

Charakterisierung der DNA-schädigenden Wirkung von Acrylamid in Lebensmitteln am Modell der Ratte

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

(D 386)

vorgelegt von
Diplom-Lebensmittelchemikerin
Julia Feld

Kaiserslautern, 2010

für Michael

Die vorliegende Arbeit entstand im Zeitraum von Mai 2006 bis September 2009 im
Fachbereich Chemie, Fachrichtung Lebensmittelchemie und Toxikologie
der Technischen Universität Kaiserslautern

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 16.12.2010

Prüfungskommission

Vorsitzender: Prof. Dr. Stefan Ernst
1. Berichterstatter: Prof. Dr. Gerhard Eisenbrand
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Dieter Schrenk

Ich danke Herrn Prof. Dr. Eisenbrand und Herrn Dr. Baum für die Überlassung des
interessanten Themas und die stete Diskussionsbereitschaft und Unterstützung während
meiner Promotionszeit.

Inhalt

1	EINLEITUNG	1
2	THEORETISCHE GRUNDLAGEN	3
2.1	Acrylamid	3
2.1.1	Allgemeine Grundlagen	3
2.1.2	Expositionsquellen und -abschätzungen	3
2.1.3	Bildung von Acrylamid im Lebensmittel	5
2.1.4	Strategien zur Minimierung des Acrylamid-Gehaltes im Lebensmittel	9
2.1.5	Toxikokinetik	10
2.1.5.1	Aufnahme	10
2.1.5.2	Verteilung	11
2.1.5.3	Metabolismus	12
2.1.5.4	Ausscheidung	16
2.1.5.5	Reaktion mit Makromolekülen	18
2.1.6	Toxikodynamik	21
2.1.6.1	Genotoxizität und Mutagenität	21
2.1.6.2	Kanzerogenität	24
2.1.6.3	Neurotoxizität	25
2.1.6.4	Reproduktionstoxizität	26
2.2	Biochemische Grundlagen der DNA	26
2.2.1	DNA-Alkylierung	26
2.2.2	Reparatur alkylierter DNA-Basen	30
2.3	Methodische Grundlagen	33
2.3.1	Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)	33
2.3.2	Comet Assay	35
2.3.3	HPLC-MS/MS und Elektrospray-Ionisierung (ESI)	36
2.3.3.1	Elektrospray-Ionisierung (ESI)	37
2.3.3.2	Triple-Quadrupol-Tandemmassenspektrometer	38
3	PROBLEMSTELLUNG	40
4	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	42
4.1	Einfluss der Lebensmittelmatrix auf die biologische Aktivität von Acrylamid in der Ratte	42
4.1.1	Vorversuche	43
4.1.2	Untersuchung der DNA-schädigenden Wirkung von Acrylamid mittels Comet Assay	45
4.1.3	Genexpressionsuntersuchungen mittels Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)	50
4.1.4	Untersuchung von <i>N7</i> -Guanin-Addukten des Glycidamids mittels HPLC-MS/MS	55
4.1.4.1	Etablierung der HPLC-Methode zur Untersuchung von <i>N7</i> -Guanin-Addukten des Glycidamids	56
4.1.4.2	Bestimmung von <i>N7</i> -Guanin-Addukten des Glycidamids in DNA aus Gewebeproben	64

4.2	Untersuchung der zeit- und dosisabhängigen Bildung von <i>N7</i>-Guanin-Addukten des Glycidamids sowie Acrylamid- und Glycidamid-Mercaptursäuren in der Ratte	70
4.2.1	Bestimmung von <i>N7</i> -Guanin Addukten des Glycidamids in DNA aus Gewebeproben	70
4.2.1.1	Zeitabhängige Bildung von <i>N7</i> -Guanin-Addukten des Glycidamids	70
4.2.1.2	Dosisabhängige Bildung von <i>N7</i> -Guanin-Addukten des Glycidamids	76
4.2.2	Untersuchung der Mercaptursäuren von Acrylamid und Glycidamid	79
4.2.2.1	Zeitabhängige Bildung von Acrylamid- und Glycidamid-Mercaptursäuren	79
4.2.2.2	Dosisabhängige Bildung von Acrylamid- und Glycidamid-Mercaptursäuren	87
4.3	Abschließende Betrachtung	91
5	ZUSAMMENFASSUNG	94
6	METHODEN UND MATERIALIEN	97
6.1	Fütterungsstudie an der Ratte	97
6.1.1	Spezifikation der Acrylamid-haltigen Lebensmittel	97
6.1.2	Konditionierung der Tiere	101
6.1.3	Behandlung der Tiere in der Hauptstudie	102
6.1.4	Kumulative Dosis (450 bzw. 900 µg Acrylamid/kg KG) und 10 mg Acrylamid/kg KG	103
6.1.5	Einfluss von Isofluran auf den Metabolismus von Acrylamid	104
6.2	Studie zur zeit- und dosisabhängigen Bildung von <i>N7</i>-Glycidamid-Guanin-Addukten und Mercaptursäuren in der Ratte	105
6.3	Genexpressionsuntersuchungen	106
6.3.1	RNA Isolierung	106
6.3.2	reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)	106
6.3.3	Primervalidierung	107
6.3.4	Gelelektrophorese	108
6.3.5	Detektion	108
6.3.6	Verwendete Puffer und Lösungen	108
6.4	alkalische Einzelzellgelelektrophorese – Comet Assay	109
6.4.1	Vorbereiten der Objektträger	109
6.4.2	Isolierung von Leberzellen	109
6.4.3	Viabilitätsbestimmung mit Trypanblau	110
6.4.4	Auftragen des Probenmaterials auf den Objektträger	111
6.4.5	Zelllyse	111
6.4.6	Enzymbehandlung	111
6.4.7	DNA-Entwindung und Gelelektrophorese	111
6.4.8	Neutralisation, Konservierung und Anfärben	112
6.4.9	Auswertung	112
6.4.10	Verwendete Puffer und Lösungen	112
6.5	Massenspektrometrische Untersuchungen	115
6.5.1	Allgemeines	115
6.5.1.1	Tuning und Kalibrierung	115
6.5.1.2	Optimierung der substanz- und quellenspezifischen Parameter	116
6.5.1.3	Quantifizierung mittels Isotopenverdünnungsanalyse	118
6.5.1.4	Nachweis- und Bestimmungsgrenzen	118

6.5.2	Bestimmung von <i>N7</i> -Glycidamid-Guanin-Addukten mittels HPLC-ESI-MS/MS	118
6.5.2.1	Massenspektrometrische Untersuchungen	118
6.5.2.2	Chromatographie	120
6.5.2.3	Linearität	121
6.5.2.4	Nachweis- und Bestimmungsgrenze	121
6.5.2.5	Lauf-zu-Lauf- und Tag-zu-Tag-Variabilität	123
6.5.2.6	Gewebeisolierung und Verdau	123
6.5.2.7	Chloroform-Phenol-Extraktion	124
6.5.2.8	Ethanolpräzipitation	124
6.5.2.9	DNA-Konzentrationsbestimmung	125
6.5.2.10	Neutrale thermische Hydrolyse	125
6.5.2.11	Isolierung der <i>N7</i> -Glycidamid-Guanin-Addukte mittels Größenausschlusszentrifugation	125
6.5.2.12	Wiederfindung der <i>N7</i> -Glycidamid-Guanin-Addukte nach der Größenausschlusszentrifugation	126
6.5.3	Bestimmung der Mercaptursäuren von Acrylamid und Glycidamid	126
6.5.3.1	Massenspektrometrische Untersuchungen	126
6.5.3.2	Chromatographie	128
6.5.3.3	Linearität	129
6.5.3.4	Nachweis- und Bestimmungsgrenzen	129
6.5.3.5	Tag-zu-Tag- und Lauf-zu-Lauf-Variabilität	130
6.5.3.6	Aufreinigung und Aufkonzentrierung der Mercaptursäuren mittels Festphasenextraktion	130
6.5.3.7	Wiederfindung der Mercaptursäuren nach der Festphasenextraktion	131
6.6	verwendete Geräte	132
6.7	verwendete Chemikalien	133
7	ABKÜRZUNGEN	134
8	LITERATUR	137
9	ANHANG	150

1 Einleitung

Die α,β -ungesättigte Carbonylverbindung Acrylamid entsteht beim Erhitzen von kohlenhydratreichen Lebensmitteln aus der Reaktion von Aminosäuren (hauptsächlich Asparagin) und reduzierenden Zuckern als Nebenprodukt der Maillard-Reaktion [Stadler et al., 2002; Mottram et al., 2002]. Die durchschnittliche tägliche Acrylamidaufnahme mit der Nahrung wird in Deutschland auf 0,6 $\mu\text{g}/\text{kg KG}$ geschätzt [BfR, 2003a]. Weltweit wird eine durchschnittliche tägliche Aufnahme von 1 μg Acrylamid/kg KG angenommen [JECFA, 2010].

Basierend auf Tierstudien legte die World Health Organisation einen NOAEL von 0,5 mg Acrylamid/kg KG für Neurotoxizität und einen NOAEL von 2 mg Acrylamid/kg KG für Reproduktionstoxizität fest [WHO, 2002]. Ausgehend von einer täglichen Acrylamid-Aufnahme von 1 $\mu\text{g}/\text{kg KG}$ berechnete das Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) einen Margin of Exposure (MOE) von 300, welcher als bedenklich für die menschliche Gesundheit eingeschätzt wird [JECFA, 2010]. In Langzeitstudien an Ratten wurde auch ein kanzerogenes Potential von Acrylamid nachgewiesen, was zu seiner Klassifizierung als „wahrscheinlich kanzerogen am Menschen“ (Kategorie 2a) durch die International Agency for Research on Cancer führte [IARC, 1994]. Als Auslöser der Kanzerogenität von Acrylamid wird ein genotoxischer Mechanismus vermutet, der auf der Reaktion von Glycidamid mit der DNA unter Ausbildung des Hauptadduktes *N7*-Glycidamid-Guanin (*N7*-GA-Guanin) basiert [Rice, 2005]. Die mögliche promotagene Wirkung der *N7*-GA-Guanin-Addukte beruht auf ihrer chemischen Instabilität, die die Ringöffnung der geschädigten Base oder ihre Hydrolyse unter Ausbildung einer apurinischen Stelle zur Folge haben kann.

Entscheidend für die Risikobewertung von Acrylamid ist der Abstand zwischen der niedrigsten, genotoxisch wirksamen Konzentration und der unter ungünstigen Bedingungen im Organismus erreichten Konzentration. Dieses Zusammenspiel wird beeinflusst durch die Aufnahme von Acrylamid aus dem Lebensmittel, die Metabolisierung von Acrylamid zu Glycidamid sowie deren Entgiftung und die Reparatur der geschädigten DNA.

In den meisten Studien zur Untersuchung der Genotoxizität und Kanzerogenität von Acrylamid *in vivo* wurde Acrylamid als Reinstoff in wässriger Lösung verwendet. Dabei bleibt jedoch unberücksichtigt, inwieweit sich die komplexe Lebensmittelmatrix auf die Bioverfügbarkeit und die biologische Aktivität von Acrylamid auswirkt. Zudem ist nicht bekannt, in welchem Ausmaß die Metabolisierung zum genotoxischen Metaboliten Glycidamid bei der Aufnahme von Acrylamid über Lebensmittel erfolgt und ob Lebensmittelinhaltsstoffe einen Beitrag zur Giftung oder Entgiftung leisten. Vergleichende

Untersuchungen zur Genotoxizität von Acrylamid, aufgenommen über Trinkwasser oder nach Generierung im Lebensmittel, sind damit für die Risikobewertung von Acrylamid von wesentlicher Bedeutung.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Acrylamid

2.1.1 Allgemeine Grundlagen

Acrylamid (2-Propenamid) liegt bei Raumtemperatur als sehr gut wasserlöslicher, kristalliner Feststoff vor. Es besitzt ein Molekulargewicht von 71,06 g/mol. Oberhalb des Schmelzpunktes von 84 °C neigt es zur Polymerisierung. Diese Eigenschaft macht man sich zunutze bei der Herstellung von Polyacrylamiden, die vor allem in der Abwasseraufbereitung, in der papier- und zellstoffverarbeitenden Industrie, zur Mineralölaufarbeitung, sowie in molekularbiologischen Labors verwendet werden. Außerdem finden Polyacrylamide Verwendung als Zusatzstoffe in Kosmetika und Farben.

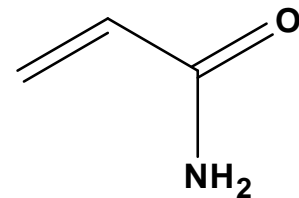


Abbildung 2.1: Acrylamid

Auf Grund seiner α,β -ungesättigten Amid-Struktur reagiert es mit nucleophilen Verbindungen in einer Michael-Addition [Calleman et al., 1996; Dearfield et al., 1995]. Von der International Agency for Research on Cancer (IARC) wurde Acrylamid als „wahrscheinlich kanzerogen beim Menschen“ (Gruppe 2a) eingestuft [IARC, 1994].

2.1.2 Expositionsquellen und -abschätzungen

Die Entdeckung von Acrylamid als Lebensmittelkontaminante erfolgte eher zufällig. Durch einen Unfall bei Bauarbeiten im schwedischen Hallandsås-Tunnel im Jahr 1997 gelangte offenbar unvollständig polymerisiertes Acrylamid ins Grundwasser. In der Folge wurden ein vermehrtes Fischsterben und neurologische Störungen bei Rindern beobachtet. Die Untersuchung von betroffenen Tunnelarbeitern ergab, dass diese zwar deutliche Acrylamid-Belastungen aufwiesen, aber auch bei der nicht beruflich exponierten Kontrollgruppe eine Hintergrundbelastung an Acrylamid-Hämoglobinaddukten festzustellen war [Bergmark et al., 1997; Törnqvist et al. 1998]. Die Vermutung, dass Acrylamid möglicherweise beim Erhitzen von Lebensmitteln entstehen könnte wurde durch eine Studie an Ratten, denen eine gebratene Standarddiät verabreicht wurde, bestätigt [Tareke et al., 2000].

Insbesondere erhitze kohlenhydratreiche Lebensmittel wie Pommes Frites und Kartoffelchips, aber auch Backwaren wie Lebkuchen und Knäckebrot weisen hohe Gehalte an Acrylamid auf [Tareke et al., 2002]. Auch Kaffee hat einen deutlichen Anteil an der

Acrylamid-Exposition über Lebensmittel [Boon et al., 2005]. In Tabelle 2.1 sind die Acrylamidgehalte einiger Lebensmittelgruppen aufgeführt.

Tabelle 2.1: Acrylamidgehalte verschiedener Lebensmittelgruppen in µg/kg Lebensmittel [Bayrisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, 2008]

Lebensmittelgruppe	Probenzahl	Minimum	Median	Maximum
Lebkuchen und lebkuchenhaltiges Gebäck	96	< 20	121,2	1232,0
Spekulatius	27	< 20	117,9	361,1
Feine Backwaren (außer Mürbeteig)	5	< 20	72,8	991,8
Knäckebrot	4	139,6	283,3	387,9
Kartoffelchips	96	45,7	286,7	2365,0
Pommes Frites, zubereitet	69	< 20	357,6	1276,3
Kaffee, geröstet	47	18,9	192,2	556,4
Kaffeextrakt	34	180,7	708,7	1372,6
Kaffeersatz	22	76,5	520,0	920,0
Getreidebeikost (Säuglinge/Kleinkinder)	6	< 20	18,5	93,7
Kinderkeks	22	< 20	26,7	168,8
Säuglings- und Kleinkindernahrung	4	9,2	12,4	29,8

Das Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) schätzt die durchschnittliche tägliche Acrylamid-Aufnahme der Bevölkerung weltweit auf 0,3 bis 2,0 µg/kg KG. Konsumenten, die im Perzentil 90 bis 97,5 % liegen, nehmen zwischen 0,6 und 3,5 µg Acrylamid/kg KG/d auf [WHO, 2005]. Basierend auf aktuellen Acrylamid-Gehalten aus Daten der deutschen Lebensmittelüberwachung und einer nationalen Verzehrsstudie aus den späten 1980er Jahren schätzt das BfR die tägliche Acrylamid-Aufnahme des deutschen Verbrauchers über Lebensmittel auf ca. 0,6 µg/kg KG [BfR, 2003a].

Die Acrylamid-Exposition über Lebensmittel ist für Kinder und Jugendliche vermutlich höher als für Erwachsene. Neben unterschiedlichen Ernährungsgewohnheiten ist hierfür das mit dem geringeren Körpergewicht verbundene erhöhte Verhältnis an Aufnahme pro kg Körpergewicht und Tag verantwortlich. Dies wurde auch in einer Studie des BfR gezeigt, in der von über 1000 Berliner Schülerinnen und Schülern zwischen 15 und 18 Jahren Daten zur

Aufnahme von Acrylamid aus belasteten Lebensmitteln erhoben wurden. Die ermittelten Verzehrdaten wurden mit aktuellen Acrylamid-Belastungsdaten der Lebensmitteluntersuchungsbehörden verknüpft. Es wurde eine mittlere tägliche Aufnahme von 1,1 µg Acrylamid/kg KG ermittelt, wobei 5 % aller Berliner Schülerinnen und Schüler täglich mehr als 3,4 µg Acrylamid/kg KG und 1 % mehr als 6,9 µg Acrylamid/kg KG/d aufnahmen [BfR, 2004]. In einer weiteren Studie mit Kindern im Alter von fünf bis sechs Jahren wurde an Hand von Fragebögen und Mercaptursäure-Biomonitoring eine tägliche Acrylamid-Aufnahme mit einem Median von 0,54 µg/kg KG herausgefunden [Heudorf et al., 2008].

Eine zusätzliche wichtige Expositionsquelle für Acrylamid ist Tabakrauch. Im gefilterten Hauptstrom einer Zigarette wurden 1,1 µg bis 2,3 µg Acrylamid nachgewiesen [Smith et al., 2000]. Anhand von Acrylamid-Hämoglobinaddukten wurde geschätzt, dass das Rauchen von Tabakprodukten zu einem Anstieg der Acrylamid-Hämoglobinaddukte um 6 pmol/g Hb pro Zigarette und Tag führt, was einer Exposition von ca. 2 µg Acrylamid/kg KG/d entspricht [Bergmark et al., 1997; Schettgen et al., 2004b].

Weitere, weniger relevante Expositionsquellen sind die Aufnahme von Acrylamid über das Trinkwasser und Kosmetika.

Gemäß Trinkwasserverordnung muss der Acrylamidgehalt im Trinkwasser unterhalb der Nachweisgrenze liegen. Schätzungen zu Folge liegt die tägliche Exposition mit Acrylamid über das Trinkwasser bei 3,6 ng/kg KG und wird als vernachlässigbar gering bewertet [European Commission, 2002].

Kosmetische Mittel, in denen Polyacrylamid eingesetzt wird, können auch Spuren des Monomers Acrylamid aufweisen. Für Körperpflegemittel, die auf der Haut verbleiben, darf der Restgehalt an Acrylamid in Polyacrylamid 0,1 mg/kg Produkt nicht überschreiten. In sonstigen Kosmetika liegt der Grenzwert bei 0,5 mg Acrylamid/kg Produkt [BfR, 2003b]. Die lebenslang über kosmetische Mittel aufgenommene tägliche Dosis an Acrylamid wird im Mittel auf 0,23 ng/kg KG/d für Frauen und 0,17 ng/kg KG/d für Männer geschätzt. Damit werden Kosmetika als eine vernachlässigbare Acrylamid-Quelle angesehen [Van Landingham et al., 2004].

2.1.3 Bildung von Acrylamid im Lebensmittel

Die Bildung von Acrylamid im Lebensmittel wird durch die Zusammensetzung des Lebensmittels und die Art der Zubereitung beeinflusst. So weisen kohlenhydratreiche, stark erhitzte Lebensmittel besonders hohe Gehalte an Acrylamid auf [Tareke et al., 2002].

In der Literatur sind verschiedene mögliche Bildungswege von Acrylamid in Lebensmitteln beschrieben. Der quantitativ bedeutendste Mechanismus geht von der Bildung von Acrylamid als Nebenprodukt der Maillard-Reaktion zwischen Aminosäuren und reduzierenden Zuckern aus. Dabei werden die höchsten Acrylamid-Gehalte in Anwesenheit der Aminosäure Asparagin erhalten, allerdings kann Acrylamid auch aus Methionin und Glutamin entstehen [Mottram et al., 2002; Stadler et al., 2002]. Modellstudien zeigten, dass im Vergleich zu Glucose, Fructose zu einer stärkeren Acrylamid-Bildung führt. Die Autoren führen dies auf den niedrigeren Schmelzpunkt von Fructose und die damit einhergehende schnellere Reaktion mit Asparagin zurück [Stadler et al., 2004]. Entgegen der Theorie, dass Acrylamid nur durch Einfluss reduzierender Zucker entstehen kann, wurde auch eine vergleichbare Acrylamid-Bildung aus Saccharose nachgewiesen. Dies wird mit der Hydrolyse von Saccharose zu Monosacchariden während des Erhitzungsvorganges begründet [Taeymans et al., 2004].

Die Art der Carbonylquelle hat einen bedeutenden Einfluss auf die Acrylamid-Bildung. Hierbei ist deren funktionelle Gruppe in β -Position zum Stickstoff von Asparagin entscheidend. Die Reaktion von Asparagin mit α -Hydroxycarbonylverbindungen führt zu einer deutlich größeren Ausbeute an Acrylamid, als die Reaktion von Asparagin mit Dicarbonylverbindungen [Stadler et al., 2004].

Der vermutete Mechanismus der Acrylamid-Bildung aus der Reaktion von Asparagin und α -Hydroxycarbonylverbindungen führt über *N*-Glycosyl-Asparagin unter Wasserabspaltung zu einer Schiffschen Base, aus der durch Decarboxylierung ein Azomethinylid entsteht. Aus diesem geht durch Tautomerisierung ein decarboxyliertes Amadori-Produkt hervor. Durch β -Elimination werden ein Aminoketon und Acrylamid gebildet (Abbildung 2.2) [Stadler et al., 2004].

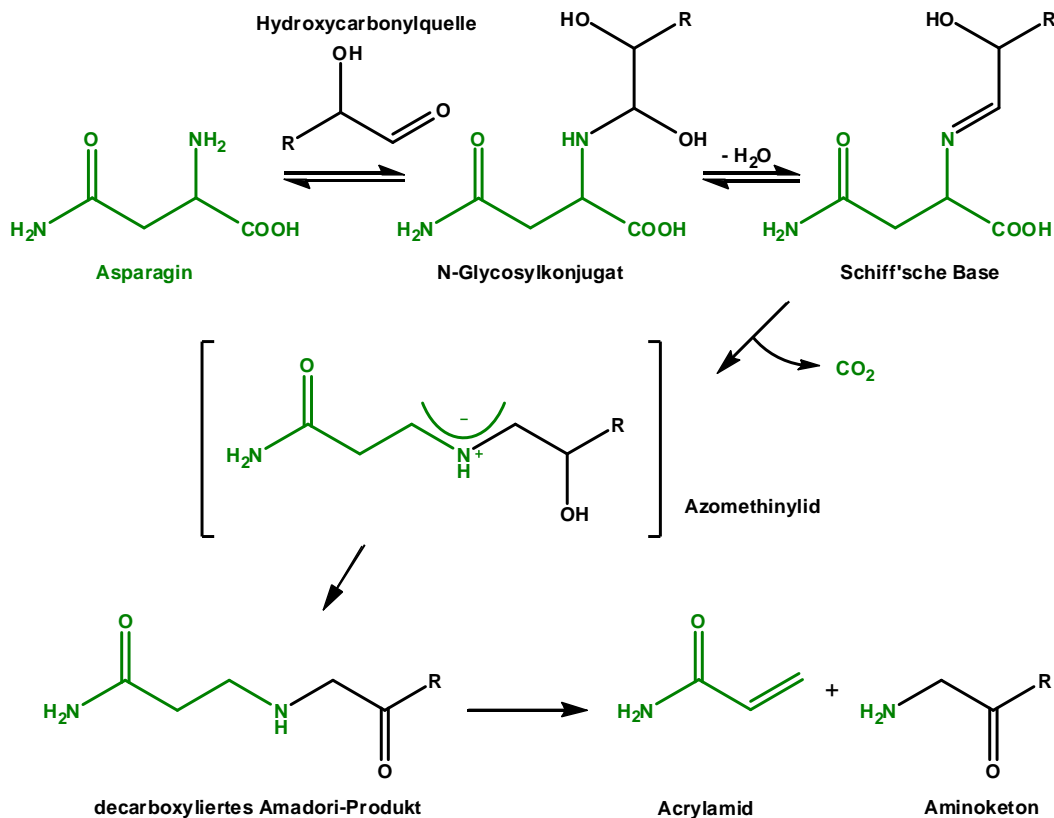


Abbildung 2.2: Bildung von Acrylamid aus der Reaktion von Asparagin mit α -Hydroxycarbonylen [Stadler et al., 2004; Yaylayan et al., 2003; Zyzak et al., 2003]

Die Reaktion von Asparagin mit Dicarbonylverbindungen führt ebenfalls zur Bildung einer Schiffschen Base, aus der nach Decarboxylierung ein Azomethinylid entsteht. Dies führt zur Entstehung von Imin A, aus dem ein Strecker-Aldehyd hervorgeht und Imin B, das durch Hydratisierung zu 3-Aminopropionamid wird. Aus diesem entsteht unter Abspaltung von Ammoniak Acrylamid (Abbildung 2.3). In welchem Maße die Acrylamid-Entstehung auf diesem Weg eine Rolle spielt wird noch diskutiert [Stadler et al., 2004; Granvogel et al., 2006].

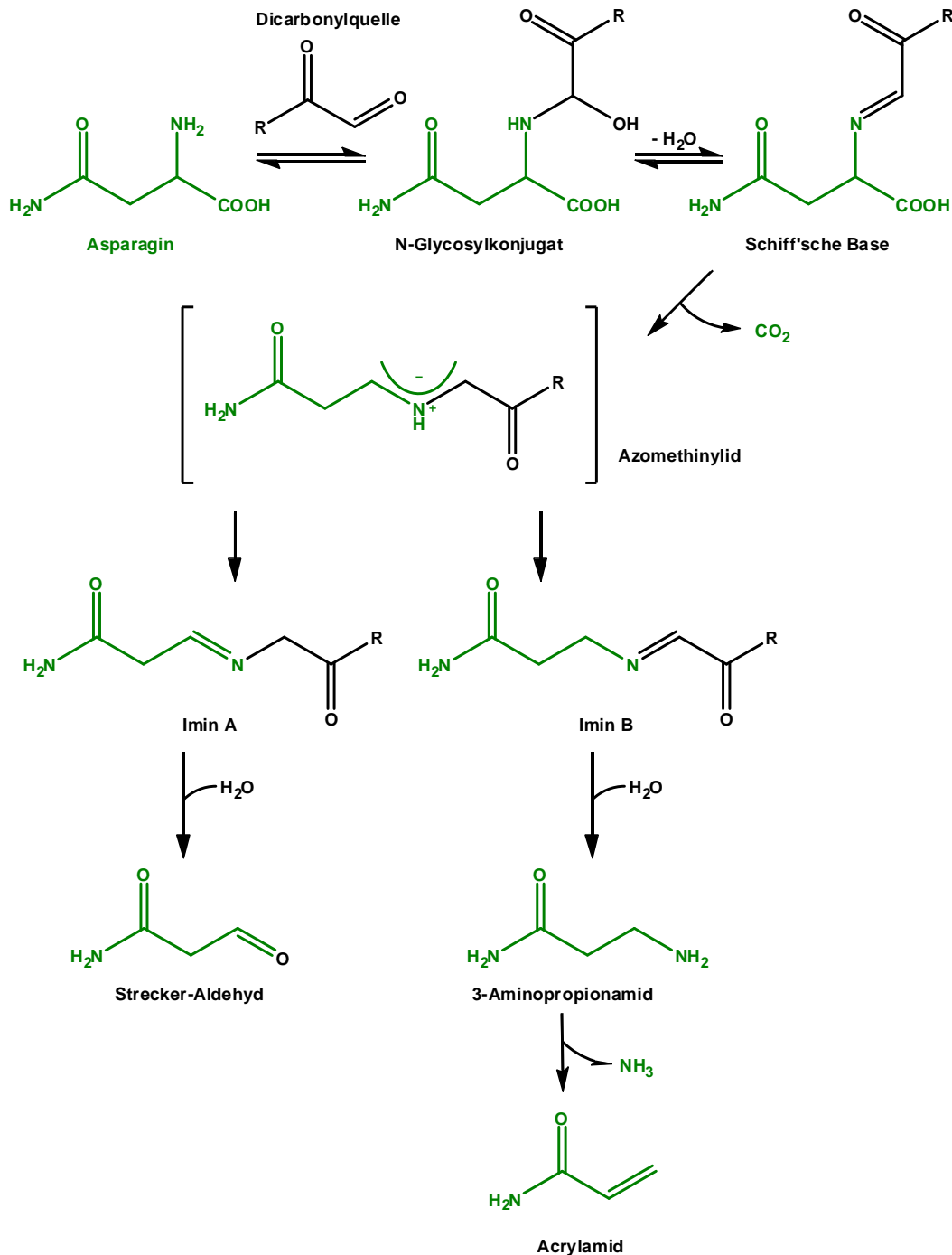


Abbildung 2.3: Bildung von Acrylamid aus der Reaktion von Asparagin mit Dicarbonylverbindungen [Stadler et al., 2004; Yaylayan et al., 2003; Zyzak et al., 2003]

Eine wichtige Rolle in der Acrylamid-Bildung im Lebensmittel scheint 3-Aminopropionamid zuzukommen. Neben der Entstehung von 3-Aminopropionamid als Acrylamid-Vorstufe bei der Reaktion von Aminosäuren und Dicarbonylen kann es auch bei der Reaktion von Aminosäuren mit Hydroxycarbonylen entstehen. Durch Oxidation der dabei gebildeten Glycosylamine werden Oxoimine gebildet, die schließlich zu 2-Aminopropionamid

hydrolysiert werden [Granvogl & Schieberle, 2006]. 3-Aminopropionamid wird aber auch als das biogene Amin von Asparagin angesehen, das auf Grund seiner Entstehung durch Erhitzung des Lebensmittels oder seiner enzymatischer Bildung in rohem Gemüse bereits in Abwesenheit reduzierender Zucker zur Acrylamid-Bildung führt [Schieberle et al., 2005]. Da freies Asparagin in fast allen Lebensmitteln vorhanden ist, erklärt dieser Aspekt vermutlich auch die Anwesenheit von Acrylamid in den meisten Lebensmitteln.

Erstmals konnte 2008 Glycidamid im Lebensmittel von Granvogl et al. nachgewiesen werden. In Kartoffelchips wurde ein Glycidamid-Gehalt von 1,5 µg/kg (0,5 % des Acrylamid-Gehaltes) und in Pommes Frites Glycidamid-Gehalte zwischen 0,3 µg und 0,6 µg/kg (0,2 % des Acrylamid-Gehaltes) gemessen. Die Entstehung von Glycidamid aus Acrylamid im Lebensmittel hängt von der Bildung von Hydroperoxiden ab. In einem Versuch wurden Pommes Frites in Kokosnussöl, das reich an gesättigten Fettsäuren ist, und in Sonnenblumenöl, welches viele ungesättigte Triglyceride enthält, frittiert. Nach dem Frittieren wurden je nach Bräunungsgrad Glycidamid-Gehalte von 0,002 µg bis 0,02 µg/kg in den in Kokosnussöl frittierten Pommes Frites gemessen, während in den in Sonnenblumenöl frittierten Pommes Frites 0,2 µg bis 0,4 µg/kg detektiert wurden [Granvogl et al., 2008]. Laut BfR stellen die in den Kartoffelprodukten nachgewiesenen geringen Glycidamid-Mengen verglichen mit der endogenen Bildung von Glycidamid nach Aufnahme von Acrylamid aus dem Lebensmittel allenfalls ein geringes Risiko dar [BfR, 2008].

2.1.4 Strategien zur Minimierung des Acrylamid-Gehaltes im Lebensmittel

Die Acrylamid-Gehalte in Lebensmitteln sind durch verschiedene Faktoren beeinflussbar. Die Minimierung des Acrylamid-Gehaltes im Lebensmittel beginnt bereits mit der Auswahl der Kartoffel- oder Getreidesorte, die die niedrigsten Asparagin- und Zuckergehalte aufweist. Außerdem kann der Asparagingehalt des Lebensmittels durch Asparaginasebehandlung reduziert werden. Bei der Herstellung der Lebensmittel können beispielsweise Temperatur, Zubereitungszeit, der Wassergehalt des Lebensmittels und der pH-Wert die Acrylamid-Bildung beeinflussen [Friedman & Levin, 2008]. Eine Absenkung der Zubereitungstemperatur von frittierten Kartoffelprodukten von 185 °C auf 175 °C bewirkte bereits eine Verminderung des Acrylamid-Gehaltes um 35 % [Gertz, 2002]. Ebenso beeinflusst der Zusatz von organischen Säuren den Acrylamid-Gehalt im Lebensmittel positiv. Bei niedrigen pH-Werten liegt die Aminogruppe des Asparagins verstärkt protoniert vor. Zum Start der Maillard-Reaktion wird jedoch die nucleophile unprotonierte Form der Aminosäure benötigt [De Vleeschouwer et al., 2006]. Bei der Zubereitung von Lebkuchen, einem Lebensmittel mit

besonders hohen Acrylamid-Gehalten, konnte durch Ersatz des Backtriebmittels Ammoniumbicarbonat durch Natriumbicarbonat die Acrylamid-Bildung um mehr als 60 % reduziert werden [Amrein et al., 2004].

Um die Acrylamid-Belastung des Verbrauchers durch Lebensmittel so gering wie möglich zu halten, wurde ein Minimierungskonzept entwickelt, das zu einer stetigen Absenkung des Acrylamid-Gehaltes in Lebensmitteln führen soll. Hierbei werden die betroffenen Lebensmittel zu Warengruppen zusammengefasst, aus denen jeweils die 10 % der am stärksten belasteten Lebensmittel identifiziert werden. Der niedrigste Acrylamid-Gehalt wird als Signalwert für diese Warengruppe festgelegt. Hersteller aller Produkte, deren Acrylamid-Gehalte oberhalb des Signalwertes liegen, werden von den Überwachungsbehörden vorrangig kontaktiert, um die Acrylamid-Belastung ihrer Waren zu minimieren [BVL, 2005].

2.1.5 Toxikokinetik

2.1.5.1 Aufnahme

Eine Vielzahl von Untersuchungen hat gezeigt, dass Acrylamid schnell und, je nach Art der Applikation, im Organismus nahezu vollständig aufgenommen werden kann.

Nach oraler Verabreichung einer [2,3-¹⁴C]-Acrylamid-Dosis von 1 mg bis 100 mg/kg KG an Fischer-344 (F344) Ratten wurde eine dosisunabhängige Ausscheidungsrate festgestellt. Im Vergleich zu einer Gruppe von Tieren, denen 10 mg [2,3-¹⁴C]-Acrylamid/kg KG i.v. verabreicht wurden, konnte ebenfalls kein Unterschied in der Ausscheidungsrate festgestellt werden. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass Acrylamid vollständig oral aufgenommen wird [Miller et al., 1982]. In einer Studie von Bjellaas et al. wurden verschiedene Acrylamid-Dosen subcutan oder über die Diät in Form von Knäckebrot an männliche Mäuse verabreicht. An Hand der gemessenen Metabolite im Urin konnte kein Unterschied in der Bioverfügbarkeit festgestellt werden [Bjellaas et al., 2007]. Studien von Doerge et al. an F344 Ratten und B6C3F1 Mäusen, denen 0,1 mg Acrylamid/kg KG i.v., per Gavage oder oral über eine mit Acrylamid angereicherte Standarddiät verabreicht wurden, zeigten jedoch Unterschiede in der oralen Bioverfügbarkeit von Acrylamid auf. Diese wurde an Hand der gemessenen Serumgehalte von Acrylamid und Glycidamid ermittelt. Die maximalen Acrylamid-Serumgehalte nach Verabreichung von Acrylamid i.v., per Gavage oder über die angereicherte Standarddiät wurden bei Mäusen nach 5, 15 und 30 Minuten, bei Ratten nach 15 Minuten, 1 bis 2 Stunden und 2 Stunden erreicht. Verglichen mit der area under the curve (AUC) für die i.v. Verabreichung sind in den Mäusen 32-52 % Acrylamid über Gavage, über die Diät 23 % Acrylamid bioverfügbar. In den Ratten sind nach

Schlundsondierung 60-98 % Acrylamid bioverfügbar, über die Diät 32-44 % [Doerge et al., 2005a,c].

Nach 24-stündiger dermaler Exposition von vier männlichen F344 Ratten mit 162 mg [2,3-¹⁴C]-Acrylamid/kg KG wurden im Mittel 21 % der verabreichten Dosis in Urin, Fäces, Atemluft und Geweben wiedergefunden. In der gleichen Studie wurden je acht männliche F344 Ratten und B6C3F1 Mäuse über sechs Stunden inhalativ mit 2,9 ppm einer [1,2,3-¹³C]-[2,3-¹⁴C]-Acrylamid-Mischung (90:10) behandelt. Nach inhalativer Verabreichung wurde eine sechsmal geringere Acrylamid-Aufnahme als nach dermaler Exposition festgestellt. Zudem zeigten sich Unterschiede in den verwendeten Tierspezies, da 24 Stunden nach einer sechsstündigen Inhalation von 5,6 ppm Acrylamid in Ratten bis zu viermal weniger Acrylamid wiedergefunden wurde als in Mäusen [Sumner et al., 2003].

2.1.5.2 Verteilung

Die Verteilung von Acrylamid im Organismus erfolgt unabhängig von der Art der Verabreichung. In einer Studie von Miller et al., bei der männliche F344 Ratten mit 10 mg/kg KG [2,3-¹⁴C]-Acrylamid i.v. behandelt wurden, konnten anhand der Radioaktivität eine Stunde nach der Verabreichung die höchsten Konzentrationen an Acrylamid und seiner Metabolite in Leber, Fettgewebe, Niere und Hoden beobachtet werden. Insgesamt konnten die größten Anteile der Acrylamid-Dosis in Muskeln (48 %), Haut (15 %), Blut (12 %) und Leber (7 %) der Tiere wiedergefunden werden [Miller et al., 1982]. Im Plasma von männlichen Sprague-Dawley Ratten, denen 50 mg Acrylamid/kg KG i.p. verabreicht wurden, betrug die biologische Halbwertszeit von Acrylamid ungefähr zwei Stunden [Barber et al., 2001].

Nach subcutaner Verabreichung von 0,16 mg [¹⁴C]-Acrylamid/kg KG an männliche Mäuse wurden nach 48 Stunden 92 % der Radioaktivität im Urin wiedergefunden, wobei nur 55 % der Dosis als Glycidamid und Mercaptursäuren von Acrylamid (AAMA) und Glycidamid (GAMA) detektiert werden konnten. Weitere 2 % der Radioaktivität wurden in Fäces, Leber, Darminhalt und Blut der behandelten Tiere, sowie dem Waschwasser der Käfige detektiert [Bjellaas et al., 2007].

Nach dermaler Verabreichung von 162 mg [2,3-¹⁴C]-Acrylamid/kg KG für 24 Stunden an F344 Ratten wurden 36 % der absorbierten Acrylamid-Dosis im Urin, 3 % in der Atemluft und weniger als 1 % in den Fäces gefunden. Im Körpergewebe konnten die höchsten relativen Gehalte an Radioaktivität im Blut (~ 1 µmol/g Gewebe), der Haut (0,4 µmol/g Gewebe), Leber, Milz, Hoden und Nieren (je 0,3 µmol/g Gewebe) sowie Lunge, Thymusdrüse, Gehirn

und Nebenhoden (0,2 µmol/g Gewebe) detektiert werden [Sumner et al., 2003]. Nach sechsständiger Inhalation von 2,9 ppm einer [1,2,3-¹³C]-[2,3-¹⁴C]-Acrylamid-Mischung (90:10) wurden 31 % der absorbierten Dosis über den Urin, 3 % über Fäces und 2 % über die Atemluft ausgeschieden. Die höchsten relativen Gehalte an Radioaktivität konnten mit 0,1 µmol/g Gewebe auch in dieser Studie in den Blutzellen gefunden werden. Unmittelbar nach der sechsständigen Exposition wurden Plasmagehalte von 0,03 µmol/g Gewebe gemessen, nach 24 Stunden wurden noch 0,004 µmol/g Gewebe im Plasma gefunden [Sumner et al., 2003].

Auf Grund seiner hohen Wasserlöslichkeit überwindet Acrylamid die Blut-Hirn- und die Placenta-Schranke. Dabei gehen mindestens 50 % des von der Mutter aufgenommenen Acrylamids auf den Fötus über [Schettgen et al., 2004a]. Auch in humaner Muttermilch wurden Acrylamid-Gehalte von bis zu 18,8 µg/l nachgewiesen [Sörgel et al., 2002].

2.1.5.3 Metabolismus

Der Metabolismus von Acrylamid kann zum einen oxidativ (Phase I-Metabolismus) und zum anderen durch Konjugation an die Thiolgruppe von Glutathion (GSH; Phase II-Metabolismus) verlaufen (Abbildung 2.4).

Der oxidative Metabolismus von Acrylamid führt zur Entstehung des Epoxides Glycidamid. Als Hauptenzym für die Bildung von Glycidamid wurde Cytochrom P450 2E1 (CYP 2E1) identifiziert. In einer Studie von Sumner et al. wurden Wildtyp-Mäuse, die mit dem CYP-Hemmstoff 1-Aminobenzotriazol (ABT) vorbehandelt wurden, CYP 2E1-null Mäuse und Wildtyp-Mäuse mit 50 mg [1,2,3-¹³C]-Acrylamid/kg KG p.o. behandelt. Im Urin der mit ABT vorbehandelten Mäuse sowie der CYP 2E1-null Mäuse wurden keine Glycidamid-Metabolite gefunden [Sumner et al., 1999]. In einer weiteren Studie wurden Wildtyp- und CYP 2E1-null Mäuse i.p. mit 50 mg Acrylamid/kg KG behandelt. Nach sechs Stunden konnten im Plasma der Wildtyp-Mäuse 0,84 µM Acrylamid und 33 µM Glycidamid detektiert werden, während die Plasmagehalte der CYP 2E1-null Mäuse bei 115 µM Acrylamid und 1,7 µM Glycidamid lagen. In den CYP 2E1-null Mäusen konnten auch nur Spuren der Addukte von Glycidamid mit dem endständigen Valin des Hämoglobins (GAVal) und dem N7 des Guanin (N7-GA-Guanin) gefunden werden, während die AAVal-Gehalte doppelt so hoch waren wie in den Wildtyp-Mäusen. In der CYP 2E1-null-Negativkontrollgruppe konnte kein Glycidamid detektiert werden. Die Tatsache, dass Spuren von Glycidamid und Glycidamid-Metaboliten in den Acrylamid-behandelten CYP 2E1-null Mäusen gefunden wurden, deutet auf einen weiteren Bildungsweg von Glycidamid hin, dem jedoch eine untergeordnete Rolle zukommt

[Ghanayem et al., 2005]. In Versuchen mit humanen Lebermikrosomen konnte gezeigt werden, dass CYP 2E1 auch im menschlichen Acrylamid-Metabolismus das Hauptenzym für die Bildung von Glycidamid ist [Settels et al., 2008].

In einer Studie an Mäusen, denen 0,1 mg Acrylamid/kg KG i.v., per Schlundsonde oder über eine angereicherte Standarddiät verabreicht wurden, konnten unabhängig von der Verabreichungsform die höchsten Glycidamid-Gehalte im Serum nach zwei Stunden festgestellt werden [Doerge et al., 2005a]. Bei gleichem Studiendesign wurden an Ratten die höchsten Serumgehalte an Glycidamid nach zwei Stunden in der Gavage-Gruppe und nach vier Stunden in der Diät- und der i.v.-Gruppe gemessen [Doerge et al. 2005b]. Die Verhältnisse der Area under the curve (AUC)-Werte von Glycidamid und Acrylamid liegen für die beiden oralen Verabreichungswege in Mäusen und Ratten immer höher als für die i.v. Applikation. Diese Datenlage deutet auf einen First Pass Metabolismus der Leber hin.

Studien an Ratten geben Hinweise darauf, dass der Metabolismus von Acrylamid zu Glycidamid dosisabhängig und sättigbar ist. An Hand der Glycidamid-Hämoglobinaddukte konnte nach Verabreichung von 5 mg Acrylamid/kg KG an Ratten eine Glycidamid-Bildung von 51 % detektiert werden, während nach 100 mg Acrylamid/kg KG nur 13 % zu Glycidamid verstoffwechselt wurden. Auch bei der Behandlung von Ratten mit 10 mg Acrylamid/kg KG für 10 Tage oder 3,3 mg Acrylamid/kg KG für 30 Tage wurde eine höhere Glycidamid-Bildungsrate bei niedriger Dosierung festgestellt [Bergmark et al., 1991].

Desweiteren ist die Bildungsrate von Glycidamid speziesabhängig. Nach oraler Verabreichung von 50 mg Acrylamid/kg KG an Mäuse und Ratten wurden 50-70 % der Dosis als Glycidamid und Glycidamid-Metabolite im Urin der Mäuse wiedergefunden, während die Ratten nur 30-40 % der Dosis in Form von Glycidamid und Glycidamid-Metaboliten ausschieden [Sumner et al., 1992, 2003].

Eine weitere Möglichkeit der Metabolisierung von Acrylamid und auch Glycidamid bietet die Konjugation mit Glutathion (L- γ -Glutamyl-L-cysteinylglycin). Die Bildung von Glutathion in der Leber erfolgt durch enzymatische Verknüpfung von L-Glutaminsäure mit L-Cystein und anschließender Kondensation mit Glycin [Commandeur et al., 1995]. Durch Reaktion von Fremdstoffen mit der Thiolgruppe von Glutathion werden elektrophile Stellen von Fremdstoffmolekülen in der Regel inaktiviert. Die Fremdstoffe werden wasserlöslicher und können dadurch besser vom Organismus ausgeschieden werden [Habig et al., 1974]. Die Reaktion läuft für viele Fremdstoffe nicht-enzymatisch ab. Sie kann aber auch unter katalytischer Beteiligung von Glutathion-S-Transferasen (GST) beschleunigt werden [Eisenbrand & Metzler, 2005].

Die GST-Superfamilie beinhaltet mindestens 10 Isoenzyme, die als Hetero- oder Homodimere vorliegen können und gewebespezifisch verteilt sind. Es wird unterschieden zwischen cytosolischen und membranständigen, sogenannten mikrosomalen GSTs. In der

Leber männlicher Sprague-Dawley Ratten wurden hauptsächlich GST α 1 und GST α 2 nachgewiesen [Treptow-van Lishaut et al., 1999].

In einigen Fällen werden die Glutathion-Konjugate direkt über die Galle ausgeschieden. Meistens werden sie jedoch vom Organismus zu so genannten Mercaptursäuren abgebaut [Eisenbrand & Metzler, 2005]. Dies erfolgt in einem mehrstufigen Prozess, bei dem zuerst die Glutaminsäure durch γ -Glutamyltranspeptidase abgespalten wird. Im zweiten Schritt wird Glycin, katalysiert durch Cysteinglycindipeptidase bzw. Aminopeptidase M, aus dem Molekül entfernt. Mittels Cystein-S-Konjugat-N-Acetyltransferase wird das Cystein-Addukt zur Mercaptursäure acetyliert. [Commandeur et al., 1995]

Durch Abbau der Acrylamid- und Glycidamid-Glutathion-Konjugate entstehen die Acrylamid-Mercaptursäure *N*-Acetyl-S-(2-carbamoylethyl)-cystein (AAMA) und die Glycidamid-Mercaptursäuren *N*-Acetyl-S-(2-hydroxy-2-carbamoylethyl)-cystein (GAMA-3) und *N*-Acetyl-S-(1-carbamoyl-2-hydroxyethyl)-cystein (GAMA-2). Diese werden mit dem Urin ausgeschieden und häufig als Biomarker der Exposition herangezogen.

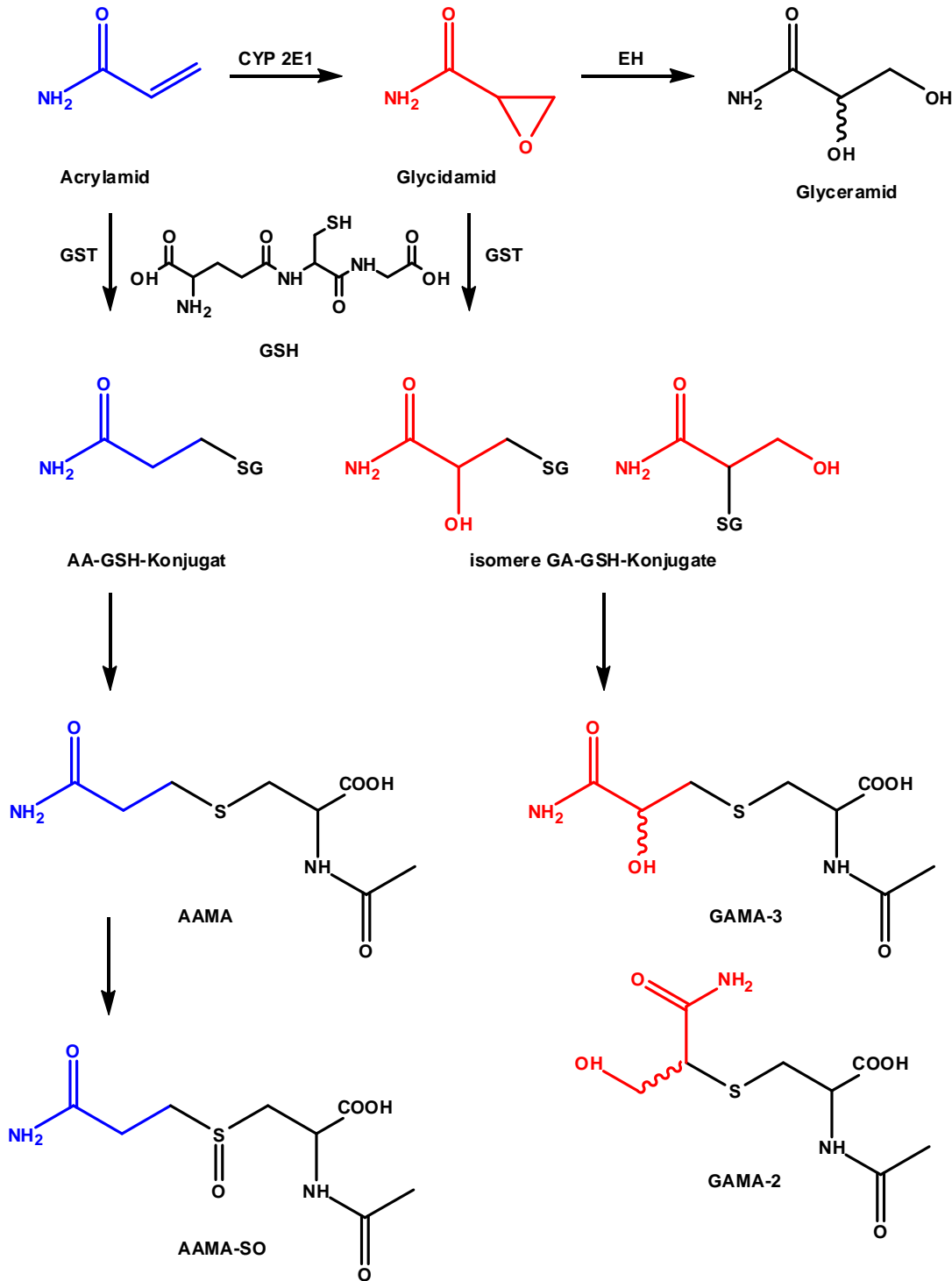


Abbildung 2.4: Metabolismus von Acrylamid im Menschen [modifiziert nach Sumner et al., 1992; Friedman, 2003; Fennell et al., 2005]

CYP 2E1: Cytochrom P450 2E1; EH: Epoxidhydrolase; GSH: Glutathion; GST: Glutathion-S-Transferase; AAMA: Acrylamid-Mercaptursäure; GAMA: Glycidamid-Mercaptursäure; AAMA-SO: Sulfoxid der Acrylamid-Mercaptursäure

Im menschlichen Organismus scheint die Konjugation von Acrylamid mit Glutathion eine bedeutendere Rolle zu spielen als die Umsetzung zu Glycidamid [Fuhr et al., 2006]. In einer Studie von Fennell et al. wurden 3 mg [1,2,3-¹³C]-Acrylamid/kg KG oral an Menschen und Ratten verabreicht. Im Urin von Menschen und Ratten wurde AAMA als Hauptmetabolit gefunden (22 % und 29 % der Dosis). Im menschlichen Urin lagen zudem 4 % der Acrylamid-Dosis als *N*-Acetyl-S-(2-carbamoylethyl)-cystein-S-oxid (AAMA-SO) vor. Glycidamid wurde im menschlichen Organismus hauptsächlich durch die Epoxidhydrolase zu Glyceramid hydrolysiert (3,3 % der Dosis) und nur zu geringen Teilen an Glutathion konjugiert, während es in Ratten verstärkt an Glutathion gebunden wurde (21 % der Dosis). Glyceramid konnte bei einer Dosis von 3 mg Acrylamid/kg KG im Rattenurin nicht detektiert werden [Fennell et al., 2005].

In der Toxikokinetik von Maus, Ratte und Mensch wurden also Unterschiede beim oxidativen Metabolismus von Acrylamid zu Glycidamid, wie auch bei der Konjugation von Acrylamid und Glycidamid an Glutathion und der Epoxidhydrolase-vermittelten Hydrolyse von Glycidamid zu Glyceramid beobachtet. Insgesamt deuten die Ergebnisse auf eine Abnahme der Effektivität der Glycidamidbildung in der Reihenfolge Maus > Ratte > Mensch hin.

2.1.5.4 Ausscheidung

Die Ausscheidung von Acrylamid und seiner Metabolite (Abbildung 2.4) erfolgt hauptsächlich über die Niere. In der Ratte wurde ein biphasischer Verlauf der Exkretion beobachtet. Die erste Eliminierungsphase hat eine Halbwertszeit von < 5 Stunden, während die zweite Phase eine Halbwertszeit von < 8 Tagen beträgt. Nach sieben Tagen wurden 71 % der verabreichten Dosis über den Urin ausgeschieden, davon 62 % innerhalb der ersten 24 Stunden. Mit den Fäces wurden nach sieben Tagen nur 6 % der Dosis ausgeschieden, die biliäre Ausscheidung betrug 15 % [Miller et al., 1982].

Auch der Mensch scheidet Acrylamid und seine Metabolite hauptsächlich mit dem Urin aus. In Humanstudien wurden Halbwertszeiten von 3,1 bis 3,5 Stunden nach oraler Aufnahme von 0,5 mg bis 3 mg [1,2,3-¹³C]-Acrylamid/kg KG [Fennell et al., 2006] bzw. $2,4 \pm 0,4$ Stunden nach oraler Aufnahme von 12,4 µg Acrylamid/kg KG in Kartoffelchips [Fuhr et al., 2006] ermittelt.

In Tabelle 2.2 ist die Verteilung der Acrylamid-Metabolite im Urin verschiedener Spezies aufgeführt.

Tabelle 2.2: Metabolitenverteilung von Acrylamid im Urin verschiedener Spezies (angegeben in % der verabreichten Acrylamid-Dosis)

Acrylamid: AA; AAMA: Acrylamid-Mercaptursäure; AAMA-SO: AAMA-Sulfoxid; GA: Glycidamid; GAMA: Glycidamid-Mercaptursäure; GE: Glyceramid; ng: nicht gemessen; nd: nicht detektiert; nq: nicht quantifiziert

Studie	Design	AA	AAMA	AAMA-SO	GA	GAMA-3	GAMA-2	GE	GAMA/AAMA
Sumner et al. 1997 Maus	20 mg/kg KG oral 24h-Urin	ng	11	ng	22	14	5	2,5	1,7
Doerge et al. 2007 Maus	0,1 mg/kg KG oral 24h-Urin	0,7	7	ng	17	16	ng	ng	2,2
Doerge et al. 2007 Maus	0,1 mg/kg KG i.v. 24h-Urin	4	40	ng	18	12	ng	ng	0,3
Sumner et al. 1992 Ratte	50 mg/kg KG oral 24h-Urin	ng	34	ng	2,8	7,9	4,5	1,2	0,4
Doerge et al. 2007 Ratte	0,1 mg/kg KG oral 24h-Urin	2	31	ng	6	28	ng	ng	0,9
Doerge et al. 2007 Ratte	0,1 mg/kg KG i.v. 24h-Urin	3	46	ng	3,5	14	ng	ng	0,3
Fennell et al. 2005 Ratte	3 mg/kg KG oral 24h-Urin	ng	29	ng	nd	13	8	nd	0,7
Fennell et al. 2006 Mensch	3 mg/kg KG oral 24h-Urin	3,2	28	7,3	0,7	0,6	0,2	ng	0,02
Fennell et al. 2006 Mensch	3 mg/kg KG dermal 24h-Urin	0,2	3,2	1,0	0,01	0,12	0,016	ng	0,03
Fuhr et al. 2006 Mensch	13 µg/kg KG oral 72h-Urin	4,4	50	ng	nq	5,9	ng	ng	0,12
Hartmann et al. 2008b Mensch	13 µg/kg KG oral 48h-Urin	ng	52	ng	ng	4,6	0,8	ng	0,1

Die Wiederfindungsrate von Acrylamid und seinen Metaboliten (Glycidamid, AAMA und dessen unacetylierte Vorstufe Cystein-S-Propionamid, AAMA-SO sowie GAMA) im Urin nach oraler Aufnahme von 0,5 mg, 1 mg und 3 mg [1,2,3-¹³C]-Acrylamid /kg KG betrug nach 24 Stunden ca. 46 %, 50 % und 40 % der verabreichten Dosis [Fennell et al., 2006]. 72 Stunden nach der oralen Aufnahme von 12,4 µg Acrylamid/kg KG wurden 60,3 % der Dosis in Form von Acrylamid, AAMA und GAMA im Urin wiedergefunden [Fuhr et al., 2006].

An Hand der hohen GAMA/AAMA-Verhältnisse wird deutlich, dass in der Maus der oxidative Metabolismus von Acrylamid zu Glycidamid überwiegt. Der Mensch und auch die Ratte

scheiden hingegen deutlich weniger GAMA als AAMA aus, was für eine überwiegende Konjugation von Acrylamid an Glutathion spricht.

Im menschlichen Urin konnte mit AAMA-Sulfoxid (AAMA-SO) zudem noch ein weiterer Metabolit nachgewiesen werden. Dieser wird im Menschen in quantifizierbaren Mengen gebildet, konnte im Nager jedoch nicht detektiert werden [Fennell et al., 2006].

2.1.5.5 Reaktion mit Makromolekülen

Reaktion mit Hämoglobin

Eine weitere Form der Entgiftung von Acrylamid und Glycidamid besteht in ihrer Reaktion mit nucleophilen Seitenketten von Proteinen. Hierbei steht besonders Hämoglobin im Fokus, da sich die Acrylamid- und Glycidamid-Hämoglobinaddukte auf Grund der relativ langen Lebensdauer der Erythrocyten als Biomarker der Exposition eignen.

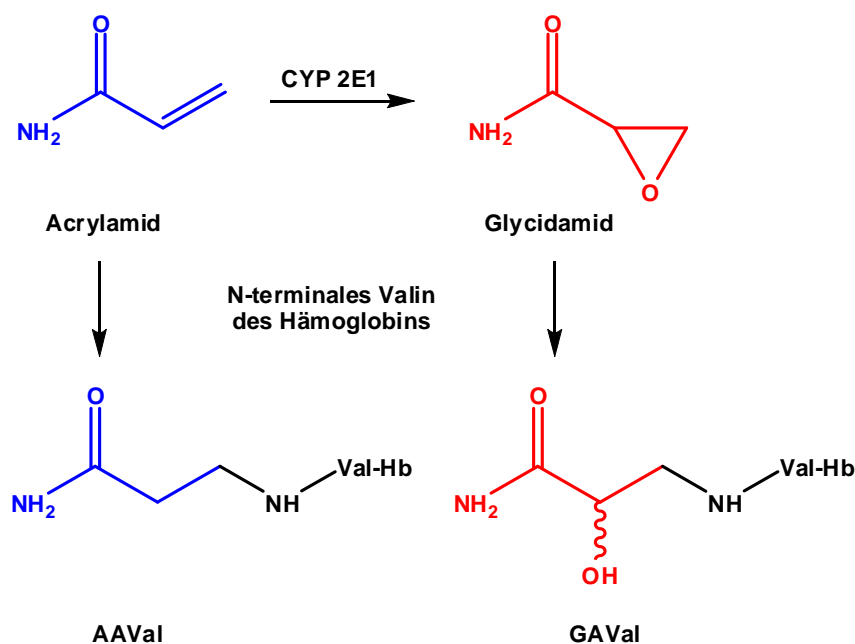


Abbildung 2.5: Hämoglobin-Addukte von Acrylamid und Glycidamid [modifiziert nach Sumner et al., 1992; Friedman, 2003]

CYP 2E1: Cytochrom P450 2E1; AAVal: Acrylamid-Addukt mit dem N-terminalen Valin des Hämoglobins; GAVal: Glycidamid-Addukt mit dem N-terminalen Valin des Hämoglobins

Hämoglobinaddukte liefern eine Grundlage für toxikokinetische Untersuchungen und werden beispielsweise zur Bestimmung der Arbeitsplatzexposition herangezogen [Bergmark, 1991 & 1997; Calleman, 1994; Licea Pérez et al., 1999; Hagmar et al., 2001; Paulsson et al., 2005]. Auch der Nachweis der Bildung von Acrylamid in erhitzten Lebensmitteln erfolgte über die

Untersuchung der Acrylamid-Hämoglobinaddukte in einer Rattenstudie [Tareke et al., 2000 & 2002].

Der Nachweis von Acrylamid- und Glycidamid-Hämoglobinaddukten erfolgte *in vivo* und *in vitro* erstmals durch Calleman et al.. Hierbei wurde die Verbindung von Acrylamid und Glycidamid mit Cystein im Hämoglobin untersucht. Es stellte sich heraus, dass Acrylamid-Hämoglobinaddukte im Gegensatz zu Glycidamid-Hämoglobinaddukten dreimal häufiger und dosisabhängig gebildet werden [Calleman et al., 1990; Bergmark et al., 1991].

Eine methodische Verbesserung und Steigerung der Sensitivität des Nachweises von Hämoglobin-Addukten, insbesondere in Humanblut, gelang durch Verwendung des modifizierten Edman-Abbaus, bei dem die Acrylamid- und Glycidamid-Addukte mit dem endständigen Valin des Hämoglobins erfasst werden [Bergmark et al., 1991].

In verschiedenen Studien wurden Verhältnisse von GAVal zu AAVal zwischen 0,07 [Perez et al., 1999] und 0,96 [Paulsson et al., 2003a] gefunden.

Reaktion mit der DNA

In vitro Versuche zeigten, dass Acrylamid selbst nur eine schwache Tendenz zur Bildung von DNA-Addukten hat [Solomon et al., 1985]. Glycidamid hingegen ist 100- bis 1000-fach reaktiver gegenüber DNA als Acrylamid [Friedman, 2003]. Das hauptsächlich gebildete Glycidamid-DNA-Addukt ist das *N7*-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)-guanin (*N7*-GA-Guanin). *In vivo* wurde es erstmals in Leber-DNA von männlichen Sprague-Dawley Ratten und BALB/c Mäusen, denen 46 mg oder 53 mg [¹⁴C]-Acrylamid/kg KG i.p. verabreicht wurden, mittels radiodetektion nach chromatischer Auftrennung nachgewiesen [Segeberäck et al., 1995]. Ein weiteres *in vivo* gebildetes Glycidamid-DNA-Addukt ist das *N3*-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)-adenin (*N3*-GA-Adenin). *N3*-GA-Adenin wurde neben *N7*-GA-Guanin massenspektrometrisch nachgewiesen in Lebern, Lungen und Nieren von männlichen und weiblichen Mäusen, denen 50 mg Acrylamid/kg KG i.p. verabreicht wurden. Sechs Stunden nach Verabreichung wurden 1000-2000 *N7*-GA-Guanin Addukte/10⁸ Nukleotide und 20-30 *N3*-GA-Adenin Addukte/10⁸ Nukleotide detektiert. Bislang wurde außerdem *in vitro* die Bildung der Glycidamid-DNA-Addukte *N*⁶-(2-carboxy-2-hydroxyethyl)-2'-desoxyadenosin, *N*1-(2-carboxy-2-hydroxyethyl)-2'-desoxyadenosin und 1,*N*⁶-(2-hydroxypropanoyl)-2'-desoxyadenosin nachgewiesen (Abbildung 2.6) [Gamboa da Costa et al., 2003].

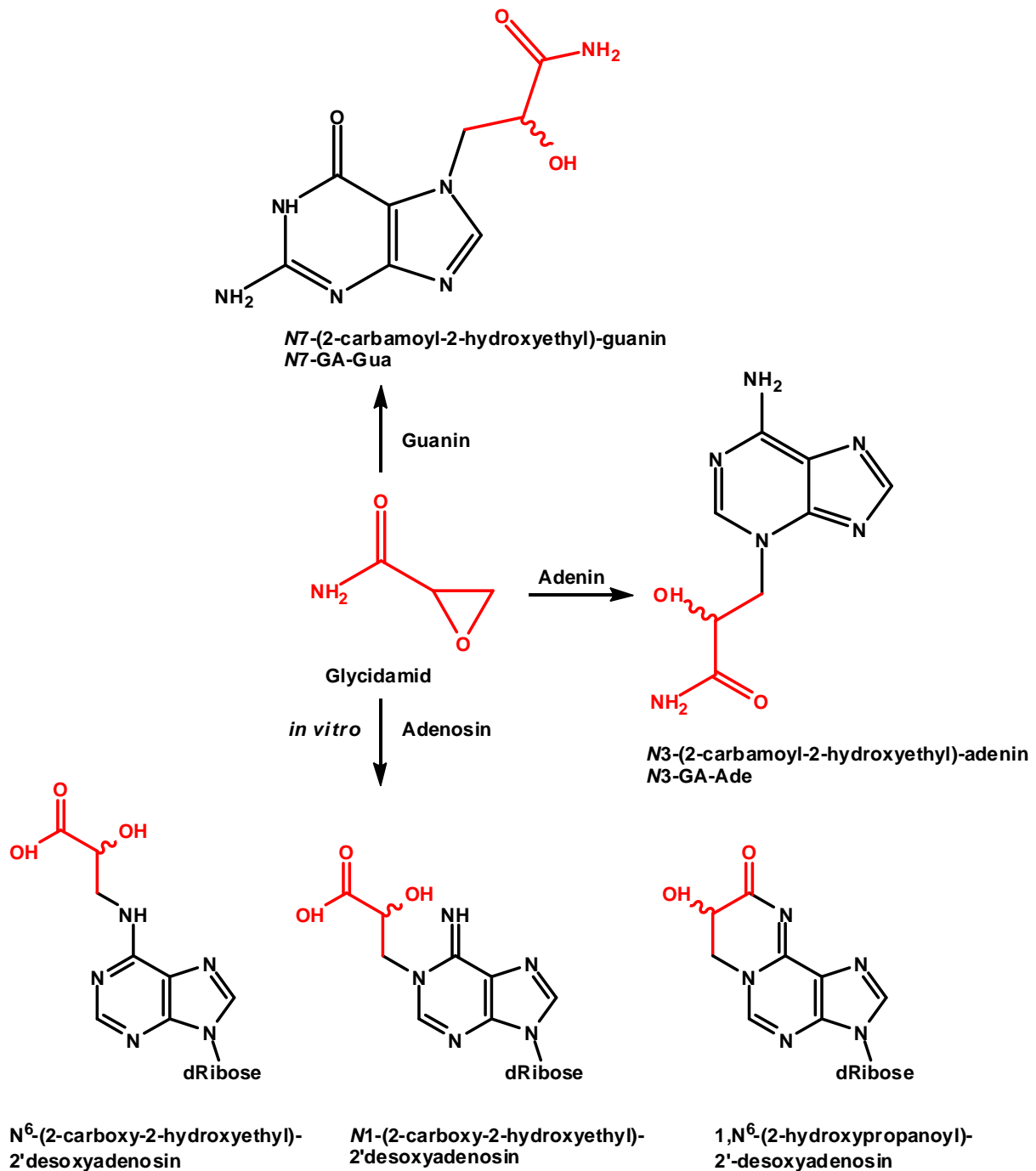


Abbildung 2.6: Glycidamid-DNA-Addukte [modifiziert nach Gamboa da Costa et al., 2003]

Sechs Stunden nach Verabreichung von 50 mg Acrylamid/kg KG i.p. an männliche und weibliche F344-Ratten und B6C3F₁-Mäuse wurden in allen untersuchten Geweben *N*7-GA-Guanin und *N*3-GA-Adenin nachgewiesen. In Mäusen wurden 840-1000 *N*7-GA-Guanin/10⁸ Nukleotide in Leukocyten und den untersuchten Organen (Leber, Lunge, Niere, Hoden) gemessen, während in Ratten 270-960 *N*7-GA-Guanin/10⁸ Nukleotide in Leukocyten bzw. den untersuchten Organen (Leber, Gehirn, Schilddrüse, Hoden/Brustdrüse) gefunden

wurden. Es wurde ca. 75-mal mehr *N7*-GA-Guanin als *N3*-GA-Adenin detektiert. In der gleichen Studie wurden Ratten und Mäusen beider Geschlechter über 50 Tage wiederholt mit 1 mg Acrylamid/kg KG/d im Trinkwasser behandelt. Die Lebern der Tiere wurden zu verschiedenen Zeitpunkten auf Glycidamid-DNA-Addukte untersucht. In beiden Spezies wurde nach 14 Tagen ein Steady State von *N7*-GA-Guanin beobachtet. Dieser lag in den Mäuselebern geschlechtsunabhängig bei ca. 360 *N7*-GA-Guanin/10⁸ Nukleotide, während der Steady State in den Lebern der weiblichen Ratten bei 140 *N7*-GA-Guanin/10⁸ Nukleotide lag, und damit höher war als in den Lebern männlicher Ratten (100 *N7*-GA-Guanin/10⁸ Nukleotide) [Doerge et al., 2005b]. Dieser Geschlechtsunterschied wurde in einer Studie, in der männliche und weibliche F344-Ratten mit 0,1 mg Acrylamid/kg KG schlundsondiert wurden, ebenfalls beobachtet. Nach 10 Stunden wurde in den Lebern der weiblichen Tiere (8 *N7*-GA-Guanin/10⁸ Nukleotide) signifikant mehr *N7*-GA-Guanin gefunden als in männlichen Ratten (3 *N7*-GA-Guanin/10⁸ Nukleotide) [Doerge et al., 2005c].

N7-GA-Guanin und *N3*-GA-Adenin können einer spontanen Depurinierung unterliegen und sind somit mögliche Promutagene. Es wird vermutet, dass die abasische Stelle, die durch die Depurinierung von *N7*-GA-Guanin entsteht, während der DNA-Replikation durch Desoxyadenosin ersetzt wird, was zu G-T-Transversionen führt [Zeynep Atay et al., 2005].

2.1.6 Toxikodynamik

2.1.6.1 Genotoxizität und Mutagenität

Die Induktion von Chromosomen-Aberrationen durch Acrylamid wurde in einer Reihe von Studien untersucht. Dabei wird unterschieden zwischen Aberrationen vom Chromatid-Typ, die das Brechen eines einzelnen Chromatides beschreiben und Aberrationen vom Chromosomen-Typ, die das Brechen beider Schwesterchromatide an homologer Stelle charakterisieren. In V79H3 Zellen des chinesischen Hamsters, die für 24 Stunden mit 0, 0,5 mM, 1 mM, 2 mM, 3 mM, 4 mM oder 5 mM Acrylamid inkubiert wurden, konnte ein signifikanter Anstieg der Chromatid-Aberrationen ab 2 mM Acrylamid (0,14 mg Acrylamid/ml) beobachtet werden. V79H3 Zellen, die mit 0, 0,5 mM, 1 mM, 1,5 mM, 2 mM und 2,5 mM Acrylamid für 24 Stunden inkubiert wurden, zeigten zudem Schwesterchromatid-Austausche (SCE) ab 1 mM Acrylamid [Tsuda et al., 1993]. In einer weiteren Studie wurden V79 Zellen des chinesischen Hamsters für drei Stunden mit 0,1 mg, 0,3 mg, 1 mg, 2 mg und 3 mg Acrylamid/ml mit und ohne metabolische Aktivierung durch S9-Mix inkubiert. In den Zellen, die mit Acrylamid und S9-Mix koinkubiert wurden, stieg die Frequenz der Chromosomen-Aberrationen ab 0,1 mg Acrylamid/ml an. Zellen, die nur mit Acrylamid inkubiert wurden, zeigten erst ab 1 mg Acrylamid/ml vermehrt Chromosomen-Aberrationen.

Ab 2 mg Acrylamid/ml wurden cytotoxische Effekte beobachtet [Knaap et al., 1988]. Auch in Maus-Lymphomzellen, für vier Stunden ohne metabolische Aktivierung mit 0,65 mg, 0,75 mg und 0,85 mg Acrylamid/ml inkubiert wurden, konnten ähnliche Beobachtungen gemacht werden. In diesen Zellen konnten ab 0,75 mg Acrylamid/ml Chromosomen-Aberrationen nachgewiesen werden [Moore et al., 1987].

In vivo wird zur Untersuchung von Chromosomen-Aberrationen meist der Mikrokerntest in Erythrocyten oder dem Knochenmark von Nagetieren durchgeführt. Paulsson et al. untersuchten Mikrokerne in polychromatischen Erythrocyten von männlichen CBA-Mäusen, die 24 Stunden zuvor 25 mg oder 50 mg Acrylamid/kg KG i.p. verabreicht bekamen. Es wurde ein dosisabhängiger Anstieg der Mikrokernfrequenz beobachtet, parallel zu dem Anstieg der Hb-Addukte AAVal und GAVal. Im Knochenmark von männlichen Sprague-Dawley Ratten, denen 100 mg Acrylamid/kg KG i.p. verabreicht wurde, konnte 24 und 48 Stunden nach der Applikation keine erhöhte Mikrokernfrequenz festgestellt werden. Hier wurden ebenfalls die Hb-Addukte als Expositionsbiomarker mit überprüft. Es konnte ein deutlicher Anstieg von AAVal und ein leichter Anstieg von GAVal detektiert werden [Paulsson et al., 2002]. Die stärkere Glycidamidbildung in den Mäusen lässt sich vermutlich durch den ausgeprägteren oxidativen Metabolismus von Acrylamid zu Glycidamid erklären, der in der Literatur beschrieben wird. Nach Verabreichung von Glycidamid an männliche Sprague-Dawley Ratten und CBA-Mäuse wurde eine Erhöhung der Mikrokernfrequenz festgestellt. Daraus schlossen die Autoren, dass Glycidamid für die Induktion der Mikrokerne in Ratte und Maus verantwortlich ist [Paulsson et al., 2003]. Für diese Vermutung spricht auch, dass in CYP 2E1-null-Mäusen nach Verabreichung von Acrylamid keine Mikrokerne im Blut induziert wurden. In Wildtyp-Mäusen war die Mikrokernfrequenz jedoch deutlich erhöht [Ghanayem et al., 2005]. Eine weitere Studie an männlichen Mäusen untersuchte die Wirkung von 1 mg, 3 mg, 6 mg, 12 mg, 24 mg und 30 mg Acrylamid/kg KG, die i.p. verabreicht wurden mittels Durchflusscytometrie. Nach 42 Stunden wurden die polychromatischen Erythrocyten des retrobulbär entnommenen Blutes auf Mikrokerne untersucht. Ab 6 mg Acrylamid/kg KG war die Mikrokernfrequenz signifikant erhöht [Abramsson-Zetterberg, 2003]. Dieses Ergebnis wurde auch durch die Arbeit von Zeiger et al. bestätigt, die männliche Mäuse über 28 Tage mit 0,125 mg bis 24 mg Acrylamid/kg KG/d behandelten. Auch nach dieser langen Behandlungsdauer wurde mittels Durchflusscytometrie eine signifikante Erhöhung der Mikrokernfrequenz erst ab 4 mg Acrylamid/kg KG/d in normochromatischen Erythrocyten und ab 6 mg Acrylamid/kg KG/d in Reticulocyten festgestellt [Zeiger et al., 2009].

Untersuchungen zur strangbrechenden Wirkung von Acrylamid und Glycidamid wurden in unserer Arbeitsgruppe mit Hilfe des alkalischen Comet Assays durchgeführt. Dazu wurden Blutproben von drei gesunden männlichen Probanden mit 1 mM bis 6 mM Acrylamid oder

0,1 mM bis 3 mM Glycidamid für 1, 2 oder 4 Stunden bei 37 °C inkubiert. Acrylamid induzierte keine DNA-Strangbrüche, während nach 4 Stunden Inkubation mit 0,3 mM Glycidamid signifikante DNA-Schäden detektiert werden konnten [Baum et al., 2005]. Eine weitere Sensitivierung des alkalischen Comet Assays lässt sich durch eine zusätzliche Behandlung der lysierten Zellen mit dem bakteriellen Base Excision Repair-Enzym Formamidopyrimidin-DNA-Glycosylase (FPG) erreichen. Dieses erkennt geschädigte Basen, schneidet sie aus der DNA und fügt einen Strangbruch ein. Nach Anwendung dieser zusätzlichen Modifikation werden Glycidamid-induzierte DNA-Schäden im Vollblut nach 4 Stunden bereits ab 10 µM signifikant erkennbar [Thielen et al., 2006].

In vivo wurde der Comet Assay in Leukocyten, Gehirn, Knochenmark, Leber, Hoden und Nebennieren männlicher Sprague-Dawley Ratten durchgeführt, denen oral 18 mg, 36 mg oder 54 mg Acrylamid/kg KG verabreicht wurden. Die Tiere wurden nach 24 Stunden getötet. In einem zusätzlichen Versuch wurden weitere Ratten mit 54 mg Acrylamid/kg KG behandelt und bereits nach 2 oder 5 Stunden getötet. Eine Steigerung der Sensitivität des Comet Assays durch zusätzliche Behandlung der lysierten Zellen mit einem DNA-Reparaturenzym wurde nicht vorgenommen. Signifikant erhöhte DNA-Schäden wurden in der höchsten Dosisgruppe nach 2 Stunden in Hoden und Nebennieren, nach 5 Stunden in Leukocyten, Knochenmark, Leber und Nebennieren detektiert, nicht aber in den Hoden. Nach 24 Stunden wurde eine signifikante DNA-Schädigung in der 36 mg Acrylamid/kg KG-Gruppe nur im Gehirn der Tiere festgestellt, während in der 54 mg Acrylamid/kg KG-Gruppe die DNA in Leukocyten, Gehirn und Hoden signifikant geschädigt war [Manière et al., 2005].

Zur Untersuchung der mutagenen Wirkung wurde Acrylamid im Ames Test auf Bakterienstämmen von *Salmonella typhimurium* (TA1535, TA1537, TA1538, TA98, TA100 und TA102) [Hashimoto & Tanii, 1985; Knaap et al., 1988; Tsuda et al., 1993], *Escherichia coli* (WP2uvrA) [Tsuda et al., 1993] und *Klebsiella pneumoniae* (ur⁺pro⁻) [Knaap et al., 1988] mit und ohne metabolische Aktivierung getestet. In keinem Bakterienstamm konnte eine mutagene Wirkung von Acrylamid detektiert werden. Glycidamid hingegen zeigte sich in *S. typhimurium* TA100 und TA1535 ab 5 mg Glycidamid/Platte mutagen [Hashimoto & Tanii, 1985]. Mutationen in diesen beiden Salmonella-Stämmen deuten auf Basenpaarsubstitutionen als Auslöser der Mutation hin.

In Säugetierzelllinien wurde das Potential von Acrylamid und Glycidamid untersucht Mutationen an den Thymidinkinase (TK)- und Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase (HPRT)-Loci zu verursachen. In Lymphomzellen der Maus (L5178Y/TK[±]), die für zwei oder vier Stunden mit bis zu 10 mg Acrylamid/ml sowohl mit, als auch ohne metabolische Aktivierung inkubiert wurden, konnten Mutationen der TK- und HPRT-Loci erst bei cytotoxischen Acrylamid-Konzentrationen festgestellt werden [Knaap et al., 1988]. In unserer Arbeitsgruppe wurden Acrylamid und Glycidamid hinsichtlich ihrer Mutagenität am *hprt*-Gen

getestet. Dazu wurden V79 Zellen mit 0,1 mM bis 10 mM Acrylamid bzw. 0,4 mM bis 2 mM Glycidamid für 24 Stunden inkubiert. Acrylamid bewirkte keine Mutationen, Glycidamid war ab 0,8 mM signifikant mutagen. Allerdings wirkte Glycidamid bei dieser Konzentration auch schon leicht cytotoxisch [Baum et al., 2005].

2.1.6.2 Kanzerogenität

Die kanzerogene Wirkung von Acrylamid wurde in zwei Langzeitstudien an Ratten untersucht. Johnson et al. veröffentlichten 1986 die Ergebnisse ihrer zweijährigen Studie an männlichen und weiblichen F344-Ratten, denen täglich 0,01 mg bis 2 mg Acrylamid/kg KG im Trinkwasser verabreicht wurden. Die männlichen und weiblichen Tiere der Gruppen, die 0,01 mg oder 0,1 mg Acrylamid/kg KG/d im Trinkwasser erhielten zeigten keine signifikant erhöhte Tumorzinzidenz. In den männlichen Tieren der 0,5 mg und 2 mg Acrylamid/kg KG/d-Gruppen wurde eine signifikante Zunahme von peritonealen Mesotheliomen im Bereich der Hoden (Tunica vaginalis testis) festgestellt. In der höchsten Dosis-Gruppe wurde bei den weiblichen Tieren eine Zunahme der Tumoren der Brustdrüse, des Zentralnervensystems, der Mundhöhle und des Uterus beobachtet. Unabhängig vom Geschlecht wurde in der 2 mg Acrylamid/kg KG/d-Gruppe eine erhöhte Tumorzinzidenz in der Schilddrüse festgestellt [Johnson et al., 1986].

In einer vergleichbaren Langzeitstudie von Friedman et al. wurden männliche F344-Ratten mit 0,1 mg bis 2 mg Acrylamid/kg KG/d und weibliche F344-Ratten mit 1 mg oder 3 mg Acrylamid/kg KG/d im Trinkwasser behandelt. Nach zwei Jahren wurde bei den mit 2 mg Acrylamid/kg KG/d behandelten männlichen Ratten ebenfalls eine Zunahme an Mesotheliomen der Tunica vaginalis testis und an Tumoren der Schilddrüse beobachtet. In den weiblichen Ratten wurden in beiden Behandlungsgruppen Tumoren der Brust- und Schilddrüse festgestellt.

Die kanzerogene Wirkung von Acrylamid am Menschen wurde in verschiedenen epidemiologischen Studien untersucht. In Kohortenstudien mit exponierten Arbeitern konnte im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung keine eindeutige Korrelation zwischen Acrylamidexposition und Tumorzinzidenz festgestellt werden [Sobel et al., 1986; Collins et al., 1989; Marsh et al., 1999].

Ein möglicher Zusammenhang zwischen einer erhöhten Krebsinzidenz und der Aufnahme von Acrylamid über die Nahrung wurde von Mucci et al. in mehreren Studien untersucht. Durchgeführt wurden hierzu zwei Fall-Kontroll-Studien an Männern und Frauen der schwedischen Bevölkerung, bei denen der Fokus auf Tumoren des Dick- und Enddarms, der Blase und der Niere lag [Mucci et al., 2003, 2004]. Außerdem wurden zwei Kohortenstudien

an schwedischen Frauen durchgeführt, die sich auf Tumoren des Dick- und Enddarmes bzw. der Brust konzentrierten [Mucci et al., 2005, 2006]. Mit Hilfe von Fragebögen wurde das Ernährungsverhalten der untersuchten Personen eruiert. Auch Pelucchi et al. untersuchten in einer Fall-Kontroll-Studie an schweizerischen und italienischen Patienten eine Korrelation zwischen der Acrylamidexposition über die Nahrung und Tumoren in Mundhöhle, Rachen, Kehlkopf, Speiseröhre, Dick- und Enddarm, Brust, Eierstöcken und Prostata [Pelucchi et al., 2006]. Es konnte jedoch in keiner der Studien ein Zusammenhang zwischen der Krebsentstehung und der Acrylamidexposition hergestellt werden.

2.1.6.3 Neurotoxizität

Die neurotoxische Wirkung von Acrylamid wurde bekannt durch accidentielle Vergiftungen oder chronische Exposition am Arbeitsplatz. Beobachtet wurden leichte und reversible Störungen des peripheren Nervensystems wie Taubheit von Händen und Füßen und Muskelschwäche der Beine. Die chronische Exposition mit Acrylamid führte aber auch zu schwerwiegenden Störungen wie cerebraler Dysfunktion und Neuropathien [Hagmar et al., 2001]. In Langzeitstudien an Ratten, die täglich oral mit 2 mg Acrylamid/kg KG behandelt wurden, konnte histopathologisch eine Degeneration der peripheren Nerven beobachtet werden. Die Tiere zeigten keine klinischen Symptome [Johnson et al., 1986; Friedman et al., 1995].

Auf Grundlage von *in vivo* Versuchen wird vermutet, dass die primäre neurotoxische Schädigung durch Acrylamid an den Nervenendigungen stattfindet. Als Konsequenz kommt es zu Axonopathien, die einhergehen mit Ataxien, kognitiven Beeinträchtigungen und Skelettmuskelschwäche [LoPachin et al., 2008].

Wie Acrylamid die Nervenendigungen schädigt ist noch unklar. Es werden zwei Hypothesen diskutiert. Die eine Hypothese beruht auf der Hemmung der schnellen axonalen Reizweiterleitung [Sickles et al., 2002], die andere legt die Hemmung der Erregungsübertragung zwischen den Nervenzellen [LoPachin et al., 2002] zu Grunde.

Glycidamid scheint bei der Induktion von Neurotoxizität nur eine untergeordnete Rolle zu spielen [Tyl & Friedman, 2003].

Auf der Grundlage bisheriger Tierversuche legte die WHO 2002 einen NOAEL von 0,5 mg/kg KG/d für die neurotoxische Wirkung von Acrylamid fest [WHO, 2002].

2.1.6.4 Reproduktionstoxizität

Reproduktionstoxische Effekte wurden in verschiedenen Mehrgenerationen-Studien an Ratten und Mäusen nachgewiesen. Oral applizierte Dosen ab 5 mg Acrylamid/kg KG bewirkten eine höhere Abortrate und daraus resultierend eine geringere Anzahl an Nachkommen in der F₀- und F₁-Generation. Höhere Dosierungen (ab 15 mg Acrylamid/kg KG) beeinflussten zudem das Paarungsverhalten und die Spermienmotilität und -morphologie, was zu einer reduzierten Fertilität führte. In Crossover Studien wurde gezeigt, dass die weibliche Reproduktionsfähigkeit durch Acrylamid weit weniger beeinträchtigt wird, als die männliche. Reproduktionstoxische Effekte konnten nur festgestellt werden, nachdem behandelte Männchen mit unbehandelten Weibchen verpaart wurden [Shipp et al., 2006].

In einer Studie von Costa et al. wurde Glycidamid auf mögliche reproduktionstoxikologische Effekte hin untersucht. Dazu wurden männliche Sprague-Dawley Ratten 14 Tage lang mit 50 mg Glycidamid/kg KG/d behandelt. Es wurden Verringerungen im Gewicht der Nebenhoden und in der Spermienanzahl und -viabilität festgestellt [Costa et al., 1992].

Für Acrylamid wurde ein NOAEL für Reproduktionstoxizität von 2 mg/kg KG/d festgelegt [WHO, 2002].

2.2 Biochemische Grundlagen der DNA

In Säugerzellen liegt die DNA als Doppelhelix vor. Sie besteht aus einem Rückgrad von Desoxyribosen, die an ihren 3'- und 5'-Hydroxylgruppen über eine Phosphodiesterbrücke verbunden sind. Das 1'-Ende jedes Zuckermoleküls ist über eine glykosidische Bindung mit einer von vier DNA-Basen verknüpft. Bei den DNA-Basen handelt es sich um die Purinbasen Guanin und Adenin und den Pyrimidinbasen Cytosin und Thymin. Im DNA-Doppelstrang sind die DNA-Basen über Wasserstoffbrückenbindungen mit den Basen des komplementären Stranges verbunden. Dabei verbinden sich Adenin und Thymin über zwei und Guanin und Cytosin über drei Wasserstoffbrückenbindungen.

2.2.1 DNA-Alkylierung

Fast alle Heteroatome der DNA können von Elektrophilen, wie alkylierenden Agenzien angegriffen werden [Gates, 2009]. Die Alkylierung kann zum einen durch endogene

Substanzen wie Betain oder Cholin erfolgen. Andererseits kann auch eine Exposition mit genotoxischen Agenzien erfolgen, die wiederum direkt-alkylierend oder erst nach metabolischer Aktivierung wirken können. Die Alkylierung kann mono- oder bifunktionell erfolgen. Bei der monofunktionellen Alkylierung reagiert das Agenz mit bestimmten nucleophilen Stellen der DNA-Basen und des Phosphatrückgrades. Bifunktionelle Alkylanzien fügen cross-links in die DNA ein, die die Replikation der DNA verhindern.

Die Reaktivität von alkylierenden Agenzien wird durch Angabe der Swain Scott Konstanten s ausgedrückt. Alkylanzien mit hohen s -Werten sind hochmolekular, ungeladen und polarisierbar und greifen bevorzugt an $N3$ -Adenin und $N7$ -Guanin an. Agenzien mit niedrigem s -Wert sind niedermolekular, positiv geladen und schlecht polarisierbar und alkylieren weniger nucleophile Zentren wie O^6 -Guanin [Beranek et al., 1990]. Das $N7$ des Guanins ist die nucleophilste Stelle innerhalb der DNA-Basen und wird bevorzugt von kleinen Alkylanzien angegriffen [Gates, 2009].

Es werden zwei Arten von Alkylierungsreaktionen unterschieden. S_N1 -Reaktionen folgen einer Kinetik erster Ordnung und werden hauptsächlich von Alkylanzien mit niedrigen s -Werten angeregt. Agenzien mit hohen s -Werten folgen einer S_N2 -Kinetik [Beranek et al., 1990].

In Abbildung 2.7 sind die bevorzugten Angriffspunkte von monofunktionell-alkylierenden Agenzien dargestellt.

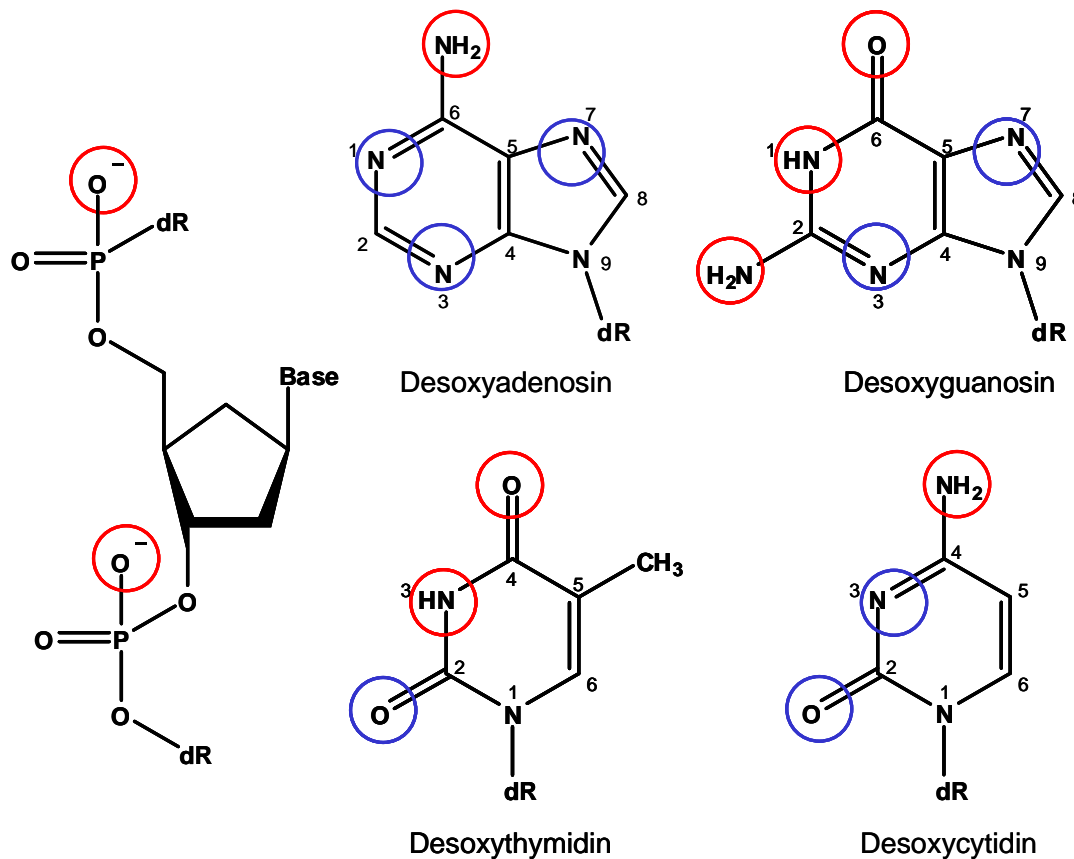


Abbildung 2.7: Angriffspunkte für Alkylierungen in DNA-Basen und Desoxyribose-Phosphat-Rückgrad [modifiziert nach Gates, 2009]

(dR = Desoxyribose, die rot markierten Angriffspunkte führen zu stabilen, die blau markierten zu instabilen DNA-Addukten)

Die Alkylierung an $N1$, $N2$ und $O6$ des Guanins, $N1$ und $O4$ des Thymins, $N6$ des Adenins und $N4$ des Cytosins führt zu chemisch stabilen DNA-Addukten. Besonders die strukturellen Veränderungen an $O6$ -Guanin und $O4$ -Thymin in der Basenpaar-Region verhindern die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen. Dadurch werden Basenfehlpaarungen verursacht und es kommt ohne rechtzeitige Reparatur zu GC \rightarrow AT-Transitions-Mutationen durch $O6$ -Alkylguanin bzw. AT \rightarrow GC-Transitions-Mutationen durch $O4$ -Alkylthymin [Gates, 2009; Jenkins et al., 2005].

Instabile DNA-Addukte entstehen durch eine Alkylierung an $N7$ und $N3$ des Guanins, an $N7$, $N3$ und $N1$ des Adenins, an $N3$ und $O2$ des Cytosins, sowie an $O2$ des Thymins. Die Folge sind ring-geöffnete Basen (Formamidopyrimidine, FaPy) und abasische Stellen. Apurinische Stellen entstehen durch die spontane Hydrolyse der glykosidischen Bindung zu Guanin und Adenin schneller (Geschwindigkeitskonstante $3,0 \times 10^{-11} \text{ s}^{-1}$), als apyrimidinische Stellen (Geschwindigkeitskonstante $1,5 \times 10^{-12} \text{ s}^{-1}$). Die apurinischen und apyrimidinischen Stellen

sind cytotoxisch und mutagen [Gates, 2009; Loeb & Preston, 1986]. Die nachfolgende Abbildung 2.8 erläutert schematisch die Entstehung einer apurinischen Stelle.

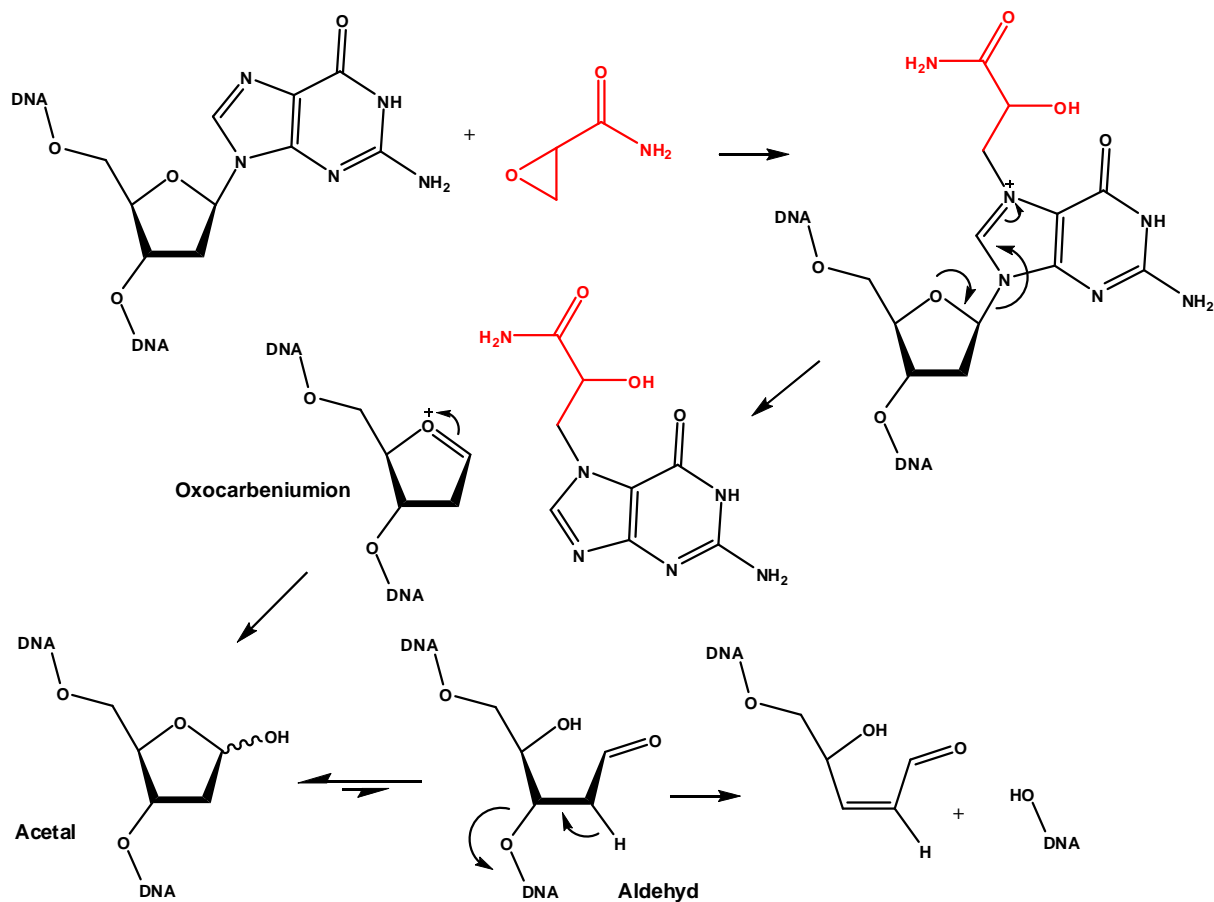


Abbildung 2.8: Entstehung einer apurinischen Stelle am Beispiel der Alkylierung von *N7*-Guanin durch Glycidamid [modifiziert nach Gates, 2009]

Die Alkylierung der *N7*-Position des Guanins führt zu einer positiven Formalladung des Moleküls. Dadurch werden die Eigenschaften des Guanins als Abgangsgruppe verbessert und die Stärke der glykosidischen Bindung geschwächt. Durch die spontane Depurinierung entsteht ein Oxocarbeniumion, das sich rasch durch Hydrolyse in eine apurinische Stelle umwandelt. Diese liegen zu 99 % als Acetal vor, stehen aber im Gleichgewicht mit der ring-geöffneten Aldehydform. Der Verlust des aciden α -Protons des Aldehyds führt zur β -Eliminierung des Phosphatrestes am 3'-Ende der apurinischen Stelle und damit zum DNA-Strangbruch [Gates, 2009; Loeb & Preston, 1986].

Neben der Bildung apurinischer Stellen ist eine weitere Folge instabiler DNA-Addukte die Entstehung von ring-geöffneten Formamidopyrimidinen. Diese kommen zustande durch die Hydroxylierung der *C8*-Position eines *N7*-Alkylguanins, wie in Abbildung 2.9 gezeigt. Die Reaktion läuft unter physiologischen Bedingungen jedoch langsamer ab, als die

Depurinierung. Allerdings werden Formamidopyrimidine nachweislich *in vivo* gebildet und die glykosidische Bindung ist im neutralen pH-Milieu stabil [Gates, 2009]. Formamidopyrimidine können die DNA-Replikation blockieren und wirken auf diese Weise cytotoxisch und mutagen [Marnett & Burcham, 1993]. Allerdings können Formamidopyrimidine auch durch Enzyme unter Ausbildung einer apurinischen Stelle aus der DNA entfernt werden [Loeb & Preston, 1986].

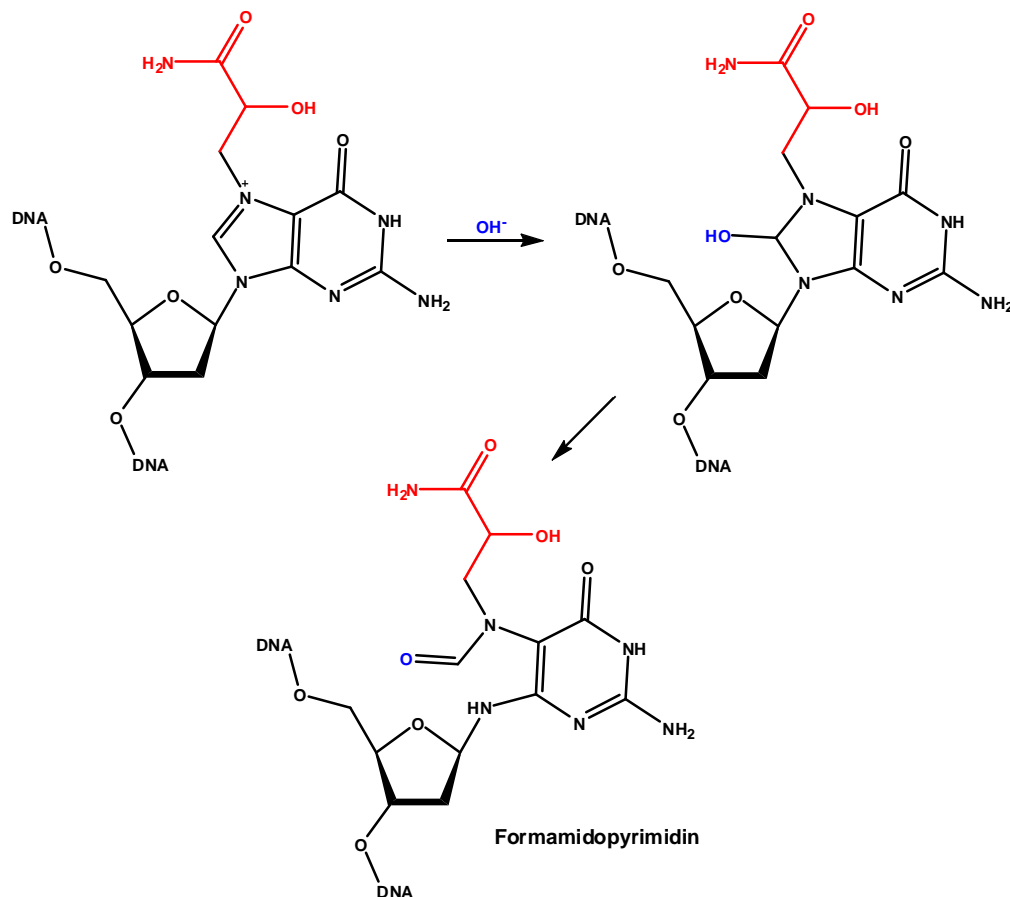


Abbildung 2.9: Entstehung eines Formamidopyrimidins am Beispiel der Alkylierung von *N7*-Guanin durch Glycidamid [modifiziert nach Gates, 2009]

2.2.2 Reparatur alkylierter DNA-Basen

Die Reparatur der geschädigten DNA ist ein wichtiger Faktor, der das Auftreten von Mutationen beeinflusst. Es sind verschiedene Mechanismen bekannt, die DNA-Addukte und DNA-Schäden effektiv reparieren, wie z.B. Basen und Nucleotid Exzisions-Reparatur (BER bzw. NER), Mismatch Reparatur und Alkyltransferase-vermittelte Reparatur [Jarabek et al., 2009]. DNA-Schäden und DNA-Addukte, die durch Alkylanzien entstanden sind, werden

hauptsächlich durch BER und Alkyltransferase-vermittelte Reparatur behoben. *N3*- oder *N7*-alkylierten Adenine und Guanine werden meist durch BER repariert [Jenkins et al., 2005].

Die BER wird initiiert durch DNA-Glykosylasen, die die geschädigte DNA-Base erkennen und entfernen.

Bei der BER wird unterschieden zwischen short-patch BER und long-patch BER. Die short-patch BER stellt den einfacheren und häufigeren Mechanismus dar. In beiden Fällen wird die Reparatur durch eine DNA-Glykosylase initiiert. Es werden Typ I- und Typ II-Glykosylasen unterschieden. Typ I-Glykosylasen erkennen die alkylierte DNA-Base und katalysieren daraufhin die Trennung der glykosidischen Bindung zwischen DNA-Base und Desoxyribose, wodurch eine apurinische oder apyrimidinische (AP) Stelle entsteht. Das Desoxyribose-Phosphat-Rückgrad des DNA-Stranges wird an der AP-Stelle durch eine DNA-AP-Endonuclease oder eine DNA-AP-Lyase getrennt. Die DNA-AP-Endonuclease trennt das DNA-Rückgrad am 5'-Ende, die DNA-AP-Lyasen am 3'-Ende zur AP-Stelle. Typ II-Glykosylasen sind bifunktionell und neben ihrer DNA-Glykosylase-Aktivität mit einer zusätzlichen Endonuclease-Aktivität ausgestattet. Im Fall der short-patch BER wird anschließend durch die DNA-Polymerase β eine passende DNA-Base eingesetzt und durch eine DNA-Ligase 3 wird das DNA-Rückgrad wieder verbunden. Die long-patch BER unterscheidet sich von der short-patch BER dadurch, dass DNA-Polymerase β oder DNA-Polymerase δ einen Teil des DNA-Stranges um die geschädigte DNA-Base polymerisieren und einfügen. Die Flap-Endonuclease trennt die überhängenden Oligonukleotide ab und ermöglicht der DNA-Ligase 1 das DNA-Rückgrad zu verbinden (Abbildung 2.10) [Robertson et al., 2009].

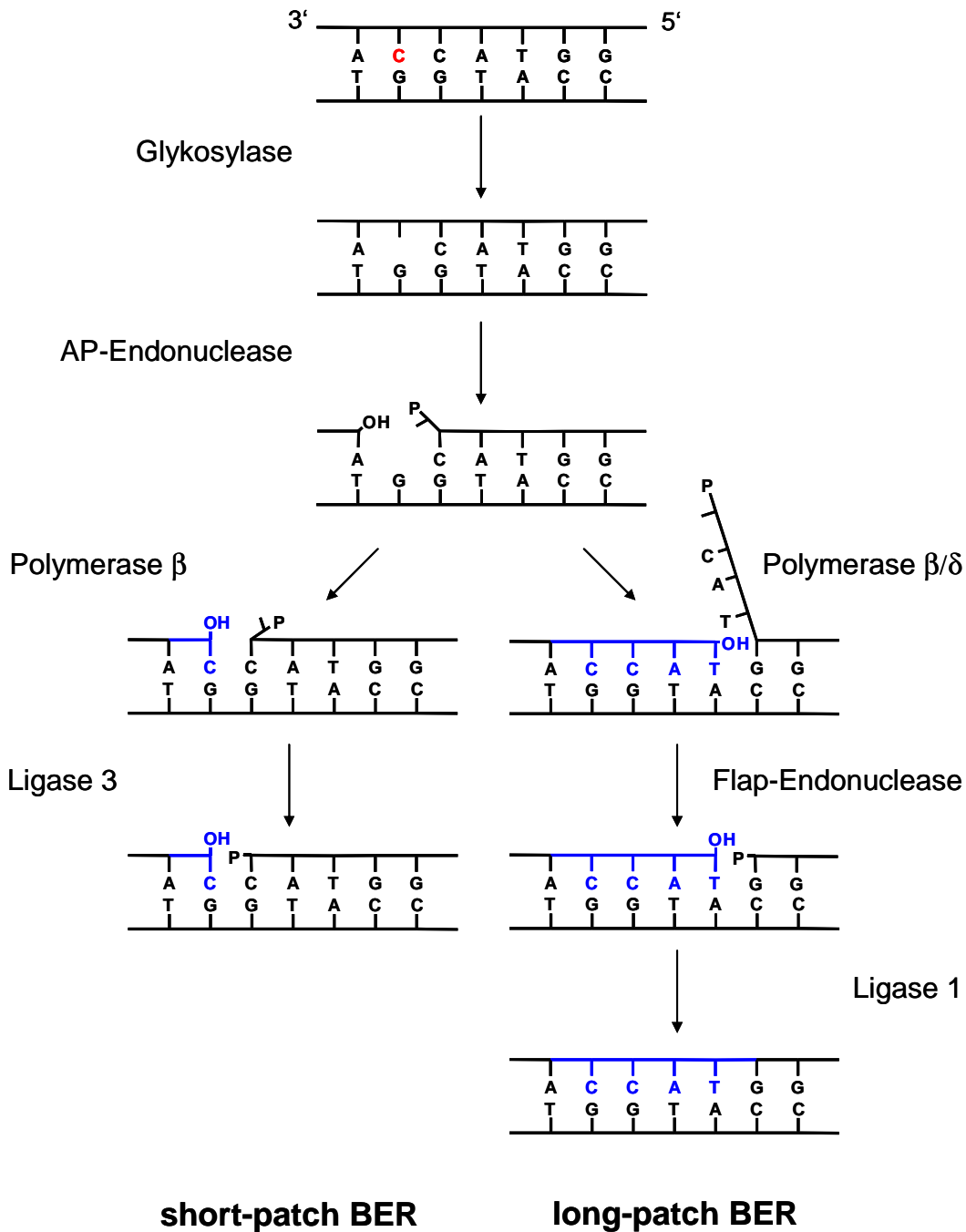


Abbildung 2.10: Mechanismus der Base Excision Repair [modifiziert nach Robertson et al., 2009]

DNA-Addukte am O⁶ des Guanins werden meistens durch Alkylguanin-Transferasen repariert. Diese übertragen die Alkylgruppe vom O⁶-Guanin auf einen Cystein-Rest im aktiven Zentrum des Enzyms. Dadurch kommt es zum Funktionsverlust der Alkylguanin-Transferase. Im Gegensatz zum bakteriellen Enzym ist das der Eukaryoten nicht in der Lage Alkylreste am O²-und O⁴-Thymin zu entfernen [Jenkins et al., 2005; Jarabek et al., 2009].

Ein Vorteil der Reparatur durch Alkylguanin-Transferasen gegenüber der BER ist die fehlerfreie Umsetzung, die durch den Einsatz eines einzigen Enzyms ermöglicht wird. Allerdings ist die Reparatur durch Alkylguanin-Transferasen limitiert durch die Anzahl der Enzyme und eher sättigbar. Die BER ist einerseits sehr effizient und zuverlässig, auf der anderen Seite können durch die Beteiligung mehrerer Enzyme am Reparaturprozess Fehler wie der Einbau einer falschen DNA-Base geschehen, die letztendlich zu Mutationen führen können [Jarabek et al., 2009].

2.3 Methodische Grundlagen

2.3.1 Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)

Zur Untersuchung der Expression von Enzymen auf Genebene wird die Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction; PCR) verwendet. Diese ermöglicht die selektive Vervielfältigung einer beliebigen DNA-Sequenz im zu untersuchenden Genom. Dadurch können kleinste Mengen des Ausgangsmaterials vermehrt und per Gelelektrophorese detektierbar gemacht werden. Der PCR liegt die DNA-Replikation zu Grunde, bei der die DNA durch Polymerasen verdoppelt wird.

Einem PCR-Ansatz werden neben der zu vervielfältigenden DNA, Nukleotide, die die vier DNA-Basen enthalten, Primer und eine DNA-Polymerase zugefügt. Die Primer bestehen aus kurzen Oligonukleotiden und lagern sich zu Beginn der PCR an beiden Strängen des zu replizierenden DNA-Abschnitts an und begrenzen ihn dadurch. Als Polymerase wird gewöhnlich die DNA-Polymerase 1 (*Taq*-Polymerase) des Bakteriums *Thermus aquaticus* verwendet. Das Enzym ist hitzestabil, es wird also auch bei hohen Temperaturen, wie sie bei der PCR verwendet werden, nicht denaturiert. In jedem Replikationszyklus wird ein dreiphasiger Temperaturgradient verwendet (Abbildung 2.11) [Brown, 1996; Lottspeich & Zorbas, 1998].

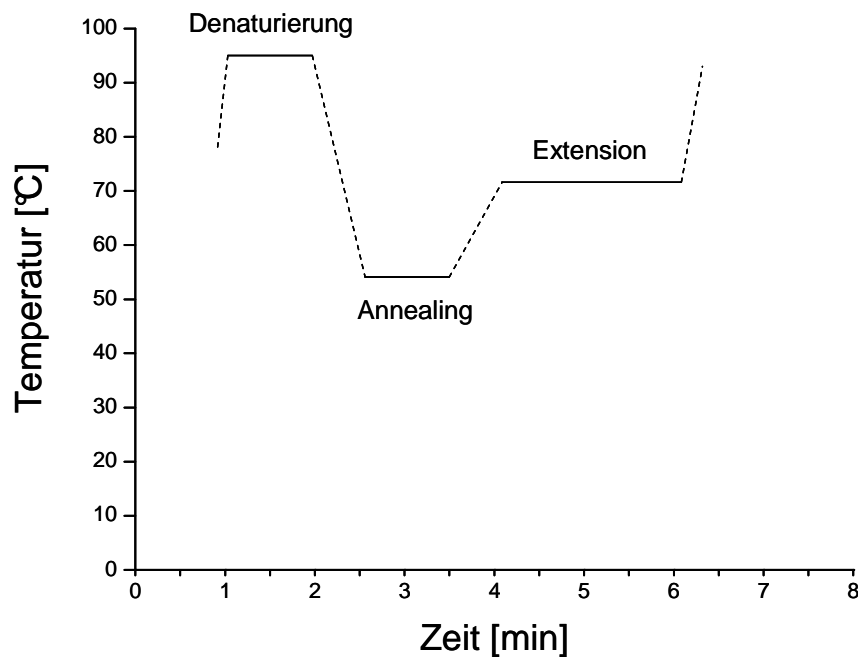


Abbildung 2.11: Schematischer Ablauf eines PCR-Zyklus [modifiziert nach Brown, 1996]

In der ersten Phase, der sogenannten Denaturierung, lösen sich die Wasserstoffbrückenbindungen des DNA-Doppelstranges, so dass DNA-Einzelstränge vorliegen. Dies geschieht gewöhnlich bei 95 °C. In der zweiten Phase folgt die Anlagerung der Primer an die DNA-Einzelstränge, das sogenannte Annealing. Jeder Primer hat eine spezifische Annealingtemperatur, die im Vorfeld des Versuchs etabliert werden muss. In der Regel liegt die Annealingtemperatur zwischen 50 und 60 °C. Wird die Annealingtemperatur zu hoch gewählt, bleiben Primer und Matrize getrennt, liegt sie zu niedrig, kommt es zu fehlerhaften Hybriden. Die DNA-Synthese schließlich findet in der Extension-Phase bei 72 °C statt. Bei dieser Temperatur hat die *Taq*-Polymerase ihr Aktivitätsoptimum. Anschließend beginnt der Zyklus wieder mit der DNA-Denaturierung und wird insgesamt 30-40 Mal durchlaufen [Brown, 1996; Lottspeich & Zorbach, 1998].

Der Nachweis der mittels RT-PCR synthetisierten DNA erfolgte im Rahmen dieser Arbeit durch Gelelektrophorese.

2.3.2 Comet Assay

Mit der alkalischen Einzelzellgelelektrophorese (Comet Assay) lassen sich durch Radikale sowie alkylierende oder interkalierende Agenzien induzierte DNA-Schäden in einzelnen Zellen einfach, schnell und kostengünstig nachweisen. Außerdem kann die Methode in allen eukaryotischen Gewebe- und Zelltypen angewendet werden.

Das Prinzip des Comet Assay beruht auf der Migration der in Agarose eingebetteten DNA im elektrischen Feld. Der Name der Methode leitet sich von dem Bild der Zellen nach der Elektrophorese ab. Unter dem Mikroskop betrachtet hat die Zelle die Form eines Kometen, mit einem Kopf (Zellkern) und einem Schweif aus kleineren DNA-Fragmenten, die im elektrischen Feld Richtung Anode gewandert sind. Das größte Spektrum an DNA-Schäden kann mittels alkalischer Einzelzellgelelektrophorese ($\text{pH} > 13$) erfasst werden. Diese Methode ermöglicht die Detektion von Doppel- und Einzelstrangbrüchen, alkalilabilen Stellen in Form von Einzelstrangbrüchen und Einzelstrangbrüchen durch unvollständige base excision repair [Tice et al., 2000; Hartmann et al. 2003].

Der alkalische Comet Assay kann durch Behandlung der Zellen mit Reparaturenzymen weiter modifiziert werden. In dieser Arbeit wurde die aus *E. coli* gewonnene Endonuclease Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase (FPG) verwendet. FPG erkennt oxidative und durch Alkylierung induzierte DNA-Schäden und die daraus entstandenen ringgeöffneten Formamidopyrimidine/Imidazole, sowie abasische Stellen in Folge spontaner Depurinierung. FPG ist ein bifunktionelles Enzym mit einer DNA-Glykosylase- und einer AP-Lyase-Aktivität. Die DNA-Glykosylase erkennt modifizierte Basen und entfernt sie aus der DNA unter Ausbildung einer abasischen Stelle. Die AP-Lyase trennt daraufhin das Desoxyribosephosphat-Rückgrad der DNA, wodurch es zum Strangbruch kommt [Karakaya et al., 1997; Robertson et al., 2009].

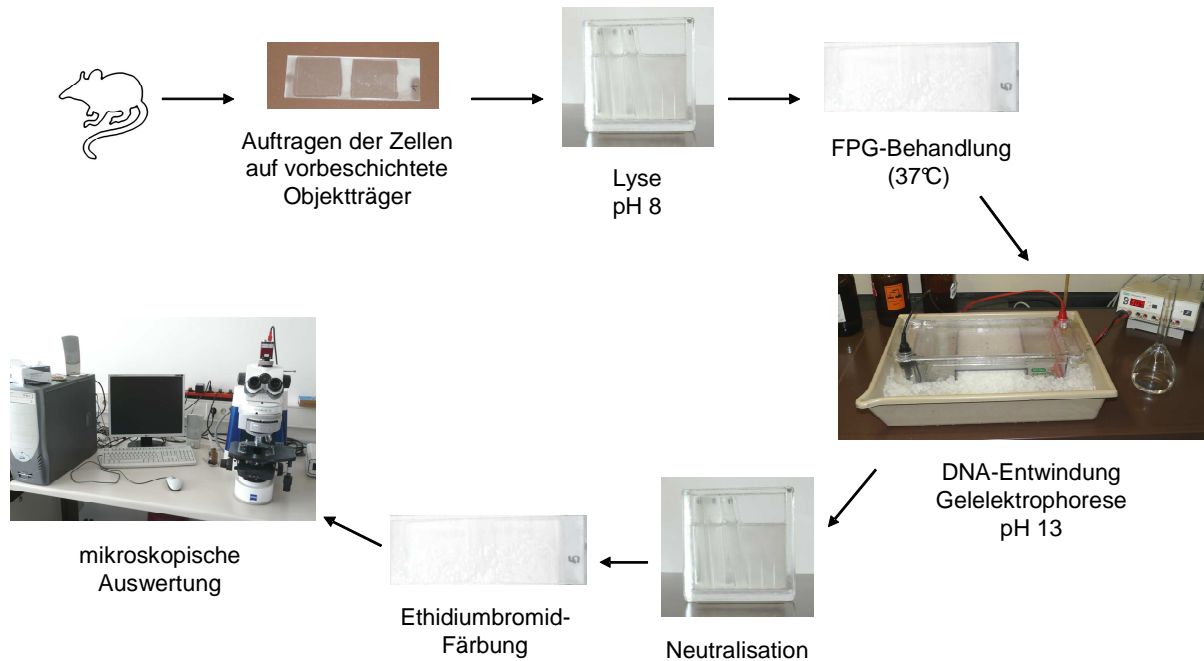


Abbildung 2.12: Schematische Durchführung des Comet Assay [modifiziert nach Tice et al., 2000]

In vorausgegangenen Arbeiten der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass Glycidamid-induzierte DNA-Schäden nach Behandlung mit dem Reparaturenzym FPG sensitiver detektiert werden konnten [Thielen et al., 2006]. Glycidamid reagiert mit der DNA hauptsächlich unter Bildung des *N7*-GA-Guanin-Adduktes. Dieses kann sich spontan aus der DNA herauslösen und dadurch zu einer apurinen Stelle führen oder durch Ringöffnung zu einem Formamido-Pyrimidin (FaPy) umgelagert werden [Gates, 2009].

2.3.3 HPLC-MS/MS und Elektrospray-Ionisierung (ESI)

Mit Hilfe der Kopplung von Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) und Massenspektrometrie (MS) lassen sich polare, schwer flüchtige und thermolabile Verbindungen qualitativ und quantitativ untersuchen. Ein Massenspektrometer besteht aus einer Ionisationseinheit, einem Massentrennsystem und einem Detektor. Zur Analyse müssen die zu untersuchenden Substanzen zunächst in freie Kationen, Anionen oder Radikationen überführt werden. Mittels der bei der Ionisation erhaltenen kinetischen Energie und einer angelegten elektrischen Hochspannung werden die Ionen zur Massenaufftrennung beschleunigt [Cammann, 2000].

2.3.3.1 Elektrospray-Ionisierung (ESI)

Während die Ionenquelle bei Atmosphärendruck arbeitet, finden Massentrennung und Detektion im Hochvakuum statt. Dieses verhindert Stöße der Ionen an Luft- und Gasteilchen und gewährleistet so eine bleibende Ionisierung. Wichtig für die Empfindlichkeit des Massenspektrometers ist die Ionenausbeute. Als Ionisationsmethode wurde in dieser Arbeit die Electrospray Ionisierung (ESI) angewendet. Durch ESI werden die zu untersuchenden Substanzen nur zu einem geringen Teil fragmentiert. Vielmehr werden Molekülionen und Quasimolekülionen, die die Molekülmasse \pm der Masse eines Wasserstoffatoms tragen ($[M+H]^+$; $[M-H]^-$), erzeugt. Dadurch eignet sich ESI besonders für bereits ionische Substanzen oder solche, die leicht protoniert oder deprotoniert werden können.

Abbildung 2.13 zeigt das Prinzip der ESI. Das HPLC-Eluat wird durch eine Kapillare, an der eine Hochspannung angelegt ist in das Interface geleitet. Zeitgleich wird Stickstoff als Vernebelungsgas (nebulizer gas) zugeführt, was zur Bildung von kleinen geladenen Eluat-Tröpfchen an der Kapillarspitze führt. Die eingestellte Temperatur und das aufgeheizte Vernebelungsgas fördern die Verdunstung des Lösungsmittels, wodurch es zum Anstieg des Ladungs-Volumen-Verhältnisses und schließlich zur Coulomb-Explosion kommt, bei der eine weitere Verkleinerung der Tröpfchen stattfindet. Zur Massentrennung und Detektion werden die Teilchen durch das Orifice in den Hochvakuumbereich geleitet.

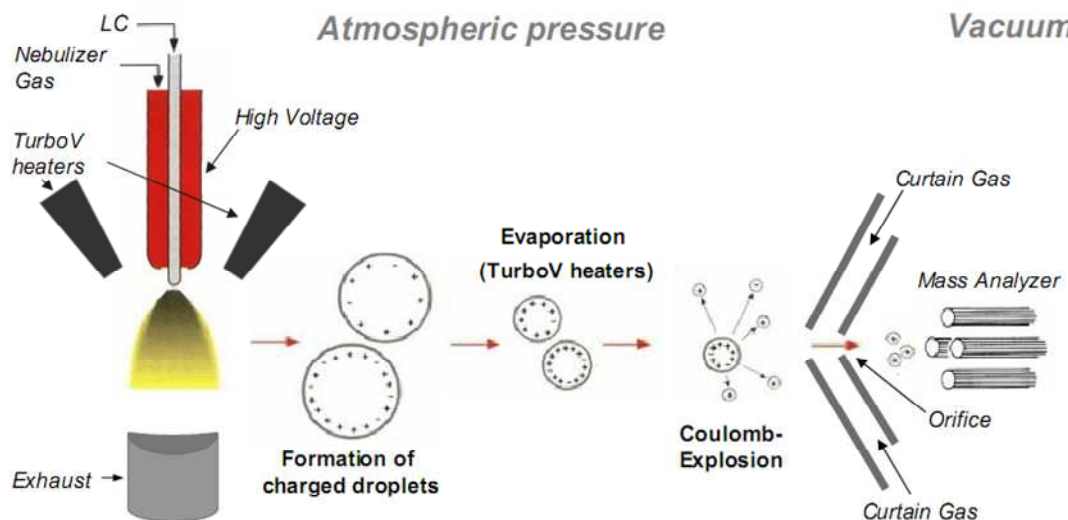


Abbildung 2.13: Prinzip der Elektrospray Ionisation (ESI) [Applied Biosystems, 2008]

2.3.3.2 Triple-Quadrupol-Tandemmassenspektrometer

Die Auftrennung der Analytionen nach ihrem Masse/Ladungs-Verhältnis erfolgt mit Hilfe eines Quadrupol-Massenfilters. Ein Quadrupol besteht aus vier konzentrischen Stabelektroden, die zueinander parallel angeordnet sind. Die gegenüberliegenden Stabelektroden sind an eine variable und jeweils entgegengesetzt gepolte Gleichspannungsquelle angeschlossen. Eine zusätzlich überlagerte modulierbare Hochspannungsfrequenz führt dazu, dass nur Ionen bestimmter Massen den Massendetektor erreichen [Cammann, 2000].

Triple-Quadrupol-Analysatoren (MS/MS) bestehen aus vier Quadrupolen (Abbildung 2.14). Q0 befindet sich hinter der Ionisationskammer und leitet den Massenstrom zum nachgeschalteten Q1, der wie Q3 der Massenselektion dient. Zwischen Q1 und Q3 befindet sich Q2, der als Stoßzelle zur gezielten Fragmentierung verwendet werden kann.

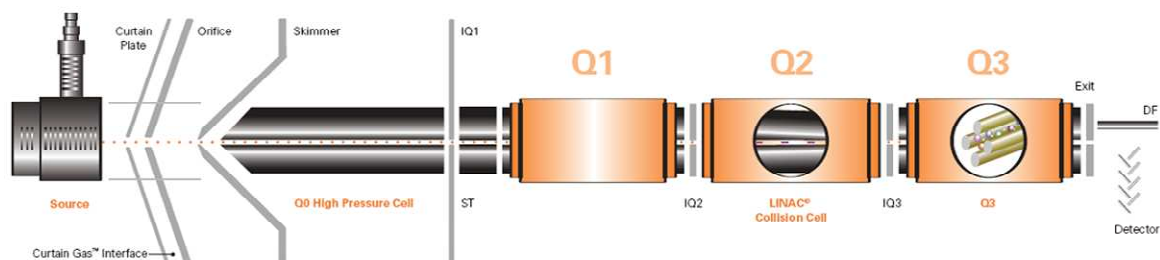


Abbildung 2.14: Schematische Darstellung eines Triple-Quadrupol-Analysators [Applied Biosystems, 2008]

Die Massenselektoren können je nach Fragestellung eingestellt werden. Neben Q1- und Q3-Scans können mit Hilfe der MS/MS-Modi Scans zur Identifizierung und Strukturaufklärung von Elternionen (Q1: Massenbereich; Q2: Fragmentierung; Q3: definierte Masse) und Produktionen (Q1: definierte Masse; Q2: Fragmentierung; Q3: Massenbereich) durchgeführt werden. Für den in dieser Arbeit verwendeten Multiple Reaction Monitoring (MRM)-Modus (Abbildung 2.15) wurden für Q1 eine definierte Masse eingestellt. Nach Fragmentierung an Q2 wurde an Q3 die Masse eines spezifischen Fragmentes detektiert. Dieser Modus bietet den Vorteil, dass Störsignale komplexer Matrices, wie z.B. von biologischen Proben, ausgeblendet werden können, wodurch das Signal/Rausch-Verhältnis verbessert und die Empfindlichkeit der Messung erhöht wird.

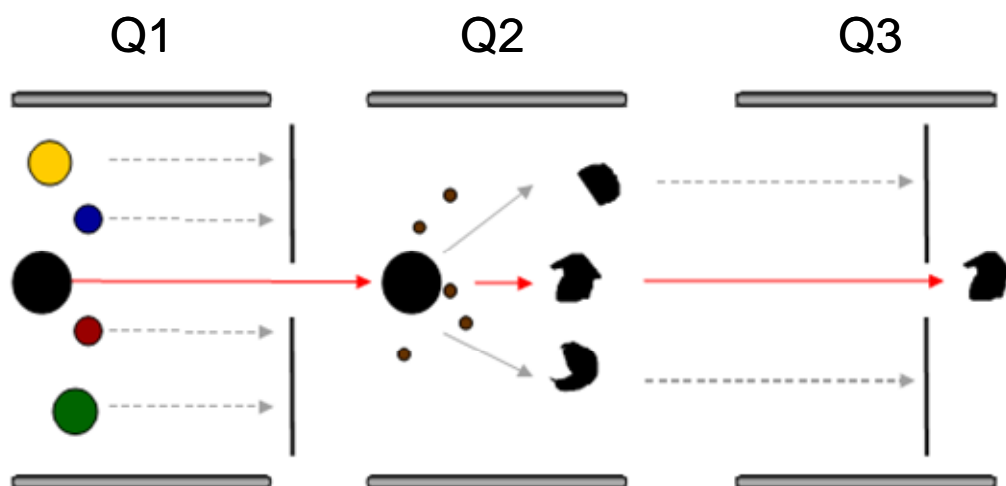


Abbildung 2.15: Schematische Darstellung des MRM-Modus [Applied Biosystems, 2008]

3 Problemstellung

Ein Kernpunkt der Risikobewertung von Acrylamid ist der Einfluss der Lebensmittelmatrix auf die Bioverfügbarkeit und den Metabolismus von Acrylamid und somit auf seine genotoxische und kanzerogene Wirkung. Dabei ist der Abstand zwischen der niedrigsten, genotoxisch wirksamen Konzentration und der unter ungünstigen Bedingungen im Organismus erreichten Konzentration entscheidend. Diese Balance wird durch eine Reihe von Faktoren bestimmt, zu denen die Freisetzung von Acrylamid aus der Lebensmittelmatrix sowie die Aufnahme von Acrylamid durch die Darmwand und die Metabolisierung von Acrylamid zu Glycidamid gehören. Daneben kommen auch Schutzmechanismen des Körpers wie die Reparatur der geschädigten DNA sowie die Entgiftung von Acrylamid und Glycidamid durch Bindung an Glutathion oder unkritische Makromoleküle, wie Blutproteine, zum Tragen.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der genotoxischen Wirkung von Acrylamid *in vivo* anhand des modifizierten Comet Assays sowie der massenspektrometrischen Untersuchung von *N7*-Glycidamid-Guanin-Addukten (*N7*-GA-Guanin). Dieses wird in der Literatur als Hauptaddukt von Glycidamid mit der DNA beschrieben und hauptsächlich für die genotoxische Wirkung von Acrylamid verantwortlich gemacht [Rice, 2005].

Die Problematik wurde in zwei Teilprojekten bearbeitet. Zum einen wurde die Auswirkung verschiedener Lebensmittelmatrices auf die genotoxische Wirkung von Acrylamid in der Ratte im Vergleich zur Acrylamid-Aufnahme über Trinkwasser per Schlundsonde untersucht. In den bislang durchgeführten Studien zur Untersuchung der Bioverfügbarkeit und biologischen Aktivität von Acrylamid wurde in der Regel Acrylamid als Reinstoff in Trinkwasser verabreicht. Nur wenige Studien beschäftigten sich bisher mit dem Einfluss der Lebensmittelmatrix auf die Bioverfügbarkeit und Wirkung von Acrylamid [Bjellaas et al., 2007; Doerge et al., 2005].

Zur Untersuchung verwendet wurden Lebkuchen und Brotkruste, sowie Pommes Frites, die entweder direkt aus der Kartoffel geschnitten wurden und somit eine intakte Gewebestruktur aufwiesen oder aus Kartoffelerzeugnissen rekombiniert wurden. Die Lebensmittel wurden über maximal neun Tage mit einer täglichen Acrylamid-Dosis von 100 µg/kg KG für Pommes Frites und Lebkuchen bzw. 50 µg/kg KG für Brotkruste an männliche Sprague-Dawley Ratten verfüttert. Die Tötung der Tiere erfolgte 24 Stunden nach der letzten Acrylamid-Dosierung. Mit Hilfe des in der Arbeitsgruppe etablierten *in vivo* Comet Assays wurden Blut- und Leberzellen der Tiere auf DNA-Schäden untersucht. Als weiterer genotoxischer Parameter wurde *N7*-GA-Guanin, massenspektrometrisch in der aus Leber, Niere, Lunge und Hoden isolierten DNA der Ratten bestimmt. Die Entwicklung der dazu benötigten HPLC-MS/MS-

Methode erfolgte ebenfalls im Rahmen der vorliegenden Arbeit. Desweiteren sollte eine mögliche Beeinflussung fremdstoffmetabolisierender Enzyme durch Acrylamid oder Bestandteile der Lebensmittelmatrices untersucht werden. Dies geschah anhand der Phase I- und Phase II-Enzyme Cytochrom P450 2E1 (CYP 2E1) und Glutathion-S-Transferase $\alpha 2$ (GST $\alpha 2$) nach einem, fünf und neun Tagen Behandlung mittels Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR).

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die zeit- und dosisabhängige Bildung von *N7*-GA-Guanin-Addukten in der DNA aus Leber, Niere und Lunge weiblicher Sprague-Dawley Ratten untersucht. Diese Studien sollten als Vorversuche für ein weiteres Projekt durchgeführt werden, welches sich gezielt mit der Entstehung von DNA-Addukten im Bereich realer Exposition beschäftigt. Dazu wurden die Ratten zunächst einmalig mit 1 mg oder 10 mg Acrylamid/kg KG per Schlundsonde behandelt und die Gewebeproben nach 8, 16 oder 24 Stunden entnommen und untersucht. Nach Ermittlung des Zeitpunktes der maximalen *N7*-GA-Guanin-Adduktbildung wurden weitere Ratten einmalig mit 0,1 mg, 0,5 mg, 3 mg oder 6 mg Acrylamid/kg KG behandelt. Neben der *N7*-GA-Guanin-Adduktbildung wurde die Bildung der Mercaptursäuren von Acrylamid und Glycidamid mittels HPLC-MS/MS untersucht. Die Mercaptursäuren entstehen als Abbauprodukte der Glutathionkonjugate von Acrylamid und Glycidamid und werden über den Urin ausgeschieden. Sie dienen als Expositionsbiomarker und geben Auskunft über die Aufnahme, Giftung und Entgiftung, sowie Ausscheidung von Acrylamid innerhalb von 24 Stunden.

Zusammenfassend liegen die wesentlichen Ziele der vorliegenden Arbeit in der Untersuchung

- der Auswirkung der Lebensmittelmatrix auf die Genotoxizität von Acrylamid
- der zeit- und dosisabhängigen Bildung von *N7*-GA-Guanin-Addukten in verschiedenen Organen
- des Einflusses der Lebensmittelmatrix bzw. von Acrylamid auf die fremdstoffmetabolisierenden Enzyme CYP 2E1 und GST $\alpha 2$
- der zeit- und dosisabhängigen Bildung und Entgiftung von Glycidamid in Form seiner Mercaptursäure

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Einfluss der Lebensmittelmatrix auf die biologische Aktivität von Acrylamid in der Ratte

Im Rahmen des FEI-geförderten Projektes „Umsetzung neuer Verfahrensabläufe in Produktionsanlagen für Kartoffel- und Getreideerzeugnisse mit reduzierten Gehalten an Acrylamid und dessen Folgeprodukten“ (AiF 209 ZBG) wurde an männlichen Sprague-Dawley Ratten untersucht, ob die Lebensmittelmatrix Einflüsse auf die Bioverfügbarkeit und die biologische Aktivität von Acrylamid hat. Untersucht wurden Lebkuchen und Brotkruste als fettarme und trockene Lebensmittel auf Getreidebasis und Pommes Frites als wasser- und fettreiches Lebensmittel auf Kartoffelbasis. Neben Pommes Frites, die direkt aus der Kartoffel geschnitten wurden, kamen Pommes Frites, die aus Kartoffelerzeugnissen rekombiniert wurden, zum Einsatz. Die Lebensmittel wurden von unseren Projektpartnern mit Acrylamid-Gehalten, wie sie unter ungünstigen Herstellungs- und Zubereitungsbedingungen zu erwarten sind, erzeugt. In beiden Arten von Pommes Frites wurden Acrylamid-Gehalte von 2800 µg/kg erreicht, während in der Brotkruste nur 1400 µg Acrylamid/kg generiert werden konnten. Die Bestimmung der Acrylamid-Gehalte im Lebkuchen erwies sich als schwierig, da die Kontrollmessungen, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten von mehreren Laboratorien durchgeführt wurden zu stark schwankenden Ergebnissen führten. Es wurde ein durchschnittlicher Acrylamid-Gehalt von 4150 ± 800 µg/kg ermittelt.

In der Tierstudie erhielten jeweils drei Ratten über maximal neun Tage eine Acrylamid-Dosis von 100 µg/kg KG/d in geschnittenen (PFG) bzw. rekonstituierten (PFR) Pommes Frites oder Lebkuchen (LK). Die Brotkruste-Gruppe (BK) wurde aufgrund der niedrigen Acrylamid-Gehalte mit 50 µg Acrylamid/kg KG/d dosiert. Als Referenzen wurden pro Dosisgruppe eine Negativkontrollgruppe (TW) und eine mit der entsprechenden Acrylamid-Dosis im Trinkwasser per Schlundsonde behandelte Gruppe (AA-TW) mitgeführt (Abbildung 4.1).

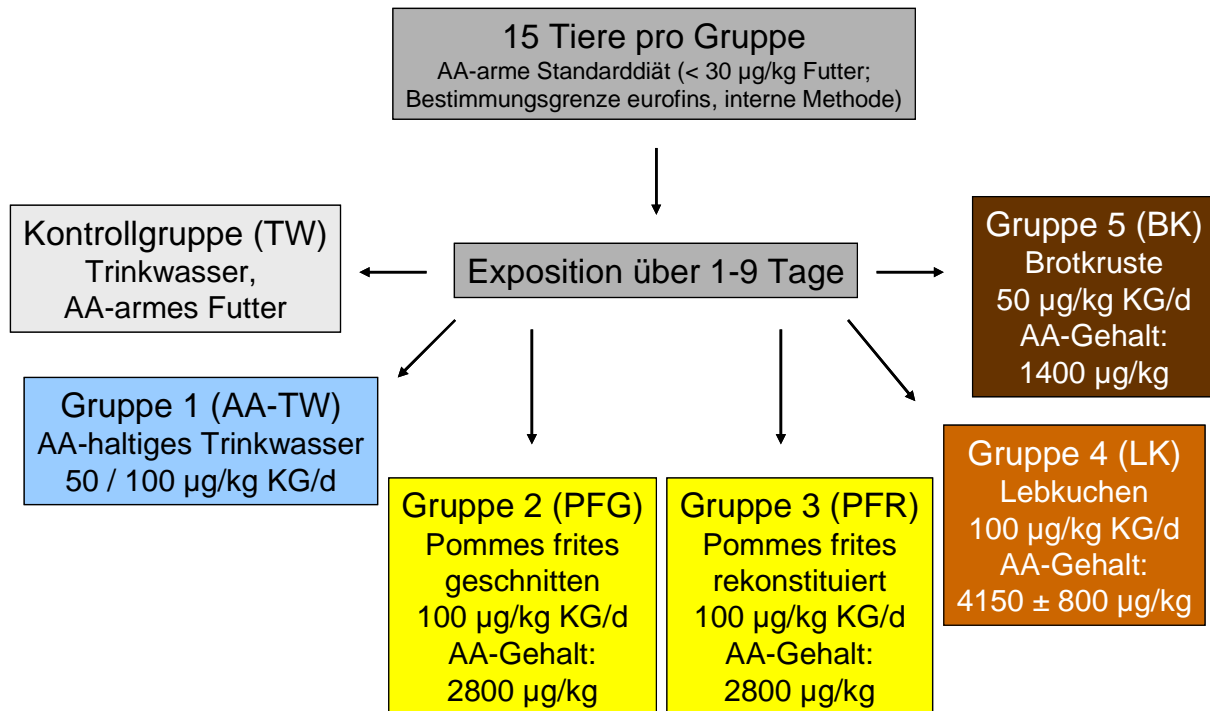


Abbildung 4.1: Behandlungsgruppen der Tierstudie

In einem zusätzlichen Versuch wurden jeweils drei Tiere mit einer Einzeldosis von 450 µg bzw. 900 µg Acrylamid/kg KG in Trinkwasser per Schlundsonde behandelt, um die einzelne kumulative Dosis mit der Aufnahme von 50 µg bzw. 100 µg Acrylamid/kg KG/d über neun Tage vergleichen zu können. Außerdem wurde zwei Tieren einmalig 10 mg Acrylamid/kg KG in Trinkwasser mittels Schlundsonde verabreicht.

In der vorliegenden Arbeit wurde das genotoxische Potential von Acrylamid nach Aufnahme über Trinkwasser und Lebensmittel mittels Comet Assay und *N7*-GA-Guanin-Adduktmessung untersucht. Des Weiteren wurde der Einfluss einer täglichen Aufnahme von 100 µg Acrylamid/kg KG auf die metabolisierenden Enzyme CYP 2E1 und GSTα2 mittels RT-PCR untersucht.

4.1.1 Vorversuche

In einem Vorversuch wurde untersucht, ob die Narkose durch Isofluran, die zum Schlundsondieren der Tiere notwendig war und wegen der Gleichbehandlung an allen Tieren vorgenommen wurde, einen Einfluss auf den Metabolismus von Acrylamid hat. Acrylamid wird ebenso wie Isofluran durch CYP 2E1 metabolisiert [Sumner et al., 1999; Kharasch et al., 1993], so dass eine gegenseitige Beeinflussung des Metabolismus nicht auszuschließen ist. Plate et al. untersuchten den Einfluss von Isofluran auf die CYP 2E1-Aktivität in der Leber

von Wistarratten. Bei einer Isofluran-Behandlungsdauer bis zu 75 Sekunden wurde keine signifikante Änderung der CYP 2E1-Aktivität festgestellt [Plate et al., 2005].

Um den Einfluss von Isofluran auf den Acrylamid-Stoffwechsel zu untersuchen wurden jeweils zwei männliche Sprague-Dawley Ratten an zwei aufeinander folgenden Tagen mit oder ohne Narkose mit 100 µg Acrylamid/kg KG/d schlundsondiert. 24 Stunden nach der letzten Verabreichung wurde den Tieren Blut entnommen. Außerdem wurde der Sammel-Urin der letzten 24 Stunden nach der zweiten Acrylamid-Applikation auf Acrylamid- und Glycidamid-Mercaptursäuren untersucht.

Mit dem Comet Assay konnten im Blut der narkotisierten und nicht narkotisierten Tiere keine Unterschiede in der DNA-Schädigung festgestellt werden. Die Tail Intensities lagen im Blut der narkotisierten Tiere bei $5,6 \pm 0,7 \%$ und im Blut der nicht-narkotisierten Tiere bei $5,1 \pm 0,2 \%$.

Um den Einfluss der Narkose auf die Negativkontrolle zu untersuchen wurden drei Tiere mit Isofluran narkotisiert und drei weitere nicht betäubt. Nach 24 Stunden wurde Blut entnommen das mittels Comet Assay auf DNA-Schäden untersucht wurde. Auch in diesem Experiment wurden zwischen den beiden Negativkontrollgruppen keine signifikanten Unterschiede festgestellt, so dass auch in den nachfolgend durchgeführten Versuchen mit keinem signifikanten Einfluss durch die Narkose zu rechnen ist.

Die Ergebnisse der Comet Assay-Untersuchungen spiegeln sich auch in den Ergebnissen zur Untersuchung der Mercaptursäuren und Hämoglobinaddukte von Acrylamid und Glycidamid wider. Es konnte gezeigt werden, dass weder die Mercaptursäuren, noch die Hämoglobinaddukte von Acrylamid und Glycidamid durch Isofluran signifikant beeinflusst werden. Die Ausscheidung der Glycidamid-Mercaptursäure GAMA, dem Hauptmetaboliten von Glycidamid, lag in den narkotisierten Tiere bei $14,4 \pm 1,3 \%$ der Acrylamid-Dosis und in den nicht narkotisierten Tieren bei $15,2 \pm 0,4 \%$ der Acrylamid-Dosis [Berger, 2010].

Die Ergebnisse deuten insgesamt darauf hin, dass eine kurzzeitige Isofluran-Narkose (~ 60 Sekunden) die Metabolisierung von Acrylamid zu Glycidamid sowie die Entgiftung von Acrylamid und Glycidamid durch Bindung an Glutathion nicht beeinflusst.

Alle Tiere der nachfolgend beschriebenen Studien wurden mit Isofluran narkotisiert.

4.1.2 Untersuchung der DNA-schädigenden Wirkung von Acrylamid mittels Comet Assay

Mit dem Comet Assay sollte in Blut- und Leberzellen von Ratten untersucht werden, ob Acrylamid-Konzentrationen von bis zu 10 mg/kg KG zu messbaren DNA-Schäden führen. *Ex vivo*-Studien an humanem Vollblut zeigten bereits, dass Acrylamid bis zu einer Konzentration von 6 mM keine DNA-Strangbrüche verursacht. Das genotoxische Potential von Acrylamid kommt erst durch Metabolisierung zum Epoxid Glycidamid zustande [Baum et al., 2005]. Glycidamid bindet an DNA-Basen, insbesondere unter *N7-GA-Guanin-Addukt*-Bildung. Die Alkylierung der DNA-Basen führt zu einer Destabilisierung der glykosidischen Bindung, was zur Folge hat, dass durch spontane Depurinierung apurinische (AP)-Stellen entstehen [Safhill et al., 1985]. Die AP-Stellen sind alkali-labil, so dass während der alkalischen DNA-Entwindung aus den AP-Stellen Einzelstrangbrüche entstehen können [Tice et al., 2000].

FPG ist ein bifunktionelles Enzym aus der Gruppe der Basen Excisions-Reparatur (BER)-Enzyme, dessen DNA-Glykosylase-Funktion ringgeöffnete *N7-GA-Guanin-Addukte*, sogenannte Formamidopyrimidine, erkennt, und unter Erhalt einer AP-Stelle entfernt (siehe Kapitel 2.2). Diese und andere, durch spontane Depurinierung entstandene AP-Stellen werden durch die AP-Lyase-Funktion des Enzyms zu Einzelstrangbrüchen umgewandelt [Laval, 1996].

In *ex vivo*-Untersuchungen an humanem Vollblut zeigte Glycidamid nach vierstündiger Inkubation bei 37 °C mit 300 µM ein DNA-schädigendes Potential im Comet Assay [Baum et al., 2005]. Durch eine zusätzliche Behandlung mit dem bakteriellen DNA-Reparaturenzym Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase (FPG) konnten mit dem Comet Assay signifikant mehr Strangbrüche detektiert werden (4 Stunden, 10 µM) [Thielen et al., 2006].

Auf Grund der vorliegenden *ex vivo*-Daten wurde in der durchgeführten Tierstudie auf das Standardprotokoll des Comet Assay verzichtet und nur der mit FPG modifizierte Comet Assay angewandt.

Um einem falsch-positiven Effekt vorzubeugen, muss bei der Untersuchung von DNA-Schäden auch immer eine möglicherweise auftretende Zytotoxizität untersucht werden, da diese ebenfalls zu einer Fragmentierung der DNA führt. Mit Hilfe des Trypanblau-Ausschlusstests können nekrotische Zellen, deren Membranintegrität verloren gegangen ist, von lebenden Zellen unterschieden werden. Das Verhältnis von lebenden Zellen zur Gesamtzahl wird auch als Viabilität bezeichnet. Unter allen untersuchten Bedingungen wurden in den Leberzellen Viabilitäten von 99-100 % gemessen.

Die beiden nachfolgenden Abbildungen zeigen die Ergebnisse der Untersuchung zur DNA-schädigenden Wirkung von Acrylamid in Leberzellen (Abbildung 4.2) und Leukocyten (Abbildung 4.3) nach Verabreichung von 50 µg Acrylamid/kg KG/d in Trinkwasser (AA-TW 0,05 mg/kg KG) und Brotkruste (BK), 100 µg Acrylamid/kg KG/d über geschnittene (PFG) oder rekonstituierte (PFR) Pommes Frites, Lebkuchen und Trinkwasser (AA-TW 0,1 mg/kg KG). Dargestellt ist die Veränderung der DNA-Schäden gegenüber der Negativkontrolle von jeweils drei behandelten Tieren nach 1-9 Tagen Exposition. Die Organentnahme erfolgte jeweils 24 Stunden nach der letzten Acrylamid-Verabreichung.

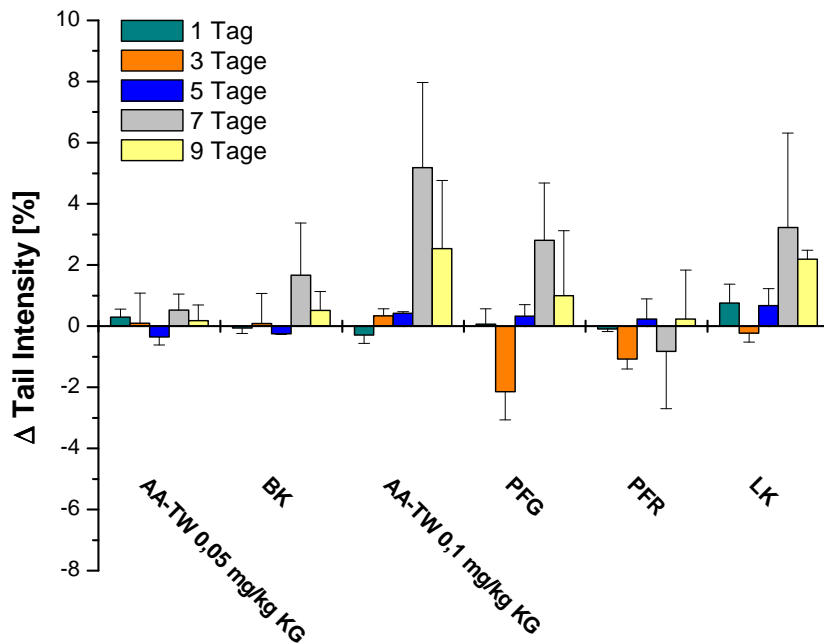


Abbildung 4.2: Veränderung der DNA-Schäden in Leberzellen von Acrylamid-behandelten Ratten gegenüber der Negativkontrolle

AA-TW: Acrylamid-Dosis in Trinkwasser, BK: Brotkruste, PFG: Pommes Frites aus Kartoffel geschnitten, PFR: Pommes Frites aus Kartoffelerzeugnis rekonstituiert, LK: Lebkuchen

Mittelwert über 3 Tiere ± Standardabweichung

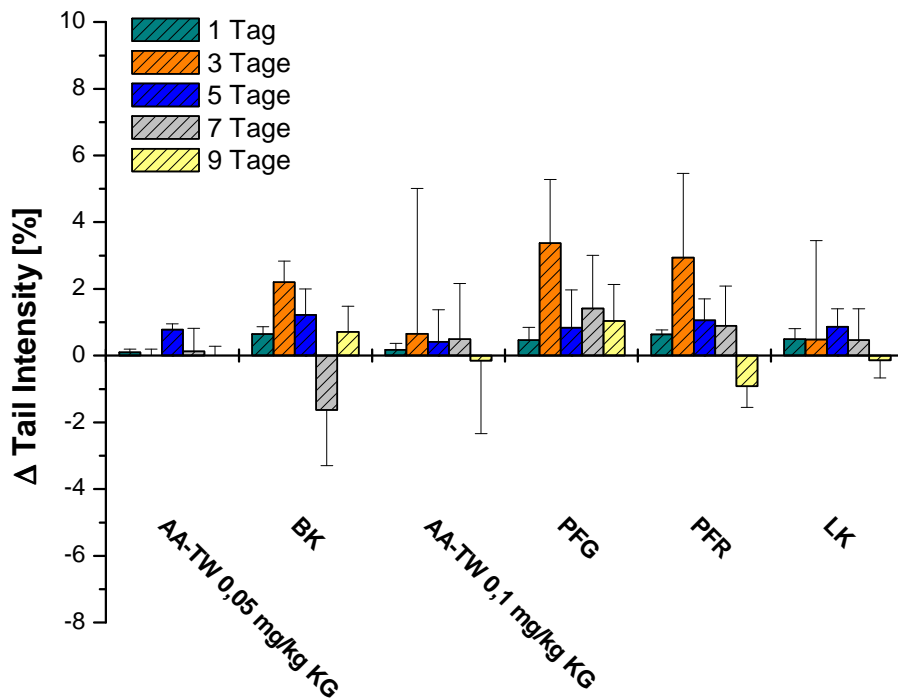


Abbildung 4.3: Veränderung der DNA-Schäden im Blut von Acrylamid-behandelten Ratten gegenüber der Negativkontrolle

AA-TW: Acrylamid-Dosis in Trinkwasser, BK: Brotkruste, PFG: Pommes Frites aus Kartoffel geschnitten, PFR: Pommes Frites aus Kartoffelerzeugnis rekonstituiert, LK: Lebkuchen
Mittelwert über 3 Tiere \pm Standardabweichung

Es wurde in beiden untersuchten Zellarten keine signifikante Induktion von DNA-Schäden durch Acrylamid im Vergleich zur Negativkontrolle festgestellt. Besonders nach 3, 7 und 9 Tagen Fütterung traten große individuelle Schwankungen ohne erkennbare Tendenz zwischen den gemessenen Tail Intensities der Einzeltiere einer Behandlungsgruppe auf. Die Tail Intensities in den Leberzellen und Leukocyten veränderten sich während des Versuchszeitraums im Bereich von maximal $\pm 5\%$ um den Kontrollwert.

Abbildung 4.4 zeigt die Ergebnisse zur einmaligen Behandlung der Tiere mit 0,45 mg, 0,9 mg und 10 mg Acrylamid/kg KG in Trinkwasser mittels Schlundsonde. In den mit 0,45 mg und 0,9 mg Acrylamid/kg KG dosierten Gruppen wurden drei Tiere, mit 10 mg Acrylamid/kg KG zwei Tiere behandelt.

Wie auch in den mit 50 μ g und 100 μ g Acrylamid/kg KG behandelten Tieren lagen die DNA-Schäden der Tiere, die einmalig mit 450 μ g und 900 μ g Acrylamid/kg KG behandelt wurden, im Bereich der Negativkontrolle.

Eine deutliche Erhöhung der DNA-Strangbrüche wurde lediglich nach einmaliger Verabreichung von 10 mg Acrylamid/kg KG festgestellt. Diese Dosierung verursachte in den Leukocyten eine Erhöhung der Tail Intensity (TI) um $41,0 \pm 1,5 \%$ und in den Leberzellen um $9,2 \pm 1,5 \%$.

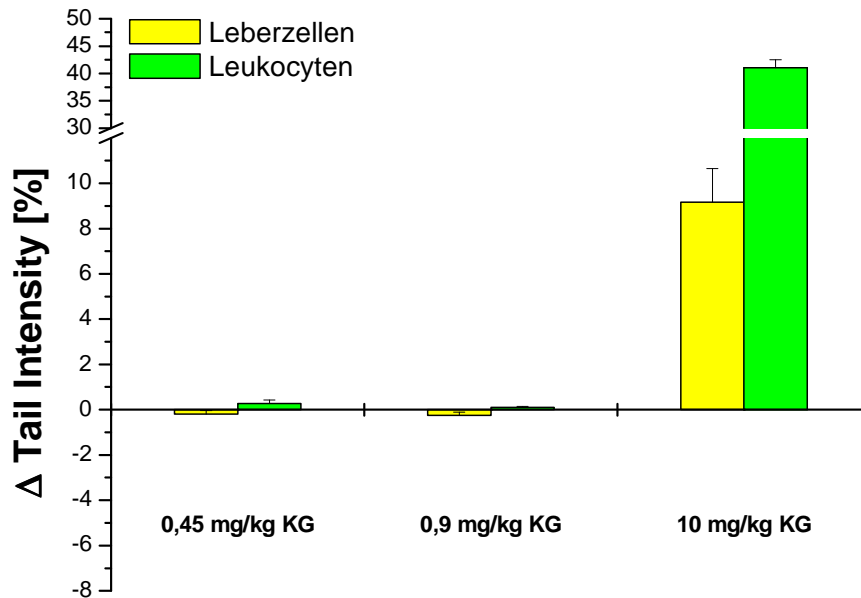


Abbildung 4.4: Veränderung der DNA-Schäden in Blut- und Leberzellen von Acrylamid-behandelten Ratten gegenüber der Negativkontrolle

Mittelwert über 2-3 Tiere \pm Standardabweichung (2 Tiere in der 10 mg Acrylamid/kg KG-Gruppe)

Mit dem Comet Assay wurde im Dosisbereich von 50 μ g bis 900 μ g Acrylamid/kg KG keine signifikante DNA-Schädigung in den Blut- und Leberzellen der behandelten Ratten festgestellt werden. Auch nach Verabreichung von 50 μ g oder 100 μ g Acrylamid/kg KG über maximal neun Tage wurden keine signifikanten DNA-Schäden beobachtet. Lediglich die Behandlung von zwei Ratten mit 10 mg Acrylamid/kg KG führte zu einem Anstieg der DNA-Schädigung.

In einer Studie von Manière et al. wurden 24 Stunden nach Verabreichung von 54 mg Acrylamid/kg KG an männliche Sprague-Dawley Ratten signifikante DNA-Schäden in Leukocyten, aber nicht in Leberzellen festgestellt. Allerdings führte diese Arbeitsgruppe den Comet Assay ohne zusätzliche FPG-Inkubation durch, durch die wahrscheinlich schon in geringeren Konzentrationen DNA-Schäden detektierbar gewesen wären. In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass signifikante DNA-Schäden in V79-Zellen und humanem Vollblut ab Konzentration von 300 μ M Glycidamid ohne FPG-Behandlung [Baum

et al., 2005] und ab 10 μM Glycidamid mit FPG-Behandlung mit dem Comet Assay detektiert wurden [Thielen et al., 2006].

Die im Rahmen der FEI-Studie untersuchten Blutserumgehalte an Acrylamid und Glycidamid nach Verabreichung von 100 μg Acrylamid/kg KG über Trinkwasser oder geschnittene Pommes Frites zeigten, dass Glycidamid erstmals vier Stunden nach Acrylamid-Aufnahme in einer Konzentration von weniger als 0,06 μM nachzuweisen war.

Im 24-Stunden-Sammelurin der behandelten Ratten wurden ca. 10-25 % der Acrylamid-Dosis als GAMA wiedergefunden [Berger et al., 2010]. Insgesamt lässt dies darauf schließen, dass die Entgiftung von Glycidamid so effizient verläuft, dass keine mit dem Comet Assay messbaren DNA-Schäden entstehen.

4.1.3 Genexpressionsuntersuchungen mittels Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Nach Exposition der Studientiere mit Acrylamid in Pommes Frites und Brotkruste wurde eine Veränderung des Mercaptursäureverhältnisses GAMA/AAMA zu einer, im Vergleich zur Acrylamid-Aufnahme über Trinkwasser (Schlundsonde), stärkeren Bildung von GAMA beobachtet [Berger et al., 2010]. Dieses Ergebnis könnte durch eine Veränderung im Cytochrom P450 (CYP) 2E1-Metabolismus zustande kommen, da CYP 2E1 das Hauptenzym für die Giftung von Acrylamid zu Glycidamid ist. Desweiteren stellte sich die Frage, ob sich die Expression von fremdstoffmetabolisierenden Enzymen auf RNA-Ebene nach wiederholter Acrylamid-Behandlung gegenüber einmaliger Gabe von Acrylamid verändert. Dazu wurde RNA aus den Lebern der Ratten isoliert, die mit 100 µg Acrylamid/kg KG/d für einen, fünf oder neun Tage behandelt wurden. Neben dem Gen für CYP 2E1 wurde auch das Gen für Glutathion-S-Transferase (GST) α 2 untersucht, welches als Entgiftungsenzym für die Konjugation von Glutathion (GSH) an Fremdstoffe verantwortlich ist. In Lebern männlicher Sprague-Dawley Ratten macht GST α die Hauptisoform der GSTs aus [Treptow-Van Lishaut et al., 1999].

Die Untersuchung erfolgte mit Hilfe der semiquantitativen Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR). Als house-keeping Gen wurde Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) mitgeführt. Zur Auswertung der Genexpression wurden die Ergebnisse der Messungen von CYP 2E1 und GST α 2 zunächst mit der entsprechenden GAPDH-Expression korreliert. Anschließend erfolgte der Bezug auf die Negativkontrolle.

Abbildung 4.5 zeigt beispielhaft die Ergebnisse der Gelelektrophorese nach einmaliger Verabreichung von 100 µg Acrylamid/kg KG. Aufgetragen wurden pro Bande 200 ng RNA.

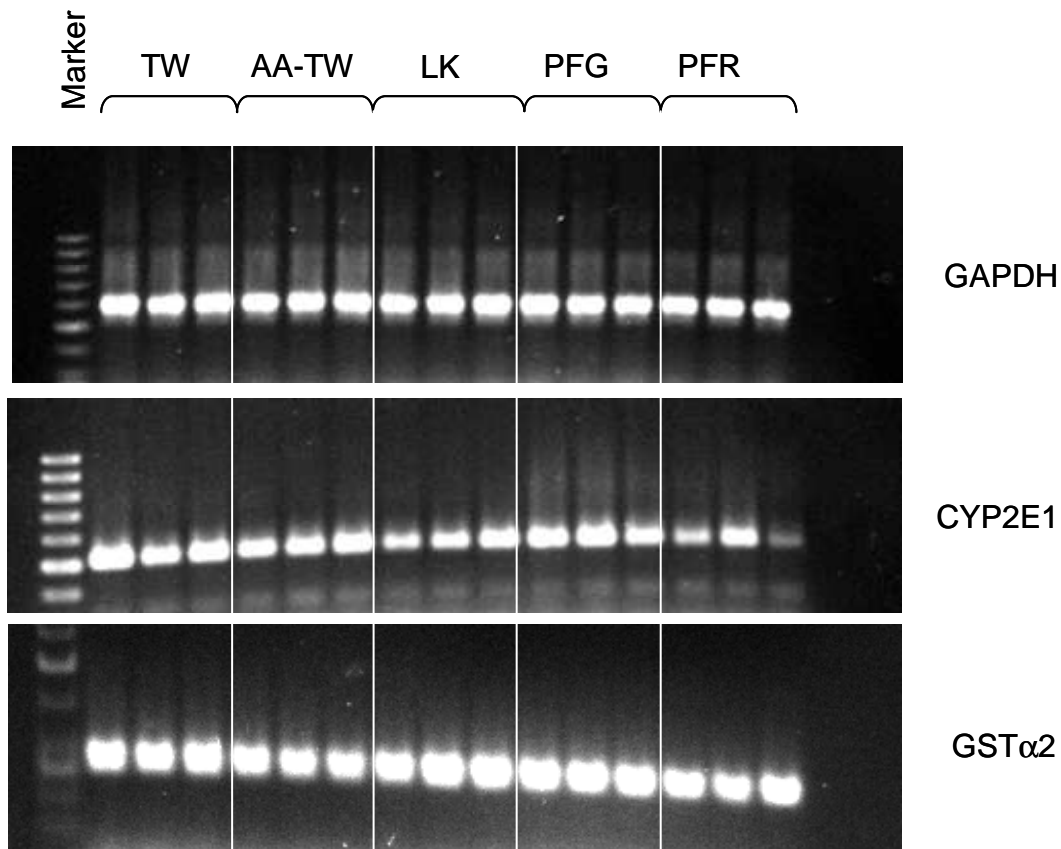


Abbildung 4.5: repräsentatives RT-PCR-Gel von GAPDH (house-keeping Gen), CYP 2E1 und GSTα2 nach einmaliger Gabe von 100 µg Acrylamid/kg KG in Trinkwasser (Gavage) oder Acrylamid-haltigen Lebensmitteln

TW: Negativkontrollgruppe, AA-TW: Acrylamid-Dosis in Trinkwasser, LK: Lebkuchen, PFG: Pommes Frites aus Kartoffel geschnitten, PFR: Pommes Frites aus Kartoffelerzeugnis rekonstituiert; 3 Tiere pro Gruppe

In Abbildung 4.6 ist die Veränderung der Genexpression von CYP 2E1 von jeweils drei behandelten Tieren gegenüber der Negativkontrolle nach einem, fünf und neun Tagen dargestellt.

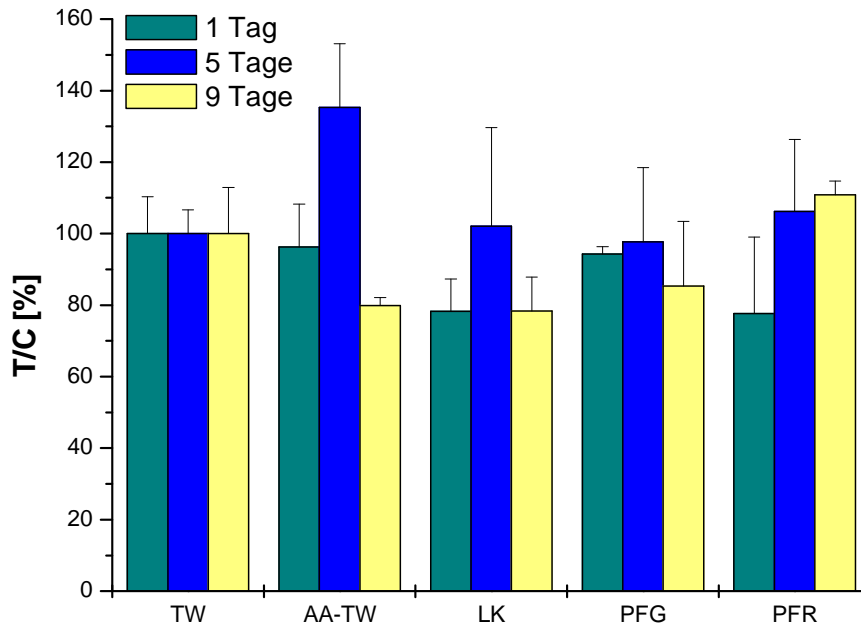


Abbildung 4.6: Veränderung der Genexpression von CYP 2E1 in Rattenlebern nach einem, fünf und neun Tagen Behandlung mit 100 µg Acrylamid/kg KG/d über Trinkwasser (AA-TW), Lebkuchen (LK), geschnittene und rekonstituierte Pommes Frites (PFG; PFR) gegenüber der Negativkontrolle (TW) n = 3; Mittelwert über 3 Tiere ± Standardabweichung

Nach einem Tag Behandlung ist eine leichte Abnahme der CYP 2E1-Expression in den mit Lebkuchen und rekonstituierten Pommes Frites gefütterten Tieren zu beobachten, während die Werte der mit Acrylamid im Trinkwasser oder geschnittenen Pommes Frites behandelten Tiere nahezu auf Kontrolllevel bleiben. Nach fünf Tagen deutet sich in der mit Acrylamid im Trinkwasser behandelten Gruppe eine Zunahme der Expression von CYP 2E1 an. In den anderen Behandlungsgruppen wurde kein Effekt auf die CYP 2E1-Expression festgestellt. Nach neun Tagen ist wiederum ein Trend zu einer erniedrigten CYP 2E1-Expression in den Gruppen zu beobachten, denen Acrylamid im Trinkwasser, Lebkuchen und geschnittenen Pommes Frites verabreicht wurde. In der mit rekonstituierten Pommes Frites gefütterten Gruppe ist hingegen eine leichte Erhöhung der CYP 2E1-Expression festzustellen.

Mei et al. untersuchten die Veränderung der CYP 2E1-Genexpression an männlichen Mäusen, denen über drei Wochen 500 mg Acrylamid/l im Trinkwasser verabreicht wurde. 24 Stunden nach der letzten Behandlung wurde die Veränderung der CYP 2E1-

Genexpression in der Leber mittels Real-time PCR und Microarray untersucht. Dabei wurde mit der Real-time PCR eine 3,5-fache Erhöhung der CYP 2E1-Genexpression beobachtet, während der Microarray keinen Unterschied zur Negativkontrolle zeigte [Mei et al., 2008]. Vergleichbare Untersuchungen wurden in der Ratte noch nicht durchgeführt. Allerdings ist die Umsetzung von Acrylamid zu Glycidamid, berechnet anhand von Acrylamid- und Glycidamid-Biomarkern, in der Maus etwa doppelt so hoch wie in der Ratte und viermal so hoch wie im Menschen [Fuhr et al., 2006]. Es können also keine Rückschlüsse von der CYP 2E1-Genexpression in der Maus auf die in der Ratte gezogen werden.

Abbildung 4.7 zeigt die Veränderung der Genexpression von GST α 2 der Acrylamid-behandelten Tiere gegenüber der Negativkontrolle nach einem, fünf und neun Tagen.

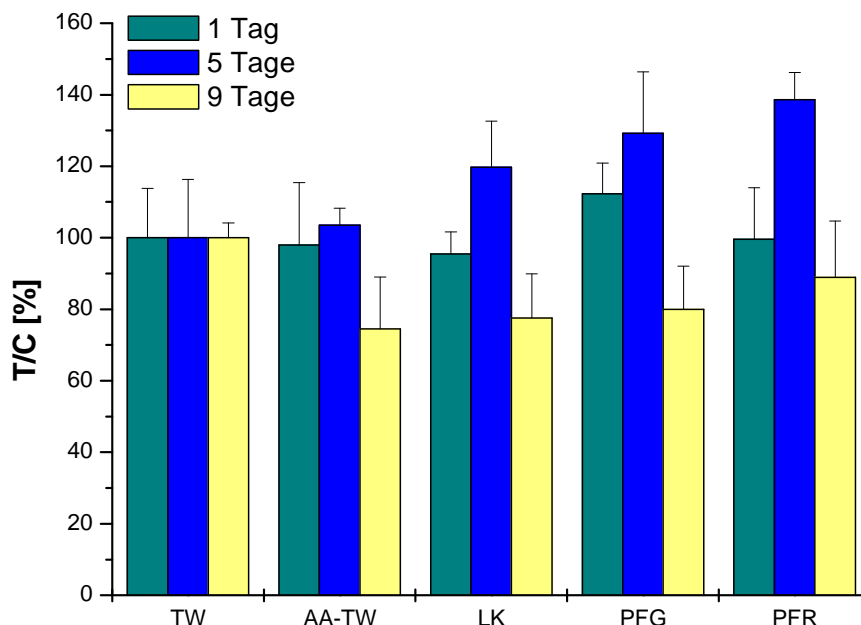


Abbildung 4.7: Veränderung der Genexpression von GST α 2 in Rattenlebern nach einem, fünf und neun Tagen Behandlung mit 100 µg Acrylamid/kg KG/d über Trinkwasser (AA-TW), Lebkuchen (LK), geschnittene und rekonstituierte Pommes Frites (PFG; PFR) gegenüber der Negativkontrolle (TW) n = 3; Mittelwert über 3 Tiere \pm Standardabweichung

Nach dem ersten Tag ist lediglich in der mit geschnittenen Pommes Frites behandelten Gruppe eine leichte Erhöhung der GST α 2-Expression zu beobachten, während die Werte in den anderen Gruppen auf Kontrollniveau verbleiben. Nach fünftägiger Acrylamid-Behandlung ist ein Anstieg der GST α 2-Expression in allen mit Acrylamid-haltigen Lebensmitteln gefütterten Gruppen festzustellen. Nur die GST α 2-Expression der Tiere, die mit Acrylamid im

Trinkwasser behandelt wurden verändert sich nicht gegenüber der Kontrolle. Nach neun Tagen ist in allen Behandlungsgruppen eine leichte Abnahme der GST α 2-Expression zu beobachten.

Abbildung 4.8 zeigt das Ergebnis der Acrylamid- und Glycidamid-Mercaptursäureausscheidung AAMA und GAMA im 24-Stunden-Sammelurin der mit 100 μ g Arylamid/kg KG/d über Trinkwasser (Schlundsonde) oder Pommes Frites behandelten Ratten [Berger et al., 2010].

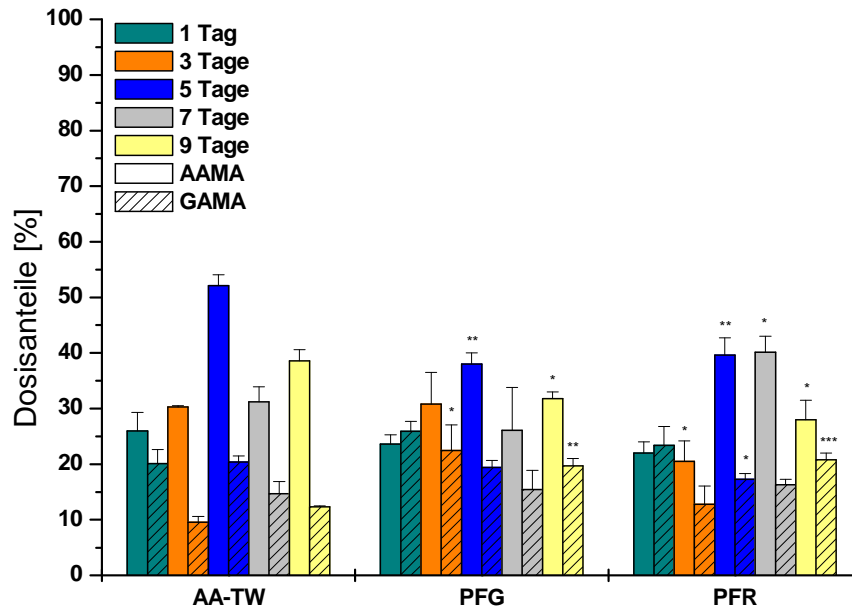


Abbildung 4.8: AAMA- und GAMA-Ausscheidung in % der verabreichten Acrylamiddosis nach 1-, 3-, 5-, 7-, und 9-tägiger Exposition mit 100 μ g Acrylamid/kg KG über Trinkwasser (AA-TW), geschnittene und rekonstituierte Pommes Frites (PFG; PFR) [Berger, 2010]

AAMA: Acrylamid-Mercaptursäure; GAMA: Glycidamid-Mercaptursäure

Mittelwert \pm SD, 3 Tiere pro Gruppe; *: signifikant unterschiedlich zur AA-Trinkwassergruppe (* p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001)

Die Abbildung zeigt, dass die GAMA-Ausscheidung in den Lebensmittelgruppen nach einem, drei und neun Tagen erhöht war gegenüber der Gruppe, die mit Acrylamid im Trinkwasser dosiert wurden. Nach fünf und sieben Tagen Behandlung wurden in allen Gruppen ähnliche Dosisanteile an GAMA ausgeschieden. Die Ausscheidung von AAMA lag nach Tag 1 in allen Gruppen auf einem vergleichbaren Niveau. Nach fünf und neun Tagen war die AAMA-Ausscheidung in beiden Pommes Frites Gruppen signifikant niedriger als in der mit Acrylamid im Trinkwasser behandelten Gruppe.

Die Untersuchung der Genexpression von CYP 2E1 ergeben nach Tag 1 und 9 vergleichbare Werte in den mit Acrylamid im Trinkwasser oder in geschnittenen Pommes Frites behandelten Ratten. Im Gegensatz dazu war die Expression von CYP 2E1 in den mit rekonstituierten Pommes Frites gefütterten Ratten nach einem Tag leicht erniedrigt und nach neun Tagen leicht erhöht. Nach fünf Tagen war die CYP 2E1-Expression in der Gruppe, denen Acrylamid im Trinkwasser gegeben wurde leicht erhöht gegenüber den Lebensmittelgruppen.

Die GST α 2-Expression lag nach Tag 1 und Tag 9 in allen Gruppen auf einem vergleichbaren Niveau. Nach fünf Tagen ergab die Untersuchung der GST α 2-Expression leicht erhöhte Werte in den mit Acrylamid in Lebensmitteln behandelten Tieren gegenüber der Gruppe, die Acrylamid im Trinkwasser erhielt.

Insgesamt sind während des Versuchszeitraums von maximal neun Tagen lediglich Tendenzen zu einer Induktion oder Hemmung von CYP 2E1 und GST α 2 durch Acrylamid oder Lebensmittelinhaltsstoffe zu erkennen, die sich nicht mit den von Berger [2010] gemessenen Mercaptursäuren korrelieren lassen. Die erhöhte Ausscheidung von GAMA in den Lebensmittelgruppen ist also vermutlich nicht hauptsächlich auf eine Beeinflussung von fremdstoffmetabolisierenden Enzymen zurückzuführen. Wahrscheinlich wird Acrylamid im Darm langsamer aus der Lebensmittelmatrix aufgenommen und aus diesem Grund auch effektiver zu Glycidamid metabolisiert.

4.1.4 Untersuchung von *N*7-Guanin-Addukten des Glycidamids mittels HPLC-MS/MS

Da Glycidamid in der Literatur als DNA-reaktiver Metabolit von Acrylamid für die Schädigung der DNA verantwortlich gemacht wird, wurde zusätzlich zum Comet Assay eine sensitivere Methode zur Erfassung der Interaktion von Glycidamid mit der DNA angewendet. Als Endpunkt wurde mittels HPLC-MS/MS die Bildung von *N*7-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)-guanin (*N*7-GA-Guanin), dem Haupt-Addukt von Glycidamid mit der DNA, untersucht. Dazu wurde DNA aus verschiedenen Organen der behandelten Tiere isoliert und die Addukte durch neutrale thermische Hydrolyse von der DNA getrennt. Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe der Isotopenverdünnungsanalyse im positiven Multiple Reaction Monitoring (MRM)-Modus. Die Synthese des dazu benötigten ¹⁵N₅-*N*7-GA-Guanin-Standards sowie die Etablierung der MRM-Methode wurden in der Arbeitsgruppe im Rahmen der Diplomarbeit von Nico Watzek durchgeführt [Watzek, 2009].

4.1.4.1 Etablierung der HPLC-Methode zur Untersuchung von *N7*-Guanin-Addukten des Glycidamids

Mit Hilfe der Spritzenpumpe wurden zunächst die Q1- und Q3-Fragmentierungsmuster des Analyten und des internen Standards bestimmt. Diese sind in den folgenden Abbildungen gezeigt. Das im Q1-Scan ermittelte Masse-zu-Ladungsverhältnis des einfach ionisierten positiv geladenen *N7*-GA-Guanin-Addukts beträgt m/z 239,2. Dem entsprechend liegt das Masse-zu-Ladungsverhältnis des $^{15}\text{N}_5$ -*N7*-GA-Guanin bei m/z 244,2.

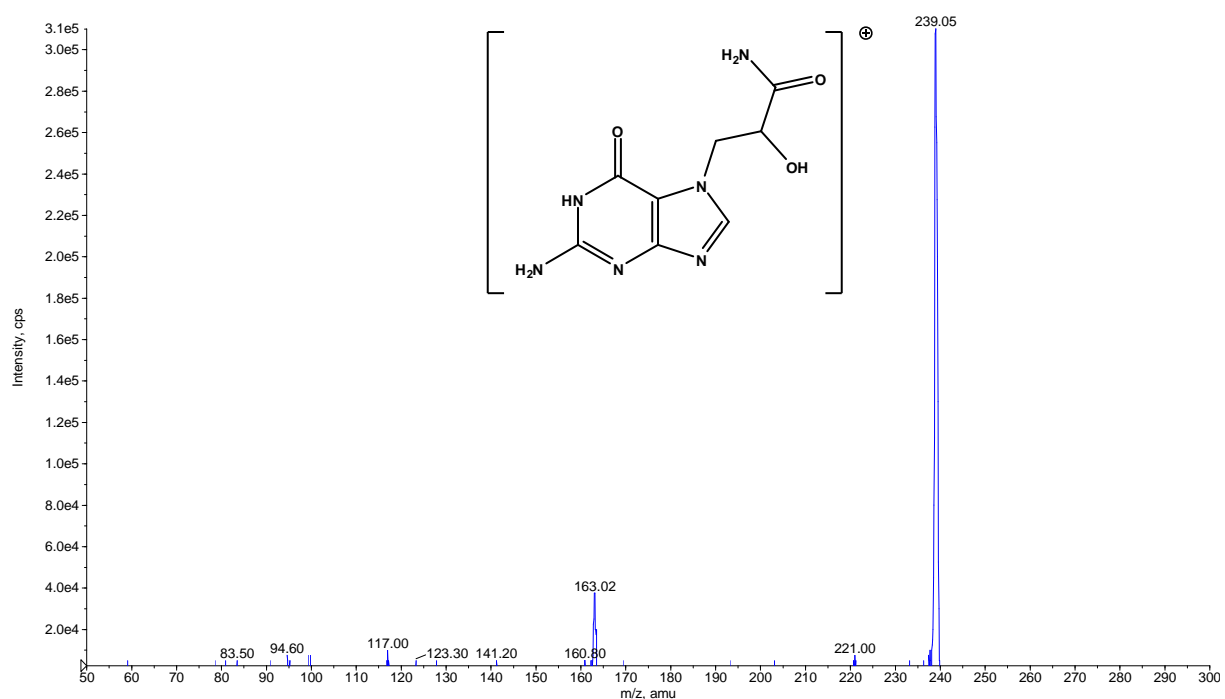


Abbildung 4.8: Massenscan von *N7*-GA-Guanin an Q1 (positiver Modus, m/z 100-300)

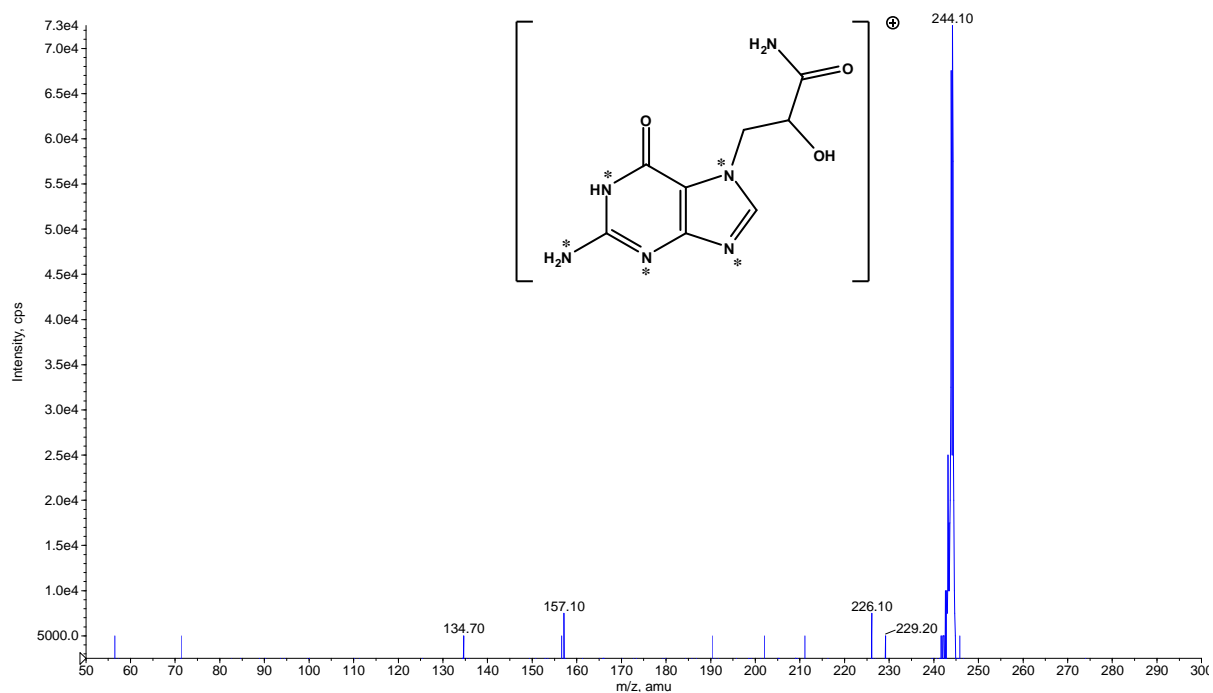


Abbildung 4.9: Massenscan von $^{15}\text{N}_5$ -*N7*-GA-Guanin an Q1 (positiver Modus, m/z 100-300)

Um ein gut detektierbares, charakteristisches Fragmentation zu bestimmen, wurden am Q3 Produktionenscans von Analyt und Standard durchgeführt und den ermittelten Masse-zu-Ladungsverhältnissen eine Struktur zugeordnet. Diese sind in den Abbildungen 4.10 und 4.11 dargestellt. Es ergaben sich identische Fragmentationen für die markierte und die unmarkierte Verbindung, die sich in den Massen lediglich um die Anzahl der enthaltenen ^{15}N -Atome unterschieden.

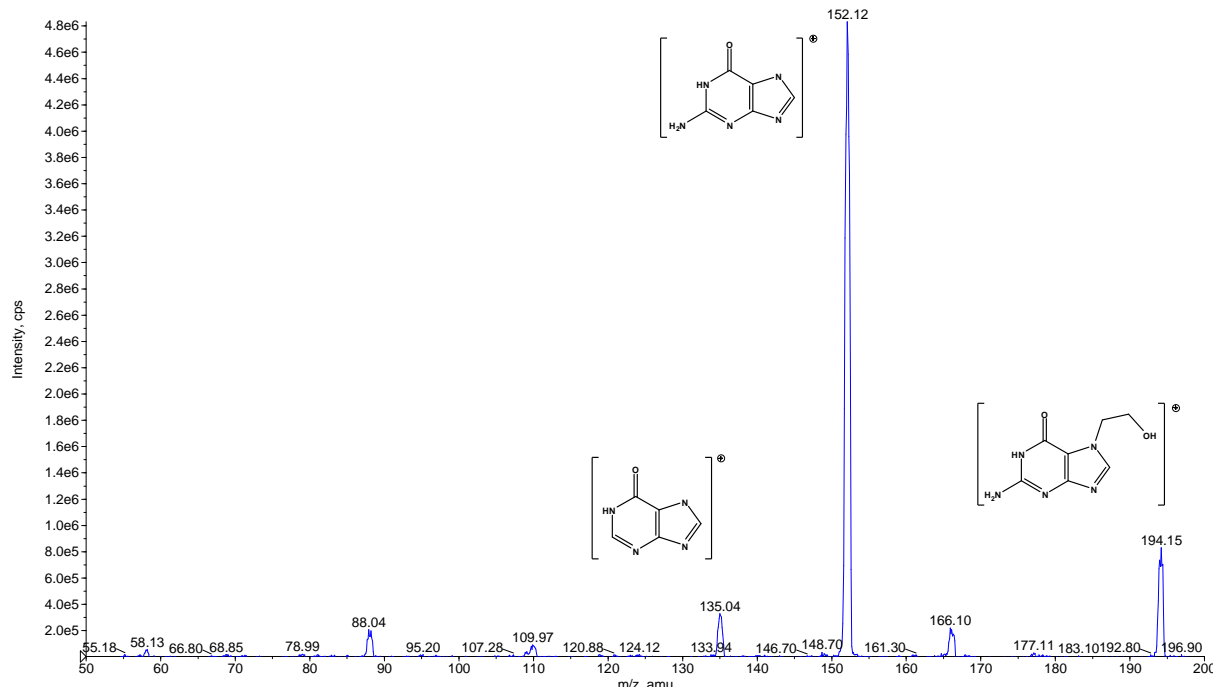


Abbildung 4.10: Produktions-Scan von *N7*-GA-Guanin (m/z 239,17) an Q3 (positiver Modus, m/z 50-200)

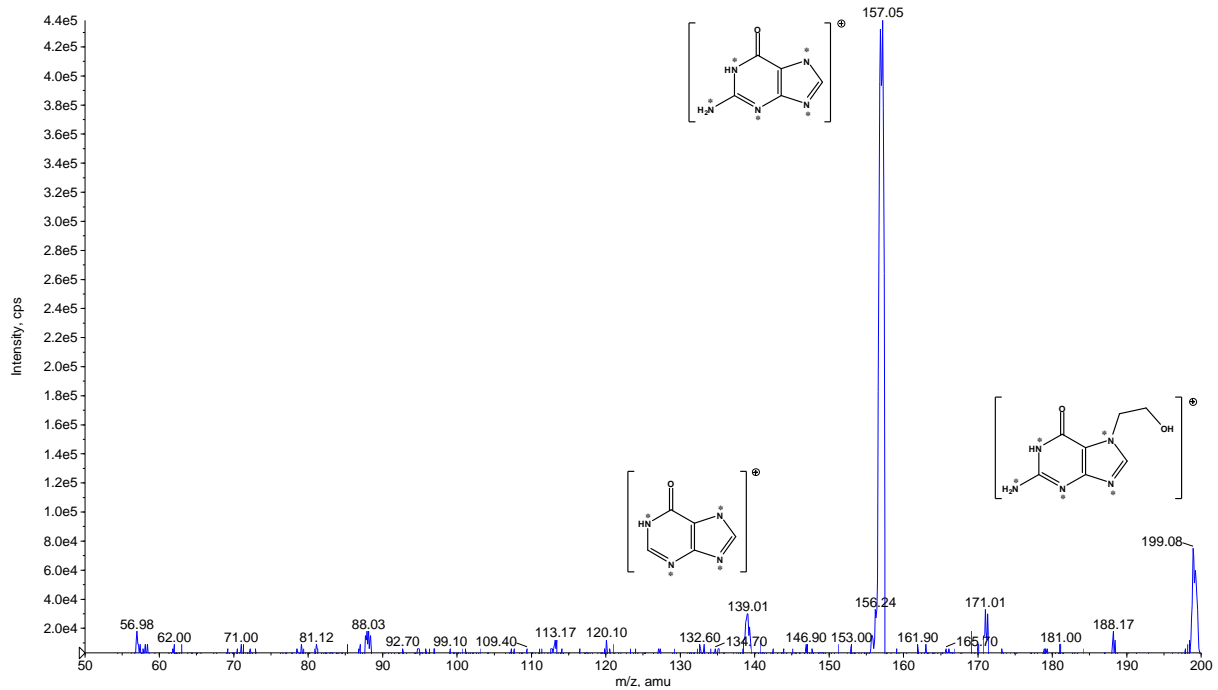


Abbildung 4.11: Produktionen-Scan von $^{15}N_5$ -*N7*-GA-Guanin (m/z 244,15) an Q3 (positiver Modus, m/z 50-200)

Für die Bestimmung der *N7*-GA-Guanin-Addukte im MRM-Modus wurden die ermittelten Massenübergänge m/z 239,2 \rightarrow 152,1 und m/z 244,2 \rightarrow 157,1 für Analyt und internen Standard verwendet.

Von der Arbeitsgruppe um Doerge wurde bereits eine HPLC-Methode zur Messung von *N7*-GA-Guanin beschrieben, unter Verwendung einer Phenomenex Luna C18-2-Säule (150 x 2 mm, 3 μ m) und isokratischer Elution (2 % Acetonitril, 0,2 ml/min). Um die Ionisierung im positiven Modus zu verbessern, wurde statt Wasser 0,1 % (v/v) Ameisensäure eingesetzt. Die Retentionszeit sollte 4,8 Minuten betragen [Gamboa da Costa et al., 2003]. Die Abbildung 4.12 zeigt das Ergebnis der Messung von 0,84 pmol *N7*-GA-Guanin Standard. Die Retentionszeit betrug bei relativ großer Peakbreite nur 3,8 Minuten.

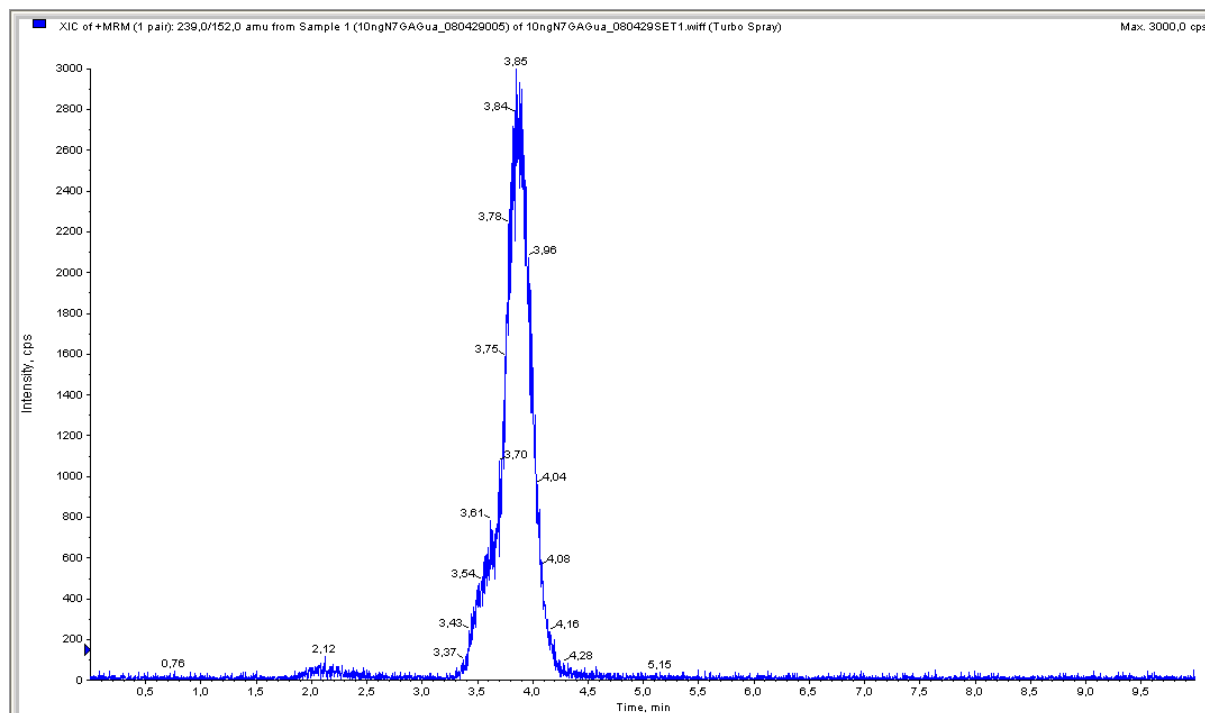


Abbildung 4.12: HPLC-MS/MS-Chromatogramm eines *N7*-GA-Guanin Standards gemessen mit einer Phenomenex Luna C18-Säule (150 x 2 mm, 3 μ m) unter isokratischen Bedingungen (2 % Acetonitril in Ameisensäure (0,1 % v/v), 0,2 ml/min)

Aufgrund der geringen Retentionszeit erschien die Anwendung eines Fließmittelgradienten nicht sinnvoll. Durch Verwendung einer Phenomenex Luna C8 (150 x 2 mm, 3 μ m) Säule, die durch ihre kürzeren Kohlenstoffketten weniger unpolar ist, als die Luna C18-Säule, sollte eine Erhöhung der Retentionszeit erreicht werden. Gemessen wurde zunächst ebenfalls isokratisch mit 2 % Acetonitril in Ameisensäure (0,1 % v/v). Abbildung 4.13 zeigt das Ergebnis der Messung von 0,42 pmol *N7*-GA-Guanin Standard. Die Peakbreite ist im Vergleich zur C18-Säule um die Hälfte verringert. Es konnte jedoch keine deutliche Veränderung der Retentionszeit erreicht werden, die immer noch bei 4,6 Minuten lag.

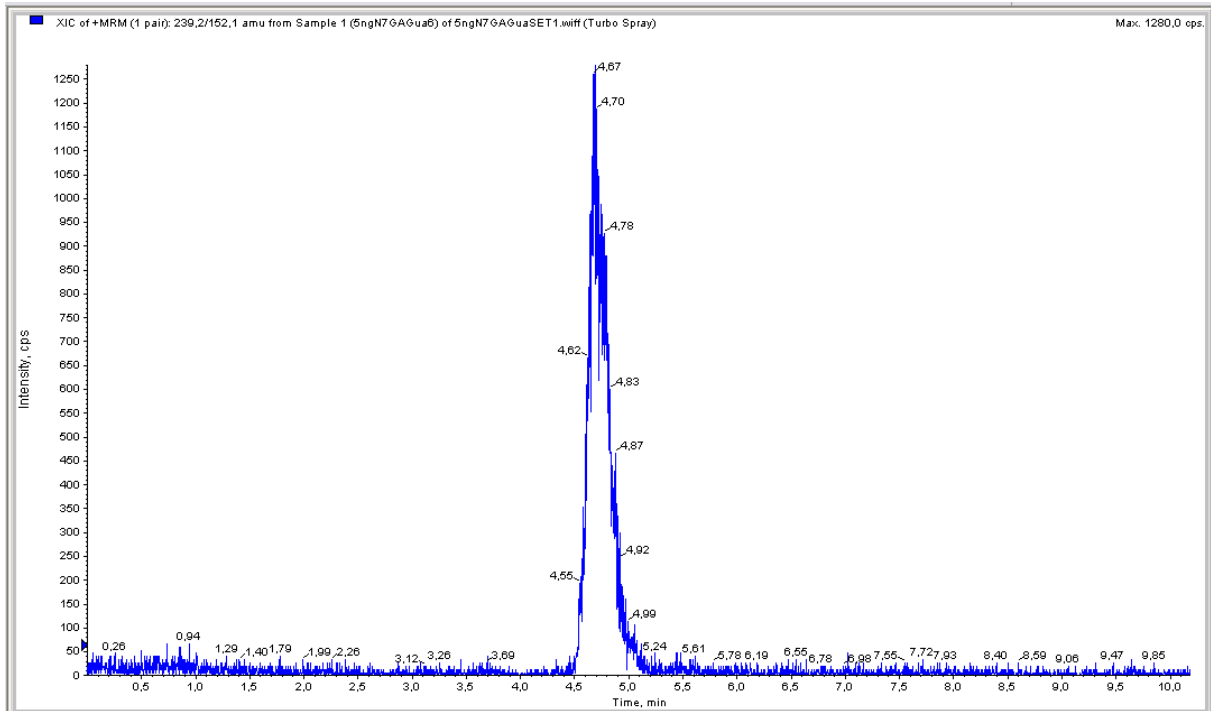


Abbildung 4.13: HPLC-MS/MS-Chromatogramm eines *N7*-GA-Guanin Standards gemessen mit einer Phenomenex Luna C8-Säule (150 x 2 mm, 3 μ m) unter isokratischen Bedingungen (2 % Acetonitril in Ameisensäure, 0,2 ml/min)

Als nächstes wurde eine Phenomenex Aqua C18 (250 x 4,6 mm, 5 μ m) ausprobiert, die länger als die beiden Luna-Säulen ist und so für eine spätere Retentionszeit und eine bessere Auftrennung sorgen kann. Abbildung 4.14 zeigt das Ergebnis der Messung von 0,84 pmol *N7*-GA-Guanin Standard unter isokratischen Bedingungen (2 % Acetonitril in Ameisensäure, 0,3 ml/min). Die Retentionszeit des Analyten lag bei 19,9 Minuten und die Peakbreite betrug ca. 1,5 Minuten.

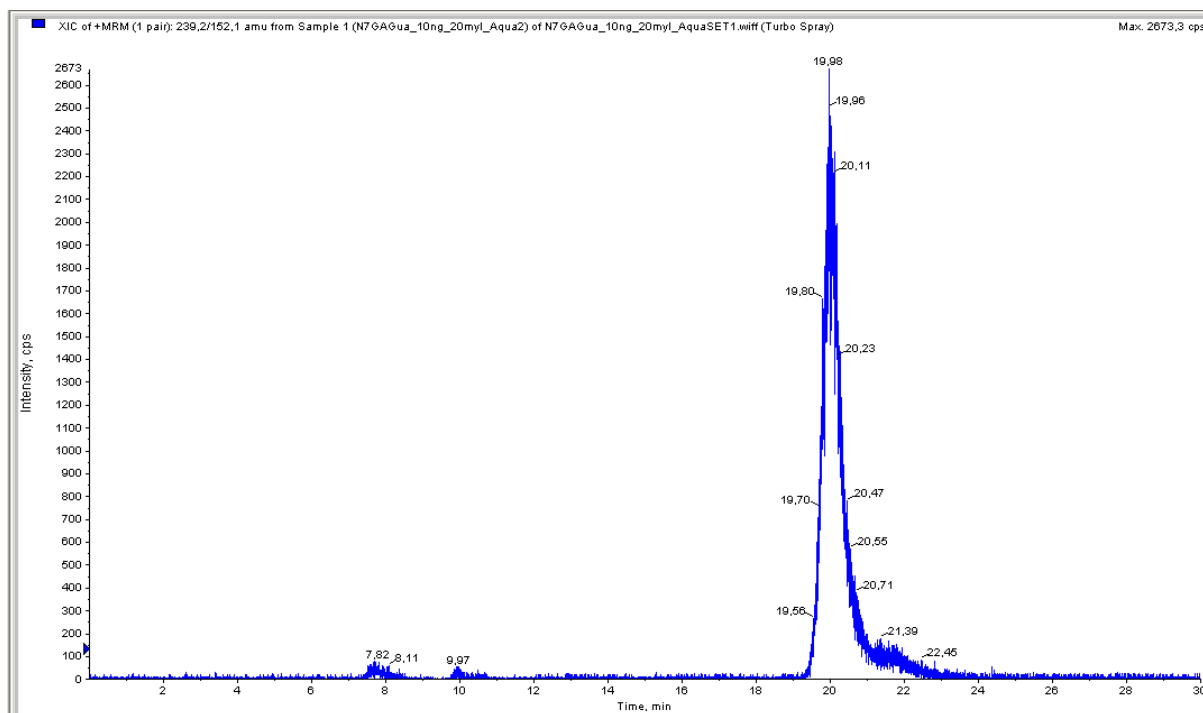


Abbildung 4.14: HPLC-MS/MS-Chromatogramm eines *N7*-GA-Guanin Standards gemessen mit einer Phenomenex Aqua C18-Säule (250 x 4,6 mm, 5 µm) unter isokratischen Bedingungen (2 % Acetonitril in Ameisensäure, 0,3 ml/min)

Bei dieser Retentionszeit kann zur weiteren Optimierung auch ein Fließmittelgradient eingesetzt werden. Die nachfolgenden Messungen wurden mit der Aqua C18-Säule und einem Acetonitril-Gradienten von 2 % auf 25 % Acetonitril in 15 Minuten durchgeführt. Dadurch konnte die Retentionszeit von 19,9 Minuten auf 16,7 Minuten verringert und die Peakbreite auf 0,7 Minuten reduziert werden. Ein Beispielchromatogramm ist in Abbildung 4.15 gezeigt. Es zeigt die Messung von 0,42 pmol *N7*-GA-Guanin Standard. Die Messung aller Proben erfolgte mit Hilfe dieser optimierten HPLC-Methode.

Ergebnisse und Diskussion

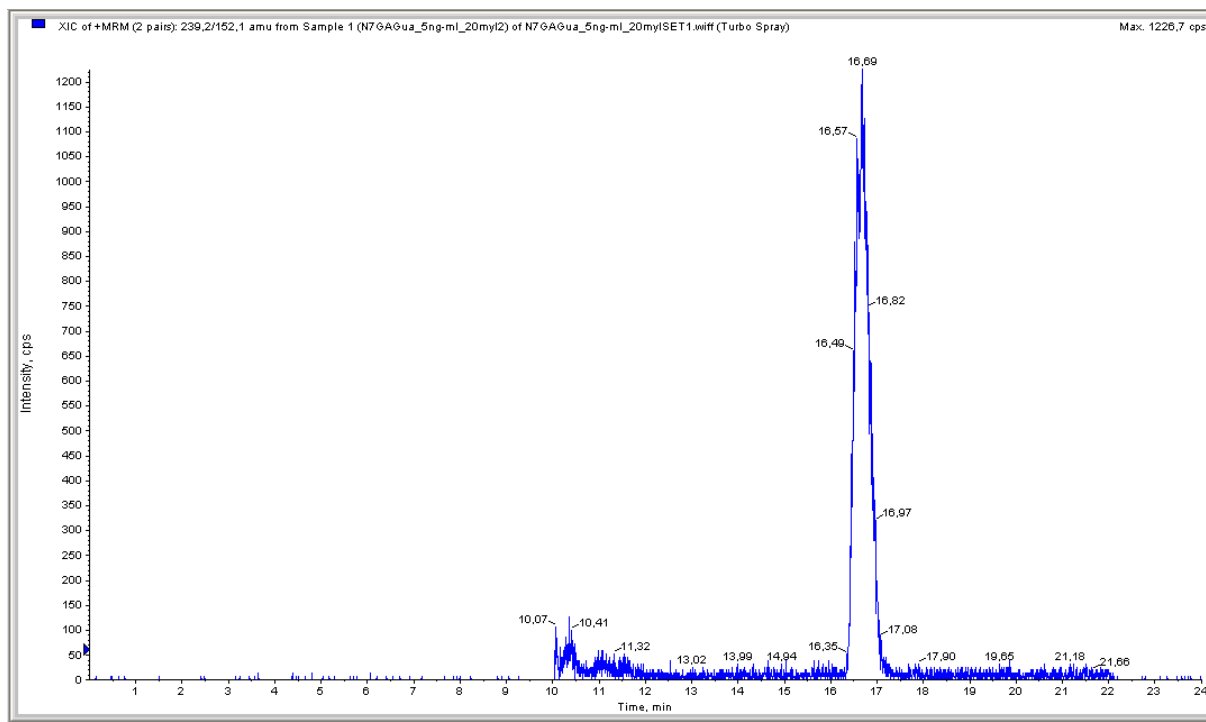


Abbildung 4.15: HPLC-MS/MS-Chromatogramm eines *N7*-GA-Guanin Standards gemessen mit einer Phenomenex Aqua C18-Säule (250 x 4,6 mm, 5 μ m) und Acetonitril-Gradienten (2 %-25 % Acetonitril in 15 Minuten, 0,3 ml/min)

In Tabelle 4.1 sind alle getesteten HPLC-Bedingungen zusammenfassend dargestellt. Zur Untersuchung der Proben der Tierversuche wurde der Fließmittelgradient an der Aqua C18-Säule angewendet.

Tabelle 4.1: Getestete HPLC-Bedingungen zur Elution von *N7*-GA-Guanin-Addukten

Säule	Elutionsart	Ameisensäure (0,1 % v/v) [%]	Acetonitril [%]	Flow [ml/min]	Retentionszeit [min]
Luna C18-2 150 x 2 mm, 3 μ m	isokratisch	98	2	0,2	3,8
Luna C8 150 x 2 mm, 3 μ m	isokratisch	98	2	0,2	4,6
Aqua C18 250 x 4,6 mm, 5 μ m	isokratisch	98	2	0,3	19,9
Aqua C18 250 x 4,6 mm, 5 μ m	Gradient	98 \rightarrow 75 (15 min)	2 \rightarrow 25 (15 min)	0,3	16,7

4.1.4.2 Bestimmung von *N*7-Guanin-Addukten des Glycidamids in DNA aus Gewebeproben

Auf *N*7-GA-Guanin-Bildung untersucht wurden die Lebern aller Studientiere, sowie Nieren, Lungen und Hoden nach einem, fünf und neun Tagen Behandlung mit Acrylamid im Trinkwasser (Schlundsonde) oder im Lebensmittel. Außerdem wurden Lebern, Nieren, Lungen und Hoden der kumulativen Dosisgruppen und die Lebern der mit 10 mg Acrylamid/kg KG behandelten Tiere untersucht.

Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der Methode liegen bei 8,5 fmol bzw. 17 fmol. Bei einer durchschnittlich eingesetzten DNA-Menge von 184 µg ergeben sich dadurch eine Nachweisgrenze von 1 Addukt/10⁸ Nukleotide bzw. 43 fmol/mg DNA und eine Bestimmungsgrenze von 3 Addukten/10⁸ Nukleotide bzw. 92 fmol/mg DNA.

In keiner der Negativkontrollen wurde *N*7-GA-Guanin detektiert. In der DNA der Tiere, die mit 50 µg oder 100 µg Acrylamid/kg KG/d behandelt wurden, konnte zu keinem Zeitpunkt *N*7-GA-Guanin nachgewiesen werden. Abbildung 4.16 zeigt beispielhaft das Chromatogramm der Analyt- und Standardspur von *N*7-GA-Guanin in der Leber-DNA einer Ratte, die über fünf Tage mit 100 µg Acrylamid/kg KG behandelt wurde. Im unteren Chromatogramm ist der interne Standard mit einer Retentionszeit von 16,7 Minuten gut zu erkennen, während im oberen Chromatogramm zu dieser Zeit kein Signal zu sehen ist. Auf der Analytspur wird bei ca. 16,1 Minuten Retentionszeit in den meisten Fällen ein unspezifisches Signal detektiert. Durch Aufdotieren einiger Proben wurde allerdings ausgeschlossen, dass dieses Signal mit dem Analyten in Zusammenhang steht.

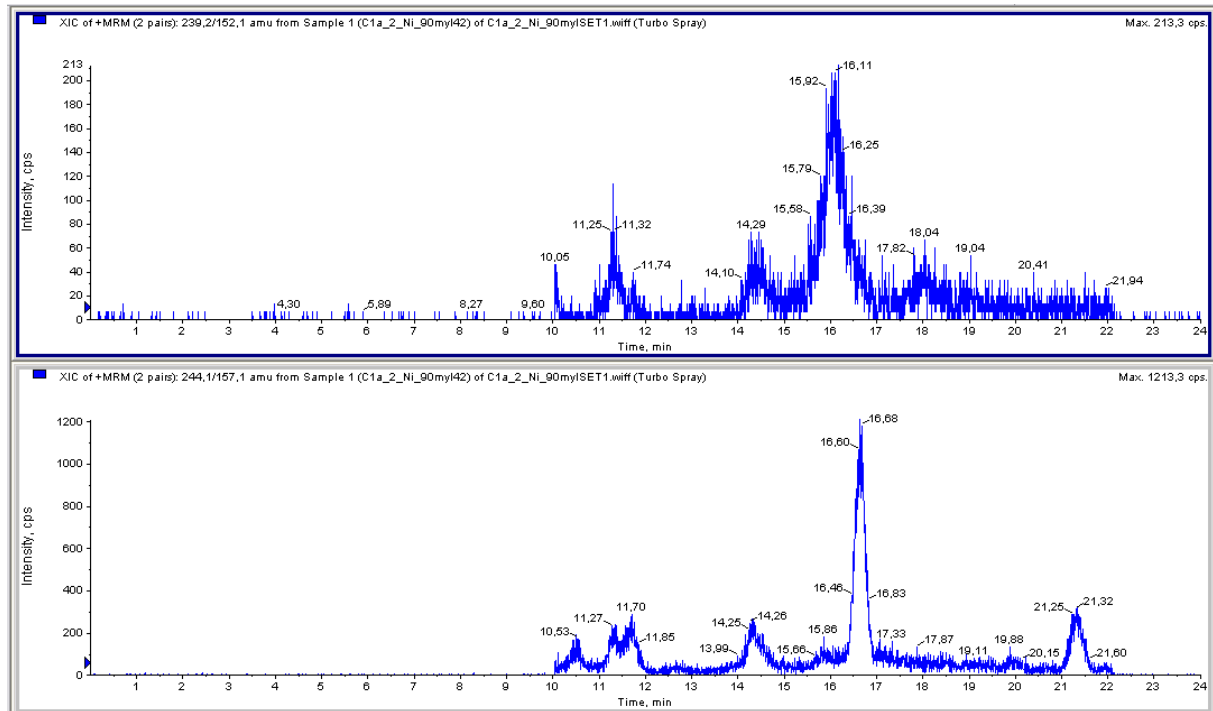


Abbildung 4.16: HPLC-MS/MS-Chromatogramm der Analyt- und Standardspur von *N7*-GA-Guanin in der Nieren-DNA einer einmalig mit 100 µg Acrylamid/kg KG behandelten männlichen Sprague-Dawley Ratte (oberes Chromatogramm: Massenspur des Analyten; unteres Chromatogramm: Massenspur des internen Standards)

Nach einmaliger Verabreichung von 450 µg Acrylamid/kg KG, also der kumulativen Dosis der 50 µg Acrylamid/kg KG/d-Gruppen über neun Tage, konnte *N7*-GA-Guanin in allen Geweben der Tiere nachgewiesen, aber nicht quantifiziert werden. Als Beispiel dafür ist in Abbildung 4.17 das Chromatogramm von *N7*-GA-Guanin in der Hoden-DNA einer mit 450 µg Acrylamid/kg KG behandelten männlichen Sprague-Dawley Ratte gezeigt. Auch in diesem Chromatogramm ist auf der Analytspur (oben) das unspezifische Matrixsignal bei 16 Minuten Retentionszeit zu erkennen. Allerdings erscheint direkt daneben ein zweites Signal, das durch Aufdotieren eindeutig dem *N7*-GA-Guanin zugeordnet werden konnte. In der Negativkontrolle wurden keine *N7*-GA-Guanin-Addukte detektiert.

Ergebnisse und Diskussion

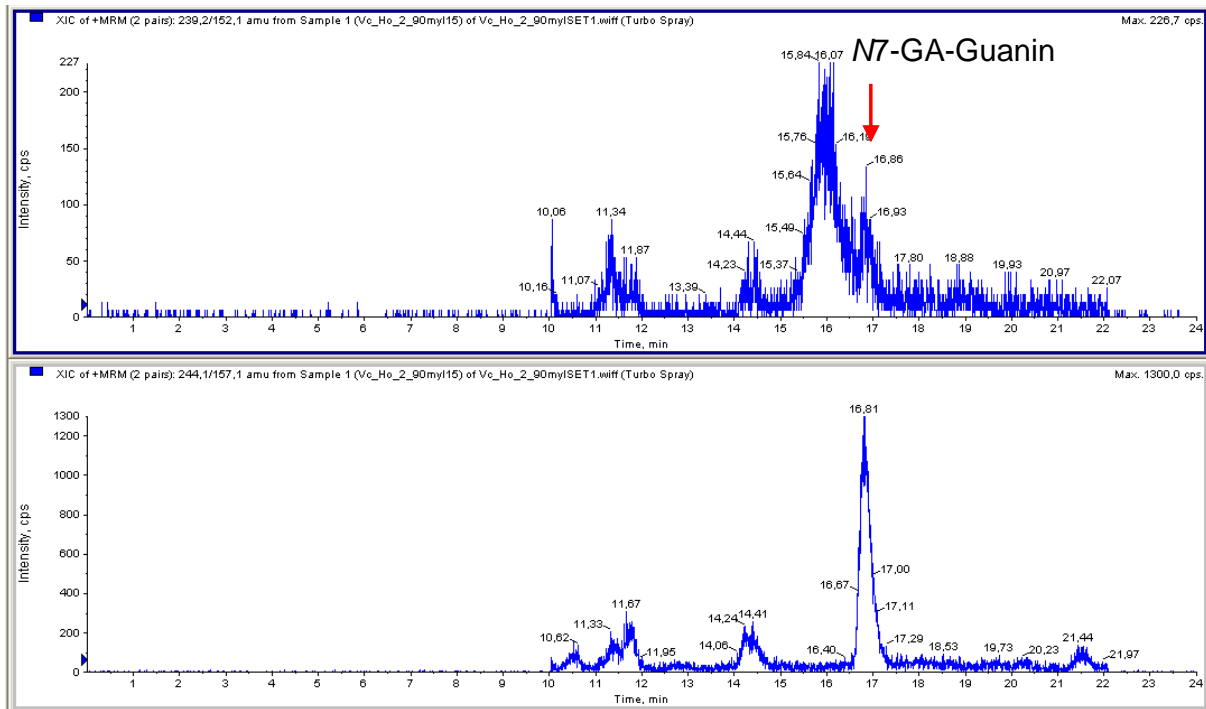


Abbildung 4.17: Qualitativer Nachweis von *N7*-GA-Guanin in der Hoden-DNA einer einmalig mit 450 µg Acrylamid/kg KG behandelten männlichen Sprague-Dawley Ratte (oberes Chromatogramm: Massenspur des Analyten; unteres Chromatogramm: Massenspur des internen Standards)

Die einmalige Verabreichung von 10 mg Acrylamid/kg KG und 900 µg Acrylamid/kg KG, der kumulativen Dosis der 100 µg Acrylamid/kg KG/d-Gruppen über neun Tage, ergab quantifizierbare Signale. Abbildung 4.18 zeigt beispielhaft das HPLC-MS/MS-Chromatogramm der *N7*-GA-Guanin-Addukte der DNA aus der Lunge einer Ratte, die einmalig mit 900 µg Acrylamid/kg KG behandelt wurde.

Ergebnisse und Diskussion

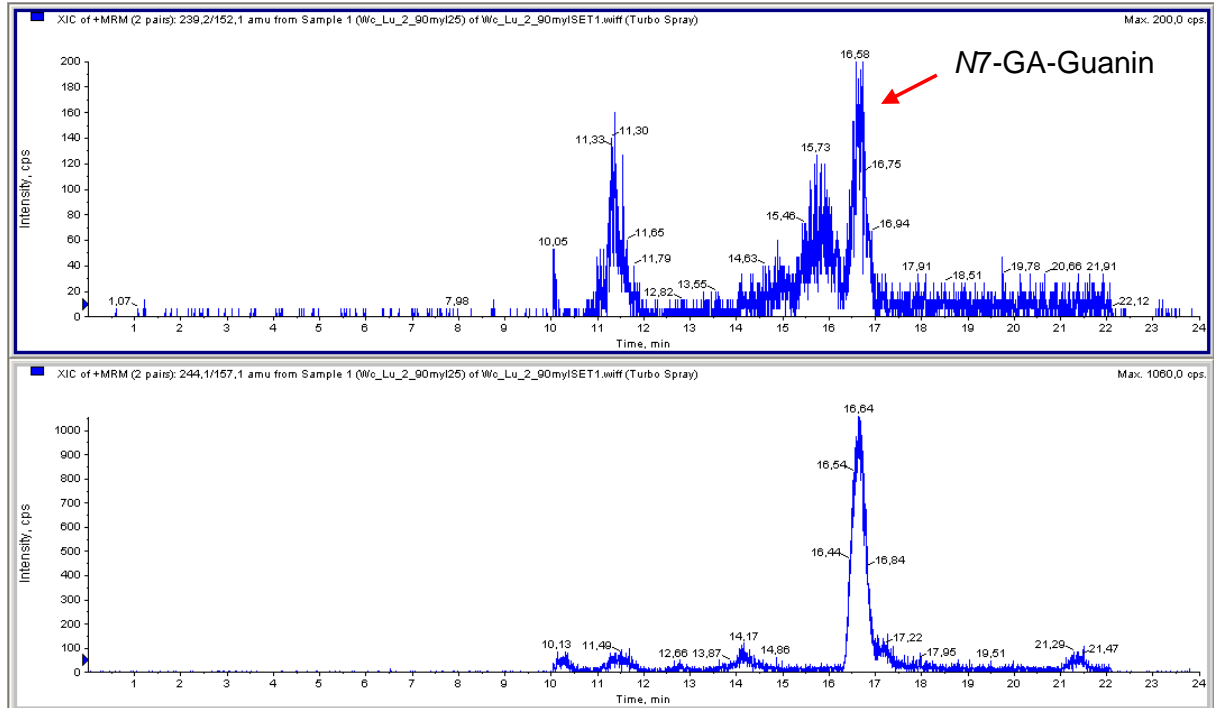


Abbildung 4.18: Quantitativer Nachweis von *N7*-GA-Guanin in DNA aus der Lunge einer einmalig mit 900 µg Acrylamid/kg KG behandelten männlichen Sprague-Dawley Ratte (oberes Chromatogramm: Massenspur des Analyten; unteres Chromatogramm: Massenspur des internen Standards)

Wie in Abbildung 4.19 gezeigt, führte eine einmalige Dosis von 900 µg Acrylamid/kg KG bei drei Tieren im Mittel zu $15,0 \pm 3,9$ Addukten/ 10^8 Nukleotide (461 ± 122 fmol/mg DNA) in der Leber, $12,5 \pm 2,3$ Addukten/ 10^8 Nukleotide (382 ± 69 fmol/mg DNA) in der Niere, $20,4 \pm 10,2$ Addukten/ 10^8 Nukleotide (626 ± 313 fmol/mg DNA) in der Lunge und $8,8 \pm 0,8$ Addukten/ 10^8 Nukleotide (269 ± 24 fmol/mg DNA) in den Hoden. Nach einer einmaligen Acrylamid-Dosis von 10 mg/kg KG an zwei Ratten wurden in den Lebern der Tiere im Mittel $67,9 \pm 14,8$ Addukte/ 10^8 Nukleotide (2083 ± 453 fmol/mg DNA) gemessen.

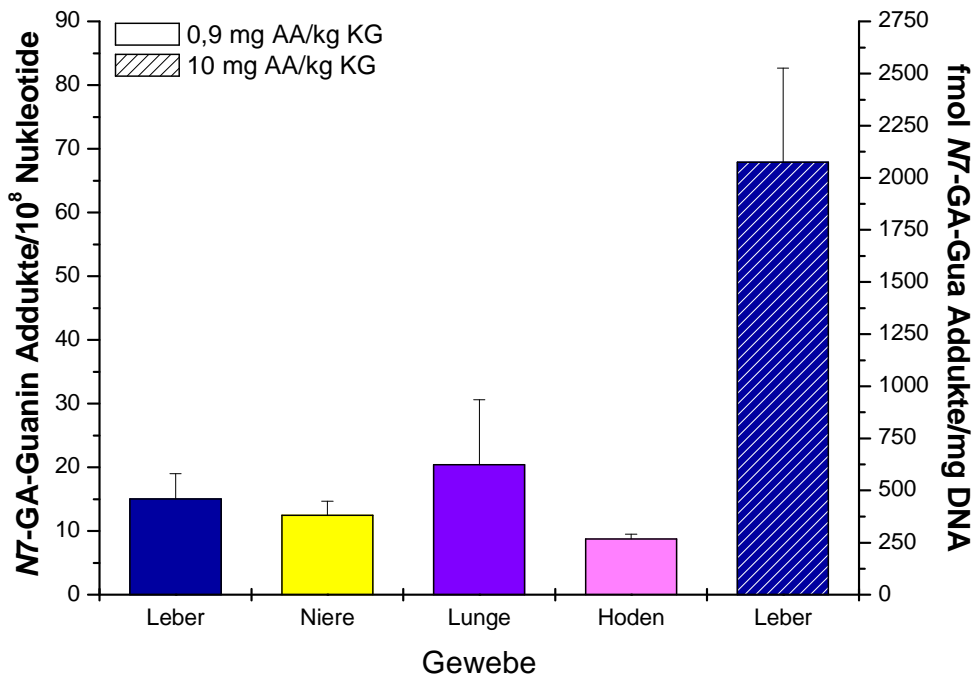


Abbildung 4.19: *N7*-GA-Guanin-Addukte in DNA aus Geweben von männlichen Sprague-Dawley Ratten, die einmalig mit 900 µg Acrylamid/kg KG bzw. 10 mg Acrylamid/kg KG im Trinkwasser behandelt wurden.

$n = 2$, Mittelwert über 3 bzw. 2 Tiere (10 mg/kg KG) \pm Standardabweichung

Die Arbeitsgruppe von Doerge et al. führte ebenfalls Studien zur *N7*-GA-Guanin-Addukt-Bildung durch. Männliche und weibliche B6C3F₁-Mäuse, sowie männliche und weibliche F344-Ratten, wurden einmalig mit 0,1 mg Acrylamid/kg KG in Trinkwasser schlundsondiert. Nach 8 bzw. 10 Stunden wurden die Tiere getötet und die Lebern zur DNA-Isolierung entnommen. In den Mäusen wurden 5 *N7*-GA-Guanin-Addukte/ 10^8 Nukleotide detektiert, in den männlichen und weiblichen Ratten 3 bzw. 8 *N7*-GA-Guanin-Addukte/ 10^8 Nukleotide gemessen [Doerge et al., 2005 a, b]. Auch im höheren Dosisbereich wurden von der Gruppe um Doerge deutlich mehr *N7*-GA-Guanin-Addukte gemessen, als in der vorliegenden Arbeit.

Mit 5-8 *N7*-GA-Guanin-Addukten/10⁸ Nukleotide konnten in den Lebern der weiblichen Sprague-Dawley Ratten, denen im Rahmen der Untersuchung der zeit- und dosisabhängigen Bildung von *N7*-GA-Guanin-Addukten 1 mg Acrylamid/kg KG verabreicht wurden (Kapitel 4.2.) ähnlich hohe Addukt Mengen bestimmt werden, wie in den von Doerge et al. mit 0,1 mg Acrylamid/kg KG behandelten F344-Ratten [Doerge et al., 2005 b].

Außerdem wurden in der Studie von Doerge et al. nach Gabe von 0,1 mg Acrylamid/kg KG im Trinkwasser per Schlundsonde an männliche und weibliche F344-Ratten maximale Acrylamid-Serumgehalte von 0,5 µM bzw. 1,2 µM nach 2 Stunden und maximale Glycidamid-Serumgehalte von 0,2 µM bzw. 0,7 µM nach 2 Stunden gemessen [Doerge et al., 2005 b]. Nach Verabreichung von 0,1 mg Acrylamid/kg KG in Trinkwasser per Schlundsonde an männliche Sprague-Dawley Ratten wurden im Rahmen des FEI-geförderten Projektes zur Untersuchung der Bioverfügbarkeit von Acrylamid auch die Serumspiegel von Acrylamid und Glycidamid zu den Zeitpunkten 30 Minuten, 1, 2 und 4 Stunden nach Acrylamid-Gabe gemessen. Das Maximum an Acrylamid im Serum wurde in dieser Studie bereits nach 30 Minuten mit Gehalten von 1,84 µM Acrylamid bestimmt. Spuren von Glycidamid konnten nur nach 4 Stunden mit einem Gehalt von weniger als 0,06 µM detektiert werden [Berger et al., 2010].

Allerdings zeigten Tareke et al. anhand von Untersuchungen mit Lebermikrosomen männlicher F344- und Sprague-Dawley Ratten, dass die Umsetzung von Acrylamid zu Glycidamid in F344-Ratten (12 pmol/min/µg Protein) fast doppelt so schnell stattfindet, wie in Sprague-Dawley Ratten (7,4 pmol/min/µg Protein) [Tareke et al., 2006]. Die Diskrepanz, die zwischen den Biomarkern der Untersuchungen von Doerge et al. und der FEI-Studie gesehen wurde, lässt sich also vermutlich zumindest teilweise durch die Verwendung unterschiedlicher Rattenarten erklären.

Aus den Ergebnissen zur Untersuchung der *N7*-GA-Guanin-Addukte kann geschlossen werden, dass in dem verabreichten Acrylamid-Dosisbereich DNA-Addukte effektiv repariert werden und dass eine neuntägige Exposition mit niedrigen Acrylamid-Dosen nicht zu einer messbaren Akkumulation von DNA-Addukten führt. Dies wird auch durch frühere *in vitro*-Studien unserer Arbeitsgruppe belegt, in denen die Abnahme der durch Glycidamid verursachten DNA-Schäden in V79-Zellen untersucht wurde. Es wurde gefunden, dass Schäden, die durch weniger als 800 µM Glycidamid induziert wurden, innerhalb einer achtstündigen Nachkultivierung nahezu vollständig repariert werden [Baum, 2008]. Desweiteren wurde in den untersuchten Ratten anhand der Mercaptursäuren von Acrylamid und Glycidamid im niedrigen Dosisbereich eine effektive Entgiftung des gebildeten Glycidamids über Glutathion nachgewiesen [Berger et al., 2010].

Im Gegensatz zu den im Rahmen dieser Arbeit gefundenen Ergebnissen wird in der Literatur beschrieben, dass die Verabreichung von 1 mg Acrylamid/kg KG/d in Trinkwasser an

weibliche und männliche F344-Ratten über ca. 50 Tage zunächst zu einer Akkumulation der *N7*-GA-Guanin-Addukte führt. Dabei wurde in den weiblichen Ratten die Einstellung eines steady-state Levels nach 14 Tagen beobachtet. In den Lebern der männlichen Ratten wurden zu allen Zeitpunkten weniger *N7*-GA-Guanin-Addukte gemessen. Hier wurde nach 14 Tagen ebenfalls eine maximale DNA-Adduktbildung registriert, die allerdings in den folgenden Wochen langsam sank [Doerge et al., 2005 c].

4.2 Untersuchung der zeit- und dosisabhängigen Bildung von *N7*-Guanin-Addukten des Glycidamids sowie Acrylamid- und Glycidamid-Mercaptursäuren in der Ratte

In Vorbereitung auf ein Projekt, welches sich gezielt mit der Entstehung von Glycidamid-DNA-Addukten im Tier nach Verabreichung von Acrylamid-Dosen beschäftigt, die im Bereich realer Exposition liegen, sollte untersucht werden, welcher Zeitpunkt nach der Acrylamid-Behandlung optimal ist, um *N7*-GA-Guanin-Addukte zu bestimmen. Untersucht wurde die *N7*-GA-Guanin-Addukt-Bildung in Leber, Lunge und Niere weiblicher Sprague-Dawley Ratten. Zur Überprüfung der Exposition und der Glycidamid-Bildung wurden die entsprechenden Acrylamid- und Glycidamid-Mercaptursäuren (AAMA und GAMA) als zusätzliche Biomarker herangezogen. Die Mercaptursäuren wurden aus dem Urin der Tiere mittels Festphasen-Extraktion (SPE) abgetrennt und massenspektrometrisch vermessen.

In dieser Studie wurden weibliche Ratten verwendet, da Doerge et al. beschreiben, dass diese etwas empfindlicher gegenüber der Bildung von *N7*-GA-Guanin sind als männliche Ratten [Doerge et al., 2005b].

4.2.1 Bestimmung von *N7*-Guanin Addukten des Glycidamids in DNA aus Gewebeproben

4.2.1.1 Zeitabhängige Bildung von *N7*-Guanin-Addukten des Glycidamids

Die Untersuchung zur Zeitabhängigkeit der Bildung von *N7*-GA-Guanin wurde durchgeführt mit DNA von weiblichen Sprague-Dawley Ratten, denen 1 mg Acrylamid/kg KG bzw. 10 mg Acrylamid/kg KG im Trinkwasser per Schlundsonde verabreicht wurden. Die Organentnahme erfolgte jeweils 8, 16 und 24 Stunden nach der Behandlung. Nach Isolierung der DNA aus Lebern, Nieren und Lungen der Tiere mittels Phenol-Chloroform-Extraktion wurde die DNA neutral-thermisch hydrolysiert und die *N7*-GA-Guanin-Addukte

massenspektrometrisch bestimmt. Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe der Isotopenverdünnungsanalyse.

Abbildung 4.20 zeigt das Ergebnis der Untersuchung der Bildung von *N7*-GA-Guanin nach Verabreichung von 1 mg Acrylamid/kg KG.

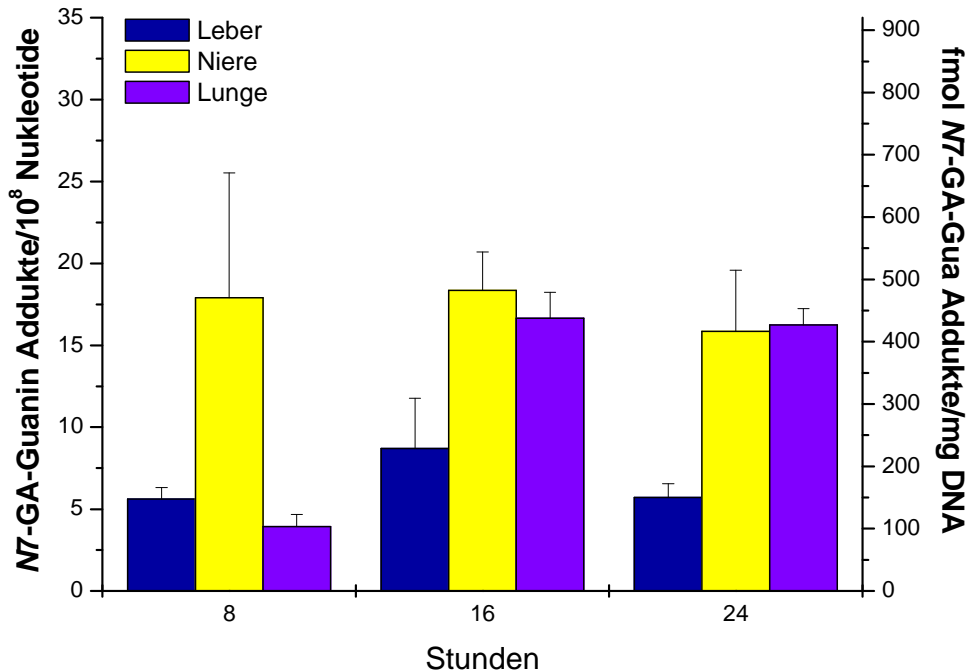


Abbildung 4.20: *N7*-GA-Guanin-Addukte in DNA aus Geweben von weiblichen Sprague-Dawley Ratten, die 8, 16 oder 24 Stunden nach einmaliger Verabreichung von 1 mg Acrylamid/kg KG im Trinkwasser isoliert wurden.

Mittelwert über 2 Tiere \pm Standardabweichung

Aus den Ergebnissen zur Untersuchung der *N7*-GA-Guanin-Adduktbildung 8, 16 und 24 Stunden nach Verabreichung von 1 mg Acrylamid/kg KG lässt sich kein Trend zu einer maximalen DNA-Adduktbildung ablesen. In den Lebern wurden zu allen Untersuchungszeitpunkten deutlich niedrigere *N7*-GA-Guanin-Gehalte (6-9 Addukte/10⁸ Nukleotide) als in Lungen und Nieren gemessen. Die Addukte in Nieren und Lungen lagen meist in einem ähnlich hohen Bereich von 16-18 Addukten/10⁸ Nukleotide, außer zum Zeitpunkt 8 Stunden nach Exposition, zu dem in den Lungen lediglich $3,9 \pm 0,8$ Addukte/10⁸ Nukleotide gefunden wurden.

Die Abbildungen 4.21 zeigt ein repräsentatives HPLC-MS/MS-Chromatogramm der *N7*-GA-Guanin-Addukt-Bestimmung in Nieren-DNA 16 Stunden nach Verabreichung von 1 mg Acrylamid/kg KG.

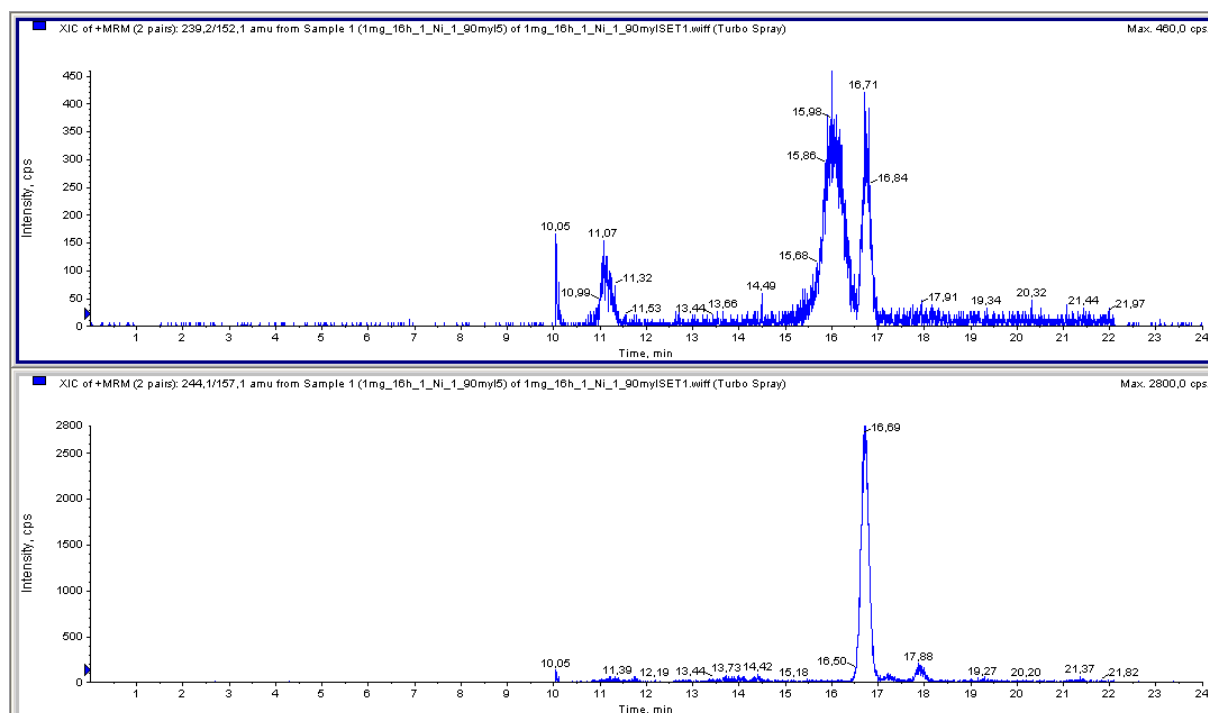


Abbildung 4.21: HPLC-MS/MS-Chromatogramm der Bestimmung von *N*7-GA-Guanin in der Niere einer mit 1 mg Acrylamid/kg KG behandelten weiblichen Sprague-Dawley Ratte (oberes Chromatogramm: Massenspur des Analyten; unteres Chromatogramm: Massenspur des internen Standards)

Abbildung 4.22 zeigt die Ergebnisse zur Untersuchung der *N7*-GA-Guanin-Bildung 8, 16 und 24 Stunden nach Verabreichung von 10 mg Acrylamid/kg KG.

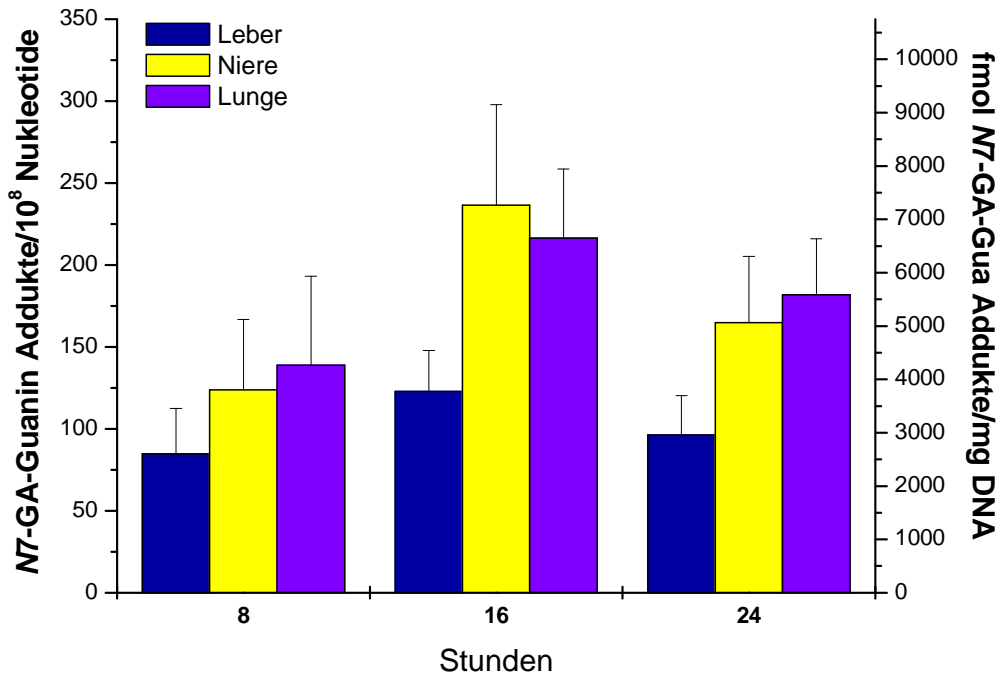


Abbildung 4.22: *N7*-GA-Guanin-Addukte in der DNA aus Geweben von weiblichen Sprague-Dawley Ratten, die 8, 16 oder 24 Stunden nach einmaliger Verabreichung von 10 mg Acrylamid/kg KG im Trinkwasser isoliert wurden.

Mittelwert über 3 bzw. 4 Tiere \pm Standardabweichung (3 Tiere nach 8 Stunden)

In der Leber wurden innerhalb von 24 Stunden nach Verabreichung von 10 mg Acrylamid/kg KG mit 85-123 Addukten/10⁸ Nukleotiden deutlich weniger Addukte gemessen als in Niere und Lunge, die in einem ähnlich hohen Bereich von 124-236 Addukten/10⁸ Nukleotide bzw. 139-216 Addukten/10⁸ Nukleotide lagen. In dieser Dosisgruppe deutet sich nach 16 Stunden eine maximale *N7*-GA-Guanin-Adduktbildung an. Zu diesem Zeitpunkt wurden $122,9 \pm 25,1$ Addukte/10⁸ Nukleotide (3770 ± 769 fmol/mg DNA) in den Lebern, $236,5 \pm 61,4$ Addukte/10⁸ Nukleotide (7107 ± 1723 fmol/mg DNA) in den Nieren und $216,4 \pm 42,3$ Addukten/10⁸ Nukleotide (6590 ± 1309 fmol/mg DNA) in den Lungen der Tiere gemessen.

Abbildung 4.23 zeigt beispielhaft das HPLC-MS/MS-Chromatogramm der *N7*-GA-Guanin-Addukt-Bestimmung in der Nieren-DNA einer Ratte 16 Stunden nach Behandlung mit 10 mg Acrylamid/kg KG.

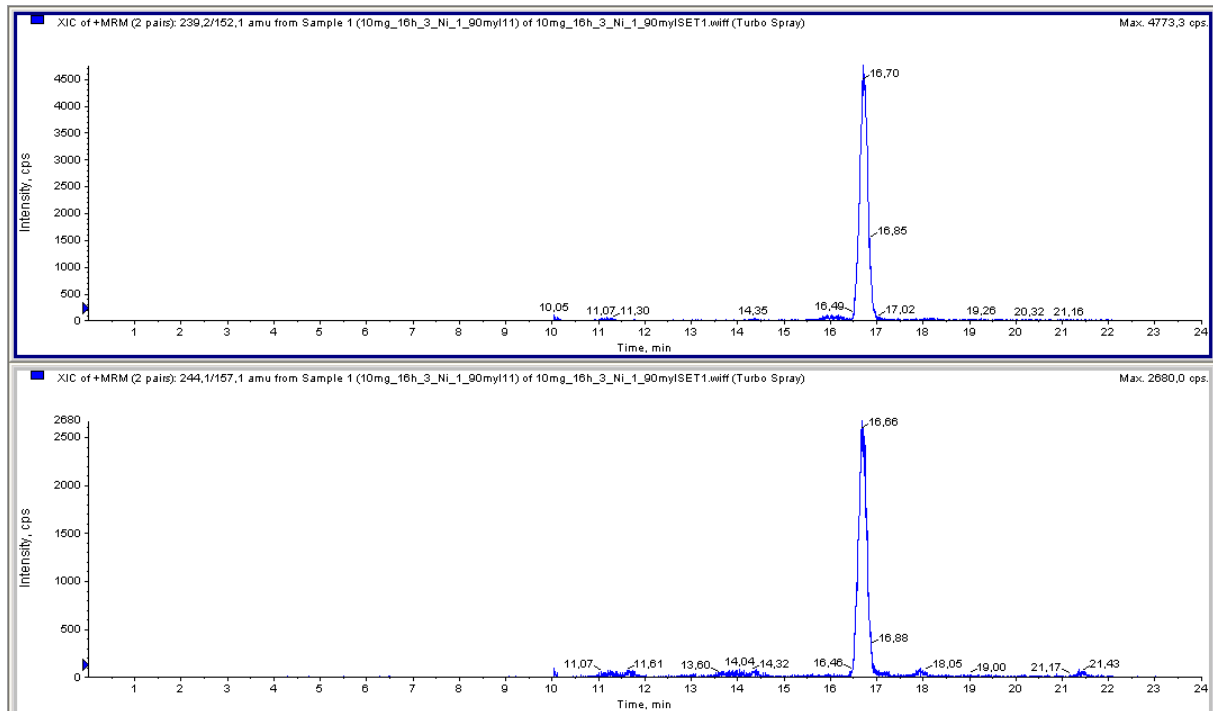


Abbildung 4.23: HPLC-MS/MS-Chromatogramm der Bestimmung von *N7*-GA-Guanin in der Niere einer mit 10 mg Acrylamid/kg KG behandelten weiblichen Sprague-Dawley Ratte (oberes Chromatogramm: Massenspur des Analyten; unteres Chromatogramm: Massenspur des internen Standards)

Manière et al. untersuchten die zeitabhängige *N7*-GA-Guanin-Bildung 5, 24, 48 und 72 Stunden nach Verabreichung von 18 mg oder 54 mg Acrylamid/kg KG in DNA aus Leber, Gehirn und Hoden männlicher Sprague-Dawley Ratten. Das Maximum der *N7*-GA-Guanin-Bildung wurde in beiden Untersuchungsgruppen 24 Stunden nach Verabreichung der Acrylamid-Dosis gemessen [Manière et al., 2005]. Die Ergebnisse der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur zeitabhängigen Bildung von *N7*-GA-Guanin-Addukten deuten auf ein Maximum der *N7*-GA-Guanin-Bildung 16 Stunden nach Verabreichung der Acrylamid-Dosis hin. In Abhängigkeit von der Acrylamid-Dosis von 1 und 10 mg Acrylamid/kg KG wurden mit 17-237 *N7*-GA-Guanin-Addukten/ 10^8 Nukleotide ähnlich hohe Addukt-Gehalte in Nieren- und Lungen-DNA gemessen, während in der Leber mit 9-123 *N7*-GA-Guanin-Addukten/ 10^8 Nukleotide deutlich geringere Addukt mengen bestimmt wurden. Dieser Effekt könnte auf die Entgiftung von Glycidamid durch die Konjugation an GSH zurückzuführen sein, das in der Leber mit 7-8 mM in wesentlich höherer Konzentration vorliegt, als in anderen Organen [Tateishi et al., 1977]. Allerdings ist aus der Literatur auch bekannt, dass die Kapazität der DNA-Reparatursysteme in der Leber deutlich größer ist, als in anderen Organen [Jenkins et al., 2005].

Auch in Untersuchungen an weiblichen B6C3F₁-Mäusen wurde festgestellt, dass die DNA-Adduktbildung in der Leber im Vergleich zu anderen Organen geringer ist. In den männlichen Mäusen lagen jedoch die *N*7-GA-Guanin Gehalte in Leber und Lunge auf einem ähnlich hohen Niveau und in der Niere deutlich darunter [Gamboa da Costa et al., 2003]. In Ratten wurden ähnliche Studien noch nicht durchgeführt.

4.2.1.2 Dosisabhängige Bildung von N7-Guanin-Addukten des Glycidamids

Zur Untersuchung der dosisabhängigen Bildung von N7-GA-Guanin-Addukten wurde der Zeitpunkt 16 Stunden gewählt, da sich zu diesem Zeitpunkt in der 10 mg Acrylamid/kg KG-Gruppe eine leichte Tendenz zu einer maximalen N7-GA-Guanin-Bildung zeigte. Dazu wurden die Werte der 16 Stunden-Tiere, die für die Zeitabhängigkeitsuntersuchung mit 1 mg Acrylamid/kg KG oder 10 mg Acrylamid/kg KG behandelt wurden, herangezogen. Zusätzlich wurde jeweils drei Tieren 0,1 mg, 0,5 mg, 3 mg oder 6 mg Acrylamid/kg KG verabreicht. Diese Tiere wurden ebenfalls nach 16 Stunden getötet und Lebern, Lungen und Nieren zur DNA-Isolierung entnommen. Das Ergebnis der N7-GA-Guanin-Bildung ist in Abbildung 4.24 dargestellt.

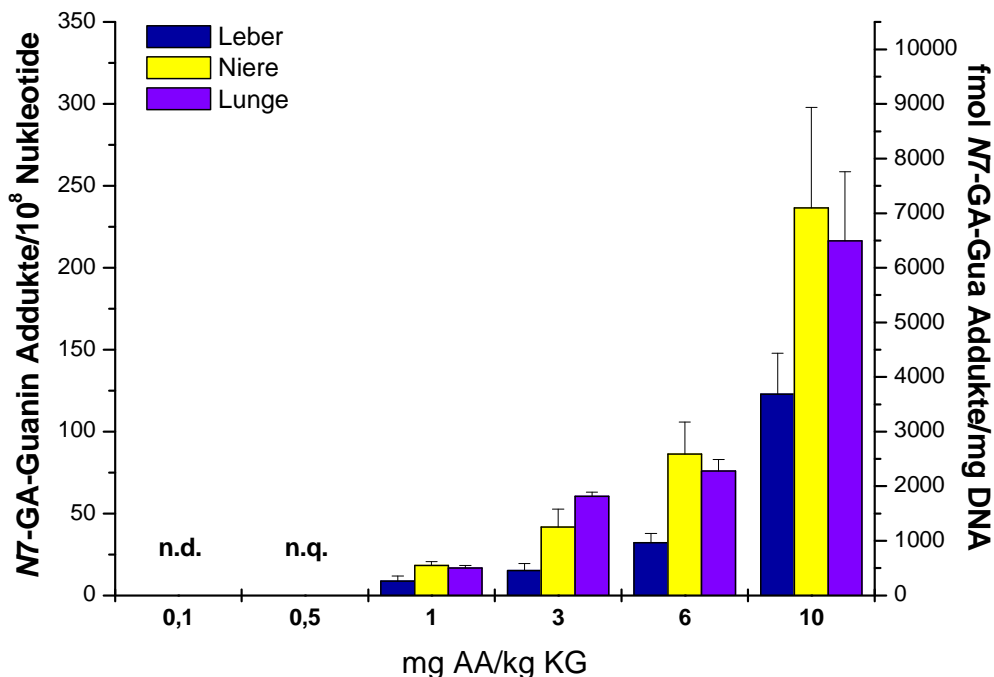


Abbildung 4.24: N7-GA-Guanin-Addukte in DNA aus Geweben von weiblichen Sprague-Dawley Ratten, die 16 Stunden nach einmaliger Verabreichung von 0,1 mg, 0,5 mg, 1 mg, 3 mg, 6 mg und 10 mg Acrylamid/kg KG im Trinkwasser isoliert wurden. (n.d.: nicht detektierbar, n.q.: nicht quantifizierbar)

Mittelwert \pm Standardabweichung (n = 2; 1 mg Acrylamid/kg KG: 2 Tiere; 0,1 mg, 0,5 mg, 3 mg und 6 mg Acrylamid/kg KG: 3 Tiere; 10 mg Acrylamid/kg KG: 4 Tiere)

Bei der Dosis von 0,1 mg Acrylamid/kg KG konnten in keinem der untersuchten Organe Addukte detektiert werden, während die Dosis von 0,5 mg Acrylamid/kg KG zu

detektierbaren aber nicht quantifizierbaren Signalen führte. Die Verabreichung von 1 mg Acrylamid/kg KG ergab nach 16 Stunden $8,7 \pm 3,1$ Addukte/ 10^8 Nukleotide ($266,6 \pm 94,4$ fmol/mg DNA) in den Lebern, $18,4 \pm 2,3$ Addukte/ 10^8 Nukleotide ($563,1 \pm 64,1$ fmol/mg DNA) in den Nieren und $16,7 \pm 1,6$ Addukte/ 10^8 Nukleotide ($511,2 \pm 48,1$ fmol/mg DNA) in den Lungen der Ratten. Nach Behandlung der Ratten mit 3 mg Acrylamid/kg KG per Gavage wurden $15,3 \pm 4,2$ Addukte/ 10^8 Nukleotide (468 ± 129 fmol/mg DNA) in den Lebern, $41,7 \pm 10,8$ Addukte/ 10^8 Nukleotide (1279 ± 333 fmol/mg DNA) in den Nieren und $60,4 \pm 2,6$ Addukte/ 10^8 Nukleotide (1854 ± 80 fmol/mg DNA) in den Lungen der Tiere detektiert. Nach Gabe von 6 mg Acrylamid/kg KG wurden $32,2 \pm 5,6$ Addukte/ 10^8 Nukleotide (988 ± 171 fmol/mg DNA) in den Lebern, $86,2 \pm 19,6$ Addukte/ 10^8 Nukleotide (2645 ± 600 fmol/mg DNA) in den Nieren und $76,0 \pm 7,1$ Addukte/ 10^8 Nukleotide (2330 ± 219 fmol/mg DNA) in den Lungen der Tiere gemessen. In der 10 mg Acrylamid/kg KG-Gruppe wurden nach 16 Stunden $122,9 \pm 25,1$ Addukte/ 10^8 Nukleotide (3770 ± 769 fmol/mg DNA) in den Lebern, $236,5 \pm 61,4$ Addukte/ 10^8 Nukleotide (7107 ± 1723 fmol/mg DNA) in den Nieren und $216,4 \pm 42,3$ Addukten/ 10^8 Nukleotide (6590 ± 1309 fmol/mg DNA) in den Lungen der Tiere gemessen.

Deutlich erkennbar ist, wie bereits bei der Zeitabhängigkeitsuntersuchung festgestellt, dass die *N7*-GA-Guanin-Addukte in wesentlich geringerer Menge in der Leber gebildet werden als in Niere und Lunge. In allen Organen kann ein dosisabhängiger Verlauf der Adduktbildung aufgezeigt werden. Der Anstieg deutet einen exponentiellen Kurvenverlauf an (Abbildung 4.25).

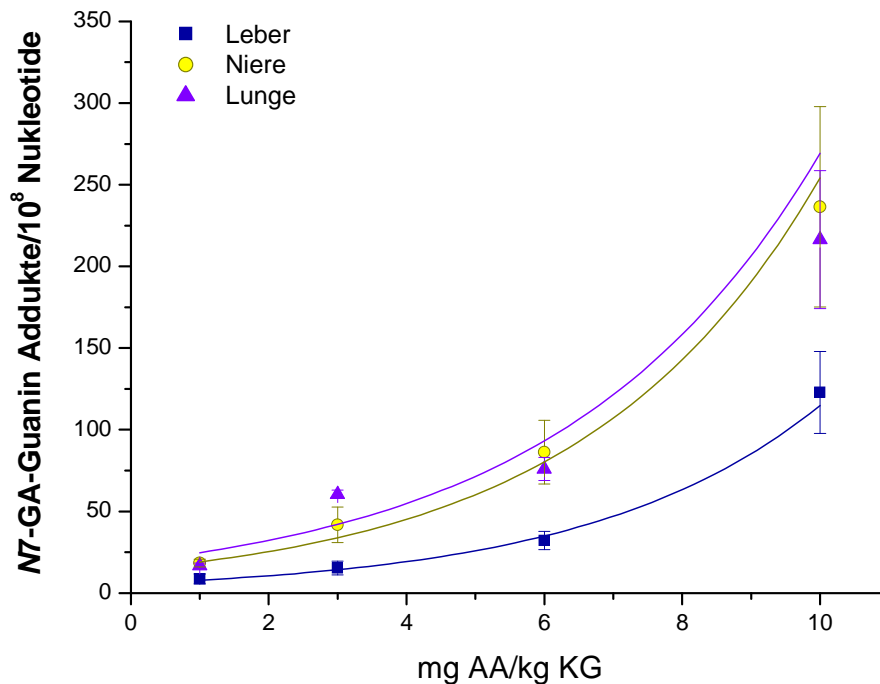


Abbildung 4.25: Exponentieller Fit der *N7*-GA-Guanin-Addukte in Leber, Niere und Lunge von weiblichen Sprague-Dawley Ratten 16 Stunden nach Verabreichung von 1 mg, 3 mg, 6 mg und 10 mg Acrylamid/kg KG

Mittelwert \pm Standardabweichung (n = 2; 1 mg Acrylamid/kg KG: 2 Tiere; 0,1 mg, 0,5 mg, 3 mg und 6 mg Acrylamid/kg KG: 3 Tiere; 10 mg Acrylamid/kg KG: 4 Tiere)

Es deutet sich ein exponentieller Zuwachs der *N7*-GA-Guanin-Addukte in allen untersuchten Organen an mit Bestimmtheitsmaßen von $R^2 = 0,98572$ im Lebergewebe, $R^2 = 0,9725$ im Nierengewebe und $R^2 = 0,69013$ im Lungengewebe. Im Gegensatz dazu wurde sowohl in der Ausscheidung von AAMA als auch in der von GAMA ein linearer Anstieg beobachtet (siehe Kapitel 4.2.2.2). Dies lässt darauf schließen, dass eine Entgiftung von Acrylamid und Glycidamid auch im Dosisbereich von 10 mg Acrylamid/kg KG stattfindet.

Die Gruppe um Gamboa da Costa untersuchte die dosisabhängige Bildung von *N7*-GA-Guanin-Addukten in Lebern und Lungen von mit 1 mg, 10 mg oder 50 mg Acrylamid/kg KG i.p. behandelten B6C3F₁-Mäusen. Die Autoren interpretierten ebenfalls einen supralinearen Kurvenverlauf [Gamboa da Costa et al., 2003]. Zeiger und Kollegen untersuchten ebenfalls an Mäusen einen Dosisbereich von 0,125 mg bis 24 mg Acrylamid/kg KG, in dem 11 Datenpunkte abgegriffen wurden. Es wurde ein linearer Anstieg der *N7*-GA-Guanin-Addukte mit zunehmender Dosis festgestellt [Zeiger et al., 2009].

4.2.2 Untersuchung der Mercaptursäuren von Acrylamid und Glycidamid

Die Mercaptursäuren von Acrylamid und Glycidamid, AAMA und GAMA, wurden als zusätzlicher Expositionsbiomarker zu den *N7*-GA-Guanin-Addukten untersucht. Mercaptursäuren sind Abbauprodukte von Glutathionkonjugaten und werden mit dem Urin ausgeschieden. Da es sich bei den Mercaptursäuren um die Hauptmetaboliten von Acrylamid in der Ratte handelt, können sie zur Abschätzung des Ausmaßes der Bildung und Entgiftung von Glycidamid herangezogen werden.

4.2.2.1 Zeitabhängige Bildung von Acrylamid- und Glycidamid-Mercaptursäuren

Im Rahmen der Zeitabhängigkeitsuntersuchungen wurden parallel zu den *N7*-GA-Guanin-Addukten auch die Mercaptursäuren von Acrylamid und Glycidamid untersucht.

Abbildung 4.26 zeigt die absoluten Mercaptursäureausscheidungen der Ratten, die mit 1 mg Acrylamid/kg KG behandelt wurden, im Sammelurin nach 8, 16 und 24 Stunden.

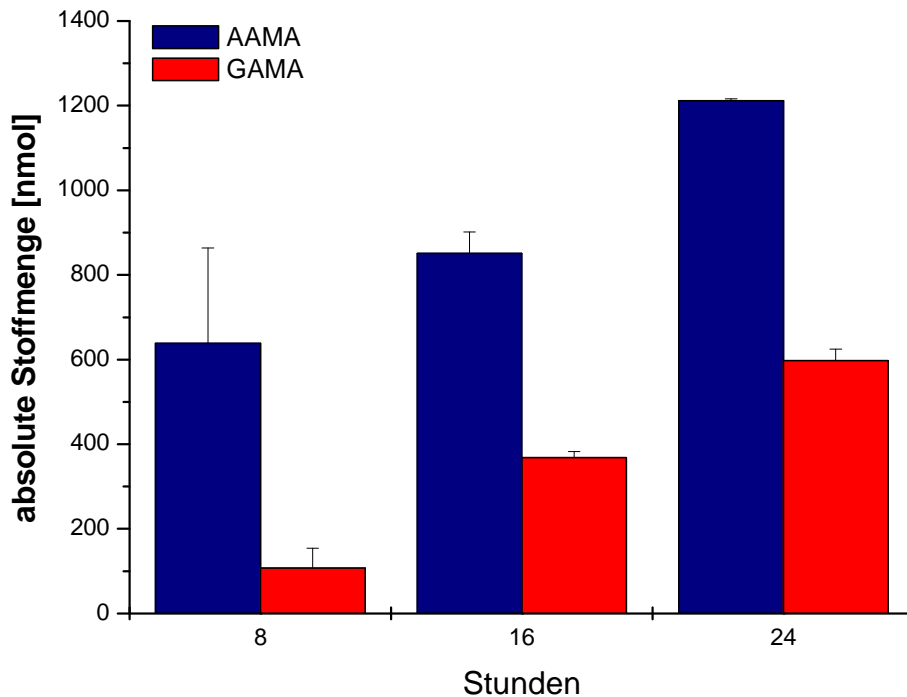


Abbildung 4.26: Acrylamid- und Glycidamid-Mercaptursäureausscheidung der Ratten, die mit 1 mg Acrylamid/kg KG behandelt wurden im 8-, 16- und 24-Stunden-Sammelurin. Mittelwert über zwei Tiere \pm Standardabweichung (n = 2)

In den behandelten Gruppen stiegen die AAMA- und die GAMA-Ausscheidung mit der Zeit an. Im 24-Stunden-Sammelurin wurde die höchste Ausscheidung an AAMA und GAMA detektiert. Innerhalb von 24 Stunden lag die absolute Ausscheidung an AAMA bei $1211,6 \pm 4,7$ nmol und die von GAMA bei $597,3 \pm 27,4$ nmol. Im 16-Stunden-Sammelurin wurden absolute Gehalte von $850,9 \pm 50,5$ nmol AAMA und $368,4 \pm 13,9$ nmol GAMA gemessen. In den ersten 8 Stunden schieden die Ratten $638,6 \pm 225,1$ nmol AAMA und $107,1 \pm 46,8$ nmol GAMA aus. In der Negativkontrolle konnte kein AAMA und GAMA nachgewiesen werden.

Die Abbildung 4.27 zeigt exemplarisch das Chromatogramm der AAMA- und GAMA-Ausscheidung 16 Stunden nach Verabreichung von 1 mg Acrylamid/kg KG.

Ergebnisse und Diskussion

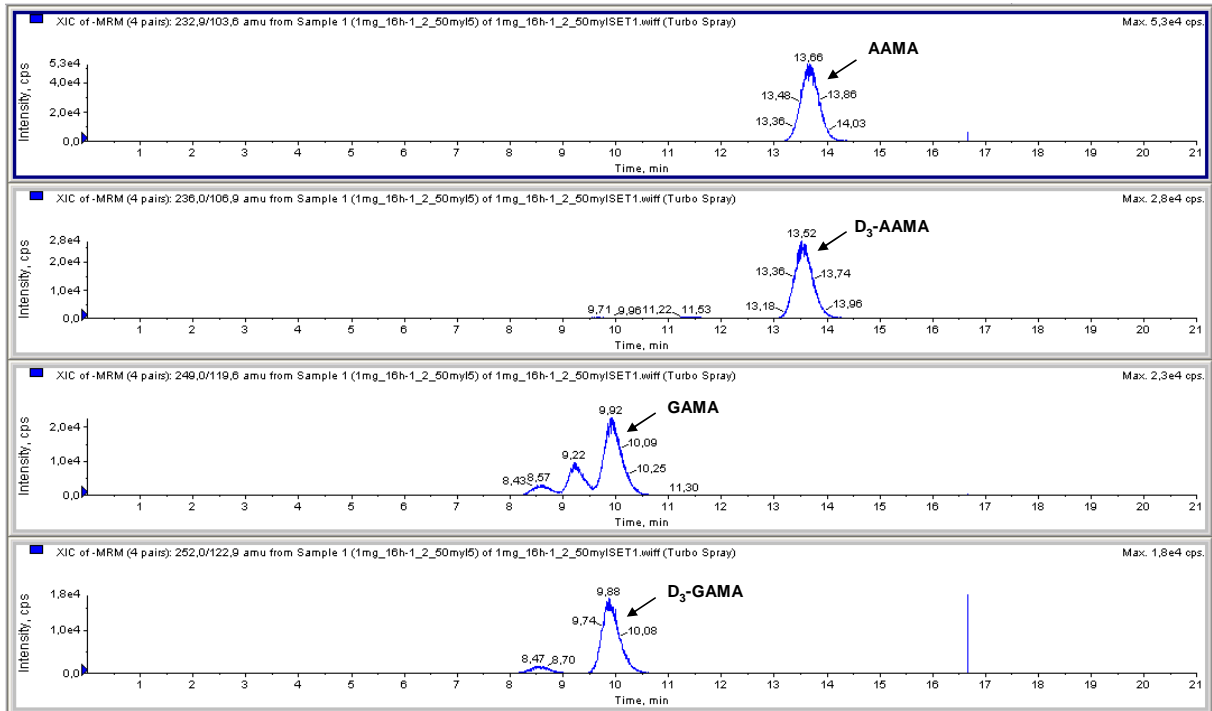


Abbildung 4.27: repräsentatives HPLC-MS/MS-Chromatogramm der AAMA- und GAMA-Ausscheidung im 16-Stunden-Sammelurin einer mit 1 mg Acrylamid/kg KG behandelten weiblichen Sprague-Dawley Ratte

Wie Abbildung 4.28 zeigt, wurden nach Verabreichung von 10 mg Acrylamid/kg KG im 24-Stunden-Sammelurin Absolutmengen von $15747,4 \pm 2131,8$ nmol AAMA und $5571,4 \pm 1535,6$ nmol GAMA gefunden. Innerhalb von 16 Stunden schieden die Ratten $9871,4 \pm 1506,5$ nmol AAMA und $4137,6 \pm 1101,0$ nmol GAMA aus. Im 8-Stunden-Sammelurin der Tiere wurden $6068,4 \pm 1883,7$ nmol AAMA und $1262,3 \pm 239,8$ nmol GAMA detektiert. In der Negativkontrolle dieser Behandlungsgruppe war AAMA im Urin eines der drei Kontrolltiere mit 0,7 nmol messbar. GAMA konnte nicht detektiert werden.

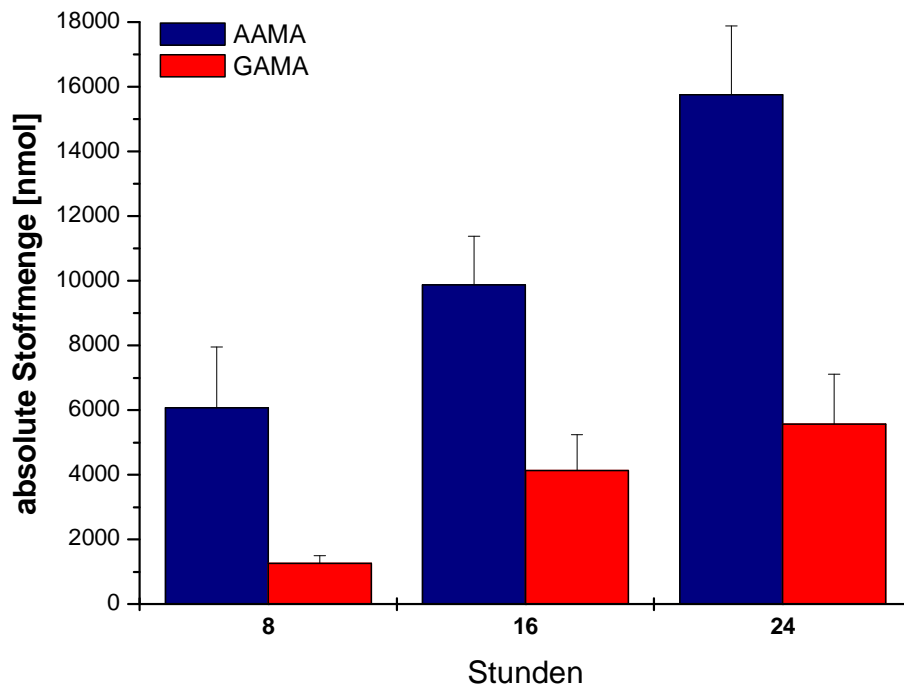


Abbildung 4.28: Acrylamid- und Glycidamid-Mercaptursäureausscheidung der Ratten, die mit 10 mg Acrylamid/kg KG behandelt wurden nach 8, 16 und 24 Stunden.

Mittelwert \pm Standardabweichung (n = 2; nach 8 Stunden: 3 Tiere; nach 16 und 24 Stunden: 4 Tiere)

In Abbildung 4.29 sind die Gesamtmercaptursäureausscheidung der mit 1 mg und 10 mg Acrylamid/kg KG behandelten Ratten sowie die AAMA- und GAMA-Gehalte in Prozent der verabreichten Acrylamid-Dosis aufgetragen.

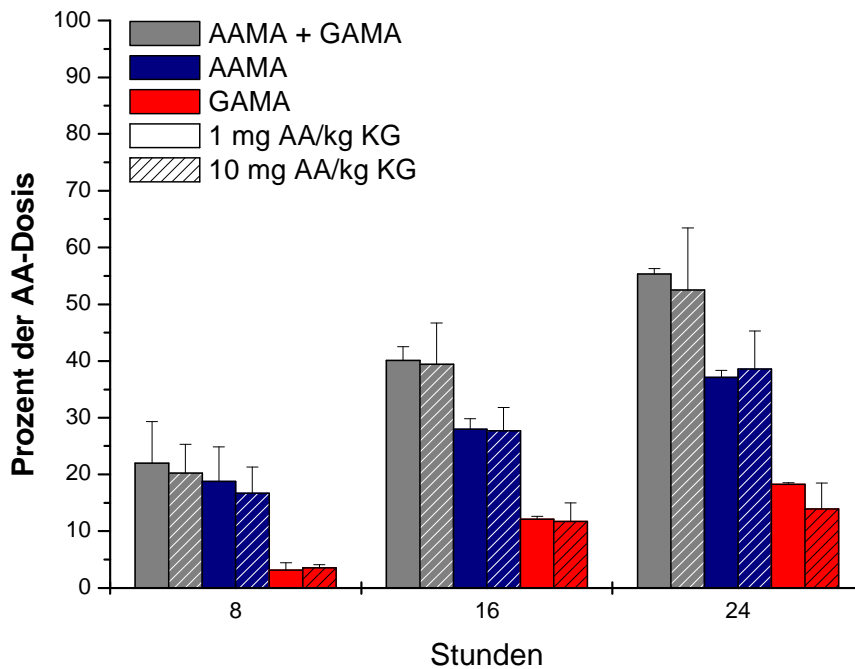


Abbildung 4.29: Ausgeschiedene Menge an AAMA und GAMA in Prozent der verabreichten Dosis im 8-, 16- und 24-Stunden-Sammelurin nach Verabreichung von 1 mg und 10 mg Acrylamid/kg KG an weibliche Sprague-Dawley Ratten

Mittelwert \pm Standardabweichung (n = 2; 1 mg Acrylamid/kg KG: 2 Tiere, 10 mg Acrylamid/kg KG nach 8 Stunden: 3 Tiere; 10 mg Acrylamid/kg KG nach 16 und 24 Stunden: 4 Tiere)

In der mit 1 mg Acrylamid/kg KG behandelten Gruppe wurden im Sammelurin nach 8 Stunden $18,8 \pm 6,1$ %, nach 16 Stunden $28,0 \pm 1,9$ % und nach 24 Stunden $37,1 \pm 1,2$ % als AAMA ausgeschieden. Die wiedergefundene Menge an GAMA belief sich nach 8 Stunden auf $3,2 \pm 1,3$ %, nach 16 Stunden auf $12,1 \pm 0,6$ % und nach 24 Stunden auf $18,3 \pm 0,3$ % der gegebenen Acrylamid-Dosis.

In der 10 mg Acrylamid/kg KG-Gruppe wurden mit $16,7 \pm 4,6$ % nach 8 Stunden, $27,7 \pm 4,1$ % nach 16 Stunden und $38,6 \pm 6,7$ % nach 24 Stunden ähnliche AAMA-Dosisgehalte wie in der 1 mg Acrylamid/kg KG-Gruppe ausgeschieden. An GAMA wurden nach 8 Stunden $3,5 \pm 0,5$ %, nach 16 Stunden $11,7 \pm 3,3$ % und nach 24 Stunden $13,9 \pm 4,6$ % der Acrylamid-Dosis gefunden. Dieses Ergebnis deckt sich ebenfalls weitgehend mit der 1 mg Acrylamid/kg KG-Gruppe.

Die in der Literatur veröffentlichten Daten bestätigen das 24-Stunden-Ergebnis. So wurden nach oraler Verabreichung von Acrylamid-Dosen zwischen 0,1 mg und 50 mg/kg KG im 24-Stunden-Sammelurin von männlichen Ratten Mercaptursäure-Gesamtausscheidungen von 46 % bzw. 54 % [Sumner et al., 1992, 2003], 50 % [Fennell et al., 2005] und 59 % [Doerge et

al., 2007] gefunden. Auch die im Rahmen der FEI-geförderten Tierstudie zur Bioverfügbarkeit von Acrylamid untersuchten männlichen Sprague-Dawley Ratten schieden nach 0,05 mg bzw. 0,1 mg Acrylamid/kg KG-Gabe zwischen 48 und 58 % der verabreichten Acrylamid-Dosis als AAMA und GAMA aus [Berger et al., 2010].

Weibliche F344-Ratten schieden innerhalb von 24 Stunden nach Gabe von 0,1 mg Acrylamid/kg KG per Gavage ebenfalls 50 % der verabreichten Dosis in Form von AAMA und GAMA aus [Doerge et al., 2007]. Dies deutet darauf hin, dass keine signifikanten Unterschiede im Metabolismus von weiblichen und männlichen Ratten hinsichtlich der Entgiftung von Acrylamid und Glycidamid durch Konjugation an GSH bestehen.

In der Literatur wird auch eine Sättigung des oxidativen Metabolismus von Acrylamid zu Glycidamid von Doerge et al., Fennell et al. und Sumner et al. beschrieben. Diese verabreichten Acrylamid mittels Gavage an männliche F344-Ratten und beobachteten Ausscheidungen von 31 % AAMA und 28 % GAMA nach Gabe von 0,1 mg/kg KG [Doerge et al., 2007] sowie 29 % AAMA und 21 % GAMA nach Gabe von 3 mg/kg KG [Fennell et al., 2005]. Nach Verabreichung von 50 mg Acrylamid/kg KG wurde jedoch bei vergleichbarer Mercaptursäure-Gesamtausscheidung eine mit 42 % erhöhte AAMA-Ausscheidung und eine mit 12 % erniedrigte Ausscheidung an GAMA festgestellt [Sumner et al., 2003].

Dieser Effekt konnte in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen bis zu einer Dosis von 10 mg Acrylamid/kg KG nicht beobachtet werden.

Abbildung 4.30 zeigt die GAMA/AAMA-Verhältnisse nach Verabreichung von 1 mg und 10 mg Acrylamid/kg KG.

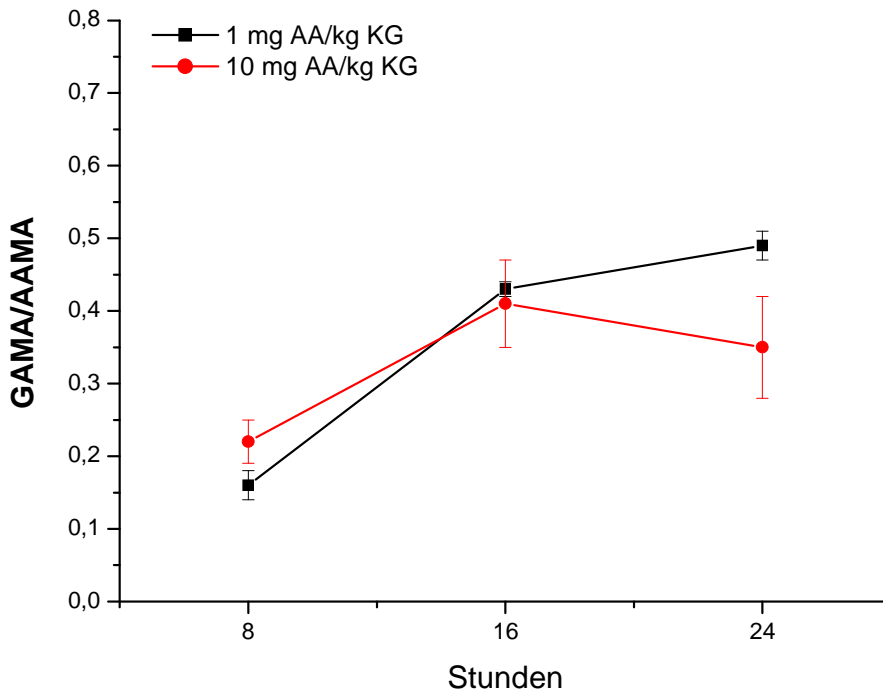


Abbildung 4.30: GAMA/AAMA-Verhältnis 8, 16 und 24 Stunden nach Verabreichung von 1 oder 10 mg Acrylamid/kg KG an weibliche Sprague-Dawley Ratten

Mittelwert \pm Standardabweichung ($n = 2$; 1 mg Acrylamid/kg KG: 2 Tiere, 10 mg Acrylamid/kg KG nach 8 Stunden: 3 Tiere; 10 mg Acrylamid/kg KG nach 16 und 24 Stunden: 4 Tiere)

Das GAMA/AAMA-Verhältnis in der 1 mg Acrylamid/kg KG-Gruppe steigt zwischen acht und 16 Stunden stark an (von 0,16 auf 0,43) und hat einen flacheren Anstieg zwischen 16 und 24 Stunden (von 0,43 auf 0,49). In der 10 mg Acrylamid/kg KG-Gruppe steigt das GAMA/AAMA-Verhältnis zwischen acht und 16 Stunden ebenfalls stark an (von 0,22 auf 0,41). In dieser Gruppe liegt das Maximum des GAMA/AAMA-Verhältnisses allerdings bei 16 Stunden, zwischen 16 und 24 Stunden flacht die Kurve ab (von 0,41 auf 0,35).

Die AAMA- und GAMA-Ausscheidungen in Prozent der verabreichten Dosis lagen in allen Untersuchungszeiträumen für die beiden Behandlungsgruppen auf einem vergleichbaren Niveau. Nur im 24-Stunden-Sammelurin der mit 10 mg Acrylamid/kg KG behandelten Ratten wurde eine im Vergleich zur 1 mg Acrylamid/kg KG-Gruppe verminderte prozentuale Ausscheidung von GAMA beobachtet, wie in Abbildung 4.29 gezeigt. Aufgrund dieser Differenz lässt sich auch der Unterschied im GAMA/AAMA-Verhältnis nach 24 Stunden erklären.

Allerdings wurden in der 1 mg Acrylamid/kg KG-Gruppe nur zwei Tiere pro Zeitpunkt betrachtet. In der 10 mg Acrylamid/kg KG-Gruppe, in der zwar mehr Tiere pro Zeitpunkt untersucht wurden, gab es größere Schwankungen in den Ausscheidungen der einzelnen Tiere ($15,8 \pm 5,7$ ml, Range: 9,0-22,6 ml). Um eine Aussage über eine möglicherweise veränderte Glycidamid-Bildung oder Glycidamid-Entgiftung im höheren Dosisbereich zu treffen, bedarf dieser Befund weiterer Abklärung.

In anderen Studien, in denen 0,1 mg bis 50 mg Acrylamid/kg KG per Gavage an Ratten verabreicht wurden, wurden im 24-Stunden-Sammelurin der Tiere GAMA/AAMA-Verhältnisse von 0,4-0,9 bestimmt [Doerge et al., 2007; Fennell et al., 2005; Sumner et al., 1992]. Im Rahmen der FEI-geförderten Studie zum Einfluss der Lebensmittelmatrix auf die Bioverfügbarkeit wurden nach bis zu neuntägiger Verabreichung von 0,05 mg und 0,1 mg Acrylamid/kg KG/d per Gavage durchschnittliche GAMA/AAMA-Verhältnisse von 0,43 und 0,46 gemessen. In den Ausscheidungen der über Lebensmittel mit 0,05 mg und 0,1 mg Acrylamid/kg KG/d behandelten Tiere wurden mit GAMA/AAMA-Verhältnissen von durchschnittlich 0,72 für die PFG-Gruppe, 0,66 für die PFR-Gruppe und 0,58 für die BK-Gruppe stets höhere Verhältnisse als in den mit Acrylamid im Trinkwasser behandelten Tieren ermittelt [Berger et al., 2010]. Die dazu untersuchten PCR-Proben ließen sich jedoch nicht mit den Mercaptursäure-Ausscheidungen korrelieren (Kapitel 4.1.3).

Auch in den Urinen der Tiere, die einmalig mit 0,45 mg und 0,9 mg Acrylamid/kg KG behandelt wurden, konnten GAMA/AAMA-Verhältnisse von 0,41 und 0,43 im 24-Stunden-Sammelurin festgestellt werden. Lediglich nach Verabreichung von 10 mg Acrylamid/kg KG wurde ein höheres GAMA/AAMA-Verhältnis von 0,62 bestimmt [Berger et al., 2010].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde nach Verabreichung von 1 mg Acrylamid/kg KG an weibliche Sprague-Dawley Ratten ein GAMA/AAMA-Verhältnis von 0,49 detektiert. Dieses ist höher, als das GAMA/AAMA-Verhältnis der mit 0,9 mg Acrylamid/kg KG behandelten männlichen Sprague-Dawley Ratten (0,43). Ein Anstieg des GAMA/AAMA-Verhältnisses nach Gabe von 10 mg Acrylamid/kg KG konnte im 24-Stunden-Sammelurin der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten weiblichen Sprague-Dawley Ratten jedoch nicht festgestellt werden. In dieser Gruppe wurde ein GAMA/AAMA-Verhältnis von 0,35 detektiert. Dieser Unterschied in der hohen Dosisgruppe deutet auf eine stärkere Metabolisierung von Acrylamid zu Glycidamid in männlichen Ratten hin. In Untersuchungen von Doerge et al. zur Gesamtausscheidung von AAMA und GAMA wurden jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen weiblichen und männlichen F344-Ratten festgestellt [Doerge et al., 2007].

Fennell et al. untersuchten die Ausscheidung von Acrylamid-Metaboliten in unterschiedlichen Zeiträumen nach einmaliger oraler Gabe von 0,5 mg, 1 mg oder 3 mg Acrylamid/kg KG in Trinkwasser an männliche Probanden. Dabei wurde gefunden, dass die AAMA-Ausscheidung in allen Dosisgruppen mit 12-14 % der Acrylamid-Dosis innerhalb der ersten

8 Stunden am größten ist, während die GAMA-Ausscheidung mit 0,3-0,4 % der Acrylamid-Dosis zwischen 8 und 16 Stunden maximal ist [Fennell et al., 2006]. Auch Fuhr et al. untersuchten die Ausscheidung von AAMA und GAMA in verschiedenen Zeiträumen nach Gabe von 12,4 µg Acrylamid/kg KG in Kartoffelchips an drei weibliche und drei männliche Probanden. Auch in dieser Studie wurde im Mittel eine maximale AAMA-Ausscheidung nach 6,9 Stunden und eine maximale GAMA-Ausscheidung nach 14,9 Stunden festgestellt [Fuhr et al., 2006]. Diese Beobachtung ist trotz der Metabolismus-Unterschiede zwischen Mensch und Ratte vergleichbar mit den Ergebnissen der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Mercaptursäure-Ausscheidungen. Die mit 1 und 10 mg Acrylamid/kg KG behandelten Ratten schieden mit 19 bzw. 17 % der Acrylamid-Dosis den größten Teil an AAMA innerhalb der ersten 8 Stunden nach Verabreichung der Acrylamid-Dosis aus, während die Ausscheidung von GAMA mit 9 bzw. 8 % der Acrylamid-Dosis zwischen 8 und 16 Stunden maximal war.

4.2.2.2 Dosisabhängige Bildung von Acrylamid- und Glycidamid-Mercaptursäuren

Nach Acrylamid-Gabe wurde die maximale Mercaptursäureausscheidung zwar erst mit dem 24-Stunden-Sammelurin detektiert, die maximale DNA-Adduktbildung deutet sich jedoch bereits nach 16 Stunden an. Da im Rahmen dieser Arbeit der Schwerpunkt auf der Untersuchung von *N7*-GA-Guanin-Addukten lag, erfolgte die Untersuchung der dosisabhängigen Bildung von AAMA und GAMA nach Verabreichung von 0,1 bis 10 mg Acrylamid/kg KG im 16-Stunden-Sammelurin.

Wie in Abbildung 4.31 gezeigt steigt die absolute Ausscheidung von AAMA und GAMA mit zunehmender Dosis linear an. Dies lässt darauf schließen, dass eine effektive Entgiftung von Acrylamid und Glycidamid auch noch im Dosisbereich bis 10 mg Acrylamid/kg KG stattfindet. Im Gegensatz zu den *N7*-GA-Guanin-Addukten konnten die Mercaptursäuren von Acrylamid und Glycidamid auch in den mit 0,1 und 0,5 mg Acrylamid/kg KG behandelten Ratten mit $106,8 \pm 17,4$ nmol bzw. $498,9 \pm 23,7$ nmol AAMA und $48,7 \pm 10,4$ nmol bzw. $308,8 \pm 67,9$ nmol GAMA quantifiziert werden. Damit lag der GAMA-Gehalt im 16-Stunden-Urin der mit 0,5 mg Acrylamid/kg KG behandelten Ratten in einem ähnlichen Bereich, wie der der 1 mg Acrylamid/kg KG-Gruppe, in der $368,4 \pm 13,9$ nmol GAMA, aber $850,9 \pm 50,5$ nmol AAMA gemessen wurden. Im 16-Stunden-Sammelurin der mit 3 mg, 6 mg und 10 mg Acrylamid/kg KG behandelten Ratten wurden $2630,3 \pm 376,1$ nmol, $5299,3 \pm 150,1$ nmol und $9871,4 \pm 1506,5$ nmol AAMA und $1214,9 \pm 203,2$ nmol, $2673,1 \pm 172,5$ nmol und $4137,6 \pm 1101,0$ nmol GAMA absolut ausgeschieden.

In der Negativkontrollgruppe wurden im Urin von fünf der acht Kontrolltiere $2,5 \pm 1,0$ nmol AAMA und im Urin von zwei der acht Kontrolltiere $0,84 \pm 0,5$ nmol GAMA nachgewiesen.

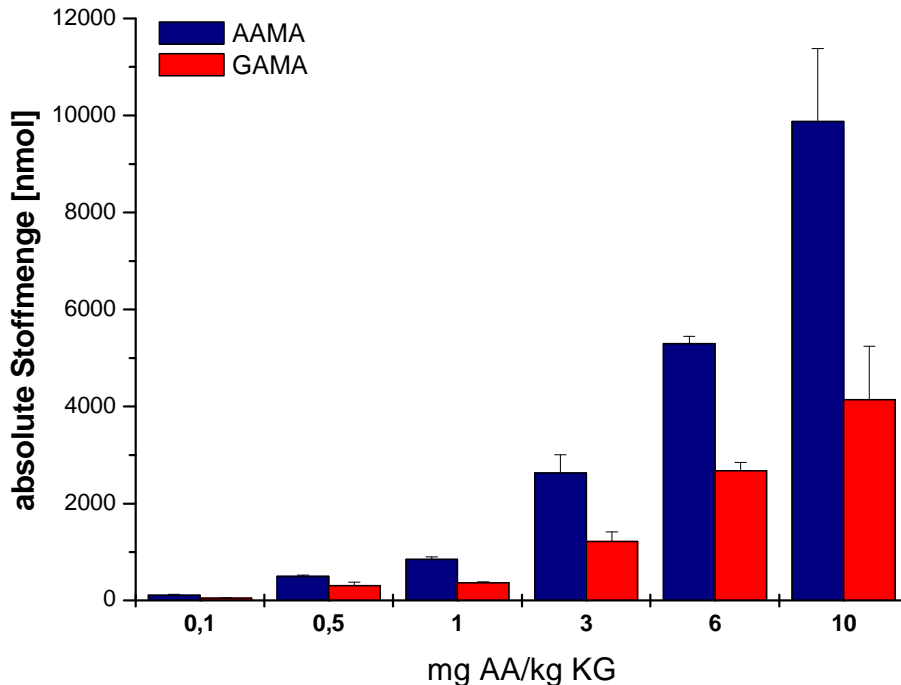


Abbildung 4.31: Absolute Ausscheidung von AAMA und GAMA 16 Stunden nach Verabreichung von 0,1 bis 10 mg Acrylamid/kg KG an weibliche Sprague-Dawley Ratten

Mittelwert \pm Standardabweichung (n = 2; 1 mg Acrylamid/kg KG: 2 Tiere; 0,1 mg, 0,5 mg, 3 mg und 6 mg Acrylamid/kg KG: 3 Tiere; 10 mg Acrylamid/kg KG: 4 Tiere)

Abbildung 4.32 zeigt die AAMA- und GAMA-Ausscheidung in Prozent der verabreichten Acrylamid-Dosis. Die AAMA-Ausscheidung ist in den mit 0,1 mg und 0,5 mg Acrylamid/kg KG behandelten Ratten mit $36,3 \pm 6,2$ % und $35,0 \pm 2,3$ % höher, als in den mit 1-10 mg Acrylamid/kg KG behandelten Ratten, die in einem Bereich von 28-30 % der Dosis schwankt. Auch die GAMA-Ausscheidung ist in den 0,1 und 0,5 mg Acrylamid/kg KG-Gruppen mit $16,5 \pm 3,5$ % bzw. $21,6 \pm 4,3$ % höher, als in den mit mindestens 1 mg Acrylamid/kg KG behandelten Ratten (12-14 %).

Durch die vermehrte Ausscheidung von AAMA und GAMA ergibt sich auch eine höhere Gesamtmercaptursäureausscheidung bei 0,1 mg und 0,5 mg Acrylamid/kg KG (53-57 %), als in den mit 1 bis 10 mg Acrylamid/kg KG dosierten Gruppen (40-44 %).

Im 24-Stunden-Sammelurin der im Rahmen des FEI-geförderten Projektes zur Bioverfügbarkeit von Acrylamid aus Lebensmittelmatrix mit 0,05 mg bis 10 mg Acrylamid/kg KG einmalig per Gavage behandelten Ratten wurde ein solches

Ergebnis nicht beobachtet. Die mit 0,05 mg und 0,1 mg Acrylamid/kg KG behandelten Ratten schieden 40,2 bzw. 46,1 % der Acrylamid-Dosis als Mercaptursäuren aus und die, denen 0,45 mg, 0,9 mg und 10 mg Acrylamid/kg KG gegeben wurde, schieden 60,7 %, 51,7 % und 57,7 % der Acrylamid-Dosis als Mercaptursäuren aus [Berger et al., 2010].

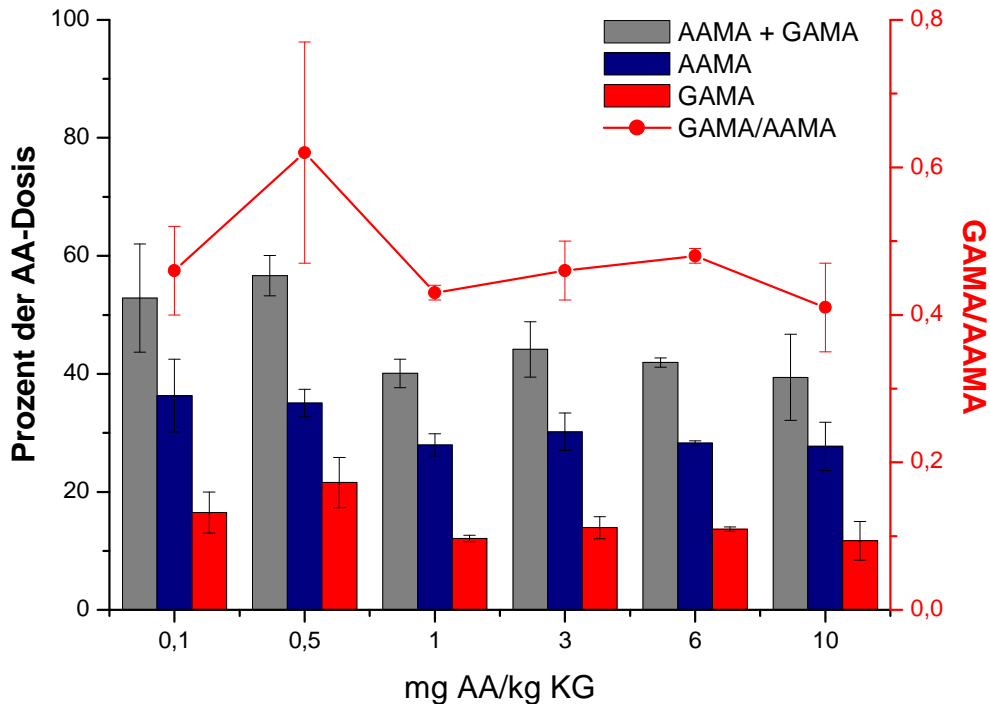


Abbildung 4.32: Ausgeschiedene Menge an AAMA und GAMA in Prozent der verabreichten Dosis und GAMA/AAMA-Verhältnis im 16-Stunden-Sammelurin nach Verabreichung von 0,1 bis 10 mg Acrylamid/kg KG an weibliche Sprague-Dawley Ratten
Mittelwert \pm Standardabweichung (n = 2; 1 mg Acrylamid/kg KG: 2 Tiere; 0,1 mg, 0,5 mg, 3 mg und 6 mg Acrylamid/kg KG: 3 Tiere; 10 mg Acrylamid/kg KG: 4 Tiere)

Das Verhältnis von GAMA zu AAMA liegt generell in einem ähnlichen Bereich. Im 16-Stunden-Sammelurin wurden GAMA/AAMA-Verhältnisse von $0,46 \pm 0,06$ nach Gabe von 0,1 mg Acrylamid/kg KG, $0,43 \pm 0,01$ nach Gabe von 1 mg Acrylamid/kg KG, $0,46 \pm 0,04$ nach Gabe von 3 mg Acrylamid/kg KG, $0,48 \pm 0,01$ nach Gabe von 6 mg Acrylamid/kg KG und $0,41 \pm 0,06$ nach Gabe von 10 mg Acrylamid/kg KG bestimmt. Lediglich in der 0,5 mg Acrylamid/kg KG-Gruppe ist das GAMA/AAMA-Verhältnis mit $0,62 \pm 0,15$ erhöht. In dieser Dosisgruppe wurden allerdings auch starke Schwankungen in den Ausscheidungsraten der Einzeltiere beobachtet ($10,0 \pm 5,3$ ml, Range: 6,0-17,5 ml). Zudem

liegt die absolute GAMA-Ausscheidung nach Gabe von 0,5 mg Acrylamid/kg KG im Bereich der GAMA-Ausscheidung, die in der 1 mg Acrylamid/kg KG-Gruppe gemessen wurde.

4.3 Abschließende Betrachtung

Die genotoxische Wirkung von Acrylamid wurde anhand des Comet Assays und der massenspektrometrischen Bestimmung von *N7*-GA-Guanin-Addukten untersucht. Diese Untersuchung erfolgte in zwei Teilprojekten. Das eine Projekt beschäftigte sich mit der Bioverfügbarkeit von Acrylamid aus der Lebensmittelmatrix. Dazu wurden männliche Sprague-Dawley Ratten im Dosisbereich von 50 bzw. 100 µg Acrylamid/kg KG über einen Zeitraum von maximal neun Tagen mit Acrylamid in Lebensmitteln oder Trinkwasser per Schlundsonde behandelt. Die Probennahme erfolgte nach 24 Stunden. In einem weiteren Versuch wurde einmalig 0,45 und 0,9 mg Acrylamid/kg KG in Trinkwasser per Schlundsonde an jeweils drei Ratten verabreicht, was der kumulativen Dosis der neun Tage entspricht. Außerdem wurden noch zwei Tiere mit 10 mg Acrylamid/kg KG im Trinkwasser über Schlundsonde behandelt.

Der Schwerpunkt des zweiten Projektes lag auf der zeit- und dosisabhängigen Bildung von *N7*-GA-Guanin-Addukten in weiblichen Sprague-Dawley Ratten. Die zeitabhängige Bildung der *N7*-GA-Guanin-Addukte wurde 8, 16 und 24 Stunden nach Verabreichung von 1 und 10 mg Acrylamid/kg KG untersucht. Dabei wurde die Tendenz zu einer maximalen *N7*-GA-Guanin-Adduktbildung nach 16 Stunden beobachtet. Die Untersuchung der dosisabhängigen Bildung erfolgte daher im Dosisbereich von 0,1 bis 10 mg Acrylamid/kg KG zum Zeitpunkt 16 Stunden nach Verabreichung.

Nach Gabe von 50 und 100 µg Acrylamid/kg KG über maximal neun Tage wurde weder in den mit Acrylamid im Trinkwasser noch in den mit Acrylamid im Lebensmittel gefütterten Ratten eine DNA-Schädigung mit dem Comet Assay festgestellt. Auch die Messung der *N7*-GA-Guanin-Addukte in diesem Dosisbereich lag in allen untersuchten Geweben der männlichen und weiblichen Sprague-Dawley Ratten und zu allen untersuchten Zeitpunkten unterhalb der Nachweisgrenze von 1 Addukt/10⁸ Nukleotide. Es wurde auch keine Akkumulierung der *N7*-GA-Guanin-Addukte über den maximalen Behandlungszeitraum von neun Tagen beobachtet. Im parallel dazu untersuchten 24 Stunden-Sammelurin der Tiere wurden ca. 10-25 % der Acrylamiddosis als Glycidamid-Mercaptursäure GAMA und 20-55 % der Acrylamiddosis als Acrylamid-Mercaptursäure AAMA wiedergefunden [Berger et al., 2010]. Insgesamt deutet dies auf eine effiziente Reparatur möglicher DNA-Addukte und eine effektive Entgiftung von Glycidamid hin.

Nach Exposition der Studientiere mit Acrylamid in Pommes Frites und Brotkruste wurde eine Veränderung des Mercaptursäureverhältnisses GAMA/AAMA zu einer stärkeren Bildung von GAMA im Vergleich zur Acrylamid-Aufnahme über Trinkwasser beobachtet [Berger et al., 2010]. Aus diesem Grund wurde eine mögliche Beeinflussung der

fremdstoffmetabolisierenden Gene CYP 2E1 und GST α 2 durch Lebensmittelinhaltsstoffe mittels RT-PCR untersucht. Die Genexpressionsuntersuchungen der RNA aus Rattenlebergewebe der 100 μ g Acrylamid/kg KG/d-Gruppen nach einem, fünf oder neun Tagen Behandlung ergaben jedoch keinen Trend bezüglich einer Beeinflussung von CYP 2E1 und GST α 2. Die Verschiebung des GAMA/AAMA-Verhältnisses in den Lebensmittelgruppen ist also vermutlich nicht auf eine Beeinflussung von fremdstoffmetabolisierenden Enzymen zurückzuführen. Vielmehr deutet das Ergebnis darauf hin, dass Acrylamid langsamer aus der Lebensmittelmatrix resorbiert wird und aus diesem Grund effektiver zu Glycidamid umgesetzt werden kann.

Ab einer Dosis von 0,45 bzw. 0,5 mg Acrylamid/kg KG nach 24 oder 16 Stunden konnten *N7*-GA-Guanin-Addukte nachgewiesen werden, die unterhalb der Bestimmungsgrenze von 3 Addukten/ 10^8 Nukleotide lagen. Auch in diesem Dosisbereich wurden keine mit dem Comet Assay messbaren DNA-Schäden festgestellt.

Quantifizierbare *N7*-GA-Guanin-Addukte wurden nach Verabreichung von 0,9 bzw. 1 mg Acrylamid/kg KG in allen untersuchten Geweben der männlichen und weiblichen Sprague-Dawley Ratten und zu allen untersuchten Zeitpunkten gefunden. Diese lagen 24 Stunden nach Verabreichung von 0,9 mg Acrylamid/kg KG in den Hoden, Nieren, Lebern und Lungen der männlichen Ratten zwischen 9 und 20 Addukten/ 10^8 Nukleotide. Mit dem Comet Assay konnten keine DNA-Schäden in den untersuchten Blut- und Leberzellen festgestellt werden. In den Lebern, Nieren und Lungen der weiblichen Ratten wurden 24 Stunden nach Verabreichung von 1 mg Acrylamid/kg KG zwischen 6 und 17 Addukte/ 10^8 Nukleotide gefunden. Nach 16 Stunden wurden in den Lebern, Lungen und Nieren der weiblichen Sprague-Dawley Ratten zwischen 9 und 19 Addukte/ 10^8 Nukleotide gemessen.

In allen behandelten weiblichen Ratten wurden in den Lebern stets weniger *N7*-GA-Guanin-Addukte gefunden, als in den Nieren und Lungen. Dieser Effekt könnte auf eine stärkere Entgiftung von Glycidamid durch die Konjugation an GSH zurückzuführen sein, das in der Leber mit 7-8 mM in wesentlich höherer Konzentration vorliegt, als in anderen Organen [Tateishi et al., 1977]. Allerdings ist aus der Literatur auch bekannt, dass die Kapazität der DNA-Reparatursysteme in der Leber deutlich größer ist, als in anderen Organen [Jenkins et al., 2005]. In den mit 0,9 mg Acrylamid/kg KG behandelten männlichen Ratten wurde ein solches Ergebnis jedoch nicht gefunden.

Nach einmaliger Verabreichung von 10 mg Acrylamid/kg KG an weibliche Sprague-Dawley Ratten wurde eine Tendenz zur maximalen *N7*-GA-Guanin-Adduktbildung nach 16 Stunden festgestellt. Zu diesem Zeitpunkt wurden zwischen 123 und 237 Addukte/ 10^8 Nukleotide in den Lebern, Lungen und Nieren der Tiere gemessen. Nach 24 Stunden wurden in den

Lebern der Tiere 97 Addukte/10⁸ Nukleotide und in den Nieren und Lungen 165 bzw. 182 Addukte/10⁸ Nukleotide bestimmt. Nach Verabreichung der gleichen Acrylamid-Dosis an zwei männliche Sprague-Dawley Ratten wurden nach 24 Stunden in den Lebern der Tiere im Mittel 68 Addukte/10⁸ Nukleotide gemessen. Andere Organe wurden in dieser Gruppe nicht betrachtet. Nach Verabreichung von 10 mg Acrylamid/kg KG wurde auch eine Erhöhung der DNA-Schäden in Blut- und Leberzellen mittels Comet Assay detektiert.

Ob die Beobachtung, dass die Lebern der weiblichen Tiere mehr Addukte aufweisen, als die Lebern der männlichen Tiere, einen geschlechtsspezifischen Effekt darstellt, bedarf weiterer Abklärung.

Allerdings wurde diese Beobachtung in einem Dosisbereich gemacht, der für die reale Exposition mit Acrylamid im Lebensmittel keine Rolle spielt. Weltweit wird eine durchschnittliche tägliche Aufnahme von 1 µg Acrylamid/kg KG angenommen [JECFA, 2010]. Die niedrigste im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Dosis lag um den Faktor 50 höher und führte zu keinen messbaren *N7*-GA-Guanin-Addukten oder DNA-Schäden.

N7-GA-Guanin-Addukte konnten erst ab einer Dosis detektiert werden, die um den Faktor 450-500 höher lag als die durchschnittliche tägliche Aufnahme des Menschen. Eine Akkumulierung der *N7*-GA-Guanin-Addukte in den Ratten, die mit 50 oder 100 µg Acrylamid/kg KG über neun Tage behandelt wurden, wurde nicht beobachtet. Zudem konnte anhand der Mercaptursäuren von Acrylamid und Glycidamid gezeigt werden, dass im niedrigen untersuchten Dosisbereich von 50 und 100 µg Acrylamid/kg KG eine effiziente Entgiftung von Acrylamid und Glycidamid nach Aufnahme von Acrylamid im Trinkwasser oder Lebensmittel stattfindet [Berger et al., 2010]. Im untersuchten Dosisbereich bis 10 mg Acrylamid/kg KG wurde keine Sättigung der Mercaptursäurebildung festgestellt.

Insgesamt deuten die Ergebnisse auf eine effiziente Reparatur der DNA-Addukte und eine effektive Entgiftung von Acrylamid und Glycidamid im niedrigen Dosisbereich hin.

5 Zusammenfassung

Ein Kernpunkt der Risikobewertung von Acrylamid ist der Abstand zwischen der niedrigsten, genotoxisch wirksamen Konzentration und der unter ungünstigen Bedingungen im Organismus erreichten Konzentration. Dieses Gleichgewicht wird bestimmt durch eine Reihe von Faktoren, zu denen die Freisetzung und Aufnahme von Acrylamid aus dem Lebensmittel, die Metabolisierung von Acrylamid zu Glycidamid, die Entgiftung von Acrylamid und Glycidamid durch Bindung an Glutathion oder unkritische Makromoleküle sowie die Reparatur der geschädigten DNA gehören.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zwei Teilprojekte bearbeitet, die sich mit der Untersuchung der genotoxischen Wirkung von Acrylamid *in vivo* beschäftigten. Als genotoxische Endpunkte wurden DNA-Schäden mit Hilfe des modifizierten Comet Assay sowie *N7*-GA-Guanin-Addukte mittels HPLC-MS/MS untersucht.

Im ersten Teilprojekt wurden zum einen die Einflüsse der Lebensmittelmatrix auf die genotoxische Wirkung von Acrylamid an männlichen Sprague-Dawley Ratten untersucht. Jeweils drei Ratten wurden über maximal neun Tage Acrylamid-Dosen von 50 µg/kg KG/d in Trinkwasser oder Brotkruste bzw. 100 µg/kg KG/d in Trinkwasser (Schlundsonde), geschnittenen und rekonstituierten Pommes Frites sowie Lebkuchen verabreicht. Zusätzlich wurden jeweils drei Tiere einmalig mit einer Dosis von 450 µg bzw. 900 µg Acrylamid/kg KG in Trinkwasser mittels Schlundsonde behandelt, was der maximalen Aufnahmemenge über neun Tage entspricht. Außerdem wurde zwei Tieren einmalig 10 mg Acrylamid/kg KG in Trinkwasser per Schlundsonde verabreicht. Die Tötung der Tiere sowie Blut- und Organentnahme erfolgten 24 Stunden nach der letzten Acrylamid-Gabe.

Die Untersuchung der Genotoxizität erfolgte einerseits anhand von DNA-Schäden in Blut- und Leberzellen mittels Comet Assay. Dieser wurde modifiziert durch eine zusätzliche Behandlung der zu untersuchenden DNA mit dem bakteriellen DNA-Reparaturenzym FPG. Dieses erkennt Formamidopyrimidine und apurinische Stellen und fügt einen Strangbruch ein. Dadurch wird eine sensitivere Erfassung von DNA-Addukten, wie z.B. *N7*-GA-Guanin ermöglicht. Die Untersuchung ergab keine signifikante DNA-Schädigung in den Blut- und Leberzellen der Tiere, die über maximal neun Tage mit 50 µg oder 100 µg Acrylamid/kg KG im Trinkwasser oder Lebensmittel behandelt wurden. Auch die einmalige Verabreichung von 450 µg bzw. 900 µg Acrylamid/kg KG im Trinkwasser führte zu keiner signifikanten Erhöhung der DNA-Schädigung. Lediglich nach der Gabe von 10 mg Acrylamid/kg KG wurden DNA-Schäden in Blut und Leber detektiert.

Daneben wurde *N7*-GA-Guanin, das Hauptaddukt von Glycidamid mit der DNA, mittels HPLC-MS/MS bestimmt. Hierzu wurden die DNA-Addukte mittels neutraler thermischer

Hydrolyse aus der DNA herausgelöst. Die HPLC-Methode wurde im Rahmen dieser Arbeit in der Arbeitsgruppe etabliert. Die Methode bietet gegenüber dem modifizierten Comet Assay, trotz eines vergleichbaren Endpunktes, eine sensitivere Möglichkeit zur Untersuchung von Interaktionen von Glycidamid mit der DNA. Untersucht wurde die Bildung von *N7*-GA-Guanin-Addukten in Leber-, Nieren-, Lungen- und Hoden-DNA. In den Geweben der für maximal neun Tage mit 50 oder 100 µg Acrylamid/kg KG im Trinkwasser oder Lebensmittel behandelten Ratten wurden keine *N7*-GA-Guanin-Addukte detektiert und lagen somit unterhalb der Nachweisgrenze von 1 Addukt/10⁸ Nukleotide. Nach einmaliger Verabreichung von 450 µg Acrylamid/kg KG wurden in allen Organen der behandelten Tiere *N7*-GA-Guanin-Addukte detektiert, die allerdings unterhalb der Bestimmungsgrenze von 3 Addukten/10⁸ Nukleotide lagen. Die einmalige Gabe von 900 µg Acrylamid/kg KG führte im Mittel zu 8-20 Addukten/10⁸ Nukleotide in Lungen, Lebern, Nieren und Hoden der behandelten Tiere. Nach einmaliger Acrylamid-Dosis von 10 mg/kg KG an zwei Ratten wurden in den Lebern der Tiere im Mittel 67,9 ± 14,8 Addukte/10⁸ Nukleotide gemessen. Weitere Organe wurden in dieser Dosisgruppe nicht untersucht.

Die Expression von fremdstoffmetabolisierenden Enzymen auf RNA-Ebene wurde mittels semiquantitativer Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion beobachtet. Es wurde untersucht, inwieweit sich die Expression von CYP 2E1 oder GSTα2 im Verlauf der Acrylamid-Behandlung der Ratten verändert und ob es Unterschiede gibt zwischen der Behandlung mit Acrylamid im Trinkwasser per Schlundsonde und Acrylamid im Lebensmittel, da nach Exposition der Studientiere mit Acrylamid in Pommes Frites und Brotkruste eine Veränderung des Mercaptursäureverhältnisses GAMA/AAMA zu einer, im Vergleich zur Acrylamid-Aufnahme über Trinkwasser, stärkeren Bildung von GAMA beobachtet wurde [Berger et al., 2010]. Während des Versuchszeitraums von maximal neun Tagen wurden lediglich Tendenzen zur Erhöhung oder Erniedrigung der CYP 2E1- und GSTα2-Expressionen in den Behandlungsgruppen festgestellt. Diese ließen jedoch nicht auf einen modulierenden Effekt von Lebensmittelinhaltsstoffen schließen und sich auch nicht mit den von Berger et al. gemessenen Mercaptursäure-Ausscheidungen korrelieren. Vermutlich lässt sich die höhere Ausscheidung von GAMA in den Lebensmittelgruppen mit der langsameren Aufnahme von Acrylamid aus der Lebensmittelmatrix erklären, die zu einer effektiveren Metabolisierung von Acrylamid zu Glycidamid führen kann.

In einer weiteren Studie wurde an weiblichen Sprague-Dawley Ratten eine zeit- und dosisabhängige Bildung von *N7*-GA-Guanin-Addukten untersucht. Dazu wurde zum einen der Zeitpunkt nach Acrylamid-Verabreichung bestimmt, an dem die meisten *N7*-GA-Guanin-Addukte im Gewebe vorliegen. Untersucht wurden Lebern, Nieren und Lungen der Tiere 8, 16 und 24 Stunden nach Verabreichung von 1 mg und 10 mg Acrylamid/kg KG. Es wurde

eine Tendenz zur maximalen *N7*-GA-Guanin-Adduktbildung 16 Stunden nach Dosierung mit 10 mg Acrylamid/kg KG festgestellt. Die Ergebnisse der mit 1 mg Acrylamid/kg KG behandelten Tiere deuten auf eine maximale Adduktbildung nach 16 oder 24 Stunden hin. Aus diesem Grund erfolgte die Untersuchung der dosisabhängigen *N7*-GA-Guanin-Bildung im Dosisbereich von 0,1 mg bis 10 mg Acrylamid/kg KG 16 Stunden nach Verabreichung von Acrylamid. Als weitere Biomarker wurden die Mercaptursäuren von Acrylamid und Glycidamid im Urin der Tiere bestimmt. Diese ermöglichen eine Abschätzung des Ausmaßes der Entstehung von Glycidamid und der Entgiftung von Acrylamid und Glycidamid.

Die absolute Mercaptursäureausscheidung stieg linear mit der Zeit in beiden Untersuchungsgruppen an und war im 24-Stunden-Sammelurin am größten. Die Ergebnisse der gemessenen Mercaptursäuren zeigen insgesamt, dass 53-55 % der Acrylamiddosis von 1 und 10 mg/kg KG innerhalb von 24 Stunden als Mercaptursäuren ausgeschieden werden und dadurch eine effektive Entgiftung von Acrylamid gewährleistet ist. Anhand der ausgeschiedenen GAMA-Menge lässt sich rückschließen, dass 14-18 % der verabreichten 1 und 10 mg Acrylamid/kg KG innerhalb von 24 Stunden zu Glycidamid metabolisiert werden. Allerdings bleibt dabei die Menge an freiem Glycidamid sowie Glyceramid im Urin unberücksichtigt. Berger et al. fanden nach oraler Verabreichung von 0,1 mg Acrylamid ca. 2 % freies Glycidamid im Urin der behandelten Sprague-Dawley Ratten, während Doerge et al. nach oraler Verabreichung von 0,1 mg Acrylamid/kg KG an Fischer 344 Ratten 6 % freies Glycidamid und 1,6 % Glyceramid im Urin fanden [Berger et al., 2010; Doerge et al., 2007]. Die Untersuchung der Mercaptursäuren im 16-Stunden-Sammelurin nach Gabe von 0,1 bis 10 mg Acrylamid/kg KG zeigte, dass die absolute Ausscheidung von AAMA und GAMA linear mit der Dosis ansteigt.

Die dosisabhängige Bildung von *N7*-GA-Guanin-Addukten wurde 16 Stunden nach Verabreichung von Acrylamiddosen zwischen 0,1 mg und 10 mg/kg KG untersucht. Die *N7*-GA-Guanin-Addukte konnten erst ab einer Dosis von 1 mg Acrylamid/kg KG in der DNA der Tiere quantifiziert werden. Die Adduktbildung in der 0,1 mg Acrylamid/kg KG-Gruppe lag unterhalb der Nachweisgrenze, während die Addukte in der 0,5 mg Acrylamid/kg KG-Gruppe zwar nachweisbar, aber nicht quantifizierbar waren. Im Bereich von 1 bis 10 mg Acrylamid/kg KG wurde ein dosisabhängiger Anstieg der *N7*-GA-Guanin-Addukte beobachtet.

6 Methoden und Materialien

6.1 Fütterungsstudie an der Ratte

Die Fütterungsstudie wurde im Rahmen des Projektes „Umsetzung neuer Verfahrensabläufe in Produktionsanlagen für Kartoffel- und Getreideerzeugnisse mit reduzierten Gehalten an Acrylamid und dessen Folgeprodukten“ (Projekt-Nr.: AiF 209 ZBG) in Kooperation mit Prof. Dr. Gert Fricker vom Institut für pharmazeutische Technologie der Ruprecht-Karls Universität Heidelberg durchgeführt.

6.1.1 Spezifikation der Acrylamid-haltigen Lebensmittel

Die aus Kartoffeln geschnittenen Pommes Frites (PFG) bzw. aus Kartoffelerzeugnissen rekonstituierten Pommes Frites (PFR) wurden vom Deutschen Institut für Lebensmitteltechnik (DIL) hergestellt. Die verwendete Brotkruste (BK) und der Lebkuchen (LK) stammten vom Institut für Lebensmittel- und Umweltforschung (ILU) in Nuthetal (Abbildung 6.1).



Abbildung 6.1: Verwendete Lebensmittel zur Durchführung der Acrylamid-Fütterungsstudie

a: Lebkuchen (LK), b: Pommes Frites geschnitten (PFG), c: Pommes Frites rekonstituiert (PFR), d: Brotkruste (BK)

Die Lebkuchen wurden nach einer Standardrezeptur für einfache braune Lebkuchen hergestellt. Dazu wurde ein Grundteig aus Weizenmehl (Type 550, 21,7 %), Roggenmehl (Type 1150, 9,3 %), Invertzuckercreme (25,2 %), Glucosesirup (2,8 %), 10 %-iger Milchsäure (2 %), Wasser (23,6 %), Gewürz (9,4 %), ABC-Trieb (3,6 %) und Pottasche (2,4 %) gemischt. Der Teig wurde zu einem Band mit 5 mm Dicke ausgerollt und rechteckige Teigstücke mit einem Gewicht von ca. 40 g ausgestochen. Die Teigstücke wurden anschließend in einem Etagenbackofen (Oberhitze 190°C/Unterhitze 160°C) für 20 Minuten gebacken.

Zur Herstellung der geschnittenen Pommes Frites wurden Speisekartoffeln (Wernsing GmbH, Addrup) zu Stäbchen geschnitten und lauwarm gewässert. Anschließend wurden die Stäbchen mit einem Fön getrocknet (ca. 3 Minuten in flacher Schicht, Oberfläche trocken) und in 300 g Portionen für 2 Minuten bei 180 °C frittiert (Frymaster, Enodis, Eschborn). Die rekonstituierten Pommes Frites wurden aus einem Teig von 30 % Kartoffelflocken (Emslandstärke, Emlichheim), 20 % Kartoffelgranulat (Emslandstärke, Emlichheim) und 50 % Leitungswasser hergestellt. Nach dem Ausrollen des Teiges auf eine Dicke von 8 mm erfolgte, zum Ausgleich der internen Wasserverteilung, eine zweistündige Teigruhe. Anschließend wurde der Teig in Stäbchen geschnitten ($\varnothing = 8$ mm) und in 300 g Portionen für 3 Minuten bei 175°C frittiert (Frymaster, Enodis, Eschborn). Die fertig frittierten Pommes Frites wurden unmittelbar nach der Herstellung eingefroren und unter Einbeziehung aller Chargen gemischt (jeweils ca. 3 kg Endprodukt).

Zur Generierung möglichst hoher Acrylamid-Gehalte in der Brotkruste erfolgte der Einsatz von Roggenvollkornmehl verbunden mit einer längeren Backzeit (60 min; Temperaturgradient von 250 °C auf 210 °C), sowie der Zusatz von Invertzuckercreme (3 % auf Gesamtmehl) und ABC-Trieb (1 % auf Gesamtmehl). Die Eingangsbestimmung der Acrylamid-Gehalte erfolgte durch die herstellenden Institute, Kontrollmessungen wurden von Eurofins Analytik, Hamburg durchgeführt.

Die ermittelten Gehalte der geschnittenen und rekonstituierten Pommes Frites (PFG und PFR) sowie Brotkruste (BK) sind in Tabelle 6.1 aufgeführt. Nach Erhalt der Lebensmittel und nach dreimonatiger Lagerung bei -20 °C wurden weitere Kontrollmessungen durchgeführt (Eurofins Analytik, Hamburg). Die Daten belegen, dass der Acrylamid-Gehalt der Lebensmittel PFR, PFG und BK sich während der Lagerung nicht signifikant verändert. Zur Durchführung der Fütterungsversuche wurden für die geschnittenen und rekonstituierten Pommes Frites Acrylamid-Gehalte von 2800 µg/kg sowie für Brotkruste von 1400 µg/kg angenommen.

Tabelle 6.1: AA-Gehalte in Pommes Frites, aus der Kartoffel geschnitten (PFG) oder aus Kartoffelprodukten rekonstituiert (PFR) und Brotkruste (BK)

	Hersteller [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	eurofins [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	eurofins [$\mu\text{g}/\text{kg}$]
Datum	06/07	06/07	09/07
PFG	2841 (DIL)	2800	2900
PFR	2847 (DIL)	2600	2800
BK	1294 (ILU)	1400	1400

Für den Acrylamid-Gehalt des Lebkuchens wurden, trotz mehrmalig durchgeführter Kontrollmessungen, stark unterschiedliche Werte ermittelt (Tabelle 6.2). Die in den jeweiligen Messungen untersuchten Lebkuchen stammten jeweils aus der gleichen Probe und waren gleich behandelt. Dazu wurden repräsentative Stichproben in flüssigem Stickstoff tiefgefroren, pulverisiert und anschließend auf Trockeneis an die jeweiligen Institute verschickt.

Tabelle 6.2: ermittelte AA-Gehalte des Lebkuchens

(A: Institut für Lebensmittel- und Umweltforschung, Nuthetal; B: Eurofins Analytik, Hamburg; C: Deutsches Institut für Lebensmitteltechnik e.V., Potsdam Rehbrücke; D: Lehrstuhl für Lebensmittelchemie, Technische Universität München, Garching; E: Zentrallabor der deutschen Süßwarenindustrie, Bonn)

Datum	Institut	Acrylamid-Gehalt [$\mu\text{g}/\text{kg}$]
02/07	A	3181
06/07	B	3600
07.09.07		4100
12.09.07		4500, 4700
10/07	A	3550
	C	3700
	D	4200
	E	4250
11/07	D	LC-MS: 3500, 3700; GC-MS: 5400
05/08	C	4100
	A	3500
	D	LC-MS: 4000; GC-MS: 3700
11/08	Berger, 2010	LC-MS: 6321 ± 49

In Abhängigkeit von den Analysenergebnissen wurden zur Durchführung der Fütterungsversuche für den AA-Gehalt des Lebkuchens unterschiedliche Werte angenommen (Tabelle 6.3).

Tabelle 6.3: mittlere AA-Gehalte des Lebkuchens zur Durchführung der Fütterungsversuche in Abhängigkeit der Analysenergebnisse

Fütterungszeitraum [d]	Acrylamid-Gehalte [$\mu\text{g}/\text{kg}$]
1	5400
3	3200
5	5400
7	3400
9	4063

6.1.2 Konditionierung der Tiere

Die männlichen Sprague-Dawley Ratten (CrI:CD(SD); 6-8 Wochen alt; Körpergewicht ~ 250 g) wurden nach Eintreffen und Anpassung an die Umgebungsbedingungen (22 °C; Tag-Nacht Rhythmus) über 10 Tage mit einer Acrylamid-armen Standarddiät (ssniff Spezialdiät; Bestimmung der AA-Gehalte durch EUROFINS Hamburg: < 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$) an die Futteraufnahme und den Fresszyklus (bestimmte Menge in definiertem Zeitraum) im Stoffwechselkäfig gewöhnt. Nach Nüchternsetzen der Tiere über Nacht im Gemeinschaftskäfig wurde jeweils an Einzeltiere im Stoffwechselkäfig 15 g Pelletfutter (Acrylamid-arm) verfüttert. Für die vollständige Futteraufnahme wurde ein Zeitraum von drei Stunden gewährt. Danach wurden die Tiere wieder in die Gemeinschaftshaltung zurück verbracht und erhielten jeweils weitere 10 g Standarddiät pro Tier.

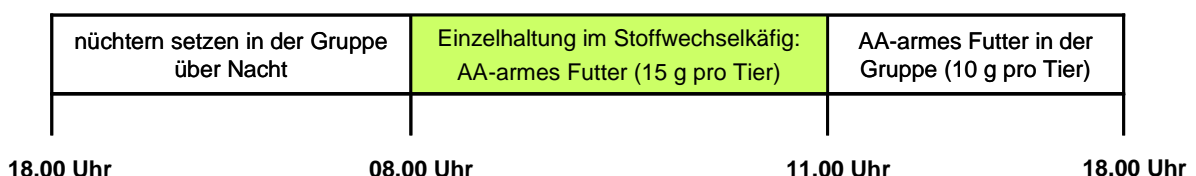


Abbildung 6.2: Verlauf der Konditionierung

6.1.3 Behandlung der Tiere in der Hauptstudie

Pro Fütterungsperiode wurden jeweils 3 Tiere (Körpergewicht: 287 ± 16 g) aus den Gruppen Trinkwasserkontrolle (AA-TW), Lebkuchen (LK), Pommes Frites geschnitten (PFG) und Pommes Frites rekonstituiert (PFR) (Tabelle 6.4) mit $100 \mu\text{g}$ Acrylamid/kg KG gleichzeitig behandelt. In der Brotkruste konnten auch nach Variation der Rezeptur (Zusatz von ABC-Trieb und von reduzierenden Kohlenhydraten) und des Backprozesses (Institut für Lebensmittel- und Umweltforschung, Nuthetal) lediglich Gehalte von maximal $1400 \mu\text{g}$ Acrylamid/kg generiert werden. Die täglich zugeführte Dosis wurde deshalb bei Brotkruste (BK) auf $50 \mu\text{g}$ Acrylamid/kg KG reduziert und die Trinkwasserkontrolle (AA-TW) entsprechend angepasst. Bei den durchgeführten Versuchen wurden jeweils drei Tiere als Negativkontrolle (TW) mitgeführt.

Tabelle 6.4: Behandlungsgruppen

	Kontrolle (TW)	AA-haltiges Trinkwasser (AA-TW)	Pommes frites geschnitten (PFG)	Pommes frites rekonstituiert (PFR)	Lebkuchen (LK)	Brotkruste (BK)
AA-Gehalte [$\mu\text{g}/\text{kg}$]			2800	2800	3200-5400	1400
Tägliche AA-Dosis [$\mu\text{g}/\text{kg KG}$]		50 bzw. 100	100	100	100	50
Behandlung im Stoffwechselkäfig	Trinkwasser und Standarddiät ad lib.	Trinkwasser ad lib.				

Während des Behandlungszyklus in der Hauptstudie (Abbildung 6.3) wurden die Tiere täglich gewogen, um die zu verabreichende Menge an Acrylamid-haltigem Lebensmittel bzw. Trinkwasser für die exakte Dosierung ermitteln zu können. Anschließend wurden die Tiere im Stoffwechselkäfig mit 4-11 g der Lebensmittel gefüttert. Die Futteraufnahme erfolgte innerhalb eines Zeitraumes von drei Stunden. Die Acrylamid-Dosis wurde den über Nacht nüchtern gesetzten Tieren der AA-TW-Gruppe über zwei Schlundsondierungen (unter leichter Isofluran-Narkose zur schonenden Applikation) zum Zeitpunkt 0 und 1,5 Stunden nach Beginn der Fütterung verabreicht (je ca. $0,5 \text{ ml}$ einer $17 \mu\text{g}/\text{ml}$ bzw. $25 \mu\text{g}/\text{ml}$ AA-Trinkwasserlösung), um die Acrylamid-Aufnahme zeitlich den Fütterungsbedingungen anzunähern. Anschließend erhielten die Tiere noch 15 g AA-arme Standarddiät (AA-TW-Gruppe: 25 g) im Gemeinschaftskäfig. Art und Sequenz der Behandlung war für alle Gruppen gleich.

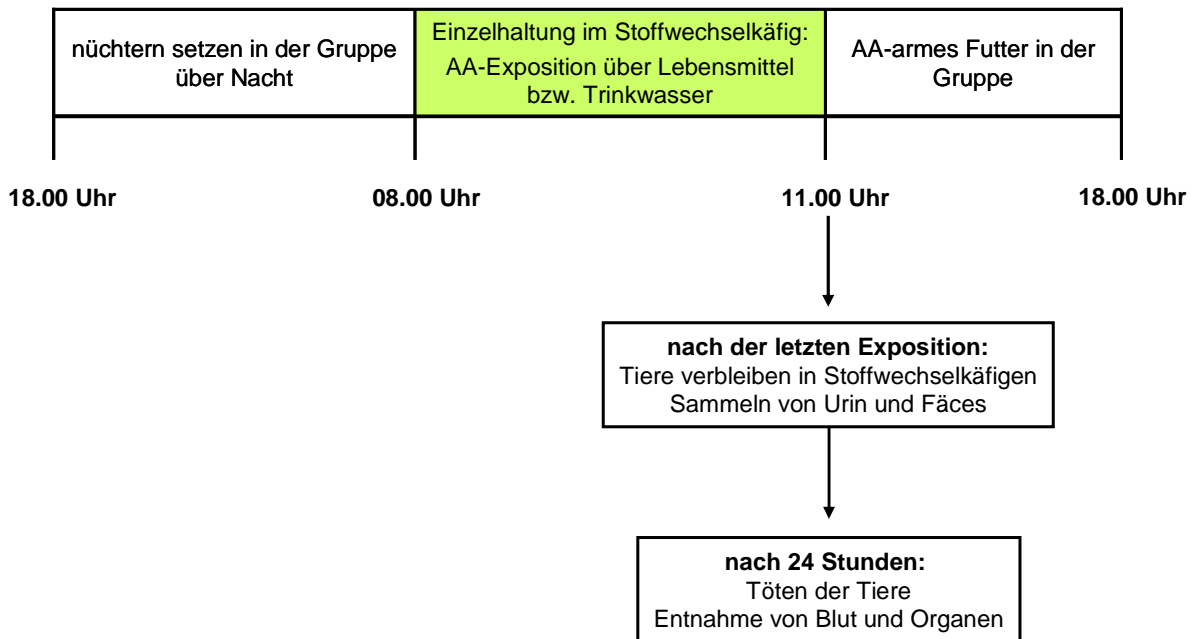


Abbildung 6.3: Zeitzyklus der Fütterungsversuche

Nach der letzten Exposition verblieben die Versuchstiere zum Sammeln von Urin und Fäces in ihren Stoffwechselkäfigen und erhielten Acrylamid-arme Standarddiät und Trinkwasser ad lib. Nach 24 Stunden wurden die Versuchstiere durch cervikale Dislokation getötet und Blut und Organe entnommen. Die Gewebeproben zur Untersuchung der Genexpression und der DNA-Adduktbildung wurden in RNALater bzw. 20 % DMSO (v/v) gegeben, sofort auf Trockeneis gestellt und bei -80 °C gelagert. Für den Comet Assay wurden Blut und Lebergewebe sofort verarbeitet, wie in Kapitel 4.1.2 beschrieben.

6.1.4 Kumulative Dosis (450 bzw. 900 µg Acrylamid/kg KG) und 10 mg Acrylamid/kg KG

Nach dem Nüchternsetzen der Versuchstiere über Nacht wurde die kumulative Dosis aus der Fütterungsstudie (450 bzw. 900 µg Acrylamid/kg KG) an jeweils drei Versuchstiere durch Schlundsondierung mit ca. 0,5 ml (in Abhängigkeit von der Körpermasse) einer 250 µg/ml bzw. 500 µg/ml Acrylamid-Trinkwasserlösung verabreicht. 10 mg Acrylamid/kg KG wurden zwei Versuchstieren durch Schlundsondierung mit jeweils ca. 0,5 ml einer 5 mg/ml Acrylamid-Trinkwasserlösung appliziert. Die jeweiligen Schlundsondierungen wurden unter leichter Isofluran-Narkose durchgeführt. Die Versuchstiere verblieben für 24 Stunden im Stoffwechselkäfig um Urin und Fäces zu sammeln. Anschließend wurden sie durch cervikale Dislokation getötet und Blut sowie Organe entnommen. Die Gewebeproben zur

Untersuchung der DNA-Adduktbildung wurden in 20 % DMSO (v/v) gegeben, sofort auf Trockeneis gestellt und bei -80 °C gelagert. Für den Comet Assay wurden Blut und Lebergewebe sofort verarbeitet, wie in Kapitel 4.1.2 beschrieben.

Das Versuchsprotokoll entsprach im Übrigen der Behandlung mit Acrylamid-haltigem Trinkwasser in der Hauptstudie (Kapitel 6.1.3).

6.1.5 Einfluss von Isofluran auf den Metabolismus von Acrylamid

Um den Einfluss des zur Narkotisierung verwendeten Isoflurans auf den Metabolismus von Acrylamid zu untersuchen, erhielten vier Versuchstiere an zwei aufeinanderfolgenden Tagen jeweils 100 µg Acrylamid/kg KG. Nach dem Nüchternsetzen der Versuchstiere über Nacht wurde die tägliche Dosis durch zwei Schlundsondierungen zum Zeitpunkt 0 und 1,5 Stunden mit ca. 0,5 ml (in Abhängigkeit von der Körpermasse) einer 25 µg/ml Acrylamid-Trinkwasserlösung appliziert. Bei zwei Versuchstieren wurden die jeweiligen Schlundsondierungen nach leichter Isofluran-Narkose durchgeführt, die beiden anderen Tiere wurden ohne Narkotisierung behandelt. Die Mercaptursäuren wurden nach den jeweiligen Applikationen im 24 Stunden Sammelurin bestimmt. Die Entnahme von Blut erfolgte 24 Stunden nach der letzten Applikation. Dieses wurde für den Comet Assay wie in Kapitel 6.4 beschrieben weiterverarbeitet.

6.2 Studie zur zeit- und dosisabhängigen Bildung von N7-Glycidamid-Guanin-Addukten und Mercaptursäuren in der Ratte

Die Haltung und Behandlung der Versuchstiere erfolgte im Tierhaus der TU Kaiserslautern. Verwendet wurden weibliche Sprague-Dawley Ratten, (CrI:CD(SD); 8-10 Wochen alt; Körpergewicht ~ 220 g). Nach dem Eintreffen und Anpassung an die Umgebungsbedingungen (22 °C; Tag-Nacht Rhythmus) wurden sie über fünf Tage an die Haltung im Stoffwechsellkäfig gewöhnt, indem sie täglich drei Stunden in den Stoffwechsellkäfigen verbrachten. Anschließend wurden sie wieder in die Gemeinschaftskäfige umgesetzt.

Am Abend vor der Behandlung wurden die Tiere in der Gemeinschaftshaltung Nüchterngesetzt. Um die genaue Dosierung zu bestimmen, wurden die Ratten vor der Applikation gewogen. Anschließend wurden sie im Exsikkator mit ca. 5 ml Isofluran, das auf Zellstofftücher aufgebracht war, innerhalb von 60 Sekunden narkotisiert. Die Schlundsondierung erfolgte mit 0,1-10 mg Acrylamid/kg KG in ca. 0,5 ml Acrylamid-Lösung (0,05 bis 5 mg Acrylamid/ml). Im Stoffwechsellkäfig erhielten die Tiere Trinkwasser und Acrylamid-arme Standarddiät ad lib. Der Urin der Ratten wurde über 8 bis 24 Stunden gesammelt. Die Tötung der Tiere erfolgte 8 bis 24 Stunden nach der Acrylamid-Applikation durch cervikale Dislokation. Anschließend wurden die Organe zur weiteren Untersuchung entnommen. Für jede Dosisgruppe wurde auch eine Negativkontroll-Gruppe mitgeführt, die, abgesehen von der Acrylamid-Applikation, analog behandelt wurde.

6.3 Genexpressionsuntersuchungen

Die während der Tierstudie entnommenen Leberproben wurden bis zur RNA-Isolierung im Biofreezer bei -80 °C gelagert.

6.3.1 RNA Isolierung

Die RNA-Isolierung erfolgte mit Hilfe des peqGOLD Total RNA Kit der Firma peqlab. Pro Probe wurden ca. 25 mg Leber in ein Precellys-Röhrchen mit Keramikkügelchen (2 ml) eingewogen und mit 400 µl TRK-Lyse-Puffer versetzt. Das Lebergewebe wurde dann mit einem Precellys-Homogenisator zerkleinert (2 x 20 Sekunden). Gegen den Schaum der sich während der Homogenisation gebildet hatte wurde 50 µl Isopropanol zugegeben. Anschließend wurde das Homogenat auf eine Shredder-Säule in einem Zentrifugenröhrchen (2 ml) gegeben und 1 Minute bei 12.000 x g zentrifugiert. Der Säulendurchfluss wurde mit 600 µl 70 %-igem Ethanol (v/v) versetzt, mit der Pipette resuspendiert und auf eine HiBind-Säule in einem Zentrifugenröhrchen (2 ml) gegeben. Die Probe wurde 1 Minute bei 10.000 x g zentrifugiert und der Säulendurchfluss verworfen. Dann wurde die Säule zunächst durch Zugabe von 500 µl RNA-Waschpuffer I und Zentrifugieren für 15 Sekunden bei 10.000 x g gewaschen. Anschließend wurde noch zweimal mit je 600 µl RNA-Waschpuffer II und Zentrifugieren für 15 Sekunden bei 10.000 x g gewaschen. Der Säulendurchfluss wurde jeweils verworfen. Dann wurde die HiBind-Säule durch Zentrifugieren bei 10.000 x g für 2 Minuten getrocknet. Zur Elution wurde die HiBind-Säule in ein frisches Sammelröhrchen (1,5 ml) gesteckt. Die RNA wurde mit 50 µl RNase freiem dH₂O durch zentrifugieren für 1 Minute bei 5.000 x g eluiert.

Der RNA-Gehalt und die Reinheit der Proben wurden mittels NanoDrop ND-1000 bestimmt. Jede Probe wurde auf eine Konzentration von 200 ng RNA/12,5 µl mit dH₂O eingestellt und erneut am NanoDrop vermessen.

6.3.2 reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Die PCR wurde mit dem peqGOLD „Single Tube“ RT-PCR-Kit von peqlab durchgeführt. Der PCR-Mastermix für einen Ansatz enthält 5 µl 5x-Reaktionspuffer, 2,5 µl dNTP-Mix (5 mM), 2 µl Forward Primer, 2 µl Reverse Primer und 1 µl Enzym. Zu diesem Ansatz wurden 200 ng RNA in 12,5 µl dH₂O gegeben. Anschließend wurden die Proben gevortext und in den Thermocycler gestellt. Tabelle 6.5 zeigt das verwendete PCR-Protokoll.

Tabelle 7.6: PCR-Temperatur-Protokoll (T_A : spezifische Annealing-Temperatur der Primer)

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit	Zyklen
1	65	5 min	1
2	4	3 min	1
3	42	45 min	1
4	95	10 min	1
5	95	30 s	30
	T_A	30 s	
	72	30 s	
6	72	5 min	1
7	4	∞	1

Nach der PCR wurden die Proben entweder direkt mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und detektiert, oder bei -80 °C bis zur Gelelektrophorese gelagert.

6.3.3 Primervalidierung

Vor der Durchführung der PCR musste die Annealing-Temperatur der spezifischen Primer optimiert werden. Dazu wurde das PCR-Protokoll mit verschiedenen Annealing-Temperaturen ausprobiert. Einen Orientierungspunkt zur Temperaturfindung bietet die Schmelztemperatur der Primer. In Tabelle 6.6 sind die verwendeten Primer und ihre spezifischen, in dieser Arbeit verwendeten Annealing-Temperaturen aufgelistet.

Tabelle 6.6: Spezifische Annealing-Temperaturen der Primer

Gen	5'-Sense-3'	3'-Antisense-5'	Annealing-Temperatur T_A [°C]
GAPDH	ACTCTACCCACGGCAAGTTCA	AGGCAACACCTAGACTGTACG	54
CYP2E1	ACATTTCTGATTGGCTGCGC	AACTGTCCAATAACCCGGT	57
GST α 2	TGATGTTTGACCAAGTGCCCA	GTTTTTGCCATGAACGGACG	56

6.3.4 Gelelektrophorese

Auf Grund der Länge des Amplicons wurden die Proben, die auf GAPDH (890 bp) und CYP 2E1 (506 bp) untersucht werden sollten in einem 1,3 %-igen Agarosegel aufgetrennt, die Proben für GST α 2 (256 bp) in einem 2 %-igen Agarosegel. Dazu wurden 1,3 oder 2,0 g Agarose eingewogen, mit 100 ml 1x-TAE-Puffer aufgefüllt und in der Mikrowelle erhitzt, bis sich die Agarose löste. Nach dem Abkühlen wurde wieder mit 1x-TAE-Puffer auf 100 ml aufgefüllt, das Gel gegossen und der Kamm zur Ausbildung der Beladungskammern eingesetzt. Nach dem das Gel ausgehärtet war, wurde der Kamm gezogen und die Elektrophoresekammer mit 1x-TAE-Puffer gefüllt, so dass das Gel vollständig bedeckt war. Die PCR-Proben (25 μ l) wurden mit 5 μ l 6x-Ladepuffer (Fermentas) versetzt und gevortext. Davon wurden 15 μ l in eine Geltasche gefüllt und der Rest als Rückstellprobe bei -20 $^{\circ}$ C aufbewahrt. Zur Zuordnung der Banden wurde außerdem bei jedem Lauf 10 μ l DNA-Ladder mitgeführt.

Die Elektrophorese lief bei 85 V 120 Minuten für die 1,3 %-igen und 150 Minuten für die 2 %-igen Agarosegele.

6.3.5 Detektion

Zur Detektion wurde das Agarosegel im Anschluss an die Elektrophorese für ca. 15 Minuten in einem Ethidiumbromidbad angefärbt. Die Banden wurden mit Hilfe des Lumi-Imager™ bei 600 nm detektiert.

6.3.6 Verwendete Puffer und Lösungen

TAE-Puffer

50x-TAE-Stammlösung (pH 8)

2 M Tris Base

0,05 M Na₂EDTA

5,71 % (v/v) Eisessig

TAE-Gebrauchslösung

1:50-Verdünnung der TAE-Stammlösung mit H₂O_{Bidest}

DNA-Ladder

verwendet wurde die GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus von Fermentas

Gebrauchslösung

50 µl dH₂O

5 µl DNA-Ladder

5 µl 6x-Ladepuffer

pro Gellauf wurden 10 µl Gebrauchslösung eingesetzt

Ethidiumbromid-Bad

400 ml H₂O_{Bidest}

400 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml)

6.4 alkalische Einzelzellgelelektrophorese – Comet Assay

6.4.1 Vorbereiten der Objektträger

Die aufgerauten Objektträger wurden zunächst mit 40 µl normal melting agarose (NMA) dünn beschichtet. Nach dem Trocknen wurden mit jeweils 65 µl NMA zwei Gelkissen auf den Objektträger gegossen, die mit Deckgläsern bedeckt wurden. Anschließend wurden die Objektträger auf einer gekühlten Unterlage aushärten gelassen. Die Objektträger wurden bis zum Gebrauch in einer mit Ethanol (70 % v/v) befeuchteten Box bei 4 °C aufbewahrt.

6.4.2 Isolierung von Leberzellen

Aus dem linken Leberlappen wurde ein Stück herausgeschnitten, das mit 5 ml eiskalter Hank's buffered salt solution (HBSS, pH 7,4, mit 20 mM EDTA und 10 % DMSO) gewaschen und anschließend in 1 ml HBSS mit der Schere mechanisch zerkleinert wurde. Die Zellsuspension wurde 1:40 mit HBSS verdünnt (30 µl Zellsuspension + 1170 µl HBSS) und in vier 1,5 ml-Reaktionsgefäße à 250 µl aliquotiert.

Das dem HBSS-Puffer zugesetzte DMSO diente zur Vermeidung von zusätzlichen oxidativen DNA-Schäden. EDTA wurde zugesetzt, um Calcium und Magnesium aus den Zellen zu komplexieren und eine Aktivierung von Endonucleasen zu verhindern.

6.4.3 Viabilitätsbestimmung mit Trypanblau

Die Viabilität der Zellen wurde mikroskopisch mit Hilfe einer Neubauerzählkammer bestimmt. Diese besteht aus neun Quadraten, die jeweils eine Fläche von 1 mm^2 und eine Tiefe von $0,1 \text{ mm}$ haben. Dadurch ergibt sich pro Quadrat ein Volumen von $0,1 \mu\text{l}$ [Lindl, 2000].

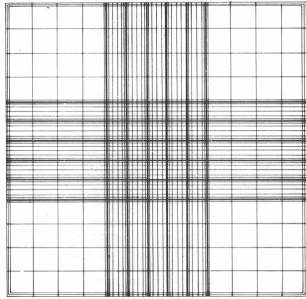


Abbildung 6.4: Neubauer-Zählkammer [Lindl, 2000]

Zum Auszählen der Zellen werden $50 \mu\text{l}$ Zellsuspension mit Trypanblaulösung im Verhältnis 1:1 versetzt. Tote Zellen färben sich auf Grund ihrer Membrandurchlässigkeit nach Zugabe des Farbstoffes blau. Durch Kapillarkräfte zieht sich ein definiertes Volumen an Zellsuspension zwischen Deckglas und Zählkammer (Abbildung 6.4) [Lindl, 2000].

Ausgezählt werden die vier Eckquadrate der Neubauer-Zählkammer. Tote Zellen werden extra gezählt. Durch Multiplikation des Mittelwertes der vier Eckquadrate mit dem Faktor 10^4 und dem Verdünnungsfaktor 2 ergibt sich die Zellzahl pro ml Zellsuspension [Lindl, 2000].

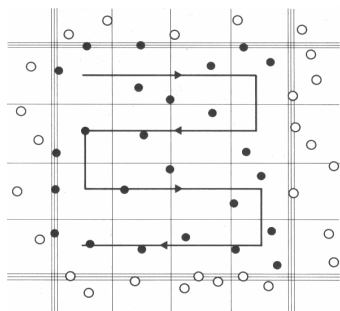


Abbildung 6.5: Auszählen der Zellen in einem der Eckquadrate, gezählt werden nur die schwarz dargestellten Zellen [Lindl, 2000]

Die Viabilität errechnet sich aus der Differenz der Anzahl der lebenden Zellen und der Gesamtzellzahl (lebende und tote Zellen). Um durch Zelltod entstandene DNA-Schäden ausschließen zu können, sollte die Viabilität über 80 % liegen.

6.4.4 Auftragen des Probenmaterials auf den Objektträger

Die Leberzellsuspension wurde bei 4 °C und 400 x g für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Hepatocytenpellets bzw. 6 µl Blut wurden in 65 µl low melting agarose (LMA) resuspendiert, auf die vorbereiteten Objektträger gegeben und sofort wieder mit einem Deckglas bedeckt. Die Gele wurden auf einer gekühlten Unterlage aushärten gelassen.

6.4.5 Zelllyse

Die Zellen wurden zunächst über Nacht bei 4 °C mit einem DMSO-haltigen Lysepuffer (pH 10) lysiert. Während der Zelllyse kann Eisen aus im Blut und Geweben vorhandenen Erythrocyten austreten, welches die DNA zusätzlich schädigen kann. Das DMSO im Lysepuffer schützt die Zellen vor einer möglichen radikal-induzierten DNA-Schädigung. Nach der Lyse wurden die Zellen dreimal mit Waschpuffer gewaschen.

6.4.6 Enzymbehandlung

Um den Assay möglichst empfindlich zu machen wurden die Zellen mit dem bakteriellen Reparaturenzym Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase (FPG) behandelt. Dazu wurden je 50 µl FPG-Lösung auf die Gele aufgetragen, die sofort mit einem Deckglas bedeckt wurden. Die Objektträger wurden für 30 Minuten bei 37 °C im Wasserbad inkubiert.

6.4.7 DNA-Entwindung und Gelelektrophorese

Um die DNA zu entwinden wurden die Objektträger für 20 Minuten mit alkalischem Elektrophoresepuffer bedeckt in der Elektrophoresekammer belassen. Der alkalische Elektrophoresepuffer bewirkt neben der DNA-Entwindung auch das Einfügen von Einzelstrangbrüchen an alkali-labilen Stellen. Die Elektrophorese wurde für weitere 20 Minuten bei 25 V (konstant) und ca. 300 mA (eingestellt mit Elektrophorese-Puffer) durchgeführt. Die DNA-Entwindung und Gelelektrophorese erfolgten auf Eis.

6.4.8 Neutralisation, Konservierung und Anfärben

Nach der Elektrophorese wurde die DNA dreimal mit Neutralisationspuffer gewaschen. Zur Konservierung wurden die Objektträger für zwei Minuten mit eiskaltem 95 %-igem Ethanol p.A. behandelt. Die Objektträger wurden bei Raumtemperatur in Objektträgerboxen gelagert. Vor dem Auswerten der Objektträger wurde die DNA mit Ethidiumbromidlösung angefärbt. Dazu wurden je 40 µl Ethidiumbromidlösung auf die Gele gegeben und mit Deckgläsern bedeckt.

6.4.9 Auswertung

Die Auswertung der Objektträger erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axio Imager.A1) mit Quecksilberdampfampe und einem nachgeschalteten Filter (Filter Set 15: λ_{ex} 546 ± 12 nm, λ_{em} 590 nm), der das Ethidiumbromid anregt. Die Bilder wurden von einer Kamera auf den PC übertragen und konnten mit einer speziellen Software (Perceptive Instruments Comet Assay 4) ausgewertet werden. Dazu wurden pro Deckglas 50 vereinzelte Zellen mäanderförmig ausgezählt. Pro Tier und Organ wurden zwei codierte Objektträger angefertigt. Die DNA Schädigung wurde angegeben als Veränderung der Tail Intensity gegenüber der Negativkontrolle. Die Tail Intensity gibt die Intensität des Kometenschweifes in Prozent verglichen mit der Intensität des Kometenkopfes derselben Zelle in Prozent an.

6.4.10 Verwendete Puffer und Lösungen

Hanks buffered salt solution (HBSS, pH 7,4)

137 mM NaCl
5,37 mM KCl
0,34 mM Na₂HPO₄
0,44 mM KH₂PO₄
4,2 mM NaHCO₃
5,55 mM Glucose
20,14 mM HEPES
20 mM EDTA
10 % (v/v) DMSO

PBS für Agarose (pH 7,4)

137 mM NaCl

2,7 mM KCl

1,5 mM KH_2PO_4

8,1 mM Na_2HPO_4

Agarose

normal melting agarose (NMA)

0,5 % (w/v) NMA in 50 ml PBS für Agarose ansetzen

low melting agarose (LMA)

0,8 % (w/v) LMA in 50 ml PBS für Agarose ansetzen

Die Agarose wurde in der Mikrowelle erhitzt und auf einem Magnetrührer warmgehalten.

Lysepuffer

Lysepuffer-Stammlösung (pH 10)

2,5 M NaCl

0,1 M EDTA

0,1 M Tris

in $\text{H}_2\text{O}_{\text{Bidest}}$ lösen, pH einstellen und 1 % N-Laurylsarcosin hinzufügen

Lysepuffer-Gebrauchslösung

89 % (v/v) Lysepuffer-Stammlösung

10 % (v/v) DMSO

1 % (v/v) Triton X-100

Waschpuffer (pH 8,0)

4 mM HEPES

10 mM KCl

0,05 mM EDTA

0,02 mg/ml BSA

FPG-Lösung

FPG-Stammlösung

100 µl Waschpuffer

100 µl Glycerin

mit H₂O_{Bidest} auf 1 ml auffüllen

10 µl FPG-Enzym zu 990 µl geben, auf 25 µl aliquotieren und bei -80 °C lagern

FPG-Gebrauchslösung

1:30-Verdünnung der FPG-Stammlösung mit Waschpuffer

Entwindungs- und Elektrophoresepuffer (pH 13)

300 mM NaOH

1 mM EDTA

Neutralisationspuffer (pH 7,5)

0,4 M Tris/HCl

Ethidiumbromidlösung

Ethidiumbromid-Stammlösung

10 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml)

4990 µl H₂O_{Bidest}

Ethidiumbromid-Gebrauchslösung

1:10-Verdünnung der Ethidiumbromid-Stammlösung mit H₂O_{Bidest}

6.5 Massenspektrometrische Untersuchungen

6.5.1 Allgemeines

Die im Rahmen dieser Arbeit getätigten massenspektrometrischen Untersuchungen wurden an den Triple-Quadrupol-Massenspektrometern API 2000™ bzw. API 3200™ mit Elektrosprayionisation (ESI) durchgeführt.

6.5.1.1 Tuning und Kalibrierung

Tuning und Kalibrierung der Massenspektrometer wurden mit Polypropylen (PPG)-Standards von Applied Biosystems durchgeführt. Dazu wurden je nach Gerät und Polarisierung unterschiedliche PPG-Standards verwendet (Tabelle 6.7).

Tabelle 6.7: für Tuning und Kalibrierung verwendete Polypropylen (PPG)-Standards

	ESI positiv	ESI negativ
API 2000	PPG	PPG 3000
API 3200	PPG (1:10)	PPG 3000

Zum Tuning der Massenspektrometer wurde ihr Auflösungsvermögen anhand der Peak-Breite und -Schärfe mit PPG-Standards optimiert. Dadurch wird eine hohe Sensitivität der Messungen ermöglicht. Optimalerweise liegt die Peak-Breite für die beiden Massenspektrometer zwischen 0,6 und 0,8 amu bei 50 % der maximalen Peak-Höhe. Dies wurde für alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten massenspektrometrischen Untersuchungen sichergestellt.

Die Kalibrierung der Massenspektrometer erfolgte anhand der spezifischen Fragmentionen der PPG-Standards. Durch die Kalibrierung wurde die korrekte Zuordnung eines massenspektrometrischen Signals zu einem spezifischen Masse/Ladungs-Verhältnis bei akzeptabler Massenverschiebung ermöglicht.

6.5.1.2 Optimierung der substanz- und quellenspezifischen Parameter

Das Massenspektrometer verfügt über verschiedene Parameter die für jeden Analyt spezifisch optimiert werden können, um eine möglichst hohe Sensitivität des Gerätes zu erreichen (Abbildung 6.6). Unterschieden werden Quellenparameter und substanzspezifische Parameter.

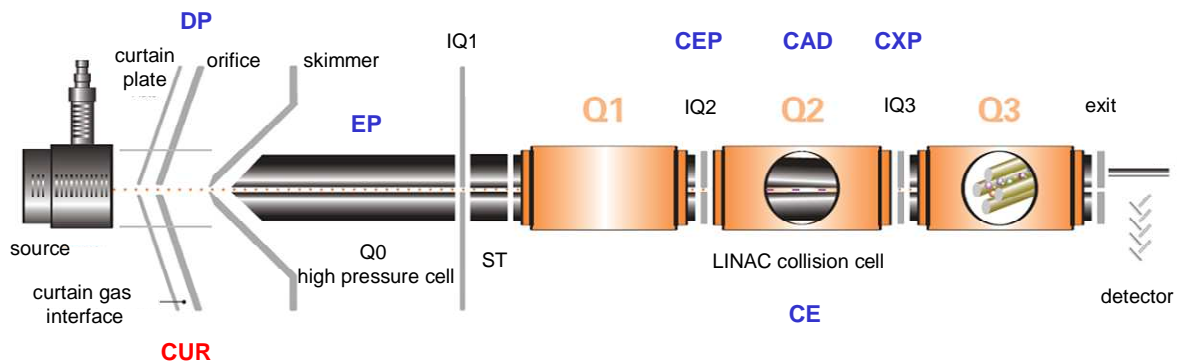


Abbildung 6.6: Schematischer Aufbau eines Triple-Quadrupolspektrometers [modifiziert nach Applied Biosystems, 2008]

(rot: Quellenparameter, blau: substanzspezifische Parameter, CUR: Curtain Gas, DP: Declustering Potential, EP: Entrance Potential, CEP: Collision Cell Entrance Potential, CE: Collision Energy, CAD: Collisionally Activated Dissociation, CXP: Collision Cell Exit Potential)

Zu den quellenspezifischen Parametern zählen Ion Spray Voltage, Nebulizer Gas, Turbo Gas, Temperatur und Curtain Gas. Ihre Funktion ist in Tabelle 6.8 erklärt.

Zur Optimierung der quellenspezifischen Parameter wurde zunächst die Zusammensetzung des Fließmittels zur Retentionszeit des Analyten bestimmt. Diese wurde dann mit der entsprechenden Flussrate isokratisch an der HPLC eingestellt. Nun wurde mit Hilfe des FIA (Flow Injection Analysis)-Tools der Analyst 1.4.2 Software der Analyt mittels Loop-Injection (ohne Säulen-Trennung) unter wechselnden Quellenparametern injiziert.

Tabelle 6.8: Quellenspezifische Parameter

Parameter	Abkürzung	Aufgabe
Ion Spray Voltage	IS	Spannung an der Spray-Nadel: Ionisierung der Probe
Nebulizer Gas (N ₂)	GS1	Bildung von kleinen Lösungsmitteltröpfchen; beeinflusst Stabilität und Sensitivität des Sprays
Turbo Gas (N ₂)	GS2	Verdampfung des Lösungsmittels
Temperatur	TEM	Temperatur von GS2: Verdampfung des Lösungsmittels, dadurch Bildung von Analyt-Ionen in der Gasphase
Curtain Gas	CUR	Gasstrom zwischen Curtain Plate und Orifice: Schutz der Ionenoptik vor Kontamination durch Lösungsmitteltröpfchen

Zu den substanzspezifischen Parametern zählen Declustering Potential, Entrance Potential, Collision Cell Entrance Potential, Collision Energy, CAD-Gas und Collision Cell Exit Potential. Diese wurden mit Hilfe der Spritzenpumpe (Flow: 10 µl/min) und dem „Quantitative Optimization“-Tool der Analyst 1.4.2 Software optimiert. In Tabelle 6.9 sind die zu optimierenden substanzspezifischen Parameter und ihre Aufgaben aufgelistet.

Tabelle 6.9: Substanzspezifische Parameter

Parameter	Abkürzung	Aufgabe
Declustering Potential	DP	Potentialdifferenz zwischen Skimmer und Orifice: minimiert die Bildung von Lösungsmittelclusterionen
Entrance Potential	EP	Potentialdifferenz zwischen Skimmer und Q0: Fokussierung der Ionen in Q0
Collision Cell Entrance Potential	CEP	Potentialdifferenz zwischen Q0 und dem Eingang von Q2: Fokussierung der Ionen in Q2
Collision Energy	CE	Potentialdifferenz zwischen Q0 und Q2: entspricht der Energie, die das Elternion durch Beschleunigung nach Q2 erhält; steuert die Fragmentierung
Collisionally Activated Dissociation Gas	CAD-Gas	Druck des Collision Gas (N ₂) in Q2
Collision Cell Exit Potential	CXP	Potentialdifferenz zwischen Q2 und Q3: fokussiert und beschleunigt die Ionen von Q2 in Q3

6.5.1.3 Quantifizierung mittels Isotopenverdünnungsanalyse

Die Quantifizierung der Analyte erfolgte mittels Isotopenverdünnungsanalyse. Dazu wurden interne Standards verwendet, in denen mehrere Atome der Moleküle durch stabile Isotope mit höherer Masse ersetzt sind. Diese haben den Vorteil, dass sie bereits vor der Probenaufarbeitung zugesetzt werden können und so analog zum Analyten behandelt werden. Auf Grund der strukturellen Ähnlichkeit zum Analyten verhält sich der interne Standard auch in seinen physikalischen und chemischen Eigenschaften nahezu identisch. Aus diesem Grund kann auch bei Probenaufarbeitung, Chromatographie, Ionisierung und Detektion davon ausgegangen werden, dass sich Analyt und interner Standard ähnlich verhalten.

6.5.1.4 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

Die Nachweisgrenze entspricht der kleinsten Konzentration einer Verbindung, die mit einem Analyseverfahren noch detektierbar ist. Dabei wird von einem Signal/Rausch-Verhältnis von 3:1 ausgegangen. Die Bestimmungsgrenze wird meistens als das Doppelte der Nachweisgrenze definiert und gibt den untersten Wert an, der noch reproduzierbar quantifiziert werden kann. Die Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen erfolgte anhand von Kalibriergeraden, für die Peakhöhe gegen die Konzentration aufgetragen wurde. Die Berechnung von Nachweis- und Bestimmungsgrenze erfolgt durch Einsetzen des entsprechenden Hintergrundrauschens in die erhaltenen Regressionsgeraden.

6.5.2 Bestimmung von *N*7-Glycidamid-Guanin-Addukten mittels HPLC-ESI-MS/MS

6.5.2.1 Massenspektrometrische Untersuchungen

Die Detektion der *N*7-GA-Guanin-Addukte erfolgte mittels HPLC-MS/MS (API 3200) nach positiver Ionisierung (Electrospray Ionisation, ESI) im Multiple Reaction Monitoring (MRM)-Modus. Die Etablierung einer MRM-Methode wurde im Rahmen der Diplomarbeit von Nico Watzek durchgeführt. Zunächst wurden die charakteristischen Molekül- und Fragmentionen des Analyten und des Standards mittels Massenscans identifiziert. Dazu wurden Standards (250 ng/ml) bei einem Flow von 10 µl/min (Spritzenpumpe) im positiven Ionisationsmodus im Massenbereich von 90-250 m/z gescannt. Im positiven Molekülionen-Scan wurde für den Analyten ein Verhältnis von m/z 239,2 und für den um 5 Masseneinheiten schwereren Isotopenstandard ein Verhältnis von m/z 244,2 ermittelt. Die charakteristischen

Fragmentierungsmuster des Analyten und des isotonenmarkierten Standards wurden mit Hilfe eines Produktionenscans ermittelt. Für beide Substanzen ergaben sich die gleichen Fragmente, deren Massen sich lediglich in der Anzahl der in ihnen enthaltenen ^{15}N -Atome unterschieden.

Die Entwicklung der Multiple Reaction Monitoring (MRM)-Methode erfolgte unter Berücksichtigung der im Produktionenscan ermittelten Massenübergänge m/z 239,2 \rightarrow 152,1 für den Analyten und m/z 244,2 \rightarrow 157,1 für den isotonenmarkierten Standard. Zur Optimierung der massenspezifischen Parameter der Methode wurden Standardlösungen (250 ng/ μl , Spritzenpumpenflow: 10 $\mu\text{l}/\text{min}$) verwendet. In Tabelle 6.10 sind die ermittelten massenspezifischen Parameter aufgelistet, die zur Messung von *N7*-GA-Guanin verwendet wurden. Auf Grund der starken strukturellen Ähnlichkeit des Analyten und des internen Standards wurden keine wesentlichen Unterschiede in den optimierten Parametern festgestellt. Aus diesem Grund wurden zur Entwicklung der Messmethode von *N7*-GA-Guanin-Addukten identische substanz- und quellenspezifische Parameter für Analyt und internen Standard herangezogen.

Tabelle 6.10: massenspezifische Parameter zur Messung von *N7-GA-Guanin* und $^{15}\text{N}_5$ -*N7-GA-Guanin*

(CUR: curtain gas, CAD: Collisionally Activated Dissociation Gas, IS: Ion Spray Voltage, TEM: Temperatur, GS 1: Nebulizer Gas, GS 2: Turbo Gas, DP: Declustering Potential, EP: Entrance Potential, CEP: Collision Cell Entrance Potential, CXP: Collision Cell Exit Potential)

	<i>N7-GA-Guanin</i>	$^{15}\text{N}_5$ - <i>N7-GA-Guanin</i>
Q1 [amu]	239,2	244,2
Q3 [amu]	152,1	157,1
Dwell time [ms]	150	150
quellenspezifische Parameter		
CUR [psi]	30	30
CAD [psi]	7	7
IS [kV]	5500	5500
TEM [°C]	400	400
GS 1 [psi]	30	30
GS 2 [psi]	30	30
substanzspezifische Parameter [V]		
DP	36	36
EP	9	9
CEP	27	27
CXP	4	4

6.5.2.2 Chromatographie

Die Chromatographie der *N7-GA-Guanin*-Addukte wurde mit Hilfe einer Phenomenex Aqua C18-Säule (250 x 4,6 mm, 5 μM , 125 Å) bei einem Flow von 0,3 ml/min durchgeführt. Die Elution erfolgte mit einem Acetonitril-Gradienten, der in Tabelle 6.11 gezeigt ist. Um Verunreinigungen des Massenspektrometers so gering wie möglich zu halten, wurde der Eluent mittels Valco Valve nur zwischen der 10. und 22. Minute in die Ionenquelle geleitet und ansonsten in den Lösungsmittelabfall. Um Matrixeinfüsse auf die Signale von Analyt

und Standard aufeinander folgender Messungen zu vermeiden, wurde in das Messprotokoll ein Spülgradient integriert. Pro Messung wurden 50-90 µl Probe injiziert.

Tabelle 6.11: Fließmittelzusammensetzung zur Gradientenelution der *N7*-GA-Guanin-Addukte und des anschließenden Spülgradienten

Fließmittel A: 0,05 % Ameisensäure; Fließmittel B: Acetonitril

Zeit [min]	Flow [ml/min]	Fließmittel A [%]	Fließmittel B [%]
0	0,3	98	2
15	0,3	75	25
16	0,3	98	2
22	0,3	98	2
24	0,5	10	90
32	0,5	10	90
34	0,5	98	2
38	0,5	98	2
39	0,3	98	2
40	0,3	98	2

6.5.2.3 Linearität

Für die Quantifizierung der *N7*-GA-Guanin-Addukte mittels Isotopenverdünnungsanalyse wurde ein in unserer Arbeitsgruppe synthetisierter ¹⁵N₅-markierter *N7*-GA-Guanin Standard verwendet [Watzek, 2009].

Die Überprüfung der Linearität erfolgte im Rahmen der Diplomarbeit von Nico Watzek. Dazu wurde eine Standardreihe mit 0,1-10 ng/ml *N7*-GA-Guanin verwendet, in der zu jeder Verdünnung 5 ng/ml ¹⁵N₅-*N7*-GA-Guanin zugesetzt wurde. Injiziert wurden jeweils 20 µl Standardlösung.

Die Untersuchung ergab, dass der isotonenmarkierte Standard zur Quantifizierung der *N7*-GA-Guanin-Addukte verwendet werden kann [Watzek, 2009].

6.5.2.4 Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Zur Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze wurde, auf Grund von starken Schwankungen zwischen den Matrices der einzelnen Tiere und Organe, auf eine

Aufdotierung der Probenmatrix verzichtet. Daher erfolgte die Bestimmung von Nachweis- und Bestimmungsgrenze durch Messung einer Standardreihe von *N7*-GA-Guanin in BisTris/EDTA-Puffer (0,1-1 ng/μl bzw. 21-210 amol absolut). Aufgetragen wurden die erhaltenen Peakhöhen gegen die entsprechende Konzentration (Abbildung 6.7).

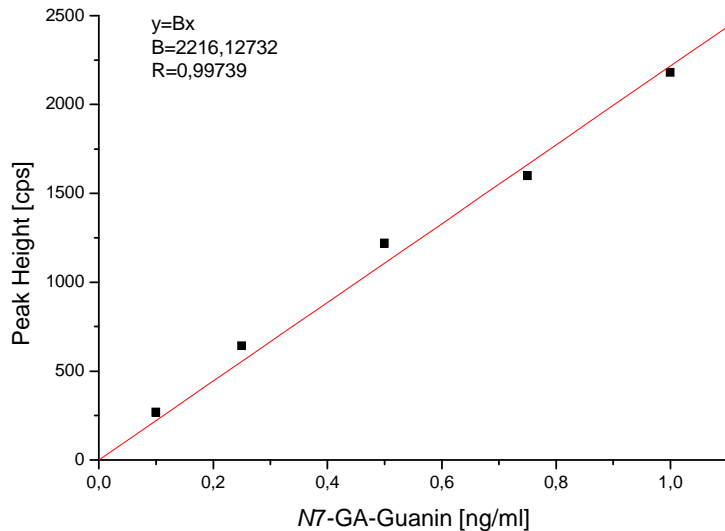


Abbildung 6.7: Kalibriergerade zur Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für die Quantifizierung von *N7*-GA-Guanin-Addukten

Zur Berechnung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze wurde von einem Hintergrundrauschen von 30 cps ausgegangen.

Die erhaltenen absoluten Werte für die Nachweis- und Bestimmungsgrenze wurden unter Einbeziehung der in den Versuchen eingesetzten mittleren DNA-Menge (184 mg) zusätzlich als fmol/mg DNA bzw. Addukte/10⁸ Nukleotide angegeben (Tabelle 6.12).

Tabelle 6.12: Nachweis- und Bestimmungsgrenze für die Quantifizierung von *N7*-GA-Guanin-Addukten

	Nachweisgrenze	Bestimmungsgrenze
fmol absolut	8	17
fmol/mg DNA	43	92
Addukte/10 ⁸ Nukleotide	1	3

6.5.2.5 Lauf-zu-Lauf- und Tag-zu-Tag-Variabilität

Auf Grund des geringen Probenmaterials wurden Lauf-zu-Lauf- und Tag-zu-Tag-Variabilität mit *N7*-GA-Guanin-Standards im entsprechenden Konzentrationsbereich (1 und 5 ng/ml) bestimmt. Die Bestimmung der Lauf-zu-Lauf-Variabilität wurde durch jeweils drei aufeinanderfolgende Messungen durchgeführt. Es wurde eine Lauf-zu-Lauf-Variabilität der *N7*-GA-Guanin-Bestimmung von $0,97 \pm 0,27$ % festgestellt. Die Tag-zu-Tag-Variabilität wurde an zwei aufeinanderfolgenden Tagen bestimmt. Die Tag-zu-Tag-Variabilität der *N7*-GA-Guanin-Messung lag bei $2,7 \pm 1,8$ %.

6.5.2.6 Gewebeisolierung und Verdau

Zur Bestimmung von *N7*-GA-Guanin-Addukten wurden die zu untersuchenden Gewebe der Tiere entnommen und direkt in 20 % (v/v) DMSO in $\text{H}_2\text{O}_{\text{Bidest}}$ auf Trockeneis gefroren und im Biofreezer bis zur Aufarbeitung gelagert. Zur DNA-Isolierung verwendet wurden 200-300 mg des linken Leberlappens (der im Fall der FEI-Studie auch für den Comet Assay und die PCR verwendet wurde), die linke Niere und der linke Hoden (jeweils nach Entfernung der Bindegewebskapsel) sowie die Lunge. Die Gewebe wurden zunächst mit einer Schere grob zerkleinert. Anschließend wurden die Gewebestücke in einen Handpotter (5 ml) überführt und nach Zugabe von 1 ml Verdauopuffer homogenisiert (20 Hübe). Das Homogenat wurde in ein Falcon-Tube (15 ml) überführt und nach Zugabe von weiteren 3 ml Verdauopuffer für drei Stunden bei 37 °C im Wasserbad belassen. Der Verdauopuffer enthält neben Proteinase K und RNase A auch EDTA und das Detergens SDS (Natriumdodecylsulfat), die dazu führen, dass die Zellmembran zerreißt.

Verdauopuffer

25 mM EDTA (pH 8,0)

300 mM NaCl

200 mM Tris/HCl (pH 8,0)

2 % (w/v) SDS

5 % (v/v) Proteinase K (20 mg/ml)

0,2 % (v/v) RNase A (100 mg/ml)

6.5.2.7 Chloroform-Phenol-Extraktion

Um Proteine von der DNA abzutrennen, wurden zu dem verdauten Gewebehomogenat 4 ml Chloroform-Phenol-Isoamylalkohol (25:24:1) gegeben, gevortext und anschließend für fünf Minuten bei 22 °C und 4500 x g zentrifugiert. Die organischen Lösungsmittel sorgen dafür, dass die Proteine ausgefällt werden, während die DNA in der oberen wässrigen Phase verbleibt. Diese wurde mit der Pipette abgezogen und in ein frisches Falcon-Tube (15 ml) überführt. Waren an der Phasengrenze noch Proteine erkennbar, wurde dieser Schritt wiederholt. Um die wässrige Phase von organischen Lösemittelresten zu befreien wurde anschließend ein äquivalentes Volumen an Chloroform p.A. zugegeben, gemischt und zentrifugiert (5 Minuten, 22 °C, 4500 x g). Die wässrige Phase wurde erneut in ein frisches Falcon-Tube (15 ml) überführt.

6.5.2.8 Ethanolpräzipitation

Der wässrigen DNA-Lösung wurden 3 Volumina eiskaltes Ethanol p.A. und 0,1 Volumen NaCl (5 M) zugesetzt. Der Vorteil der Ethanolpräzipitation liegt darin, dass kurze Ketten und Monomere, wie Ribonucleotide, die durch die RNase A-Behandlung während des Verdaus entstehen, in Lösung bleiben. Zur Fällung wurde die DNA-Lösung für 30 Minuten auf -80 °C gekühlt oder über Nacht bei -20 °C belassen. Anschließend wurde das Präzipitat für 30 Minuten bei 4 °C und 4500 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abdekantiert und das Pellet mit 2 ml 70 % (v/v) Ethanol p.A. gewaschen. Das Pellet wurde erneut für 10 Minuten bei 4 °C und 4500 x g zentrifugiert und der Überstand abdekantiert. Die DNA wurde überkopf im Falcon-Tube (15 ml) für 15 Minuten getrocknet und je nach Größe des Pellets in 300 bis 1000 µl Puffer gelöst. Für das FEI-geförderte Projekt wurde ein BisTris/EDTA-Puffer (pH 7,1) verwendet, für das PEC-geförderte Projekt ein anionischer Phosphat-Puffer (pH 7,1). Beide Puffer wurden verglichen und es konnte kein unterschiedlicher Einfluss auf die Detektion der N7-GA-Guanin-Messungen festgestellt werden. Die Umstellung erfolgte lediglich, da die weiteren Untersuchungen der PEC-geförderten Studie mittels Accelerator Mass Spectrometry (AMS) durchgeführt werden sollten und ein organischer Puffer die Sensitivität des Gerätes beeinflusst.

BisTris/EDTA-Puffer (pH 7,1)

5 mM BisTris

0,1 mM EDTA

Phosphat-Puffer (pH 7,1)

10 mM Na₂HPO₄

1,8 mM KH₂PO₄

6.5.2.9 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die DNA-Konzentration wurde photometrisch bei einer Absorption von 260 nm (A_{260}) mittels NanoDrop ND-1000 bestimmt. Außerdem wurde die Reinheit der DNA durch das Verhältnis der Absorptionen bei 260 und 280 nm (A_{260}/A_{280}) untersucht. Dieses lag in allen untersuchten Proben zwischen 1,8 und 2,0.

Die DNA-Lösungen wurden nach Zugabe von ¹⁵N₅-markiertem N7-GA-Guanin-Standard (2,06 pmol) auf 200 µg in 300 µl Puffer verdünnt und erneut vermessen (Doppelbestimmung).

6.5.2.10 Neutrale thermische Hydrolyse

Um die Glycidamid-DNA-Addukte aus der DNA zu lösen wurden die definierten DNA-Lösungen für 15 Minuten auf 95 °C im Thermomixer erhitzt. Vorversuche haben gezeigt, dass die Addukte bereits nach fünf Minuten quantitativ aus der DNA herausgelöst werden [Watzek, 2009].

6.5.2.11 Isolierung der N7-Glycidamid-Guanin-Addukte mittels Größenausschlusszentrifugation

Die Proben der FEI-geförderten Fütterungsstudie wurden nach der neutralen thermischen Hydrolyse kurz auf Eis abgekühlt und dann zu gleichen Teilen auf je 2 konditionierte Microcon-Zentrifugenfilter (3 kDa) der Firma Millipore gegeben. Die Konditionierung der Microcons erfolgte durch Zugabe von je 50 µl BisTris/EDTA-Puffer und Zentrifugation für 75 Minuten bei 22 °C und 12.000 *x g*. Die Proben wurden für drei Stunden bei gleichen Bedingungen zentrifugiert, die beiden Aliquots jeder Probe anschließend wieder vereinigt und bis zur massenspektrometrischen Vermessung bei -20 °C gelagert.

Da die Microcon-Zentrifugenfilter nicht mehr verfügbar waren, wurde das Protokoll zur Aufarbeitung der Proben der PEC-geförderten Studie zur Untersuchung der zeit- und dosisabhängigen N7-GA-Guanin-Addukt-Bildung leicht verändert. Diese wurden nach der neutralen thermischen Hydrolyse ebenfalls kurz auf Eis abgekühlt und dann auf einen

Amicon-Zentrifugenfilter (3 kDa) der Firma Millipore aufgebracht. Die Proben wurden dann für eine Stunde bei 22 °C und 12.000 x g zentrifugiert und anschließend massenspektrometrisch vermessen.

6.5.2.12 Wiederfindung der N7-Glycidamid-Guanin-Addukte nach der Größenausschlusszentrifugation

Zur Ermittlung der Wiederfindung des N7-GA-Guanins nach der Größenausschlusszentrifugation mit den Microcon-Zentrifugenfiltern wurden 4,2 pmol N7-GA-Guanin in 200 µl BisTris/EDTA-Puffer (n = 10) gegeben, neutral thermisch hydrolysiert und wie in Kapitel 7.5.2.8 beschrieben isoliert. Um mögliche Einflüsse der DNA-Matrix zu untersuchen, wurde der gleiche Ansatz mit 100 µg aufgereinigter DNA (Salmon Testes) versetzt und analog behandelt.

Die massenspektrometrische Untersuchung ergab eine Wiederfindung von 69 % ohne Zusatz von DNA und 73 % nach Zusatz von DNA.

Die Wiederfindung von N7-GA-Guanin nach Größenausschlusszentrifugation mit den Amicon-Zentrifugenfiltern erfolgte durch Zugabe von 0,84 pmol N7-GA-Guanin zu 200 µl Phosphat-Puffer (n = 4). Mögliche Einflüsse der DNA-Matrix wurden durch Zugabe von 200 µg aufgereinigter DNA (Salmon Testes) überprüft. Die Proben wurden ebenfalls neutral thermisch hydrolysiert und wie in Kapitel 7.5.2.8 beschrieben isoliert.

Die Wiederfindung über die Amicon-Zentrifugenfilter betrug 77 % in den Ansätzen ohne DNA und 80 % nach Zugabe von DNA.

6.5.3 Bestimmung der Mercaptursäuren von Acrylamid und Glycidamid

Die Etablierung der Untersuchungsmethode zur Bestimmung der Mercaptursäuren von Acrylamid und Glycidamid erfolgte im Rahmen der Dissertation von Franz Berger [2010].

6.5.3.1 Massenspektrometrische Untersuchungen

Zur Identifizierung der Molekül- und Fragmentionen der Analyten und internen Standards wurden zunächst Massenscans im Bereich von m/z 50-300 im negativen Ionisationsmodus durchgeführt. Dazu wurden Standardlösungen im Konzentrationsbereich von 100-250 ng/ml über die Spritzenpumpe mit einem Flow von 10 µl/min in die Massenspektrometer injiziert. Die für die Messung relevanten Massenübergänge lagen bei 233,0 → 103,9 für AAMA,

235,9 → 106,8 für D₃-AAMA, 249,0 → 119,9 für GAMA und 251,9 → 122,9 für D₃-GAMA. Anhand dieser spezifischen Massenübergänge erfolgte die Optimierung der substanz- und quellenspezifischen Parameter. Dazu wurden Standardlösungen mit einer Konzentration von 250 ng/ml in Methanol mit der Spritzenpumpe (Flow: 10 µl/min) in die Massenspektrometer injiziert und die Parameter mit Hilfe des Quantitative Optimization Tools der Analyst 1.4.2 Software (API 3200) bzw. des Manual Tuning Tools der Analyst 1.4.1 Software (API 2000™) optimiert. Aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit wurden identische Parameter für Analyt und internen Standard verwendet (Tabellen 6.13 und 6.14) [Berger, 2010].

Tabelle 6.13: massenspezifische Parameter zur Messung von AAMA, D₃-AAMA, GAMA und D₃-GAMA am API 2000™-MS/MS-System

(CUR: curtain gas, CAD: Collisionally Activated Dissociation Gas, IS: Ion Spray Voltage, TEM: Temperatur, GS 1: Nebulizer Gas, GS 2: Turbo Gas, DP: Declustering Potential, EP: Entrance Potential, CE: Collision Energy)

	AAMA	D ₃ -AAMA	GAMA	D ₃ -GAMA
Q1	233,0	235,9	249,0	251,9
Q3	103,9	106,8	119,9	122,9
Dwell time [ms]	75			
	quellenspezifische Parameter			
CUR [psi]	30			
CAD [psi]	5			
IS [kV]	-3500			
TEM [°C]	475			
GS 1 [psi]	30			
GS 2 [psi]	45			
	substanzspezifische Parameter [V]			
DP	-30			
EP	-5			
CE	-15			
FP	-400			

Tabelle 6.14: massenspezifische Parameter zur Messung von AAMA, D₃-AAMA, GAMA und D₃-GAMA am API 3200-MS/MS-System

(CUR: curtain gas, CAD: Collisionally Activated Dissociation Gas, IS: Ion Spray Voltage, TEM: Temperatur, GS 1: Nebulizer Gas, GS 2: Turbo Gas, DP: Declustering Potential, EP: Entrance Potential, CEP: Collision Cell Entrance Potential, Collision Cell Exit Potential)

	AAMA	D ₃ -AAMA	GAMA	D ₃ -GAMA
Q1	233,0	235,9	249,0	251,9
Q3	103,9	106,8	119,9	122,9
Dwell time [ms]	75			
	quellenspezifische Parameter			
CUR [psi]	10			
CAD [psi]	5			
IS [kV]	-4500			
TEM [°C]	450			
GS 1 [psi]	30			
GS 2 [psi]	30			
	substanzspezifische Parameter [Volt]			
DP	-25		-30	
EP	-5		-4,5	
CE	-22		-22	
CEP	-1		-1	
CXP	-14		-16	

6.5.3.2 Chromatographie

Die chromatographische Auftrennung der Mercaptursäuren erfolgte mit Hilfe einer Phenomenex Luna C8 (2) RP-Säule (150 x 4,6 mm, 3 µm). Tabelle 6.15 zeigt die Zusammensetzung des Fließmittels. Die Elution wurde bei einem Flow von 0,3 ml/min unter isokratischen Bedingungen durchgeführt. Außerdem wurde in das Messprotokoll ein Spülgradient integriert, der Einflüsse von Matrixbestandteilen der Urinproben auf die Signale von Analyten und internen Standards verhindern sollte. Um das Massenspektrometer vor

Verunreinigungen zu schützen, wurde der Eluent mittels Valco Valve nur zwischen der 4. und 17. Minute in die Ionenquelle überführt. Die injizierten Probenvolumina lagen bei 20-50 µl.

Tabelle 6.15: Fließmittelzusammensetzung zur isokratischen Elution der Mercaptursäuren und des anschließenden Spülgradienten

Fließmittel A: 0,1 % Ameisensäure mit 5 % (v/v) Acetonitril; Fließmittel B: Acetonitril

Zeit [min]	Flow [ml/min]	Fließmittel A [%]	Fließmittel B [%]
Initial	0,3	100	0
1	0,3	100	0
17	0,3	100	0
18	0,6	100	0
22	0,6	10	90
35	0,6	10	90
40	0,6	100	0
45	0,3	100	0

6.5.3.3 Linearität

Die Linearität und die Bestimmung der Kalibriergeraden wurde mit methanolischen Standardlösungen im Konzentrationsbereich von 2,5 bis 8000 ng/ml AAMA bzw. GAMA überprüft. Dazu wurde ein Volumen von 10 µl Standardlösung injiziert, die jeweils 3 µg/ml D₃-AAMA und D₃-GAMA enthielten [Berger, 2010].

6.5.3.4 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen wurden mit methanolischen Standardlösungen der Konzentrationsbereiche 12,5 bis 250 ng/ml (API 2000) bzw. 2,5 bis 100 ng/ml (API 3200) ermittelt. Dazu wurden jeweils 50 bzw. 10 µl Standardlösung injiziert. Durch Auftragung der Peakhöhe gegen die Konzentration wurden Regressionsgeraden ermittelt, aus denen durch Einsetzen eines Hintergrundrauschens von 30 bzw. 25 cps die in Tabelle 6.16 aufgelisteten Nachweis- und Bestimmungsgrenzen ermittelt werden konnten [Berger, 2010].

Tabelle 6.16: Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für die Quantifizierung der Mercaptursäuren von Acrylamid und Glycidamid am API 2000™- und API 3200-MS/MS-System

		AAMA	GAMA
API 2000	Nachweisgrenze [pmol]	4	6
	Bestimmungsgrenze [pmol]	8	12
API 3200	Nachweisgrenze [fmol]	86	112
	Bestimmungsgrenze [fmol]	172	224

6.5.3.5 Tag-zu-Tag- und Lauf-zu-Lauf-Variabilität

Die Ermittlung der Lauf-zu-Lauf-Variabilität wurde durch aufeinanderfolgende Messungen ($n = 4$) von Mercaptursäuren unterschiedlicher Urinproben ($n = 3$) durchgeführt. Es wurden Lauf-zu-Lauf-Variabilitäten von $2,1 \pm 0,4 \%$ für AAMA und $3,5 \pm 0,6 \%$ für GAMA festgestellt. Die Tag-zu-Tag-Variabilität wurde durch Untersuchung der Mercaptursäuren in unterschiedlichen Urinproben ($n = 3$) an zwei aufeinanderfolgenden Tagen bestimmt. Die Tag-zu-Tag-Variabilitäten lagen bei $0,4 \pm 0,2 \%$ für AAMA und bei $1,3 \pm 0,3 \%$ für GAMA [Berger, 2010].

6.5.3.6 Aufreinigung und Aufkonzentrierung der Mercaptursäuren mittels Festphasenextraktion

Nach Verabreichung der Acrylamid-Dosis wurde der Urin der Ratten über 8, 16 und 24 Stunden gesammelt und bis zur weiteren Bearbeitung bei -20 °C gelagert.

Die Isolierung der Mercaptursäuren von Acrylamid und Glycidamid erfolgte in Anlehnung an die von Böttcher et al. (2005a) veröffentlichte Methode. Dazu wurden die Urinproben nach dem Auftauen gevortext und für 20 Minuten bei Raumtemperatur und $3500 \times g$ zentrifugiert. Das Urinvolumen wurde mit Hilfe einer Messpipette bestimmt. Zwischen 0,1 und 2 ml Urin wurden mit Ammoniumformiatpuffer (50 mM; pH 2,5) auf ein Volumen von 8 ml aufgefüllt. Nach Zugabe der internen Standards D_3 -AAMA (1,69-42,14 nmol) und D_3 -GAMA (2,04-39,48 nmol) wurde mit 4 N HCl ein pH-Wert von 2,5 eingestellt.

Die SPE-Säulen (Isolute ENV+, 100 mg, 10 ml) wurden durch Zugabe von 4 ml Methanol, 2 ml H_2O_{Bidest} und 2 ml HCl (pH 2,5) konditioniert. Die vorbereitete Probelösung wurde auf die SPE-Säule gebracht und mit 2 ml HCl (pH 2,5) und 1 ml HCl (pH 2,5) mit 10 % (v/v)

Methanol gewaschen. Das Säulenmaterial wurde an der Wasserstrahlpumpe getrocknet und die Mercaptursäuren mit 1,85 ml Methanol (1 % (v/v) Ameisensäure) in 1,5 ml-Reaktionsgefäße eluiert. Um eine vollständige Elution zu gewährleisten, wurden im Säulenmaterial verbliebene Materialreste mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Die methanolischen Proben wurden im Stickstoffstrom bis zur Trockene eingedampft und in 500 µl Ameisensäure (0,1 % v/v) aufgenommen. Nach Zentrifugation für 20 Minuten bei 11.000 x g und Raumtemperatur wurde der Überstand in Autosampler-Vials überführt und massenspektrometrisch vermessen.

6.5.3.7 Wiederfindung der Mercaptursäuren nach der Festphasenextraktion

Die Wiederfindung der SPE-Methode wurde mit internen Standards der Konzentration 100 µg/ml D₃-AAMA und 12,9 µg/ml D₃-GAMA untersucht (n = 3). Es wurden Wiederfindungen von 97 ± 15 % für AAMA und 49 ± 10 % für GAMA ermittelt [Berger, 2010].

6.6 verwendete Geräte

Biofreezer	VIP Series -86 °C (Sanyo)
Elektrophoresekammer	
für Comet Assay	Subcell GT (Bio-Rad)
für PCR	PerfectBlue Gelsystem Mini L (Peqlab)
Feinwaage	CP224S (Sartorius)
Gefrierschrank	Comfort *** (Liebherr)
Grobwaage	Typ 1507 bzw. 1404 (Sartorius)
Handhomogenisator	Duall 23(Kontess Glass Co)
HPLC MS/MS	
HPLC	2x Series 200 Micro Pump, Series 200 Autosampler (Perkin Elmer) Jasco 2008 (Jasco)
MS/MS	API 2000™ mit ESI-Quelle (Applied Biosystems) API 3200 mit ESI-Quelle (Applied Biosystems)
Magnetrührer mit Heizplatte	MR 2002 (Heidolph)
Mikroskop	Axio Imager A1 (Zeiss) mit Kamera (Allied technologies)
Mikrowelle	700 w (Sharp)
Netzteil	
für Comet Assay	PowerPac 300 (Bio-Rad)
für PCR	PowerPac Basic (Bio-Rad)
pH-Meter	pH 522 (WTW)
Pipetten	Research (Eppendorf)
Precellys-Homogenisator	Precellys 24 (Bertin Technologies)
Stoffwechselkäfige	Tecniplast
Thermocycler	PTC-100 (MJ Research Inc.)
Thermomixer	5436 (Eppendorf)
Tischzentrifuge	Centrifuge 5417 R (Eppendorf)
Vakuumkammer	Macherey und Nagel
Wasserbad	Köttermann
Zentrifuge	Centrifuge 5804 R (Eppendorf)

6.7 verwendete Chemikalien

D3-AAMA	synthetisiert von S. Foth, AG Eisenbrand
D3-GAMA	synthetisiert von M. Redecker, AG Eisenbrand
FPG	zur Verfügung gestellt von A. R. Collins, Universität Oslo
Isofluran	Baxter
N7-GA-Guanin	synthetisiert von N. Watzek, AG Eisenbrand
¹⁵ N ₅ -N7-GA-Guanin	synthetisiert von N. Watzek, AG Eisenbrand
PPG-Kalibrierlösung	Applied Biosystems
PPG 3000-Kalibrierlösung	Applied Biosystems
Proteinase K	QIAGEN
RNase A	QIAGEN
Stickstoff (technisch)	Air Liquide Deutschland GmbH
Triton-X	Serva
Trypanblau	Serva

Alle hier nicht aufgeführten Chemikalien können über die Firmen Sigma-Aldrich, Fluka, Merck und Riedel de Häen bezogen werden oder sind im Methodenteil aufgeführt.

7 Abkürzungen

A	Adenin
a	Jahr
AA	Acrylamid
AAMA	N-Acetyl-S-(2-carbamoylethyl)cystein
AAMA-SO	N-Acetyl-S-(2-carbamoylethyl)cystein-S-oxid
AA-TW	Acrylamid im Trinkwasser
AAVal	N-(2-carbamoylethyl)valin
ABT	1-Aminobenzotriazol
AP	apurine bzw. apyrimidinische Stelle
API	Atmospheric Pressure Ionisation
AUC	Area Under Curve
BER	Base Excision Repair
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
bidest.	bidestilliert
BK	Brotkruste
BVL	Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit
C	Cytosin
cps	counts per second
CYP	Cytochrom-P450 abhängige Monooxygenase
d	Tag
DNA	Desoxyribonucleic Acid
EH	Epoxidhydrolase
ESI	Electron Spray Ionisation
F344-Ratte	Fischer-344-Ratte
FaPy	Formamidopyrimidine
FPG	Formamidopyrimidin-DNA-Glycosylase
G	Guanin
GA	Glycidamid
GAMA-2	N-Acetyl-S-(R,S)-(1-carbamoyl-2-hydroxyethyl)cystein
GAMA-3	N-Acetyl-S-(R,S)-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)cystein
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GAVal	N-(R,S)-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)valin
GE	Glyceramid
GSH	Glutathion

Abkürzungen

GST	Glutathion-S-Transferase
Hb	Hämoglobin
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
IARC	International Agency for Research on Cancer
IS	interner Standard
JECFA	Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives
kDa	kilo-Dalton
KG	Körpergewicht
LK	Lebkuchen
m/z	Masse-zu-Ladungsverhältnis
MOE	Margin of Exposure
MRM	Multiple Reaction Monitoring
MS	Massenspektrometrie, Massenspektrometer
n	Anzahl unabhängiger Versuche
N3-GA-Adenin	N3-(R,S)-(2-Carbamoyl-2-hydroxyethyl)adenin
N7-GA-Guanin	N7-(R,S)-(2-Carbamoyl-2-hydroxyethyl)guanin
nd	nicht detektierbar
NER	Nucleotide Excision Repair
ng	nicht gemessen
NOAEL	No Observed Adverse Effect Level
nq	nicht quantifizierbar
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PFG	Pommes Frites (aus Kartoffel geschnitten)
PFR	Pommes Frites (aus Kartoffelerzeugnissen rekombiniert)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
Q	Quadrupol
R ²	Bestimmtheitsmaß
RNA	Ribonucleic Acid
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase Chain Reaction
s	Sekunde
s	Swain Scott Konstante
SCE	Schwesterchromatid-Austausch
SD-Ratte	Sprague-Dawley Ratte
SIM	Selected Ion Monitoring

Abkürzungen

SPE	Solid Phase Extraction
T	Thymin
TI	Tail Intensity
TK	Thymidinkinase
v/v	Volumenverhältnis
WHO	World Health Organisation

8 Literatur

Abramsson-Zetterberg L (2003): The dose-response relationship at very low doses of acrylamide is linear in the flow cytometer-based mouse micronucleus assay. *Mutat Res.* 535 (2), 215-22

Amrein TM, Schönbächler B, Rohner F, Lukac H, Schneider H, Keiser A, Escher F, Amadó R (2004): Potential for Acrylamide formation in potatoes: data from the 2003 harvest. *Eur. Food Res. Technol.* 219, 572-578

Applied Biosystems (2008): API 3200/4000/5000TM LC-MS/MS System Basic Training, PowerPoint Präsentation

Barber DS, Hunt JR, Ehrich MF, Lehning EJ, LoPachin RM (2001): Metabolism, toxicokinetics and hemoglobin adduct formation in rats following subacute and subchronic acrylamide dosing. *Neurotoxicology* 22, 341-353

Baum M, Fauth E, Fritzen S, Herrmann A, Mertes P, Rudolphi M, Spormann T, Zankl H, Eisenbrand G, Bertow D (2005): Acrylamide and glycidamide: approach towards risk assessment based on biomarker guided dosimetry of genotoxic/mutagenic effects in human blood. *Adv. Exp. Med. Biol.* 561, 77-88

Baum M, Loeppky RN, Thielen S, Eisenbrand G (2008): Genotoxicity of Glycidamid in Comparison to 3-N-Nitroso-oxazolidin-2-one. *J. Agric. Food Chem.* 56 (15), 5989-5993

Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (2008): Untersuchungsergebnisse: Acrylamid in Lebensmitteln.

<http://www.lgl.bayern.de/lebensmittel/rueckstaende/acrylamid/acrylamid-werte.htm>

Benford D, Bolger PM, Carthew P, Coulet M, DiNovi M, Leblanc JC, Renwick AG, Setzer W, Schlatter J, Smith B, Slob W, Williams G, Wildemann T (2010): Application of the Margin of Exposure (MOE) approach to substances in food that are genotoxic and carcinogenic. *Food Chem. Toxicol.* 48 Suppl 1, 2-24

Beranek DT (1990): Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents. *Mutat. Res.* 231 (1), 11-30

Berger FI, Feld J, Bertow D, Eisenbrand G, Fricker G, Gerhardt N, Merz KH, Richling E, Baum M (2010): Biological effects of acrylamide after daily ingestion of various foods in comparison to water: A study in rats. *Mol. Nutr. Food Res.*, in press

Berger F (2010): Metabolismus und Bioverfügbarkeit der Lebensmittelkontaminante Acrylamid in Ratte und Mensch. Dissertation, Technische Universität Kaiserslautern

Bergmark E, Calleman CJ, Costa LG (1991): Formation of hemoglobin adducts of acrylamide and its epoxide metabolite glycidamide in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 111 (2), 352-363

Bergmark E (1997): Hemoglobin adducts of acrylamide and acrylonitrile in laboratory workers, smokers and non-smokers. *Chem. Res. Toxicol.* 10 (1), 78-84

Bundesinstitut für Risikobewertung (2003a): Zur aktuellen Risikobewertung von Acrylamid in Lebensmitteln. *Bundesgesundheitsblatt* 46, 405-415

Bundesinstitut für Risikobewertung (2003b): Quellen für Acrylamid in Kosmetika. Stellungnahme des BfR vom 24. März 2003

Bundesinstitut für Risikobewertung (2004): Zwei Jahre Acrylamid – Eine Bilanz aus Sicht der Risikobewertung. Stellungnahme des BfR vom 19. März 2004

Bundesinstitut für Risikobewertung (2008): Besteht ein gesundheitliches Risiko durch Glycidamid in Lebensmitteln? Stellungnahme des BfR vom 23. Oktober 2008

Bjellaas T, Ølstørn HB, Becher G, Alexander J, Knutsen SH, Paulsen JE (2007): Urinary metabolites as biomarkers of acrylamide exposure in mice following dietary crisp bread administration or subcutaneous injection. *Toxicol. Sci.* 100 (2), 374-380

Boon PE, de Mul A, van der Voet H, van Donkersgoed G, Brette M, van Klaveren JD (2005): Calculations of dietary exposure to acrylamide. *Mutat. Res.* 580, 143-155

Brown TA (1996): Gentechnologie für Einsteiger. *Spektrum Akademischer Verlag*

Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (2005):

Minimierungskonzept zur Senkung der Acrylamidgehalte in Lebensmitteln

http://www.bvl.bund.de/cln_007/nn_493416/DE/01_Lebensmittel/03_UnerwStoffeUndOrganismen/04_Acrylamid/00_Minimierungskonzept/Im_acrylamid_minimierungskonzept_node.html_nnn=true

Calleman CJ, Wu Y, He F, Tian G, Bergmark E, Zhang S, Deng H, Wang Y, Crofton KM, Fennell T, Costa LG (1994): Relationships between biomarkers of exposure and neurological effects in a group of workers exposed to acrylamide. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 126 (2), 361-371

Calleman CJ (1996): The metabolism and pharmacokinetics of acrylamide: implications for mechanisms of toxicity and human risk estimation. *Drug Metab. Rev.* 28 (4), 527-590

Cammann K (2000): Instrumentelle Analytische Chemie. *Spektrum Akademischer Verlag*

Collins JJ, Swaen GM, Marsh GM, Utidjian HM, Caporossi JC, Lucas LJ (1989): Mortality patterns among workers exposed to acrylamide. *J. Occup. Med.* 31 (7), 614-617

Commandeur JN, Stijntjes GJ, Vermeulen NP (1995): Enzymes and transport systems involved in the formation and disposition of glutathione S-conjugates. Role in bioactivation and detoxication mechanisms of xenobiotics. *Pharmacol. Rev.* 47, 271-330

Costa LG, Deng H, Gregotti C, Manzo L, Faustman EM, Bergmark E, Calleman CJ (1992): Comparative studies on the neuro- and reproductive toxicity of acrylamide and its epoxide metabolite glycidamide in the rat. *Neurotoxicology* 13 (1), 219-224

De Vleeschouwer K, Van der Plancken I, Van Loey A, Hendrickx ME (2006): Impact of pH on the kinetics of acrylamide formation/elimination reactions in model systems. *J. Agric. Food Chem.* 54, 7847-7855

Dearfield KL, Douglas GR, Ehling UH, Moore MM, Sega GA, Brusick DJ (1995): Acrylamide: a review of its genotoxicity and an assessment of heritable genetic risk. *Mutat. Res.* 330 (1-2), 71-99

Doerge DR, Young JF, McDaniel LP, Twaddle NC, Churchwell MI (2005a): Toxicokinetics of acrylamide and glycidamide in B6C3F1 mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 202 (3), 258-267

Doerge DR, Young JF, McDaniel LP, Twaddle NC, Churchwell MI (2005b): Toxicokinetics of acrylamide and glycidamide in Fischer 344 rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 208, 199-209

Doerge DR, Gamboa da Costa G, McDaniel LP, Churchwell MI, Twaddle NC, Beland FA (2005c): DNA adducts derived from administration of acrylamide and glycidamide to mice and rats. *Mutat. Res.* 580 (1-2), 131-141

Doerge DR, Twaddle NC, Boettcher MI, McDaniel LP, Angerer J (2007): Urinary excretion of acrylamide and metabolites in Fischer 344 rats and B6C3F(1) mice administered a single dose of acrylamide. *Toxicol. Lett.* 169 (1), 34-42

European Commission (2002): Risk Assessment Report, Acrylamide, First Priority List, 24

Fennell TR, Sumner SC, Snyder RW, Burgess J, Spicer R, Bridson WE, Friedman MA (2005): Metabolism and hemoglobin adduct formation of acrylamide in humans. *Toxicol. Sci.* 85, 447-459

Fennell TR, Sumner SC, Snyder RW, Burgess J, Friedman MA (2006): Kinetics of elimination of urinary metabolites of acrylamide in humans. *Toxicol. Sci.* 93 (2), 256-267

Friedman MA, Dulak LH, Stedham MA (1995): A lifetime oncogenicity study in rats with acrylamide. *Fundam. Appl. Toxicol.* 27, 95-105

Friedman M & Levin CE (2008): Review of methods for the reduction of dietary content and toxicity of acrylamide. *J. Agric. Food Chem.* 56 (15), 6113-6140

Friedman M (2003): Chemistry, biochemistry, and safety of acrylamide. A review. *J. Agric. Food Chem.* 51 (16), 4504-4526

Fuhr U, Boettcher MI, Kinzig-Schippers M, Weyer A, Jetter A, Lazar A, Taubert D, Tomalik-Scharte D, Pournara P, Jakob V, Harlfinger S, Klaassen T, Berkessel A, Angerer J, Sorgel F, Schomig E (2006): Toxicokinetics of acrylamide in humans after ingestion of a defined dose in a test meal to improve risk assessment for acrylamide carcinogenicity. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 15, 266-271

Gamboa da Costa G, Churchwell MI, Hamilton LP, Von Tungeln LS, Beland FA, Marques MM, Doerge DR (2003): DNA adduct formation from acrylamide via conversion to glycidamide in adult and neonatal mice. *Chem. Res. Toxicol.* 16 (10), 1328-1337

Gates KS (2009): An overview of chemical processes that damage cellular DNA: spontaneous hydrolysis, alkylation, and reactions with radicals. *Chem. Res. Toxicol.* 22 (11), 1747-1760

Gertz CKS (2002): Analysis of acrylamide and mechanisms of its formation in deep-fried products. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 104, 762-771

Ghanayem BI, McDaniel LP, Churchwell MI, Twaddle NC, Snyder R, Fennell TR, Doerge DR (2005): Role of CYP2E1 in the epoxidation of acrylamide to glycidamide and formation of DNA and hemoglobin adducts. *Toxicol. Sci.* 88, 311-318

Granvogl M & Schieberle P (2006): Thermally generated 3-aminopropionamide as a transient intermediate in the formation of acrylamide. *J. Agric Food Chem.* 54, 5933-5938

Granvogl M, Koehler P, Latzer L, Schieberle P (2008): Development of a stable isotope dilution assay for the quantitation of glycidamide and its application to foods and model systems. *J. Agric. Food Chem.* 56, 6087-6092

Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB (1974): Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249 (22), 7130-7139

Hagmar L, Törnqvist M, Nordander C, Rosén I, Bruze M, Kautiainen A, Magnusson AL, Malmberg B, Aprea P, Granath F, Axmon A (2001): Health effects of occupational exposure to acrylamide using hemoglobin adducts as biomarkers of internal dose. *Scand. J. Work Environ.* 27 (4), 219-226

Hartmann A, Agurell E, Beevers C, Brendler-Schwaab S, Burlinson B, Clay P, Collins A, Smith A, Speit G, Thybaud V, Tice RR (2003): Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. 4th International Comet Assay Workshop. *Mutagenesis* 18 (1), 45-51

Hashimoto K & Tanii H (1985): Mutagenicity of acrylamide and its analogues in *Salmonella typhimurium*. *Mutat. Res.* 158 (3), 129-133

Heudorf U, Hartmann E, Angerer J (2008): Acrylamide in children--exposure assessment via urinary acrylamide metabolites as biomarkers. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 212, 135-141

IARC International Agency for Research on Cancer (1994): Monographs on the Evaluation of Carcinogen Risk to Humans: Some Industrial Chemicals. *International Agency for Research on Cancer* Vol. 60, Lyon

Jarabek AM, Pottenger LH, Andrews LS, Casciano D, Embry MR, Kim JH, Preston RJ, Reddy MV, Schoeny R, Shuker D, Skare J, Swenberg J, Williams GM, Zeiger E (2009): Creating context for the use of DNA adduct data in cancer risk assessment: I. Data organization. *Crit. Rev. Toxicol.* 39 (8), 659-678

Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (2010): Seventy-second meeting

Jenkins GJS, Doak SH, Johnson GE, Quick E, Waters EM, Parry JM (2005): Do dose response thresholds exist for genotoxic alkylating agents? *Mutagenesis* 20, 389-398

Johnson KA, Gorzinski SJ, Bodner KM, Campbell RA, Wolf CH, Friedman MA, Mast RW (1986): Chronic toxicity and oncogenicity study on acrylamide incorporated in the drinking water of Fischer 344 rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 85 (2), 154-168

Karakaya A, Jaruga P, Bohr VA, Grollman AP, Dizdaroglu M (1997): Kinetics of excision of purine lesions from DNA by Escherichia coli Fpg protein. *Nucleic Acids Res.* 25 (3), 474-479

Kharasch ED, Thummel KE, Mhyre J, Lillibridge JH (1993): Single-dose disulfiram inhibition of chlorzoxazone metabolism: a clinical probe for P450 2E1. *Clin. Pharmacol. Ther.* 53, 643-650

Knaap AG, Kramers PG, Voogd CE, Bergkamp WG, Groot MG, Langebroek PG, Mout HC, van der Stel JJ, Verharen HW (1988): Mutagenic activity of acrylamide in eukaryotic systems but not in bacteria. *Mutagenesis* 3 (3), 263-268

Laval J (1996): Role of DNA repair enzymes in the cellular resistance to oxidative stress. *Pathol. Biol.* 44, 14-24

Licea Pérez H, Cheong HK, Yang JS, Osterman-Golkar S (1999): Simultaneous Analysis of Hemoglobin Adducts of Acrylamide and Glycidamide by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Analytical Biochemistry* 274, 76-82

Lindl T (2000): Zell- und Gewebekultur, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg; 4., überarbeitete und erweiterte Auflage

Loeb LA & Preston BD (1986): Mutagenesis by apurinic/apyrimidinic sites. *Annu. Rev. Genet.* 20, 201-230

LoPachin RM (2002): The role of fast axonal transport in acrylamide pathophysiology: Mechanism or epiphenomenon? *Neuro. Toxicol.* 23, 253-257

LoPachin RM & Gavin T (2008): Acrylamide-induced nerve terminal damage: relevance to neurotoxic and neurodegenerative mechanisms. *J. Agric. Food Chem.* 56 (15), 5994-6003

Lottspeich F & Zorbas H (1998): Bioanalytik. *Spektrum Akademischer Verlag*

Manière I, Godard T, Doerge DR, Churchwell MI, Guffroy M, Laurentie M, Poul JM (2005): DNA damage and DNA adduct formation in rat tissues following oral administration of acrylamide. *Mutat. Res.* 580 (1-2), 119-129

Marnett LJ & Burcham PC (1993): Endogenous DNA adducts: potential and paradox. *Chem. Res. Toxicol.* 6 (6), 771-785

Marsh GM, Lucas LJ, Youk AO, Schall LC (1999): Mortality patterns among workers exposed to acrylamide: 1994 follow up. *Occup. Environ. Med.* 56 (3), 181-190

Mei N, Guo L, Tseng J, Dial SL, Liao W, Manjanatha MG (2008): Gene expression changes associated with xenobiotic metabolism pathways in mice exposed to acrylamide. *Environ. Mol. Mutagen.* 49 (9), 741-745

Miller MJ, Carter DE, Sipes IG (1982): Pharmacokinetics of acrylamide in Fisher-344 rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 63, 36-44

Moore MM, Amtower A, Doerr C, Brock KH, Dearfield KL (1987): Mutagenicity and clastogenicity of acrylamide in L5178Y mouse lymphoma cells. *Environ. Mutagen.* 9 (3), 261-267

Mottram DS, Wedzicha BL, Dodson AT (2002): Acrylamide is formed in the Maillard reaction. *Nature* 419, 448-449

Mucci LA, Dickman PW, Steineck G, Adami HO, Augustsson K (2003): Dietary acrylamide and cancer of the large bowel, kidney, and bladder: absence of an association in a population-based study in Sweden. *Br. J. Cancer.* 88 (1), 84-89

Mucci LA, Lindblad P, Steineck G, Adami HO (2004): Dietary acrylamide and risk of renal cell cancer. *Int. J. Cancer.* 109 (5), 774-776

Mucci LA, Sandin S, Bälter K, Adami HO, Magnusson C, Weiderpass E (2005): Acrylamide intake and breast cancer risk in Swedish women. *JAMA.* 293 (11), 1326-1327

Mucci LA, Adami HO, Wolk A (2006): Prospective study of dietary acrylamide and risk of colorectal cancer among women. *Int. J. Cancer.* 118 (1), 169-173

Paulsson B, Grawe J, Törnqvist M (2002): Hemoglobin adducts and micronucleus frequencies in mouse and rat after acrylamide or N-methylolacrylamide treatment. *Mut. Res.* 516, 101-111

Paulsson B, Kotova N, Grawé J, Henderson A, Granath F, Golding B, Törnqvist M (2003a): Induction of micronuclei in mouse and rat by glycidamide, genotoxic metabolite of acrylamide. *Mutat. Res.* 535 (1), 15-24

Paulsson B, Athanassiadis I, Rydberg P, Törnqvist M (2003b): Hemoglobin adducts from glycidamide: acetonisation of hydrophilic groups for reproducible gas chromatography/tandem mass spectrometric analysis. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 17, 1859-1865

Paulsson B, Rannug A, Henderson AP, Golding BT, Törnqvist M, Warholm M (2005): In vitro studies of the influence of glutathione transferases and epoxide hydrolase on the detoxification of acrylamide and glycidamide in blood. *Mutat. Res.* 580 (1-2), 53-59

Pelucchi C, Galeone C, Levi F, Negri E, Franceschi S, Talamini R, Bosetti C, Giacosa A, La Vecchia C (2006): Dietary acrylamide and human cancer. *Int. J. Cancer.*, 118 (2):467-71

Perez HL, Cheong HK, Yang JS, Osterman-Golkar S (1999): Simultaneous analysis of hemoglobin adducts of acrylamide and glycidamide by gas chromatography-mass spectrometry. *Anal. Biochem.* 274, 59-68

Plate AY, Crankshaw DL, Gallaher DD (2005): The effect of anesthesia by diethyl ether or isoflurane on activity of cytochrome P450 2E1 and P450 reductases in rat liver. *Anesth. Analg.* 101 (4),1063-1064

Rice JM (2005): The carcinogenicity of acrylamide. *Mutat. Res.* 580, 3-20.

Robertson AB, Klungland A, Rognes T, Leiros I (2009): DNA repair in mammalian cells: Base excision repair: the long and short of it. *Cell Mol. Life Sci.* 66 (6), 981-993

Saffhill R, Margison GP, O'Connor PJ (1985): Mechanisms of carcinogenesis induced by alkylating agents. *Biochim. Biophys. Acta.* 823 (2), 111-145

Schettgen T, Kutting B, Hornig M, Beckmann MW, Weiss T, Drexler H, Angerer J (2004a): Trans-placental exposure of neonates to acrylamide - a pilot study. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 77, 213-216

Schettgen T, Rossbach B, Kutting B, Letzel S, Drexler H, Angerer J (2004b): Determination of haemoglobin adducts of acrylamide and glycidamide in smoking and non-smoking persons of the general population. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 207, 531-539

Schieberle P, Köhler P, Granvogl M (2005): New aspects on the formation and analysis of acrylamide. *Adv. Exp. Med. Biol.* 561, 205-222.

Segeberäck D, Calleman CJ, Schroeder JL, Costa LG, Faustman EM (1995): Formation of N7-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)guanine in DNA of the mouse and the rat following intraperitoneal administration of [¹⁴C]acrylamide. *Carcinogenesis* 16 (5), 1161-1165

Settels E, Bernauer U, Palavinskas R, Klaffke HS, Gundert-Remy U, Appel KE (2008): Human CYP2E1 mediates the formation of glycidamide from acrylamide. *Arch. Toxicol.* 82 (10), 717-727

Shipp A, Lawrence G, Gentry R, McDonald T, Bartow H, Bounds J, Macdonald N, Clewell H, Allen B, Van Landingham C (2006): Acrylamide: review of toxicity data and dose-response analyses for cancer and noncancer effects. *Crit. Rev. Toxicol.* 36 (6-7), 481-608

Sickles DW, Stone JD, Friedman MA (2002): Fast axonal transport: a site of acrylamide neurotoxicity? *Neuro. Toxicol.* 23, 223-251

Smith CJ, Perfetti TA, Rumble MA, Rodgman A, Doolittle DJ (2000): "IARC group 2A Carcinogens" reported in cigarette mainstream smoke. *Food. Chem. Toxicol.*, 38, 371-383

Sobel W, Bond GG, Parsons TW, Brenner FE (1986): Acrylamide cohort mortality study. *Br. J. Ind. Med.* 43 (11), 785-788

Solomon JJ, Fedyk J, Mukai F, Segal A (1985): Direct alkylation of 2'-deoxynucleosides and DNA following in vitro reaction with acrylamide. *Cancer Res.* 45 (8), 3465-3470

Sörgel F, Weissenbacher R, Kinzig-Schippers M, Hofmann A, Illauer M, Skott A, Landersdorfer C (2002): Acrylamide: increased concentrations in homemade food and first evidence of its variable absorption from food, variable metabolism and placental and breast milk transfer in humans. *Chemotherapy* 48 (6), 267-274.

Stadler RH, Blank I, Varga N, Robert F, Hau J, Guy PA, Robert MC, Riediker S (2002): Acrylamide from Maillard reaction products. *Nature* 419 (6906), 449-450

Stadler RH, Robert F, Riediker S, Varga N, Davidek T, Devaud S, Goldmann T, Hau J, Blank I (2004): In-depth mechanistic study on the formation of acrylamide and other vinylogous compounds by the maillard reaction. *J. Agric. Food Chem.* 52, 5550-5558

Sumner SC, MacNeela JP, Fennell TR (1992): Characterization and quantitation of urinary metabolites of [1,2,3-¹³C]acrylamide in rats and mice using ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Chem. Res. Toxicol.* 5 (1), 81-89

Sumner SC, Fennell TR, Moore TA, Chanas B, Gonzalez F, Ghanayem BI (1999): Role of cytochrome P450 2E1 in the metabolism of acrylamide and acrylonitrile in mice. *Chem. Res. Toxicol.* 12, 1110-1116

Sumner SC, Williams CC, Snyder RW, Krol WL, Asgharian B, Fennell TR (2003): Acrylamide: a comparison of metabolism and hemoglobin adducts in rodents following dermal, intraperitoneal, oral, or inhalation exposure. *Toxicol. Sci.* 75, 260-270

Taeymans D, Wood J, Ashby P, Blank I, Studer A, Stadler RH, Gondé P, Van Eijck P, Lalljie S, Lingnert H, Lindblom M, Matissek R, Müller D, Tallmadge D, O'Brien J, Thompson S, Silvani D, Whitmore T (2004): A review of acrylamide: an industry perspective on research, analysis, formation, and control. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 44 (5), 323-347

Tareke E, Rydberg P, Karlsson P, Eriksson S, Törnqvist M: (2000): Acrylamide: a cooking carcinogen? *Chem. Res. Toxicol.* 13, 517-522

Tareke E, Rydberg P, Karlsson P, Eriksson S, Törnqvist M (2002): Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. *J. Agric. Food. Chem.* 50, 4998-5006

Tareke E, Twaddle NC, Mc Daniel LP, Churchwell MI, Young JF, Doerge DR (2006): Relationships between biomarkers of exposure and toxicokinetics in Fischer 344 rats and B6C3F1 mice administered single doses of acrylamide and glycidamide and multiple doses of acrylamide. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 217, 63-75

Tateishi N, Higashi T, Naruse A, Nakashima K, Shiozaki H (1977): Rat liver glutathione: possible role as a reservoir of cysteine. *J. Nutr.* 107 (1), 51-60

Thielen S, Baum M, Hoffmann M, Loeppky RN, Eisenbrand G (2006): Genotoxicity of glycidamide in comparison to (+/-)-anti-benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide and alpha-acetoxy-N-nitroso-diethanolamine in human blood and in mammalian V79-cells. *Mol. Nutr. Food Res.* 50, 430-436

Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF (2000): Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.* 35, 206-221

Törnqvist M, Bergmark E, Ehrenberg L, Granath F (1998): Risk Assessment of Acrylamide; Report 7/98. Swedish Inspectorate; Solna, Schweden.

Törnqvist M, Fred C, Haglund J, Helleberg H, Paulsson B, Rydberg P (2002): Protein adducts: quantitative and qualitative aspects of their formation, analysis and applications. *J. Chromatogr. B* 778, 279-308

Treptow-van Lishaut S, Rechkemmer G, Rowland I, Dolara P, Pool-Zobel BL (1999): The carbohydrate crystalline and colonic microflora modulate expression of glutathione S-transferase subunits in colon of rats. *Eur. J. Nutr.* 38 (2), 76-83

Tsuda H, Shimizu CS, Taketomi MK, Hasegawa MM, Hamada A, Kawata KM, Inui N (1993): Acrylamide; induction of DNA damage, chromosomal aberrations and cell transformation without gene mutations. *Mutagenesis* 8 (1), 23-29

Twaddle NC, McDaniel LP, Gamboa da Costa G, Churchwell MI, Beland FA, Doerge DR (2004): Determination of acrylamide and glycidamide serum toxicokinetics in B6C3F1 mice using LC-ES/MS/MS. *Cancer Lett.* 207 (1), 9-17

Tyl RW & Friedman MA (2003): Effects of acrylamide on rodent reproductive performance. *Reprod. Toxicol.* 17 (1), 1-13.

Van Landingham CB, Lawrence GA, Shipp AM (2004): Estimates of lifetime-absorbed daily doses from the use of personal-care products containing polyacrylamide: a Monte Carlo analysis. *Risk Anal.* 24 (3), 603-619

Watzek N (2009): Acrylamid und Glycidamid: Dosimetrie der Bildung von DNA-Addukten und Mercaptursäuren *in vitro*. Diplomarbeit, Technische Universität Kaiserslautern

World Health Organisation (2002): Health implications of acrylamide in food. Report of a Joint FAO/WHO consultation

Yaylayan VA, Wnorowski A, Perez Locas C (2003): Why asparagine needs carbohydrates to generate acrylamide. *J. Agric. Food Chem.* 51 (6), 1753-1757

Zeiger E, Recio L, Fennell TR, Haseman JK, Snyder RW, Friedman M (2009): Investigation of the low-dose response in the *in vivo* induction of micronuclei and adducts by acrylamide. *Toxicol. Sci.* 107 (1), 247-257

Zeynep Atay N, Calgan D, Özakat E, Varnali T (2005): Acrylamide and glycidamide adducts of guanine. *J. Mol. Structure: THEOCHEM* 728, 249-251

Zyzak DV, Sanders RA, Stojanovic M, Tallmadge DH, Eberhart BL, Ewald DK, Gruber DC, Morsch TR, Strothers MA, Rizzi GP, Villagran MD (2003): Acrylamide formation mechanism in heated foods. *J. Agric. Food*

9 Anhang

Untersuchung der CYP2E1- und GST α 2-Expression in mit Acrylamid behandelten Ratten mittels RT-PCR

CYP 2E1

1 Tag

	CYP2E1		GAPDH		T/C [%]		Bezug auf TW [%]	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
TW	53561,1	7468,1	57705,2	4263,2	92,6	9,5	100,0	10,3
AA-TW	54195,8	2158,9	61576,0	5681,2	89,0	11,2	96,2	12,1
LK	44075,3	1808,7	61337,2	4984,2	72,5	8,4	78,3	9,0
PFG	51529,1	4462,0	59002,7	4962,5	87,3	1,9	94,3	2,0
PFR	33438,6	6999,8	47327,8	2872,7	71,8	19,8	77,6	21,4

5 Tage

	CYP2E1		GAPDH		T/C [%]		Bezug auf TW [%]	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
TW	25921,2	1721,4	51281,0	4495,5	50,8	3,4	100,0	6,6
AA-TW	37737,8	4538,9	55052,2	721,3	68,7	9,1	135,3	17,8
LK	27878,3	8683,8	53270,3	2336,1	51,8	14,0	102,1	27,6
PFG	23937,0	4719,5	48588,5	2755,2	49,6	10,6	97,7	20,8
PFR	28841,3	6778,4	53100,5	2561,8	53,9	10,2	106,2	20,1

9 Tage

	CYP2E1		GAPDH		T/C [%]		Bezug auf TW [%]	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
TW	40838,9	7028,7	56614,7	3125,7	71,8	9,3	100,0	12,9
AA-TW	35147,2	4216,2	61142,0	5554,9	57,3	1,6	79,9	2,2
LK	38089,9	4953,8	67728,7	4620,5	56,3	6,8	78,4	9,4
PFG	45337,3	11106,0	73450,0	4402,7	61,2	13,0	85,3	18,1
PFR	49107,3	1683,4	61745,2	1650,0	79,6	2,8	110,9	3,8

GST α 2**1 Tag**

	GSTα2		GAPDH		T/C [%]		Bezug auf TW [%]	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
TW	63337,3	9867,3	57705,2	4263,2	109,7	15,1	100,0	13,8
AA-TW	65137,0	6332,6	61576,0	5681,2	107,5	19,0	98,0	17,4
LK	64040,7	3454,3	61337,2	4984,2	104,8	6,7	95,5	6,1
PFG	72544,0	6489,2	59002,7	4962,5	123,2	9,5	112,3	8,6
PFR	51334,7	4856,3	47327,8	2872,7	109,3	15,8	99,6	14,4

5 Tage

	GSTα2		GAPDH		T/C [%]		Bezug auf TW [%]	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
TW	42229,4	9347,5	51281,0	4495,5	81,5	13,3	100,0	16,3
AA-TW	46482,0	2751,1	55052,2	721,3	84,4	3,9	103,5	4,8
LK	51911,0	5251,1	53270,3	2336,1	97,6	10,5	119,7	12,9
PFG	51409,7	8727,2	48588,5	2755,2	105,4	14,0	129,2	17,2
PFR	59848,4	942,2	53100,5	2561,8	113,0	6,2	138,6	7,6

9 Tage

	GSTα2		GAPDH		T/C [%]		Bezug auf TW [%]	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
TW	52832,1	1674,4	56614,7	3125,7	93,5	3,9	100,0	4,1
AA-TW	42652,6	9403,3	61142,0	5554,9	69,6	13,5	74,5	14,5
LK	48560,1	5126,2	67728,7	4620,5	72,4	11,6	77,5	12,4
PFG	54657,3	6821,5	73450,0	4402,7	74,8	11,3	80,0	12,1
PFR	51272,2	8757,8	61745,2	1650,0	83,1	14,8	88,9	15,8

Comet Assay

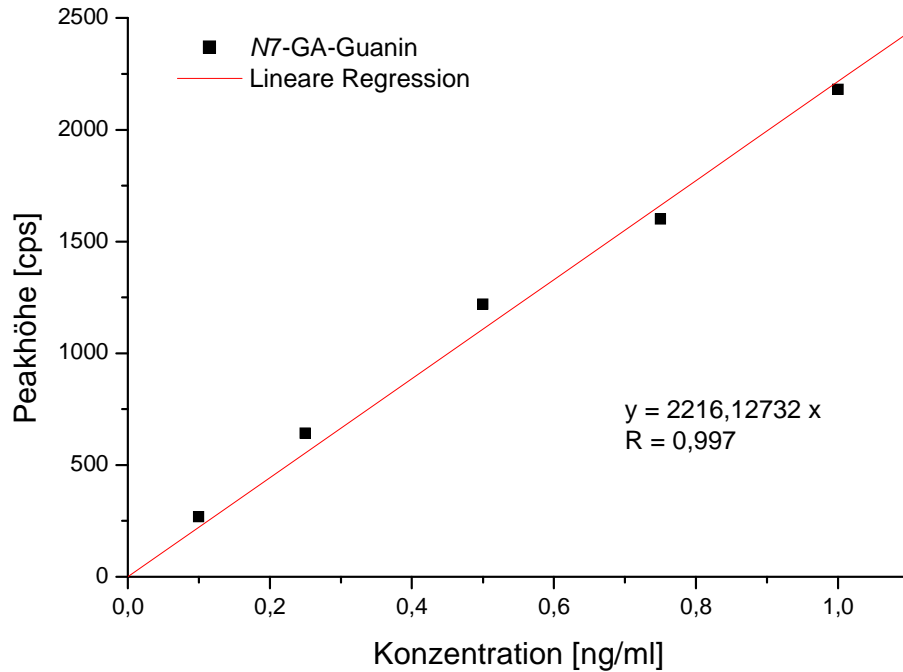
	1 Tag				3 Tage				5 Tage			
	Leber		Blut		Leber		Blut		Leber		Blut	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
Negativkontrolle	1,26	0,31	0,96	0,07	8,93	0,91	7,30	0,90	1,21	0,23	1,89	0,05
AA-TW (100 µg/kg)	0,96	0,27	1,14	0,19	9,28	0,23	7,97	4,35	1,63	0,12	2,31	0,25
LK	2,01	0,62	1,45	0,32	8,71	0,29	7,78	2,97	1,89	0,55	2,75	0,54
PFG	1,33	0,50	1,43	0,39	6,79	0,93	10,68	1,91	1,54	0,37	2,79	1,13
PFR	1,17	0,09	1,60	0,14	7,85	0,32	10,24	2,52	1,44	0,66	2,95	0,64
Negativkontrolle	1,26	0,31	0,96	0,07	3,55	0,76	3,64	0,20	2,26	0,54	2,45	0,17
AA-TW (50 µg/kg)	1,55	0,27	1,07	0,10	3,65	0,98	5,85	0,63	1,90	0,26	3,23	0,17
BK	1,20	0,18	1,60	0,22	3,64	0,98	5,54	1,54	2,01	0,02	3,67	0,78

	7 Tage				9 Tage			
	Leber		Blut		Leber		Blut	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
Negativkontrolle	6,57	0,96	5,56	0,13	4,16	1,48	6,27	2,10
AA-TW (100 µg/kg)	11,75	0,61	5,98	2,56	6,69	2,23	6,12	2,19
LK	9,79	3,09	5,99	1,22	6,35	0,29	6,13	0,53
PFG	9,38	1,87	6,97	1,60	5,15	2,13	7,31	1,09
PFR	5,75	1,87	6,46	1,19	4,39	1,60	5,35	0,63
Negativkontrolle	3,66	1,28	6,68	0,80	1,96	0,45	2,90	0,28
AA-TW (50 µg/kg)	4,17	0,53	6,81	0,69	2,14	0,51	2,91	0,28
BK	5,32	1,71	5,05	1,67	2,47	0,62	3,61	0,77

	kumulative Dosis			
	Leber		Blut	
Negativkontrolle	1,03	0,5	0,68	0,34
0,45 mg/kg KG	0,84	0,7	0,96	0,51
0,9 mg/kg KG	0,79	0,4	0,79	0,27
Negativkontrolle	7,32	1,47	2,32	0,47
10 mg/kg KG	16,49	2,66	43,35	1,56

N7-GA-Guanin-Addukte

Regressionsgerade der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen



kumulative Dosis

mg Acrylamid/kg KG	0,45				0,9				10
	Leber	Niere	Lunge	Hoden	Leber	Niere	Lunge	Hoden	Leber
Addukte/10⁸ Nukleotide	n.q.	n.q.	n.q.	n.q.	15,04	12,46	20,40	8,76	67,91
Standardabweichung	---	---	---	---	3,98	2,25	10,19	0,78	14,78
fmol Addukt/mg DNA	n.q.	n.q.	n.q.	n.q.	461,29	382,30	625,83	268,62	2083,11
Standardabweichung	---	---	---	---	122,15	68,98	312,70	24,03	453,44

Untersuchung der zeit- und dosisabhängigen Bildung von N7-GA-Guanin
1 mg Acrylamid/kg KG

	8 Stunden			16 Stunden			24 Stunden		
	Leber	Niere	Lunge	Leber	Niere	Lunge	Leber	Niere	Lunge
Addukte/10⁸ Nukleotide	5,6	17,9	3,9	8,7	18,4	16,7	5,7	15,8	16,2
Standardabweichung	0,7	7,6	0,7	3,1	2,3	1,6	0,9	3,7	1,0
fmol Addukt/mg DNA	171,9	549,2	120,6	266,6	563,1	511,2	175,1	486,1	498,0
Standardabweichung	22,2	218,7	17,7	94,4	64,1	48,1	26,1	107,5	18,5

10 mg Acrylamid/kg KG

	8 Stunden			16 Stunden			24 Stunden		
	Leber	Niere	Lunge	Leber	Niere	Lunge	Leber	Niere	Lunge
Addukte/10⁸ Nukleotide	84,7	123,9	138,8	122,9	236,5	216,4	96,2	164,9	181,7
Standardabweichung	27,8	42,9	54,4	25,1	61,4	42,2	24,0	40,3	34,4
fmol Addukt/mg DNA	2598,9	3296,4	4249,0	3769,5	7107,1	6589,7	2951,3	5051,5	5564,9
Standardabweichung	851,8	1383,8	1669,5	768,7	1723,0	1308,8	736,0	1227,3	1102,2

3 mg Acrylamid/kg KG

	16 Stunden		
	Leber	Niere	Lunge
Addukte/10⁸ Nukleotide	15,3	41,7	60,4
Standardabweichung	4,2	10,9	2,6
fmol Addukt/mg DNA	468,3	1279,5	1853,7
Standardabweichung	129,5	333,4	79,6

6 mg Acrylamid/kg KG

	16 Stunden		
	Leber	Niere	Lunge
Addukte/10⁸ Nukleotide	32,2	86,2	76,0
Standardabweichung	5,6	19,6	7,1
fmol Addukt/mg DNA	987,9	2645,0	2330,5
Standardabweichung	171,3	599,9	218,8

Acrylamid- und Glycidamid-Mercaptursäuren

zeitabhängige Bildung

1 mg Acrylamid/kg KG

	Kontrolle	8 Stunden	16 Stunden	24 Stunden
Stoffmenge AAMA [nmol]	n.d.	638,6	850,9	1211,6
Standardabweichung	---	225,1	50,5	4,7
Stoffmenge GAMA [nmol]	n.d.	107,1	368,4	597,3
Standardabweichung	---	46,8	13,9	27,4
GAMA/AAMA		0,16	0,43	0,49
Standardabweichung		0,02	0,01	0,02
AAMA [% Dosis]		18,81	27,98	37,10
Standardabweichung		6,06	1,87	1,24
GAMA [% Dosis]		3,15	12,11	18,26
Standardabweichung		1,29	0,55	0,30
AAMA + GAMA [% Dosis]		21,96	40,09	55,36
Standardabweichung		7,35	2,41	0,94

10 mg Acrylamid/kg KG

	Kontrolle	8 Stunden	16 Stunden	24 Stunden
Stoffmenge AAMA [nmol]	n.d.	6068,4	9871,4	15747,4
Standardabweichung	---	1883,7	1506,5	2131,8
Stoffmenge GAMA [nmol]	n.d.	1262,3	4137,6	5571,4
Standardabweichung	---	239,8	1101,0	1535,6
GAMA/AAMA		0,22	0,41	0,35
Standardabweichung		0,03	0,06	0,07
AAMA [% Dosis]		16,72	27,70	38,56
Standardabweichung		4,60	4,10	6,73
GAMA [% Dosis]		3,54	11,71	13,93
Standardabweichung		0,54	3,30	4,59
AAMA + GAMA [% Dosis]		20,26	39,41	52,48
Standardabweichung		5,03	7,30	10,99

dosisabhängige Bildung im 16-Stunden-Sammelurin

	Kontrolle	mg Acrylamid/kg KG			
		0,1	0,5	3	6
Stoffmenge AAMA [nmol]	2,9	106,8	498,9	2630,3	5299,3
Standardabweichung	0,5	17,4	23,7	376,1	150,1
Stoffmenge GAMA [nmol]	1,3	48,7	308,8	1214,9	2673,1
Standardabweichung	0,0	10,4	67,9	203,2	172,5
GAMA/AAMA		0,5	0,6	0,5	0,5
Standardabweichung		0,1	0,2	0,0	0,0
AAMA [% Dosis]		36,3	35,0	30,2	28,2
Standardabweichung		6,2	2,3	3,2	0,4
GAMA [% Dosis]		16,5	21,6	14,0	13,7
Standardabweichung		3,5	4,3	1,9	0,4
AAMA + GAMA [% Dosis]		52,8	56,6	44,2	41,9
Standardabweichung		9,2	3,4	4,7	0,8

verwendete Formeln**Lineare Regression (nach Origin 6.0):**

$$y_i = A + Bx_i$$

y-Achsenabschnitt

$$A = \frac{\left(\sum_i y_i\right)\left(\sum_i x_i^2\right) - \left(\sum_i x_i\right)\left(\sum_i (x_i \cdot y_i)\right)}{N}$$

Steigung

$$B = \frac{n\sum_i (x_i \cdot y_i) - \left(\sum_i x_i\right)\left(\sum_i y_i\right)}{N}$$

Nenner

$$N = n\sum_i x_i^2 - \left(\sum_i x_i\right)^2$$

Fehler der Steigung

$$m_B = \sqrt{\frac{nS}{(n-2)N}}$$

Fehler des y-Achsenabschnittes

$$m_A = \sqrt{\frac{S\sum_i x_i^2}{(n-2)N}}$$

Fehlerquadratsumme

$$S = \sum_{i=1}^n (y_i - Bx_i - A)^2$$

arithmetischer Mittelwert

$$\bar{x} = \frac{\sum_i x_i}{n}$$

Standardabweichung

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n}}$$

Veröffentlichungen

Posterbeiträge

Franz Berger, Julia Feld, Matthias Baum, Gerhard Eisenbrand

„Acrylamide: Impact of food-matrices on bioavailability and biological effects on rats.“

25 Jahre Lebensmittelchemie & Toxikologie an der TU Kaiserslautern, Symposium
„Cornerstones of the Life Science in Chemistry“, 28.09.2007 in Kaiserslautern

Franz Berger, Julia Feld, Matthias Baum, Gerhard Eisenbrand

„Acrylamid: Einfluss der Lebensmittelmatrix auf Bioverfügbarkeit und biologische Effekte in der Ratte.“

GDCH-Jahrestagung 2008, Regionalverband Süd-West, 3.-4.3.08 in Stuttgart-Hohenheim

Franz Berger, Julia Feld, Matthias Baum, Gerhard Eisenbrand

„Acrylamide: Impact of food-matrices on bioavailability and biological effects in rats.“

49. Jahrestagung der DGPT 2008, 11.-13.3.08 in Mainz

Julia Feld, Sandra Jakobs, Gerhard Eisenbrand

„Influence of GSK-3 inhibitors on phosphorylation of the NF κ B subunit p65 in pancreatic cancer cells.“

49. Jahrestagung der DGPT 2008, 11.-13.3.08 in Mainz

Matthias Baum, Franz Ingo Berger, Julia Feld, Gerhard Eisenbrand

„Influence of food matrices on bioavailability and biological effects of acrylamide in the rat.“

99th AACR Annual Meeting 2008, 12-16.4.08 in San Diego, USA

Julia Feld, Franz Ingo Berger, Matthias Baum, Gerhard Eisenbrand

„Biomarker der Exposition und biologischen Wirksamkeit von Acrylamid *in vivo*.“

37. Deutschen Lebensmittelchemikertag, 8.-10.09.2008 in Kaiserslautern

Julia Feld, Franz Berger, Matthias Baum, Gerhard Eisenbrand

„Effect of Food Matrices on Bioavailability and Biological Effects of Acrylamide in Rats.“

45th Congress of the European Societies of Toxicology, 05.-08.10.08 in Rhodos, Griechenland

Julia Feld, Franz Ingo Berger, Matthias Baum, Gerhard Eisenbrand
„Balance of toxification and detoxification of acrylamide in the rat.”
50. Jahrestagung der DGPT 2009, 10.-12.3.09 in Mainz

Matthias Baum, Franz Berger, Julia Feld, Gerhard Eisenbrand
„Is there an effect of food matrices on the bioavailability of acrylamide?”
SOT 48th Annual Meeting & ToxExpoTM, 15.-19.03.09 in Baltimore, USA

Matthias Baum, Franz Ingo Berger, Julia Feld, Gerhard Eisenbrand
„Acrylamide in food: Balance of toxification and detoxification in the rat at doses, reflecting dietary worst case situations.”
100th AACR Annual Meeting 2009, 18.-22.04.09 Denver, USA

Watzek N, Berger F, Eisenbrand G, Feld J, Hengstler J, Richling E, Schug M, Baum M
„Acrylamid: Metabolismus und biologische Effekte in primären Rattenhepatozyten“
38. Deutschen Lebensmittelchemikertag, 14.-16.09.2009 in Berlin

Publikationen

Franz Berger, Julia Feld, Matthias Baum, Gerhard Eisenbrand
„Acrylamide: Impact of food-matrices on bioavailability and biological effects in rats.”
Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, 377, Supplement 1, 2008

Julia Feld, Sandra Jakobs, Gerhard Eisenbrand
„Influence of GSK-3 inhibitors on phosphorylation of the NFκB subunit p65 in pancreatic cancer cells.”
Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, 377, Supplement 1, 2008

Baum M, Berger FI, Feld J, Gerhardt N, Eisenbrand G
„Impact of food matrices on bioavailability and biological effects of acrylamide in rats.”
Research Association of the German Food Industry AiF 209 ZBG, 62-70, 2008

Julia Feld, Franz Berger, Matthias Baum, Gerhard Eisenbrand
„Effect of Food Matrices on Bioavailability and Biological Effects of Acrylamide in Rats.”
Toxicology Letters, Volume 180, Supplement 1 (2008), S82

Matthias Baum, Franz Ingo Berger, Julia Feld, Gerhard Eisenbrand

„Acrylamid: Bioverfügbarkeit aus Lebensmitteln.“

Lebensmittelchemie Vol. 63 No. 2-2009

Julia Feld, Franz Ingo Berger, Matthias Baum, Gerhard Eisenbrand

„Balance of toxification and detoxification of acrylamide in the rat.“

Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, 379, Supplement 1, 2009

Franz Ingo Berger, Julia Feld, Daniel Bertow, Gerhard Eisenbrand, Gert Fricker, Natalie

Gerhardt, Karl-Heinz Merz, Elke Richling, Matthias Baum

„Biological effects of acrylamide after daily ingestion of various foods in comparison to water:

A study in rats.“ Mol. Nutr. Food Res., in press

Ich danke allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Insbesondere gilt mein **Dank**

- dem Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI) für die finanzielle Unterstützung des Teilprojektes „Acrylamid in Lebensmitteln: Einfluss spezifischer Lebensmittelmatrices auf Bioverfügbarkeit und biologische Effekte in der Ratte“ im Rahmen des FEI-Projektes „Entwicklung und Anwendung neuer Verfahrensabläufe in Produktionsanlagen für Kartoffel- und Getreideerzeugnisse mit reduzierten Gehalten an Acrylamid und dessen Folgeprodukten“ (AiF 209 ZBG), welches in Zusammenarbeit mit dem Bund für Lebensmittelrecht und Lebensmittelkunde e.V. (BLL) durchgeführt wurde.
- der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Gert Fricker, Institut für Pharmazie und Molekulare Biotechnologie, Ruprecht-Karls Universität Heidelberg, für die Unterstützung bei der Durchführung der Tierversuche.
- Dr. Knut Franke (DIL Quakenbrück), Dr. Michael Granvogl (TU München) und Dr. Heinz Kaiser (ILU Nuthetal) für die Bestimmung der Acrylamid-Gehalte in den verwendeten Lebensmitteln.
- den Arbeitsgruppen von Herrn Prof. Dr. Dr. Schrenk und Frau Prof. Dr. Richling für die gute Zusammenarbeit.
- Ari, Eva, Rainer und Sylvia für ihre Hilfe bei technischen Problemen aller Art.
- Ingrid und Heike für die Unterstützung bei den alltäglichen Kleinigkeiten außerhalb des Labors.
- Michael, Sandra und Karl-Heinz für die stete Hilfs- und Diskussionsbereitschaft.
- meinen Laborkollegen Franz, Nadine, Nico, Tamara, Hannah und Gina für ihre Hilfsbereitschaft, die fachlichen Diskussionen und ihre Freundschaft.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Julia Feld
Geburtsdatum 18.12.1981 in Lebach
Familienstand ledig

Hochschulbildung

seit 05/2006 Promotion bei Prof. Dr. Gerhard Eisenbrand an der Technischen Universität Kaiserslautern, Fachbereich Chemie, Fachrichtung Lebensmittelchemie und Toxikologie
Thema: „Charakterisierung der DNA-schädigenden Wirkung von Acrylamid in Lebensmitteln am Modell der Ratte“

10/2001-03/2006 Studium der Lebensmittelchemie an der TU Kaiserslautern
Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Gerhard Eisenbrand mit dem Thema: „Untersuchung zur Bedeutung der Glykogensynthase-Kinase 3 in humanen Pankreastumorzellen“
Abschluss: Diplom-Lebensmittelchemikerin

Berufstätigkeit

seit 05/2010 Dr. Knoell Consult GmbH, Tätigkeit im Bereich Product Safety and Chemicals Management

Weiterbildung

seit 09/2007 Weiterbildung zur Fachtoxikologin der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT)

02/2006 Strahlenschutz-Lehrgang an der Technischen Akademie Südwest
Erwerb der Sachkunde im Strahlenschutz

Schulische Ausbildung

1998-2001 Geschwister-Scholl-Gymnasium Lebach, Allgemeine Hochschulreife
1992-1998 Kreisrealschule Lebach
1988-1992 Grundschule St. Barbara Landsweiler