

**Charakterisierung des toxischen Potentials von
 α,β -ungesättigten Carbonylverbindungen
mit *in-vitro* Testmethoden**

Vom Fachbereich Chemie der Universität Kaiserslautern
zur Verleihung des akademischen Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“
genehmigte Dissertation

D 386

vorgelegt von
Diplom-Lebensmittelchemiker Volker Glaab

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 03.05.2001

Betreuer der Arbeit: Prof. Dr. G. Eisenbrand

Kaiserslautern 2001

Die vorliegende Arbeit entstand zwischen November 1997 und August 2000 im Fachbereich Chemie, Institut für Lebensmittelchemie und Umwelttoxikologie der Universität Kaiserslautern.

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 03.05.2001

Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. H.-G. Kuball

1. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Eisenbrand

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. D. Schrenk

Ich danke Herrn Prof. Dr. G. Eisenbrand und Frau Dr. C. Janzowski für die Überlassung des Themas sowie für Anregungen und die wohlwollende Unterstützung während der Promotionszeit.

1. Einleitung	1
1.1 α,β-ungesättigte Carbonylverbindungen	1
1.1.1 <i>Vorkommen von 2-Alkenalen.....</i>	2
1.1.2 <i>Vorkommen von 2-Cyclohexen-1-on und 5-Hydroxymethylfurfural</i>	6
2. Theoretische Grundlagen.....	9
2.1 Biogenese und Bildung von α,β-ungesättigten Carbonylverbindungen... 	9
2.1.1 <i>Lipidperoxidation.....</i>	9
2.1.1.1 <i>Autoxidation.....</i>	9
2.1.1.2 <i>Lipoxygenase-Katalyse</i>	10
2.1.2 <i>Bildung von 5-Hydroxymethylfurfural.....</i>	12
2.1.2.1 <i>Maillard-Reaktion.....</i>	12
2.1.2.2 <i>Thermische Zersetzung von Fructose</i>	13
2.2 Reaktivität.....	13
2.3 Biotransformation.....	14
2.3.1 <i>Glutathion-S-transferase (GST) und Reaktion mit Glutathion (GSH).....</i>	15
2.3.2 <i>Reaktion mit Alkohol- und Aldehyddehydrogenasen (ADH und AIDH) ...</i>	16
2.3.3 <i>Epoxidierung.....</i>	17
2.3.4 <i>Sulfotransferase (SULT)-vermittelte Sulfatierung von 5-Hydroxymethylfurfural.....</i>	18
2.4 Biologische Wirkung	19
2.4.1 <i>Cytotoxizität in-vitro</i>	19
2.4.2 <i>Cytotoxizität in-vivo.....</i>	20
2.4.3 <i>Mutagenität und Gentoxizität.....</i>	22
2.4.3.1 <i>Mutagenitätstests</i>	22
2.4.3.2 <i>Gentoxizitätstests</i>	23
2.4.4 <i>DNA-Addukte.....</i>	24
2.4.5 <i>Kanzerogenitäts- und Subchronische Studien.....</i>	27
2.5 Testmethoden	29
2.5.1 <i>Wachstumshemmung und Cytotoxizität.....</i>	29
2.5.1.1 <i>Wachstumshemmung (SRB-Test).....</i>	29
2.5.1.2 <i>Cytotoxizität (Membranintegrität, Trypanblau-Test).....</i>	30

2.5.2	<i>Mutationstest (HPRT-Test)</i>	30
2.5.3	<i>Gentoxizitätstest</i>	32
2.5.3.1	UMU-Test	33
2.5.3.2	Comet-Assay	35
2.5.4	<i>Glutathion-Bestimmung</i>	37
2.5.5	<i>Oxidative DNA-Modifikationen</i>	39
2.5.6	<i>Apoptose</i>	44
3.	Problemstellung	47
4.	Ergebnisse und erste Diskussion	50
4.1	Wachstumshemmung und Cytotoxizität	50
4.1.1	<i>Wachstumshemmung (Sulforhodamin-B-Test)</i>	50
4.1.1.1	Homologe 2-Alkenale	50
4.1.1.2	Weitere ungesättigte Aldehyde	51
4.1.1.3	2-Cyclohexen-1-on (CHX)	52
4.1.1.8	Diskussion der Ergebnisse des SRB-Tests	53
4.1.2	<i>Cytotoxizität (Trypanblau-Ausschluß)</i>	54
4.2	Induktion von DNA-Schäden	56
4.2.1	<i>Vorarbeiten</i>	56
4.2.2	<i>DNA-Schäden in V79 Zellen</i>	57
4.2.2.1	Homologe 2-Alkenale	57
4.2.2.2	Weitere ungesättigte Aldehyde	58
4.2.2.3	2-Cyclohexen-1-on (CHX)	59
4.2.2.4	Vergleich der Ergebnisse	60
4.2.3	<i>DNA-Schäden in Caco-2 Zellen</i>	62
4.2.3.1	Homologe 2-Alkenale	62
4.2.3.2	Weitere ungesättigte Aldehyde	63
4.2.3.3	2-Cyclohexen-1-on (CHX)	64
4.2.3.4	Reduzierung der Inkubationszeiten	64
4.2.3.5	Vergleich der Ergebnisse	65
4.2.4	<i>DNA-Schäden in primären humanen Colonzellen</i>	67
4.2.5	<i>Diskussion der Ergebnisse des Comet-Assays</i>	68

4.3 Mutationen am <i>hprt</i>-locus	71
4.3.1 (<i>E</i>)-2-Hexenal (HEX).....	71
4.3.2 (2 <i>E</i> ,6 <i>Z</i>)-2,6-Nonadienal (NONDI)	72
4.3.3 Diskussion der Ergebnisse des HPRT-Tests.....	73
4.4 Einfluß auf den zellulären Glutathionspiegel	74
4.4.1 Vorarbeiten	74
4.4.2 GSH-Depletion an V79 Zellen	75
4.4.2.1 Homologe 2-Alkenale	75
4.4.2.2 Weitere ungesättigte Aldehyde.....	76
4.4.2.3 2-Cyclohexen-1-on (CHX)	77
4.4.2.4 Vergleich der Ergebnisse	78
4.4.3 GSH-Depletion an Caco-2 Zellen	79
4.4.3.1 Homologe 2-Alkenale	79
4.4.3.2 2-Cyclohexen-1-on (CHX)	80
4.4.3.3 Vergleich der Ergebnisse	80
4.4.4 GSH-Depletion in primären humanen Colonzellen	81
4.4.4.1 (<i>E</i>)-2-Hexenal (HEX) und 2-Cyclohexen-1-on (CHX)	81
4.4.3 Diskussion der Ergebnisse der Bestimmung des tGSH-Gehaltes	82
4.5 Oxidative DNA-Schäden	85
4.5.1 Vorarbeiten	85
4.5.2 Untersuchungen an V79 Zellen	86
4.5.2.1 Homologe 2-Alkenale	86
4.5.2.2 Weitere ungesättigte Aldehyde.....	89
4.5.2.3 2-Cyclohexen-1-on (CHX)	92
4.5.2.4 Vergleich der Ergebnisse	93
4.5.3 Untersuchungen an primären humanen Colonzellen.....	96
4.5.4 Induktion oxidativer DNA-Schäden während 3 h Postinkubation in V79 Zellen.....	97
4.5.5 Diskussion der Ergebnisse des modifizierten Comet-Assays	98
4.6 Gentoxizität in Bakterien	100
4.6.1 Vorarbeiten	100
4.6.2 (<i>E</i>)-2-Hexenal (HEX).....	100
4.6.3 2-Cyclohexen-1-on (CHX)	101

4.6.4	5-Hydroxymethylfurfural (HMF).....	102
4.6.5	Diskussion der Ergebnisse des UMU-Tests	104
4.7	Induktion von Apoptose	106
4.7.1	Orientierende Untersuchungen mit 2-(E)-Hexenal (HEX).....	106
4.7.2	Diskussion der in der Durchflußcytometrie erhaltenen Ergebnisse	108
5.	Gesamtdiskussion	110
6.	Material und Methoden	118
6.1	Geräte, Materialien und Lösungen	118
6.1.1	Allgemeine Geräte, Materialien und Lösungen.....	118
6.1.2	Wachstumshemmung und Cytotoxizität.....	120
6.1.3	HPRT-Test.....	121
6.1.4	Comet-Assay	121
6.1.5	Bestimmung des zellulären Glutathiongehaltes.....	123
6.1.6	Gentoxizität in Bakterien (UMU-Test)	124
6.1.7	Induktion von Apoptose	125
6.2	Methoden.....	126
6.2.1	Zellkultur	126
6.2.1.1	V79 Zellen	126
6.2.1.2	Caco-2 Zellen	126
6.2.2	Primäre humane Colonzellen.....	127
6.2.3	Kultivierung von Salmonella typhimurium TA1535/pSK1002.....	127
6.2.4	Testmethoden.....	128
6.2.4.1	Wachstumshemmung (Sulforhodamin-B-Test; SRB-Test)	128
6.2.4.2	Cytotoxizität (Trypanblau-Test).....	129
6.2.4.3	DNA-Schädigung (Comet-Assay)	129
6.2.4.4	HPRT-Test	132
6.2.4.5	Glutathionbestimmung.....	134
6.2.4.6	Oxidative DNA-Schäden.....	135
6.2.4.7	UMU-Test	136
6.2.4.8	Apoptose-Messung.....	138
7.	Zusammenfassung	140

8. Literatur	141
9. Anhang	158
9.1 Wachstumshemmung (Sulforhodamin-B-Test).....	158
9.1.1 <i>Homologe 2-Alkenale</i>	158
9.1.2 <i>Weitere ungesättigte Aldehyde.....</i>	159
9.1.3 <i>2-Cyclohexen-1-on (CHX)</i>	161
9.2 Induktion von DNA-Schäden.....	161
9.2.1 <i>DNA-Schäden in V79 Zellen.....</i>	161
9.2.1.1 <i>Homologe 2-Alkenale</i>	161
9.2.1.2 <i>Weitere ungesättigte Aldehyde.....</i>	163
9.2.1.3 <i>2-Cyclohexen-1-on (CHX)</i>	164
9.2.2 <i>DNA-Schäden in Caco-2 Zellen.....</i>	165
9.2.2.1 <i>Homologe 2-Alkenale</i>	165
9.2.2.2 <i>Weitere ungesättigte Aldehyde.....</i>	166
9.2.2.3 <i>2-Cyclohexen-1-on (CHX)</i>	168
9.2.3 <i>DNA-Schäden in primären humanen Colonzellen</i>	168
9.3 GSH-Depletion.....	169
9.3.1 <i>GSH Depletion an V79 Zellen.....</i>	169
9.3.1.1 <i>Homologe 2-Alkenale</i>	169
9.3.1.2 <i>Weitere ungesättigte Aldehyde.....</i>	171
9.3.1.3 <i>2-Cyclohexen-1-on (CHX)</i>	172
9.3.2 <i>GSH-Depletion an Caco-2 Zellen</i>	173
9.3.2.1 <i>Homologe 2-Alkenale</i>	173
9.3.2.2 <i>2-Cyclohexen-1-on (CHX)</i>	174
9.3.3 <i>GSH-Depletion in primären humanen Colonzellen</i>	175
9.4 Oxidative DNA-Schäden.....	176
9.4.1 <i>Oxidative DNA-Schäden an V79 Zellen.....</i>	176
9.4.1.1 <i>Homologe 2-Alkenale</i>	176
9.4.1.2 <i>Weitere ungesättigte Aldehyde.....</i>	179
9.4.1.3 <i>2-Cyclohexen-1-on (CHX)</i>	182
9.4.1.4 <i>Vergleich der Ergebnisse</i>	182
9.4.2 <i>Oxidative DNA-Schäden an primären humanen Colonzellen</i>	183

9.4.3	<i>Oxidative DNA-Schäden während 3 h Postinkubation in V79 Zellen....</i>	184
9.5	Gentoxizität in Bakterien.....	185
9.5.1	<i>(E)-2-Hexenal (HEX).....</i>	185
9.5.2	<i>2-Cyclohexen-1-on (CHX)</i>	186
9.5.3	<i>5-Hydroxymethylfurfural (HMF).....</i>	186
9.6	Induktion von Apoptose.....	187
9.6.1	<i>Inkubation mit HEX.....</i>	187

Abkürzungen

A	Adenin (im Bezug auf DNA-Basen) alpha (im Bezug auf GST-Isoenzymfamilien)
AA	Aminoanthracen
Abb.	Abbildung
ADH	Alkoholdehydrogenase
AIDH	Aldehyddehydrogenase
ATP	Adenosintriphosphat
bidest.	Bidestilliert
C	Cytosin
CA	Zimtaldehyd
Caco-2	Humane Adenokarzinomzelllinie
CHX	2-Cyclohexen-1-on
dG	2`Desoxyguanosin
DC ₅₀	Konzentration, die zu einer 50%igen DNA-Schädigung führt
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSB	DNA-Doppelstrangbrüche
DTNB	5,5´-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure)
EC	Elektrochemisch
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Endo III	Endonuklease III
FAPyA	4,6-Diamino-5-formamidopyrimidin
FAPyG	2,6-Diamino-4-Hydroxy-5-Formamidopyrimidin
FKS	Fötale Kälberserum
FPG	Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase
G	Guanin
GC	Gaschromatographie
GPX	Glutathionperoxidase
GSH	Glutathion
GSR	Glutathionreduktase

GSSG	Glutathiondisulfid
GST	Glutathion-S-Transferase
HBSS	Hank`s buffered salt solution
HEX	(E)-2-Hexenal
HEXDI	(2E,4E)-2,4-Hexadienal
HMF	5-Hydroxymethylfurfural
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
IC ₅₀	Konzentration, die zu einer 50%igen Inhibierung führt
i.p.	intraperitoneal
KG	Körpergewicht
LC ₅₀	Konzentration, die zu einer 50%igen Sterblichkeit führt
LDH	Lactatdehydrogenase
LMA	low melting agarose
LPO	Lipidperoxidation
LOOH	Lipidhydroperoxid
L1210 Zellen	Maus Leukämiezelllinie
M	Molar (im Bezug auf Konzentrationen) mü (im Bezug auf GST-Isoenzyme)
MNNG	M-Methyl-N'-nitro-nitrosoguanidin
MS	Massenspektrometrie
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphathydrat
NMA	normal melting agarose
NONDI	(2E,6Z)-2,6-Nonadienal
NONE	(E)-2-Nonenal
OCTE	(E)-2-Octenal
P	pi (im Bezug auf GST-Isoenzyme)
PAPS	3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat
PBS	Phosphatgepufferte isotonische Kochsalzlösung
ppm	parts per million
REA	„Reassemble“ Puffer
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive sauerstoffspezies
SDS	Natriumdodeylsulfat

SMF	5-Sulfooxymethylfurfural
SRB	Sulforhodamin B
SSB	DNA-Einzelstrangbrüche
S. typhimurium	Salmonella typhimurium
SULT	Sulfotransferase
T	Thymidin (im Bezug auf Basen) Theta (im Bezug auf GST-Isoenzymfamilien)
Tab.	Tabelle
TG	Thioguanin
tGSH	Gesamtglutathion
TI	tail intensity
TRIS	Tris-hydroxymethylaminomethan
UPM	Umdrehungen pro Minute
U	Enzymeinheiten; die Enzymmenge die 1 μ mol Substrat pro Minute umsetzt
UV	Ultraviolett
V79	Lungenfibroblasten Zelllinie des chinesischen Hamsters
VIS	Sichtbares Licht
Z	zheta (im Bezug auf GST-Isoenzymfamilien)

1. Einleitung

1.1 α,β -ungesättigte Carbonylverbindungen

α,β -ungesättigte Carbonylverbindungen sind Substanzen, die in der Umwelt weitverbreitet vorkommen. Sie sind zum einen in verschiedensten Lebensmitteln natürlich enthalten, zum anderen entstehen sie bei Verbrennungsprozessen. Ihre Struktur (Abbildung 1) ermöglicht ihnen, mit Nucleophilen zu reagieren.

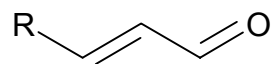


Abb. 1 Allgemeine Struktur α,β -ungesättigter Carbonylverbindungen

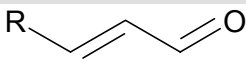
Aufgrund der Doppelbindung in Konjugation zum Carbonylsauerstoff können die Eigenschaften der Carbonylgruppe auf das β -Kohlenstoffatom des ungesättigten Systems übertragen werden. Als mögliche Reaktionen kommen 1,4-Additionen oder auch Kondensationen mit primären Aminen zu Schiffschen Basen in Betracht (Burkl et al., 1967; Kautiainen, 1992).

Bedeutung haben die längerkettigen Vertreter der Verbindungen vor allem als Aromastoffe. Sie bestimmen zum Teil charakteristisch den Geruch verschiedener Früchte bzw. Gemüse.

1.1.1 Vorkommen von 2-Alkenalen

Einige Verbindungen und ihre Geruchsqualitäten sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tab. 1 Strukturen und Geruch der untersuchten α,β -ungesättigten Carbonylverbindungen

Name (Abkürzung)	CAS	R 	Geruchsqualität ¹	Anzahl der LM, in denen Stoff nachgewiesen wurde ²
(E)-2-Hexenal (HEX)	6728-26-3	-CH ₂ -CH ₂ -CH ₃	Apfel	80
(E)-2-Octenal (OCTE)	2548-87-0	-CH ₂ -(CH ₂) ₃ -CH ₃	fettig, nußartig	30
(E)-2-Nonenal (NONE)	18829-56-6	-CH ₂ -(CH ₂) ₄ -CH ₃	talkig, Gurke	50
(2E,4E)-2,4-Hexadienal (HEXDI)	142-83-6	-CH=CH-CH ₃		
(2E,6Z)-2,6-Nonadienal (NONDI)	557-48-2	-CH ₂ -CH ₂ - CH=CH-CH ₂ -CH ₃	Gurke	
(E)-2-Zimtaldehyd (CA)	14371-10-9	-C ₆ H ₅	Zimt	30

¹ entnommen aus Belitz und Grosch (1992)

² Anzahl der Lebensmittel, in denen die Verbindung nachgewiesen wurde, entnommen aus Feron et al. (1991)

Umfassendes Datenmaterial liegt zum Vorkommen von HEX vor. Die Tabellen 2 und 3 geben einen Überblick über das natürliche Vorkommen von HEX in verschiedenen Gemüse- und Obstsorten.

Tab. 2 Vorkommen von HEX in Frischgemüse

Vorkommen	Gehalt	Referenz
Frischgemüse		
Chicorée	1 - 10 mg/kg	Götz-Schmidt et al., 1986
Endivie	20 - 150 mg/kg	Götz-Schmidt et al., 1986; Götz-Schmidt und Schreier, 1986; Gölzer et al., 1996
Frisée	9,4 mg/kg	Gölzer 1995
Spinat	n.b - < 1 mg/kg	Götz-Schmidt et al., 1986
Tomate	1,1 mg/kg - 10 mg/kg	Buttery et al., 1987; Gölzer, 1995; Boelens und vanGemert, 1987
Gurke	1 - 3 mg/kg	Gölzer 1995 Boelens und vanGemert, 1987
Paprika	8,9 mg/kg	Gölzer 1995
Lauch	10 - 30 mg/kg	Götz-Schmidt et al., 1986

n.b. nicht bestimmbar

Tab. 3 Vorkommen von HEX in Frischobst, Südfrüchten, Tee und Olivenöl

Vorkommen	Gehalt	Referenz
Frischobst		
Äpfel (Cox; Jonathan, Goldparmäne)	20 - 24 mg/kg	Drawert et al., 1973
Erdbeere	2,5 - 5,4 mg/kg	Larsen et al., 1992
Trauben	10 - 120 mg/kg	Götz-Schmidt et al., 1986; Drawert et al., 1973
Südfrüchte		
Banane	30 - 76 mg/kg	Gölzer 1995; Gölzer et al., 1996; Feron et al., 1991
Kiwi	1,6 - 11,8 mg/kg	Takeko et al., 1986; Gölzer 1995
Mango	2 mg/kg	MacLeod und Snyder, 1988
Tee		
schwarzer Tee	7,9 - 25,3 mg/kg	Skobeleva et al., 1979; Hatanaka et al., 1976
Speiseöle		
Olivenöl (nicht raffiniert)	7 mg/kg	Kreyenmeier et al., 1992; Reiners und Grosch, 1997

In den genannten Lebensmitteln liegen die HEX-Gehalte meist im unteren mg/kg-Bereich. Die höchsten Gehalte betragen ca. 100 mg/kg. Neben den aufgeführten Lebensmitteln kommt HEX ebenfalls in vielen Blattgeweben vor, unter anderem in Rettich und Kohlrabi (Götz-Schmidt E.M. et al., 1986). Aber auch im Blattgewebe von Bodensträuchern wie Heidelbeere, Preiselbeere und Robinie (Schildknecht, 1961) konnte das auch als Blätteraldehyd bekannte HEX in größeren Mengen nachgewiesen werden.

Feron et al. (1991) beschreiben, das OCTE in über 30 verschiedenen Lebensmitteln bestimmt wurde. So konnte es z.B. in der Schale von Orangen (Boelens und Sindreu, 1986), in Spargel, Preiselbeere, Feige (de Vincenzi et al., 1989) und Gurke (Zhou et

al., 2000) nachgewiesen werden. Neben dem Vorkommen in Gemüse und Obst wurde es auch in Milchpulver (Shiratsuchi et al., 1994) und im Aroma von getrocknetem Schinken (Barbieri et al., 1992) detektiert. Feron et al. (1991) geben die höchste Konzentration von OCTE mit 100 mg/kg an. Dieser Wert wurde im Schalenöl einer Orange bestimmt. Boelens und van Gemert (1987) beschreiben in ihrer Arbeit Gehalte von ungefähr 0,2 mg/kg OCTE in Hühnchen (erhitzt), Erdnüssen (geröstet) und Kartoffelchips.

Von den über 50 Lebensmitteln, in denen NONE vorkommt (Feron et al., 1991), hat die Gurke bezüglich des Vorkommens die größte Bedeutung. Dort stellt NONE eine der Hauptverbindungen des Aromas da. Des Weiteren kommt NONE in Karotten (Boelens und van Gemert, 1987), Spargel, Preiselbeere, Feige, Mango (de Vincenzi et al., 1989), Äpfeln (Drawert et al., 1973) und Olivenöl (Reiners und Grosch, 1997) vor. Auch außerhalb von Obst und Gemüse konnte NONE nachgewiesen werden, z.B. in Milchpulver (Shiratsuchi et al., 1994) Hühnchen (erhitzt), Erdnüssen (geröstet), Kartoffelchips (Boelens und van Gemert, 1987) und Popcorn (Buttery et al., 1997). Die Konzentrationen an NONE bewegen sich meist im µg/kg-Bereich, nur in der Gurke wurden Gehalte im unteren mg/kg Bereich bestimmt.

CA grenzt sich von den vorher genannten 2-Alkenalen ab, da er ein aromatisches Grundgerüst besitzt. Wie der Name schon besagt, kommt CA vor allem in Zimt als sogenannte „impact compound“ vor, im Rindenöl wurden Gehalte von 815 g/kg nachgewiesen (Feron et al., 1991; Senanayake et al., 1978). Mantovani et al. (1989) berichten vom Einsatz als Aromastoff, z.B. in Getränken, Eiscreme, Kaugummi und Konfekt. Die Gehalte variieren von 8 - 700 mg/kg. Neben der Anwendung als Aromastoff für Lebensmittel wird CA auch in größeren Mengen im Kosmetikbereich eingesetzt. Nach Frosch et al. (1995) gehört CA zu den 25 am häufigsten eingesetzten Bestandteilen von Parfüms, Haushaltsprodukten und Seifen in den USA. Der Einsatz in Deodorants (bis zu 424 mg/kg) und Zahnpasta ist ebenfalls beschrieben (Rastogi et al., 1998; Sainio und Kanerva, 1995).

Zum Vorkommen von HEXDI liegt im Vergleich zu den anderen Verbindungen wenig Datenmaterial vor. HEXDI wurde unter anderem in der Aromafraktion der Kiwi (Takeko et al., 1986) und der Tomate (Krumbein und Auerswald 1998) nachgewiesen.

NONDI, auch Veilchenblätteraldehyd genannt, ist ein weit verbreiteter Aromastoff. Er stellt aufgrund seiner geringen Aromaschwelle einen der wichtigsten Aromastoffe der

Lipidperoxidation da. In der Gurke ist er einer der Hauptkomponenten des Aromas. Die Gehalte in der Gurke liegen zwischen 2 und 6 mg/kg (Boelens und van Gemert, 1987; Hatanaka et al., 1975). Ebenso wurde NONDI auch in Mango, Äpfeln, Endivie, Traubensaft, Wein und Tee nachgewiesen (de Vincenzi et al., 1989; Drawert et al., 1973; Götz-Schmidt und Schreier 1986; Kosteridis und Baumes, 2000; Kawakami et al., 1995). Auch konnte die Bildung von NONDI aus Algen (Burlingame et al., 1992) nachgewiesen werden was zu einer Gurkenote im Trinkwasser führte. Beim Dünsten von Karpfenfilet wurde NONDI ebenfalls bestimmt (Schlüter und Steinhart 1996).

1.1.2 Vorkommen von 2-Cyclohexen-1-on und 5-Hydroxymethylfurfural

Außer den 2-Alkenalen (Tabelle 1) wurden die Verbindungen 2-Cyclohexen-1-on (CHX, CAS: 930-68-7) und 5-Hydroxymethylfurfural (HMF, CAS: 67-47-0) untersucht. Ihre Struktur ist in Abbildung 2 dargestellt.

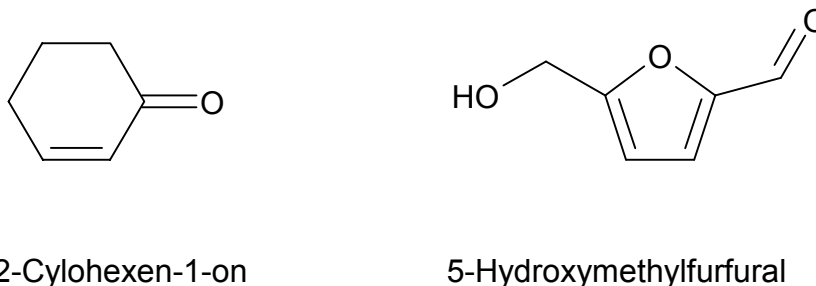


Abb. 2 Struktur von 2-Cyclohexen-1-on und 5-Hydroxymethylfurfural

CHX ist eine Verbindung, die ins aktuellere toxikologische Interesse geriet, da sie als Kontamination in künstlich gesüßten Erfrischungsgetränken nachgewiesen wurde. Die Getränke waren alle mit Cyclamat gesüßt, und die nachgewiesenen Gehalte lagen bei maximal 1,4 mg/kg (Hahn, 1996; Le Quere et al., 1994). Neben dieser Kontamination kommt CHX auch natürlich in verschiedenen Früchten vor. Es wurde bisher als flüchtige Komponente des charakteristischen Aromas der Babacofrucht (Barbeni et al., 1990), der Chayote (MacLeod 1990) und der frischen und gekochten Brotfrucht (Iwaoka et al., 1994) identifiziert. Außerdem ist CHX ein Bestandteil des Aromas von Wildreis (Withycombe et al., 1978).

Daneben ist CHX auch in Röstaromen enthalten (Baltes und Mevissen, 1988) und wurde in der Fraktion flüchtiger Verbindungen aus geröstetem Kaffee (Friedel et al., 1971) und gerösteten Haselnüssen (Kinlin et al., 1972) nachgewiesen. CHX entsteht auch bei Verbrennungsprozessen, so konnte es im Haupt- und Nebenstromrauch des Tabakrauches detektiert werden (Mauldin und Vickroy, 1976; Petterssoon et al., 1980). Ebenso konnte CHX in Flüssigrauchpräparaten in relativ hohen Konzentrationen (26,8 mg/l) nachgewiesen werden (Guillèn und Manzanos, 1999).

Bei HMF handelt es sich um eine den α,β -ungesättigten Verbindungen verwandte Struktur (Abbildung 2). Es entsteht vor allem beim Erhitzen von Lebensmitteln. HMF ist eines der Hauptprodukte der Maillard-Reaktion (nicht-enzymatische Bräunung) und wird ebenfalls im Laufe der Karamelisierung gebildet. Zum Vorkommen liegen aufgrund einer großen Untersuchung von Bachmann et al. (1997) sehr viele Daten vor. In dieser Studie wurden über 500 Lebensmittel verschiedenster Produktgruppen untersucht. Die Konzentrationen von HMF und der Median einiger ausgewählter Lebensmittel sind in Tabelle 4 aufgeführt. Der höchste Median wurde bei der Untersuchung von Trockenpflaumensaft ermittelt (1350 mg/l). Imming (2000) wies in seiner Untersuchung von Pflaumenmus Höchstgehalte an HMF von 4000 mg/kg nach.

Tab. 4 HMF-Konzentration in diversen Lebensmitteln (mg/kg, mg/l)

Lebensmittel/Produkt	Bereich	Median
Trockenpflaumensaft ¹	510 - 2850	1350
Likörweine ¹	620 - 840	830
Karamelprodukte ¹	110 - 9500	220
Dörrobst ¹ (Pflaumen, Äpfel, Birnen)	26 - 3500	140
dunkle Brotsorten ¹	5,2 - 220	95
Pflaumenmus ²	100 - 4000	-

¹ entnommen aus Bachmann et al. (1997)

² entnommen aus Imming (2000)

Neben dem Vorkommen in Lebensmitteln wurde HMF auch in hitzesterilisierten Peritoneal-Dialyseflüssigkeiten, Parenteral-Lösungen und pharmazeutischen injizierbaren Formulierungen, die Dextrose enthalten, nachgewiesen (Hryniewicz et al., 1996, Wieslander et al., 1995; Ulbricht et al., 1984; Jellum et al., 1973). In Kautabak, Zigarettenrauch und Holzrauch konnte HMF ebenfalls detektiert werden (Baldwin et al., 1994; Black, 1966; Chou und Hee, 1994).

2. Theoretische Grundlagen

2.1 Biogenese und Bildung von α,β -ungesättigten Carbonylverbindungen

2.1.1 Lipidperoxidation

α,β -Ungesättigte Carbonylverbindungen können im Rahmen der Lipidperoxidation (LPO) aus ungesättigten Fettsäuren gebildet werden. Die LPO ist ein komplexer Vorgang, infolge dessen verschiedenste α,β -ungesättigte Carbonylverbindungen entstehen. Die LPO kann man in eine Autoxidation und Lipoxygenase katalysierte Reaktion unterteilen. Auf diese Varianten wird folgend näher eingegangen.

2.1.1.1 Autoxidation

Unter der Autoxidation von ungesättigten Fettsäuren versteht man verschiedene ineinander greifende Reaktionen, in deren Folge es zur Generierung unterschiedlicher Verbindungen, unter anderem auch von 2-Alkenalen, kommt. Die Elementarschritte der Autoxidation beruhen auf einer Radikalkettenreaktion (Start, Kettenwachstum, Verzweigung und Abbruch). Diese Reaktionsschritte lassen sich auf jede ungesättigte Fettsäure übertragen. Ungesättigte Fettsäuren werden mit zunehmender Anzahl der Allylgruppen bevorzugt autoxydiert, da der Primärschritt der Autoxidation, die Abstraktion eines Wasserstoffradikals, an einer Allylgruppe energetisch begünstigt ist. Als Primärprodukte der Autoxidation entstehen Monohydroperoxide. Aus Linolsäure z.B. entstehen das 9- und 13-Hydroperoxid als Hauptprodukte und die 8-, 10-, 12- und 14-Hydroperoxide als Nebenprodukte, die nur 4 % der Monohydroperoxide darstellen. Der Start der Radikalkettenreaktion kann durch Fotooxygenierung, Schwermetalle, Häm-Katalyse und aktivierten Sauerstoff initiiert werden. Für die Bildung der geruchsaktiven Carbonylverbindungen, zu denen auch die hier untersuchten 2-Alkenale gehören, wird als wahrscheinlichster Mechanismus die β -Spaltung der Monohydroperoxide angenommen. In Tabelle 5 sind einige Autoxidationsprodukte verschiedener ungesättigter Fettsäuren aufgeführt, die hier untersuchten Verbindungen sind durch Fettdruck hervorgehoben. (Belitz und Grosch 1992)

Tab. 5 Bei der Autooxidation ungesättigter Fettsäuren entstehende flüchtige Verbindungen (Belitz und Grosch 1992)

Ölsäure	Linolsäure	Linolensäure
Heptanal	Pentanal	Propanal
Octanal	Hexanal	2tr-Butenal
Nonanal	Heptanal	2tr-Pentenal
Decanal	2tr-Heptanal	2tr-Hexenal
2tr-Decenal	Octanal	3tr-Hexenal
2tr-Undecenal	2c-Octenal	3c-Hexenal
	2tr-Octenal	2tr-Heptenal
	2c-Nonenal	2tr,6c-Nonadienal
	2tr-Nonenal	
	2tr,4tr-Nonadienal	

tr = trans, c = cis

2.1.1.2 Lipoxygenase-Katalyse

In zahlreichen Pflanzen und auch in bestimmten tierischen Geweben werden wesentliche Aromastoffe durch eine enzymatische-oxidative Spaltung ungesättigter Fettsäuren gebildet. Das dafür verantwortliche Enzym ist die Lipoxygenase. Sie peroxidiert nur Fettsäuren, die ein 1-cis,4-cis-Pentadiensystem enthalten. Man unterscheidet zwei Typen der Lipoxygenase: Typ I reagiert nur mit freien Fettsäuren und mit hoher Substratspezifität, so wird z.B. aus der Linolsäure nur das 9- oder das 13-Hydroperoxid gebildet. Typ II wirkt unspezifischer, es werden beide Hydroperoxide gebildet, und das Enzym besitzt die Fähigkeit zur Co-Oxidation. Außerdem reagiert Typ II auch mit veresterten Substratfettsäuren, das heißt, daß sie in Lebensmitteln nicht die „Vorarbeit“ einer Lipase benötigt. Die durch die Lipoxygenasen gebildeten Fettsäurehydroperoxide werden in Pflanzen durch Lyasen gespalten. Infolgedessen entsteht eine Vielzahl von Stoffen, die wesentlich zum Aroma von Obst und Gemüse beitragen. Ein entsprechendes Schema der enzymatischen Bildung von HEX und NONDI aus der Linolensäure ist in Abbildung 3 zu sehen. (Belitz und Grosch, 1992)

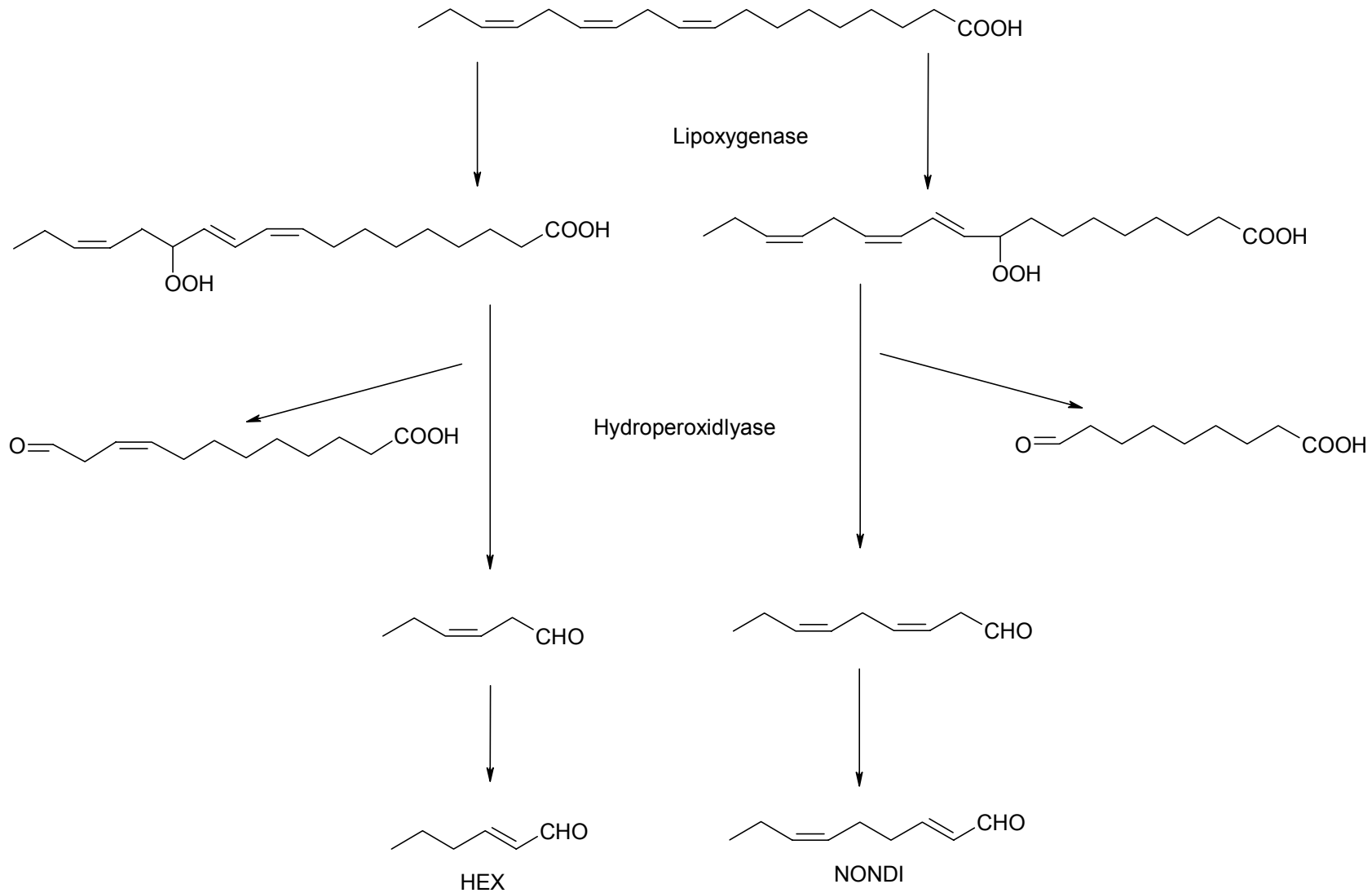


Abb. 3 Lipoxygenaseabhängige Bildung von HEX und NONDI aus Linolensäure (modifiziert nach Hatanaka et al., 1986)

2.1.2 Bildung von 5-Hydroxymethylfurfural

2.1.2.1 Maillard-Reaktion

Einen der Hauptwege zur Bildung von HMF stellt die Maillard-Reaktion dar, die auch als nicht-enzymatische Bräunung bekannt ist. Darunter versteht man die Reaktion von reduzierenden Kohlenhydraten mit Aminverbindungen, die zu einer Vielzahl unterschiedlichster Produkte führen kann. Bei den Aminverbindungen kann es sich um Proteine, Peptide, Aminosäuren oder Amine handeln. Mögliche Produkte sind Melanoidine, flüchtige Verbindungen, Bitterstoffe oder auch Verbindungen mit stark reduzierenden Eigenschaften, sogenannte Reduktone.

Die Maillard-Reaktion läuft über eine Vielzahl von Zwischenschritten ab, wovon hier nur auf die wichtigsten nachfolgend eingegangen wird. Der primäre Schritt ist die Addition der Aminverbindung an die Carbonylgruppe, die nach Wasserabspaltung zum Imin bzw. Glykosylamin (N-Glykosid) führt. Die gebildeten Aldosylamine bzw. Ketosylamine werden zu den entsprechenden Desoxyketosen bzw. Desoxyaldosen umgelagert, dies wird als Amadori- bzw. Heyns-Umlagerung bezeichnet. Anschließend kommt es im pH-Bereich 4-7 zur Bildung von 1-, 3- und 4-Desoxydicarbonylverbindungen, sogenannten Desoxyosonen, die als reaktive α -Dicarbonylverbindungen eine Vielzahl von Folgeprodukten liefern.

HMF kann als Folgeprodukt eines 3-Desoxyosons von Hexosen entstehen, ein möglicher Bildungsweg ist in Abbildung 4 dargestellt. (Belitz und Grosch, 1992)

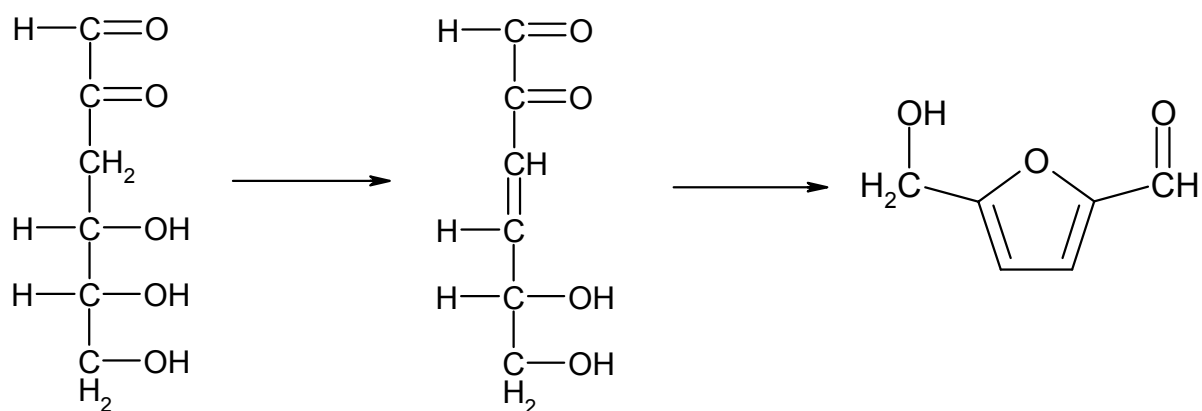


Abb. 4 Bildung von HMF aus einem 3-Desoxyoson einer Hexose (Belitz und Grosch, 1992)

2.1.2.2 Thermische Zersetzung von Fructose

Eine weitere Möglichkeit der Bildung von HMF aus Fructose nimmt als Zwischenstufe die Bildung eines Fructofuranosylkations (siehe Abbildung 5) an.

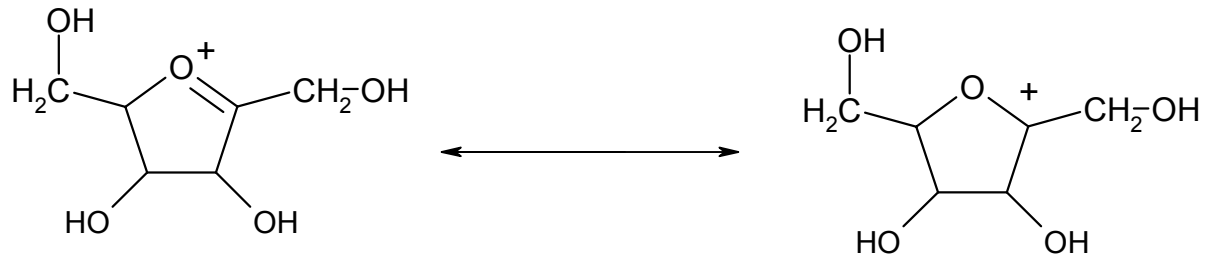


Abb. 5 Struktur eines Fructofuranosylkations (modifiziert nach Antal und Mok, 1990)

Bei Temperaturen im Bereich von 80 - 95 °C im stark sauren Bereich wurden bis zu 20 % HMF aus Fructose gebildet. Die Mengen an HMF, die bei der Bildung aus Glucose oder anderen Aldohexosen entstanden, waren im Gegensatz dazu sehr gering. Erhöht man die Temperaturen drastisch (175 - 390 °C), so steigen die Ausbeuten an HMF aus Fructose und auch aus den Aldohexosen deutlich an. (Antal und Mok, 1990)

2.2 Reaktivität

α,β -Ungesättigte Carbonylverbindungen sind direkt wirkende Substanzen, die keinen Aktivierungsschritt benötigen, um mit Zellbestandteilen zu reagieren. Ihre hohe Reaktivität beruht auf der in Konjugation zur Carbonylgruppe stehenden Doppelbindung. Die durch die elektronenziehende Wirkung des Sauerstoffs verursachte Polarisierung des Carbonylkohlenstoffs kann an den C3-Kohlenstoff weitergegeben werden. Neben dem Angriff an der Carbonylgruppe können Nukleophile auch mittels einer 1,2- oder 1,4-Addition reagieren (Morrison und Boyd, 1986). In Abbildung 6 ist die Reaktion eines 2-Alkenals mit einem Nukleophil schematisch dargestellt.

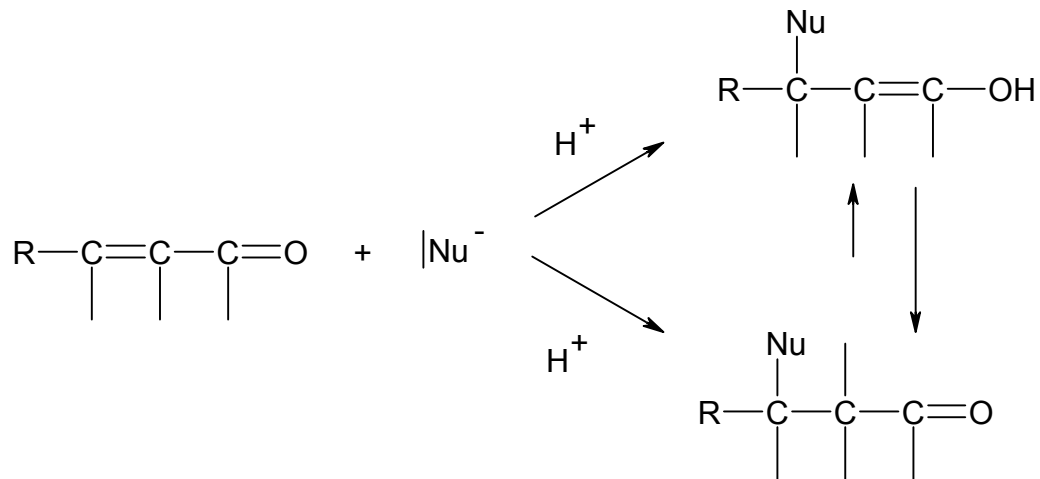


Abb. 6 Nukleophile Addition an 2-Alkenale

Als Reaktionspartner stehen den α,β -ungesättigten Verbindungen in der Zelle verschiedene Nukleophile zu Verfügung. In erster Linie kommen Glutathion, Proteine und DNA/RNA in Frage. In einer Michael-Addition analogen Reaktion kommt es an Proteinen bevorzugt zu einer Addition an den SH-Gruppen (Burkl et al., 1967). Es werden auch Kondensationen mit Aminogruppen zu Schiffsbasen für verschiedene Alkenale beschrieben (Kautiainen 1992). In Bindungsstudien zeigte sich, daß die 2-Alkenale unterschiedliche Affinitäten zu zellulären Nukleophilen aufweisen. Für HEX wird eine leicht höhere Affinität zur DNA im Vergleich zur RNA und eine deutlich geringere Affinität zu den Proteinen festgestellt, so daß sich für HEX die folgende Reihung der Affinitäten zu den unterschiedlichen Makromolekülen ergibt: DNA > RNA > Protein (Eisenbrand et al., 1995).

2.3 Biotransformation

Unter Biotransformation versteht man die enzymkatalysierte Umsetzung organischer Substanzen im Organismus. Für die meisten Fremdstoffe kann der Metabolismus in zwei Phasen unterteilt werden. In der Phase I-Reaktion werden in die Fremdstoffe durch Oxidation, Reduktion oder Hydrolyse funktionelle Gruppen eingeführt. In der Phase II-Reaktion, auch als Konjugationsreaktion bezeichnet, wird dann ein polares Molekül an den Fremdstoff angehängt, damit ein gut wasserlösliches und ausscheidbares Produkt entsteht (Eisenbrand und Metzler, 1994).

Im Allgemeinen können die verschiedenen Möglichkeiten der Biotransformation der reaktiven α,β -ungesättigten Verbindungen als entgiftend angesehen werden. In Abbildung 7 sind die Reaktionen zu den entsprechenden Glutathionaddukten,

Alkoholen und Säuren dargestellt. Die Glutathionaddukte werden dann in der Regel zu den entsprechenden Mercaptursäuren abgebaut. Ausnahmen von der entgiftenden Biotransformation (der α,β -ungesättigten Carbonylverbindungen) sind die beschriebene Giftung von HMF über Sulfotransferasen zu dem entsprechenden 5-Sulfooxymethylfurfural (Surh et al., 1994) und die für Acrolein beschriebene Möglichkeit der Epoxidierung über Cytochrom P450 (Patel et al., 1980).

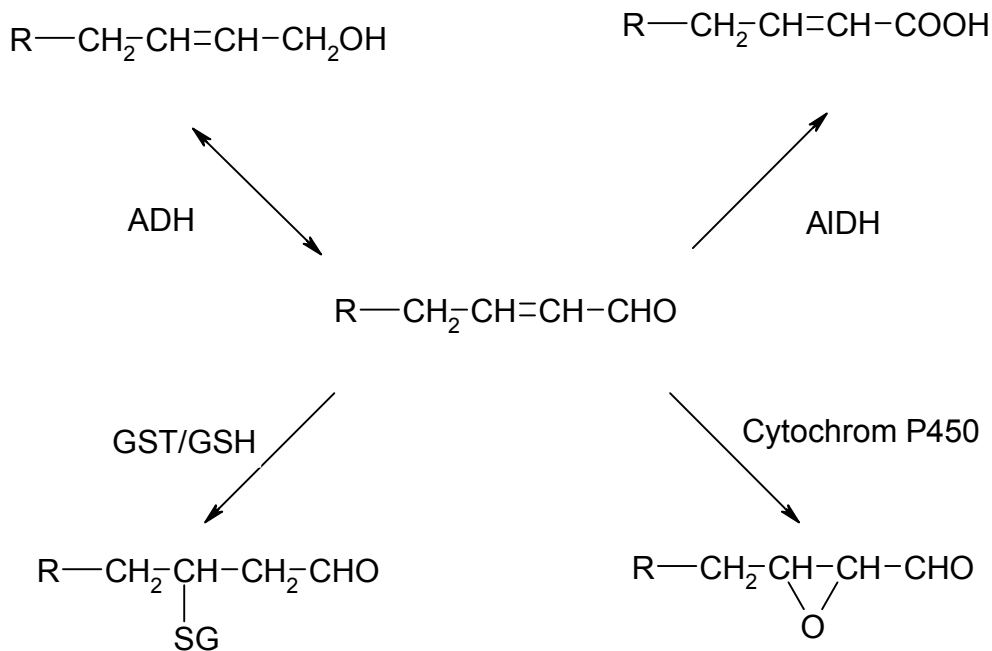


Abb. 7 Biotransformation von 2-Alkenalen mittels Alkoholdehydrogenasen (ADH) zu Alkoholen, durch Aldehyddehydrogenasen (AIDH) zu den entsprechenden Säuren, über Glutathion-S-Transferase (GST) oder direkt mit Glutathion (GSH) zu den Glutathion-Addukten und Cytochrom P450 vermittelte Epoxidierung

2.3.1 Glutathion-S-transferase (GST) und Reaktion mit Glutathion (GSH)

Glutathion, eines der bedeutendsten intrazellulären Peptide, kommt in den meisten Körpergeweben in relativ hohen Konzentrationen (1 - 10 mmol/kg Feuchtgewicht) vor, ebenso Glutathion-S-Transferasen, wobei die Isoenzymausstattung stark variieren kann, siehe auch Kapitel 2.5.4 (Oesch, 1994; Tjalkens et al., 1998).

Die direkte Reaktion von α,β -ungesättigten Carbonylverbindungen mit Glutathion (Esterbauer et al., 1975) bzw. die enzymatische Reaktion von Glutathion über Glutathion-S-Transferasen (GST) (Boylund und Chasseaud, 1967) stellen einen wirkungsvollen Pfad der Entgiftung dar. Die enzymkatalysierte Reaktion mit GSH läuft ungefähr um den Faktor 500 schneller ab als die nicht-enzymatische direkte

Reaktion mit GSH (Eisenbrand et al., 1995; Schuhmacher, 1990). Mit zunehmender Kettenlänge der 2-Alkenale nimmt die Geschwindigkeit der nicht-enzymatischen Reaktion mit GSH ab (Schuhmacher, 1990). Chien et al. (1994) verglichen Aldehyd und Keton und beobachteten, daß das Aldehyd OCTE (C8) schneller mit GSH reagiert als das Keton (*E*)-3-Nonen-2-on (C9). Für Acrolein wurde gezeigt, daß die Umsetzung mit GSH am stärksten durch die GST-Isoenzymfamilie P katalysiert wird. Die Isoenzymfamilien M und A zeigen deutlich geringere Aktivitäten. (Berhane und Mannervik, 1990)

Neben der enzymkatalysierten Umsetzung der α,β -ungesättigten Carbonylverbindungen durch GSTs zu den entsprechenden Glutathionaddukten wurde auch die Hemmung verschiedener GST-Isoenzymfamilien durch diese Verbindungen beschrieben. Wiederum für Acrolein wurde festgestellt, daß in Abwesenheit von GSH die Isoenzymfamilie π am effektivsten inhibiert wird (Berhane und Mannervik, 1990). Für OCTE und (*E*)-3-Nonen-2-on konnte eine spezifische Inhibierung unterschiedlicher GST-Isoenzymfamilien beobachtet werden. OCTE inhibiert spezifisch die Vertreter der A-Familie, (*E*)-3-Nonen-2-on spezifisch die der M-Familie (Chien et al. 1994).

Alternativ zum weiteren Abbau des GSH-Alkenal-Adduktes zur entsprechenden Merkaptursäure kann es auch zu einer Spaltung des Adduktes kommen (Esterbauer et al., 1975). Eisenbrand et al. (1995) konnten im zellfreien System die Spaltung verschiedener GSH-Alkenal-Addukte nachweisen. Für die HEX- und NONDI GSH-Konjugate wurden Halbwertszeiten von 2,1 bzw. 1,2 Stunden (37 °C) bestimmt. Aufgrund dieser Reversibilität der Bindung könnte das GSH-Konjugat als Transportform fungieren.

2.3.2 Reaktion mit Alkohol- und Aldehyddehydrogenasen (ADH und AIDH)

Eisenbrand et al. (1995) beschreiben die Reduktion und Oxidation von 2-Alkenalen durch cytosolische und mikrosomale Fraktionen aus der Rattenleber. Überwiegend findet eine Oxidation durch AIDH zu den entsprechenden Säuren statt. Es konnte gezeigt werden, daß die Umsatzraten mit zunehmender Kettenlänge der homologen Verbindungen C4 - C9 ansteigen (Schuhmacher, 1990).

AIDHs kommen in verschiedenen Kompartimenten der Zelle vor (Mitchell und Petersen, 1993). Aus Rattenleber konnten AIDHs mit unterschiedlichen spezifischen

Aktivitäten in den mitochondrialen, cytosolischen und mikrosomalen Fraktionen nachgewiesen werden. Für Crotonaldehyd wurde beschrieben, daß er nur von mikrosomaler AIDH oxidiert wird. Gleichzeitig wurde gezeigt, daß Crotonaldehyd ein reversibler, nicht kompetitiver Hemmstoff von mitochondrialer und cytosolischer AIDH ist. (Mitchell und Petersen, 1993)

Eine weitere Möglichkeit der Biotransformation der Aldehyde ist die ADH katalysierte Umsetzung zum entsprechenden Alkohol. Dieser Pfad trägt jedoch nur zu einem geringen Anteil zur Detoxifizierung von Alkenalen bei (Eisenbrand et al., 1995).

2.3.3 Epoxidierung

Nach Inkubation von Acrolein mit isolierten Rattenlebermikrosomen wurde das Epoxid Glycidaldehyd nachgewiesen (Patel et al., 1980). Bei dieser Epoxidierung handelt es sich um eine Giftung, Glycidaldehyd wird als kanzerogen eingestuft (IARC, 1985). Schuhmacher (1990) konnte nach Inkubationen mit Rattenlebermikrosomen zeigen, daß die Bindungsspektren von HEX und Crotonaldehyd mit Cytochrom P450 vorwiegend Typ-I-Charakteristik aufweisen. Dies entspricht einer Bindung an der Substratbindungsstelle, in der Nähe des zentralen Eisenatoms, die eine Voraussetzung für eine spätere Monooxygenierung darstellt (Wolff und Schwarz, 1997). In Abbildung 8 sind die möglichen Bindungsstellen von Fremdstoffen am Enzym Cytochrom P450 dargestellt. Es bestehen die Möglichkeiten zur Bindung als Substrat (Typ I) oder als Ligand (Typ II).

Zu einer anderen Aussage bezüglich der Bindung von HEX an Cytochrom P450 kamen Lame und Segall, (1987) sie inkubierten HEX mit Leberzellenmikrosomen der Maus und beobachteten eine deutliche Verminderung des Gehaltes an freiem Cytochrom P450. Diese Abnahme führten sie auf eine Reaktion von HEX mit den freien SH-Gruppen des Enzyms zurück.

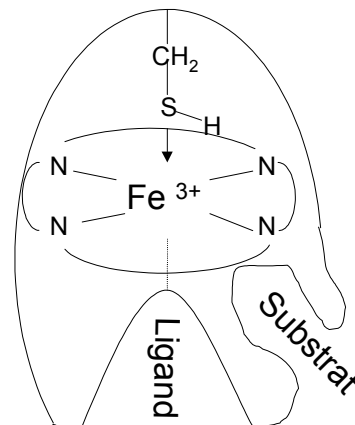


Abb. 8 Mögliche Bindungsstellen von Fremdstoffen am Enzym Cytochrom P450 (nach Wolff und Scharz, 1997)

2.3.4 Sulfotransferase (SULT)-vermittelte Sulfatierung von 5-Hydroxymethylfurfural

Für HMF wird die Sulfotransferase-vermittelte Bildung eines elektrophilen Esters 5-Sulfooxymethylfurfural diskutiert. Dabei stellt Sulfat die Abgangsgruppe dar. Der mögliche Mechanismus dieser Sulfatierung und der anschließenden Generierung einer aktiven Zwischenverbindung ist in Abbildung 9 dargestellt.

Für die Bildung des 5-Sulfooxymethylfurfurals (SMF) wird eine Sulfotransferase (SULT)-vermittelte Reaktion unter Anwesenheit 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat (PAPS), welches als Donor der Sulfatgruppe dient, diskutiert. Nach Abspaltung des Hydrogensulfats kommt es zur Bildung eines Carbokations, welches als Alkylans mit DNA, RNA oder Proteinen reagieren kann. (Suhr et al., 1994). Eine gesteigerte mutagene Wirkung von HMF bei Anwesenheit der cytosolischen Rattenleberfraktion und PAPS, sowie die nicht beobachtete mutagene Wirkung bei gleichzeitiger Anwesenheit von SULT-Inhibitoren (Lee et al., 1995) stützt diese Theorie. Somit führt die Sulfatierung nicht zur Detoxifizierung eines Fremdstoffes, sondern zu einem aktivierten ultimalen Metaboliten.

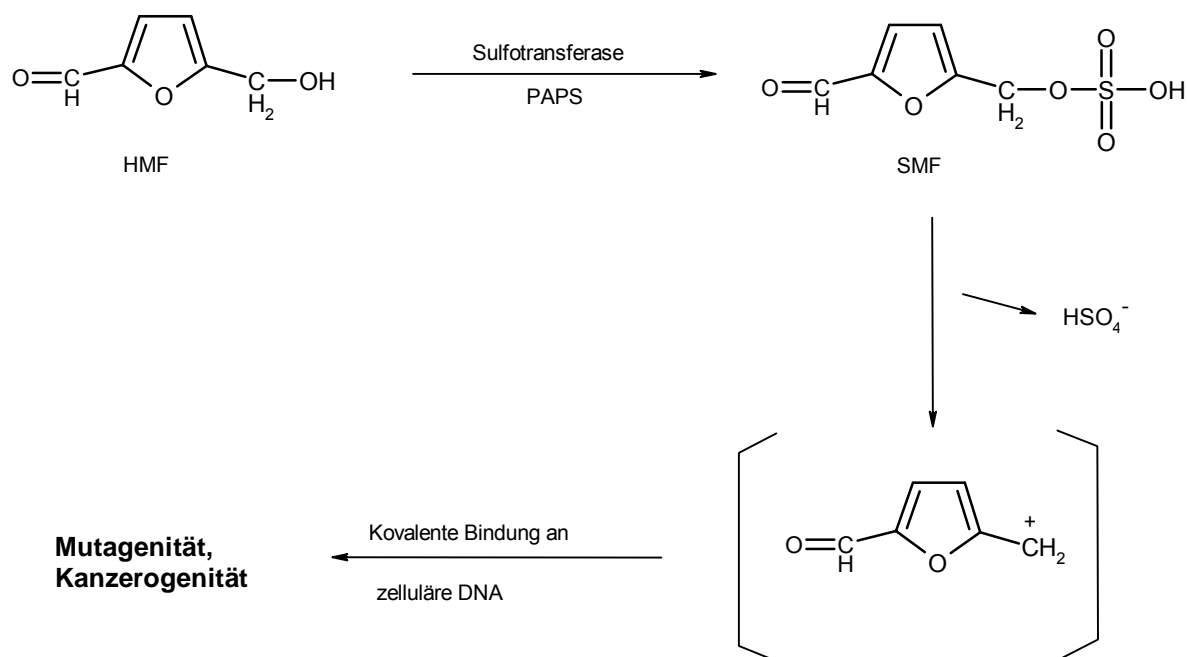


Abb. 9 Möglicher metabolischer Aktivierungsweg von HMF über allylische Sulfonierung (modifiziert nach Suhr et al., 1994)

2.4 Biologische Wirkung

2.4.1 Cytotoxizität *in-vitro*

Cytotoxische Effekte sind für einige der hier untersuchten Verbindungen beschrieben worden.

In Bakterien (*Salmonella typhimurium* TA 104) nimmt die Toxizität der einfach ungesättigten Aldehyde mit zunehmender Kettenlänge (C6 - C9) zu. Die Zugabe großer Mengen an Glutathion (10 mM) reduziert die Cytotoxizität um einen Faktor ≥ 5 (Marnett et al., 1985). Die Auswirkung einer weiteren konjugierten Doppelbindung (HEX/HEXDI) wird unterschiedlich diskutiert. Zum einen wird von einer Erhöhung der Cytotoxizität berichtet (Marnett et al., 1985), in einer anderen Arbeit (Eder et al., 1992) wurde eine Verminderung der cytotoxischen Wirkung beobachtet. Im Vergleich zu dem entsprechenden Alkohol zeigt HEX eine um den Faktor 2 höhere Cytotoxizität (Deng et al., 1993).

In Cytotoxizitätstests an Säugerzellen wurde ebenfalls eine Zunahme der cytotoxischen Wirkung mit zunehmender Kettenlänge (C5 - C9) beobachtet (Canonero et al., 1990). Die Einführung einer weiteren Doppelbindung in Konjugation zur ersten korreliert mit einer Zunahme der toxischen Wirkung (Kaneko et al., 1988). Vergleicht

man die cytotoxische Wirkung innerhalb der C6 Verbindungen HEX, HEXDI und CHX, so ist HEXDI leicht cytotoxischer als HEX und HEX deutlich cytotoxischer als CHX (Curvall et al., 1984). Bei dieser Untersuchung wurden verschiedene Parameter wie Inhibierung des Zellwachstums, die Induktion von Membranschäden oder ciliotoxische Wirkungen zur Bestimmung der Cytotoxizität zusammengefaßt.

Mehrfach nachgewiesen ist die Hemmung von Enzymen durch α,β -ungesättigte Carbonylverbindungen. So konnte z.B. eine Inhibierung der GST A durch HEX (10 μ M) nach einstündiger Inkubation in IGR-39 Zellen (humane Melanomkrebszelllinie) beobachtet werden. CA und Crotonaldehyd hemmten diese Familie leicht schwächer, und Acrolein führt zu keiner Inhibierung bei nicht cytotoxischen Konzentrationen. (van Iersel et al., 1996) Für OCTE wird ebenfalls die Hemmung dieser Isoenzymfamilie am isolierten Enzym nachgewiesen (Chien et al., 1994). Für 4-Hydroxy-2-Nonenal konnte in Untersuchungen an verschiedenen Zelllinien ab Konzentrationen $> 15 \text{ nmol}/10^6$ Zellen eine Inhibierung der Glutathionperoxidase Aktivität bestimmt werden (Kinter und Roberts, 1996). Für einige 2-Alkenale, darunter auch CA, ist auch eine Inhibierung der Glutathionreduktase beschrieben (Vander Jagt et al., 1997). Auch Wechselwirkungen mit Cytochromen (C und P450) werden für HEX beschrieben (Židek et al., 1997; Lame und Segall, 1987). Die Untersuchungen zur Reaktion mit Cytochrom P450 wurden mit Mikrosomen und HEX Konzentrationen von bis zu 1 mM, die Untersuchungen zur Interaktion mit Cytochrom C wurden am isolierten Enzym mit 20fachen Überschuß an HEX durchgeführt. Auch die Hemmung der Glucose-6-phosphatase über eine kovalente Bindung an der Mercaptogruppe durch α,β -ungesättigte Carbonylverbindungen ist nachgewiesen (Jørgensen et al., 1992).

Die Interaktionen mit Enzymen können weitreichende Auswirkungen für Zellen und Organismus haben und auch zu cytotoxischen Wirkungen führen.

2.4.2 Cytotoxizität *in-vivo*

Daten zur akuten Toxizität (LD_{50}) einiger α,β -ungesättigter Carbonylverbindungen in experimentellen Untersuchungen an Nagern sind in Tabelle 6 zusammengefaßt.

Bei den nicht cyclischen Aldehyden nimmt die akute Toxizität mit zunehmender Kettenlänge (C3 bis C6) deutlich ab, was im Widerspruch zu den beobachteten Cytotoxizitätsdaten *in-vitro* steht. Auffallend ist, daß für das Keton CHX (C6) und für

Crotonaldehyd (C4) nahezu identische LD₅₀-Werte (Ratte oral) beschrieben sind. Möglicherweise spielt hierfür die Lipophilie der Substanzen eine Rolle. Die Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten der beiden Substanzen sind für Crotonaldehyd mit log P = 0,63 (IARC, 1995) und für mit CHX log P = 0,61 (Sangster, 1989) nahezu gleich. Möglich wäre somit eine vergleichbare Aufnahme /Akkumulation in Zellen.

Tab. 6 Akute Toxizitätsdaten ausgewählter α,β -ungesättigter Carbonylverbindungen

Substanz	Organismus (Applikationsart)	LD ₅₀	Literatur
Acrolein ((E)-2-Propenal)	Maus (oral)	28 mg/kg	IARC, 1985
	Ratte (oral)	46 mg/kg	IARC, 1985
Crotonaldehyd ((E)-2-Butenal)	Maus (oral)	104 mg/kg	NTP, 2000
	Ratte (oral)	206 mg/kg	NTP, 2000
HEX	Ratte (oral)	800 mg/kg	Gaunt et al., 1981
	Ratte (i.p.)	100-200 mg/kg	Opdyke 1975
	Maus (i.p.)	100-200 mg/kg	Opdyke 1975
	Kanninchen (dermal)	600 mg/kg	Opdyke 1975
CHX	Ratte (oral)	220 mg/kg	Levin et al., 1972
	Kanninchen (dermal)	70 mg/kg	Levin et al., 1972
CA	Ratte (oral)	2100 mg/kg	Mereto et al., 1994
HMF	Ratte (oral)	3100 mg/kg	Ulbricht et al., 1984

2.4.3 Mutagenität und Gentoxizität

2.4.3.1 Mutagenitätstests

Für die hier diskutierten α,β -ungesättigten Carbonylverbindungen liegen zum Teil auch Untersuchungen zur Mutagenität vor. Untersuchungen mit Bakterien zeigen in Abhängigkeit der gewählten Inkubationsbedingungen und eingesetzten Bakterienstämmen widersprüchliche Ergebnisse. Marnett et al. (1985) untersuchten verschiedene 2-Alkenale auf mutagene Wirkung an *Salmonella typhimurium* TA104 im Ames-Test. Sie konnten zeigen, daß mit zunehmender Kettenlänge (C3 - C6) die Mutagenität der Verbindungen abnahm. Für die Verbindungen mit Kettenlänge C7 - C9 und CA war eine mutagene Wirkung nicht nachweisbar, dies wird mit der hohen cytotoxischen Wirkung der Verbindungen erklärt. Die Einführung einer konjugierten Doppelbindung führt im Fall von HEX/HEXDI zu einem Anstieg des mutagenen Potentials. Eder et al. (1993a) beobachteten für α,β -ungesättigte Carbonylverbindungen der Kettenlänge C4 - C7 in *Salmonella typhimurium* TA100 nur bei Einsatz der dreifachen Zelldichte eine eindeutige mutagene Wirkung der Substanzen. Die Mutagenität nimmt auch hier mit zunehmender Kettenlänge ab. In der Arbeit von Eder et al. (1993a) konnte auch für CHX eine schwach mutagene Wirkung festgestellt werden. Die mutagene Wirkung aller untersuchten Verbindungen nahm bei Zugabe von mikrosomalen Mix ab.

Für HMF liegen widersprüchliche Aussagen zur mutagenen Wirkung unter Zusatz von mikrosomalen Mix in *S. typhimurium* TA 98 und 100 vor. Ohne mikrosomalen Mix gibt es keine positiven Befunde. (Aeschbacher et al., 1981; Florin et al., 1980; Kasai et al., 1982; Kim et al., 1987; Shinohara et al., 1986; Kong et al., 1988)

In Säugerzellen (V79 Zellen) wurde das mutagene Potential α,β -ungesättigter Carbonylverbindungen mittels HPRT-Test bestimmt. Canonero et al. (1990) untersuchten die homologe Reihe der Verbindungen Pentenal bis NONE. Alle untersuchten Substanzen induzierten Mutationen. Im Gegensatz zu den Untersuchungen an Bakterien wurde hier eine Zunahme der mutagenen Wirkung mit zunehmender Kettenlänge beobachtet.

2.4.3.2 Gentoxizitätstests

Gentoxische Endpunkte sind für einige α,β -ungesättigte Carbonylverbindungen beschrieben. Größtenteils wurden nur wenige Konzentrationen verwendet und keine Dosis-Wirkungskurve ermittelt. Die Untersuchungen wurden sowohl an Bakterien als auch an Säugerzellen durchgeführt.

Im SOS-Chromotest an *Escherichia coli* PQ37 besaßen die 2-Alkenale (C3 - C8) und CA unter Standardbedingungen (DMSO als Lösungsmittel) keine gentoxische Wirkung. Acrolein, Crotonaldehyd und HEXDI zeigten gentoxische Wirkungen, wenn sie mit Ethanol anstatt DMSO als Lösungsmittel inkubiert wurden. HEX und Heptenal zeigten auch unter diesen Bedingungen keinen positiven Befund. (Eder et al., 1993a) Formaldehyd, Acrolein und Crotonaldehyd wurden im UMU-Test untersucht, der ebenfalls die Induktion der SOS-Reparaturenzymkaskade als Maß für die Induktion gentoxischer Wirkung erfaßt. Nur Formaldehyd zeigte hier eine eindeutige gentoxische Wirkung. (Benamira und Marnett, 1992) Für HMF wird von Kong (1988) in diesem Testsystem eine gentoxische Wirkung ohne Angabe der eingesetzten Konzentration beschrieben. Im Rec-Assay an *Bacillus subtilis* konnte ebenfalls eine gentoxische Wirkung von HMF festgestellt werden (Shinohara et al., 1986).

In Säugerzellen wurde die Induktion der außerplanmäßigen DNA-Synthese in Rattenhepatocyten als Marker für eine vorhandene gentoxische Wirkung angenommen. Hier zeigte NONE eine stärkere gentoxische Wirkung als HEX (Griffin und Segall, 1986). Die Induktion von DNA-Strangbrüchen wurde über die alkalische Filterelution und über den Comet-Assay detektiert. In Namalva Zellen, Rattenhepatocyten, primären Rattencolonzellen und in primären humanen Colonzellen wurde ein konzentrationsabhängiger Anstieg von DNA-Strangbrüchen für Crotonaldehyd und HEX festgestellt. Der Unterschied in der Wirkung der beiden Verbindungen war nur gering. (Eisenbrand et al., 1995; Gölzer et al., 1996) Eder et al. (1993a) untersuchten eine Reihe von 2-Alkenalen (C3 - C8) und CA an einer Leukämiezelllinie der Maus (L1210 Zellen) und konnten DNA-Schäden nur in Konzentrationen detektieren, bei denen auch cytotoxische Effekte auftraten. Nur bei HEX und Heptenal traten DNA-Schäden vor der beginnenden Cytotoxizität auf.

Eine Reihe cytogenetischer Endpunkte (Schwesterchromatidaustausch, strukturelle Chromosomenaberrationen, Induktion von Mikrokernen) wurden von Dittberner et al. (1995) nach Inkubation von Crotonaldehyd, HEX und NONDI in Lymphozyten oder Namalva Zellen bestimmt. In diesen Untersuchungen zeigte sich NONDI als

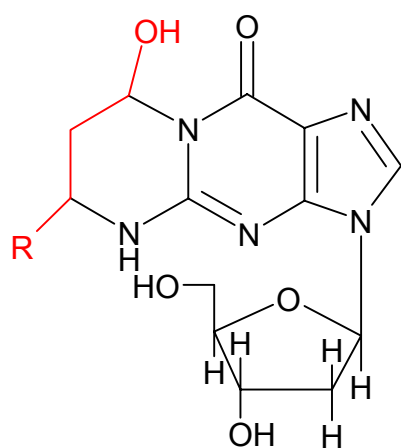
potenteste Verbindung, gefolgt von Crotonaldehyd und HEX. Mereto et al. (1994) untersuchten die Induktion von Mikrokernen in der Leber von Nagern nach oraler Applikation von CA. Es konnte ein signifikanter Anstieg der Anzahl von Mikrokernen in Hepatocyten von Ratte und Maus festgestellt werden.

In zwei Untersuchungen zur Auswirkung von HEX auf die Mundschleimhaut des Menschen (*in-vivo*) wurde festgestellt, daß HEX genotoxische Wirkungen besitzt. In einem Ansatz wurden Mundspülungen mit HEX-Lösungen (10 ppm) durchgeführt, in einem anderen Ansatz aßen die Personen 3 - 6 Bananen, dabei konnte jeweils eine Verdopplung der Mikrokerne in der Mundschleimhaut bestimmt werden. Für die Untersuchung mit der HEX-Lösung war der Unterschied zur Kontrolle signifikant, für die Untersuchung mit den Bananen nicht. (Dittberner et al., 1997)

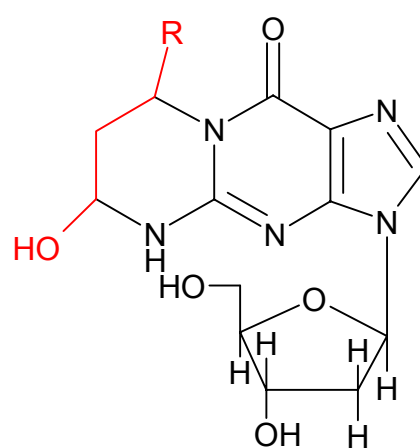
2.4.4 DNA-Addukte

Interaktionen von Aldehyden und Ketonen mit DNA, Nukleotiden, Nucleosiden bzw. Basen wurden von mehreren Gruppen berichtet. Für 2-Alkenale sind verschiedene Typen von Addukten beschrieben. Reaktionen finden überwiegend mit Guanin (G) statt, unabhängig davon, ob G frei, als Nucleosid bzw. Nucleotid oder in der DNA vorliegt. Für Acrolein werden auch Adenin-Addukte beschrieben. (Eder et al., 1993b; Chung et al., 1984; Nath und Chung 1994; Gölzer et al., 1996)

In Abbildung 10 sind die möglichen Adduktypen für Acrolein, Crotonaldehyd, Pentenal, HEX und HEXDI dargestellt.



1,2-Cyclisches-dG-Addukt (TypA)



1,2-Cyclisches-dG-Addukt (TypB)

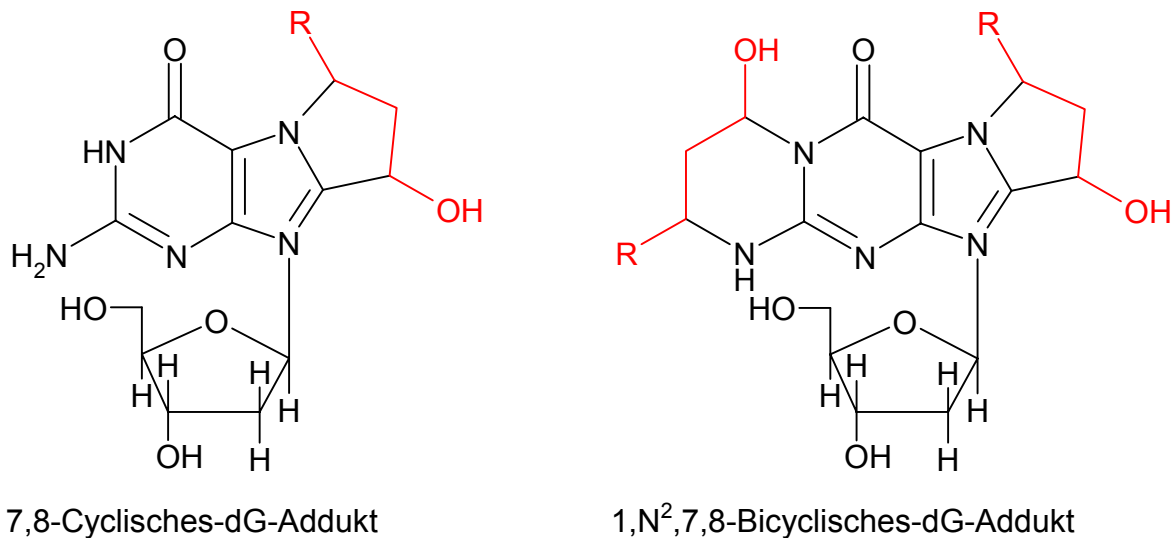


Abb. 10 dG-Addukte von 2-Alkenalen (modifiziert nach Eder et al., 1993b)

Welche Addukt-Typen für die verschiedenen Alkenale nachgewiesen wurden, kann Tabelle 7 entnommen werden. Bei den 1,2-cyclischen-dG-Addukten von Crotonaldehyd, Pentenal und HEX handelt es um ein Isomerengemisch. Für das 7,8-cyclische-dG-Addukt wurden cis- und trans-Isomere nur nach spontaner Abspaltung des Ribose-Restes nachgewiesen. (Eder und Hoffman 1992; Eder und Hoffman 1993)

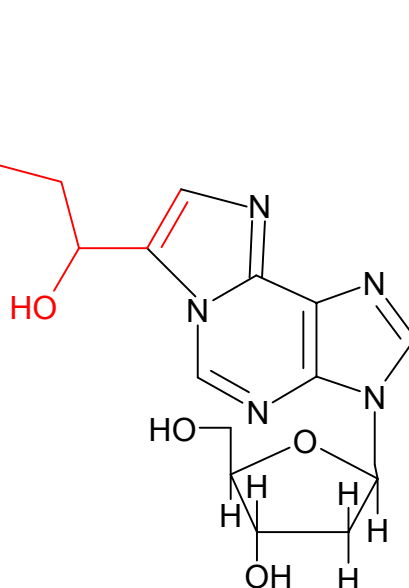
Tab. 7 Charakterisierte dG-Addukte von 2-Alkenalen (modifiziert nach Eder et al., 1993b)

Substanz	R	1,2-Cyclisches-dG-Addukt		7,8-Cyclisches-dG-Addukt	1,N ² ,7,8-Bicyclisches-dG-Addukt
		Typ A	Typ B		
Acrolein	-H	+	+	-	+
Crotonaldehyd	-CH ₃	+	-	+	+
Pentalenal	-CH ₂ -CH ₃	+	-	+	-
HEX	-CH ₂ -CH ₂ -CH ₃	+	-	+	-
HEXDI	-CH=CH-CH ₃	+	-	+	-

+: nachgewiesen

-: nicht nachgewiesen

Für OCTE konnte bei Anwesenheit von Wasserstoffperoxid die Bildung des 1,N⁶-Etheno-2'-Deoxoyadenosin-Addukts nachgewiesen werden (Carvalho et al., 2000). Die Struktur dieses Addukts ist in Abbildung 11 dargestellt.



1,N⁶-Etheno-2'-Deoxoyadenosin Addukt

Abb. 11 OCTE-dA-Addukt bei Anwesenheit von H₂O₂ (modifiziert nach Carvalho et al., 2000)

Auch *in-vivo* wurden Addukte von Crotonaldehyd mit dG nachgewiesen. So konnte zum Beispiel nach dermalen Applikation von Crotonaldehyd an Mäusen das 1,2-cyclische-dG-Addukte isoliert werden (Chung et al., 1989). Der gleiche Addukttyp wurde für HEX in Ratten nachgewiesen. 24 Stunden nach oraler Applikation von HEX wurden Addukte im Vormagen, Leber, Ösophagus und in der Niere detektiert. Die höchsten Adduktlevel wurde 48 Stunden nach der Applikation beobachtet. (Schuler und Eder, 1999) Gölzer et al. (1996) konnten mit einer Dosis an HEX von 330 mg/kg Körpergewicht (KG) bis zu 16 Stunden nach oraler Gabe keine DNA-Addukte nachweisen.

Die Relevanz der 1,2-cyclischen-dG-Addukte konnte in Modelluntersuchungen durch den kurzkettigsten Vertreter dieses Addukttyps, 1,N²-Propanodeoxyguanosin, aufgezeigt werden. So führte der Einbau von 1,N²-Propanodeoxyguanosin in Oligodeoxynukleotide, welche als Plasmid in *E. coli* transfiziert wurden, zu Basenpaarsubstitutionen, vornehmlich G zu T-Transversionen (Moriya et al., 1989). In Untersuchungen von Benamira et al. (1992) wurde beobachtet, daß 1,N²-Propanodeoxyguanosin auch Rasterschubmutationen auslöst. Czerny et al. (1998) konnte aus Basensequenz-Analysen von Mutanten folgern, daß Crotonaldehyd 39 %

Punktmutationen, 46 % Deletionen und 15 % Insertionen und Inversionen auslöst. Es scheint, daß es sich bei den 1,N²-Addukten um persistente Verbindungen handelt, welche als prämutagene Läsionen anzusehen sind (Marnett, 1994).

Auch für das Keton CHX sind im zellfreien System Addukte mit dG beschrieben. Identifiziert wurden zwei Strukturen (Abbildung 12), ein tetracyclisches Addukt (Hoffman et al., 1989 und Chung et al., 1988) und ein N²-substituiertes offenkettiges Addukt als Hauptprodukt (Chung et al., 1988). Für jeden Addukttyp wurde ein Paar von Diastereomeren nachgewiesen.

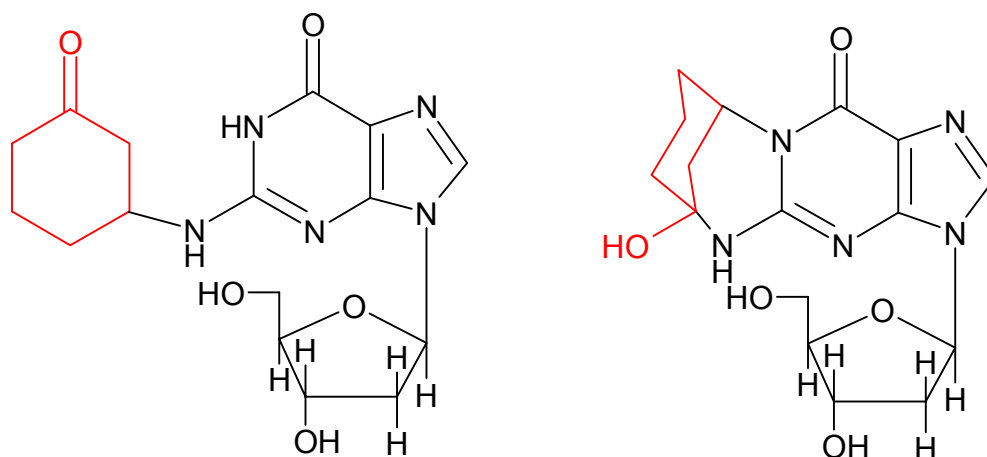


Abb. 12 Addukte von CHX mit dG (modifiziert nach Chung et al., 1988; Hoffman et al., 1989)

2.4.5 Kanzerogenitäts- und Subchronische Studien

Kanzerogenitätsstudien liegen nur für die Substanzen Acrolein und Crotonaldehyd vor. In der Studie mit Acrolein wurde Ratten über 2 Jahre hinweg eine tägliche Dosis von bis zu 2,5 mg/kg KG oral per Schlundsonde verabreicht. Selbst in der höchsten Konzentration konnte kein signifikanter Anstieg an neoplastischen oder nicht-neoplastischen Veränderungen festgestellt werden. (Parent et al., 1992) Einen ebenfalls negativen Befund zeigte die Studie an Mäusen, denen über 18 Monate eine tägliche Dosis von bis zu 4,5 mg/kg KG verabreicht wurde (Parent et al., 1991). Im Gegensatz dazu zeigte Crotonaldehyd ein kanzerogenes Potential. In einer Studie an Ratten wurden über 113 Wochen Konzentrationen von 42 und 421 mg/l im Trinkwasser verabreicht. In der Gruppe, die der niedrigsten Konzentration ausgesetzt war, wurden Lebertumore bei zwei von siebenundzwanzig Tieren festgestellt. In der

Hochdosisgruppe wurden keine Lebertumore induziert. 23 von 27 Tieren der Niedrigdosisgruppe und 13 von 23 Tiere der Hochdosisgruppe zeigten veränderte Leberzell-Foci. Bei den Foci handelt es sich um Herde präneoplastischer Zellen. Aus ihnen können sich benigne Tumore und schließlich hepatozelluläre Karzinome entwickeln. (Schulte-Hermann et al., 1994) Bei der Untersuchung auf Entstehung anderer Tumore außerhalb der Leber konnte nur noch eine Erhöhung der Häufigkeit von Blasenpapillomen bei der Niedrigdosisgruppe (2) im Vergleich zur Kontrolle (0) detektiert werden. (Chung et al., 1986)

Für CHX liegen noch keine Kanzerogenitätsstudien vor, jedoch wurden im Hinblick auf geplante Kanzerogenitätsstudien schon subchronische Studien durchgeführt. In einer 13-wöchigen Studie an F344-Ratten und B6C3F1-Mäusen wurden die Tiere Konzentrationen von 2,5; 5 und 10 ppm CHX in der Atemluft ausgesetzt. Für alle eingesetzten Konzentrationen wurden Hyperplasien und Metaplasien im Nasenraum der Tiere beobachtet. Zu Erosionen und Entzündungen im Nasenraum kam es nach Exposition von 10 ppm CHX in der Atemluft an Mäusen. Eine Zunahme des Lebergewichtes wurde bei Mäusen beobachtet, die 5 und 10 ppm CHX exponiert waren, und bei Ratten, die 10 ppm CHX ausgesetzt waren. (Cunningham et al., 1999)

2.5 Testmethoden

2.5.1 Wachstumshemmung und Cytotoxizität

Wachstumshemmung und Cytotoxizität einer chemischen Verbindung sind grundlegende Parameter, die im Rahmen der *in-vitro* Testung des toxischen Potentials einer Substanz routinemäßig bestimmt werden.

2.5.1.1 Wachstumshemmung (SRB-Test)

Die Bestimmung der Wachstumshemmung erfolgte mittels des Sulforhodamin-B-Tests (SRB-Test). Der Test basiert auf einer schnellen und empfindlichen Messung des zellulären Proteingehaltes adhärent wachsender Zellkulturen.

Zur Proteinbestimmung wird der stark pinkfarbene Aminoxanthan-Farbstoff Sulforhodamin-B eingesetzt (Abbildung 13).

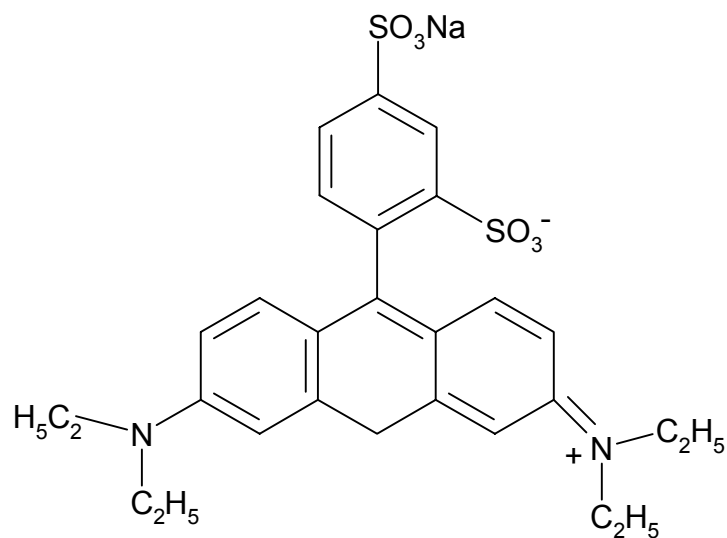


Abb. 13 Sulforhodamin-B

Im Sauren bindet Sulforhodamin-B stabil und mit hoher Empfindlichkeit an Proteine. (Skehan et al., 1990) Der Vorteil des SRB-Tests im Vergleich zu anderen Tests, z.B. dem Tetrazolium-Test (MTT), liegt in der besseren Linearität zur Zellzahl, der höheren Sensitivität und Reproduzierbarkeit (Keepers et al., 1991).

2.5.1.2 Cytotoxizität (Membranintegrität, Trypanblau-Test)

Zur Bestimmung der cytotoxischen Wirkung eignet sich der Trypanblau-Test. Mit ihm kann schnell und einfach eine direkte cytotoxische Wirkung erfaßt werden, wenn diese zur Zerstörung der Zellmembran führt. Lebende Zellen mit intakter Membran können Trypanblau nicht aufnehmen. Abgestorbene Zellen erscheinen unter dem Mikroskop dunkel, lebende Zellen hell (Lindl, 1987). Neben der Anwendung von Farbstoffen zur Prüfung auf eine vorhandenen Membranintegrität wird auch die Freisetzung von Enzymen, z.B. der Lactatdehydrogenase (LDH), erfaßt (Wilson A.P., 1992; Cook and Mitchell, 1989). Die Durchführung gestaltet sich zeitaufwendiger, die Erfassung der LDH-Aktivität erfolgt über eine photometrische zeitabhängige Bestimmung, so daß sich dieses Verfahren weniger zur schnellen Viabilitätsprüfung der Zellen eignet.

2.5.2 Mutationstest (HPRT-Test)

Die Bestimmung der mutagenen Wirkung stellt einen wichtigen Parameter bei der Einschätzung des toxischen Potentials einer Verbindung dar. Infolge von Mutationen in Körperzellen kann es zur Auslösung von Krebs kommen. Keimbahnmutationen können an die Folgegeneration weitergegeben werden und genetisch bedingte Erkrankungen verursachen. (Eisenbrand und Metzler, 1994).

Mutationen können in *in-vitro* Untersuchungen an Bakterien oder Säugerzellen mit verschiedenen Testmethoden nachgewiesen werden. Häufig verwendet werden der Ames-Test, ein Bakterien-Genmutationstest, oder der HPRT-Test, ein Säugerzell-Genmutationstest. Wegen der höheren Relevanz für den Menschen wurde in dieser Arbeit der HPRT-Test zur Untersuchung der mutagenen Wirkung ausgewählter α,β -ungesättigter Carbonylverbindungen eingesetzt.

Mit dem HPRT-Test besteht die Möglichkeit, Vorwärtsmutationen in Säugerzellen zu detektieren. Mutationen werden am erblichen Verlust der Aktivität der Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT) erkannt, einem Enzym, das freie Purinbasen in die entsprechenden Nukleosidmonophosphate umwandelt und somit für eine Neusynthese von Nukleinsäuren verfügbar macht. (Andrae, 1996) In Abbildung 14 ist die Funktion des Enzyms bei der Bildung von Guanosinmonophosphat (GMP) dargestellt. Eine Ribosephosphateinheit wird von Phosphoribosyl- α -pyrophosphat

(PRPP) auf Guanin übertragen. Unter Abspaltung von Pyrophosphat (PP_i) entsteht das entsprechende Nukleotid.

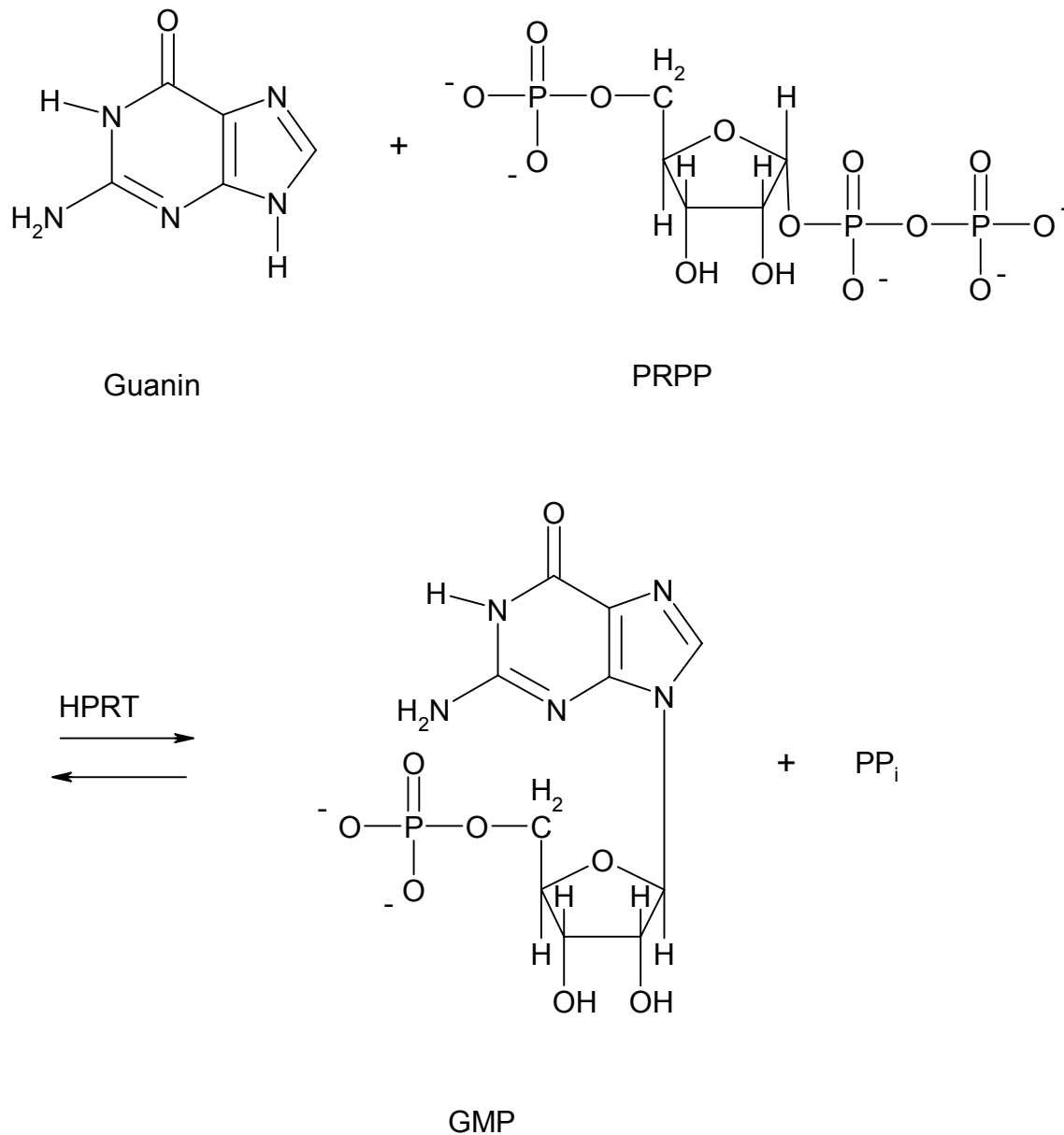


Abb. 14 Funktion des HPRT-Enzyms (modifiziert nach Voet und Voet, 1992)

Das Prinzip des Testes basiert darauf, daß Mutationen am *hprt*-Gen zu einem Verlust oder einer starken Abnahme der HPRT-Aktivität führen. Kommen nun die Zellen mit einer Guanin-anlogen Verbindung wie 6-Thioguanin (Abbildung 15) in Kontakt, wird diese Verbindung bei funktionsfähigem Enzym zum Nukleotid überführt, welches stark toxisch wirkt und zum Absterben der Zellen führt. HPRT-defiziente Zellen bzw. mutierte Zellen sind lebensfähig, da sie die Guanin-analoge Verbindung nicht einbauen können, sondern statt dessen die Guaninnukleotide über einen energiein-

tensiveren Weg de novo synthetisieren. (Bradley et al., 1981; Burkhart-Schultz et al., 1996; Glatt, 1993)

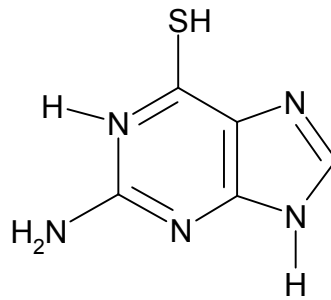


Abb. 15 Struktur von 6-Thioguanin

Mit dem HPRT-Test können Basenpaarsubstitutionen, Leserastermutationen oder auch kleine Deletionen erfaßt werden (Andrae, 1996).

Als weitere Mutationstest in V79 Zellen steht der Na⁺/K⁺-ATPase Genmutationstest (Ouabin-Resistenztest) zu Verfügung. Mit ihm können Mutationen am ATPase-Gen, welche das essentielle Enzym Na⁺/K⁺-ATPase exprimiert, erfaßt werden. Da mit diesem System jedoch nur Basenpaarsubstitutionen detektiert werden können, spielt dieser Test in der Routine-Mutagenitätstestung keine Rolle. (Andrae, 1996)

2.5.3 Gentoxizitätstest

Zur Untersuchung der gentoxischen Wirkung der Substanzen wurden zwei verschiedene Testsysteme eingesetzt, die unterschiedliche Endpunkte detektieren. Der UMU-Test, ein Bakterientest, erfaßt indirekt die Induktion der DNA-Reparatur in *Salmonella typhimurium*. Kommt es zur Aktivierung der SOS-Reparaturenzymkaskade, wird gleichzeitig ein Reporter gen aktiviert, was zur Expression einer Galactosidase führt.

Der Comet-Assay (Einzelzell-Gelelektrophorese) basiert auf dem unterschiedlichen Wanderungsverhalten von DNA-Fragmenten im elektrischen Feld und kann mit allen eukaryontischen Zellen durchgeführt werden, vorausgesetzt die Zellen lassen sich vereinzeln.

2.5.3.1 UMU-Test

Testsysteme, die Reparaturen an der DNA erfassen, sind vielfältig. Oft beruhen sie auf dem Einbau radioaktiv markierter Desoxyribonukleoside, meist [³H]-Thymidin, wie z.B. beim Nachweis der außerplanmäßigen DNA-Synthese (UDS-Test) oder über die Gleichgewichtszentrifugation (Andrae, 1996). Testsysteme, die auf der Induktion der SOS-Reparatur beruhen, sind z.B. der SOS-Chromotest oder der UMU-Test.

Als Testsystem werden Bakterien genutzt, bei denen die Induktion der SOS-Reparaturenzymkaskade erfaßt wird. Nach Exposition mit einer Chemikalie, die zu einer Schädigung der DNA führt oder in die DNA-Replikation eingreift, kommt es zu einem Anstieg der Expression von Genen, die zur SOS-Reparaturenzymkaskade gehören. (Walker, 1984) Bei *Escherichia coli* spielt das *recA*-Gen eine Schlüsselstellung bei der SOS-Antwort. Durch DNA-Schädigung wird es aktiviert und spaltet in seiner Protease-aktiven Form das LexA-Protein. Das LexA-Protein fungiert als Repressor für mindestens 17 Gene, die unter SOS-Kontrolle stehen. (Kaina, 1993) Während des normalen Wachstums wird die Expression der SOS-Gene überwiegend durch LexA kontrolliert. Treten an der DNA jedoch so viele Schäden auf, daß nach der Replikation Lücken auftreten, so verbindet sich RecA mit den einzelsträngigen DNA-Bereichen und stimuliert die Spaltung von LexA. Es kommt zu einer Expression der SOS-Gene. Zu diesen gehören z.B. die *uvr*-Gene, die eine wichtige Rolle bei der Excisionsreparatur spielen, das *recA*-Gen, das für das Enzym der Rekombinationsreparatur kodiert oder die *umu*-Gene, deren Produkte daran beteiligt sind, Basen an Schadstellen innerhalb der DNA zu ersetzen, selbst wenn gar keine Information darüber vorliegt, welche Basen sich ursprünglich an dieser Stelle befunden haben. (Voet und Voet, 1992)

Der UMU-Test wird für viele unterschiedliche Substanzklassen eingesetzt (Oda et al. 1985; 1992; 1993, Nakamura et al. 1987, Ono et al. 1991, Benamira und Marnett, 1992). Substanzen, die im UMU-Test gentoxische Wirkungen besitzen, verursachen auch meistens im Ames-Test Mutationen. Jedoch wurde auch schon beobachtet, daß Stoffe, die im Ames-Test mutagene Wirkungen zeigten, im UMU-Test negative Ergebnisse lieferten. (Nakamura 1987)

Als Teststamm werden üblicherweise Bakterien des Typs *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002, TA1535/NM2009 und TA1535/NM3009 benutzt, in die das *umuC-lacZ*-Gen transfiziert ist. Die Stämme unterscheiden sich zum Teil bezüglich ihrer

Enzymausstattung. In Tabelle 8 sind die Aktivitäten der Nitroreduktase, O- und N-Acetyltransferase sowie der Glutathion-S-Transferase in den verschiedenen Bakterienstämmen aufgeführt.

Tab. 8 Enzymaktivitäten von *Salmonella typhimurium* TA 1535/pSK 1002 , TA 1535/NM2009 und TA 1535/NM3009 (Shimada et al., 1994; Oda et al., 1996)

Stamm	Nitroreduktase-Aktivität	O-Acetyltransferase-Aktivität	N-Acetyltransferase-Aktivität	Glutathion-S-transferase-Aktivität
	nmol /min/mg Protein			
TA 1535/pSK1002	118	0,4	13	100
TA 1535/NM2009	-	162	175	-
TA 1535/NM3009	253	222	184	-

- es wurde keine Untersuchung zu diesem Parameter durchgeführt

Zur Untersuchung verschiedener Substanzklassen wurden unterschiedliche Teststämme generiert, die sich in ihrer spezifischen Enzymausstattung unterscheiden. Der Stamm *Salmonella typhimurium* TA1535/NM2009 wurde entwickelt, um die Aktivierung von Azofarbstoffen und aromatischen Aminen über eine P-450/O-Acetyltransferase zu überprüfen. *Salmonella typhimurium* TA 1535/NM3009 wurde generiert, da viele Nitroarene (nitrierte polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe) ihre kanzerogene und mutagene Wirkung erst nach einer Aktivierung durch ein Nitroreduktase/O-Acetyltransferase System zeigen. Oda et al. (1996) erzeugten einen spezifischen Stamm (*Salmonella typhimurium* NM5004), der eine extrem hohe GST-Aktivität aufweist (7,7 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ Protein), um damit Untersuchungen zur Aktivierung bzw. Deaktivierung von Substanzen durchzuführen.

Kommt es zu Schäden an der DNA, wird infolge der Induktion der SOS-Kaskade β -Galactosidase produziert, die durch das *lacZ*-Gen kodiert wird. Nach Zerstörung der Bakterienmembran kann die Aktivität des Enzyms indirekt über die Spaltung des Substrates Nitrophenylgalactose (Abbildung 16) kolorimetrisch bestimmt werden.

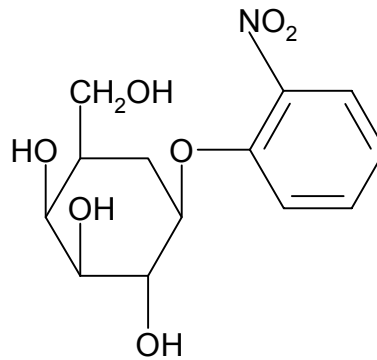


Abb. 16 2-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid

Die Extinktion des freigesetzten Nitrophenols wird bei einer Wellenlänge von 420 nm gemessen.

Ein Vorteil des UMU-Assays gegenüber dem Ames-Test besteht darin, daß man für die Durchführung nur 1,5 Tage benötigt. Der klassische Ames-Test ist ein Plattentest, der aufgrund der Nachwuchszeit der Bakterien 3-4 Tage erfordert. Ein weitere Vorteil des UMU-Tests im Vergleich zu anderen Reparaturtests liegt darin, daß er ohne radioaktiv markierte Verbindungen auskommt. Der UMU-Test wird auch im Umweltmonitoring eingesetzt. Er ist der erste Gentoxizitätstest, der nach einer DIN-Norm für die Abwasseruntersuchung standardisiert wurde. (Reifferscheid et al. 1997)

2.5.3.2 Comet-Assay

Der Comet-Assay, der auch als Einzelzell-Gelelektrophorese bezeichnet wird, ermöglicht den sensitiven Nachweis von DNA-Modifikationen in einzelnen Zellen, die zu DNA-Strangbrüchen führen. Alternative Methoden zum Nachweis von DNA-Einzelstrangbrüchen (SSB) sind unter anderem die Gradientenzentrifugation, die DNA-Entwindung mit anschließender Chromatographie, der DNA-Niederschlags-Assay und die alkalische Filterelution (Ahnström, 1988).

Die Bedeutung der alkalischen Filterelution in der Forschung ist im Vergleich zum Comet-Assay innerhalb des letzten Jahrzehnts stark zurückgegangen. Anfang der 90er Jahre (1990-1994) wurden deutlich mehr Publikationen veröffentlicht, die die Induktion von DNA-Strangbrüchen mit Hilfe der Filterelution untersuchten als mit dem Comet-Assay (107 zu 32). Dieses Bild wandelte sich ab 1995. Im Zeitraum von 1995 bis 2000 änderte sich das Verhältnis auf 122 zu 735 Publikationen zu Gunsten des Comet-Assays (DIMDI, 2000).

Der Comet-Assay basiert auf einer Beobachtung von Rydberg und Johanson (1978), daß nach Behandlung von Zellen mit ionisierter Strahlung die Zellkerne mit zunehmender Dosis immer diffuser wurden. Ausgehend von dieser Beobachtung erfolgte durch Ostling und Johanson (1984) eine Verbesserung der Technik, durch eine anschließende Elektrophorese. In Abhängigkeit der Strahlendosis trat die DNA unterschiedlich weit aus dem Zellkern aus, was durch das Anfärben mit Fluoreszenzfarbstoffen gut unter dem Mikroskop zu beobachten war. Wird der Comet-Assay unter neutralen Bedingungen durchgeführt, werden nur DNA-Doppelstrangbrüche (DSB) erfaßt. Im alkalischen Milieu (wo die DNA als Einzelstrang vorliegt) werden neben DSB auch SSB und alkali-labile Stellen detektiert (Fairbairn et al., 1995): SSB werden ab einem pH von $\geq 12,1$ detektiert, alkali-labile Stellen können erst ab einem pH ≥ 13 bestimmt werden, so daß durch die Variation des pH-Wertes zusätzliche Informationen zur Art der DNA-Schäden gewonnen werden können (Horváthová et al., 1998). In der Regel wird der Comet-Assay im alkalischen Milieu (pH ≥ 13) durchgeführt (Kassie et al., 2000; Fairbairn et al., 1995). Zur Anwendung kommt der Comet-Assay bei *in-vitro* und *in-vivo* Gentoxizitätstests, in großen Ausmaß auch in Biomonitoring-Studien (Kassie et al., 2000). In Abbildung 17 sind die Zellkerne ungeschädigter und geschädigter Zellen zu sehen.

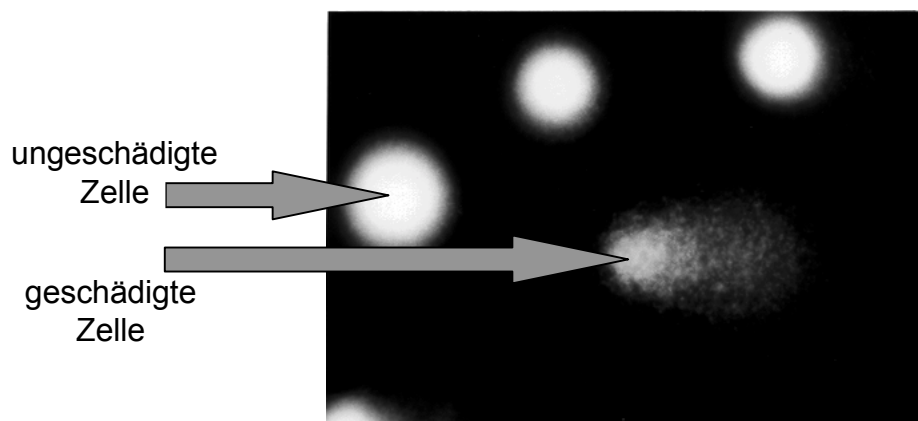


Abb. 17 Zellkerne im Comet-Assay

Als Maß für die DNA-Schädigung können verschiedene Parameter herangezogen werden. Die meiste Anwendung findet immer noch die Bestimmung der sogenannten „tail length“ (26 von 33 Publikationen), d.h. der Länge des DNA-Schweifes. Sie wird entweder von der Mitte des Zellkerns oder vom Ende des Zellkerns bis zum Schweifende gemessen. Ein weiteres Maß zur Quantifizierung der DNA-Schäden ist

die Bestimmung der sogenannten „tail intensity“ (10/33) und des „tail moments“ (14/33). Die „tail intensity“ (TI) oder Fluoreszenzintensität im Schweif, ist ein Maß für den prozentualen Anteil an DNA im Kometen-Schweif (Kassie et al., 2000). Das „tail moment“ ist das Produkt aus Schweiflänge („tail length“) und „tail intensity“ (McKelvey-Martin et al., 1993).

2.5.4 Glutathion-Bestimmung

Glutathion (Abbildung 18) ist ein ubiquitär verbreitetes Tripeptid (γ -L-Glutamyl-L-Cysteinylglycin) mit vielfältigen biologischen Funktionen. Die Synthese von GSH wird von den Enzymen γ -Glutamylcystein Synthetase und GSH-Synthetase katalysiert (Meister, 1995).

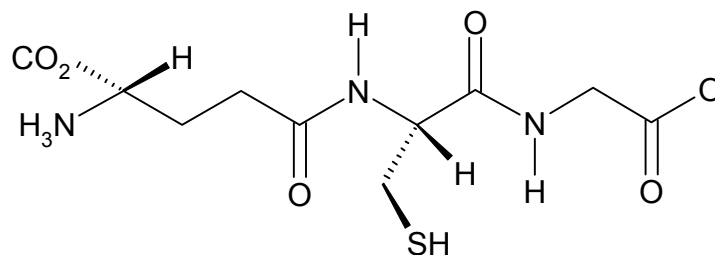


Abb. 18 Struktur von GSH

Die ungewöhnliche Struktur von GSH, bei der die γ -Carboxylgruppe von Glutamin mit der α -Aminogruppe von Cystein verbunden ist, führt dazu, daß die Verbindung gegenüber Proteasen und Peptidasen unempfindlich ist, und der GSH-Metabolismus eigenständig kontrolliert wird (Jones et al., 1995). Glutathion kann sowohl in reduzierter Form (GSH), als auch in oxidiert Form (GSSG) vorliegen. In Säugerzellen findet man GSH-Konzentrationen von 0,5 - 10 mM, in Blutplasma sind jedoch nur Konzentrationen im mikromolaren Bereich vorhanden. Das Verhältnis von GSH zu GSSG liegt in der Regel bei oder größer 10 zu 1. Die durch die Glutathionreduktase (GSR) katalysierte Reaktion von GSSG zu GSH (Abbildung 19) ist von entscheidender Bedeutung, um das Verhältnis von GSH zu GSSG innerhalb der Zelle aufrecht zu erhalten (Halliwell und Gutteridge, 1999).

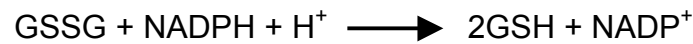


Abb. 19 GSR-katalysierte Umsetzung von GSSG zu GSH

Glutathion spielt eine wichtige Rolle bei der Detoxifizierung von Fremdstoffen. Zum einen kann es direkt, zum anderen über eine Glutathion-S-Transferase (GST) vermittelte Reaktion mit Elektrophilen reagieren (siehe auch Kapitel 2.3.1) (Wolff und Schwarz, 1996). Die gebildeten Glutathion-Addukte können über einen Membran-gebundenen Transporter aus der Zelle ausgeschleust und nach weiterem enzymatischen Abbau als Merkaptursäuren aus dem Organismus ausgeschieden werden (Ketterer, 1998).

Zur Zeit sind insgesamt 7 Klassen von GST bekannt. Sie wurden in Eukaryonten und Prokaryonten nachgewiesen und kommen zum Teil im Cytoplasma, in Mikrosomen und in Mitochondrien vor (Landi, 2000). Die Klassen A (α), M (μ), P (π), T (θ) und Z (ζ) finden sich im Cytosol (de Bruin, et al., 1999; Eaton und Bammler, 1999).

Alle cytosolischen GST sind aus 2 Untereinheiten aufgebaut. Innerhalb der einzelnen Familien werden neben Homodimeren auch Heterodimere gebildet. Die einzelnen Untereinheiten werden durch arabische Ziffern in historischer Reihenfolge ihrer Charakterisierung bezeichnet. Für die verschiedenen Klassen sind eine Reihe unterschiedlicher Isoenzyme beschrieben, die sich durch ihre Substratspezifität zum Teil deutlich unterscheiden. Auch die Expression der unterschiedlichen Isoenzyme in den Geweben ist nicht gleich, was bisher aber nur zum Teil untersucht ist. So wird z.B. deutlich mehr GST T in normalen humanem Magen- und Colongewebe exprimiert als in Tumorgewebe (deBruin et al., 1999). Allerdings existieren auch Beobachtungen, die von einer Erhöhung der GST-Aktivitäten in Tumorgewebe berichten, so z.B. von Clapper et al. (1991), die eine Erhöhung der GST A Aktivität bei Colonkrebs nachwies.

Ein weitere wichtige Rolle spielt GSH als Antioxidans. Es kann über Glutathionperoxidase (GPX) katalysiert mit H_2O_2 bzw. anderen freien Hydroperoxiden, z.B. Lipidhydroperoxiden (LOOH) reagieren. Dabei wird es zu GSSG oxidiert (Abbildung 20). (Halliwell und Gutteridge, 1999; Chaudière und Ferrari-Iliou, 1999)

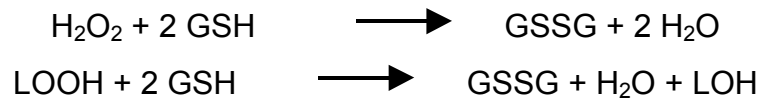


Abb. 20 Glutathionperoxidase (GPX) katalysierte Reaktionen

Die Rückführung von GSSG in die reduzierte Form geschieht über die GSR-vermittelte Reaktion (Abbildung 19).

GSH kann auch direkt mit Radikalen reagieren. Durch Abstraktion eines Wasserstoffatoms kommt es zur Bildung eines Thiolradikals. Die Zusammenlagerung zweier dieser Radikale führt zu oxidiertem Glutathion (Kelly 1999). Die Thiolradikale können jedoch auch mit anderen zellulären Molekülen reagieren, was auch die Fähigkeit des Glutathions erklärt unter bestimmten Bedingungen als Prooxidans zu fungieren und sogar mutagene Eigenschaften zu entfalten (Younes, 1994). Unter physiologischen Bedingungen überwiegt jedoch die Funktion des Glutathions als Radikalfänger. GSH ist in viele zelluläre Prozesse involviert, z.B. Regeneration von Dehydroascorbinsäure zu Ascorbinsäure, die Zell-Zell-Kommunikation oder den intrazellulären Kupfer-Transport (Barhoumi et al., 1993).

2.5.5 Oxidative DNA-Modifikationen

Infolge von oxidativem Streß kann es zu einer Vielzahl von Schäden an Biomolekülen wie Proteinen, Fetten und DNA kommen (Halliwell und Gutteridge, 1999).

Als eine der Quellen von oxidativem Streß kommt die Reduktion von molekularem Sauerstoff zu Wasser innerhalb der Zellatmung in Betracht. In Abbildung 21 sind die vier Reaktionsschritte dargestellt, die zur Reduktion von Sauerstoff über Superoxidationradikal (1), Wasserstoffperoxid (2) und Hydroxylradikal (3) zu Wasser (4) führen.

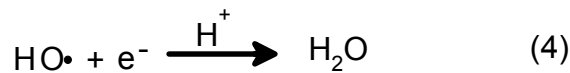
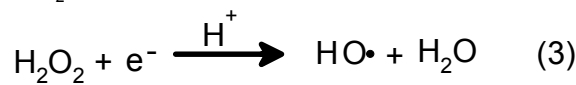
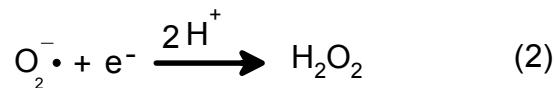


Abb. 21 Reduktion von Sauerstoff zu Wasser (nach Kelly et al., 1998)

Man geht davon aus, daß 1 - 5 % der bei der Zellatmung gebildeten reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) aus dem Elektronentransport der Atmungskette ausscheren und zu zellulären Schäden führen können.

ROS können aber auch bei der Zersetzung von Hydroperoxiden unter Anwesenheit von Schwermetallionen und durch Enzyme (z.B. Bildung von Superoxidradikalanionen $\text{O}_2^{\cdot-}$) gebildet werden. Zu den Enzymen, die Superoxidradikalanionen generieren, gehören Diaminoxidase, Tryptophan-Dioxygenase und Cytochrom-P450-Reduktase. Aus Wasserstoffperoxid, das durch Guanylatcyclase und Glucoseoxidase generiert werden kann, kann im Rahmen der Fenton-Reaktion ein Hydroxylradikal und ein Hydroxid entstehen.

Neben intrazellulären Vorgängen kommen auch Fremdstoffe als Ursachen für oxidativen Streß in Betracht. Fremdstoffe können durch Redoxcycling zur Produktion von ROS beitragen, was z.B. für Chinone bekannt ist, die in den mitochondrialen Elektronentransport eingreifen, oder aber auch Enzyme inhibieren, die als Antioxidantien fungieren oder Radikalfänger depletieren. (Bolton et al., 2000; Kelly et al., 1998) In Abbildung 22 sind die Reaktionsschritte, die zur Detoxifizierung von Superoxidradikalanionen beitragen, und die Funktion der verschiedenen Enzyme, deren Hemmung weitreichende Folgen für den oxidativen Status haben, dargestellt.

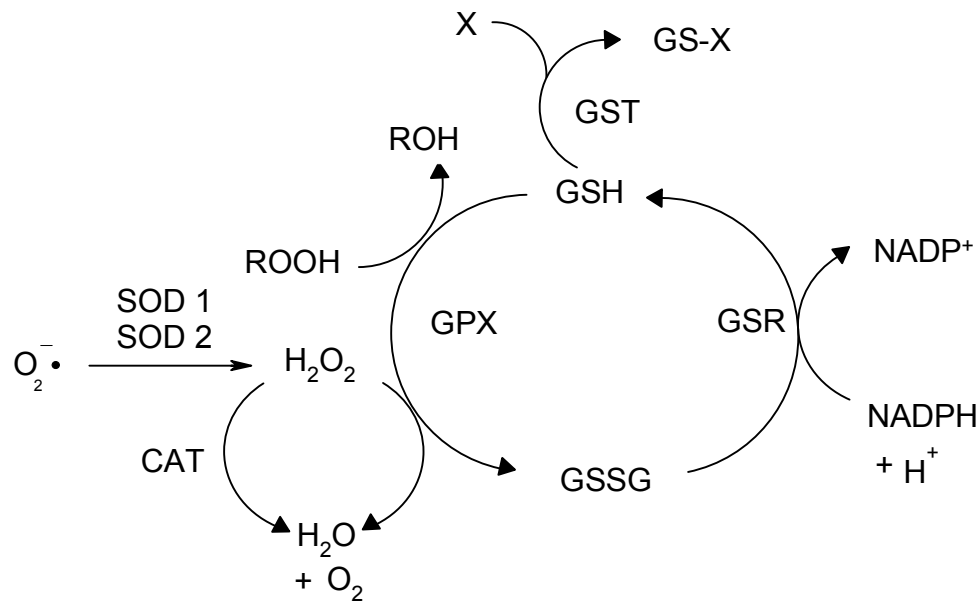


Abb. 22 Antioxidansmetabolismus (modifiziert nach Bravard et al., 1994)

Superoxiddismutasen (SOD 1 und SOD 2) katalysieren die Reaktion des Superoxidradikalanions zu Wasserstoffperoxid. Dieses kann über die Katalase (CAT) oder über die Glutathionperoxidase (GPX) zu Wasser und Sauerstoff umgesetzt werden. Beim Weg über GPX wird Glutathion oxidiert. GPX kann auch Monohydroperoxide zu den entsprechenden Alkoholen reduzieren. Das oxidierte Glutathion (GSSG) wird über die Glutathionreduktase (GSR) reduziert, wobei NADPH als Cofaktor wirkt. GSH kann auch (siehe 2.5.4) direkt oder enzymatisch vermittelt mit elektrophilen Fremdstoffen (X) reagieren und die entsprechenden Glutathionaddukte bilden. (Bravard et al., 1994)

Kommt es infolge einer der oben genannten Reaktionen zur Induktion von oxidativem Streß, so stellt die DNA einen toxikologisch besonders relevanten Angriffspunkt dar. Die Möglichkeiten zur DNA-Modifikation durch ROS sind vielfältig. Die am häufigsten untersuchte Modifikation ist die Hydroxylierung von Guanin durch Hydroxylradikale zum 8-Hydroxyguanin, bzw. die Bildung der ringgeöffneten Variante 2,6-Diamino-4-Hydroxy-5-Formamidopyrimidin (FAPyG), siehe Abbildung 23. (Jaruga und Dizdaroglu, 1996; Dizdaroglu et al., 1991; Calderòn-Garcidueñas et al., 1999; Kasai, 1997; Halliwell und Gutteridge, 1999; Foksinski et al., 1999)

Auch für andere DNA-Basen sind ROS bedingte Veränderungen beschrieben. Häufig werden Veränderungen an Adenin beobachtet, die zur Bildung von 4,6-Diamino-5-formamidopyrimidin (FAPyA) und 8-Hydroxyadenin führen, siehe Abbildung 24 (Dizdaroglu et al., 1991; Jaruga und Dizdaroglu, 1996; Termini, 2000).

Bei 8-Hydroxyguanin und FAPyG, die mit Hilfe des Enzyms Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase (FPG) detektiert werden können, und FAPyA, das mit Hilfe des Enzyms Endonuklease III (Endo III) nachgewiesen werden kann, handelt es sich um die drei häufigsten Basenmodifikationen, die im Anschluß an eine Induktion von oxidativen Streß detektiert werden.

Mögliche Konsequenzen von oxidativem Streß können Mutationen sein. So führt die Bildung von 8-Hydroxyguanin aufgrund der Ausbildung von Wasserstoffbrücken zu Fehlpaarungen mit Adenin, die GC zu TA Transversionen auslösen. Das Entstehen von 8-Hydroxyadenin führt in geringen Umfang zu Fehlpaarungen mit Guanin. Die beiden ringgeöffneten Vertreter, FAPyG und FAPyA, blockieren die DNA-Replikation. (Halliwell und Gutteridge, 1999; Calderón-Garcidueñas et al., 1999)

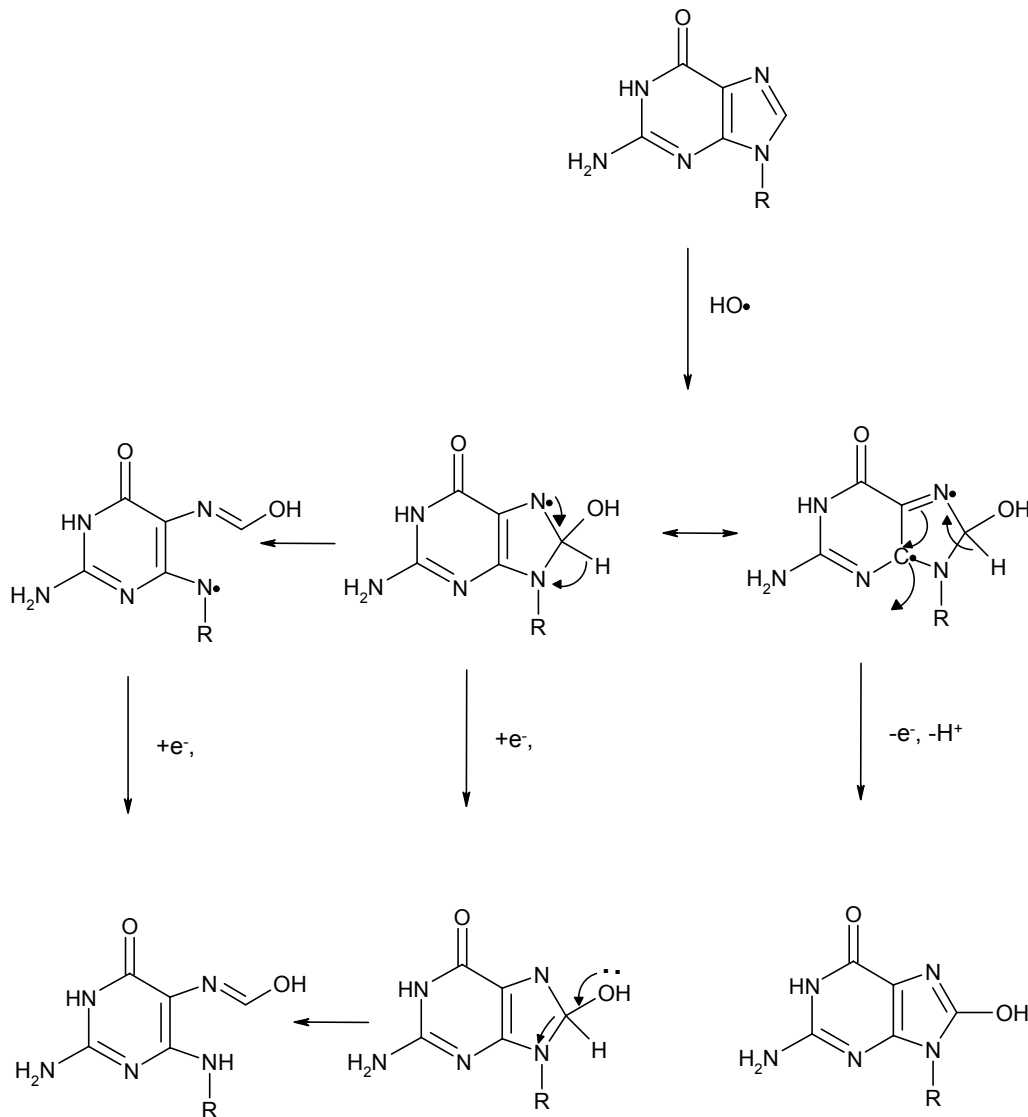


Abb. 23 Modifikation von Guanin durch ein Hydroxylradikal (nach Breen and Murphy, 1995)



Abb. 24 Strukturen von 4,6-Diamino-5-formamidopyrimidin (FAPyA) und 8-Hydroxyadenin (Haliwell und Gutteridge, 1999)

Innerhalb der Zellen gibt es jedoch auch eine Anzahl verschiedener Reparaturmechanismen, die zur Beseitigung von oxidativen DNA-Modifikationen führen, wie die Basen-Excisions-Reparatur und die Nukleotid-Excisions-Reparatur. In *Escherichia coli* konnten spezifische Enzyme detektiert werden, die eine Großzahl der möglichen oxidierten DNA-Basen reparieren. Dabei handelt es sich um die Enzyme Endo III und FPG. Das Enzym Endo III detektiert spezifisch oxidierte Pyrimidinbasen und das Enzym FPG spezifisch oxidierte Purinbasen. In anderen Organismen und in humanen Geweben wurden entsprechende Enzyme gefunden. (Jaruga und Dizdaroglu, 1996; Salles et al., 1999; Doetsch et al., 1987)

Der Nachweis oxidativer DNA-Modifikationen kann mit verschiedenen Methoden erfolgen, z.B. über HPLC mit elektrochemischem (EC) oder UV-Detektor, GC-MS oder immunchemisch. Im modifiziertem Comet-Assay werden durch Einsatz der Enzyme FPG oder Endo III spezifisch oxidierte Basen ausgeschnitten, dies wird als zusätzlicher oxidativer DNA-Schaden quantifiziert (FPG- oder Endo III sensitive sites) (Foksinski et al., 1999; Kasai, 1997; Calderón-Garcidueñas et al., 1999; Collins et al., 1996; Dizdaroglu et al., 1991; Gedik et al., 1998).

Der Comet-Assay stellt im Vergleich zur HPLC/EC-Methode die sensitivere, schnellere und kostengünstigere Methode dar (ILSI, 2000). So liegen die im Comet-Assay mittels FPG-Behandlung detektierten Strangbrüche bei $0,25 \text{ pro } 10^9$ Dalton DNA, die durch die HPLC-EC-Methode bestimmten Grundgehalte an 8-Hydroxyguanin pro 10^9 Dalton DNA zwischen 1,3 und 76. (Collins et al., 1996; Foksinski et al., 1999). Ein weiterer Vorteil des Comet-Assays liegt in der Tatsache, daß bei der Durchführung des Tests keine Isolierung der DNA notwendig ist und somit eine artifizielle Oxidation während der Aufarbeitung im Gegensatz zu anderen Testmethoden nahezu ausgeschlossen werden kann.

2.5.6 Apoptose

Apoptose, ein Begriff der von Kerr et al. (1972) zum ersten Mal verwendet wurde, steht für „programmierter Zelltod“, der die häufigste Form von Zelltod im Organismus darstellt. Die Apoptose wird von physiologischen oder abnormalen Prozessen gesteuert, während die Nekrose, der nicht-physiologische Zelltod, infolge extremer toxischer Belastung oder massiver Zellverletzung auftritt. (Guerrero und Arias, 1998; Krammer, 1996)

Die Apoptose hat eine wichtige Funktion innerhalb der normalen Entwicklung der Gewebe, deren Formen und der Zellerneuerung (Fawthrop et al., 1991). Neben ihrer Bedeutung in der Embryonalentwicklung spielt die Apoptose auch in den Körperzellen des Erwachsenen eine bedeutende Rolle. Als Beispiele sind Homöostase von Organen, das Abschilfern der Darmschleimhaut, die Rückbildung des Brustgewebes nach dem Stillen oder die Funktion innerhalb des Immunsystems zu nennen. (Orrenius, 1996)

Der Vorgang der Apoptose läßt sich anhand einer Reihe morphologischer Veränderungen erfassen. Dazu gehören die Zellschrumpfung, die Kondensation und Umordnung des Chromatins und der Zerfall der Zellen zu apoptotischen Körperchen. Die Plasmamembran bleibt bis zur Phagocytose erhalten, der apoptotische Zelltod ist in der Regel nicht mit einer Entzündung verbunden. (Orrenius, 1996)

Neben den morphologischen Veränderungen treten bei der Apoptose eine große Anzahl komplexer biochemischer Veränderungen auf (Schwartzman und Cidlowski, 1993). Die Apoptose kann über unterschiedliche Mediatoren, welche unterschiedlichen Gruppen zugeordnet werden können, induziert werden. Hier werden Plasmamembran-Rezeptoren, Auslöser von Stress, Stoffe, die den Calciumhaushalt beeinflussen, und Substanzen, die zu DNA-Schäden führen, diskutiert. (Guerrero und Arias, 1998)

Das bedeutendste biochemische Merkmal für Apoptose ist das Auftreten internukleosomaler DNA-Fragmente, die 180 - 200 Basenpaare groß sind. Diese Fragmente erzeugen in einer konventionellen Gelelektrophorese eine typische DNA-Leiter. (Wyllie et al., 1980) Die DNA-Fragmentierung ist ein Phänomen, welches zu einem frühen Zeitpunkt innerhalb des apoptotischen Prozesses auftritt, DNA-Fragmente können schon ab 2 Stunden nach Induktion der Apoptose beobachtet werden (Schwartzman und Cidlowski, 1993). Das Auftreten der internukleosomalen DNA-

Fragmente resultiert aus der Aktivierung einer oder mehrere Endonukleasen, welche die DNA in Linkersequenzen schneidet (Fawthrop et al., 1991).

Nachweismöglichkeiten für die Induktion von Apoptose sind die Bestimmung unterschiedlicher biochemischer Parameter mit Hilfe von Schnelltests (z.B. Caspase-Test, FAS-Elisa-Kit), elektrophoretische Methoden zur Auftrennung der DNA Fragmente, sowie die Durchflußcytometrie. Die Durchflußcytometrie bietet die Möglichkeit, mehrere Merkmale apoptotischer Zellen, z.B. den DNA- und Proteingehalt gleichzeitig zu bestimmen. Bei der Behandlung mit Kernisolationslösung treten aus apoptotischen Zellen die typischen DNA-Fragmente zum Teil aus den Zellen aus. Apoptotische Zellen weisen daher im Vergleich zu nicht apoptotischen Zellen geringere DNA-Gehalte auf, die man in der Darstellung der durchflußcytometrischen Ergebnisse als 1-Parameter-Histogramm (Abbildung 25) als sogenannten Sub-G₁-Peak erkennen kann. (Umansky et al., 1981, Nicoletti et al., 1991, Elstein et al., 1995, Elstein und Zucker, 1995)

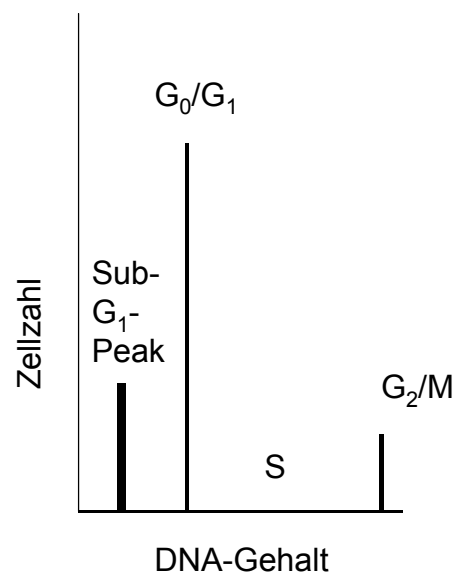


Abb. 25 Schematische Darstellung eines 1-Parameter-Histogramms; die Bezeichnungen G₀/G₁, S und G₂/M stehen für die unterschiedlichen Phasen des Zellzykluses, die sich bezüglich des zellulären DNA-Gehaltes unterscheiden

DNA- und Protein-Gehalte können mit Hilfe der Durchflußcytometrie gleichzeitig mittels differentieller Färbung mit DAPI und Sulforhodamin101 erfaßt werden. Der Proteingehalt apoptotischer Zellen ist wie der DNA-Gehalt im Vergleich zu nicht apoptotischen Zellen verringert. (Darzynkiewicz et al., 1992) Bei nekrotischen Zellen

zeigt sich ein verminderter Proteingehalt bei einem fast „normalen“ DNA-Gehalt. Ein großer Anteil des Proteins geht schnell bei der Zerstörung der Plasmamembran verloren, die DNA bleibt jedoch erhalten. Aufgrund dessen wird eine Unterscheidung apoptotischer und nekrotischer Zellen ermöglicht.

3. Problemstellung

α,β -Ungesättigte Carbonylverbindungen kommen zum Teil in relativ großen Mengen natürlich in Lebensmitteln vor (z.B. HEX, CA, HMF). Auch werden sie als Aromastoffe Lebensmitteln zugesetzt (z.B. HEX, OCTE, NONE, NONDI, HEXDI, CA) und/oder wurden als Kontaminanten in Lebensmittel nachgewiesen (z.B. HMF, CHX). Vor allem die Reaktivität der Verbindungen mit zellulären Nukleophilen wie Peptiden, Proteinen, Enzymen, RNA und DNA ist im Hinblick auf eine mögliche toxische Relevanz von Interesse. Als Konsequenzen dieser Reaktionen können cytotoxische, gentoxische oder mutagene Wirkungen induziert werden.

Bereits vorliegende Studien, die sich mit der Toxizität dieser Verbindungsklasse befassen, erlauben keinen umfassenden Überblick. Die meisten dieser Arbeiten wurden *in-vitro* an Zellen oder in Form von zellfreien Modell-Experimenten durchgeführt. In den Studien wurden unterschiedliche Testsysteme eingesetzt und in der Regel keine Dosis-Wirkungskurven erstellt (Benamira und Marnett, 1992; Canonero et al., 1990; Chung et al., 1988; Curvall et al., 1984; Dittberner et al. 1995; Eder et al., 1992; Eisenbrand et al., 1995; Gölzer et al., 1996; Jørgensen et al., 1992; Kaneko et al., 1988; Marnett et al., 1985). Ein Vergleich des toxischen Wirkpotentials einzelner Vertreter dieser Substanzklasse ist aufgrund mangelnder Daten schwierig bzw. nicht möglich.

Ziel dieser Arbeit war es, das toxische Potential der Verbindungen HEX, OCTE, NONE, HEXDI, NONDI, CA und CHX *in-vitro* zu erfassen und vergleichend zu diskutieren. Die Verbindungen wurden anhand mehrerer Gesichtspunkte ausgewählt. Ein Teil der Verbindungen besitzt aufgrund des weit verbreiteten Vorkommens und relativ hoher Gehalte in Lebensmitteln eine Relevanz (z.B. HEX, CA, CHX); für andere Vertreter lagen kaum Daten zum toxischen Potential vor (z.B. CHX, NONDI). Weiterhin von Interesse waren mögliche Struktur-Wirkungsbeziehungen die durch Vergleich einzelner Verbindungen (HEX, OCTE, NONE; HEX, CHX; HEX, HEXDI; NONE, NONDI) aufgezeigt werden sollten.

HEX, die Substanz für die die meisten *in-vitro* Daten verfügbar waren und zum Teil auch *in-vivo* Ergebnisse vorlagen, wurde als Referenzsubstanz in alle Untersuchungen einbezogen. HMF, eine Verbindung, die strukturelle Ähnlichkeiten zu den 2-Alkenalen aufweist, wurde nur in einigen Testsystemen untersucht, mit dem Ziel bereits in AG Eisenbrand erhaltene Ergebnisse (Samimi, 1999) zu ergänzen.

Eingesetzt wurde ein Spektrum von *in-vitro* Testsystemen mit denen Aussagen zur Gentoxizität/Mutagenität der Verbindungen erhalten werden sollten, ergänzt durch Daten zur Cytotoxizität/Wachstumshemmung und zur Auswirkung auf den zellulären Glutathionspiegel.

Erste Hinweise auf das cytotoxische Potential der Verbindungen sollten Untersuchungen zur Membranintegrität der Zellen mittels Trypanblau-Test liefern. Zur Quantifizierung der Wachstumshemmung wurde der Sulforhodamin-B-Test eingesetzt. Beide Methoden werden standardmäßig bei der toxikologischen Prüfung von Fremdstoffen verwendet. Die cytotoxische Wirkung der Verbindungen ist auch für andere Tests von Bedeutung. So kann es beim Nachweis von DNA-Schäden durch starke cytotoxische Wirkungen zu einem Anstieg von Strangbrüchen kommen. Bei Bestimmung des Gesamtglutathiongehaltes können Schäden an der Membran durch einen vermehrten Austritt an Glutathion eine substanzbedingte Depletion vortäuschen. Daher wurden Zellinkubate mit Viabilitäten von < 75 % in der Regel nicht weiter berücksichtigt.

Veränderungen an der DNA können weitreichende Folgen haben. Daher wurden zwei Methoden ausgewählt um die gentoxische Wirkung der Verbindungen zu ermitteln. Einige Vertreter sollten im UMU-Test an Bakterien untersucht werden, einem Screeningtest, der die Induktion der SOS-Reparaturenzymkaskade zur Quantifizierung der gentoxischen Wirkung nutzt. Umfassender sollte die Induktion von DNA-Schäden in Säugerzellen mittels Einzelzell-Gelelektrophorese (Comet-Assay) erfaßt werden. Hierbei handelt es sich um ein relativ neues Verfahren, das DNA-Strangbrüche in einzelnen Zellen sensitiv quantifiziert. Da sich DNA-Schäden als Mutationen manifestieren können, sollte die mutagene Wirkung einiger Vertreter α,β -ungesättigter Carbonylverbindungen im HPRT-Test an V79 Zellen geprüft werden.

Glutathion (GSH), ein bedeutendes zelluläres Nukleophil, besitzt eine wichtige Funktion im Fremdstoffmetabolismus und in der Aufrechterhaltung des Redox-Gleichgewichtes. Substanzbedingte Veränderungen des Gesamtglutathiongehaltes (tGSH) können mit Hilfe eines empfindlichen photometrischen Assays verfolgt werden. Als mögliche Konsequenz der GSH-Depletion ist das Auftreten oxidativer DNA-Modifikationen denkbar. Dies sollte in einem modifiziertem Comet-Assay, mit dem man spezifisch oxidierte Purine erfaßt, geprüft werden.

Die Untersuchungen sollten in erster Linie in Säugerzellen durchgeführt werden: V79 Zellen, eine Zelllinie des Chinesischen Hamsters, eignen sich aufgrund ihrer geringen metabolischen Aktivität, ihrer einfachen Kultivierung und ihres schnellen Wachstums. Caco-2 Zellen, eine humane Adenokarzinomzelllinie, die häufig in Resorptionsstudien verwendet wird, besitzt Eigenschaften, die denen von Dünndarm und Colon sehr nahe kommen. Somit sind sie als Modell für die Prüfung von Stoffen, die mit der Nahrung aufgenommen werden, geeignet. Außerdem wurden Untersuchungen an humanen primären Colonzellen durchgeführt, die aus Biopsieproben isoliert wurden. Darmtumore (Dickdarm und Mastdarm) stellen bei Frauen die zweithäufigste und bei Männern die dritthäufigste Krebserkrankung dar (Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland, 1999).

4. Ergebnisse und erste Diskussion

4.1 Wachstumshemmung und Cytotoxizität

Untersuchungen zur Wachstumshemmung und zur Cytotoxizität wurden für alle in Tabelle 1 (siehe Kapitel 1.1.1) aufgeführten 2-Alkenale und CHX durchgeführt. Die Wachstumshemmung und die cytotoxische Wirkung wurde an V79 Zellen quantifiziert. Zum besseren Vergleich der Verbindungen wurde für die cytotoxische Wirkung der LC_{50} -Wert und für die wachstumshemmende Wirkung der IC_{50} -Wert berechnet.

4.1.1 Wachstumshemmung (Sulforhodamin-B-Test)

4.1.1.1 Homologe 2-Alkenale

Die Ergebnisse der wachstumshemmenden Wirkung der homologen 2-Alkenale (*E*-2-Hexenal (HEX), (*E*-2-Octenal (OCTE) und (*E*-2-Nonenal (NONE) sind gemeinsam in Abbildung 26 dargestellt. Bei OCTE war eine wachstumshemmende Wirkung schon bei sehr geringen Konzentrationen zu beobachten. Bei einer Konzentration von 5 μ M waren annähernd 50 % der Zellen in ihrem Wachstum gehemmt. Konzentrationen ≥ 15 μ M ließen kaum noch Wachstum zu. HEX und NONE waren in ihrer Wirkung nahezu identisch und im Vergleich zu OCTE schwächer wirksam. Sie verursachten bei einer Konzentration von 20 μ M eine Wachstumshemmung von nahezu 85 %.

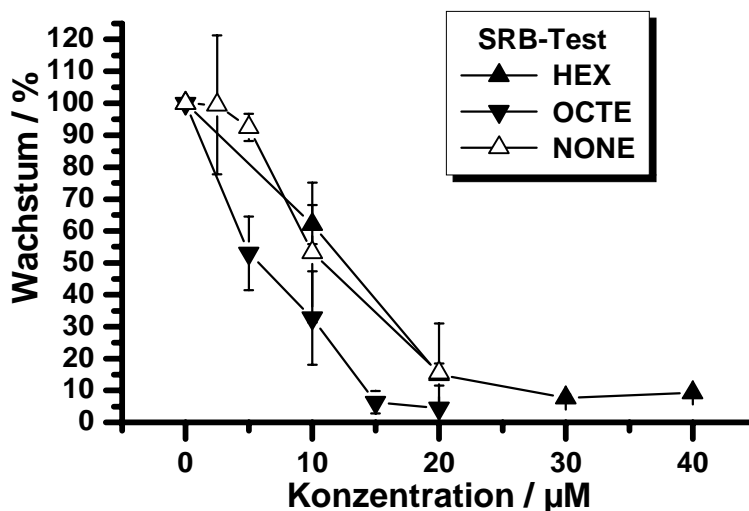


Abb. 26 SRB-Test an V79 Zellen, 24 h Inkubation mit HEX $n = 3$; OCTE $n = 3$ bzw. $n = 4$ für 0 und 10 μM ; NONE $n = 4$ bzw. $n = 3$ für 5 μM

4.1.1.2 Weitere ungesättigte Aldehyde

Die Verbindungen (2*E*,4*E*)-2,4-Hexadienal (HEXDI), (2*E*,6*Z*)-2,6-Nonadienal (NONDI) und Zimtaldehyd (CA) wurden ebenfalls auf ihre wachstumshemmende Wirkung untersucht. Die Ergebnisse der SRB-Tests sind in Abbildung 27 dargestellt. HEXDI unterscheidet sich von HEX durch eine zusätzliche konjugierte Doppelbindung. NONDI dagegen enthält im Vergleich zu NONE eine zusätzliche isolierte Doppelbindung. Die Wachstumshemmung trat bei Behandlung mit HEXDI sehr frühzeitig auf. Schon bei einer Konzentration von 5 μM betrug die Zellzahl nur noch ein Drittel der Kontrolle. NONDI war mit seiner Wirkung nahezu identisch mit HEXDI. Wurden die Zellen mit CA inkubiert, so war eine im Vergleich zu HEXDI und NONDI schwächere Wirkung zu beobachten. Eine vollständige Wachstumshemmung wurde erst bei 1,5fach höherer Konzentration (30 μM) detektiert.

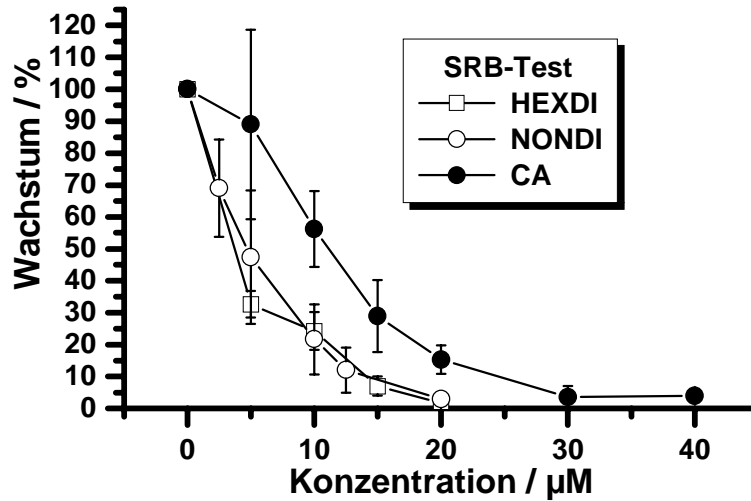


Abb. 27 SRB-Test an V79 Zellen, 24 h Inkubation mit HEXDI $n = 3$ bzw. $n = 4$ für 0 und $10 \mu\text{M}$; NONDI $n = 5$ bzw. $n = 3$ für $10 \mu\text{M}$ und $n = 2$ für $12,5$ und $20 \mu\text{M}$; CA $n = 4$ bzw. $n = 3$ für $20 \mu\text{M}$ und $n = 2$ für $5, 30, 40 \mu\text{M}$

4.1.1.3 2-Cyclohexen-1-on (CHX)

Bei CHX (Abbildung 28) führte die geringste untersuchte Konzentration ($5 \mu\text{M}$) noch zu keiner Inhibierung des Zellwachstums. Bei höheren Konzentrationen wurde eine konzentrationsabhängige Reduzierung des Wachstums festgestellt.

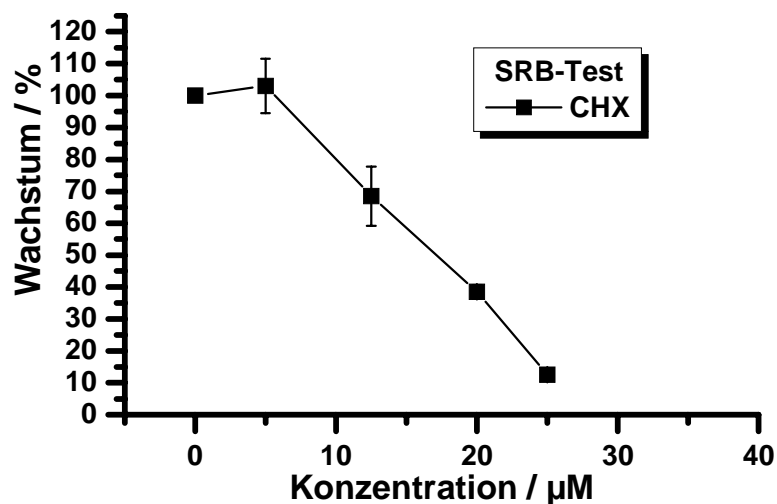


Abb. 28 SRB-Test an V79 Zellen, 24 h Inkubation mit CHX $n = 4$ bzw. $n = 3$ für $5 \mu\text{M}$ und $n = 2$ für $20 \mu\text{M}$

4.1.1.8 Diskussion der Ergebnisse des SRB-Tests

Um die wachstumshemmende Wirksamkeit der Verbindungen zu vergleichen, eignet sich die Betrachtung des IC₅₀-Wertes (Tabelle 9), der über eine log-probit Transformation berechnet wurde.

Tab. 9 IC₅₀-Werte der untersuchten α,β -ungesättigten Carbonylverbindungen, ermittelt nach 24 h Inkubation der Substanzen in V79 Zellen mittels SRB-Test

Substanz	IC ₅₀ */ μM	n**
HEX	11,2 \pm 1,0	3
OCTE	5,8 \pm 1,5	3
NONE	9,1 \pm 1,2	3
HEXDI	4,1 \pm 0,4	3
NONDI	5,2 \pm 1,4	4
CA	10,2 \pm 1,6	4
CHX	15,0 \pm 2,0	4
HMF***	6,4 x 10 ³ \pm 2,0 x 10 ³	5

* Mittelwert \pm SD bzw. Spannweite (n = 2)

** Anzahl unabhängiger Experimente

*** Janzowski et al. (2000a)

Man erkennt, daß die IC₅₀-Werte aller untersuchten 2-Alkenale und CHX im unteren mikromolaren Bereich liegen. HEXDI zeigt den geringsten IC₅₀-Wert gefolgt von NONDI und OCTE. NONE, HEX und CA folgen mit leicht schwächerer Wirkung. CHX ist nahezu um den Faktor 4 schwächer wirksam als HEXDI. HMF stellt eine Ausnahme dar, es hat eine um den Faktor 500 - 1600 schwächere Wirkung als die übrigen untersuchten Verbindungen. Canonero et al. (1990) beschreiben eine deutliche Zunahme der Cytotoxizität in Reihe der einfach ungesättigten 2-Alkenale nach einstündiger Inkubation in V79 Zellen. Kaneko et al. (1988) beobachteten diesen Effekt bei Bestimmung der Wachstumsverhalten von humanen Endothelzellen

nach dreistündiger Inkubation und anschließender Nachwachszeit. Die Steigerung der wachstumshemmenden Wirkung mit zunehmender Kettenlänge konnte im SRB-Test an V79 Zellen nicht beobachtet werden. Die Einführung einer konjugierten Doppelbindung führt beim Vergleich zwischen HEX und HEXDI zu einem Anstieg der toxischen Wirkung (Faktor 3). Eine ähnliche Steigerung der cytotoxischen Wirkung wurde ebenfalls in der Arbeit von Canonero et al. (1990) für diese beiden Verbindungen nach einstündiger Inkubation nachgewiesen.

4.1.2 Cytotoxizität (Trypanblau-Ausschluß)

Um die cytotoxische Wirkung der α,β -ungesättigten Carbonylverbindungen zu erfassen, wurden die Verbindungen für 1 h mit V79 Zellen inkubiert. Dabei wurden die gleichen Bedingungen gewählt wie auch später bei Bestimmung der Induktion von DNA-Schäden (Kapitel 4.3) und des zellulären Glutathionspiegels (Kapitel 4.4). Die aus den Konzentration-Wirkungskurven über log-probit Transformation berechnete Konzentrationen, bei der 50 % der Zellen abgestorben sind (LC_{50} -Wert), sind für die untersuchten Verbindungen in Tabelle 10 dargestellt. Die hier untersuchten α,β -ungesättigten Carbonylverbindungen variieren in ihrer Cytotoxizität über einen sehr weiten Konzentrationsbereich. NONDI, die toxischste Verbindung (LC_{50} : 270 μ M), ist um den Faktor 18 stärker wirksam als CHX. Die cytotoxische Wirkung nimmt in der Reihe der homologen 2-Alkenale mit zunehmender Kettenlänge deutlich zu. Die Einführung einer konjugierten Doppelbindung verstärkt den cytotoxischen Effekt, wie man im Vergleich zwischen HEX und HEXDI erkennen kann. Die Einführung einer zweiten isolierten Doppelbindung führt bei NONE und NONDI nicht zu einem Anstieg der cytotoxischen Wirkung.

Tab. 10 Cytotoxizitätsdaten (LC_{50} -Wert) der untersuchten α,β -ungesättigten Carbonylverbindungen nach 1 h Inkubation in V79 Zellen (Trypanblau-Test)

Substanz	$LC_{50}^*/\mu M$	n**
HEX	3666 ± 659	3
OCTE	545 ± 65	2
NONE	271 ± 7	2
HEXDI	705 ± 65	2
NONDI	270 ± 20	2
CA	4450 ± 150	2
CHX	4750 ± 250	2
HMF***	$115 \times 10^3 \pm 4 \times 10^3$	3

* Mittelwert \pm SD bzw. Spannweite (n = 2)

** Anzahl unabhängiger Experimente

*** Janzowski et al. (2000a)

Im Vergleich zu den IC_{50} -Werten (24 h Inkubation) liegen die LC_{50} -Werte der Verbindungen (1 h Inkubation) erwartungsgemäß in einem wesentlich höheren Bereich (\approx Faktor 10). Die stark unterschiedliche Wirksamkeit zwischen HMF und den Alkenalen/CHX bei Bestimmung der Wachstumshemmung (Faktor 426 bis 1600) hat sich bei Bestimmung der Cytotoxizität (Faktor 24 bis 425) verringert. Die von Canonero et al. (1990) beschriebene Zunahme der Cytotoxizität mit zunehmender Kettenlänge innerhalb der Reihe der einfach ungesättigten 2-Alkenale konnte für die hier untersuchten Verbindungen HEX, OCTE und NONE bestätigt werden.

In Caco-2 Zellen wurden nur Konzentrationen getestet, die im Comet-Assay (Kapitel 4.3.2) und bei der Bestimmung des zellulären Glutathionspiegels (Kapitel 4.4.2) eingesetzt wurden. Die nach einstündiger Inkubation beobachteten Effekte waren mit den in V79 Zellen beobachteten Wirkungen vergleichbar. Auch für HMF wurde in Caco-2 Zellen ein LC_{50} -Wert von $118 \times 10^3 \mu M \pm 3 \times 10^3$ (Janzowski et al. 2000a) bestimmt, der nahezu identisch ist mit dem in V79 Zellen.

4.2 Induktion von DNA-Schäden

Auf Induktion von DNA-Schäden wurde mit Hilfe des Comet-Assays getestet. Untersuchungen wurden an V79 und Caco-2 Zellen sowie zum Teil an humanen primären Colonzellen durchgeführt. Ausgewertet wurden die Zellen (Zellkerne) anhand ihrer DNA-Menge im Schweif, der sog. „tail intensity“ (TI), wobei die Zellen mit einem TI < 17 % als ungeschädigt betrachtet wurden. Die Ergebnisse der Substanzen sind als ungeschädigte Zellen gegenüber den Konzentrationen aufgetragen.

In der Regel wurden nur Konzentrationen berücksichtigt, bei denen die Viabilität > 75 % (cytotoxische Grenzkonzentration) betrug. Ansonsten könnte man durch Zelltod bedingte DNA-Schäden nicht ausschließen und somit eine mögliche genotoxische Wirkung nicht beurteilen.

4.2.1 Vorarbeiten

Untersucht wurden mögliche Unterschiede des elektrischen Feldes innerhalb der Elektrophoresekammer. Dazu wurde ein Comet-Assay mit einer spezifischen Substanzkonzentration für alle Objektträger in regelmäßigen Abständen wiederholt. In der folgenden Tabelle 11 sind exemplarisch die Ergebnisse einer Untersuchung an V79 Zellen nach einstündiger Inkubation mit 50 µM Wasserstoffperoxid (H₂O₂) auf Eis dargestellt.

Tab. 11 Elektrophoresekammer-Test, 1 h Inkubation von V79 Zellen mit 50 µM H₂O₂ auf Eis, Numerierung nach Lage in Elektrophoresekammer

Objektträgernummer	Ungeschädigte Zellen/%	Objektträgernummer	Ungeschädigte Zellen/%	Objektträgernummer	Ungeschädigte Zellen/%
11	4,5	6	4,0	1	1,0
12	1,0	7	1,0	2	1,5
13	4,5	8	2,0	3	-
14	6,5	9	2,0	4	2,0
15	3,0	10	1,0	5	3,0

Der Anteil an ungeschädigten Zellen auf den einzelnen Objektträgern ist unabhängig von der Position innerhalb der Elektrophoresekammer und variiert zwischen 1,0 und 6,5 %.

Weiterhin wurde der Einfluß unterschiedlicher Zeiten der Behandlung mit Elektrophoresepuffer (20 oder 40 Minuten) und unterschiedlich lange Elektrophoresezeiten (20 oder 30 Minuten) getestet. In den untersuchten Bedingungen Behandlungszeit Puffer/Elektrophoresedauer (40/30 bzw. 20/20 Minuten) ergaben sich keine deutlichen Unterschiede, so daß die kürzeren Behandlungszeiten für die folgenden Untersuchungen ausgewählt wurden.

4.2.2 DNA-Schäden in V79 Zellen

Nach einstündiger Inkubation mit der jeweiligen Substanz wurde die Viabilität der Zellen bestimmt und anschließend der Comet-Assay durchgeführt (siehe Kapitel 5.2.4.3). Zum besseren Vergleich wurden die Konzentrations-Wirkungskurven analog der IC_{50} - bzw. LC_{50} -Bestimmung einer log-probit Transformation unterzogen und diejenige Konzentration (DC_{50} -Wert) berechnet, bei der 50 % Zellen DNA-Schäden aufweisen, d.h. deren $TI \geq 17$ % ist.

4.2.2.1 Homologe 2-Alkenale

Die Verbindungen (*E*)-2-Hexenal (HEX), (*E*)-2-Octenal (OCTE) und (*E*)-2-Nonenal (NONE) sind gemeinsam in Abbildung 29 dargestellt. Für HEX wurde eine deutliche konzentrationsabhängige Zunahme der DNA-Schäden im nicht cytotoxischen Bereich beobachtet. Die Viabilität der Zellen betrug bei 250 μ M 96 %. Für das längerkettige Analoge OCTE ergab sich eine in Vergleich zu HEX geringere DNA-schädigende Wirkung.

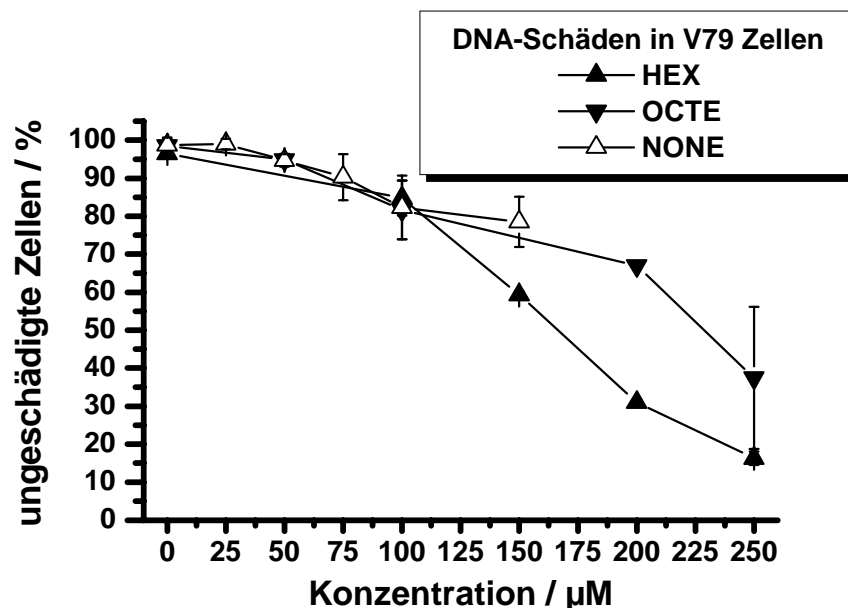


Abb. 29 Induktion von DNA-Schäden in V79 Zellen, erfaßt im Comet-Assay nach einstündiger Inkubation mit HEX, OCTE oder NONE

Bei der Konzentration von 250 μM OCTE betrug die Viabilität nur noch 67 %. Daher ist bei dieser Konzentration nicht auszuschließen, daß ein Teil der beobachteten DNA-Fragmentation eventuell bereits auf cytotoxische Wirkungen zurückzuführen ist. Ein weiterer Anstieg der cytotoxischen Wirkung wurde bei der Inkubation der V79 Zellen mit NONE detektiert. Bei einer Konzentration von 150 μM betrug die Viabilität 83 %. Bei höheren Konzentrationen nahm die Viabilität deutlich ab, so daß eine weitere Durchführung des Comet-Assays unter Standardbedingungen nicht möglich war. Bis zu der höchst eingesetzten Konzentration von 150 μM war nur ein geringfügiger Anstieg an DNA-Schäden zu beobachten, ähnlich wie für OCTE.

4.2.2.2 Weitere ungesättigte Aldehyde

Die Verbindungen (2*E*,4*E*)-2,4-Hexadienal (HEXDI), (2*E*,6*Z*)-2,6-Nonadienal (NONDI) und Zimtaldehyd (CA) sind in Abbildung 30 dargestellt. Für HEXDI traten cytotoxische Wirkungen im Vergleich zu OCTE und NONE erst bei deutlich höheren Konzentrationen auf. Bei 500 μM konnte eine Viabilität von 73 % bestimmt werden. Gleichzeitig waren bei dieser Konzentration auch starke DNA-schädigende Wirkungen zu beobachten. Auch bei NONDI war ein konzentrationsabhängiger Anstieg der DNA-Schäden zu beobachten. Nach Inkubation mit NONDI wiesen bei

einer Konzentration von 150 μM nahezu 80 % der Zellen im Comet-Assay DNA-Schäden auf. Bei dieser Konzentration waren noch 74 % der Zellen viabel. Auch CA verursachte einen konzentrationsabhängigen Anstieg der DNA-Schäden. Die beobachtete DNA-schädigende Wirkung war im Vergleich zu den anderen Verbindungen am schwächsten ausgeprägt. Bei der höchsten eingesetzten Konzentration (500 μM) betrug die Viabilität 73 %.

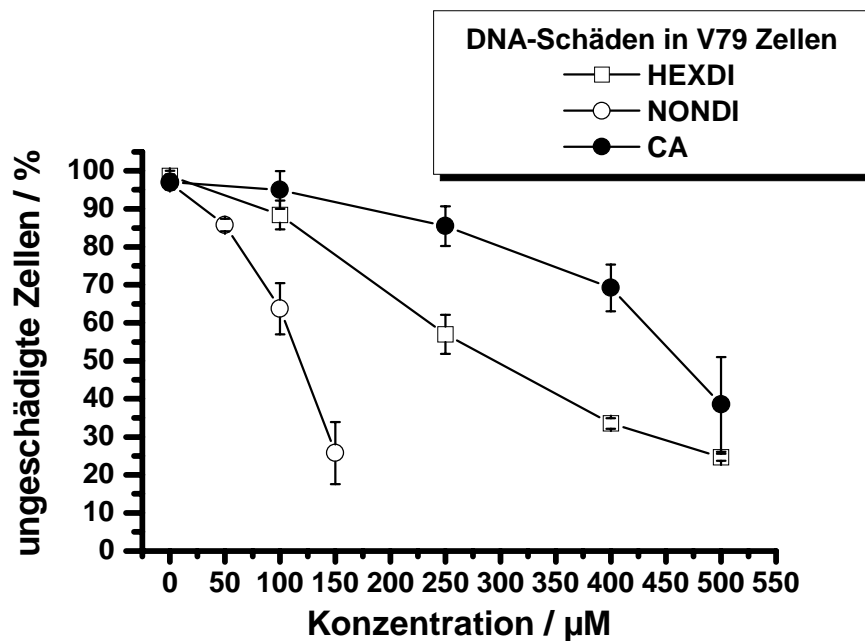


Abb. 30 Induktion von DNA-Schäden in V79 Zellen, erfaßt im Comet-Assay nach einstündiger Inkubation mit HEXDI, NONDI oder CA

4.2.2.3 2-Cyclohexen-1-on (CHX)

Für CHX war auch bei einer Konzentration von 500 μM nahezu keine cytotoxische Wirkung festzustellen, die Viabilität der V79 Zellen lag bei 95 %. Gleichzeitig induzierte CHX deutliche DNA-Schäden in den V79 Zellen (Abbildung 31). CHX wies als einzige der untersuchten Verbindungen einen deutlichen sigmoidalen Kurvenverlauf auf. Zwischen 200 und 300 μM nahmen die DNA-Schäden drastisch zu.

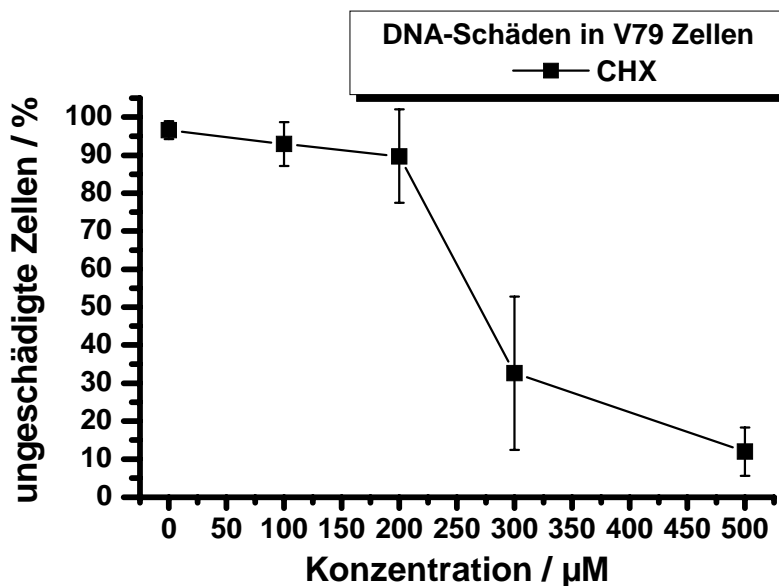


Abb. 31 Induktion von DNA-Schäden in V79 Zellen, erfaßt im Comet-Assay nach einstündiger Inkubation mit CHX

4.2.2.4 Vergleich der Ergebnisse

Zum besseren Vergleich der Verbindungen wurden in Tabelle 12 die DC_{50} -Werte zusammengefaßt. Der DC_{50} -Wert gibt die Konzentration an, bei der die Substanz in 50 % der Zellen DNA-Schäden verursacht, die zu einem Anstieg der TI im Schweif über 17 % führt. Ein deutlicher Effekt der Kettenlänge innerhalb der homologen 2-Alkenale konnte nicht beobachtet werden, HEX ist etwas wirksamer als OCTE. Es konnte jedoch, wie auch schon in Kapitel 4.1.2 berichtet, ein deutlicher Anstieg der cytotoxischen Wirkung mit zunehmender Kettenlänge beobachtet werden. Dieser Effekt führte bei NONE dazu, das die Berechnung eines DC_{50} -Wertes nicht möglich war. Die Einführung einer weiteren konjugierten Doppelbindung (vergleiche HEX mit HEXDI) führte zu einer Verminderung des DNA-schädigenden Potentials. NONDI besaß jedoch die ausgeprägteste gentoxische Wirkung. Die schwächste Wirkung zeigte CA, hier wurde bis zu einer Konzentration von 400 μM nur eine schwache Gentoxizität beobachtet. CHX war ähnlich wirksam wie HEXDI.

Tab. 12 DC₅₀-Werte der untersuchten Verbindungen, die im Comet-Assay in V79 Zellen nach einstündiger Inkubation ermittelt wurden

Substanz	DC ₅₀ */ μM	n**
HEX	165 \pm 23	3
OCTE	191 \pm 30	4
<i>NONE</i>	150***	-
HEXDI	281 \pm 16	3
NONDI	109 \pm 10	3
CA	492 \pm 111	4
CHX	272 \pm 23	3
<i>HMF****</i>	8000***	-

* Mittelwert \pm SD bzw. Spannweite bei n = 2

** Anzahl unabhängiger Experimente

*** höchste unterhalb der Cytotoxizitätsgrenze eingesetzte Konzentration bis zu der nur geringfügige Genotoxizität beobachtet wurde

**** Janzowski et al. (2000a)

4.2.3 DNA-Schäden in Caco-2 Zellen

Die Methodik war bis auf die eingesetzte Zellzahl ($2,5 \times 10^5$ statt $2,0 \times 10^6$) identisch mit den in V79 Zellen durchgeführten Versuchen.

4.2.3.1 Homologe 2-Alkenale

Die Verbindungen HEX, OCTE und NONE sind gemeinsam in Abbildung 32 dargestellt. HEX zeigte in Caco-2 Zellen im Vergleich zu V79 Zellen erst bei höheren Konzentrationen eine gentoxische Wirkung. Im Konzentrationsbereich zwischen 100 und 200 μM nahmen die DNA-Schäden drastisch zu. Die Viabilität betrug bei einer Konzentration 500 μM 86 %. OCTE zeigte in Caco-2 Zellen ebenfalls eine deutliche gentoxische Wirkung. Bei einer Konzentration von 300 μM betrug die Viabilität 78 %. Die DNA-schädigende Wirkung lässt sich mit der von HEX vergleichen. Für OCTE trat in Caco-2 Zellen im Vergleich zu V79 Zellen erst bei höheren Konzentrationen DNA-Schäden auf.

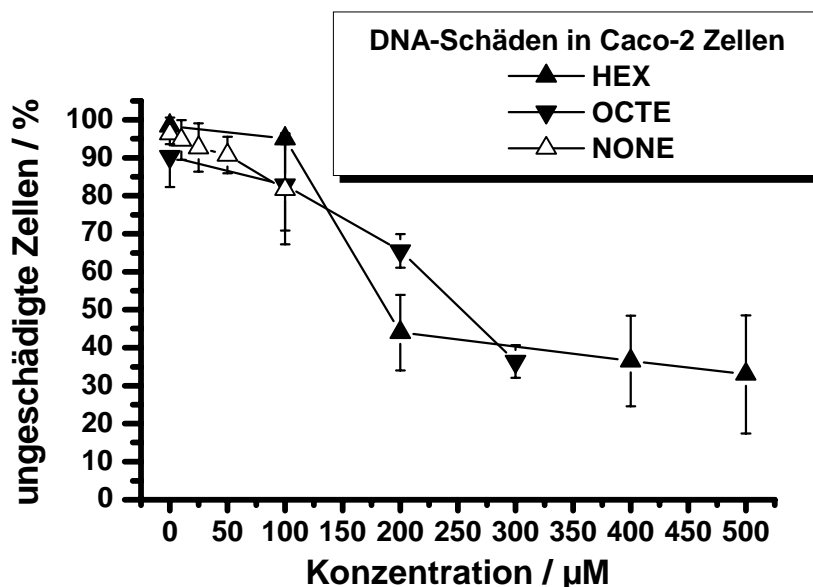


Abb. 32 Induktion von DNA-Schäden in Caco-2 Zellen, erfaßt im Comet-Assay nach einstündiger Inkubation mit HEX, OCTE oder NONE

NONE induzierte auch in Caco-2 Zellen bis zu einer Konzentration von 100 μM nur geringfügige DNA-Schäden. Die Viabilität betrug dabei 87 %. Bei höheren Konzen-

trationen fiel sie jedoch unter 75 %, weshalb diese nicht mehr zur Bestimmung potentiell gentoxischer Wirkungen von NONE verwendet werden konnten.

4.2.3.2 Weitere ungesättigte Aldehyde

Die Ergebnisse der Verbindungen (2*E*,4*E*)-2,4-Hexadienal (HEXDI), (2*E*,6*Z*)-2,6-Nonadienal (NONDI) und Zimtaldehyd (CA) sind in Abbildung 33 zu sehen. Für HEXDI konnte eine starke Zunahme gentoxischer Schäden im nicht cytotoxischen Bereich festgestellt werden. Bei einer Konzentration von 250 μM waren noch 89 % der Zellen viabel, gleichzeitig weisen nur noch ca. 30 % der Zellen keine DNA-Schäden auf. NONDI zeigte auch in Caco-2 Zellen eine starke gentoxische Wirkung. Bis zu einer Konzentration von 100 μM traten kaum DNA-Schäden auf. Bei 150 μM (Viabilität 69 %) wiesen jedoch bereits ca. 60 % der Zellen DNA-Schäden auf.

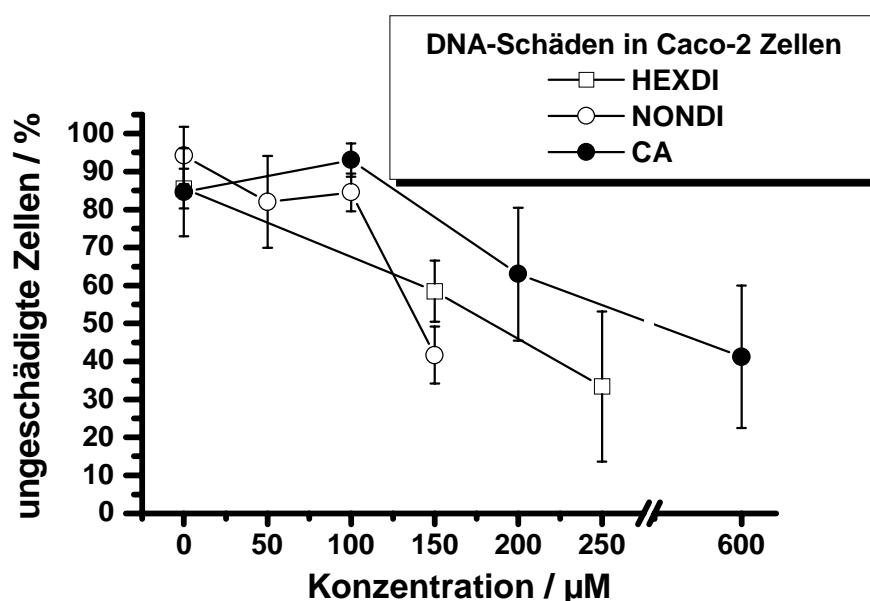


Abb. 33 Induktion von DNA-Schäden in Caco-2 Zellen, erfaßt im Comet-Assay nach einstündiger Inkubation mit HEXDI, NONDI oder CA

CA verursachte in Caco-2 Zellen wie in V79 Zellen erst bei höheren Konzentrationen DNA-Schäden. Ab einer Konzentration von 200 μM war ein deutlicher Anstieg der Schädigung zu beobachten. Bei einer Konzentration von 600 μM betrug die Viabilität 81 %.

4.2.3.3 2-Cyclohexen-1-on (CHX)

Bei der Untersuchung von CHX ergab sich, daß eine eindeutige DNA-schädigende Wirkung in Caco-2 Zellen erst bei höheren Konzentrationen als in V79 Zellen auftrat (Abbildung 34). Bei einer eingesetzten Konzentration von 600 μM waren noch 82 % der Zellen viabel.

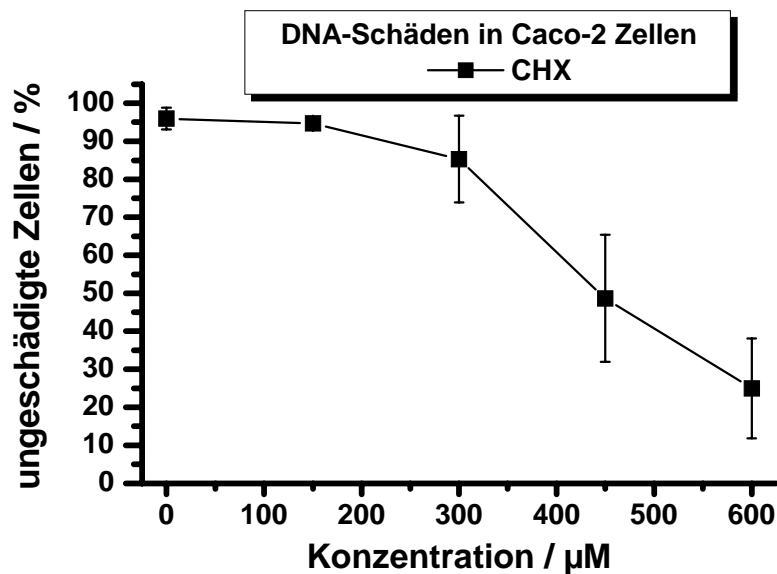


Abb. 34 Induktion von DNA-Schäden in Caco-2 Zellen, erfaßt im Comet-Assay nach einstündiger Inkubation mit CHX

4.2.3.4 Reduzierung der Inkubationszeiten

Für einige Substanzen wurde exemplarisch die Inkubationszeit von 60 auf 30 Minuten reduziert. Dies geschah, um die Diskussion der Ergebnisse zu erleichtern, die bei der Untersuchung von Caco-2 Zellen und primären humanen Colonzellen gewonnen wurden (Kapitel 4.2.4). In Tabelle 13 sind die Ergebnisse einiger Verbindungen dargestellt.

Tab. 13 Reduzierung der Inkubationszeit im Comet-Assay für Caco-2 Zellen von 60 auf 30 Minuten

Substanz (Konzentration)	ungeschädigte Zellen in % nach 30 Minuten Inkubation	ungeschädigte Zellen in % nach 60 Minuten Inkubation
Kontrolle	93	91
HEX (400 µM)	17	21
OCTE (300 µM)	16	5
HEXDI (400 µM)	29	34
CHX (800 µM)	14	1

Man erkennt, daß bereits nach 30 Minuten der überwiegende Anteil der DNA-Schäden auftrat. Bei OCTE und CHX stiegen die DNA-Schäden im Zeitraum zwischen 30 und 60 Minuten noch leicht an, bei den anderen Verbindungen trat keine Veränderung mehr auf.

4.2.3.5 Vergleich der Ergebnisse

Der Vergleich der DC_{50} -Werte der einzelnen Verbindungen (Tabelle 14) zeigt, daß NONDI und HEXDI die stärksten gentoxischsten Wirkungen verursachten. Leicht schwächer wirkten HEX und OCTE. CHX und CA besaßen ein nahezu um den Faktor 4 schwächeres gentoxisches Potential als HEXDI oder NONDI. Für NONE konnte aufgrund der starken cytotoxischen Wirkung kein DC_{50} -Wert berechnet werden. Für HMF konnte ebenfalls kein DC_{50} -Wert berechnet werden, da bis zur cytotoxischen Grenzkonzentration (80 mM) im Comet-Assay keine gentoxischen Effekte nachweisbar waren (Janowski et al., 2000a).

Tab. 14 DC₅₀-Werte der untersuchten Verbindungen, ermittelt im Comet-Assay in Caco-2 Zellen nach einstündiger Inkubation

Substanz	DC ₅₀ */ μ M	n**
HEX	246 \pm 76	3
OCTE	247 \pm 12	2
<i>NONE</i>	100***	-
HEXDI	169 \pm 9	3
NONDI	124 \pm 26	2
CA	538 \pm 127	2
CHX	455 \pm 28	3
<i>HMF****</i>	8000***	-

* Mittelwert \pm SD bzw. Spannweite bei n = 2

** Anzahl unabhängiger Experimente

*** höchste unterhalb der Cytotoxizitätsgrenze eingesetzte Konzentration, bis zu der nur geringfügige Genotoxizität beobachtet wurde

**** Janzowski et al. (2000a)

4.2.4 DNA-Schäden in primären humanen Colonzellen

An primären humanen Colonzellen, isoliert aus Biopsiematerial, wurden ausgewählte Versuche durchgeführt. Da nur wenig Biopsiematerial zu Verfügung stand, wurden nur HEX, NONDI, CHX und HMF in wenigen Konzentrationen untersucht. Im Gegensatz zu den Versuchen an Zelllinien wurden die Zellen nur für 30 Minuten mit Substanz inkubiert, analog der Vorschrift von Pool-Zobel et al. (1999), da mit zunehmender Inkubationszeit die Viabilitäten der Kontrollen abnahmen. Die Ergebnisse des Comet-Assays sind in Abbildung 35 dargestellt. Als Positivkontrolle wurde M-Methyl-N'-nitro-nitrosguanidin (MNNG) mitgeführt. Die Viabilitäten betragen für alle Substanzen bei den eingesetzten Konzentrationen ungefähr 90 %. Die Abbildung veranschaulicht die Verteilung der DNA-Schäden in Schädigungsklassen.

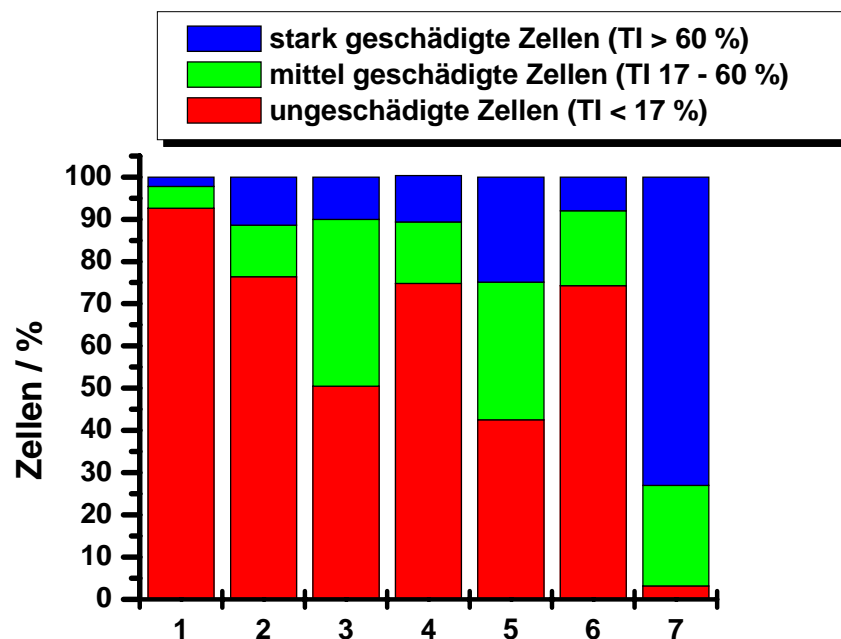


Abb. 35 DNA-Schäden im Comet-Assay an humanen primären Colonzellen nach dreißigminütiger Inkubation

- | | |
|-----------------|-----------------|
| 1: Kontrolle | 5: NONDI 300 µM |
| 2: CHX 800 µM | 6: HMF 80 mM |
| 3: HEX 400 µM | 7: MNNG 33 µM |
| 4: NONDI 200 µM | |

Die Inkubation mit CHX (800 μM), NONDI (200 μM) und HMF (80 mM) führten zu einem leichten Anstieg an DNA-Schäden. Im Vergleich zur Kontrolle wiesen ca. 25 % der Zellen DNA-Schäden auf. HEX (400 μM) und NONDI (300 μM) führten unter den gleichen Versuchsbedingungen in 50 % der Zellen DNA-Schäden. Die Positivprobe MNNG induzierte die meisten DNA-Schäden: Bei einer Konzentration von 33 μM wiesen nur 3 % der Zellen keine DNA-Schäden auf. Auch der Anteil an stark geschädigten Zellen war mit 73 % für MNNG am stärksten ausgeprägt.

DC₅₀-Werte konnten aufgrund der geringen Anzahl an untersuchten Konzentrationen nicht berechnet werden. Für HEX und NONDI ließen sich jedoch nach Abbildung 35 Werte von 400 μM respektive 300 μM abschätzen. NONDI zeigte die stärkste gentoxische Wirkung. HEX war um einen Faktor 4 stärker wirksam als CHX.

4.2.5 Diskussion der Ergebnisse des Comet-Assays

Alle untersuchten α,β -ungesättigten Carbonylverbindungen außer NONE induzieren in den getesteten Zellsystemen konzentrationsabhängig DNA-Schäden. NONE konnte aufgrund starker cytotoxischer Wirkungen nur in einem kleinen Konzentrationsbereich getestet werden, in dem keine bzw. nur geringfügige DNA-Schäden induziert wurden. Für alle Zellsysteme (V79, Caco-2 und primäre humane Colonzellen) lassen sich einige allgemein gültige Aussagen treffen.

NONDI ist in allen getesteten Zellsystemen die Substanz mit der stärksten DNA-schädigenden Wirkung. CA zeigt in allen untersuchten Zelllinien die schwächste DNA-schädigende Wirkung. HEX ist in allen Untersuchungen leicht gentoxischer als OCTE, jedoch um einen Faktor 1,3 - 2,0 weniger gentoxisch als NONDI. Eine Aussage zum Einfluß der Kettenlänge innerhalb der homologen 2-Alkenale bezüglich der DNA-schädigenden Wirkung läßt sich aufgrund der starken cytotoxischen Effekte von NONE nicht treffen. Das gentoxische Potential von CHX ist gegenüber HEX um einen Faktor von ≈ 2 in den Zelllinien und um einen Faktor von ≈ 4 in den humanen Colonzellen verringert.

Vergleicht man die beobachteten Effekte zwischen den unterschiedlichen Zellsystemen, so zeigt sich, daß die α,β -ungesättigten Carbonylverbindungen in V79 Zellen in der Regel schon bei geringeren Konzentrationen DNA-Schäden gleichen Ausmaßes induzieren als in Caco-2 Zellen. HEXDI und CHX stellen eine Ausnahme dar: HEXDI verursacht in Caco-2 Zellen schon bei einer um ein Drittel geringeren Konzentration

DNA-Schäden als dies in V79 Zellen der Fall ist. CHX wirkt in Caco-2 deutlich schwächer als in den V79 Zellen. In primären humanen Colonzellen ist das genotoxische Potential von HEX und NONDI um den Faktor 2 geringer als in den eingesetzten Säugerzelllinien. CHX besitzt eine gegenüber den Zelllinien um Faktor 3-4 verringerte Genotoxizität. Einzige Ausnahme ist HMF, das in den primären humanen Zellen ein leicht genotoxischeres Potential aufweist als in den Säugerzelllinien. Möglicherweise könnte dies daran liegen, daß es sich bei den primären humanen Colonzellen um ein metabolisch kompetenteres Zellsystem handelt, das zur metabolischen Aktivierung von HMF befähigt ist (siehe auch Kapitel 2.3.4).

Die unterschiedliche Empfindlichkeit wird durch verschiedene Parameter bestimmt. So können sich die Zelltypen bezüglich ihrer Ausstattung an entgiftenden Enzymen und in ihrer Kompetenz zur Reparatur von DNA-Schäden unterscheiden. Die Gehalte der Zellen an Glutathion-S-Transferasen (GST), die eine wichtige Rolle beim Fremdstoffmetabolismus der α,β -ungesättigten Carbonylverbindungen innehaben, sind dabei von Bedeutung. Caco-2 Zellen zeigen eine sehr hohe Aktivität von GST (3680 nmol/min/mg Protein; Peters und Roelofs, 1992), für V79 Zellen schwanken die Angaben für GST-Aktivitäten zwischen 60 und 637 nmol/min/mg Protein (Summer und Wiebel, 1981, Medh et al., 1990, Glatt et al., 1990). Für Zellen des humanen Colon sigmoidum liegen keine detaillierte Daten vor. Batist et al. (1988) wiesen für Colonzellen GST-Aktivitäten im Bereich von 26 bis 213 nmol/min/mg Protein nach.

Neben der Gesamtaktivität der GST spielt auch die spezifische Isoenzymausstattung eine wichtige Rolle. Für V79 Zellen sind die GST Isoenzymfamilien A, M, P und T und deren Aktivität beschrieben, es wurden aber keine expliziten Gehalte bestimmt (Swedmark et al., 1992, Summer und Wiebel, 1981, Medh et al., 1990). Caco-2 Zellen besitzen hohe Gehalte an GST P und GST A (38 bzw 3 $\mu\text{g}/\text{mg}$ Protein; Peters und Roelofs, 1992). Der Gehalt an GST A, der aus isolierten Zellen des Colon sigmoidum bestimmt wurde, lag bei 62 ng/ 10^6 Zellen (Pool-Zobel et al., 1999). In den Biopsieproben aus dieser Arbeit entsprachen $1,3 \times 10^6$ Zellen einem mg Protein, so daß man unter der Annahme, daß die von Pool-Zobel et al. (1999) untersuchten Colonzellen ähnliche Werte zeigten, einen GST A Gehalt von 81 ng/mg Protein annehmen kann.

Die höhere Empfindlichkeit der V79 Zellen gegenüber den Caco-2 Zellen, die trotz der höheren eingesetzten Zellzahl beobachtet wurde, könnte somit zum Teil auf die

niedrigere Gesamt-GST-Aktivität der V79 Zellen und die unterschiedliche Isoenzymausstattung an GSTs im Vergleich zu den Caco-2 Zellen zurückführen sein. Die leicht schwächere Wirkung der Substanzen in den primären humanen Colonzellen im Vergleich zu den Caco-2 Zellen läßt sich nicht durch Unterschiede in den GSH/GST Gehalten bzw. der Aktivität erklären.

Vergleicht man die Ergebnisse des Comet-Assays mit denen anderer Arbeiten, bezüglich der DNA-schädigenden Wirkung, so lassen sich große Übereinstimmungen feststellen. Eder et al. (1992) detektierten für HEX ab Konzentrationen von 250 μM DNA-Strangbrüche in der alkalischen Filterelution. Eine Konzentration von 500 μM führte nach einer 30 minütigen Inkubationszeit neben DNA-Strangbrüchen auch zu starken cytotoxischen Wirkungen. OCTE war unter den gleichen Bedingungen leicht schwächer wirksam als HEX, CA zeigte die schwächste Wirkung. Die Induktion von DNA-Schäden durch HEX in Colonzellen des Menschen, die durch Gölzer et al. (1996) untersucht wurden, sind nahezu identisch mit den in dieser Arbeit ermittelten Werten für HEX in humanen Colonzellen. Eisenbrand et al. (1995), die die Wirkung von HEX und den kürzerkettigen Vertretern Acrolein und Crotonaldehyd mittels alkalischer Filterelution in Namalva Zellen untersuchten, detektierten eine 50%ige DNA-Schädigung durch HEX bei einer Konzentration von ca. 350 μM . Aufgrund des anderen Zellsystems (Namalva Zellen) und der größeren Menge an eingesetzten Zellen (20×10^6 Zellen) läßt sich die erniedrigte Sensitivität gegenüber V79 Zellen und Caco-2 Zellen erklären.

Dittberner et al. (1995), die ebenfalls die gentoxische Wirkung von HEX und NONDI in *in-vitro* Tests untersuchten, zeigten, daß NONDI bei bereits nur halb so hohen Konzentrationen wie HEX zum Schwesterchromatidaustausch, zu strukturellen Chromosomenaberrationen und zur Induktion von Mikrokernen in Lymphozyten oder Namalva Zellen führt. Der Unterschied zwischen den Konzentrationen beider Verbindungen beträgt nahezu Faktor zwei, wobei es zu ersten signifikanten Anstiegen der oben genannten Endpunkte bei Konzentration von NONDI zwischen 20 - 40 μM kommt.

4.3 Mutationen am *hprt*-locus

Die Untersuchungen wurden mit NONDI und HEX, den beiden Verbindungen mit der höchsten Gentoxizität, in V79 Zellen durchgeführt.

4.3.1 (*E*)-2-Hexenal (HEX)

Mutationen am *hprt*-Gen wurden für HEX nach einstündiger Inkubation ab einer Konzentration von 100 μM festgestellt (Tabelle 15). Die Anzahl der Mutanten pro 10^6 Zellen unterschied sich dabei signifikant von der Kontrolle ($P < 0,01$).

Tab. 15 Mutagenität von HEX und MNNG in V79 Zellen, ermittelt im HPRT-Test nach einstündiger Inkubation und anschließender Nachwachszeit

Substanz	Mutanten*/ 10^6 Zellen	n**	Viabilität***
Kontrolle (DMSO, 0,2 %)	$4,3 \pm 3,1$	3	100 %
HEX (100 μM)	$15,7 \pm 3,9$	3	62 %
HEX (125 μM)	23	1	48 %
HEX (150 μM)	$17,8 \pm 1,8$	2	17 %
MNNG (10 μM)	278 ± 13	3	75 %

* Mittelwert \pm SD bzw. Spannweite bei $n = 2$

** Anzahl unabhängiger Experimente

*** Zellzahl der lebenden Zellen bei der ersten Passage im Verhältnis zur Kontrolle

Mit zunehmender Konzentration stieg die cytotoxische Wirkung von HEX stark an, so daß ab einer Konzentration $> 150 \mu\text{M}$ der Test nach dem Standardprotokoll nicht mehr durchgeführt werden konnte. Somit ließ sich eine konzentrationsabhängige Wirkung von HEX nicht bestimmen. Die Positivprobe N-Methyl-N'-Nitronitrosoguanidin (MNNG 10 μM) führte zu einem drastischen Anstieg der Mutantenzahlen, welcher sich hochsignifikant von der Kontrolle ($P < 0,001$) unter-

scheidet. Zur besseren Einstufung des mutagenen Potentials wurde der D_{3C} -Wert, d.h. die Konzentration, ab der eine Erhöhung der Mutantenzahl um das 3fache der Kontrolle stattfindet, berechnet.

$$D_{3C} = \frac{3CD}{Y}$$

C: spontane Mutationsfrequenz

Y: beobachtete Mutationsfrequenz bei Konzentration D

Ab einer 3fachen Erhöhung der Mutantenzahl gegenüber der Kontrolle werden die Substanzen als mutagen eingestuft (Bradley et al., 1987). Aus den Daten (Tabelle 15) läßt sich für HEX ein D_{3C} -Wert von 87 μM und für MNNG ein D_{3C} -Wert von 0,5 μM berechnen.

Der bei der Inkubation mit HEX beobachtete starke cytotoxische Effekt scheint im Widerspruch zur cytotoxischen Wirkung von HEX im Trypanblau-Test zu stehen. In beiden Versuchen wurden die Substanzen für eine Stunde inkubiert, jedoch wurden im HPRT-Test 24 bis 48 Stunden nachinkubiert und dann die Lebendzellzahl erfaßt. Dies erklärt die höhere Sensitivität der Zellen gegenüber HEX im HPRT-Test.

4.3.2 (2E,6Z)-2,6-Nonadienal (NONDI)

Untersuchungen mit NONDI wurden vergleichend durchgeführt. Es konnte keine Erhöhung der Mutantenzahlen bis zu einer Konzentration von 25 μM beobachtet werden (Tabelle 16). Ab einem Bereich von 30 - 40 μM traten so starke cytotoxische Wirkungen auf, daß eine Durchführung nach den Standardprotokoll nicht mehr möglich war. MNNG war wieder deutlich mutagen und der D_{3C} -Wert berechnete sich in diesen Untersuchungen zu 0,9 μM .

Tab. 16 Mutagenität von NONDI und MNNG in V79 Zellen, ermittelt im HPRT-Test nach einstündiger Inkubation und anschließender Nachwachszeit

Substanz	Mutanten*/10 ⁶ Zellen	n**	Viabilität***
Kontrolle (DMSO, 0,2 %)	4,7 ± 2,9	3	100 %
NONDI (10 µM)	2,7	1	98 %
NONDI (25 µM)	2,0 ± 0	2	60 %
MNNG (10 µM)	162,7 ± 53	3	73 %

* Mittelwert ± SD bzw. Spannweite bei n = 2

** Anzahl unabhängiger Experimente

*** Zellzahl der lebenden Zellen bei der ersten Passage im Verhältnis zur Kontrolle

Die durch NONDI verursachten cytotoxischen Wirkungen traten im HPRT-Test schon bei niedrigeren Konzentrationen auf (Faktor 10) als im Trypanblau-Test. Die beobachtete höhere Sensitivität der Zellen gegenüber NONDI ist mit der von HEX vergleichbar, die dafür möglicherweise zugrundeliegenden Ursachen sind in 4.2.1 erläutert.

4.3.3 Diskussion der Ergebnisse des HPRT-Tests

Um die im HPRT-Test erhaltenen Ergebnisse einzuordnen, wurden Daten aus anderen Arbeiten zum Vergleich herangezogen. Canonero et al. (1990) konnten eine Konzentrationsabhängigkeit der Wirkung von HEX feststellen. Die Untersuchung wurde mit Konzentrationen bis einschließlich 300 µM durchgeführt. Bei diesen Konzentrationen wurden ebenfalls starke cytotoxische Effekte beobachtet. Die Viabilität betrug bei 300 µM nur noch 18 % absolut (Kontrolle: 80 % absolut). Der von Canonero berechnete D_{3C}-Wert von 87 µM ist mit dem hier bestimmten D_{3C}-Wert identisch.

Für NONDI wurden bisher keine Mutationstests am hprt-locus durchgeführt. Cytogenetische Endpunkte zeigen ab Konzentrationen von ≥ 40 µM signifikante Unterschiede zur Kontrolle, eine Konzentration, die im HPRT-Test nicht mehr

einsetzbar war und bis zu der noch keine Mutationen nachzuweisen waren. Für HMF ist ab einer Konzentration von 120 mM eine 3fache Erhöhung des Kontrollwertes nachgewiesen (Janowski et al., 2000a). Ein konzentrationsabhängiger Anstieg der Mutantenzahlen war aufgrund der cytotoxischen Wirkung nicht zu beobachten. Für CHX wurde mit zunehmender Konzentration ein Anstieg der Mutantenzahlen nachgewiesen. CHX zeigte unter den gleichen Versuchsbedingungen wie HEX ab einer Konzentration von $\geq 400 \mu\text{M}$ mutagene Wirkung (Janowski et al., 2000b). Hier waren keine starken cytotoxischen Effekte bis zu einer Konzentration von $1000 \mu\text{M}$ erkennbar. Die Bestimmung der Mutagenität der 2-Alkenale gestaltet sich im allgemeinen aufgrund starker cytotoxischer Effekte schwierig. Die Konzentrationsbereiche, in denen mutagene Wirkungen und cytotoxische Wirkungen auftreten liegen sehr nahe beieinander bzw. überlappen sich. Somit ist häufig eine Bestimmung der Mutagenität nicht möglich.

4.4 Einfluß auf den zellulären Glutathionspiegel

Die Untersuchungen wurden für alle Verbindungen an V79 Zellen durchgeführt sowie für einige ausgewählte Verbindungen an humanen Colonzellen. Bestimmt wurde der Gesamtglutathiongehalt (tGSH), d.h. die Summe aus reduziertem (GSH) und oxidiertem (GSSG) Glutathion. Es wurden Konzentrationen eingesetzt, die deutlich unterhalb der jeweiligen LC_{50} -Werte lagen.

4.4.1 Vorarbeiten

Zur Etablierung der Methode waren einige Vorarbeiten notwendig. Da die Extinktionen der Eichreihen äußerst niedrig ausfielen, wenn man die Glutathionbestimmung mit Lösungen analog zur Literatur (Akerboom und Sies, 1981) durchführte, wurden zur Erhöhung der Nachweisempfindlichkeit einige Parameter variiert. So führte die Erhöhung des Anteiles an DTNB-Lösung innerhalb der NADPH/DTNB-Lösung auf 5 % zu einer Verzehnfachung der Extinktionswerte (0,003 auf 0,032; $10 \mu\text{M}$ GSH Standard). Ebenfalls positiv bemerkbar machte sich die Erhöhung der Einheiten an Glutathionreduktase im Küvettenansatz von 0,24 auf 3,9 U/ml (0,032 auf 0,075; $10 \mu\text{M}$ GSH Standard). Von großer Bedeutung für die Reproduzierbarkeit der Glutathionbestimmung war auch das exakte Einhalten des Zeitintervalls zwischen

Zugabe der GSR und dem Ablesen der Extinktion. Gerade bei hohen GSH-Gehalten stiegen die Extinktionen äußerst schnell an, aus diesem Grund wurden die Probenwerte auch immer doppelt bestimmt. Die Nachweisgrenze betrug $0,625 \mu\text{M}$ GSH.

4.4.2 GSH-Depletion an V79 Zellen

Die tGSH-Gehalte der mit Lösungsmittel (1 % DMSO) behandelten Zellen lagen bei $18,4 \pm 4,3 \text{ nmol/mg Protein}$ bzw. bezogen auf die Zellzahl bei $2 \pm 0,3 \text{ nmol}/10^6$ in V79 Zellen.

4.4.2.1 Homologe 2-Alkenale

(*E*)-2-Hexenal (HEX), (*E*)-2-Octenal (OCTE) und (*E*)-2-Nonenal (NONE) sind gemeinsam in Abbildung 36 dargestellt. HEX induzierte eine deutliche, konzentrationsabhängige Depletion des tGSH-Gehaltes. Bereits ab sehr geringen Konzentrationen ($2,5 \mu\text{M}$) kam es zu einer deutlichen Abnahme des tGSH-Gehaltes. Bei einer Konzentration von $10 \mu\text{M}$ waren schon nahezu 50 % des tGSH-Gehaltes depletiert und nach Inkubation mit $50 \mu\text{M}$ war kaum noch freies Glutathion nachweisbar. Für OCTE und NONE ergab sich ein zu HEX vergleichbares Bild.

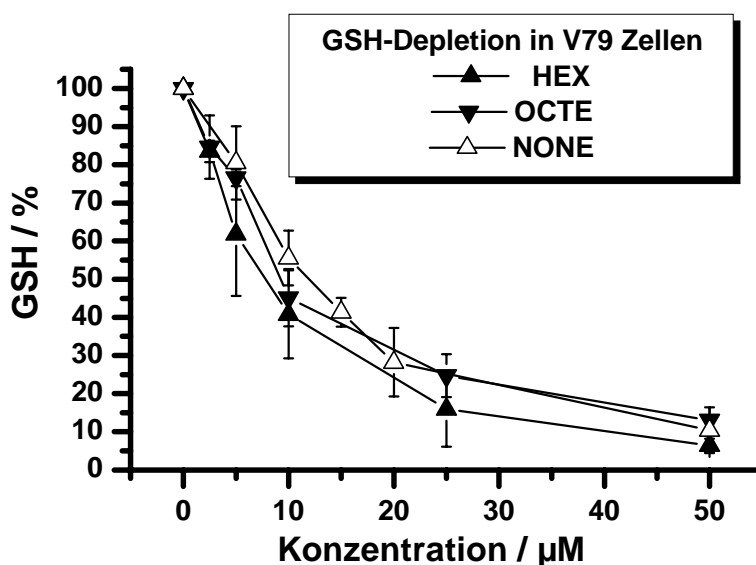


Abb. 36 tGSH-Gehalte in V79 Zellen nach einstündiger Inkubation mit HEX, OCTE oder NONE

Exemplarisch wurde für 2 Konzentrationen von HEX (50 und 100 μM) auch der tGSH-Gehalt nach 1 h Inkubation sowie einstündiger Inkubation mit anschließender dreistündiger Postinkubationszeit bestimmt. Nach 1 h Inkubation war mehr tGSH depletiert als nach 3 h Postinkubationszeit (Abbildung 37). Innerhalb der dreistündigen Postinkubationszeit in serumfreien Medium war ein Anstieg des tGSH-Gehaltes zu beobachten. Unterschiede zwischen den eingesetzten Konzentrationen von 50 μM und 100 μM HEX waren nicht zu erkennen.

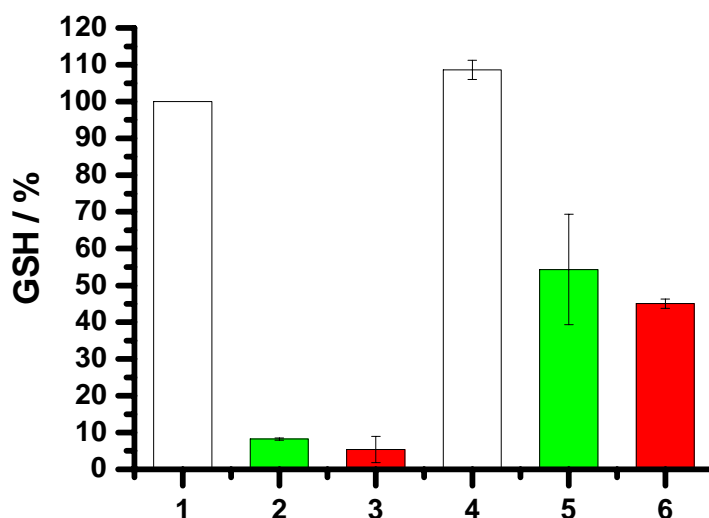


Abb. 37 tGSH-Gehalte in V79 Zellen nach einstündiger Inkubation mit HEX (1: Kontrolle; 2: HEX 50 μM ; 3: HEX 100 μM) und anschließender drei stündiger Postinkubationszeit (4: Kontrolle; 5: HEX 50 μM ; 6: HEX 100 μM)

4.4.2.2 Weitere ungesättigte Aldehyde

Die Ergebnisse der Verbindungen (2*E*,4*E*)-2,4-Hexadienal (HEXDI), (2*E*,6*Z*)-2,6-Nonadienal (NONDI) und Zimtaldehyd (CA) sind in Abbildung 38 zusammengefaßt. Bei HEXDI war auch eine konzentrationsabhängige Wirkung auf den tGSH-Gehalt zu erkennen. Bis zu einer Konzentration von 25 μM war eine starke Depletion des tGSH-Gehaltes auf 40 % des Kontrollwertes zu beobachten. In einem Bereich zwischen 25 und 100 μM wurde nur noch eine langsame Abnahme des Gesamtglutathiongehaltes detektiert. Bei NONDI fällt auf, daß bereits zwischen 5 - 25 μM ein starker Abfall des tGSH-Gehaltes auf knapp 15 % des Kontrollwertes zu beobachten war.

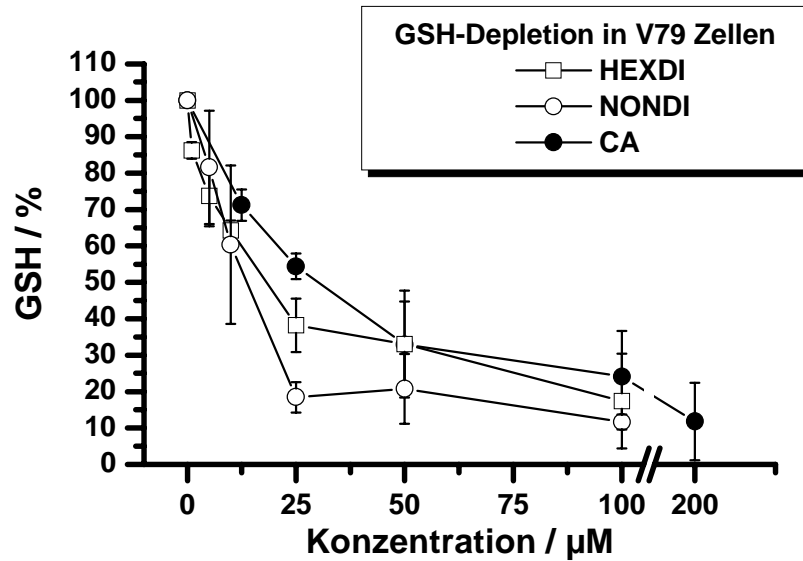


Abb. 38 tGSH-Gehalte in V79 Zellen nach einstündiger Inkubation mit HEXDI, NONDI oder CA

Für CA wurden Konzentrationen bis 200 µM eingesetzt. Hier kam es schon in niedrigen Konzentrationsbereich (50 µM) zu einer deutlichen tGSH-depletierenden Wirkung.

4.4.2.3 2-Cyclohexen-1-on (CHX)

CHX wurde bis zu einer 50 mikromolaren Konzentration getestet. 10 µM CHX depletierte bereits nahezu 50 % des vorhandenen tGSH-Gehaltes (Abbildung 39). Zwischen 20 und 50 µM gab es kaum noch Unterschiede in der Wirkung, auch hier wurde eine Sättigung erreicht.

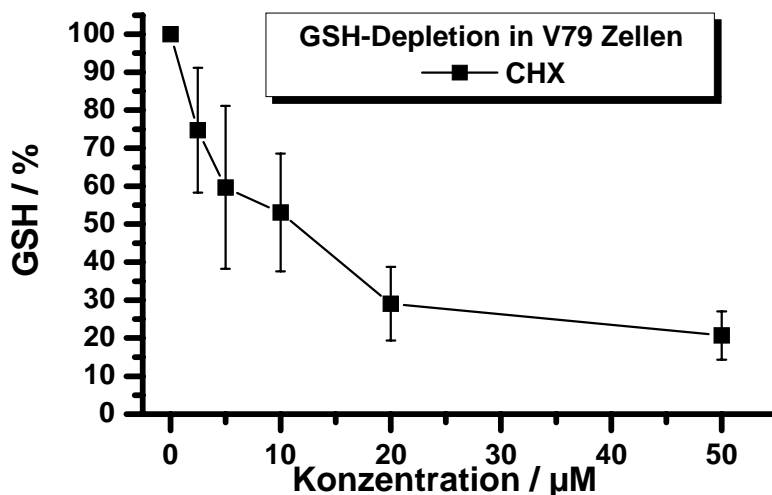


Abb. 39 tGSH-Gehalte in V79 Zellen nach einstündiger Inkubation mit CHX

4.4.2.4 Vergleich der Ergebnisse

Bei allen untersuchten Verbindungen handelt es sich um potente tGSH-Depletierer. Die homologen 2-Alkenale mit der Kettenlänge C6, C8 und C9 sind in ihrer Wirkung nahezu identisch und verringern schon bei sehr geringen Konzentrationen den tGSH-Gehalt. Bei einer Konzentration von 25 μM sind nur noch ca. 20 % des tGSHs im Vergleich zum Kontrollwert vorhanden. NONDI zeigt eine vergleichbare Wirkungsstärke wie die oben erwähnten 2-Alkenale. CHX ist um den Faktor 2 schwächer wirksam. CA und HEXDI erzielen erst bei 100 μM eine Depletion des tGSH-Gehaltes auf 20 % des Kontrollwertes.

Somit ergibt sich für die Glutathion-depletierende Wirkung der untersuchten α,β -ungesättigten Carbonylverbindungen in V79 Zellen nach einstündiger Inkubation folgende Reihung mit abnehmender Wirkung:

HEX, OCTE, NONE, NONDI > CHX > HEXDI, CA.

Für HMF (80 mM) ist eine Depletion auf ca. 20 % des Kontrollwertes beschrieben (Janzowski et al., 2000a).

4.4.3 GSH-Depletion an Caco-2 Zellen

Die tGSH-Gehalte der mit Lösungsmittel (1% DMSO) behandelten Zellen lagen bei $21,2 \pm 4,3$ nmol/mg Protein bzw. bezogen auf die Zellzahl bei $7 \pm 1,1$ nmol/ 10^6 .

4.4.3.1 Homologe 2-Alkenale

Die Verbindungen (*E*)-2-Hexenal (HEX), (*E*)-2-Octenal (OCTE) und (*E*)-2-Nonenal (NONE) sind gemeinsam in Abbildung 40 zu sehen. Bei HEX kam es auch in Caco-2 Zellen zu einer konzentrationsabhängigen Depletion des zellulären Glutathionspiegels. Ab einer Konzentration von 50 μ M waren nahezu 60 % des tGSH-Gehaltes depletiert, eine weitere Erhöhung der HEX Konzentration führte nur noch zu einer geringen weiteren Abnahme des tGSH-Gehaltes.

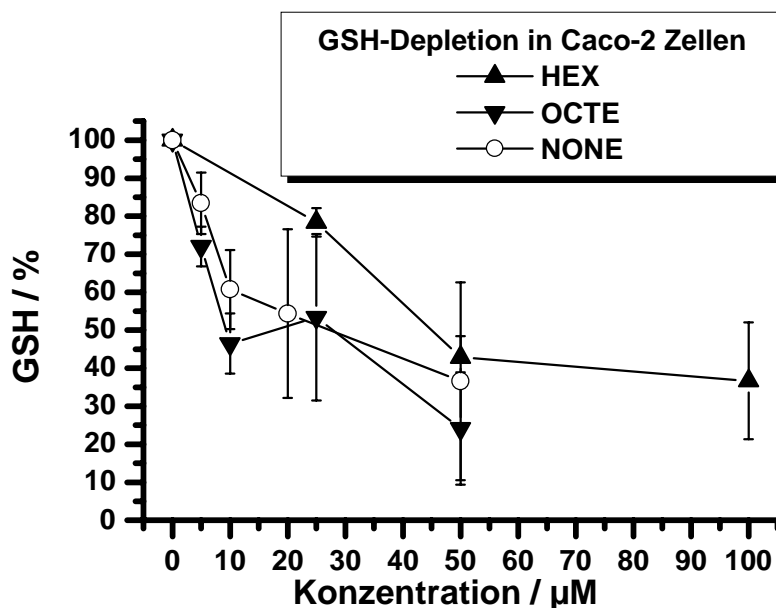


Abb. 40 tGSH-Gehalte in Caco-2 Zellen nach einstündiger Inkubation mit HEX, OCTE oder NONE

Nach Inkubation mit OCTE und NONE wurde vor allem in niedrigen Konzentrationen eine wesentlich effektivere tGSH-Depletion beobachtet.

4.4.3.2 2-Cyclohexen-1-on (CHX)

CHX wurde in Konzentrationen bis 400 μM getestet (Abbildung 41). Es kann ein konzentrationsabhängiger Verlauf der Depletion des tGSH-Gehaltes bis zu 50 μM der Testsubstanz erkannt werden. Selbst deutlich höhere Konzentrationen (100 und 400 μM) führten nicht zu einer weiteren Verstärkung des Effektes. Es wurde eine Sättigung erreicht.

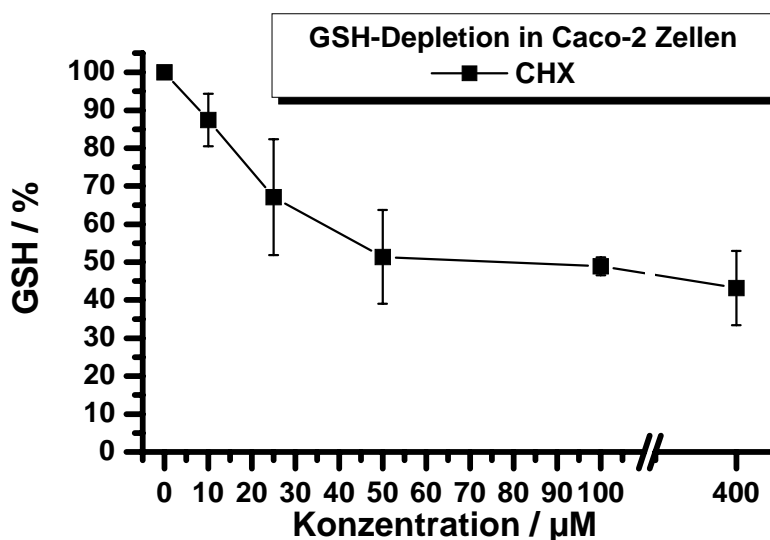


Abb. 41 tGSH-Gehalte in Caco-2 Zellen nach einstündiger Inkubation mit CHX

4.4.3.3 Vergleich der Ergebnisse

Vergleicht man die Verbindungen miteinander, so ist festzustellen, daß alle untersuchten Verbindungen zu einer ausgeprägten tGSH-Depletion in Caco-2 Zellen führten. OCTE und NONE besitzen eine leicht stärkere Wirkung als HEX und CHX. Bei CHX und OCTE, die auch in höheren Konzentrationen getestet wurden, wurde schon bei relativ niedrigen Substanzkonzentrationen ein Sättigungs-Plateau erreicht, selbst der Einsatz höherer Konzentrationen führt nicht zu einer weiteren Abnahme des tGSH-Gehaltes.

4.4.4 GSH-Depletion in primären humanen Colonzellen

Die tGSH-Gehalte der mit Lösungsmittel (1 % DMSO) behandelten Zellen lagen bei $6,8 \pm 3,4$ nmol/mg Protein bzw. bezogen auf die Zellzahl bei $5 \pm 2,7$ nmol/ 10^6 .

Die stärkere Schwankung im Vergleich zu den Zelllinien läßt sich auf individuelle Unterschiede der isolierten Biopsieproben zurückführen.

4.4.4.1 (E)-2-Hexenal (HEX) und 2-Cyclohexen-1-on (CHX)

HEX und CHX führten zu einer vergleichbaren GSH-Depletion in primären humanen Colonzellen nach 30 minütiger Inkubation, wobei CHX leicht schwächer wirksam war. Ab einer Konzentration von 100 μ M (HEX) bzw. 200 μ M (CHX) war ein Plateau erreicht, ab dem selbst höhere Dosen keine weitere tGSH-Depletion mehr bewirkten (Abbildung 42).

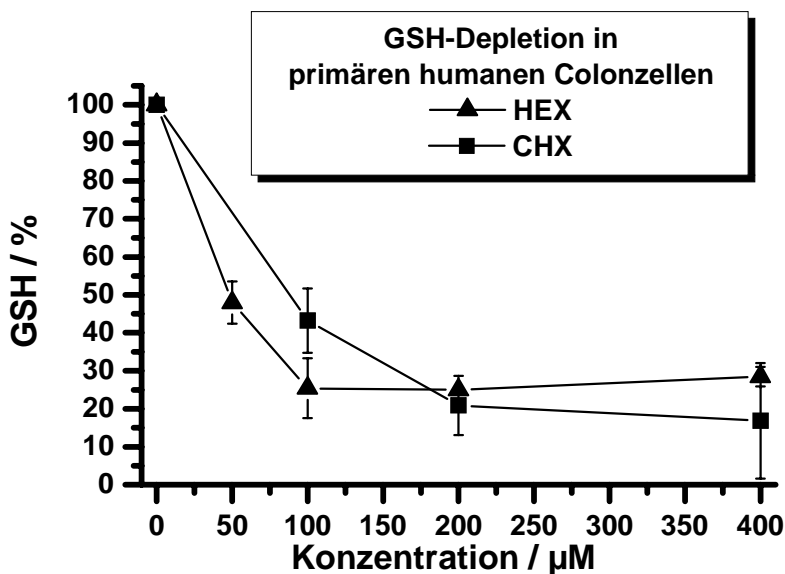


Abb. 42 GSH-Gehalte in primären humanen Colonzellen nach 30 minütiger Inkubation mit HEX oder CHX

4.4.3 Diskussion der Ergebnisse der Bestimmung des tGSH-Gehaltes

Alle untersuchten Substanzen induzieren unabhängig vom eingesetzten Zelltyp konzentrationsabhängig eine tGSH-Depletion. Die Konzentrationen, die hierfür in V79 Zellen notwendig sind, bewegen sich im unteren mikromolaren Bereich für alle untersuchten α,β -ungesättigten Carbonylverbindungen. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Verbindungen fallen relativ gering aus. HEX, OCTE, NONE und NONDI sind die potentesten Vertreter, gefolgt von CHX, HEXDI und CA.

Die Effektivität der GSH-Depletion in den Caco-2 Zellen ist etwas geringer. Alle Verbindungen zeigen in den Caco-2 Zellen eine um einen Faktor zwischen 2 und 5 schwächere Wirkung als in V79 Zellen. Auch findet eine Depletion nur auf 20 bis 40 % des Kontrollwertes statt, das heißt, ein relativ hohes Sättigungsniveau wird erreicht, ab dem höhere Substanzkonzentrationen keinen weiteren Einfluß auf eine Depletion des tGSH-Gehaltes besitzen.

In primären humanen Colonzellen wurden nur die beiden Verbindungen HEX und CHX untersucht. Beide Substanzen depletieren das zelluläre Glutathion auf 20 % der Kontrolle. HEX ist annähernd um den Faktor 2 stärker wirksam als CHX, und beide Substanzen sind ungefähr um den Faktor 5 schwächer wirksam als in V79 Zellen.

Die unterschiedliche Effektivität der Verbindungen in den verschiedenen Zelllinien kann zum Teil durch Zelltyp-spezifische Unterschiede erklärt werden. So unterscheiden sich z.B. die tGSH-Gehalte der lösungsmittelbehandelten Kontrollen für die unterschiedlichen Zellsysteme zum Teil deutlich. Sie liegen für V79 Zellen bei $2 \pm 0,3$ nmol/ 10^6 Zellen, für Caco-2 Zellen bei $7 \pm 1,1$ nmol/ 10^6 Zellen und für primäre humane Colonzellen bei $5 \pm 2,7$ nmol/ 10^6 Zellen. Diese Unterschiede könnten eine Erklärung für die unterschiedlichen prozentualen Sättigungsniveaus liefern. In V79 Zellen und in den primären humanen Colonzellen, die beide weniger tGSH pro 10^6 Zellen enthalten als die Caco-2 Zellen, bewirkt die Depletion einer gleichen Menge an tGSH eine stärkere prozentuale Abnahme des tGSH-Gehaltes als in Caco-2 Zellen.

Ein weitere Erklärung könnte in den zelltypischen unterschiedlichen Enzymmustern und Enzymgehalten liegen, wobei hier in erster Linie die Ausstattung an Glutathion-S-Transferasen (GST) von Interesse ist. Wie bereits in Kapitel 2.3.1 beschrieben wird, katalysieren GST die Umsetzung von α,β -ungesättigten Carbonylverbindungen mit GSH. Neben der Umsetzung durch GST wird ebenfalls in verschiedenen Arbeiten

beschrieben, daß es durch Alkenale auch zu einer Inhibierung spezifischer GST-Klassen kommt.

Chien et al. (1994) beschreiben für OCTE die Hemmung der A und M Isoenzymklassen in Hepatocyten der Ratte. Die selektive Inhibierung der humanen GST P1-1 durch HEX, CA und andere α,β -ungesättigte Carbonylverbindungen beschreiben van Iersel et al. (1997). Gerade für Caco-2 Zellen werden hohe Gehalte an GST P und GST A (38 bzw 3 $\mu\text{g}/\text{mg}$ Protein; Peters und Roelofs, 1992) beschrieben, so daß eine Hemmung dieser Enzyme ebenfalls eine mögliche Erklärung für eine geringere GSH-Depletion liefern könnte.

Die beobachteten Effekte auf den zellulären tGSH-Spiegel lassen sich mit Literaturdaten vergleichen. Die für CHX beobachtete tGSH-Depletion in V79 Zellen stimmt gut mit der tGSH-Depletion in humanen Lymphocyten überein. Hier führten 20 μM CHX zu einer Verminderung des tGSH-Gehaltes auf unter 20 % des Kontrollwertes (Fischman et al., 1981). Für CHX wird weiterhin eine GSH-depletierende Wirkung *in-vivo* nach intraperitonealer (i.p.) Injektion an der Ratte und in der Maus beschrieben (Benzi et al., 1991; Masakuwa et al., 1989). In Untersuchungen an Ratten, denen die Substanzen HEX, NONE, CHX und CA i.p. verabreicht wurden, zeigte sich bei der Depletion hepatozellulären GSHs ein differenziertes Bild. CHX war die am stärksten wirkende Verbindung, um einen Faktor 4 stärker als NONE, Faktor 2 stärker als HEX und nahezu um den Faktor 12 stärker als CA, wenn man die verabreichten Mengen und das Maß der GSH-Depletion berücksichtigt (Boylard und Chasseaud, 1970). Diese starke Wirkung von CHX im Vergleich zu den anderen α,β -ungesättigten Carbonylverbindungen konnte in den *in-vitro* tGSH-Bestimmungen nicht beobachtet werden. Die Unterschiede liegen sicherlich in den unterschiedlichen Testmethoden begründet, denn für die Reihung der LD₅₀-Daten aus *in-vivo* Daten (Tabelle 6) ergibt sich für diese Substanzen ein ähnliches Bild.

In der exemplarischen Untersuchung zur Bestimmung der tGSH-Gehalte nach dreistündiger Postinkubation im Anschluß an eine einstündige Inkubation mit HEX wurde ein Anstieg der tGSH-Gehalte beobachtet. Dieser Effekt kann auf eine Freisetzung von GSH aus dem GSH-HEX-Addukt hindeuten bzw. auf eine eventuelle Neusynthese von GSH hinweisen. Eine enzymatisch katalysierte und direkte Bildung von GSH-Aldehyd-Addukten sowie deren Zerfall wurde von Eisenbrand et al. (1995) für HEX, OCTE und NONDI im zellfreien System bestimmt. Die Halbwertszeiten (25 °C) der Addukte bewegten sich um die 7 Stunden, nur NONDI zeigte eine

Halbwertszeit von 3,5 Stunden. Somit könnte der Wiederanstieg des tGSH-Gehaltes nach vorhergehender Behandlung mit HEX zum Teil auf den Zerfall des GSH-Adduktes zurückzuführen sein.

4.5 Oxidative DNA-Schäden

Infolge der starken Glutathion-Depletion nach Inkubation mit α,β -ungesättigten Carbonylverbindungen wurden mögliche Konsequenzen untersucht. Wie in Kapitel 2.5.4 beschrieben, besitzt Glutathion neben seiner Rolle im Fremdstoffmetabolismus auch eine wichtige Funktion für das Redox-Gleichgewicht. Als Folge einer Veränderung dieses Gleichgewichtes kann es zur Induktion oxidativen Stresses kommen, der Auswirkungen auf verschiedene Makromoleküle der Zelle (z.B. DNA, Proteine, Lipide) haben könnte. Zur Bestimmung möglicher DNA-Schäden wurden oxidative DNA-Modifikationen in einem modifizierten Comet-Assay in V79, Caco-2 und primären humanen Colonzellen untersucht. Zum Nachweis spezifischer oxidativer DNA-Schäden an Purinbasen wurde das Enzym Formamidopyrimidin-Glykosylase (FPG) eingesetzt. Der Einsatz dieses Enzyms wurde gewählt, da mittels FPG zwei der drei häufigsten DNA-Modifikationen (siehe Kapitel 2.5.5) nach Induktion oxidativen Stresses mittels H_2O_2 detektiert werden können. Mit FPG wurde direkt nach der einstündigen Inkubation bzw. nach der dreistündigen Postinkubation auf oxidierte Purinbasen getestet. Weiterhin wurde die Sensitivität der Zellen gegenüber zusätzlichem, künstlich induziertem oxidativen Streß (H_2O_2) untersucht. H_2O_2 induziert in erster Linie Einzelstrangbrüche (SSB), die unter alkalischen Bedingungen im Comet-Assay zu einer DNA-Fragmentierung führen. Dargestellt wurden die Ergebnisse als Mittelwert TI (%). Dies ermöglichte eine differenziertere Erkennung von Unterschieden (siehe auch Kapitel 4.5.1).

4.5.1 Vorarbeiten

Zunächst mußte die optimale Enzymkonzentration ermittelt werden, die den Nachweis der FPG-sensitiven Stellen ermöglicht. Eine 3000fache Verdünnung der Stammlösung erwies sich als geeignet. Ein weiterer wichtiger Punkt war die Auswahl der H_2O_2 -Konzentration die zur Induktion von oxidativem Streß eingesetzt werden sollte. Die gewählte Konzentration sollte selbst nur geringe direkte DNA-Schäden und auch nur einen geringen Anstieg FPG-sensitiver Stellen zur Folge haben. Getestet wurden Konzentrationen von 25 - 100 μM H_2O_2 . Als geeignet erwies sich eine Konzentration von 25 μM (siehe auch Abbildungen 43 - 49). Bei Einsatz einer Konzentration von 100 μM H_2O_2 wurden bereits ohne FPG-Behandlung eine TI von

circa 50 % detektiert, so daß spezifische FPG-sensitive Schäden nicht mehr nachweisbar waren. In einem Vorversuch wurde der gleichzeitige Einsatz von FPG und Endo III zur Detektion oxidiertes Purine und Pyrimidine getestet. Es wurden jedoch schon in den Kontrollzellen DNA-Schäden detektiert, so daß auf einen gemeinsamen Einsatz der Enzyme verzichtet wurde.

4.5.2 Untersuchungen an V79 Zellen

Die Prüfung auf erhöhte Sensitivität der Zellen gegenüber oxidativem Streß erfolgte nach einstündiger Inkubation mit Testsubstanz und anschließender Kurzzeitinkubation (5 Minuten auf Eis) mit H₂O₂. Die H₂O₂-Konzentration betrug 25 µM. Untersucht wurden α,β-ungesättigte Carbonylverbindungen in Konzentrationen, die bereits eine effektive GSH-Depletion zeigten (siehe 4.4), jedoch nur geringe direkte DNA-Schäden induzierten (siehe 4.3).

4.5.2.1 Homologe 2-Alkenale

Die Verbindungen (*E*)-2-Hexenal (HEX), (*E*)-2-Octenal (OCTE) und (*E*)-2-Nonenal sind in den Abbildungen 43 - 45 dargestellt. Für die Induktion oxidativer DNA-Schäden durch 100 µM HEX konnte nach einstündiger Inkubation kein Anstieg der FPG-sensitiven Stellen nachgewiesen werden (Abbildung 43). Wurden die Zellen anschließend mit H₂O₂ behandelt, so führte dies zu einer starken DNA-Schädigung, FPG-sensitive Stellen waren nicht nachweisbar.

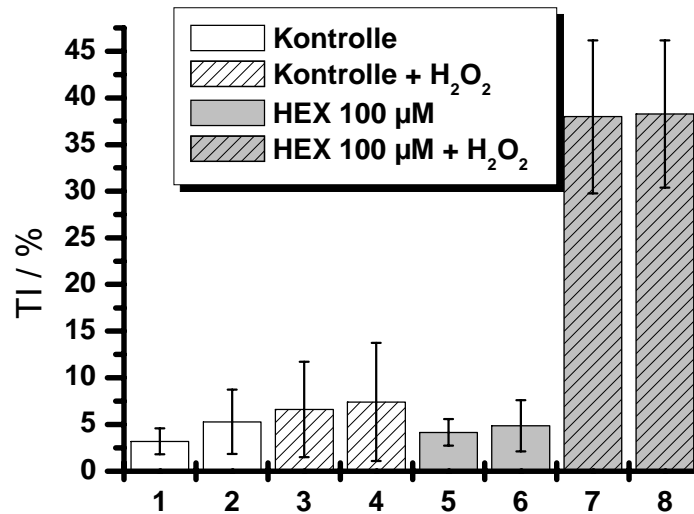


Abb. 43 Induktion oxidativer DNA-Schäden im Comet-Assay nach einstündiger Inkubation mit 100 µM HEX und anschließender fünfminütiger Postinkubation mit 25 µM H₂O₂ auf Eis; Balken 1, 3, 5 und 7 wurden mit Puffer behandelt, Balken 2, 4, 6 und 8 mit FPG; n = 2

Mit OCTE wurde konzentrationsabhängig die Induktion oxidativer DNA-Schäden untersucht. Direkt nach Substanzinkubation wurde keine Induktion FPG-sensitiver Stellen beobachtet (Abbildung 44). Folgte der Inkubation eine H₂O₂-Behandlung, so konnte ein konzentrationsabhängiger Anstieg der DNA-Schäden festgestellt werden, spezifische FPG-sensitive Stellen wurden jedoch nicht detektiert.

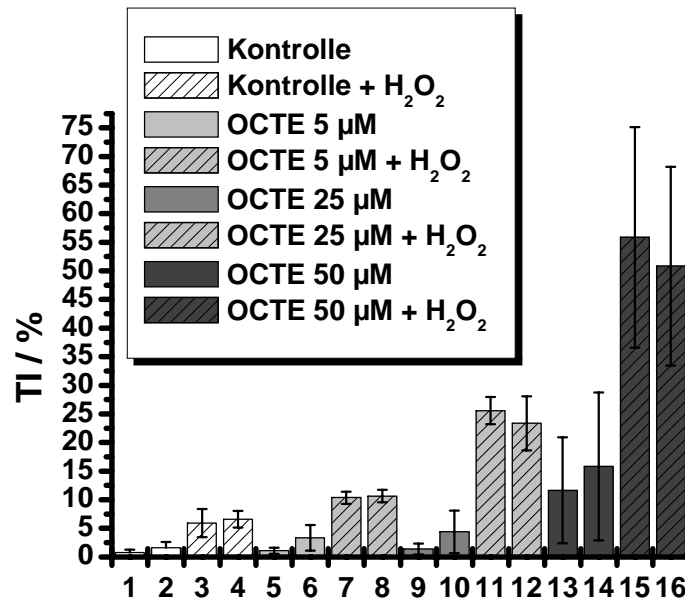


Abb. 44 Induktion oxidativer DNA-Schäden im Comet-Assay nach einstündiger Inkubation mit OCTE und anschließender fünfminütiger Postinkubation mit 25 µM H₂O₂ auf Eis; Balken 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 und 15 wurden mit Puffer behandelt, Balken 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 und 16 mit FPG; n = 2 außer Kontrolle n = 3

Bei Behandlung der Zellen mit NONE führten weder eine 50 µM noch eine 100 µM Konzentration zu FPG-sensitiven Stellen direkt nach Substanzinkubation (Abbildung 45). Ein Anstieg H₂O₂-bedingter DNA-Schäden war für beide Konzentrationen nachzuweisen. Erstmals konnten auch spezifische FPG-sensitive Stellen nach Substanzinkubation und anschließender H₂O₂-Behandlung nachgewiesen werden, für die auch eine Konzentrationsabhängigkeit festgestellt werden konnte.

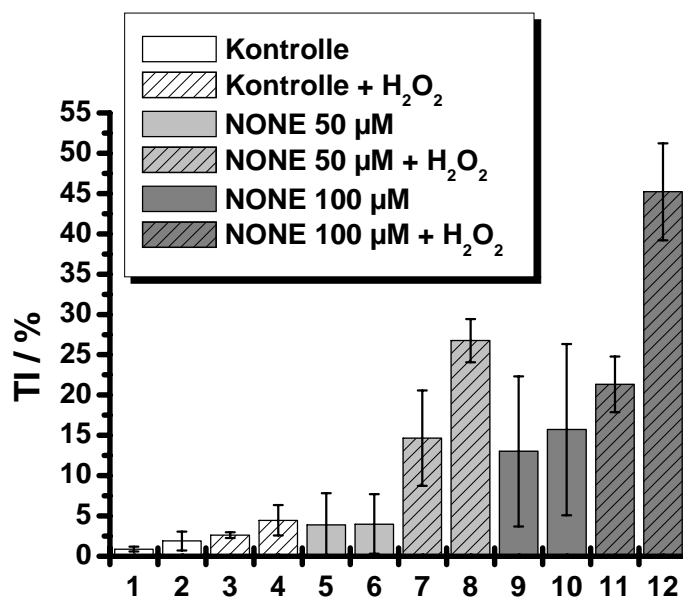


Abb. 45 Induktion oxidativer DNA-Schäden im Comet-Assay nach einstündiger Inkubation mit NONE und anschließender fünfminütiger Postinkubation mit 25 µM H₂O₂ auf Eis; Balken 1, 3, 5, 7, 9 und 11 wurden mit Puffer behandelt, Balken 2, 4, 6, 8, 10 und 12 mit FPG; n = 2

4.5.2.2 Weitere ungesättigte Aldehyde

Die Ergebnisse der Verbindungen (2*E*,4*E*)-2,4-Hexadienal (HEXDI), (2*E*,6*Z*)-2,6-Nonadienal (NONDI) und Zimtaldehyd (CA) sind in den Abbildungen 46 - 48 dargestellt. HEXDI induzierte weder in einer 25 mikromolaren noch in einer 100 mikromolaren Konzentration oxidierte Purine, die mittels FPG detektiert werden konnten (Abbildung 46). Die 25 mikromolare Konzentration führte nach Induktion oxidativen Stresses (H₂O₂) nur zu einem geringen Anstieg an DNA-Schäden, im Vergleich zur H₂O₂ behandelten Kontrolle. Wurde oxidativer Streß nach Inkubation mit 100 µM HEXDI induziert, so konnte ein starker Anstieg an DNA-Schäden bestimmt werden. Für beide eingesetzten Konzentrationen konnten jedoch auch nach H₂O₂-Behandlung keine FPG-sensitiven Stellen nachgewiesen werden.

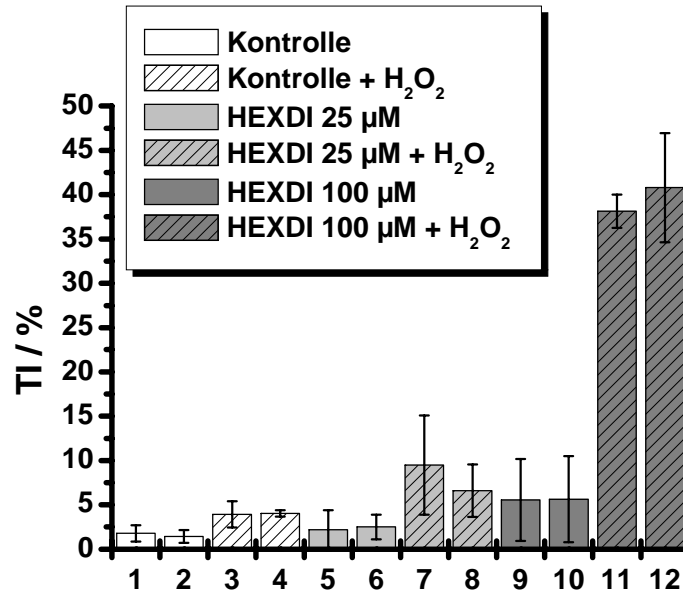


Abb. 46 Induktion oxidativer DNA-Schäden im Comet-Assay nach einstündiger Inkubation mit HEXDI und anschließender fünfminütiger Postinkubation mit 25 µM H₂O₂ auf Eis; Balken 1, 3, 5, 7, 9 und 11 wurden mit Puffer behandelt, Balken 2, 4, 6, 8, 10 und 12 mit FPG; n = 2

Oxidative DNA-Schäden durch NONDI wurde mit den Konzentrationen 25, 50 und 100 µM erfaßt. In Abbildung 47 sind die Ergebnisse dargestellt. Für keine der Konzentrationen waren FPG-sensitive Stellen nachweisbar. In Abhängigkeit von der Konzentration führte die Nachbehandlung der Zellen mit H₂O₂ zu einem Anstieg der DNA-Schäden. Der bei einer Konzentration von 100 µM NONDI und 25 µM H₂O₂ beobachtete Anstieg der TI auf 63 % stellt den bisher höchsten ermittelten TI-Wert dar. Bei diesem Wert war kaum noch ungeschädigte DNA nachzuweisen. Spezifische oxidierte Purine konnten jedoch auch nach erfolgter Induktion oxidativen Stresses nicht detektiert werden.

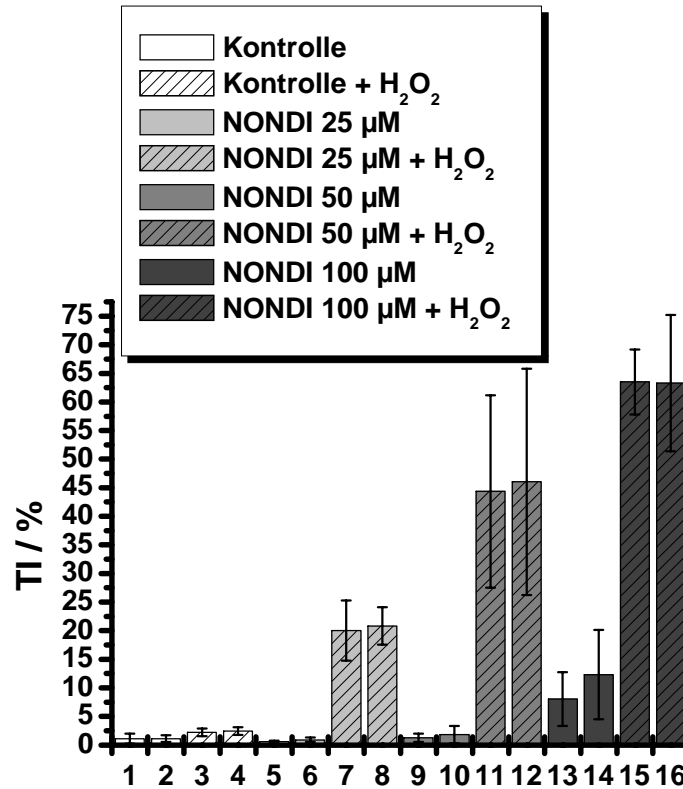


Abb. 47 Induktion oxidativer DNA-Schäden im Comet-Assay nach einstündiger Inkubation mit NONDI und anschließender fünfminütiger Postinkubation mit 25 µM H₂O₂ auf Eis; Balken 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 und 15 wurden mit Puffer behandelt, Balken 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 und 16 mit FPG; n = 2 außer Kontrolle n = 4 und 50 µM n = 3

Die Induktion oxidativer DNA-Schäden wurde nach erfolgter Inkubation mit CA in Konzentrationen zwischen 50 und 200 µM getestet (Abbildung 48). FPG-sensitive Stellen konnten direkt nach einstündiger Inkubation nicht beobachtet werden. Ein Anstieg der H₂O₂-bedingten DNA-Schäden war erst bei einer Konzentration von 100 µM und 200 µM festzustellen und fiel relativ schwach aus. Jedoch konnten spezifische FPG-sensitive Stellen nach H₂O₂-Behandlung für beide Konzentrationen nachgewiesen werden. Der Anstieg an FPG-sensitiven Stellen war konzentrationsabhängig.

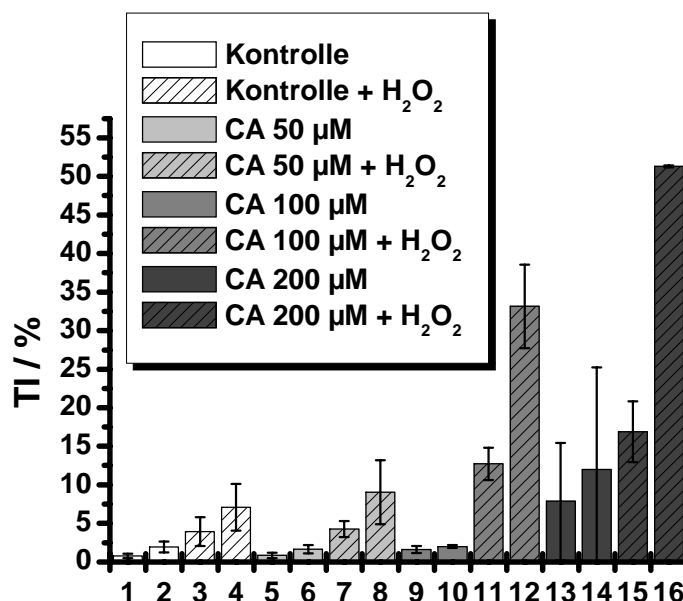


Abb. 48 Induktion oxidativer DNA-Schäden im Comet-Assay nach einstündiger Inkubation mit CA und anschließender fünfminütiger Postinkubation mit 25 μM H_2O_2 auf Eis; Balken 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 und 15 wurden mit Puffer behandelt, Balken 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 und 16 mit FPG; $n = 2$ außer Kontrolle $n = 3$, 50 μM und 200 μM + H_2O_2 $n = 1$

4.5.2.3 2-Cyclohexen-1-on (CHX)

V79 Zellen, die mit CHX inkubiert wurden, zeigen ebenfalls eine erhöhte Sensitivität gegenüber künstlich induziertem oxidativen Streß (nach H_2O_2 -Behandlung). In Abbildung 49 sind die DNA-Schäden dargestellt, die nach Inkubation mit 100 und 200 μM CHX detektiert wurden. Die Daten für die 100 mikromolare Konzentration wurden freundlicherweise von Sträßer (2001) zur Verfügung gestellt. Eine spezifische Sensitivität gegenüber FPG konnte weder direkt noch nach H_2O_2 -Behandlung nachgewiesen werden. Ein deutlicher konzentrationsabhängiger Anstieg der durch oxidativen Streß induzierten DNA-Schäden wurde beobachtet.

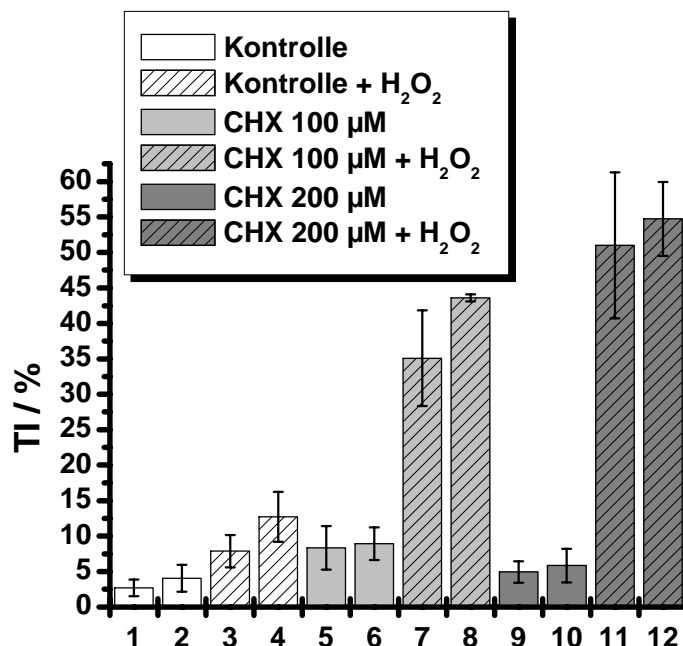


Abb. 49 Induktion oxidativer DNA-Schäden im Comet-Assay nach einstündiger Inkubation mit CHX und anschließender fünfminütiger Postinkubation mit 25 μM H_2O_2 auf Eis; Balken 1, 3, 5, 7, 9 und 11 wurden mit Puffer behandelt, Balken 2, 4, 6, 8, 10 und 12 mit FPG; $n = 3$ außer CHX 200 μM $n = 2$

4.5.2.4 Vergleich der Ergebnisse

Um die Wirkungen der einzelnen Verbindungen besser vergleichen zu können, ist in den Abbildungen 50 und 51 exemplarisch nur eine Konzentration für jede untersuchte Verbindung dargestellt. Es wurden Konzentrationen ausgewählt, die zu einem ähnlichen Schädigungsmuster führten. Direkte FPG-sensitive Stellen waren in V79 Zellen nach einstündiger Inkubation in keinem Fall nachweisbar.

Die Ergebnisse der Verbindungen HEX, OCTE und NONE sind in Abbildung 50 zusammengefasst. Eine Zunahme der oxidativen Schäden infolge einer Verlängerung der Alkylkette ist nicht zu beobachten. Eine Vorbehandlung der Zellen mit OCTE führt unter gleichen Bedingungen zu den meisten oxidativen Schäden, nach H_2O_2 -Behandlung. NONE ist deutlich weniger wirksam als HEX und OCTE. Jedoch ist NONE von diesen drei Verbindungen die einzige, die in V79 Zellen zu einer H_2O_2 -abhängigen Induktion FPG-sensitiver Stellen führt.

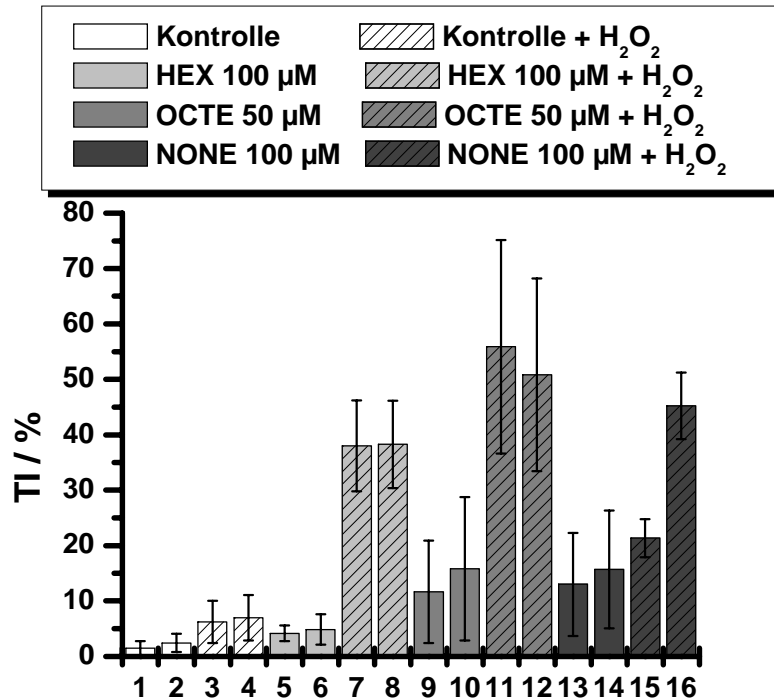


Abb. 50 Induktion oxidativer DNA-Schäden im Comet-Assay nach einstündiger Inkubation mit HEX, OCTE und NONE und anschließender fünfminütiger Postinkubation mit 25 µM H₂O₂ auf Eis; Balken 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 und 15 wurden mit Puffer behandelt, Balken 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 und 16 mit FPG; der Kontrollwert ergibt sich aus den gemittelten Werten der jeweiligen Kontrollen

In Abbildung 51 sind die Verbindungen HEXDI, NONDI, CA und CHX dargestellt. Auch diese Verbindungen führen in den hier dargestellten Konzentrationen zu einem Anstieg von DNA-Schäden nach Induktion oxidativen Stresses durch H₂O₂. Spezifische FPG-sensitive Stellen sind auch nach erfolgter H₂O₂-Behandlung nur in den CA behandelten Zellen zu erkennen.

CA und NONE sind die einzigen der hier untersuchten Verbindungen, bei denen es nach der Induktion von oxidativem Streß zu einer Erhöhung an FPG-sensitiven DNA-Schäden kommt.

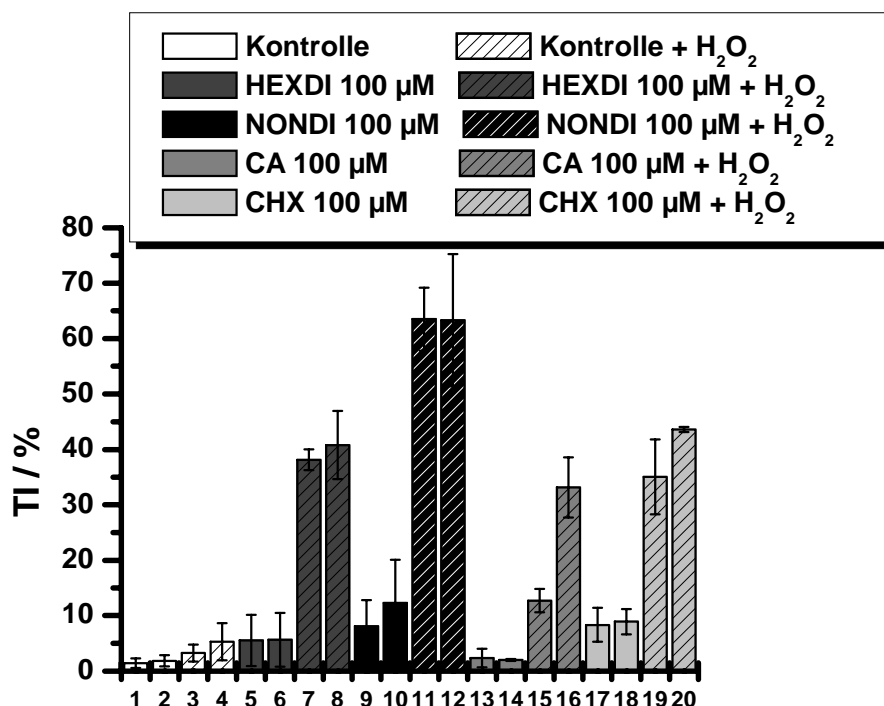


Abb. 51 Induktion oxidativer DNA-Schäden im Comet-Assay nach einstündiger Inkubation mit CHX, CA, HEXDI und NONDI und anschließender fünfminütiger Postinkubation mit 25 µM H₂O₂ auf Eis; Balken 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 und 19 wurden mit Puffer behandelt, Balken 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 und 20 mit FPG; der Kontrollwert ergibt sich aus den gemittelten Werten der jeweiligen Kontrollen

Die durch die Substanzen und nachfolgender H₂O₂-Behandlung induzierten oxidativen DNA-Schäden liegen für alle Verbindungen in der gleichen Größenordnung. Ausgeprägte Unterschiede, die durch die Struktur der Verbindungen zustande kommen könnten sind somit nicht zu beobachten. Eine Ausnahme stellen NONDI und OCTE dar. NONDI zeigt bei gleicher Konzentration wie die übrigen Verbindungen (außer OCTE) eine größere DNA-Schädigung (TI ≈ 60 %). OCTE verursacht eine vergleichbare Wirkung wie die übrigen Verbindungen schon bei einer um den Faktor 2 verringerten Konzentration. Für NONE bewirkt die Einführung einer weiteren Doppelbindung an Position 6 des Kohlenstoffgerüsts eine Verstärkung der Wirkung. CHX besitzt die gleiche Wirkungsstärke wie die ringgeöffnete C6 Verbindung HEX.

4.5.3 Untersuchungen an primären humanen Colonzellen

Auf Induktion oxidativer DNA-Schäden an primären humanen Colonzellen wurde nach 30 minütiger Inkubation mit 200 μM HEX bzw. 400 μM CHX und anschließender Kurzzeitbehandlung mit H_2O_2 untersucht. Bei Inkubationen mit 25 μM H_2O_2 , der Konzentration, die bei den Versuchen mit V79 Zellen zum Einsatz kam (siehe Kapitel 4.5.1), wurde ein starker Anstieg an DNA-Schäden in den Kontrollzellen beobachtet. Dies spiegelt sich in einem Zuwachs des mittleren TI um 14 bzw. 12 Prozentpunkte bezogen auf die Kontrolle wider (Abbildung 52). Daher wurde eine H_2O_2 -Konzentration von 10 μM , eine Konzentration, mit der es in Kontrollzellen nur zu einem geringen Anstieg direkter bzw. FPG-sensitiver DNA-Schäden kam für die weiteren Versuche eingesetzt. Für HEX und CHX war direkt nach der 30 minütigen Inkubation kein Anstieg an FPG-sensitiven DNA-Schäden zu detektieren. Die Induktion von oxidativem Streß mittels H_2O_2 führte jedoch zu einem Anstieg der DNA-Schäden. Spezifische FPG-sensitive Stellen waren auch nach H_2O_2 -Behandlung nicht zu beobachten (Abbildung 52).

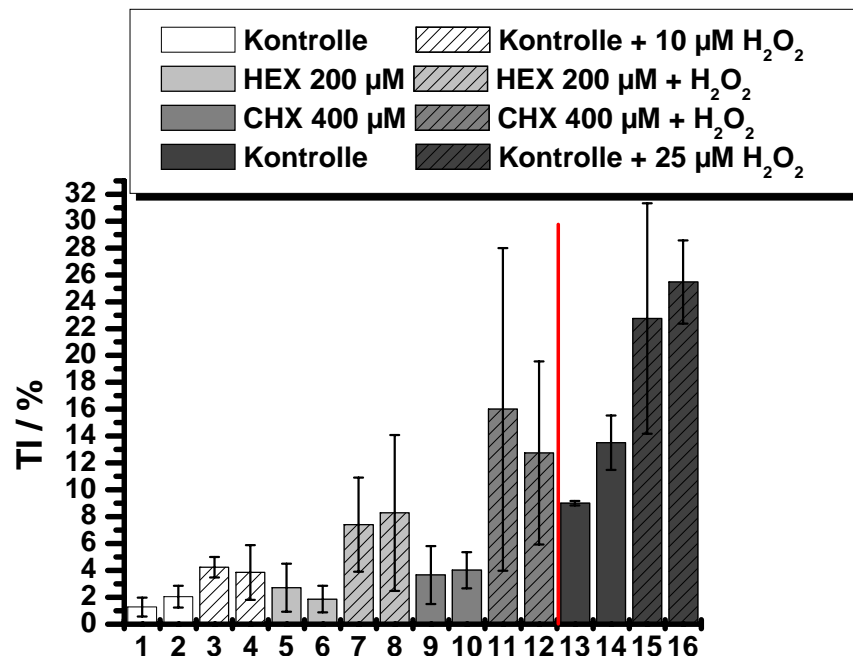


Abb. 52 Induktion oxidativer DNA-Schäden im Comet-Assay nach dreißigminütiger Inkubation mit HEX und CHX und anschließender fünfminütiger Postinkubation mit 10 μM H_2O_2 auf Eis; Balken 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 und 15 wurden mit Puffer behandelt, Balken 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 und 16 mit FPG; n = 4; außer CHX n = 5; Balken 13-16 stellen Kontrollwerte einer unabhängigen Untersuchung dar, bei der eine 25 mikromolare H_2O_2 eingesetzt wurde

Die relativ großen Schwankungen lassen sich zum Teil durch die unterschiedliche Sensitivität des Probenmaterials der verschiedenen Probanden erklären.

4.5.4 Induktion oxidativer DNA-Schäden während 3 h Postinkubation in V79 Zellen

In einem orientierenden Versuch wurde die DNA-schädigende Wirkung von HEX nach einer Postinkubationszeit von 3 Stunden in Kulturflaschen untersucht. Hintergrund war die Frage, ob aufgrund der beobachteten GSH-Depletion (4.4.2.1) oxidativer Streß in den Zellen verstärkt auftritt.

In Abbildung 53 sind die Ergebnisse dargestellt. Bei den Kontrollzellen wurden weder direkt nach Inkubation noch nach Postinkubation oxidative (FPG-sensitive) DNA-Schäden detektiert. Eine Konzentration von 100 μM HEX führt zu einem starken Anstieg an DNA-Schäden nach einstündiger Inkubation, jedoch nicht zu FPG-sensitiven Stellen. Nach dreistündiger Postinkubation sind die direkten DNA-Schäden zu einem Großteil repariert, gleichzeitig wurden FPG-sensitive DNA-Schäden nachgewiesen.

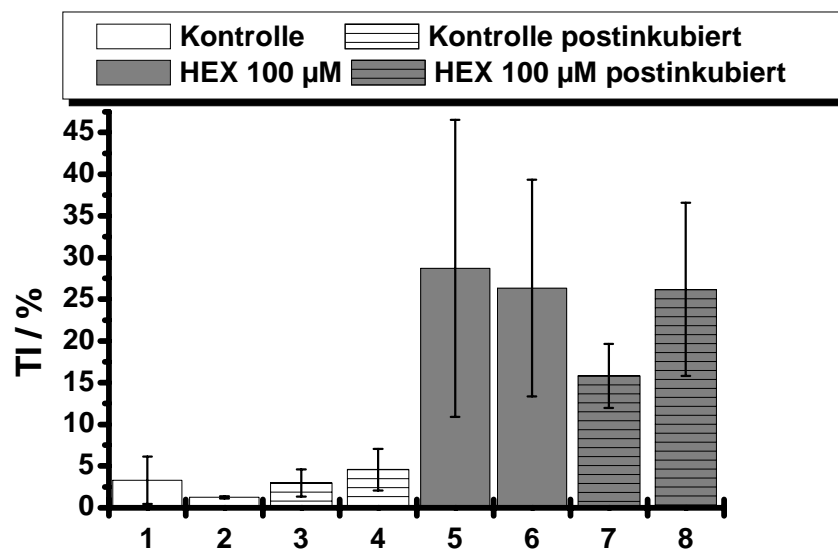


Abb. 53 Induktion oxidativer DNA-Schäden im Comet-Assay nach einstündiger Inkubation mit HEX und anschließender Postinkubation für drei Stunden; Balken 1, 3, 5, und 7 wurden mit Puffer und Balken 2, 4, 6 und 8 mit FPG behandelt; $n \geq 5$, außer für Balken 2: $n = 2$ und Balken 4: $n = 3$

4.5.5 Diskussion der Ergebnisse des modifizierten Comet-Assays

Für keine der untersuchten α,β -ungesättigten Carbonylverbindungen waren in den untersuchten Zellsystemen nach einstündiger Inkubation oxidierte Purine mittels FPG-Behandlung im Comet-Assay nachweisbar. Gleichzeitig konnte für alle Verbindungen eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber H_2O_2 vermittelten Streß nachgewiesen werden. Dies war zum Teil direkt abhängig von der Substanzkonzentration. Die Wirkung von 100 μM HEX wurde durch Ergebnisse mit niedrigeren Konzentrationen (25 und 50 μM) (Sträßer (2001); Müller (2000)) abgesichert und eine Konzentrationsabhängigkeit aufgezeigt. CHX induziert in V79 Zellen ebenfalls schon bei niedrigeren Konzentrationen (50 μM) eine erhöhte Sensitivität gegenüber künstlich induziertem oxidativen Streß (Sträßer, 2001). Eine Erklärung für die nur bei NONE und CA nachgewiesenen FPG-sensitiven Stellen nach H_2O_2 -Behandlung könnte in der geringeren Anzahl direkter H_2O_2 -bedingter DNA-Schäden liegen. Bei beiden Substanzen werden deutlich weniger direkte DNA-Schäden nachgewiesen als bei den restlichen Verbindungen, so daß ein Anstieg von spezifischen FPG-sensitiven Stellen deutlicher detektierbar ist.

Vergleicht man die durch HEX (100 μM) induzierten DNA-Schäden in Versuchen mit und ohne Postinkubation (Abbildung 29, 43 und 53), so erkennt man, daß sich das Ausmaß an DNA-Schäden stark unterscheidet. Bei dem Vergleich ist jedoch zu beachten, daß bei den einstündigen Inkubationen die Zellen als Zellsuspension der Substanz ausgesetzt waren, in der Untersuchung zur Postinkubation die Inkubation mit HEX, innerhalb der Kulturflasche durchgeführt wurde, d.h. die Zellen als Monolayer der Substanz ausgesetzt waren, der Substanz gegenüber also eine größere Angriffsfläche geboten haben, was eine mögliche Erklärung für die größere Empfindlichkeit liefern könnte.

Untersuchungen zur Induktion oxidativer Schäden durch α,β -ungesättigte Carbonylverbindungen mittels modifiziertem Comet-Assay sind bisher in der Literatur kaum beschrieben. Pool-Zobel et al. (1999) berichten von der Detektion direkter Endonuklease III-spezifischer DNA-Schäden in HT29 Klon 19A Zellen nach einer Inkubation mit 400 μM HEX. In der vorliegenden Arbeit konnten für HEX (100 μM) keine direkten oxidativen (FPG-sensitiven) DNA-Schäden beobachtet werden. Ein direkter Vergleich der Ergebnisse ist nicht möglich, da andere spezifische DNA-Modifikationen in

anderen Zellen untersucht wurden, und eine wesentlich höhere Konzentrationen eingesetzt wurde.

Die in dieser Arbeit erstmals untersuchte Induktion oxidativer/FPG-sensitiver DNA-Schäden durch α,β -ungesättigte Carbonylverbindungen bzw. die erhöhte Sensitivität verschiedener Zelllinien gegenüber künstlich induziertem oxidativen Streß (durch H_2O_2) zeigt, daß die Verbindungen HEX, OCTE, NONE, CA, CHX, HEXDI und NONDI das Gleichgewicht zwischen oxidativen und antioxidativen Zellbestandteilen stark beeinflussen. Durch die Interaktion der Substanzen mit Glutathion kommt es zu einer starken Verringerung der antioxidativen Kapazität, was sich in der Postinkubation in einer höheren Empfindlichkeit der Zellen gegenüber oxidativem Streß bemerkbar macht. Dieser Effekt tritt schon bei Substanzkonzentrationen auf, die sich im unteren mikromolaren Bereich bewegen ($\leq 100 \mu M$) und noch nicht cytotoxisch sind.

4.6 Gentoxizität in Bakterien

Für die Verbindungen HEX, CHX und HMF wurden Untersuchungen zur Gentoxizität im UMU-Test durchgeführt. Die Bakterien wurden mit der jeweiligen Substanz für zwei Stunden inkubiert. Die Ergebnisse sind dargestellt als UMU-Units in Prozent. Von einer gentoxischen Wirkung wird gesprochen, wenn der Kontrollwert um das 1,5fache überschritten wird.

4.6.1 Vorarbeiten

Zu Beginn der Untersuchungen wurde die Durchführung des Tests optimiert. Bei früheren Arbeiten (Glaab, 1997) fiel eine große Schwankung der Meßwerte auf. Es zeigte sich, daß ein entscheidender Punkt bei der Durchführung des Tests die Zerstörung der Zellmembran und die damit verbundene Freisetzung der β -Galactosidase ist. Verschiedene Einflußparameter wurden variiert, der Chloroformzusatz und die Einwirk- bzw. Durchmischungszeit. Es stellte sich heraus, daß bei Anwendung von 2,5 μ l Chloroform und einer Verteilungszeit von 5 Sekunden mittels Vortex die Meßwerte gut reproduzierbar waren.

4.6.2 (E)-2-Hexenal (HEX)

In Abbildung 54 sind die UMU-Units verschiedener HEX-Konzentrationen aufgetragen. Bei der höchsten eingesetzten Konzentration (500 μ M) betrug die Bakterienzahl nur noch 63 % der Kontrolle. Eine Induktion der SOS-Reparatur-Kaskade durch HEX war nicht festzustellen, vielmehr war eine Abnahme der UMU-Units, d.h. eine Reduktion der Galactosidase-Aktivität unter den Kontrollwert zu sehen.

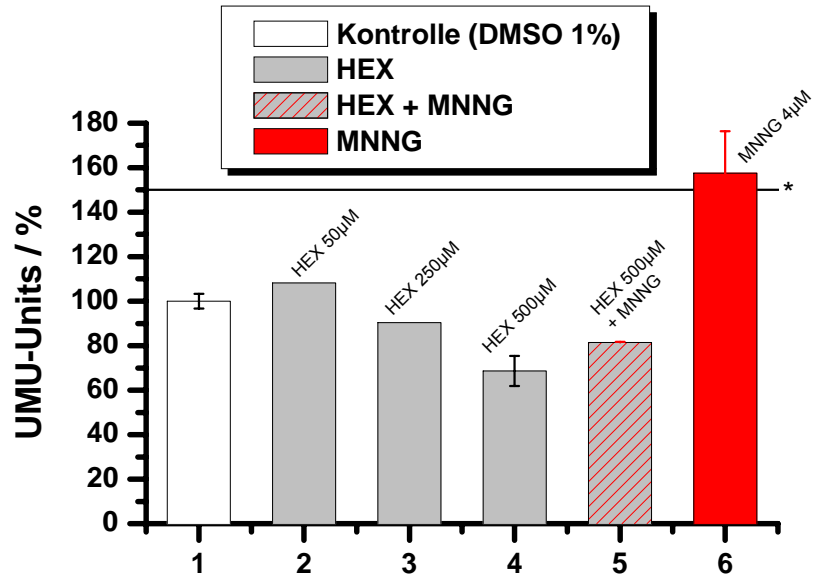


Abb. 54 Zweistündige Inkubation von *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002 mit HEX sowie Koinkubation mit MNNG, Kontrolle (DMSO) und MNNG UMU-Test: n = 3; HEX: n = 1; HEX 500 µM und HEX 500 µM + MNNG: n = 2; *: 1,5fach über Kontrolle

Die Positivprobe MNNG führte zu einer mehr als 1,5fachen Erhöhung der UMU-Units, d.h. zu einer Induktion der SOS-Reparaturenzymkaskade. Inkubierte man HEX gleichzeitig mit MNNG, so waren die UMU-Units niedriger als bei der Kontrolle.

4.6.3 2-Cyclohexen-1-on (CHX)

CHX wurde in Konzentrationen von 100 bis 1000 µM eingesetzt (Abbildung 55). Eine Erhöhung der UMU-Units über den Kontrollwert war nicht feststellbar.

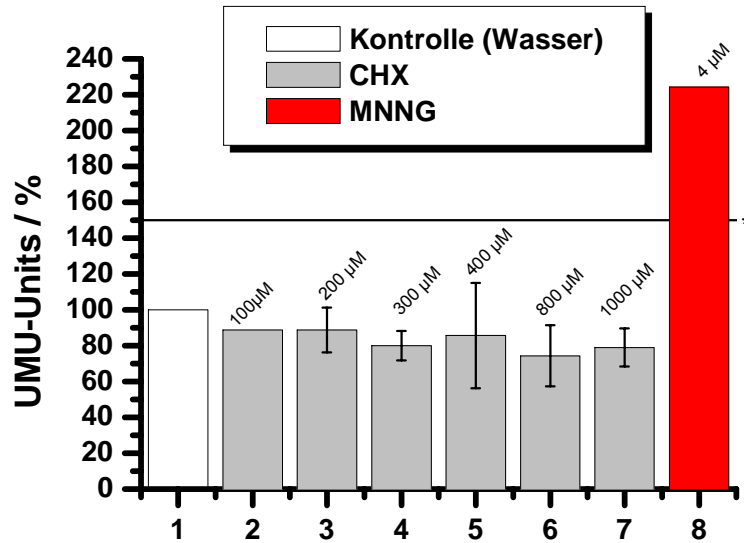


Abb. 55 Zweistündige Inkubation von *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002 mit CHX und Kontrolle (Wasser) UMU-Test: $n \geq 3$; CHX 100 µM: $n = 2$; MNNG: $n = 1$; *: 1,5fach über Kontrolle

Die Werte lagen alle ungefähr 20 Prozentpunkte unterhalb denen der Kontrolle. MNNG wurde nur in einem Versuch als Positivprobe mitgeführt und bewirkte dort eine deutliche Induktion der UMU-Units (2fach über Kontrollwert).

4.6.4 5-Hydroxymethylfurfural (HMF)

HMF zeigte einen konzentrationsabhängigen Anstieg der UMU-Units (Abbildung 56). Ab einer Konzentration von 12 mM war ein signifikanter ($P < 0,01$) und ab 16 mM ein hoch signifikanter ($P < 0,001$) Unterschied zur Kontrolle zu erkennen. Das Bakterienwachstum betrug bei der höchsten Konzentration noch 59 %. Somit konnte für HMF im UMU-Test ein gentoxisches Potential nachgewiesen werden. Die Positivkontrolle MNNG war ebenfalls eindeutig gentoxisch.

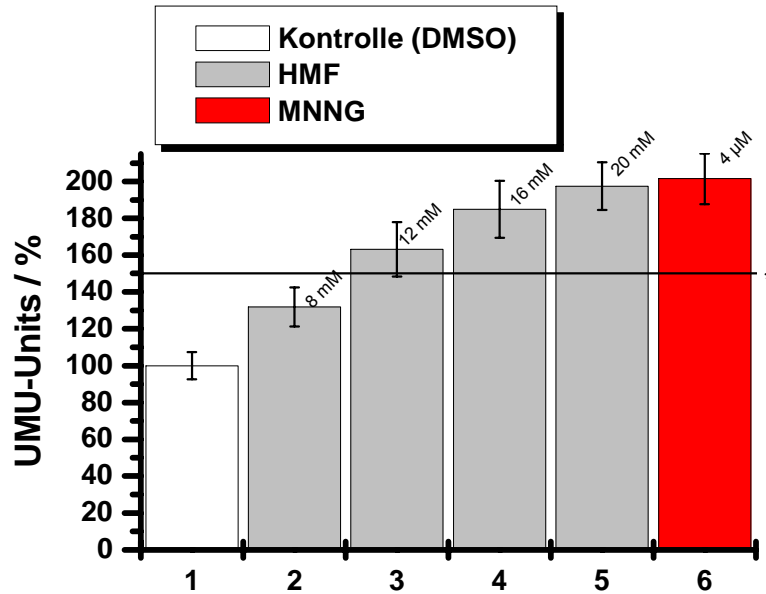


Abb. 56 Zweistündige Inkubation von *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002 mit HMF, Kontrolle (DMSO) und MNNG im UMU-Test: $n \geq 3$; HMF 8 mM: $n = 2$; *: 1,5fache über Kontrolle

In einem separaten Ansatz wurde mittels mikrosomalen Mix auf eine mögliche metabolische Aktivierung von HMF geprüft. Als Positivprobe wurde 2-Aminoanthracen (AA) verwendet. AA wird unter Einfluß von mikrosomalem Mix metabolisch aktiviert. In Abbildung 57 sind die Ergebnisse der Untersuchung dargestellt. Für HMF war keine mikrosomale Aktivierung festzustellen. Die UMU-Units bewegten sich im gleichen Bereich wie beim Ansatz von HMF mit deaktiviertem (gekochten) mikrosomalen Mix. Die durch Mikrosomen aktivierte Positivprobe AA induzierte deutlich die SOS Reparatur in *Salmonella typhimurium* TA1525/pSH1002, es kam zu einer dreifachen Erhöhung der UMU-Units.

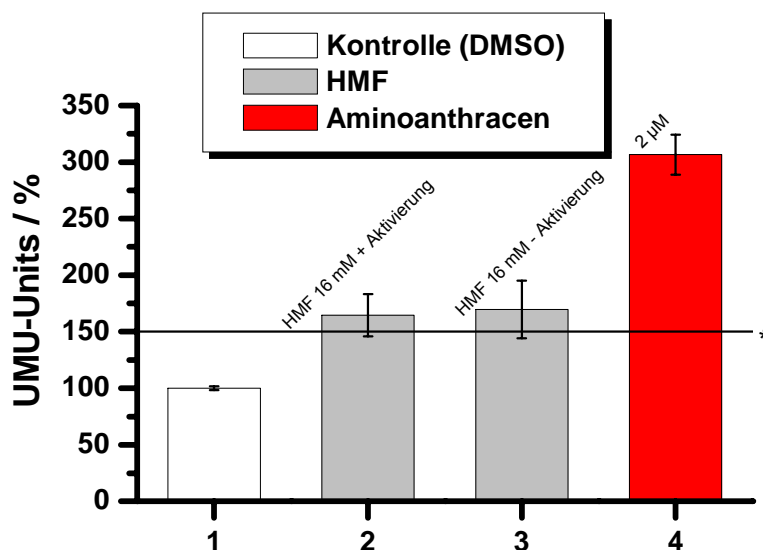


Abb. 57 Zweistündige Inkubation von HMF mit *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002, Kontrolle (DMSO) und Aminoanthracen im UMU-Test: n = 3; HMF 16 mM ohne Aktivierung: n = 2; *: 1,5fach über Kontrolle

4.6.5 Diskussion der Ergebnisse des UMU-Tests

HMF induziert im Gegensatz zu den beiden anderen untersuchten Verbindungen HEX und CHX signifikant die SOS-Reparaturenzymkaskade in *Salmonella typhimurium* TA1525/pSK1002. Eine metabolische Aktivierung von HMF mittels mikrosomalen Mix ist nicht zu beobachten.

HEX und CHX bewirken bis zur cytotoxischen Konzentration (HEX \leq 500 μ M, CHX \leq 1000 μ M) keinen Anstieg, sondern im Gegenteil eine Abnahme der UMU-Units. Ein Grund dafür könnte ein Eingreifen der Substanzen in den Mechanismus der SOS-Reparatur sein. Ein Indiz hierfür liefert die beobachtete Verminderung der UMU-Units bei kombinierten Einsatz von MNNG und HEX. Ein zusätzliches zellfreies Modell-Experiment, bei dem β -Galactosidase mit HEX inkubiert wurde, zeigte eine leicht verminderte Freisetzung von Nitrophenol aus der entsprechenden Nitrophenylgalactose. Dies deutet auf eine Inhibierung der β -Galactosidase durch HEX hin. Für CHX könnte ein ähnlicher Mechanismus angenommen werden.

Die von Kong (1988) berichtete Aktivität von HMF im UMU-Assay konnte bestätigt und eine Konzentrationsabhängigkeit der Wirkung aufgezeigt werden. Benamira und Marnett (1992) untersuchten kürzerkettige α,β -ungesättigte Carbonylverbindungen und Formaldehyd ebenfalls im UMU-Test an *Salmonella typhimurium*

TA1535/pSK1002. Die einzige Substanz, die zu einer deutlichen Induktion führte, war Formaldehyd (2,4fach über Kontrollwert). Acrolein und Crotonaldehyd führten nur zu einem geringen Anstieg über den Kontrollwert (1,2 bzw. 1,5fach über Kontrollwert). Ono et al. (1991) kamen für Formaldehyd und Acrolein zu ähnlichen Ergebnissen.

Im SOS-Chromotest, einem Gentoxizitätstest, der mit *Escherichia coli* durchgeführt wird und ebenfalls die Bildung von β -Galactosidase als Marker für die Gentoxizität nimmt, (Quillardet und Hofnung, 1985) wurden 2-Alkenale von Eder et al. (1993) untersucht. Sie konnten für HEX, OCTE, CA, HEXDI und NONDI keine Induktion der SOS-Reparatur nachweisen.

In einem weiteren Gentoxizitätstests an Rattenhepatocyten konnte nach Inkubation mit 10 μ M CHX eine außerplanmäßige DNA-Synthese (UDS) festgestellt werden (Williams et al., 1989). HEX und NONE zeigten im selben Testsystem in einer Untersuchung von Griffin und Segall (1986) erst bei 20fach höheren Konzentrationen eine Wirkung.

Die hier erwähnten 2-Alkenale und Formaldehyd, die im UMU-Test oft nur eine schwache bzw. keine Induktion der SOS Reparatur auslösen, zeigen im Ames-Test oder auch dem Rec-Assay deutlich mutagene bzw. gentoxische Wirkung (Ono et al., 1991; Eder et al., 1982; Eder et al., 1993a). Auch CHX, welches im UMU-Test nicht zu einer Induktion der SOS-Reparaturenzymkaskade führte, induzierte im Ames-Test eine schwache mutagene Wirkung (Lutz et al., 1982). Mögliche Erklärungen für das unterschiedliche Verhalten der Substanzen in den Gentoxizitätstestsystemen bzw. Bakterienmutagenitätstests könnten in der unterschiedlichen Art der ausgelösten Mutation bzw. in der Induktion von DNA-Schäden liegen. So sind z.B. die typischen DNA-Addukte der Alkenale bekannt, und man erkennt deutliche Unterschiede zwischen den Adduktypen der kürzerkettigen Vertreter und z.B. HEX (siehe Tabelle 7, Kapitel 2.4.4). Ein weiterer Faktor könnte die unterschiedliche Struktur der Verbindungen sein. Nur die kurzkettigen Vertreter der α,β -ungesättigten Carbonylverbindungen, d.h. Verbindungen mit hoher Michael-Reaktivität, zeigen eine gentoxische Wirkung im UMU-Test. Höhere Gehalte an Addukten an der DNA könnten die Unterschiede bezüglich der Gentoxizität erklären (Benamira et al., 1992). Für die Untersuchung einer gentoxischen Wirkung von α,β -ungesättigten Carbonylverbindungen scheint die Induktion eines Reportergens mit nachfolgender Expression der β -Galactosidase nicht geeignet zu sein. Dies zeigen die Ergebnisse des UMU-Tests und des SOS-Chromotests.

4.7 Induktion von Apoptose

4.7.1 Orientierende Untersuchungen mit 2-(E)-Hexenal (HEX)

Untersuchungen zur Induktion von Apoptose durch HEX wurden exemplarisch in V79 Zellen mit Hilfe der Durchflußcytometrie und einer 2-Parameterbestimmung (DNA und Protein) durchgeführt. Nach 1 h Inkubation mit der Substanz und verschiedenen Postinkubationszeiten (6 und 16 Stunden nach Inkubation) wurde auf die Induktion von Apoptose geprüft.

In den Abbildungen 58 bis 60 sind die erhaltenen Ergebnisse zusammengefaßt. In Abbildung 58 ist die Verteilung der Zellen nach einer einstündigen Inkubation mit HEX bzw. der Lösungsmittelkontrolle dargestellt. Der Prozentualeanteil der Zellen auf die verschiedenen Zellzyklusphasen unterscheidet sich nicht zwischen Kontrolle und HEX-inkubierten Zellen. Es war weder eine Induktion der Apoptose noch eine Erhöhung des Anteiles an toten Zellen gegenüber der Kontrolle festzustellen. In einem Versuch mit 300 μM HEX wurden 1,2 % apoptotische Zellen und 1,8 % Zelltrümmer detektiert.

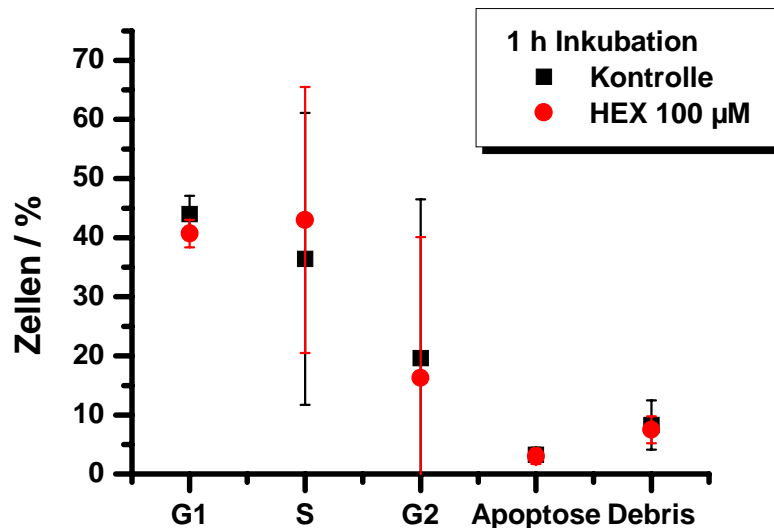


Abb. 58 Prozentuale Verteilung der V79 Zellen auf die verschiedenen Zellzyklusphasen (G1 = G₁/G₀-Phase; S = S-Phase; G2 = G₂/M-Phase) und prozentualer Anteil an apoptotischen und abgestorbenen Zellen (Apoptose und Debris); Kontrolle: n = 3 (außer Apoptose: n = 2); HEX 100 μM : n = 4 (außer Apoptose n = 2)

In Abbildung 59 sind die Ergebnisse nach einer sechsstündigen Postinkubation dargestellt.

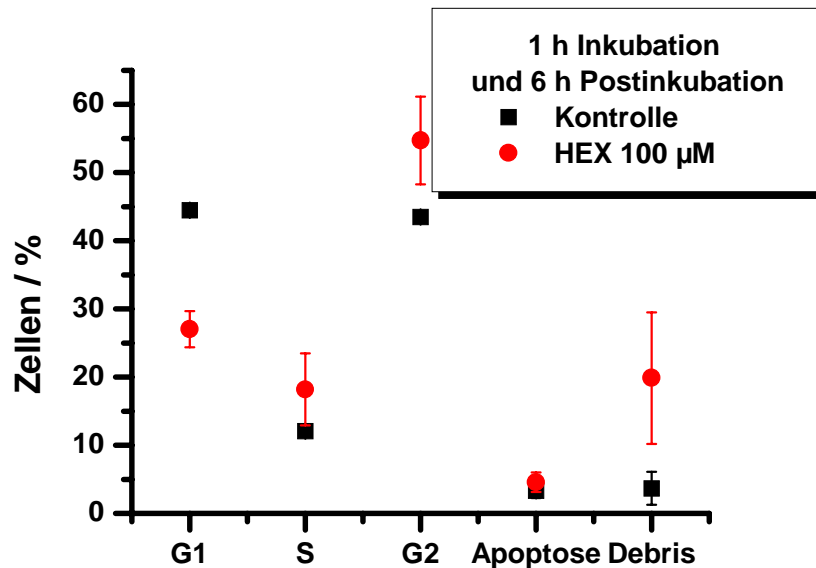


Abb. 59 Prozentuale Verteilung der V79 Zellen auf die verschiedenen Zellzyklusphasen (G1 = G₁/G₀-Phase; S = S-Phase; G2 = G₂/M-Phase) und prozentualer Anteil an apoptotischen und abgestorbenen Zellen (Apoptose und Debris); DMSO: n = 3; HEX 100 µM: n = 5

Für die mit HEX inkubierten Zellen ergab sich eine leichte Verschiebung von der G₁/G₀-Phase hin zur G₂/M-Phase. Die Kontrollzellen zeigten diese Verschiebung nicht. Eine Induktion von Apoptose konnte nicht nachgewiesen werden. Der Anteil an abgestorbenen Zellen erhöhte sich für die mit HEX behandelten Zellen deutlich.

Die Ergebnisse nach 16-stündiger Postinkubationszeit sind in Abbildung 60 zu sehen. Im Gegensatz zu den Ergebnissen direkt nach der einstündigen Inkubation war eine deutliche Verschiebung des Zellzyklus in der Kontrolle und der mit HEX inkubierten Zellen zu beobachten. Nur ein geringer Anteil der Zellen befand sich in der G₂/M-Phase. Etwas mehr als die Hälfte der Zellen befand sich in der S-Phase. Zusätzlich ist die Auswirkung einer Inkubation mit 5 mM H₂O₂-Lösung (Positivkontrolle) aufgezeigt. Die mit H₂O₂ behandelten Zellen befanden sich ebenfalls überwiegend in der S-Phase, annähernd gleich viele Zellen waren in der G₁/G₀- und G₂/M-Phase. Der Anteil an toten Zellen hat sich für die Kontrolle nicht verändert, jedoch kam es für die mit HEX inkubierten Zellen zu einem weiteren Anstieg des

Debris, verglichen zu der 6-stündigen Postinkubationszeit (annähernd 30 % tote Zellen gegenüber 20 %)

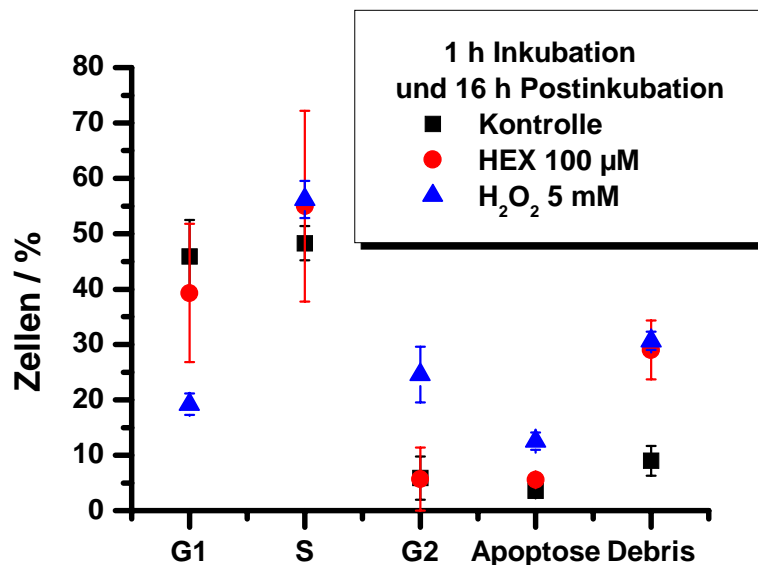


Abb. 60 Prozentuale Verteilung der V79 Zellen auf die verschiedenen Zellzyklusphasen (G1 = G₁/G₀-Phase; S = S-Phase; G2 = G₂/M-Phase) und prozentualer Anteil an apoptotischen und abgestorbenen Zellen (Apoptose und Debris); DMSO: n = 4 (außer Apoptose: n = 2); HEX 100 µM: n = 5 (außer Apoptose n = 3); H₂O₂ 5 mM: n = 5

Der Anteil apoptotischer Zellen nach HEX-Behandlung (5,6 % ± 0,4) war nur geringfügig erhöht (Kontrolle: 3,6 % ± 0,3). Für die Positivprobe H₂O₂ (5 mM) konnte ein deutlicher Anstieg an apoptotischen Zellen beobachtet werden. Hier fand man einen Anteil von 12,6 % ± 1,6 Zellen, die in Apoptose gegangen waren, das 3,5fache der Kontrolle.

4.7.2 Diskussion der in der Durchflußcytometrie erhaltenen Ergebnisse

Die Versuche zeigen, daß HEX (100 µM) in V79 Zellen weder direkt nach einer einstündigen Inkubation noch nach Postinkubation (6 und 16 Stunden) Apoptose induziert. Der Anstieg an abgestorbenen Zellen während der Postinkubation stimmt mit den Ergebnissen, die in Untersuchungen zur Wachstumshemmung erhalten wurden, gut überein. Die in dieser Arbeit beobachtete Induktion von Apoptose in V79 Zellen durch eine 5 mM H₂O₂-Lösung nach einer 16-stündigen Postinkubationszeit wurde von Hiraoka et al. (1997) bereits nach einer 6 h Postinkubation mittels DNA-

Leiter nachgewiesen. Genzlinger (1999) zeigte in ihrer Arbeit für HEX ab einer Konzentration von 100 μM einen schwachen jedoch signifikanten Anstieg an apoptotischen Zellen in der histiozytischen Lymphomzelllinie U937 bzw. in der promyelozytischen Leukämiezelllinie HL60. Weiterhin konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß das Maximum der beobachteten Apoptose zwischen 3 und 24 h nach der einstündigen Inkubation mit HEX (125 μM) liegt. Diese Ergebnisse zeigen, daß HEX zur Apoptoseinduktion befähigt ist, V79 Zellen jedoch weniger empfindlich sind. Die geringe Fähigkeit der V79 Zellen in Apoptose zu gehen, zeigen auch die Untersuchungen von Becker et al. (2001). Die Verbindungen HEXDI und NONDI zeigten schon bei niedrigeren Konzentrationen (75 bzw. 30 μM) eine ähnliche Wirkung wie HEX. CHX, welches für 24 h inkubiert wurde, verursachte in den beiden Zelllinien ab einer Konzentration von 75 μM einen hoch signifikanten Anstieg apoptotischer Zellen. In zwei anderen Zelllinien (K562; myeloische Leukämiezelllinie und Molt4 lymphoplastische Leukämiezelllinie) konnte keine Induktion von Apoptose durch die Substanzen nachgewiesen werden. (Genzlinger, 1999)

Die Versuche mit HEX ohne Postinkubation, die identisch zur Prüfung auf Induktion von DNA-Schäden durchgeführt wurden (Kapitel 4.2.2.2), deuten darauf hin, daß die beobachteten DNA-Schäden nicht auf eine apoptotische sondern auf eine gentoxische Wirkung zurückzuführen sind.

5. Gesamtdiskussion

Die Ergebnisse zur Toxizität der getesteten α,β -ungesättigten Carbonylverbindungen in V79 Zellen sind in Tabelle 17 zusammengefaßt.

Tab. 17 Toxizitätsdaten der untersuchten 2-Alkenale und CHX in V79 Zellen: Angegeben sind die berechneten LC₅₀-, DC₅₀- und D_{3C}-Werte bzw. die GSH-Depletion (Depletion auf 20 % des Kontrollwertes, geschätzte Werte); die Substanzen sind mit zunehmender Wirkungsstärke von oben nach unten angeordnet

Cytotoxizität LC₅₀	DNA-Schäden DC₅₀	Mutagenität D_{3C}	GSH-Depletion
CHX 4750 µM	CA 492 µM	CA -	CA 100 µM
CA 4450 µM	HEXDI 281 µM	HEXDI -	HEXDI 100 µM
HEX 3666 µM	CHX 272 µM	CHX** 296 µM	CHX 50 µM
HEXDI 705 µM	OCTE 191 µM	HEX 87 µM	HEX 25 µM
OCTE 545 µM	HEX 165 µM	OCTE** 35 µM	OCTE 25 µM
NONE 271 µM	NONDI 109 µM	NONE** 5 µM	NONE 25 µM
NONDI 270 µM	NONE n.b.	NONDI n.b.	NONDI 25 µM

n.b. nicht bestimmbar (aufgrund starker cytotoxischer Wirkungen)

- nicht untersucht

* Daten von Canonero et al. (1990)

** Daten von Glaab (1997)

Als grundlegender Parameter wurde die **cytotoxische Wirkung** der Verbindungen anhand der Membranintegrität untersucht. Für die einfach ungesättigten 2-Alkenale HEX, OCTE und NONE ist ein deutlicher Anstieg der cytotoxischen Wirkung mit zunehmender Kettenlänge zu beobachten. Eine entsprechende Abhängigkeit der cytotoxischen Wirkung an V79 Zellen innerhalb der homologen 2-Alkenale wurde auch von Canonero et al. (1990) und von Kaneko et al. (1988) beschrieben. Als Ursache wird die Lipophilie der Substanzen diskutiert, die mit zunehmender Kettenlänge ansteigt (Eder et al., 1992). Die Einführung einer zweiten konjugierten Doppelbindung verstärkt die cytotoxische Wirkung, wie man im Vergleich HEX zu HEXDI sieht. Unter Berücksichtigung verschiedener Cytotoxizitätsdaten wurde auch von Curvall et al. (1984) eine Erhöhung der cytotoxischen Wirkung durch eine zusätzliche konjugierte Doppelbindung (HEX/HEXDI) beobachtet. Die LC_{50} -Werte von CA und CHX sind nahezu gleich und gegenüber HEX nur leicht erhöht. Auch Curvall et al. (1984) beobachtete nur geringe Unterschiede zwischen HEX und CHX bei der Induktion von Membranschäden. Unter Berücksichtigung weiterer Cytotoxizitätsendpunkte wurde HEX als deutlich toxischer bewertet.

Hinsichtlich der **Wachstumshemmung** (24 h Inkubation; mehrtägige Nachwuchszeit) fallen die Unterschiede zwischen den Verbindungen deutlich geringer aus. Alle IC_{50} -Werte liegen zwischen 4 μ M (OCTE) und 15 μ M (CHX). Die längere Inkubationszeit erklärt die deutlich niedrigeren Wirkkonzentrationen. Unter diesen Bedingungen kommt es zu einer stärkeren Schädigung, unterschiedliche Reaktivitäten der Verbindungen scheinen in ihrer Bedeutung verringert.

Die Übertragbarkeit von der *in-vitro* auf die *in-vivo* Situation erscheint problematisch, da Parameter wie Resorption, Metabolismus und gewebespezifische Sensitivitäten der Verbindungen dabei eine wichtige Rolle spielen. In *in-vivo* Versuchen zur Bestimmung der akuten Toxizität (oral) der 2-Alkenale (C3, C4 und C6) ist eine umgekehrte Reihenfolge der Wirkungsstärke in Bezug auf die Kettenlänge beschrieben worden. Mit zunehmender Kettenlänge nimmt die Toxizität deutlich ab. Auch die starke akute toxische Wirkung von CHX (Faktor 4 stärker wirksam als HEX, siehe Tabelle 6) fällt auf.

Die **DNA-schädigende Wirkung** aller Verbindungen (außer NONE) zeigt in V79 Zellen einen konzentrationsabhängigen Anstieg. Für NONE war aufgrund starker cytotoxischer Wirkungen der Comet-Assay nicht durchführbar. Eine Unterscheidung der DNA-Schäden aufgrund cytotoxischer bzw. gentoxischer Wirkungen konnte somit

nicht vorgenommen werden. Das DNA-schädigende Potential der übrigen Verbindungen variiert zwischen NONDI (stärkste Wirkung) und CA (schwächste Wirkung) nur um den Faktor 5. Daß es sich bei den beobachteten DNA-Schäden um gentoxische und nicht um cytotoxische Wirkungen handelt, scheint durch die Prüfung auf Cytotoxizität (Trypanblau-Test) und Apoptose gesichert. Die Induktion von Apoptose war für HEX in V79 Zellen nicht nachweisbar (Kapitel 4.7).

Der Vergleich mit Literaturdaten zeigt eine gute Übereinstimmung hinsichtlich der DNA-schädigenden Wirkung von HEX (siehe Tabelle 18). Das stärkere Wirkpotential von HEX im Vergleich zu OCTE und CA und die Problematik des Überlappens von gentoxischer und cytotoxischer Wirkung, wurde auch von Eder et al. (1993a) beschrieben (siehe Tabelle 18). Eine ähnliche relative Wirksamkeit von NONDI und HEX wird auch von Dittberner et al. (1995) für cytogenetische Endpunkte in Lymphozyten und Namalva Zellen beschrieben. NONDI war in der Regel um den Faktor zwei stärker wirksam als HEX.

Tab. 18 Induktion von DNA-Strangbrüchen nach Behandlung mit α,β -ungesättigten Carbonylverbindungen: Literaturvergleich

Substanz	Ergebnis (Zelltyp)	Literatur
HEX 300 μ M	ca. 40 % DNA-Schäden (Namalva Zellen)	Eisenbrand et al., 1995
HEX 250 μ M	+ (L1210)	Eder et al., 1993a
OCTE 350 μ M	+ (L1210)	Eder et al., 1993a
CA 300 μ M	(+) (L1210)	Eder et al., 1993a

+ positiv, bei nicht cytotoxischer Konzentration

(+) positiv, bei cytotoxischer Konzentration

Mutationen am *hprt*-locus in V79 Zellen wurden in der vorliegenden Arbeit exemplarisch für die stark gentoxischen Verbindungen HEX und NONDI untersucht. NONDI induzierte starke cytotoxische Effekte schon bei geringer Konzentration (40 μ M), so daß eine Durchführung des Tests nach dem Standardprotokoll nicht mehr möglich war. Niedrigere Konzentrationen waren nicht mutagen. HEX war aufgrund cytotoxischer Wirkungen in Konzentrationen > 150 μ M nicht mehr

einsetzbar. Zwischen 100 und 150 μM war ein mutagenes Potential zu beobachten. Diese Beispiele zeigen die Probleme des Überlappens cytotoxischer und mutagener Wirkungen. Mit zunehmender Kettenlänge der homologen 2-Alkenale nimmt die mutagene Wirkung deutlich zu (Tabelle 17). CHX ist schwächer wirksam (Faktor 3) als HEX, jedoch konnte für CHX eine konzentrationsabhängiger Anstieg der Mutantenrate beobachtet werden.

Der **Glutathionspiegel** der V79 Zellen wurde wie erwartet bereits durch niedrige, nicht cytotoxische/DNA-schädigende Substanzkonzentration depletiert (siehe Abbildungen 36 und 38). Nach Aufnahme der α,β -ungesättigten Carbonylverbindungen in die Zelle steht das cytosolische GSH als primärer Reaktionspartner in Konzentrationen von 0,5 -10 mM zu Verfügung (siehe auch Kapitel 2.5.4). Die Verbindungen HEX, OCTE, NONE und NONDI waren geringfügig stärker GSH-depletierend als CHX. CHX war stärker wirksam als HEXDI und CA (Tabelle 17). Die geringe Variabilität zwischen den einzelnen Verbindungen deutet auf eine GST-abhängige Konjugation hin. Die direkte Reaktivität der Verbindungen (Esterbauer et al., 1975) scheint eine untergeordnete Rolle zu spielen. Schuhmacher (1990) konnte an Rattenhepatocyten zeigen, daß die GST-vermittelte Umsetzung von 2-Alkenalen um den Faktor 500 schneller abläuft als die spontane Reaktion. Der für HEX untersuchte zeitliche Verlauf des tGSH-Gehaltes in V79 Zellen zeigt, daß 3 Stunden nach Inkubation wieder ein Wert von ca. 50 % der Kontrolle erreicht wird. Mögliche Ursachen für den Anstieg sind die Spaltung des GSH-Adduktes (Eisenbrand et al., 1995) und/oder die Neusynthese von GSH. Die beobachteten Effekte von CHX auf den zellulären tGSH-Spiegel stimmen gut mit der von Fischmann et al. (1981) beobachteten Ergebnissen mit humanen Lymphocyten überein (20 μM CHX: < 20 % des Kontrollwert). Untersuchungen an Ratten (Boylund und Chasseaud, 1970), denen HEX, NONE, CHX und CA i.p. verabreicht wurden, zeigten für die Depletion von hepatozellulärem GSH eine andere Reihung bezüglich der Wirkungsstärke: CHX > HEX > NONE > CA.

Aufgrund der starken GSH-depletierenden Wirkung der Verbindungen wurde auf erhöhte Sensitivität gegenüber **oxidativem Streß** geprüft. Direkt nach einstündiger Inkubation von V79 Zellen mit 2-Alkenalen bzw. CHX war das Ausmaß spezifischer FPG-sensitiver DNA-Schäden nicht erhöht. Wurden die Zellen jedoch mit H_2O_2 nachbehandelt, so waren DNA-Schäden deutlich nachweisbar. Für HEX wurde zusätzlich auf oxidierte Purinbasen nach dreistündiger Postinkubationszeit geprüft.

Neben der Reparatur direkt induzierter DNA-Schäden wurden erstmals spezifische FPG-sensitive Schäden detektiert. Sträßler (2001) untersuchte aufbauend auf der vorliegenden Arbeit, die Substanzen HEXDI, CA und CHX unter identischen Bedingungen. Für alle Substanzen wurde dabei die Reparatur der direkten DNA-Schäden beobachtet, für CA wurden weiterhin spezifische FPG-sensitive Schäden festgestellt. CHX und HEXDI führten in Konzentrationen von 400 μM bzw. 300 μM nicht zu oxidativen DNA-Schäden. Somit scheint für die Induktion oxidierter Purine eine Substanzspezifität vorzuliegen, die sich durch die GSH-depletierende Wirkung der Verbindungen nicht erklären läßt. Ein Alkenal-abhängiges Auftreten oxidativer DNA-Schäden wurde bisher nur für HEX beschrieben (Pool-Zobel et al., 1999). In HT29 Zellen induzierte HEX (400 μM ; 30 minütige Inkubation) oxidative Modifikationen an Pyrimidinbasen der DNA. Die Bedeutung der 2-Alkenal/CHX abhängigen erhöhten Sensitivität gegenüber oxidativem Streß und der Induktion oxidativer DNA-Modifikationen bei Postinkubation für die gentoxische Wirkung der Verbindungen ist noch nicht geklärt.

Vergleicht man die eingesetzten **Zellsysteme** so zeigen die V79 Zellen die höchste Empfindlichkeit gegenüber α,β -ungesättigten Carbonylverbindungen. Bezogen auf die Induktion von DNA-Schäden waren die Substanzen, mit Ausnahme von HEXDI, in Caco-2 Zellen leicht schwächer wirksam als in V79 Zellen. Die primären Colonzellen zeigten die geringste Empfindlichkeit. Für die GSH-depletierende Wirkung der Substanzen wurde eine ähnliche Reihung beobachtet. Eine geringere Empfindlichkeit primärer Colonzellen gegenüber induzierten oxidativem Streß nach 2-Alkenal- bzw. CHX-Inkubation wurde ebenfalls festgestellt. Zwei bis vierfach höhere Substanzkonzentration waren erforderlich, um eine vergleichbare Wirkung wie in V79 Zellen zu erzielen. Sträßler (2001) konnte diese Ergebnisse auch für Caco-2 Zellen zeigen.

Für das **toxische/gentoxische/mutagene Potential** der Verbindungen ergibt sich folgendes Bild: In den verschiedenen Testsystemen zeigten NONE und NONDI die stärkste toxische Wirkung, gefolgt von OCTE, das vor allem bei der Induktion der DNA-Schäden und der cytotoxischen Wirkung um einen Faktor 2 schwächer wirksam war. Ähnlich wie OCTE jedoch deutlich weniger cytotoxisch verhielt sich HEX. Ein uneinheitliches Bild gibt HEXDI, zum Teil ist es toxischer als HEX (IC_{50} , LC_{50} , DC_{50} Caco-2 Zellen) in anderen Untersuchungen ist es weniger toxisch als HEX (DC_{50} V79

Zellen, GSH-Depletion). Die schwächste Wirkung innerhalb der 2-Alkenale zeigte CA.

CHX war in seiner Wirkung mit CA vergleichbar, bei der Induktion von DNA-Schäden und bei der GSH-Depletion war CHX leicht stärker wirksam. Im Vergleich zum offenkettigen Aldehyd HEX war CHX in der Regel maximal um den Faktor 2 schwächer wirksam. Bei der Induktion von DNA-Schäden in primären humanen Colonzellen und bei der Mutagenität in V79 Zellen war CHX um den Faktor 3 bis 4 schwächer als HEX.

Die strukturell verwandte Verbindung HMF wurde in einigen Versuchen mituntersucht um das toxische Profil der Verbindung zu ergänzen. HMF zeigte erst im millimolaren Bereich in den untersuchten Testsystemen toxische Wirkungen (≥ 12 mM UMU-Test bzw. 80 mM Comet-Assay, primäre humane Colonzellen) und ist somit um einen Faktor 1000 weniger wirksam als die 2-Alkenale oder CHX. Diese deutlich schwächere Wirkung von HMF deckt sich mit den Ergebnissen vorausgegangener *in-vitro* Untersuchungen (Janzowski et al., 2000a, Samimi, 1999).

Zusammenfassend läßt sich für das toxische/genotoxische/mutagene Potential der untersuchten Verbindungen folgende Reihung festlegen:

NONE, NONDI > OCTE \geq HEX \approx HEXDI > CHX \approx CA >>> HMF

Hinsichtlich einer **Risikoabschätzung** müssen neben den toxischen Wirkungen auch die täglichen Aufnahmemengen der Verbindungen berücksichtigt werden.

Für NONDI wird von einer täglichen Aufnahme zwischen 0,06 und 0,1 mg ausgegangen, für NONE von 0,2 mg und für HEXDI von 0,02 mg (Flavis Datenbank 2000). Für HEX wird die mittlere tägliche Aufnahme über die Nahrung (nur unter Berücksichtigung des natürlichen Vorkommens) von verschiedenen Quellen (Glaab 2000; Eder et al., 1999; Flavis Datenbank 2000) auf ca. 3 mg geschätzt. Daten zur Ableitung der täglichen Aufnahmemenge von OCTE, CA und CHX waren nicht verfügbar. Die Mengen an OCTE dürften im Bezug auf das Vorkommen in natürlichen Lebensmitteln (Kapitel 1.1.1) im gleichen Bereich bzw. unterhalb der Mengen von NONE liegen. Eine genaue Abschätzung der Aufnahmemenge von CA gestaltet sich schwierig, da hier in erster Linie eine Aufnahme über mit CA aromatisierte Lebensmitteln stattfindet, hierfür aber kaum Daten vorliegen. Für CHX dürften die aufgenommenen Mengen ausgehend von den höchsten Gehalten in Erfrischungsgetränken (Kapitel

1.1.2) in der Regel unter 1 mg liegen. Die mittlere tägliche Aufnahmemenge von HMF liegt zwischen 30 und 60 mg (Janzowski et al., 2000a). 2-Alkenale werden auch zur Aromatisierung von Lebensmitteln verwendet. Angaben zur Aufnahme über diesen Weg liegen in der Regel nicht vor. Für HEX werden etwa 3 mg/Person/Tag über aromatisierte Lebensmittel diskutiert, dies entspricht der Menge, die auch über natürliche Lebensmittel aufgenommen wird (Schreier, 2000), so daß sich hieraus für HEX eine tägliche Aufnahmemenge von ≈ 6 mg ableiten läßt.

Ausgehend von den vorliegenden *in-vitro* Daten scheint von den beiden toxischsten Verbindungen NONE und NONDI aufgrund des geringen Vorkommens und des starken Überlappens von cytotoxischen und DNA-schädigenden/mutagenen Konzentrationsbereichen, keine gentoxische Gefährdung auszugehen. Die Substanzen OCTE, HEXDI und CHX sind deutlich weniger toxisch und kommen ebenfalls nur in geringen Mengen vor. Für CA läßt sich aufgrund fehlender Daten keine Aussage treffen. Für HMF kommt man ausgehend von der täglichen mittleren Aufnahme auf Gehalte von 0,5 - 1 mg/kg KG. Obwohl die toxische Wirkung von HMF im Vergleich zu den 2-Alkenalen um den Faktor 1000 schwächer ausgeprägt ist, kann es gerade hier in Einzelfällen zu extrem höheren Aufnahmemengen über die Nahrung (siehe Tabelle 4) kommen.

HEX muß aufgrund seiner starken toxischen Wirkung *in-vitro* und der relativ hohen täglichen Aufnahme gesondert betrachtet werden. Wie bereits oben erwähnt, kann man für HEX eine tägliche Aufnahmemenge von ca. 6 mg annehmen. Der in der Literatur beschriebene NOAEL von HEX wurde aus Versuchen zur akuten Toxizität in Ratten ermittelt. Er liegt bei 80 mg/kg KG und stellt die Konzentration dar, bei der noch keine renale Dysfunktion beobachtet wurde (Gaunt et al., 1971). Bezieht man diesen Wert beim Menschen auf sein Körpergewicht (60 kg), so ergibt sich ein NOAEL von 4800 mg pro Person. Für die Übertragbarkeit von Tierversuchsdaten müssen jedoch verschiedene Sicherheitsfaktoren berücksichtigt werden, die z.B. die Interspeziesvarianz (Faktor 10) Intraspeziesvarianz (Faktor 10) und Risiken der Übertragbarkeit von subchronischen zu chronischen Aufnahmen (Faktor 10). Berücksichtigt man diesen Faktor 1000, so ergibt sich eine duldbare tägliche Aufnahmemenge von 5 mg pro Person, die ausgehend aus dem vorliegenden NOAEL als gesundheitlich unbedenklich angesehen werden kann, was der Größenordnung der geschätzten täglichen Aufnahmemenge von HEX entspricht.

Unberücksichtigt bleiben bei dieser Annahme jedoch die eindeutige gentoxische/mutagene Wirkung von HEX aus den vorliegenden *in-vitro* Daten, sowie die punktuell mögliche stark erhöhten Konzentrationen an HEX, vor allem in Zellen die sich in der Nähe des Resorptionortes befinden. Um eine Gesundheitsgefährdung durch HEX mit Sicherheit ausschließen zu können, erscheint es daher notwendig, daß weitergehende *in-vivo* Untersuchungen bezüglich der Resorption aus dem Gastrointestinaltrakt, des Metabolismus und der gentoxischen/mutagenen Wirkungen von HEX vorgenommen werden.

6. Material und Methoden

6.1 Geräte, Materialien und Lösungen

6.1.1 Allgemeine Geräte, Materialien und Lösungen

Zur Untersuchung eingesetzte Chemikalien:

(*E*)-2-Hexenal (HEX; CAS: 6728-26-3)

(*E*)-2-Octenal (OCTE; CAS: 2548-87-0)

(*E*)-2-Nonenal (NONE; CAS: 18829-56-6)

(2*E*,4*Z*)-2,4-Hexadienal (HEXDI; CAS: 142-83-6)

(2*E*,6*Z*)-2,6-Nonadienal (NONDI; CAS: 557-48-2)

(*E*)-2-Zimtaldehyd (CA; CAS: 14371-10-9)

2-Cyclohexen-1-on (CHX; CAS 930-68-7)

N-Methyl-N'-Nitronitrosoguanidin (MNNG; CAS: 70-25-7)

5-Hydroxymethylfurfural (HMF; CAS: 67-47-0)

Alle Substanzen wurden von Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, bezogen.

Ihre Reinheit war $\geq 95\%$

Allgemein benötigte Substanzen und Medien:

Dulbecco`s Modified Eagle Medium (DMEM) mit 4500 mg/l D-Glucose, mit 584 mg/l L-Glutamin, ohne Pyruvat, mit 15 mg/l Phenolrot [Gibco]

Dulbeccos MEM/Nutrient Mix F12 [Gibco]

Fötale Kälberserum (FKS) [Gibco]

Penicillin - Streptomycin 10000 U Penicillin/l; 10000 µg Streptomycin/l [Gibco]

Natriumpyruvat [Gibco]

Trypsin [Severa]

EDTA p.A. [Severa]

Natriumchlorid p.A. [Roth]

Kaliumchlorid p.A. [Merck]

Dinatriumhydrogenphosphat p.A. [Merck]

Kaliumhydrogenphosphat p.A. [Merck]

Natriumhydroxid p.A. [Riedel de Haen]

Caco-2 Medium:	Dulbeccos MEM/Nutrient Mix F12 + 100 ml FKS + 5 ml Penicillin/Streptomycin
PBS-Stammlösung:	5 g NaCl + 0,25 g KCl + 0,72 g Na ₂ HPO ₄ + 0,125 g KH ₂ PO ₄ auf 1 l mit bidest. Wasser auffüllen; pH-Wert 7,3-7,4
PBS-Lösung:	50 ml Stammlösung bidest. Wasser auf 500 ml auffüllen, vor Gebrauch autoklavieren
Trypsinlösung:	0,125 g Trypsin + 0,0625 g EDTA mit PBS-Lösung auf 250 ml auffüllen; pH-Wert 7,4

6.1.2 Wachstumshemmung und Cytotoxizität

Neubauerzählkammer [Fischer]

Trypanblau: 0,5 g Trypanblau
0,9 g NaCl
mit bidest. Wasser auf 100 ml auffüllen

96 Lochplatten [Greiner]

EIA-Reader [Biorad]

Filter 595nm [Biorad]

SRB-Färbung: 50 % Trichloressigsäure
0,4 % SRB gelöst in 1 % Essigsäure
10 mM Tris (pH 7,5)

6.1.3 HPRT-Test

Üblicher Zellbedarf wie unter 6.1.1 beschrieben

10 cm und 15 cm Petrischalen [Nunc; Greiner]

Medium (serumfrei): 500 ml DMEM
 +5 ml Na-Pyruvat
 +5 ml Penicillin/Streptomycin

Selektionsmedium:
(TG-Medium) 500 ml DMEM
 +25 ml FKS
 +5 ml Na-Pyruvat
 +5 ml Penicillin/Streptomycin
 +0,5 ml TG-Stammlösung

TG-Stammlösung: 9 mg 6-Thioguanin in 1 ml DMSO

Kochsalzlösung: 0,9 % NaCl

Ethanol (vergällt)

Methylenblaulösung: 0,5 % Methylenblau in Ethanol

6.1.4 Comet-Assay

Objektträger einseitig ganz mattiert 26 x 76 x 1,0 mm [Menzel; Braunschweig]

Deckgläser 24 x 24 mm [Menzel; Braunschweig]

Low Melting Point Agarose LMP [Biomme]

Normal Melting Point Agarose NMA [Roth]

Elektrophoresekammer für horizontale Gelelektrophorese [Biorad]

Wasserbad [Julabo]

Zeiss Axioskop 20, Filter Set 15 [Anregung: BP 546/12; Emission: LP 590]

Comet II [Perceptive Instruments, Suffolk, England]

Phosphatpuffer (PBS):	8,0 g NaCl 0,2 g KCl 0,2 g KH ₂ PO ₄ 1,15 g Na ₂ HPO ₄ mit bidest. Wasser auf 1 l auffüllen und mit 1 N NaOH auf pH 7,4 einstellen
NMA:	0,5 % in PBS
LMA:	0,7 % in PBS
Lyse-Lösung: (Stammlösung)	146,1 g NaCl 37,2 g EDTA 1,2 g Tris in 1 l bidest. Wasser lösen und mit NaOH (ca. 8 g) auf pH 10 einstellen 10 g N-Laurylsarcosin Na-Salz
(Gebrauchslösung):	89 % Lyse-Stammlösung 1 % Triton X-100 10 % DMSO
Elektrophoresepuffer: (Stammlösungen)	200 g NaOH in 500 ml bidest. Wasser 14,9 g EDTA in 200 ml bidest. Wasser
(Gebrauchslösung)	30 ml NaOH-Lösung 5 ml EDTA-Lösung auf 1 l mit bidest. Wasser auffüllen
Neutralisationspuffer:	48,5 g Tris auf 1 l mit bidest. Wasser auffüllen und mit HCl auf pH 7,5 einstellen

Ethidiumbromid Lösung:

(Stammlösung)	10 mg in 50 ml bidest. H ₂ O
(Gebrauchslösung)	100 µl Stammlösung + 900 µl bidest. H ₂ O

6.1.5 Bestimmung des zellulären Glutathiongehaltes

Glutathion (GSH; CAS: 70-18-8)

Glutathion Reduktase (GSR; CAS: 9001-48-3)

NADPH (CAS: 2646-71-1)

Alle oben genannten Substanzen wurden von Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, erworben.

Phosphatpuffer pH 7,5: 22,8 g K₂HPO₄
 + 13,6 g KH₂PO₄
 + 292 mg EDTA
mit bidest. Wasser auf 1000 ml auffüllen und pH
einstellen

REA-Puffer: 1,952 g MES
 + 38 mg EGTA
 + 10,2 g MgCl₂
auf 100 ml mit bidest. Wasser auffüllen und auf pH
7,5 einstellen

DTNB-Lösung: 50 mg 5,5`-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure) (DTNB)
 + 15 mg NaHCO₃
auf 10 ml mit Phosphatpuffer auffüllen
portioniert bei -20 °C lagerbar

NADPH/DTNB-Lösung: 0,15 mg NADPH
 + 5,5 µl DTNB-Lösung
pro ml Phosphatpuffer
Lösung immer frisch ansetzen

5-Sulfosalicylsäure:	16,4%ige Lösung in bidest. Wasser ansetzen
Triethanolamin-Lösung:	20%ige Lösung in bidest. Wasser ansetzen
GSR-Lösung:	3,9 U Glutathionreduktase (GSR)/10 µl Phosphatpuffer ansetzen

6.1.6 Gentoxizität in Bakterien (UMU-Test)

LB- Medium:	5 g Bacto-tryptone (Casein) + 2,5 g Bacti-yeast-extract + 2,5 g NaCl auf 500 ml mit bidest. Wasser auffüllen und mit NaOH auf pH 7,2 einstellen
TGA-Medium:	10 g Bacto-tryptone + 5 g NaCl + 10 ml 20%ige Glucoselösung auf 1000 ml mit bidest. Wasser auffüllen
Z-Puffer:	8,518 g Na ₂ HPO ₄ + 4,799 g NaH ₂ PO ₄ (Monohydrat) + 0,746 g KCl + 0,120 g MgSO ₄ auf 1000 ml mit bidest. Wasser auffüllen
Z-Puffer-Lösung:	0,35 ml Mercaptoethanol pro 100 ml Z-Puffer
Na-Carbonat-Lösung:	53 g Na ₂ CO ₃ (wasserfrei) in 500 ml bidest. Wasser gelöst
SDS 0,1 %:	0,5 g in 500 ml bidest. Wasser

Phosphat-Puffer 0,5 M pH 7,4: 100 ml 0,5 M Na₂HPO₄-Lösung
+ 100 ml 0,5 M NaH₂PO₄-Lösung auf pH 7,4 einstellen

0,1 M Na-Phosphat Puffer:
pH 7,0 39 ml einer NaH₂PO₄-Lösung (27,6 g/l)
+ 61 ml einer Na₂HPO₄-Lösung (28,4 g/l)
auf 200 ml mit bidest. Wasser auffüllen

o-Nitro-phenyl-β-D-Galacto-pyranosid-Lösung:
4 mg o-Nitro-phenyl-β-D-Galacto-pyranosid/ml 0,1 M
Na-Phosphat Puffer pH 7,0

Ampicillin-Lösung: 50 mg Ampicillin/ml bidest. Wasser

6.1.7 Induktion von Apoptose

70 % Ethanol

Kernisolationslösung (KIL)

DAPI/SR101 Färbelösung

Die beiden Lösungen wurden freundlicherweise von Herrn Romanakis (Westpfalzkl-
nikum Kaiserslautern) zu Verfügung gestellt.

6.2 Methoden

6.2.1 Zellkultur

Die Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Zellen wurden in einem Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die letzte Passagierung vor einem Test wurde mindestens 24 h vor Testbeginn durchgeführt. Routinemäßig wurden die Zellen auf Mykoplasmenbefall geprüft. Bei Mykoplasmen handelt es sich um die kleinsten sich selbst vermehrenden Prokaryonten. Sie sind zwischen 0,22 µm und 2 µm groß und können daher nicht von Sterilfiltern zurückgehalten werden. Mykoplasmen können den Stoffwechsel der Wirtszellen beeinflussen. Identifizieren kann man sie mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskop (Anregung: 365 nm, Emission: 420 nm), nachdem ihrer DNA mit DAPI gefärbt wurde (Lindl, 1987). Die Mykoplasmen sind dann als kleine, hell leuchtende Punkte zu erkennen.

6.2.1.1 V79 Zellen

Die benutzten V79 Zellen wurden freundlicherweise von Prof. Dr. J. Döhmer, TU München, zur Verfügung gestellt. Zum Einsatz kamen nur Zellen der Parentalzelllinie. Kultiviert wurden die Zellen in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), supplementiert mit 10 % FKS, 1 mM Na-Pyruvat, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (alles erworben von Life Technologie GmbH, Eggenstein). Einstündige Inkubationen wurden in serumfreien Kultur-Medium durchgeführt. Nach der Inkubation wurde das Inkubationsmedium bei anschließender Postinkubationen verworfen, die Zellen mit PBS gespült und anschließend in Kulturmedium weiter kultiviert. Für die Untersuchungen mit Zellsuspensionen von V79 Zellen, wurden 2×10^6 Zellen/ml verwendet.

6.2.1.2 Caco-2 Zellen

Die verwendeten Caco-2 Zellen wurden vom Deutschenkrebsforschungszentrum (DKFZ), Heidelberg, bezogen. Kultiviert wurden die Zellen in DMEM/Nutrient-Mix F12, angereichert mit 20 % FKS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin

(Life Technologie GmbH, Eggenstein). Inkubiert wurde immer im serumfreien Medium (identisch mit Kultur-Medium, jedoch ohne Zusatz von FKS).

6.2.2 Primäre humane Colonzellen

Primäre humane Colonzellen wurden aus Biopsieproben des Colon Sigmoidum gewonnen. Die Biopsieproben wurden von Prof. Dr. F.W. Albert, und seinem Team, Westpfalzkrankenhaus, Kaiserslautern, den Patienten entnommen und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die Arbeiten mit Biopsieproben wurden von der Ethik-Kommission der Landesärztekammer Rheinland-Pfalz genehmigt. Die Isolierung der Zellen lehnt sich an die von Pool-Zobel et al. (1999) veröffentlichte Methode an. Die Gewebeprobe, welche nach ihrer Entnahme in HBSS-Lösung bei 4 °C aufbewahrt wurden, wurden innerhalb von 2 bis 4 Stunden nach der Entnahme aufgearbeitet. Das Gewebe wurde zunächst mechanisch mittels einer Schere zerkleinert. Anschließend wurden die Zellen in einer HBSS-Lösung (pH 7,4), die zusätzlich Proteinase K und Kollagenase (2 mg/ml und 1 mg/ml) enthielt, für 30 Minuten bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 6 Minuten bei 900 UPM abzentrifugiert. Danach wurden die Zellen in DMEM (ohne FKS) aufgenommen. Für die verschiedenen Untersuchungen wurden die Zellen auf eine Zellzahl von $2,5 \times 10^5$ Zellen/ml eingestellt und gleichzeitig ihre Viabilität bestimmt. Bei den unterschiedlichen Versuchen mit diesen Zellen wurden Inkubationszeiten von 30 Minuten gewählt.

6.2.3 Kultivierung von *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002

Von der gefrorenen, in flüssigem Stickstoff konservierten Kultur wurde unter sterilen Bedingungen mit Hilfe eines Holzstäbchens ein wenig entnommen und in 25 ml LB-Medium (mit 10 µl Ampicillin-Lösung) im verschraubbaren sterilen Erlenmeyer suspendiert. Der Ansatz wurde bei 37 °C und ca. 160 UPM mit einem leicht geöffnetem, fixiertem Schraubverschluß über Nacht (ca. 14 Stunden) inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Bakterienkultur in einem sterilen Erlenmeyer 1:40 mit TGA-Medium (mit 12 µl Ampicillin-Lösung) verdünnt und bei 37 °C und 160 UPM weiterkultiviert. Die Weiterkultivierung erfolgte so lange, bis eine Bakteriendichte erreicht wurde, die bei einer Wellenlänge von 600 nm in einem UV/VIS-Photometer zu einer Extinktion zwischen 0,25 - 0,30 führte. Bis zur anschließenden Versuchs-

durchführung wurde die Bakterienlösung auf Eis gestellt, um das Bakterienwachstum zu unterbrechen.

6.2.4 Testmethoden

Die theoretischen Hintergründe der verwendeten Testmethoden sind in den Kapiteln 2.5.1 bis 2.5.6 beschrieben.

6.2.4.1 Wachstumshemmung (Sulforhodamin-B-Test; SRB-Test)

Durchführung: 400 Zellen in 250 µl Kulturmedium wurden in je einem Loch einer 96-Loch-Mikrotiterplatte ausgesät, wobei jeweils die Löcher am Rand leer gelassen wurden, um Randeffekte auszuschließen. Die Platten wurden anschließend für 24 h im Brutschrank kultiviert, um die Zellen anwachsen zu lassen. Nach dieser Zeitspanne wurde das Kulturmedium verworfen, die Zellen mit PBS gewaschen und Inkubationsmedium, welches die in DMSO gelösten Substanzen enthielt, auf die Zellen aufgebracht. Nach einer Inkubationsdauer von 24 h wurde das Inkubationsmedium abgesaugt, die Zellen gewaschen und Kulturmedium zugegeben. Die Zellen wurden solange kultiviert, bis die Kontrollzellen eine Konfluenz von ungefähr 70 % erreichten, dies war in der Regel nach 4 - 5 Tagen der Fall. Die anschließende Fixierung und Färbung des Proteins orientierte sich weitestgehend an der Arbeit von Skehan et al. (1990). Die am Boden haftenden Zellen wurden durch eine 10 % Trichloressigsäure (1 h, 4 °C) fixiert, anschließend wurden die Platten mit Leitungswasser ausgewaschen und getrocknet. Zur Färbung des fixierten Proteins wurden 50 µl SRB-Lösung in jedes Loch gefüllt. Nach 30 Minuten wurde die ungebundene Farbe mit 1 % Essigsäure ausgewaschen. Anschließend wurde der ans Protein gebundene Farbstoff mittels Tris-Puffer (200 µl/Loch) extrahiert und die Extinktionen in einem Plate-Reader bei 570 bzw. 596 nm bestimmt. Die ermittelten Extinktionen der jeweiligen Konzentrationen (für jede Konzentration erhält man 12 Einzelwerte) wurden gemittelt und anschließend ins prozentuale Verhältnis zur Kontrolle gesetzt. Die Kontrolle wurde für jeden Versuch immer mit 100 % angenommen. Anschließend wurden die Ergebnisse in Graphen dargestellt, wobei das Wachstum des Mittelwertes in % gegen die Konzentrationen aufgetragen wurde. Zum besseren Vergleich der Substanzwirkungen wurde die Konzentration berechnet, die zu einer 50%igen

Inhibierung des Zellwachstums führt, der sogenannte IC_{50} -Wert. Dazu wurden die Daten einer log-probit-Transformation unterzogen, und der IC_{50} -Wert mit Hilfe des Computerprogrammes Origin berechnet. Die IC_{50} -Werte der unabhängigen Versuche wurden gemittelt und der Mittelwert mit Standardabweichung ($n \geq 3$) oder Spannweite ($n = 2$) angegeben.

6.2.4.2 Cytotoxizität (Trypanblau-Test)

Zur Bestimmung der Cytotoxizität wurde der Trypanblau-Test verwendet. Mit ihm wird die Membranintegrität der Zellen erfaßt. Bei Zellen mit funktionierender unzerstörter Membran gelangt der Farbstoff nicht in die Zelle, tote Zellen mit zerstörter Membran nehmen den Farbstoff auf und erscheinen unter dem Mikroskop blau. Zur Bestimmung der Cytotoxizität wurde ein Aliquot (50 μ l) der Zellsuspension mit 50 μ l Trypanblaulösung (0,4 % Trypanblau in PBS) gut vermischt und 10 μ l dieser Lösung wurden umgehend in einer Neubauerzählkammer ausgezählt (Lindl, 1987). Die Viabilität der Zellen wurde prozentual ausgerechnet, wobei die lebenden Zellen ins Verhältnis zur Gesamtzellzahl gesetzt wurden (Viabilität in Prozent).

6.2.4.3 DNA-Schädigung (Comet-Assay)

Der schematische Ablauf der Durchführung des Comet-Assays ist in Abbildung 61 dargestellt, einschließlich der Modifikationen zum Nachweis FPG-sensitiver Stellen. Die Durchführung des Test orientiert sich an der von Singh et al. (1988) beschriebenen alkalischen Methode. Die Zellen wurden entweder in 10 ml Reaktionsgefäßen (bei Inkubationszeiten ≤ 1 Stunde) oder in 75 cm² Kulturflaschen (bei Inkubationszeiten > 1 Stunde) mit den Substanzen inkubiert. Die Inkubation in den Kulturflaschen wurde gewählt, um ein Absterben der Zellen bzw. ein zu starkes Anhaften an der Gefäßwandung und ein Verklumpen der Zellen in den Reaktionsgefäßen bei längerer Inkubationsdauer zu vermeiden. Anschließend wurden die Zellen trypsiniert oder es wurde direkt ein Aliquot (50 μ l) der Zellsuspension für die Zellzählung entnommen und die restlichen Zellen in Portionen von 1×10^5 Zellen (V79 Zellen) bzw. 5×10^4 Zellen (Colonzellen) auf 1,5 ml Reaktionsgefäße verteilt und abzentrifugiert (5 Minuten bei 900 UPM und 4 °C). Die folgenden Arbeitsschritte erfolgten im Eisbad und im abgedunkelten Raum. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in

50 µl low-melting Agarose aufgenommen, resuspendiert und auf mit normal-melting Agarose vorbeschichtete Objektträger aufgetragen und mit einem Deckglas bedeckt. Nach Verfestigung der Agarose wird das Deckglas entfernt und die Objektträger für mindestens 1 Stunde in eine Lyselösung gestellt. Nach der Lyse wurden die Objektträger in eine horizontale Gelelektrophoresekammer gelegt, die mit einem alkalischen Elektrophoresepuffer (4 °C) gefüllt war und die Objektträger vollständig bedeckte. Nach einer 20 minütigen Wartezeit, in der die Entwindung der DNA stattfand, schloß sich eine Elektrophorese (25 V, 300 mA) für 20 Minuten an. Nachfolgend wurden die Objektträger dreimal mit einem Neutralisationspuffer neutral gewaschen, leicht getrocknet, mit 50 µl Fluoreszenzfarbstoff (Ethidiumbromid) behandelt und mit einem Deckglas in einer feuchten Box bei 4 °C bis zur Auswertung aufbewahrt. Die Auswertung erfolgte in der Regel einen Tag nach der Durchführung des Tests am Fluoreszenzmikroskop (Anregung: BP 546/12, Emission LP 590) mit Hilfe des Softwareprogrammes Comet II der Firma Perceptive Instruments, Suffolk, UK. Es wurden für jede Konzentration eines Versuchs 2 x 50 Zellen ausgewertet, wobei die Zellen mäanderförmig ausgezählt und Zellen, die sich am Rand der Agaroseschicht befanden, nicht berücksichtigt wurden.

Comet-Assay

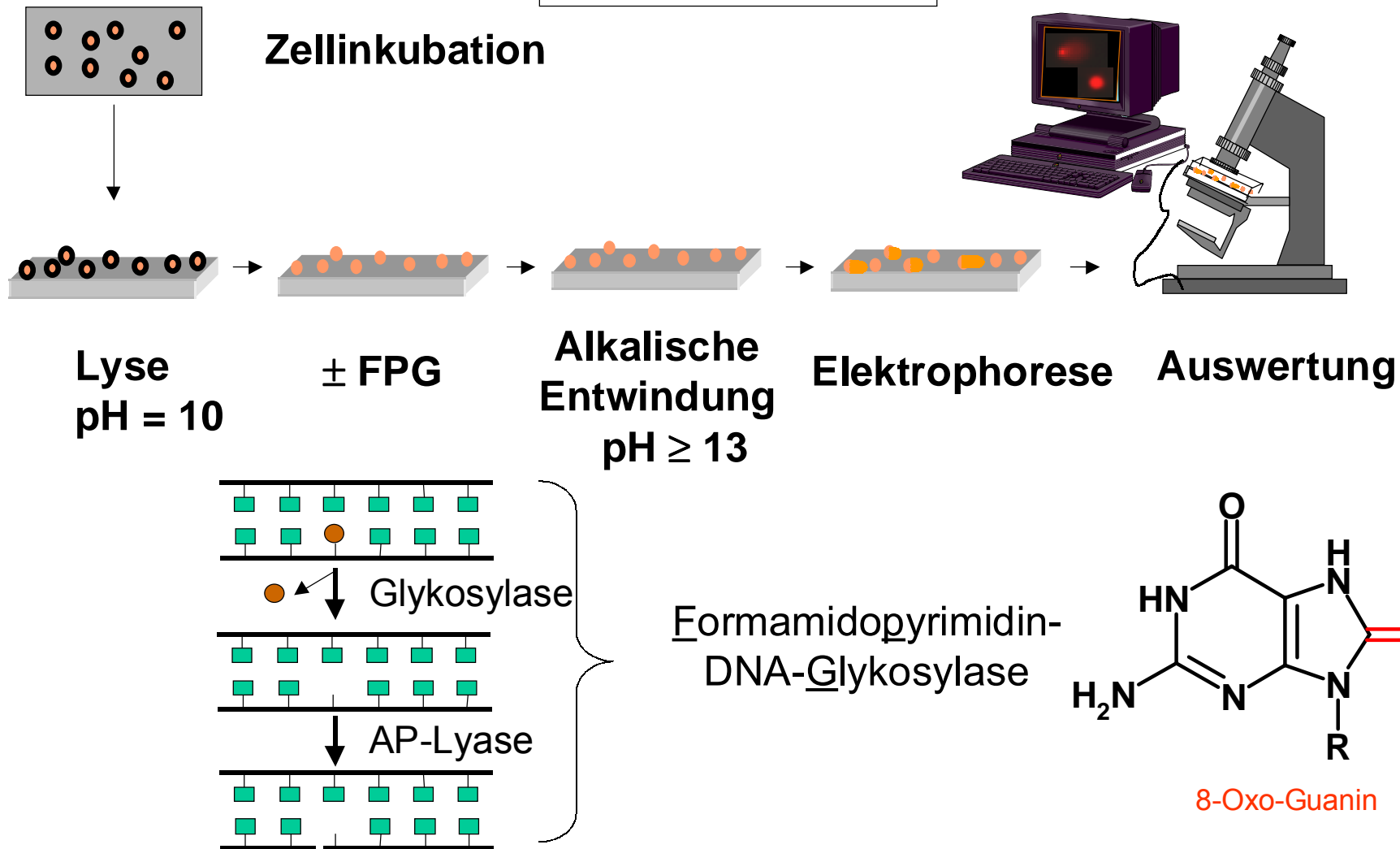


Abb. 61 Schema der Durchführung des Comet-Assays

Als Parameter zur Einstufung der DNA-schädigenden Wirkung der Substanzen wurde die sogenannte „tail intensity“ (TI) herangezogen. Sie gibt den prozentualen Anteil der DNA-Menge an, die sich im Schweif befindet (Kassie et al., 2000). Nach erfolgter Auswertung der Zellen wurden die erhaltenen TI's in verschiedenen Schädigungsklassen analog einer früheren Einteilung nach Schweiflänge eingeteilt (Pool-Zobel et al., 1993; Gölzer et al., 1996). In Tabelle 19 ist die Einstufung der TI's in die verschiedenen Schädigungsklassen dargestellt.

Tab. 19 Einteilung der TI nach Schädigungsklassen

TI %	Klassifizierung
< 17	ungeschädigt
$17 \leq 60$	mittel geschädigt
> 60	stark geschädigt

Für die Einteilung ungeschädigter Zellen wurde ein relativ großer TI-Bereich gewählt, um nur deutlich positive Ergebnisse zu erfassen. Die Darstellung erfolgte meist als Punktediagramm, bei dem die ungeschädigten Zellen gegenüber der eingesetzten Konzentration dargestellt wurden. Zum Teil, vor allem bei der Darstellung der DNA-schädigenden Wirkung in primären humanen Colonzellen, wurde die Verteilung der Zellen in die unterschiedlichen Schädigungsklassen als Balkendiagramm dargestellt. Als weitere Größe zu einer besseren Quantifizierung des gentoxischen Potentials wurde erstmals der sogenannte DC₅₀-Wert, der sich an die bekannten IC₅₀ und LC₅₀-Werte anlehnt, eingeführt. Der DC₅₀-Wert gibt die Konzentration an, bei der 50 % der Zellen DNA-Schäden aufweisen, d.h. deren TI größer bzw. gleich 17 % ist. Wenn eine Konzentrationsabhängigkeit der DNA-Schädigung vorlag, wurde zur Berechnung des DC₅₀-Wertes eine log-probit Transformation der Dosis-Wirkungskurve durchgeführt.

6.2.4.4 HPRT-Test

Der HPRT-Test bietet die Möglichkeit, Vorwärtsmutationen in Säugerzellen festzustellen. Als Zelllinie wurden V79 Zellen eingesetzt. Die Durchführung orientierte sich an die von Canonero et al. (1990) beschriebene Methode. V79 Zellen wurden

mit einer Zelldichte von 1×10^6 Zellen pro Konzentrationsansatz in 75 cm^2 Kulturflaschen ausgesät. Nach einer 24-stündigen Anwachszeit wurden die Zellen mit der Testsubstanz für eine Stunde in serumfreien Medium inkubiert. Da es sich bei den untersuchten Substanzen um flüchtige Stoffe handelt, wurde die Inkubation in einem separaten Brutschrank durchgeführt. Nachfolgend sind die einzelnen Schritte der Durchführung detailliert zusammengefaßt.

Durchführung

0. Tag: Pro Konzentration werden 1×10^6 Zellen in 75 cm^2 Flaschen ausgesät.
1. Tag: Das Medium wird abgegossen und der Monolayer 2x mit PBS gewaschen. Das Inkubationsmedium (15 ml) wird in die Flasche gefüllt und für 1 Stunde inkubiert. Nach der Inkubation wird das Inkubationsmedium abgegossen, die Zellen 2 mal mit PBS gewaschen und Kulturmedium zugegeben.
2. Tag: Die Zellen werden passagiert und gleichzeitig die Zellzahl ermittelt. In neue Kulturflaschen werden erneut 1×10^6 Zellen ausgesät.
4. Tag: Passage wie am 2. Tag
6. Tag: Die Zellen werden abtrypsinisiert, und es werden pro Konzentration 3 Flaschen mit 1×10^6 Zellen ausgesät. Als Medium wird nun das Selektionsmedium (TG-Medium) benutzt. Gleichzeitig wird eine Kontrolle zur Erfassung der cytotoxischen Wirkung der Substanzen angesetzt. Dazu werden 240 Zellen in Petrischalen mit N-Medium ausgesät.
- 13.-16. Tag: Die überlebenden Zellen haben Kolonien gebildet, die gut mit dem Auge wahr genommen werden können. Der Test wird abgebrochen. Dazu wird das Medium abgegossen und die Zellen zweimal mit Kochsalzlösung gespült. Zum Fixieren der Kolonien werden 5 ml Ethanol (-18°C) für 15 min zugegeben, anschließend abgegossen und für die Färbung der Zellen ethanolsche Methylenblaulösung für 30 Minuten auf die Zellen einwirken gelassen. Danach wird der ungebundene Farbstoff abgegossen und die Kolonien mit Leitungswasser gewaschen. Anschließend werden die gebildeten Kolonien ausgezählt.

Die Anzahl der Mutanten wurde im Bezug auf die jeweiligen Konzentrationen angegeben. Lag die Mutantenzahl der Substanzinkubationen um den Faktor 3 über der Kontrolle, so kann man von einer mutagenen Wirkung sprechen (Bradley et al.,

1981). Zum besseren Vergleich der mutagenen Wirkung eignet sich die Berechnung des mutagenen Potentials. Unter dem mutagenen Potential versteht man die Konzentration (μM) der Verbindung, die zu einer Xfachen Erhöhung der Mutantenzahl im Vergleich zur Kontrolle führt (Bradley et al. 1981).

In der Regel wird der D_{3C} berechnet, d.h. der Wert, der zu einer 3fachen Erhöhung der Mutantenzahl führt. Folgend ist die Formel zur Berechnung von D_{3C} aufgeführt.

$$D_{3C} = \frac{3CD}{Y}$$

C: spontane Mutationsfrequenz
Y: beobachtete Mutationsfrequenz bei Konzentration D

6.2.4.5 Glutathionbestimmung

Bei der hier angewendeten Glutathionbestimmung wurde ein Verfahren gewählt, das sich an die Bestimmung von Akerboom und Sies, (1981) anlehnt. Bei diesem Verfahren wird der Gesamtglutathiongehalt ($t\text{GSH} = \text{GSH} + \text{GSSG}$) bestimmt. Es handelt sich um einen kinetischen Assay, in dem GSH, GSSG und Glutathionreduktase (GSR) kontinuierlich 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure) (DTNB) in einer NADPH abhängigen Reaktion zu 5-Thio-2-Nitrobenzoat (TNB) reduzieren. In Abbildung 62 ist das Schema der Reaktion dargestellt.

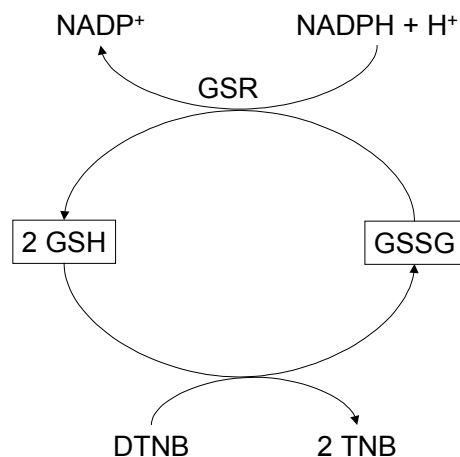


Abb. 62 Reduktion von 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure) (DTNB) in einer NADPH abhängigen Reaktion zu 5-Thio-2-nitrobenzoat (TNB), in Anwesenheit von GSH und GSSG

Die Bildung von TNB wurde über die Absorption bei 412 nm zeitlich verfolgt. Die Geschwindigkeit der TNB Bildung war proportional zur $t\text{GSH}$ Konzentration. Die

Berechnung der tGSH Konzentration erfolgt durch Vergleich mit entsprechenden Standardlösungen.

Durchführung der GSH-Bestimmung: Nach Inkubation der Zellen (V79, Caco-2 und primäre humane Colonzellen) wurde ein Aliquot (50 µl) zur Bestimmung der Viabilität entnommen und der Rest der Zellsuspension zentrifugiert (2000 UPM, 7 Minuten, 4 °C). Das Inkubationsmedium wurde verworfen, die Zellen mit PBS gewaschen, nochmals zentrifugiert und anschließend in einem halben Milliliter REA-Puffer aufgenommen. Durch mehrmaliges Schockgefrieren wurden die Zellmembranen zerstört und ein Aliquot (2 x 50 µl) zur Bestimmung des Proteingehaltes entnommen. Die Bestimmung des Proteingehaltes erfolgte mittels eines photometrischen Assays mit Bischinolincarbonensäure (BCA-Assay; Pierce, Rockford USA). Das restliche Homogenisat wurde abzentrifugiert und der Überstand (350 µl) bzw. die in Wasser gelösten Standards mit Sulfosalicylsäure (153 µl) behandelt und für 20 Minuten zur Proteinfällung auf Eis gestellt. Das ausgefallene Protein wurde bei 13000 UPM, 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand (450 µL) wurde mit Triethanolamin (20%ige Lösung, 54 µl) neutralisiert. Für jede Konzentration wurden zweimal 50 µl entnommen und in zwei Küvetten mit 940 µl einer NADPH/DTNB-Lösung versetzt. Vor Zugabe der GSR wurde die Absorption zum Zeitpunkt 0 bestimmt und 2 Minuten nach Zugabe der 10 µl GSR erfolgte die Messung des zweiten Absorptionwertes. Die erhaltenen Probenwerte wurden mit den Eichwerten verglichen. Unter Berücksichtigung der Proteinwerte erfolgte die Angabe der Glutathiongehalte in nmol GSH pro mg Protein. Zur Darstellung der Depletion wurden die tGSH-Gehalte in ihrem prozentualen Verhältnis zur Kontrolle (100 %) angegeben und gegenüber der eingesetzten Konzentration aufgetragen.

6.2.4.6 Oxidative DNA-Schäden

Oxidative DNA-Schäden wurden mittels eines modifizierten Comet-Assays detektiert. Dabei wurden überwiegend die gleichen Schritte durchgeführt wie bei der Durchführung des Comet-Assays in Kapitel 6.2.4.3 beschrieben. Nach der Lyse wurde ein zusätzlicher Schritt eingefügt (siehe Abbildung 61). Die Zellen wurden 3 mal mit Enzympuffer gewaschen und anschließend mit FPG Enzym bzw. mit Enzympuffer für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Dabei wurde das von A.R. Collins, Rowett Research Institute, Aberdeen, Schottland Großbritannien, freundlicherweise zur Verfügung

gestellte Enzym 3000fach verdünnt eingesetzt. die folgenden Schritte wurden wie in 6.2.4.3 dargestellt durchgeführt. Die Auswertung der DNA-Schäden (inklusive FPG-sensitiver Stellen) erfolgte anhand der Mittelwerte der TI-Werte der ausgezählten Zellen pro Objektträger. Diese Art der Auswertung wurde gewählt, da sie erlaubt, die Ergebnisse differenzierter darzustellen; kleinere Effekte können besser sichtbar gemacht werden. Der gemittelte TI in % wurde gegen die eingesetzten Konzentrationen als Balkendiagramm aufgetragen.

6.2.4.7 UMU-Test

Der UMU-Test sollte als Screeningtest zur Untersuchung der gentoxischen Potentiale der Verbindungen eingesetzt werden. Infolge der Interaktion der Substanz mit der DNA sollte es zur Auslösung der SOS-Reparaturenzymkaskade kommen, infolge dessen auch die Bildung der β -Galactosidase induziert wird. Die β -Galactosidase Konzentration kann dann durch Spaltung des o-Nitro-phenyl- β -D-Galactopyranosid und der Bildung von Nitrophenol erfaßt werden.

Für den Test wurden die in Kapitel 6.2.3 beschriebenen Bakterien eingesetzt. Die Durchführung orientierte sich an der von Oda et al. (1985) beschriebenen Methode. Zunächst wurden die Bakterien analog dem folgenden Schema mit der potentiell gentoxischen Substanz für zwei Stunden in 10 ml Reaktionsgefäßen inkubiert.

Reagenz	Blindwert	Probenwert
Puffer 0,5 M, pH 7,4	150 μ l	150 μ l
bideist. H ₂ O	220 μ l	220 μ l
Substanz	7,5 μ l (Lösungsmittel)	7,5 μ l
Bakterien	1125 μ l	1125 μ l
Inkubation bei 37 °C und maximaler Rüttelgeschwindigkeit im Wasserbad für 2 Stunden		

Danach wurden die Bakterien für jede Bestimmung in 4 Reaktionsgefäße á 2 ml aufgeteilt und nach folgendem Schema weiter behandelt.

Reagenz	Blindwert	Probenwert
Bakteriensuspension nach Inkubation	/	100 µl
bidest. H ₂ O	100 µl	/
Z-Puffer Lösung	900 µl	900 µl
SDS 0,1 %	25 µl	25 µl
Chloroform	2,5 µl	2,5 µl
Vortex (5 Sekunden)		
o-Nitro-phenyl-β-D-Galactopyranosid-Lösung	100 µl	100 µl
Inkubation bei 37 °C im Wasserbad für 15 Minuten		
Na ₂ CO ₃ -Lösung	500 µl	500 µl

Anschließend wurden die Lösungen in Küvetten überführt. Kam es infolge einer Auslösung der SOS-Reparaturenzymkaskade zu einer Bildung von β-Galactosidase, so konnte deren Aktivität durch Zugabe des Substrats des o-Nitro-phenyl-β-D-Galactopyranosid erfaßt werden. Die β-Galactosidase spaltet das Substrat, das gebildete Nitrophenol konnte photometrisch bei 420 nm detektiert werden. Zur Absicherung der Ergebnisse wurde immer eine Doppelbestimmung durchgeführt. Wurde zusätzlich noch auf eine mögliche metabolische Aktivierung der Substanz durch Mikrosomen getestet, so wurde das oben genannte Schema leicht variiert. Neben den Mikrosomen (5-100 µg Protein pro Milliliter Bakteriensuspension) wurde auch ein NADPH-generierendes System benötigt (0,5 mM Glucose-6-phosphat + 0,75 IU Glucose-6-phosphatdehydrogenase + 1 mM NADP⁺). Die Erhöhung des Volumens durch diese Komponenten wurde durch Verminderung des Volumens an bidest. Wasser ausgeglichen.

Die photometrische Messung erfolgte bei 3 verschiedenen Wellenlängen. Bei 420 nm wurde die Absorption durch o-Nitrophenol und die durch die Zelltrümmer verursachte Lichtstreuung gemessen. Die Absorption, die durch o-Nitrophenol verursacht wurde, wurde durch die Messung bei 550 nm korrigiert. Bei dieser Wellenlänge trägt nur die Lichtstreuung an den Zelltrümmern zum Messeffekt bei. Zusätzlich wurde das Bakterienwachstum bei 600 nm bestimmt. (Miller 1972)

Die Induktion der Genexpression berechnet sich nach folgender Formel, wobei die oben genannten Werte der jeweiligen Messungen berücksichtigt werden (Shimada et al. 1994):

$$\text{UMU-Units (Units/ml)} = \frac{1000 \times (A_{420} - 1,75 \times A_{550})}{15(\text{min}) \times 0,1(\text{Verdünnung}) \times A_{600}}$$

A_{420} : Absorption bei 420 nm

A_{550} : Absorption bei 550 nm

A_{600} : Absorption bei 600 nm

Die absoluten UMU-Units wurden in relative Units (bezogen auf die Kontrolle) umgerechnet und gegen die eingesetzte Konzentrationen als Balkendiagramm aufgetragen. Ab einer Erhöhung der UMU-Units um mehr als das 1,5fache der Kontrolle spricht man von einer schwachen gentoxischen Wirkung der Substanz (Ono et al., 1991).

6.2.4.8 Apoptose-Messung

Für die Messung apoptotischer Vorgänge wurde die Durchflußcytometrie gewählt. Die Durchflußcytometrie stellt ein optisches Meßsystem für einzelne in einem Flüssigkeitsstrom fokussierte Partikel dar und basiert auf dem Prinzip der quantitativen Fluorochromierung.

Nach Inkubation der V79 Zellen wurden sie für die Apoptose-Messung aufgearbeitet. Nachdem das Medium abzentrifugiert wurde, wurde das Pellet mit PBS gewaschen und anschließend die Zellen unter ständigem Schütteln mit 70 % Ethanol (4 °C) fixiert. Für die Messung des DNA- und Protein-Gehaltes wurden 1×10^6 Zellen abzentrifugiert, mit 0,5 ml einer Kernisolationslösung aufgenommen und für 10 Minuten inkubiert. Anschließend wurde dieser Lösung ca. 3 ml einer HR-B Färbelösung (DAPI/SR101) zugegeben und die DNA sowie das Protein für mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur gefärbt. Die durchflußcytometrische Messung erfolgte am PASIII Durchflußcytometer der Firma Partec (Münster) im Arbeitskreis Zankl (Fachbereich Biologie, Universität Kaiserslautern). Nach einer Vorlaufzeit von ca. 30 Minuten wurden 5000 Zellen pro Versuchsansatz bei einer Fließgeschwindigkeit von 150-200 Zellen pro Sekunde vermessen. Die Daten der DNA- und Proteinbestimmungen wurden gespeichert als Histogramm visualisiert und einer ersten Bewertung

unterzogen. Im Anschluß wurden die gespeicherten Daten transformiert und mittels des Multi-Cycle-Computerprogramms von Rabinowitsch (1990, Phoenix Flow Systems, San Diego, Kalifornien) sowie des WinMDI-Computerprogramms (J-Trotter, Version 2.3, 1996) ausgewertet. Das Multi-Cycle-Programm basiert auf dem Prinzip der Kurvenanpassung, welche das DNA-Histogramm als Summe dreier analytischer Funktionen darstellt, die die G_0/G_1 -, S- und G_2/M -Phasenverteilung beschreiben. Bei WinMDI wurden Regionen/Gates definiert und der Prozentsatz an Ereignissen in diesen berechnet. Mit Hilfe der beiden Auswerteprogramme wurden Aussagen zur prozentualen Zellzyklus-Verteilung und zum prozentualen Anteil toter und apoptotischer Zellen getroffen. Diese Daten wurden für jede Konzentration als Punktediagramm gegen die jeweiligen Parameter aufgetragen.

7. Zusammenfassung

Untersucht wurden eine Reihe von α,β -ungesättigten Carbonylverbindungen, die im Hinblick auf ihr Vorkommen in Lebensmitteln, ihrer zum Teil noch nicht hinreichend bekannten toxikologischen Wirkungen und Hinsichtlich möglicher Struktur-Wirkungsbeziehungen ausgewählt wurden: (*E*)-2-Hexenal (HEX), (*E*)-2-Octenal (OCTE), (*E*)-2-Nonenal (NONE), (*2E,4E*)-2,4-Hexadienal (HEXDI), (*2E,6Z*)-2,6-Nonadienal (NONDI), (*E*)-2-Zimtaldehyd (CA) und 2-Cyclohexen-1-on (CHX). In einige Tests wurde auch die strukturell verwandte Verbindung 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) einbezogen. Mit Hilfe der gewonnenen Daten sollte eine Abschätzung des toxischen (gentoxischen) Potentials der Verbindungen ermöglicht werden.

Neben Cytotoxizität und Wachstumshemmung wurde vor allem auf Induktion von DNA-Schäden mittels Comet-Assay geprüft, für einige Substanzen auch auf Induktion von Mutationen mittels HPRT-Test. Weiterhin wurden Veränderungen des zellulären Glutathionspiegels und oxidative DNA-Modifikationen mittels modifiziertem Comet-Assay erfaßt. In orientierenden Versuchen wurde auf Induktion von Apoptose mittels Durchflußcytometrie geprüft. Die Untersuchungen wurden an V79 Zellen, einer Lungenfibroblastenzelllinie des Chinesischen Hamsters, Caco-2 Zellen, einer humane Adenokarzinomzelllinie, und an primären humanen Colonzellen durchgeführt. Ergänzend wurde auf Gentoxizität an Bakterien im UMU-Test geprüft.

Die Ergebnisse zeigen, daß alle untersuchten α,β -ungesättigten Carbonylverbindungen außer NONE in nicht cytotoxischen Konzentrationen konzentrationsabhängig DNA-Schäden in den verschiedenen Säugerzellen induzieren. Eine DNA-schädigende Wirkung von NONE konnte aufgrund der starken cytotoxischen Wirkung der Verbindung nicht beobachtet werden. Induktion von Apoptose, die für HEX in V79 Zellen untersucht wurde, konnte nicht nachgewiesen werden. Somit kann für die beobachteten DNA-Schäden eine gentoxische Wirkung angenommen werden. Mutagenität war für HEX, nur in der Nähe des cytotoxischen Grenzbereichs nachweisbar. Im Vergleich zur DNA-Schädigung in geringeren Konzentrationen depletierten alle untersuchten Verbindungen den Glutathionspiegel. Erstmals konnte unter diesen Bedingungen eine erhöhte Empfindlichkeit der Zellen gegenüber induziertem oxidativem Streß (H_2O_2) nachgewiesen werden. Weiterhin wurde erstmals für HEX eine erhöhte oxidative DNA-Schädigung im Verlauf einer mehrstündigen Postinkubation (ohne Zugabe eines Oxidans) gezeigt. Die Bedeutung

dieser oxidativen DNA-Schäden für die gentoxische Wirkung der 2-Alkenale/CHX ist derzeit noch nicht abschätzbar. Für den UMU-Test wurde belegt, daß er zum Nachweis gentoxischer Wirkungen von 2-Alkenalen ungeeignet ist, aufgrund einer durch die Substanz bedingte Beeinflussung der β -Galactosidase-Aktivität (Kapitel 4.6). Die strukturell verwandte Verbindung HMF, führte jedoch zu einer konzentrationsabhängigen Induktion der SOS-Reparaturenzymkaskade.

Für das toxische/gentoxische/mutagene Potential der untersuchten Verbindungen läßt sich zusammenfassend folgende Reihung festlegen:

NONE, NONDI > OCTE \geq HEX \approx HEXDI > CHX \approx CA >>> HMF

Am wirksamsten waren NONDI und NONE in den verwendeten Testsystemen. Das geringe Vorkommen dieser Verbindungen in der Umwelt/Nahrung und ihre starke Cytotoxizität relativieren jedoch das gentoxische Gefährdungspotential. HEX war in der Regel entweder gleich stark (GSH-Depletion; Induktion oxidativer Schäden) oder leicht schwächer (Induktion von DNA-Schäden) wirksam als NONDI/NONE. Die Verbindungen (OCTE, HEXDI und CHX) sind schwächer wirksam und/oder kommen in deutlich geringeren Mengen vor, so daß für sie von einem zu vernachlässigenden Gefährdungspotential ausgegangen werden kann. CA besitzt ebenfalls eine geringere gentoxische Wirkung als HEX, da aber keine Daten zur täglichen Aufnahme vorliegen, ist eine Risikoabschätzung nicht möglich. HMF eine Substanz dessen mittlere täglich Aufnahme auf 30 bis 60 mg/kg geschätzt wird (Janowski et al., 2000a) besitzt eine im Vergleich zu den 2-Alkenalen um den Faktor 1000 schwächere toxische Wirkung, so daß auch von dieser Verbindung keine direktes Risiko ausgeht. Aufgrund der deutlich geringeren cytotoxischen Wirkung von HEX im Vergleich zu NONE/NONDI (Faktor 14) und des relativ hohen Vorkommens (geschätzte mittlere tägliche Aufnahme pro Person: \approx 6 mg) ist das mögliche Gefährdungspotential durch HEX höher einzuschätzen.

8. Literatur

- Aeschbacher H.U., Chappuis C., Manganel M. und Aeschbach R. (1981) Investigation of maillard products in bacterial mutagenicity test systems, *Progress Food Nutrition Science* 5, 279-294.
- Ahnström G. (1988) Techniques to measure DNA single-strand breaks in cells: A review, *Int. J. Radiat. Biol.* 54, 695-707.
- Akerboom T.P.M. und Sies H. (1981) Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples, *Methods in Enzymology* 77, 373-382.
- Andrae U. (1996) Gentoxizitätstests in vitro, in *Toxikologie - Eine Einführung für Naturwissenschaftler und Mediziner*, Greim H. und Deml E. (Hrsg.), VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.
- Antal M.J. und Mok W.S.L. (1990) Mechanism of formation of 5-(hydroxymethyl)-2-furaldehyde from D-fructose and sucrose, *Carbohydrate Research* 199, 91-109.
- Bachmann S., Meier M. und Känzig A. (1997) 5-Hydroxymethyl-2-furfural (HMF) in Lebensmitteln, *Lebensmittelchemie* 50, 49-50.
- Baldwin I.T., Staszak-Kozinski L. und Davidson R. (1994) Up in smoke: I. Smoke-derived germination cues for postfire annual, *Nicotiana attenuata* torr. ex. Watson, *Journal of Chemical Ecology* 20, 2345-2371.
- Baltes W. und Mevissen L. (1988) Model reactions on roast aroma formation. VI. Volatile reaction products from the reaction of phenylalanine with glucose during cooking and roasting, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 187, 209-214.
- Barbeni M., Guarda P., Villa M., Cabeila P., Pivetti F. und Ciaccio F. (1990) Identification and sensory analysis of volatile constituents of babaco fruit (*Carica pentagona* Helibior), *Flavour Fragrance J.* 5(1), 27-32.
- Barhoumi R., Bowen J.A., Stein L.S., Echols J. und Burghardt R.C. (1993) Concurrent analysis of intracellular glutathione content and gap junctional intercellular communication, *Cytometry* 14, 747-756.
- Barieri G., Bolzoni L., Parolari G., Virgill R., Buttini R., Careri M. und Mangia A. (1992) Flavour compounds of dry-cured ham, *J. Agric. Food Chem.* 40, 2389-2394.
- Batist G., Mekhail-Ishak K., Hudson N.B. und deMuys J.-M. (1988) Interindividual variation in phase II detoxification enzymes in normal human colon mucosa, *Biochemical Pharmacology* 373, 4241-4243.

- Becker R., Ritter A., Zdzieicka M. und Kaina B. (2001) Apoptotic mechanism underlying the cytotoxic effect of the crosslinking chemotherapeutic drugs mitomycin C and glufosamide, *Archives of Pharmacology* 363, Suppl., R151.
- Berhane K. und Mannervik B. (1990) Inactivation of the genotoxic aldehyde acrolein by human glutathione transferases of classes Alpha, mu and Pi, *Molecular Pharmacology* 37, 251-254.
- Belitz H.D. und Grosch W. (1992) Sensorische Eigenschaften von Aromastoffen aus der Lipidperoxidation, *Lehrbuch der Lebensmittelchemie* 187.
- Benamira M. und Marnett L.J. (1992) The lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal is a potent inducer of the SOS response, *Mutation Research* 293, 1-10.
- Benamira M., Singh U. und Marnett L.J. (1992) Site-specific frameshift mutagenesis by a propanodeoxyguanosine adduct positioned in the (CpG)₄ hot-spot of *Salmonella typhimurium* his D3052 carried on an M13 vector, *J. Biol. Chem.* 267, 22392-22400.
- Benzi G., Curti D., Marzatico F. und Pastoris O. (1991) Age-related acute depletion of cerebral glutathione by peroxidative stress, *Journal of Neuroscience Research* 29, 527-532.
- Black D.K. (1966) Isolation of 5-Hydroxymethylfurfural from cigarette smoke condensate, *Chemistry and Industry* 32, 1380.
- Boelens M.H. und Sindreu R.J. (1988) Essential oils from seville bitter orange (*Citrus aurantium* l. ssp. *amara* l.), *Flavours and Fragrances* 551-565.
- Boelens M.H. und Gemert L.J. (1987) Organoleptic properties of aliphatic aldehydes, *Perfumer & Flavorist* 12, 31-43.
- Bolton J.L., Trush M.A., Penning T.M., Dryhurst G. und Monks T.J. (2000) Role of quinones in toxicology, *Chemical Research in Toxicology* 13, 135-160.
- Boyland E. und Chasseaud L.F. (1970) The effect of some carbonyl compounds on rat liver glutathione levels, *Biochemical Pharmacology* 19, 1526-1528.
- Boyland E. und Chasseaud L.F. (1967) Enzyme catalysed conjugation with unsaturated compounds, *Biochem. J.* 104, 95-102.
- Bradley M., Bhuyan B., Francis M.C. Langenbach R., Peterson A. und Hubermann E. (1981) Mutagenesis by chemical agents in V79 Chinese hamster cells: A review and analysis of the literature, *Mutation Research* 87, 81-142.
- Bravard A., Beaumatin J., Dussaulx E., Lesuffleur T., Zweibaum A. und Luccioni C. (1994) Modifications of the anti-oxidant metabolism during proliferation and differentiation of colon tumor cell lines, *Int. J. Cancer* 59, 843-847.

- Breen A.P. und Murphy J.A. (1995) Reactions of oxyl radicals with DNA, *Free Rad. Biol. Med.* 18, 1033.
- Bruce R.W., Archer M.C., Corpet D.E., Medline A., Minkin S., Stamp D., Yin Y. und Zhang X.-M. (1993) Diet, aberrant crypt foci and colorectal cancer, *Mutation Research* 290, 111-118.
- de Bruin W.C.C., Wagenman M.J.M., Board P.G. und Peters W.H.M. (1999) Expression of glutathione S-transferase θ class isoenzymes in human colorectal and gastric cancers, *Carcinogenesis* 20, 1453-1457.
- Burgl W., Kramer I. und Schauenstein E. (1967) Über die Bindung α,β -ungesättigter Aldehyde in Zellen und Geweben, *Z. Naturforschung* 22b, 763-767.
- Burkhart-Schultz K.J., Thompson C.L. und Jones I.M. (1996) Spectrum of somatic mutation at the hypoxanthine phosphoribosyltransferase (*hprt*) gene of healthy people, *Carcinogenesis* 17, 1871-1883.
- Burlingame G.A., Muldowney J.J. und Maddrey R.E. (1992) Cucumber flavour in Philadelphia's drinking water, *Journal AWWA* 92-97.
- Buttery R.G., Ling L.C. und Stern D.J. (1997) Studies on popcorn aroma and flavour volatiles, *J. Agric. Food Chem.* 45, 837-843.
- Buttery R.G., Teranishi R. und Ling L.C. (1987) Fresh tomato aroma volatiles: A quantitative study, *J. Agric. Food Chem.* 35, 540-544.
- Calderón-Garcidueñas L., Wen-Wang L., Zhang Y.-J., Rodriguez-Alcaraz A., Osnaya N., Villarreal-Calderón A. und Santella R.M. (1999) 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine, a major mutagenic oxidative DNA lesion, and DNA strand breaks in nasal respiratory epithelium of children exposed to urban pollution, *Environmental Health Perspective*, 107, 469-474.
- Canonero R., Martelli A., Marinari U.M. und Brambilla G. (1990) Mutation induction in Chinese hamster lung V79 cells by five alk-2-enals produced by lipid peroxidation, *Mutation Research* 244, 153-156.
- Carvalho V., Asahara F., di Mascio P., de Aruda Campos I.P., Cadet J. und Medeiros M.M.G. (2000) Novel 1,N⁶-etheno-2'-deoxyadenosine adducts from lipid peroxidation products, *Chem. Res. Toxicol.* 13, 397-405.
- Chaudière J. und Ferrari-Iliou R. (1999) Intracellular Antioxidants: From chemical to biochemical mechanisms, *Food and Chemical Toxicology* 37, 949-962.
- Chien C., Kirolos K.S., Linderman R.J. und Dauterman W.C. (1994) α,β -Unsaturated carbonyl compounds: Inhibition of rat liver glutathione S-transferase isozymes and chemical reaction with reduced glutathione, *Biochimica et Biophysica Acta* 1204, 175-180.
- Chou C.C. und Hee S.S.Q. (1994) Salvia-available carbonyl compounds in some chewing tobaccos, *J. Agric. Food Chem.* 42, 2225-2230.

- Chung F.L., Young R. und Hecht S.S. (1989) Detection of cyclic 1,N²-propanodeoxyguanosine adducts in DNA of rats treated with N-nitrosopyrrolidine and mice treated with crotonaldehyde, *Carcinogenesis* 10, 1291-1297.
- Chung F.L., Roy K.R. und Hecht S.S. (1988) A study of reactions of α,β -unsaturated carbonyl compounds with deoxyguanosine, *J. Org. Chem.* 53, 14-17.
- Chung F.L., Tanaka T. und Hecht S.S. (1986) Induction of rat liver tumours in F344 rats by crotonaldehyde, *Cancer Research* 46, 1285-1289.
- Chung F.L., Young R. und Hecht S.S. (1984) Formation of cyclic 1,n²-Propanodeoxyguanosine adducts in DNA upon reaction with acrolein or crotonaldehyde, *Cancer Research* 44, 990-995.
- Clapper M.L., Hoffman S.J. und Tew K.D. (1991) Glutathione S-transferase in normal and malignant human colon tissue, *Biochim. Biophys. Acta* 1096, 209-216.
- Cook J.A. und Mitchell J.B. (1989) Viability measurements in mammalian cell systems, *Analytical Biochemistry* 179, 1-7.
- Collins A.R., Dušinská M., Gedik, C.M. und Štětina R. (1996) Oxidative damage to DNA: Do we have a reliable biomarker ?, *Environmental Health Perspectives*, 104, 465-469.
- Cunningham M.L., Price H.C., O'Connor R.W., Moorman M.P., Mahler J.F., Nold J.B. und Morgan D.L. (1999) Prechronic inhalation toxicity studies of 2-cyclohexen-1-one, *Society of Toxicology, Abstrakt*.
- Curvall M., Enzell C.R., und Pettersson B. (1984) An evaluation of the utility of four in vitro short term tests for predicting the cytotoxicity of individual compounds derived from tobacco smoke, *Cell Biology and Toxicology* 1, 173-193.
- Czerney, C., Eder E. und Rüniger T.M. (1998) Genotoxicity and mutagenicity of the α,β -unsaturated carbonyl compound crotonaldehyde (butenal) on a plasmid shuttle vector, *Mutation Research* 407, 125-134.
- Darzynkiewicz Z., Brunno S., Del Bino G., Gorczyca W., Hotz M.A., Lassota P. und Tragonas F. (1992) Features of apoptotic cells measured by flow cytometry, *Cytometry* 13, 795-808.
- Deng W., Hamilton-Kemp T.R., Nielsen M.T., Andersen R.A., Collins G.B. und Hildebrand D.F. (1993) Effects of six-carbon aldehydes and alcohol's on bacterial proliferation, *J. Agric. Food Chem.* 41, 506-510.
- DIMDI, (2000) Literaturrecherche im Internet: www.dimdi.de vom 01.12.2000.
- Dittberner U., Schmetzer B., Gölzer P., Eisenbrand G. und Zankl H. (1997) Genotoxic effects of 2-*trans*-hexenal in human buccal mucosa cells in vivo, *Mutation Research* 390, 161-165.

- Dittberner U., Eisenbrand G. und Zankl H. (1995) Genotoxic effects of the α,β -unsaturated aldehydes 2-*trans*-butenal, 2-*trans*-hexenal and 2-*trans*, 6-*cis*-nonadienal, Mutation Research 335, 259-265.
- Dizdaroglu M., Nackerdien Z., Chao B.-C., Gajewski E. und Rao G. (1991) Chemical nature of in vivo DNA base damage in hydrogen peroxide treated mammalian cells, Archives of Biochemistry and Biophysics, 285, 388-390.
- Doetsch P.W., Henner W.D., Cunningham R.P., Toney J.H. und Helland D.E. (1987) A highly conserved endonuclease activity present in Escherichia coli, bovine, and human cells recognises oxidative DNA damage at sites of pyrimidines, Molecular and Cellular Biology 7, 36-32.
- Drawert F., Tressel R., Heimann W., Emberger R. und Speck M (1973) Über die Biogenese von Aromastoffen bei Pflanzen und Früchten XV*; Enzymatisch-oxidative bildung von C6-Aldehyden und Alkoholen und deren Vorstufen bei Äpfeln und Trauben, Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm. 2, 10-22.
- Eaton D.L. und Bammler T.K. (1999) Concise review of the glutathione S-transferases and their significance to toxicology, Toxicological Sciences 49, 156-164.
- Eder E. und Hoffman C. (1993) Identification and Characterisation of deoxyguanosine adducts of mutagenic β -alkyl-substituted acrolein congeners, Chem. Res. Toxicol. 6, 486-489.
- Eder E., Scheckenbach S., Deiniger C. und Hoffman C. (1993a) The possible role of α,β -unsaturated carbonyl compounds in mutagenesis and carcinogenesis, Toxicology Letters 67, 87-103.
- Eder E., Hoffman C., Sporer S. und Scheckenbach S. (1993b) Biomonitoring studies and susceptibility markers for acrolein congeners and allylic and benzyl compounds, Environmental Health Perspectives 99, 245-247.
- Eder E. und Hoffman C. (1992) Identification and Characterisation of deoxyguanosine-crotonaldehyde adducts. Formation of 7,8 cyclic adducts and 1,N²,7,8 bis-cyclic adducts, Chem. Res. Toxicol. 5, 802- 808.
- Eder E., Deininger C., Neudecker T. und Deininger D. (1992) Mutagenicity of β -alkyl substituted acrolein congeners in the *Salmonella typhimurium* strain TA100 and genotoxicity testing in the SOS chromotest, Environmental and Molecular Mutagenesis 19, 338-345.
- Eder E., Henschler D. und Neudecker T. (1982) Mutagenic properties of allylic and α,β -unsaturated compounds: Consideration of alkylating mechanisms, Xenobiotica 12, 831-848.
- Eisenbrand G., Schuhmacher J. und Gölzer P. (1995) The influence of glutathione and detoxifying enzymes on DNA damage induced by 2-alkenals in primary rat hepatocytes and human lymphoblastoid cells, Chemical Research in Toxicology 8, 40-46.

- Eisenbrand G. und Metzler M. (1994) Prüfung auf Mutagenität und Kanzerogenität, in Toxikologie für Chemiker, Georg Thieme Verlag, 130-144.
- Elstein K.H., Thomas D.J. und Zucker R.M. (1995) Factors affecting flow cytometric detection of apoptotic nuclei by DNA analysis, *Cytometry* 21, 170-176.
- Elstein K.H. und Zucker R.M. (1994) Comparison of cellular and nuclear flow cytometric techniques for discriminating apoptotic sub populations, *experimental Cell Research* 211, 322-331.
- Esterbauer H. Zollner H. und Scholz N. (1975) Reaction of glutathione with conjugated carbonyls, *Z. Naturforsch.* 30C, 466-473.
- Fairbairn D.W., Olive P.L. und O'Neil K.L. (1995) The comet assay: A comprehensive review, *Mutation Research* 339, 37-59.
- Fawthrop D.J., Boobis A.R. und Davies D.S. (1991) Mechanisms of cell death, *Arch. Toxicol.* 65, 437-444.
- Feron V.J., Til H.P., de Vrijer F., Woutersen R.A., Cassee F.R. und van Bladeren P.J. (1991) Aldehydes: Occurrence, carcinogenic potential, mechanism of action and risk assessment, *Mutation Research* 259, 363-385.
- Fischman C.M., Udey M.C., Kurtz M. und Wedner H.J. (1981) Inhibition of Lecitin-induced lymphocyte activation by 2-cyclohexen-1-one: Decreased intracellular glutathione inhibits an early event in the activation sequence, *Journal of Immunology* 127, 2257-2262.
- Flavis-Datenbank (2000) Version 5.3
- Florin I., Rutberg L., Curvall M. und Enzell C.R. (1980) Screenig of tobacco smoke constituents for mutagenicity using the Ames test, *Toxicology* 18, 219-232.
- Fokinski M., Bialkowski K., Skiba M., Ponikowska I., Szmurlo W. und Olinski R. (1999) Evaluation of 8-oxodeoxyguanosine, typical oxidative DNA damage, in lymphocytes of ozone-treated arteriosclerotic patients, *Mutation Research* 438, 23-27.
- Friedel P., Radford T., Renner J. A., Shephard F.W. und Gianturco M.A. (1971) Some constituents of the aroma complex of coffee, *J. Agric. Food Chem.* 19(3), 530-532.
- Frosch P.J., Pilz B., Andersen K.E., Burrows D., Camaras J.G., Dooms-Goossens A., Ducombs G., Fuchs T., Hannukelsa M., Lachapelle J.M., Lahti A., Maibach H.I., Menne T., Rycroft R.J.G., Shaw S., Wahlberg J.E., White I.R. und Willkinson J.D. (1995) Patch testing with fragrances: Results of a multicenter study of the European Environmental and Contact Dermatitis Research Group with 48 frequently used constituents of perfumes, *Contact Dermatitis* 33, 333-342.

- Gaunt I.F., Colley J., Wright M., Creasey M., Grasso P., Gangolli S.D. (1971) Acute and short-term toxicity studies on trans-2-hexenal, Food Cosmet. Toxicol. 9, 775-786.
- Gedik C.M., Wood S.G. und Collins A.R. (1998) Measuring oxidative damage to DNA, HPLC and the comet assay compared, Free Radical Res. 29, 609-615.
- Genzlinger A. (1999) Apoptosebestimmung mittels 2-Parameter-Durchflußzytometrie, Agarose Gelelektrophorese und Fluoreszenzmikroskopie nach Induktion durch α,β -ungesättigte Aldehyde und Ketone, Dissertation, Universität Kaiserslautern.
- Glaab V., Gölzer P. und Janzowski C. (2000) Hexenal 6. Sitzung der Senatskommission zur Beurteilung der gesundheitlichen Unbedenklichkeit von Lebensmitteln Arbeitsgruppe „Lebensmittelbegleitstoffe“. Kaiserslautern, 26.10.2000.
- Glaab V. (1997) Untersuchungen zur *in-vitro* Genotoxizität und Mutagenität von 2-Cyclohexen-1-on im Vergleich zu aromawirksamen Alkenalen, Diplomarbeit, Universität Kaiserslautern.
- Glatt H. (1993) HPRT-Genmutationstest in V79 Zellen des Chinesischen Hamsters, in Mutationsforschung und genetische Toxikologie, Wissenschaftliche Buchgesellschaft Darmstadt, 243-262.
- Glatt H., Gemperlein I., Setiabudi F., Platt K.L. und Oesch F. (1990) Expression of xenobiotic-metabolizing enzymes in propagatable cell cultures and induction of micronuclei by 13 compounds, Mutagenesis 5, 241-9.
- Götz-Schmidt E.M. und Schreier P. (1986) Neutral volatiles from blended endive (*Cichorium endivia*, L.), J. Agric. Food Chem. 34, 212-215.
- Götz-Schmidt E.M., Wenzel M. und Schreier P. (1986) C₆-Volatiles in homogenates from green leaves: Localisation of hydroperoxide lyase activity, Lebensm. Wiss. u. -Technol. 19, 152-15.
- Gölzer P. (1995) Entwicklung einer ³²P-Postlabelling Methode und Untersuchung der DNA-schädigenden Wirkung von Crotonaldehyd und Hexenal, Dissertation, Universität Kaiserslautern.
- Gölzer P., Janzowski C., Pool-Zobel B.L. und Eisenbrand G. (1996) (*E*)-2-Hexenal-induced DNA damage and formation of cyclic 1,N²-(1,3-propano)-2'-deoxyguanosine adducts in mammalian cells, Chem. Res. Toxicol. 9, 1207-1213.
- Griffin D.S. und Segall H.J. (1986) Genotoxicity and cytotoxicity of selected pyrrolizidine alkaloids, a possible alkenal metabolite of the alkaloids, and related alkenals, Toxicology and Pharmacology 86, 227-234.
- Guillèn M.D. und Manzanos M.J. (1999) Smoke and liquid smoke. Study of an aqueous smoke flavouring from the aromatic plant *Thymus vulgaris* L, Journal of the Science of Food and Agriculture 79, 1267-1274.

- Guerrero A. und Arias M. (1996) Apoptosis, in Cell Physiology Source Book, 2nd Edition 1031-1043.
- Hahn H. (1996) Über das Vorkommen von 2-Cyclohexen-1-on in süßstoffhaltigen Erfrischungsgetränken, Lebensmittelchemie 50, 52-55.
- Halliwell B. und Gutteridge J.M.C. (1999) Free radicals in biology and medicine, Oxford University Press, Third Edition.
- Hatanaka A., Kajiwara T. und Sekija J. Fatty acid hydroperoxide lyase in plant tissue, in Biogenesis of Aromes (eds. Parliment T.H. und Croteau R.) American Chemical Society 13, 167-175.
- Hatanaka A., Kajiwara T., Sekija J. und Hirata H. (1976) Biosynthetic pathway of leaf aldehyde in *Farfugium japonicum* Kitamura leaves, Agric. Biol. Chem. 40, 2177-2180.
- Hatanaka A., Kajiwara T. und Harada T. (1975) Biosynthetic pathway of cucumber alcohol: trans-2,cis-6-Nonadienol via cis-3,cis-6-nonadienal, Phytochemistry 4, 2589-2592.
- Hiraoka W., Fuma K. und Kuwabara M. (1997) Concentration-dependent modes of cell death in Chinese hamster V79 cells after treatments with H₂O₂, J. Radiat. Res. 38, 95-102.
- Hoffman C., Bastian H., Wiedemann M., Deininger C. und Eder E. (1989) Detection of Acrolein congener DNA adducts isolated from cellular systems, Arch. Toxicol. Suppl. 13, 219-223.
- Horváthová E., Slameňová D., Hlinčíková L., Mandal T.K., Gábelová A. und Collins A.R. (1998) The nature and origin of DNA single-strand breaks determined with the comet assay, Mutation Research 409, 163-171.
- Hryniewicz C.L., Koberda M. und Konkowski M.S. (1996) Quantitation of 5-hydroxymethylfurfural (5-HMF) and related substances in dextrose injections containing drugs and bisulfite, Journal of Pharmaceutical Biomedical Analysis 14, 429-434.
- IARC (1995) IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, 36, Allyl Compounds, Aldehydes, Epoxides and Peroxides, Lyon, 373-391.
- IARC (1985) IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, 36, Allyl Compounds, Aldehydes, Epoxides and Peroxides, Lyon, 133-161.
- van Iersel M.L.P.S., Ploemen J.-P. H.T.M., Struik I., van Amersfoort C., Keyzer A.E., Scheffwerlie J.G. und van Bladeren P.J. (1996) Inhibition of glutathione S-transferase activity in human melanoma cells by α,β -unsaturated carbonyl de-

- rivatives. Effects of acrolein, citral, crotonaldehyde, curcumin, ethacrynic acid and trans-2-hexenal, *Chem.-Biol. Interactions* 102, 117-132.
- ILSI (2000) Markers of oxidative damage and antioxidant protection, current status and relevance to disease, Report of a Workshop held on 28-30 June 1999 in Prague, Czech Republic.
- Iwaoka, W., Y. Hagi, K. Umano und Shibamoto T. (1994) Volatile chemicals identified in fresh and cooked breadfruit, *J. Agric. Food. Chem.* 42, 975-976.
- Iming R. (2000) 5-Hydroxymethylfurfural in Pflaumenmusen, *Lebensmittelchemie* 54, 111.
- Janzowski C., Glaab V., Samimi E., Schlatter J. und Eisenbrand G. (2000a) 5-Hydroxymethylfurfural: Assessment of mutagenicity, DNA-damaging potential and reactivity towards cellular glutathione, *Food and Chemical Toxicology* 38, 801-809.
- Janzowski C., Glaab V., Samimi E., Schlatter J., Pool-Zobel B.L. und Eisenbrand G. (2000b) Food relevant α,β -unsaturated carbonyl compounds: In vitro toxicity, genotoxic (mutagenic) effectiveness and reactivity towards glutathione. In *Carcinogenic and Anticarcinogenic Factors in Food* (eds. Eisenbrand G., Dayan A.D., Elias P.S., Grunow W. and Schlatter J.) 469-473.
- Jaruga P. und Dizdaroglu M. (1996) Repair of products of oxidative DNA base damage in human cells, *Nucleic Acids Research* 24, 1389-1394.
- Jellum E., Borresen H.C. und Eldjarn L. (1973) The presence of furan derivatives in patients receiving fructose-containing solutions intravenously, *Clinica Chimica Acta* 47, 191-201.
- Jones D.P., Brown L.A.S. und Sternberg P. (1995) Variability in glutathione-dependent detoxification in vivo and its relevance to detoxication of chemical mixtures, *Toxicology* 105, 267-274.
- Jørgensen B.M., Agerbo P., Jensen B., Børresen T. und Hólmer G. (1992) Inhibition of microsomal glucose 6-phosphatase by unsaturated aliphatic aldehydes and ketones, *Chem.-Biol. Interact.* 81, 209-218.
- Kaina B. (1993) Mechanismus der DNA-Reparatur und der Mutagenese, *Mutationsforschung und genetische Toxikologie*, Wissenschaftliche Buchgesellschaft Darmstadt, 65-86.
- Kaneko T., Kaji K. und Matsuo M. (1988) Cytotoxicities of a linoleic acid hydroperoxide and its related aliphatic aldehydes towards cultured human umbilical vein endothelial cells, *Chem. Biol. Interactions* 67, 295-304.
- Kautiainen A. (1992) Determination of hemoglobin adducts from aldehydes formed during lipid peroxidation in vitro, *Chem.-Biol. Interactions* 83, 55-63.

- Kawakami M., Ganguly S.N., Banerjee J. und Kobayashi A. (1995) Aroma composition of oolong tea and black tea brewed extraction method and characterizing compounds of Darjeeling tea aroma, *J. Agric. Food Chem.* 43, 200-207.
- Kasai H. (1997) Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, as a marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis, *Mutation Research* 387, 147-163.
- Kasai H., Kumeno K., Yamaizumi Z., Nishimura S., Nagao M., Fujita Y., Sugimura T., Nukaya H. und Kosuge T. (1982) Mutagenicity of methylglyoxal in coffee, *Gann* 73, 681-683.
- Kassie F., Parzefall W. und Knasmüller S. (2000) Single cell gel electrophoresis assay: A new technique for human biomonitoring studies, *Mutation Research* 463, 13-31.
- Keepers Y.P., Pizao P.E., Peters G.J. van Ark-Otte J., Winograd B. und Pinedo H.M. (1991) Comparison of the Sulforhodamin B protein and tetrazolium (MTT) assays for in vitro chemosensitivity testing, *Eur. J. Cancer* 7, 897-900.
- Kelly F.J. (1999) Glutathione: In defence of the lung, *Food and Chemical Toxicology* 37, 963-966.
- Kelly S.A., Havrilla C.M., Brady T.C., Harris Abramo K. und Levin E.D. (1998) Oxidative stress in toxicology: Established mammalian and emerging piscine model systems, *Environmental Health Perspectives* 106, 375-384.
- Kerr J.F.R., Wyllie A.H. und Currie A.R. (1972) Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics, *Br. J. Cancer* 26, 239-257.
- Ketterer B. (1998) Glutathione S-transferases and prevention of cellular free radical damage, *Free Rad. Res.* 28, 647-658.
- Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister (Hrsg.) (1999) Krebs in Deutschland - Häufigkeiten und Trends, ISBN 3-88718-153-0
- Kim S.B., Hayase F. und Kato H. (1987) Desmutagenic effect of α -dicarbonyl and α -hydroxycarbonyl compounds against mutagenic heterocyclic amines, *Mutation Research* 177, 9-15.
- Kinlin, T.E., Muralidhara R., Pittet A.O., Sanderson A. und Walradt J.P. (1972) Volatile components of roasted filberts, *J. Agric. Food. Chem.* 20(59), 1021-1028.
- Kinter M. und Roberts R.J. (1996) Glutathione consumption and glutathione peroxidase inactivation in fibroblast cell lines by 4-hydroxy-2-nonenal, *Free Radical Biology & Medicine* 21, 457-462.
- Kong Z.L., Mitsuiki M., Nonaka M. und Omura H. (1988) Mutagenic activities of furfurals and the effects of Cu^{2+} , *Mutation Research* 203, 376.

- Kosterids Y. und Baumes R. (2000) Identification of impact odorants in Bordeaux red grape juice, in the commercial yeast used for its fermentation, and in the produced wine, *J. Agric. Food Chem.* 48, 400-406.
- Kramer P.H. (1996) Apoptose im Immunsystem: Mord oder Selbstmord, *Robert Koch Mitt.* 20, 32-43.
- Kreyenmeier F., Schulte E. und Thier H.P., Gaschromatographische Bestimmung von Aldehyden in Pflanzenölen nach Derivatisierung zu den Pentafluoroximen, *Lebensmittelchemie* 51, 83.
- Krumbein A und Auerswald H. (1998) Characterisation of aroma volatiles in tomatoes by sensory analyses, *Nahrung* 42, 395-399.
- Lame M.W. und Segall H.J. (1987) In vitro effects of trans-4-hydroxy-2-alkenals on mouse liver cytochrome P-450, *Chem.-Biol. Interactions* 62, 59-74.
- Landi S. (2000) Mammalian classes of theta GST and differential susceptibility to carcinogens: A review, *Mutation Research* 43, 247-283.
- Larsen M., Poll L. und Olsen C.E. (1992) Evaluation of the aroma composition of some strawberry (*Fragaria ananassa* Duch) cultivars by use of odour threshold values, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 195, 536-539.
- Lee Y.-C., Shlyankevich M., Jeong H.-K., Douglas J.S. und Surh Y.-J. (1995) Bioactivation of 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde to an electrophilic and mutagenic allylic sulfuric acid ester, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 209, 996-1002.
- Le Quere J.L., Leschaeve I., Demaizières D. Issanchou S. und Delache R. (1994) Chemical and sensory effects of intense sweeteners on the flavour of diet orange soft drinks, *Trends in Flavour Research* 387-393.
- Levin L., G.B. Meyers und L. Liddane (1972) 2-Cyclohexen-1-one: Toxicology and Study of an occupational dermal exposure, *American Industrial Hygiene association Journal* 5, 338-342.
- Lutz D., Eder E., Neudecker T. und Henschler D. (1982) Structure-mutagenicity relationship in α,β -unsaturated carbonylic compounds and their corresponding allylic alcohols, *Mutation Research* 93, 305-315.
- Marnett L.J. (1994) DNA adducts of α,β -unsaturated aldehydes and dicarbonyl compounds, IARC, DNA Adducts: Identification and biological significance, Scientific Publication No. 125, 151-163.
- Marnett L.J., Hurd H.K., Hollstein M.C., Levin D.E., Esterbauer H. und Ames B.N. (1985) Naturally occurring carbonyl compounds are mutagens in Salmonella tester strain TA104, *Mutation Research* 148, 25-34.
- Masukawa T., Sai M. und Tochino Y (1989) Methods for depleting brain glutathione, *Life Science* 44, 417-424.

- Mauldin R.K. und Vickroy D.G. (1976) A new technique for analysis of the semivolatile phase of smoke, *Tob. Sci.* 20, 100-103.
- MacLeod G. (1990) Volatile components of chayote, *Phytochemistry* 29(4), 1197-1200.
- MacLeod A.J. und Snyder C.H. (1988) Volatile components of mango preserved by deep freezing, *J. Agric. Food Chem.* 36, 137-139.
- Mantovani A., Stazi A.V., Macri C., Riccardi C., Piccioni A. und Badellino E. (1989) Pre-natal (segment II) toxicity study of cinnamic aldehyde in the Sprague-Dawley rat, *Food Chem. Toxicol.* 12, 781-786.
- Marnett L.J., Hurd H.K., Hollstein M.C., Levin D.E., Esterbauer H. und Ames B. (1985) Naturally occurring carbonyl compounds are mutagens in *Salmonella* tester strain TA104, *Mutation Research* 148, 25-34.
- McKelvey-Martin V.J., Green M.H.L., Schmezer P., Pool-Zobel B.L., de Meo M.P. und Collins A.R. (1993) The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): A european review, *Mutation Research* 288, 47-63.
- Medh R.D., Gupta V., Zhang Y., Awasthi Y.C. und Belli J.A. (1990) Glutathione S-transferase and p-glycoprotein in multidrug resistant Chinese hamster cells, *Biochem. Pharmacol* 39, 1641-5.
- Meister A. (1995) Glutathione biosynthesis and its inhibition, *Methods Enzymol* 252, 26-30.
- Mereto E., Brambilla-Campart G., Ghia M., Martelli A. und Brambilla G. (1994) Cinnamaldehyde-induced micronuclei in rodent liver, *Mutation Research* 322, 1-8.
- Mitchell D.Y. und Petersen D.R. (1993) Inhibition of rat liver mitochondrial and cytosolic aldehyde dehydrogenase by crotonaldehyd, *Drug Metabolism and Disposition* 21, 396-399.
- Morrison R.T. und Boyd R.N. (1986) *Lehrbuch der organischen Chemie*, 2. Auflage, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.
- Moriya M., Marinelli E., Shibutani S. und Joseph J. (1989) Site-specific mutagenesis using the model exocyclic DNA adduct 1,N²-propanodeoxyguanosine, *Proceedings Am. Assoc. Cancer Research* 30, 140.
- Müller C. (2000) Untersuchungen zur oxidativen DNA Schädigung durch 2-Cylohexen-1-on und trans-2-Hexenal, Diplomarbeit, Universität Kaiserslautern.
- Nakamura S.C., Oda Y., Shimada T., Oki I. und Sugimoto K. (1987) SOS-inducing activity of chemical carcinogens and mutagens in *Salmonella typhimurium* TA1535/psK1002: Examination with 151 chemicals, *Mutation Research* 192, 239-246.

- Nath R.G. und Chung F.L. (1994) Detection of exocyclic 1,N²-propanodeoxguanosine adducts as common DNA lesions in rodents and humans, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91, 7491-7495.
- Neubert D. (1994) Möglichkeiten und Methoden der quantitativen Risikoabschätzung, in *Lehrbuch der Toxikologie* (Hrsg. Marquardt H. und Schäfer S.G.), Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, 840-913.
- Nicoletti I., Migliorati G., Pagliacci M.C., Grigani F. und Riccardi C.A. (1991) A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry, *Journal of Immunological Methods* 55, 3093-3098.
- NTP (2000) NTP Chemical Repository, Internetadresse: ntp-db.niehs.nih.gov/NTP_Reports
- Oda Y., Yamazaki H., Thier R., Ketterer B., Guengerich P.F. und Shimada T. (1995) A new Salmonella typhimurium NM5004 strain expressing rat glutathione S-transferase 5-5: Use in detection of genotoxicity of dihaloalkenes using SOS/umu test system, *Carcinogenesis* 17, 297-302.
- Oda Y., Yamazaki H., Watanabe M., Nohmi T. und Shimada T. (1993) Highly sensitive umu test system for the detection of mutagenic nitrosarenes in Salmonella typhimurium NM3009 having high O-acetyltransferase and nitroreductase activities, *Environmental and Mol. Mut.* 21, 357-364.
- Oda Y., Shimada T., Watanabe M., Ishidate M. und Nohmi T. (1992) A sensitive umu test system for the detection of mutagenic nitroarenes in Salmonella typhimurium NM1011 having a high nitroreductase activity, *Mutation Research* 272, 91-99.
- Oda Y., Nakamura S., Oki I., Kato T. und Shinagawa H. (1985) Evaluation of the new system (umu test) for the detection of environmental mutagens and carcinogens, *Mutation Research* 147, 219-229.
- Oesch F. (1994) Fremdstoffmetabolismus, in *Lehrbuch der Toxikologie* (Hrsg. Marquardt H. und Schäfer S.G.), Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, 68 -105.
- Ono Y., Somiya I. und Kawamura M. (1991) The evaluation of genotoxicity using DNA repairing test for chemicals produced in chlorination and ozonation processes, *Sci. Tech.* 23, 329-338.
- Opdyke D.L.J. (1975) Monographs on fragrance raw materials, *Food Cosmetic Toxicol.* 13, 449-457.
- Orrenius S. (1996) Molekulare Medizin: Was uns der Zelltod lehrt, in *Die Zukunft der Medizin* (Hrsg. Kaiser G., Siegrist J., Rosenfeld E., Wetzel-Vandai K.), Campus Verlag Frankfurt/New York, 65-78.

- Ostling O. und Johanson K.J. (1984) Microelectrophoresis study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 123, 291-298.
- Parent R.A., Caravello H.E. und Long J.E. (1992) Two-year toxicity and carcinogenicity study of acrolein in rats, *Journal of Applied Toxicology* 12, 131-139.
- Parent R.A. Caravello H.E. und Long J.E. (1991) Oncogenicity study of acrolein in mice, *J. A. Coll. Toxicol.* 10, 647-659.
- Patel J.M., Wood J.C. und Leibman K.C. (1980) The biotransformation of allyl alcohol and acrolein in rat liver and lung preparations, *Drug Metab. Dispos.* 8, 305-308.
- Peters W.H.M. und Roelofs H.M.J. (1992) Biochemical characterisation of resistance to mitoxantrone and adriamycin in Caco-2 human colon adenocarcinoma cells: A possible role for glutathione S-transferases, *Cancer Research* 52, 1886-1890.
- Pettersson B., Curvall M. und Enzell C.R. (1980) Effects of tobacco smoke compounds on the noradrenaline induced oxidative metabolism in isolated brown fat cells, *Toxicology* 18(1), 1-15.
- Pool-Zobel B.L., Abrahamse S.L., Collins A.R., Kark W., Gugler R., Oberreuther D., Siegel E.G., Treptow-van Lishaut S. und Rechkemmer G. (1999) Analysis of DNA strand breaks, oxidized bases, and glutathione-S-transferase P1 in human colon cells from biopsies, *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 8, 609-614.
- Pool-Zobel B.L., Guigas C., Klein R., Neudecker Ch., Renner H.W. und Schmezer P. (1993) Assessment of genotoxic effects by lindane, *Food and Chemical Toxicology* 31, 271-283.
- Quillardet P. und Hofnung M. (1985) The SOS chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: Procedures, *Mutation Research* 147, 65-78.
- Raffael A. und Valet G. (1982) Distinction of macrophages subpopulations: Measurement of functional cell parameters by flow cytometry, *Advances in experimental Medicine and Biology* 155, 453-459.
- Rastogi S.C., Johansen J.D., Frosch P., Menne T., Bruze M., Lepoittevin J.P., Dreier B., Andersen K.E. und White I.R. (1998) Deodorants on the European market: Quantitative chemical analysis of 21 fragrances, *Contact Dermatitis* 36, 29-35.
- Reifferscheid G., Schmid C. und Zahn R.K. (1997) Broad applicability of the SOS/umu test in environmental genotoxicity testing, *Abstract in Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 379.
- Reiners J. und Grosch W. (1997) Untersuchung des Aromas von nativen Olivenölen extra unterschiedlicher Provinz, *Lebensmittelchemie* 51, 44.

- Rydberg B. und Johanson K.J. (1978) Estimation of DNA strand breaks in single mammalian cells, DNA Repair and Mechanisms (eds. Hanawalt E.C., Friedberg E.C. and Fox C.F.), Academic Press, New York, 465-468.
- Salles B., Sattler U., Bozzato C. und Calsou P. (1999) Repair of oxidative DNA damage in vitro: A tool for screening antioxidative compounds, Food and Chemical Toxicology 37, 1009-1014.
- Samimi E. (1999) Untersuchungen zur Cytotoxizität, Gentoxizität und Mutagenität von 5-Hydroxymehtylfurfural, Diplomarbeit, Universität Kaiserslautern.
- Sangster J. (1989) Octanol-water partition coefficients of simple organic compounds, J. Phys. Chem. Ref. Data, 18839, 1111-1229.
- Sainio E.L. und Kanerva L. (1995) Contact allergens in toothpaste's and a review of their hypersensitivity, Contact Dermatitis 33, 100-105.
- Schildknecht H. (1961) Über Insekten- und Pflanzenabwehrstoffe, ihre Isolierung und Aufklärung, Angew. Chemie 73, 171.
- Schlüter S. und Steinhart H. (1996) Hauptaromakomponenten des gedünsteten Karpfenfilets (*Cyprinus carpio* L.), Lebensmittelchemie 50, 85.
- Schreier P. (2000) persönliche Mitteilung
- Schuhmacher J. (1990) Untersuchungen zur Gentoxizität und zum Metabolismus aromawirksamer α,β -ungesättigter Aldehyde, Dissertation, Universität Kaiserslautern.
- Schuler D. und Eder E. (1999) Detection of 1,*N*²-propanodeoxyguanosine adducts of 2-hexenal in organs of Fischer 344 rats by a ³²P-post labelling technique, Carcinogenesis 20, 1345-1350.
- Schulte-Hermann R., Marian B. und Bursch (1994) Tumorpromotion, in Lehrbuch der Toxikologie (Hrsg. Marquardt H. und Schäfer S.G.), Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, 148-177.
- Schwartzman R.A. und Cidlowski J.A. (1993) Apoptosis: The biochemistry and molecular biology of programmed cell death, Endocrine Reviews 14, 133-151.
- Senanayake U.M., Lee T.H. und Wills R.B.H. (1978) Volatile constituents of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) oils, J. Agric. Food Chem. 26, 822-825.
- Shimada T., Oda Y., Yamazaki H., Mimura M. und Guengerich F.P. (1994) SOS function tests for studies of chemical carcinogenesis using *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002, NM2009, and NM3009, Methods in Molecular Genetics 5, 342-355.
- Shinohara K., Kim E.-H. und Omura H. (1986) Furans as the mutagens formed by amino-carbonyl reactions, Developments in Food Science 13, 353-362.

- Shiratsuchi H., Shimoda M., Imayoshi K., Noda K. und Osajima Y. (1994) Volatile flavour compounds in spray-dried skim milk powder, *J. Agric. Food Chem.* 42, 984-988.
- Skehan P., Storeng R., Scudiero D., Monks A., McMahon J., Vistica D., Warren J.T., Bokesch H., Kenney S. und Boyd M.R. (1990) New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening, *Journal of the National Cancer Institute* 82, 1107-1112.
- Skobeleva N.I., Bezzubov A.A., Petrova T.A. und Bokuchava (1979) Aroma forming substances in black tea, *Prikladnaya Biohimiya i Mikrobiologiya* 15, 915-922.
- Sträßer U. (2001) persönliche Mitteilung
- Suhr Y.-J., Liem A., Miller J.A. und Tannenbaum R. (1994) 5-Sulfoxymethylfurfural as a possible ultimate mutagenic and carcinogenic metabolite of the Maillard reaction product, 5-hydroxymethylfurfural, *Carcinogenesis* 15, 2375-2377.
- Summer K.-H. und Wiebel F.J. (1981) Glutathione and glutathione S-transferase activities of mammalian cells in culture, *Toxicol Lett.* 9, 409-413.
- Swedmark S., Romert L., Morgenstern R. und Jensen D. (1992) Studies on glutathione transferses belonging to class pi in cell lines with different capacities for conjugating (+)-7 beta, 8 alpha-dihydroxy-9 alpha, 10 alpha-oxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzoapyrene, *Carcinogenesis* 13, 1719-1723.
- Takeko G.R., Güntert M., Flath R.A., Wurz R.E. und Jennings W. (1986) Volatile Constituents of kiwi fruit (*Actinidia chinensis* Planch.), *J. Agric. Food Chem.* 34, 576-578.
- Termini J. (2000) Hydroperoxide-induced DNA damage and mutations, *Mutation Research* 450, 107-124.
- Tjalkens R.B., Luckey S.W., Kroll D.J. und Petersen D.R. (1998) α,β -Unsaturated aldehydes increase glutathione s-transferase mRNA and Protein: Correlation with activation of the antioxidant response element, *Archives of Biochemistry and Biophysics* 359,42-50.
- Ulbricht R.J., Northup S.J. und Thomas J.A. (1984) A review of 5-hydroxymethylfurfural (HMF) in parenteral solutions, *Fundamental and Applied Toxicology* 4, 843-853.
- Umansky S.R., Korol B.R. und Nelipovic P.A. (1981) In vivo DNA degradation in the thymocytes of gamma-irradiated or hydrocortison-treated rats, *Biochimica and Biophysica Acta* 655, 281-290.
- Vander Jagt D.L., Hunsaker L.A., Vander Jagt T.J., Gomez M.S., Gonzales D.M., Deck L.M. und Royer R.E. (1997) Inactivation of glutathione reductase by 4-hydroxy-nonenal and other endogenous aldehydes, *Biochemical Pharmacology* 53, 1133-1140.

- de Vincenzi M., Badellino E., di Folco S., Dracos A., Magliola M., Stacchini A., Stacchini P. und Silano V. (1989) A basis of estimation of consumption: Literature for selected food volatiles. Part III, Food Additives and Contaminants 6, 235-267.
- Voet D. und Voet J.G. (1992) Biochemie, VCH, Verlagsgesellschaft, Weinheim.
- Walker G.C. (1984) Mutagenesis and inducible responses to deoxyribonucleic acid damage in *Escherichia coli*, Microbiological Reviews 48, 60-93.
- Wolff T. und Schwarz L.R. (1996) Fremdstoffmetabolismus in Toxikologie - Eine Einführung für Naturwissenschaftler und Mediziner, Greim H. und Deml E. (Hrsg.), VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.
- Wieslander A.P., Andren A.H.G., Nilsson-Thorell C., Muscalu N., Kjellstrand P.T.T. und Rippe B. (1995) Are aldehydes in heat sterilized peritoneal dialysis fluids toxic in vitro? Peritoneal Dialysis International 15, 348-352.
- Williams G.M., Mori H. und McQueen C.A. (1989) Structure-activity relationships in the rat hepatocyte DNA-repair test for 300 chemicals, Mutation Research 221, 263-286.
- Wilson A.P. (1992) Cytotoxicity and viability assays in Animal cell culture - A practical approach, (ed. Freshney R.I.) 2nd edition, IRL Press at Oxford University Press, oxford, 263 - 303.
- Withycombe D.A., Lindsay R.C. und Stuibler D.A. (1978) Isolation and identification of volatile components from wild rice grain (*Zizania aquatica*), J. Agric. Food Chem. 26, 816-822.
- Younes M. (1994) Freie Radikale und reaktive Sauerstoffspezies, in Lehrbuch der Toxikologie (Hrsg. Marquardt H. und Schäfer S.G.), Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, 94-105.
- Zhou A., McFeeters R.F. und Felming H.P. (2000) Development of oxidized odor and volatile aldehydes in fermented cucumber tissue exposed to oxygen, J. Agric. Food Chem. 48, 193-197.
- Žídek L., Doležel P., Chmelík J., Baker A.G. und Novotný M. (1997) Modification of horse heart cytochrome c with trans-2-hexenal, Chem. Res. Toxicol. 10, 702-710.

9. Anhang

9.1 Wachstumshemmung (Sulforhodamin-B-Test)

9.1.1 Homologe 2-Alkenale

(E)-2-Hexenal (HEX)

Konzentration/ μM	Mittelwert*/%	n**
0	100,0	3
10	62,0 \pm 6,1	3
20	15,0 \pm 3,5	3
30	7,7 \pm 1,2	3
40	9,3 \pm 0,6	3

* Wachstum

** Anzahl unabhängiger Experimente

(E)-2-Octenal (OCTE)

Konzentration/ μM	Mittelwert*/%	n**
0	100	4
5	53 \pm 11,5	3
10	32,8 \pm 14,6	4
15	6,3 \pm 3,5	3
20	4,5 \pm 0,5	2

* Wachstum

** Anzahl unabhängiger Experimente

(E)-2-Nonenal (NONE)

Konzentration/ μM	Mittelwert*/%	n**
0	100,0	4
2,5	99,5 \pm 21,7	4
5	92,4 \pm 4,2	3
10	53,2 \pm 21,9	4
20	15,6 \pm 15,4	4

* Wachstum

** Anzahl unabhängiger Experimente

9.1.2 Weitere ungesättigte Aldehyde

(2E,4E)-2,4-Hexadienal (HEXDI)

Konzentration/ μM	Mittelwert*/%	n**
0	100,0	4
5	32,7 \pm 4,2	3
10	24,3 \pm 5,9	4
15	7,0 \pm 3,0	3
20	1,7 \pm 0,6	3

* Wachstum

** Anzahl unabhängiger Experimente

(2E,6Z)-2,6-Nonadienal (NONDI)

Konzentration/ μM	Mittelwert*/%	n**
0	100,0	5
2,5	69,0 \pm 15,2	5
5	47,4 \pm 20,9	5
10	21,7 \pm 11,0	3
12,5	12,0 \pm 2,5	2
20	3,0 \pm 0	2

* Wachstum

** Anzahl unabhängiger Experimente

Zimtaldehyd (CA)

Konzentration/ μM	Mittelwert*/%	n**
0	100,0	4
5	89,0 \pm 21,0	2
10	56,3 \pm 11,9	4
15	29,0 \pm 8,2	2
20	15,3 \pm 4,5	3
30	3,5 \pm 2,5	2
40	4,0 \pm 1,0	2

* Wachstum

** Anzahl unabhängiger Experimente

9.1.3 2-Cyclohexen-1-on (CHX)

Konzentration/ μM	Mittelwert*/%	n**
0	100	4
5	103 \pm 8,5	3
12,5	68,5 \pm 9,3	4
20	38,5 \pm 1,6	2
25	12,5 \pm 1,7	4

* Wachstum

** Anzahl unabhängiger Experimente

9.2 Induktion von DNA-Schäden

9.2.1 DNA-Schäden in V79 Zellen

9.2.1.1 Homologe 2-Alkenale

(E)-2-Hexenal (HEX)

Konzentration/ μM	Mittelwert*/%	n**
0	96,5 \pm 1,0	4
100	84,8 \pm 3,5	2
150	59,3 \pm 0,7	2
200	31,0	1
250	16,3 \pm 1,8	4

* ungeschädigte Zellen (TI < 17%)

** Anzahl unabhängiger Experimente

(E)-2-Octenal (OCTE)

Konzentration/ μM	Mittelwert*/%	n**
0	98,5 \pm 1,9	4
50	94,9 \pm 1,1	2
100	81,7 \pm 7,7	4
200	67	1
250	37,5 \pm 18,7	4

* ungeschädigte Zellen (TI < 17%)

** Anzahl unabhängiger Experimente

(E)-2-Nonenal (NONE)

Konzentration/ μM	Mittelwert*/%	n**
0	98,7 \pm 2,0	3
25	99	1
50	94,7 \pm 1,6	3
75	90,3 \pm 6,1	3
100	82,3 \pm 8,4	3
150	78,5 \pm 0,5	2

* ungeschädigte Zellen (TI < 17%)

** Anzahl unabhängiger Experimente

9.2.1.2 Weitere ungesättigte Aldehyde

(2E,4E)-2,4-Hexadienal (HEXDI)

Konzentration/ μM	Mittelwert*/%	n**
0	98,6 \pm 1,4	3
100	88,4 \pm 3,8	3
250	57,0 \pm 5,2	3
400	33,5 \pm 1,4	3
500	24,7 \pm 0,7	2

* ungeschädigte Zellen (TI < 17%)

** Anzahl unabhängiger Experimente

(2E,6Z)-2,6-Nonadienal (NONDI)

Konzentration/ μM	Mittelwert*/%	n**
0	96,8 \pm 0,4	3
50	85,7 \pm 1,7	3
100	63,7 \pm 6,7	3
150	25,7 \pm 8,1	3

* ungeschädigte Zellen (TI < 17%)

** Anzahl unabhängiger Experimente

Zimtaldehyd (CA)

Konzentration/ μM	Mittelwert*/%	n**
0	97,1 \pm 2,0	4
100	95,0 \pm 5,0	4
250	85,5 \pm 5,3	4
400	69,2 \pm 6,1	3
500	38,5 \pm 12,5	4

* ungeschädigte Zellen (TI < 17%)

** Anzahl unabhängiger Experimente

9.2.1.3 2-Cyclohexen-1-on (CHX)

Konzentration/ μM	Mittelwert*/%	n**
0	96,6 \pm 2,4	15
100	92,9 \pm 5,7	5
200	89,7 \pm 12,3	7
300	32,6 \pm 20,2	5
500	12,0 \pm 6,4	3

* ungeschädigte Zellen (TI < 17%)

** Anzahl unabhängiger Experimente

9.2.2 DNA-Schäden in Caco-2 Zellen

9.2.2.1 Homologe 2-Alkenale

(E)-2-Hexenal (HEX)

Konzentration/ μM	Mittelwert*/%	n**
0	98,4 \pm 2,2	3
100	95,0 \pm 1,0	2
200	44,0 \pm 5,0	2
400	36,5 \pm 5,8	2
500	38,5 \pm 5,5	2

* ungeschädigte Zellen (TI < 17%)

** Anzahl unabhängiger Experimente

(E)-2-Octenal (OCTE)

Konzentration/ μM	Mittelwert*/%	n**
0	90,3 \pm 8,0	3
100	82,8 \pm 12,0	3
200	65,5 \pm 5,0	2
300	36,4 \pm 4,3	3

* ungeschädigte Zellen (TI < 17%)

** Anzahl unabhängiger Experimente

(E)-2-Nonenal (NONE)

Konzentration/μM	Mittelwert*/%	n**
0	96,3 \pm 2,7	3
10	94,7 \pm 5,2	3
25	92,7 \pm 6,4	3
50	90,7 \pm 4,8	3
100	81,7 \pm 14,5	3

* ungeschädigte Zellen (TI < 17%)

** Anzahl unabhängiger Experimente

9.2.2.2 Weitere ungesättigte Aldehyde**(2E,4E)-2,4-Hexadienal (HEXDI)**

Konzentration/μM	Mittelwert*/%	n**
0	85,5 \pm 5,2	4
100	58,5 \pm 8,1	4
250	33,4 \pm 19,8	5

* ungeschädigte Zellen (TI < 17%)

** Anzahl unabhängiger Experimente

(2E,6Z)-2,6-Nonadienal (NONDI)

Konzentration/ μM	Mittelwert*/%	n**
0	94,3 \pm 7,5	2
50	82,0 \pm 12,1	3
100	84,5 \pm 6	2
150	41,7 \pm 7,5	3

* ungeschädigte Zellen (TI < 17%)

** Anzahl unabhängiger Experimente

Zimtaldehyd (CA)

Konzentration/ μM	Mittelwert*/%	n**
0	84,6 \pm 11,6	3
100	93,0 \pm 2,2	2
200	63,0 \pm 8,8	2
600	41,3 \pm 18,7	3

* ungeschädigte Zellen (TI < 17%)

** Anzahl unabhängiger Experimente

9.2.2.3 2-Cyclohexen-1-on (CHX)

Konzentration/ μM	Mittelwert*/%	n**
0	96,0 \pm 2,8	3
150	94,7 \pm 1,0	2
300	85,3 \pm 11,0	2
450	75,3 \pm 9,0	2
600	48,7 \pm 16,7	3

* ungeschädigte Zellen (TI < 17%)

** Anzahl unabhängiger Experimente

9.2.3 DNA-Schäden in primären humanen Colonzellen

Konzentration/ μM	ungeschädigte Zellen/%	mittel geschädigte Zellen/%	stark geschädigte Zellen/%
Kontrolle	92,6	5,2	2,2
CHX 800 μM	76,4	12,2	11,4
HEX 400 μM	50,5	39,5	10,0
NONDI 200 μM	74,8	14,6	10,6
NONDI 300 μM	42,5	32,6	24,9
HEX 80 mM	74,3	17,7	8,0
MNNG 33 μM	3,2	23,8	73,0

9.3 GSH-Depletion

9.3.1 GSH Depletion an V79 Zellen

9.3.1.1 Homologe 2-Alkenale

(E)-2-Hexenal (HEX)

Konzentration/ μM	Mittelwert tGSH/%	n*
0	100,0	4
2,5	83,5 \pm 2,0	2
5	61,8 \pm 16,2	3
10	40,8 \pm 11,6	3
25	15,9 \pm 13,9	2
50	6,4	1

* Anzahl unabhängiger Experimente

(E)-2-Octenal (OCTE)

Konzentration/ μM	Mittelwert GSH/%	n*
0	100,0	5
2,5	84,6 \pm 6,0	2
5	76,6 \pm 2,2	4
10	45,2 \pm 7,5	4
25	24,7 \pm 5,7	5
50	13,0 \pm 0,3	3

* Anzahl unabhängiger Experimente

(E)-2-Nonenal (NONE)

Konzentration/μM	Mittelwert GSH/%	n*
0	100	7
5	80,5 \pm 9,6	7
10	55,5 \pm 7,2	7
15	41,4 \pm 5,3	2
20	28,2 \pm 9,0	7
50	10,4 \pm 6,0	4

* Anzahl unabhängiger Experimente

(E)-2-Hexenal (HEX) 3 h Postinkubation

Konzentration/μM	Mittelwert GSH/%	n*
0	100	2
50	8,2 \pm 0,3	2
100	5,35 \pm 3,6	2
0 (3 h Postinkubiert)	108,6 \pm 1,3	2
50 (3 h Postinkubiert)	54,3 \pm 15	2
100 (3 h Postinkubiert)	45,1 \pm 1,25	2

* Anzahl unabhängiger Experimente

9.3.1.2 Weitere ungesättigte Aldehyde

(2E,4E)-2,4-Hexadienal (HEXDI)

Konzentration/ μM	Mittelwert GSH/%	n*
0	100,0	3
1	86,3 \pm 2,3	2
5	73,8 \pm 8,4	3
10	64,3 \pm 2,7	3
25	38,2 \pm 7,3	3
50	33,0 \pm 14,7	3
100	17,4 \pm 13,0	3

* Anzahl unabhängiger Experimente

(2E,6Z)-2,6-Nonadienal (NONDI)

Konzentration/ μM	Mittelwert GSH/%	n*
0	100,0	5
5	81,5 \pm 15,6	4
10	60,3 \pm 21,8	5
25	18,4 \pm 4,2	3
50	20,8 \pm 9,6	4
100	11,6 \pm 1,5	2

* Anzahl unabhängiger Experimente

Zimtaldehyd (CA)

Konzentration/ μM	Mittelwert GSH/%	n*
0	100,0	4
12,5	71,3 \pm 3,1	2
25	54,4 \pm 2,5	2
50	32,9 \pm 11,8	4
100	24,1 \pm 12,5	4
200	11,8 \pm 10,6	4

* Anzahl unabhängiger Experimente

9.3.1.3 2-Cyclohexen-1-on (CHX)

Konzentration/ μM	Mittelwert GSH/%	n*
0	100	6
2,5	74,8 \pm 16,5	4
5	59,7 \pm 21,5	4
10	53,1 \pm 15,5	5
20	29,0 \pm 9,7	5
50	20,7 \pm 6,3	5

* Anzahl unabhängiger Experimente

9.3.2 GSH-Depletion an Caco-2 Zellen

9.3.2.1 Homologe 2-Alkenale

(E)-2-Hexenal (HEX)

Konzentration/ μM	Mittelwert GSH/%	n*
0	100	6
25	78,4 \pm 3,7	3
50	42,9 \pm 5,6	6
100	36,7 \pm 15,4	5
200	27,4 \pm 11,3	5

* Anzahl unabhängiger Experimente

(E)-2-Octenal (OCTE)

Konzentration/ μM	Mittelwert GSH/%	n
0	100,0	5
5	72,0 \pm 5,2	4
10	46,5 \pm 7,9	4
25	53,4 \pm 21,9	3
50	24,1 \pm 14,8	4

* Anzahl unabhängiger Experimente

(E)-2-Nonenal (NONE)

Konzentration/ μM	Mittelwert GSH/%	n*
0	100,0	4
5	83,4 \pm 8,0	4
10	60,7 \pm 10,4	4
20	54,3 \pm 22,2	3
50	36,6 \pm 26,0	4

* Anzahl unabhängiger Experimente

9.3.2.2 2-Cyclohexen-1-on (CHX)

Konzentration/ μM	Mittelwert GSH/%	n
0	100,0	6
10	87,4 \pm 7,0	4
25	67,1 \pm 15,2	4
50	51,4 \pm 12,4	4
100	48,9 \pm 2,4	3
400	43,2 \pm 6,9	2

* Anzahl unabhängiger Experimente

9.3.3 GSH-Depletion in primären humanen Colonzellen

(E)-2-Hexenal (HEX)

Konzentration/ μM	Mittelwert GSH/%	n*
0	100,0	3
50	48,0 \pm 5,5	2
100	25,4 \pm 7,9	2
200	25,0	1
400	28,5 \pm 2,6	2

* Anzahl unabhängiger Experimente

2-Cyclohexen-1-on (CHX)

Konzentration/ μM	Mittelwert GSH/%	n*
0	100,0	3
100	43,3 \pm 8,4	2
200	20,9 \pm 7,8	2
400	16,9 \pm 15,3	2

* Anzahl unabhängiger Experimente

9.4 Oxidative DNA-Schäden

9.4.1 Oxidative DNA-Schäden an V79 Zellen

9.4.1.1 Homologe 2-Alkenale

(*E*)-2-Hexenal (HEX)

Konzentration/ μM	Mittelwert TI/%	n*
Kontrolle	3,2 \pm 1,4	3
Kontrolle + FPG	5,3 \pm 3,5	3
Kontrolle + H ₂ O ₂	6,6 \pm 5,1	3
Kontrolle + H ₂ O ₂ + FPG	7,4 \pm 6,3	3
100	4,2 \pm 1,6	2
100 + FPG	4,9 \pm 1,7	2
100 + H ₂ O ₂	38,0 \pm 9,2	2
100 + H ₂ O ₂ + FPG	38,3 \pm 8,6	2

* Anzahl unabhängiger Experimente

(E)-2-Octenal (OCTE)

Konzentration/ μM	Mittelwert TI/%	n*
Kontrolle	$0,8 \pm 0,5$	4
Kontrolle + FPG	$1,6 \pm 1,0$	4
Kontrolle + H_2O_2	$5,9 \pm 2,5$	3
Kontrolle + H_2O_2 + FPG	$6,6 \pm 1,5$	3
5	$1,1 \pm 0,5$	3
5 + FPG	$3,3 \pm 2,2$	3
5 + H_2O_2	$10,4 \pm 1,1$	3
5 + H_2O_2 + FPG	$10,7 \pm 1,1$	3
25	$1,4 \pm 1,0$	2
25 + FPG	$4,4 \pm 4,3$	2
25 + H_2O_2	$25,6 \pm 2,8$	2
25 + H_2O_2 + FPG	$23,4 \pm 10,1$	2
50	$11,6 \pm 9,3$	3
50 + FPG	$15,8 \pm 13,0$	3
50 + H_2O_2	$55,9 \pm 18,1$	2
50 + H_2O_2 + FPG	$50,8 \pm 18,5$	2

* Anzahl unabhängiger Experimente

(E)-2-Nonenal (NONE)

Konzentration/ μM	Mittelwert TI/%	SD (Min zu Max*)	n
Kontrolle	$0,9 \pm 0,3$	0,6	2
Kontrolle + FPG	$1,9 \pm 1,3$	2,6	2
Kontrolle + H_2O_2	$2,6 \pm 0,4$	0,7	2
Kontrolle + H_2O_2 + FPG	$4,4 \pm 1,9$	3,8	2
50	$3,9 \pm 4,3$	8,5	2
50 + FPG	$4,0 \pm 3,6$	7,1	2
50 + H_2O_2	$14,6 \pm 6,0$	12	2
50 + H_2O_2 + FPG	$26,7 \pm 2,5$	5	2
100	$13,0 \pm 10,1$	20,2	2
100 + FPG	$15,7 \pm 10,9$	21,8	2
100 + H_2O_2	$21,3 \pm 4,2$	8,4	2
100 + H_2O_2 + FPG	$45,2 \pm 7,3$	14,6	2

* Anzahl unabhängiger Experimente

9.4.1.2 Weitere ungesättigte Aldehyde

(2E,4E)-2,4-Hexadienal (HEXDI)

Konzentration/ μM	Mittelwert TI/%	n*
Kontrolle	$1,8 \pm 0,9$	3
Kontrolle + FPG	$1,4 \pm 0,7$	3
Kontrolle + H_2O_2	$3,9 \pm 1,4$	2
Kontrolle + H_2O_2 + FPG	$4,0 \pm 0,4$	2
25	$2,2 \pm 2,2$	3
25 + FPG	$2,5 \pm 1,4$	3
25 + H_2O_2	$9,5 \pm 5,3$	2
25 + H_2O_2 + FPG	$6,6 \pm 2,8$	2
100	$5,6 \pm 4,6$	3
100 + FPG	$5,6 \pm 4,9$	3
100 + H_2O_2	$38,1 \pm 2,1$	2
100 + H_2O_2 + FPG	$40,8 \pm 7,4$	2

* Anzahl unabhängiger Experimente

(2E,6Z)-2,6-Nonadienal (NONDI)

Konzentration/ μM	Mittelwert TI/%	n*
Kontrolle	1,1 \pm 0,9	4
Kontrolle + FPG	1,1 \pm 0,6	4
Kontrolle + H ₂ O ₂	2,2 \pm 0,7	4
Kontrolle + H ₂ O ₂ + FPG	2,4 \pm 0,7	4
25	0,6 \pm 0,2	2
25 + FPG	0,9 \pm 0,4	2
25 + H ₂ O ₂	20,0 \pm 6,4	2
25 + H ₂ O ₂ + FPG	20,8 \pm 3,6	2
50	1,3 \pm 0,7	3
50 + FPG	1,8 \pm 1,5	3
50 + H ₂ O ₂	44,3 \pm 16,8	3
50 + H ₂ O ₂ + FPG	46,0 \pm 19,8	3
100	8,1 \pm 5,2	2
100 + FPG	12,3 \pm 7,8	2
100 + H ₂ O ₂	63,5 \pm 6,7	2
100 + H ₂ O ₂ + FPG	63,3 \pm 14,3	2

* Anzahl unabhängiger Experimente

Zimtaldehyd (CA)

Konzentration/ μM	Mittelwert TI/%	n*
Kontrolle	$0,8 \pm 0,3$	3
Kontrolle + FPG	$1,9 \pm 0,7$	3
Kontrolle + H_2O_2	$3,9 \pm 1,9$	3
Kontrolle + H_2O_2 + FPG	$7,1 \pm 3,0$	3
50	0,9	1
50 + FPG	1,6	1
50 + H_2O_2	4,3	1
50 + H_2O_2 + FPG	9,1	1
100	$1,6 \pm 0,5$	2
100 + FPG	$2,0 \pm 0,3$	2
100 + H_2O_2	$12,7 \pm 2,4$	2
100 + H_2O_2 + FPG	$33,2 \pm 6,1$	2
200	$7,8 \pm 7,6$	2
200 + FPG	$12,0 \pm 14,5$	2
200 + H_2O_2	$16,9 \pm 4,6$	2
200 + H_2O_2 + FPG	$51,3 \pm 0,1$	2

* Anzahl unabhängiger Experimente

9.4.1.3 2-Cyclohexen-1-on (CHX)

Konzentration/ μM	Mittelwert TI/%	n*
Kontrolle	$2,7 \pm 1,2$	3
Kontrolle + FPG	$4,1 \pm 1,9$	3
Kontrolle + H_2O_2	$7,9 \pm 2,3$	3
Kontrolle + H_2O_2 + FPG	$12,7 \pm 3,5$	3
100	$8,3 \pm 3,1$	3
100 + FPG	$8,9 \pm 2,3$	3
100 + H_2O_2	$35,1 \pm 6,8$	3
100 + H_2O_2 + FPG	$43,6 \pm 0,5$	3
200	$4,9 \pm 1,5$	3
200 + FPG	$5,8 \pm 2,4$	3
200 + H_2O_2	$51,0 \pm 9,8$	2
200 + H_2O_2 + FPG	$54,7 \pm 5,0$	2

* Anzahl unabhängiger Experimente

9.4.1.4 Vergleich der Ergebnisse

Die Werte für die verschiedenen Substanzen sind den jeweiligen Tabellen für die Substanzen in Kapitel 9.4.1.1 bis 9.4.1.3 zu entnehmen.

9.4.2 Oxidative DNA-Schäden an primären humanen Colonzellen

Konzentration/ μM	Mittelwert TI/%	n*
Kontrolle	$1,3 \pm 0,7$	4
Kontrolle + FPG	$2,0 \pm 0,8$	5
Kontrolle + H_2O_2	$4,2 \pm 0,8$	4
Kontrolle + H_2O_2 + FPG	$3,8 \pm 2,0$	4
HEX 200	$2,7 \pm 1,8$	4
HEX 200 + FPG	$1,9 \pm 1,0$	3
HEX 200 + H_2O_2	$7,4 \pm 3,5$	3
HEX 200 + H_2O_2 + FPG	$8,3 \pm 5,8$	3
CHX 400	$3,6 \pm 2,2$	5
CHX 400 + FPG	$4,0 \pm 1,3$	5
CHX 400 + H_2O_2	$16,0 \pm 12,0$	4
CHX 400 + H_2O_2 + FPG	$12,7 \pm 6,8$	4
Kontrolle	$9,0 \pm 0,2$	3
Kontrolle + FPG	$13,5 \pm 2,0$	3
Kontrolle + H_2O_2 25	$22,8 \pm 8,6$	4
Kontrolle + H_2O_2 25 + FPG	$25,5 \pm 3,1$	3

* Anzahl unabhängiger Experimente

9.4.3 Oxidative DNA-Schäden während 3 h Postinkubation in V79 Zellen

Konzentration/ μM	Mittelwert TI/%	n*
Kontrolle	$3,3 \pm 2,8$	5
Kontrolle + FPG	$1,3 \pm 0,1$	2
Kontrolle (3 h Postinkubation)	$3,0 \pm 1,6$	5
Kontrolle + (3 h Postinkubation) + FPG	$4,6 \pm 2,5$	3
HEX 200	$28,7 \pm 17,8$	6
HEX 200 + FPG	$26,3 \pm 13,0$	5
HEX 200 +(3 h Postinkubation) + H_2O_2	$15,8 \pm 3,8$	5
HEX 200 + (3 h Postinkubation) + FPG	$26,2 \pm 10,4$	6

* Anzahl unabhängiger Experimente

9.5 Gentoxizität in Bakterien

9.5.1 (E)-2-Hexenal (HEX)

Konzentration/ μM	absolute UMU-Units	n*
Kontrolle	$254,3 \pm 8,4$	3
50	275,1	1
250	229,8	1
500	$174,6 \pm 7$	2
500 + MNNG 4	$207,2 \pm 0,4$	2
MNNG 4	$400,6 \pm 75,3$	3

* Anzahl unabhängiger Experimente

9.5.2 2-Cyclohexen-1-on (CHX)

Konzentration/ μM	rel. UMU-Units/%	n*
Kontrolle	100,0	5
100	$88,8 \pm 4,5$	2
200	$88,8 \pm 12,5$	5
300	$79,9 \pm 8,3$	3
400	$85,7 \pm 29,4$	3
800	$74,3 \pm 17,0$	3
1000	$79,0 \pm 10,6$	3
MNNG 4	224,4	1

* Anzahl unabhängiger Experimente

9.5.3 5-Hydroxymethylfurfural (HMF)

5-Hydroxymethylfurfural (HMF) ohne Aktivierung

Konzentration/mM	abs. UMU-Units	n*
Kontrolle	$226,3 \pm 16,7$	6
8	$298,5 \pm 22,5$	2
12	$369,2 \pm 54,4$	3
16	$418,4 \pm 65,0$	5
20	$447,1 \pm 57,8$	3
MNNG 4	$455,9 \pm 62,5$	4

* Anzahl unabhängiger Experimente

5-Hydroxymethylfurfural (HMF) mit Aktivierung

Konzentration/mM	abs. UMU-Units	n*
Kontrolle + S9-Mix	218,1 ± 3,7	3
16 + S9-Mix	358,9 ± 67,4	3
16 - S9-Mix	369,9 ± 61,3	2
Aminoanthracen + S9-Mix	668,5 ± 117,9	3

* Anzahl unabhängiger Experimente

9.6 Induktion von Apoptose

9.6.1 Inkubation mit HEX

Einstündige Inkubation mit HEX

Parameter	Kontrolle*/%	n**	HEX 100 μ M*/%	n**
G1	44,0 ± 3,1	3	40,7 ± 2,3	4
S	36,4 ± 24,7	3	43,0 ± 22,5	4
G2	19,6 ± 26,9	3	16,3 ± 23,8	4
Apoptose	3,26 ± 1,2	2	3,0 ± 0,7	2
Debris	8,3 ± 4,2	3	7,5 ± 2,3	4

* Mittelwert der Zellen

** Anzahl unabhängiger Experimente

Einstündige Inkubation mit HEX und 6stündige Postinkubation

Parameter	Kontrolle*/%	n**	HEX* 100 µM/%	n**
G1	44,5 ± 0,9	3	27,0 ± 2,6	5
S	12,1 ± 0,5	3	18,2 ± 5,3	5
G2	43,5 ± 0,4	3	54,7 ± 6,4	5
Apoptose	3,3 ± 1,1	3	4,6 ± 1,4	5
Debris	3,7 ± 2,4	3	19,9 ± 9,6	5

* Mittelwert der Zellen

** Anzahl unabhängiger Experimente

Einstündige Inkubation mit HEX und 16stündige Postinkubation

Parameter	Kontrolle*/%	n**	HEX* 100µM/%	n**	H ₂ O ₂ * 5 mM/%	n**
G1	45,9 ± 6,6	4	39,3 ± 12,5	5	19,2 ± 1,9	5
S	48,3 ± 3,1	4	55,0 ± 17,2	5	56,2 ± 3,3	5
G2	5,9 ± 3,9	4	5,7 ± 5,7	5	24,6 ± 5,0	5
Apoptose	3,6 ± 0,3	2	5,6 ± 0,4	3	12,6 ± 1,6	3
Debris	9,0 ± 2,7	4	29,0 ± 5,3	5	30,6 ± 1,6	5

* Mittelwert der Zellen

** Anzahl unabhängiger Experimente

Veröffentlichungen aus dieser Arbeit

Publikationen:

Glaab V., Collins A.R., Eisenbrand G. und Janzowski C. DNA damaging potential, mutagenicity and glutathione depletion of 2-cyclohexene-1-one in mammalian cells, compared to food relevant 2-alkenals, zur Veröffentlichung eingereicht.

Janzowski C., **Glaab V.**, Samimi E., Schlatter J. und Eisenbrand G. (2000) 5-Hydroxymethylfurfural: Assessment of mutagenicity, DNA damaging potential and reactivity towards cellular glutathione, Food Chemical and Toxicology 38, 801-809.

Janzowski C., **Glaab V.**, Samimi E., Schlatter J., Pool-Zobel B.L. und Eisenbrand G. (2000) Food relevant α,β -unsaturated carbonyl compounds: In vitro toxicity, genotoxic (mutagenic) effectiveness and reactivity towards glutathione. In Carcinogenic and Anticarcinogenic Factors in Food (Eds. Eisenbrand G., Dayan A.D., Elias P.S., Grunow W. and Schlatter J.) 469-473.

Vorträge:

Glaab V., Gölzer P. und Janzowski C. (2000) Hexenal 6. Sitzung der Senatskommission zur Beurteilung der gesundheitlichen Unbedenklichkeit von Lebensmitteln Arbeitsgruppe „Lebensmittelbegleitstoffe“. Kaiserslautern, 26.10.2000.

Glaab V. (2000) α,β -ungesättigte Carbonylverbindungen. 5. Sitzung der SKLM Arbeitsgruppe „Lebensmittelbegleitstoffe“. Zürich 06-07.04.2000.

Glaab V., Matyas A., Müller C., Eisenbrand G. und Janzowski C. (2000) α,β -ungesättigten Carbonylverbindungen: Beeinflussung des zellulären Glutathiospiegels. Regionaltagung Südwest der Lebensmittelchemischen Gesellschaft. Karlsruhe 03-04.03.2000.

Glaab V., Janzowski C., Ruf T., Albert F.W. und Eisenbrand G. (2000) Einsatz humaner Colonzellen zur Prüfung lebensmittelrelevanter Stoffe auf toxische/genotoxische Wirkung. Jahreskongreß der Saarländisch-Pfälzischen Internistengesellschaft. Saarbrücken 10-11.03.2000.

Glaab V., Schlatter J., Eisenbrand G. und Janzowski C. (2000) Genotoxic and mutagenic effects of 5-hydroxymethylfurfural (HMF) in bacterial and mammalian cells. 18. Tagung der Gesellschaft für Umwelt- Mutationsforschung e.V.. Ulm 22-25.02.2000.

Glaab V. Janzowski C. und Eisenbrand G. (1998) In-vitro Untersuchung des genotoxischen/mutagenen Potentials von 2-Cyclohexen-1-on im Vergleich zu aromawirksamen 2-Alkenalen. Regionaltagung Südwest der Lebensmittelchemischen Gesellschaft. Gießen 09-10.03.1998.

Abstraktpublikationen:

- Glaab V.**, Eisenbrand G. und Janzowski C. (2001) Einfluß α,β -ungesättigter Carbonylverbindungen auf den zellulären Glutathiongehalt und mögliche Konsequenzen, Archives of Pharmacology 363, Supplement R169.
- Janzowski C., **Glaab V.**, Müller C. und Eisenbrand G. (2000) α,β -Ungesättigten Carbonylverbindungen in Lebensmitteln: In-vitro Untersuchungen zur Induktion von oxidativem Streß an Säugerzellen. Lebensmittelchemie, 54, 134.
- Glaab V.**, Müller C., Eisenbrand G. und Janzowski C. (2000) α,β -Unsaturated carbonyl compounds: Inducers of oxidative DNA damage? Archives of Pharmacology 361, R155.
- Janzowski C., **Glaab V.**, Müller C., Collins A.R. und Eisenbrand G. (2000) Induction of oxidative DNA damage in V79 cells following incubation with (*E*)-2-hexenal and 2-cyclohexen-1-one, Proceedings of the American Association for Cancer Research 41,234.
- Janzowski C., **Glaab V.**, Schlatter J., Albert, F.W und Eisenbrand G. (2000) In-vitro Untersuchungen zur genotoxischen/mutagenen Wirkung von 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) und seiner Reaktivität gegenüber Glutathion. Lebensmittelchemie 54, 34.
- Janzowski C., **Glaab V.** und Eisenbrand G. (1999) Food relevant α,β -unsaturated carbonyl compounds: Reactivity towards glutathione and induction of oxidative DNA damage, ISSX Proceedings 15, 241
- Janzowski C., **Glaab V.**, Samimi E., Schlatter J., Schmitz H., Schrenk D. und Eisenbrand G. (1999) 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) genotoxic/mutagenic effectiveness and reactivity towards glutathione compared to structurally related α,β -unsaturated carbonyl compounds, Proceedings of the American Association for Cancer Research 40, 508.
- Janzowski C., **Glaab V.**, Albert, F.W., Schlatter J., Pool-Zobel B.L. und Eisenbrand G. (1999) Food relevant α,β -unsaturated carbonyl compounds, investigated for genotoxic/mutagenic effectiveness, cytotoxicity and glutathione depletion, Journal of Cancer Research and Clinical Oncology Suppl. 125, 30.
- Glaab V.** Janzowski C. und Eisenbrand G. (1999) DNA-schädigendes und mutagenes Potential von 2-Cyclohexen-1-on im Vergleich zu anderen α,β -ungesättigten Carbonylverbindungen, Lebensmittelchemie 53, 46.
- Janzowski C., **Glaab V.**, Samimi E., Schlatter J., Pool-Zobel B.L. und Eisenbrand G. (1998) Genotoxic and mutagenic effectiveness of food relevant alpha, beta-unsaturated carbonyl compounds. Cancer Detection and Prevention, 22 Supl.1, 133.
- Janzowski C., **Glaab V.**, Samimi E. und Eisenbrand G. (1998) Genotoxic/mutagenic effectiveness of 2-cyclohexen-1-one (CHO) in mammalian cells compared to

flavouring alkenals, Proceedings of the American Association for Cancer Research 39, 331.

Janzowski C., **Glaab V.** und Eisenbrand G. (1998) Cytotoxische und genotoxische Wirkungen von lebensmittelrelevanten α,β -ungesättigten Carbonylverbindungen, Lebensmittelchemie 52, 53.

Janzowski C., **Glaab V.** und Eisenbrand G. (1997) Cytotoxic and mutagenic effectiveness of food related α,β -unsaturated carbonyl compounds in mammalian cells, Mutation Research 379, Suppl. 1, 175.

Janzowski C., **Glaab V.** und Eisenbrand G. (1997) Cytotoxic and genotoxic effects of 2-cyclohexen-1-one in V79 cells and in Salmonella typhimurium, Proceedings of the American Association for Cancer Research 38, 41.

Tagungsbandbeiträge:

Glaab V., Sträßer U., Albert F.W., Eisenbrand G., Janzowski C. (2001) α,β -Ungesättigte Carbonylverbindungen: Induktion für oxidativen Streß infolge Glutathion-Depletion, Jahreskongreß der Saarländisch-Pfälzischen Internistengesellschaft. Saarbrücken 8-10.03.2001.

Glaab V., Sträßer U., Albert F.W., Eisenbrand G., Janzowski C. (2001) α,β -Ungesättigte Carbonylverbindungen: Induktion für oxidativen Streß infolge Glutathion-Depletion, Posterpräsentation des Schwerpunktes Medizin, Naturwissenschaften und Technik, Universität Kaiserslautern, 09.12.2000.

Janzowski C., **Glaab V.**, Ruf T., Albert F.W. und Eisenbrand G. (1999) Einsatz humaner Colonzellen zur Prüfung lebensmittelrelevanter Stoffe auf toxische/genotoxische Wirkung. Posterpräsentation auf der Tagung der Gastroenterologen-Rheinland-Pfalz, Bad Kreuznach 29-30.10.1999.

Janzowski C., **Glaab V.**, Samimi E., Albert F.W. und Eisenbrand G. (1998) In-vitro Untersuchungen zum genotoxischen/mutagenen Potential von lebensmittelrelevanten α,β -ungesättigten Carbonylverbindungen. Posterpräsentation des Schwerpunktes Medizin, Naturwissenschaften und Technik, Universität Kaiserslautern, 21.11.1998.

Danken möchte ich

meinen Forschungspraktikanten Effat Samimi Sedeh, Jörg Ertel, Ragna Hussong, Stephanie Lösch, Marco Zimmer, Christoph Müller, Sandra Schwarz, Ute Sträßler und Anita Lagutschenkov sowie den Austauschstudenten Céline Gonthier und Julien Demausy,

meinen ehemaligen Laborkollegen Kirsten Ackermann, Tanja Reichert, Agnes Matyas, Maria Lorenz, besonders Hennieke Kamp und Christoph Müller,

meinen ehemaligen Zellaborkollegen Matthias Baum, Sabine Guth, Sonja Böhm, Anette Höll, Miriam Gensler, Sigi Follmann, Karsten Müller (Danke für die Kopien) und Daniela Seng,

dem 5. Stock, vor allem Andrea Thommet und Anja Müller,

den Mitstreitern im Volleyball und Fußball,

den 11.30 Uhr-Mittagsessern und Mittwochs-Frühstückern,

den Fachtoxkurskollegen und Ferienwohnungsliebhabern,

unseren guten Seelen im Sekretariat Ingrid Romani, Ingrid Hemm und Heike Syring,

dem fruchtbaren Nachbarlabor mit Rainer Scheuermann, Ari Vetter, Susanne Gölzer und Silke Ripp für manchen Spaß und Gefallen (ich sage nur Pipettenspitzen),

Daniela Seng für manche Neuigkeit, die vielen Mails und die gute Freundschaft,

Matthias Baum für unsere gemeinsamen Vorträge (Äppelwoi in Gießen), die gute Freundschaft und die Hilfe in den letzten Tagen dieser Arbeit,

Christoph Müller für die Zusammenarbeit im Labor, die Nachrichten aus dem Labor während der Zeit des Zusammenschreibens, die Übernachtungsmöglichkeiten, die gute Freundschaft und für alles, was ich jetzt eh vergessen habe,

den vier „Unzertrennlichen“ Christoph, Vera, Hennieke und Silke für gemütliche Abende mit selbstgebrautem Bier,

Claudia und Kalle für das Korrekturlesen und manch lustigen Abend,

Ellen, Markus, Stefan, Ingrid und Hartmut, und allen, die ich hier Vergessen habe.

Besonderer Dank gebührt natürlich meiner Familie, meinen Eltern, die mir das Studium ermöglicht haben, Thomas, Barbara und Ralph, die immer zu mir gestanden haben, Volkmar und Vicky für viele interessante Diskussionen, sowie Ulrike und Werner.

Mein liebster Dank gilt natürlich Tatiana für die wunderbaren gemeinsamen Jahre in Kaiserslautern und dafür, daß sie meine Frau ist.

LEBENS LAUF

Name Volker Glaab
Geburtsdatum 21.02.1971
Geburtsort Offenbach a.M.
Familienstand verheiratet
Staatsangehörigkeit deutsch

Schulbildung

08/1977 – 06/1981 Grundschule Anna-Freud-Schule, Mainflingen
08/1981 – 06/1983 Förderstufe Gerhart-Hauptmann-Schule, Klein-Welzheim
08/1983 – 06/1990 Gymnasium Einhardschule, Seligenstadt
12.06.1990 Abitur

Zivildienst

07/1990 - 09/1991 Kuratorium für Heimdialyse e.V., Offenbach

Hochschulstudium

10/1991 – 10/1997 Studiengang Lebensmittelchemie an der Universität Kaiserslautern
28.03.1994 staatliche Vorprüfung
13.12.1996 Erste Staatsprüfung
21.10.1997 Erlangen des Diploms im Studiengang LM-Chemie
seit 11/1997 Promotion im Arbeitskreis Prof. Dr. G. Eisenbrand, Lebensmittelchemie und Umwelttoxikologie, Fachbereich Chemie der Universität Kaiserslautern

Tätigkeit während des Hochschulstudiums

02/1997 - 08/1998 wissenschaftliche Hilfskraft
09/1998 - 11/2000 wissenschaftlicher Mitarbeiter