der Kontrolltiere. Die Untersuchungen der Spermienmotilität und der Vaginalzytologie waren ohne Befund. Bei den männlichen Mäusen ergaben sich im Vergleich zu den Kontrollen am Ende der 13wöchigen Versuchszeit keine Unterschiede hinsichtlich der Körpergewichtsentwicklung, bei den weiblichen Mäusen lagen die Körpergewichte in allen Konzentrationen signifikant unter denen der Kontrolltiere. Klinische Symptome während des Versuches wurden nicht beobachtet. Bei der hämatologischen Befundung am 4. Versuchstag wurde ab einer Konzentration von 220 ppm bei beiden Geschlechtern eine leichte normozytäre, normochrome Anämie (erniedrigte Erythrozytenzahl sowie Hämatokrit- und Hämoglobin-Konzentration ohne Effekt auf Zellvolumen, Retikulozytenzahl und polychromatische Zellen) festgestellt. Bis zum Tag 24 wurde die Anämie makrozytär (erhöhtes Zellvolumen). Nach 13 Wochen lag der gleiche Befund vor. Zu Versuchsende waren die absoluten und relativen Testesgewichte in der 2200 und 7000 ppm-Gruppe signifikant niedriger als die der Kontrolltiere. Bei den männlichen Mäusen wurden in der höchsten Konzentration signifikant höhere absolute und relative Lebergewichte, bei den weiblichen Mäusen in der höchsten Konzentration signifikant höhere absolute Lebergewichte beobachtet. Die absoluten Milzgewichte lagen ab 700 ppm bei beiden Geschlechtern unter den Kontrollwerten, bei den männlichen Tieren ab 220 ppm, und bei den weiblichen Tieren bei 7000 ppm auch die relativen Milzgewichte. Die absoluten Nierengewichte erwiesen sich bei den weiblichen Mäusen ab 220 ppm als signifikant erhöht. Die Glutathion-Konzentrationen waren in den Lungen der weiblichen Mäuse an Tag 1 und in Leber und Lunge beider Geschlechter in der höchsten Konzentration in Woche 12 niedriger als bei den Kontrolltieren. Das Verhältnis Gesamt-Sulfhydryl : Glutathion war bei diesen Gruppen größer als bei den Kontrolltieren. Mikroskopisch wurden Veränderungen im Vormagen (epitheliale Hyperplasie ab 700 ppm), in der Nasenhöhle (Degeneration des olfaktorischen Epithels bei männlichen Tieren bei 7000 ppm), in der Leber (hepatozelluläre Hypertrophie ab 2200 ppm) und den Testes (Atrophie der Samenkanälchen bei 7000 ppm) festgestellt. Die Epididymi-

desgewichte der Mäuse, die gegenüber 700 bis 7000 ppm exponiert waren, lagen um 12 bzw. 30 % unter denen der Kontrollen, Spermienkopfzahl und die Spermienkonzentration um 12 bzw. 46 % und die Spermienmotilität um 6 bzw. 23 %. Bei den weiblichen Mäusen in der 7000 ppm-Gruppe war der durchschnittliche Östruszyklus signifikant länger als bei der Kontrollgruppe (Melnick et al., 1994; NTP, 1995).

36 Mäuse, 11 Ratten bzw. 5 Kaninchen inhalierten Isopren für 4 Stunden/Tag 4 oder 5 Monate (nur Ratten) lang. Die Isopren-Konzentration in der Inhalationskammer schwankte zwischen 2200 und 4900 mg/m<sup>3</sup> (Nominalkonzentration 5000 mg/m<sup>3</sup>). Angaben zur Art und Anzahl der Kontrollgruppen liegen nicht vor. Todesfälle waren nicht zu verzeichnen. Bei den Mäusen ließ sich während des Versuches kein Einfluß auf das Verhalten und die Körpergewichtsentwicklung feststellen. Eine neuropharmakologische Untersuchung am Ende des Versuches ergab eine verminderte Leistung im Schwimmtest (Schwimmzeit: exponierte Tiere 16,1 Minuten, Kontrolltiere 33,9 Minuten). Bei den Ratten entsprach die Körpergewichtsentwicklung der der Kontrolltiere. Ab dem dritten Behandlungsmonat war ein verringerter Sauerstoffverbrauch zu beobachten. Er betrug zu Versuchsende für die Kontrolltiere 2210 ml/Stunde/kg Körpergewicht, für die behandelte Gruppe 1860 ml/Stunde/kg Körpergewicht. Bei den Kaninchen fanden sich erhöhte Leukozyten- sowie leicht verringerte Erythrozytenwerte; der Hämoglobin-Gehalt blieb unbeeinflusst. Bei der Sektion wurden bei allen Tieren erhöhte Lungen-, Nieren- sowie Gehirngewichte festgestellt. Bei der histopathologischen Untersuchung wurden bei einigen Tieren degenerative Veränderungen in der Leber gesehen. Bei Ratten und Kaninchen wurden Reizung der Bronchien sowie Schädigung der Lunge (erhöhte Anzahl von Becherzellen in der bronchialen Schleimhaut, Infiltration von Entzündungszellen in die Bronchialwand, Schädigung der bronchialen Epithelzellen, Vaskulitis mit perivaskulären Ödemen) beobachtet, bei den Ratten zusätzlich eine „Reizung“ der Schilddrüse, bei Kaninchen Veränderungen des Myokards (Infiltration des Interstitiums, Schwund der Querstreifung; keine weiteren Angaben; Gostinskii, 1965). Aufgrund der unzureichenden Dokumentation von Versuchsaufbau und von Versuchsergebnissen ist diese Studie zur Beurteilung der systemischen Toxizität nach wiederholter Applikation nur eingeschränkt geeignet.

15 Ratten waren gegenüber Isopren in Konzentrationen von 200 bis 600 mg/m<sup>3</sup> 5 Stunden täglich an 6 Tagen/Woche 6 Monate lang exponiert. 15

Tiere dienten als Kontrollen. Während des Versuches wurden keine Verhaltensänderungen oder neurotoxischen Symptome beobachtet. Die Körpergewichtsentwicklung verlief normal. Nach 2 Monaten zeigte sich ein veringertes Gehalt an Hippursäure im Harn, der zu Versuchsende wieder im Bereich der Kontrollwerte lag. Nierenfunktion sowie hämatologische Parameter waren nicht beeinträchtigt. Histologisch zeigten sich am Versuchsende eitrig Bronchitis, Hyperplasie der bronchialen Lymphknoten, Verdickung der alveolären Scheidewände, Emphysem, fettige Dystrophie der Leberzellen, histiozytäre Infiltrate in Nieren und Herz sowie Hämosiderinablagerungen in der Milz (Korbakova und Fedorova, 1964). Aufgrund der unzureichenden Dokumentation von Versuchsaufbau und von Versuchsergebnissen ist diese Studie zur Beurteilung der systemischen Toxizität nach wiederholter Applikation nur bedingt geeignet.

## **7.6 Gentoxizität**

### **7.6.1 In vitro**

Isopren (Reinheitsgrad > 99 %) wurde im Salmonella/Mikrosomen-Test (Präinkubationstest) an den Salmonella typhimurium-Stämmen TA 98, TA 100, TA 1535 und TA 1537 ohne und mit metabolischer Aktivierung (S9-Mix aus mit Aroclor 1254 induzierter Ratten- bzw. Syrischer Hamsterleber) auf genmutagene Eigenschaften geprüft. Es kamen Konzentrationen von 100, 333, 1000, 3333 und 10000 µg/Platte zum Einsatz. Als Lösungsmittel wurde Dimethylsulfoxid (DMSO) verwendet. In der höchsten Konzentration besaß Isopren bakteriotoxische Eigenschaften. Die Substanz erwies sich sowohl mit als auch ohne metabolische Aktivierung als nicht mutagen in diesem Testsystem (NTP, 1983, 1995, 1997; Mortelmans et al., 1986).

Ebenfalls keine Hinweise auf mutagene Eigenschaften von Isopren (Reinheitsgrad 99 %) fanden sich in einem weiteren Salmonella/Mikrosomen-Test, durchgeführt als Exsikkatortest, an den Salmonella typhimurium-Stämmen TA 98, TA 100, TA 1530, TA 1535 und TA 1538 mit und ohne metabolische Aktivierung (S9-Mix aus mit Aroclor induzierter Rattenleber). Es wurden Konzentrationen von 25 % v/v (für den Stamm TA 1530 75 % v/v) in der Atmosphäre überprüft. Die Expositionszeit betrug 24 Stunden (De Meester et al., 1981).

Als negativ erwies sich Isopren auch an den *Salmonella typhimurium*-Stämmen TA 102 und TA 104 (keine weiteren Angaben; Kushi et al., 1985).

Die folgenden Isopren-Metaboliten wurden ohne metabolische Aktivierung an den *Salmonella typhimurium*-Stämmen TA 98 und TA 100 auf mutagene Eigenschaften untersucht:

- I 3,4-Epoxy-3-methyl-1-buten (Reinheitsgrad 95 %)
- II 3,4-Epoxy-2-methyl-1-buten (keine Angaben zum Reinheitsgrad)
- III 2-Methyl-1,2,3,4-diepoxybutan (Reinheitsgrad 99 %)

Die Metaboliten kamen in Konzentrationen von 2 bis 30 mM/Platte (entsprechend 136 bis 2043 µg/Platte) zum Einsatz. In der hohen Konzentration trat eine bakteriotoxische Wirkung auf. Für die Metaboliten I und II fanden sich keine mutagenen Eigenschaften. Metabolit III führte ab einer Konzentration von etwa 5 mM/Platte (entsprechend 341 µg/Platte) zu einer konzentrationsabhängig erhöhten Revertanzahl bei beiden Stämmen. Bei einer Konzentration von 5 mM/Platte lag die Revertanzahl beim Stamm TA 98 1,5fach und beim Stamm TA 100 2,4fach, bei 10 mM/Platte (entsprechend 681 µg/Platte) 2,8- bzw. 9,4fach und bei 15 mM/Platte (entsprechend 1022 µg/Platte) 1,5- bzw. 11,5fach über den Kontrollwerten. Für den Metaboliten III wurden in einem in vitro-Testverfahren ausgeprägte alkylierende Eigenschaften gefunden. Als Nukleophil diente Nicotinamid. Die Alkylierungsraten betragen für Metabolit I 15, für Metabolit II 35 und für Metabolit III 360 (Gervasi et al., 1985; Gervasi und Longo, 1990).

Isopren (Reinheitsgrad > 99 %; Lösungsmittel DMSO) induzierte im SCE-Test in Konzentrationen von 50 bis 1600 µg/ml ohne metabolische Aktivierung (Expositionszeit 26 Stunden) und von 160 bis 5000 µg/ml mit metabolischer Aktivierung (S9-Mix aus mit Aroclor 1254 induzierten Lebern männlicher Sprague-Dawley-Ratten; Expositionszeit 2 Stunden) keine erhöhte Schwester-Chromatid-Austauschrates in CHO-Zellen. Positivkontrollen wurden mit Mitomycin C bzw. Cyclophosphamid behandelt. Ausgewertet wurden jeweils 50 Zellen. Angaben zur Zytotoxizität fehlen (NTP, 1995, 1997).

Im Chromosomenaberrationstest an CHO-Zellen erwies sich Isopren (Reinheitsgrad > 99 %; Lösungsmittel DMSO) mit und ohne metabolische Aktivierung (S9-Mix aus mit Aroclor 1254 induzierten Lebern männlicher Sprague-Dawley-Ratten) in Konzentrationen von 1600 bis 5000 µg/ml als nega-

tiv. Die Expositionszeiten ohne metabolische Aktivierung betragen 10 Stunden, mit metabolischer Aktivierung 2 Stunden. Positivkontrollen wurden mit Mitomycin C bzw. Cyclophosphamid behandelt. Ausgewertet wurden jeweils 200 Zellen. Angaben zur Zytotoxizität fehlen (NTP, 1995, 1997).

### 7.6.2 In vivo

In der in Kapitel 7.7 beschriebenen Kanzerogenitätsstudie an männlichen und weiblichen F344-Ratten (NTP, 1997) wurden je 10 zusätzliche Tiere/Geschlecht an 6 Stunden/Tag 5 Tage/Woche 4 Wochen lang gegenüber Isopren (Reinheitsgrad 99 %) in Konzentrationen von 0 (Kontrollen), 220, 700 oder 7000 ppm (entsprechend 0, 614, 1953 oder 19530 mg/m<sup>3</sup>) exponiert. Die Tiere wurden insgesamt 17- bis 19mal exponiert mit mindestens zwei aufeinanderfolgenden Expositionen vor der Tötung und Präparation der Lungenfibroblasten. Pro Tier wurden 1000 Lungenfibroblasten hinsichtlich Mikrokernen untersucht. Eine erhöhte Anzahl mikrokernhaltiger Lungenfibroblasten wurde nicht festgestellt. Positivkontrollen wurden nicht mitgeführt (NTP, 1997).

15 männliche B6C3F1-Mäuse (Alter 5 bis 6 Wochen) wurden 6 Stunden/Tag an 12 Tagen (3 Tage Exposition, 2 Tage Pause, 5 Tage Exposition, 2 Tage Pause, 4 Tage Exposition) gegenüber Isopren (Reinheitsgrad > 98 %) in Konzentrationen von 438, 1750 bzw. 7000 ppm (entsprechend 1222, 4883 bzw. 19530 mg/m<sup>3</sup>) exponiert. 15 Kontrolltiere inhalierten Luft. Ca. eine Stunde vor der 12. Exposition wurde eine 50 mg Bromdesoxyuridin-Tablette subkutan implantiert. Zur Bestimmung von Chromosomenaberrationen wurden 10 der eingesetzten Tiere zwischen 17 und 20 Stunden nach der Implantation getötet, während die anderen 5 Mäuse für eine Bestimmung der Schwester-Chromatid-Austauschrates 24 Stunden nach der Tablettenimplantation getötet wurden. 2 Stunden vor der Tötung wurden jedem Tier 2 ml Colchicin/kg Körpergewicht intraperitoneal verabreicht. Gleichzeitig wurde von jedem Tier zur Bestimmung der Mikronuklei in den Erythrozyten ein Blutaussstrich aus peripherem Blut (Schwanzvene) angefertigt. Nach der Tötung wurde von jedem Tier das Knochenmark präpariert und hinsichtlich Chromosomenaberrationen und Schwester-Chromatid-Austauschrates untersucht. Die Exposition gegenüber Isopren bewirkte in den verabreichten Konzentrationen einen signifikanten Anstieg der Schwester-Chromatid-Austauschrates im Knochenmark sowie der mikrokernhalti-

gen Erythrozyten im peripheren Blut. Zudem bewirkte die Exposition eine Verlängerung der mittleren Regenerationszeit der Knochenmarkzellen in der höchsten Konzentration sowie eine dosisabhängige Reduktion der polychromatischen Erythrozyten im peripheren Blut. Anzeichen einer chromosomenaberrativen Wirkung ergaben sich dagegen nicht. Auch der Mitoseindex im Knochenmark war nicht signifikant verändert (Tice et al., 1988; Shelby, 1990; NTP, 1995, 1997).

Im Rahmen einer Kanzerogenitätsstudie mit inhalativer Applikation von Isopren an B6C3F1-Mäusen (siehe Kapitel 7.7; Placke et al., 1996; IISRP, 1993) wurde nach Expositionszeiten von täglich 8 Stunden über 40 (70, 140 und 2200 ppm) bzw. 80 Wochen (10, 70, 280, 700, 2200 (4 Stunden) und 2200 ppm) bei jeweils 10 Tieren das periphere Blut nach der Methode von Miller (1973) hinsichtlich Mikronuklei untersucht. Jeweils 10 Tiere dienten als Kontrollen. Pro Tier wurden 2000 Erythrozyten ausgewertet. Nach 40 Wochen zeigten sich bei den Tieren, die gegenüber 70 und 140 ppm exponiert waren, keine Unterschiede zu den Kontrolltieren. Die Anzahl der Mikronuklei bei den Tieren der 2200 ppm-Gruppe war gegenüber den Kontrollen signifikant (um 147 %) erhöht. Nach einer Expositionszeit von 80 Wochen ergaben sich bei den Tieren der 10 und 70 ppm-Gruppen keine Unterschiede zu den Kontrolltieren. Alle Tiere, die gegenüber Konzentrationen  $\geq 280$  ppm exponiert waren, wiesen gegenüber den Kontrollen signifikant erhöhte Mikronukleiwerte auf (280 ppm um 92 %, 700 ppm um 133 %, 2200 ppm (4 Stunden) um 167 % und 2200 ppm um 125 %; IISRP, 1993; Placke et al., 1996). Die oben beschriebene Erhöhung der Anzahl der mikronukleihaltigen Erythrozyten im peripheren Blut (Tice et al., 1988; Shelby, 1990; NTP, 1995) konnte also auch in dieser Studie bestätigt werden.

In den Neoplasmen der Harderschen Drüse von männlichen B6C3F1-Mäusen, die 6 Monate lang Isopren-Konzentrationen von 2200 und 7000 ppm (entsprechend 6138 und 19530 mg/m<sup>3</sup>) ausgesetzt waren und anschließend 6 Monate lang nachbeobachtet wurden (genaue Versuchsbeschreibung siehe Kapitel 7.7; Melnick et al., 1992, 1994, 1996; NTP, 1995), wurden die genetischen Veränderungen in den K- und H-ras Protoonkogenen charakterisiert. Die Mutationen an K- und H-ras wurden durch Einzelstrang-Konformationspolymorphismus-Analyse und direkte Sequenzierung von mittels Polymerase-Kettenreaktion amplifizierter DNA, die aus diesen Neoplasmen isoliert wurde, identifiziert. Eine hohe Frequenz an K- und H-ras

Mutationen wurde in den Isopren-induzierten Neoplasmen (100 %) gefunden im Vergleich zu Neoplasmen von Kontrolltieren (0 %) oder von historischen Kontrollen für B6C3F1-Mäuse (65 %). Die vorherrschenden Mutationen bestanden aus A zu T Transversionen (CAA zu CTA) am K-ras Kodon 61 (15/30) und C zu A Transversionen (CAA zu AAA) am H-ras Kodon 61 (8/30). Nach den Autoren legen diese Daten nahe, daß die Aktivierung von ras-Protoonkogenen zur Tumorentstehung in der Harderschen Drüse von Isopren-exponierten B6C3F1-Mäusen beiträgt (keine weiteren Angaben; Hong et al., 1995).

## 7.7 Kanzerogenität

Gruppen von je 40 männlichen F344-Ratten wurden täglich für 6 Stunden (plus 12 Minuten zur Erreichung von 90 % der Zielkonzentration) an 5 Tagen/Woche 26 Wochen lang gegenüber Isopren-Dampfkonzentrationen (Reinheitsgrad > 99 %) von 0 (Kontrollen), 70, 220, 700, 2200 oder 7000 ppm (entsprechend 0, 195, 614, 1953, 6138 oder 19530 mg/m<sup>3</sup>) ganzkörperexponiert. Nach der 26wöchigen Exposition wurden je 10 Tiere/Gruppe hinsichtlich hämatologischer Parameter sowie makroskopisch und mikroskopisch untersucht, die restlichen 30 Tiere/Gruppe wurden 26 Wochen lang nachbeobachtet. Bei den exponierten Ratten entsprach die Körpergewichtsentwicklung der der Kontrollen. Ein Tier der 220 ppm-Gruppe starb während der Expositionsperiode (keine Angabe der Ursache). Klinische Symptome wurden während des Versuches nicht beobachtet. Am Ende der Expositionsperiode wurden keine Veränderungen bei den untersuchten hämatologischen Parametern zwischen exponierten und Kontrollratten festgestellt. Die absoluten Lebergewichte waren in der höchsten Konzentration signifikant erhöht, die absoluten Nierengewichte in allen Expositionskonzentrationen. Die Organgewichtserhöhungen waren am Ende der Nachbeobachtungszeit reversibel. In den Testes wurde am Ende der 26wöchigen Exposition ab 700 ppm eine erhöhte Inzidenz an Hyperplasien der interstitiellen Zellen unterschiedlichen Grades festgestellt (Kontrolle 10 %, 7000 ppm 100 %). Da nach den Autoren solche Hyperplasien in 6 Monate alten Ratten unüblich sind, wurden sie als behandlungsbedingt gewertet. Am Ende der Nachbeobachtungszeit wurde eine erhöhte Inzidenz an Adenomen der interstitiellen Zellen festgestellt (Melnick et al., 1992, 1994, 1996; NTP, 1995).

In einer weiteren Kanzerogenitätsstudie an F344-Ratten wurden Gruppen von je 50 männlichen und 50 weiblichen Tieren gegenüber Isopren (Reinheitsgrad 99 %) in Dampfkonzentrationen von 0 (Kontrollen), 220, 700 oder 7000 ppm (entsprechend 0, 614, 1953 oder 19530 mg/m<sup>3</sup>) für 6 Stunden (plus 12 Minuten zur Erreichung von 90 % der Zielkonzentration)/Tag an 5 Tagen/Woche 104 Wochen lang exponiert. Nach 3, 6, 12 und 18 Monaten wurde der Urin von je 10 männlichen und 10 weiblichen Tieren/Gruppe hinsichtlich Gewicht und Konzentration an Kreatinin und 2-Hydroxy-2-methyl-3-butensäure untersucht. 2-Hydroxy-2-methyl-3-butensäure, ein Oxidationsprodukt des Isopren-Metaboliten trans-3-Methyl-2-buten-3,4-diol, stellt nach den Autoren einen Biomarker für die Exposition gegenüber Isopren dar (siehe auch Kapitel 7.1; NTP, 1994). In allen Gruppen, die gegenüber Isopren exponiert waren, stieg die Konzentration an 2-Hydroxy-2-methyl-3-butensäure mit steigender Isopren-Konzentration. Die steigenden Konzentrationen an 2-Hydroxy-2-methyl-3-butensäure waren jedoch, normalisiert auf das Harnkreatinin, nicht proportional der Isopren-Konzentration, was nach den Autoren auf einen nicht linearen Metabolismus im geprüften Konzentrationsbereich hinwies. Die Überlebensrate und die Körpergewichtsentwicklung der gegenüber Isopren exponierten Ratten glichen denen der Kontrolltiere. Die Tumorinzidenzen sind in Tabelle 11 dargestellt. Bei den männlichen Tieren traten in der höchsten Konzentration und bei den weiblichen Tieren ab der untersten geprüften Konzentration von 220 ppm erhöhte Inzidenzen an Fibroadenomen der Brustdrüse auf. Ebenfalls erhöht waren bei den männlichen Tieren ab einer Expositionskonzentration von 700 ppm die Inzidenzen an Adenomen der interstitiellen Zellen in den Hoden und an Nierentubulusadenomen sowie an Nierentubulushyperplasie. Im Gehirn wurden bei den männlichen Tieren 2 und bei den weiblichen Tieren 7 Neoplasmen, wie malignes und benignes Astrozytom, malignes Gliom und Medullablastom, meningealer Granularzelltumor und meningeales Sarkom, festgestellt, die bei den historischen Kontrollen sehr selten oder nie aufgetreten sind und die nach den Autoren daher ebenfalls behandlungsbedingt sein könnten. An nicht neoplastischen Veränderungen wurden bei den männlichen Ratten in den 700 und 7000 ppm-Gruppen eine erhöhte Inzidenz an Fibrose in der Milz beobachtet. Bei den männlichen Ratten war in der hohen Konzentrationsgruppe vermehrt eine Hyperplasie der Nebenschilddrüsen zu verzeichnen, die nach den Autoren oft bei männlichen Ratten mit Nephropathie beobachtet wird. Aufgrund der bei den männlichen Ratten erhöhten Inzidenz an Brustdrüsentumoren, Nierentubulustumoren

und Hodentumoren erwies sich Isopren für männliche Ratten als eindeutig kanzerogen (clear evidence of carcinogenic activity). Bei weiblichen Ratten zeigten sich Hinweise auf eine kanzerogene Wirkung (some evidence of carcinogenic activity) aufgrund der erhöhten Inzidenz an Fibroadenomen der Brustdrüse. Auch das Auftreten sehr seltener Gehirntumoren bei den weiblichen Tieren wurde von den Autoren als mögliche Folge der Behandlung angesehen (NTP, 1997).

| <b>Tabelle 11. Tumorinzidenzen bei männlichen und weiblichen F344-Ratten nach 104wöchiger Exposition gegenüber Isopren</b> |                     |                 |                 |                  |                  |                  |                  |                  |
|--|---------------------|-----------------|-----------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
|  | Konzentration (ppm) |                 |                 |                  |                  |                  |                  |                  |
|  | 0                   |                 | 220             |                  | 700              |                  | 7000             |                  |
|  | ♂                   | ♀               | ♂               | ♀                | ♂                | ♀                | ♂                | ♀                |
| <b>Brustdrüse</b>  |                     |                 |                 |                  |                  |                  |                  |                  |
| Fibroadenome   | 2/50<br>(4 %)       | 19/50<br>(38 %) | 4/50<br>(8 %)   | 35/50*<br>(70 %) | 6/50<br>(12 %)   | 32/50*<br>(64 %) | 21/50*<br>(42 %) | 32/50*<br>(64 %) |
| Karzinome  | 0/50                | 4/50            | 1/50            | 2/50             | 1/50             | 1/50             | 2/50             | 3/50             |
| Fibroadenome und Karzinome   | 2/50<br>(4 %)       | 20/50<br>(40 %) | 5/50<br>(10 %)  | 35/50*<br>(70 %) | 7/50<br>(14 %)   | 32/50*<br>(64 %) | 21/50*<br>(42 %) | 32/50*<br>(64 %) |
| <b>Nieren</b>  |                     |                 |                 |                  |                  |                  |                  |                  |
| Nierentubulusadenome oder Karzinome  | 2/50<br>(4 %)       | 0/50            | 4/50<br>(8 %)   | 0/50             | 8/50*<br>(16 %)  | 5/50             | 15/50*<br>(30 %) | 0/50             |
| <b>Hoden</b>   |                     |                 |                 |                  |                  |                  |                  |                  |
| Adenome  | 33/50<br>(66 %)     | -               | 37/50<br>(74 %) | -                | 44/50*<br>(88 %) | -                | 48/50*<br>(96 %) | -                |
| <b>Gehirn</b>  |                     |                 |                 |                  |                  |                  |                  |                  |
| maligne oder benigne Astrozytome   | 0/50                | 0/50            | 0/50            | 0/50             | 0/50             | 1/50             | 1/50             | 0/50             |
| maligne Gliome   | 0/50                | 0/50            | 0/50            | 0/50             | 0/50             | 0/50             | 0/50             | 1/50             |
| maligne Medullablastome  | 0/50                | 0/50            | 0/50            | 0/50             | 0/50             | 0/50             | 0/50             | 1/50             |
| meningeale benigne Granularzelltumoren   | 0/50                | 0/50            | 0/50            | 1/50             | 1/50             | 0/50             | 0/50             | 1/50             |
| meningeale Sarkome   | 0/50                | 0/50            | 0/50            | 1/50             | 0/50             | 0/50             | 0/50             | 1/50             |
| * signifikant unterschiedlich zur Kontrollgruppe   |                     |                 |                 |                  |                  |                  |                  |                  |

Gruppen von je 40 männlichen B6C3F1-Mäusen wurden, wie in der oben geschilderten 26wöchigen Rattenstudie (siehe Melnick et al., 1992, 1994, 1996; NTP, 1995), täglich für 6 Stunden (plus 12 Minuten zur Erreichung von 90 % der Zielkonzentration) an 5 Tagen/Woche 26 Wochen lang gegenüber Isopren-Dampfkonzentrationen (Reinheitsgrad > 99 %) von 0 (Kontrollen), 70, 220, 700, 2200 oder 7000 ppm (entsprechend 0, 195, 614, 1953, 6138 oder 19530 mg/m<sup>3</sup>) ganzkörperexponiert. Nach der 26wöchigen Exposition wurden je 10 Tiere/Gruppe hinsichtlich hämatologischer Parameter sowie makroskopisch und histopathologisch untersucht, die restli-

chen 30 Tiere/Gruppe wurden 26 Wochen lang nachbeobachtet. Während der Expositionsperiode starben je ein Tier der Kontrollgruppe, der 70 und 700 ppm-Gruppe, 2 Tiere der 2200 ppm-Gruppe und 6 Tiere der 7000 ppm-Gruppe oder wurden in moribundem Zustand getötet. Während der Nachbeobachtungsperiode starben je 2 Tiere in der 0, 220, 700 und 2200 ppm-Gruppe, eines in der 70 ppm-Gruppe und 3 in der 7000 ppm-Gruppe. Die Körpergewichte lagen in der höchsten Konzentration nach der 26wöchigen Exposition signifikant unter denen der Kontrolle, am Ende der Nachbeobachtungszeit jedoch wieder im Bereich der Kontrollen. An klinischen Symptomen wurden zum Ende der Expositionsperiode hin in der höchsten Konzentration abnormale Haltung und Paralyse der hinteren Extremitäten beobachtet, die im Verlauf der Nachbeobachtungszeit reversibel waren (Ergebnisse zu weitergehenden neurotoxischen Untersuchungen sind ausführlich in Kapitel 7.10 dargestellt). Ab einer Konzentration von 700 ppm trat am Ende der Expositionszeit, wie schon in der 13-Wochen-Inhalationsstudie (siehe Kapitel 7.5), eine makrozytäre Anämie auf. In der höchsten Konzentration lagen die absoluten und relativen Lebergewichte am Ende der Expositions- sowie der Nachbeobachtungsperiode signifikant über den Kontrollwerten. Am Ende der Nachbeobachtungszeit waren auch die relativen Lebergewichte der 700 und 2200 ppm-Gruppe erhöht. Geringere absolute und relative Testesgewichte waren in der höchsten Konzentration am Ende der Expositionsperiode zu verzeichnen, ein Befund, der zu Versuchsende reversibel war. Zu beiden Untersuchungszeitpunkten waren bei den Tieren, die gegenüber 7000 ppm exponiert waren, die absoluten Gehirngewichte niedriger als die der Kontrolltiere; am Ende der Nachbeobachtungszeit lagen ab einer Konzentration von 700 ppm die relativen Gehirngewichte signifikant unter denen der Kontrolltiere. Am Versuchsende wurden ab einer Konzentration von 700 ppm erhöhte Tumorinzidenzen in Leber, Lunge, Vormagen und Harderscher Drüse festgestellt (siehe Tabelle 12). Auch waren ab dieser Konzentration die Inzidenzen an multiplen und/oder malignen Neoplasmen höher als bei den Kontrollen.

**Tabelle 12. Tumorzinzenzen bei männlichen B6C3F1-Mäusen nach 26wöchiger Exposition gegenüber Isopren und 26wöchiger Nachbeobachtungszeit**

|   | Konzentration (ppm) |                |                |                   |                   |                   |
|---|---------------------|----------------|----------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|   | 0                   | 70             | 220            | 700               | 2200              | 7000              |
| Leber<br>(hepatozelluläre Adenome oder Karzinome)               | 7/30<br>(23 %)*     | 3/30<br>(10 %) | 7/29<br>(24 %) | 15/30<br>(50 %)** | 18/30<br>(60 %)** | 17/28<br>(61 %)** |
| Lunge<br>(alveoläre/bronchioläre Adenome oder Karzinome)        | 2/30<br>(7 %)       | 2/30<br>(7 %)  | 1/29<br>(3 %)  | 5/30<br>(17 %)    | 10/30<br>(33 %)** | 9/28<br>(32 %)**  |
| Vormagen<br>(Plattenepithelzellpapillome oder -karzinome)       | 0/30<br>(0 %)       | 0/30<br>(0 %)  | 0/30<br>(0 %)  | 1/30<br>(3 %)     | 4/30<br>(13 %)    | 6/30<br>(20 %)**  |
| Hardersche Drüse<br>(Adenome)                                   | 2/30<br>(7 %)       | 6/30<br>(20 %) | 4/30<br>(13 %) | 14/30<br>(47 %)** | 13/30<br>(43 %)** | 12/30<br>(40 %)** |
| * Anzahl der Tiere mit Neoplasmen/Anzahl der untersuchten Tiere |                     |                |                |                   |                   |                   |
| ** signifikant unterschiedlich zur Kontrollgruppe               |                     |                |                |                   |                   |                   |

An nicht neoplastischen Veränderungen wurden in der 7000 ppm-Gruppe in den Testes eine Atrophie der Samenkanälchen, ab 700 ppm epitheliale Hyperplasie des Vormagens und ab 220 ppm eine leichte Degeneration des olfaktorischen Epithels und makrozytäre Anämie beobachtet. Für Mäuse erwies sich Isopren aufgrund dieser Ergebnisse als eindeutig kanzerogen (clear evidence of carcinogenicity; Melnick et al., 1992, 1994, 1996; NTP, 1995).

Eine weitere Kanzerogenitätsstudie mit inhalativer Exposition wurde an männlichen und weiblichen B6C3F1-Mäusen (50 Tiere/Gruppe) durchgeführt. Eingesetzt wurden Isopren-Konzentrationen (Reinheitsgrad  $\geq 99\%$ ) von 10 bis 2200 ppm (entsprechend 28 bis 6138 mg/m<sup>3</sup>). Die Expositionszeiten betragen 4 oder 8 Stunden/Tag, 5 Tage/Woche über 20, 40 oder 80 Wochen (Ganzkörperexposition). Danach wurden die Tiere bis zur Woche 104 nachbeobachtet. Der Versuchsaufbau ist in Tabelle 13 dargestellt.

| <b>Tabelle 13. Versuchsaufbau einer chronischen Inhalationsstudie mit Isopren an B6C3F1-Mäusen über bis zu 80 Wochen</b> |                      |                  |                                    |                        |
|--|----------------------|------------------|------------------------------------|------------------------|
| Konzentration  |                      | Anzahl der Tiere | Tägliche Expositionszeit (Stunden) | Versuchsdauer (Wochen) |
| (ppm)  | (mg/m <sup>3</sup> ) |                  |                                    |                        |
| 0  | 0                    | 50 ♂, 50 ♀       | 8                                  | 80                     |
| 10   | 28                   | 50 ♂, 50 ♀       | 8                                  | 80                     |
| 70   | 195                  | 50 ♂, 50 ♀       | 8                                  | 80                     |
| 70   | 195                  | 50 ♂             | 8                                  | 40                     |
| 140  | 391                  | 50 ♂             | 8                                  | 40                     |
| 280  | 781                  | 50 ♂             | 8                                  | 80                     |
| 280  | 781                  | 50 ♂             | 8                                  | 20                     |
| 700  | 1953                 | 50 ♂             | 8                                  | 80                     |
| 2200   | 6138                 | 50 ♂             | 8                                  | 80                     |
| 2200   | 6138                 | 50 ♂             | 8                                  | 40                     |
| 2200   | 6138                 | 50 ♂             | 4                                  | 80                     |
| 2200   | 6138                 | 50 ♂             | 4                                  | 20                     |

Die ersten 13 Wochen wurden die Körpergewichte wöchentlich, später monatlich erfaßt. Am Versuchsende wurden hämatologische Parameter untersucht (Anzahl Erythrozyten, Hämatokrit, Hämoglobin, Anzahl Leukozyten, Differentialblutbild und morphologische Untersuchung) und bei allen Tieren eine umfassende makroskopische und histopathologische Untersuchung durchgeführt. Es wurde ein konzentrationsabhängiger Effekt von Isopren auf die Überlebensrate festgestellt. Etwa in Woche 80 hatten die Tiere, die Konzentrationen  $\geq 280$  ppm ausgesetzt waren, niedrigere Überlebensraten ( $< 50\%$ ; keine weiteren Angaben). Diese Tiere wurden daher bereits in Woche 96 getötet, um sicherzustellen, daß eine ausreichende Anzahl für die histopathologische Untersuchung zur Verfügung stand. Die Körpergewichtsentwicklung entsprach in allen exponierten Gruppen der der Kontrolltiere. An klinischen Symptomen wurden ab dem Versuchstag 56 in den 2200 ppm-Gruppen eine behandlungsbedingte Schwellung des Abdomens festgestellt. Die Häufigkeit dieser Schwellung korrelierte direkt mit der Inzidenz an Lebertumoren. Erstmals ab dem Versuchstag 534 wurde eine Schwellung der Augen beobachtet, die mit der Inzidenz an Tumoren der Harderschen Drüse korrelierte. Substanzbedingte Effekte auf die untersuchten hämatologischen Parameter wurden nicht festgestellt. Bei den Tieren, die 80 Wochen lang Isopren-Konzentrationen von 280, 700 und 2200

ppm ausgesetzt waren, lagen die absoluten und relativen Hodengewichte signifikant unter denen der Kontrollen (um 20 bis 30 %). Bei den weiblichen Tieren lagen die Ovariengewichte in den beiden Expositionsgruppen (10 und 70 ppm) nicht signifikant unter denen der Kontrollen. Die Tumorzinzidenzen der männlichen Tiere sind in Tabelle 14 dargestellt.

| <b>Tabelle 14. Tumorzinzidenzen bei männlichen B6C3F1-Mäusen nach 20-, 40- bzw. 80wöchiger Exposition gegenüber Isopren (Gesamtversuchsdauer 96 bzw. 104 Wochen)</b> |       |       |                    |       |                    |                    |                    |                    |                      |                      |                    |                    |
|--|-------|-------|--------------------|-------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|----------------------|----------------------|--------------------|--------------------|
| ppm/Wochen   | 0/80  | 10/80 | 70/40              | 70/80 | 140/40             | 280/20             | 280/80             | 700/80             | 2200/20 <sup>①</sup> | 2200/80 <sup>①</sup> | 2200/40            | 2200/80            |
| ppm x Wochen   | 0     | 800   | 2800               | 5600  | 5600               | 5600               | 22400              | 56000              | 22000                | 88000                | 88000              | 176000             |
| Alveoläre/bronchioläre   |       |       |                    |       |                    |                    |                    |                    |                      |                      |                    |                    |
| Adenome  | 11/50 | 16/50 | 8/50               | 4/50  | 10/50              | 16/50              | 13/50              | 23/50 <sup>②</sup> | 14/50                | 15/50                | 29/49 <sup>②</sup> | 30/50 <sup>②</sup> |
| Karzinome  | 0     | 1     | 0                  | 2     | 1                  | 3                  | 1                  | 7 <sup>②</sup>     | 2                    | 3                    | 3                  | 7 <sup>②</sup>     |
| Hepatozelluläre  |       |       |                    |       |                    |                    |                    |                    |                      |                      |                    |                    |
| Adenome  | 11/50 | 12/50 | 14/49              | 5/50  | 22/50 <sup>②</sup> | 18/49              | 24/50 <sup>②</sup> | 27/48 <sup>②</sup> | 22/50 <sup>②</sup>   | 21/50 <sup>②</sup>   | 28/47 <sup>②</sup> | 30/50 <sup>②</sup> |
| Karzinome  | 9     | 6     | 11                 | 9     | 10                 | 12                 | 16                 | 17                 | 12                   | 15                   | 18 <sup>②</sup>    | 16                 |
| Hardersche Drüse   |       |       |                    |       |                    |                    |                    |                    |                      |                      |                    |                    |
| Adenome  |       |       |                    |       |                    |                    |                    |                    |                      |                      |                    |                    |
| Karzinome  | 4/47  | 4/49  | 13/48 <sup>②</sup> | 9/50  | 12/50 <sup>②</sup> | 16/49 <sup>②</sup> | 17/50 <sup>②</sup> | 26/49 <sup>②</sup> | 19/49 <sup>②</sup>   | 28/50 <sup>②</sup>   | 31/49 <sup>②</sup> | 35/50 <sup>②</sup> |
|  | 0     | 0     | 0                  | 0     | 2                  | 3                  | 1                  | 3                  | 1                    | 2                    | 0                  | 2                  |
| Hämangiosarkome  |       |       |                    |       |                    |                    |                    |                    |                      |                      |                    |                    |
| Herz   |       |       |                    |       |                    |                    |                    |                    |                      |                      |                    |                    |
| Milz   | 0/49  | 0/50  | 0/49               | 0/50  | 0/50               | 0/50               | 2/50               | 1/50               | 4/50                 | 1/50                 | 1/49               | 1/50               |
|  | 1/49  | 3/48  | 1/47               | 2/50  | 3/50               | 2/47               | 1/50               | 2/48               | 2/48                 | 2/50                 | 0/47               | 1/49               |
| Vormagen   |       |       |                    |       |                    |                    |                    |                    |                      |                      |                    |                    |
| Plattenepithelzellpapillome  | 0/50  | 0/48  | 0/47               | 0/50  | 0/49               | 0/46               | 0/50               | 1/47               | 0/48                 | 1/50                 | 2/47               | 1/50               |
| Plattenepithelzellkarzinome  | 0     | 0     | 0                  | 0     | 0                  | 0                  | 1                  | 0                  | 1                    | 1                    | 0                  | 3                  |
| Histiozytäre Sarkome   | 0/50  | 2/50  | 2/50               | 2/50  | 1/50               | 8/50 <sup>②</sup>  | 4/50               | 2/50               | 5/50 <sup>②</sup>    | 7/50 <sup>②</sup>    | 7/50 <sup>②</sup>  | 2/50               |
| Lymphome   | 2/50  | 1/50  | 2/50               | 4/50  | 1/50               | 7/50               | 5/50               | 4/50               | 4/50                 | 4/50                 | 5/50               | 6/50               |

① Exposition für 4 statt 8 Stunden/Tag  
 ② signifikant unterschiedlich zu den Kontrolltieren (p < 0,05; Fisher's Exact Test)

Ab einer Konzentration von 140 ppm war die Inzidenz an hepatozellulären Adenomen und ab einer von 70 ppm die an Adenomen der Harderschen Drüse signifikant erhöht. Die Inzidenz an primären alveolären Adenomen und Karzinomen war in den Gruppen, die 8 Stunden/Tag gegenüber 700 oder 2200 ppm Isopren exponiert waren, signifikant erhöht. Bei 6 Mäusen, die gegenüber Konzentrationen von > 140 ppm exponiert waren, wurden Plattenepithelzellkarzinome des Vormagens diagnostiziert. Insgesamt 5 Plattenepithelzellpapillome des Vormagens wurden bei Tieren der beiden oberen Konzentrationsgruppen festgestellt. Die Inzidenz an histiozytären Sarkomen war bei einer Expositionskonzentration von 280 ppm nicht kon-

zentrationsabhängig erhöht. Bei den exponierten männlichen Tieren wurde eine leicht erhöhte Inzidenz an Hämangiosarkomen der Milz und des Herzens beobachtet. Nach den Autoren treten bei B6C3F1-Mäusen Hämangiosarkome des Herzens äußerst selten auf (0/658 bei historischen Kontrollen aus chronischen Inhalationsstudien). Bei den weiblichen Tieren, die gegenüber 10 und 70 ppm Isopren exponiert waren, wurden in der 70 ppm-Gruppe erhöhte Inzidenzen an Hämangiosarkomen der Milz (4/50; Kontrollen 1/50), Adenomen der Harderschen Drüse (8/49; Kontrollen 2/49) und Adenomen der Hypophyse (9/49; Kontrollen 1/49) beobachtet. Verglichen mit historischen Kontrollwerten für Hämangiosarkome der Milz (4/654; 0,61 %) hielten die Autoren die erhöhte Inzidenz an Hämangiosarkomen in der 70 ppm-Gruppe (8 %) für möglicherweise behandlungsbedingt. Die erhöhten Inzidenzen an Adenomen der Harderschen Drüse und der Hypophyse lagen noch im Bereich der historischen Kontrollen. An nicht neoplastischen Veränderungen wurden bei den männlichen Tieren der oberen Konzentrationsgruppen ein leichter Anstieg an Hyperplasien der alveolären Epithelzellen und an fokalen epithelialen Hyperplasien der Vormagenmucosa beobachtet (keine weiteren Angaben). Bei den weiblichen Mäusen der 70 ppm-Gruppe und bei den männlichen Tieren in den 140, 280, 700 und 2200 ppm-Gruppen wurde fokal leichte Metaplasie des olfaktorischen Epithels zum respiratorischen Epithel festgestellt. Bei den exponierten Mäusen wurden erhöhte Inzidenzen an degenerativen Veränderungen in Herzmuskel, Hoden und Nebenhoden sowie Preputialdrüse festgestellt (keine weiteren Angaben), die von den Autoren auf den schlechten Allgemeinzustand der Tiere zurückgeführt wurden. Eine Paralyse der hinteren Extremitäten und degenerativen Veränderungen im Rückenmark, wie sie in der oben beschriebenen Kanzerogenitätsstudie des National Toxicology Program (NTP) beobachtet wurden (siehe auch Kapitel 7.10), wurden nicht festgestellt. Als no observed effect level wurden in dieser Studie 10 ppm (entsprechend 28 mg/m<sup>3</sup>) und als lowest observed effect level für Tumoren 70 ppm (entsprechend 195 mg/m<sup>3</sup>) angegeben. Mit dem Versuchsdesign dieser Studie wurde auch festgestellt, daß die kumulative Exposition keine adäquate Vorhersage der Tumorzinzidenz erlaubt. Die selbe kumulative Exposition schien mehr oder weniger toxisch, je nachdem, wie sie über die Zeit erfolgte. So resultierte z. B. eine um den Faktor 4 erhöhte Isoprenkonzentration (von 70 auf 280 ppm) bei gleichzeitiger Verkürzung der Expositionsdauer um den Faktor 4 (von 80 auf 20 Wochen) in einem signifikanten Anstieg der Lungentumoren von 12 auf 38 % und in einem Anstieg

der Lebertumoren um 25 % (IISRP, 1993; Placke et al., 1996; Cox et al., 1996).

Aufgrund der Ergebnisse der Kanzerogenitätsstudie des NTP an Ratten und Mäusen (Melnick et al., 1992, 1994, 1996; NTP, 1995) stuft die International Agency for Research on Cancer (IARC) Isopren 1994 als möglicherweise kanzerogen für den Menschen (possibly carcinogenic to humans) ein (Gruppe 2B; IARC, 1994). Auch in den zwischenzeitlich durchgeführten weiteren Kanzerogenitätsstudien (IISRP, 1993; Placke et al., 1996; Cox et al., 1996; NTP, 1997) hat sich Isopren als kanzerogen erwiesen.

In einer Tumorinitiations-Promotionsstudie erhielten je 30 weibliche ICR-Swiss-Mäuse (55 bis 60 Tage alt) 7,12-Dimethylbenz[ $\alpha$ ]anthracen (DMBA) einmalig in einer Dosierung von 0,125 mg in 0,25 ml Aceton auf die geschorene Rückenhaut appliziert. Nach einem behandlungsfreien Zeitraum von 3 Wochen wurde den Tieren 0,15 % Isopren mit 0,006 % Krotonharz 5mal pro Woche 18 Wochen lang auf die Haut appliziert. Entsprechende Kontrollgruppen (DMBA + Krotonharz, DMBA, Aceton) wurden mitgeführt. Die Tiere wurden wöchentlich hinsichtlich Anzahl und Verteilung von Tumoren untersucht und monatlich gewogen. Am Versuchsende wiesen 90 % der mit Isopren und Krotonharz behandelten Tiere sowie der Positivkontrolltiere Tumoren auf. Pro Maus wurden 8,0 Papillome festgestellt (DMBA + Krotonharz 12,2, DMBA 0, Aceton 0; keine weiteren Angaben; Shamberger, 1971).

## **7.8 Reproduktionstoxizität**

Je 24 bis 26 trächtige Sprague-Dawley-Ratten wurden gegenüber 0 (Kontrollen), 280, 1400 oder 7000 ppm Isopren (entsprechend 0, 781, 3906 oder 19530 mg/m<sup>3</sup>; Reinheitsgrad > 99 %) als Dampf an den Tagen 6 bis 19 der Trächtigkeit für 6 Stunden (plus 12 Minuten zur Erreichung von 90 % der Zielkonzentration)/Tag ganzkörperexponiert. Je 10 nicht trächtige Weibchen wurden pro Konzentration mitgeführt. Die Körpergewichte der trächtigen Tiere wurden an den Tagen 0, 6, 10, 14, 17 und 20 bestimmt, die der nicht trächtigen an den Tagen 1, 5, 10 und 20. Einen Tag nach der letzten Exposition wurden die Tiere getötet, Leber, Niere und gravider Uterus gewogen, die Anzahl der Implantationen, Resorptionen und lebender

und toter Feten/Wurf bestimmt sowie die Plazenta untersucht. Die lebenden Feten wurden gewogen und auf viszerale und skelettale Mißbildungen geprüft. Während des Versuches starb keines der trächtigen Tiere. Klinische Symptome wurden nicht beobachtet. Bei den trächtigen und nicht trächtigen Tieren entsprach die Körpergewichtsentwicklung zu allen Untersuchungszeitpunkten der der Kontrollen. Die Organgewichte der trächtigen Tiere unterschieden sich nicht von denen der Kontrolltiere, mit Ausnahme des relativen Nierengewichtes in der höchsten Konzentration (7000 ppm), das leicht, aber signifikant höher war als das der Kontrolltiere ( $p < 0,05$ ; Turkey's-t-Test). Implantationen/Mutttertier, Resorptionen/Wurf, Fetenmortalität und Körpergewichte der Feten unterschieden sich nicht signifikant bei exponierten und bei Kontrolltieren. Eine erhöhte Inzidenz an Mißbildungen oder ein erhöhter Prozentsatz von Mißbildungen/Wurf wurde bei den exponierten Tieren nicht festgestellt. Die Inzidenz an Feten mit Variationen oder verminderter Ossifikation war bei den exponierten Tieren nicht erhöht (Mast et al., 1989; NTP, 1995).

In oben beschriebener Versuchsanordnung wurden auch je 27 bis 29 trächtige CD1-Swiss-Mäuse gegenüber Isopren an den Tagen 6 bis 17 der Trächtigkeit exponiert. Die Bestimmung der Körpergewichte erfolgte bei den trächtigen Tieren an den Tagen 0, 6, 9, 12, 15 und 18, die der nicht trächtigen an den Tagen 1, 5, 10 und 18. Während des Versuches starb kein Tier. Klinische Symptome wurden nicht beobachtet. Bei den nicht trächtigen Tieren entsprach die Körpergewichtsentwicklung der der Kontrollen. Gegenüber den Kontrollen niedrigere Körpergewichte wurden dagegen bei den exponierten Tieren an den Tagen 12, 15 und 18 festgestellt, in der höchsten Konzentration (7000 ppm) signifikant an den Tagen 15 und 18. In der höchsten Konzentration lagen die Gewichte des graviden Uterus signifikant unter denen der Kontrolle. Die absoluten Gewichte von Leber und Nieren der exponierten Tiere unterschieden sich nicht signifikant von denen der Kontrollen. In der 1400 ppm-Gruppe lagen jedoch die relativen Lebergewichte und in der 7000 ppm-Gruppe die relativen Leber- und Nierengewichte signifikant über denen der Kontrollgruppe. Bei den exponierten Tieren waren die Anzahl von Implantationen/Mutttertier und Resorptionen/Wurf gegenüber den Kontrollen nicht verändert. Es gab keine signifikanten Unterschiede bei der Fetensterblichkeit oder der Anzahl von lebenden Feten/Wurf. Die Körpergewichte der männlichen und weiblichen Feten fielen jedoch mit steigender Konzentration. Signifikant unter denen der

Kontrolltiere lagen sie bei den männlichen Feten bei 1400 und 7000 ppm und bei den weiblichen Feten bei allen drei Konzentrationen. Die Gesamtinzidenz an Mißbildungen oder der Prozentsatz mißgebildeter Feten/Wurf waren nicht erhöht. Die Inzidenz an Variationen und verminderten Ossifikationen stieg von 22,3 % bei den Kontrollen auf 40,3 % in der 7000 ppm-Gruppe. Der Prozentsatz der Feten/Wurf mit Variationen/verminderter Ossifikation (vorwiegend überzählige Rippen) stieg mit steigender Konzentration und lag in der höchsten Konzentration signifikant über dem der Kontrollen (Kontrolle 24 %, 7000 ppm 41,3 %; Mast et al., 1989; NTP, 1995).

Wistar-Ratten erhielten oral vom 9. bis 12. Trächtigkeitstag 22, 379 bzw. 1895 mg Isopren/kg Körpergewicht. Hinweise auf embryotoxische bzw. teratogene Effekte ergaben sich nicht. Bei den Feten wurde eine geringfügig retardierte Ossifikation des Sternums und in noch geringerem Maß des Hinterhauptbeins gefunden (keine weiteren Angaben; Tsutsumi et al., 1969).

In den in Kapitel 7.5 beschriebenen 13-Wochen-Inhalationsstudien des National Toxicology Program (NTP) ergaben sich bei Untersuchungen der Spermienmotilität und Vaginalzytologie bei Fischer-344-Ratten, die gegenüber 70, 700 oder 7000 ppm Isopren exponiert waren, keine Befunde. Bei den Mäusen dagegen lagen die absoluten und relativen Testesgewichte in den beiden höchsten Konzentrationen (2200 und 7000 ppm) unter denen der Kontrollen. Histologisch wurde bei 7000 ppm eine Atrophie der Samenkanälchen festgestellt. Bei den Tieren, die für die Untersuchung der Spermienmotilität vorgesehen waren (70, 700 und 7000 ppm), lagen die Gewichte der Epididymides in der 700 bzw. 7000 ppm-Gruppe um 12 bzw. 30 % unter den der Kontrollen. Die Spermienkopfzahl und die Spermienkonzentration waren im Vergleich zu den Kontrollen bei der 700 bzw. 7000 ppm-Gruppe um 12 bzw. 14 % geringer und die Spermienmotilität um 6 bzw. 23 %. Bei den weiblichen Mäusen war in der höchsten Konzentration der durchschnittliche Östruszyklus signifikant länger als bei der Kontrollgruppe (Melnick et al., 1994; NTP, 1995).

Bei den exponierten Ratten wurde in den in Kapitel 7.7 beschriebenen Kanzerogenitätsstudien des NTP am Ende der 26wöchigen Expositionszeit in den Testes histologisch eine erhöhte Inzidenz an Hyperplasien der interstitiellen Zellen unterschiedlichen Grades beobachtet. Da nach den Autoren solche Hyperplasien in 6 Monate alten Ratten unüblich sind, wurden

sie als behandlungsbedingt gewertet. Bei den Tieren, die 26 Wochen lang nachbeobachtet wurden, wurde eine erhöhte Inzidenz an Adenomen der interstitiellen Zellen festgestellt. Bei den Mäusen waren am Ende der Expositionszeit in der höchsten Konzentration geringere absolute und relative Testesgewichte zu verzeichnen. Histologisch wurde bei den Tieren in der höchsten Konzentration eine Atrophie der Samenkanälchen beobachtet. Am Ende der Nachbeobachtungszeit lagen die Testesgewichte und die Inzidenz an Atrophie der Samenkanälchen wieder im Bereich der Kontrollen (Melnick et al., 1994; NTP, 1995).

Bei gegenüber Isopren exponierten männlichen Ratten (4000 mg/m<sup>3</sup> für 4 Stunden) waren 24 Stunden nach Expositionsende keine Veränderungen bei der Anzahl der Spermatozoen, des Prozentsatzes lebender und beweglicher Spermatozoen, der osmotischen Resistenz und bei der Anzahl pathologischer Spermatozoen berichtet worden (keine weiteren Angaben; Repina, 1988).

Zur Prüfung einer möglichen toxischen Wirkung auf die Ovarien wurden 10 28 Tage alten weiblichen B6C3F1-Mäusen 7,34 mmol Isopren (keine Angaben zum Reinheitsgrad)/kg Körpergewicht/Tag (entsprechend 500 mg/kg Körpergewicht/Tag) intraperitoneal 30 Tage lang verabreicht. 10 Kontrolltiere erhielten Sesamöl (2,5 ml/kg Körpergewicht). Nach Applikationsende am Tag 30 wurden die Tiere am ersten Tag des Diöstrus ihres Zyklus getötet. Der Östruszustand wurde mit Hilfe der Vaginalzytologie bestimmt. Die Ovarien wurden histopathologisch untersucht, wobei in jedem 20. Schnitt die kleinen und die wachsenden präantralen Follikel gezählt wurden. Isopren reduzierte die Anzahl der kleinen Follikel um  $76 \pm 5$  % (Kontrollgruppe  $131 \pm 13$ , Versuchsgruppe  $31 \pm 6$ ) und die der wachsenden Follikel um  $46 \pm 8$  % (Kontrollgruppe  $51 \pm 4$ , Versuchsgruppe  $28 \pm 4$ ) und erwies sich somit als toxisch für die Ovarien (Doerr et al., 1995).

## **7.9 Wirkungen auf das Immunsystem**

Bei der Ratte fanden sich 24 Stunden nach einer 4stündigen Exposition gegenüber Isopren eine verringerte Zellzahl und ein verringerter Mitoseindex im Thymus. Die Expositionskonzentrationen betragen  $8400 \pm 1090$  bzw.  $21410 \pm 1630$  mg/m<sup>3</sup>. Außerdem waren das absolute und relative Thymusgewicht signifikant erniedrigt. 3 Tage nach der Exposition hatten sich die

Werte wieder normalisiert. Nach Exposition gegenüber niedrigeren Isopren-Konzentrationen (810 bzw. 2180 mg/m<sup>3</sup>) zeigte sich eine Erhöhung des Mitoseindex im Thymus sowie der Lymphozytenzahl im peripheren Blut 24 Stunden nach der Exposition (keine weiteren Angaben; Mamedov, 1979).

Männliche Wistar-Ratten wurden gegenüber Isopren in Konzentrationen von  $98 \pm 4$  bzw.  $1016 \pm 28$  mg/m<sup>3</sup> für 4 Stunden/Tag über 30 Tage exponiert. Die Untersuchungen nach 2, 4, 8, 15 bzw. 30 Versuchstagen umfaßten die Ermittlung von Milz- und Thymusgewicht, Zellzahl und Mitoseindex im Thymus sowie die Anzahl von Lymphozyten im peripheren Blut. Weitere Angaben über die Anzahl der Tiere/Gruppe bzw. Art der Kontrollgruppe liegen nicht vor. Während der Verabreichung kam es in beiden Konzentrationsgruppen phasenweise zu einer verringerten Zellzahl sowie zu einer signifikanten Hemmung der Mitose im Thymus, zu signifikant erhöhten Lymphozytenwerten im peripheren Blut sowie einem verringerten Thymus- bzw. signifikant erhöhten Milzgewicht. Nach 30 Tagen Exposition war in der niedrigen Konzentration der Mitoseindex im Thymus erhöht, während in der hohen Konzentration sowohl die Zellzahl als auch der Mitoseindex im Thymus signifikant verringert waren (keine weiteren Angaben; Mamedov, 1979).

Weiterhin wurden Ratten gegenüber Isopren-Konzentrationen von  $116 \pm 7$  bzw.  $10 \pm 0,15$  mg/m<sup>3</sup> an 4 Stunden/Tag 4 Monate lang exponiert. Danach wurden die Tiere einen Monat lang nachbeobachtet. Nach 1, 2, 3, 4 und 5 Monaten wurden Milz- und Thymusgewicht, Zellzahl und Mitoseindex im Thymus sowie die Anzahl von Lymphozyten im peripheren Blut ermittelt. Untersucht wurden auch die Immunreaktion auf Schaferythrozyten, die Zellzusammensetzung des Leistenlymphknotens und des Knochenmarks sowie die Anzahl der Lymphozyten im Femur, des weiteren andere „integrale Indices“, wie „Nerz“-Reflex, Orientierungsreaktionen usw.. In der höchsten Konzentrationsgruppe waren nach 3 Monaten die Zellzahl im Thymus und das Thymusgewicht signifikant vermindert, nach 4 Monaten dagegen erhöht. Die Lymphozytenzahl im peripheren Blut war ebenfalls verändert. Am Ende der Nachbeobachtungszeit zeigten die Tiere im Vergleich zu einer Kontrollgruppe (keine weiteren Angaben) keine Unterschiede. In der unteren Konzentrationsgruppe lagen alle geprüften Parameter im Bereich der Kontrolltiere. Allerdings zeigte sich einen Monat nach Ver-

suchsende eine erhöhte proliferative Aktivität des Thymus (keine weiteren Angaben; Mamedov, 1979).

Kaninchen (Stamm, Alter und Gewicht nicht angegeben) wurden gegenüber durchschnittlich 400 mg Isopren/m<sup>3</sup> für 4 Stunden/Tag 4 Monate lang bei Raumtemperatur bzw. bei 30 bis 32 °C exponiert. Eine Kontrollgruppe wurde mitgeführt. 2 Wochen nach Versuchsbeginn und im weiteren Versuchsverlauf alle 4 Wochen wurden Bakterizidität des Blutserums, Komplement-Titer, Lysozym-Aktivität, Aktivität der  $\beta$ -Lysine, Gesamtgehalt von Nukleinsäure im Blut, Gesamteiweiß, Eiweißfraktionen im Blutserum und die Phagozytose-Aktivität bestimmt. Bei den Tieren, die bei Raumtemperatur exponiert wurden, zeigte sich nur gegen Ende der Versuchsdauer eine Abnahme der Aktivität der Immuneigenschaften (keine weiteren Angaben). Bei den gegenüber Isopren bei höheren Temperaturen exponierten Tieren zeigte sich zu Beginn der Expositionsphase eine Aktivierung der Schutz-eigenschaften (keine weiteren Angaben), anschließend eine Normalisierung und zu Versuchsende eine Abnahme von Lysozym- und Phagozytose-Aktivität, von Nukleinsäuren und Gesamteiweiß (Samedov et al., 1978; Faustov, 1972).

Aufgrund der unzureichenden Dokumentation von Versuchsaufbau und Versuchsergebnissen sind diese Studien zur Bewertung der Wirkungen von Isopren auf das Immunsystem nicht geeignet.

## **7.10 Neurotoxizität**

Um mögliche neurotoxische Effekte von Isopren zu untersuchen, wurden in der in Kapitel 7.7 beschriebenen Kanzerogenitätsstudie des NTP (Melnick et al., 1992, 1994, 1996; NTP, 1995) bei den männlichen Mäusen, die 26 Wochen lang gegenüber Isopren-Dampf exponiert worden waren und anschließend 26 Wochen nachbeobachtet wurden, am Ende der Expositionszeit sowie während der Recovery-Periode am Tag 2 sowie nach 1, 3 und 6 Monaten die Griffstärke der Vorder- und Hinterextremitäten untersucht. Am Ende der 26wöchigen Expositionszeit lag die Griffstärke der Vorder- und Hinterextremitäten ab einer Konzentration von 220 ppm signifikant unter der der Kontrollen. Während der Recovery-Periode wurden keine signifikanten Unterschiede bei der Griffstärke der Vorderextremitäten beobachtet, während sich die Griffstärke der Hinterextremitäten erst zum Untersu-

chungszeitpunkt nach 3 Monaten wieder normalisiert hatte. Am Ende der Nachbeobachtungszeit lagen die relativen Gehirngewichte ab einer Konzentration von 700 ppm signifikant unter denen der Kontrollen. Histologisch wurden am Ende der Expositionszeit geringgradige degenerative Veränderungen der weißen Substanz des Rückenmarks bei allen Tieren, die gegenüber 7000 ppm exponiert waren, und bei einem Tier, das gegenüber 2200 ppm exponiert war, sowie degenerative Veränderungen des Ischiasnervs bei 2 Tieren der 7000 ppm-Gruppe festgestellt. Nach der 6monatigen Recovery-Periode lag die Inzidenz für eine leichte Rückenmarkdegeneration bei allen exponierten Gruppen signifikant über der der Kontrollen. Die Degeneration war charakterisiert durch ausgedehnte helle Stellen in der weißen Substanz, von denen einige eosinophile Globuli oder „Ovoide“ enthielten. Diese Degeneration des Rückenmarks wurde von den Autoren für die wahrscheinlichste Ursache der Beeinträchtigung der Hinterextremitäten gehalten (Melnick et al., 1994, 1996; NTP, 1995).

Bei der Maus lag der Schwellenwert für eine verringerte motorische Aktivität bei etwa 1100 mg Isopren/m<sup>3</sup> bei 40minütiger Expositionszeit (keine weiteren Angaben; Gostinskii, 1965).

Katzen wurde ein bedingter Reflex (Nahrungsreflex auf Glöckchen, Licht und Summer) antrainiert. Die gemessenen Parameter waren die Latenzphase zwischen Reiz und Bewegungsreaktion und die Geschwindigkeit des Herbeilaufens auf das Signal. Nach einer 1stündigen Exposition gegenüber 400 mg Isopren/m<sup>3</sup> zeigte sich bei einem Tier nur eine geringfügig verlängerte Latenzphase und eine Verlangsamung des Herbeilaufens. Diese Veränderungen hielten 14 Tage lang an. 2 weitere Katzen waren nach Exposition gegenüber 500 bzw. 700 mg/m<sup>3</sup> stärker beeinträchtigt (bis zu einer fehlenden Reaktion auf den Reiz). Die Veränderungen waren nach 14 Tagen reversibel. Als Schwellenkonzentration wurden 400 mg Isopren/m<sup>3</sup> angegeben (keine weiteren Angaben; Korbakova und Fedorova, 1964).

Männliche Ratten (keine Angaben zu Stamm und Anzahl) wurden gegenüber 4000 mg Isopren/m<sup>3</sup> 4 Stunden lang exponiert. Nach Expositionsende wurden der „Summationsschwellenkennwert“ und der Fluchtreflex untersucht. Gegenüber einer Kontrollgruppe wurden „Summationsschwellenkennwert“ und die Anzahl der Fluchtversuche signifikant erniedrigt (keine weiteren Angaben; Repina, 1988).

## 7.11 Sonstige Wirkungen

### ***Hämoglobin-Addukt-Bildung***

Zur Prüfung, ob Isopren mit Hämoglobin Addukte bilden kann, erhielten je 3 männliche B6C3F1-Mäuse und 3 männliche Sprague-Dawley-Ratten (12 bis 14 Wochen alt)  $^{14}\text{C}$ -Isopren, formuliert in Maiskeimöl, in Dosen von 0,3, 3, 300, 1000 und 3000  $\mu\text{mol/kg}$  Körpergewicht (entsprechend ca. 0,02, 0,20, 20,4, 68,1 bzw. 204,4 mg/kg Körpergewicht) einmalig oder 500  $\mu\text{mol/kg}$  Körpergewicht (entsprechend ca. 34 mg/kg Körpergewicht) täglich an 1, 2 oder 3 Tagen intraperitoneal verabreicht. 24 Stunden nach der Applikation wurde das Globin aus Blutproben isoliert und nach entsprechender Aufbereitung mit Hilfe der Flüssigkeitsszintillationsspektroskopie auf Radioaktivität untersucht. Bis zu einer Dosis von 500  $\mu\text{mol } ^{14}\text{C}$ -Isopren/kg Körpergewicht war bei beiden Spezies die analysierte  $^{14}\text{C}$ -Addukt-Menge linear der verabreichten Dosis. Wiederholte Applikationen von 500  $\mu\text{mol/kg}$  Körpergewicht zeigten, daß  $^{14}\text{C}$ -Addukte nahezu linear der verabreichten Menge akkumulierten. Bei beiden Spezies wurden etwa gleiche Mengen an  $^{14}\text{C}$ -Addukten (ca. 40 pmol/mg Globin bei 3000  $\mu\text{mol/kg}$ ) nachgewiesen. Die Effektivität der Addukt-Bildung, korrigiert hinsichtlich der innerhalb von 24 Stunden abgeatmeten Isopren-Menge (siehe Kapitel 7.1), betrug für Mäuse  $0,158 \pm 0,035$  und für Ratten  $0,079 \pm 0,016$  ((pmol  $^{14}\text{C}$ -Addukt/mg Globin)/( $\mu\text{mol}$  retiniertes  $^{14}\text{C}$ -Isopren/kg Körpergewicht); Sun et al., 1989).

Männlichen B6C3F1-Mäusen (3 bis 4 Tiere/Gruppe) wurden 33,2 mg unmarkiertes Isopren oder 35,3 mg  $^{14}\text{C}$ -markiertes Isopren/kg Körpergewicht, formuliert in Maiskeimöl, intraperitoneal an den Tagen 1, 2, 3, 6 und 7 verabreicht. Das Blut wurde 24 Stunden nach der letzten Injektion gesammelt und hinsichtlich der Bildung von Hämoglobin-Addukten untersucht. 24 Stunden nach der letzten Injektion wurden 3 bis 6 % der verabreichten Radioaktivität im Blut und 5 % in der Karkasse nachgewiesen. Angaben zur Menge der entstandenen Hämoglobin-Addukte wurden nicht gemacht (NTP, 1994).

Je 4 männliche B6C3F1-Mäuse (ca. 28 g schwer, 12 bis 13 Wochen alt) inhalierten einmalig 6 Stunden lang 20, 200 oder 2000 ppm  $^{14}\text{C}$ -Isopren (entsprechend ca. 56, 560 bzw. 5600 mg/m<sup>3</sup>). 24 Stunden nach der Exposition wurde das Hämoglobin isoliert und nach entsprechender Aufbereitung die vorhandene Radioaktivität bestimmt. Bei einer Konzentration von 20 ppm

bildeten sich an Hämoglobin-Addukten  $11 \pm 0,5$  pmol/mg Globin, bei 200 ppm  $90 \pm 13$  pmol/mg Globin und bei 2000 ppm  $170 \pm 13$  pmol/mg Globin. Nach inhalativer Applikation wurden im Gegensatz zu oben beschriebener Hämoglobin-Addukt-Bildung nach intraperitonealer Applikation bei höheren Konzentrationen größere Mengen an Hämoglobin-Addukten gebildet. Nach Ansicht der Autoren könnte dies daran liegen, daß die intraperitoneale Injektion eine Bolusdosis darstellt mit einer hohen systemischen Konzentration und damit einer Sättigung des Metabolismus (Bond et al., 1991).

### ***Einfluß von Isopren auf Enzyme***

Kaninchen, die Isopren-Dämpfen (Konzentration nicht angegeben) 4 Stunden/Tag über 2 Monate exponiert waren, ließen eine Abnahme des Gesamtproteins sowie einen Anstieg des Albumin-/Globulin-Verhältnisses im Knochenmark erkennen (keine weiteren Angaben; Faustov und Lobeeva, 1970).

Isopren, formuliert in Maiskeimöl, wurde an 5 bis 7 männliche Swiss-Mäuse in einer Dosis von 500 mg/kg Körpergewicht für 2 oder 7 aufeinanderfolgende Tage verabreicht (wahrscheinlich oral), um festzustellen, ob die Substanz die Aktivität fremdstoffmetabolisierender Enzyme und die Aktivität der Isopren-Epoxidase modifizieren kann. Die Lebermikrosomen der behandelten Mäuse zeigten gegenüber denen der Kontrollen keine Veränderungen in den Spiegeln von Cytochrom  $b_5$  und Cytochrom P-450 sowie in den Aktivitäten der Aminopyrin-N-Demethylase, der Dinemorphan-N-Demethylase und der Isopren-Epoxidase. Die Untersuchungen wurden in zwei voneinander unabhängigen Versuchen durchgeführt (keine weiteren Angaben; Del Monte et al., 1985).

### ***Endogene Entstehung von Isopren***

Bei Maus, Meerschweinchen, Kaninchen, Hund und Huhn (keine weiteren Angaben) ließen sich keine signifikanten Mengen an Isopren in der Atemluft nachweisen. Bei Ratten wurde während der Laktation oder der Fütterung mit saurer Sahne und Hüttenkäse Isopren in der Expirationsluft nachgewiesen (keine weiteren Angaben; Gelmont et al., 1981).

Dünne Schnitte (< 0,3 mm) von Leber und Nieren pathogenfreier Ratten wurden in verschlossenen Glasflaschen 3 Stunden lang bei 37 °C in Phosphatpuffer inkubiert und anschließend die Atmosphäre über den Schnitten gaschromatographisch untersucht. Es wurden geringe Mengen an Isopren nachgewiesen. Die Mengen waren größer, wenn die Gewebe von jungen, 2 bis 4 Monate alten Tieren stammten (keine weiteren Angaben; Gelmont et al., 1981).

Endogen entstandenes Isopren wurde auch im Blut von Versuchstieren nachgewiesen. Hierfür wurde 2 Ratten, 2 Kaninchen, 4 Ponies, 5 Hunden, 5 Kühen und 7 Mutterschafen Blut entnommen, das mit Hilfe von Gaschromatographie/Massenspektrometrie untersucht wurde. Im Gegensatz zum Humanblut (siehe Kapitel 8) konnten nur sehr geringe Mengen an Isopren nachgewiesen werden (< 1 nmol/l; keine weiteren Angaben; Cailleux et al., 1992).

Da sich nur bei der Ratte meßbare Mengen an Isopren in der Expirationsluft nachweisen ließen (siehe oben; Gelmont et al., 1981), wurde versucht, in der zytosolischen Fraktion aus der Leber dieser Spezies die Biosynthese von Isopren aus DL-Mevalonat in vitro nachzuweisen. Die zytosolische Fraktion wurde aus Lebern adulter Sprague-Dawley-Ratten (200 bis 300 g schwer) gewonnen. 3,5 ml dieser Fraktion wurden bei 37 °C zusammen mit DL-Mevalonat (10 mM) und Adenosintriphosphat (5,0 mM) 3 Stunden lang in geschlossenen Reaktionsgefäßen inkubiert. Der Nachweis von entstandenem Isopren erfolgte mit Hilfe der Headspace-Technik gaschromatographisch. Es konnten  $418 \pm 53$  pmol Isopren nachgewiesen werden. Bei Inkubation ohne Zusatz von DL-Mevalonat wurde kein Isopren gefunden. Ein Reaktionsansatz ohne Adenosintriphosphat resultierte in einer 75prozentigen Reduktion der Isopren-Synthese ( $108 \pm 11$  pmol). Die Isopren-Bildung wurde durch Säurebehandlung um das 146fache erhöht. Diese Ergebnisse wurden von den Autoren dahingehend interpretiert, daß eine enzymatische Umwandlung von Mevalonat zu zytosolischen Zwischenprodukten der Sterin-Biosynthese, wie Isopentenylpyrophosphat und das isomere Dimethylallylpyrophosphat, erfolgt, die, neben ihrer Kondensation zu Geranylpyrophosphat, nicht enzymatisch zu Isopren umgewandelt wurden (Deneris et al., 1984, 1985).

## 8 Erfahrungen beim Menschen

Eine Frau und 2 Männer waren je 5 Minuten lang Isopren-Konzentrationen von 278 bis 27800 mg/m<sup>3</sup> ausgesetzt. Es wurden folgende Befunde erhoben: 278 mg/m<sup>3</sup> gerade geruchlich wahrnehmbar; 695 mg/m<sup>3</sup> deutlich geruchlich wahrnehmbar; 2780 mg/m<sup>3</sup> sehr deutlich geruchlich wahrnehmbar; 13900 mg/m<sup>3</sup> sehr deutlich geruchlich wahrnehmbar, Kopfschmerzen; 27800 mg/m<sup>3</sup> deutliche Reizung der Bronchien, starke Kopfschmerzen (keine weiteren Angaben; Bayer, 1972).

Eine Konzentration von 160 mg/m<sup>3</sup> führte bei 10 Freiwilligen zu einer leichten Irritation der Schleimhäute von Nase, Larynx und Pharynx. Die Geruchsschwelle lag bei 10 mg/m<sup>3</sup> (keine weiteren Angaben; Gostinskii, 1965).

Nach Muir (1971) führte auch flüssiges Isopren zu Irritationen an Haut und Augen.

6 Freiwillige (5 Männer, eine Frau) inhalierten Isopren in Konzentrationen von 0 (Kontrolle), 8 und 50 ppm (entsprechend ca. 22 bzw. 140 mg/m<sup>3</sup>) in einem geschlossenen spirometrischen System (15,6 l einschließlich Lungenvolumen). Die Konzentrations-Zeit-Verläufe von inhaliertem und exhalierendem Isopren wurden bis zu 3 Stunden gaschromatographisch bestimmt. Anhand der pharmakokinetischen Daten, die mittels eines Zweikompartiment-Modells, das die Gasphase des Systems ebenso wie den Körper als jeweils homogene Einheit behandelt, in der sich die Substanz sofort und gleichmäßig verteilt, in Ratten und Mäusen bestimmt wurden (siehe Kapitel 7.1; Peter et al., 1987), wurden Konzentrations-Zeit-Kurven für den Menschen vorhergesagt. Aus den Rattendaten extrapolierte Kurven stimmten mit den gemessenen Daten besser überein als die aus den Mäusedaten extrapolierten. Innerhalb des gemessenen Konzentrationsbereiches wurde eine Kinetik 1. Ordnung festgestellt. Die Clearance betrug 81 l/Stunde. Da in diesen Versuchen die Ventilationsrate etwa 320 l/Stunde betrug, ergab sich eine pulmonale Retention von 25 %. Wie bei Ratten und Mäusen wurde nur eine begrenzte Akkumulation im Körper von etwa der 3fachen atmosphärischen Konzentration beobachtet. Der Metabolismus von inhaliertem Isopren wurde eher durch den Transport zu den metabolisierenden Stellen als durch die metabolische Kapazität begrenzt. Die endogene Produktions-

rate wurde mit  $0,15 \mu\text{mol}/(\text{Stunde} \times \text{kg Körpergewicht})$  berechnet (keine weiteren Angaben; Hartmann und Kessler, 1990).

Weiterhin wurden 6 Probanden (5 Männer, eine Frau, Alter 19 bis 41 Jahre) in einem geschlossenen Expositionssystem (Spirometer, Volumen 13,8 l) gegenüber Isopren (Reinheitsgrad 99,5 %) in Konzentrationen von 0, 8,3, 36,4, 42,2, 44,6 und 45,5 ppm (entsprechend 0, ca. 23, 102, 118, 124 bzw. 127  $\text{mg}/\text{m}^3$ ) bis zu 3 Stunden exponiert. Der Zeitverlauf der Konzentrationsänderung im System nach Expositionsbeginn wurde gaschromatographisch bestimmt. Zur pharmakokinetischen Analyse wurde ein Zweikompartiment-Modell (siehe oben) eingesetzt. Die Prozesse der inhalativen Aufnahme, Exhalation und Metabolisierung verliefen nach einer Kinetik 1. Ordnung. Die Produktionsrate wurde als konstant während der Versuchsdauer angesehen. Die pharmakokinetischen Daten bei Ratten und Mäusen (siehe Kapitel 7.1; Peter et al., 1987) wurden unter Verwendung eines Oberflächenfaktors ( $\text{Körpergewicht}^{2/3}$ ) auf jeden Probanden extrapoliert. Mit diesen Werten und der endogenen Produktionsrate als variablem Parameter wurden den experimentellen Datensätzen Kurven angepaßt. Aus den Parametern der extrapolierten Kurven ließen sich folgende pharmakokinetische Eigenschaften beim Menschen ableiten. Das Konzentrationsverhältnis Körper/Umgebungsluft blieb bei einer Konzentration zwischen 10 und 50 ppm nahezu konstant und lag, bedingt durch den Metabolismus, weit unter dem thermodynamischen Verteilungskoeffizienten Organismus/Luft. Die auf die Konzentration in der Atmosphäre bezogenen Werte der inhalatorischen, exhalatorischen und metabolischen Clearance ergaben nach Multiplikation mit der atmosphärischen Konzentration die eingeatmete, abgeatmete bzw. metabolisierte Menge/Zeiteinheit im Fließgleichgewicht. Bei einer Isopren-Konzentration im Bereich von 10 bis 50 ppm lagen die extrapolierten Werte für die inhalatorische Clearance bei 219 bzw. 98 l/Stunde, für die exhalatorische Clearance bei 70 bzw. 14 l/Stunde und für die metabolische Clearance bei 168 bzw. 114 l/Stunde extrapoliert von Daten der Maus bzw. Ratte. Gemäß der Extrapolation mit Daten der Maus metabolisiert der Mensch etwa 71 % des exogen aufgenommenen Isoprens und atmet den Rest unverändert ab. Geht man von den Rattendaten aus, so wird vom Menschen bei gleicher Umgebungskonzentration nur halb so viel Isopren aufgenommen, davon werden 89 % metabolisiert und nur 11 % unverändert abgeatmet. Die alveoläre Retention für exogenes Isopren lag bei einem angenommenen alveolären Atemminutenvolumen von

5 l bei 56 % (extrapoliert aus Daten der Maus) bzw. 38 % (extrapoliert aus Daten der Ratte). Die endogene Produktionsrate betrug  $0,19 \pm 0,04$   $\mu\text{mol}/\text{Stunde}/\text{kg}$  (extrapoliert aus Daten der Maus) bzw.  $0,29 \pm 0,06$   $\mu\text{mol}/\text{Stunde}/\text{kg}$  (extrapoliert aus Daten der Ratte). Die durchschnittliche Belastung des Organismus durch endogen gebildetes Isopren lag bei etwa 264 pmol/ml Gewebe (extrapoliert aus Daten der Maus) bzw. 332 pmol/ml Gewebe (extrapoliert aus Daten der Ratte). Die mit diesen Daten berechnete täglich abgeatmete Menge an Isopren betrug 6,0 mg (Mäusedaten) bzw. 3,8 mg (Rattendaten; Hartmann, 1994).

4 bzw. 5 gesunde Versuchspersonen (3 Männer, eine Frau, 54 bis 75 kg schwer, 19 bis 34 Jahre alt bzw. 4 Männer, eine Frau, 54 bis 91 kg schwer, 28 bis 41 Jahre alt) wurden gegenüber Isopren (Reinheitsgrad 99,5 %) in Konzentrationen von 0 bzw. ca. 8 oder 40 ppm (entsprechend ca. 22 oder 112  $\text{mg}/\text{m}^3$ ) 2,5 Stunden lang in einem geschlossenen Spirometersystem (Volumen 13,8 oder 12 l) mit künstlicher Luft (< 1 % Kohlenwasserstoffe) exponiert und die Konzentrations-Zeit-Verläufe gaschromatographisch bestimmt. Bei der Exposition gegenüber 0 oder 40 ppm resultierte die endogene Isopren-Entstehung in einer Plateau-Konzentration von ca. 0,6 ppm (ca. 1,7  $\text{mg}/\text{m}^3$ ), bei der die Metabolismusrate der endogenen Entstehung gleich. Mit Hilfe eines physiologisch-toxikokinetischen Modells wurde die endogene Entstehungsrate für einen 70 kg schweren Menschen mit 23,8  $\mu\text{mol}/\text{Stunde}$  berechnet und mit Hilfe dieses Wertes die Menge an exhalierendem endogen entstandenem Isopren mit 3,4 mg innerhalb von 24 Stunden. Dieser Wert stimmte mit den direkt gemessenen Werten überein (siehe z. B. Gelmont et al., 1981). Die Metabolisierungsrate für endogen entstandenes Isopren wurde mit 0,31  $\mu\text{mol}/\text{Stunde}/\text{kg}$  Körpergewicht angegeben (keine weiteren Angaben, insbesondere zu den Ergebnissen nach Exposition gegenüber 8 ppm; Filser et al., 1996).

Bei 12 gesunden Freiwilligen ohne bekannte medizinische Probleme wurden Proben der eingeatmeten Luft und der Expirationsluft zwischen 7:00 und 11:00 Uhr morgens gesammelt und mittels Gaschromatographie/Massenspektrometrie hinsichtlich flüchtiger organischer Verbindungen untersucht. Aus der Konzentration in der Expirationsluft minus der Konzentration in der eingeatmeten Luft wurde ein alveolärer Gradient berechnet, der für Isopren stark negativ war (ca.  $-2,1 \times 10^5$ ). Nach den Autoren weist ein negativer Gradient darauf hin, daß eine flüchtige organische Verbindung von außerhalb des Körpers stammt und entweder katabolisiert oder über

einen extrapulmonalen Weg ausgeschieden wird (keine weiteren Angaben; Phillips et al., 1994).

Bei 13 Probanden, die nicht mit Lösungsmittel arbeiteten, wurde mittels Gaschromatographie/Massenspektrometrie eine Isopren-Konzentration von durchschnittlich 0,23 ppm (0,01 bis 0,45 ppm; entsprechend 0,64 (0,03 bis 1,26) mg/m<sup>3</sup>) in der Expirationsluft festgestellt (keine Angaben zum Sammelzeitraum). Bei bis zu 7 Tage alten Neugeborenen konnte kein Isopren in der Expirationsluft nachgewiesen werden (Jansson und Larsson, 1969).

Bei 30 Versuchspersonen wurden 30 l der Expirationsluft aufgefangen, wovon eine 3 l-Probe nach entsprechender Aufarbeitung auf den Gehalt an Kohlenwasserstoffen untersucht wurde. Die Konzentration an Isopren betrug 30 bis 70 % der gesamten Kohlenwasserstoffe. Die ausgeatmete Menge an Isopren wurde mit 2 bis 4 mg/24 Stunden berechnet. Hinsichtlich Alter, Geschlecht, ethnischer Gruppe, Nahrung, Lebensstil, nüchternem bzw. nicht nüchternem Zustand ergaben sich bei den Probanden keine Unterschiede. Die ausgeatmete Isopren-Menge differierte individuell von Tag zu Tag. Nach Meinung der Autoren stellt Isopren eine endogene Substanz dar, die entweder als Nebenprodukt der Isoprenoid-Biosynthese oder als Endprodukt des Isoprenoid-Abbaus entsteht (Gelmont et al., 1981).

8 männliche Freiwillige (Alter 23 bis 47 Jahre, 5 Nichtraucher, 3 Raucher) atmeten 60 Minuten lang Luft ein, in der gaschromatographisch kein Isopren nachweisbar war. In der Expirationsluft, die nach entsprechender Aufbereitung ebenfalls gaschromatographisch untersucht wurde, wurden 69 Verbindungen nachgewiesen. Die abgeatmeten Isopren-Mengen betragen bei den Rauchern 15 bis 390 µg/Stunde und bei den Nichtrauchern 16 bis 250 µg/Stunde. Die höchste Isopren-Menge wurde bei einer Person festgestellt, die der Meinung war, während des Versuches nicht genügend Luft zu bekommen. Die Autoren führten die Entstehung des Isoprens auf psychologischen Stress sowie auf den Katabolismus von Verbindungen mit Steroidstruktur oder die Mevalonsäure-Synthese zurück (Conkle et al., 1975).

Bei 28 gesunden freiwilligen Stadtbewohnern (15 Männer, 13 Frauen, Alter 18 bis 60 Jahre, Nichtraucher, keine Krankheiten oder Einnahme von Medikamenten) wurde 8mal für 3 bis 4 Minuten die Expirationsluft gesammelt und organische Komponenten nach entsprechender Aufbereitung gaschro-

matographisch bestimmt. Ab 7 Tage vor dem Sammeln der Proben wurde die Exposition gegenüber Parfüm, Farben, Kleber, Aerosolen und Staub, Zigarettenrauch sowie industriell verschmutzter Luft vermieden. Background-Proben des Analysensystems wurden innerhalb von 18 Monaten 20mal analysiert. Anhand der gaschromatographischen Auswertung wurden 103 organische Verbindungen endogenen oder exogenen Ursprungs in der Expirationsluft festgestellt. Isopren (33 ng/l) wurde neben Aceton (120 ng/l) und Acetonitril (24 ng/l) als eine Hauptkomponente bestimmt (Krotoszynski et al., 1977).

In einer weiteren Untersuchung der gleichen Arbeitsgruppe wurden mit der selben Methode 387 Proben ausgeatmeter Luft von 54 gesunden Freiwilligen (35 Männer, 19 Frauen) analysiert. Es wurden 115 organische Verbindungen endogener oder exogener Herkunft bestimmt. Als Hauptkomponenten erwiesen sich neben Isopren Dinitromethan, Chloroform, 1-Propanol, 2-Methyl-1-butanol und Dichloracetylen (insgesamt 37,8 % der nachgewiesenen Verbindungen). In 70 % der Proben wurde Isopren mit einer durchschnittlichen Konzentration von 28,9 ng/l gefunden. Die Autoren bezeichneten Isopren als primäre endogene Verbindung, deren Auftreten in der Expirationsluft in Zusammenhang mit physiologischem Stress und deren Herkunft in Zusammenhang mit dem Katabolismus von CoQ- und anderen Verbindungen mit Steroidstruktur oder der Mevalonsäure-Synthese diskutiert wurde (Krotoszynski et al., 1979).

Die Isopren-Konzentration in der Expirationsluft von 43 freiwilligen Versuchspersonen (20 Männer, 23 Frauen, Alter 22 bis 75 Jahre, Nichtraucher) wurde am Morgen 3 Stunden nach der letzten Mahlzeit gaschromatographisch bestimmt. Die Versuchspersonen atmeten zuvor eine Stunde lang Raumluft ein, in der kein Isopren nachgewiesen werden konnte. Die durchschnittliche Isopren-Konzentration in der Expirationsluft betrug  $7,05 \pm 3,53$  nmol/l. Eine signifikante Änderung der Isopren-Konzentration mit dem Lebensalter konnte nicht festgestellt werden (Mendis et al., 1994).

Isopren wurde bei 16 Probanden (6 Männer, 10 Frauen, Nichtraucher) in der Expirationsluft mittels Gaschromatographie und UV-spektrographischer Methoden nachgewiesen. Hierfür exhalierten die Versuchspersonen nach Anhalten des Atems für 30 Sekunden in einen 5 l-Plastikbeutel bei einer konstanten Temperatur von 35 °C. Die mittlere Isopren-Konzentration in der Expirationsluft betrug  $3,73 \pm 1,86$  nmol/l (entsprechend

0,254 ± 0,127 µg/l). Geschlechtsspezifische Unterschiede wurden nicht festgestellt. Aus 9 aufeinanderfolgenden Messungen innerhalb von 100 Minuten bei einem männlichen Probanden ergab sich ein Mittelwert von 3,69 ± 0,60 nmol/l (entsprechend 0,251 ± 0,040 µg/ml). Die Autoren führten die gegenüber anderen Studien niedrigeren gemessenen Werte von Isopren in der Expirationsluft auf das verbesserte Analysenverfahren zurück, das andere Kohlenwasserstoffe, wie Methan, Ethan und n-Pentan, sicher ausschließt (Jones et al., 1995).

Die Konzentration von Isopren in der Alveolarluft von gesunden Probanden betrug bei einer Sammelzeit von 6 bis 8 Stunden 28,3 ± 9,7 nmol/l, entsprechend ca. 1,93 ± 0,66 µg/l (25 Proben). Es ergaben sich keine Unterschiede zwischen Männern und Frauen. Ein Tagesrhythmus wurde beobachtet mit sinkenden Isopren-Konzentrationen während des Tages und steigenden während der Nacht (keine weiteren Angaben; DeMaster et al., 1976).

In einer weiteren Studie mit 50 freiwilligen Versuchspersonen (30 Frauen und 20 Männer, 15 bis 60 Jahre alt) wurde festgestellt, daß die Konzentration an endogen entstandenem Isopren in der Expirationsluft davon abhängig war, ob sich die Personen in wachem Zustand oder im Schlaf befanden. In wachem Zustand zwischen 8:00 und 23:00 Uhr wurde bei allen Versuchspersonen eine durchschnittliche Isopren-Konzentration von 14,6 ± 6,4 nmol/l (entsprechend 0,99 ± 0,44 µg/l) ermittelt. Während der Nacht wurden bei 13 Personen, die schliefen, Konzentrationen zwischen 42,4 ± 13,5 und 45,3 ± 16,5 nmol/l (entsprechend zwischen 2,89 ± 0,92 und 3,09 ± 1,12 µg/l) nachgewiesen. Nach dem Aufwachen fielen die Isopren-Konzentrationen schnell innerhalb von weniger als 20 Minuten auf die „Wachwerte“ ab. Personen (n = 9), die während der Nacht wach blieben, wiesen ähnliche Isopren-Konzentrationen wie die tagsüber gemessenen auf (17,7 ± 7,0 nmol/l, entsprechend 1,21 ± 0,48 µg/l). Bei 9 der schlafenden Personen wurden neben den Isopren-Konzentrationen auch die verschiedenen Schlafstadien (I, II, III, IV, REM) verfolgt. Eine Beziehung zwischen den ermittelten Isopren-Konzentrationen und den Schlafstadien ergab sich jedoch nicht (Cailleux und Allain, 1989).

10 gesunde Versuchspersonen (9 Männer, eine Frau, durchschnittliches Alter 26 ± 2 Jahre, Nichtraucher) wurden an unterschiedlichen Tagen 130 Minuten lang in einer Ganzkörperinhalationskammer gegenüber variablen

Ozon-Konzentrationen (anfänglich 150 ppb, im Lauf der Exposition bis zu 350 ppb) oder gefilterter Luft exponiert. Die Expositionen umfaßten alternierend 10minütige Ruhephasen und 10minütige Laufbandübungen. Die Expirationsluft wurde vor und unmittelbar nach der Exposition spirometrisch gesammelt, bei 6 Personen auch 19 ± 1 Stunden nach Expositionsende, und die Isopren-Konzentration gaschromatographisch bestimmt. Die Isopren-Konzentration (Werte vor der Exposition 0,37 bis 3,2 nmol/l) war unmittelbar nach Expositionsende signifikant erniedrigt, unabhängig davon, ob die Versuchspersonen gegenüber Ozon oder gefilterter Luft exponiert waren (um durchschnittlich 19 bzw. 17 %). Nach den Autoren legten diese Ergebnisse nahe, daß körperliche Tätigkeit alleine die Isopren-Konzentration in der Atemluft reduziert ohne additiven Effekt des Ozons. Bei den 6 Personen, bei denen die Atemluft 19 ± 1 Stunde nach der Exposition untersucht wurde, zeigten sich, vor allem nach Exposition gegenüber Ozon, Isopren-Konzentrationen, die gegenüber den Werten vor der Exposition signifikant erhöht waren (Ozon um 99 %, gefilterte Luft um 51 %). Die Autoren schlugen daher die Isopren-Konzentration in der Expirationsluft als Marker einer physiologischen Antwort auf einen durch Oxidantien, wie Ozon, induzierten Schaden an epithelialen Membranen im unteren Respirationstrakt vor (Foster et al., 1996).

Endogen entstandenes Isopren wurde auch im Blut von 10 Versuchspersonen (6 Frauen und 4 Männer, Alter 30 bis 50 Jahre) mittels Gaschromatographie/Massenspektrometrie nachgewiesen. Hierfür wurden den Personen am Morgen in wachem Zustand 10 ml Blut entnommen. Die gemessenen Isopren-Konzentrationen im Humanblut lagen zwischen 15 und 70 nmol/l (entsprechend 1,02 und 4,77 µg/l) mit einem Mittelwert von 37 ± 25 nmol/l (entsprechend 2,52 ± 1,70 µg/l; Cailleux et al., 1992).

Um den Zusammenhang zwischen der Entstehung des endogenen Isoprens, das in der Atemluft nachgewiesen wird, und der Cholesterinsynthese (siehe Kapitel 7.11; Deneris et al., 1984, 1985) beim Menschen zu untersuchen, wurde freiwilligen Versuchspersonen Lovastatin, ein Präparat, das die Cholesterinsynthese hemmt, einmalig oder über 6 Wochen verabreicht oder sie erhielten über 6 Wochen eine mit Cholesterin angereicherte Diät. In den Versuchen mit einmaliger Applikation wurden 20, 40 oder 80 mg Lovastatin um 20:00 Uhr 5 gesunden männlichen Personen (18 bis 50 Jahre alt) verabreicht. Die Isopren-Konzentration in der Expirationsluft wurde 24 Stunden vor und nach der Einnahme in 4stündigen Abständen

gaschromatographisch bestimmt. Verglichen mit den Isopren-Konzentrationen vor der Lovastatin-Einnahme erniedrigten alle drei Dosen 6 und 10 Stunden nach Einnahme die Isopren-Konzentrationen in der Atemluft signifikant (um  $\geq 36\%$ ). Die 6wöchige tägliche Gabe von 40 mg Lovastatin an 8 männliche Versuchspersonen (30 bis 72 Jahre alt) reduzierte die Isopren-Konzentration in der Atemluft um  $27 \pm 9\%$  und die Cholesterinsynthese in frisch isolierten mononukleären Leukozyten (gemessen über die  $^{14}\text{C}$ -Acetat-Aufnahme in Sterine) um  $12 \pm 6\%$ . Eine mit Cholesterin angereicherte Diät (1070 mg/Tag) erniedrigte die Isopren-Konzentration in der Atemluft und die Cholesterinsynthese in den mononukleären Leukozyten bei den 8 Personen um  $16 \pm 5$  bzw.  $19 \pm 4\%$ . Ermittelt wurden die Werte vor und nach der 6wöchigen Behandlung jeweils zwischen 6:00 und 7:00 Uhr morgens. Nach den Autoren legen die parallel erniedrigte Isopren-Konzentration und Cholesterinsynthese in den mononukleären Leukozyten nahe, daß das Isopren in der Expirationsluft aus dem Cholesterinsyntheseweg stammt (Stone et al., 1993).

Es wurde von einer Beeinflussung verschiedener Enzyme in Lymphozyten/Granulozyten (Erniedrigung der Aktivität der Succinatdehydrogenase, Erhöhung der Aktivität der alkalischen und sauren Phosphatase) bei Arbeitern in der Gummiindustrie berichtet. Die Arbeiter waren neben Isopren auch gegenüber Styrol, Butadien, Isobutylen und Chlormethan exponiert (keine weiteren Angaben; Mamedov und Aliev, 1985 a, b). Die bestimmten Enzyme unterliegen einer großen Schwankungsbreite (alkalische und saure Phosphatase) bzw. einem starken hormonellen Einfluß (Succinatdehydrogenase). Aufgrund dieser Schwankungsbreite, der Mischexposition und der nur unzureichenden Dokumentation von Untersuchungsmethoden und -ergebnissen sind diese Studien zur Beurteilung der Wirkung von Isopren auf den Menschen nicht geeignet.

Bei 630 (350 Männer, 280 Frauen) in der Isopren-Gummiproduktion Beschäftigten, die gegenüber Formaldehyd, Dimethyldioxan und Isopren in Konzentrationen, die den sowjetischen MAK-Werten entsprachen oder darunter lagen ( $0,5$ ,  $10$  bzw.  $40\text{ mg/m}^3$ ), exponiert waren, wurde der obere Atemtrakt über 4 Jahre (1965 bis 1968) untersucht. Es wurde ein großer Prozentsatz an pathologischen Veränderungen festgestellt, die mit der Dauer der Beschäftigung zunahmen. Bei Personen, die in diesem Produktionsbereich ein Jahr oder weniger tätig waren, war die vorherrschende Veränderung eine katarrhalische Entzündung der Nase. Bei längerdauernden

der Beschäftigung ergab sich ein Anstieg der Quantität degenerativer und atrophischer Prozesse. Die Temperatur der Nasenschleimhaut lag bei Arbeitern bei der Herstellung von synthetischem Gummi unter der von Arbeitern einer Kontrollgruppe ( $32,4 \pm 0,1$  °C, Kontrollgruppe  $33,1 \pm 0,4$  °C). Der pH-Wert des Nasensekrets wich etwas in Richtung sauer ab (7,0, Kontrollgruppe 7,2). Zytogramme aus der Nasenschleimhaut wiesen auf entzündliche und degenerative Veränderungen in der Nasenschleimhaut hin. Die Inzidenz und der Grad einer Verschlechterung des Riechvermögens stieg ebenfalls mit der Dauer der Beschäftigung (Mitin, 1969). Da es sich um eine Mischexposition am Arbeitsplatz handelt und Einzelheiten zu Meßergebnissen nicht mitgeteilt werden, ist diese Studie zur Beurteilung der Wirkung von Isopren auf den Menschen nicht geeignet.

## **9 Grenzwerte**

Die Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe der Deutschen Forschungsgemeinschaft (MAK-Kommission) wird die Möglichkeit der Aufstellung eines MAK-Wertes sowie die Notwendigkeit einer Einstufung der Krebs erzeugenden Wirkung überprüfen.

In der ehemaligen UdSSR wurde ein „Short Term Exposure Limit“ von  $40 \text{ mg/m}^3$  Luft festgelegt (Shugaev, 1969; Taalman, 1996; IARC, 1994) und in Polen und Bulgarien ein TLV-Wert von 100 bzw.  $10 \text{ mg/m}^3$  (IARC, 1994; Taalman, 1996).

## **10 Arbeitsmedizinische Empfehlungen**

Allgemeine arbeitsmedizinische Vorsorgeuntersuchungen in Anlehnung an die BG-Vorschrift „Arbeitsmedizinische Vorsorge“ (BGV A4, bisherige VBG 100).

## Literatur

Bayer AG, Institut für Toxikologie

Isopren - Akute Toxizitätsuntersuchungen

unveröffentlichter Bericht Nr. 3373 (1972)

Bogaards, J.J.P., Venekamp, J.C., van Bladeren, P.J.

The biotransformation of isoprene and the two isoprene monoepoxides by human cytochrome P450 enzymes, compared to mouse and rat liver microsomes

Chem. Biol. Interact., 102, 169 - 182 (1996)

Bogaards, J.J.P., Venekamp, J.C., van Bladeren, P.J.

The biotransformation of isoprene and the two isoprene mono-epoxides by human cytochrome P450 enzymes, compared to mouse and rat liver microsomes

in: TNO Nutrition and Food Research Institute

Biennial Report 1995/1996, p. 116 - 117 (1997)

Bond, J.A., Bechtold, W.E., Birnbaum, L.S., Dahl, A.R., Medinsky, M.A., Sun, J.D., Henderson, R.F.

Disposition of inhaled isoprene in B6C3F1 mice

Toxicol. Appl. Pharmacol., 107, 494 - 503 (1991)

Cailleux, A., Allain, P.

Isoprene and sleep

Life Sci., 44 (24), 1877 - 1880 (1989)

Cailleux, A., Cogny, M., Allain, P.

Blood isoprene concentrations in humans and in some animal species

Biochem. Med. Metab. Biol., 47, 157 - 160 (1992)

Conkle, J.P., Camp, B.J., Welch, B.E.

Trace composition of human respiratory gas

Arch. Environ. Health, 30, 290 - 295 (1975)

Cox, L.A., jr., Bird, M.G., Griffis, L.

Isoprene cancer risk and the time pattern of dose administration

Toxicology, 113, 263 - 272 (1996)

Dahl, A.R., Bond, J.A., Henderson, R.F., Birnbaum, L.S.

Inhalation toxicity of isoprene (2-methyl-1,3-butadiene) studied

Ind. Hyg. News Rep., 29 (4) (1986)

Dahl, A.R., Birnbaum, L.S., Bond, J.A., Gervasi, P.G., Henderson, R.F.

The fate of isoprene inhaled by rats: comparison to butadiene

Toxicol. Appl. Pharmacol., 89, 237 - 248 (1987)

Dahl, A.R., Bechtold, W.E., Bond, J.A., Henderson R.F., Mauderly, J.L., Muggenburg, B.A., Sun, J.D., Birnbaum, L.S.

Species differences in the metabolism and disposition of inhaled 1,3-butadiene and isoprene

Environ. Health Perspect., 86, 65 - 69 (1990)

- Del Monte, M., Citti, L., Gervasi, P.G.  
Isoprene metabolism by liver microsomal monooxygenases  
*Xenobiotica*, 15, 591 - 597 (1985)
- DeMaster, E.G., Alexander, C.S., Nagasawa, H.T.  
Isoprene, an endogenous constituent of human alveolar air. Appearance of a diurnal rhythm  
*Fed. Proc.*, 35, 838 (1976)
- De Meester, C., Mercier, M., Poncelet, F.  
Mutagenic activity of butadiene, hexachlorobutadiene, and isoprene  
in: Gut, I., Cikrt, M., Plaa, G.L. (eds.)  
*Industrial and environmental xenobiotics*, p. 195 - 203  
Springer Verlag, Berlin (1981)
- Deneris, E.S., Stein, R.A., Mead, J.F.  
In vitro biosynthesis of isoprene from mevalonate utilizing a rat liver cytosolic fraction  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 123 (2), 691 - 696 (1984)
- Deneris, E.S., Stein, R.A., Mead, J.F.  
Acid-catalyzed formation of isoprene from a mevalonate-derived product using a rat liver cytosolic fraction  
*J. Biol. Chem.*, 260 (3), 1382 - 1385 (1985)
- Doerr, J.K., Hooser, S.B., Smith, B.J., Sipes, I.G.  
Ovarian toxicity of 4-vinylcyclohexene and related olefins in B6C3F1 mice: role of diepoxides  
*Chem. Res. Toxicol.*, 8, 963 - 969 (1995)
- EC (European Commission)  
Existing Chemicals Bureau, Joint Research Centre, Ispra, Italien  
IUCLID-Datensatz Isoprene  
CD-ROM, ed. I (1996)
- Egle, J.L., Gochberg, B.J.  
Retention of inhaled isoprene and methanol in the dog  
*Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, 36, 369 - 373 (1975)
- Faustov, A.O.  
Toxisch-hygienische Charakteristik des Gasfaktors bei der Herstellung einiger Arten von synthetischen Kautschuken für allgemeine Verwendungszwecke (deutsche Übersetzung aus dem Russischen)  
Trudy Voronezhskii Meditsinskii Institut, 87, 10 - 16 (1972)
- Faustov, A.S., Lobeeva, N.V.  
Action of some chemical substances on the protein content of serum and bone marrow  
*Chem. Abstr.*, 73, Abstr. 118648c (1970)
- Filser, J.G., Csanády, G.A., Denk, B., Hartmann, M., Kauffmann, A., Kessler, W., Kreuzer, P.E., Pütz, C., Shen, J.H., Stei, P.  
Toxicokinetics of isoprene in rodents and humans  
*Toxicology*, 113, 278 - 287 (1996)

- Foster, W.M., Jiang, L., Stetkiewicz, P.T., Risby, T.H.  
Breath isoprene: temporal changes in respiratory output after exposure to ozone  
J. Appl. Physiol., 80 (2), 706 - 710 (1996)
- Gage, J.C.  
The subacute inhalation toxicity of 109 industrial chemicals  
Br. J. Ind. Med., 27, 1 - 18 (1970)
- Gargas, M.L., Burgess, R.J., Voisard, D.E., Cason, G.H., Andersen, M.E.  
Partition coefficients of low-molecular-weight volatile chemicals in various liquids on tissues  
Toxicol. Appl. Pharmacol., 98, 87 - 99 (1989)
- Gelmont, D., Stein, R.A., Mead, J.F.  
Isoprene - the main hydrocarbon in human breath  
Biochem. Biophys. Res. Commun., 99, 1456 - 1460 (1981)
- Gervasi, P.G., Longo, V.  
Metabolism and mutagenicity of isoprene  
Environ. Health Perspect., 86, 85 - 87 (1990)
- Gervasi, P.G., Citti, L., Del Monte, M., Longo, V., Benetti, D.  
Mutagenicity and chemical reactivity of epoxidic intermediates of the isoprene metabolism and other structurally related compounds  
Mutat. Res., 156, 77 - 82 (1985)
- Gostinskii, V.D.  
Toxicity of isoprene and maximal safe concentration of the vapor in air (englische Übersetzung aus dem Russischen)  
Gig. Tr. Prof. Zabol., Heft 9, 36 - 42 (1965)
- Hartmann, M., Kessler, W.  
Pharmacokinetics and endogenous production of isoprene in humans  
Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol., 341, Suppl., R 13, Abstr. 50 (1990)
- Hartmann, M.  
Pharmakokinetik und endogene Produktion von Isopren beim Menschen  
GSF-Bericht 21/94 (1994)
- Hoechst AG  
Rohstoff-Datenblatt Isopren (1995)
- Hong, H.L., Devereux, T.R., Boorman, G.A., Sills, R.C.  
ras Oncogene mutations in Harderian gland neoplasms of B6C3F1 mice exposed to isoprene for 6 months  
FASEB J., 9 (3), A 132, Abstr. 774 (1995)
- IARC (International Agency for Research on Cancer)  
Isoprene  
IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risk Chem. Hum., 60, 215 - 232 (1994)
- IISRP (International Institute of Synthetic Rubber Producers, Inc.)  
TSCA 8(e) Meldung an die U.S. Environmental Protection Agency vom 07.09.1993

- Jansson, B.O., Larsson, B.T.  
Analysis of organic compounds in human breath by gas chromatography-mass spectrometry  
J. Lab. Clin. Med., 74, 961 - 966 (1969)
- Jones, A.W., Lagesson, V., Tagesson, C.  
Determination of isoprene in human breath by thermal desorption gas chromatography with ultraviolet detection  
J. Chromatogr. B, 672, 1 - 6 (1995)
- Korbakova, A.I., Fedorova, V.I.  
Zur Toxikologie von Isopren (deutsche Übersetzung aus dem Russischen)  
Toksikol. Novykh. Prom. Khim. Veshchesto., 6, 18 - 29 (1964)
- Krotoszynski, B., Gabriel, G., O'Neill, H., Claudio, M.P.A.  
Characterization of human expired air: a promising investigative and diagnostic technique  
J. Chromatogr. Sci., 15, 239 - 244 (1977)
- Krotoszynski, B.K., Bruneau, G.M., O'Neill, H.J.  
Measurement of chemical inhalation exposure in urban population in the presence of endogenous effluents  
J. Anal. Toxicol., 3, 225 - 234 (1979)
- Kushi, A., Yoshida, D., Mizusaki, S.  
Mutagenicity of gaseous nitrogen oxides and olefins on Salmonella TA102 and TA104  
Mutat. Res., 147, 263 - 264 (1985)
- Lide, D.R., Frederikse, H.P.R. (eds.)  
CRC Handbook of chemistry and physics  
77th ed., p. 3-89, 6-88  
CRC Press, Boca Raton, New York, London, Tokyo (1996)
- Longo, V., Citti, L., Gervasi, P.G.  
Hepatic microsomal metabolism of isoprene in various rodents  
Toxicol. Lett., 29, 33 - 37 (1985)
- Mamedov, A.M.  
Reaktion des Lymphgewebes nach Inhalation von Isopren und einige integrale Indices (deutsche Übersetzung aus dem Russischen)  
Gig. Tr. Prof. Zabol., Heft 6, 34 - 37 (1979)
- Mamedov, A.M., Aliev, V.A.  
Succinate dehydrogenase activity of immunocompetent cells in workers with occupational exposure in styrene and butadiene rubber production  
Azerb. Med. Zh., 62, 25 - 29 (1985 a)  
sowie in: Chem. Abstr., 102, Abstr. 225331h (1985)
- Mamedov, A.M., Aliev, V.A.  
Activity of acid and alkaline phosphatases of the blood neutrophils in workers engaged in the manufacture of synthetic rubber  
Gig. Tr. Prof. Zabol., Heft 5, 31 - 35 (1985 b)  
sowie in: Chem. Abstr., 103, Abstr. 58476w (1985)

- Mast, T.J., Rommereim, R.L., Weigel, R.J., Stoney, K.H., Schwetz, B.A., Morrissey, R.E.  
Inhalation developmental toxicity of isoprene in mice and rats  
Toxicologist, 10, 42, Abstr. 165 (1989)
- Melnick, R.L., Roycroft, J.H., Chou, B.J., Ragan, H.A., Miller, R.A.  
Inhalation toxicology of isoprene in F344 rats and B6C3F1 mice following two-week exposures  
Environ. Health Perspect., 86, 93 - 98 (1990)
- Melnick, R.L., Eustis, S.L., Chou, B., Miller, R.  
Proliferative lesions induced by isoprene in mice, but not in rats, after 26 weeks of inhalation exposure  
Proc. Am. Assoc. Cancer Res., 33, 115 (1992)
- Melnick, R.L., Sills, R.C., Roycroft, J.H., Chou, B.J., Ragan, H.A., Miller, R.A.  
Isoprene, an endogenous hydrocarbon and industrial chemical, induces multiple organ neoplasia in rodents after 26 weeks of inhalation exposure  
Cancer Res., 54, 5333 - 5339 (1994)
- Melnick, R.L., Sills, R.C., Roycroft, J.H., Chou, B.J., Ragan, H.A., Miller, R.A.  
Inhalation toxicity and carcinogenicity of isoprene in rats and mice: comparisons with 1,3-butadiene  
Toxicology, 113, 247 - 252 (1996)
- Mendis, S., Sobotka, P.A., Euler, D.E.  
Pentane and isoprene in expired air from humans: gas-chromatographic analysis of single breath  
Clin. Chem., 40 (8), 1485 - 1488 (1994)
- Miller, R.C.  
The micronucleus test as an in vivo cytogenetic method  
Environ. Health Perspect., 6, 167 - 170 (1973)
- Mitin, Y.V.  
Über Veränderungen in den oberen Atemwegen von Beschäftigten bei der Herstellung von Isoprenkautschuk (deutsche Übersetzung aus dem Russischen)  
Zh. Ushn. Nos. Gorl. Bolezn., 29, 79 - 83 (1969)
- Mortelmans, K., Haworth, S., Lawlor, T., Speck, W., Tainer, B., Zeiger, E.  
Salmonella mutagenicity tests: II. Results from the testing of 270 chemicals  
Environ. Mutagen., 8, Suppl. 7, 1 - 119 (1986)
- Muir, G.D. (ed.)  
Hazards in the chemical laboratory, p. 159 - 160  
The Royal Institute of Chemistry, London (1971)
- NTP (National Toxicology Program)  
Salmonella mutagenesis test results  
NTP Techn. Bull., 9, 5 - 6 (1983)
- NTP (National Toxicology Program)  
Intraperitoneal administration of isoprene to B6C3F1 mice and urinary metabolites of isoprene in F-344 rats and B6C3F1 mice  
unveröffentlichte Untersuchungen (1994)

- NTP (National Toxicology Program)  
 NTP Technical Report on toxicity studies of isoprene (CAS No. 78-79-5) administered by inhalation to F344/N rats and B6C3F1 mice  
 Toxicity Report Series Number 31, NIH Publication No. 95-3354 (1995)
- NTP (National Toxicology Program)  
 NTP Technical Report on the toxicology and carcinogenesis studies of isoprene (CAS No. 78-79-5) in F344/N rats (inhalation studies)  
 Draft Technical Report NTP TR 486, NIH Publication No. 97-3976 (1997)
- Oettingen, von, W.F.  
 Toxicity and potential dangers of aliphatic and aromatic hydrocarbons  
 Publ. Health Bull. No. 255, 26 - 28 (1940)
- Peter, H., Wiegand, H.J., Bolt, H.M., Greim, H., Walter, G., Berg, M., Filser, J.G.  
 Pharmacokinetics of isoprene in mice and rats  
 Toxicol. Lett., 36, 9 - 14 (1987)
- Peter, H., Wiegand, H.J., Filser, J.G., Bolt, H.M., Laib, R.J.  
 Inhalation pharmacokinetics of isoprene in rats and mice  
 Environ. Health Perspect., 86, 89 - 92 (1990)
- Phillips, M., Greenberg, J., Awad, J.  
 Metabolic and environmental origins of volatile organic compounds in breath  
 J. Clin. Pathol., 47, 1052 - 1053 (1994)
- Placke, M.E., Griffis, L., Bird, M., Bus, J., Persing, R.L., Cox, L.A., jr.  
 Chronic inhalation oncogenicity study of isoprene in B6C3F1 mice  
 Toxicology, 113, 253 - 262 (1996)
- Repina, E.F.  
 Untersuchung der selektiven gonadotoxischen Aktivität von Isopren und Piperilen im akuten Versuch (deutsche Übersetzung aus dem Russischen)  
 Gig. Proizv. Okruzh Sredy, Okhrana Zdorov'ya, Rab v Neftegazodobyv i Neftekhim, Prom-sit, M, 96 - 99 (1988)
- Samedov, I.G., Mamedov, A.M., Mamedova, L.N., Bekesev, I.A.  
 Immunologische Indices als mögliche Kriterien zur Bewertung der Einwirkung von chemischen Faktoren mit geringer Intensität auf den Organismus (deutsche Übersetzung aus dem Russischen)  
 Azerb. Med. Zh., 55, 58 - 61 (1978)
- Shamberger, R.J.  
 Inhibitory effect of vitamin A on carcinogenesis  
 J. Natl. Cancer Inst., 47, 667 - 673 (1971)
- Shelby, M.D.  
 Results of NTP-sponsored mouse cytogenetic studies on 1,3-butadiene, isoprene, and chloroprene  
 Environ. Health Perspect., 86, 71 - 73 (1990)
- Shell (Deutsche Shell Chemie GmbH)  
 EUCLID data sheet isoprene (1993)

- Shugaev, B.B.  
Distribution in the organism and toxicity of aliphatic hydrocarbons (englische Übersetzung aus dem Russischen)  
Farmakol. Toxikol., 31, 162 - 165 (1968)
- Shugaev, B.B.  
Concentrations of hydrocarbons in tissues as a measure of toxicity  
Arch. Environ. Health, 18, 878 - 882 (1969)
- Small, R.D., Golding, B.T., Watson, W.P.  
Species differences in the stereochemistry of the metabolism of isoprene in vitro  
Xenobiotica, 27 (11), 1155 - 1164 (1997)
- Stone, B.G., Besse, T.J., Duane, W.C., Evans, C.D., DeMaster, E.G.  
Effect of regulating cholesterol biosynthesis on breath isoprene excretion in men  
Lipids, 28 (8), 705 - 708 (1993)
- Sun, J.D., Dahl, A.R., Bond, J.A., Birnbaum, L.S., Henderson, R.F.  
Characterization of hemoglobin adduct formation in mice and rats after administration of [<sup>14</sup>C]butadiene or [<sup>14</sup>C]isoprene  
Toxicol. Appl. Pharmacol., 100, 86 - 95 (1989)
- Taalman, R.D.F.M.  
Isoprene: background and issues  
Toxicology, 113, 242 - 246 (1996)
- Tice, R.R., Boucher, R., Luke, C.A., Paquette, D.E., Melnick, R.L., Shelby, M.D.  
Chloroprene and isoprene: cytogenetic studies in mice  
Mutagenesis, 3 (2), 141 - 146 (1988)
- Tsutsumi, S., Yamaguchi, T., Komatsu, S., Tamura, S.  
On the teratogenic effects of vitamin A-like substances  
Proc. Congenital Anomalies Res. Assoc., Ann. Rep. No. 9, 27 (1969)
- VCI (Verband der chemischen Industrie)  
VCI-Altstoffliste  
Chemische Industrie, Sonderdruck aus Heft 4 (1988)
- Weitz, H.M., Löser, E.  
Isoprene  
in: Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry  
5th ed., vol. A14, p. 627 - 644  
VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim (1989)
- Wistuba, D., Weigand, K., Peter, H.  
Stereoselectivity of in vitro isoprene metabolism  
Chem. Res. Toxicol., 7, 336 - 343 (1994)