

Acrylamid und Acrolein: Toxikokinetik hitzeinduzierter Kontaminanten in Lebensmitteln

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

D 386

vorgelegt von Diplom-Lebensmittelchemiker
Nico Watzek

Datum der wissenschaftlichen Aussprache: 09.03.2012

Kaiserslautern 2012

für Michaela

„So eine Arbeit wird eigentlich nie fertig, man muss sie für fertig erklären, wenn man nach der Zeit und den Umständen das Möglichste getan hat“

Johann Wolfgang von Goethe (1749-1832)

Der experimentelle Teil dieser Arbeit entstand im Zeitraum von April 2009 bis Oktober 2011 in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. rer. nat. Elke Richling im Fachbereich Chemie, Fachrichtung Lebensmittelchemie und Toxikologie der Technischen Universität Kaiserslautern.

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 09.03.2012

Prüfungskommission:

Vorsitzender:	Prof. Dr. rer. nat. Helmut Sitzmann
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. rer. nat. Elke Richling
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. rer. nat. Gerhard Eisenbrand

Ich danke Frau Prof. Dr. Elke Richling und Herrn Prof. Dr. Gerhard Eisenbrand für die Überlassung des interessanten Themas und die stete Diskussionsbereitschaft und Unterstützung während und nach meiner Promotionszeit.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I	
Veröffentlichungen	VI	
Abkürzungsverzeichnis	IX	
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	XII	
Summary.....	XIX	
1	Einleitung	1
2	Theoretische Grundlagen	4
2.1	Acrylamid	4
2.1.1	Allgemeines.....	4
2.1.2	Expositionsquellen für den Menschen	4
2.1.3	Bildung von Acrylamid im Lebensmittel	5
2.1.4	Acrylamidgehalte in verschiedenen Lebensmitteln.....	7
2.2.5	Toxikologie von Acrylamid	9
2.2.5.2	Toxikokinetik von Acrylamid.....	9
2.2.5.2.1	Aufnahme und Verteilung von Acrylamid im Organismus	9
2.2.5.2.2	Metabolismus von Acrylamid im Organismus.....	9
2.2.5.2.3	Ausscheidung von Acrylamid aus dem Organismus	13
2.2.5.3	Toxikodynamik von Acrylamid	13
2.2.5.3.1	Neurotoxizität von Acrylamid	13
2.2.5.3.2	Reproduktionstoxizität von Acrylamid	14
2.2.5.3.3	Genotoxizität und Kanzerogenität von Acrylamid	14
2.3	Acrolein	17
2.2.4	Allgemeines.....	17
2.2.5	Bildung von Acrolein	18
2.2.5.1	Exogene Bildungsmechanismen von Acrolein.....	18
2.2.5.2	Endogene Bildungsmechanismen von Acrolein	21
2.2.6	Acroleingehalte in Lebensmitteln	22
2.2.7	Toxikologie von Acrolein	23
2.2.7.1	Toxikokinetik von Acrolein.....	23
2.2.7.1.1	Aufnahme und Verteilung von Acrolein in den Organismus	23
2.2.7.1.2	Metabolismus von Acrolein im Organismus.....	24
2.2.7.1.3	Ausscheidung von Acrolein aus dem Organismus	26
2.2.7.2	Toxikodynamik von Acrolein	26
2.2.7.2.1	Akute, subchronische und chronische Toxizität von Acrolein.....	26
2.2.7.2.2	Reproduktionstoxizität von Acrolein.....	27
2.2.7.2.3	Genotoxizität und Kanzerogenität von Acrolein.....	27
2.3	Grundlagen und Biochemie der Desoxyribonukleinsäure (DNA)	29
2.3.1	Aufbau der DNA	29
2.3.2	DNA-Schäden und mögliche Folgen.....	30
2.3.3	Reparatur von DNA-Schäden	31

2.4	Stadien der Tumorentstehung	33
2.5	Biomonitoring	35
2.6	Risikobewertung	36
2.7	DNA-Addukte im Risikomanagement	38
2.8	Analytik	43
2.8.1	Hochleistungsflüssigchromatographie	43
2.8.2	Massenspektrometrie (MS)	44
2.8.3	Kopplungsprinzip von HPLC und MS	45
2.8.4	Kalibrierung und Tuning der Massenspektrometer	48
2.8.5	Stabilisotopenverdünnungsanalyse (SIVA)	49
3	Problemstellung	51
4	Ergebnisse und Diskussion	53
4.1	Methodenentwicklung	53
4.1.1	Messung von α - und γ -Hydroxypropanodeoxyguanosin	53
4.1.1.1	Darstellung von α - und γ -Hydroxy- $^{15}\text{N}_5$ -propanodeoxyguanosin (α - und γ -OH- $^{15}\text{N}_5$ -PdG)	53
4.1.1.2	Etablierung einer Messmethode für OH-PdG-Addukte mittels HPLC-ESI-MS/MS	56
4.2	<i>In vitro</i> Experimente mit Acrylamid und Acrolein	63
4.2.1	Acrylamid	63
4.2.1.1	Inkubation von primären Rattenhepatozyten mit Acrylamid	63
4.2.1.1.1	Bestimmung der Zytotoxizität von Acrylamid und Glycidamid mittels Resazurin-Reduktionstest in primären Rattenhepatozyten	64
4.2.1.1.2	Bestimmung der Biomarker für die Giftung von Acrylamid	66
4.2.1.1.2.1	Freies Glycidamid im Zellkulturmedium	66
4.2.1.1.2.2	N7-GA-Gua-Addukte aus der DNA von primären Rattenhepatozyten	69
4.2.1.1.3	Bestimmung der Biomarker für die Entgiftung	70
4.2.1.1.3.1	Glutathionaddukte von Acrylamid und Glycidamid im Zellkulturmedium	71
4.2.1.1.3.2	Bestimmung der Mercaptursäuren im Zellkulturmedium nach Inkubation von primären Rattenhepatozyten mit Acrylamid	74
4.2.1.1.4	Korrelation der Kinetik der AA-GSH-Bildung mit der Glycidamidbildung	79
4.2.2	Acrolein	80
4.2.2.1	Untersuchung zur Acrolein-konzentrationsabhängigen DNA Adduktbildung	80
4.2.2.2	Untersuchung zur Reaktionskinetik der DNA-Adduktbildung	83
4.3	<i>In vivo</i> Experimente	85
4.3.1	Untersuchung zur biologischen Aktivität geringer Acrylamidkonzentrationen in der Ratte	85
4.3.1.1	Acrylamid	85
4.3.1.1.1	Bestimmung der Mercaptursäuren von Acrylamid und Glycidamid im Sammelurin	86

4.3.1.1.2	Bestimmung von <i>N</i> 7-Glycidamid-Guanin-Addukten aus der DNA von Gewebeproben.....	89
4.3.1.2	Acrolein	95
4.3.1.2.1	Bestimmung von 3-HPMA im Sammelurin.....	95
4.3.1.2.2	Bestimmung von OH-PdG-Addukten aus der DNA von Gewebeproben.....	97
4.3.2	Bestimmung der Eliminationskinetik von Acrolein im Menschen nach einmaliger Aufnahme	98
4.3.3	Bestimmung der Ausscheidungskinetik von Acrolein und Acrylamid im Menschen nach Aufnahme von kommerziell erhältlichen Kartoffelchips.....	101
4.3.4	Bestimmung der Ausscheidungskinetik von Acrolein und Acrylamid im Menschen nach Aufnahme von selbst hergestellten Kartoffelchips	110
5	Zusammenfassung	118
6	Material und Methoden	120
6.1	Allgemeines	120
6.2	Verwendete Reagenzien/Lösungen, Verbrauchsmaterialien und Geräte	121
6.2.1	Reagenzien/Lösungen	121
6.2.2	Verbrauchsmaterialien	122
6.2.3	Geräte	123
6.3	Synthese von α- und γ-1-N²-Hydroxypropano-[¹⁵N₅]-2'-deoxyguanosin	125
6.4	Methodenentwicklung und -etablierung	127
6.4.1	Etablierung einer Messmethode zur Quantifizierung von Kreatinin mittels HPLC-ESI-MS in Urinproben	128
6.4.1.1	Optimierung der HPLC-Methode	128
6.4.1.2	Optimierung der gerätespezifischen Parameter	130
6.4.2	Bestimmung der Mercaptursäuren von Acrolein, Acrylamid und Glycidamid.....	134
6.4.2.1	Bestimmung der Carboxyethylmercaptursäure (CEMA).....	134
6.4.2.1.1	Optimierung der HPLC-Methode	134
6.4.2.1.2	Optimierung der gerätespezifischen Parameter	135
6.4.2.1.3	Entwicklung einer geeigneten Aufarbeitungsmethode für CEMA.....	141
6.4.2.2	Methodenentwicklung zur Chromatographie von 3-HPMA, CEMA, AAMA und GAMA.....	144
6.5	<i>In vitro</i> Experimente	146
6.5.1	Acrylamid	146
6.5.1.1	Inkubation von primären Rattenhepatozyten mit Acrylamid	146
6.5.1.1.1	Allgemeines.....	146
6.5.1.1.2	Bestimmung der Zellzahl und der Viabilität.....	147
6.5.1.1.3	Kultivierung und Behandlung der Hepatozyten	149
6.5.1.1.4	Inkubation mit Acrylamid.....	150

6.5.1.1.5	Bestimmung der Zytotoxizität von Acrylamid und Glycidamid mittels Resazurin-Reduktionstest.....	150
6.5.1.1.6	Bestimmung von Glycidamid im Zellkulturmedium	151
6.5.1.1.7	Bestimmung der Glutathionaddukte von Acrylamid und Glycidamid im Zellkulturmedium.....	154
6.5.1.1.8	Bestimmung der Mercaptursäuren von Acrylamid und Glycidamid im Zellkulturmedium.....	156
6.5.1.1.9	Bestimmung von N7-GA-Gua-Addukten aus der DNA von primären Rattenhepatozyten.....	159
6.5.2	Acrolein	162
6.5.2.1	Inkubation von DNA mit Acrolein	162
6.5.2.1.1	Allgemeines.....	162
6.5.2.2	Untersuchung zur Acrolein-konzentrationsabhängigen DNA-Adduktbildung	163
6.5.2.3	Untersuchung zur Reaktionskinetik der DNA-Adduktbildung	164
6.6	In vivo Experimente	164
6.6.1	Tierstudie	164
6.6.1.1	Herstellung eines Acrylamid-armen Rattenfutters	165
6.6.1.2	Konditionierung der Tiere.....	165
6.6.1.3	Behandlung der Versuchstiere.....	166
6.6.1.4	Bestimmung von AAMA, GAMA und 3-HPMA.....	167
6.6.1.5	Bestimmung von N7-GA-Gua-Addukten.....	168
6.6.2	Bestimmung der Ausscheidungskinetik von Acrolein im Menschen nach Aufnahme einer Einzeldosis	170
6.6.2.1	Durchführung der Studie.....	170
6.6.2.2	Bestimmung von AAMA, GAMA, 3-HPMA und CEMA	171
6.6.2.3	Bestimmung von Kreatinin	171
6.6.3	Bestimmung der Ausscheidungskinetik von Acrolein und Acrylamid im Menschen nach Aufnahme von selbst hergestellten Kartoffelchips	172
6.6.3.1	Durchführung der Studie.....	172
6.6.3.2	Bestimmung von AAMA, GAMA und 3-HPMA.....	173
6.6.4	Bestimmung der Ausscheidungskinetik von Acrolein und Acrylamid im Menschen nach Aufnahme von kommerziell erhältlichen Kartoffelchips.....	173
6.6.4.1	Durchführung der Studie.....	173
6.6.4.2	Bestimmung von AAMA, GAMA, 3-HPMA und CEMA	174
7	Literaturverzeichnis	175
8	Anhang	194
8.1	Regressions- und Kalibriergeraden (Linearität) zur Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen	194
8.1.1	Acrylamid	194
8.1.2	Glycidamid	195
8.1.3	AAMA	196

8.1.4	GAMA.....	197
8.1.5	3-HPMA.....	198
8.1.6	N7-GA-Gua (API 3200).....	199
8.1.7	N7-GA-Gua (API 5500 QTRAP)	200
8.1.8	AA-GSH	201
8.1.9	GA-GSH.....	202
8.2	Verwendete Formeln	203

Veröffentlichungen

Publikationen

Watzek, N., Berger, F., Eisenbrand G., Feld, J., Hengstler, J.G., Richling, E., Schug M., Baum, M. (2010), Acrylamid: Metabolismus und biologische Effekte in primären Rattenhepatozyten. Lebensmittelchemie, 64(5), 127-128

Watzek, N., Baum, M., Berger, F., Feld, J., Richling, E., Doroshyenko, O., Tomalik-Scharte, D., Fuhr, U., Eisenbrand, G. (2010), Comparison of dietary exposure to acrylamide and acrolein: monitoring mercapturic acids in human urine after consumption of potato crisps. Cancer Research, 70(8), 4692

Baum, M., **Watzek, N.**, Berger, F., Feld, J., Doroshyenko, O., Tomalik-Scharte, D., Fuhr, U., Eisenbrand, G., Richling, E. (2010), Acrolein and acrylamide: Exposure estimation of food borne toxicants by monitoring mercapturic acids in human urine after consumption of potato crisps. Toxicology Letters, 196, S44

Watzek, N., Baum, M., Berger, F., Eisenbrand, G., Feld, J., Doroshyenko, O., Tomalik-Scharte, D., Fuhr, U., Richling, E., (2010), Acrolein und Acrylamid: Abschätzung der Exposition hitzeinduzierter Lebensmittel-Kontaminanten mittels Bestimmung von Mercaptursäuren in Humanurin nach Verzehr von Kartoffelchips. Lebensmittelchemie 65(3), 64

Watzek, N., Berger, F., Eisenbrand G., Feld, J., Hengstler, J.G., Richling, E., Schug M., Baum, M. (2011), Acrylamide: toxicokinetics in primary rat hepatocytes. Archives of Pharmacology, 383, 95

Watzek, N., Baum, M., Berger, F., Eisenbrand, G., Feld, J., Doroshyenko, O., Tomalik-Scharte, D., Fuhr, U., Richling, E. (2011), Acrolein and acrylamide: Comparison of the exposure via determination of mercapturic acids in urine after consumption of potato crisps. Archives of Pharmacology, 383, 94-95

Watzek, N., Baum, M., Berger, F., Eisenbrand, G., Feld, J., Fuhr, U., Tomalik-Scharte, D., Richling, E. (2011), Exposure to acrolein exceeds that to acrylamide: Monitoring mercapturic acids in human urine after consumption of potato crisps. Toxicology Letters, 205, S77

Watzek N., Boehm N., Feld J., Scherbl D., Berger F., Merz K.H., Lampen A., Reemtsma T., Tannenbaum S., Skipper P. L., Baum M., Richling E., Eisenbrand G. (2012), *N7-Glycidamide-guanine DNA adduct formation by orally ingested acrylamide in rats: a dose response study encompassing human diet-related exposure levels*. *Chemical Research in Toxicology*, 25(2), 381-390

Diskussionsvorträge

Watzek, N., Baum, M., Berger, F., Eisenbrand, G., Feld, J., Doroshyenko, O., Tomalik-Scharte, D., Fuhr, U., Richling, E. (2011), Vergleich der ernährungsbedingten Exposition von Acrolein und Acrylamid: Untersuchung von Mercaptursäuren nach Aufnahme von Kartoffelchips. Lebensmittelchemische Gesellschaft; Fachgruppe in der Gesellschaft Deutscher Chemiker, Regionalverbände Nord & Süd-West, Kassel, Deutschland

Scherbl, D., **Watzek, N.**, Baum, M., Berger, F., Eisenbrand, G., Feld, J., Hengstler, J. G., Schug, M., Richling, E. (2011), Acrylamid wird in primären Rattenleberzellen effizient durch Bindung an Glutathion inaktiviert. 40. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Halle (Saale), Deutschland

Posterpräsentationen

Watzek, N., Berger, F., Eisenbrand, G., Feld, J., Hengstler, J.G., Richling, E., Schug, M., Baum, M. (2009), Acrylamid: Metabolismus und biologische Effekte in primären Rattenhepatozyten. 38. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Berlin, Deutschland

Baum, M., **Watzek, N.**, Berger, F., Feld, J., Doroshyenko, O., Tomalik-Scharte, D., Fuhr, U., Eisenbrand, G., Richling, E. (2010), Acrolein and acrylamide: Exposure estimation of food borne toxicants by monitoring mercapturic acids in human urine after consumption of potato crisps. 12. International Congress of Toxicology, Barcelona, Spanien

Watzek, N., Baum, M., Berger, F., Eisenbrand, G., Feld, J., Doroshyenko, O., Tomalik-Scharte, D., Fuhr, U., Richling, E., (2010), Exposition mit Acrolein ist wesentlich höher als mit Acrylamid: Mercaptursäuren im Humanurin nach Verzehr von Kartoffelchips. 39. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Stuttgart- Hohenheim, Deutschland

Watzek, N., Baum, M., Berger, F., Feld, J., Richling, E., Doroshyenko, O., Tomalik-Scharte, D., Fuhr, U., Eisenbrand, G. (2011), Comparison of dietary exposure to acrylamide and acrolein: monitoring mercapturic acids in human urine after consumption of potato crisps. AACR 102nd Annual Meeting, Orlando (Florida), USA

Watzek, N., Berger, F., Eisenbrand G., Feld, J., Hengstler, J.G., Richling, E., Schug M., Baum, M. (2011), Acrylamide: toxicokinetics in primary rat hepatocytes. 77. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pharmakologie und Toxikologie (DGPT), Frankfurt am Main, Deutschland

Watzek, N., Baum, M., Berger, F., Eisenbrand, G., Feld, J., Doroshyenko, O., Tomalik-Scharte, D., Fuhr, U., Richling, E. (2011), Acrolein and acrylamide: Comparison of the exposure via determination of mercapturic acids in urine after consumption of potato crisps. 77. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pharmakologie und Toxikologie (DGPT), Frankfurt am Main, Deutschland

Watzek, N., Baum, M., Berger, F., Eisenbrand, G., Feld, J., Fuhr, U., Tomalik-Scharte, D., Richling, E. (2011), Exposure to acrolein may largely exceeds that to acrylamide: Monitoring mercapturic acids in human urine after consumption of potato crisps. 47. Congress of the European Societies of Toxicology, Paris, Frankreich

Scherbl, D., **Watzek, N.**, Baum, M., Berger, F., Doroshyenko, O., Feld, J., Fuhr, U., Tomalik-Scharte, D., Eisenbrand, G., Richling, E. (2012), Mercaptursäuren im Humanurin als Marker für die Exposition von Acrolein und Acrylamid. Lebensmittelchemische Gesellschaft; Fachgruppe in der Gesellschaft Deutscher Chemiker, Regionalverbände Süd-West, Kaiserslautern, Deutschland

Watzek N., Boehm N., Feld J., Scherbl D., Berger F., Merz K.H., Lampen A., Reemtsma T., Tannenbaum S., Skipper P. L., Baum M., Richling E., Eisenbrand G. (2012), Low dose oral application of acrylamide to rats: mercapturic acid excretion and *N7*-GA-Gua DNA adduct formation, Gesellschaft für Umwelt - Mutationsforschung e.V. (GUM), 26. GUM-Tagung, Mainz

Abkürzungsverzeichnis

AA	Acrylamid
AAMA	<i>N</i> -Acetyl- <i>S</i> -(2-carbamoylethyl)-cystein
AC	Acrolein
ADI	Acceptable Daily Intake
ALARA-Prinzip	As Low As Reasonably Achievable,
AMS	Accelerator Mass Spectrometry
AP-Stelle	Apurinic / Apyrimidinic Site
API	Atmospheric Pressure Ionisation
ARE	Antioxidant Responsive Element
AUC	Area Under Curve
BEAMS Lab	Biological Engineering Accelerator Mass Spectrometry Laboratorium
bidest	bidestilliert
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
BMDL	Benchmark Dose Lower Confidence Limit
BP	Watson-Crick-Basenpaare
°C	Grad Celsius
c	zenti (10 ⁻²)
CYP	Cytochrom-P450 abhängige Monooxygenase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic Acid, englisch für Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EH	Epoxidhydrolase
ESI	Elektronenspray-Ionisation
f	femto (10 ⁻¹⁵)
FADH	reduziertes Flavinadenindinukleotid
FKS	Fötales Kälberserum
FMNH	reduziertes Flavinmononukleotid
FPG	Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase
g	Gramm
GA	Glycidamid
GAMA	<i>N</i> -Acetyl- <i>S</i> -(2-carbamoyl-2-hydroxy-ethyl)-cystein
GSH	Glutathion
GSR	Glutathion-Reduktase
GST	Glutathion- <i>S</i> -Transferase

h	Stunde
HSAB-Konzept	Hard-Soft-Acid-Base-Konzept nach Pearson
HCOOH	Ameisensäure
HPLC	High Performance (Pressure) Liquid Chromatography
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-transferase
IARC	International Agency for Research on Cancer
HPLC-ESI-MS/MS	Liquid Chromatography / Mass Spectrometry
IS	interner Standard
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
l	Liter
LD ₅₀	letale Dosis 50
LOD	Limit of Detection
LOQ	Limit of Quantification
m	Meter
m	milli (10 ⁻³)
M	molar (mol/l)
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
min	Minute
MIT	Massachusetts Institute of Technology
MOA	Mode of Action
MOE	Margin of Exposure
mol	Basiseinheit der Stoffmenge
MOS	Margin of Safety
MRM	Multiple Reaction Monitoring
MS	Massenspektrometer, Massenspektrometrie
MS/MS	Tandemmassenspektrometrie
MW	Mittelwert
μ	mikro (10 ⁻⁶)
N7-GA-Gua	N7-(2-Carbamoyl-2-hydroxyethyl)-guanin
NADH	reduziertes Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	reduziertes Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
n	Anzahl unabhängiger Versuche
n	nano (10 ⁻⁹)
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
nm	Nanometer

NO(A)EL	No Observed (Adverse) Effect Level
Nrf2	Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2
OH-PdG	α - und γ -Hydroxypropanodeoxyguanosin
p	piko (10^{-12})
p.a.	pro analysis
PAK	polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
PBS	Phosphate Buffered Saline
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration (potentia hydrogenii)
pK _s	Logarithmus der Säuredissoziationskonstante
RP	Reversed Phase
rpm	Rotations per minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SCE	Sister chromatid exchange (Schwesterchromatidaustausch)
SCF	Scientific Committee on Food
SD	Standard Deviation
SD-Ratten	Sprague Dawley-Ratten
SIVA	Stabilisotopenverdünnungsanalyse
SPE	Solid Phase Extraction (Festphasenextraktion)
T	Temperatur
TDI	Tolerable Daily Intake
UV	ultraviolett
WHO	World Health Organisation
z. B.	zum Beispiel

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1	Strukturformel von Acrylamid	4
Abbildung 2	Bildungsmechanismus von Acrylamid aus Asparagin in Lebensmitteln; grün: Asparagin; rot: Acrylamid [nach <i>Zyzak et al., 2003</i>]	6
Abbildung 3	Nebenweg der Bildung von Acrylamid in Lebensmitteln aus Triacylglyceriden [nach <i>Becalski et al., 2003</i>]	7
Tabelle 1	Übersicht über Acrylamidgehalte ausgewählter Lebensmittel ($\mu\text{g}/\text{kg}$) [<i>BVL, 2010</i>]	8
Abbildung 4	Konjugation von Acrylamid und Abbau der Glutathion-Addukte zur Mercaptursäure [modifiziert nach <i>Forth et al., 1996</i>]	10
Abbildung 5	Metabolismus des Acrylamids im Menschen [modifiziert nach <i>Boettcher & Angerer, 2005</i>]	12
Abbildung 6	Strukturen <i>in vitro</i> identifizierter DNA-Addukte aus der Reaktion mit Glycidamid [<i>Gamboa da Costa et al., 2003</i>].....	16
Tabelle 2	DNA-Addukt-Level nach <i>in vitro</i> Inkubationen von DNA mit Glycidamid (ausgedrückt in Addukten pro 10^8 Nukleotiden) [nach <i>Gamboa da Costa et al., 2003</i>]	17
Abbildung 7	Strukturformel von Acrolein (links) und dessen Keto-Enol-Tautomerie (rechts)	17
Abbildung 8	Postulierter Bildungsmechanismus von Acrolein aus ungesättigten Fettsäuren am Beispiel von Arachidonsäure; grün: Arachidonsäure; rot: Acrolein [modifiziert nach <i>Esterbauer et al., 1991</i>].....	19
Abbildung 9	Exogene Bildungsmechanismen von Acrolein aus Glucose; grün: Glucose; orange: Hydroxyaceton; rot: Acrolein; 3,4-RA: 3,4-Retroaldolspaltung [modifiziert nach <i>Yaylayan & Keyhani, 2000</i>]	20
Abbildung 10	Exogene Bildungsmechanismen von Acrolein aus Methionin; grün: Methionin; rot: Acrolein [modifiziert nach <i>Stevens & Maier, 2008</i>]	21
Abbildung 11	Endogener Bildungsmechanismus von Acrolein aus Threonin; Myeloperoxidase (MPO) grün: Threonin; rot: Acrolein [modifiziert nach <i>Eisenbrand & Schreier, 2006</i>]..	21
Abbildung 12	Endogener Bildungsmechanismus von Acrolein aus Polyaminen; grün: Spermin; rot: Acrolein; Aminooxidase (AO) [modifiziert nach <i>Stevens & Maier, 2008</i>]	22
Abbildung 13	Literaturbekannter Metabolismus des Acroleins [modifiziert nach <i>Stevens & Maier, 2008</i>]	25
Abbildung 14	Watson-Crick-Basenpaarung [modifiziert nach <i>Kunz et al., 2009</i>].....	29
Abbildung 16	Funktionsprinzip des Base Excision Repair (BER)-Systems [<i>Friedberg et al., 2005</i>]..	32
Abbildung 17	Funktionsprinzip des Nucleotide Excision Repair (NER)-Systems [<i>Friedberg et al., 2005</i>]	32
Abbildung 18	Mehrstufenmodell der chemischen Kanzerogenese [<i>Harris, 1991</i>]	34
Abbildung 19	Übersicht zu Risikobewertung und Risikomanagement für gesundheits-schädliche Stoffe [modifiziert nach <i>Marquardt & Schäfer, 2008</i>]	37
Abbildung 20	Schematischer Aufbau einer HPLC-Anlage [modifiziert nach <i>Cammann, 2001</i>]	44
Abbildung 21	Schematische Darstellung der Elektronensprayionisation (ESI) [<i>ABSciex, 2008</i>]	45
Abbildung 22	Schematische Darstellung der Messung im MRM-Mode [<i>ABSciex, 2008</i>]	47
Abbildung 23	Schematische Darstellung der Messung im Produktionenscan [<i>ABSciex, 2008</i>]	47
Tabelle 4	Übersicht über die substanzspezifischen Parameter und deren Funktion.....	48
Tabelle 5	Übersicht über die quellspezifischen Parameter und deren Funktion.....	49

Abbildung 24	Schema der Stabilisotopenverdünnungsanalyse [modifiziert nach <i>Rychlik & Asam, 2008</i>] 50
Abbildung 25	Syntheschema zur DNA-Adduktbildung aus der Reaktion von stabilisotopenmarkiertem Guanosin mit Acrolein (* Stabilisotopenmarkierung)..... 54
Tabelle 6	Vergleich der NMR-Daten der synthetisierten isotopenmarkierten OH-PdG-Addukte mit Literaturdaten [<i>Klesen, 2010</i>] 55
Abbildung 26	Produktionenspektrum von OH-[¹⁵ N ₅]-PdG ([M + H] ⁺ , <i>m/z</i> 329) an Q3 im Massenbereich von <i>m/z</i> 90-340 56
Tabelle 7	Gerätebedingungen zur Bestimmung der OH-PdG-Addukte..... 57
Tabelle 8	Gerätespezifische Parameter für die Bestimmung der OH-PdG-Addukte mittels SIVA (API 3200) 58
Abbildung 27	Kalibriergerade zur quantitativen Bestimmung von OH-PdG-Addukten mittels SIVA.. 59
Tabelle 9	Konzentrationen und Quotienten der Kalibrierreihe der OH-PdG-Addukte 59
Abbildung 28	Kalibriergerade zur Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen bei der HPLC-ESI-MS/MS-Bestimmung von OH-PdG-Addukten mittels SIVA 60
Tabelle 10	LOD (S/R: 3) und LOQ (S/R: 6) der Bestimmung von OH-PdG und Lauf-zu-Lauf und Tag-zu-Tag-Variabilität [%] während der Bestimmung von OH-PdG..... 61
Abbildung 29	Überprüfung der möglichen Beeinflussung des MRM-Übergangs von OH-PdG durch OH-[¹⁵ N ₅]-PdG 62
Abbildung 30	Repräsentatives Beispielchromatogramm einer Messung von OH-PdG-Addukten der DNA aus einer Leberprobe der Ratte, die mit Acrylamid (6000 µg/kg KG) behandelt wurde (Details siehe Kapitel 4.3.1.2.2) 63
Abbildung 31	Bestimmung der Zytotoxizität von Acrylamid und Glycidamid (0,2 bis 3000 µM) nach Inkubation von primären Rattenhepatozyten über 24 Stunden bei 37 °C (n = 3); *: signifikant unterschiedlich zur Mediumkontrolle (p < 0,05); **: signifikant unterschiedlich zur Mediumkontrolle (p < 0,01); Saponin diente als Positivkontrolle 65
Abbildung 32	Darstellung der Konzentration an freiem Glycidamid [µM] im Zellkulturmedium nach konzentrations- (2 bis 2000 µM) und zeitabhängiger (1 bis 24 h) Inkubation von primären Rattenhepatozyten mit Acrylamid (n = 3) 67
Abbildung 33	Darstellung der Bildungskinetik von Glycidamid nach konzentrations- (20 bis 2000 µM) und zeitabhängiger (1 bis 24 h) Inkubation von primären Rattenhepatozyten mit Acrylamid (n = 3) 68
Tabelle 11	Zusammenfassung der Daten zur Bildungskinetik von Glycidamid nach Inkubation von primären Rattenhepatozyten mit Acrylamid (n = 3) 68
Abbildung 34	Zeitabhängige Bildung von N7-GA-Gua-Addukten/10 ⁸ Nukleotide in der DNA von primären Rattenhepatozyten nach einmaliger Inkubation mit 2000 µM Acrylamid über 6 bis 24 h (n = 3) 69
Abbildung 35	Darstellung der gebildeten AA-GSH-Addukte (µM) im Zellkulturmedium nach konzentrations- (0,2 bis 2000 µM) und zeitabhängiger (15 min bis 24 h) Inkubation von primären Rattenhepatozyten mit Acrylamid (n = 3) 71
Abbildung 36	Bestimmung der Bildungskinetik von AA-GSH nach konzentrations- (0,2 bis 2000 µM) und zeitabhängiger (15 min bis 24 h) Inkubation bis 24 h von primären Rattenhepatozyten mit Acrylamid (n = 3) 73
Tabelle 12	Übersicht über die Bildungskinetik von AA-GSH nach Inkubation von primären Rattenhepatozyten mit Acrylamid über 24 h (0,2 bis 2000 µM; n = 3); *: bis 8 h ermittelt 74

Abbildung 37	AAMA- und GAMA-Konzentration [μM] im Zellkulturmedium nach konzentrations- (2 bis 2000 μM) und zeitabhängiger (2 bis 24 h) Inkubation von primären Rattenhepatozyten mit Acrylamid (n = 3) 75
Abbildung 38	Darstellung der Abhängigkeit der AAMA-Bildungskinetik von Konzentration (20 bis 2000 μM) und Zeit (2 bis 24 h) der Inkubation von primären Rattenhepatozyten mit Acrylamid (n = 3) 76
Abbildung 39	Darstellung der Abhängigkeit der GAMA-Bildungskinetik von Konzentration (20 bis 2000 μM) und Zeit (4 bis 24 h) der Inkubation von primären Rattenhepatozyten mit Acrylamid (n = 3) 76
Tabelle 13	Übersicht über die Bildungskinetik von AAMA und GAMA nach Inkubation von primären Rattenhepatozyten mit Acrylamid (20 bis 2000 μM ; n = 3) 77
Abbildung 40	Bestimmung des GAMA/AAMA-Verhältnisses nach konzentrations- (20 bis 2000 μM) und zeitabhängiger (4 bis 24 h) Inkubation von primären Rattenhepatozyten mit Acrylamid (n = 3) 78
Abbildung 41	Zusammenhang zwischen der Glycidamidkonzentration (μM) im Vergleich zur AA-GSH-Adduktkonzentration (μM) nach Inkubation von primären Rattenhepatozyten (n = 3) mit Acrylamid (20 bis 2000 μM) 79
Tabelle 14	Übersicht über das Verhältnis der Bildung von Glycidamid im Vergleich zur Bildung von AA-GSH-Addukten nach Inkubation von primären Rattenhepatozyten mit Acrylamid (20 bis 2000 μM ; n = 3) 80
Abbildung 42	Darstellung der gebildeten OH-PdG-Addukte/ 10^8 Nukleotide nach konzentrationsabhängiger Inkubation von DNA (100 bis 1000 μg) mit Acrolein (0,2 bis 2000 μM ; n = 3) 81
Abbildung 43	Darstellung der gebildeten N7-GA-Gua-Addukte/ 10^8 Nukleotide nach konzentrationsabhängiger Inkubation von DNA (100 bis 500 μg) mit Acrylamid (2 bis 2000 μM ; n = 3) 82
Tabelle 15	Verhältnisse der N7-GA-Gua- und OH-PdG-Adduktbildung nach Inkubation von DNA (100, 200 und 500 μg) mit Acrylamid oder Acrolein (20 bis 2000 μM ; n = 3) 83
Abbildung 44	Gebildete Menge OH-PdG-Addukt (pmol) nach zeitabhängiger Inkubation (0,5 bis 24 h) von 200 μg DNA mit Acrolein (200 μM ; n = 3) 84
Tabelle 16	Überblick über die gebildeten Adduktmengen (pmol/200 μg DNA) aus der Untersuchung der zeitabhängigen OH-PdG-Bildung über 24 h (n = 3; MW \pm SD) 84
Abbildung 45	Darstellung dergebildeten AAMA- (rot) und GAMA-Mengen (grün) im 16 h-Urin von mit Acrylamid-behandelten SD-Ratten (0,1 bis 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG: n = 8; 1.000 bis 10.000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG: n = 3 [Feld, 2010]) 86
Abbildung 46	Darstellung der Dosis-Wirkungsbeziehung von AAMA und GAMA im 16 h-Urin von mit Acrylamid-behandelten SD-Ratten (Kontrolle-100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG: n = 8; 1.000-10.000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG: n = 3 [Feld, 2010]) 87
Abbildung 47	Darstellung der N7-GA-Gua-Adduktmengen/ 10^8 Nukleotide in der Leber 2,3- $^{14}\text{C}_2$ -Acrylamid-behandelter SD-Ratten (500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG) ermittelt mit unterschiedlichen Aufarbeitungsmethoden und Messtechniken (AMS und HPLC-ESI-MS/MS) 89
Abbildung 48	Darstellung der gebildeten N7-GA-Gua-Addukte/ 10^8 Nukleotide (16 h) in verschiedenen Geweben (Leber, Niere und Lunge) von mit Acrylamid-behandelten SD-Ratten (0,1 bis 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG: n = 8; 500 bis 10000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG: n = 3 [Feld, 2010]; LOD: 0,2 Addukte/ 10^8 Nukleotide) 91

Abbildung 49	Darstellung der Dosis-Wirkungsbeziehungen der Bildung von <i>N7</i> -GA-Gua-Addukten (16 h) in verschiedenen Geweben (Leber, Niere, Lunge) von mit Acrylamid-behandelten SD-Ratten (0,1 bis 100 µg/kg KG: n = 8; 500 bis 10000 µg/kg KG: n = 3) 92
Abbildung 50	Darstellung der Ausscheidung von 3-HPMA (nmol) im 16 h-Urin von Acrylamid-behandelten SD-Ratten (0,1 bis 100 µg/kg KG; n = 8) 96
Abbildung 51	Darstellung der OH-PdG-Addukte/10 ⁸ Nukleotide in Leberproben von mit Acrylamid-behandelten (100-10000 µg/kg KG) SD-Ratten (n = 2-3) 98
Abbildung 52	Darstellung der Elimination von AAMA, GAMA, 3-HPMA und CEMA (µmol/g Kreatinin) im Humanurin bis 24 h nach Aufnahme von 7,5 µg Acrolein/kg KG (n = 1, Doppelbestimmung) 99
Abbildung 53	Zeitabhängige Elimination von Acrolein als 3-HPMA und CEMA (nmol) im Humanurin bis 24 h nach Aufnahme von 7,5 µg Acrolein/kg KG (n = 1, Doppelbestimmung) 100
Abbildung 54	Darstellung der AAMA-Konzentrationen (µmol/g Kreatinin) im Humanurin bis zu 24 h nach Aufnahme von 44 µg Acrylamid über 175 g handelsüblicher Kartoffelchips (n = 5, Doppelbestimmung) 102
Abbildung 55	Darstellung der GAMA-Konzentrationen (µmol/g Kreatinin) im Humanurin bis zu 24 h nach Aufnahme von 44 µg Acrylamid über 175 g handelsüblicher Kartoffelchips (n = 5, Doppelbestimmung) 103
Abbildung 56	Darstellung der 3-HPMA-Konzentrationen (µmol/g Kreatinin) im Humanurin bis zu 24 h nach Aufnahme von 4,6 µg Acrolein über 175 g handelsüblicher Kartoffelchips (n = 5, Doppelbestimmung) 104
Abbildung 57	Darstellung der CEMA-Konzentrationen (µmol/g Kreatinin) im Humanurin bis zu 24 h nach Aufnahme von 4,6 µg Acrolein über 175 g handelsüblicher Kartoffelchips (n = 5, Doppelbestimmung) 105
Abbildung 58	Bestimmung der Ausscheidungskinetik von AAMA, GAMA, 3-HPMA und CEMA im Humanurin nach Aufnahme von 175 g handelsüblichen Kartoffelchips (n = 5, Doppelbestimmung) 106
Tabelle 17	Übersicht über die Bildungskinetik von AAMA GAMA, 3-HPMA und CEMA nach Aufnahme von 175 g handelsüblichen Kartoffelchips (n = 5, Doppelbestimmung).... 107
Abbildung 59	Darstellung der AAMA-, GAMA-, 3-HPMA- und CEMA-Konzentrationen (µmol/ g Kreatinin) im Humanurin bis zu 24 h nach Aufnahme von 44 µg Acrylamid und 4,6 µg Acrolein über 175 g handelsüblicher Kartoffelchips (Median, n = 5, Doppelbestimmung) 108
Abbildung 60	Darstellung der 3-HPMA- und CEMA-Konzentrationen (µmol/ g Kreatinin) im Humanurin bis zu 24 h nach Aufnahme von 7,5 µg Acrolein/kg KG im Vergleich zur Ausscheidung nach Aufnahme von durchschnittlich 0,01 µg Acrolein/kg KG über 175 g handelsüblicher Kartoffelchips (Median, n = 5, Doppelbestimmung)..... 109
Abbildung 61	Mögliche Speicherformen für Acrolein in Lebensmitteln; Dioxalan aus Reaktion mit Kohlenhydraten (links) und Oxazolidin aus der Reaktion mit Aminosäuren am Beispiel von Serin (rechts) 110
Abbildung 62	Darstellung der AAMA-Konzentrationen (µmol/g Kreatinin) im Humanurin bis zu 72 h nach Aufnahme von 1 mg Acrylamid über 150 g selbst hergestellter Kartoffelchips (n = 13, Doppelbestimmung) 112

Abbildung 63	Darstellung der GAMA-Konzentrationen ($\mu\text{mol/g}$ Kreatinin) im Humanurin bis zu 72 h nach Aufnahme von 1 mg Acrylamid über 150 g selbst hergestellter Kartoffelchips ($n = 13$, Doppelbestimmung).....	113
Abbildung 64	Darstellung der 3-HPMA-Konzentrationen im Humanurin ($\mu\text{mol/g}$ Kreatinin) bis zu 72 h nach Aufnahme von 150 g selbst hergestellter Kartoffelchips unbekannter Acroleinkonzentration ($n = 13$, Doppelbestimmung).....	114
Abbildung 65	Darstellung der AAMA-, GAMA- und 3-HPMA-Konzentrationen ($\mu\text{mol/g}$ Kreatinin) im Humanurin bis zu 72 h nach Aufnahme von 1 mg Acrylamid und unbekannter Menge Acrolein über 150 g selbst hergestellte Kartoffelchips (Median, $n = 13$, Doppelbestimmung)	114
Abbildung 66	Resonanzstrukturen von Acrylamid (oben) und Acrolein (unten)	115
Tabelle 18	Übersicht über die Kalibrierung der chemischen Verschiebung bei der Auswertung von $^1\text{H-NMR}$ und/oder $^{13}\text{C-NMR}$ -Kernspinresonanzspektren.....	120
Tabelle 19	Zusammenfassung der HPLC-Bedingungen zur Bestimmung von Kreatinin mittels SIVA	129
Abbildung 67	Repräsentatives HPLC-ESI-MS-Chromatogramm einer Messung von Kreatinin aus Humanurin im SIM-Modus; A: Totalionenchromatogramm, B: Kreatinin ($R_t = 4,5$ min; m/z 114), C: D_3 -Kreatinin ($R_t = 4,4$ min; m/z 117)	129
Tabelle 20	Gerätespezifische Parameter zur Bestimmung von Kreatinin im Humanurin mittels SIVA (API 2000)	131
Tabelle 21	Konzentrationen und Quotienten der Kalibrierreihe von Kreatinin.....	131
Abbildung 68	Kalibriergerade zur Quantifizierung von Kreatinin mittels SIVA.....	132
Abbildung 69	Kalibriergerade zur Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze bei der Quantifizierung von Kreatinin	132
Tabelle 22	LOD (S/R: 3) und LOQ (S/R: 6) der Bestimmung von Kreatinin und Lauf-zu-Lauf und Tag-zu-Tag-Variabilität [%] während der Bestimmung von Kreatinin	133
Tabelle 23	Zusammenfassung der HPLC-Bedingungen zur Bestimmung von Carboxyethylmercaptursäure (CEMA) mittels SIVA	134
Abbildung 70	Repräsentatives HPLC-ESI-MS/MS-Chromatogramm einer Messung von CEMA aus einem Standardgemisch (100 ng/ml) im MRM-Modus; A: Totalionenchromatogramm, B: CEMA ($R_t = 23,1$ min; m/z 234 \rightarrow 105), C: D_3 -CEMA ($R_t = 23,1$ min; m/z 237 \rightarrow 105).....	135
Abbildung 71	Produktionenspektrum von CEMA an Q3 (m/z 90-240; $c = 250$ ng/ml).....	136
Abbildung 72	Produktionenspektrum von D_3 -CEMA an Q3 Q3 (m/z 90-240; $c = 250$ ng/ml)	136
Tabelle 24	Gerätespezifische Parameter zur Bestimmung von CEMA im Urin mittels SIVA (API 3200)	137
Tabelle 25	Konzentrationen und Quotienten der Kalibrierreihe von CEMA.....	138
Abbildung 73	Kalibriergerade zur Quantifizierung von CEMA mittels SIVA.....	138
Abbildung 74	Kalibriergerade zur Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze bei der Quantifizierung von CEMA	139
Tabelle 26	LOD (S/R: 3) und LOQ (S/R: 6) der Bestimmung von CEMA und Lauf-zu-Lauf und Tag-zu-Tag-Variabilität [%] während der Bestimmung von CEMA	140
Abbildung 75	Überprüfung der möglichen Beeinflussung des MRM-Übergangs von CEMA durch D_3 -CEMA.....	141

Abbildung 76	Darstellung der Optimierung der Probenvorbereitung durch Testung unterschiedlicher Methanolkonzentrationen zur Elution von CEMA (100 ng/ml) von der SPE-Säule (ENV ⁺ , 100 mg).....	142
Abbildung 77	Darstellung der Optimierung der Probenvorbereitung durch Testung unterschiedlicher Methanolkonzentrationen zum Waschen der SPE-Säule (ENV ⁺ , 100 mg) nach Aufgabe von CEMA (100 ng/ml).....	143
Abbildung 78	Darstellung der Wiederfindung von CEMA nach Aufkonzentrieren mittels Vakuumzentrifuge (VZ) und unter Stickstoffstrom (N ₂) (n = 3).....	144
Abbildung 79	Repräsentatives HPLC-ESI-MS/MS-Chromatogramm einer Messung von AAMA und GAMA eines Standardgemischs (100 ng/ml) im MRM-Modus; A: AAMA (Rt = 12,0 min; m/z 233 → 104), B: D ₃ -AAMA (Rt = 12,0 min; m/z 236 → 107), C: GAMA (Rt = 9,5 min; m/z 249 → 120); D: D ₃ -GAMA (Rt = 9,5 min; m/z 252 → 123).....	145
Abbildung 80	Repräsentatives HPLC-ESI-MS/MS-Chromatogramm einer Messung von 3-HPMA und CEMA eines Standardgemischs (100 ng/ml) im MRM-Modus; A: 3-HPMA (Rt = 22,5 min; m/z 220 → 91), B: D ₃ -3-HPMA (Rt = 22,5 min; m/z 223 → 91), C: CEMA (Rt = 23,1 min; m/z 234 → 105); D: D ₃ -CEMA (Rt = 23,1 min; m/z 237 → 105).....	146
Abbildung 81	Darstellung einer Neubauer-Zählkammer [Lindl, 2002].....	147
Abbildung 82	Vorgehensweise des Auszählens der Zellen in einem der Eckquadrate, es werden nur die schwarzen Zellen gezählt [Lindl, 2002].....	148
Abbildung 83	Primäre Rattenhepatozyten (links: Vergrößerung 100x; rechts: Vergrößerung 200x)	149
Abbildung 84	Reaktionsschema zum Resazurin-Reduktionstest.....	150
Tabelle 27	Optimierte Probenvorbereitungsmethode zur Aufreinigung von Glycidamid mittels ENV ⁺ -Säulen (500 mg).....	152
Tabelle 28	Zusammenfassung der HPLC-Bedingungen zur Bestimmung von Glycidamid mittels SIVA.....	152
Tabelle 29	LOD (S/R: 3) und LOQ (S/R: 6) der Bestimmung von Glycidamid und Lauf-zu-Lauf und Tag-zu-Tag-Variabilität [%] während der Bestimmung von Glycidamid.....	153
Tabelle 30	Gerätespezifische Parameter zur Bestimmung von Glycidamid im Zellkulturmedium mittels SIVA (API 3200).....	153
Tabelle 31	Optimierte Probenvorbereitungsmethode zur Aufreinigung von GSH-Addukten mittels XAW-Säulen (200 mg).....	154
Tabelle 32	Zusammenfassung der HPLC-Bedingungen zur Bestimmung der GSH-Addukte mittels SIVA.....	155
Tabelle 33	Gerätespezifische Parameter zur Bestimmung von GSH-Addukten im Zellkulturmedium mittels SIVA (API 3200).....	155
Tabelle 34	LOD (S/R: 3) und LOQ (S/R: 6) der Bestimmung von GSH-Addukten und Lauf-zu-Lauf und Tag-zu-Tag-Variabilität [%] während der Bestimmung von GSH-Addukten.....	156
Tabelle 35	Optimierte Probenvorbereitungsmethode zur Aufreinigung von MA mittels ENV ⁺ -Säulen (100 mg).....	157
Tabelle 36	Zusammenfassung der HPLC-Bedingungen zur Bestimmung der Acrylamid- und Glycidamidmercaptursäuren (AAMA und GAMA) mittels SIVA.....	157
Tabelle 37	LOD (S/R: 3) und LOQ (S/R: 6) der Bestimmung von AAMA und GAMA und Lauf-zu-Lauf und Tag-zu-Tag-Variabilität [%] während der Bestimmung von AAMA und GAMA.....	158

Tabelle 38	Gerätespezifische Parameter zur Bestimmung von MA im Zellkulturmedium mittels SIVA (API 3200).....	158
Tabelle 39	Zusammenfassung der HPLC-Bedingungen zur Bestimmung von <i>N7</i> -GA-Gua mittels SIVA (API 3200).....	161
Tabelle 40	LOD (S/R: 3) und LOQ (S/R: 6) der Bestimmung von <i>N7</i> -GA-Gua und Lauf-zu-Lauf und Tag-zu-Tag-Variabilität [%] während der Bestimmung von <i>N7</i> -GA-Gua (API 3200).....	161
Tabelle 41	Gerätespezifische Parameter zur Bestimmung von <i>N7</i> -GA-Gua aus der DNA mittels SIVA (API 3200).....	162
Tabelle 42	Optimierte Probenvorbereitungsmethode zur Aufreinigung von DNA mittels Strata-Säulen (30 mg).....	164
Abbildung 85	Fotographie des Rattenfutters.....	165
Abbildung 86	Fotographie einer Ratte im Ganzglas-Stoffwechselkäfig.....	166
Tabelle 43	Übersicht über die Behandlungsgruppen.....	166
Abbildung 87	Darstellung des Behandlungsschemas zur Tierstudie.....	167
Tabelle 44	Optimierte Probenvorbereitungsmethode zur Aufreinigung von DNA mittels ENV ⁺ -Säulen (100 mg) [<i>Böhm, 2011</i>].....	168
Tabelle 45	LOD (S/R: 3) und LOQ (S/R: 6) der Bestimmung von <i>N7</i> -GA-Gua und Lauf-zu-Lauf und Tag-zu-Tag-Variabilität [%] während der Bestimmung von <i>N7</i> -GA-Gua (API 5500 QTRAP).....	169
Tabelle 46	Gerätespezifische Parameter zur Bestimmung von <i>N7</i> -GA-Gua aus der DNA mittels SIVA (API 5500 QTRAP).....	170

Summary

The α,β -unsaturated carbonyl compounds acrylamide and acrolein are formed to some extent during the heating of food.

Within the present work, toxicokinetics and toxicodynamics of acrylamide and acrolein were studied *in vitro* and *in vivo*. The research specifically focused on the dose-response relationship regarding the genotoxicity of acrylamide and its metabolite glycidamide as well as the formation of mercapturic acids. The formation and excretion of acrylamide related mercapturic acids (AAMA and GAMA) is considered to be the main detoxifying pathway of these compounds and thus regarded as valuable biomarkers of exposure. The metabolic capacity was examined in a rat study taking into account the background acrylamide exposure of humans, estimated to range between 1-4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw.

The results of this dose-response study in rats, encompassing a large dose range of 0.1-10,000 μg acrylamide/kg bw, provided quantitative information on DNA adduct formation mediated through the genotoxic metabolite glycidamide for the first time in human exposure related relevant doses. In the low single exposure range of 0.1-10 μg acrylamide/kg bw, N7-GA-Gua adduct formation, the far most prominent DNA lesion induced by glycidamide, is confined to the low end of human background DNA adducts of various origin in the organs tested. The presence of a nowadays analytical determinable lesions background level of DNA lesions resulting from various genotoxic agents should take into consideration as a basis for future improvement of the risk assessment of genotoxic agents at low doses. Within the present work most sensitive analytical instruments were used and therefore it was possible to investigate genotoxic effects down to human consumer relevant exposure for the first time. But it has to be kept in mind that there is a need to increase awareness of the fact that genotoxicity by itself does not sufficiently describe the risk posed by carcinogens. The ensuing biological response, especially the risk connected with functional consequences following fixation or expression of mutations, needs to be included in a improved risk assessment.

These results, particularly data to toxicokinetics, should be supported by *in vitro* experiments conducted with primary hepatocytes. Therefore, a further focus of the present work were incubation experiments of primary rat hepatocytes with acrylamide. It has been shown, that acrylamide glutathione adducts (AA-GSH) were detectable prior to glycidamide formation. Direct comparison of the glycidamide and AA-GSH adduct formation rate allowed to conclude that detoxification of acrylamide in primary rat hepatocytes is up to three times faster than the toxification to glycidamide. Furthermore, in addition to the coupling of xenobiotics to GSH, primary rat hepatocytes are known to be capable degrading GSH adducts to the corresponding mercapturic acids at least in small amounts.

To elucidate the hazard potential of acrolein, the DNA adduct formation was investigated *in vitro*. As a suitable biomarker the formation of the main DNA adduct hydroxypropyldeoxyguanosine (OH-PdG) was investigated. The usage of the stable isotope dilution analysis required the synthesis and characterisation of hydroxypropyl-¹⁵N₅-deoxyguanosine (OH-[¹⁵N₅]-PdG). DNA incubation experiments showed a concentration as well as a time dependent DNA adduct formation.

The toxicokinetics of acrylamide and acrolein *in vivo* after consumption of commercial available contaminated potato chips were investigated in two human studies. The excretion kinetics of acrolein related mercapturic acids clearly correlated with ingestion of the potato chips. A comparison of the urinary excreted mercapturic acids of acrylamide and acrolein indicated a four to 13 fold higher food associated exposure of acrolein as compared to acrylamide. Analytical determination of the acrolein contents in the commercial available study potato chips showed contaminating in the low ppb range and therefore could explain only a marginal proportion of the in urine determined mercapturic acid content. Since acrolein could be chemically bound to the food matrix, its determination via the available analytical GC-methodology may lead to an underestimation of the actually 'bioavailable' concentration. The examination of acrolein binding and liberation processes, for example in the gastrointestinal tract by acid hydrolysis or microflora should be the aim of further studies. The results of both human intervention studies provided strong indications pointing towards an endogenous formation of acrolein due to the relative high amount of acrolein related mercapturic acids in the urine after the wash-out phase. Further investigations should elucidate the endogenous exposure and formation mechanisms of acrolein and possible other alkenals from various physiological sources. In contrast to database available at present on biological effects of individual substances, although limited, data on combined effects of different heat induced substances like acrylamide and acrolein are lacking. The overall effect of such combined exposures to toxification and detoxification should be a major aim of further studies.

1 Einleitung

Acrylamid und Acrolein gehören zu den α,β -ungesättigten Carbonylverbindungen. Sie zeichnen sich, wie andere α,β -ungesättigte Carbonylverbindungen, durch eine hohe Reaktionsfähigkeit aus. Einerseits können sie leicht mit Proteinen und DNA reagieren, was zytotoxische und genotoxische Wirkungen hervorrufen kann, andererseits können sie aber auch schnell durch Glutathionkonjugation detoxifiziert werden [SKLM, 2005].

Acrylamid ist eine in großem Umfang produzierte Industriechemikalie, die hauptsächlich Anwendung bei der Herstellung von Polyacrylamidprodukten findet. Aus Acrylamid hergestellte Polymere und Copolymere werden in der Kosmetikindustrie, als Bindemittel bei der Papierherstellung, als Flockungsmittel in der Abwasseraufbereitung und in biochemischen Laboratorien verwendet. Nachdem Acrylamid-Hämoglobin-Addukte im Jahre 2002 auch in nicht Acrylamid-exponierten Personen gefunden wurden, vermutete man Lebensmittel als mögliche Expositionsquelle. Dies wurde anschließend durch Studien bestätigt [Tareke *et al.*, 2002]. Es konnte gezeigt werden, dass Acrylamid beim Erhitzen von Lebensmitteln vor allem bei hohen Temperaturen im Verlauf der Maillard-Reaktion gebildet werden kann. Der wesentliche Schritt ist hierbei die Kondensationsreaktion der Aminosäure Asparagin mit reduzierenden Zuckern wie zum Beispiel Glucose und Fructose [Zyzak *et al.*, 2003]. Da es weder natürlich in der Rohware vorkommt, noch während des üblichen Herstellungsprozesses des Lebensmittels hinzugefügt wird, wird Acrylamid als unerwünschte Verunreinigung, als so genannte Lebensmittelkontaminante, eingestuft. Zu besonders Acrylamid-belasteten Lebensmitteln zählen Pommes Frites, Bratkartoffeln und Kartoffelchips, Getreideprodukte wie Brot und Backwaren, sowie Kaffee und Kakao. Seit der Entdeckung von Acrylamid in Lebensmitteln wurden verschiedene *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen zur Toxikokinetik und -dynamik durchgeführt. Acrylamid ist laut dieser Studien als neurotoxisch an Menschen und Tieren, entwicklungs- und reproduktionstoxisch, genotoxisch und kanzerogen in Nagern, anzusehen [Ghanayem *et al.*, 2005]. Als Industriechemikalie wurde Acrylamid daher im Jahre 1994 von der International Agency for Research on Cancer (IARC) in die Gruppe 2A als Stoff eingestuft, der wahrscheinlich krebserzeugend beim Menschen ist [IARC, 1994].

Mittlerweile gilt als gesichert, dass über Lebensmittel keine neurotoxischen Aufnahmemengen erreicht werden: Die World Health Organisation (WHO) beziffert die weltweite durchschnittliche Exposition mit Acrylamid über Lebensmittel auf 1-4 μg Acrylamid/kg Körpergewicht (KG) und Tag [JECFA, 2010], wohingegen der No Observed Adverse Effect Level (NOAEL) für eine neurotoxische Wirkung in Ratten bei 0,5 mg/kg KG und Tag liegt [Watzek *et al.*, 2012].

Acrylamid wird im Organismus zum genotoxischen Metaboliten Glycidamid giftig. Glycidamid bildet DNA-Addukte vor allem mit dem *N7* des Guanins. Glycidamid-DNA-Addukte konnten im Tierversuch an Nagern nach Verabreichung hoher Mengen Acrylamid in allen untersuchten Organen gefunden werden [Gamboa da Costa et al., 2003]. Als Hauptweg der Entgiftung von Acrylamid und Glycidamid gilt die Bindung an Glutathion (GSH). Aufgrund des oxidativen Metabolismus von Acrylamid hängt die biologische Wirkung wesentlich vom Gleichgewicht der giftigen und entgiftenden Metabolismuswege in der Leber ab.

Acrolein ist eine sehr leicht flüchtige farblose Flüssigkeit und sehr gut in Wasser löslich. Acrolein wird seit 1940 kommerziell zur Herstellung von Acrylsäure, dem Ausgangsprodukt für Acrylatpolymere, industriell produziert. Außerdem kann Acrolein aus Aminosäuren, Fetten oder Kohlenhydraten während des Erhitzens von Lebensmitteln gebildet werden. Während der Zubereitung von kohlenhydratreichen Lebensmitteln kann Acrolein wie auch Acrylamid im Verlauf der Maillard-Reaktion entstehen [Stevens & Maier, 2008]. Es konnte in Früchten, Gemüse, Fisch und Käse nachgewiesen, sowie in Schnäpsen und Wein analytisch erfasst werden [Collin et al., 1993; Feron et al., 1991]. Eine umfassende Expositionsabschätzung ist nur bei Erfassung sämtlicher Expositionsrouten wie zum Beispiel Inhalation durch Rauchen und endogene Belastung durch Lipidperoxidation und Polyamin-Metabolismus möglich. Acrolein ist als einfachster α,β -ungesättigter Aldehyd hochreaktiv gegenüber Nucleophilen wie z.B. Thiol- oder Aminogruppen unter Ausbildung von Michael-Addukten. Die hohe Reaktivität und Flüchtigkeit von Acrolein führt dazu, dass derzeit kaum zuverlässige Daten zu Acroleingehalten speziell in kohlenhydratreichen Lebensmitteln vorliegen. Zudem ist bisher ungeklärt, in welchem Ausmaß Acrolein zur Gesamtexposition gegenüber hitzeinduzierten Schadstoffen neben Acrylamid in Lebensmitteln beiträgt. Die derzeitige Datenlage lässt eine eindeutige Risikobewertung nicht zu. Eine stetige Exposition mit Acrolein gilt als sicher. Nach Inhalation verbleibt Acrolein aufgrund der hohen Gewebereaktivität irreversibel im Respirationstrakt und wirkt dort stark reizend. Acrolein kann Atemprobleme und virale, bakterielle und mycobakterielle Erkrankungen verursachen. Des Weiteren wird davon ausgegangen, dass eine gesteigerte Acroleinemission mit einem erhöhten Gesundheitsrisiko an respiratorischen Erkrankungen wie beispielsweise Asthma zu erkranken, assoziiert ist [Schettgen et al., 2008].

Allerdings konnte gezeigt werden, dass die toxikologischen Effekte von Acrolein im Gegensatz zu Acrylamid nicht auf einer erhöhten Tumorzinzidenz beruhen. Daher wurde Acrolein von der IARC in Kategorie 3 eingestuft: Es gilt als möglicherweise krebserzeugend beim Menschen, allerdings ist die Datenlage nicht ausreichend, um eine eindeutige Beurteilung vornehmen zu können [IARC, 1995].

Um das Risiko von Acrylamid und Acrolein für den Menschen abschätzen zu können, gilt es detaillierte Erkenntnisse über den Metabolismus und die Eliminierung, die Toxikokinetik, beider Stoffe zu erlangen.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Acrylamid

2.1.1 Allgemeines

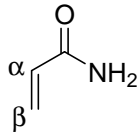


Abbildung 1 Strukturformel von Acrylamid

Acrylamid ist eine α,β -ungesättigte Carbonylverbindung mit einem relativen Molekulargewicht von 71,08 g/mol (Abbildung 1). Es ist leicht löslich in Wasser, Alkoholen und Aceton. Acrylamid ist ein lichtempfindliches, weißes und kristallines Pulver, welches leicht durch Alkali abgebaut wird [Eisenbrand & Schreier, 2006].

2.1.2 Expositionsquellen für den Menschen

Im Jahre 1997 kam es im Rahmen von Bauarbeiten an einem Eisenbahntunnel durch den Hallandsås in Schweden während der Arbeiten zu starken Wassereintrüben. Diese sollten mit großen Mengen eines acrylamidhaltigen Polymers verhindert werden. Durch unvollständige Polymerisation gelangten die leicht wasserlöslichen Acrylamidmonomere in die Umwelt. Das kontaminierte Wasser führte infolgedessen zu großem Fischsterben und neurologischen Störungen bei Rindern. Untersuchungen zur Belastung der Tunnelarbeiter mit Acrylamid nach dem Unglück zeigten, dass nicht nur die betroffenen Arbeiter mit Acrylamid exponiert waren, sondern auch die Personen der Kontrollgruppe [Svensson *et al.*, 2003].

Nachfolgende Untersuchungen zeigten, dass bestimmte Lebensmittel eine wichtige Expositionsquelle für Acrylamid beim Menschen darstellen. Die unterschiedliche Belastung durch Lebensmittel innerhalb der Bevölkerung variiert sowohl durch individuelle Verzehrgeohnheiten, als auch durch Unterschiede in den Acrylamidgehalten im Lebensmittel. Für Trinkwasser ist in der Europäischen Union ein Grenzwert für Acrylamid von 0,1 μg Acrylamid/l festgelegt worden, die Welt-Gesundheits-Organisation (WHO) empfiehlt einen Grenzwert von 0,5 μg /l. Geht man von der höchsten zu erwartenden

Acrylamidkonzentration (0,125 µg/l), einer Aufnahmemenge von 2 Liter Wasser am Tag und einem Körpergewicht von 70 kg aus, so erhält man eine tägliche Aufnahmemenge von 3,6 ng Acrylamid pro kg Körpergewicht. Diese Belastung wird als vernachlässigbar gering bewertet [Gomes *et al.*, 2002].

Aber nicht nur Lebensmittel stellen eine Expositionsquelle für Acrylamid dar, sondern auch eine Reihe von anderen Quellen liefert einen Betrag zur Hintergrundbelastung des Menschen durch Acrylamid. Hierbei spielt das Rauchen eine nicht unerhebliche Rolle. So kann das durch Pyrolyse entstandene Acrylamid im gefilterten Hauptstrom von Zigaretten mit Gehalten von 1,1-2,3 µg Acrylamid pro Zigarette nachgewiesen werden [Smith *et al.*, 2000]. Dies führt laut Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) für Raucher zu Zusatzbelastungen von 0,5-2 µg Acrylamid pro kg KG und Tag [BfR, 2003].

Ferner wird Acrylamid als Polymer auch zur Herstellung von kosmetischen Produkten verwendet. Kosmetika können als Verunreinigung ebenfalls Spuren von monomerem Acrylamid enthalten und stellen somit eine mögliche Expositionsquelle für den Verbraucher dar. Nach der 26. Richtlinie 2002/34/EG darf der Restacrylamidgehalt in Körperpflegemitteln, welche auf der Haut verbleiben 0,1 mg/kg nicht überschreiten. Bei allen sonstigen kosmetischen Mitteln ist er auf 0,5 mg/kg beschränkt [BfR, 2003]. Dabei wird eine Acrylamidaufnahme von 0,23 ng Acrylamid / kg KG bei der Frau und eine Acrylamidaufnahme von 0,17 ng Acrylamid / kg KG beim Mann angenommen. Insgesamt werden Kosmetika bei beiden Geschlechtern jedoch als vernachlässigbare Expositionsquelle für Acrylamid eingeschätzt.

2.1.3 Bildung von Acrylamid im Lebensmittel

Während des Erhitzens von Nahrungsmitteln reagieren reduzierende Zucker mit Aminosäuren, wodurch eine Kaskade von Reaktionen eingeleitet wird, was anschließend zur Bräunung der erhitzten Lebensmittel führt. In dieser so genannten Maillard-Reaktion werden verschiedene reaktive Mono- und Dicarbonyl-Verbindungen erzeugt, die für die Bräunungsreaktion verantwortlich sind [Eisenbrand & Schreier, 2006].

In Untersuchungen zum Bildungsmechanismus (Abbildung 2) von Acrylamid in Lebensmitteln wurde von Zyzak und Mitarbeitern gezeigt, dass die erste Stufe der Acrylamidbildung der nukleophile Angriff der α -Aminogruppe des freien Asparagins an einen reduzierenden Zucker wie zum Beispiel Glucose als Carbonylquelle ist [Zyzak *et al.*, 2003]. Es bildet sich eine Schiff'sche Base, die unter Hitze decarboxyliert wird. Die decarboxylierte Schiff'sche Base kann zum einen zu 3-Aminopropionamid hydrolysiert werden, welches beim Erhitzen über die Elimination von Ammoniak zu Acrylamid abgebaut wird. Zum anderen

kann es zur direkten Abspaltung eines Imins aus der decarboxylierten Schiff'schen Base unter Entstehung von Acrylamid kommen [Zyzak et al., 2003].

Weitere untergeordnete Entstehungsquellen für Acrylamid stellen analoge Nebenreaktionen dar, an denen verschiedene andere Aminosäuren, wie zum Beispiel Glutamin, Methionin und Cystein und verschiedene reduzierende Zucker als Carbonylkomponenten beteiligt sind.

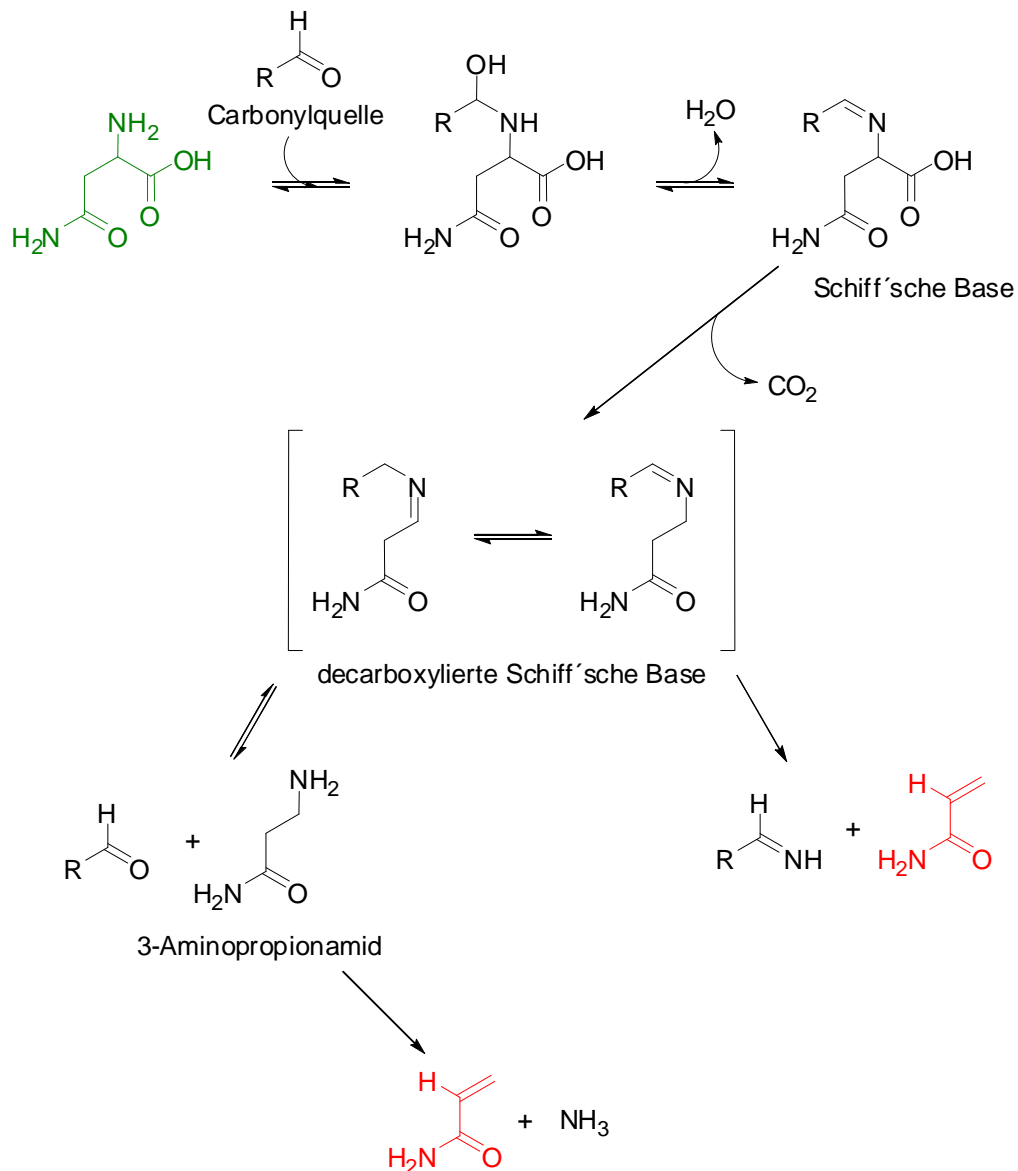


Abbildung 2 Bildungsmechanismus von Acrylamid aus Asparagin in Lebensmitteln; grün: Asparagin; rot: Acrylamid [nach Zyzak et al., 2003]

Ein weiterer möglicher Mechanismus der Acrylamidbildung verläuft nicht über die Maillard-Reaktion, sondern geht von Triacylglyceriden aus (Abbildung 3). Diese setzen bei der Zubereitung von Lebensmitteln über 200 °C Glycerol frei, aus dem durch Dehydrierung über

ein Propendiol Acrolein entstehen kann. Durch Oxidation des Acroleins zur Acrylsäure kann dieses in Gegenwart eines Stickstoffdonors wie Ammonium oder Aminosäuren zu Acrylamid weiterreagieren. Dieser Bildungsmechanismus stellt allerdings einen untergeordneten Bildungsweg für Acrylamid dar [Becalski et al., 2003].

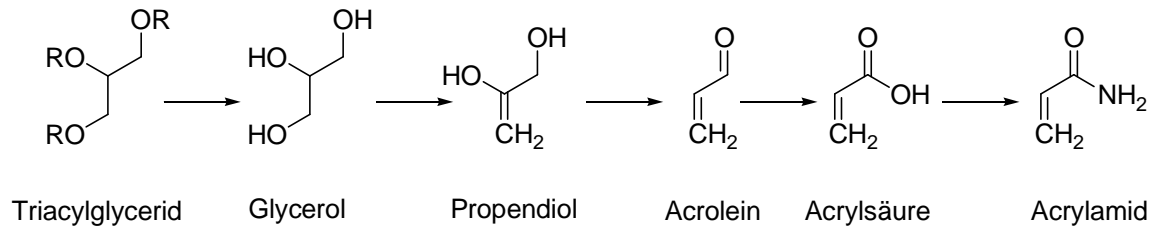


Abbildung 3 Nebenweg der Bildung von Acrylamid in Lebensmitteln aus Triacylglyceriden
[nach Becalski et al., 2003]

Mittlerweile sind verschiedene Bildungswege von Acrylamid in Lebensmitteln beschrieben worden. In diesen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass sowohl die Zusammensetzung, als auch die Art der Herstellung beziehungsweise Zubereitung des Lebensmittels einen Einfluss auf den Acrylamidgehalt im Lebensmittel hat [Tareke et al., 2002]. Einflussgrößen, wie der Wassergehalt oder auch die physikalische Beschaffenheit der Lebensmittelmatrix können den mechanistischen Bildungsweg von Acrylamid beeinflussen. So konnte gezeigt werden, dass bei Backwaren der Austausch des Backtriebmittels Ammoniumhydrogencarbonat (Hirschhornsalz) mit Natriumhydrogencarbonat die Acrylamidbildung um bis zu 60% reduzierte. Außerdem beeinflusst, wie in Abbildung 2 gezeigt, die Carbonylquelle die Acrylamidbildung wesentlich, weswegen die Verwendung von Saccharose anstatt reduzierender Zucker ebenfalls zu reduzierten Gehalten führte. Da Acrylamid eine thermisch gebildete Lebensmittelkontaminante ist, die erst bei hohen Temperaturen entsteht, hatte auch die Wahl der Zubereitungstemperatur einen Einfluss auf den Acrylamidgehalt. So bewirkt eine Absenkung der Temperatur bei der Zubereitung von frittierten Kartoffelprodukten von 185 °C auf 175 °C bereits eine Verringerung des Acrylamidgehalts um bis zu 35% [Gertz, 2002].

2.1.4 Acrylamidgehalte in verschiedenen Lebensmitteln

Nahrungsmittel mit einem hohen Gehalt an Acrylamid enthalten in der Regel die Präkursoren Stärke und freie Aminosäuren, wie zum Beispiel Kartoffeln und Getreide [Friedman, 2003]. In

einer Bewertung des Scientific Committee on Food (SCF) wurde aus diesem Grund vor hohem Gehalten, vor allem in hocherhitzten, besonders stärkehaltigen Lebensmitteln gewarnt. Der Nachweis der Acrylamidbildung in verschiedenen verarbeiteten Nahrungsmitteln ist jedoch kein neues Risiko im Sinne, dass es einer Einführung einer kanzerogenen Chemikalie in die Lebensmittelkette entspricht. Stattdessen stellt der Nachweis nur eine neue Erkenntnis eines bisher nicht registrierten, aber existierenden Risikos dar [SCF, 2002]. Häufig aufgenommene Nahrungsmittel mit einem hohen Anteil an Acrylamid sind in Tabelle 1 aufgezeigt.

Tabelle 1 Übersicht über Acrylamidgehalte ausgewählter Lebensmittel ($\mu\text{g}/\text{kg}$) [BVL, 2010]

Nahrungsmittel	Median [Mittelwert]	min-max
Kartoffelchips [n = 363]	275 [385]	8-3453
Lebkuchen [n = 567]	278 [522]	5-4200
Knäckebrot [n = 144]	250 [260]	5-950
Pommes frites (tiefgefroren) [n = 590]	194 [256]	5-2030
Kaffee (geröstet) [n = 243]	187 [213]	19-861
Spekulatius [n = 176]	134 [163]	15-1042

Betrachtet man diese Literaturdaten (Tabelle 1), so fällt auf, dass es sehr große Unterschiede in den Acrylamidgehalten gibt. Die Gehalte variieren sowohl in den verschiedenen Lebensmittelkategorien (Knäckebrot vs. Kaffee), als auch in unterschiedlichen Produkten der gleichen Lebensmittelkategorie (unter anderem Pommes Frites und Kartoffelchips). Daher scheinen sie nicht nur aus der Menge an im Lebensmittel vorhandenen Ausgangsprodukten der Acrylamidbildung, sondern auch aus den unterschiedlichen Herstellungsprozessen wie zum Beispiel Temperatur, Zeit, Art des Fritierfettes oder Art der Lebensmittelmatrix abzuhängen [Friedman, 2003].

Basierend auf einer ausgewogenen Ernährung wird die tägliche Aufnahmemenge von Acrylamid in den westlichen Industriestaaten auf ungefähr 1-4 μg pro kg Körpergewicht geschätzt [JECFA, 2010].

Um die Belastung von Verbrauchern durch Acrylamid in Lebensmitteln möglichst gering zu halten, entwickelte das BfR ein dynamisches Konzept zur Minimierung der Acrylamidgehalte. So werden vorrangig diejenigen Hersteller von den Überwachungsbehörden kontaktiert, die in ihrer Warengruppe zu den 10 Prozent mit den höchsten Acrylamidgehalten gehören. Dieses Konzept ist als Signalwert-Konzept bekannt und bezeichnet den untersten

Acrylamidgehalt dieser 10 Prozent am höchsten belasteten Lebensmittel. Somit soll eine schnellstmögliche Reduzierung der Acrylamidgehalte gewährleistet werden.

2.2.5 Toxikologie von Acrylamid

2.2.5.2 Toxikokinetik von Acrylamid

2.2.5.2.1 Aufnahme und Verteilung von Acrylamid im Organismus

Acrylamid kann inhalativ, dermal oder oral aufgenommen werden. Durch Nahrungsmittel aufgenommenes Acrylamid wird sowohl im Menschen als auch im Nager im gesamten Organismus schnell auf alle Gewebe verteilt. So konnte von Miller et al. an F344-Ratten, die eine Dosis von 10 mg ¹⁴C-Acrylamid pro kg Körpergewicht oral aufgenommen hatten, gezeigt werden, dass sich die Radioaktivität vor allem auf Muskel (48%), Haut (15%), Blut (12%) und Leber (7%) verteilte [Miller et al., 1982].

Die gleichmäßige Verteilung deckt sich mit der relativ hohen Wasserlöslichkeit und dem niedrigen Molekulargewicht von Acrylamid, so dass es Membranen leicht passieren kann [Segerback et al., 1995; Sorgel et al., 2002]. Diese Tatsache steht im Einklang mit den Befunden aus Untersuchungen von Sorgel und Mitarbeiter, die herausfanden, dass Acrylamid die Blut-Hirn-Schranke und die humane Plazenta überwinden kann. Es konnte gezeigt werden, dass innerhalb einer halben Stunde etwa 20% der aufgenommenen Acrylamiddosis auf den Fötus über ging [Sorgel et al., 2002].

Um die Bioverfügbarkeit von Acrylamid nach Aufnahme über Lebensmitteln zu untersuchen, wurden im Rahmen einer *in vivo* Studie an männliche Sprague Dawley-Ratten (SD-Ratten) verschiedene Lebensmittel verfüttert. Es wurde die Bildung der Expositionsbiomarker Hämoglobin-Addukte und Mercaptursäuren mit der nach Aufnahme der gleichen Dosis Acrylamid nach Aufnahme über Trinkwasser verglichen. Die Ergebnisse konnten belegen, dass die Verfügbarkeit von Acrylamid aus Lebensmitteln mit derjenigen aus Trinkwasser vergleichbar war [Berger et al., 2011].

2.2.5.2.2 Metabolismus von Acrylamid im Organismus

Die Reaktivität von Acrylamid zeichnet sich vor allem dadurch aus, dass es durch seinen α,β -ungesättigten Charakter als Michael-Akzeptor elektrophil an Thiol-, Hydroxyl- oder Amino-Gruppen addieren kann. Der Acrylamidmetabolismus verläuft über mehrere Wege, welche in

Entgiftungs- und in Giftungs-Reaktionen eingeteilt werden. Bei den Entgiftungsreaktionen können Acrylamid als auch dessen Phase-I-Metabolit, Glycidamid, einerseits durch kovalente Bindung an Blutproteine, wie zum Beispiel Hämoglobin Addukte bilden, andererseits besteht die Möglichkeit dass sie nach Kopplung an Glutathion zu den entsprechenden Mercaptursäuren abgebaut und anschließend über den Urin ausgeschieden werden [Ghanayem et al., 2005].

Angriffspunkt für die Hämoglobinadduktbildung stellt vor allem die N-terminale Amino-Gruppe des Valins aus dem Hämoglobin dar, welche mit Acrylamid und Glycidamid zu Acrylamid-Valin- und Glycidamid-Valin-Hämoglobinaddukten reagiert [Calleman et al., 1993]. Es wird angenommen, dass die Biotransformation des Acrylamids mittels Glutathion-Konjugation (GSH) möglicherweise über die Glutathion-S-Transferasen (GST) katalysiert wird [Miller et al., 1982]. Dies führt zu einer Fülle verschiedener Metabolite. Den Hauptanteil der ausgeschiedenen Mercaptursäure-Konjugate beim Menschen nimmt das N-Acetyl-S-(2-carbamoylethyl)-cystein (AAMA) ein, gefolgt von dem N-Acetyl-S-carbamoyl-ethylcystein-S-oxid (AAMA-Sulfoxid), was letztlich einer Detoxifikation des Acrylamids entspricht [Fennell & Friedman, 2005].

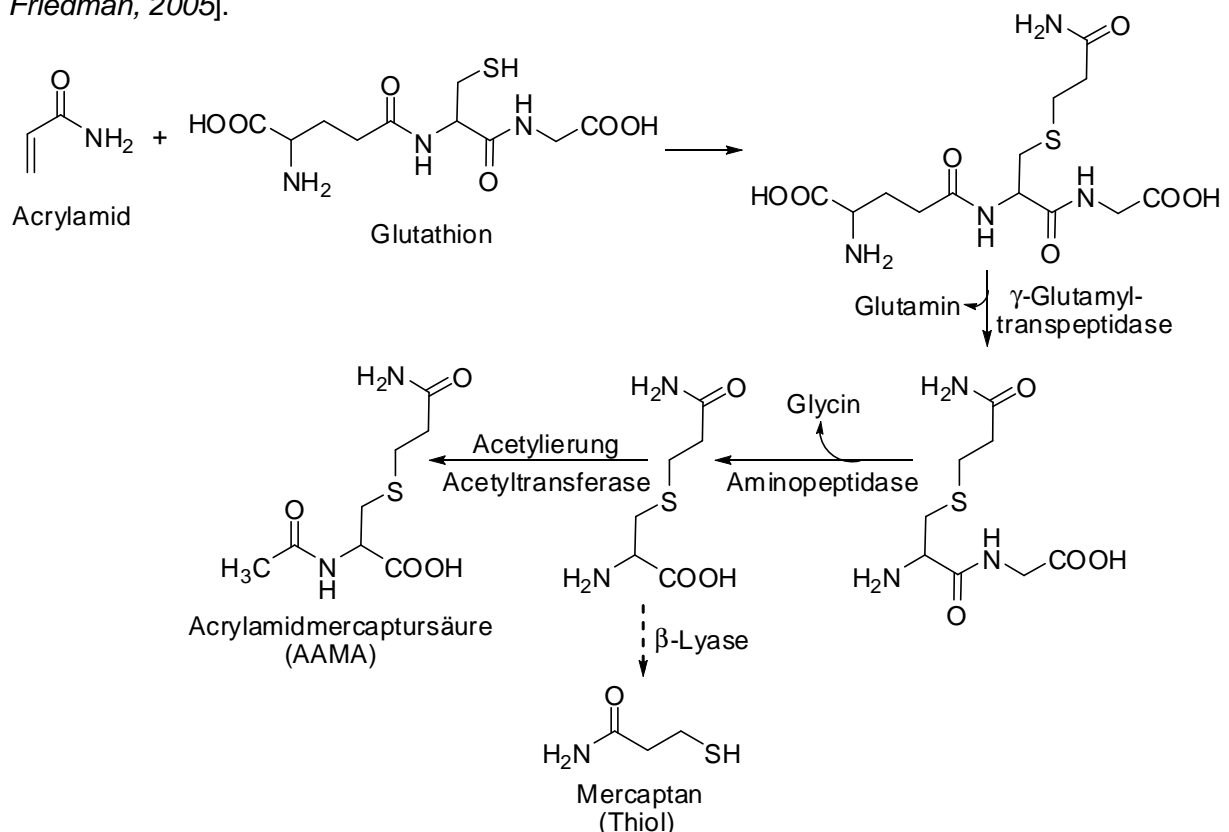


Abbildung 4 Konjugation von Acrylamid und Abbau der Glutathion-Addukte zur Mercaptursäure [modifiziert nach Forth et al., 1996]

In Abbildung 4 ist die Bildung der Mercaptursäuren als wichtigste Metabolisierungsreaktion am Beispiel von Acrylamid gezeigt. Nach Konjugation des Acrylamids mit Glutathion über die

GST wird das so entstandene Glutathionaddukt einem mehrstufigen Abbaumechanismus unterworfen. Im ersten Schritt wird Glutamin durch die γ -Glutamyltranspeptidase abgespalten. Danach erfolgt die Abspaltung von Glycin, was durch eine Aminopeptidase katalysiert wird. Das verbleibende Cysteinderivat unterliegt im letzten Schritt einer Acetylierung, wodurch im obigen Beispiel die Acrylamid-Mercaptursäure entsteht, die im Menschen zum entsprechenden Sulfoxid weitermetabolisiert werden kann [Forth *et al.*, 1996].

Die Arbeitsgruppe von Fuhr führten eine Studie durch, bei der freiwillige Probanden eine Portion Kartoffelchips zu sich nahmen, die einer Aufnahmemenge von 0,94 mg Acrylamid entsprach. Nach 72 Stunden wurden etwa 60% der Dosis des aufgenommenen Acrylamids in Form von wenig unverändertem Acrylamid und seiner Mercaptursäuren im Urin wiedergefunden [Fuhr *et al.*, 2006].

Als weiterer Metabolisierungsweg kann Acrylamid über Oxidation zu einem reaktiven Epoxid-Zwischenprodukt, dem Glycidamid, umgesetzt werden. Es wurde gezeigt, dass diese Funktionalisierungsreaktion hauptsächlich durch das Cytochrom P450 2E1 (CYP450 2E1) katalysiert wird [Ghanayem *et al.*, 2005; Sumner *et al.*, 1999]. Glycidamid kann ebenfalls mittels Glutathion über die entsprechenden Urinmetaboliten *N*-Acetyl-S-(2-carbamoyl-2-hydroxy-ethyl)-cystein (GAMA) und *N*-Acetyl-S-(1-carbamoyl-2-hydroxy-ethyl)-cystein (GAMA2) detoxifiziert werden [Fuhr *et al.*, 2006]. Vergleichende Untersuchungen zwischen Menschen und Nagern zeigten, dass das Ausmaß der Oxidation von Acrylamid zu Glycidamid bei Nagern 2 bis 4-fach stärker ausgeprägt ist und in der Reihenfolge Maus > Ratte > Mensch abnimmt [Fennell & Friedman, 2005].

Der Metabolismus des Glycidamids zeigt weitere Speziesunterschiede zwischen Nagern und Menschen. Wird in der Ratte und der Maus der größte Teil des Glycidamids mit Glutathion konjugiert, so scheint beim Menschen der überwiegende Teil zum Glyceramid entgiftet zu werden. Diese Vermutung bestätigt eine Studie von Fennel und Mitarbeitern, bei der nach einer oral aufgenommenen Menge von 3 mg Glycidamid, Glyceramid als 11% der Gesamtmetabolite identifiziert werden konnte, wohingegen der Anteil von Glycidamidmetaboliten nur 2,6% betragen hat. Glyceramid entsteht durch Hydrolyse aus Glycidamid, ist im Gegensatz zu Glycidamid nicht elektrophil und reagiert nicht mit Nukleophilen wie zum Beispiel DNA-Basen [Fennell *et al.*, 2005].

Glycidamid ist in der Lage mit DNA zu reagieren und Addukte zu bilden. Gamboa da Costa und Mitarbeiter konnten die Bildung verschiedenster Glycidamid-DNA-Addukte *in vivo* an Ratten nachweisen [Gamboa da Costa *et al.*, 2003]. Näheres zu Reaktionen von Acrylamid und Glycidamid mit der DNA wird in Kapitel 2.2.5.3.3 beschrieben.

Eine Übersicht über den Gesamtmetabolismus von Acrylamid im Menschen ist in Abbildung 5 dargestellt.

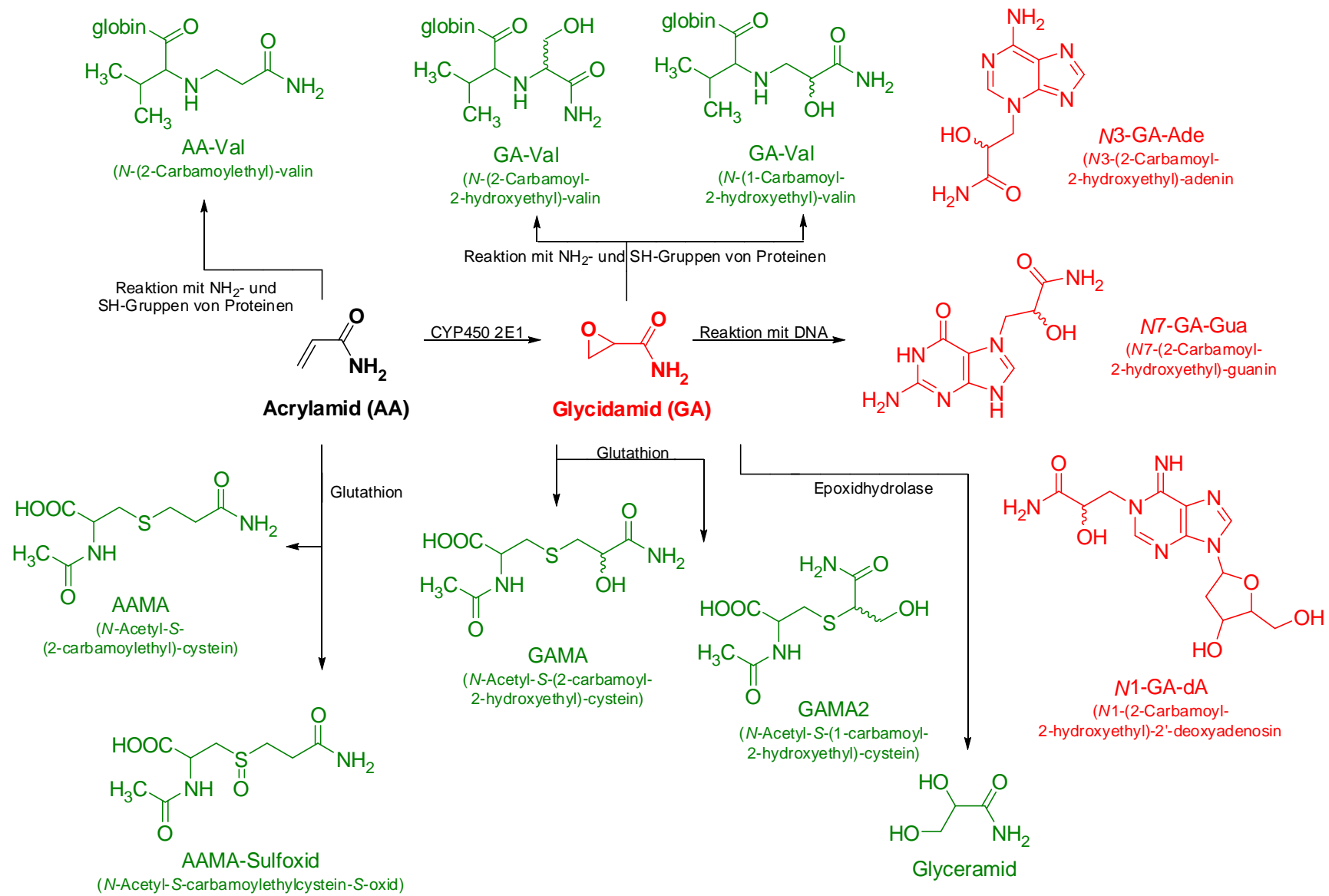


Abbildung 5 Metabolismus des Acrylamids im Menschen [modifiziert nach Boettcher & Angerer, 2005]

2.2.5.2.3 Ausscheidung von Acrylamid aus dem Organismus

Die Ausscheidung von Acrylamid und seinen Metaboliten erfolgt primär über die Niere. In der Arbeitsgruppe konnte anhand einer Tierstudie mit Sprague Dawley Ratten gezeigt werden, dass bis zu 65% einer oral aufgenommenen Acrylamiddosis über Mercaptursäuren im Urin ausgeschieden wurden [Berger et al., 2011]. Beim Menschen beträgt die Ausscheidungsrate nach einer oral aufgenommenen Acrylamiddosis etwa 60% (siehe Abschnitt 2.2.5.2.2) [Doroshenko et al., 2009]. Sowohl bei Mensch als auch bei der Ratte konnten im Urin hauptsächlich hohe Anteile an AAMA ermittelt werden. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Konjugation von Acrylamid mit GSH die Giftung zu Glycidamid bevorzugt abläuft [Fennell & Friedman, 2005].

2.2.5.3 Toxikodynamik von Acrylamid

Die Hauptwirkungen eines durch Acrylamid ausgelösten toxischen Effektes äußern sich in Neurotoxizität in Menschen und Tieren, Entwicklungs- und Reproduktions-Toxizität, Genotoxizität und Kanzerogenität in Nagern [Ghanayem et al., 2005].

2.2.5.3.1 Neurotoxizität von Acrylamid

Die neurotoxische Wirkung des Acrylamids im Menschen ist hauptsächlich aus Intoxifikationen bei Unfällen und durch chronische Exposition zum Beispiel am Arbeitsplatz bekannt, wobei hohe Acrylamidexpositionen bei der industriellen Produktion oder auch in speziellen Bereichen, wie im Tunnelbau, in dem Acrylamid als Dichtungsmasse eingesetzt wird, auftreten können [Li & Ho, 2005]. Zu den akuten toxischen Wirkungen von Acrylamid zählen Taubheitsgefühl in den Beinen und Händen oder der Verlust der Fußreflexe. Chronische Exposition führt zu schwereren Symptomen, wobei die Nervenendigungen die Anfangsbereiche der Läsionen darstellen. Die Degradation terminaler Nerven führt zur Verminderung der kognitiven Funktionen und Zerstörung der Großhirnrinde, des Thalamus und Hippocampus. Obwohl hauptsächlich über periphere Neuropathien berichtet wird, werden auch andere Teile des Nervensystems befallen [Friedman, 2003].

In zwei Langzeitstudien an F344-Ratten über 18 Monate, welche oral mit 2,0 mg Acrylamid/kg KG behandelt wurden, konnten einerseits Degenerationen des *Nervus tibialis* als auch des *Nervus ischiadicus* verzeichnet werden [Friedman et al., 1995; Johnson et al., 1986].

Für die neurotoxischen Wirkungen von Acrylamid wurde im Jahre 2002 ein No Observed Adverse Effect Level (NOAEL) von 0,5 mg/kg KG festgelegt [WHO, 2002].

2.2.5.3.2 Reproduktionstoxizität von Acrylamid

In einer Studie an trächtigen Mäusen wurde nach Verabreichung von 45 mg Acrylamid/kg KG pro Tag während der Schwangerschaftstage 6-17 eine Verminderung der Geburtsgewichte festgestellt [Field et al., 1990]. Nach dermalen Exposition mit Acrylamid konnten darüber hinaus Chromosomenschäden in Keimzellen beobachtet werden [Gutierrez-Espeleta et al., 1992]. Aufgrund dessen wurde der zugrunde liegende molekulare Mechanismus der entwicklungs- und reproduktionstoxischen Wirkungen von Acrylamid bei männlichen Tieren auf die Alkylierung von Protaminen und Motorproteinen der Spermien zurückgeführt [Tyl & Friedman, 2003]. Nach Gabe von 50-200 ppm Acrylamid über Trinkwasser und einem Zeitraum von 70 Tagen wurde bei Ratten von verringerter Spermienbeweglichkeit, erniedrigtem Geburtsgewicht und einer langsameren Gewichtszunahme während der Lactationsperiode berichtet. Außerdem konnten Störungen im Paarungsverhalten erwachsener Tiere beobachtet werden [Zenick et al., 1986]. Diese Beobachtungen decken sich mit Befunden einer weiteren Studie an Ratten, bei der nach Verabreichung von 5-20 mg Acrylamid/kg KG neben verringertem Geburtsgewicht und niedrigerer Anzahl an Nachkommen auch Anomalien der Spermienanatomie und – beweglichkeit detektiert wurden [Wise et al., 1995].

Für die Acrylamid vermittelte Reproduktionstoxizität wurde ein NOAEL von 2,0 mg/kg KG festgelegt [WHO, 2002].

2.2.5.3.3 Genotoxizität und Kanzerogenität von Acrylamid

Die Genotoxizität und Kanzerogenität von Acrylamid kann auf die Bildung von DNA-Addukten zurückgeführt werden. Hierbei können DNA-Addukte, die nur ineffizient repariert werden, beispielsweise zur Basenfehlpaarung während der DNA-Replikation führen, was wiederum Mutationen hervorrufen kann. Spezifische Mutationen in wichtigen Genen, die zum Beispiel Proteine codieren, welche wiederum für Zellzyklus und Wachstum verantwortlich sind (Onkogene und Tumorsuppressorgene), können die Tumorgenese auslösen [Besaratinia & Pfeifer, 2005].

In vitro und *in vivo* Studien an Tieren belegen, dass sowohl Acrylamid, als auch Glycidamid DNA-modifizierend wirken können. Acrylamid allein besitzt nur eine sehr geringe bis keine

DNA-Reaktivität, jedoch können spezifische DNA-Addukte auf Basis des Glycidamids nach metabolischer Aktivierung über CYP450 2E1 beobachtet werden [Gamboa da Costa et al., 2003; Sumner et al., 1999]. So zeigte Acrylamid keinerlei Mutagenität im Ames-Test, sowohl mit, als auch ohne Zusatz eines metabolisierenden Systems. Glycidamid hingegen ist im Ames-Test auch ohne aktivierendes System mutagen [Hashimoto & Tanii, 1985].

Dieses Ergebnis deckt sich mit *in vitro* Untersuchungen der Induktion von hPRT-Mutationen an V79-Zellen, die belegen, dass Glycidamid selbst ohne Zusatz eines aktivierenden Systems ab einer Konzentration von 800 µM mutagenes Potential aufweist. Acrylamid hingegen zeigte bei diesen Versuchen bis 10 mM kein mutagenes Potential [Li & Ho, 2005]. Nach vierstündiger Inkubation von humanen Lymphozyten mit bis zu 6 mM Acrylamid konnten mittels Einzelzellgelelektrophorese (Comet Assay) keine DNA-Strangbrüche beobachtet werden. Jedoch führte die Inkubation mit Glycidamid im gleichen Experiment zu einem Anstieg der Strangbrüche bereits ab 0,3 mM [Baum et al., 2005]. Nach Erhöhung der Sensitivität des Comet Assay durch zusätzliche Inkubation mit dem DNA-Reparaturenzym Formamidopyrimidin-DNA-glykosylase (FPG) konnte gezeigt werden, dass Glycidamid bereits bei einer Konzentration von 10 µM nach vier Stunden DNA-Strangbrüche induzieren konnte [Thielen et al., 2006]. In anschließenden *in vivo* Untersuchungen mittels Comet Assay wurde eine signifikante Erhöhung der DNA-Schäden in Hepatozyten und Leukozyten der Ratten lediglich ab einer einmaligen Verabreichung von 10 mg Acrylamid/kg KG über Trinkwasser festgestellt, wohingegen N7-GA-Gua-Addukte in diesem Versuch bereits ab 0,5 mg/kg KG mittels Tandemmassenspektrometer nachweisbar waren [Berger et al., 2011; Feld, 2010]. Allerdings konnten Solomon und Mitarbeiter nachweisen, dass auch Acrylamid *in vitro* mit der DNA reagieren kann und Addukte bildete. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass es sich hierbei um optimale chemische Bedingungen und eine lange Reaktionszeit (40 Tage) handelte, so dass die Ergebnisse nicht auf die menschliche Exposition übertragen werden können. Es wurde geschlussfolgert, dass Glycidamid im Vergleich zu Acrylamid etwa um den Faktor 100- bis 1000-fach reaktiver ist [Solomon et al., 1985].

Änderungen in der DNA-Sequenz können Effekte auf die Chromosomenstruktur beinhalten, die sich wiederum im klastogenen Potential von Acrylamid und Glycidamid widerspiegeln. Diese genotoxischen Effekte wurden durch Untersuchungen an menschlichen Lymphozyten mittels Messung der DNA-Schädigung per Comet Assay, die ab einer Konzentration von 300 µM Glycidamid messbar war, nachgewiesen [Li & Ho, 2005]. Außerdem konnten Paulsson und Mitarbeiter im Blut von Mäusen nach einmaliger interperitonealer Verabreichung von Acrylamid in Dosen von bis zu 1,5 mmol/kg Körpergewicht nach 48 Stunden eine Zunahme von Mikrokernen nachweisen [Paulsson et al., 2003].

In einer chronischen Toxizitätsstudie über zwei Jahre an Fischer 344-Ratten konnte durch Friedman et al. gezeigt werden, dass es ab einer Dosis von 3 mg Acrylamid pro kg Körpergewicht zu einer Zunahme der Inzidenz an Tumoren des Brustgewebes, Zentralnervensystems, Schilddrüsengewebes, klitoralen Gewebes und des Uterus in weiblichen Tieren kam. Ab einer Dosis von 2 mg/kg Körpergewicht waren Tumore in Schilddrüse und Hoden von männlichen Ratten zu beobachten [Friedman et al., 1995].

Bisher sind bereits verschiedene DNA-Addukte, die aus der Exposition gegenüber Acrylamid und Glycidamid resultieren, *in vitro* identifiziert und anschließend in Tierexperimenten validiert worden. Für die Reaktion von Glycidamid mit DNA konnten folgende Addukte nachgewiesen werden (siehe Abbildung 6).

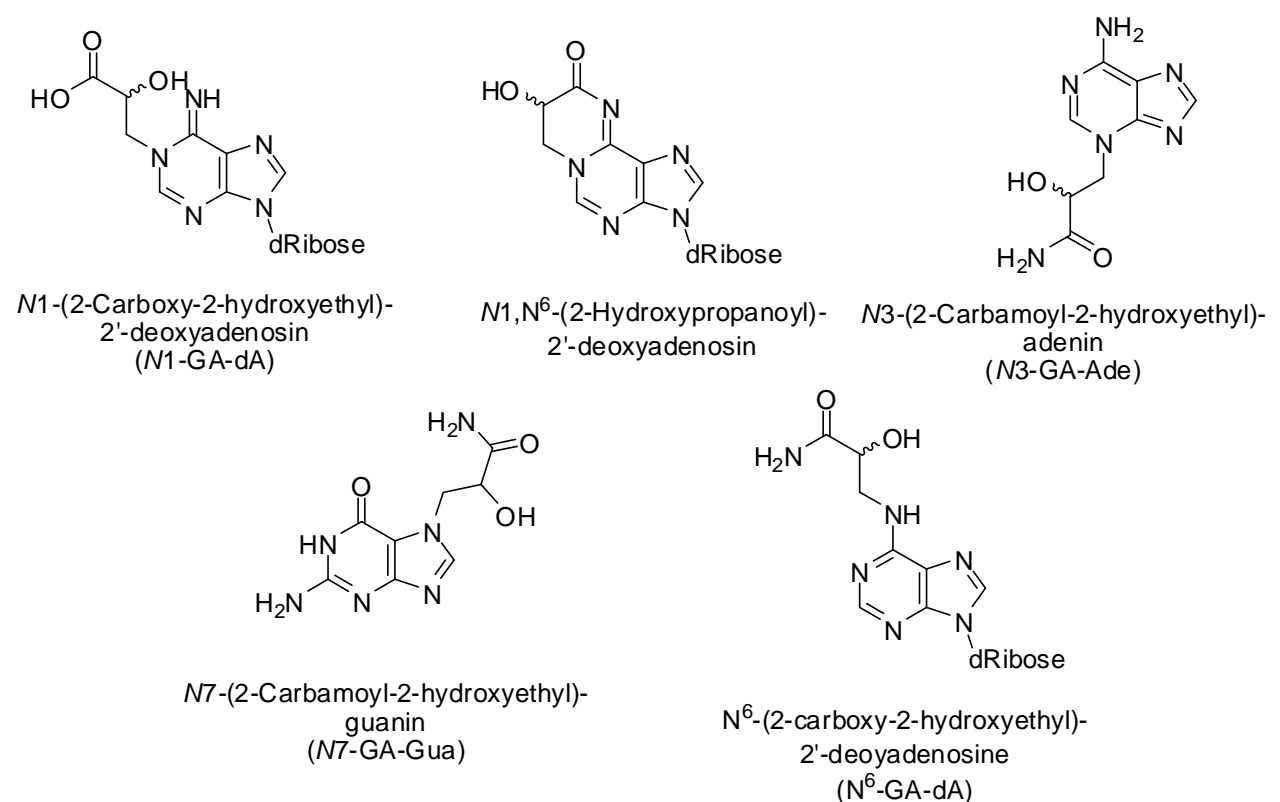


Abbildung 6 Strukturen *in vitro* identifizierter DNA-Addukte aus der Reaktion mit Glycidamid [Gamboa da Costa et al., 2003]

Gamboa da Costa und Mitarbeiter konnten außerdem durch Messungen belegen, dass das N7-GA-Gua eine besondere Rolle einnimmt, da es das prädominante DNA-Addukt aus der Exposition mit Acrylamid darstellt [Gamboa da Costa et al., 2003] (Tabelle 2).

Tabelle 2 DNA-Addukt-Level nach *in vitro* Inkubationen von DNA mit Glycidamid (ausgedrückt in Addukten pro 10^8 Nukleotiden) [nach *Gamboa da Costa et al., 2003*]

Reaktionsbedingung GA/DNA (mg/mg)	N7-GA-Gua	N1-GA-dA	N3-GA-Ade
10^0	> 130 000	25 000	2 200
10^{-1}	17 000		240
10^{-2}	1 400		19
10^{-3}	140		1.9
10^{-4}	17		
10^{-5}	2.0		

Die Daten von Gamboa da Costa und Mitarbeitern (Tabelle 2) zeigen, dass die Bildungsrate des N7-Glycidamid-Guanin-Adduktes bei Inkubation von 1 mg DNA mit 1 mg Glycidamid mit mehr als 130 000 Addukten/ 10^8 Nukleotide näherungsweise um das 5-fache höher war als die des N1-GA-dA (25 000 Addukte/ 10^8 Nukleotide) und sogar bis zu 100-fach höher als die des N3-GA-Ade (2 200 Addukte/ 10^8 Nukleotide). In *in vivo* Versuchen an Mäusen wurden Leber, Lunge und Niere der Tiere auf Glycidamid-DNA-Addukte untersucht. Dabei wurden in allen Geweben Addukte in vergleichbaren Mengen gefunden, was auf die rasche Verteilung von Acrylamid im Körper zurückzuführen ist (siehe Kapitel 2.2.5.2.1) [*Gamboa da Costa et al., 2003*].

Auf der Grundlage dieser zahlreichen Untersuchungen hat die International Agency for Research on Cancer (IARC) Acrylamid als möglicherweise kanzerogen am Menschen eingestuft.

2.3 Acrolein

2.2.4 Allgemeines

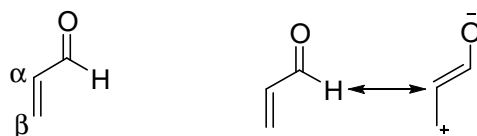


Abbildung 7 Strukturformel von Acrolein (links) und dessen Keto-Enol-Tautomerie (rechts)

Acrolein ist die einfachste α,β -ungesättigte Carbonylverbindung mit einem relativen Molekulargewicht von 56,06 g/mol. Es ist leicht löslich in Wasser, Ethanol und Diethylether. Acrolein ist eine farblose bis gelbliche, brennbare, niedrig viskose Flüssigkeit mit einem Siedepunkt von 52 °C, die durch einen stechenden Geruch gekennzeichnet ist. Es neigt leicht zu Polymerisations- und Additionsreaktionen und zeichnet sich durch eine Keto-Enol-Tautomerie aus (Abbildung 7) [Eisenbrand & Schreier, 2006; Esterbauer et al., 1991].

2.2.5 Bildung von Acrolein

Acrolein kommt in der Umwelt ubiquitär vor. Durch unvollständige Verbrennungsprozesse enthält die Luft im Durchschnitt 14,3 $\mu\text{g Acrolein/m}^3$ und stellt damit die Hauptexpositionsquelle dar [DeWoskin et al., 2003]. Darüber hinaus konnte im Hauptstrom von Zigaretten ein Gehalt von 56-118 $\mu\text{g Acrolein pro Zigarette}$ ermittelt werden [Talhout et al., 2006].

Acrolein wird industriell zur Produktion von Acrylsäure und zur Herstellung von Kunststoffen genutzt [Parent et al., 1992]. Außerdem kann es während Erhitzungsprozesse aus Kohlenhydraten, Pflanzenölen, tierischen Fetten und Aminosäuren entstehen und natürlicherweise in verschiedenen Lebensmitteln vorkommen [Schettgen et al., 2008; Stevens & Maier, 2008].

2.2.5.1 Exogene Bildungsmechanismen von Acrolein

Umano und Shibamoto bestimmten die Freisetzung von Acrolein aus kochendem Öl und Fleischfett und konnten eine zeit und temperaturabhängige Bildung von Acrolein beobachten [Umano & Shibamoto, 1987]. Weiterführende Studien konnten belegen, dass das Frittieren mit Ölen ab einer Temperatur von 180 °C zu Acroleingehalten von 5-250 mg/kg führen konnte, die in die Atmosphäre freigesetzt werden können und so als eine weitere Acroleinexpositionsquelle dienen. Acrolein kann durch Dehydratisierung von Glycerin und Lipidperoxidation entstehen, wobei durch β -Spaltung von Fettsäurehydroperoxiden Acrolein freigesetzt werden kann, was in Abbildung 8 am Beispiel von Arachidonsäure exemplarisch gezeigt ist [Esterbauer et al., 1991].

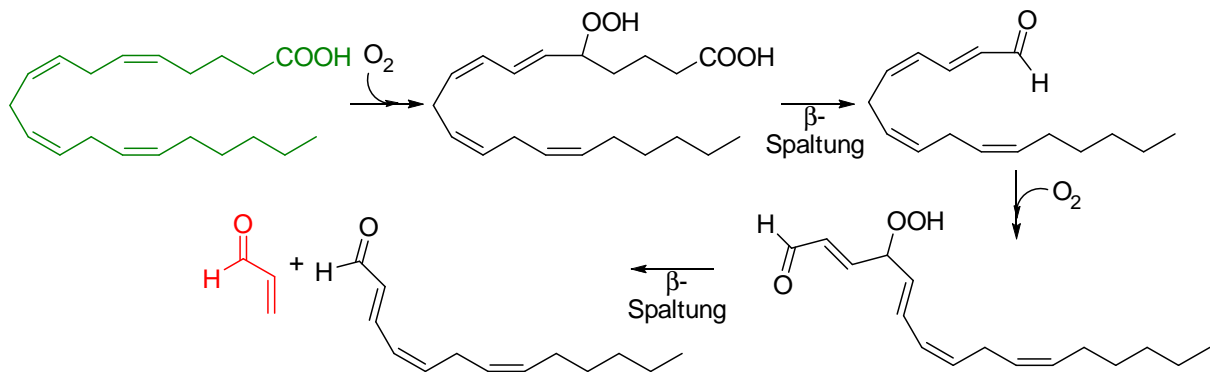


Abbildung 8 Postulierter Bildungsmechanismus von Acrolein aus ungesättigten Fettsäuren am Beispiel von Arachidonsäure; grün: Arachidonsäure; rot: Acrolein [modifiziert nach Esterbauer *et al.*, 1991]

Auch in kohlenhydratreichen Lebensmitteln kann durch Erhitzen im Laufe der Maillard-Reaktion Acrolein gebildet werden. Hierbei kann Glucose durch Kohlenstoff-Kohlenstoff-Spaltung oder Reaktion mit Aminosäuren zu reaktiven Kohlenhydratintermediaten umgesetzt werden. Es kann zum Beispiel durch Dehydratisierung und anschließender 3,4-Retroaldolspaltung zur Bildung von 1-Propen-2,3-diol kommen, welches sich zum Hydroxyaceton umlagern kann. Durch 2,3-Enolisierung und erneute Dehydratisierung kann daraus wie in Abbildung 9 dargestellt Acrolein entstehen [Yaylayan *et al.*, 1999; Yaylayan & Keyhani, 2000].

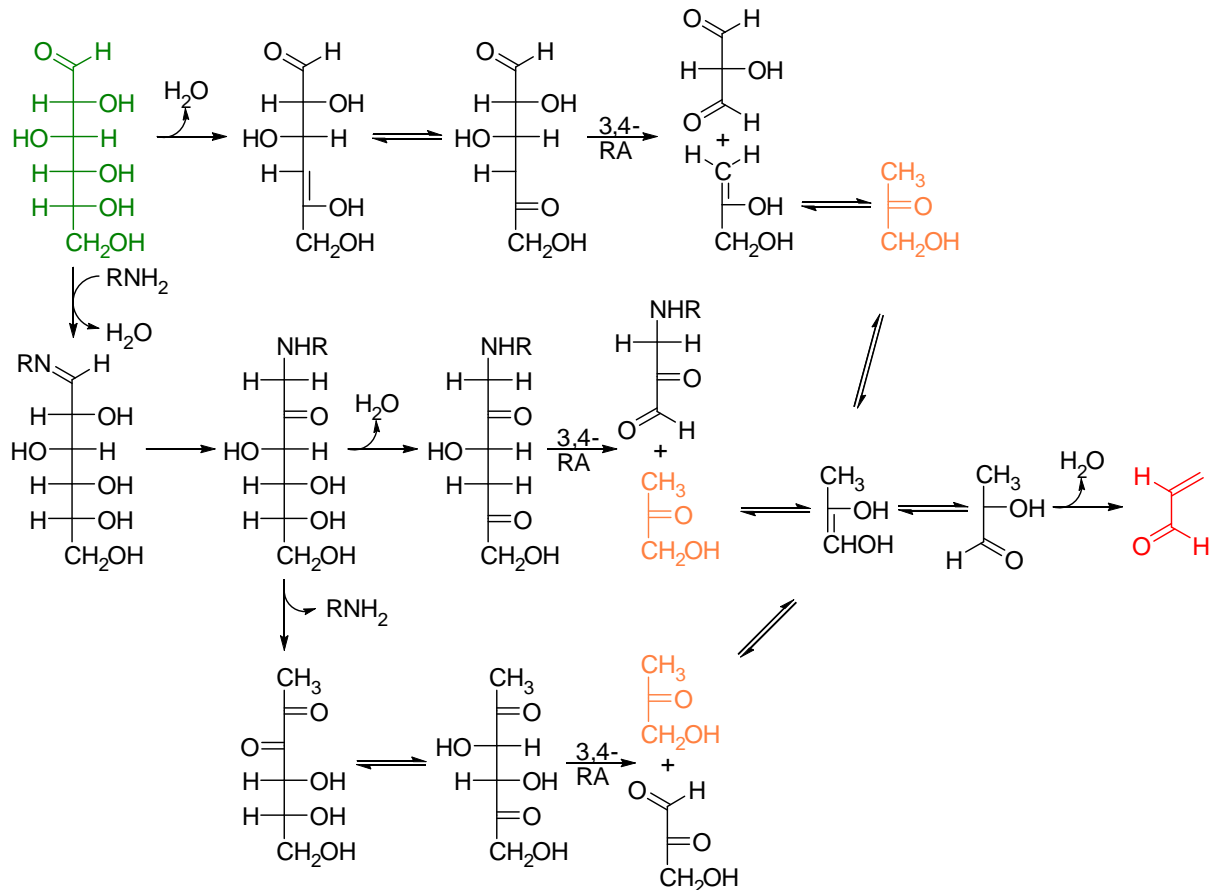


Abbildung 9 Exogene Bildungsmechanismen von Acrolein aus Glucose; grün: Glucose; orange: Hydroxyaceton; rot: Acrolein; 3,4-RA: 3,4-Retroaldolspaltung [modifiziert nach *Yaylayan & Keyhani, 2000*]

Während des Erhitzens von Lebensmitteln kann es zur thermischen Zersetzung von Aminosäuren wie Methionin und Threonin und zur Bildung von Acrolein kommen.

Der Strecker-Abbau führt zur Bildung von Methional aus Methionin, welches durch Retro-Michael-Addition in Methanthiol und Acrolein überführt werden kann. Die Oxidation von Methional liefert Methionalsulfoxid, dessen Spaltung in Acrolein und Methylsulfensäure resultiert (Abbildung 10) [Ballance et al., 1961; Mottram et al., 2002].

Im Falle des Threonin führt der Strecker-Abbau zum 2-Hydroxypropanal, welches durch Dehydratisierung zum Acrolein abgebaut wird (siehe Abbildung 11) [Li & Ho, 2005].

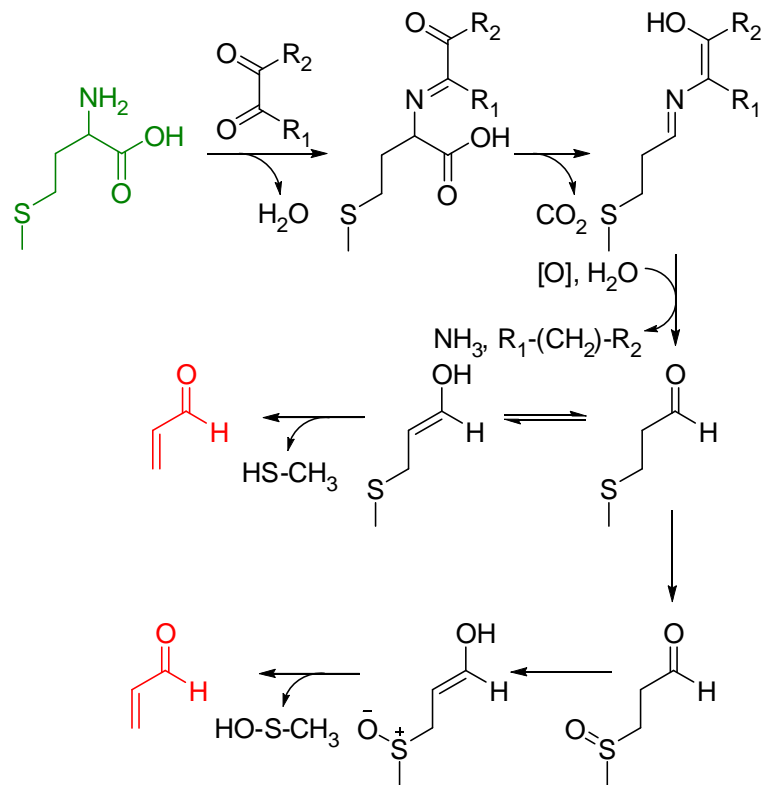


Abbildung 10 Exogene Bildungsmechanismen von Acrolein aus Methionin; grün: Methionin; rot: Acrolein [modifiziert nach Stevens & Maier, 2008]

2.2.5.2 Endogene Bildungsmechanismen von Acrolein

Eine endogene Hauptquelle für Acrolein sind Aminosäuren, wie Threonin, welche durch Myeloperoxidase (MPO)-vermittelte Oxidation in 2-Hydroxypropanal umgewandelt wird. So gebildetes 2-Hydroxypropanal kann durch Dehydratisierung zum Acrolein abgebaut werden (siehe Abbildung 9) [Anderson et al., 1997].

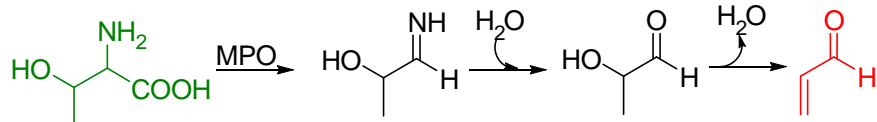


Abbildung 11 Endogener Bildungsmechanismus von Acrolein aus Threonin; Myeloperoxidase (MPO) grün: Threonin; rot: Acrolein [modifiziert nach Eisenbrand & Schreier, 2006]

Eine weitere Quelle für endogen gebildetes Acrolein stellen Polyamine wie zum Beispiel Spermin dar. Hierbei katalysieren Kupfer-abhängige Aminooxidasen (AO) und FAD-abhängige Polyaminooxidasen die Umsetzung. Es entstehen Spermidin, Acrolein und 3-Aminopropanal über einen Imin-Übergangszustand gefolgt von Hydrolyse und Addition bzw. Eliminationsreaktionen (Abbildung 12) [Stevens & Maier, 2008].

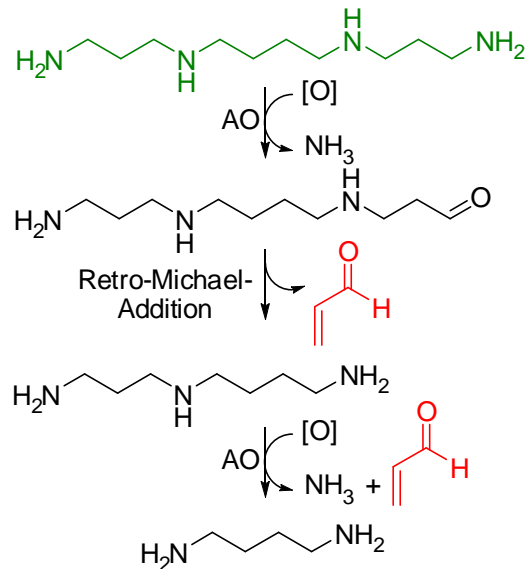


Abbildung 12 Endogener Bildungsmechanismus von Acrolein aus Polyaminen; grün: Spermin; rot: Acrolein; Aminooxidase (AO) [modifiziert nach Stevens & Maier, 2008]

2.2.6 Acroleingehalte in Lebensmitteln

Gehalte von Acrolein in Lebensmitteln sind nur sehr begrenzt verfügbar (Tabelle 3), da valide Methoden zur Erfassung von Acrolein speziell in stärke-reichen Nahrungsmitteln derzeit nicht zur Verfügung stehen. Die Daten in Tabelle 3 geben einen Überblick über Acroleingehalte einiger ausgewählter Lebensmittelgruppen und sind weder repräsentativ noch auf die allgemeine Ernährungssituation übertragbar. Die Gehalte variieren stark abhängig von der Zubereitung oder Verarbeitung und der Zusammensetzung der untersuchten Lebensmittel. Die höchsten Gehalte konnten in alkoholischen Getränken wie Wein oder Spirituosen ermittelt werden.

Tabelle 3 Übersicht über Acroleingehalte ausgewählter Lebensmittel

Lebensmittel	Acroleingehalt [mg/kg]	Quelle
Feta	0,3-1,3	[Collin et al., 1993]
Donuts	0,1-0,9	[Lane & Smathers, 1991]
Wein	> 3,8	[Sponholz, 1982]
Früchte	< 0,01-0,03	[Feron et al., 1991]
Gemüse	> 0,59	[Feron et al., 1991]
Weinbrand/Cognac	1,4-1,5	[Panosyan et al., 2001]

In verschiedenen Obstsorten, unter anderem Himbeeren, Trauben, Erdbeeren oder Brombeeren wurden Gehalte zwischen 0,01-0,05 mg/kg bestimmt. Ebenso konnten in manchen Gemüsesorten, wie zum Beispiel Kohl, Möhren oder Tomaten Werte von bis zu 0,59 mg/kg gefunden werden. In Fisch und Käse hingegen wurden Konzentrationen von 0,1-0,9 mg/kg bzw. 0,29-1,3 mg/kg nachgewiesen. Aber auch in alkoholischen Getränken wie Rotwein (bis zu 3,8 mg/kg) oder Bier (1,1-2 µg/l) ist Acrolein enthalten [Feron et al., 1991]. Über Acroleingehalte in hitzebehandelten Lebensmitteln gibt es bisher nur wenige Daten, da die Analytik vor allem in kohlenhydratreichen Lebensmitteln aufgrund der hohen Reaktivität von Acrolein anspruchsvoll ist. Sofern Daten über Gehalte in diesen Lebensmitteln vorhanden sind, bewegen sich diese im Bereich von wenigen µg/kg [Osorio & de Lourdes Cardeal, 2011].

2.2.7 Toxikologie von Acrolein

2.2.7.1 Toxikokinetik von Acrolein

2.2.7.1.1 Aufnahme und Verteilung von Acrolein in den Organismus

Acrolein kann inhalativ, dermal oder oral aufgenommen werden. Acrolein wird im Nager im gesamten Organismus aufgrund der hohen Wasserlöslichkeit ($\log K_{OW} = -1,1$ bis $-1,0$) schnell auf alle Gewebe verteilt, zeigt aber keine Tendenz zur Akkumulation, da es Membranen durch passive Diffusion leicht durchdringen kann [Abraham et al., 2011].

2.2.7.1.2 Metabolismus von Acrolein im Organismus

In den Organismus aufgenommenes Acrolein kann auf mehrere Wege metabolisiert werden. Einerseits kann es zur Addition von GSH an die Doppelbindung (Michael-Addition) kommen, andererseits zur Oxidation der Aldehydfunktion zur Acrylsäure und anschließenden weiteren oxidativen Schritten bis zur Bildung von Malonsäure. Als weiterer Metabolisierungsschritt wäre die Oxidation der Doppelbindung unter Bildung eines Epoxids (Glycidaldehyd) und die Bindung an die DNA denkbar [Stevens & Maier, 2008].

Nach einmaliger oder wiederholter oraler Gabe von 2,5 mg Acrolein/kg KG oder einer einmaligen Dosis von 15 mg/kg KG an Ratten konnten im Urin *N*-Acetyl-S-(3-hydroxypropyl)-cystein (3-HPMA), *N*-Acetyl-S-(2-carboxyethyl)-cystein (CEMA), Malonsäure, *N*-Acetyl-S-(2-carboxy-2-hydroxyethyl)-cystein und 4-Hydroxypropionsäure nachgewiesen werden [Parent et al., 1996].

Die Bildung und Ausscheidung von 3-HPMA und CEMA erfolgt nach Kopplung von Acrolein an GSH und Abbau zu *N*-Acetyl-S-(3-oxopropyl)-cystein (OPMA). Die OPMA-Bildung wiederum verläuft analog zu jener von AAMA und GAMA, wie in Kapitel 2.2.5.2.2 und Abbildung 4 beschrieben. Durch Oxidation oder Reduktion der Aldehydfunktion von OPMA entstehen die im Urin erfassten MA (3-HPMA und CEMA). Flavinabhängige Monooxygenasen können zusätzlich aus OPMA das *N*-Acetyl-S-(3-oxopropylcystein)-S-oxid bilden, welches durch Retro-Michael-Addition beziehungsweise β -Elimination Acrolein freisetzen kann [Hashmi et al., 1992].

Die enzymatische Bildung von Glycidaldehyd aus Acrolein ist gefolgt von der überwiegenden Kopplung an GSH, Abbau zur entsprechenden MA (*N*-Acetyl-S-(2-carboxy-2-hydroxyethyl)-cystein) und Ausscheidung über den Urin [Parent et al., 1998]. Andererseits kann Glycidaldehyd auch über eine Hydrolase zu Glyceraldehyd hydrolysiert werden [Patel et al., 1980].

Eine Michael-Addition von Wasser an Acrolein liefert 3-Hydroxypropanal, welches nach Oxidation in 3-Hydroxypropionsäure und anschließend in Malonsäure überführt werden kann. Die Bildung von Malonsäure wird auf die Darmflora zurückgeführt, da dieser Metabolit nach intravenöser Verabreichung nicht detektiert werden konnte [Parent et al., 1998].

Acrolein kann sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Addukte mit der DNA bilden [Nath & Chung, 1994; Pawlowicz et al., 2006]. In Zellkulturexperimenten konnten Acrolein-DNA-Addukte nach Inkubation von humanen Lungenzellen und Ovarien eines chinesischen Hamsters (V79) mit Acrolein gefunden werden [Feng et al., 2006; Foiles et al., 1990]. Außerdem wurden diese Addukte sowohl bei Untersuchungen von humanem Gewebe als auch in Gewebe von unbehandelten Nagern erfasst. Hintergrundgehalte an Acrolein-DNA-Addukten wurden in Lebergewebe von Ratten und Mäusen nachgewiesen [Nath & Chung, 1994].

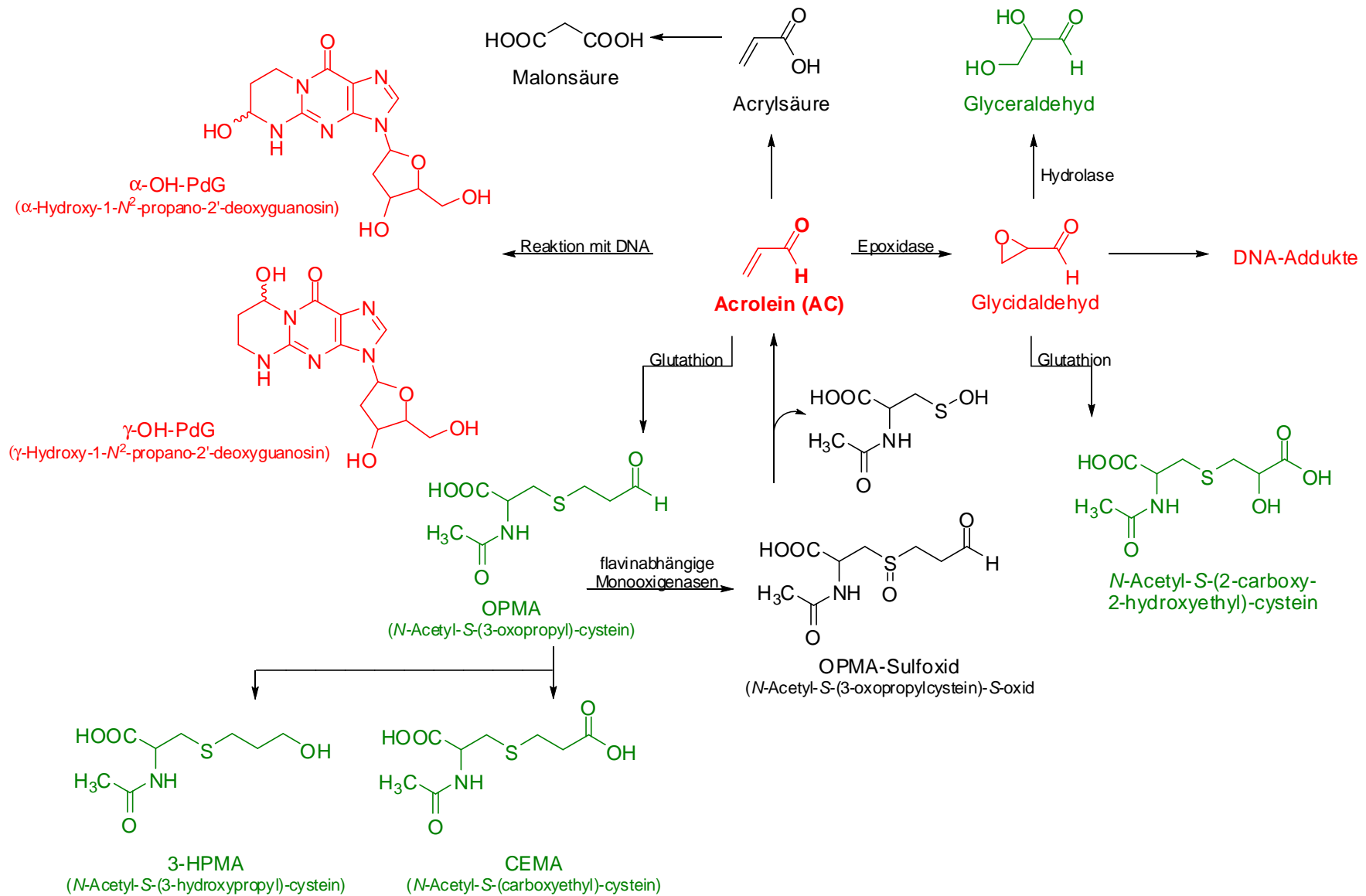


Abbildung 13 Literaturbekannter Metabolismus des Acroleins [modifiziert nach Stevens & Maier, 2008]

2.2.7.1.3 Ausscheidung von Acrolein aus dem Organismus

Nach einmaliger oraler Gabe von 2,5 mg radioaktiv markiertem 2,3-¹⁴C₂-Acrolein/kg KG an Ratten, konnten in einem Zeitraum von bis zu sieben Tage nach Applikation 52-63% der Radioaktivität im Urin, 12-15% im Fäces und etwa 30% als abgeatmetes CO₂ in der Luft wiedergefunden werden. Annähernd 90% der Dosis wurden innerhalb von 24 h ausgeschieden. Auch nach täglicher Gabe (14 Tage) von unmarkiertem Acrolein, gefolgt von einer einmaligen Dosis radioaktiv markiertem Acrolein war das Ausscheidungsprofil ähnlich [Parent et al., 1996].

Nach oraler Applikation konnte 3-HPMA mit 79% der gegebenen Dosis als Hauptmetabolit im 24 h-Urin identifiziert werden [Sanduja et al., 1989]. In einer weiteren Studie an Ratten konnten nach intraperitonealer Applikation von 0,5-2,0 mg Acrolein/kg KG an Ratten hingegen nur 29 ± 7% der Dosis nach 24 h als Summe aus 3-HPMA und CEMA im Urin wiedergefunden werden, wobei CEMA nur annähernd 10% der absoluten ausgeschiedenen Menge an MA entsprach [Linhart et al., 1996]. In derselben Studie konnten 3-HPMA und CEMA im Urin von Ratten gefunden werden, die mit Acrolein nach Inhalation exponiert wurden. Jedoch war die ausgeschiedene Menge im Vergleich zur intraperitonealen Behandlung geringer [Linhart et al., 1996].

2.2.7.2 Toxikodynamik von Acrolein

2.2.7.2.1 Akute, subchronische und chronische Toxizität von Acrolein

Die letale Dosis (LD₅₀) von Acrolein nach einmaliger oraler Gabe liegt bei Ratten, Mäusen und Hamstern im Bereich von 7-46 mg/kg KG [Gomes et al., 2002]. Beagle-Hunde, die über ein Jahr mit einer täglichen Dosis von 0,1-2 mg Acrolein/kg KG in Gelatine kapseln behandelt wurden, zeigten vermehrtes Erbrechen nach der Behandlung, was zu einer Veränderungen von biochemischen Parametern, wie Reduktion von Calcium, Albumin und der absoluten Proteinmengen im Serum führte [Parent et al., 1992].

In Studien zur chronischen Toxizität wurden Ratten täglich oral mit Dosen von 0,05, 0,5 und 2,0 mg Acrolein/kg KG über einen Zeitraum von zwei Jahren täglich behandelt. Bei allen behandelten Tieren wurden niedrigere Level an Kreatininphosphokinase im Serum beobachtet, jedoch konnten keine Hinweise auf mikroskopisch detektierbare Läsionen nachgewiesen werden. Außerdem kam es zu einer erhöhten Mortalität in den beiden höheren Dosisgruppen [Parent et al., 1992].

2.2.7.2.2 Reproduktionstoxizität von Acrolein

Reproduktions- und entwicklungstoxische Wirkungen von Acrolein wurden in Ratten und Kaninchen untersucht. Trächtigen Kaninchen wurde täglich zwischen Tag 7 und 19 der Gestationsphase 0,1-2,0 mg Acrolein/kg KG oral verabreicht. Bis zur höchsten Dosisgruppe (2,0 mg/kg KG) wurden keine teratogenen Wirkungen beobachtet. Bei höheren Dosierungen von 4-6 mg/kg KG traten erhöhte Sterblichkeit der Elterntiere, spontane Fehlgeburten und Magengeschwüre auf. Acrolein hatte weder Einfluss auf die Entwicklung der Föten, noch zeigte es an ihnen teratogene Effekte [Parent et al., 1993].

In einer Mehrgenerationsstudie wurden Ratten (Elterntiere, F0-Generation) mit 1,0-6,0 mg Acrolein/kg KG über 70 Tage nach Geburt und die weiblichen Tiere weiter bis zur Stillzeit der Nachkommen behandelt. Zusätzlich wurde deren F1-Generation analog behandelt, um auch deren Nachkommen (F2-Generation) zu untersuchen. Die Untersuchungen an der F2-Generation zeigten eine weitgehend unbeeinflusste Fruchtbarkeit, Überlebensrate und morphologische Entwicklung der Nachkommen. In der höchsten Dosisgruppe wurde eine erhöhte Sterbensrate in der F0- und F1-Generation beobachtet. Daher wurde Acrolein als nicht reproduktionstoxisch eingestuft, obwohl es in diesem Versuch toxische Effekte ab einer Dosis von 3,0 mg/kg KG und Tag verursachte [Parent et al., 1992].

2.2.7.2.3 Genotoxizität und Kanzerogenität von Acrolein

Untersuchungen zur Mutagenität von Acrolein in bakteriellen Testsystemen mit *Salmonella typhimurium*-Stämmen zeigten sowohl positive als auch negative Ergebnisse [Kim et al., 2007; Liu et al., 2010].

In vitro konnte Acrolein DNA-Schäden in Somazellen erzeugen. DNA-Strangbrüche wurde nach Acroleininkubation in Fibroblasten der Haut und Bronchialepithelzellen detektiert [Li et al., 2008]. In V79-Zellen (1-2 mM) [Smith et al., 1990] und auch in anderen Zelltypen (CHO-Zellen) konnten nach Acroleinbehandlung genotoxische Wirkungen wie z.B. Schwesterchromatidaustauschereignisse (SCEs) beobachtet werden [Kim et al., 2007; Li et al., 2008; Liu et al., 2010]. Allerdings konnten ebenfalls in CHO-Zellen sowohl mit, als auch ohne metabolische Aktivierung keine mutagenen Effekte im HPRT-Test erfasst werden [Parent et al., 1991].

Es gibt nur wenige und ausschließlich negative Ergebnisse aus *in vivo* Studien zur Genotoxizität nach Acroleinexposition [Gomes et al., 2002]. Nach oraler Gabe von bis zu 10 mg Acrolein/kg KG über 14 Wochen wurden keine Effekte auf die Bildung von

Mikrokernen in Erythrozyten in peripheren Blut von männlichen und weiblichen Mäusen beobachtet [Irwin, 2006].

Aufgrund einer relativ hohen Zytotoxizität von Acrolein ist es nicht einfach, kanzerogene Wirkungen im Rahmen von Langzeitstudien zu erfassen [Liu et al., 2010]. Studien in Mäusen konnten keinen Einfluss von Acrolein auf die Bildung von Tumoren zeigen. Die Tiere wurden mit einer täglichen oralen Dosis von 0,5-4,5 mg/kg KG über 18 Wochen behandelt, wobei in den Behandlungsgruppen eine verminderte Zunahme des Körpergewichts und eine erhöhte Sterblichkeit in der höchsten Dosisgruppe beobachtet wurde [Parent et al., 1991]. Cohen et al. berichteten von einer tumorinitiierenden Wirkung im Blasengewebe von intraperitoneal behandelten männlichen Ratten, die über sechs Wochen zweimal pro Woche Acrolein in einer Dosis von 2,0 mg/kg KG erhalten haben [Cohen et al., 1992].

Wie bereits in Kapitel 2.2.7.1.2 erwähnt, konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt werden, dass Acrolein die Fähigkeit besitzt mit der DNA Addukte zu bilden [Nath & Chung, 1994; Pawlowicz et al., 2006]. Acrolein bildet mit Guanosin zwei Isomere, α - und γ -Hydroxypropanodeoxyguanidin (α - und γ -OH-PdG). Gehalte dieser beiden Isomere konnten in humaner DNA von Placenta und Leukozyten nachgewiesen werden, wobei die Mengen an γ -Isomer signifikant höher waren als die des α -Isomers [Chen & Lin, 2009].

Untersuchungen des Lungengewebes von Rauchern und Nichtrauchern konnten belegen, dass es keinen Unterschied in den OH-PdG-Adduktgehalten gab [Zhang et al., 2011]. Die Anzahl von näherungsweise 1 Addukt/ 10^7 Nukleotide, die in dieser Studie gefunden wurden, waren höher als diejenige einiger anderer kanzerogener Substanzen wie zum Beispiel polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK), für die Adduktmenge von etwa 0,3 Addukten/ 10^7 Nukleotide gefunden wurden [Zhang et al., 2007]. Aufgrund der fehlenden kanzerogenen Potentials von Acrolein *in vivo* Studien wird angenommen, dass die OH-PdG-Addukte nur ein geringes mutagenes Potential besitzen, da diese relativ schnell und effizient repariert werden können [Sanchez et al., 2003; Yang et al., 2002b]. Hierbei scheint die Ringstruktur des γ -OH-PdG eine Rolle zu spielen, da in doppelsträngiger DNA die exozyklische Struktur des Addukts geöffnet vorliegen kann. Dieses ringoffene Addukt kann leicht und effizient repariert werden, womit das niedrige mutagene Potential erklärt werden könnte [de los Santos et al., 2001]. Demgegenüber wurde für die geschlossene Form des γ -OH-PdG ein relativ starkes mutagenes Potential nachgewiesen werden [Liu et al., 2010]. Das offenkettige γ -OH-PdG-Addukt könnte außerdem zur Quervernetzung von Peptiden oder Proteinen und DNA-Molekülen führen [Minko et al., 2008; Sanchez et al., 2003; VanderVeen et al., 2008]. Im Gegensatz zum relativ schwachen mutagenen Potential des γ -OH-PdG-Addukts konnte gezeigt werden, dass das α -OH-PdG-Addukt ein potentes Mutagen ist, da es in der Zelle nur schwer repariert wird [Sanchez et al., 2003; Yang et al., 2002a].

2.3 Grundlagen und Biochemie der Desoxyribonukleinsäure (DNA)

2.3.1 Aufbau der DNA

Bei nahezu allen Lebewesen besteht die molekulare Erbinformation aus Desoxyribonukleinsäure (DNA). Bei der DNA handelt es sich um zwei lange lineare Polynukleotidketten, den DNA-Strängen, die aus zwei Purinen (Guanin oder Adenin) und zwei Pyrimidinen (Thymin und Cytosin) zusammengesetzt sind. Ein einzelnes Nukleotidpaar besteht jeweils aus einem Purin und einem Pyrimidin, wobei jeweils Adenin mit Thymin (AT) oder Guanin mit Cytosin (GC) paaren. Die AT-Watson-Crick-Basenpaare (AT-BP) koppeln jeweils über zwei und die GC-Watson-Crick-Basenpaare (GC-BP) über drei Wasserstoffbrückenbindungen. BP sind über Zucker-Phosphatbindungen miteinander verbunden. Die Entfernung zwischen den BP in einem Molekül entspricht 10 Nukleotidpaaren pro Drehung der DNA-Doppelhelix, was einem Abstand von 3,4 Å entspricht. Innerhalb eines DNA-Moleküls muss die Anzahl der Adenin- und der Thyminmoleküle oder Guanin- und Cytosinmoleküle identisch sein, wobei das Verhältnis der AT- und GC-BP innerhalb der DNA von Spezies zu Spezies variieren kann. Die beiden Stränge der Doppelhelix sind komplementär und antiparallel in Bezug auf die beiden Zucker-Phosphat-Bindungen angeordnet: bezogen auf die endständige OH-Gruppe der Ribose ist ein Strang in 3'-5'- und ein Strang in 5'-3'-Stellung angeordnet [Marquardt & Schäfer, 2008].

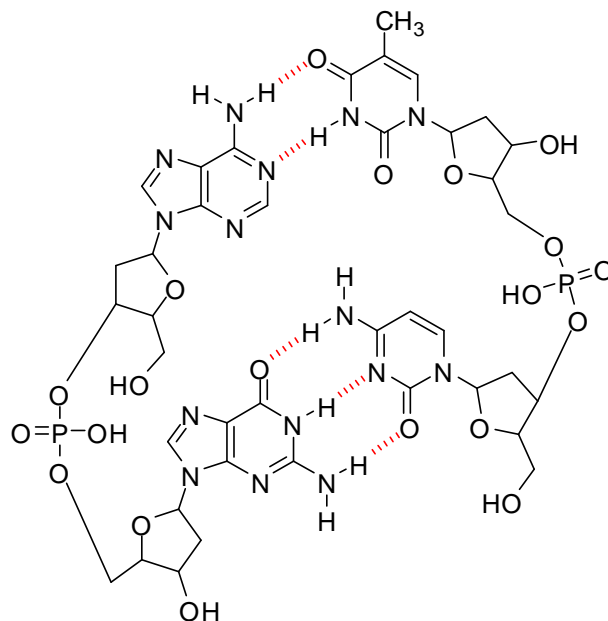


Abbildung 14 Watson-Crick-Basenpaarung [modifiziert nach Kunz et al., 2009]

Im Unterschied zu prokaryontischen Zellen (Bakterien) zeichnen sich eukaryontische Zellen (Pflanzen und Tiere) vor allem durch ihre höhere Anzahl an funktionalen Chromosomengebilden aus, die auch an ihren DNA-Molekülen ausgeprägter differenziert sind. Außerdem unterscheiden sich die Gene bezüglich ihrer Lage und Anzahl auf den jeweiligen Chromosomen und den Mechanismen der Genregulierung [Marquardt & Schäfer, 2008].

2.3.2 DNA-Schäden und mögliche Folgen

Die Stabilität und Integrität der DNA ist zahlreichen schädigenden Agenzien endogenen oder exogenen Ursprungs ausgesetzt. Zu den endogenen Agenzien zählen unter anderem in Folge des Stoffwechsels gebildete reaktive Sauerstoffspezies (ROS) oder auch Fehler, die bei der Replikation auftreten können. Zu exogenen gebildeten, schädigenden Agenzien gehören zum Beispiel Röntgenstrahlung, Viren und elektrophile Alkylantien. Die Summe der täglichen Schädigungen wird auf etwa 10^4 - 10^6 Ereignisse pro Zelle und Tag geschätzt. Ein Mensch besteht aus circa 10^{12} Zellen. Somit müssen circa 10^{16} - 10^{18} Reparaturereignisse stattfinden, damit der Organismus vor einer Erkrankung wie einer Krebserkrankung geschützt werden kann. Das Entstehen von Schäden an der DNA kann Auswirkungen auf die Mitose oder Meiose (Zellzyklusarrest, Apoptose) haben, zur DNA-Reparatur führen oder Mutationen oder Krebs verursachen (Abbildung 15) [Scharer, 2003] .

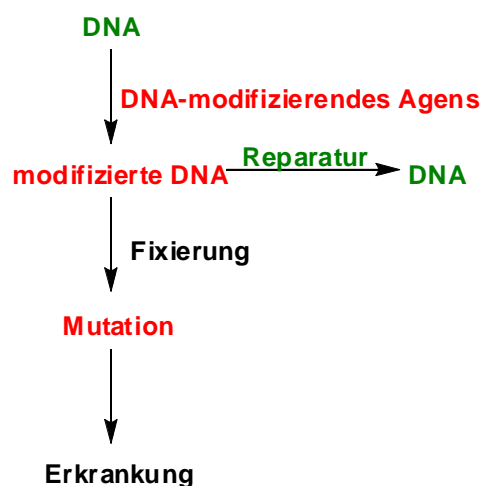


Abbildung 15 Postulierter Mechanismus genetischer Schäden durch DNA-modifizierende Agentien [modifiziert nach Marquardt & Schäfer, 2008]

DNA-Schäden in Soma­zellen können sich in verschiedenartigen Erscheinungsformen der Toxizität manifestieren. Einerseits kann es sowohl zu inhärenter als auch kanzerogen induzierter Form der Onkogenese kommen. Andererseits zur Teratogenese aufgrund von somatischen Mutationen in differenzierenden Zellgruppen. Aufgrund der Inaktivierung der Spermatogenese und/oder chromosomalen Translokationen kann es ebenfalls zur (Teil-) Sterilität kommen. Keimzellmutationen sind mit einer Vielzahl von Erkrankungen oder Fehlbildungen assoziiert und werden in der Regel bei der Reproduktion von Generation zu Generation übertragen [Scharer, 2003].

2.3.3 Reparatur von DNA-Schäden

Die genetische Information im Organismus wird durch unterschiedliche Vorgänge enzymatischer DNA-Reparatur geschützt. Es wird zwischen dem O⁶-Methylguaninmethyltransferasesystem (MGMT), den Nukleotid- (NER) und Basenexzisionsreparatursystemen (BER) unterschieden. Diese Systeme unterscheiden sich sowohl in ihrer Effizienz, als auch in ihrer Fehlerrate. Welches Reparatursystem aktiviert wird, hängt von der Position und der Art der modifizierten Base ab, ob sich die Base auf dem transkribierten Strang befindet oder in welchem Gewebe oder Zelltyp (Soma- oder Keimzelle) das Addukt gebildet wurde [Kunz *et al.*, 2009; Waters *et al.*, 2009].

Bei hoher endogener Exposition mit einem DNA-Adduktbildenden Stoff, kann es außerdem zu einer Sättigung der Reparaturenzyme kommen, sodass ab dieser Konzentration ein lineares Anwachsen der Dosis-Wirkungskurve für DNA-Addukte dieses Stoffes zu erwarten wäre [Jarabek *et al.*, 2009].

BER und NER sind die am besten untersuchten Reparatursysteme und weisen nur eine geringe Fehlerrate bei der DNA-Reparatur auf. Dennoch können sie nicht alle DNA-Addukte erkennen und fehlerfrei reparieren, sodass es zum Einbau falscher, zu vieler oder zu weniger Basen kommen kann, was wiederum zu Mutationen führen kann [Jarabek *et al.*, 2009].

BER ist ein mehrstufiger Prozess, bei dem verschiedene Enzyme zum Einsatz kommen. Zunächst wird die *N*-glykosidische Bindung der Base zum Zuckerphosphatrückgrat durch Glycosylasen gespalten, wobei freie Basen gebildet werden, wodurch in der DNA selbst eine AP-Stelle (apurinische und apyrimidinische Stellen) entsteht. Nun wird durch eine Endonuklease ein Strangbruch mit einem 5'-terminalen Deoxyribosephosphatrest hervorgerufen, der durch das Enzym Deoxyribosephosphodiesterase ausgeschnitten wird. Die dadurch entstehende Einzelnukleotidlücke wird mit Hilfe der DNA-Polymerase und der DNA-Ligase mit der komplementären Base ausgefüllt (Abbildung 16) [Friedberg *et al.*, 2005].

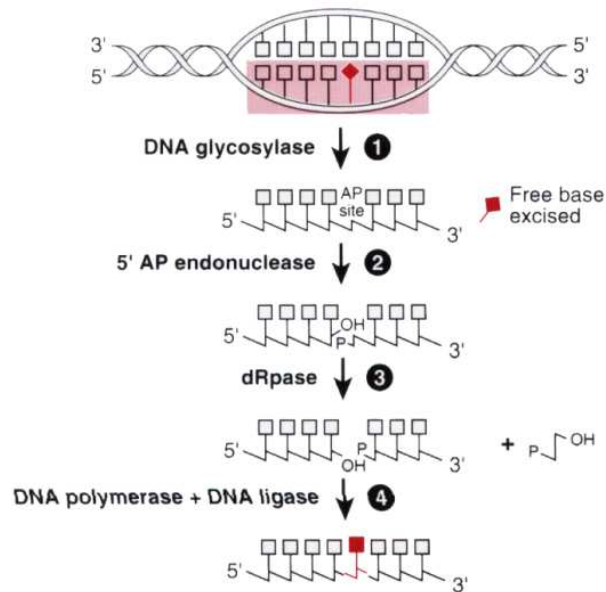


Abbildung 16 Funktionsprinzip des Base Excision Repair (BER)-Systems [Friedberg et al., 2005]

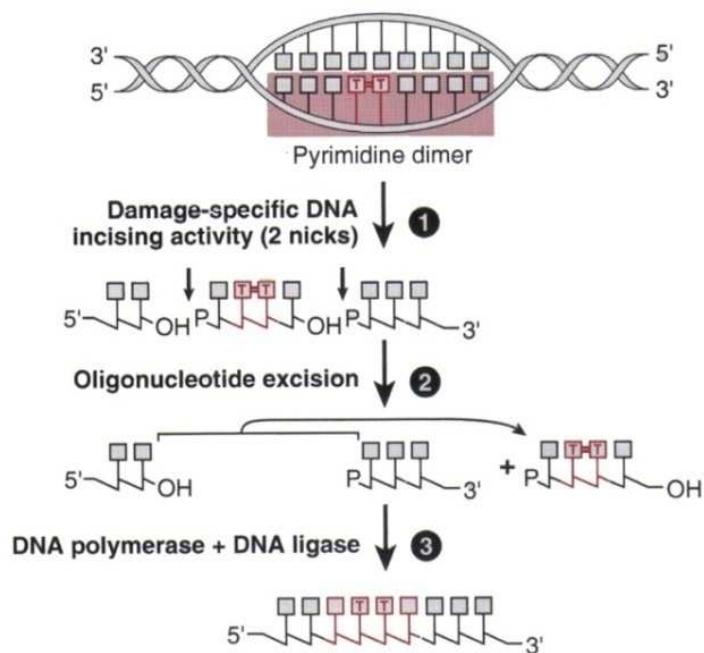


Abbildung 17 Funktionsprinzip des Nucleotide Excision Repair (NER)-Systems [Friedberg et al., 2005]

Das NER-System funktioniert ähnlich zu dem BER-System, allerdings wird hier nicht nur eine Base entfernt, sondern immer ein Oligonukleotidfragment, weshalb zum Beispiel Pyrimidindimere entfernt werden können. Um die entstandene Lücke mit den komplementären Basen zu füllen wird wie beim BER-System die DNA-Polymerase und DNA-Ligase benötigt (Abbildung 17) [Friedberg et al., 2005].

Das MGMT-System ist auf die Reparatur von kleinen Addukten, die durch Alkylierungen am O⁶ des Guanins oder der O⁴-Position des Thymins hervorgerufen werden, beschränkt. Hierbei wird das O⁶-Methylguanin effizienter repariert. Die Reparatur wird durch die Transaktion der Alkylgruppe von der DNA-Base auf einen Cysteinrest des Reparaturproteins realisiert. Die Vorteile dieses Systems sind seine Schnelligkeit (weniger als eine Sekunde bei 37 °C) und seine Fehlerfreiheit, welche dadurch erklärt werden kann, dass beim Reparaturvorgang keinerlei Veränderung an der DNA-Basenstruktur vorgenommen wird und zudem nur ein Enzym an der Reparatur beteiligt ist. Im Reparaturmechanismus liegt allerdings auch der Nachteil dieses Systems, denn pro Reparaturvorgang wird ein Reparaturenzym inaktiviert. Es handelt sich um ein Suizidenzym, was bei hoher Auslastung schnell zur 'Erschöpfung' des Systems führen kann [Friedberg *et al.*, 2005; Jarabek *et al.*, 2009].

2.4 Stadien der Tumorentstehung

Genotoxizität bezeichnet die Fähigkeit eines Agens das genetische Material einer Zelle zu schädigen, wofür verschiedene Quellen, wie chemische Substanzen (z.B. Acrylamid, Aflatoxine, Nitrosamine), energiereiche Strahlung (z.B. Röntgenstrahlung oder UV-Strahlung) oder Viren ursächlich sein können [Eisenbrand & Schreier, 2006].

Als genotoxische Effekte bezeichnet man unmittelbare strukturelle Veränderungen am genetischen Material, wie zum Beispiel DNA-Addukte, oxidative Schäden, sowie den Verlust oder falschen Ersatz von Nukleinsäurebasen. Diese Schäden können durch DNA-Reparaturenzyme behoben werden. Hierin liegt der Unterschied zur Mutagenität, welche den irreversiblen Schaden beschreibt, der an die Tochterzelle vererbt wird. Somit liegt bei einer Mutation immer ein genotoxisches Ereignis vor, wohingegen ein genotoxischer Schaden nicht zwangsläufig zu einer Mutation führen muss [Eisenbrand & Schreier, 2006; Jarabek *et al.*, 2009].

Trotzdem kann ein genotoxisches Ereignis in Somazellen einen Schritt im Mehrstufenprozess der Kanzerogenese, der Transformation einer Normalzelle in eine neoplastische Zelle darstellen [Eisenbrand & Schreier, 2006].

Die Transformation einer „Normalzelle“ in eine Krebszelle und deren klonales Auswachsen zu einem Tumor versteht man heute als komplexen Mehrstufenprozess, der Zeit benötigt und bei dem noch nicht alle Schritte vollends verstanden werden.

Der Gesamtprozess wird in drei große Phasen unterteilt, welche als *Initiation*, *Promotion* und *Progression* bezeichnet werden (Abbildung 18) [Eisenbrand *et al.*, 2005].

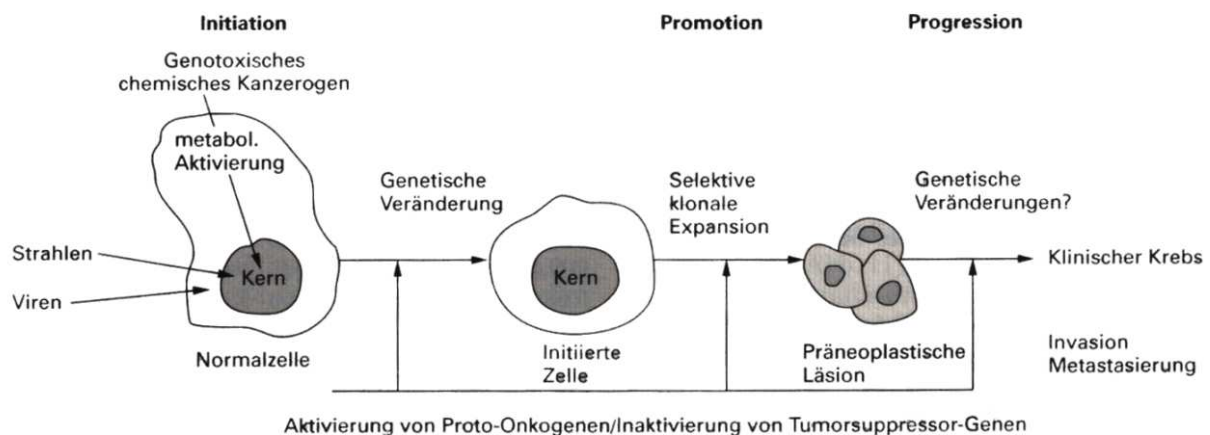


Abbildung 18 Mehrstufenmodell der chemischen Kanzerogenese [Harris, 1991]

Unter der *Initiation* versteht man eine irreversible Veränderung des genetischen Materials, welche an die Tochterzellen weitergegeben wird und meist aus mehreren Mutationen besteht. Allerdings reicht diese Phase allein noch nicht zur Krebsentstehung aus. Beispiele für Initiationsereignisse sind kovalente DNA-Adduktbildung, beispielsweise durch Acrylamid oder Aflatoxin, Bildung von AP-Stellen und Interkalation von Stoffen wie zum Beispiel Ethidiumbromid [Eisenbrand et al., 2005].

In der zweiten Phase, der *Promotion*, wird die Zellproliferation durch molekulare Mechanismen, wie Eingriffe in Signalkaskaden stimuliert. Dieser Vorgang erfolgt bevorzugt bei initiierten Zellen. Bleibende Veränderungen in der Zelle werden nicht hervorgerufen. Die Promotion ist eine weitgehend reversible Phase, die zur Mikrotumorentstehung mehrere Wochen oder Monate Wirkzeit benötigt. Ein Beispiel für einen tumorpromovierenden Stoff, welcher auf die Leber wirkt, ist Phenobarbital [Eisenbrand et al., 2005].

Die dritte, als *Progression* bezeichnete, Phase der Kanzerogenese beläuft sich beim Menschen auf einen Zeitraum von mehreren Monaten oder auch Jahren. In dieser Zeit nimmt die Wachstumsautonomie, sowie die Malignität des Mikrotumors durch zusätzliche Mutationen zu [Eisenbrand et al., 2005].

Der entstandene Tumor weist sechs Charakteristika auf, die ihn von normalem Gewebe unterscheiden. Sein Zellwachstum ist uneingeschränkt und unabhängig von externen Wachstumssignalen, wobei er nicht auf wachstumshemmende Signale reagiert. Außerdem nimmt die Apoptose ab, während die Angiogenese verstärkt wird. Der Tumor kann in gesundes Gewebe eindringen und Metastasen bilden [Jarabek et al., 2009].

Chemische Substanzen können sowohl als alleinige Promotoren als auch als Solitärkanzerogene wirken, wobei Solitärkanzerogene gleichzeitig Initiator und Promotor

darstellen. Die Existenz von alleinigen Initiatoren wird angezweifelt, da alle Initiatoren in genügend hoher Konzentration auch als Promotoren und somit als Solitärkanzerogen wirken. Ein Beispiel für ein Solitärkanzerogen ist Asbest [*Eisenbrand et al., 2005*].

Stoffe, die erst durch metabolische Aktivierung zu aktiven Elektrophilen umgewandelt werden, werden als Präkanzerogene bezeichnet. Beispiele hierfür sind Benzo[a]pyren und Aflatoxine [*Eisenbrand et al., 2005*].

2.5 Biomonitoring

Ziel des Biomonitorings ist es, die menschliche Gesundheit vor schädlichen Einflüssen zu schützen. Realisiert wird dies durch die Untersuchung biologischer Proben auf Schadstoffe oder Effektparameter, welche als Biomarker bezeichnet werden. Ursprünglich bezeichneten Biomarker biologische Makromoleküle wie DNA, RNA, Hämoglobin und andere Proteine, die mit chemischen Stoffen analytisch nachweisbare Reaktionsprodukte bilden. Inzwischen wird der Begriff weiter gefasst und schließt jede Art messbarer Parameter ein, die geeignet sind, Interaktionen zwischen biologischen Systemen und potentiellen Schadwirkungen zu erfassen. Letztere können chemischer, physikalischer oder biologischer Natur sein. Die gemessene Reaktion kann funktionell, physiologisch oder biochemisch sein und auf zellulärer Ebene stattfinden oder eine molekulare Wechselwirkung darstellen. Dazu zählt zum Beispiel die DNA-Adduktbildung aus der Reaktion von Acrylamid mit DNA-Basen. Der analytische Nachweis dieser Addukte erfolgt zumeist in biologischen Flüssigkeiten wie Blut oder in Organewebe mittels instrumentell-analytischer Methoden [*Eisenbrand et al., 2005*].

Prinzipiell werden drei Arten von Biomarkern unterschieden: Expositionsbiomarker, Effektbiomarker und Suszeptibilitätsbiomarker [*Jarabek et al., 2009*]. Unter zu Hilfenahme von Expositionsbiomarkern lassen sich z.B. berufsbedingte Expositionen gegen andere Expositionsquellen abgrenzen. Voraussetzung hierfür ist allerdings, dass sich der zu analysierende Biomarker nur von einer Substanz ableitet. Mit Expositionsbiomarkern lässt sich aber nicht festlegen, was die Quelle der Exposition ist. Des Weiteren kann man keine Aussagen über die Expositionsroute treffen. Eine besondere Bedeutung als Langzeitexpositionsbiomarker haben z.B. Acrylamidaddukte am *N*-terminalen Valin des Hämoglobins. Hämoglobinaddukte sind gut verfügbar, in der Regel stabil und die Lebensdauer der Erythrocyten von 120 Tagen wird durch die Adduktbildung nicht beeinflusst. Es ist somit möglich einen Querschnitt der Exposition über einen Zeitraum von vier Monaten anzugeben, denn Hämoglobinaddukte werden aufgrund des Fehlens von geeigneten Enzymsystemen nicht repariert [*Bergmark et al., 1993; Farmer, 2004*].

Die bei der Entgiftung eines Stoffes mit Glutathion (GSH) gebildeten Mercaptursäuren (MA) finden in der Toxikologie Anwendung als Kurzzeitmarker. Sie werden über den Harn ausgeschieden, was gleichzeitig Vorteile und Nachteile hat. Der Vorteil besteht darin, dass das Untersuchungsmaterial ausreichend und leicht zugänglich ist. Als Nachteil ist vor allem die variierende Zusammensetzung des Harns anzusehen, die unter anderem von der Flüssigkeitsaufnahme und der Temperatur abhängt. Um dennoch zuverlässige Ergebnisse zu erzielen, wird häufig der 24 h-Sammelurin untersucht [Marquardt & Schäfer, 2008].

Effektbiomarker dienen als Indikatoren einer Veränderung der funktionellen Kapazität bzw. des veränderten Zustands eines biologischen Systems aufgrund einer Krankheit oder einer Exposition mit einem toxischen Agens. Besondere Bedeutung kommt den Biomarkern genotoxischer Effekte zu, als Beispiele sind hier Chromosomenabberationen, Schwesterchromatidaustausche und Punktmutationen zu nennen. Ein Zusammenhang von erhöhtem Vorkommen an Chromosomenaberrationen und einer erhöhten Inzidenz an Krebs zu erkranken wurde bisher durch zwei Kohortenstudien nachgewiesen [Aitio & Kallio, 1999].

Biomarker der Suszeptibilität geben Hinweise auf Intraspezies-Unterschiede gegenüber Xenobiotika. Es kann zu unterschiedlich schwer ausgeprägten adversen Effekten kommen, was in genetisch bedingten Unterschieden der Enzyme des Fremdstoffmetabolismus (Polymorphismus) begründet ist. Die Messung der Aktivität der Enzymsysteme kann als Biomarker der Suszeptibilität dienen [Marquardt & Schäfer, 2008].

2.6 Risikobewertung

Die Charakterisierung und Quantifizierung des Eintretens gesundheitsschädigender Wirkungen bei einer gegebenen oder einer angenommenen Expositionshöhe wird als Risikobewertung bezeichnet und lässt sich als folgende Gleichung darstellen:

$$\text{Risiko} = \text{Exposition} \times \text{Gefährdungspotential}$$

Das Risiko, ausgehend von einem bestimmten Stoff, ist für ein biologisches System (zum Beispiel den Menschen) als das Produkt aus seinem stoffintrinsicem und nicht modifizierbarem Gefährdungspotential und der nicht stoffintrinsicem, modifizierbaren Exposition gegenüber diesem Stoff definiert. Generell lässt sich der Prozess der Risikobewertung in verschiedene Schritte einteilen (Abbildung 19).

Bei der toxikologischen Charakterisierung erfolgt die Identifikation eines chemischen, biologischen oder physikalischen Agens, mit dem ein Organismus exponiert sein könnte. Außerdem erfolgen Vorschläge zur Einstufung und Kennzeichnung dieses Stoffes. Die

Dosis-Wirkungsbeziehung am jeweiligen toxikologischen Endpunkt beschreibt die quantitativen Beziehungen zwischen dem Ausmaß der Exposition und der Häufigkeit des Auftretens eines toxischen Schadens. Mittels der Expositionsabschätzung erfolgt die Beurteilung der möglichen Aufnahme eines chemischen, biologischen oder physikalischen Agens, wobei Umweltexposition, Nahrungsexposition oder Arbeitsplatzexposition zu berücksichtigen sind.

Unter Berücksichtigung von Unsicherheiten (Datenqualität, inter- und intraindividuelle Speziesunterschiede, speziell empfindliche Spezies) der oben genannten Punkte kann letztendlich eine Risikobewertung erfolgen, die eine Einschätzung der Eintrittswahrscheinlichkeit und Schwere der bekannten oder potentiellen adversen Effekte auf die Gesundheit von Organismen vornimmt. Da die Risikobewertung meist mit einer Schlussfolgerung abschließt, die verschiedene Optionen des Vorgehens offen lässt, schließt sich daran ein regulatorisches Handeln an, das Risikomanagement genannt wird [Marquardt & Schäfer, 2008].

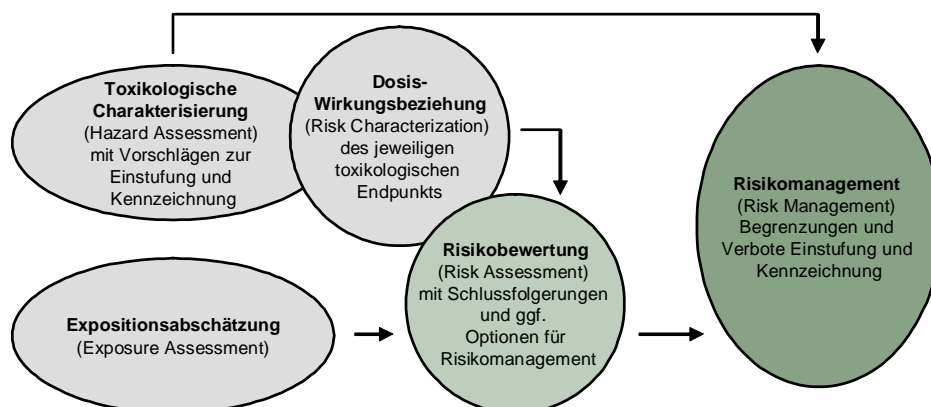


Abbildung 19 Übersicht zu Risikobewertung und Risikomanagement für gesundheitsschädliche Stoffe [modifiziert nach Marquardt & Schäfer, 2008]

Die Bewertung von Chemikalien erfordert eine ausreichende Datenlage, welche in Europa durch ein einheitliches Chemikaliengesetz (REACH, Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals) vorgeschrieben und deren Prüfumfang von der Größe der jährlichen Herstellungsmengen (1-10 t, 10-100 t, 100-1.000 t und > 1.000 t) und dem Verwendungszweck abhängig ist. Zu den Prüfungen zählen unter anderem akute, subchronische und chronische Toxizität, Mutagenität und Kanzerogenität, Reproduktionstoxizität oder Hautsensibilisierung. Anhand dieser Daten lassen sich eine Reihe von gesundheitlich relevanten Grenzen auf Grundlage des NOAEL unter Berücksichtigung von Sicherheitsfaktoren, wie der Interspezies-Unterschied (Faktor 10),

Intraspezies-Unterschied (Faktor 10), aufgrund der Extrapolation (Faktor 1-10) und Datenqualität (Faktor 1-10), ableiten. Zu den ableitbaren Größen zählen zum Beispiel der Acceptable Daily Intake (ADI) und der Tolerable Daily Intake (TDI). Ein weiterer Parameter bei der Risikobewertung speziell für nicht kanzerogene Stoffe stellt der Margin of Safety (MOS) dar, der den Abstand zwischen dem NOAEL und der gemessenen oder geschätzten Aufnahmemenge als Quotient ausdrückt. Bei Kanzerogenen, wie Acrylamid, ist ein striktes Minimierungsgebot (ALARA-Prinzip; as low as reasonably achievable) vorgeschrieben. Ferner kann, im Gegensatz zu dem MOS für nichtkanzerogene Substanzen, ein Margin of Exposure (MOE) für kanzerogene Substanzen berechnet werden, welcher vom Benchmark Dose Lower Confidence Limit 10 (BMDL10) und der gemessenen oder geschätzten Aufnahmemenge als Quotient abgeleitet wird. Liegen die Werte für den MOE über 10000 so wird im Allgemeinen von einem niedrigen öffentlichen Risiko ausgegangen [Barlow *et al.*, 2006; Eisenbrand & Schreier, 2006; Marquardt & Schäfer, 2008].

Aufgrund der relativen Häufigkeit des Auftretens von hitzinduzierten Lebensmittelkontaminanten in der menschlichen Ernährung und den sehr unterschiedlichen Gehalten in den einzelnen Lebensmittelgruppen auch aufgrund unterschiedlicher Zubereitungsmethoden (siehe z.B. Acrylamid; Tabelle 1) gestaltet sich die Expositionsabschätzung dieser Substanzen als extrem schwierig. Die konventionelle, auf Umfragebögen basierende Beurteilung der Exposition und Auswertung der Aufnahme stellt in diesem Fall nicht das Mittel der Wahl dar. Eine valide Erfassung wechselnder Gewohnheiten, wie zum Beispiel Ernährungsgewohnheiten, ist nämlich wiederum stark von Erinnerungsvermögen, Alter, Geschlecht und Jahreszeit abhängig und damit auch schwer zu erreichen. Die Versuche zum Beweise für eine Induktion von malignen Tumoren zum Beispiel durch Acrylamid am Menschen sind also in sofern ungeeignet. Es ist schwierig, eine ernährungsbedingte Aufnahme von Acrylamid mit einer Zunahme der Inzidenz einer spezifischen Tumorentstehung zu korrelieren [Martins *et al.*, 2007].

2.7 DNA-Addukte im Risikomanagement

Neben den bereits vorhandenen chemischen Stoffen wird jedes Jahr eine Reihe neuer Substanzen entwickelt, die toxikologisch bewertet werden müssen. Ein besonderes Augenmerk liegt hierbei auf der möglichen Genotoxizität und Mutagenität einer Substanz. Um festzustellen, ob eine Substanz in dieser Richtung aktiv ist, stehen zunächst die bereits erläuterten Methoden zur Verfügung. Im Verlauf der letzten Jahrzehnte versuchten Forscher einen Marker zur Erfassung der Genotoxizität zu etablieren, um mögliche adverse Effekte eines Agens frühzeitig bestimmen zu können; DNA-Addukte spielen hier die größte Rolle.

Allerdings sind sich die Forscher aufgrund der nicht eindeutigen Datenlage unsicher, ob DNA-Addukte ausschließlich als Biomarker der Exposition oder auch als Biomarker des Effekts anzusehen sind. Demnach ist auch die Rolle, die DNA-Addukte im Risiko-Management spielen noch nicht vollständig geklärt.

Für bestimmte kanzerogene Substanzen, wie (\pm)-6,7-Dihydro-7-hydroxy-1-hydroxymethyl-5H-pyrrolizin (DHP) [Fu et al., 2010] und Aflatoxin B₁ [Farmer, 2004] wurde eine Korrelation zwischen gebildeten DNA-Addukten und der Entstehung von Tumoren festgestellt. Nach der Definition von Effektbiomarkern, welche besagt, dass der Marker direkt mit der Krankheit korreliert [Jarabek et al., 2009], müsste man DNA-Addukte nach diesen Ergebnissen als Effektbiomarker einordnen. Die Gesamtdatenlage ist aber nicht eindeutig, weshalb die Mehrheit der Experten DNA-Addukte als Expositionsbiomarker definiert, welche eine Schlüsselrolle bei der Bestimmung des Mode of Action (MOA) einnehmen [Boysen et al., 2009; Farmer, 2004; Jarabek et al., 2009; Nestmann et al., 1996; Pottenger et al., 2009; Pottenger & Gollapudi, 2010].

Der MOA ist als Abfolge von Schlüsselereignissen und Prozessen definiert, die mit der Interaktion einer Substanz mit einer Zelle beginnen, durch funktionale und anatomische Veränderungen fortschreiten und in der Krebsentstehung enden. Ein Schlüsselereignis ist dabei eine empirisch beobachtbare Vorläuferstufe, welche selbst ein benötigtes Element des MOA ist, oder einen biologisch basierten Marker solch eines Elements darstellt. Beispiele für den MOA der Kanzerogenese sind Mutagenität, Mitogenese, Inhibition von Apoptose, Zytotoxizität mit einhergehender kompensatorischer Zellproliferation, hormonale Störungen oder auch eine Immunsuppression. Um den MOA zu bestimmen, ist es nötig den dosimetrischen Prozess einzubeziehen, um die relevante Dosis einer Substanz am Zielorgan abschätzen zu können. Somit muss die Absorption, der Metabolismus, einschließlich Toxifizierung und Detoxifizierung, sowie die Verteilung einer Substanz in die Organe eines Organismus beachtet werden. Der MOA ist für die Risikobewertung einer Substanz unerlässlich, da nur unter Berücksichtigung des Wirkmechanismus sinnvolle Schutzmaßnahmen ergriffen werden können [Jarabek et al., 2009].

Gegen eine Einstufung als Effektbiomarker spricht, dass nicht alle DNA-Addukte das gleiche mutagene Potential besitzen, denn ob ein DNA-Addukt sich in einer Mutation manifestiert, hängt von mehreren Faktoren ab: Stabilität des DNA-Addukts, Effizienz der Reparatur, Quantität der Addukte, Position des Addukts an der Base, Position des DNA-Addukts innerhalb des DNA Strangs und Zelltyp [Nestmann et al., 1996; Pottenger et al., 2009].

Ob aus einer elektrophilen Substanz in einer Zelle ein DNA-Addukt entsteht, hängt unter anderem von ihrem Gehalt an Glutathion und anderen Antioxidantien ab. Diese können das Elektrophil vor der Reaktion mit der DNA binden und eine Mutationsentstehung verhindern [Pottenger & Gollapudi, 2010]. Beispielsweise konnten Puppel und Mitarbeiter zeigen, dass

bei Glutathiondepletion die Häufigkeit der DNA-Strangbrüche bei gleicher Acrylamidexposition anstieg [Puppel et al., 2005].

Ist ein DNA-Addukt stabil und besitzt eine lange Halbwertszeit, so ist die Wahrscheinlichkeit der Ausbildung einer Mutation oder einem Strangbruch im Vergleich zu einer kurzen Halbwertszeit größer. Bei höherer Halbwertszeit steigt die Möglichkeit einer Replikation des Erbguts und somit die der Manifestation des genotoxischen Ereignisses in einer Mutation. Ein Beispiel für DNA-Addukte mit kurzer Halbwertszeit sind *N*7-Methyl-Guaninaddukte, deren Halbwertszeit lediglich 2-150 Stunden beträgt und die nach letzten Erkenntnissen nicht signifikant mutagen sind [Boysen et al., 2009].

Die Effizienz der Reparatur für ein bestimmtes DNA-Addukt ist von großer Bedeutung, denn wird ein DNA-Addukt vor der DNA-Replikation fehlerfrei repariert, kann aus ihm keine Mutation entstehen. Es kann nicht davon ausgegangen werden, dass alle Addukte mit der gleichen Effizienz repariert werden [Nestmann et al., 1996].

Ein Beispiel hierfür ist das *N*²-Guaninaddukt des Benzo[*a*]pyrens (BaP) und das O⁶-Methylguanin, welches durch methylierende Agenzien gebildet werden kann. Während das 'bulky adduct' des Benzo[*a*]pyrens vom NER-System nur langsam und aufgrund sterischer Behinderung nicht ausreichend repariert werden kann, wird O⁶-Methylguanin vom MGMT-System, sofern dieses nicht gesättigt ist, effizient und fehlerfrei repariert [Jarabek et al., 2009; Thielen et al., 2006].

Es ist außerdem zu beachten, dass ein von den Reparatursystemen effizient entferntes potent mutagenes DNA-Addukt, das schnell entfernt wird weniger schädlich sein kann, als ein schwach mutagenes DNA-Addukt, welches von den Reparatursystemen aber kaum oder gar nicht entfernt wird [Nestmann et al., 1996]. Die Anzahl der DNA-Addukte spielt ebenfalls eine wichtige Rolle, da die Reparatursysteme bei hoher Konzentration gesättigt sein können und deshalb nicht mehr in der Lage sind, weitere DNA-Addukte zu entfernen [Jarabek et al., 2009]. Jedoch ist es auch möglich, dass bestimmte Reparaturenzyme erst durch das Vorhandensein einer gewissen Anzahl an DNA-Addukten verstärkt induziert werden [Pottenger et al., 2009; Sander et al., 2005].

Des Weiteren müssen durch direkt und indirekt wirkende Fremdstoffe gebildete DNA-Addukte unterschieden werden. Indirekt wirkende Fremdstoffe müssen im Gegensatz zu direkt wirkenden erst durch Phase-I-Enzyme metabolisch aktiviert werden. Während für die indirekten bei hohen Dosen eine Sättigung der metabolisierenden Enzyme erwartet werden kann, sind diese bei direkt wirkenden Adduktbildnern nicht nötig, weshalb bei diesen ein linearer Dosis-Wirkungsverlauf anzunehmen ist [La & Swenberg, 1997]. Die Elektrophilie der indirekt genotoxisch wirkenden Stoffe ist ein Marker um mögliche Zielorgane vorauszusagen. Stark elektrophile Stoffe werden mit hoher Wahrscheinlichkeit im Bildungsorgan ihre Toxizität

entfalten, während weniger elektrophile Stoffe stabiler sind und der Verteilung in unterschiedliche Gewebe unterliegen [Jarabek et al., 2009].

Einen Einfluss auf die potenzielle Mutagenität einer Substanz hat auch die Position des Addukts an der Base selbst, denn ein Addukt in der Basenpaarregion hat in der Regel weitreichendere Folgen als ein Addukt außerhalb einer Basenpaarregion. Die Basenpaarregionen sind: die $N1$ -, N^2 - und O^6 - Position des Guanins (G), die $N1$ - und N^6 - Position des Adenins (A), die $N3$ - und O^4 - Position des Thymins (T) und die O^2 -, $N3$ -, N^4 - Position des Cytosins (C), wobei jeweils Guanin mit Cytosin und Adenin mit Thymin ein Basenpaar bildet (Kapitel 2.3.1; Abbildung 14) [Jarabek et al., 2009; Kunz et al., 2009].

Entsteht ein Addukt an einer dieser Paarregionen, ist die Gefahr einer Mutationsentstehung größer, da es aufgrund veränderter Wechselwirkungen zur Basentransversion kommen kann [Groopman et al., 1994; Kunz et al., 2009].

Ein Beispiel für ersteres wird von dem schon erwähnten N^2 -Guaninaddukt des BaP gebildet. Das adduktierte Guanin kann nun nicht mehr drei, sondern nur noch zwei Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden. Deshalb wird die Paarung mit Thymin anstatt Cytosin begünstigt, da Thymin nur zwei Wasserstoffbrücken ausbildet. Es kommt zur G-T-Transversion, die bei der Replikation in eine T-A-Mutation verwandelt werden kann. Zusätzlich kann bei einem 'bulky adduct' ebenfalls die DNA-Topologie gestört werden [Kunz et al., 2009; Thielen et al., 2006].

DNA-Addukte an nicht-Basenpaarregionen wie z.B. Methylierungen an der $N7$ -Position des Guanins haben keine Transitionsmutationen zur Folge. Für $N7$ -Alkyl-Guaninaddukte gibt es sogar nur wenige bis keine Anhaltspunkte für eine durch sie hervorgerufene Mutation, da die gebildeten apurinischen Stellen nicht signifikant ansteigen [Boysen et al., 2009].

Bedeutung für das Ausmaß des Schadens, welcher aus einer Mutation hervorgeht, hat die Position der Addukte innerhalb des DNA-Doppelstrangs. Befindet sich der Schaden auf dem zu transkribierendem DNA-Strang, ist die Wahrscheinlichkeit der Entstehung einer Mutation größer. Des Weiteren ist zu beachten, in welchem Gen sich ein Addukt befindet. Ist ein Reporter-gen betroffen, hat die möglicherweise entstehende Mutation nicht unbedingt weitreichende Folgen. Für ein Addukt in einem mit einer Krebserkrankung zusammenhängenden Gen kann eine mögliche resultierende Mutation schwerwiegendere Folgen haben [Jarabek et al., 2009; Nestmann et al., 1996].

Auch die verschiedenen Zelltypen bzw. deren Proliferationsraten haben einen Einfluss auf die Wahrscheinlichkeit, dass ein genotoxisches Ereignis, wie DNA-Addukte, in Mutationen resultiert. Bei Zellen mit hoher Proliferationsrate ist die Wahrscheinlichkeit, dass aus einem DNA-Addukt eine Mutation resultiert höher. Die Ursache hierfür liegt darin, dass die Reparatursysteme bei hohen im Gegensatz zu niedrigen Proliferationsraten nur einen sehr

geringen Zeitrahmen zur Verfügung haben, um die DNA-Addukte zu entfernen und mögliche Mutationen zu verhindern [La & Swenberg, 1997].

Ein weiteres Argument, das gegen DNA-Addukte als Effektbiomarker spricht ist, dass die Addukte nicht nur in den entsprechenden Zielorganen detektiert werden, in denen Tumore entstehen, sondern auch in anderen Geweben. Für von DHP stammende DNA-Addukte konnte allerdings gezeigt werden, dass in den Zielzellen (hepatische Endothelzellen), von denen der spätere Tumor abstammt eine signifikant höhere DNA-Adduktmenge vorliegt. Eine konkrete adverse Adduktmenge konnte jedoch nicht festgelegt werden [Fu et al., 2010].

Aufgrund der kontroversen Datenlage sind sich die Wissenschaftler einig, dass weder das Aufstellen eines generellen Schwellenwerts, noch die generelle Annahme eines linearen Dosis-Wirkungsverlaufs für genotoxische Effekte sinnvoll ist. Ob ein Schwellenwert angegeben werden kann, muss für jede Substanz einzeln untersucht werden, wobei eine Substanz einer Stoffklasse einen Anhaltspunkt für die gesamte Stoffklasse liefern kann [Pottenger et al., 2009; Pottenger & Gollapudi, 2010].

Um DNA-Addukte ins Risiko-Management einzubeziehen, muss ihr MOA ermittelt werden. Hier ist die Frage, ob ein Agens selbst DNA-Addukte produziert, die man als exogene DNA-Addukte definiert, oder ob das Agens auch eine endogene Adduktbildung induziert, deren Level möglicherweise über den exogenen Addukten liegt. Ein Beispiel eines solchen MOAs hat Karen Brown für durch Ethylenoxid gebildetes *N*7-(2-hydroxyethyl)guanin (*N*7-HEG) dargelegt. Bei steigender Dosis stiegen sowohl die exogenen als auch die endogenen *N*7-HEG-Addukte an. Dies lässt darauf schließen, dass beim Bildungsmechanismus der Addukte oxidativer Stress eine Rolle spielt [Tompkins et al., 2009].

Da die Rolle der DNA-Addukte bei der Krebsentstehung so komplex ist und deshalb noch nicht mit Sicherheit gesagt werden kann, welche Rolle sie im Risiko-Management spielen, werden noch weitere Daten benötigt. Aus diesem Grund müssen zukünftig weitere *in vivo* Versuche durchgeführt werden, die zusätzlich Dose-Response-Zusammenhänge bei Niedrigdosen erfassen. *In vivo* Daten sind *in vitro* Daten vorzuziehen, da sie bei der Risikoabschätzung für den Menschen von größerer Aussagekraft sind [Pottenger et al., 2009; Sander et al., 2005]. Des Weiteren sollte Mutationen ein größerer Wert zugerechnet werden als DNA-Addukten, da Mutationen einen Biomarker des frühen biologischen Effekts darstellen [Pottenger et al., 2009].

Um einen Schwellenwert für bestimmte genotoxische Substanzen ableiten zu können, sollten internationale Leitlinien festgelegt werden, in denen verankert ist, welche Daten für die Erstellung eines Schwellenwerts nötig sind [Pottenger & Gollapudi, 2010]. Festgestellt wurde weiterhin, dass die bloße Detektion des Vorhandenseins eines Addukts für die Risikobewertung einer Substanz von wenig Relevanz ist. Viel wichtiger wäre es, das Addukt

auf die vorherigen erwähnten Eigenschaften, wie die Position an der Base, und die Quantität zu untersuchen [Jarabek et al., 2009].

Um die Relevanz von DNA-Addukten im Risiko-Management zu bestimmen, muss geprüft werden, ob im Vergleich zum Background, das stoffspezifische Addukt in signifikanten Mengen vorkommt. Ist dies nicht der Fall, so ist die Relevanz dieser DNA-Addukte mit großer Wahrscheinlichkeit gering [Jarabek et al., 2009].

Außerdem sollten mögliche Interaktionen zwischen mehreren genotoxischen Substanzen untersucht werden. Z.B. zeigten BaP und UV-Strahlung einen synergistischen genotoxischen Effekt [Routledge et al., 2001].

2.8 Analytik

2.8.1 Hochleistungsflüssigchromatographie

Chromatographische Verfahren beruhen auf dem Prinzip der Verwendung zweier unterschiedlicher Phasen, einer stationären und einer mobilen Phase. Die Auftrennung einer Probe in die zu untersuchenden Analyten erfolgt hierbei durch eine Konkurrenzreaktion von Adsorption und Desorption, wobei sich die zu trennenden Komponenten in ihrem Festhalte- bzw. Desorptionsvermögen unterscheiden müssen. Bei der Festphasenchromatographie fließt eine mobile Phase an einer stationären Phase vorbei, wobei es zu Verteilungseffekten, beruhend auf unterschiedlichen physikalischen Prinzipien, kommt. Die Bindungsstärke der verschiedenen Adsorbens und die anschließende Desorption führen zur Auftrennung, wobei dies in Abhängigkeit zum Oberflächenmaterial der stationären Phase steht [Gottwald, 1992].

Die Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) ist eine Weiterentwicklung der klassischen Säulenflüssigkeitschromatographie, deren Effizienz durch eine Verkleinerung der Teilchengröße des Packungsmaterials sowie eine Instrumentalisierung wesentlich verbessert wurde. Bei der HPLC wird mit erheblich feinkörnigerem Material als bei der Säulenchromatographie gearbeitet, wodurch eine höhere Auflösung bei der Trennung, eine drastische Verkürzung der Analysendauer und einer Verbesserung der Nachweisempfindlichkeit erreicht werden kann [Cammann, 2001].

Zu unterscheidende HPLC-Methoden sind die Normal-Phase (NP) und die Reversed Phase (RP). Bei der NP-HPLC liegt eine polare, stationäre Phase vor, an der eine unpolare, mobile Phase vorbeifließt. Die Funktionsweise der RP-HPLC beruht auf dem genau umgekehrten Prinzip, bei dem eine polare, mobile Phase an einem unpolaren Säulenmaterial vorbeifließt. Hierzu wird das Säulenmaterial der NP-HPLC, meist ein Silicagel, mit siliciumorganischen Verbindungen verestert, so dass das Material nach außen unpolar wird [Gottwald, 1992].

Der prinzipielle Aufbau einer HPLC-Anlage ist in Abbildung 20 gezeigt. Ein Lösungsmittelgemisch, die mobile Phase, wird nach Entgasung durch eine oder mehrere Pumpen gefördert. Mit Hilfe eines Ventils wird eine Lösung der Probe in einem mit der mobilen Phase mischbaren Lösungsmittel injiziert. Der Trennvorgang findet auf der chromatographischen Säule statt, die bei Bedarf durch einen Säulenofen temperiert werden kann. Die getrennten Probenbestandteile werden anschließend mittels eines geeigneten Detektors nachgewiesen [Cammann, 2001].

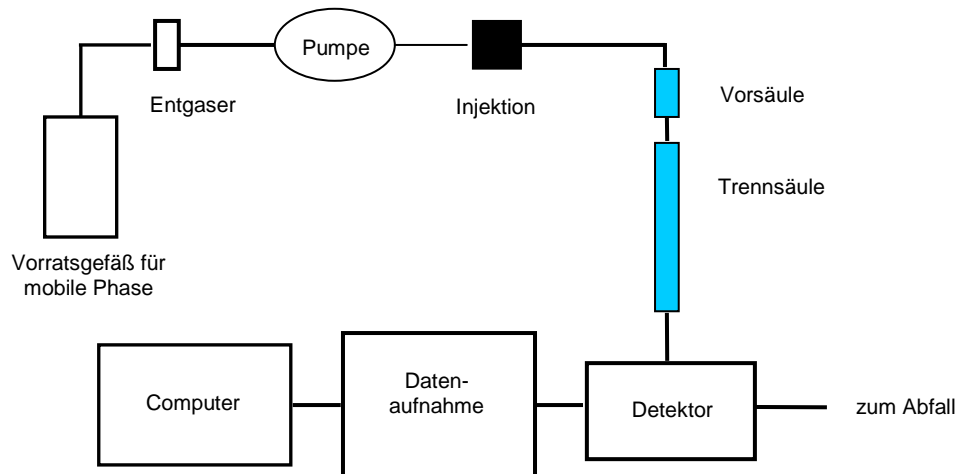


Abbildung 20 Schematischer Aufbau einer HPLC-Anlage [modifiziert nach *Cammann, 2001*]

2.8.2 Massenspektrometrie (MS)

Die Massenspektrometrie ist ein physikalisches Verfahren, das Ionen, die im Vakuum stabil sind, nach ihrem Verhältnis Masse zu Ladung (m/z) auftrennt. Die massenspektroskopische Analyse erfolgt in der Regel unter Molekül-Fragmentierung beziehungsweise Atomisierung und Ionisierung der in das Vakuum eines Massenspektrometers eingeschleusten Probe. Das ausgewählte Ionisierungsverfahren bestimmt die Fragmentierung chemischer Verbindungen. Organische Verbindungen lassen sich in der Regel im Bereich von 10^{-12} bis 10^{-17} mol noch quantitativ erfassen. In der massenspektroskopischen Analyse müssen die eingebrachten Substanzen in freie positiv oder negativ geladene Ionen bzw. Radikale überführt werden, damit sie mittels einer entsprechend angelegten elektrischen Hochspannung für die Massenauftrennung beschleunigt werden können. Die Geschwindigkeit, die die Ionen erreichen können, ergibt sich aus der kinetischen Energie, die sie erhalten, in dem sie ionisiert und im Anschluss im elektrischen Feld beschleunigt werden. Hierbei ist die

Ionisationsausbeute ausschlaggebend für die Nachweisempfindlichkeit eines Massenspektrometers [Cammann, 2001].

2.8.3 Kopplungsprinzip von HPLC und MS

Die direkte Kopplung von HPLC-Systemen und Massenspektrometern konnte erst seit Entwicklung verschiedener 'Interfaces' routinemäßig eingesetzt werden. Diese 'Interfaces' sorgen vor allem dafür, dass das Elutionsmittel vollständig entfernt und dass der zu analysierende Analyt möglichst schonend ionisiert wird. Von großer Bedeutung sind vor allem jene 'Interfaces', die bei Atmosphärendruck betrieben werden. Zu dieser Atmospheric-Pressure-Ionisation (API) zählt auch die so genannte Elektronensprayionisation (ESI). Da diese Ionisierungsart sehr schonend ist, eignet sie sich besonders für bereits ionische Substanzen oder für Substanzen, die leicht protoniert beziehungsweise deprotoniert werden können. Auch große und empfindliche Moleküle werden bei der ESI-Methode praktisch nicht fragmentiert und es werden vor allem die häufig für eine Molmassenbestimmung gewünschten Molekülionen und Quasimolekülionen wie zum Beispiel $[M+H]^+$ erzeugt. In Abbildung 21 ist die Elektronensprayionisation schematisch dargestellt [Cammann, 2001].

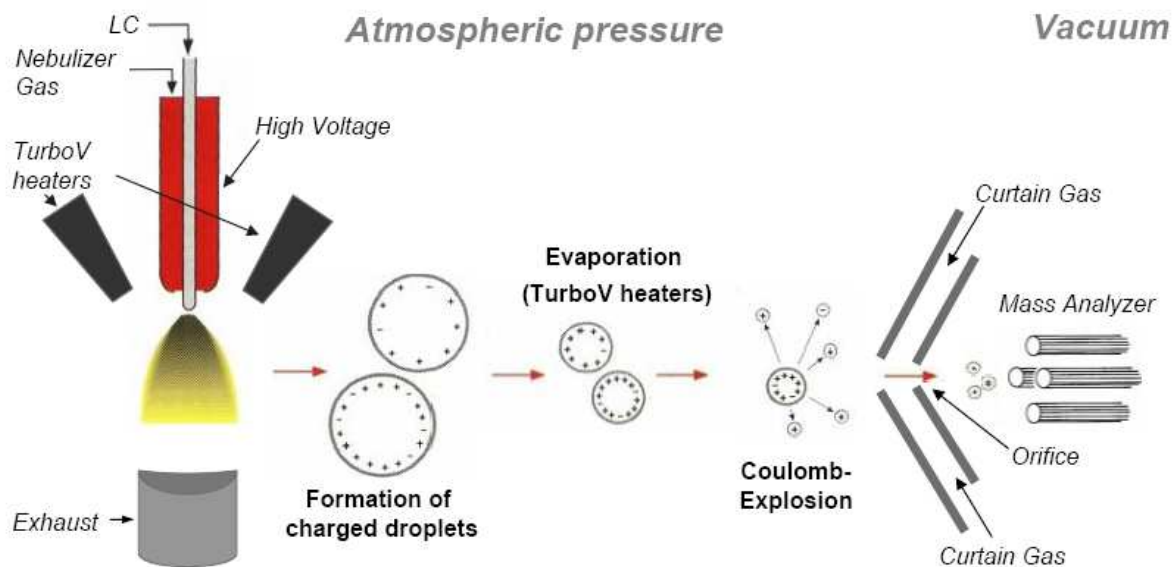


Abbildung 21 Schematische Darstellung der Elektronensprayionisation (ESI) [ABSciex, 2008]

Die Ionisierung mittels ESI findet unter Atmosphärendruck statt, wobei es zur Desolvatisierung, das heißt dem Transfer von Ionen aus der Lösung in die Gasphase,

kommen muss. Dieser Prozess kann in vier Schritte unterteilt werden: Zunächst kommt es zur Bildung kleiner geladener Tröpfchen. Durch Verdampfen kommt es zum kontinuierlichen Lösungsmittelverlust und dadurch zur Verdichtung der Ladung an der Oberfläche der Tröpfchen. Übersteigt die Ladung im Vergleich zur Oberfläche einen gewissen Punkt kommt es zur so genannten Coulomb-Explosion bei der es zum Zerfall der Tröpfchen zu Mikrotröpfchen kommt. Die ionisierten Teilchen werden zum Massenspektrometer hin beschleunigt und es kommt zur vollständigen Desolvatisierung der Analytmoleküle bevor diese durch eine Mikroöffnung in das Massenspektrometer eintreten. Stickstoff bildet hierbei einen Gasvorhang, der zum einen die Desolvatisierung unterstützt und zum anderen mit den Molekülkomplexen kollidiert und dadurch ein Eintreten vieler Neutralteilchen über die Interface-Platte verhindert. Um eine Analyse möglich zu machen ist ein kontinuierlicher Fluss der Analytlösung notwendig. Diese wird über eine Kapillare injiziert, wobei sie zusätzlich durch Anlegen einer Hochspannung als Gegenelektrode zur Interface-Platte dient und so ein elektrisches Feld entsteht. Um die Kapillare kann zusätzlich ein Gasstrom aus Stickstoff strömen, der die Zerstäubung der Analytlösung unterstützt [Cammann, 2001].

Die anschließende Auftrennung und Analyse der Analytionen erfolgt im Hochvakuum, wodurch Streuung und Stöße der Ionen an Gas- oder Luftteilchen vermieden werden. Die kinetische Energie, die die Ionen in Form von Geschwindigkeit durch Beschleunigung nach Ionisation im elektrischen Feld aufnehmen, ermöglicht die Massenauftrennung nach sechs verschiedenen Prinzipien: Magnetfeld- und Sektorfeld-Trennung, Quadrupolmassenfilter, Ionenfalle, Ionencyclotronresonanzzelle, Bestimmung einer Flugzeit und Massenbeschleuniger [Cammann, 2001].

Am weitesten verbreitet sind Quadrupol-Massenfilter. Diese sind aus vier konzentrisch parallel zueinander angeordneten Stabelektroden aufgebaut, die gegenüberliegend paarweise an eine variable jeweils entgegengesetzt gepolte Gleichspannungsquelle angeschlossen sind. Zusätzlich wird eine modulierbare Hochspannungsfrequenz überlagert, sodass nur Ionen gleicher Masse (Massenfilter) auf bestimmten stabilen Wellenbahnen beim Passieren dieser Stabelektroden den eigentlichen Massendetektor erreichen. Die Reihenschaltung von drei Quadrupolen Q0 bis Q3 bietet zusätzlich eine Möglichkeit der Strukturaufklärung. Solche Geräte werden auch als Tandemmassenspektrometer bezeichnet. In Q0 werden die Ionen ins Zentrum des Quadrupolfeldes überführt und beginnen zu oszillieren. Erst in Q1 kommt es zum Scan der Ionen nach ihrem m/z -Verhältnis. Q2 wird als Quadrupol bezeichnet, obwohl es einer Kollisionskammer entspricht. Durch eingeleitetes Gas (N_2) und einer angelegten Spannung kommt es zur Fragmentierung der Ionen. Die Molekulargewichte der entstandenen Fragmentionen werden anschließend im Messquadrupol Q3 bestimmt. Hierbei bietet der Multiple Reaction Monitoring-Mode (MRM) auch die Möglichkeit einer Quantifizierung. Im MRM-Mode werden die in Q1 selektierten

Teilchen anschließend in Q2 durch ein Kollisionsgas fragmentiert und schließlich findet in Q3 eine weitere Massenselektion anstatt eines Massenscans statt (Abbildung 22) [Cammann, 2001].

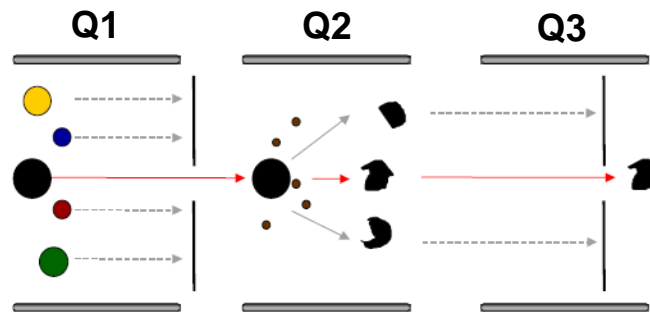


Abbildung 22 Schematische Darstellung der Messung im MRM-Mode [ABSciex, 2008]

Der wesentliche Vorteil des MRM-Mode ist die Ausblendung von Störsignalen komplexer Matrices, wie sie in biologischem Material häufig zugegen sind. Aufgrund der großen Selektivität zieht diese Methode ein sehr gutes Signal/Rausch-Verhältnis und damit eine niedrige Nachweisgrenze nach sich [Cammann, 2001].

Eine weitere Möglichkeit zur Identifizierung von Einzelkomponenten in einem Gemisch und/oder Strukturaufklärung von beispielsweise synthetisierten Standardsubstanzen bietet der Produktionenscan. Hierbei wird Q1 so eingestellt, dass nur die Ionen mit dem zu analysierenden m/z -Verhältnis selektiv in Q2 transferiert werden. Die Vorläuferionen werden in der Kollisionskammer fragmentiert und die generierten Produktionen in einem vordefinierten m/z -Bereich in Q3 detektiert (Abbildung 23).

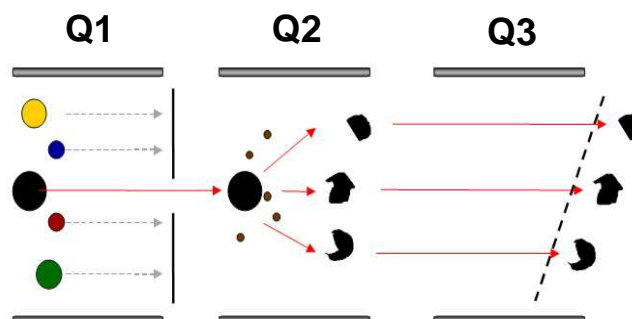


Abbildung 23 Schematische Darstellung der Messung im Produktionenscan [ABSciex, 2008]

2.8.4 Kalibrierung und Tuning der Massenspektrometer

Die Kalibrierung der Massenspektrometer (API 2000 und API 3200) erfolgt in der Regel unter Verwendung von Polypropylenglykol-Standards (PPG). Hierbei wird das Auflösungsvermögen des Massenspektrometers unter spezieller Berücksichtigung der Peak-Breite ausgewählter m/z -Verhältnisse durch Injektion der PPG-Lösung optimiert. Eine maximale Sensitivität wird bei einer Peakbreite von 0,6 bis 0,8 u bei 50% der maximalen Peakhöhe eines jeden m/z -Verhältnisses erreicht. Ferner sollte durch die Kalibrierung eine korrekte Zuordnung der massenspektrometrischen Signale zu dem dazugehörigen m/z -Verhältnis bei einer maximalen Massenverschiebung (mass shift) von 0,1 u gewährleistet werden.

Um eine maximale Sensitivität und Selektivität bei der Messung mit Massenspektrometern zu erhalten, müssen sowohl die substanzspezifischen- als auch quellenspezifischen Parameter eines jeden Analyten optimiert werden (Tuning). Die substanzspezifischen Parameter wurden mittels Spritzenpumpe (syringe pump), die quellenspezifischen Parameter mit den entsprechenden HPLC-Bedingungen optimiert. Erstere werden für jeden Analyten einzeln erfasst, letztere richten sich bei einer Messung mit mehreren Analyten gleichzeitig nach dem, dessen Konzentration am geringsten ist.

Die substanzspezifischen Parameter (siehe Tabelle 4) werden unter Verwendung der entsprechenden Software (Analyst 1.4.2) bei einer Fließgeschwindigkeit von 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ optimiert (Spritzenpumpe).

Tabelle 4 Übersicht über die substanzspezifischen Parameter und deren Funktion

Parameter	Aufgabe/Funktion
Declustering Potential (DP)	Spannung zwischen Skimmer und Orifice-Plate, dient der Minimierung der Analyt-Fließmittel-Cluster
Entrance Potential (EP)	Fokussierung und Transport der Ionen in Q0
Collision Energie (CE)	Spannung zwischen Q0 und Q2, dient der Steuerung der Kollisionsenergie
Collision Cell Entrance Potential (CEP)	Spannung zwischen Q0 und Q2-Eingang, dient der Fokussierung der Ionen in Q2
Collision Cell Exit Potential (CXP)	Spannung zwischen Q2 und Q3, dient dem Transport der Ionen von Q2 nach Q3

Die quellenspezifischen Parameter werden ebenfalls mittels der Analyst 1.4.2 Software bei der während der Elution des entsprechenden Analyten vorliegenden Fließmittelzusammensetzung optimiert. Dies erfolgt unter Verwendung einer sogenannten Loop-Injektion ohne HPLC-Säule bei isokratischen Bedingungen mit der bei der Messung verwendeten Fließmittelgeschwindigkeit. Die zu optimierenden Parameter sind in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5 Übersicht über die quellenspezifischen Parameter und deren Funktion

Parameter	Aufgabe/Funktion
Curtain Gas (CUR)	Gasdruck zwischen Curtain- und Orifice-Plate, dient dem Schutz vor Kontamination
Collision Activated Dissociation (CAD)	Gasdruck des Kollisionsgases, dient der Fragmentierung der Analyten in Q2
Ionspray Voltage (IS)	Spannung der Electrospraynadel (ESI-Probe), dient der Ionisierung der Analyten
Temperature (TEM)	Temperatur, dient der Steigerung der Verdampfung des Fließmittels und fördert Bildung von Analytionen in der Gasphase
Gas 1 (GS1)	Vernebelungsgas, dient der Bildung kleiner Fließmitteltropfen und beeinflusst die Stabilität des Electrosprays
Gas 2 (GS2)	Turbogas, dient der Verdampfung des Fließmittels in den Fließmitteltropfen

2.8.5 Stabilisotopenverdünnungsanalyse (SIVA)

Die Ursprünge der Isotopenverdünnung gehen zurück bis Anfang des 20. Jahrhunderts, als durch Soddy die Existenz von Isotopen entdeckt wurde. Er stellte fest, dass die meisten Elemente eine natürliche Isotopenverteilung von stabilen und radioaktiven Isotopomere besitzen. Wenn man nun ein Element oder eine Verbindung, die eine natürliche Isotopenverteilung aufweist, mit Material einer anderen Isotopenverteilung mischt, so wird die natürlich vorkommende Menge Isotopomer in der erhaltenen Mischung verdünnt.

Das Prinzip der Isotopenverdünnung, welche während dieser Arbeit angewendet wurde, ist in Abbildung 24 gezeigt. Nach Zusetzen von isotopenmarkiertem Standard sollte sich das Verhältnis Analyt zu Standard im Laufe der Aufarbeitung nicht verändern, da beide Verbindungen nahezu gleiche chemische und physikalische Eigenschaften besitzen.

Schließlich erlaubt die Massenspektrometrie, aufgrund der unterschiedlichen Massen, die Unterscheidung zwischen internem Standard und Analyt. Da die Stoffmenge an zugesetztem internem Standard bekannt ist, kann schließlich der Gehalt an Analyt in der Probe berechnet werden [Rychlik & Asam, 2008].

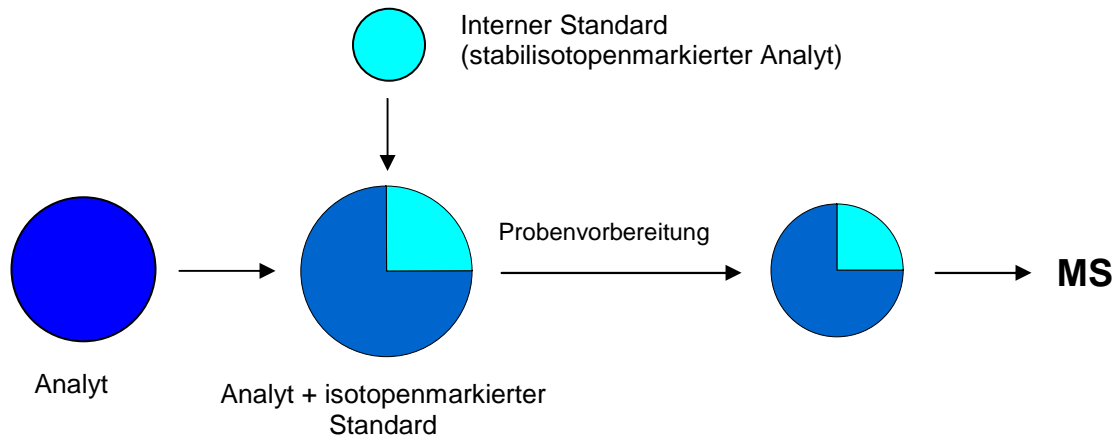


Abbildung 24 Schema der Stabilisotopenverdünnungsanalyse [modifiziert nach *Rychlik & Asam, 2008*]

Das Verhältnis Analyt und stabilisotopenmarkierter Analyt bleibt während der Probenvorbereitung konstant und kann mittels Massenspektrometer erfasst werden. Eine Grundvoraussetzung an den internen Standard ist die Markierung mit stabilen Isotopen, wie zum Beispiel mit den Isotopen ^{13}C und ^{15}N , damit sich das Verhältnis zwischen Analyt und Standard nicht durch Zersetzung des Standards verändert.

3 Problemstellung

Das Erhitzen von Nahrung ist eines der gebräuchlichsten und ältesten Verfahren um Lebensmittel zu behandeln und trägt entscheidend zur nachhaltigen Sicherung der Ernährung bei. Das Kochen, Rösten, Braten, Grillen und Frittieren als thermische Behandlung kann Lebensmittel vielfältig verändern. Neben Geschmack und Textur wird auch die Haltbarkeit verbessert. Die im Lebensmittel stattfindenden Prozesse beruhen größtenteils auf der nicht enzymatischen Bräunung, welche als Maillard-Reaktion bekannt ist [SKLM, 2007].

Die thermische Behandlung von Lebensmitteln ist sowohl mit positiven als auch mit nachteiligen Aspekten assoziiert. So schafft das Erhitzen von Nahrungsmitteln oftmals erst die Voraussetzung für den bestimmungsgemäßen Verzehr. Bei der Zubereitung entstehen beispielsweise Aromastoffe, was mit der geschmacklichen Aufwertung und der Beeinflussung des äußeren Erscheinungsbildes (Textur und Farbe) einhergeht und dadurch entscheidend zur Akzeptanz des Lebensmittels beim Verbraucher beiträgt. Die thermische Behandlung von Lebensmitteln kann aber auch unerwünschte Folgen wie zum Beispiel den Verlust an essentiellen Aminosäuren, ungesättigten Fettsäuren und Vitaminen haben. Neben dem Verlust an wichtigen Nahrungsinhaltsstoffen kann es darüber hinaus auch zur Neubildung von gesundheitlich bedenklichen Stoffen kommen. Zu diesen sogenannten hitzeinduzierten Lebensmittelkontaminanten zählen unter anderem die in der vorliegenden Arbeit behandelten α,β -ungesättigten Carbonylverbindungen Acrylamid und Acrolein [SKLM, 2007].

In der Risikobewertung ist das Risiko als Produkt aus Exposition und Gefährdungspotential definiert (Kapitel 2.6). Da sich die vorliegende Arbeit unter anderem mit der Risikobewertung von Acrylamid und Acrolein beschäftigt, sollen diese Faktoren bezüglich der beiden hitzeinduzierten Lebensmittelkontaminanten näher untersucht werden.

Dabei steht unter anderem die genotoxische Wirkung von Acrylamid *in vitro* als auch *in vivo* nach Aufnahme im Bereich der humanen Exposition (1-4 $\mu\text{g}/\text{kg KG}$ [JECFA, 2010]) im Vordergrund. Bezüglich des Acroleins sollte einerseits anhand der Untersuchung der Bildungskinetik von DNA-Addukten *in vitro* das Gefährdungspotential und andererseits durch Erfassung der MA-Ausscheidung *in vivo* die Exposition abgeschätzt und mit jener von Acrylamid verglichen werden.

Im Vorfeld der Untersuchungen der Biomarker für Exposition und Wirkung von Acrylamid und Acrolein stand die Methodenentwicklung und -optimierung. Insbesondere galt es, die analytische Erfassung von DNA-Schäden in Form von DNA-Addukten zur Detektion dieser im Spurenbereich zu etablieren, beziehungsweise weiterzuentwickeln.

Ein weiteres wesentliches Ziel dieser Arbeit war die Erfassung der giftenden und entgiftenden Stoffwechselwege von Acrylamid sowohl *in vitro* nach Inkubation von primären Rattenhepatozyten, als auch *in vivo*, in Ratte und Mensch, nach Aufnahme von Acrylamidmengen im Bereich der täglichen humanen Exposition und darunter.

Die *in vitro* Inkubationen sollten den Konzentrationsbereich abdecken, der auch im Serum von Ratten gefunden wurde, die mit Acrylamid in Trinkwasser (100 µg/kg KG) behandelt wurden: $c_{\max} = 2 \mu\text{M}$ [Berger et al., 2011]. Im Zellkulturmedium sollten Glycidamid und N7-GA-Gua-Addukte als Biomarker für Giftung und AA-GSH-Addukte sowie AAMA und GAMA als Biomarker für Entgiftung nach konzentrations- und zeitabhängiger Inkubation erfasst und somit die Kinetik der Bildung dieser Biomarker untersucht werden. Auf Grundlage der *in vitro* erhaltenen Ergebnisse sollte die Balance der Entgiftung mit der Giftung von Acrylamid verglichen werden. Die analytische Erfassung von Acrolein ist aufgrund der intrinsischen Reaktivität und hohen Flüchtigkeit schwierig. Es gibt nur wenige zuverlässige Daten über Acroleingehalte in Lebensmitteln. Nach Messung und Vergleich der MA-Ausscheidung von 3-HPMA und AAMA wird von einer Hintergrundbelastung mit Acrolein berichtet, die etwa um den Faktor drei höher als jene mit Acrylamid liegt [Schettgen et al., 2008]. Um diese Diskrepanz zu untersuchen, war ein weiteres wesentliches Ziel dieser Arbeit, der Vergleich der humanen Exposition mit Acrylamid und Acrolein im Rahmen zweier humaner Verzehrsstudien nach Aufnahme von selbst hergestellten hoch Acrylamid-belasteten und weniger belasteten kommerziell erhältlichen Kartoffelchips. Unter Verwendung der Ergebnisse der beiden Humanstudien sollte der Konzentrations-Zeit-Verlauf (Ausscheidungskinetik) ausgewählter Metabolite von Acrylamid und Acrolein (AAMA, GAMA, 3-HPMA und CEMA) im Urin nach Verzehr der Kartoffelchips ermittelt werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten jeweils Urinproben vor und bis zu 72 Stunden nach Aufnahme von Acrylamid und Acrolein über Lebensmittel mit Hilfe der in der Arbeitsgruppe etablierten HPLC-ESI-MS/MS Methode bestimmt werden. Um die Ergebnisse aus den Humanstudien mit denen anderer Arbeitsgruppen zu vergleichen, wurden die Gehalte an AAMA, GAMA, 3-HPMA und CEMA auf Kreatinin standardisiert. Daher musste darüber hinaus eine einfache und schnelle Methode zur Erfassung von Kreatinin im Humanurin auf Grundlage der HPLC-ESI-MS/MS-Messung erstellt und etabliert werden.

Zusätzlich sollte in einem Pilotexperiment mit einem Probanden die Ausscheidungskinetik von Acrolein nach Aufnahme einer Dosis im Bereich der akzeptierten Tagesdosis (TDI) erfasst werden. Mit Hilfe der Ergebnisse sollte neben der indirekten Expositionsabschätzung mit Acrolein über Lebensmittel die Basis für eine erweiterte Risikoabschätzung nach Aufnahme von Acrylamid- und Acrolein-haltigen Lebensmitteln verbessert werden.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Methodenentwicklung

In diesem Kapitel ist die im Rahmen dieser Arbeit zu bearbeitende analytische Fragestellung, die notwendige Synthese und Methodenentwicklung zur Bestimmung von α - und γ -Hydroxypropanodeoxyguanosin beschrieben. Die weiteren Methodenentwicklungen, die von der Etablierung einer geeigneten Aufreinigungsmethode für weitere Biomarker aus biologischen Matrices wie Kreatinin und CEMA bis hin zur Entwicklung geeigneter HPLC-ESI-MS/MS-Methoden zur Bestimmung und Quantifizierung dieser Biomarker reichte, sind im Material- und Methodenteil dieser Arbeit beschrieben (Kapitel 6.4).

4.1.1 Messung von α - und γ -Hydroxypropanodeoxyguanosin

4.1.1.1 Darstellung von α - und γ -Hydroxy- $^{15}\text{N}_5$ -propanodeoxyguanosin (α - und γ -OH- $^{15}\text{N}_5$ -PdG)

Als interner Standard zur Quantifizierung von α - und γ -OH-PdG (OH-PdG) sollte OH- $^{15}\text{N}_5$ -PdG (**2**) dienen. Dazu wurde zunächst die nicht stabilisotopenmarkierte Verbindung hergestellt (**1**). Deoxyguanosin bietet sich bei der Synthese als Edukt an. Die Herstellung des Addukts ausgehend von Deoxyguanosin war in der Arbeitsgruppe in Anlehnung an die Methode von Galliani und Pantarotto bereits erfolgreich durchgeführt worden und stand in ausreichender Menge zur Verfügung [Galliani & Pantarotto, 1983]. Die geringe Löslichkeit von Deoxyguanosin in Wasser, polar aprotischen und allen anderen geläufigen Lösungsmitteln bereitet experimentelle Probleme. Die Synthese von (**2**) basiert ebenfalls auf der von Galliani und Pantarotto publizierten Methode und wurde über eine Synthesestufe realisiert [Galliani & Pantarotto, 1983]. Zunächst wurde kommerziell erhältliches Deoxyguanosin mit einem Überschuss an Acrolein in DMSO versetzt. Anschließend wurde das Reaktionsprodukt ausgefällt und getrocknet, wonach ein Produktgemisch als gelber Feststoff mit einer Ausbeute von 36% erhalten werden konnte. Das Produktgemisch bestand aus α - und γ -OH- $^{15}\text{N}_5$ -PdG (**1**), wie NMR-spektroskopische Untersuchungen zeigten. Dieser Befund steht im Einklang mit der Literatur, in welcher ebenfalls von einem Isomerengemisch aus α -OH-PdG und γ -OH-PdG nach Ablauf der Reaktion berichtet wird [Galliani & Pantarotto, 1983]. Ein Überblick über das Syntheschema liefert die Abbildung 25.

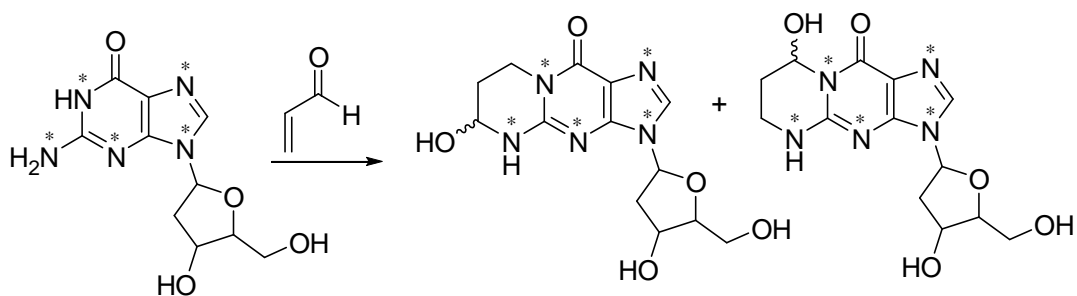


Abbildung 25 Syntheschema zur DNA-Adduktbildung aus der Reaktion von stabilisotopenmarkiertem Guanosin mit Acrolein (* Stabilisotopenmarkierung)

Die Zuordnung der Signale im ^1H -NMR-Spektrum gestaltet sich äußerst schwierig, da zu der ohnehin komplexen Struktur dieser stabilisotopen markierten Substanz zusätzlich ^{15}N -Kopplungen hinzukommen.

Im zugehörigen ^1H -NMR-Spektrum (Tabelle 6) zeigt im Guaningrundgerüst durch Kopplung mit $^{15}\text{N}_9$ und $^{15}\text{N}_7$ für das Proton an Position 8 ein Multiplett mit dem Integral von 1 bei $\delta = 7,94$ ppm. Das Signal der NH-Gruppe spaltet ebenfalls durch die ^{15}N -Kopplung zusätzlich als Dublett bei 8,39 ppm mit einem Integral von 1 auf. Die Protonen an Position 10 lassen sich als Multiplett bei einer chemischen Verschiebung von $\delta = 4,94$ ppm erkennen. Bei $\delta = 1,92$ ppm und 1,74 ppm erscheinen die beiden Protonen getrennt an Position 11 als Multiplett und Triplet. Das Signal der Protonen an Position 12 spaltet als Dublett auf und tritt bei 4,41 ppm in Resonanz.

Die Protonen des Zuckerrests erscheinen analog des unmarkierten OH-PdG (siehe Tabelle 6). Das einzelne Proton an Position 1' tritt als Triplet bei einer chemischen Verschiebung von $\delta = 6,10$ ppm in Resonanz. Die Signale der beiden Protonen an 2' fallen zusammen, spalten als Multiplett auf und erscheinen bei $\delta = 2,18$ ppm. Die beiden einzelnen Protonen an Position 3' und 4' lassen sich jeweils als schlecht aufgelöste Multipletts mit chemischen Verschiebungen von $\delta = 4,33$ ppm und $\delta = 3,79$ ppm erkennen. Das Signal der Protonen an 5' wird bei $\delta = 3,43$ ppm als Multiplett detektiert. Die OH-Gruppe an 3' tritt als schlecht aufgelöstes Dublett bei $\delta = 5,27$ ppm und jene an 5' als Multiplett bei $\delta = 4,95$ ppm in Resonanz.

Tabelle 6 Vergleich der NMR-Daten der synthetisierten isotopenmarkierten OH-PdG-Addukte mit Literaturdaten [Klesen, 2010]

Position der Protonen	α -OH-PdG	γ -OH-PdG	OH-[$^{15}\text{N}_5$]-PdG
8	7,88 s		7,94 m
10	4,87-4,91 m		4,94 m
11	1,88 d; 1,70 t		1,92 m; 1,74 t
12	4,35 d		4,41 d
NH	8,34 s		8,39 d
OH	5,89 d		5,88 d
1'	6,06 t		6,10 t
2'	2,11-2,15 m		2,18 m
3'	4,28 d		4,33 m
4'	3,75 d		3,79 d
5'	3,37-3,52 m		3,43 m
3'-OH, 5'-OH	5,22 d; 4,87-4,91 m		5,10 d; 4,95 m

Zur weiteren Charakterisierung, wurde außer dem NMR-Spektrum ein MS-Produktionenspektrum einer Lösung von 1 $\mu\text{g/ml}$ von **(1)** in Ameisensäure (0,1%; V/V) durchgeführt. Das aufgenommene Produktionenspektrum ist in Abbildung 26 dargestellt. Den fünf Signalen mit den größten Intensitäten lassen sich die in der Abbildung dargestellten Fragmente zuordnen.

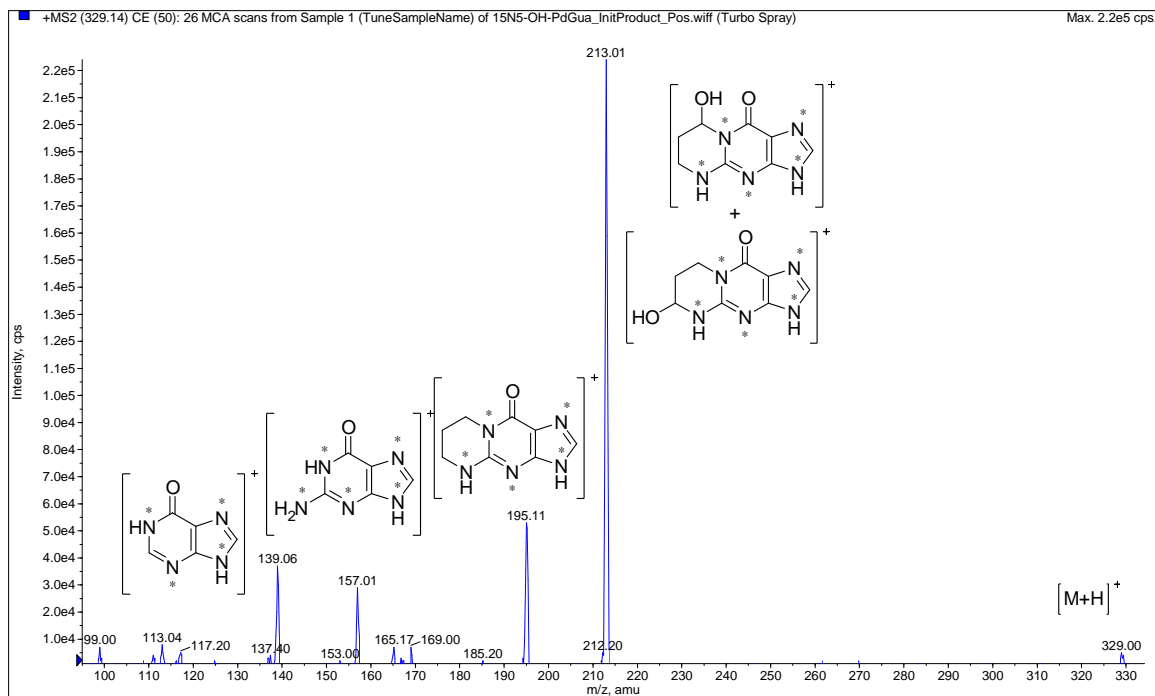


Abbildung 26 Produktionenspektrum von OH-[¹⁵N₅]-PdG ($[M + H]^+$, m/z 329) an Q3 im Massenbereich von m/z 90-340

4.1.1.2 Etablierung einer Messmethode für OH-PdG-Addukte mittels HPLC-ESI-MS/MS

Die Etablierung einer Messmethode für OH-PdG-Addukten aus biologischen Proben mittels HPLC-ESI-MS/MS wurde bereits in der Arbeitsgruppe etabliert [Klesen, 2010] und musste ausschließlich auf den stabilisotopenmarkierten OH-[¹⁵N₅]-PdG-Standard angepasst werden. Die verwendete HPLC-Säule und die chromatographischen Bedingungen sind in Tabelle 7 aufgeführt. Nach der erfolgreichen Synthese des stabilisotopenmarkierten Standards und der Optimierung der gerätespezifischen Parameter am Tandemmassenspektrometer (Tabelle 8) erfolgten die Messungen der OH-PdG-Addukte per Isotopenverdünnungsanalyse.

Tabelle 7 Gerätebedingungen zur Bestimmung der OH-PdG-Addukte

Säule	Phenomenex Aqua		
Material	C18, 250 mm x 4,6 mm, 5 µm		
Fluss	0,3 ml/min		
Fließmittel	A: Wasser (0,1% HCOOH)		B: Acetonitril
Injektionsvolumina	50 µl (Standardlösungen); 90 µl (Proben)		
Time	Flussrate [ml/min]	Fließmittel A [%]	Fließmittel B [%]
0,05	0,5	98	2
20	0,5	60	40
25	0,7	10	90
32	0,7	10	90
36	0,5	98	2
44	0,5	98	2

Tabelle 8 Gerätespezifische Parameter für die Bestimmung der OH-PdG-Addukte mittels SIVA (API 3200)

DP: Declustering Potential; EP: Entrance Potential; CE: Collision Energy; CEP: Cell Entrance Potential; CXP: Cell Exit Potential; CUR: Curtain Gas; CAD: Collisionally Activated Dissociation; IS: IonSpray Voltage; TEM: Temperature; GS1: Gas 1; GS2: Gas 2

	OH-PdG	OH-[¹⁵ N ₃]-PdG
Q1 [amu]	324,2	329,1
Q3 [amu]	208,3	213,0
Dwell [ms]	150	150
Parameter (Quadrupole)		
DP [V]	41	26
EP [V]	7	6
CE [V]	21	21
CEP [V]	26	20
CXP [V]	4	4
Source/gas (Quelle)		
CUR [psi]	40	
CAD	4	
IS [V]	5500	
TEM [°C]	390	
GS1	40	
GS2	30	

Einen wichtigen Faktor bei dieser Analysenmethode stellt die Linearität zwischen dem Verhältnis der Peakflächen Analyt zu internem Standard und Stoffmengen Analyt zu internem Standard dar. Die Linearität kennzeichnet eine Methode danach, in wie weit sie innerhalb eines bestimmten Konzentrationsbereiches proportional und somit linear ist [Kromidas, 2006].

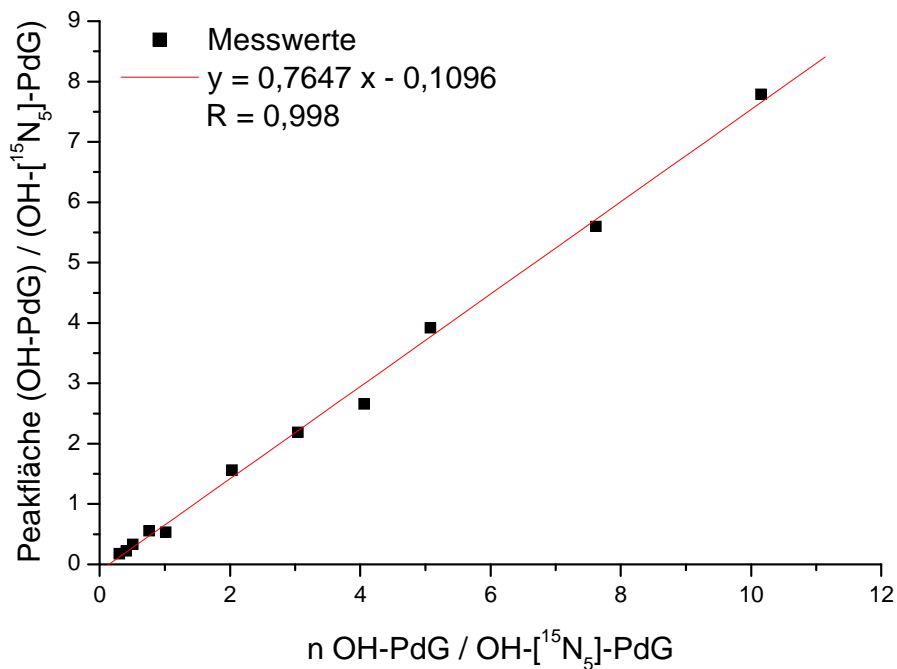


Abbildung 27 Kalibriergerade zur quantitativen Bestimmung von OH-PdG-Addukten mittels SIVA

Zur Überprüfung auf Linearität wurden Standardlösungen erstellt, welche steigende Konzentrationen an Analyten (0,3-10 ng/ml) aber gleichbleibende Menge (1,0 ng/ml) an internem Standard aufwiesen. Tabelle 9 zeigt die Stoffmengen-Verhältnisse und die durch Messung ermittelten Quotienten der jeweiligen Peakflächen.

Tabelle 9 Konzentrationen und Quotienten der Kalibrierreihe der OH-PdG-Addukte

Konzentration OH-PdG [ng/ml]	0,3	0,4	0,5	0,75	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	7,5	10,0
Konzentration OH-[¹⁵N₅]-PdG [ng/ml]	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Peakfläche Analyt / Peakfläche interner Standard	0,18	0,22	0,33	0,56	0,54	1,56	2,19	2,66	3,92	5,60	7,79
Stoffmenge Analyt / Stoffmenge interner Standard	0,30	0,41	0,51	0,76	1,02	2,03	3,05	4,06	5,08	7,62	10,15

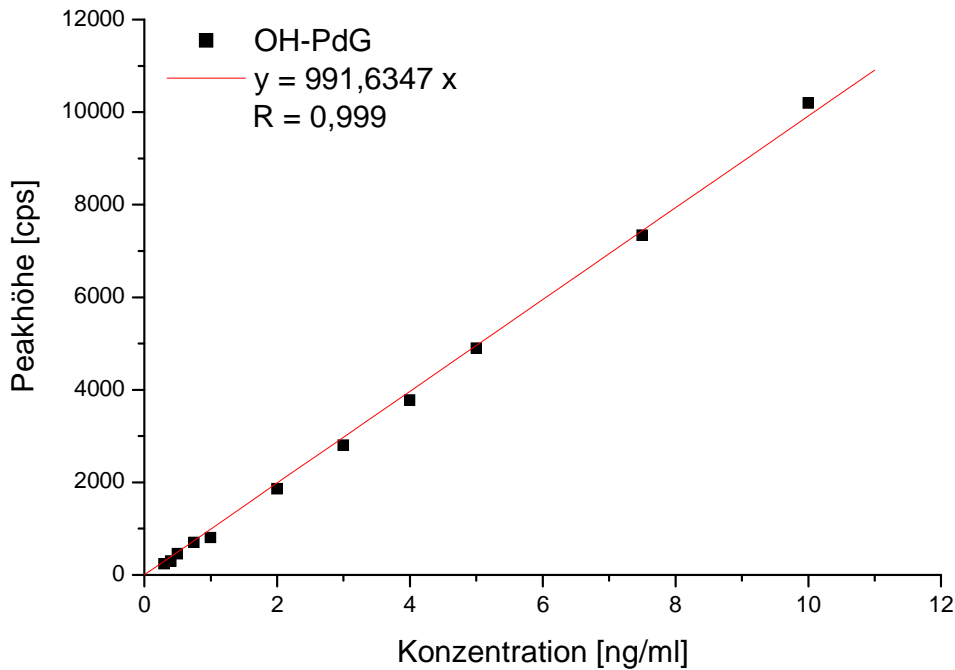


Abbildung 28 Kalibriergerade zur Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen bei der HPLC-ESI-MS/MS-Bestimmung von OH-PdG-Addukten mittels SIVA

Die Nachweisgrenze ist als die kleinste Konzentration einer Verbindung, die mit einem Analyseverfahren noch detektiert werden kann, definiert. Hierbei wird von einem Signal-Rausch-Verhältnis von 3:1 ausgegangen. Die Bestimmungsgrenze ist mit einem Verhältnis von 6:1 meist doppelt so groß und legt den untersten Wert fest, der noch reproduzierbar quantifiziert werden kann [MacDougall & Crummett, 1980].

Aus den Regressionsgeraden der Auftragung der Konzentration gegen die Peakhöhe (Abbildung 28) ließen sich durch Umstellen nach x und Einsetzen des jeweiligen Hintergrundrauschens die zugehörigen Nachweis- und Bestimmungsgrenzen errechnen.

Für die Nachweisgrenze ergibt sich mit $y = 3 \cdot 15 = 45$

$$x = \frac{45}{991,63474} = 0,045 \frac{ng}{ml}$$

Bei einer Injektionsmenge von 50 µl Standardlösung entsprach dies einer absoluten Menge von 7,1 fmol. Mit einer durchschnittlich eingesetzten DNA-Menge von 1,26 mg konnte eine Nachweisgrenze für Standardlösungen von 3 Addukten/10⁸ Nukleotide erhalten werden.

Für die Bestimmungsgrenze ergibt sich mit $y = 6 \cdot 15 = 90$

$$x = \frac{90}{991,63474} = 0,091 \frac{ng}{ml}$$

Bei einem Injektionsvolumen von 50 μ l Standardlösung entsprach dies einer absoluten Menge von 13,9 fmol. Mit einer durchschnittlich eingesetzten DNA-Menge von 1,26 mg konnte eine Bestimmungsgrenze für Standardlösungen von 6 Addukten/ 10^8 Nukleotide errechnet werden.

Schon leichte Temperaturschwankungen im Messraum können die Messgenauigkeit des Massenspektrometers beeinflussen. Um die Variabilitäten zwischen den unterschiedlichen Läufen und an verschiedenen Tagen zu bestimmen, wurde derselbe Standard (1 ng/ml) sowohl dreimal hintereinander an einem Tag, als auch an drei unterschiedlichen Tagen vermessen. Die ermittelten Nachweis- (LOD) und Bestimmungsgrenzen (LOQ) und die Lauf-zu-Lauf- und Tag-zu-Tag-Variabilitäten sind in Tabelle 10 zusammengefasst.

Tabelle 10 LOD (S/R: 3) und LOQ (S/R: 6) der Bestimmung von OH-PdG und Lauf-zu-Lauf und Tag-zu-Tag-Variabilität [%] während der Bestimmung von OH-PdG

	LOD		LOQ		Lauf-zu-Lauf-Variabilität	Tag-zu-Tag-Variabilität
OH-PdG	7,1 fmol	3,0 Addukte/ 10^8 Nukleotide	13,9 fmol	6,0 Addukte/ 10^8 Nukleotide	< 3%	< 5%

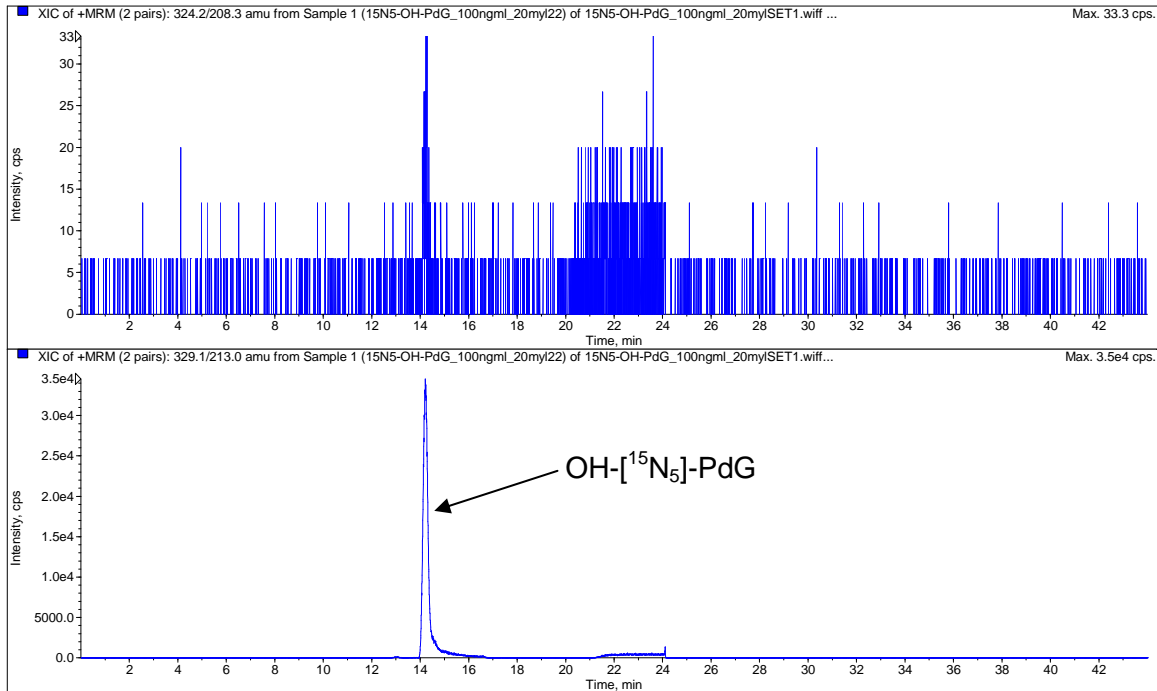


Abbildung 29 Überprüfung der möglichen Beeinflussung des MRM-Übergangs von OH-PdG durch OH-[¹⁵N₅]-PdG

Wie in Abbildung 29 zu erkennen ist, kam es im untersuchten Konzentrationsbereich zu keiner signifikanten Erhöhung des verwendeten MRM-Übergangs von OH-PdG (m/z 324,1 \rightarrow 213,0) durch OH-[¹⁵N₅]-PdG (m/z 329,1 \rightarrow 213,0). Zum Zeitpunkt der Elution des internen Standards zeigte die Ionenspur des Analyten lediglich ein Signal von 30 cps, was in etwa 0,1% der Intensität des internen Standards entspricht und somit als vernachlässigbar angesehen werden konnte. Erklärt werden kann diese Beobachtung mit der Tatsache, dass anscheinend ein geringer Bruchteil aller N-Moleküle des internen Standards nicht ¹⁵N-markiert waren. Beim Vermessen einer entsprechenden unmarkierten Analytlösung wurde eine Beeinflussung der Ionenspur des internen Standards nicht beobachtet.

Abbildung 30 zeigt ein repräsentatives Beispielchromatogramm einer Messung von OH-PdG-Addukten aus einer Leberprobe der Ratte nach Isolierung von DNA.

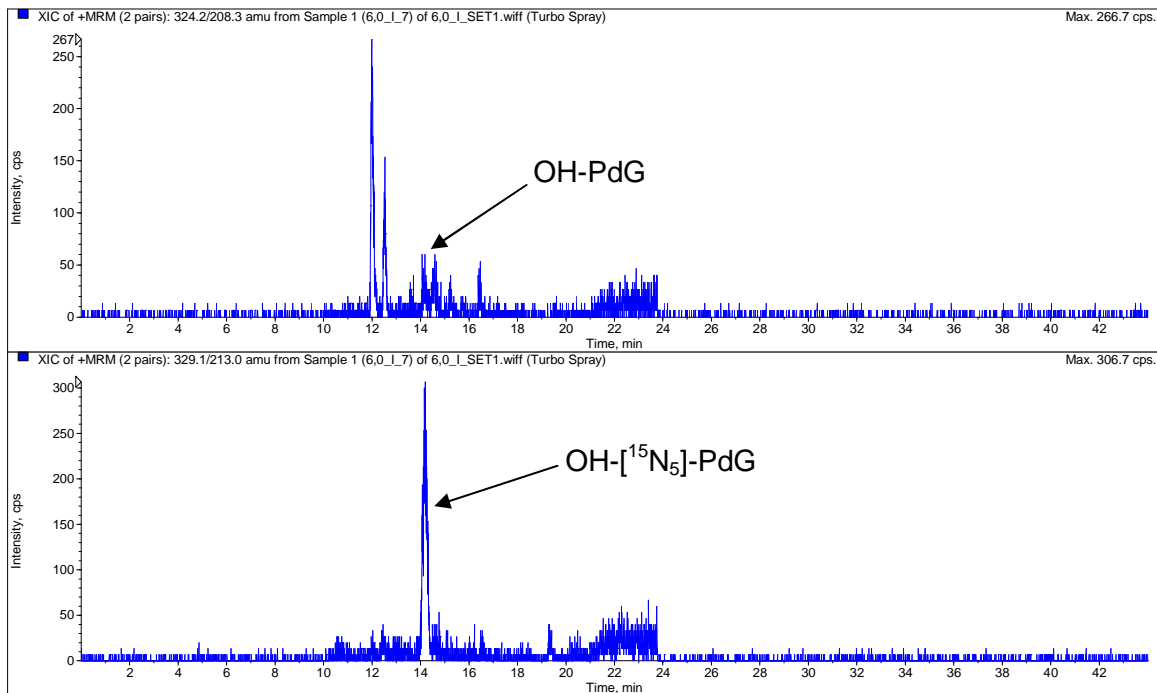


Abbildung 30 Repräsentatives Beispielchromatogramm einer Messung von OH-PdG-Addukten der DNA aus einer Leberprobe der Ratte, die mit Acrylamid (6000 µg/kg KG) behandelt wurde (Details siehe Kapitel 4.3.1.2.2)

4.2 *In vitro* Experimente mit Acrylamid und Acrolein

4.2.1 Acrylamid

4.2.1.1 Inkubation von primären Rattenhepatozyten mit Acrylamid

Die Inkubationsversuche von primären Rattenhepatozyten mit Acrylamid wurden im Rahmen dieser Arbeit in Kooperation mit der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Jan G. Hengstler am Leibniz-Institut für Arbeitsforschung an der TU Dortmund (IfADo) durchgeführt. Die Hepatozyten wurden aus zwei Monate alten männlichen Wistar Ratten isoliert [Schug *et al.*, 2008] und deren Viabilität vor jeder Inkubation bestimmt. Die Viabilität betrug jeweils mindestens $81 \pm 10\%$.

Zur Bestimmung der konzentrations- und zeitabhängigen Bildung der Biomarker für Giftung und Entgiftung während der Inkubation von primären Rattenhepatozyten mit Acrylamid wurden jeweils 15 Millionen Primärzellen mit Konzentrationen von 0,2 µM bis 2000 µM (3000 µM bei Zytotoxizitätsbestimmung) Acrylamid zwischen 0,25 und 24 Stunden bei 37 °C

inkubiert (n = 3). Anschließend wurden Glycidamid und N7-Glycidamid-Guanin-Addukte als Biomarker für Giftung und metabolisch gebildete Glutathion-Addukte (AA-GSH und GA-GSH) und Mercaptursäuren (AAMA und GAMA) als Biomarker der Entgiftung bestimmt.

4.2.1.1.1 Bestimmung der Zytotoxizität von Acrylamid und Glycidamid mittels Resazurin-Reduktionstest in primären Rattenhepatozyten

Die Erfassung der Zellproliferation und zytotoxischer Effekte von Acrylamid und Glycidamid in primären Rattenhepatozyten erfolgte mittels Resazurin-Reduktionstest, der die Reduktion des blauen Resazurin zum pinkfarbenen Resorufin als Farbreaktionstest erfasst (Kapitel 6.5.1.1.5). Die Reduktion verhält sich direkt proportional zur Konzentration an metabolisch gebildeten Intermediaten (unter anderem NADH) und mitochondrialen Aktivität, welche in proliferierenden Zellen in höherer Menge vorhanden sind, als in nicht proliferierenden Zellen. Dadurch kann eine Aussage über die Viabilität der primären Rattenhepatozyten und damit die zytotoxische Wirkung von Acrylamid und Glycidamid auf die Hepatozyten getroffen werden. Die Inkubation der primären Rattenhepatozyten erfolgte in drei unabhängigen Wiederholungen mit Acrylamid und Glycidamid über 24 Stunden bei 37 °C im Konzentrationsbereich von 0,2 bis 3000 µM. Als Negativkontrolle diente die Inkubation mit reinem Zellkulturmedium und als Positivkontrolle die Inkubation mit Saponin (0,1%).

Nach Inkubation der primären Rattenhepatozyten über 24 h mit Acrylamid wurden in dem untersuchten Konzentrationsbereich von 0,2 bis 3000 µM keine signifikanten Effekte auf die Zellviabilität und somit mitochondriale Aktivität der Primärzellen beobachtet (Abbildung 31). Die mittleren Werte für die Viabilität betragen zwischen 76-100% der mediumbehandelten Kontrolle. Acrylamid erwies sich in diesem Primärzellmodell somit als nicht zytotoxisch und konnte für weitere Metabolismusuntersuchungen unter diesen Inkubationsbedingungen eingesetzt werden.

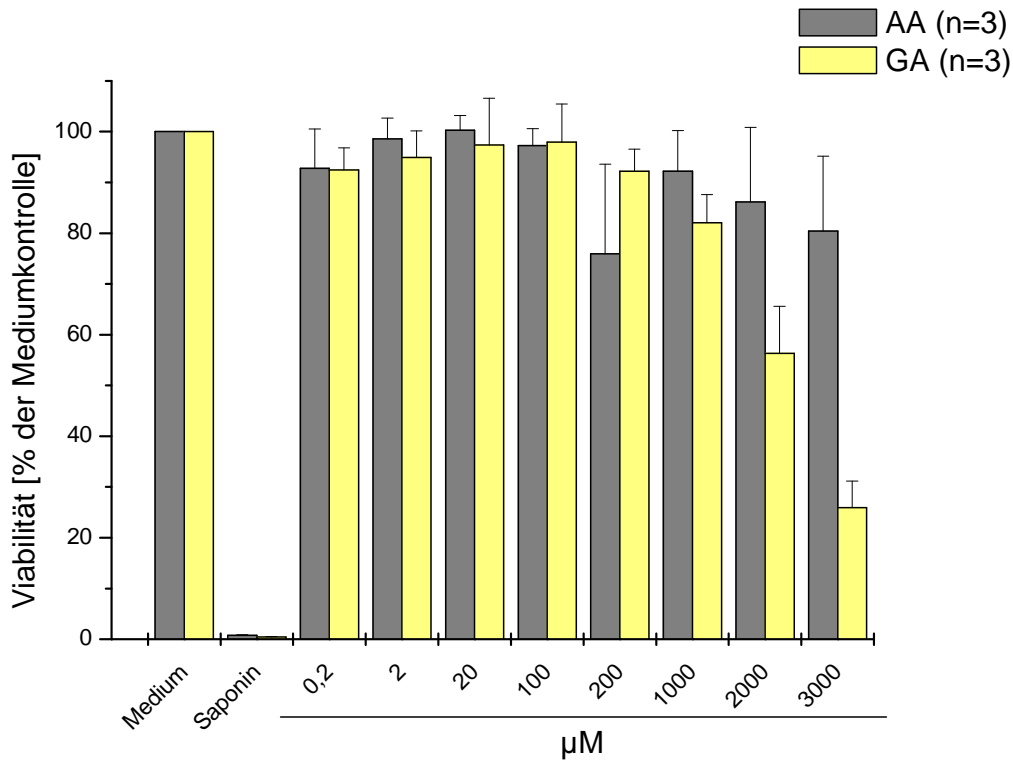


Abbildung 31 Bestimmung der Zytotoxizität von Acrylamid und Glycidamid (0,2 bis 3000 μM) nach Inkubation von primären Rattenhepatozyten über 24 Stunden bei 37 $^{\circ}\text{C}$ (n = 3); *: signifikant unterschiedlich zur Mediumkontrolle ($p < 0,05$); **: signifikant unterschiedlich zur Mediumkontrolle ($p < 0,01$); Saponin diente als Positivkontrolle

Bei der Erfassung zytotoxischer Effekte des Glycidamids konnten nach 24 h Inkubation bis zu einer Konzentration von 200 μM keine signifikanten Effekte auf die Zellviabilität beobachtet werden (92-98% der mediumbehandelten Kontrolle). Ab einer Inkubationskonzentration von 1000 μM Glycidamid kam es zur signifikanten Abnahme der Viabilität auf 82% der mediumbehandelten Kontrolle, welche mit steigender Konzentration immer weiter abnahm: 2000 μM Glycidamid 56% ($p < 0,05$) und 3000 μM Glycidamid 26% ($p < 0,01$). Vergleichbare Ergebnisse konnten Kurebayashi und Mitarbeiter beobachten, die ebenfalls primäre Rattenhepatozyten mit Acrylamid und Glycidamid in steigenden Konzentrationen inkubiert haben und ausschließlich für Glycidamid zytotoxische Effekte im Bereich zwischen 1-3 mM nachweisen konnten [Kurebayashi & Ohno, 2006]. Die durch halblogarithmische Auftragung der Konzentration gegen die Viabilität der Rattenhepatozyten und durch sigmoidaler Kurvenanpassung ermittelte inhibitorische Konzentration (IC_{50} -Wert) betrug für die Inkubation mit Glycidamid 2137 μM und lag somit in dem Bereich, von dem auch Kurebayashi und Mitarbeiter berichteten [Kurebayashi & Ohno, 2006].

Nach Inkubation von primären Rattenhepatozyten über 24 h mit 2000 μM Acrylamid wurde im Inkubationsmedium eine Konzentration von $13,2 \pm 0,2 \mu\text{M}$ metabolisch gebildetem Glycidamid bestimmt (siehe Kapitel 4.2.1.1.2.1), welche unter der im Resazurin-Reduktionstest zytotoxischen Konzentration von 1000 μM Glycidamid lag. Somit konnten Effekte des metabolisch gebildeten Glycidamids auf die Viabilität der Rattenhepatozyten ausgeschlossen werden.

4.2.1.1.2 Bestimmung der Biomarker für die Giftung von Acrylamid

Nach Inkubation von primären Rattenhepatozyten mit 0,2 bis 2000 μM Acrylamid für 24 Stunden bei 37 °C wurden als Biomarker für Giftung die metabolische Bildung von Glycidamid und das daraus resultierende *N7*-GA-Gua-Addukt untersucht. Das metabolisch gebildete Glycidamid wurde aus dem Zellkulturmedium nach Stabilisotopenverdünnung mittels SPE aufgereinigt und aufkonzentriert. Die so vorbereiteten Proben wurden mittels HPLC-ESI-MS/MS (API 3200) vermessen. Die Messung von *N7*-GA-Gua-Addukte erfolgte per Isotopenverdünnung nach Gewinnung der Addukte aus der DNA. Hierzu wurden die Primärzellen mittels Lysepuffer lysiert, die freigewordene DNA extrahiert, gefällt und aufgereinigt (Details siehe Kapitel 6.5.1.1.9). Nach erfolgter neutraler thermischer Hydrolyse und anschließender Größenausschlusszentrifugation konnten die DNA-Addukte gewonnen und mittels HPLC-ESI-MS/MS vermessen werden (API 3200).

4.2.1.1.2.1 **Freies Glycidamid im Zellkulturmedium**

Metabolisch gebildetes Glycidamid konnte bei einer Konzentration von 2 μM Acrylamid und einer Inkubationszeit von 16 h mit einer Konzentration von $0,12 \pm 0,02 \mu\text{M}$ (MW \pm SD) detektiert und quantifiziert werden (Abbildung 32). Die Bildung von Glycidamid durch die primären Rattenhepatozyten zeigte sowohl einen konzentrations- als auch einen zeitabhängigen Anstieg. Nach 24 h Inkubationsdauer lag die Glycidamid-Konzentration im Bereich zwischen $0,12 \pm 0,01 \mu\text{M}$ (Acrylamidinkubation mit 2 μM) und $13,2 \pm 0,2 \mu\text{M}$ (2000 μM Acrylamid). Bei dieser Konzentration konnte bereits nach einer Stunde Inkubationsdauer Glycidamid im Zellkulturmedium mit $0,23 \pm 0,08 \mu\text{M}$ erfasst werden.

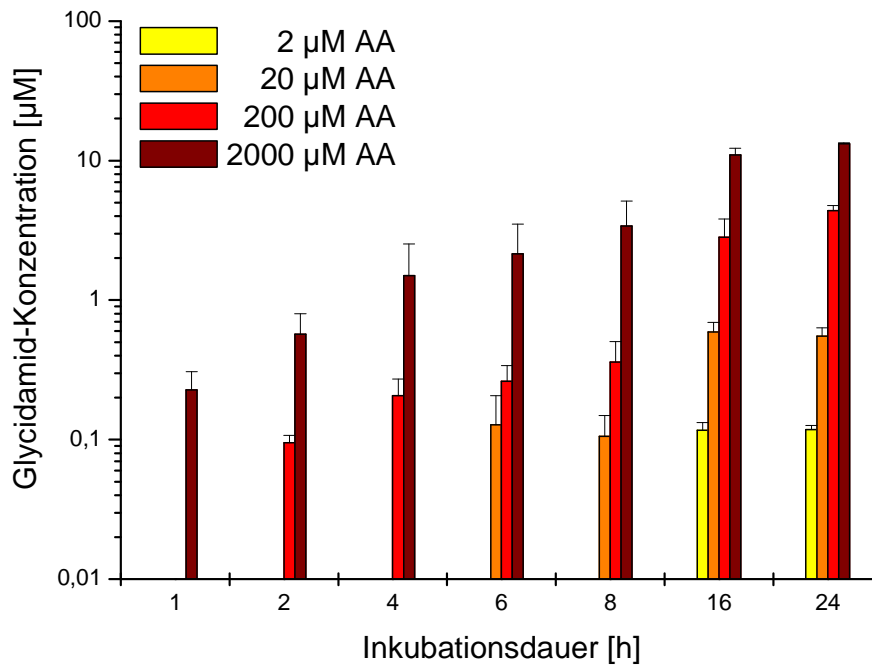


Abbildung 32 Darstellung der Konzentration an freiem Glycidamid [μM] im Zellkulturmedium nach konzentrations- (2 bis 2000 μM) und zeitabhängiger (1 bis 24 h) Inkubation von primären Rattenhepatozyten mit Acrylamid ($n = 3$)

Um die Abhängigkeit von Inkubationsdauer und Glycidamidbildung in primären Rattenhepatozyten zu untersuchen, wurden die Ergebnisse der Inkubation von Rattenhepatozyten mit Acrylamid graphisch aufgetragen. Wie in Abbildung 33 zu erkennen ist, zeigten die Inkubationen von 20 bis 2000 μM ein lineares Verhältnis, was durch zunehmende Korrelationskoeffizienten zwischen 0,882 und 0,983 bestätigt wurde (Tabelle 11).

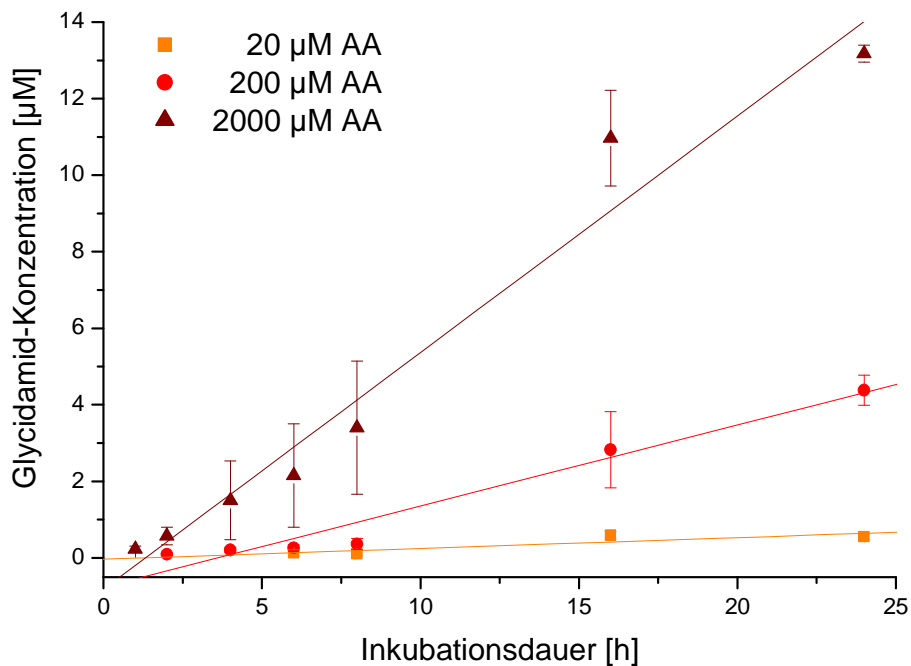


Abbildung 33 Darstellung der Bildungskinetik von Glycidamid nach konzentrations- (20 bis 2000 µM) und zeitabhängiger (1 bis 24 h) Inkubation von primären Rattenhepatozyten mit Acrylamid (n = 3)

Tabelle 11 Zusammenfassung der Daten zur Bildungskinetik von Glycidamid nach Inkubation von primären Rattenhepatozyten mit Acrylamid (n = 3)

Acrylamidkonzentration	Regressionsgerade	Korrelationskoeffizient [R]
20	$y = 0,0282 x - 0,0368$	0,882
200	$y = 0,2117 x - 0,7622$	0,981
2000	$y = 0,6179 x - 0,8140$	0,983

Aus Abbildung 33 und Tabelle 11 geht hervor, dass es mit steigender Acrylamidkonzentration zu einer Zunahme der Steigung der jeweiligen Regressionsgeraden und somit Reaktionsgeschwindigkeit für die CYP450 2E1 vermittelte Bildung von Glycidamid kam. Dies deutete darauf hin, dass die hohe Acrylamidkonzentration von 2000 µM zu keiner vollständigen Sättigung des CYP450 2E1-Metabolismus führte. Die Steigung nahm zwischen 20 und 200 µM Acrylamid Inkubationskonzentration um den Faktor acht und zwischen 200 und 2000 µM Acrylamid um den Faktor drei zu. Die weniger ausgeprägte Zunahme der Steigung darauf schließen, dass es bei einer Inkubationskonzentration von 2000 µM Acrylamid zu einer allmählichen Sättigung des CYP450 2E1-Metabolismus kam.

4.2.1.1.2.2 *N*7-GA-Gua-Addukte aus der DNA von primären Rattenhepatozyten

*N*7-GA-Gua-Addukte konnten ausschließlich in DNA-Proben der Rattenhepatozyten erfasst werden, welche mit einer Konzentration von 2000 μM Acrylamid inkubiert worden waren. In den restlichen Inkubationsansätzen lagen die Adduktkonzentrationen unter der Nachweisgrenze (ein *N*7-GA-Gua-Addukt/ 10^8 Nukleotide). Abbildung 34 zeigt die erzielten Ergebnisse. Es wurden Adduktgehalte (MW \pm SD) von 13 ± 3 Addukte/ 10^8 Nukleotide nach 6 h sowie bis 54 ± 18 Addukte/ 10^8 Nukleotide nach 24 h Inkubation ermittelt. Die höchsten Adduktgehalte wurden nach 16 h mit 127 ± 60 Addukten/ 10^8 Nukleotide gefunden.

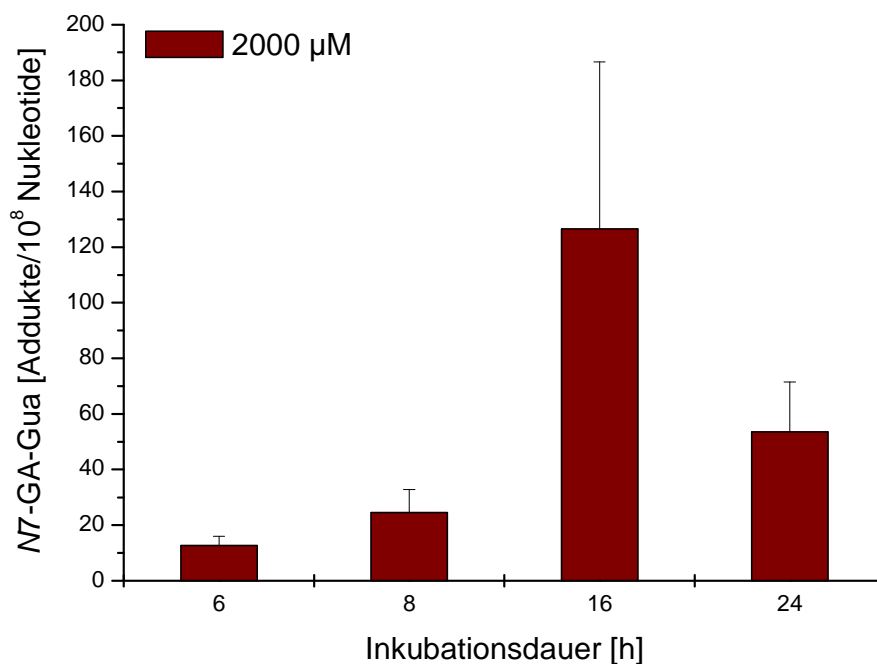


Abbildung 34 Zeitabhängige Bildung von *N*7-GA-Gua-Addukten/ 10^8 Nukleotide in der DNA von primären Rattenhepatozyten nach einmaliger Inkubation mit 2000 μM Acrylamid über 6 bis 24 h (n = 3)

Diese Ergebnisse decken sich mit Befunden aus früheren Arbeiten aus der Arbeitsgruppe Eisenbrand (Fachbereich Chemie, Fachrichtung Lebensmittelchemie und Toxikologie, Kaiserslautern), bei denen weibliche SD-Ratten einmalig mit 1-10 mg Acrylamid/kg KG per Schlundsonde behandelt wurden. Die Untersuchung der Reaktionskinetik ergab nach 16 h ebenfalls die höchste Adduktmenge in Leber-, aber auch in Nieren- und Lungengewebe (Leber: 123 ± 25 Addukte/ 10^8 Nukleotide; Niere: 237 ± 61 Addukte/ 10^8 Nukleotide; Lunge: 216 ± 42 Addukte/ 10^8 Nukleotide) [Feld, 2010].

Verglichen mit anderen DNA-Addukten sind *N*7-GA-Gua-Addukte relativ instabil. Dies kann möglicherweise damit erklärt werden, dass es nach Adduktbildung von Glycidamid mit dem

N7 der DNA-Base zu einer formellen positiven Ladung am Guaninringsystem kommt. Hierdurch können weitere Reaktionen wie zum Beispiel Öffnung des Imidazolrings und Überführung in das Formamidopyrimidin-Isomer, sowie eine spontane Depurinierung aus der DNA ablaufen. Dies würde die Ausbeute an DNA-Addukten, die durch NTH freigesetzt werden würden, erniedrigen. In Untersuchungen zur NTH (pH 7, 37 °C) konnte gezeigt werden, dass die Depurinierung von *N7*-Me-Gua etwa 10^6 -mal schneller abläuft, als die von Guanin [Gates et al., 2004].

Ein weiterer Faktor, der bei der Betrachtung der Reaktionskinetik berücksichtigt werden muss, ist die Möglichkeit der DNA-Reparatur. Ein längerer Inkubationszeitraum erhöht die Möglichkeit zur effektiveren DNA-Reparatur (siehe Kapitel 2.3.3). Frühere *in vitro* Untersuchungen zur Reparatur der *N7*-GA-Gua-Addukte in V79-Zellen zeigten, dass Strangbrüche, die durch 100 µM Glycidamid verursacht wurden, nach 4 h Nachkultivierung mit Glycidamid-freiem Zellkulturmedium nahezu vollständig repariert wurden (rund 80%) [Baum et al., 2008]. Die Halbwertszeit der *N7*-GA-Gua-Bildung betrug in diesem Versuch 14 h und ist damit mit den Daten zur Halbwertszeit von Boysen und Mitarbeitern vergleichbar, die von einer Halbwertszeit von 2 bis 150 h berichteten [Boysen et al., 2009]. Allerdings ist die Halbwertszeit der vorliegenden Arbeit im Vergleich zu den Daten von Baum und Mitarbeitern erhöht [Baum et al., 2008]. Dies könnte damit erklärt werden, dass bei dem Experiment von Baum und Mitarbeitern mit Glycidamid-freiem Medium nachinkubiert wurde, bei der Inkubation der Rattenhepatozyten mit Acrylamid im Rahmen der vorliegenden Arbeit hingegen stets neue *N7*-GA-Gua-Addukte nachgebildet werden konnten.

4.2.1.1.3 Bestimmung der Biomarker für die Entgiftung

Als Biomarker für hepatische Entgiftung wurden einerseits die GSH-Addukte von Acrylamid und Glycidamid, andererseits deren Abbauprodukte, die Mercaptursäuren AAMA und GAMA im Zellkulturmedium bestimmt. Die Kopplung an Glutathion und der anschließende Abbau zu den Mercaptursäuren gilt als der effektivste Entgiftungsmechanismus für Acrylamid. Hierbei spielt der α,β -ungesättigte Charakter eine wichtige Rolle, da Acrylamid als Elektrophil gut mit Thiolgruppen, wie zum Beispiel mit der des Glutathions, reagieren kann. Auf diesem Weg werden in Ratten etwa 60% der Acrylamiddosis konjugiert und nach Abbau zur entsprechenden Mercaptursäure innerhalb von 24 h ausgeschieden [Berger et al., 2011]. Glycidamid hingegen reagiert zwar ebenfalls bevorzugt mit Nukleophilen, jedoch ist die Reaktionsgeschwindigkeit und -affinität wesentlich geringer.

Sowohl die GSH-Addukte, als auch die MA wurden aus dem Zellkulturmedium nach Stabilisotopenverdünnung mittels SPE aufgereinigt und aufkonzentriert und im Anschluss

mittels HPLC-ESI-MS/MS (API 3200) vermessen. Die Bildung von GSH-Addukten stellt eine wichtige Möglichkeit eines Organismus dar, Acrylamid beziehungsweise metabolisch gebildetes Glycidamid zu entgiften und war somit für die Untersuchung der giftenden und entgiftenden Stoffwechselwege in primären Rattenhepatozyten geeignet.

4.2.1.1.3.1 Glutathionaddukte von Acrylamid und Glycidamid im Zellkulturmedium

Eine Bildung von AA-GSH ($5,2 \pm 0,4$ nM) im Zellkulturmedium nach Inkubation mit Acrylamid konnte bereits bei einer Inkubationskonzentration von $0,2 \mu\text{M}$ und 4 h Inkubationszeit beobachtet werden. Mit steigender Acrylamidkonzentration nahm die Inkubationszeit zur Detektion von GSH-Addukten bis auf $0,25$ h ab. Die Bildung von AA-GSH-Addukten zeigte in den Primärzellen sowohl eine Konzentrationsabhängigkeit als auch eine Zeitabhängigkeit (Abbildung 35). Eine 24 stündige Inkubation mit $0,2 \mu\text{M}$ Acrylamid führte zur Bildung von $0,02 \pm 0,002 \mu\text{M}$ AA-GSH, jene mit $2000 \mu\text{M}$ lieferte nach 24 Stunden $15,7 \pm 0,7 \mu\text{M}$ AA-GSH. Schon nach einer Inkubationszeit von 15 min ($0,25$ h) waren bei einer eingesetzten Menge von $2000 \mu\text{M}$ Acrylamid $0,24 \pm 0,04 \mu\text{M}$ AA-GSH entstanden.

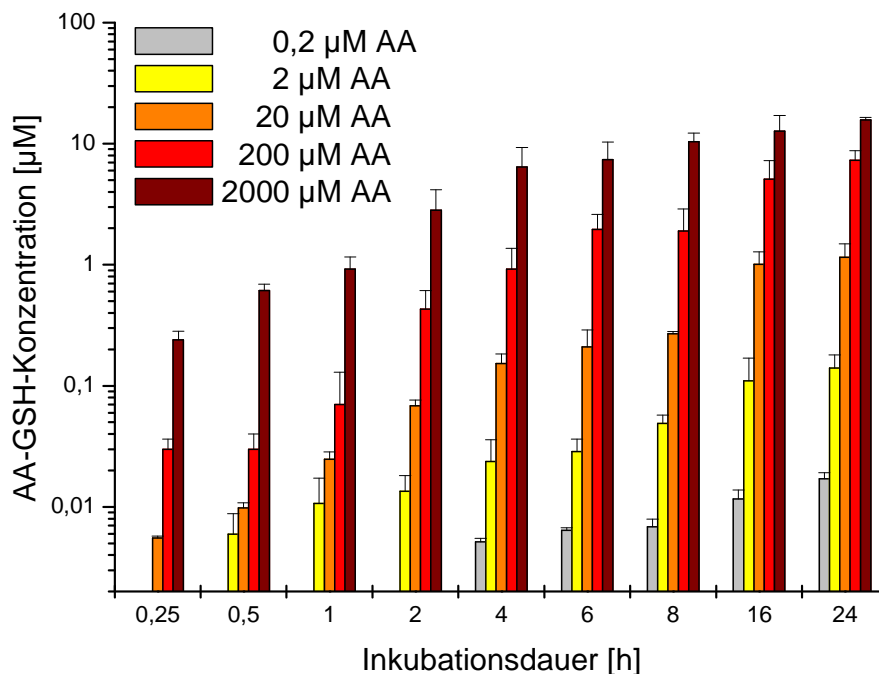


Abbildung 35 Darstellung der gebildeten AA-GSH-Addukte (μM) im Zellkulturmedium nach Konzentrations- ($0,2$ bis $2000 \mu\text{M}$) und zeitabhängiger (15 min bis 24 h) Inkubation von primären Rattenhepatozyten mit Acrylamid ($n = 3$)

Aufgrund des Fehlens eines stabilisotopenmarkierten GA-GSH-Standards und der relativ großen Variabilität bei der Wiederfindung nach SPE-Aufarbeitung war es im Rahmen dieser Arbeit ausschließlich möglich, GA-GSH qualitativ zu erfassen [Scherbl, 2011]. Untersuchungen des Inkubationsmediums auf metabolisch gebildetes Glycidamid zeigten eine Bildung bei einer Acrylamidkonzentration von 2 μM und einer Inkubationszeit von 16 h (siehe Kapitel 4.2.1.1.2.1). Die Analyse von GA-GSH ergab, dass es ebenfalls nach 16 h bei 2 μM Acrylamidkonzentration gebildet und analytisch erfasst werden konnte. Anhand des Hard-Soft-Acid-Base-Konzepts nach Pearson ist die Thiol-Reaktivität von Acrylamid im Vergleich zu Glycidamid größer [Ayers *et al.*, 2006], was bedeutet, dass die AA-GSH-Addukte wesentlich schneller als die GA-GSH-Addukte gebildet werden müssten. Dies konnte durch die Ergebnisse dieser Arbeit nicht eindeutig bestätigt werden, da die GA-GSH-Addukte während der gleichen Inkubationsbedingungen (Dauer und Acrylamidkonzentration) zu freiem Glycidamid im Zellkulturmedium analytisch erfasst wurden. Eine mögliche Erklärung dafür wäre die Tatsache, dass es sich bei der Konjugationsreaktion von Acrylamid beziehungsweise Glycidamid mit GSH um enzymatische Reaktionen handelt, die durch GST katalysiert werden. Dies kann dazu führen, dass sich die Reaktionsgeschwindigkeiten der GSH-Kopplung von Acrylamid und Glycidamid nicht mehr signifikant unterscheiden, so wie es hier beobachtet werden konnte. Die Befunde decken sich mit den Untersuchungen von Berger und Mitarbeitern, die lediglich 0,6-3,4% einer gegebenen Acrylamiddosis als freies Glycidamid im 24 h-Sammelurin von Ratten gefunden haben, die mit Acrylamiddosen von 0,1; 0,45; 0,9 und 10 mg/kg KG behandelt wurden. Demgegenüber wurden 46,1 bis 60,7% der verabreichten Dosis als MA (AAMA + GAMA) erfasst [Berger *et al.*, 2011].

Durch die erhaltenen Ergebnisse konnte die effektive Entgiftung von Acrylamid und Glycidamid via GSH-Konjugation auch mit einem *in vitro* Modell an primären Rattenhepatozyten bestätigt werden.

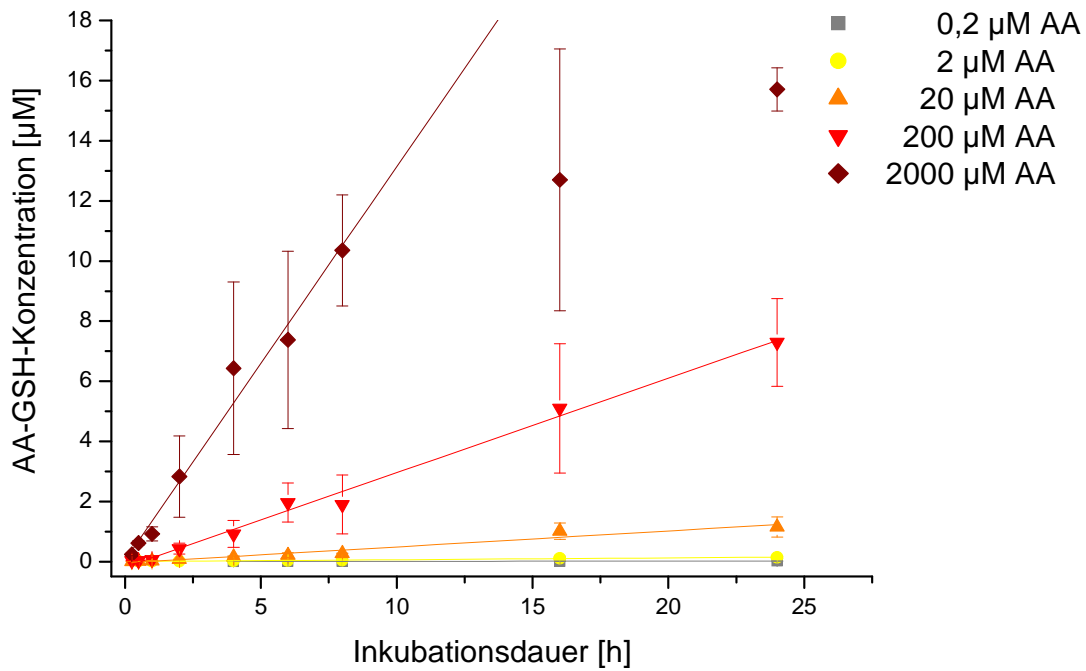


Abbildung 36 Bestimmung der Bildungskinetik von AA-GSH nach konzentrations- (0,2 bis 2000 µM) und zeitabhängiger (15 min bis 24 h) Inkubation bis 24 h von primären Rattenhepatozyten mit Acrylamid (n = 3)

Um die Abhängigkeit von Inkubationsdauer und AA-GSH-Bildung in primären Rattenhepatozyten zu untersuchen, wurden die Inkubationsergebnisse graphisch aufgetragen. Wie in Abbildung 36 zu erkennen ist, zeigten die AA-GSH-Gehalte im Bereich von 0,2-200 µM Acrylamid eine lineare Abhängigkeit, was durch Korrelationskoeffizienten von $R > 0,978$ bestätigt wurde (Tabelle 12). Darüber hinaus nahm die Reaktionsgeschwindigkeit mit steigenden Inkubationskonzentrationen zu, was durch die Zunahme der Steigung der Regressionsgeraden von 0,0006 bei 0,2 µM Acrylamid bis 1,3097 für die 2000 µM Acrylamidinkubation gekennzeichnet ist. Jedoch konnte bei 2000 µM Acrylamid eine lineare Abhängigkeit ($R = 0,990$) ausschließlich bis zu einer Inkubationsdauer von 8 h beobachtet werden. Über diese Zeit hinaus ist die Bildung nicht mehr linear abhängig von der Inkubationsdauer, was möglicherweise auf eine Depletion des GSH-Vorrats der Rattenhepatozyten oder einer Sättigung der GST durch die hohen Konzentrationen an Acrylamid schließen lässt.

Tabelle 12 Übersicht über die Bildungskinetik von AA-GSH nach Inkubation von primären Rattenhepatozyten mit Acrylamid über 24 h (0,2 bis 2000 μM ; n = 3); *: bis 8 h ermittelt

Acrylamid [μM]	Regressionsgerade	Korrelationskoeffizient [R]
0,2	$y = 0,0006 x + 0,0025$	0,997
2	$y = 0,0060 x + 0,0015$	0,992
20	$y = 0,0530 x - 0,0410$	0,978
200	$y = 0,3143 x - 0,1870$	0,996
2000	$y = 1,3097 x + 0,0396$	0,990 (*)

Ein Hepatozyt hat einen GSH-Status von etwa 1-10 mM [Marquardt & Schäfer, 2008] bei einem Volumen von $11500 \mu\text{m}^3$ [David, 1979]. Bei einer Anzahl von 5 Millionen Zellen entspricht dies einem Gesamtvolumen von 58 mm^3 . Wird der GSH-Status pro Hepatozyt auf das Gesamtvolumen der 5 Millionen inkubierten Hepatozyten bezogen, so beträgt die absolute Stoffmenge an GSH zwischen 57 und 570 nmol. Bei der Inkubation mit $2000 \mu\text{M}$ Acrylamid über 16 h konnte eine absolute AA-GSH-Konzentration von 127 nmol bestimmt werden. Dieser Wert liegt im Bereich des in der Literatur beschriebenen GSH-Status von Hepatozyten. Im Gegensatz zur CYP 450 2E1 vermittelten Epoxidierung von Acrylamid (Kapitel 4.2.1.1.2.1) deutet dies darauf hin, dass das Abflachen der Bildungskinetik bei dieser Konzentration tatsächlich auf eine allmähliche Depletion des GSH zurückzuführen sein könnte.

4.2.1.1.3.2 Bestimmung der Mercaptursäuren im Zellkulturmedium nach Inkubation von primären Rattenhepatozyten mit Acrylamid

Ab einer Inkubationskonzentration von $2 \mu\text{M}$ Acrylamid und einer Inkubationsdauer von 16 h war es möglich, AAMA mit einer Konzentration von $5,7 \pm 0,7 \text{ nM}$ zu detektieren. GAMA hingegen konnte erst ab einer eingesetzten Acrylamidkonzentration von $20 \mu\text{M}$ und 8 h Inkubationsdauer mit $4,8 \pm 1,8 \text{ nM}$ erfasst werden. Sowohl AAMA als auch GAMA zeigten eine konzentrations- und zeitabhängige Bildung (Abbildung 37). So nahm die Konzentration von AAMA über 24 h Inkubation von $7,2 \pm 0,6 \text{ nM}$ ($2 \mu\text{M}$ Acrylamid) bis $2,1 \pm 0,1 \text{ nM}$ ($2000 \mu\text{M}$ Acrylamid) zu. Jene für GAMA stieg von $5,5 \pm 1,9 \text{ nM}$ ($20 \mu\text{M}$ Acrylamid) auf $39,2 \pm 4,5 \text{ nM}$ ($2000 \mu\text{M}$ Acrylamid). Der in diesem Versuch früheste Zeitpunkt der Erfassung von AAMA war nach 2 h Inkubation ($2000 \mu\text{M}$) mit einer Endkonzentration im

Zellkulturmedium von $6,1 \pm 1,1$ nM. Verglichen mit den Ergebnissen der AA-GSH-Bildung (Kapitel 4.2.1.1.3.1) fiel auf, dass die MA (speziell AAMA) als Abbauprodukt der GSH-Addukte erheblich später in viel niedrigerer Konzentration und erst bei höheren Inkubationskonzentrationen nachzuweisen waren. Dies lässt sich auf die sich anschließenden enzymatischen Reaktionen, für die Reaktion vom GSH-Addukt zur MA, zurückführen (γ -Glutamyltranspeptidase, Aminopeptidase, Acetyltransferase), die im Organismus bevorzugt in der Niere stattfinden (Kapitel 2.2.5.2.2).

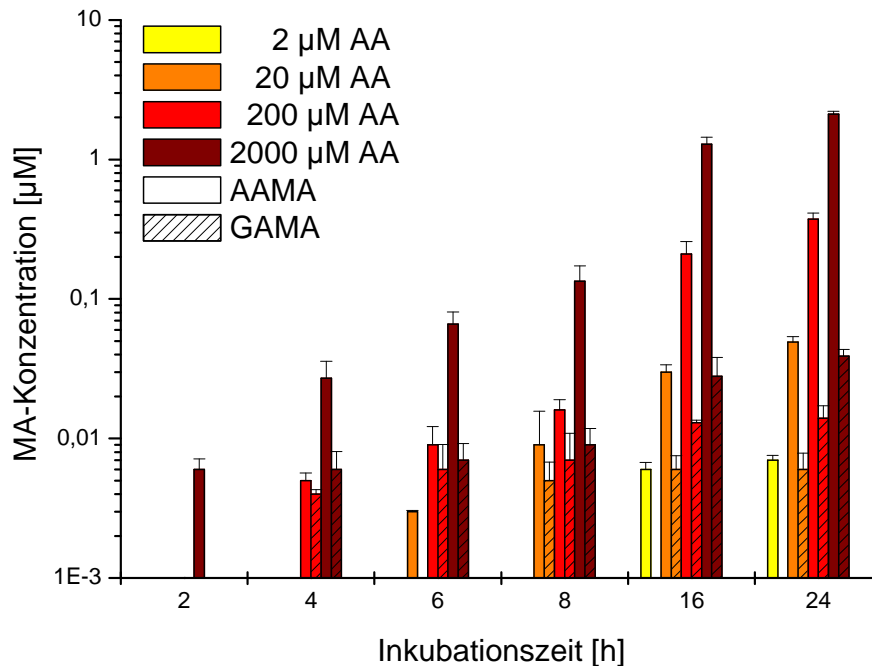


Abbildung 37 AAMA- und GAMA-Konzentration [µM] im Zellkulturmedium nach konzentrations- (2 bis 2000 µM) und zeitabhängiger (2 bis 24 h) Inkubation von primären Rattenhepatozyten mit Acrylamid (n = 3)

In Abbildung 38 und Abbildung 39 sind die Abhängigkeiten der AAMA- und GAMA-Bildung von Inkubationsdauer und -konzentration dargestellt. Anhand der in Tabelle 13 angegebenen Korrelationskoeffizienten der linearen Regression lässt sich im Bereich der Inkubationskonzentrationen von 20-2000 µM Acrylamid eine lineare Abhängigkeit erkennen. Wie schon bei der Bildung von Glycidamid und AA-GSH kam es auch bei der metabolischen Bildung von AAMA und GAMA zu einer Zunahme der Bildungsgeschwindigkeit mit steigender Acrylamidkonzentration.

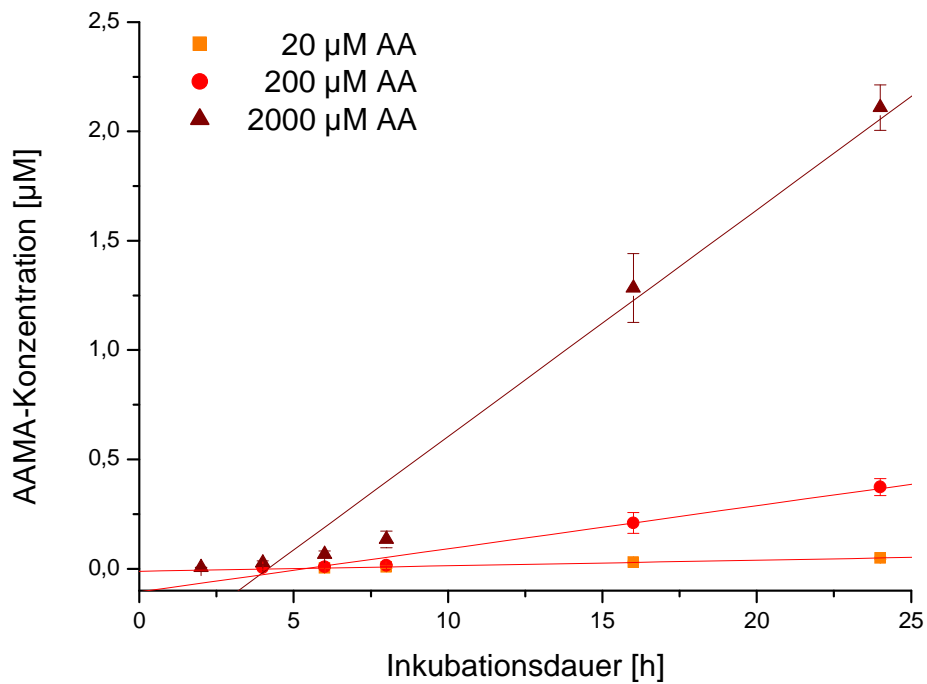


Abbildung 38 Darstellung der Abhängigkeit der AAMA-Bildungskinetik von Konzentration (20 bis 2000 µM) und Zeit (2 bis 24 h) der Inkubation von primären Rattenhepatozyten mit Acrylamid (n = 3)

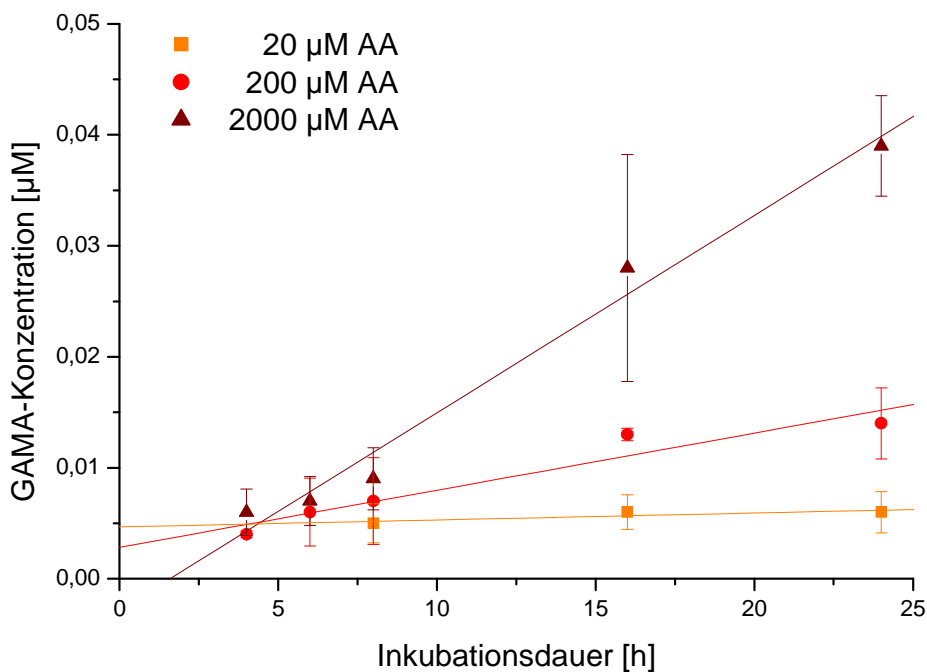


Abbildung 39 Darstellung der Abhängigkeit der GAMA-Bildungskinetik von Konzentration (20 bis 2000 µM) und Zeit (4 bis 24 h) der Inkubation von primären Rattenhepatozyten mit Acrylamid (n = 3)

Tabelle 13 Übersicht über die Bildungskinetik von AAMA und GAMA nach Inkubation von primären Rattenhepatozyten mit Acrylamid (20 bis 2000 μM ; n = 3)

Acrylamid [μM]	AAMA		GAMA	
	Regressions- gerade	Korrelations- koeffizient [R]	Regressions- gerade	Korrelations- koeffizient [R]
20	$y = 0,0026 x - 0,0117$	0,999	$y = 0,0001 x + 0,0047$	0,866
200	$y = 0,0197 x - 0,1055$	0,989	$y = 0,0005 x + 0,0028$	0,962
2000	$y = 0,1037 x - 0,4323$	0,981	$y = 0,0018 x - 0,0028$	0,991

Das Verhältnis GAMA zu AAMA (GAMA/AAMA) lässt Rückschlüsse auf die Effektivität der giftenden und entgiftenden Stoffwechselwege im Organismus aber auch in den primären Rattenhepatozyten zu. Abbildung 40 zeigt die GAMA/AAMA-Verhältnisse für die Inkubationskonzentrationen von 20-2000 μM Acrylamid graphisch dargestellt. Die Kurvenverläufe deuten an, dass es mit zunehmender Inkubationszeit, aber auch mit steigender Inkubationskonzentration zu einer Abnahme der GAMA/AAMA-Verhältnisse kam. Das MA-Verhältnis sank einerseits für die 2000 μM Inkubation von $0,28 \pm 0,15$ nach 4 h auf $0,02 \pm 0,002$ nach 24 h, andererseits nahm das GAMA/AAMA-Verhältnis bei der 24 h Inkubation von $0,12 \pm 0,05$ (20 μM Acrylamid) über $0,04 \pm 0,01$ (200 μM Acrylamid) auf $0,02 \pm 0,002$ (2 μM Acrylamid) ab.

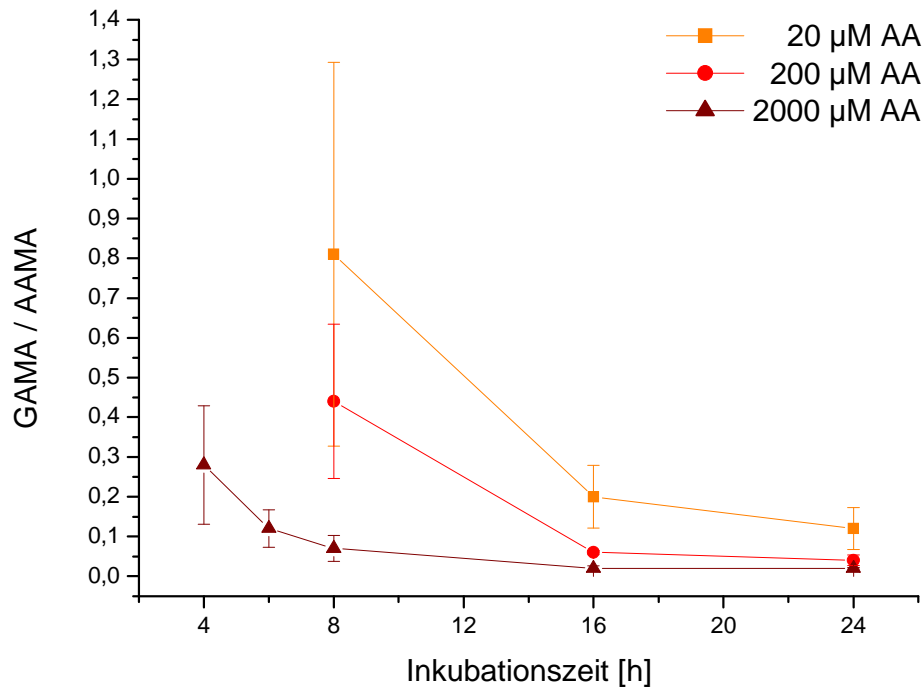


Abbildung 40 Bestimmung des GAMA/AAMA-Verhältnisses nach konzentrations- (20 bis 2000 µM) und zeitabhängiger (4 bis 24 h) Inkubation von primären Rattenhepatozyten mit Acrylamid (n = 3)

Die Abnahme des GAMA/AAMA-Verhältnisses mit steigender Inkubationsdauer lässt sich möglicherweise mit den unterschiedlichen Bildungsgeschwindigkeiten von AAMA und GAMA erklären. Betrachtet man die Steigungen der jeweiligen Regressionsgeraden (Abbildung 38 und Abbildung 39) so fällt auf, dass die Bildung von AAMA schneller als jene von GAMA verläuft (Tabelle 13). Hinzu kommt, dass zur Bildung von GAMA im Vergleich zu AAMA ein zusätzlicher Schritt, die metabolische Aktivierung zu Glycidamid notwendig ist. Die Abnahme des GAMA/AAMA-Verhältnisses mit steigender Inkubationszeit reflektiert eine relativ gleichbleibende oder verminderte Glycidamidbildung bei steigender Acrylamidkonzentration (Tabelle 13). Bei niedrigeren Inkubationskonzentrationen wird verhältnismäßig mehr Glycidamid als bei höheren Konzentrationen gebildet. Das deutet darauf hin, dass die CYP 450-abhängige Glycidamidbildung langsamer abläuft, als die vermutlich GST-vermittelte GSH-Kopplung. Außerdem könnte eine allmähliche Sättigung der enzymatischen Kapazität des Glycidamidmetabolismus (Phase I) ebenfalls zur Abnahme des GAMA/AAMA-Verhältnisses beigetragen haben.

4.2.1.1.4 Korrelation der Kinetik der AA-GSH-Bildung mit der Glycidamidbildung

Die Korrelation der Bildung von AA-GSH mit der Glycidamidbildung lässt Rückschlüsse auf das Verhältnis von Giftung und Entgiftung von Acrylamid in diesem *in vitro* Experiment an primären Rattenhepatozyten zu.

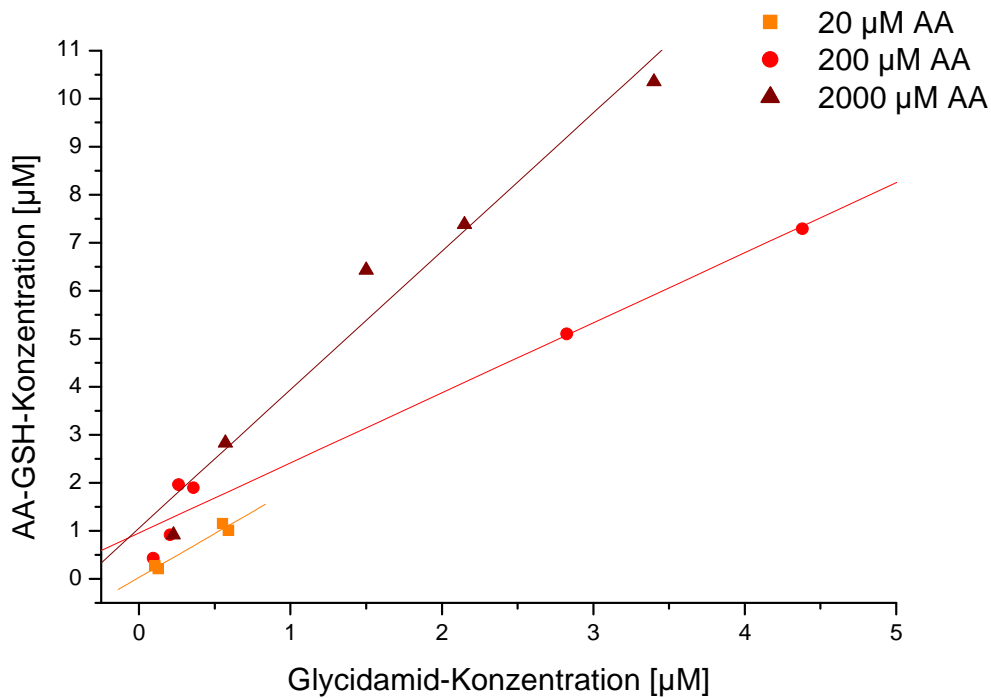


Abbildung 41 Zusammenhang zwischen der Glycidamidkonzentration (μM) im Vergleich zur AA-GSH-Adduktkonzentration (μM) nach Inkubation von primären Rattenhepatozyten ($n = 3$) mit Acrylamid (20 bis 2000 μM)

Abbildung 41 zeigt die Korrelation der AA-GSH-Bildung mit der Glycidamidbildung für die Ergebnisse aus den Versuchen mit Inkubationskonzentrationen von 20-2000 μM Acrylamid. Wie an den Korrelationskoeffizienten von $> 0,981$ (Tabelle 14) zu erkennen ist, lässt sich ein linearer Zusammenhang zwischen der Glycidamid- und der AA-GSH-Bildung ableiten.

Tabelle 14 Übersicht über das Verhältnis der Bildung von Glycidamid im Vergleich zur Bildung von AA-GSH-Addukten nach Inkubation von primären Rattenhepatozyten mit Acrylamid (20 bis 2000 μM ; n = 3)

Acrylamid [μM]	Regressionsgerade	Korrelationskoeffizient [R]
20	$y = 1,8210 x + 33,1193$	0,981
200	$y = 1,4583 x + 957,7635$	0,984
2000	$y = 2,8820 x + 1058,1820$	0,982

Mittels der Steigungen der Regressionsgeraden ist es außerdem möglich, die Geschwindigkeiten der Bildung von Glycidamid und AA-GSH zu vergleichen. Die Steigungen der jeweiligen Ausgleichsgeraden bewegten sich zwischen 1,82 und 2,88, was verdeutlicht, dass die GST-vermittelte Bildung von AA-GSH-Addukten schneller als die CYP450 2E1 katalysierte Epoxidierung von Acrylamid zu Glycidamid verläuft. Daraus lässt sich ebenfalls ableiten, dass die Entgiftungswege von Acrylamid in primären Rattenhepatozyten schneller und effektiver verlaufen als die Giftung von Acrylamid zu Glycidamid. Diese Befunde decken sich mit den *in vivo* Ergebnissen aus Kapitel 4.3.1.1.1 die belegen, dass die GAMA/AAMA-Verhältnisse in der Ratte stets einen Überschuss an AAMA im Vergleich zu GAMA aufwiesen. Außerdem konnten Berger und Mitarbeiter erst vier Stunden nach Behandlung von männlichen SD-Ratten mit 100 μg Acrylamid/kg KG ausschließlich geringe Mengen an Glycidamid (0,4 μM) in deren Blut nachweisen. Metabolisch gebildetes Glycidamid wird ebenfalls effektiv durch Bindung an GSH inaktiviert, was in Kapitel 4.2.1.1.3.1 bereits erläutert wurde.

4.2.2 Acrolein

4.2.2.1 Untersuchung zur Acrolein-konzentrationsabhängigen DNA-Adduktbildung

Zur Untersuchung der konzentrationsabhängigen Adduktbildung von Acrolein mit DNA wurden 100 μg bis 1000 μg Salmon Testes-DNA mit unterschiedlichen Acroleinkonzentrationen von 0,2 μM bis 2000 μM im temperierbaren Schüttler über 24 Stunden bei 37 $^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Nach enzymatischer Hydrolyse und Aufreinigung über Festphasenextraktion wurden die Proben mittels HPLC-ESI-MS/MS vermessen. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Abbildung 42 graphisch dargestellt.

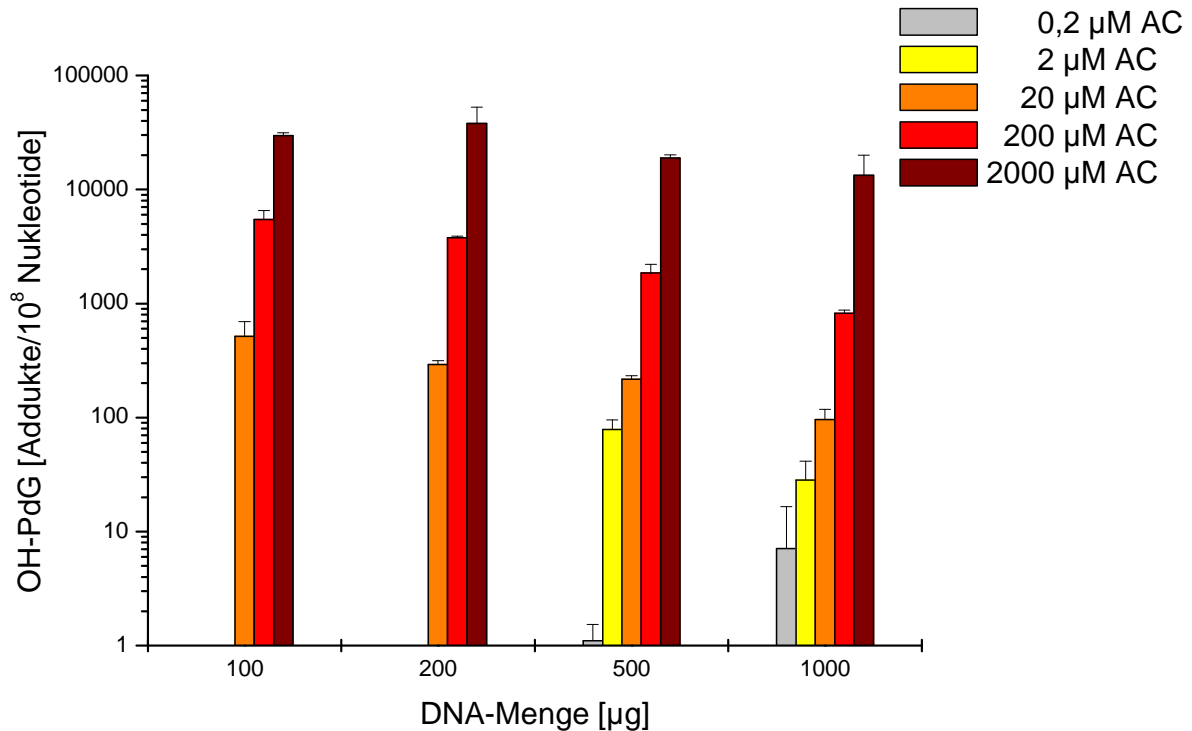


Abbildung 42 Darstellung der gebildeten OH-PdG-Addukte/10⁸ Nukleotide nach konzentrationsabhängiger Inkubation von DNA (100 bis 1000 µg) mit Acrolein (0,2 bis 2000 µM; n = 3)

In Abbildung 42 ist eine konzentrationsabhängige Adduktbildung von Acrolein mit Salmon Testes-DNA erkennbar. Ab einer Konzentration von 0,02 µM Acrolein und einer DNA-Menge von 500 µg konnten OH-PdG-Addukte nachgewiesen, aber nicht quantifiziert werden. Ab 0,2 µM Acrolein und 500 µg DNA konnten 1,1 ± 0,4 Addukte/10⁸ Nukleotide quantifiziert werden. Die Addukt mengen für α- und γ-OH-PdG beliefen sich bei 100 µg DNA im Bereich von 500 bis 29000 Addukten/10⁸ Nukleotide und bei 200 µg DNA im Bereich von 300 bis 38000 Addukten/10⁸ Nukleotide. Bei der Inkubation mit 500 µg DNA konnten Addukt mengen zwischen einem und 19000 Addukten/10⁸ Nukleotide und bei einer DNA-Menge von 1000 µg von sieben bis 13000 Addukten/10⁸ Nukleotide verzeichnet werden. Neben dem eindeutigen konzentrationsabhängigen Anstieg der gebildeten OH-PdG-Addukte bei konstanter DNA-Menge ließ sich kein eindeutiger Zusammenhang der Bildung von OH-PdG-Addukten bei konstanter Acroleinkonzentration und variierender DNA-Menge erkennen.

Werden diese Ergebnisse mit denen von früheren Arbeiten der Arbeitsgruppe Eisenbrand verglichen, bei denen in einem ähnlichen Experiment Glycidamid mit Salmon Testes-DNA inkubiert wurde (Abbildung 43), so lässt sich ein Unterschied in den jeweiligen Adduktraten erkennen, was sich im Quotienten *N7*-GAGua/OH-PdG widerspiegelt (Tabelle 15). Wie

schon bei Bildung der OH-PdG-Addukte, konnte bei den *N7*-GA-Gua-Addukten ebenfalls eine Konzentrationsabhängigkeit beobachtet werden [Watzek, 2009].

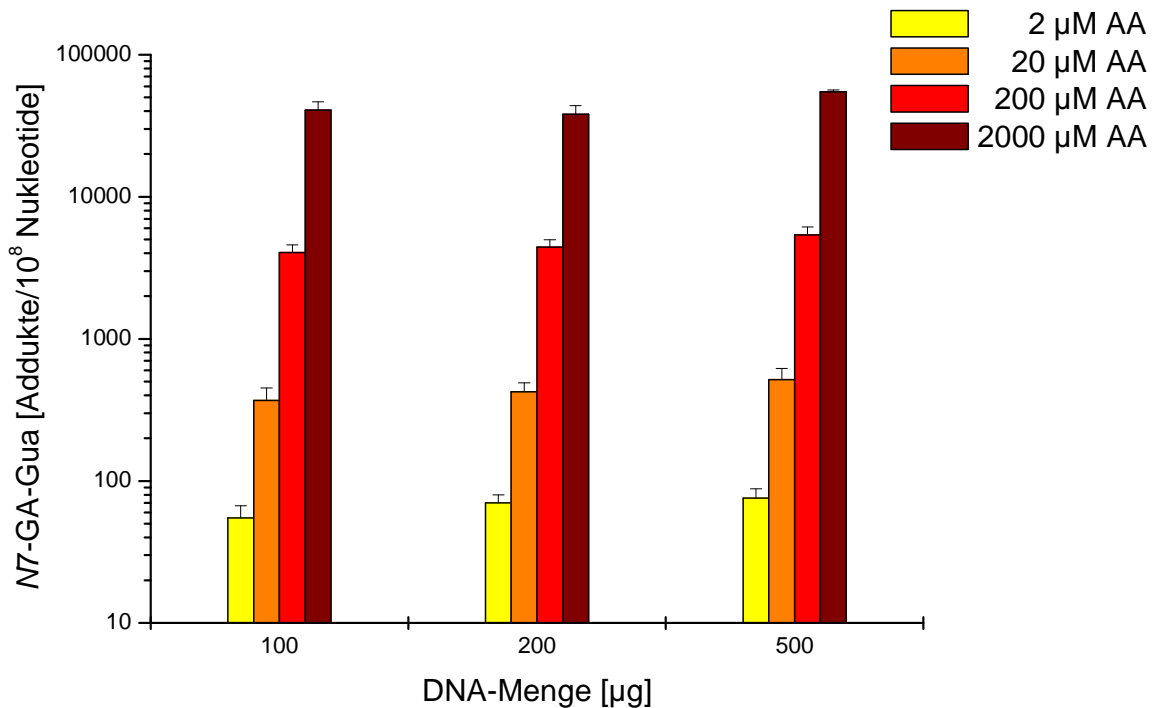


Abbildung 43 Darstellung der gebildeten *N7*-GA-Gua-Addukte/ 10^8 Nukleotide nach konzentrationsabhängiger Inkubation von DNA (100 bis 500 µg) mit Acrylamid (2 bis 2000 µM; n = 3)

Neben der Konzentrationsabhängigkeit der DNA-Adduktbildung nach Acrolein-beziehungsweise Glycidamid-Inkubation, zeigte sich eine Abnahme der DNA-Addukte nach Acrolein-Inkubation mit steigender DNA Menge, wohingegen die *N7*-GA-Gua-Adduktkonzentration bei steigender DNA Menge konstant blieb. Dies könnte möglicherweise darauf zurückgeführt werden, dass bei hohen DNA-Mengen die zur enzymatischen Hydrolyse eingesetzten Enzymmengen nicht ausreichend oder auch die Inkubationszeit mit den Enzymen zu kurz war, um die OH-PdG-Addukte quantitativ aus der DNA zu isolieren.

Anhand der Daten (Abbildung 42 und Abbildung 43) und dem Verhältnis *N7*-GA-Gua/OH-PdG (Tabelle 15) lässt sich ein gewisser Unterschied in der Reaktivität von Acrolein und Glycidamid erkennen. Grundlage für die unterschiedlichen Reaktivitäten könnten die unterschiedlichen Strukturen von Acrolein und Glycidamid sein. Acrolein ist die einfachste α,β -ungesättigte Carbonylverbindung und zeichnet sich vor allem durch Michael-Reaktivität aus. Bei Glycidamid hingegen handelt es sich um ein Epoxid, welches als hochreaktives Elektrophil hauptsächlich Alkylierungsreaktionen eingeht. Neben der Annahme, dass Glycidamid eine höhere Reaktivität gegenüber DNA als Acrolein zeigt, könnte aber auch eine

unterschiedliche Aufarbeitungsmethode der Grund für die Unterschiede in der DNA-Adduktmenge sein. So wurden die *N7*-GA-Gua-Addukte aus der Inkubation von Glycidamid mit DNA mittels neutraler thermischer Hydrolyse (NTH) isoliert, wohingegen zur Isolation der in dieser Arbeit generierten OH-PdG-Addukte jedoch eine enzymatische Hydrolyse durchgeführt (Kapitel 6.5.1.1.9 und 6.5.2.2) wurde, da die OH-PdG-Addukte im Gegensatz zu den *N7*-GA-Gua-Addukten nicht durch einfache NTH aus der DNA herauslösen lassen.

Tabelle 15 Verhältnisse der *N7*-GA-Gua- und OH-PdG-Adduktbildung nach Inkubation von DNA (100, 200 und 500 µg) mit Acrylamid oder Acrolein (20 bis 2000 µM; n = 3)

Glycidamid- bzw. Acroleinkonzentration [µM]	<i>N7</i> -GA-Gua/OH- PdG [100 µg DNA]	<i>N7</i> -GA-Gua/OH- PdG [200 µg DNA]	<i>N7</i> -GA-Gua/OH- PdG [500 µg DNA]
20	0,7	1,5	2,4
200	0,7	1,2	2,9
2000	1,4	1,0	2,9

4.2.2.2 Untersuchung zur Reaktionskinetik der DNA-Adduktbildung

Zur Untersuchung der Reaktionskinetik der DNA-Adduktbildung wurden jeweils 200 µg Salmon Testes-DNA mit 200 µM Acrolein über verschiedene Zeiträume (0,5 bis 24 h) inkubiert. Nach Aufarbeitung wurden die gebildeten OH-PdG-Addukte mittels HPLC-ESI-MS/MS analysiert.

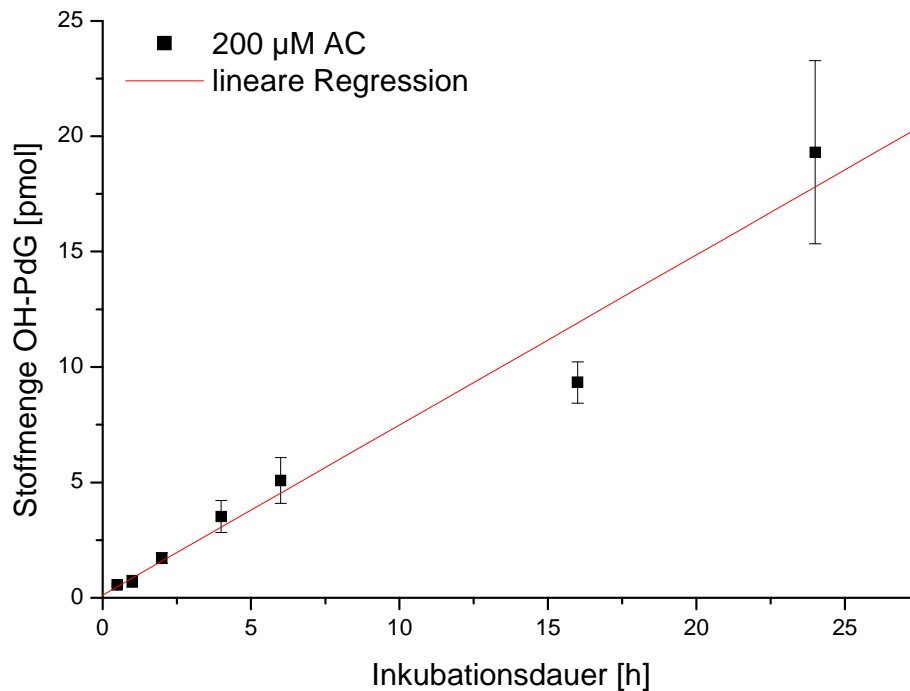


Abbildung 44 Gebildete Menge OH-PdG-Addukt (pmol) nach zeitabhängiger Inkubation (0,5 bis 24 h) von 200 µg DNA mit Acrolein (200 µM; n = 3)

Tabelle 16 Überblick über die gebildeten Addukt mengen (pmol/200 µg DNA) aus der Untersuchung der zeitabhängigen OH-PdG-Bildung über 24 h (n = 3; MW ± SD)

Inkubationszeit [h]	0,5	1	2	4	6	16	24
Addukte [pmol/200µg DNA]	0,6 ± 0,04	0,7 ± 0,3	1,7 ± 0,2	3,5 ± 0,7	5,1 ± 0,9	9,3 ± 0,9	19,3 ± 3,4
Regressionsgerade	$y = 0,7373 x + 0,1108$						

Um die Abhängigkeit von Inkubationsdauer und OH-PdG-Adduktbildung in primären Rattenhepatozyten zu untersuchen, wurden die Inkubationsergebnisse graphisch aufgetragen. Wie in Abbildung 44 zu erkennen ist, zeigten die OH-PdG-Addukte im Bereich von 0,5 bis 24 h Inkubationszeit eine lineare Abhängigkeit, was durch einen Korrelationskoeffizienten von $R > 0,982$ bestätigt wurde.

4.3 *In vivo* Experimente

4.3.1 Untersuchung zur biologischen Aktivität geringer Acrylamidkonzentrationen in der Ratte

Im Rahmen dieser Arbeit wurde als Teilprojekt des vom ISIC (Institute for Scientific Information on Coffee) geförderten Forschungsvorhaben „Holistic study on genotoxic efficacy of acrylamide in rats: single dose threshold, modulatory effects due to continuous exposure and preventive effects due to coffee consumption“ im Tierversuch untersucht, inwieweit sich das Verhältnis zwischen der metabolischen Aktivierung von Acrylamid zu Glycidamid und deren Entgiftung durch Exposition mit niedrigsten Acrylamidmengen verhält (Genehmigung des Landesuntersuchungsamtes Rheinland-Pfalz AZ: 23 177-07/G08-2-001).

In vivo Untersuchungen zur DNA-Adduktbildung von Glycidamid sowie zum Metabolismus von Acrylamid wurden bisher nur mit Acrylamidkonzentrationen über 100 µg/kg KG durchgeführt, weil die üblichen Bestimmungsmethoden mittels HPLC-ESI-MS/MS für niedrigere Konzentrationen nicht sensitiv genug waren [Doerge et al., 2005b].

Es wurde ein Acrylamid-armes Teigfutter (< 0,5 µg Acrylamid/kg) entwickelt, bei dem Inhaltsstoffe wie Glucose, Stärke, Weizenmehl, Quark, Tofu, gekochte Kartoffeln, Sojaprotein, Sonnenblumenöl und ein Vitaminmix verwendet wurden. Diese Futter wurde zwei Wochen vor der Acrylamidbehandlung an weibliche SD-Ratten verfüttert, um deren Hintergrundbelastung mit Acrylamid und anderen hitzeinduzierten Kontaminanten wie z.B. Acrolein so gering wie möglich zu halten. Der Acrylamidgehalt des Acrylamid-armen Futters lag unter der Nachweisgrenze von 0,5 µg Acrylamid/kg, was einer täglichen Aufnahme von weniger als 0,1 µg Acrylamid/kg KG durch die Versuchstiere entsprach (200 g KG, 30 g Futteraufnahme).

4.3.1.1 Acrylamid

In einer Dosis-Wirkungsuntersuchung erhielten weibliche SD-Ratten Acrylamid via Schlundsonde in einem weiten Konzentrationsbereich von 0,1-10.000 µg/kg KG, wobei die niedrigste Dosis (0,1 µg/kg KG) noch unter der geschätzten täglichen humanen Aufnahme von 1-4 µg/kg KG lag [JECFA, 2010].

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Bildung der Mercaptursäuren AAMA und GAMA und der N7-GA-Gua-Addukte im Expositionsbereich von 0,1-100 µg Acrylamid/kg KG untersucht und mit den Ergebnissen der unbehandelten Kontrollgruppe und der Daten des Hochdosisbereichs (500-10.000 µg Acrylamid/kg KG) verglichen [Feld, 2010].

4.3.1.1.1 Bestimmung der Mercaptursäuren von Acrylamid und Glycidamid im Sammelurin

Bei Mercaptursäuren handelt es sich um Biomarker, welche Rückschlüsse auf die Exposition mit Acrylamid bis zu 72 h nach Aufnahme ermöglichen [Doroshenko et al., 2009].

Die absolute MA-Ausscheidungsmenge (AAMA + GAMA) in der unbehandelten Kontrollgruppe betrug innerhalb von 16 h $0,84 \pm 0,12$ nmol. Die Behandlungsgruppen zeigten einen signifikanten dosisabhängigen Anstieg der MA-Ausscheidungen ab $1 \mu\text{g/kg KG}$ ($p < 0,01$), welcher bei höheren Dosierungen (ab $100 \mu\text{g Acrylamid/kg KG}$) noch stärker ausgeprägt war ($p < 0,001$), was in Abbildung 45 und Abbildung 46 graphisch dargestellt ist.

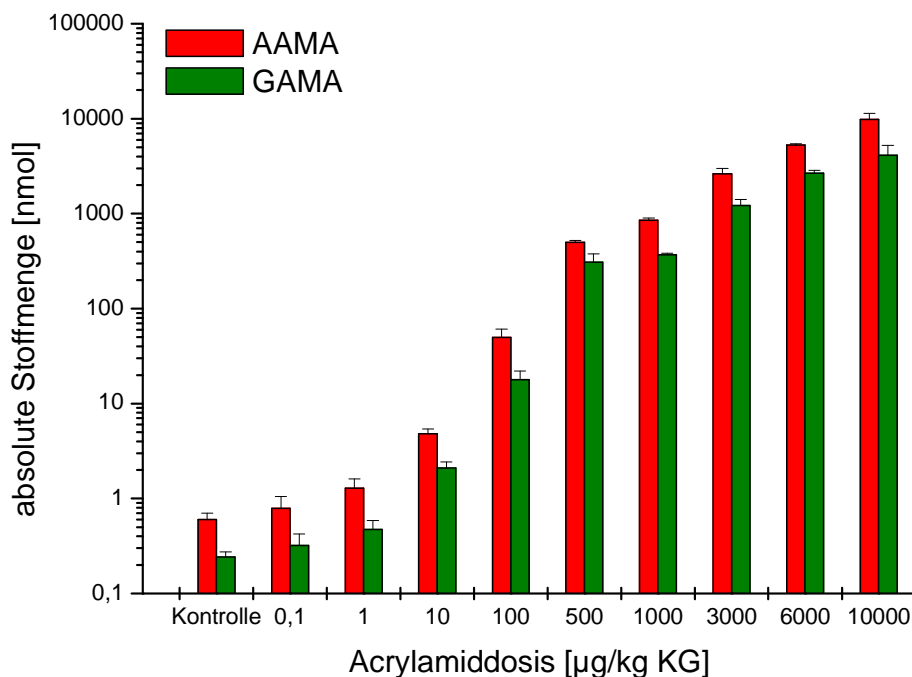


Abbildung 45 Darstellung der gebildeten AAMA- (rot) und GAMA-Mengen (grün) im 16 h-Urin von mit Acrylamid-behandelten SD-Ratten (0,1 bis $100 \mu\text{g/kg KG}$: $n = 8$; 1.000 bis $10.000 \mu\text{g/kg KG}$: $n = 3$ [Feld, 2010])

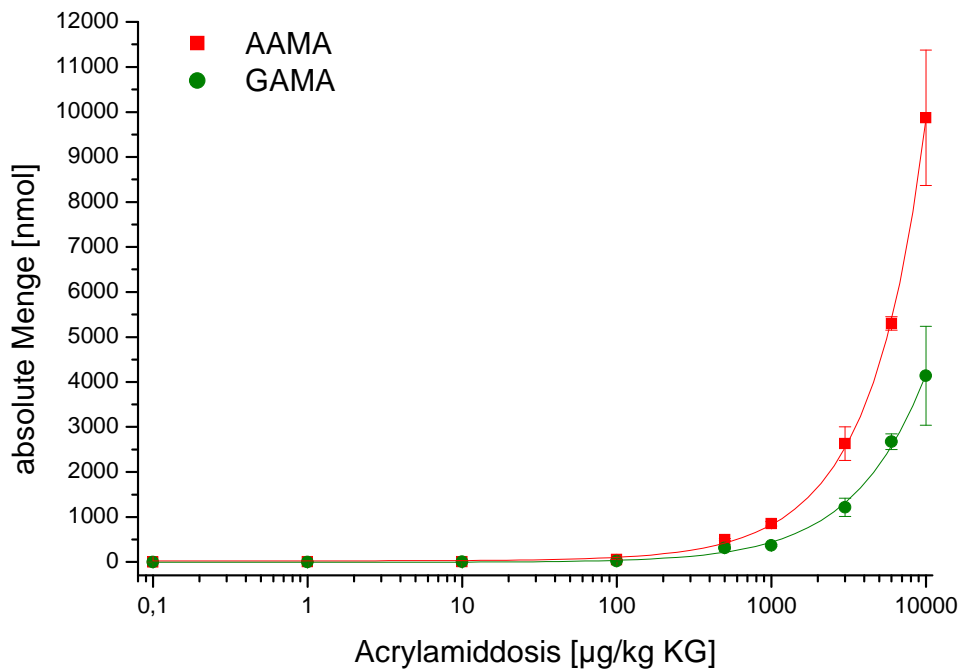


Abbildung 46 Darstellung der Dosis-Wirkungsbeziehung von AAMA und GAMA im 16 h-Urin von mit Acrylamid-behandelten SD-Ratten (Kontrolle-100 $\mu\text{g/kg KG}$: n = 8; 1.000-10.000 $\mu\text{g/kg KG}$: n = 3 [Feld, 2010])

Das GAMA/AAMA-Verhältnis lag bei allen Versuchsgruppen ohne Anzeichen einer dosisabhängigen Verschiebung im Gegensatz zu den *in vitro* Untersuchungen in Kapitel 4.2.1.1.3.2 konstant bei $0,4 \pm 0,1$. Bei den Inkubationsversuchen von primären Rattenhepatozyten nahm das GAMA/AAMA-Verhältnis nach 16 h Inkubation mit steigender Acrylamidkonzentration von $0,2 \pm 0,08$ (20 μM Acrylamid) auf $0,02 \pm 0,01$ (2000 μM Acrylamid) ab (Abbildung 40). Bei der niedrigsten Behandlungsgruppe im *in vivo* Versuch (0,1 $\mu\text{g/kg KG}$) unterschieden sich die MA-Konzentrationen nicht signifikant von der unbehandelten Kontrolle. In dieser Gruppe konnten 80% der gegebenen Dosis als MA wiedergefunden werden. Dieser Wert ist jedoch wahrscheinlich mit einem relativ großen Fehler behaftet, da bei einer kleinen Dosis von 0,1 μg Acrylamid/kg KG die Hintergrundbelastung mit Acrylamid eine größere Rolle als bei höheren Dosierungen spielte. Im Durchschnitt wurden $37,0 \pm 11,5\%$ der verabreichten Dosis nach 16 h als AAMA und GAMA im Urin nachgewiesen. Bis zur Dosisgruppe 100 $\mu\text{g/kg KG}$ konnten 20-30%, ab 1.000 $\mu\text{g/kg KG}$ 40% der verabreichten Dosis im Urin erfasst werden. Bei 500 $\mu\text{g/kg KG}$ war die absolute MA-Ausscheidung im Vergleich etwas erhöht, was sich jedoch nicht in der Menge der N7-GA-Guanin-Addukte zeigte. In einer vorangegangenen *in vivo* Studie an Ratten wurden $51 \pm 12\%$ einer gegebenen Dosis von 100 $\mu\text{g/kg KG}$ als Mercaptursäuren im Urin mit einem GAMA/AAMA-Verhältnis von 0,8 wiedergefunden [Berger et al., 2011]. Ein

ähnlicher Wert für das GAMA/AAMA-Verhältnis wurde auch in einer anderen Studie beobachtet [Kopp & Dekant, 2009]. Die Unterschiede in den Daten der vorliegenden Studie im Vergleich zu den Literaturdaten lassen sich durch die unterschiedlichen Urinsammelperioden (16 h in dieser Studie vs. 24 h in Studien in der Literatur) erklären. Die Ausscheidung von AAMA und GAMA bei Ratten ist durch eine unterschiedliche Kinetik gekennzeichnet, was sich in der maximalen Ausscheidungskonzentration widerspiegelt. Das Maximum der AAMA-Ausscheidung (t_{\max}) wird nach 10,9 h, jenes für GAMA (t_{\max}) nach 17,2 h erreicht [Kopp & Dekant, 2009]. Studien am Menschen ergaben Werte für t_{\max} AAMA von 11,5 h und t_{\max} GAMA von 22,1 h nach Aufnahme von reinem isotonenmarkiertem Acrylamid [Boettcher et al., 2006]. Die Unterschiede in den Maxima der Ausscheidung von 6 h in der Ratte im Vergleich zu 10 h beim Menschen lässt auf eine langsamere CYP450 katalysierte Epoxidierungskinetik von Acrylamid zu Glycidamid beim Menschen schließen. Diese Annahme wird weiter unterstützt durch die Tatsache, dass die absolut ausgeschiedene Menge an GAMA nach Aufnahme von 100 µg Acrylamid/kg KG nach 24 h im Urin von Ratten 20,1% der aufgenommenen Dosis, die beim Menschen nach Aufnahme von rund 1 mg (14,8 µg/kg KG) hingegen nur 1,4% betrug [Doroshenko et al., 2009]. Weitere Studien konnten belegen, dass Menschen im Vergleich zu Nagern Acrylamid weniger stark metabolisch aktivieren [Doerge et al., 2007; Fennell et al., 2005; Kopp & Dekant, 2009; Paulsson et al., 2003], gleichzeitig Acrylamid aber stärker durch Kopplung an GSH deaktivieren können [Fuhr et al., 2006]. Die MA-Bestimmung in der unbehandelten Kontrollgruppe zeigte eine Hintergrundmenge der Acrylamid- und Glycidamidausscheidung (Abbildung 45). Auf der Basis einer geschätzten täglichen Aufnahme der Ratten von 30-50 g des selbst hergestellten Futters und maximal 0,5 µg Acrylamid/kg (LOD) im Futter, haben die Tiere etwa 0,4 nmol Acrylamid pro Tag aufgenommen, was einer Dosis von rund 0,1 µg/kg KG und Tag entspricht. Die gemessene absolute Menge an ausgeschiedenen MA der unbehandelten Kontrolle betrug 0,8 nmol, was einer mutmaßlichen Dosis von 0,6-0,7 µg Acrylamid/kg KG (1,6-2,0 nmol Acrylamid) entsprach. In der niedrigsten Dosisgruppe von 0,1 µg/kg KG wurde eine im Vergleich zur Kontrollgruppe tendenziell aber nicht signifikant erhöhte absolute MA-Ausscheidung von 1,1 nmol beobachtet. Ebenso war das GAMA/AAMA-Verhältnis nicht signifikant verschieden. Diese Ergebnisse lassen eine gewisse endogene Bildung von Acrylamid im Organismus der Ratte vermuten. Die exogene Exposition der Ratten mit 0,1 µg Acrylamid/kg KG war zu gering, um im Bereich der endogenen Exposition signifikant erhöht detektiert zu werden. Auch Studien einer anderen Arbeitsgruppe konnten belegen, dass Acrylamid zu einem gewissen Maße endogen gebildet werden kann [Tareke et al., 2009; Tareke et al., 2008]. Bei Dosierungen über 0,1 µg/kg KG war die MA-Ausscheidung über den gesamten Dosisbereich signifikant erhöht, bezogen auf die jeweils niedrigere Dosisgruppe.

4.3.1.1.2 Bestimmung von *N*7-Glycidamid-Guanin-Addukten aus der DNA von Gewebeproben

Die Bestimmung der *N*7-GA-Gua-Addukte in Gewebeproben und Körperflüssigkeiten der Versuchstiere war ursprünglich durch Messung mittels Accelerator Mass Spectrometry (AMS) am BEAMS lab des Massachusetts Institute of Technology (MIT) geplant. Die AMS-Technik erlaubt die Bestimmung des Isotopenverhältnisses von ^{12}C zu ^{14}C , wobei die Sensitivität dieser Methode erheblich durch den ^{12}C -Hintergrund einer Probe beeinflusst wird. Erste Messungen von DNA-Proben zeigten anscheinend höhere Gehalte an ^{14}C -assoziierten DNA-Addukten, verglichen mit Ergebnissen aus konventioneller HPLC-ESI-MS/MS-Messungen, in den selben Proben Adduktraten lieferte, die etwa 10-100-fach niedriger lagen (Abbildung 47).

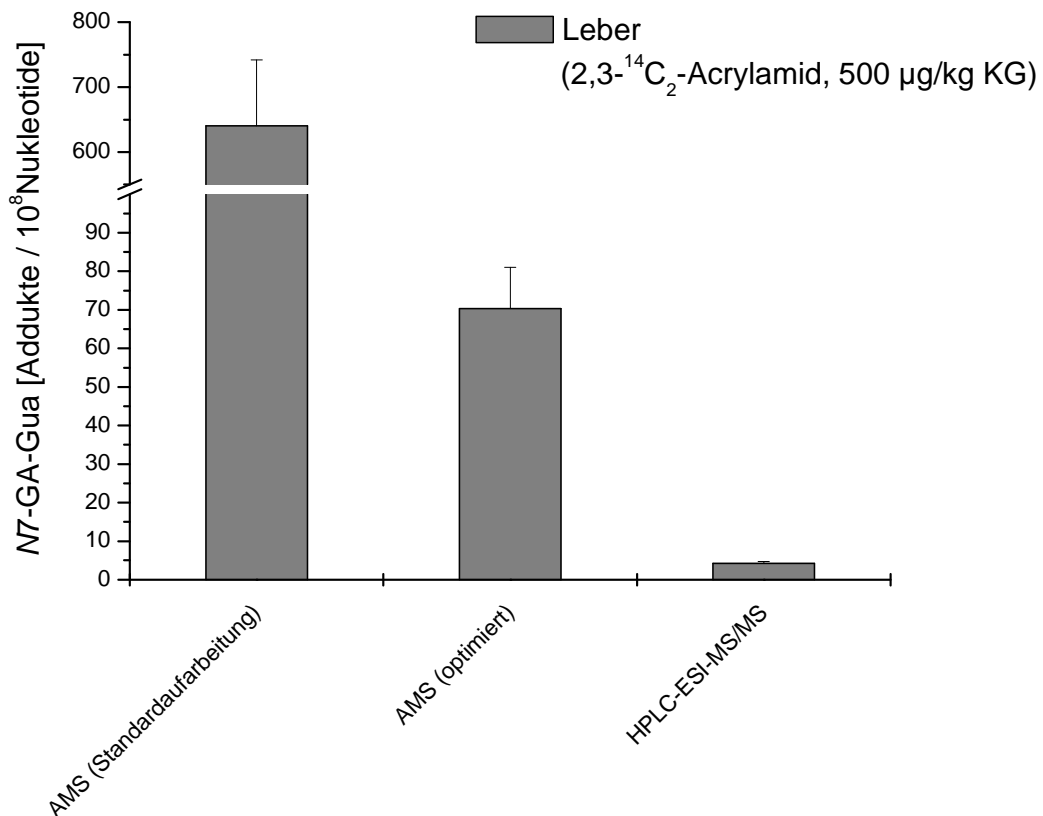


Abbildung 47 Darstellung der *N*7-GA-Gua-Addukt mengen/ 10^8 Nukleotide in der Leber 2,3- $^{14}\text{C}_2$ -Acrylamid-behandelter SD-Ratten (500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG) ermittelt mit unterschiedlichen Aufarbeitungsmethoden und Messtechniken (AMS und HPLC-ESI-MS/MS)

Dieser Befund war möglicherweise auf unspezifische Reaktionsprodukte von ^{14}C -Acrylamid mit Nukleophilen, die nicht DNA assoziiert waren und durch die vorherige Aufarbeitung nicht

ausreichend entfernt wurden, zurückzuführen (AMS Standardaufarbeitung, 640 ± 102 Addukte/ 10^8 Nukleotide). Zusätzliche Proteinase- und RNaseA-Behandlungen konnten die ^{14}C -Verunreinigung der Proben reduzieren, jedoch wiesen anschließende AMS-Messungen mit 70 ± 1 Addukten/ 10^8 Nukleotide immer noch etwa 10-fach erhöhte Werte als durch HPLC-ESI-MS/MS in den selben Proben bestimmte *N7*-GA-Gua-Addukt mengen auf (AMS optimiert) [Böhm, 2011].

Da gezeigt werden konnte, dass die Hydrolyse der *N7*-GA-Gua-Addukte durch neutrale thermische Hydrolyse (NTH) nach etwa 5 min vollständig war [Watzek, 2009], wurden weniger drastische NTH-Bedingungen getestet, um die Freisetzung nicht *N7*-GA-Gua assoziierter Verunreinigungen weiter zu reduzieren. Aber auch zusätzliche Aufreinigungs- und Aufkonzentrierungsschritte blieben erfolglos. Deshalb wurden die Proben mittels einer optimierten HPLC-ESI-MS/MS-Technik (API 5500 QTRAP, BfR, Berlin) im MRM-Mode unter Verwendung der Stabilisotopenverdünnungsanalyse (*N7*-GA- $^{15}\text{N}_5$ -Gua) vermessen. Mit Hilfe dieser Technik konnten in der Leberprobe 4 ± 1 Addukte/ 10^8 Nukleotide ermittelt werden.

Die Werte für die *N7*-GA-Gua-Addukte, die nach 16 h in Leber, Niere und Lunge bestimmt wurden, sind in Abbildung 48 dargestellt. Als Zeitpunkt der Organentnahme wurde 16 h nach Acrylamidverabreichung gewählt, da in einem Pilotexperiment an Ratten, denen 1-10 mg Acrylamid/kg KG per Schlundsonde verabreicht worden waren, die höchsten Addukt mengen in den drei Geweben nach dieser Periode beobachtet wurden [Feld, 2010]. Ein längerer Zeitraum bis zur Probennahme erhöht die Möglichkeit des Adduktverlustes durch DNA-Reparatur, Öffnung des Imidazolrings und Überführung in das Formamidopyrimidin-Isomer, sowie durch spontane Depurinierung (siehe Kapitel 2.3.3).

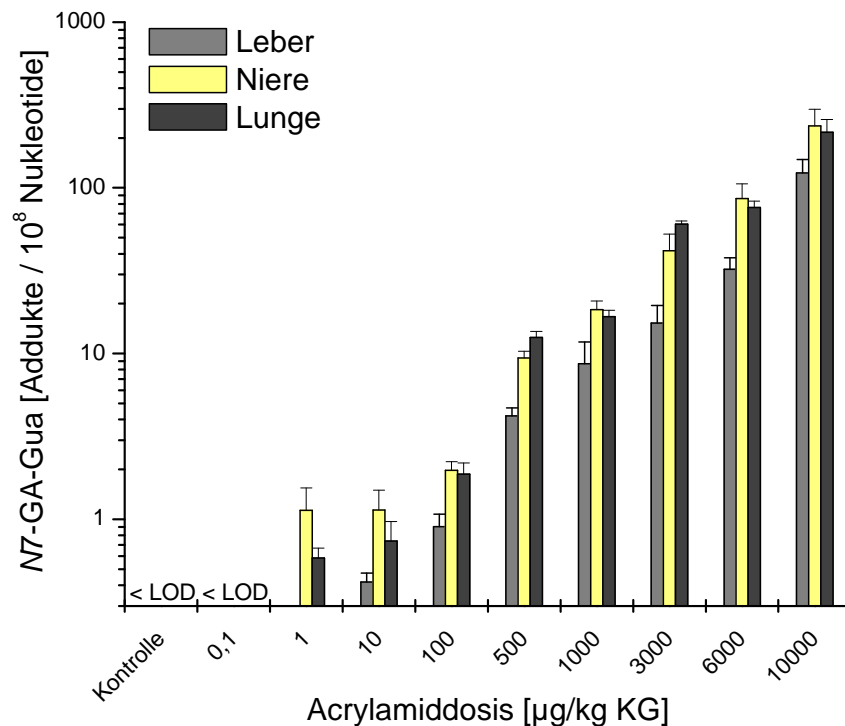


Abbildung 48 Darstellung der gebildeten *N7-GA-Gua-Addukte*/ 10^8 Nukleotide (16 h) in verschiedenen Geweben (Leber, Niere und Lunge) von mit Acrylamid-behandelten SD-Ratten (0,1 bis 100 $\mu\text{g}/\text{kg KG}$: $n = 8$; 500 bis 10000 $\mu\text{g}/\text{kg KG}$: $n = 3$ [Feld, 2010]; LOD: 0,2 Addukte/ 10^8 Nukleotide)

Bei einer Dosis von 1 μg Acrylamid/kg KG war die Bildung von *N7-GA-Gua-Addukte* in der Niere ($1,1 \pm 0,4$ Addukten/ 10^8 Nukleotide) und in der Lunge ($0,6 \pm 0,1$ Addukten/ 10^8 Nukleotide) im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe ($p < 0,001$) signifikant erhöht. Bei dieser Dosis waren in der Leber noch keine Addukte nachweisbar (LOD: 0,2 Addukte/ 10^8 Nukleotide). Bemerkenswerterweise zeigte sich bei Dosierungen von 1 und 10 $\mu\text{g}/\text{kg KG}$ keine signifikante dosisabhängige Zunahme in der Adduktbildung in der Niere und Lunge. Ab 100 μg Acrylamid/kg KG war die Zunahme der Addukte allen drei untersuchten Geweben über den gesamten Konzentrationsbereich signifikant ($p < 0,001$), verglichen mit den Adduktmengen bei 10 μg Acrylamid/kg KG. Bei allen Behandlungsgruppen waren die Werte für die *N7-GA-Gua-Addukt*gehalte in Niere und Lunge vergleichbar, wohingegen die Werte in der Leber ausnahmslos geringer waren.

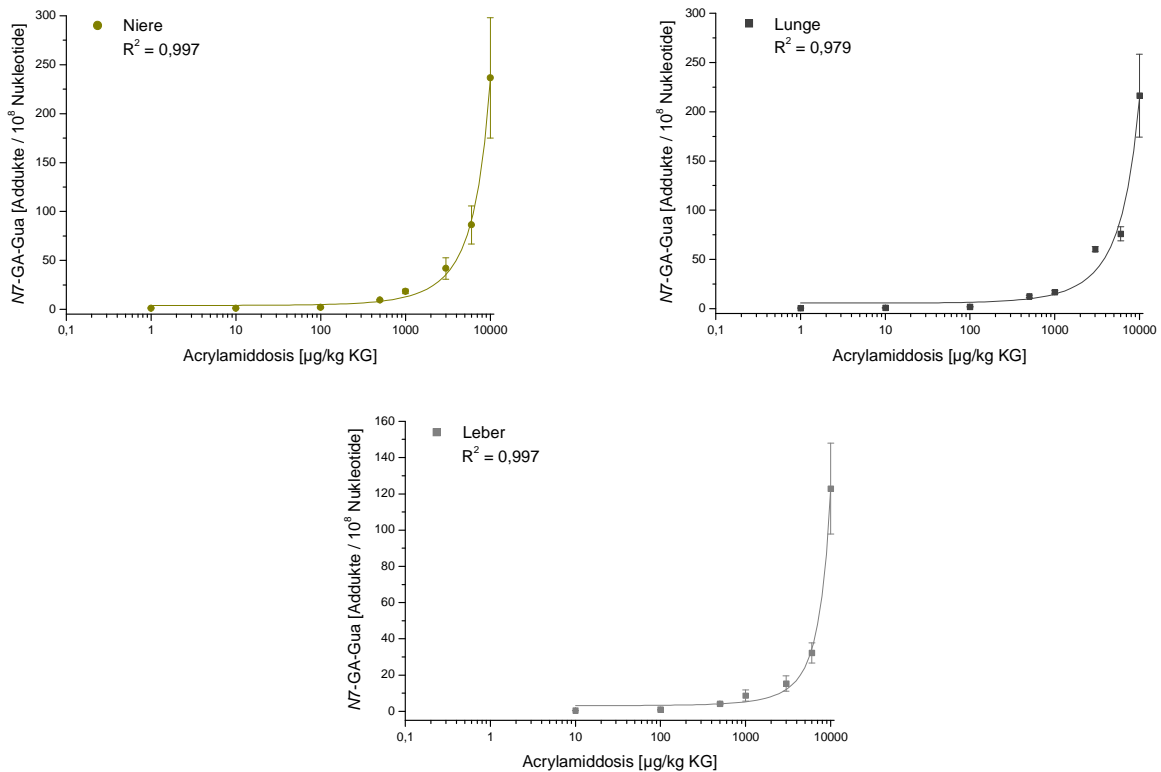


Abbildung 49 Darstellung der Dosis-Wirkungsbeziehungen der Bildung von *N7*-GA-Gua-Addukten (16 h) in verschiedenen Geweben (Leber, Niere, Lunge) von mit Acrylamid-behandelten SD-Ratten (0,1 bis 100 $\mu\text{g/kg KG}$: n = 8; 500 bis 10000 $\mu\text{g/kg KG}$: n = 3)

Die Behandlung mit 0,1 $\mu\text{g Acrylamid/kg KG}$ führte zu keiner nachweisbaren *N7*-GA-Gua-Adduktbildung in den untersuchten Organen. Analog dazu wurde auch keine signifikant erhöhte MA-Ausscheidung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle beobachtet. Bei einer Dosis von 1 $\mu\text{g/kg KG}$ waren *N7*-GA-Gua-Addukte in der Niere und Lunge jeweils mit $p < 0,001$ quantifizierbar, aber nicht in der Leber. Ab einer 10-fach höheren Dosis (10 $\mu\text{g/kg KG}$) konnten auch in der Leber Addukte quantifiziert werden. Die Addukt mengen waren aber gegenüber der Dosis von 1 $\mu\text{g Acrylamid/kg KG}$ nicht signifikant erhöht (Leber: 0,4 Addukten/ 10^8 Nucleotide; Niere: 1,1 Addukten/ 10^8 Nucleotide; Lunge: 0,7 Addukten/ 10^8 Nucleotide). Die nächst höhere Dosisgruppe (100 $\mu\text{g/kg KG}$) zeigte eine signifikante Zunahme ($p < 0,001$) der *N7*-GA-Gua-Addukte (Leber: 0,9 Addukten/ 10^8 Nucleotide; Niere: 2,0 Addukten/ 10^8 Nucleotide; Lunge: 1,9 Addukten/ 10^8 Nucleotide). Verglichen mit dem Hintergrundbereich eines Spektrums an humanen DNA-Addukten nichtrauchender Probanden, die ebenfalls mittels HPLC-ESI-MS/MS-Technik bestimmt wurden, befanden

sich die *N7*-GA-Gua-Gehalte der vorliegenden Untersuchung an Ratten bis Dosierungen von 100 µg/kg KG am unteren Ende dieser humanen Hintergrund-DNA-Addukt mengen. So wurden in humanen Gewebeproben der Leber 7-Ethyl-Gua (0,8 Addukte/10⁸ Nukleotide) [Chen et al., 2007], *N*²-Ethyl-dGuo (0,2 Addukte/10⁸ Nukleotide) [Wang et al., 2006] und zyklische Addukte wie zum Beispiel 1,*N*²-Propano-dGuo (0,3 Addukte/10⁸ Nukleotide) [Zhang et al., 2006] bestimmt. Für 7-Carboxyethyl-Gua (7,0 Addukte/10⁸ Nukleotide) [Cheng et al., 2010] und ebenso für *N*²-Ethylidine-dGuo (10,0 Addukte/10⁸ Nukleotide) [Wang et al., 2006] ergaben sich höhere Hintergrundmengen. In Ratten wurden DNA-Addukte, aus dem endogenen Ethylen-Metabolismus, wie *N7*-Hydroxyethyl-Gua (2,5 Addukte/10⁸ Nukleotide) [Marsden et al., 2007] oder aus endogener Lipidperoxidation, wie Pyrimido-[1,2-*a*]-purin-10(3*H*)-on (*N1*-*M1G*) (52,0 Addukte/10⁸ Nukleotide) gefunden [Jeong et al., 2005]. Hintergrundmengen für Formaldehyd-DNA-Addukte, in Form von *N*²-Hydroxymethyl-dG und *N*⁶-Hydroxymethyl-dA, konnten in nasalen DNA-Proben von Ratten im Bereich von 47,0 ± 18,0 Addukten/10⁸ Nukleotide [Swenberg et al., 2011] bestimmt werden. In humanen Leukozyten wurden oxidative Schäden (8-Oxo-dG) in Gehalten von etwa 100 Läsionen/10⁸ Nukleotide [Epe, 2002] und in Rattenleber 23 bis 4.800 Läsionen/10⁸ Nukleotide erhalten [Singh et al., 2009]. Mit anderen analytischen Techniken wurden 800-900 AP-Stellen/10⁸ Nukleotide detektiert [De Bont & van Larebeke, 2004]. In einer anderen Arbeit wurde ein Hintergrundbereich an DNA-Schäden durch niedrigmolekulare alkylierende Elektrophile in humanen und Rattengeweben im Bereich von 10-100 Addukten/10⁸ Nukleotide berichtet [Farmer, 2008]. Diese Hintergrundbelastung stammte mutmaßlicherweise aus exogener Exposition sowie endogenem Metabolismus. Jedoch ist zu beachten, dass diese Daten ein Gleichgewicht zwischen möglicher kontinuierlicher DNA-Adduktbildung und kontinuierlichem DNA-Adduktabbau, zum Beispiel durch spontane Reparatur oder reparaturvermittelte Eliminierung des DNA-Addukts einschließlich Zelltod oder Replikation zum Zeitpunkt der Analyse darstellen. Im Gegensatz dazu wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit Addukt mengen nach einmaliger Gabe von Acrylamid zum Zeitpunkt maximaler *N7*-GA-Gua-Konzentration bestimmt. Die Adduktgehalte in der Leber waren über den gesamten Dosisbereich (0,1 bis 10000 µg/kg KG) stets signifikant geringer ($p < 0,05$), als jene in Niere und Lunge. Bezüglich der unterschiedlichen Adduktgehalte in den verschiedenen untersuchten Organen könnte ein gewebespezifisches Gleichgewicht zwischen *N7*-GA-Gua-Adduktbildung und DNA-Reparatur vorliegen. Zusätzlich dazu könnten ebenfalls unterschiedliche GSH-Gehalte in diesen Geweben zu den verschiedenen Adduktgehalten beitragen. Zum Beispiel ist der GSH-Status in der Leber höher, verglichen mit dem der Niere und der Lunge (Leber, 6,2 µmol/g; Niere, 2,1 µmol/g; Lunge, 1,2 µmol/g) [Langley-Evans et al., 1996]. Außerdem ist die GST-Aktivität im Lebergewebe höher als in der Niere und der Lunge (Leber: 537 µmol/min pro mg Protein; Niere: 110 µmol/min pro mg Protein; Lunge:

60 $\mu\text{mol}/\text{min}$ pro mg Protein) [Giannerini et al., 2001]. Zusätzlich wurden erhebliche Mengen an GSR-Aktivität in diesen drei Organen mit der höchsten Aktivität in der Niere (135 $\mu\text{mol}/\text{min}$ pro mg Protein), gefolgt von der Leber (99 $\mu\text{mol}/\text{min}$ pro mg Protein) und Lunge (46 $\mu\text{mol}/\text{min}$ pro mg Protein) gefunden [Konsue & Ioannides, 2008]. Obwohl Lebergewebe im Vergleich der drei Organe durch die höchste CYP450 2E1-Aktivität gekennzeichnet ist, exprimiert es ebenso hohe GSH-abhängige Entgiftungsenzyme (GST und GSR). So ist die Aktivität von CYP450 2E1 in der Leber etwa zehnmal höher als die in der Lunge und 20-mal höher als in der Niere (6-Hydroxylierung von Chlorzoxazon; Leber: 0,51 nmol/min pro mg Protein; Niere: 0,025 nmol/min pro mg Protein; Lunge: 0,06 nmol/min pro mg Protein) [Zerilli et al., 1995].

Die Auswahl der Gewebe für die Adduktbestimmung orientierte sich in der vorliegenden Arbeit an der Notwendigkeit, genug Gewebematerial für die Analytik zur Verfügung zu haben. Leber, Niere und Lunge sind allerdings bisher nicht als primäre Zielorgane für Acrylamid-vermittelte Tumorentstehung in Ratten identifiziert worden. Die Befunde der vorliegenden Arbeit erlauben aber den Vergleich mit Daten der Literatur, in der ebenfalls DNA-Addukte in Leber, Niere und Lunge gemessen wurden [Gamboa da Costa et al., 2003]. In verschiedenen Studien an Acrylamid-behandelten Mäusen wurde außerdem gezeigt, dass die N7-GA-Gua-Addukte im Lebergewebe in vergleichbaren Gehalten wie auch in den Zielorganen entstehen können [Doerge et al., 2005a; Gamboa da Costa et al., 2003; Ghanayem et al., 2005].

In Kanzerogenitätsstudien an Ratten wurden nur in endokrin gesteuerten Geweben erhöhte Inzidenzen an Thyreoidea-follikelzellentumoren, peritestikulären Mesotheliomen und Mammatumoren beobachtet, was als Hinweis auf einen nicht genotoxischen Wirkmechanismus gedeutet wurde [Friedman et al., 1995; Johnson et al., 1986]. Ob eine hormonelle Fehlregulation oder andere unbekannte Faktoren der Kanzerogenität von Acrylamid in solchen Geweben zugrunde liegen, ist derzeit nicht zu beantworten. Hinweise, die für einen nicht genotoxischen Wirkmechanismus sprechen sind aber gegenwärtig nicht genügend untermauert, besonders im Vergleich zu den fundierten Beweisen auf einen genotoxischen Wirkmechanismus [Bolger et al., 2010].

Es wird vermutet, dass eine kritische minimale Anzahl an persistenten DNA-Schäden notwendig ist, um eine signifikante biologische Konsequenz auszulösen [Shuker, 2002]. Die Menge an DNA-Addukten, die durch eine DNA-reaktive Substanz gebildet werden, ist aber per se nicht prädiktiv für Mutagenität beziehungsweise Kanzerogenität. Generell sind Addukte am Sauerstoffatom der Purin- oder Pyrimidinbasen potenter mutagen als solche am N7 des Guanins, das nicht in der DNA-Basenpaarregion liegt und daher auch nicht an der DNA-Basenpaarung beteiligt ist [Epe, 2002]. DNA-Addukte und DNA-Schäden müssen als Mutationen fixiert, das heißt vererbare genetische Veränderungen, manifestiert sein, damit

es zu Konsequenzen in den späteren Stufen der Kanzerogenese kommen kann (siehe Kapitel 2.4) [Pottenger et al., 2009]. Ob DNA-Schäden letztendlich zu Tumoren führen, hängt von verschiedenen Parametern, wie zum Beispiel dem Typ und Topologie des Schadens, der Korrektheit und Geschwindigkeit von DNA-Reparaturprozessen, der Induktion von Apoptose und der Proliferationsrate der Zellen ab. Das mutagene Potential als Gesamtkonsequenz von verschiedenen DNA-Schäden kann sich über mehrere Größenordnungen unterscheiden [Nestmann et al., 1996]. Das mutagene Potential der *N7*-Addukte wird, mit Ausnahme der Aflatoxin B1-Addukte (AfB1), generell als niedrig angesehen. AfB1 ist jedoch ein potentes Mutagen und Kanzerogen, welches hauptsächlich mit *N7* des Guanins der DNA reagiert. Aus diesem Addukt bilden sich AP-Stellen und hoch persistente AfB1-Formamidopyrimidine [Smela et al., 2001]. Im Gegensatz dazu konnten verschiedenste Studien zeigen, dass Glycidamid, das vorzugsweise *N7*-GA-Gua-Addukte bildet, im Vergleich zu AfB1 ein Mutagen mit geringerer Potenz ist [Baum et al., 2005; Durling & Abramsson-Zetterberg, 2005; Glatt et al., 2005; Johansson et al., 2005; Li & Ho, 2005; Thielen et al., 2006]. Zum Beispiel führte Glycidamid im HPRT-Assay an einer Säugerzelllinie erst bei Konzentrationen, welche Größenordnungen höher lagen, als solche von präaktivierten Formen von *N*-Nitroso-Verbindungen oder polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen, zur signifikanten Induktion mutagener Wirkungen [Thielen et al., 2006].

4.3.1.2 Acrolein

4.3.1.2.1 Bestimmung von 3-HPMA im Sammelurin

Um den Einfluss des selbst hergestellten Acrylamid-armen Teigfutters auf die Aufnahme von Acrolein und dessen renale Ausscheidung als 3-HPMA nach Verabreichung von Einzeldosen von 0,1 bis zu 100 µg Acrylamid/kg KG bei den Versuchstieren (siehe Studie in Kapitel 4.3.1) zu untersuchen, wurde neben den MA von Acrylamid (AAMA und GAMA) ebenfalls der 3-HPMA-Gehalt im 16 h-Sammelurin bestimmt.

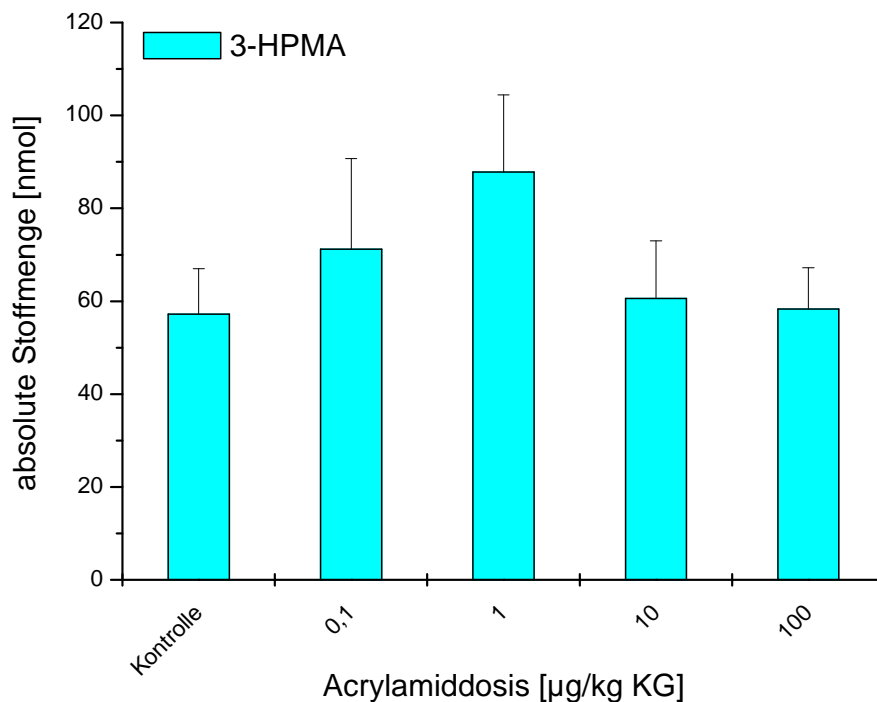


Abbildung 50 Darstellung der Ausscheidung von 3-HPMA (nmol) im 16 h-Urin von Acrylamid-behandelten SD-Ratten (0,1 bis 100 µg/kg KG; n = 8)

Die absolut ausgeschiedene Menge an 3-HPMA (MW ± SD) lag bei den mit Acrylamid behandelten Tieren und der unbehandelten Kontrollgruppe bei $66,5 \pm 17,9$ nmol (Median: 61,9 nmol; Range: 38,5-109,4 nmol). Unter Ausschluss weiterer Acrolein-assoziiertes Metabolite entspricht dies einer Dosis (MW ± SD) von $16,8 \pm 4,1$ µg Acrolein/kg KG (Median: 16,0 µg/kg KG; Range: 10,6-26,6 µg/kg KG). Insgesamt konnten starke interindividuelle Unterschiede beobachtet werden, was möglicherweise auf Unterschiede in der endogenen Bildung von Acrolein zurückzuführen ist (Abbildung 50). Unterschiede in der Futteraufnahmemenge sollte vermutlich in Anbetracht der Verwendung des nicht wärmebehandelten Teigfutters nur eine untergeordnete Rolle spielen. Zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen waren keine signifikanten Unterschiede in der Gesamtausscheidung von 3-HPMA zu erkennen. Verglichen mit Ergebnissen aus früheren Arbeiten der Arbeitsgruppe Eisenbrand, bei denen männliche SD-Ratten zur Untersuchung des Einflusses hoher Acrylamiddosen auf die Konjugation von Acrolein mit GSH mit einer einmaligen Dosis von 0,05 bis 10 mg Acrylamid/kg KG behandelt wurden, wurden im Vergleich höhere Absolutmengen an 3-HPMA mit 188 ± 64 nmol ermittelt [Berger, 2010]. Sie lagen damit etwa um den Faktor drei höher als der Mittelwert an 3-HPMA in der vorliegenden Arbeit ($66,5 \pm 17,9$ nmol). Dieser Unterschied könnte einerseits möglicherweise auf die verkürzte Urinsammelperiode von 16 h in letzterem Experiment verglichen mit 24 h in dem

vorangegangenen Versuch von Berger zurückzuführen sein. Viel wahrscheinlicher ist aber der Einfluss der Verwendung von selbst hergestelltem Teigfutter anstelle von hitzebehandeltem Standardfutter. Dies würde eine starke Belastung von hitzebehandelten Lebensmitteln mit Acrolein bedeuten.

4.3.1.2.2 Bestimmung von OH-PdG-Addukten aus der DNA von Gewebeproben

Die Bestimmung von OH-PdG-Addukten erfolgte, um den Einfluss hoher Acrylamiddosen von bis zu 10 mg/kg KG auf die Bildung von Acrolein-DNA-Addukten (Tiere aus Vorstudie; [Feld, 2010]) zu untersuchen. Da Acrylamid größtenteils über Bindung an GSH entgiftet wird, könnte es bei relativ hohen Dosierungen zur Depletion des GSH-Gehalts in der Leber der Tiere kommen, wodurch die Entgiftung von Acrolein und anderen Xenobiotika verschlechtert werden würde. Dies hätte eine Erhöhung der OH-PdG-Addukte ab einer bestimmten Acrylamiddosis zur Folge und sollte durch Messung von DNA-Addukten in den Geweben von Acrylamid behandelten weiblichen SD-Ratten näher untersucht werden. Im Lebergewebe der Tiere wurden ausschließlich DNA-Addukte im Bereich von (MW \pm SD) $10,9 \pm 3,8$ Addukte/ 10^8 Nukleotide (Median: 9,9 Addukte/ 10^8 Nukleotide; Range: 5,4-24,6 Addukte/ 10^8 Nukleotide) gefunden (Abbildung 51). Ein Vergleich der OH-PdG-Adduktgehalte mit den Gehalten von *N7*-GA-Gua-Addukten in den Leberproben der Ratten (Kapitel 4.3.1.1.2) zeigten OH-PdG-Gehalte im einem Konzentrationsbereich von *N7*-GA-Gua-Gehalten, die mit 1000-3000 μ g Acrylamid/kg KG behandelt worden waren. Als mögliche Erklärung dafür könnte eine endogene Bildung von Acrolein diskutiert werden. Außerdem könnte eine unterschiedlich stark ausgeprägte Reparatur der beiden DNA-Addukte zu diesem Unterschied geführt haben, da es sich bei dem Glycidamid-Addukt um ein *N7*-Addukt, bei OH-PdG hingegen um ein exozyklisches DNA-Addukt handelt.

Insgesamt wurden, wie auch bei den 3-HPMA-Gehalten (Kapitel 4.3.1.2.1), starke interindividuelle Schwankungen zwischen den einzelnen Versuchstieren beobachtet. Daher konnten zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen auch keine signifikanten Unterschiede in der DNA-Adduktbildung erfasst werden. Auch bei der höchsten Acrylamiddosis von 10 mg/kg KG blieb die OH-PdG-Rate mit $9,5 \pm 1,2$ Addukten/ 10^8 Nukleotide im Bereich der unbehandelten Kontrollgruppe ($10,5 \pm 2,7$ Addukte/ 10^8 Nukleotide). Die in dieser Untersuchung gefundenen Adduktraten lagen im Bereich von denen, die Zhang und Mitarbeiter im humanen Lungengewebe von Rauchern und Nichtrauchern gefunden haben (annähernd 10 Addukte/ 10^8 Nukleotide) [Zhang et al., 2007].

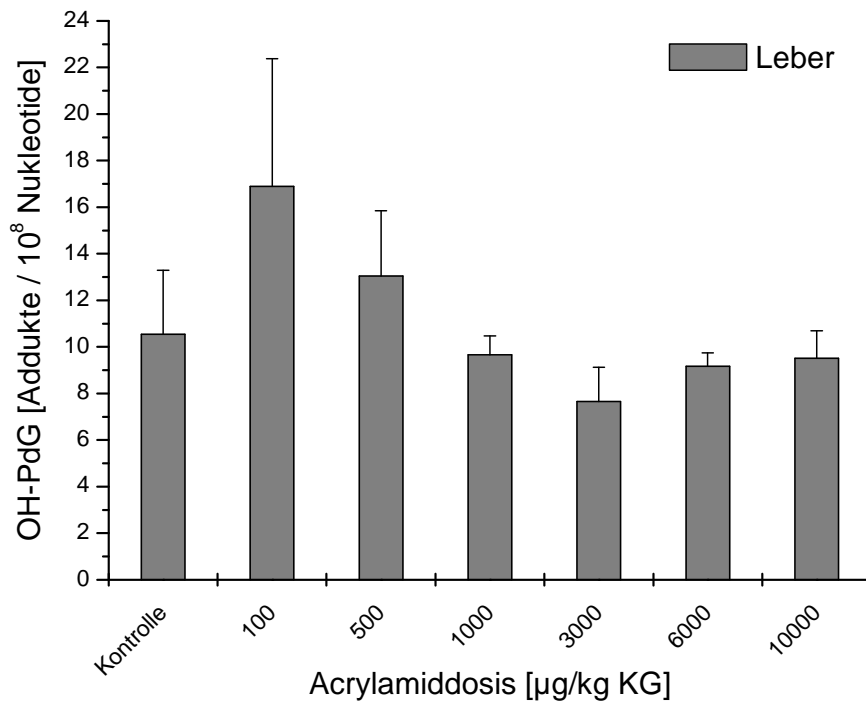


Abbildung 51 Darstellung der OH-PdG-Addukte/ 10^8 Nukleotide in Leberproben von mit Acrylamid-behandelten (100-10000 $\mu\text{g}/\text{kg KG}$) SD-Ratten (n = 2-3)

Diese Befunde decken sich mit Ergebnissen aus Untersuchungen zur 3-HPMA-Ausscheidung nach Applikation hoher Dosen Acrylamid (0,05-10 mg/kg KG) an männliche SD-Ratten [Berger, 2010], bei denen ebenfalls bis zur höchsten Acrylamiddosis, verglichen mit der unbehandelten Kontrollgruppe kein signifikanter Unterschied in der Ausscheidung beobachtet werden konnte. Die Untersuchung der DNA-Adduktbildung nach Gabe hoher Dosen an Acrylamid verdeutlichen die hohe Effektivität und Kapazität des durch GSH-Kopplung vermittelten Phase-II-Metabolismus.

4.3.2 Bestimmung der Eliminationskinetik von Acrolein im Menschen nach einmaliger Aufnahme

Zur Untersuchung der Ausscheidungskinetik von Acrolein wurde an einen Probanden in einem Vorversuch Acrolein im Bereich des TDI (7,5 $\mu\text{g}/\text{kg KG}$) verabreicht. Der Proband wurde angehalten sich 24 h vor Aufnahme und während der Studienphase Acrylamid- und Acrolein-arm zu ernähren. Anschließend wurde die MA-Ausscheidung in den Zeiträumen vor Aufnahme und 0-2 h, 2-4 h, 4-6 h, 6-8 h, 8-12 h und 12-24 h nach Aufnahme mittels HPLC-ESI-MS/MS im Urin bestimmt und auf Kreatinin bezogen.

In Abbildung 52 ist der zeitliche Verlauf der MA-Ausscheidung nach Aufnahme von 7,5 µg Acrolein/kg KG (615 µmol absolut) gezeigt. Vor Aufnahme lag der Gehalt an 3-HPMA bei $0,59 \pm 0,06$ µmol/g Kreatinin, jener von CEMA bei $0,62 \pm 0,01$ µmol/g Kreatinin. Der höchste Gehalt an 3-HPMA und CEMA wurde bereits 2 h (t_{max}) nach Aufnahme mit maximaler Konzentration (c_{max}) von $1,61 \pm 0,34$ µmol/g Kreatinin und $1,05 \pm 0,06$ µmol/g Kreatinin erreicht. Die Eliminationshalbwertszeit ($t_{1/2}$) für 3-HPMA betrug 8,9 h, jene für CEMA 11,8 h.

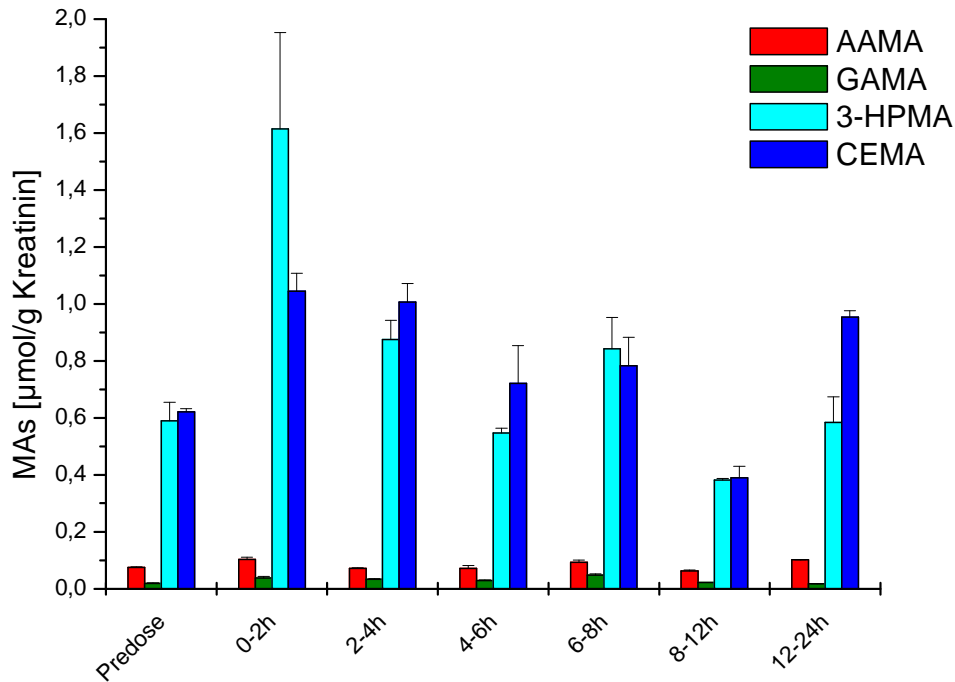


Abbildung 52 Darstellung der Elimination von AAMA, GAMA, 3-HPMA und CEMA (µmol/g Kreatinin) im Humanurin bis 24 h nach Aufnahme von 7,5 µg Acrolein/kg KG (n = 1, Doppelbestimmung)

Um einen potentiellen Einfluss der Acroleinaufnahme auf die Ausscheidung der Acrylamid-assoziierten MA (AAMA und GAMA) zu erfassen, wurden diese mitbestimmt. Die Ausscheidung von AAMA und GAMA wurde durch die Aufnahme von Acrolein nicht beeinflusst und lag im Bereich von $0,09 \pm 0,02$ µmol/g Kreatinin (Range: 0,06-0,14 µmol/g Kreatinin) beziehungsweise $0,03 \pm 0,01$ µmol/g Kreatinin (Range: 0,02-0,05 µmol/g Kreatinin).

Die Untersuchung der einzelnen MA ließ Rückschlüsse auf das Verhältnis Acrolein zu Acrylamid zum Zeitpunkt vor der Acroleinaufnahme und damit einen Vergleich einer entsprechenden Hintergrundexposition zu. Die Summe aus den Werten für 3-HPMA plus CEMA versus AAMA plus GAMA war um den Faktor 13 höher. Diese Tatsache könnte für

eine mögliche endogene Bildung von Acrolein (Kapitel 2.2.5.2) oder andere Acroleinexpositionswege (Kapitel 2.2.5.1) sprechen.

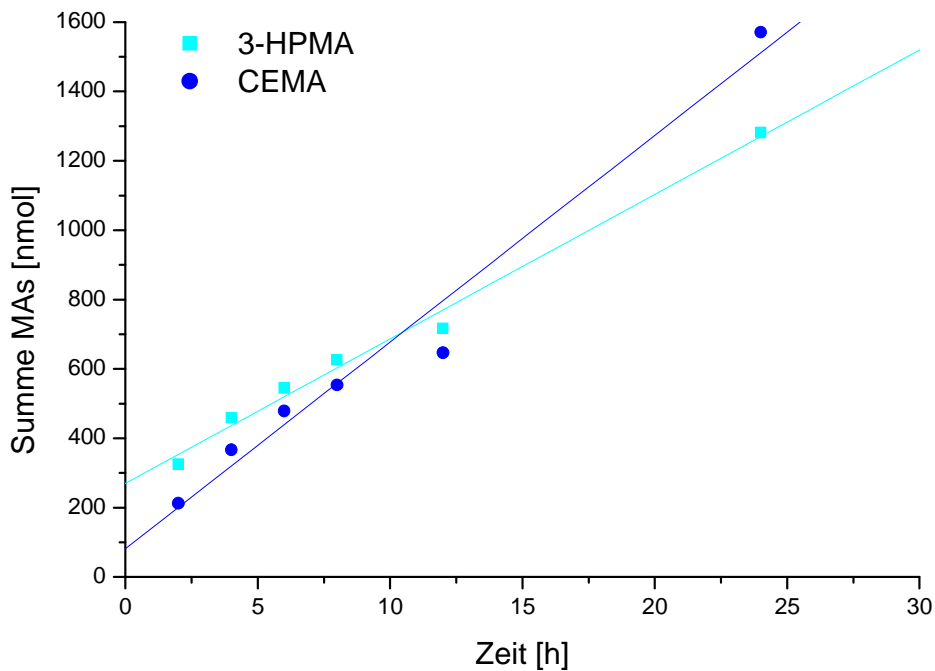


Abbildung 53 Zeitabhängige Elimination von Acrolein als 3-HPMA und CEMA (nmol) im Humanurin bis 24 h nach Aufnahme von 7,5 µg Acrolein/kg KG (n = 1, Doppelbestimmung)

Abbildung 53 zeigt die aufsummierte absolute Ausscheidung von 3-HPMA und CEMA nach Aufnahme von Acrolein in Trinkwasser. Die Ausscheidung von beiden MA ist in dem untersuchten Zeitraum linear (Korrelationskoeffizienten $R > 0,978$). Prozentual wurden über den Urin 26% der einmalig gegebenen Dosis von 7,5 µg Acrolein/kg KG innerhalb von 24 h ausgeschieden (3-HPMA plus CEMA). Dadurch wird die recht hohe Reaktivität von Acrolein im Körper verdeutlicht. Acrolein ist als einfachste α,β -ungesättigte Carbonylverbindung deutlich reaktiver gegenüber Nucleophilen als Acrylamid und neigt außerdem zu Polymerisation und Hydratisierung in wässrigem Medium. Diese Acroleinäquivalente würden vermutlich nicht mehr zur Kopplung an GSH zur Verfügung stehen und würden damit auch nicht als MA ausgeschieden und analytisch erfasst werden. Der Unterschied in der Reaktivität von Acrolein und Acrylamid zeigt sich auch beim Vergleich der MA-Ausscheidung. Nicht ganz 30% der verabreichten Dosis von 7,5 µg/kg KG werden über MA ausgeschieden. Im Vergleich hierzu lag die Ausscheidung von Acrylamid als MA nach Aufnahme über Trinkwasser bei beinahe 50% [Boettcher et al., 2006].

Bei annähernd zweitausendfach höherer Dosis haben Sanduja und Mitarbeiter im 24 h-Urin von Acrolein-behandelten Ratten etwa 80% einer mit Schlundsonde gegebenen Dosis (13 mg/kg KG) als 3-HPMA wiedergefunden [Sanduja *et al.*, 1989]. Hier scheint die Höhe der verabreichten Dosis (Faktor 1.800) einen wesentlichen Einfluss zu haben, jedoch ist nicht auszuschließen, dass Rattenstammunterschiede (bezüglich GST-Isoformen) ebenfalls beigetragen haben. Die Diskrepanz in der MA-Ausscheidung sollte anhand weiterer Versuche untersucht werden und bedarf weiterer Aufklärung.

Insgesamt verdeutlichen die Ergebnisse bei diesem Probanden, dass die Aufnahme von Acrolein im Bereich des TDI mit einem Anstieg in der Ausscheidung der Acrolein-assoziierten MA 3-HPMA und CEMA verbunden ist.

4.3.3 Bestimmung der Ausscheidungskinetik von Acrolein und Acrylamid im Menschen nach Aufnahme von kommerziell erhältlichen Kartoffelchips

Zur Untersuchung der Ausscheidungskinetik von Acrolein und Acrylamid wurde bei fünf männlichen Nichtrauchern (Alter: 24-36 Jahre) im Rahmen einer humanen Verzehrsstudie die MA-Ausscheidung zu den Urinsammelzeitpunkten vor Aufnahme, 0-2, 2-4, 4-6, 6-8, 8-12 und 12-24 h nach Verzehr von kommerziell erhältlichen Kartoffelchips mittels HPLC-ESI-MS/MS (MRM-Modus; API 3200) bestimmt (Bearbeitungsnummer Ethikkommission Rheinland-Pfalz: 837.445.11 (7987)). Die Probanden wurden angehalten, sich 24 h vor bis 24 h nach Aufnahme der Kartoffelchips sowohl Acrylamid- als auch Acrolein-arm zu ernähren, um die Hintergrundbelastung so gering wie möglich zu halten.

In Abbildung 54 ist die Ausscheidung von AAMA nach Aufnahme von 44 µg Acrylamid (0,6 µg/kg KG) über Kartoffelchips (0,25 mg Acrylamid/kg) auf Kreatinin bezogen als Boxplot gezeigt. Zum Zeitpunkt vor Aufnahme ($t = 0$ h) der Kartoffelchips betrug die AAMA-Konzentration 48 ± 17 nmol/g Kreatinin (Median: 60 nmol/g Kreatinin; Range: 35-63 nmol/g Kreatinin).

Die AAMA-Ausscheidung erreichte 4-6 h nach Aufnahme ein Maximum von 163 ± 31 nmol/g Kreatinin (Median: 164 nmol/g Kreatinin; Range: 124-216 nmol/g Kreatinin). Nach 24 h lag die Ausscheidung mit einer AAMA-Konzentration von 78 ± 38 nmol/g Kreatinin (Median: 74 nmol/g Kreatinin; Range: 40-140 nmol/g Kreatinin) wieder beim Niveau vor Kartoffelchipsverzehr. Die Eliminationshalbwertszeit betrug 11,8 h.

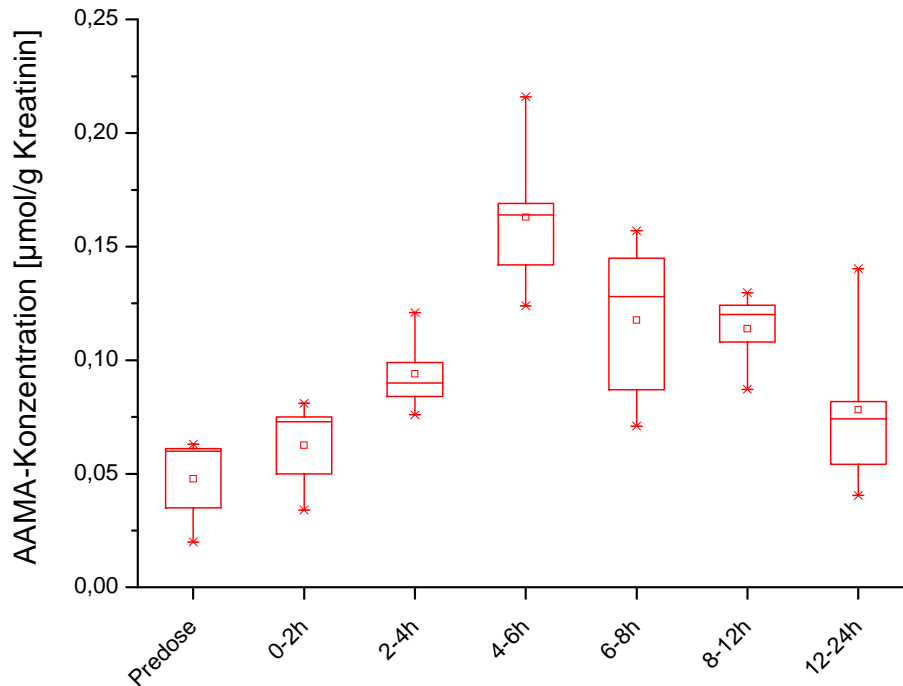


Abbildung 54 Darstellung der AAMA-Konzentrationen ($\mu\text{mol/g}$ Kreatinin) im Humanurin bis zu 24 h nach Aufnahme von $44 \mu\text{g}$ Acrylamid über 175 g handelsüblicher Kartoffelchips ($n = 5$, Doppelbestimmung)

Abbildung 55 zeigt die Ausscheidungskinetik von GAMA. Nach Exposition mit Acrylamid über die Kartoffelchips stieg der Gehalt von $16 \pm 5 \text{ nmol/g}$ Kreatinin (Median: 17 nmol/g Kreatinin; Range: $7\text{-}22 \text{ nmol/g}$ Kreatinin) vor Aufnahme auf $34 \pm 17 \text{ nmol/g}$ Kreatinin (Median: 32 nmol/g Kreatinin; Range: $12\text{-}64 \text{ nmol/g}$ Kreatinin) zum Zeitpunkt t_{max} nach 6 h an.

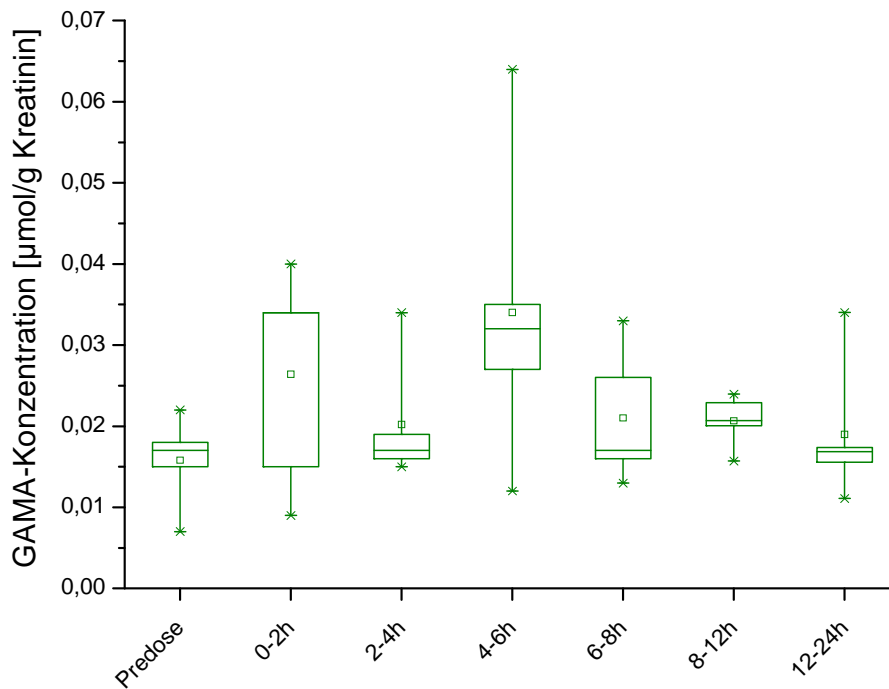


Abbildung 55 Darstellung der GAMA-Konzentrationen ($\mu\text{mol/g}$ Kreatinin) im Humanurin bis zu 24 h nach Aufnahme von $44 \mu\text{g}$ Acrylamid über 175 g handelsüblicher Kartoffelchips ($n = 5$, Doppelbestimmung)

Die Kinetik der GAMA-Ausscheidung zeigte im Gegensatz zu den anderen untersuchten MA keinen signifikanten Anstieg nach Kartoffelchipsaufnahme im untersuchten Zeitraum von 24 h. Diese Ergebnisse decken sich mit den Befunden aus der *in vivo* Studie an Ratten (Kapitel 4.3.1.1.1), bei der ein signifikanter Anstieg in der MA-Ausscheidung (AAMA und GAMA) im Vergleich zur nicht behandelten Kontrollgruppe erst ab einer Dosis von $1,0 \mu\text{g/kg}$ KG beobachtet wurde. Ratten weisen eine höhere CYP450 2E1-Aktivität als Menschen auf [Doerge et al., 2007; Fennell et al., 2005; Kopp & Dekant, 2009; Paulsson et al., 2003] und können somit Acrylamid effektiver zu Glycidamid verstoffwechseln. Die im Vergleich zur Ratte geringere CYP450 2E1-Aktivität bei Menschen ist offensichtlich nicht ausreichend, um bei der Dosis von durchschnittlich $0,6 \mu\text{g/kg}$ KG über die Aufnahme von kommerziell erhältlichen Kartoffelchips einen signifikanten Anstieg in der GAMA-Ausscheidung beobachten zu können.

Wird die absolut ausgeschiedene AAMA- und GAMA-Menge mit der aufgenommenen Menge an Acrylamid verglichen, so betrug die renale Ausscheidung $44,1 \pm 7,1\%$ der Dosis von $0,6 \mu\text{g/kg}$ KG und lag damit im Bereich der in der Literatur publizierten Wiederfindung [Boettcher et al., 2006; Doroshenko et al., 2009]. Die Ergebnisse lassen zusätzlich auch eine Aussage über die Bioverfügbarkeit von Acrylamid nach Aufnahme über Kartoffelchips im Vergleich zur Aufnahme über Trinkwasser zu. Nach Aufnahme von 1 mg

isotopenmarkiertem Acrylamid über Trinkwasser durch einen freiwilligen Probanden fanden Boettcher und Mitarbeiter rund 48% der Dosis als MA (AAMA plus GAMA) im 24 h-Sammelurin wieder. Aufgrund der nicht signifikant unterschiedlichen Wiederfindung scheint es keinen Unterschied in der Bioverfügbarkeit von Acrylamid zu geben. Von ähnlichen Ergebnisse berichteten Berger und Mitarbeiter, die die Bioverfügbarkeit von Acrylamid nach Aufnahme verschiedener Lebensmittel an männlichen SD-Ratten untersuchten und ebenfalls keinen signifikanten Unterschied in der Bioverfügbarkeit beobachten konnten [Berger *et al.*, 2011].

In weiblichen SD-Ratten betrug das GAMA/AAMA-Verhältnis in der Kontrollgruppe, wie auch bei den mit Acrylamid-behandelten Tieren im Mittel $0,4 \pm 0,1$ (Kapitel 4.3.1.1.1). Dies steht im Einklang mit dem Befund dass Ratten eine höhere CYP450-Aktivität aufweisen und somit Acrylamid schneller und effizienter zu Glycidamid verstoffwechseln als Menschen [Kopp & Dekant, 2009; Young *et al.*, 2007].

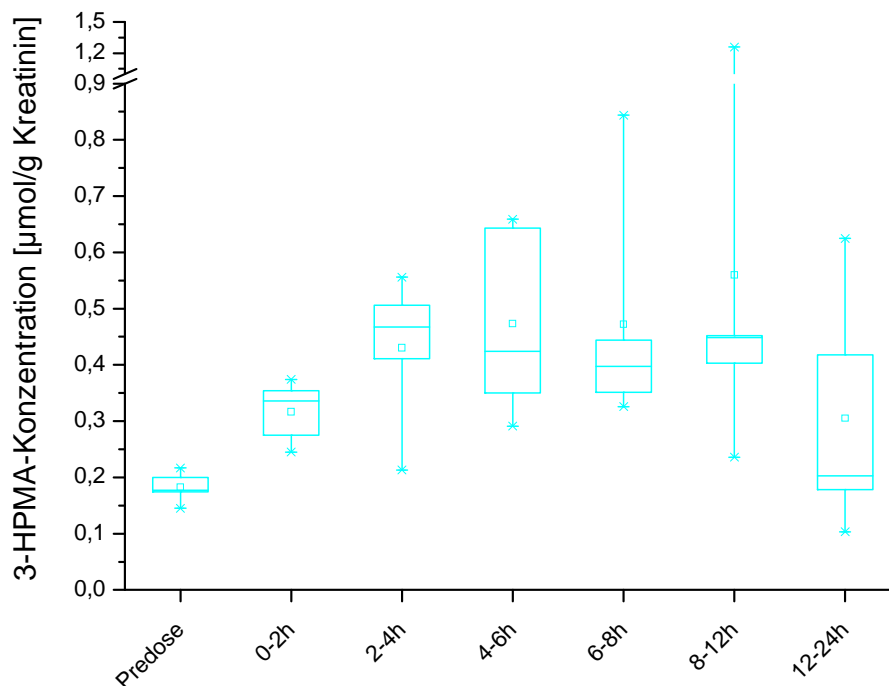


Abbildung 56 Darstellung der 3-HPMA-Konzentrationen (µmol/g Kreatinin) im Humanurin bis zu 24 h nach Aufnahme von 4,6 µg Acrolein über 175 g handelsüblicher Kartoffelchips (n = 5, Doppelbestimmung)

In Abbildung 56 ist die Ausscheidungskinetik von 3-HPMA nach Aufnahme der Kartoffelchips zu sehen. Der Acroleingehalt in den Kartoffelchips wurde von Dr. Michael Granvogel an der Technischen Universität München nach der Methode von Ewert und Mitarbeitern mittels

Headspace-GC-MS bestimmt [Ewert *et al.*, 2011]. Die ermittelte Konzentration betrug $26,5 \pm 2,1 \mu\text{g Acrolein/kg}$, was einer durchschnittlichen Dosis von $0,06 \mu\text{g/kg KG}$ und einer absolut aufgenommenen Menge von $4,6 \mu\text{g Acrolein}$ entsprach.

Der 3-HPMA-Gehalt im Humanurin stieg von einer Konzentration von $0,18 \pm 0,02 \mu\text{mol/g Kreatinin}$ (Median: $0,18 \mu\text{mol/g Kreatinin}$; Range: $0,15\text{-}0,22 \mu\text{mol/g Kreatinin}$) vor Aufnahme auf $0,43 \pm 0,12 \mu\text{mol/g Kreatinin}$ (Median: $0,47 \mu\text{mol/g Kreatinin}$; Range: $0,21\text{-}0,56 \mu\text{mol/g Kreatinin}$) zum Zeitpunkt t_{max} (2-4 h) an. Die Eliminationshalbwertszeit betrug 12,2 h.

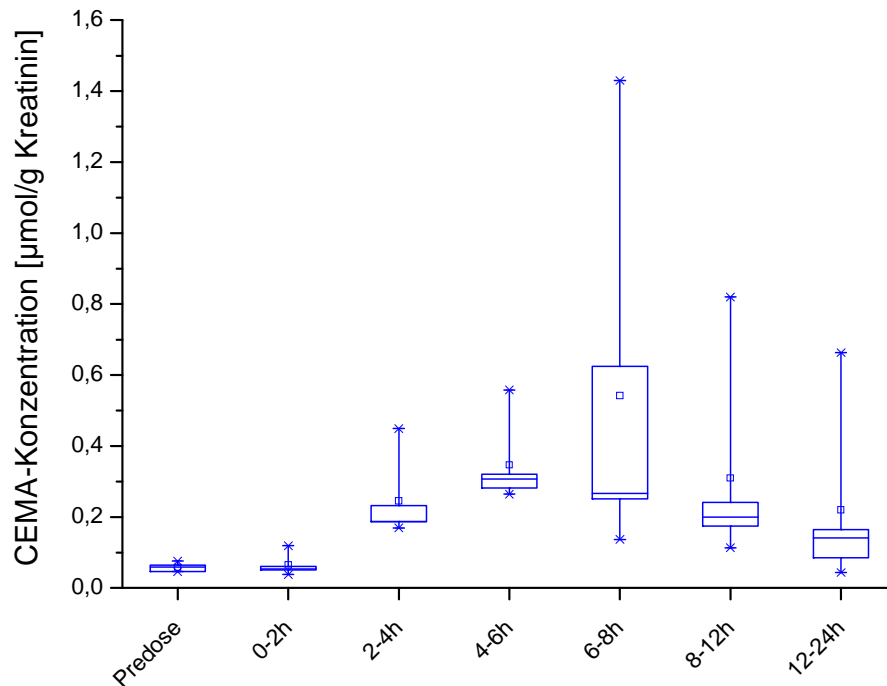


Abbildung 57 Darstellung der CEMA-Konzentrationen ($\mu\text{mol/g Kreatinin}$) im Humanurin bis zu 24 h nach Aufnahme von $4,6 \mu\text{g}$ Acrolein über 175 g handelsüblicher Kartoffelchips ($n = 5$, Doppelbestimmung)

In Abbildung 57 ist die Ausscheidungskinetik von CEMA nach Aufnahme der Kartoffelchips dargestellt. Die CEMA-Konzentration stieg im Humanurin von $0,06 \pm 0,01 \mu\text{mol/g Kreatinin}$ (Median: $0,06 \mu\text{mol/g Kreatinin}$; Range: $0,05\text{-}0,08 \mu\text{mol/g Kreatinin}$) vor Aufnahme auf $0,35 \pm 0,11 \mu\text{mol/g Kreatinin}$ (Median: $0,31 \mu\text{mol/g Kreatinin}$; Range: $0,26\text{-}0,56 \mu\text{mol/g Kreatinin}$) nach 6 h (t_{max}) an. Die Eliminationshalbwertszeit ($t_{1/2}$) lag bei 10,7 h. In der Literatur wurde von durchweg höheren Urinkonzentrationen an 3-HPMA und CEMA als sie zu den Zeitpunkten vor Aufnahme in der vorliegenden Arbeit gemessen wurden berichtet. Carmella und Mitarbeiter ermittelten mittlere 3-HPMA-Konzentrationen von $1,90 \mu\text{mol/g Kreatinin}$ (Median: $0,68 \mu\text{mol/g Kreatinin}$) bei Nichtrauchern ($n = 21$) [Carmella *et al.*, 2007]. Weniger hohe 3-HPMA-Konzentrationen haben Schettgen und Mitarbeiter ermittelt (jeweils $n = 14$)

[Schettgen *et al.*, 2008]. Dabei lagen die 3-HPMA-Gehalte bei 0,51 $\mu\text{mol/g}$ Kreatinin (Median). Das größte Probandenkollektiv verwendeten Ding und Mitarbeiter bei ihren Untersuchungen. Hier wurden mittlere 3-HPMA-Gehalte von 0,20 $\mu\text{mol/g}$ Kreatinin (Median: 0,11 $\mu\text{mol/g}$ Kreatinin) und 0,18 $\mu\text{mol/g}$ Kreatinin (Median: 0,16 $\mu\text{mol/g}$ Kreatinin) für CEMA bei 59 Nichtrauchern festgestellt [Ding *et al.*, 2009]. Die mittleren Gehalte an 3-HPMA und CEMA vor Aufnahme, die im Rahmen dieser Arbeit bestimmt wurden, betragen $0,18 \pm 0,02 \mu\text{mol/g}$ Kreatinin und $0,06 \pm 0,01 \mu\text{mol/g}$ Kreatinin.

Da die MA-Gehalte dieser Arbeit nach Einhaltung einer speziellen Diät im Vergleich zur Literatur gemessen wurden, bei denen lediglich von allgemeinen Hintergrundgehalten berichtet wurde, zeigte sich ein relativ großer Einfluss der Nahrungsaufnahme auf die Ausscheidung von vor allem von Acrolein-assoziierten MA.

Das Verhältnis 3-HPMA/CEMA lag bei rund drei. 3-HPMA schien somit der bevorzugt ausgeschiedene Metabolit von Acrolein im Urin zu sein, was in Einklang mit der Literatur stand [Parent *et al.*, 1998]. Die CEMA-Konzentration im Urin konnte allerdings nach Aufnahme von Acrolein-haltigen Lebensmitteln auf ein mit der 3-HPMA-Konzentration vergleichbares Niveau ansteigen, wie es in Abbildung 59 (z.B. 8 h nach Aufnahme) zu sehen ist.

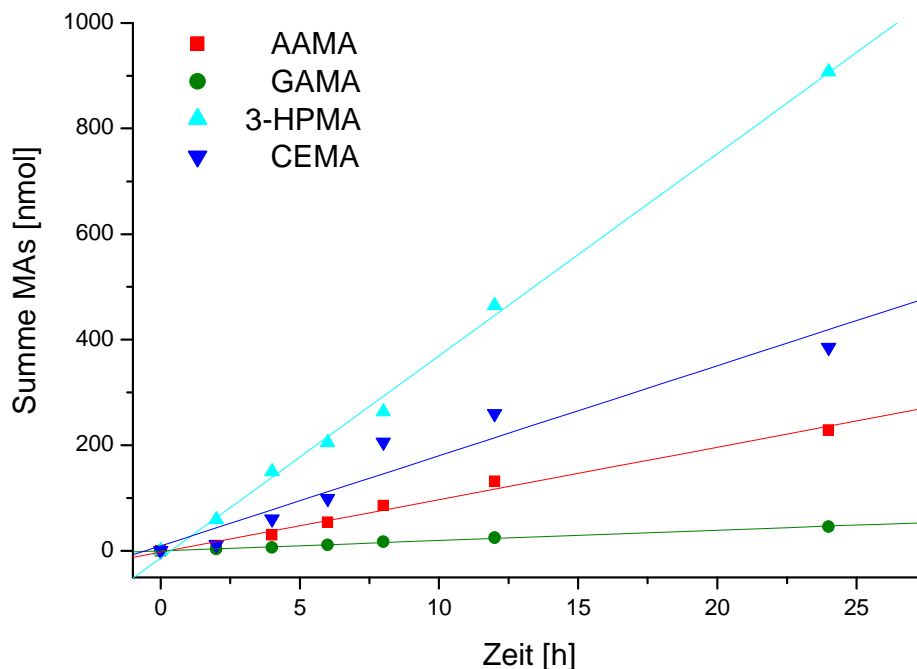


Abbildung 58 Bestimmung der Ausscheidungskinetik von AAMA, GAMA, 3-HPMA und CEMA im Humanurin nach Aufnahme von 175 g handelsüblichen Kartoffelchips (n = 5, Doppelbestimmung)

Abbildung 58 zeigt die aufsummierte absoluten Ausscheidungen der untersuchten MA AAMA, GAMA, 3-HPMA und CEMA nach Aufnahme von kommerziell erhältlichen Kartoffelchips. Die Ausscheidungen der vier MA war in dem untersuchten Zeitraum zeitbezogen linear (Korrelationskoeffizienten $R > 0,966$; Tabelle 17). Anhand der Abbildung und der Tabelle lassen sich die Geschwindigkeiten der Ausscheidungen der MA durch Vergleich der Steigungen der Regressionsgeraden ablesen. Die beiden Acrolein-assoziierten MA 3-HPMA und CEMA wurden schneller ausgeschieden, als die Acrylamid-assoziierten MA AAMA und GAMA, was sich in diesem Experiment nicht in signifikant unterschiedlichen Eliminationshalbwertszeiten widerspiegelte, die für AAMA, 3-HPMA und CEMA im Bereich zwischen elf und zwölf Stunden lagen.

Tabelle 17 Übersicht über die Bildungskinetik von AAMA GAMA, 3-HPMA und CEMA nach Aufnahme von 175 g handelsüblichen Kartoffelchips (n = 5, Doppelbestimmung)

MA	Regressionsgerade	Korrelationskoeffizient [R]
AAMA	$y = 9,9275 x - 2,1641$	0,994
GAMA	$y = 1,9545 x + 0,0409$	0,997
3-HPMA	$y = 38,2915 x - 13,4483$	0,999
CEMA	$y = 17,0582 x + 9,6769$	0,966

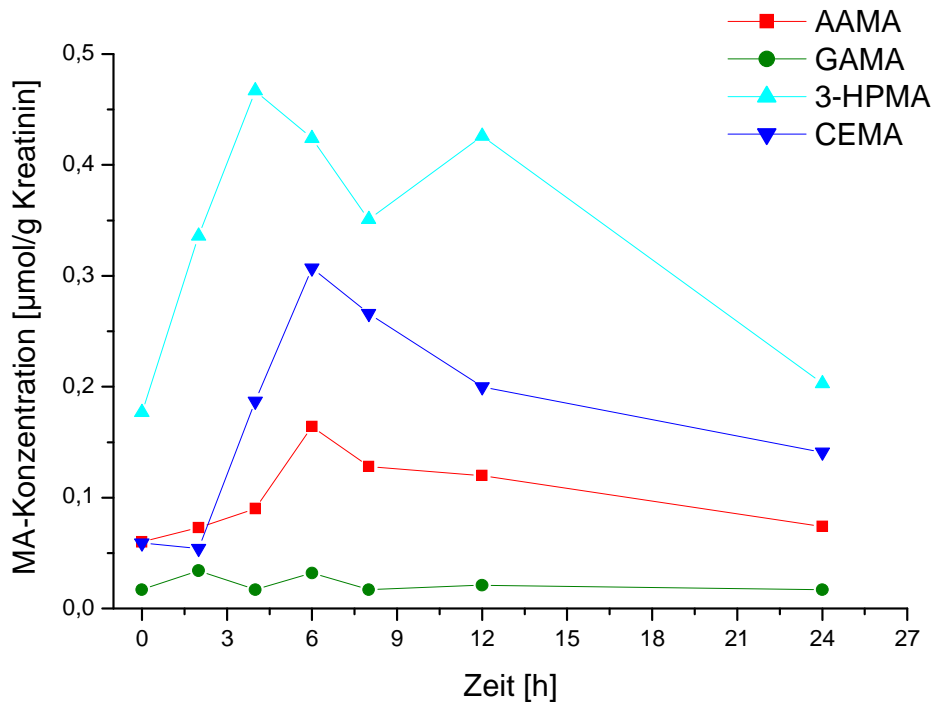


Abbildung 59 Darstellung der AAMA-, GAMA-, 3-HPMA- und CEMA-Konzentrationen ($\mu\text{mol/g}$ Kreatinin) im Humanurin bis zu 24 h nach Aufnahme von $44 \mu\text{g}$ Acrylamid und $4,6 \mu\text{g}$ Acrolein über 175 g handelsüblicher Kartoffelchips (Median, $n = 5$, Doppelbestimmung)

In Abbildung 59 sind die Medianwerte der MA als Ausscheidungskinetiken vergleichend dargestellt. Wie schon bei den Eliminationshalbwertzeiten zu erkennen war, sind die Kurvenverläufe von AAMA, 3-HPMA und CEMA vergleichbar, unterscheiden sich aber in der ausgeschiedenen Stoffmenge. Es ist ein eindeutiger Anstieg dieser drei MA nach Aufnahme der Kartoffelchips erkennbar. Werden die AUC-Werte (area under curve) der Acrylamid-assoziierten MA ($\text{AUC}_{\text{AAMA} + \text{GAMA}} = 3,0$) mit denen der Acrolein-assoziierten MA ($\text{AUC}_{\text{3-HPMA} + \text{CEMA}} = 13,0$) verglichen, so lässt sich ein Faktor von etwa vier ermitteln. Legt man gleiche Reaktivität und Kopplungsraten von Acrylamid und Acrolein im Organismus zugrunde, so muss in den kommerziell erhältlichen Kartoffelchips ein deutlich höherer Gehalt an Acrolein als an Acrylamid gewesen sein, welcher bei rund $0,25 \text{ mg/kg}$ lag.

Werden die Ausscheidungskinetiken von 3-HPMA und CEMA aus diesem Experiment mit denen nach Aufnahme von Acrolein in Trinkwasser verglichen (Kapitel 4.3.2), so lässt sich ein Unterschied in den Ausscheidungsmaxima erkennen. Nach Aufnahme von Acrolein wurden die maximalen Urinkonzentrationen für 3-HPMA und CEMA bereits nach zwei Stunden beobachtet, wohingegen nach Aufnahme von Kartoffelchips die maximalen Konzentrationen für diese MA erst sechs Stunden nach Aufnahme erreicht wurde (Abbildung

60). Dies lässt auf eine verzögerte Freisetzung von Acrolein aus der Lebensmittelmatrix schließen, was für Acrylamid auch schon bei einer früheren Studie an Ratten (SD-Ratten) in der Arbeitsgruppe Eisenbrand beobachtet wurde. Im Vergleich zur Verabreichung von 100 µg Acrylamid/kg KG über Trinkwasser war bei Aufnahme derselben Dosis über Pommes Frites die maximale Acrylamidserumkonzentration (c_{max}) um einen Faktor von drei bis vier höher. Die Aufnahme von Acrylamid über Pommes Frites führte zu einer verzögerten Freisetzung von Acrylamid aus der Lebensmittelmatrix und dadurch zu einer Verlängerung der Resorption [Berger et al., 2011].

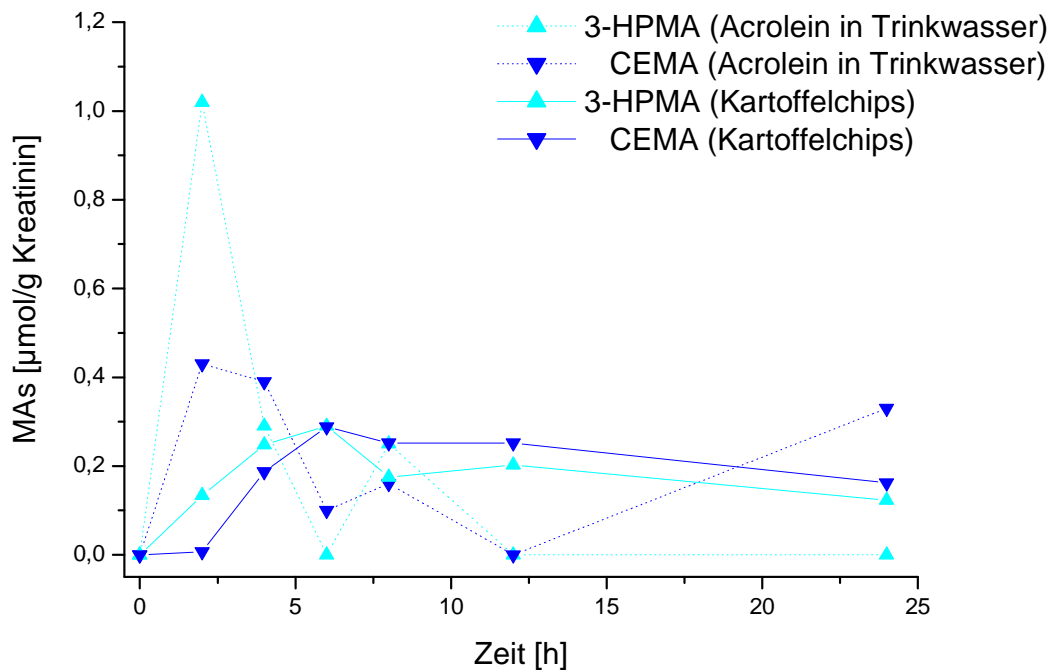


Abbildung 60 Darstellung der 3-HPMA- und CEMA-Konzentrationen ($\mu\text{mol/g}$ Kreatinin) im Humanurin bis zu 24 h nach Aufnahme von 7,5 µg Acrolein/kg KG im Vergleich zur Ausscheidung nach Aufnahme von durchschnittlich 0,06 µg Acrolein/kg KG über 175 g handelsüblicher Kartoffelchips (Median, n = 5, Doppelbestimmung)

Da Acrolein in kohlenhydratreichen Lebensmitteln noch nicht zuverlässig erfasst werden kann, lässt sich die aufgenommene Menge über 175 g Kartoffelchips und der Gehalt an Acrolein in den Kartoffelchips nur über eine Näherung angeben. Bei Gabe von Acrolein über Trinkwasser wurden 26% der aufgenommenen Dosis als MA im 24 h-Urin wiedergefunden. Wird diese Wiederfindung auf die Interventionsstudie mit handelsüblichen Kartoffelchips übertragen, so errechnet sich eine Acroleindosis von 4,3 µg/kg KG, was 57% des geltenden TDI-Wertes für Acrolein (7,5 µg/kg KG [NTP, 2006]) entspräche. Bei einer Verzehrsmenge von 175 g Kartoffelchips ließ dies auf eine Konzentration von 1,8 mg Acrolein/kg

Kartoffelchips und einer absolut aufgenommenen Menge von 320 µg schließen. Dieser Gehalt ist um ein vielfaches höher als jener, der mittels Headspace-GC-MS (26,5 µg/kg) bestimmt wurde. Eine Erklärung hierfür wäre die Möglichkeit, dass Acrolein an der Lebensmittelmatrix reversibel gebunden vorliegen könnte und somit nicht mittels Headspace-Analytik erfasst wurde. Von Acrolein ist bekannt, dass es im wässrigen System zu großen Anteilen hydratisiert vorliegt [Schmidt, 1989]. Man könnte sich ähnliche Speicherformen an Kohlenhydraten unter Bildung eines Dioxolans oder Aminosäuren wie Serin unter Bildung eines Oxazolidins vorstellen (siehe Abbildung 61), aus denen es im Magen-Darm-Trakt (obere Abschnitte) durch saure Hydrolyse oder entsprechende Mikroflora wieder freigesetzt und so erst dann bioverfügbar, d.h. resorbiert und metabolisiert werden könnte.

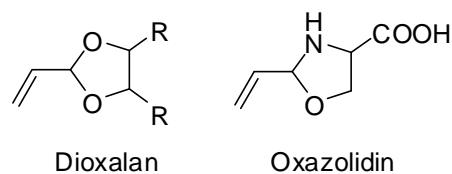


Abbildung 61 Mögliche Speicherformen für Acrolein in Lebensmitteln; Dioxalan aus Reaktion mit Kohlenhydraten (links) und Oxazolidin aus der Reaktion mit Aminosäuren am Beispiel von Serin (rechts)

Die Exposition mit Acrolein über Lebensmittel in dieser Höhe ist bisher bei der Risikobewertung nicht berücksichtigt worden. Es wäre daher notwendig im Rahmen weiterer Untersuchungen die Exposition mit Acrolein durch Verzehr hitzebehandelter Lebensmittel zu erfassen und neu zu beurteilen, da die Exposition möglicherweise über dem TDI liegen könnte.

4.3.4 Bestimmung der Ausscheidungskinetik von Acrolein und Acrylamid im Menschen nach Aufnahme von selbst hergestellten Kartoffelchips

Zur Untersuchung der Ausscheidungskinetik von Acrolein und Acrylamid nach *in vivo* Adduktbildung mit GSH und Abbau zu den entsprechenden Mercaptursäuren wurde bei 13 Probanden einer humanen Verzehrstudie die MA-Ausscheidung zu den Zeitpunkten unmittelbar vor Aufnahme, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 24, 36, 48 und 72 h in der Studienperiode R-Phase nach Aufnahme von selbst hergestellten Kartoffelchips mittels HPLC-ESI-MS/MS (API

3200) bestimmt. Die Studie wurde ursprünglich in Zusammenarbeit mit Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Uwe Fuhr mit dem Ziel der Untersuchung des Einflusses von CYP450 2E1 auf die Toxikokinetik von Acrylamid im Menschen durchgeführt (Studienschema siehe Kapitel 6.6.3): „Bedeutung der CYP450 2E1-Aktivität für die Toxikokinetik von Acrylamid beim Menschen“ (Studien-Nr. KPUK-03-ACR/PIL-01). Es sollte die Kinetik der Biomarkerbildung von Acrylamid und Glycidamid nach Gabe Acrylamid-reicher Nahrung in Form von Kartoffelchips jeweils bei unbeeinflusster (R-Phase), gehemmter (T1-Phase) und induzierter (T2-Phase) CYP450 2E1-Aktivität bestimmt werden. Die einzelnen Studienperioden wurden in randomisierter Reihenfolge durchgeführt. Um eine gleichmäßige Hintergrundbelastung der Probanden mit Acrylamid gewährleisten zu können, wurden sie angewiesen 72 Stunden vor bis 48 Stunden nach einer Studienperiode auf Acrylamid-reiche Nahrung zu verzichten. Zusätzlich wurde elf Stunden vor bis 6 Stunden nach Aufnahme der Kartoffelchips gefastet. Im Rahmen der eigentlichen Studie waren die toxikokinetischen Parameter von AAMA und GAMA bestimmt und publiziert worden [Doroshenko et al., 2009; Fuhr et al., 2006]. Aufgrund der Lagerung bei -80°C über etwa fünf Jahre wurden die Urinproben im Verlauf der vorliegenden Arbeit nochmals analysiert, um die Stabilität der MA (AAMA und GAMA) durch Vergleich der toxikokinetischen Parameter zu verifizieren. Es konnte gezeigt werden, dass die MA von Acrylamid als Expositionsbiomarker über die gesamte Lagerzeit (rund fünf Jahre) stabil waren. In Abbildung 62 ist die Ausscheidung von AAMA nach Aufnahme von 1 mg Acrylamid ($14,8 \mu\text{g}/\text{kg KG}$) über Kartoffelchips in der untersuchten Studienphase als Boxplot auf Kreatinin bezogen gezeigt. Zum Zeitpunkt vor Aufnahme ($t = 0 \text{ h}$) der Kartoffelchips betrug die AAMA-Konzentration $0,06 \mu\text{mol}/\text{g}$ Kreatinin. Nach Aufnahme der Chips nahm die Ausscheidung an AAMA innerhalb der ersten sechs Stunden (t_{max}) bis zu einer maximalen Konzentration (c_{max}) von $1,00 \mu\text{mol}/\text{g}$ Kreatinin zu. Die Eliminationshalbwertszeit betrug 14 h.

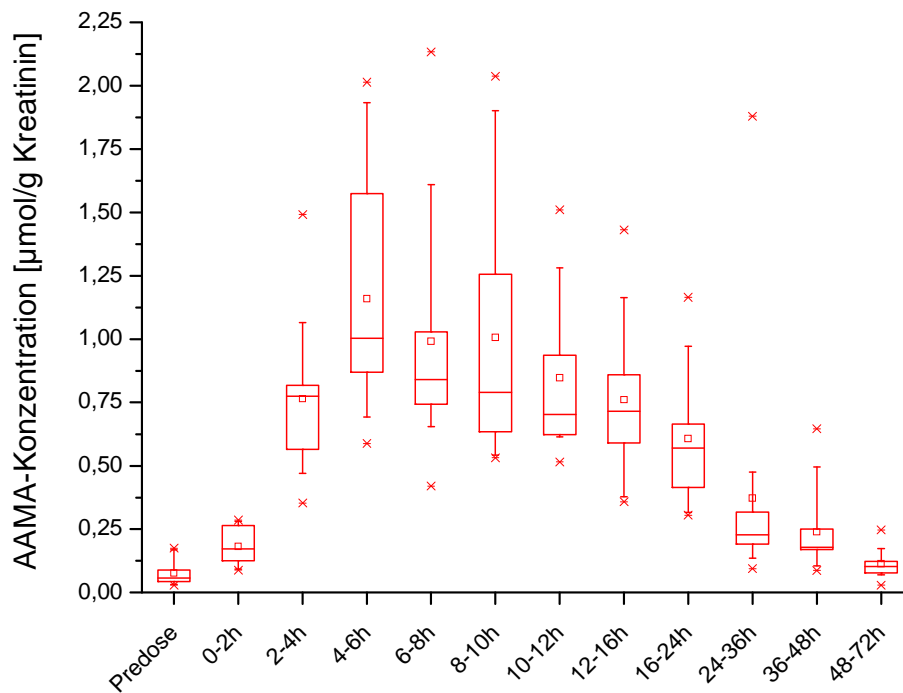


Abbildung 62 Darstellung der AAMA-Konzentrationen ($\mu\text{mol/g}$ Kreatinin) im Humanurin bis zu 72 h nach Aufnahme von 1 mg Acrylamid über 150 g selbst hergestellter Kartoffelchips ($n = 13$, Doppelbestimmung)

In Abbildung 63 ist die Ausscheidung von GAMA über 72 h nach Kartoffelchipsverzehr dargestellt. Nach Exposition mit Acrylamid stieg der Gehalt von $0,01 \mu\text{mol/g}$ Kreatinin vor Aufnahme auf $0,08 \mu\text{mol/g}$ Kreatinin innerhalb von 24 h. Die Eliminationshalbwertszeit der Ausscheidung von GAMA über den Urin betrug rund 22 h.

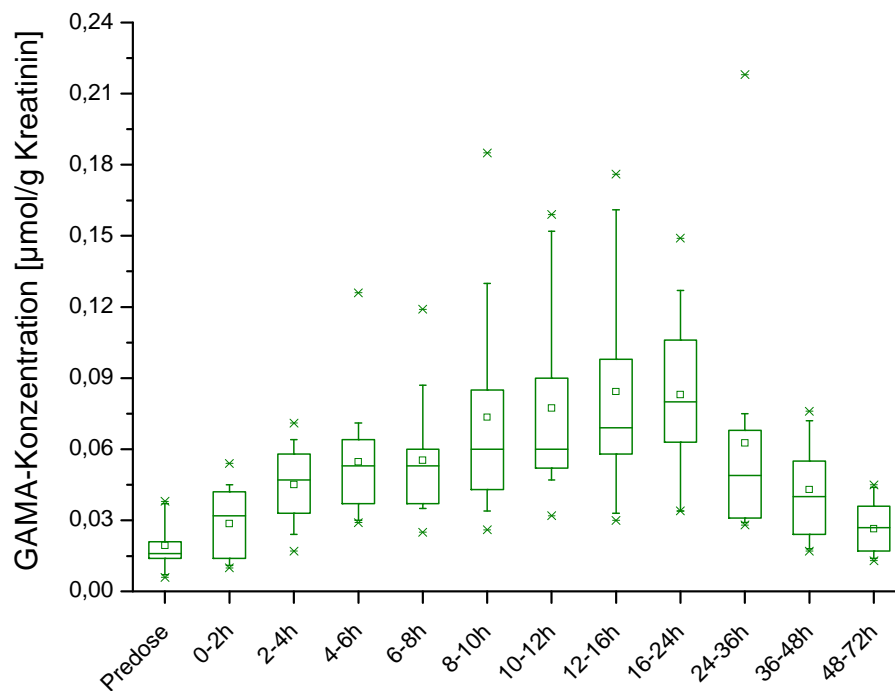


Abbildung 63 Darstellung der GAMA-Konzentrationen ($\mu\text{mol/g}$ Kreatinin) im Humanurin bis zu 72 h nach Aufnahme von 1 mg Acrylamid über 150 g selbst hergestellter Kartoffelchips ($n = 13$, Doppelbestimmung)

Abbildung 64 zeigt die Ausscheidungskinetik von 3-HPMA. Nach Aufnahme der Kartoffelchips unbekannter Acroleinkonzentration stieg der 3-HPMA-Gehalt im Humanurin von $1,96 \mu\text{mol/g}$ Kreatinin (vor Aufnahme) auf $58,01 \mu\text{mol/g}$ Kreatinin (c_{max}). Im Gegensatz zu AAMA und speziell GAMA war die maximale Ausscheidung von 3-HPMA sehr rasch erreicht: $t_{\text{max}} = 4 \text{ h}$. Dies wurde auch durch eine relativ kurze Eliminationshalbwertszeit von neun Stunden bestätigt.

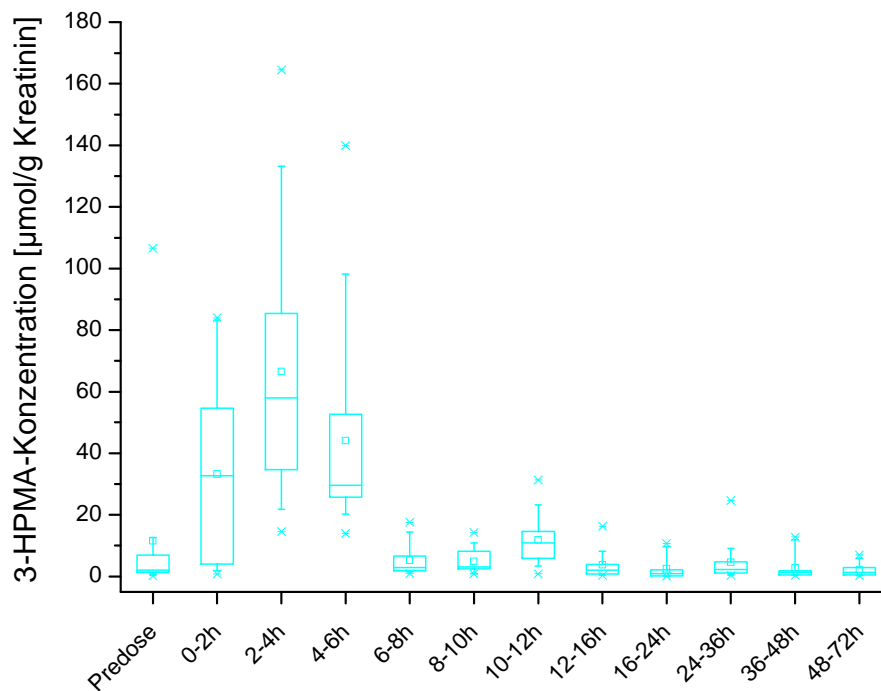


Abbildung 64 Darstellung der 3-HPMA-Konzentrationen im Humanurin ($\mu\text{mol/g}$ Kreatinin) bis zu 72 h nach Aufnahme von 150 g selbst hergestellter Kartoffelchips unbekannter Acroleinkonzentration (n = 13, Doppelbestimmung)

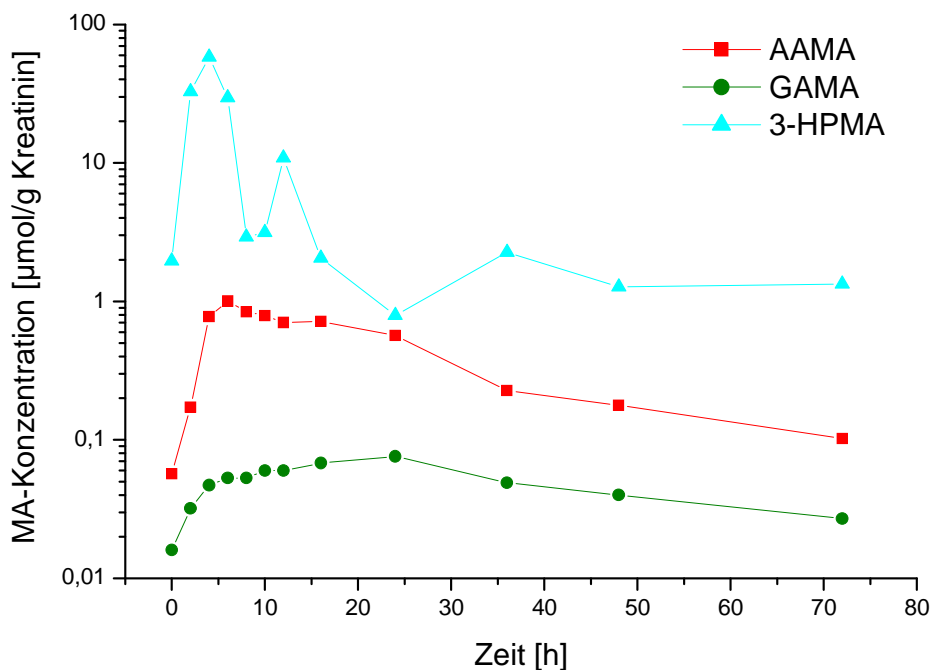


Abbildung 65 Darstellung der AAMA-, GAMA- und 3-HPMA-Konzentrationen ($\mu\text{mol/g}$ Kreatinin) im Humanurin bis zu 72 h nach Aufnahme von 1 mg Acrylamid und unbekannter Menge Acrolein über 150 g selbst hergestellte Kartoffelchips (Median, n = 13, Doppelbestimmung)

In Abbildung 65 sind die verschiedenen Ausscheidungskinetiken der drei untersuchten MA halblogarithmisch aufgetragen, wodurch die unterschiedlichen c_{\max} und t_{\max} nach Aufnahme der Kartoffelchips noch einmal verdeutlicht werden.

Die kovalente Wechselwirkung einer elektrophilen α,β -ungesättigten Carbonylverbindung mit einem Zielnukleophil, wie zum Beispiel der Thiolgruppe des GSH, hängt von der Reaktivität des Elektrophils und Nukleophils ab. Die Carboxamid-Gruppe des Acrylamids schwächt die Michael-Reaktivität aufgrund des +M-Effekts des Amids ab. Acrolein hingegen weist ein Elektronendefizit am β -Kohlenstoffatom der Doppelbindung auf, welches nicht durch einen Elektronendonator abgeschwächt wird, sondern eine Kombination von polarisierbaren beweglichen Elektronen mit den elektronenziehenden Wirkungen der Carbonylgruppe darstellt (siehe Abbildung 66).

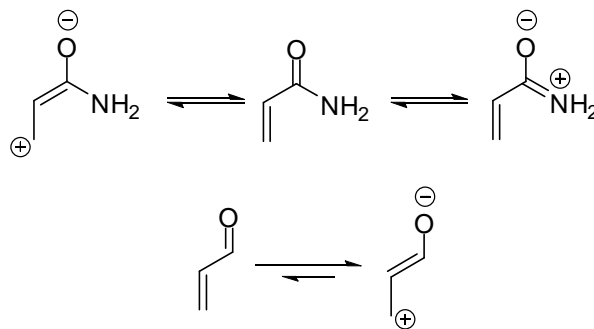


Abbildung 66 Resonanzstrukturen von Acrylamid (oben) und Acrolein (unten)

Der Unterschied im Elektronendefizit am β -Kohlenstoffatom und der daraus resultierende Unterschied in der Michael-Reaktivität könnte die verschiedenen Halbwertszeiten der MA-Elimination widerspiegeln. Dies konnte zusätzlich durch die experimentellen Reaktionskonstanten für die nicht-enzymatische Adduktbildung von Acrolein ($k_{\text{GSH}} = 2,12 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$) und Acrylamid ($k_{\text{GSH}} = -0,88 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$) mit GSH gezeigt werden [Schwobel et al., 2010]. Die Eliminationshalbwertszeiten von 3-HPMA betrug 9 h und war erheblich kürzer als jene von AAMA mit 14 h und GAMA mit 22 h.

Werden die Ausscheidungskurven aus Abbildung 65 integriert und miteinander verglichen, lassen sich Aussagen über die Verhältnisse der aufgenommenen Mengen an Acrylamid und Acrolein treffen. Die Fläche unter den Ausscheidungskurven (AUC) der Acrylamid-abhängigen MA (AAMA und GAMA) betrug 29 Flächeneinheiten. Die Fläche unter der Kurve von 3-HPMA hingegen lag bei 374; um den Faktor 12 höher.

Insgesamt verdeutlichen die Ergebnisse bei den untersuchten Probanden einen Anstieg der Ausscheidung von 3-HPMA, AAMA und GAMA nach Aufnahme von Kartoffelchips (14,8 μg Acrylamid/kg KG). Die Werte von AAMA vor Aufnahme waren mit 1,00 $\mu\text{mol/g}$ Kreatinin (207 nmol/l) und jene für GAMA mit 0,08 $\mu\text{mol/g}$ Kreatinin (39 nmol/l) nahezu identisch mit

denen, die in der original Studie bestimmt worden waren (AAMA: 252 nmol/l, GAMA: 42 nmol/l) [Fuhr et al., 2006], was die Stabilität der MA über fünf Jahre eindeutig belegte. Im Vergleich zur 3-HPMA-Konzentration, die bei 1,96 µmol/g Kreatinin (13 µmol/l) lag, waren die Werte von AAMA plus GAMA um etwa den Faktor 40 niedriger. Dies deutet darauf hin, dass die Exposition mit Acrolein im Vergleich zu Acrylamid über die selbst hergestellten Kartoffelchips viel höher zu sein scheint. Dieser Befund deckt sich einerseits mit den Ergebnissen dieser Arbeit (Kapitel 4.3.3) und andererseits mit Ergebnissen aus der Literatur. Schettgen und Mitarbeiter haben bei 14 nicht beruflich exponierten Nichtraucher eine dreifach höhere Ausscheidung von 3-HPMA im Vergleich zu AAMA beobachtet [Schettgen et al., 2004]. Der Unterschied zwischen den Konzentrationen von 3-HPMA vor Aufnahme in diesem Versuch (1,96 µmol/g Kreatinin) zu jener nach eingeschränkter Nahrungsaufnahme aus dem Versuch in Kapitel 4.3.3 (0,8 µmol/g Kreatinin) ist vermutlich auf unterschiedliche Ernährung vor den eigentlichen Experimenten zurückzuführen. In der Studie mit selbst hergestellten Kartoffelchips waren die Probanden lediglich angehalten, auf Acrylamid-reiche Nahrungsmittel zu verzichten, wohingegen in dem Experiment mit handelsüblichen Kartoffelchips die Probanden allgemein hitzebehandelte Lebensmittel wie z.B. auch gebratenes Fleisch vermeiden sollten.

Ob die Exposition mit Acrolein ausschließlich aus exogenen Quellen resultiert oder ob endogene Bildungsmechanismen von Acrolein möglicherweise ebenfalls beitragen, ist zurzeit nicht klar [Pan & Chung, 2002]. Die Werte für 3-HPMA vor Aufnahme der Kartoffelchips sind ähnlich zu solchen, von denen Carmella und Mitarbeitern für Nichtraucher berichteten (Median; 0,7 µmol/g Kreatinin) [Carmella et al., 2007]. Niedrigere Werte wurden von Ding und Mitarbeitern beobachtet (Median, 0,1 µmol/g Kreatinin). Zusätzlich zeigten sie, dass 3-HPMA und CEMA in Humanurin von Nichtrauchern in etwa gleicher Menge ausgeschieden wurden [Ding et al., 2009].

Aus der halblogarithmischen Darstellung (Abbildung 65) ist in der 3-HPMA-Ausscheidungskinetik eine deutliche Unstetigkeit verglichen mit den entsprechenden Plots von AAMA und GAMA zu erkennen. Dies könnte auf enterohepatische Zirkulation von Acroleinäquivalenten hinweisen. Für Acrolein selbst ist dies aber aufgrund des geringen Molekulargewichts auszuschließen. Aber auch eine zusätzliche Nahrungsaufnahme 6 h nach Aufnahme der Acrylamid-haltigen Kartoffelchips könnte möglicherweise hierzu beigetragen haben [Doroshenko et al., 2009]. Der Vergleich der Flächen unter den Ausscheidungskurven (AUC), die durch Integration der Kurven aus Abbildung 65 erhalten wurden, zeigte, dass die Ausscheidung von 3-HPMA jene der Summe von AAMA und GAMA um einen Faktor von 12 übertrifft. Anhand dessen ließe sich auf einen Acroleingehalt von etwa 12 mg/150g in den Studienchips schließen, der also viel höher als der Acrylamidgehalt (998 µg/150 g) wäre. Die höhere Reaktivität von Acrolein mit Nukleophilen im Vergleich zu

Acrylamid und Glycidamid [Schwobel *et al.*, 2010] könnte allerdings partiell zur gesteigerten GSH-Adduktbildung und MA-Ausscheidung beigetragen haben. Die Bestimmung der gesamten MA in den gelagerten Proben liefert ein Maß für die Exposition mit Acrylamid- und Acrolein-Äquivalenten während der Aufnahme der Kartoffelchips.

Die durchschnittliche absolute Ausscheidung von 3-HPMA der 13 Probanden betrug 98 µmol. Werden die Ergebnisse aus Kapitel 4.3.2, in dem eine Ausscheidung von rund 30% (3-HPMA plus CEMA, 24 h) einer definierten Aufnahme von Acrolein beobachtet wurde, so haben die Probanden hier Kartoffelchips mit einem berechneten Acroleingehalt von rund 18 mg/150 g aufgenommen. Dieser Wert korreliert recht gut mit dem Acroleingehalt, der über den Vergleich der AUC aus Abbildung 65 ermittelt wurde (12 mg/150 g).

5 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Toxikokinetik und -dynamik der beim Erhitzen von Lebensmitteln entstehenden Kontaminanten Acrylamid und Acrolein *in vitro* und *in vivo* zu untersuchen. Im Vordergrund stand die Erfassung dosisabhängiger Genotoxizität von Acrylamid sowie der MA als wichtigste Entgiftungsreaktion im Tierversuch im Bereich der derzeitigen Verbraucherexposition. Die Ergebnisse, insbesondere zur Toxikokinetik, sollten durch *in vitro* Versuche in primären Rattenhepatozyten untermauert werden. Außerdem sollte vergleichend die bisher kaum mithilfe von Biomarkern untersuchte nahrungsbezogene Exposition des Verbrauchers mit Acrylamid und Acrolein bestimmt werden. Eine Dosis-Wirkungsuntersuchung an SD-Ratten im Dosisbereich von 0,1 bis 10.000 µg/kg KG lieferte erstmals quantitative Informationen zur DNA-Adduktbildung durch den genotoxischen Acrylamid-Metaboliten Glycidamid bis in niedrigste Expositionsbereiche. In diesem Niedrigdosisbereich (0,1 bis 10 µg/kg KG) liegt die nach Einmaldosierung gemessene N7-GA-Gua-Bildung im unteren Bereich der humanen Hintergrundgewebsspiegel für DNA-Läsionen verschiedenen Ursprungs. Dieser Befund könnte die zukünftige Risikobewertung von Expositionen mit solchen genotoxischen Kanzerogenen auf eine neue und der Messung zugängliche Basis stellen. Mit der in dieser Arbeit eingesetzten extrem empfindlichen instrumentellen Analytik sind erstmals Messungen von genotoxischen Ereignissen bis in den Bereich der Verbraucherexposition möglich geworden. Es bleibt allerdings zu beachten, dass Genotoxizität zwar eine notwendige, aber nicht hinreichende Bedingung für Mutagenität und maligne Transformation ist. Die auf ein genotoxisches Ereignis folgende biologische Antwort, muss jedoch in die Risikobewertung mit einbezogen werden.

In primären Rattenhepatozyten ließ sich bei Inkubation mit Acrylamid zeigen, dass GSH-Addukte deutlich früher und bei niedrigeren Acrylamidkonzentrationen nachweisbar sind als Glycidamid und N7-GA-Gua-Addukte. Der direkte Vergleich der Bildung von Glycidamid mit jener der AA-GSH-Addukte ließ schließen, dass die Entgiftung von Acrylamid in primären Rattenhepatozyten bis zu dreifach schneller verläuft als die Giftung. Zusätzlich ließ sich erstmals zeigen, dass primäre Rattenhepatozyten neben der Kopplung von Xenobiotika an GSH, zumindest auch in kleinen Anteilen zur Umwandlung in die entsprechenden MA fähig sind.

Um das von Acrolein ausgehende Gefährdungspotential zu untersuchen, wurde dessen DNA-Adduktbildung *in vitro* untersucht. Als Biomarker für die Bildung eines Haupt-DNA-Adduktes wurde fünffach ¹⁵N-markiertes Hydroxypropanodeoxyguanosin (OH-[¹⁵N₅]-PdG) synthetisiert und charakterisiert. DNA Inkubationsversuche mit Acrolein zeigten eine konzentrations- und zeitabhängige Bildung der OH-PdG-Addukte. Acrolein reagierte nur wenig langsamer als Glycidamid zu diesen Addukten.

Zur Untersuchung der Toxikokinetik von Acrylamid und Acrolein *in vivo* nach Aufnahme von hoch belasteten bzw. kommerziell erhältlichen Kartoffelchips wurden zwei Humanstudien durchgeführt und die Ergebnisse ausgewertet. Die Ausscheidungskinetiken Acrolein-assoziiertes MA im Menschen korrelierten eindeutig mit der Aufnahme von Kartoffelchips. Der Vergleich der im Urin ausgeschiedenen Mengen an Acrolein- bzw. Acrylamid-assoziierten MA ließ auf eine wesentlich höhere nahrungsbezogene Exposition mit Acrolein (4- bis 12-fach) verglichen mit Acrylamid schließen. Analytische Messungen der Acroleingehalte in den Lebensmitteln hatten aber nur eine niedrige Kontamination ergeben, die nur einen geringen Anteil der expositionsbedingt im Urin erfassten MA-Mengen erklären kann. Ob Acrolein an der Lebensmittelmatrix in einer Weise gebunden vorliegt, dass es sich der analytischen Erfassung durch die zur Verfügung stehenden Verfahren wie Headspace-GC/MS entzieht und erst nach Aufnahme in den Organismus freigesetzt wird, wird Gegenstand künftiger Untersuchungen. Zusätzlich liefern die Ergebnisse beider Humanstudien starke Hinweise auf eine endogene Bildung von Acrolein, da auch in den Wash-out Phasen ein relativ hoher Anteil an Acrolein-assoziierten MA erfaßt wurde. Zukünftige Untersuchungen sollten die endogene Exposition und die Bildungsmechanismen von Acrolein und anderen Alkenalen aus verschiedenen physiologischen Quellen genauer untersuchen und in Beziehung setzen zur exogenen, ernährungsbezogenen Exposition. Ebenso sollten künftig verstärkt die Auswirkungen kombinierter Exposition durch solche erhitzungsbedingt gebildeten Stoffe untersucht werden.

6 Material und Methoden

6.1 Allgemeines

Die verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht explizit aufgeführt, von den Firmen Fluka und Sigma-Aldrich (Schnelldorf, Deutschland) im jeweils höchsten Reinheitsgrad bezogen. Radioaktives 1-¹⁴C-Acrylamid (25 mCi/mmol) wurde durch American Radiolabeled Chemicals (Saint Louis, USA) synthetisiert und zur Verfügung gestellt. Das ¹⁵N₅-markiertes Guanosin wurde von der Firma Euriso-Top (Saarbrücken, Deutschland) und das D₅-markierte Acrylamid von der Firma CDN Isotopes (Quebec, Canada) erworben. ¹³C₃-Glycidamid, sowie dreifach deuteriertes (-CD₃) und unmarkiertes Kreatinin konnten von Toronto Research Chemicals Inc. (North York, Ontario, Canada) bezogen werden. Die markierten und unmarkierten AA-GSH-Addukte, GA-GSH-Addukte [Scherbl, 2011], AAMA und GAMA [Berger, 2010] sowie die N7-GA-Gua- [Watzek, 2009] und die unmarkierten OH-PdG-Addukte [Klesen, 2010] wurden in der Arbeitsgruppe dargestellt und standen in ausreichenden Mengen zur Verfügung. Für wässrige Verdünnungen und jegliche Festphasenextraktion wurde stets frisches bidestilliertes Wasser verwendet.

Kernresonanzspektren wurden an den Geräten DPX 400 und Avance 600 der Firma Bruker (Karlsruhe, Deutschland) Biospin aufgenommen. Die Auswertung der aufgenommenen Spektren erfolgte mit dem Programm TOPSPIN 1.3, die graphische Aufarbeitung wurde mit dem Programm 1D-WinNMR der Firma Bruker durchgeführt.

Die aufgenommenen ¹H- und ¹³C-Spektren wurden jeweils gegen das verwendete Lösungsmittel kalibriert Tabelle 18.

Tabelle 18 Übersicht über die Kalibrierung der chemischen Verschiebung bei der Auswertung von ¹H-NMR und/oder ¹³C-NMR-Kernspinresonanzspektren

	DMSO-d ₆	D ₂ O
¹ H-NMR	2,49	4,7
¹³ C-NMR	39,50	-

Die Angabe der chemischen Verschiebung erfolgt in der δ-Skala in ppm. Spinmultiplizitäten sind angegeben mit s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, m = Multiplett, sowie deren Kombination wie zum Beispiel dt = Dublett vom Triplett.

6.2 Verwendete Reagenzien/Lösungen, Verbrauchsmaterialien und Geräte

6.2.1 Reagenzien/Lösungen

Ammoniumformiat-Puffer (50 mM)	3,15 g NH_4COOH mit HCl auf pH 2,5 einstellen
BisTris-Puffer	5 mM BisTris 0,1 mM EDTA auf pH 7,1 eingestellt
Hanks-Puffer ++	136,9 mM NaCl 5,4 mM KCl 0,4 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,34 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,44 mM KH_2PO_4 0,13 mM CaCl_2 2 mM HEPES 1 mM EDTA (DiNa-Dihydrat)
Hanks-Puffer --	wie Hanks ++, ohne EDTA, ohne Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Salze
Kollagenlösung	zur Verfügung gestellt von Arbeitsgruppe Hengstler
Lysepuffer	25 mM EDTA 0,3 M NaCl 0,2 M Tris/HCl 2% SDS 5% Proteinase K 0,2% RNase A H_2O
NaCl/P-Puffer	0,15 g KH_2PO_4 9,0 g NaCl 0,53 g Na_2HPO_4 mit H_2O auf 1 l auffüllen

Phosphatpuffer	100 g NaCl 14 g Na ₂ HPO ₄ 2,5 g KCl 2,5 g KH ₂ PO ₄
PBS-Puffer (10-fach)	100 g NaCl 14 g Na ₂ HPO ₄ 2,5 g KCl 2,5 g KH ₂ PO ₄
Resazurin-Arbeitslösung	10 ml Resazurin-NaCl/P-Lösung 90 ml DMEM low glucose Medium
Resazurin-NaCl/P-Lösung	0,1 ml Resazurin-Stammlösung 99,9 ml NaCl/P-Puffer
Resazurin-Stammlösung	110,5 mg Resazurin in 1 ml DMF lösen
Waschpuffer	124 ml Glucose 20 ml KH-Puffer 20 ml HEPES-Puffer auf pH 7,6 30 ml Aminosäure-Lösung 2 ml Glutamin-Lösung 1,6 ml CaCl ₂ -Lösung 0,8 ml MgSO ₄ -Lösung (MgSO ₄ *7H ₂ O) 400 mg BSA
Zellkulturmedium und -zusätze	William's Medium E, ohne L-Glutamine, ohne Phenol red, mit 2,24 g/l NaHCO ₃ Fetales Kälberserum, FKS Penicillin / Streptomycin (10.000 I.U./ml; 10.000 µg/ml) Dexamethason Gentamycin

6.2.2 Verbrauchsmaterialien

DC-Kieselgel-Folien	Machery & Nagel DC-Alufolien, Alugram Sil G/UV ₂₅₄ (20 x 20 cm)
Reaktionsgefäße	Greiner BIO ONE, 2 ml und 1,5 ml
Faltenfilter	Schleicher & Schuell

Pasteurpipetten	Einwegpipetten aus Glas circa 150 mm Brand GmbH & Co KG
pH-Papier	Riedel-de Haën pH 9,0-13,0
pH-Streifen	Merck Spezialindikator pH 6,5-10,0
Pipettenspitzen	Greiner BIO ONE, 1000 µl, 100 µl
Rundfilter	Schleicher & Schuell
SPE-Säulen	100 mg- (10 ml), 500 mg-Säulenmaterial (6 ml) Isolute ENV+® XAW Strata X
Zentrifugenröhrchen	Amicon, Bioseparation Microcon®, Centrifugal Filter Devices, 1,6 ml

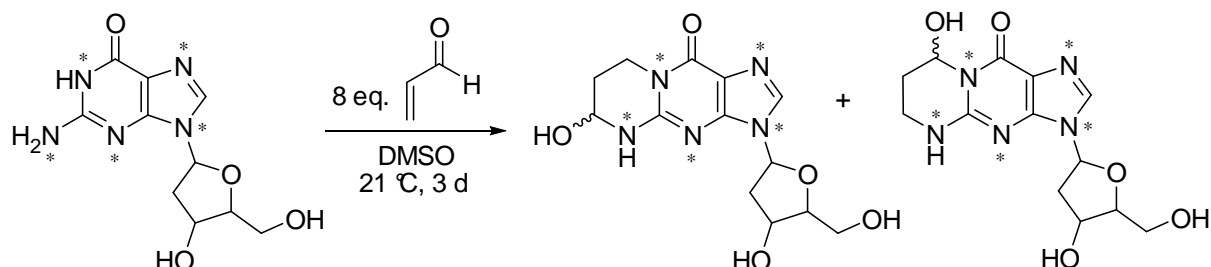
6.2.3 Geräte

Badthermometer	LHU, LET-100/30, DIN 12778
Brutschrank	CB 210 WTB Binder GmbH
Eismaschine	Wessamat Perfect ice! Combi-Line
Eppendorf-Pipetten	
Handhomogenisator	Wheaton Glashomogenisator
Heißluftfön	Steinel HL 1800E
Kühlschrank	Privileg, Privileg *** (-20 °C) Liebherr Comfort *** (-30 °C) Liebherr Premium 5 °C und -20 °C
Labor-Glasgeräte	Schott Duran ®
HPLC-ESI-MS/MS	Massenspektrometer API 2000 AB SCIEX Perkin Elmer Series 2000 Massenspektrometer API 3200 AB SCIEX HPLC Jasco 2008 Massenspektrometer API 5500 QTRAP AB SCIEX HPLC Agilent 1200 Series
Lichtmikroskop	Labovert Leitz

Magnetrührer	IKA COMBIMAG RCT
Nanodrop	NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer
Neubauer Zählkammer	Roth
Pipetten	Pipetten Abimed, Eppendorf Pipettierhilfe Pipettus® Hirschmann Laborgeräte
Rotationsverdampfer	Büchi R110 Rotavapor
Rührfisch	
Sterilwerkbank	LaminAir®HLB 2448GS Heraeus
Thermomixer	5436 Eppendorf
Überkopffrotator	Type RK 10-VS Heto Lab Equipment
Ultraschallbad	Bandelin Sonorex RK 102 H
UV-Lampe	CAMAG UV-Lampe 254 nm - 366 nm
Waage	Sartorius laboratory Sartorius CP224S (Feinwaage) Sartorius Type 1507 (Grobwaage)
Wasserbad	Köttermann Labortechnik
Vakuumpumpe	Vacuubrand Drehschieber Ölpumpe
Vortex	MS1 Minishaker; IKA®
Zentrifuge	Eppendorf Zentrifuge 5415 Eppendorf Zentrifuge 5417R Eppendorf Zentrifuge 5804R

6.3 Synthese von α - und γ -1-N²-Hydroxypropano-[¹⁵N₅]-2'-deoxyguanosin

Syntheschema:



*: Position der Isotopenmarkierung

Arbeitsvorschrift:

[¹⁵N₅]-2'-Deoxyguanosin (70 mg; 0,26 mmol) wurde in einem 10 ml-Zweihalskolben vorgelegt und unter Rühren durch Zugabe von 0,5 ml DMSO gelöst. Es entstand eine klare Lösung, welche sich durch Zugabe von Acrolein (95%; 0,14 ml; 0,188 g; 2,1 mmol) gelblich verfärbte und bei RT gerührt wurde. Nach drei Tagen wurde die Reaktion durch Zugabe von Benzol (7 ml) gestoppt, wodurch die klare Lösung trüb wurde. Die Suspension wurde weitere 4 h bei RT gerührt und der klare Überstand abdekantiert. Der gelblich viskose Rückstand wurde in Ethanol (1 ml) aufgenommen und über Nacht im Tiefkühlschrank aufbewahrt. Der Feststoff wurde mittels Hirschtrichter abgenutscht und im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Ausbeute:

$M(C_{13}H_{17}^{15}N_5O_5) = 328,3 \text{ g/mol}$
 0,03 g (0,093 mmol, 36 %) (gelber Feststoff)

Charakterisierung:

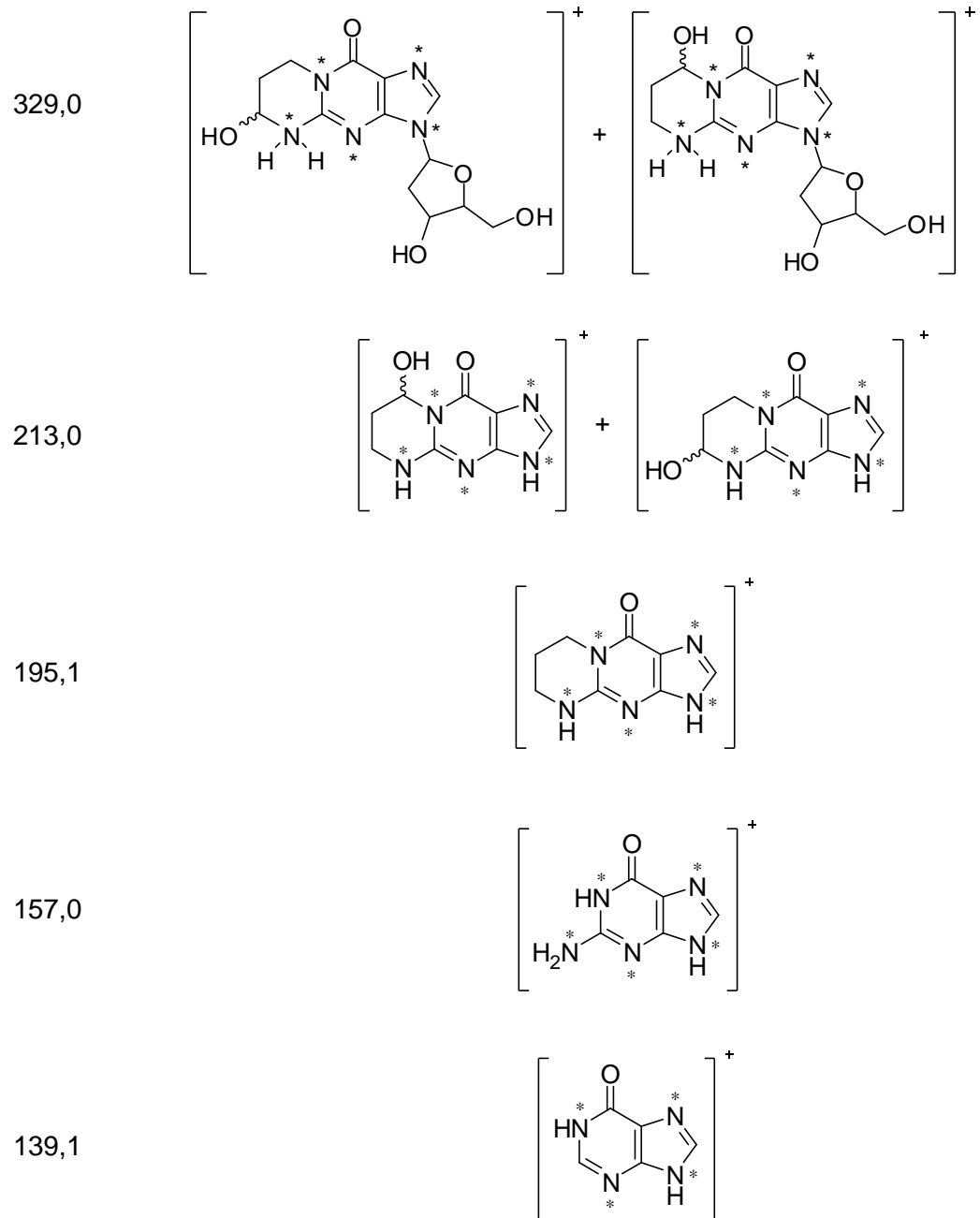
¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz, 293,5 K):

δ [ppm]: 1,74 (t, 1 H, CH); 1,92 (m, 1 H, CH); 2,18 (m, 1 H, CH₂); 3,43 (m, 2 H, CH₂); 3,79 (m, 1 H, CH); 4,33 (m, 1 H, CH); 4,41 (d, 1 H, CH); 4,94 (m, 1 H, CH); 4,95 (m, 1 H, OH); 5,10 (d, 1 H, OH); 5,88 (d, 1 H, OH); 6,10 (t, 1 H, CH); 7,94 (m, 1 H, CH); 8,39 (d, 1 H, NH)

Massenspektrum (ESI⁺; Produktionscan an Q₃; 100-350 *m/z*):

Masse-zu-Ladungsverhältnis [*m/z*]

zugehöriges Fragment



6.4 Methodenentwicklung und -etablierung

Bei den in der vorliegenden Arbeit zu bestimmenden Analyten handelte es sich um polare Substanzen, deren Eigenschaft es erlaubte, dass sie mittels flüssigchromatographischer Methoden gekoppelt mit massenselektiven Detektoren analytisch erfasst und quantifiziert werden konnten. Die analytische Erfassung und Quantifizierung setzte eine verlässliche Chromatographie voraus, bei der möglichst alle Störsubstanzen vom Analyten abgetrennt werden mussten. Praktisch wurde dies durch die geeignete Wahl der richtigen Trennsäule und durch Anwendung einer passenden HPLC-Methode realisiert. Zum anderen musste eine bestmögliche Ionisierung des Analyten im Interface zwischen HPLC und Massenspektrometer ermöglicht werden. Die maximale Empfindlichkeit bei der Bestimmung der Analyten (Kreatinin) im Urin konnte durch Anwendung der ESI im positiven beziehungsweise Modus erreicht werden. In Kombination mit der Verwendung von Ameisensäure (0,05% und 0,1% in H₂O; V/V) als Fließmittel und Methanol/Acetonitril im Gradientensystem lag der Hauptteil der Analyten aufgrund der Eluentenbedingungen geladen vor und konnten somit verlustfrei im Massenspektrometer detektiert werden.

Aufgrund der ermittelten *m/z*-Verhältnissen und den zugehörigen Intensitäten der Signale der Analytionen wurden bei den Messungen im SIM- und MRM-Modus die Massen für den Analyten und für den internen Standard bestimmt. Mit Hilfe der ermittelten Massen konnten die substanzspezifischen Parameter der Quadrupole über das Tuning Tool „Quantitative Optimization“ der Analyst 1.4.2 Software auf eine größtmögliche Empfindlichkeit hin optimiert werden. Die quellenspezifischen Parameter wurden mittels des FIA-Tools optimiert. Dabei war es notwendig anhand der Retentionszeiten der Analyten die Zusammensetzung des Fließmittels zum Zeitpunkt der Elution zu ermitteln. Anschließend wurde unter isokratischen Bedingungen mit der entsprechenden Fließmittelzusammensetzung und Flussrate der Analyten unter wechselnden Quellenparametern mittels Loop-Injektion injiziert (ohne HPLC-Säule), um eine maximale Signalintensität zu erreichen.

Nach Erwerb der stabilisotopenmarkierten Standards und der Optimierung der gerätespezifischen Parameter am Massenspektrometer erfolgten die Messungen von Kreatinin und der MA per Isotopenverdünnungsanalyse.

Einen wichtigen Faktor bei dieser Analytikmethode stellt die Linearität zwischen den Verhältnissen Peakfläche Analyt zu internem Standard und Stoffmenge Analyt zu internem Standard dar. Die Linearität kennzeichnet eine Methode danach, in wieweit sie innerhalb eines bestimmten Konzentrationsbereiches proportional und somit linear ist [*Kromidas*,

2006]. Zur Überprüfung auf Linearität wurden Standardlösungen erstellt, welche steigende Konzentrationen an Analyten aber dieselbe Menge an internem Standard aufwiesen.

Die Nachweisgrenze ist als die kleinste Konzentration einer Verbindung, die mit einem Analyseverfahren noch detektiert werden kann, definiert. Hierbei wird von einem Signal-Rausch-Verhältnis von 3:1 ausgegangen. Die Bestimmungsgrenze ist mit einem Verhältnis von 6:1 meist doppelt so groß und legt den untersten Wert fest, der noch reproduzierbar quantifiziert werden kann. Die Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen erfolgte über eine Kalibriergerade. Im Gegensatz zur eigentlichen Kalibrierfunktion zur Quantifizierung von Analyten in Lösungen wird hierbei aber nicht die Peakfläche gegen die Konzentration, sondern die Peakhöhe gegen die Konzentration dargestellt.

Schon leichte Temperaturschwankungen im Messraum können die Messgenauigkeit des Massenspektrometers beeinflussen. Um die Variabilitäten zwischen den unterschiedlichen Läufen und an verschiedenen Tagen zu bestimmen, wurde derselbe Standard sowohl dreimal hintereinander an einem Tag, als auch an drei unterschiedlichen Tagen vermessen.

6.4.1 Etablierung einer Messmethode zur Quantifizierung von Kreatinin mittels HPLC-ESI-MS in Urinproben

Kreatinin wird im Organismus durch nicht-enzymatische Umwandlungsreaktionen aus Kreatinphosphat gebildet und hauptsächlich über die Niere ausgeschieden. Hierbei steht die Ausscheidung in einem proportionalen Verhältnis zur Muskelmasse eines Individuums und ist annähernd konstant. Die Ausscheidung von Kreatinin wird durch die Nahrungsaufnahme nur wenig beeinflusst und ist unabhängig von der Diurese [Hobson, 1939].

Dadurch lassen sich im Urin bestimmte Biomarker, wie in der vorliegenden Arbeit für den Fall der MA, unabhängig von der Menge an ausgeschiedenem Urinvolumen miteinander vergleichen.

6.4.1.1 Optimierung der HPLC-Methode

Die chromatographische Trennung wurde durch die Verwendung einer Phenomenex C8-Säule unter Verwendung des in der Tabelle 19 aufgeführten Gradientensystems erreicht. Abbildung 67 zeigt ein Beispielchromatogramm einer Messung von Kreatinin im Humanurin.

Tabelle 19 Zusammenfassung der HPLC-Bedingungen zur Bestimmung von Kreatinin mittels SIVA

Säule	Phenomenex Luna		
Material	C8, 150 mm x 4,6 mm, 3 µm		
Fluss	0,3 ml/min		
Fließmittel	A: Wasser (0,05% HCOOH)	B: Methanol	
Injektionsvolumen	50 µl		

Time	Flussrate [ml/min]	Fließmittel A [%]	Fließmittel B [%]
0,1	0,3	99,0	1,0
1,0	0,3	99,0	1,0
20,0	0,3	80,0	20,0
22,0	0,3	99,0	1,0
25,0	0,3	99,0	1,0

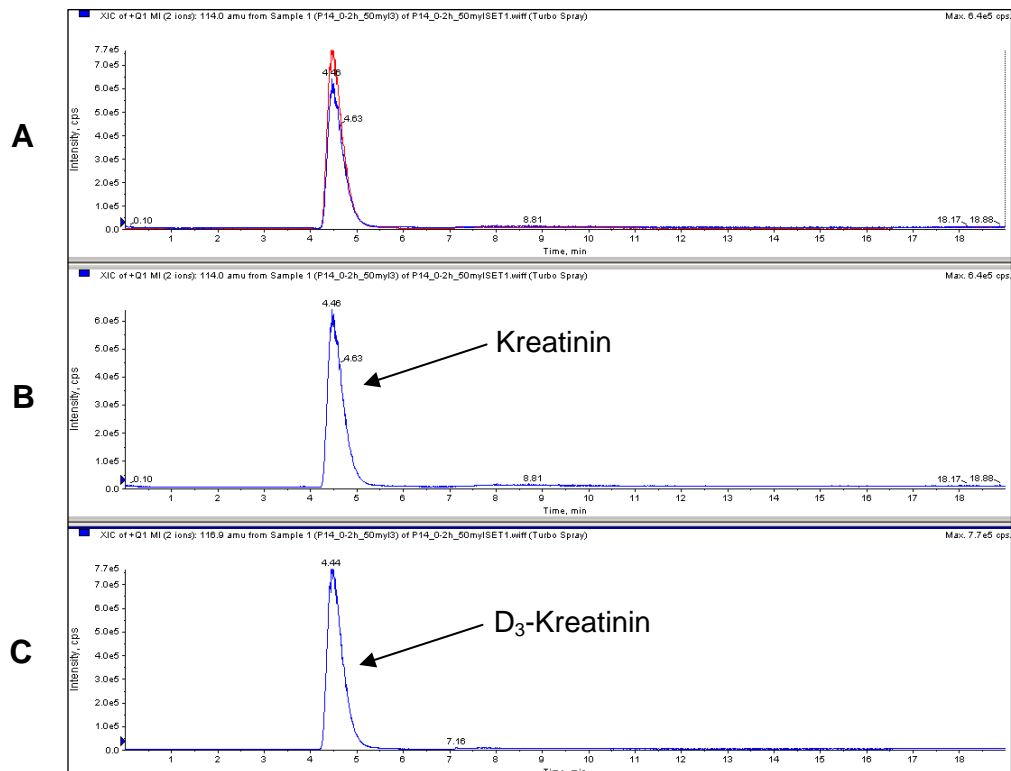


Abbildung 67 Repräsentatives HPLC-ESI-MS-Chromatogramm einer Messung von Kreatinin aus Humanurin im SIM-Modus; A: Totalionenchromatogramm, B: Kreatinin (Rt = 4,5 min; m/z 114), C: D₃-Kreatinin (Rt = 4,4 min; m/z 117)

6.4.1.2 Optimierung der gerätespezifischen Parameter

Das Erfassen und Quantifizieren von Kreatinin erfolgte im Single Ion Monitoring-Modus (SIM) mittels Isotopenverdünnungsanalyse. Hierzu mussten zuerst die charakteristischen Q1-Massen des Analyten und des internen Standards identifiziert werden. Das im Q1-Scan ermittelte Masse zu Ladungsverhältnis des einfach ionisierten positiv geladenen D₃-Kreatinin beträgt m/z 116,9 (Abbildung 67). Für den ungelabelten Analyten ergab sich dementsprechend ein um drei Masseneinheiten geringeres Verhältnis von m/z 114,0 (Abbildung 67).

In Tabelle 20 sind die für das Massenspektrometer spezifischen optimalen Bedingungen aufgelistet, die anschließend für die Kalibrierungen und Messungen von Urinproben verwendet wurden.

Tabelle 20 Gerätespezifische Parameter zur Bestimmung von Kreatinin im Humanurin mittels SIVA (API 2000)

DP: Declustering Potential; FP: Focussing Potential; EP: Entrance Potential; CEP: Cell Entrance Potential; CUR: Curtain Gas; IS: IonSpray Voltage; TEM: Temperature; GS1: Gas 1; GS2: Gas 2

	Kreatinin	D ₃ -Kreatinin
Q1 [amu]	114,0	117,0
Dwell [ms]	200	200
Parameter (Quadrupole)		
DP [V]	31	21
FP [V]	250	370
EP [V]	11	10
CEP [V]	8	9
Source/gas (Quelle)		
CUR [psi]		20
IS [V]		5000
TEM [°C]		200
GS1		30
GS2		30

Tabelle 21 zeigt die Stoffmengen-Verhältnisse und die durch Messung ermittelten Quotienten der jeweiligen Peakflächen.

Tabelle 21 Konzentrationen und Quotienten der Kalibrierreihe von Kreatinin

Konzentration Kreatinin [ng/ml]	7,5	10	12,5	25	50	75	100	250	500	750
Konzentration D₃-Kreatinin [ng/ml]	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Peakfläche Analyt / Peakfläche interner Standard	0,10	0,13	0,15	0,22	0,33	0,64	0,77	2,01	3,76	5,23
Stoffmenge Analyt / Stoffmenge interner Standard	0,08	0,10	0,13	0,26	0,51	0,77	1,03	2,56	5,13	7,69

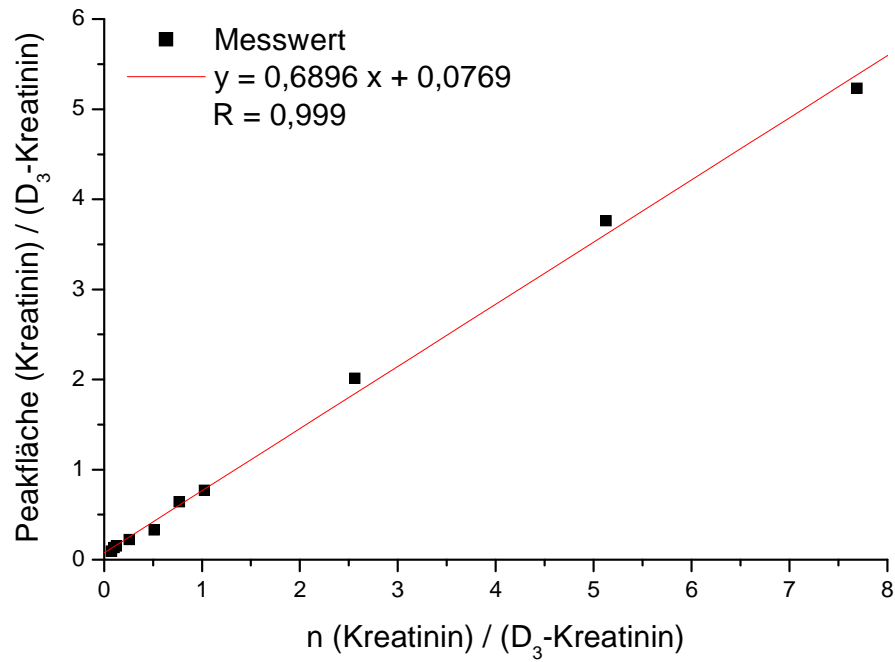


Abbildung 68 Kalibriergerade zur Quantifizierung von Kreatinin mittels SIVA

Aus Abbildung 68 geht eindeutig hervor, dass zwischen dem Analyten und dem internen Standard eine Proportionalität gegeben ist, was sich im Korrelationsfaktor R mit einem Wert von $> 0,999$ niederschlägt. Aufgrund der beobachteten Linearität ist die Anwendung der ermittelten Kalibriergerade zur Ermittlung von Kreatinin geeignet.

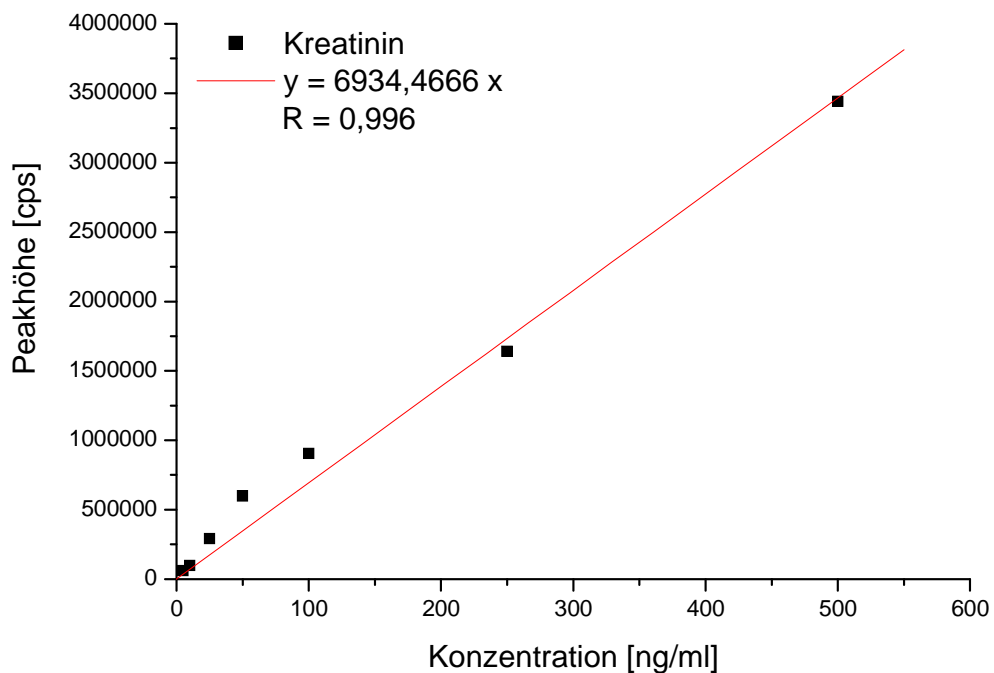


Abbildung 69 Kalibriergerade zur Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze bei der Quantifizierung von Kreatinin

Aus den Regressionsgeraden (Abbildung 69) lassen sich durch Umstellen nach x und Einsetzen des jeweiligen Hintergrundrauschens die zugehörigen Nachweis- und Bestimmungsgrenzen errechnen.

Für die Nachweisgrenze ergibt sich mit $y = 3 \cdot 10.000 = 30.000$:

$$x = \frac{30.000}{6934,5766} = 4,326 \frac{ng}{ml}$$

Bei einer Injektionsmenge von 50 μ l Standardlösung entspricht dies einer absoluten Menge von 1,9 pmol.

Für die Bestimmungsgrenze ergibt sich mit $y = 6 \cdot 10.000 = 60.000$

$$x = \frac{60.000}{6934,5766} = 8,652 \frac{ng}{ml}$$

Bei einer Injektionsmenge von 50 μ l Standardlösung entspricht dies einer absoluten Menge von 2,8 pmol.

Die ermittelten Nachweis- und Bestimmungsgrenzen und die Lauf-zu-Lauf- und Tag-zu-Tag-Variabilitäten sind in Tabelle 22 zusammengefasst.

Tabelle 22 LOD (S/R: 3) und LOQ (S/R: 6) der Bestimmung von Kreatinin und Lauf-zu-Lauf und Tag-zu-Tag-Variabilität [%] während der Bestimmung von Kreatinin

	LOD [pmol]	LOQ [pmol]	Lauf-zu-Lauf- Variabilität	Tag-zu-Tag- Variabilität
Kreatinin	1,9	2,8	< 2%	< 1%

6.4.2 Bestimmung der Mercaptursäuren von Acrolein, Acrylamid und Glycidamid

6.4.2.1 Bestimmung der Carboxyethylmercaptursäure (CEMA)

6.4.2.1.1 Optimierung der HPLC-Methode

Die chromatographische Trennung wurde durch die Verwendung einer Phenomenex C8-Säule unter Verwendung des in der Tabelle 23 aufgeführten Gradientensystems erreicht. Abbildung 70 zeigt ein Beispielchromatogramm einer Messung von CEMA im Humanurin.

Tabelle 23 Zusammenfassung der HPLC-Bedingungen zur Bestimmung von Carboxyethylmercaptursäure (CEMA) mittels SIVA

Säule	Phenomenex Luna		
Material	C8, 150 mm x 4,6 mm, 3 µm		
Fluss	0,3 ml/min		
Fließmittel	A: Wasser (0,1% HCOOH)	B: Acetonitril	
Injektionsvolumen	20 µl (Standlösungen); 50 µl (Proben)		
Time [min]	Flussrate [ml/min]	Fließmittel A [%]	Fließmittel B [%]
0,05	0,3	95	5
1	0,3	95	5
10	0,3	95	5
30	0,3	20	80

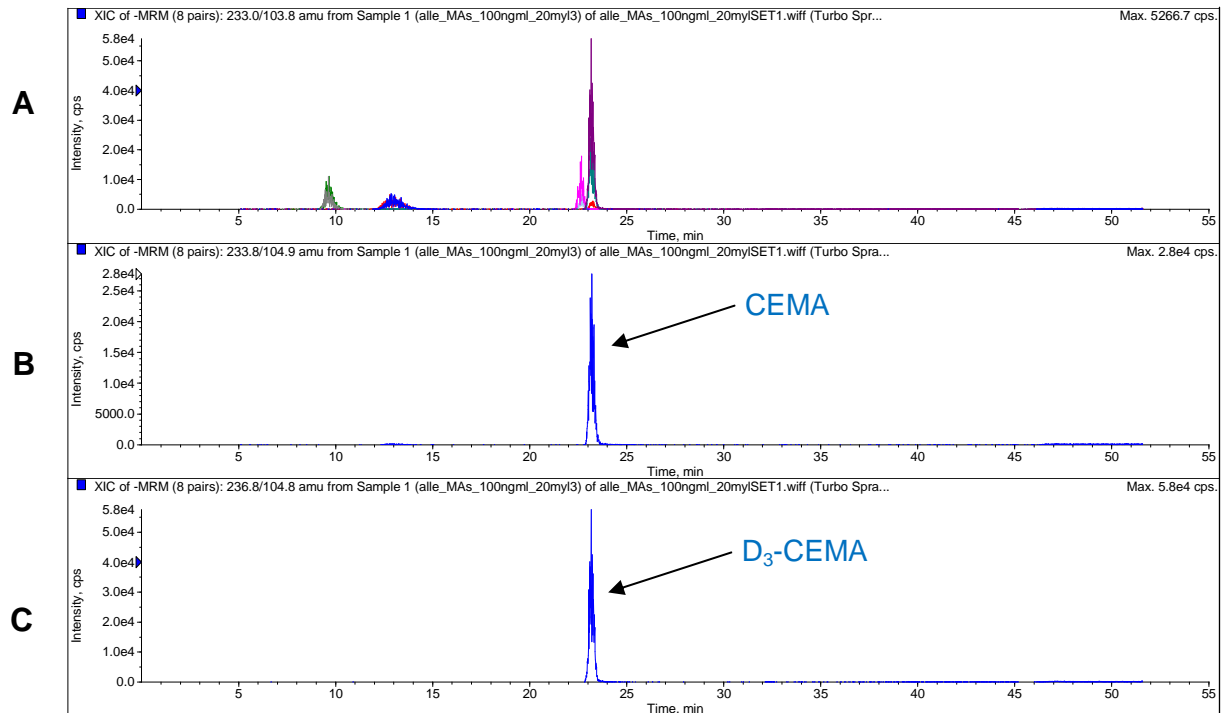


Abbildung 70 Repräsentatives HPLC-ESI-MS/MS-Chromatogramm einer Messung von CEMA aus einem Standardgemisch (100 ng/ml) im MRM-Modus; A: Totalionenchromatogramm, B: CEMA ($R_t = 23,1$ min; m/z 234 \rightarrow 105), C: D₃-CEMA ($R_t = 23,1$ min; m/z 237 \rightarrow 105)

6.4.2.1.2 Optimierung der gerätespezifischen Parameter

Das Erfassen und Quantifizieren von CEMA erfolgte im Multiple Reaction Monitoring-Modus (MRM) mittels Isotopenverdünnungsanalyse. Hierzu mussten zuerst die charakteristischen Precursor- und Produktionen des Analyten und des internen Standards identifiziert werden. Das im Precursorionenscan ermittelte Masse zu Ladungsverhältnis des einfach ionisierten negativ geladenen D₃-CEMA betrug m/z 236,8 (Abbildung 72). Für den ungelabelten Analyten ergab sich dementsprechend ein um drei Masseneinheiten niedrigeres Verhältnis von m/z 233,8 (Abbildung 71).

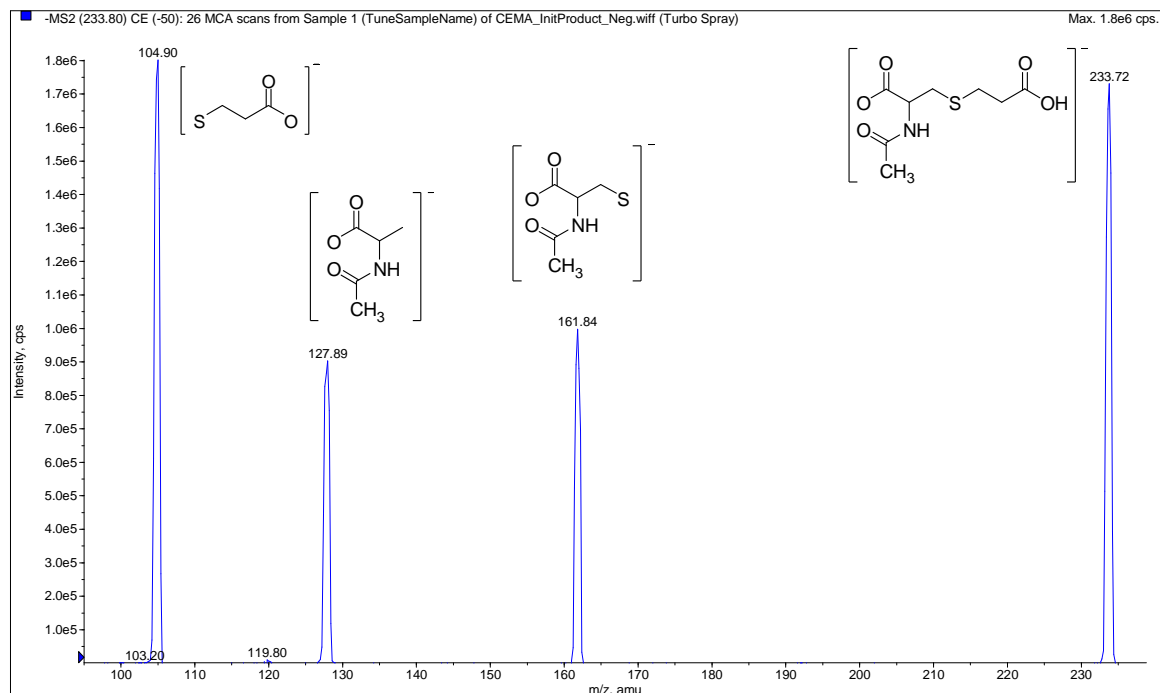


Abbildung 71 Produktionenspektrum von CEMA an Q3 (m/z 90-240; $c = 250$ ng/ml)

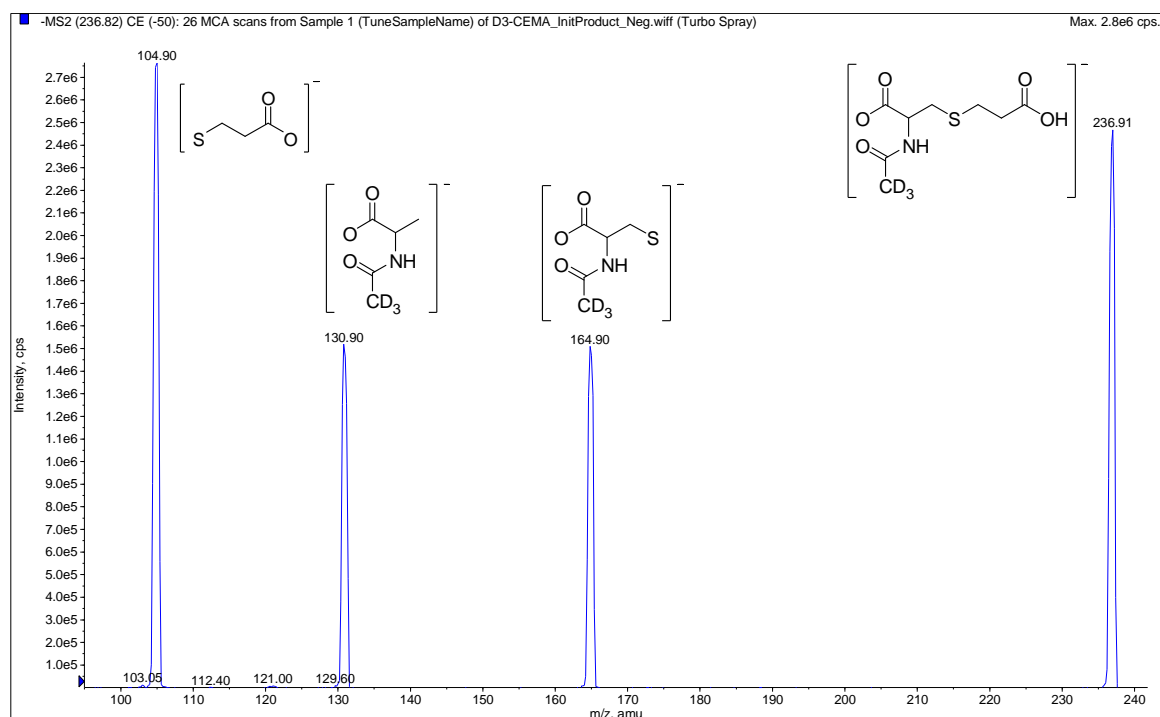


Abbildung 72 Produktionenspektrum von D₃-CEMA an Q3 Q3 (m/z 90-240; $c = 250$ ng/ml)

Aufgrund der ermittelten m/z -Verhältnisse und den zugehörigen Intensitäten der Signale der Analytionen wurden bei den Messungen im MRM-Modus die Massenübergänge

m/z 233,8 \rightarrow 104,9 für den Analyten und für den internen Standard m/z 236,8 \rightarrow 104,8 verwendet. In Tabelle 24 sind die für das Massenspektrometer spezifischen optimierten Bedingungen aufgelistet, die bei den Messungen verwendet wurden.

Tabelle 24 Gerätespezifische Parameter zur Bestimmung von CEMA im Urin mittels SIVA (API 3200)

DP: Declustering Potential; EP: Entrance Potential; CE: Collision Energy; CEP: Cell Entrance Potential; CXP: Cell Exit Potential; CUR: Curtain Gas; CAD: Collisionally Activated Dissociation; IS: IonSpray Voltage; TEM: Temperature; GS1: Gas 1; GS2: Gas 2

	CEMA	D ₃ -CEMA
Q1 [amu]	233,8	236,8
Q3 [amu]	104,9	104,8
Dwell [ms]	75	75
Parameter (Quadrupole)		
DP [V]	-15	-15
EP [V]	-9	-4
CE [V]	-22	-22
CEP [V]	-40	-16
CXP [V]	0	0
Source/gas (Quelle)		
CUR [psi]	10	
CAD	5	
IS [V]	-4500	
TEM [°C]	450	
GS1	30	
GS2	30	

Zur Überprüfung auf Linearität wurden Standardlösungen erstellt, welche steigende Konzentrationen an Analyten aber dieselbe Menge an internem Standard aufwiesen. Tabelle 25 zeigt die Stoffmengen-Verhältnisse und die durch Messung ermittelten Quotienten der jeweiligen Peakflächen.

Tabelle 25 Konzentrationen und Quotienten der Kalibrierreihe von CEMA

Konzentration CEMA [ng/ml]	1	5	10	20	30	40	50	75	100	250	500	1000	5000
Konzentration D₃-CEMA [ng/ml]	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Peakfläche Analyt / Peakfläche interner Standard	0,01	0,04	0,05	0,04	0,15	0,18	0,27	0,33	0,48	1,35	2,22	3,70	4,72
Stoffmenge Analyt / Stoffmenge interner Standard	0,01	0,05	0,10	0,20	0,30	0,41	0,51	0,76	1,01	2,53	5,06	10,13	50,64

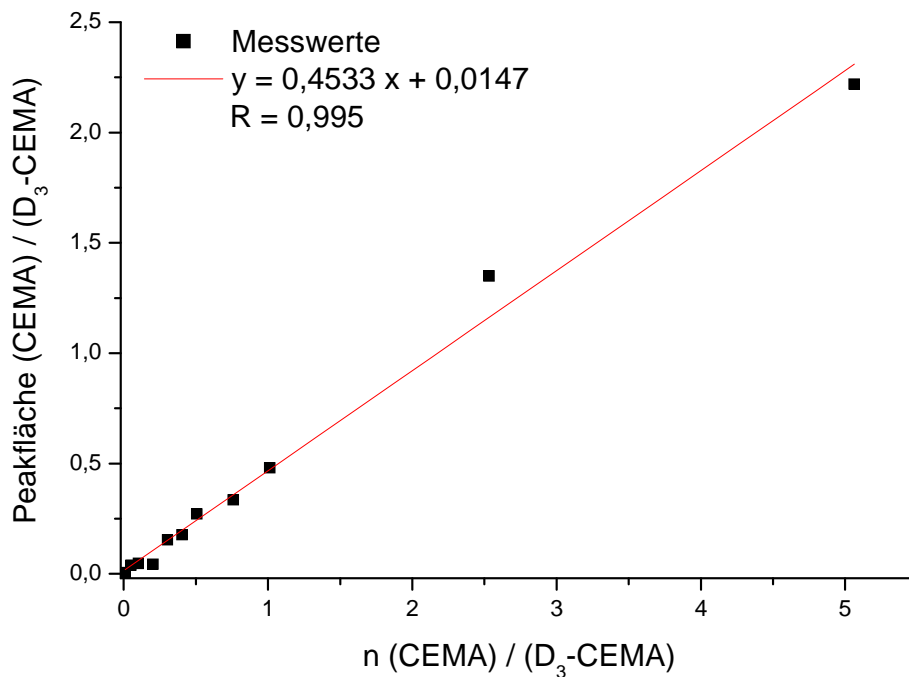


Abbildung 73 Kalibriergerade zur Quantifizierung von CEMA mittels SIVA

Aus Abbildung 73 geht eindeutig hervor, dass zwischen dem Analyten und dem internen Standard eine Proportionalität gegeben ist, was sich im Korrelationsfaktor R mit einem Wert von $> 0,995$ niederschlägt. Aufgrund des linearen Ansprechverhaltens ist die Anwendung der ermittelten Kalibriergerade zur Ermittlung von CEMA geeignet.

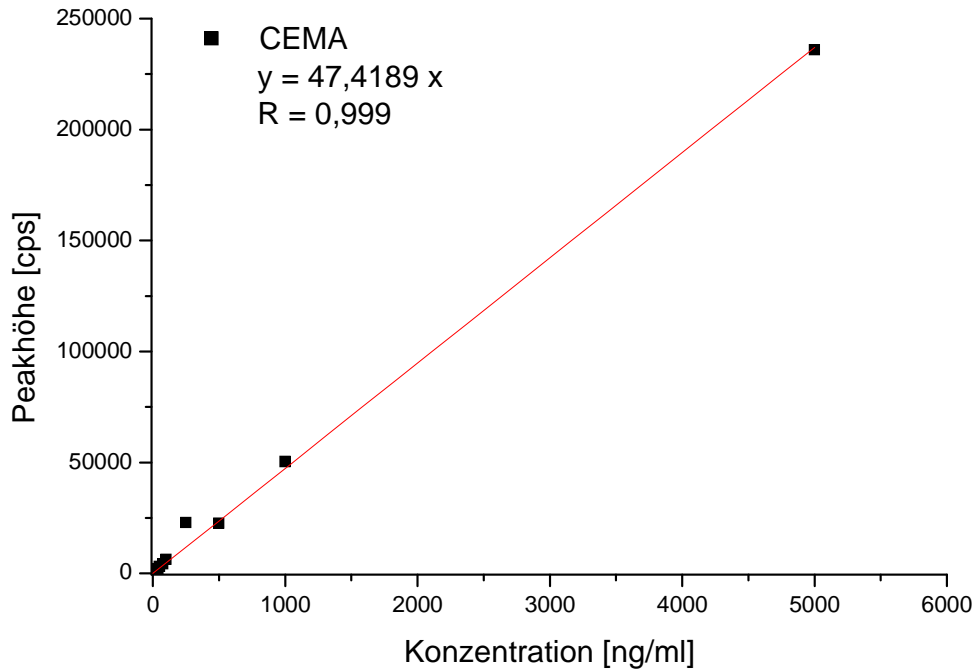


Abbildung 74 Kalibriergerade zur Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze bei der Quantifizierung von CEMA

Aus den Regressionsgeraden (Abbildung 74) lassen sich durch Umstellen nach x und Einsetzen des jeweiligen Hintergrundrauschens die zugehörigen Nachweis- und Bestimmungsgrenzen errechnen.

Für die Nachweisgrenze ergibt sich mit $y = 3 \cdot 25 = 75$:

$$x = \frac{75}{47,41888} = 1,581 \frac{ng}{ml}$$

Bei einer Injektionsmenge von 50 μ l Standardlösung entspricht dies einer absoluten Menge von 132 fmol.

Für die Bestimmungsgrenze ergibt sich mit $y = 6 \cdot 25 = 150$

$$x = \frac{150}{47,41888} = 3,163 \frac{ng}{ml}$$

Bei einer Injektionsmenge von 50 μ l Standardlösung entspricht dies einer absoluten Menge von 265 fmol.

Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit von CEMA mit den weiteren MA (AAMA, GAMA und 3-HPMA), liegt die ermittelten Nachweis- und Bestimmungsgrenzen im Bereich dieser MA (siehe Kapitel 6.5.1.1.8 und 6.6.1.4).

Die ermittelten Nachweis- und Bestimmungsgrenzen und die Lauf-zu-Lauf- und Tag-zu-Tag-Variabilitäten sind in Tabelle 26 zusammengefasst.

Tabelle 26 LOD (S/R: 3) und LOQ (S/R: 6) der Bestimmung von CEMA und Lauf-zu-Lauf und Tag-zu-Tag-Variabilität [%] während der Bestimmung von CEMA

	LOD [fmol]	LOQ [fmol]	Lauf-zu-Lauf- Variabilität	Tag-zu-Tag- Variabilität
CEMA	132	265	< 7%	< 4%

Wie in Abbildung 75 zu erkennen ist, kam es im untersuchten Konzentrationsbereich zu keiner signifikanten Erhöhung des verwendeten MRM-Übergangs von CEMA (m/z 233,8 \rightarrow 104,9) durch D₃-CEMA (m/z 236,8 \rightarrow 104,8). zu erkennen ist, kam es im untersuchten Konzentrationsbereich zu keiner gegenseitigen Beeinflussung der beiden verwendeten Ionenansichten. Zum Zeitpunkt der Elution des internen Standards zeigte die Ionenansicht des Analyten lediglich das Hintergrundsignal (ca. 25 cps). Beim Vermessen einer entsprechenden Analytlösung wurde eine Beeinflussung der Ionenansicht des internen Standards ebenfalls nicht beobachtet.

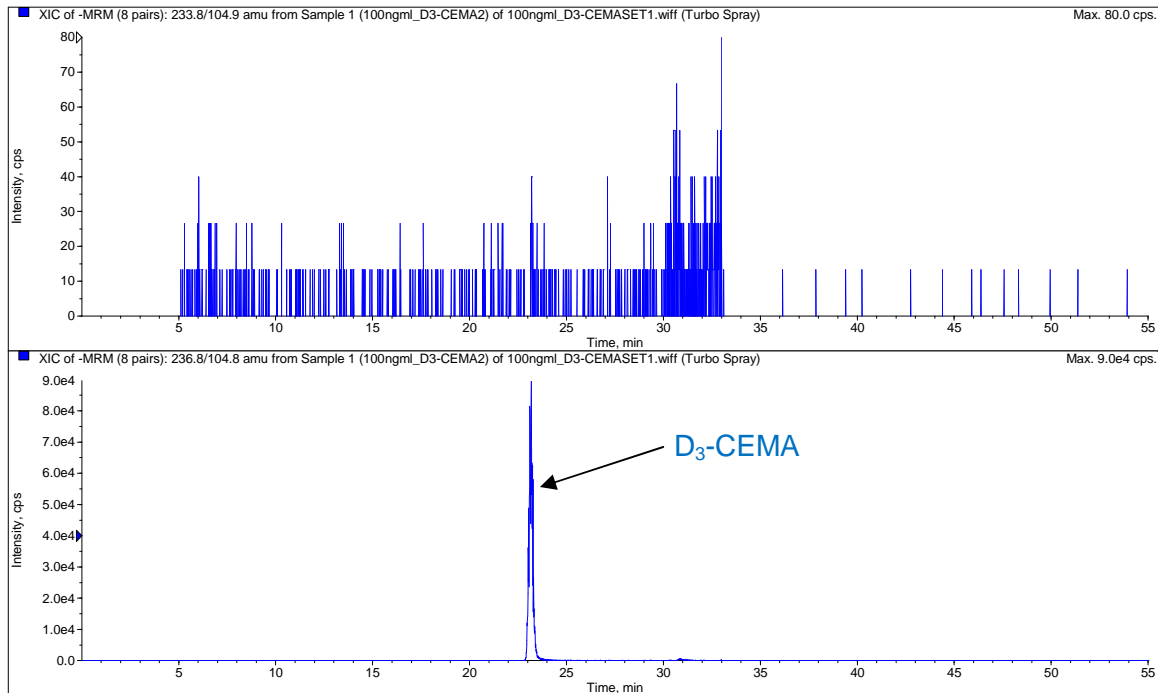


Abbildung 75 Überprüfung der möglichen Beeinflussung des MRM-Übergangs von CEMA durch D₃-CEMA

6.4.2.1.3 Entwicklung einer geeigneten Aufarbeitungsmethode für CEMA

Um die Verbindung CEMA im Spurenbereich analytisch reproduzierbar erfassen zu können, war die Entwicklung einer geeigneten Aufarbeitungsmethode notwendig, die es ermöglichen sollte, den zu untersuchenden Analyten aus der Probenmatrix spezifisch aufzureinigen und aufzukonzentrieren. Dies gelingt in der Regel mit einer geeigneten Festphasenextraktions-(SPE)-Methode. Hierzu wurden die selben SPE-Säulen (100 mg ENV⁺-Säulenmaterial) verwendet, welche auch bei der Aufarbeitung von AAMA und GAMA Anwendung fanden.

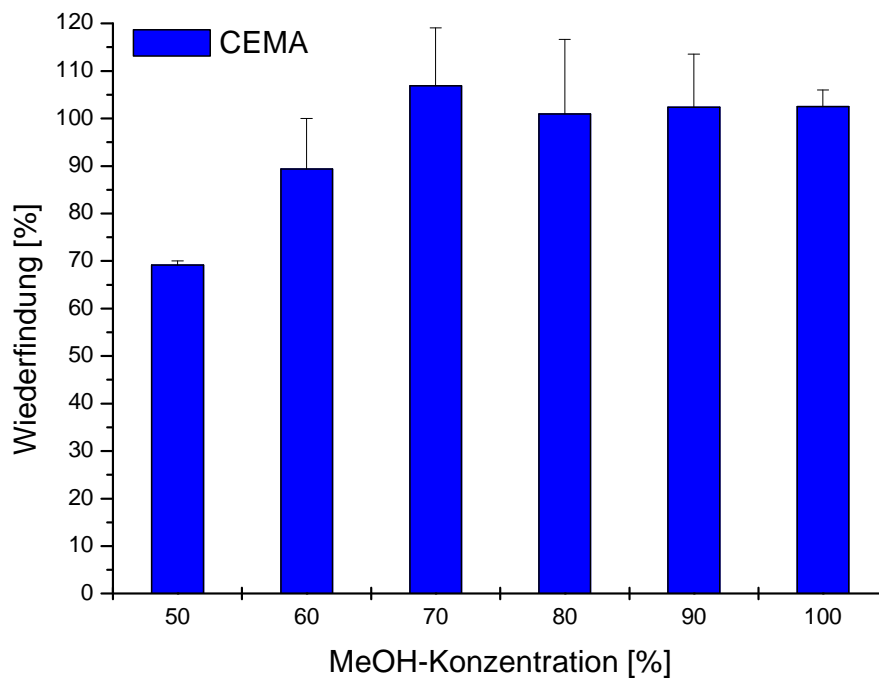


Abbildung 76 Darstellung der Optimierung der Probenvorbereitung durch Testung unterschiedlicher Methanolkonzentrationen zur Elution von CEMA (100 ng/ml) von der SPE-Säule (ENV⁺, 100 mg)

Abbildung 76 zeigt die Ergebnisse zur Ermittlung der Wiederfindung von CEMA nach Aufgabe von unmarkierter Substanz (100 ng/ml) auf die SPE-Säule und Elution mit variierender Methanol-Konzentration (50-100%; V/V; V = 1 ml). Es zeigte sich, dass die verwendete ENV⁺-Säule für die Aufarbeitung von CEMA geeignet war, da die Wiederfindung bereits bei einer Methanolkonzentration von 70% (V/V) bei $107 \pm 12\%$ lag. Mit weiter steigender Elutionskonzentration konnte keine signifikante Erhöhung in der Wiederfindung erreicht werden. Die bestehende SPE-Methode zur Aufreinigung von AAMA, GAMA und 3-HPMA verwendet Ameisensäure (1%; V/V) in Methanol (99%; V/V). Die Wiederfindung von CEMA bei einer entsprechenden Methanolkonzentration betrug $101 \pm 3\%$ und war somit für die Extraktion geeignet.

Nach Optimierung der Elutionskonzentration war es notwendig, eine geeignete Zusammensetzung der Waschlösung zu ermitteln, mit der Verunreinigungen von der Säule eluiert werden konnten, ohne möglichst die Wechselwirkung zwischen Analyten und Säulenmaterial zu beeinflussen. Dies wird in der Regel dadurch erreicht, dass Methanollösungen niedriger Konzentration verwendet werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Methanolkonzentrationen von 0-30% (V/V) getestet. Hierzu wurde nicht markierte Substanz auf die SPE-Säule aufgegeben, mit variierender Methanolkonzentration (V = 1 ml)

gewaschen und mit der vorher optimierten Elutionslösung (Ameisensäure in Methanol; 99%; V/V) eluiert. Die Ergebnisse zur Ermittlung der geeigneten Waschlösung sind in Abbildung 77 dargestellt.

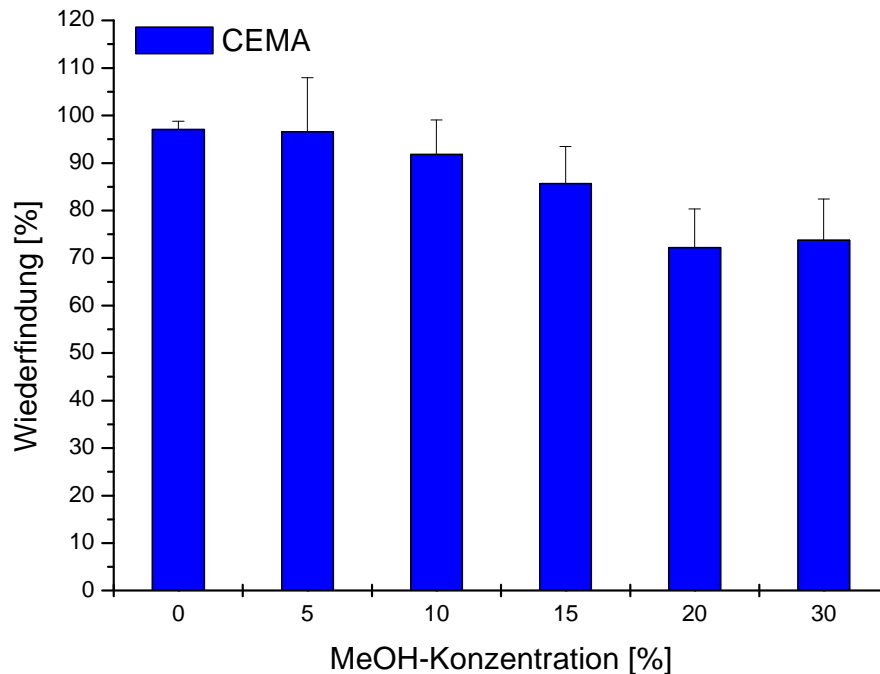


Abbildung 77 Darstellung der Optimierung der Probenvorbereitung durch Testung unterschiedlicher Methanolkonzentrationen zum Waschen der SPE-Säule (ENV⁺, 100 mg) nach Aufgabe von CEMA (100 ng/ml)

Die erhaltenen Ergebnisse verdeutlichen, dass es ab einer Methanolkonzentration von 20% zu einer signifikanten Abnahme der Wiederfindung im Vergleich zu 100% Wasser (0% Methanol) kam. Die bestehende (siehe Kapitel 6.5.1.1.8 und 6.6.1.4) SPE-Methode [Berger, 2010] zur Aufreinigung von AAMA, GAMA und 3-HPMA verwendet neben reinem Wasser ($V = 2$ ml) auch einen Waschschrift mit 10%iger Methanollösung ($V = 1$ ml). Die Wiederfindung nach Waschen mit reinem Wasser lag bei $97 \pm 2\%$, die nach Waschen mit einer 10%igen Methanollösung bei $92 \pm 7\%$. Die Ergebnisse aus der Ermittlung der Wiederfindung nach einem Waschschrift belegen, dass die bestehende Methode zur Aufreinigung von CEMA geeignet war und somit alle vier Analyten gleichzeitig und mit der bestehenden SPE-Methode (Kapitel 6.5.1.1.8) aufgearbeitet werden konnten.

Da das Aufkonzentrieren der Proben unter Stickstoffstrom sehr zeitaufwendig war, wurde zusätzlich getestet, in wie weit die Wiederfindung von CEMA durch Einengen an der Vakuumzentrifuge beeinflusst wurde. Es konnte gezeigt werden, dass die Wiederfindungen

von CEMA nach Aufkonzentration mittels Stickstoffstrom bei $110 \pm 4\%$, nach Aufkonzentration mittels Vakuumzentrifuge bei $103 \pm 13\%$ lagen (Abbildung 78) und sich die beiden Methoden somit nicht signifikant unterschieden.

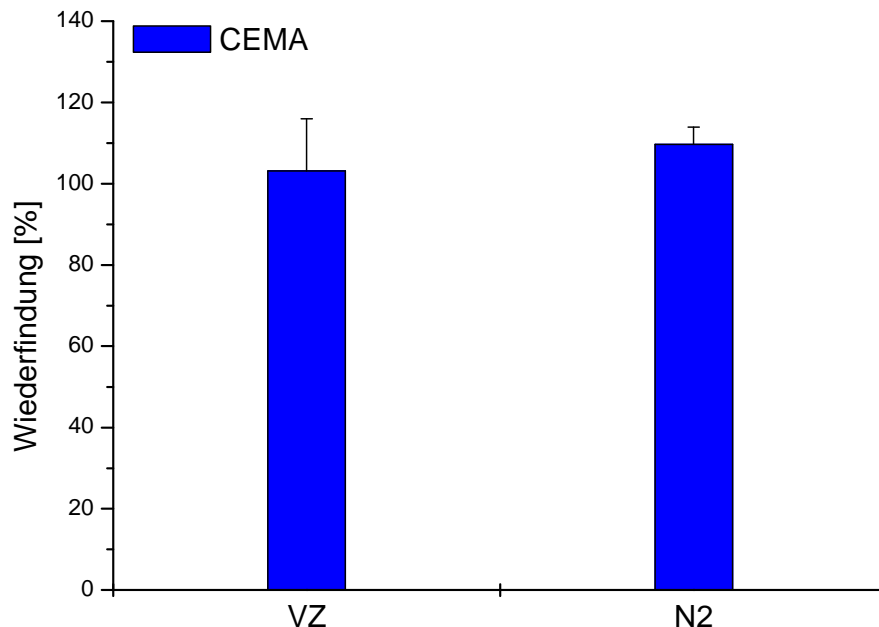


Abbildung 78 Darstellung der Wiederfindung von CEMA nach Aufkonzentrieren mittels Vakuumzentrifuge (VZ) und unter Stickstoffstrom (N2) (n = 3)

Da sich alle untersuchten MA strukturell sehr ähnlich waren, konnte davon ausgegangen werden, dass es auch bei AAMA, GAMA und 3-HPMA zu keiner signifikanten Abnahme der Wiederfindung kommen würde, weshalb im Folgenden alle Proben nach der SPE-Aufreinigung an der Vakuumzentrifuge aufkonzentriert wurden.

6.4.2.2 Methodenentwicklung zur Chromatographie von 3-HPMA, CEMA, AAMA und GAMA

Im Rahmen dieser Arbeit war es notwendig die als Kurzzeitbiomarker verwendeten MA AAMA, GAMA, 3-HPMA und CEMA mittels HPLC-ESI-MS/MS (API 3200 Tandemmassenspektrometer) quantitativ zu bestimmen. Da es möglich war, alle MA mittels einer einzigen SPE aufzuarbeiten, war es erforderlich eine geeignete chromatographische Methodik zur analytischen Erfassung zu entwickeln. Aufgrund von Koelutionen mehrerer Analyten kann es zur gegenseitigen negativen Beeinflussung durch Ionensuppression bei der

Ionisierung im Interfacebereich des Massenspektrometers kommen. Daher sollten die Analyten möglichst basisliniengetrennt im Massenspektrometer detektiert werden.

In den folgenden Abbildungen sind die MRM-Chromatogramme zur Bestimmung einer Standardlösung von AAMA, GAMA, 3-HPMA und CEMA und deren jeweiligen stabilisotopenmarkierten Standards gezeigt. Die vier Analyten sind basisliniengetrennt und weisen Retentionszeiten von 12 min für AAMA sowie 9,5 min für GAMA (Abbildung 79) und 22,5 min für 3-HPMA sowie 23,1 min für CEMA (Abbildung 80) auf. Die rechnerisch ermittelten absoluten Nachweisgrenzen liegen bei 85 fmol für AAMA, 110 fmol für GAMA, 500 fmol für 3-HPMA und 132 fmol für CEMA.

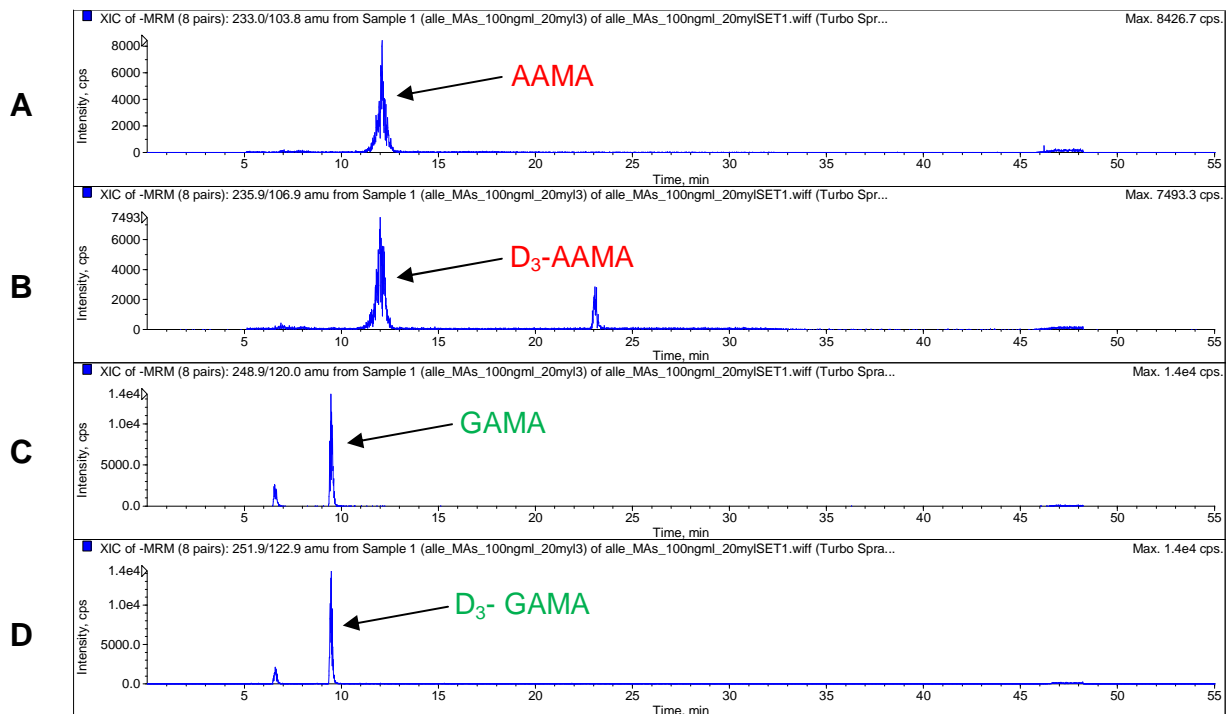


Abbildung 79 Repräsentatives HPLC-ESI-MS/MS-Chromatogramm einer Messung von AAMA und GAMA eines Standardgemischs (100 ng/ml) im MRM-Modus; A: AAMA (Rt = 12,0 min; m/z 233 \rightarrow 104), B: D₃-AAMA (Rt = 12,0 min; m/z 236 \rightarrow 107), C: GAMA (Rt = 9,5 min; m/z 249 \rightarrow 120); D: D₃-GAMA (Rt = 9,5 min; m/z 252 \rightarrow 123)

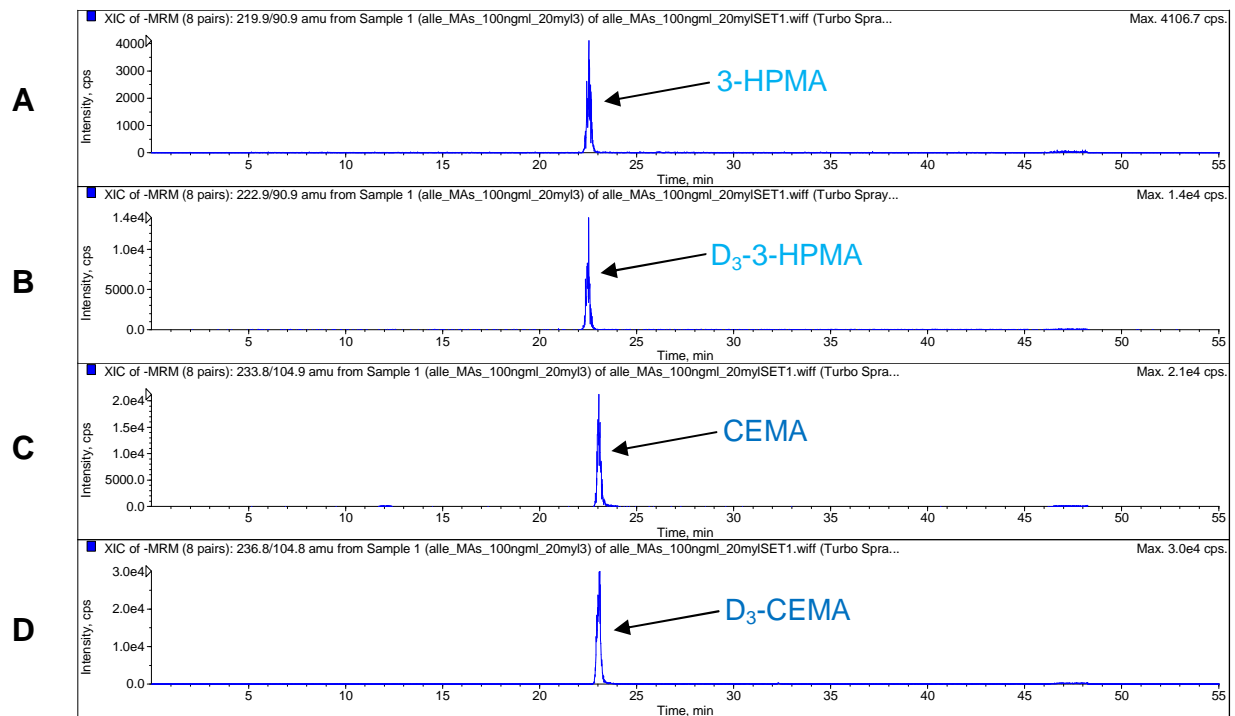


Abbildung 80 Repräsentatives HPLC-ESI-MS/MS-Chromatogramm einer Messung von 3-HPMA und CEMA eines Standardgemisches (100 ng/ml) im MRM-Modus; A: 3-HPMA (Rt = 22,5 min; m/z 220 \rightarrow 91), B: D₃-3-HPMA (Rt = 22,5 min; m/z 223 \rightarrow 91), C: CEMA (Rt = 23,1 min; m/z 234 \rightarrow 105); D: D₃-CEMA (Rt = 23,1 min; m/z 237 \rightarrow 105)

6.5 *In vitro* Experimente

6.5.1 Acrylamid

6.5.1.1 Inkubation von primären Rattenhepatozyten mit Acrylamid

6.5.1.1.1 Allgemeines

Alle zur Zellkultivierung verwendeten Medien wurden zuvor im Wasserbad (Köttermann) auf 37 °C temperiert. Sämtliche Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen an der Sterilwerkbank (Heraeus) durchgeführt. Die Kultivierung der Hepatozyten erfolgte bei 37 °C, 95 % relativer Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂-Gehalt.

6.5.1.1.2 Bestimmung der Zellzahl und der Viabilität

Die Bestimmung der Zellzahl der Hepatozyten erfolgte lichtmikroskopisch (Leitz) mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer (Abbildung 81). Diese besteht aus insgesamt neun Quadraten, von denen jedes einen Flächeninhalt von 1 mm^2 und eine Tiefe von $0,1 \text{ mm}$ besitzt. Dadurch ergibt sich für jedes Quadrat ein Volumen von $0,1 \text{ }\mu\text{l}$ [Lindl, 2002].

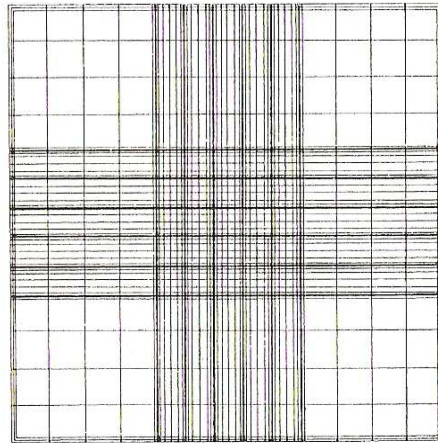


Abbildung 81 Darstellung einer Neubauer-Zählkammer [Lindl, 2002]

Zum Auszählen der Hepatozyten wurden $50 \text{ }\mu\text{l}$ Zellsuspension mit $450 \text{ }\mu\text{l}$ Waschpuffer versetzt und anschließend $25 \text{ }\mu\text{l}$ dieser Suspension mit $25 \text{ }\mu\text{l}$ Trypanblau-Lösung verdünnt. Dieser Farbstoff dringt in Zellen mit geschädigter Membran ein und färbt sie aufgrund ihrer Durchlässigkeit blau an. Durch Kapillarkräfte zieht sich ein definiertes Volumen an Zellsuspension zwischen Deckglas und Zählkammer. Unter dem Mikroskop wurden die vier Eckquadrate der Zählkammer ausgezählt (Abbildung 82). Bei der Bestimmung der Zellzahl wurden tote Zellen (blau) nicht mitgezählt. Durch Multiplikation des Mittelwertes der vier Eckquadrate mit dem Kammerfaktor 10^4 und dem Verdünnungsfaktor 20 ergab sich die Zellzahl pro ml Zellsuspension [Lindl, 2002].

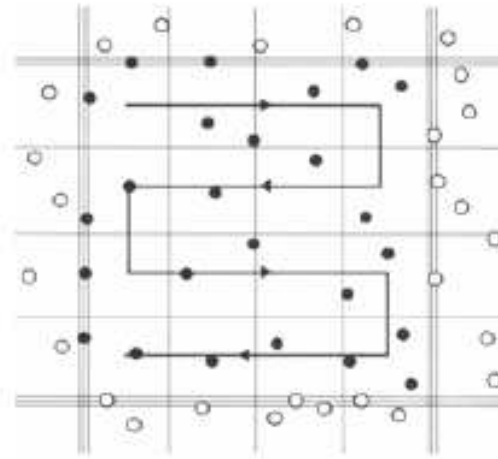


Abbildung 82 Vorgehensweise des Auszählens der Zellen in einem der Eckquadrate, es werden nur die schwarzen Zellen gezählt [*Lindl, 2002*]

$$\text{Zellzahl} / \text{ml} = \frac{Z \cdot 10^4}{4} \cdot 40$$

mit Z: lebende Zellen
 10^4 : Kammerfaktor
 20: Verdünnungsfaktor

Das Verhältnis von lebenden zu toten Zellen gibt Auskunft über die Vitalität der Primärzellen. Um diese zu bestimmen, werden die toten, also blaugefärbten, Zellen gezählt. Die Anzahl der bereits bestimmten lebenden Zellen wird durch die Summe aller Zellen dividiert und mit 100 multipliziert. Das Ergebnis drückt die Vitalität der Zellen in Prozent aus.

$$\text{Vitalität} = \frac{Z}{Z^*} \cdot 100$$

mit Z: lebende Zellen
 Z^* : Summe aller Zellen

Bei den Inkubationsexperimenten betrug die Zellzahl stets 22 bis 24 Millionen Zellen pro ml und die Vitalität mindestens $81 \pm 10\%$.

6.5.1.1.3 Kultivierung und Behandlung der Hepatozyten

Damit ein optimales Anwachsen der Zellen gewährleistet werden konnte, mussten die zu verwendenden Kulturgefäße mit einer dünnen Kollagenschicht überzogen werden. Hierzu wurde der gesamte Boden der Kultivierungsgefäße (Petrischalen) mit einer Kollagenlösung benetzt und diese mit einer Pipette wieder abgezogen, so dass eine möglichst dünne Schicht entstand. Anschließend beließ man die so vorbehandelten Gefäße zum Trocknen über Nacht in der Sterilbank. Vor dem Ausstreuen der Zellen wurden die Kultivierungsgefäße mit je 10 ml Hanks-Puffer (++) und anschließend zweimal mit je 10 ml Hanks-Puffer (--) gewaschen.

Vor dem Aussäen der Hepatozyten wurden die Petrischalen mit 20 ml serumhaltigem Medium (10% fetales Kälberserum) befüllt. Anschließend wurden pro Petrischale etwa 5 Millionen Zellen ausgesät und durch Umschwenken auf dem Boden des Kultivierungsgefäßes verteilt. Zum Absetzen und Anwachsen der Zellen wurden die Petrischalen drei Stunden im Brutschrank kultiviert. Abbildung 83 zeigt Bilder von primären Rattenhepatozyten in unterschiedlicher Vergrößerung (100x und 200x) nach dem Anwachsen lassen.

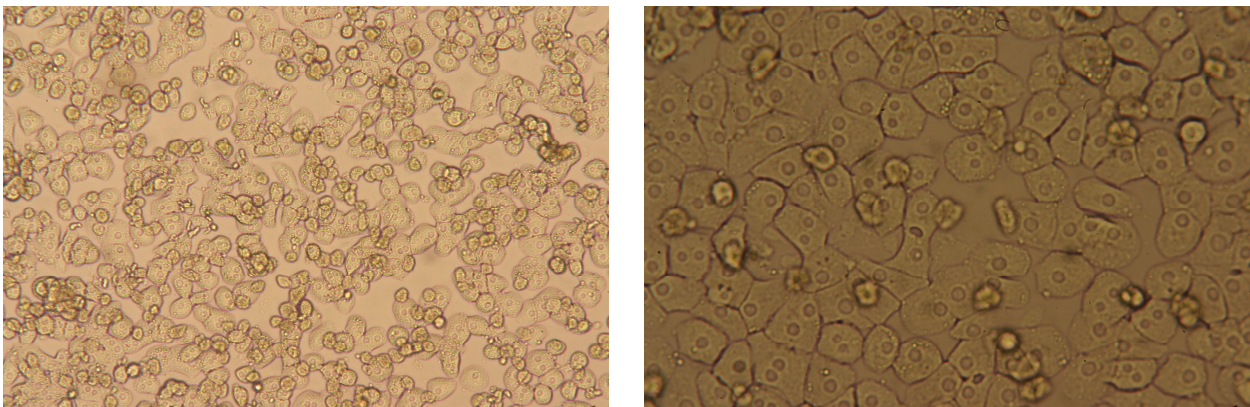


Abbildung 83 Primäre Rattenhepatozyten (links: Vergrößerung 100x; rechts: Vergrößerung 200x)

Sobald die sich die Zellen abgesetzt hatten, wurde das verbrauchte Medium abgesaugt, tote Zellen zweimal mit jeweils 10 ml PBS-Puffer abgewaschen, 10 ml frisches serumfreies Medium zugesetzt und über Nacht im Brutschrank belassen. Vor Beginn der Inkubation wurde das Medium abgesaugt, der Zellrasen mit 10 ml PBS-Puffer gewaschen und 10 ml Inkubationsmedium in die Petrischalen gegeben. Jeder Versuchsansatz enthielt eine Mediumkontrolle ohne Inkubationssubstanz. Nach Ende der Inkubationszeit wurde das Inkubationsmedium abgesaugt und in einem 50 ml-PP-Röhrchen vereinigt. Die Hepatozyten

wurden mit 2 ml PBS-Puffer gewaschen und mittels zweimaliger Zugabe von jeweils 1 ml PBS-Puffer geerntet. Die frisch geernteten Zellen wurden in einem 15 ml- PP-Röhrchen gesammelt und bei 500 x g für 5 Minuten zentrifugiert. Danach wurde der überstehende Puffer abgenommen. Die Aufbewahrung der Zellen und des Mediums erfolgte bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C.

6.5.1.1.4 Inkubation mit Acrylamid

Um die für die Inkubation benötigten unterschiedlichen Acrylamidkonzentrationen im Medium einstellen zu können, wurde eine Acrylamidstammlösung der Konzentration $c = 2 \text{ M}$ angesetzt. Hierzu wurde jeweils Acrylamid frisch in einem sterilen 1,5 ml-Reaktionsgefäß eingewogen und in sterilem Wasser gelöst. Die für die Inkubation gewählten Konzentrationen von Acrylamid im Medium betragen 0,2, 2, 20, 200 und 2000 μM . Pro Konzentration wurden jeweils drei Petrischalen á 5 Millionen Zellen inkubiert, um bei der Isolierung der DNA-Addukte genügend DNA zu erhalten. Die Inkubationsdauer im Brutschrank betrug 0,25 bis 24 Stunden.

6.5.1.1.5 Bestimmung der Zytotoxizität von Acrylamid und Glycidamid mittels Resazurin-Reduktionstest

Der Resazurin-Reduktionstest, als Modifikation des Alamar Blue Assay, dient im Allgemeinen zur Bestimmung der Zellproliferation oder zytotoxischer Effekte von verschiedenen Substanzen. Hierbei wird das blaue und gering fluoreszierende, oxidierte Resazurin in lebenden und proliferierenden Zellen in das pinkfarbene und stark fluoreszierende reduzierte Resorufin umgewandelt (Abbildung 84). Diese Reduktion verhält sich direkt proportional zur Konzentration an NADH, NADPH, FADH und FMNH und kann auf eine unbehandelte Kontrolle bezogen werden. Die Fluoreszenz des Resorufin kann bei einer Anregungswellenlänge von 544 nm und einer Emissionswellenlänge von 590 nm vermessen werden.

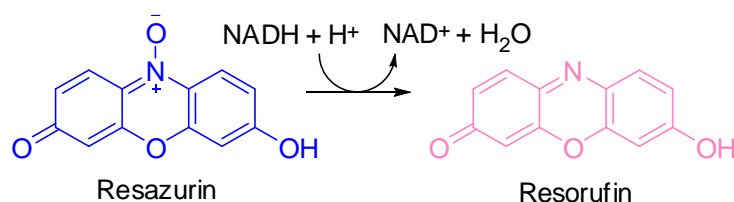


Abbildung 84 Reaktionsschema zum Resazurin-Reduktionstest

Die Kultivierung und Behandlung der primären Rattenhepatozyten erfolgte wie in Kapitel 6.5.1.1.3 beschrieben in 24 Well- Mikrotiterplatten. Mit Hilfe einer Multipette wurden pro Well 200000 Zellen in 1 ml Medium ausgestreut und für 4 h anwachsen gelassen. In jeder Platte wurden jeweils zwei Wells als Leerwerte ohne Zellen, Positiv- und Mediumkontrollen (je mit Zellen) mitgeführt. Danach wurde das Medium abgesaugt, jedes Well mit jeweils 1 ml PBS gewaschen, Inkubationsmedium entsprechender Substanzkonzentrationen zugegeben und die Mikrotiterplatte über 24 h im Brutschrank inkubiert. Die zu testenden Substanzen waren Acrylamid und Glycidamid in unterschiedlichen Konzentrationen (je 0,2 bis 3000 µM), als Positivkontrolle diente das Detergenz Saponin (0,1% Medium-Endkonzentration) und als Mediumkontrolle das Inkubationsmedium. Nach der Inkubation wurde das Inkubationsmedium abgesaugt, die Zellen durch Zugabe von 1 ml PBS gewaschen und jedes Well mit 1 ml Resazurin-Arbeitslösung versetzt. Danach wurden die Mikrotiterplatten in den Brutschrank verbracht und für eine Stunde inkubiert. Die Messung erfolgte mittels Fluoreszenz-Platereader bei einer Anregungswellenlänge von 544 nm und einer Emissionswellenlänge von 590 nm. Die Auswertung erfolgte semi-quantitativ, indem von den gewonnenen Rohdaten der gemittelte Leerwert abgezogen und anschließend auf die Mediumkontrolle bezogen wurde.

$$V = \left(\frac{(M_B - M_L)}{(M_K - M_L)} \right) \cdot 100$$

mit

- V: relative Vitalität [%]
- M_B: Messwert der Behandlung
- M_K: Messwert der Kontrolle
- M_L: Leerwert

Im Allgemeinen sollte die relative Vitalität [%] der Lösungsmittelkontrolle mit der der Mediumkontrolle korrelieren und die Werte der mit Saponin behandelten Zellen als Positivkontrolle, sollten sich aufgrund der stark zytotoxischen Wirkung bei 0% befinden.

6.5.1.1.6 Bestimmung von Glycidamid im Zellkulturmedium

Die Mediumproben der Acrylamidinkubation wurden aufgetaut und daraus jeweils 10 ml entnommen. Zur Bestimmung des metabolisch gebildeten Glycidamid wurden die Mediumproben mit ¹³C₃-Glycidamid (c = 23 µg/ml, V = 20 µl) versetzt und mittels SPE aufgereinigt und aufkonzentriert.

Die SPE-Säulen (Isolute ENV⁺; 500 mg) wurden mit 5 ml Methanol und zweimal mit 5 ml Wasser konditioniert. Nach dem Aufbringen der Proben wurde mit 4 ml Wasser gewaschen und die Analyten danach mittels 2 ml 60%iger (V/V) Methanollösung in ein 15 ml PP-Röhrchen eluiert. Zuletzt wurden die Proben unter Stickstoff auf ein Endvolumen von näherungsweise 1 ml eingengt und der Gehalt bei einem Injektionsvolumen von 50 µl mittels HPLC-ESI-MS/MS bestimmt. Die Bestimmung erfolgte anhand einer in der Arbeitsgruppe etablierten Methode [Berger et al., 2011].

Tabelle 27 Optimierte Probenvorbereitungsmethode zur Aufreinigung von Glycidamid mittels ENV⁺-Säulen (500 mg)

500 mg-Säulenmaterial	
Konditionieren	5 ml MeOH
Äquilibrieren	2 mal 5 ml bidest. H ₂ O
Probenaufgabe	10 ml Probe
Waschschritt	4 ml H ₂ O
Elution des Analyten	2 ml 60%ige MeOH-Lösung, mit gemäßigtem Vakuum trocken ziehen
Einengen	Probe unter Stickstoff einengen
HPLC-ESI-MS/MS-Messung	50 µl Injektionsvolumen

Tabelle 28 Zusammenfassung der HPLC-Bedingungen zur Bestimmung von Glycidamid mittels SIVA

Säule	Phenomenex Luna		
Material	C8, 150 mm x 4,6 mm, 3 µm		
Fluss	0,3 ml/min		
Fließmittel	A: Wasser (0,05 % Ameisensäure)	B: Acetonitril	
Injektionsvolumen	50 µl		
Time	Flussrate	Fließmittel A	Fließmittel B
0	0,3	99	1
1	0,3	99	1
15	0,3	80	20

Tabelle 29 LOD (S/R: 3) und LOQ (S/R: 6) der Bestimmung von Glycidamid und Lauf-zu-Lauf und Tag-zu-Tag-Variabilität [%] während der Bestimmung von Glycidamid

	Kalibrierfunktion	Nachweisgrenze [fmol]	Bestimmungsgrenze [fmol]	Lauf-zu-Lauf-Variabilität	Tag-zu-Tag-Variabilität
Glycidamid	$y = -0,076 + 0,965x$	12	23	< 2 %	< 2 %

Tabelle 30 Gerätespezifische Parameter zur Bestimmung von Glycidamid im Zellkulturmedium mittels SIVA (API 3200)

DP: Declustering Potential; EP: Entrance Potential; CEP: Cell Entrance Potential; CXP: Cell Exit Potential; CE: Collision Energie CUR: Curtain Gas; CAD: Collisionally Activated Dissociation; IS: Ion Spray Voltage; TEM: Temperature; GS1: Gas 1; GS2: Gas 2

	Glycidamid	¹³ C ₃ -Glycidamid
Q1 [amu]	88,1	71,0
Q3 [amu]	91,1	74,0
Dwell [ms]	100	100
Parameter		
DP [V]	21	21
EP [V]	6	6
CE	15	15
CEP [V]	10	10
CXP [V]	4	4
Source/gas		
CUR [psi]		10
CAD		5
IS [V]		5500
TEM [°C]		450
GS1		20
GS2		40

6.5.1.1.7 Bestimmung der Glutathionaddukte von Acrylamid und Glycidamid im Zellkulturmedium

Die Mediumproben der Inkubationen mit Acrylamid wurden aufgetaut und daraus jeweils ein Aliquot entnommen. Zur Bestimmung des metabolisch gebildeten Glutathionaddukte wurden die Mediumproben mit D₃-AA-GSH versetzt und mittels SPE aufgereinigt und aufkonzentriert.

Die Konditionierung der SPE-Säulen (Phenomenex, Strata XAW, 200 mg/3 ml) erfolgte durch Zugabe von 2 ml Methanol und zweimal 2 ml 50 mM Ammoniumformiatpuffer, der mit Ameisensäure auf einen pH-Wert von 2,5 eingestellt wurde. Nach Probenaufgabe (1 ml Medium versetzt mit 4 ml Ammoniumformiatpuffer) wurde die Säule durch Zugabe von 1 ml Ammoniumformiatpuffer gewaschen und mit 1,85 ml 60%iger Methanollösung (V/V) in ein 2 ml-Reaktionsgefäß eluiert. Die Probe wurde an einer beheizbaren Vakuumzentrifuge auf ca. 200 µl eingeeengt, mit 20 µl 0,1%iger Ameisensäure versetzt und der Gehalt der Glutathionaddukte bei einem Injektionsvolumen von 20 µl mittels HPLC-ESI-MS/MS bestimmt (Tabelle 31).

Tabelle 31 Optimierte Probenvorbereitungsmethode zur Aufreinigung von GSH-Addukten mittels XAW-Säulen (200 mg)

200 mg-Säulenmaterial	
Konditionieren	2 ml MeOH
Äquilibrieren	2 x 2 ml 50 mM Ammoniumformiatpuffer (pH 2,5; mit HCOOH eingestellt)
Probenaufgabe	Probe in Ammoniumformiatpuffer
Waschen	1 ml Ammoniumformiatpuffer
Trocknen	unter gemäßigttem Vakuum
Elution des Analyten	1,85 ml 60% MeOH (V/V) Einengen an der Vakuumzentrifuge (~ 200 µl) 20 µl 0,1% HCOOH (V/V) Säulen mit 5-10 ml 60% MeOH (V/V) waschen

Eine Übersicht über die verwendete Säule, die HPLC-Methode, die Nachweis- und Bestimmungsgrenze und die Kalibrierfunktion zur Quantifizierung sowie die gerätespezifischen Parameter sind in Tabelle 32 bis Tabelle 34 dargestellt. Die dazugehörigen Kalibriergeraden sind im Anhang (siehe Kapitel 8.1.8 und 8.1.9) abgebildet.

Tabelle 32 Zusammenfassung der HPLC-Bedingungen zur Bestimmung der GSH-Addukte mittels SIVA

Säule	Phenomenex Aqua		
Material	C18, 250 mm x 4,6 mm, 6 µm		
Fluss	0,5 ml/min		
Fließmittel	A: Wasser (0,1% HCOOH)	B: Acetonitril	
Injektionsvolumen	50 µl		

Time	Flussrate [ml/min]	Fließmittel A [%]	Fließmittel B [%]
0,05	0,5	98	2
5	0,5	85	15
20	0,5	75	25

Tabelle 33 Gerätespezifische Parameter zur Bestimmung von GSH-Addukten im Zellkulturmedium mittels SIVA (API 3200)

DP: Declustering Potential; EP: Entrance Potential; CEP: Cell Entrance Potential; CXP: Cell Exit Potential; CE: Collision Energie CUR: Curtain Gas; CAD: Collisionally Activated Dissociation; IS: Ion Spray Voltage; TEM: Temperature; GS1: Gas 1; GS2: Gas 2

	AA-GSH	D ₃ -AA-GSH	GA-GSH
Q1 [amu]	379,0	381,0	395,0
Q3 [amu]	104,1	107,2	120,0
Dwell [ms]	75	75	75

Parameter	AA-GSH	D ₃ -AA-GSH	GA-GSH
DP [V]	41	26	31
EP [V]	5	12	6
CE [V]	31	31	35
CEP [V]	21	21	22
CXP [V]	4	4	4

Source/gas	
CUR [psi]	15
CAD	3
IS [V]	5500
TEM [°C]	400
GS1	50
GS2	50

Tabelle 34 LOD (S/R: 3) und LOQ (S/R: 6) der Bestimmung von GSH-Addukten und Lauf-zu-Lauf und Tag-zu-Tag-Variabilität [%] während der Bestimmung von GSH-Addukten

	Kalibrierfunktion	LOD [fmol]	LOQ [fmol]	Lauf-zu- Lauf- Variabilität	Tag-zu- Tag- Variabilität
AA-GSH	$y = 0,5995 x - 0,1602$	27	45	< 2%	< 2%
GA-GSH	$y = 81,98714 x - 49,19524$	125	209	< 4%	< 3%

6.5.1.1.8 Bestimmung der Mercaptursäuren von Acrylamid und Glycidamid im Zellkulturmedium

Den aufgetauten Proben der Inkubationen von primären Rattenhepatozyten mit Acrylamid (6.5.1.1.4) wurden 4 ml (Kontrolle, 0,2 µM, 2 µM und 20 µM Acrylamid) Medium entnommen. Den Inkubationsmedien mit 200 µM und 2000 µM Acrylamid wurden 0,4 ml entnommen und mit Wasser jeweils auf 4 ml Endvolumen aufgefüllt. Zur Bestimmung der Mercaptursäuren wurden die Proben mit 4 ml Ammoniumformiat-Puffer versetzt und sowohl D₃-AAMA (c = 10 µg/ml; V = 40 µl) als auch D₃-GAMA (c = 12,9 µg/ml; V = 40 µl) zugegeben. Anschließend wurden die Proben auf pH 2-3 durch Zugabe von 4 N Salzsäure eingestellt und mittels SPE aufgereinigt und aufkonzentriert. Die SPE-Säulen (Isolute ENV⁺; 100 mg) wurden mit 4 ml Methanol konditioniert und durch zweimalige Zugabe von je 2 ml bidestilliertem Wasser und 2 ml Salzsäure (pH 2,5) äquilibriert. Nach Aufbringen der Probe wurde mit 2 ml Salzsäure (pH 2,5) und 1 ml Salzsäure-Methanol-Gemisch (10% v/v; pH 2,5) gewaschen. Danach wurden die Säulen unter gemäßigttem Wasserstrahl-Vakuum getrocknet, wonach die Analyten mit 1,85 ml Methanol (1% Ameisensäure; V/V) in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß eluiert wurden (Tabelle 35). Die Proben wurden an einer beheizbaren Vakuumzentrifuge auf ca. 100 µl eingeeengt und auf 300 µl mit 0,1%iger Ameisensäure (V/V) aufgefüllt. Die Quantifizierung erfolgte mit einem Injektionsvolumen von 50 µl per HPLC-ESI-MS/MS anhand einer im Arbeitskreis etablierten Methode [Berger, 2010].

Tabelle 35 Optimierte Probenvorbereitungsmethode zur Aufreinigung von MA mittels ENV⁺-Säulen (100 mg)

100 mg-Säulenmaterial	
Konditionieren	4 ml MeOH
Äquilibrieren	2 x 2 ml bidest. H ₂ O 2 ml HCl (pH 2,5)
Probenaufgabe	vorbereitete Probe in Ammoniumformiatpuffer
Waschen	2 ml HCl (pH 2,5) 1 ml HCl +10 % MeOH (pH 2,5)
Trocknen	unter gemäßigttem Vakuum
Elution des Analyten	1,85 ml MeOH + 1% HCOOH Einengen an der Vakuumzentrifuge (~ 200 µl) Säulen mit 5-10 ml 60% MeOH (V/V) waschen

Eine Übersicht über die verwendete Säule, die HPLC-Methode und die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen sowie die gerätespezifischen Parameter sind in Tabelle 36 bis Tabelle 38 wiedergegeben. Die dazugehörigen Kalibriergeraden sind im Anhang (siehe Kapitel 8.1.3 und 8.1.4) abgebildet.

Tabelle 36 Zusammenfassung der HPLC-Bedingungen zur Bestimmung der Acrylamid- und Glycidamidmercaptursäuren (AAMA und GAMA) mittels SIVA

Säule	Phenomenex Luna		
Material	C8, 150 mm x 4,6 mm, 3 µm		
Fluss	0,3 ml/min		
Fließmittel	A: Wasser (0,1% HCOOH)	B: Acetonitril	
Injektionsvolumen	50 µl		
Time	Flussrate [ml/min]	Fließmittel A [%]	Fließmittel B [%]
0	0,3	95	5
1	0,3	95	5
17	0,3	95	5

Tabelle 37 LOD (S/R: 3) und LOQ (S/R: 6) der Bestimmung von AAMA und GAMA und Lauf-zu-Lauf und Tag-zu-Tag-Variabilität [%] während der Bestimmung von AAMA und GAMA

	Kalibrierfunktion	LOD [fmol]	LOQ [fmol]	Lauf-zu-Lauf-Variabilität	Tag-zu-Tag-Varabilität
AAMA	$y = 0,93916 x - 0,0097$	85	170	< 2%	< 2%
GAMA	$y = 0,94512 x - 0,0110$	110	220	< 2%	< 2%

Tabelle 38 Gerätespezifische Parameter zur Bestimmung von MA im Zellkulturmedium mittels SIVA (API 3200)

DP: Declustering Potential; EP: Entrance Potential; CEP: Cell Entrance Potential; CXP: Cell Exit Potential; CE: Collision Energie CUR: Curtain Gas; CAD: Collisionally Activated Dissociation; IS: Ion Spray Voltage; TEM: Temperature; GS1: Gas 1; GS2: Gas 2

	AAMA	D ₃ -AAMA	GAMA	D ₃ -GAMA
Q1 [amu]	233,0	235,9	248,9	252,0
Q3 [amu]	103,8	106,9	120,0	122,9
Dwell [ms]	75	75	75	75
Parameter				
DP [V]	-25	-25	-30	-30
EP [V]	-5	-5	-4	-5
CE [V]	-22	-22	-22	-22
CEP [V]	-14	-14	-16	-16
CXP [V]	-1	-1	-22	-22
Source/gas				
CUR [psi]			10	
CAD			5	
IS [V]			-4500	
TEM [°C]			450	
GS1			30	
GS2			30	

6.5.1.1.9 Bestimmung von N7-GA-Gua-Addukten aus der DNA von primären Rattenhepatozyten

Die Präparation der Zell-DNA lässt sich in vier Unterpunkte aufgliedern. Zuerst erfolgte die Inkubation der Zellen, anschließend wurden sie lysiert, so dass der Zellinhalt frei wurde. Danach wurde der Zellextrakt so behandelt, dass alle Bestandteile außer der DNA entfernt wurden. Zuletzt wurde die so entstandene DNA Lösung angereichert.

Zur Lyse der Zellen gibt es einerseits physikalische Verfahren, bei denen die Zellen durch mechanische Kräfte zerstört werden und andererseits chemische Methoden, bei denen es durch Behandlung mit Substanzen, welche den Zusammenhalt der Zellhüllen beeinträchtigen, zur Lyse der Zellen kommt. Zur chemischen Lyse der Zellen braucht man im Allgemeinen einen Lysepuffer, bestehend aus Agentien, die die Zellmembran zerstören und aufbrechen. Hierfür wurde Ethylendiamintetraacetat (EDTA) in Kombination mit Natriumdodecylsulfat (SDS), einem Detergens, angewandt. EDTA entfernte die für die Aufrechterhaltung der Gesamtstruktur der Zellhülle unentbehrlichen Magnesiumionen und hemmte dazu DNA-abbauende Enzyme. SDS unterstützte den Lysevorgang, weil es Lipidmoleküle entfernt und so dafür sorgt, dass die Zellmembran zerreißt. Da die zu lysierenden Zellen außer DNA auch erhebliche Mengen an Proteinen und RNA enthält, wurde der Lyse-Puffer außerdem mit einer Peptidase in Form der Proteinase K versetzt. Dieses Enzym baut die Polypeptide zu kleineren Molekülen ab, die sich dann später bei der Extraktion mit Phenol leichter entfernen lassen. Um auch die RNA vollständig aus dem Zelllysat zu entfernen, erfolgte außerdem die Behandlung mit RNase A, die die RNA sehr schnell zu Ribonukleotidbausteinen abbaut. Um Proteine aus dem Zellextrakt zu entfernen wurde dieser mit einem Gemisch aus Phenol, Chloroform und Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt. Diese organischen Lösungsmittel fällen die Proteine aus, wohingegen die DNA in der wässrigen Lösung verbleibt. Wird der Zellextrakt mit dem Extraktionsmittel versetzt, vermischt und durch Zentrifugation getrennt, befinden sich die ausgefällten Proteine als weiße, zusammengeballte Masse an der Grenze zwischen wässriger und organischer Phase. Die Anreicherung der DNA-Proben erfolgte durch Ethanolpräzipitation in Gegenwart von Natriumchlorid. Hierbei wurde die DNA durch Abkühlen auf unter -20 °C ausgefällt und zu einem Pellet zentrifugiert. Nach Lösen der DNA in einem geeigneten Puffer, wurde die DNA-Konzentration durch UV-Absorptionsspektrometrie bei 260 nm bestimmt. Die Menge der ultravioletten Strahlung, die von einer DNA-Lösung absorbiert wird, ist ihrem Gehalt direkt proportional. Anhand dieser Methode konnte auch die Reinheit der DNA-Lösung überprüft werden. Bei einer reinen Probe liegt das Verhältnis der Absorption bei 260 und 280 nm bei 1,8. Geringere Werte weisen auf eine Verunreinigung mit Protein oder Phenol hin [Brown, 1996].

Die gekühlten DNA-Pellets wurden nach Zugabe von 0,5 ml Lyse- und Verdauopuffer und anschließender Resuspendierung im Handhomogenisator etwa 20-mal gepottert. Die so homogenisierte Zellsuspension wurde mit Hilfe von 3,5 ml Puffer in ein 15 ml PP-Röhrchen überführt und für drei Stunden bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Die DNA-Isolation erfolgte über eine Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion (25:24:1). Hierzu wurden die Proben mit 4 ml Extraktionslösung versetzt, gevortext und fünf Minuten zentrifugiert (21 °C, 4500 g). Die wässrige Nucleinsäurephase wurde abgezogen und in ein neues PP-Röhrchen überführt. Dieser Aufreinigungsschritt wurde so oft wiederholt, bis an der Phasengrenze zwischen organischer und wässriger Phase kein Protein mehr zu erkennen war. Anschließend wurde die wässrige Phase mit der äquivalenten Menge Chloroform versetzt, gemischt und ebenfalls zentrifugiert. Die obere Phase wurde abpipettiert und in ein weiteres PP-Röhrchen überführt. Aus der aufgereinigten wässrigen Phase wurde die DNA durch Zugabe von 3 Volumen Ethanol und 0,1 Volumen 5 M Natriumchlorid-Lösung gefällt. Zur vollständigen Fällung wurden die Proben gevortext und für 30 Minuten bei -80 °C belassen. Danach erfolgte eine Zentrifugation bei 4 °C und 45 00 x g für weitere 30 Minuten. Anschließend wurden die Proben durch Zugabe von 1 ml eiskaltem 70%igem Ethanol gewaschen und nach Vortexen zentrifugiert (4 °C; 45 00 x g; 10 min). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet 10 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Danach erfolgte die Resuspendierung der DNA in BisTris-Puffer, und die Zugabe von internem Standard (N7-GA-¹⁵N₅-Gua). Hierzu wurden je nach zu erwartendem Analyt-Signal 15-60 µl eines 25 ng/ml-Standards mit der zu analysierenden DNA-Lösung auf 200 µl Endvolumen aufgefüllt und deren DNA-Konzentration durch Messung mittels UV-Spektroskopie (NanoDrop) bestimmt. Die neutrale thermische Hydrolyse zur Freisetzung der DNA-Addukte erfolgte im Thermo Mixer nach Überführung von jeweils 200 µl Probe in Reaktionsgefäße (1,5 ml) bei 95 °C für 15 Minuten. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden die Proben durch ein vorher mit Wasser äquilibriertes 3 kDa Zentrifugenröhrchen zentrifugiert (1 h, 12.000 x g). Zuletzt wurden die Proben in Autosamplervials überführt und anhand einer in der Arbeitsgruppe etablierten Methode mittels HPLC-ESI-MS/MS vermessen [Feld, 2010; Watzek, 2009].

Eine Übersicht über die verwendete Säule, die HPLC-Methode und die Nachweis- und Bestimmungsgrenze sowie die gerätespezifischen Parameter sind in Tabelle 39 bis Tabelle 41 wiedergegeben. Da dazugehörigen Kalibriergeraden sind im Anhang (siehe Kapitel 8.1.6) abgebildet.

Tabelle 39 Zusammenfassung der HPLC-Bedingungen zur Bestimmung von N7-GA-Gua mittels SIVA (API 3200)

Säule	Phenomenex Luna		
Material	Aqua, 250 mm x 4,6 mm, 5 µm		
Fluss	0,3 ml/min		
Fließmittel	A: Wasser (0,05% HCOOH)	B: Acetonitril	
Injektionsvolumen	50 µl		

Time	Flussrate [ml/min]	Fließmittel A [%]	Fließmittel B [%]
0	0,3	95	5
1	0,3	95	5
17	0,3	80	20

Tabelle 40 LOD (S/R: 3) und LOQ (S/R: 6) der Bestimmung von N7-GA-Gua und Lauf-zu-Lauf und Tag-zu-Tag-Variabilität [%] während der Bestimmung von N7-GA-Gua (API 3200)

	Kalibrierfunktion	LOD [fmol]	LOQ [fmol]	Lauf-zu-Lauf-Variabilität	Tag-zu-Tag-Varabilität
N7-GA-Gua	$y = 1,90056 x - 0,04421$	8,0	17,0	< 1%	< 3%

Tabelle 41 Gerätespezifische Parameter zur Bestimmung von *N7-GA-Gua* aus der DNA mittels SIVA (API 3200)

DP: Declustering Potential; EP: Entrance Potential; CEP: Cell Entrance Potential; CXP: Cell Exit Potential; CE: Collision Energie CUR: Curtain Gas; CAD: Collisionally Activated Dissociation; IS: Ion Spray Voltage; TEM: Temperature; GS1: Gas 1; GS2: Gas 2

	<i>N7-GA-Gua</i>	<i>N7-GA-[¹⁵N₅]-Gua</i>
Q1 [amu]	239,2	244,2
Q3 [amu]	152,1	157,1
Dwell [ms]	150	150
Parameter		
DP [V]	36	36
EP [V]	9	9
CE [V]	27	27
CEP [V]	27	27
CXP [V]	4	4
Source/gas		
CUR [psi]	30	
CAD	7	
IS [V]	5500	
TEM [°C]	400	
GS1	30	
GS2	30	

6.5.2 Acrolein

6.5.2.1 Inkubation von DNA mit Acrolein

6.5.2.1.1 Allgemeines

Für die Inkubation von Salmon Testes-DNA mit Acrolein wurden jeweils 4 mg DNA pro ml Wasser gelöst. Die so erhaltene DNA-Lösung wurde in 1,5 ml-Reaktionsgefäße aliquotiert (V = 250 µl). Um die für die Inkubation benötigten unterschiedlichen Acrolein-Konzentrationen einstellen zu können, wurde eine Acrolein-Stammlösung. Die DNA-Stammlösung wird im Tiefkühlschrank bei -20 °C aufbewahrt. Die Acrolein-Lösungen wurden vor Versuchsbeginn jeweils frisch angesetzt und verdünnt.

6.5.2.2 Untersuchung zur Acrolein-konzentrationsabhängigen DNA-Adduktbildung

Die Salmon Testes-DNA und verschiedene Verdünnungen der Acrolein-Lösung wurden zu unterschiedlichen Ansätzen zusammenpipettiert. Die resultierenden Lösungen verschiedener DNA-Mengen (100, 200, 500 und 1000 µg) und unterschiedlicher Acrolein-Konzentrationen (0,02; 0,2; 2; 20; 200 und 2000 µM) wurden auf 1 ml Endvolumen aufgefüllt und im Thermo Mixer 24 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die inkubierte DNA wurde anschließend durch Zugabe von 3 Volumen eiskaltem Ethanol und 0,1 Volumen 5 M Natriumchlorid-Lösung gefällt. Zur vollständigen Fällung wurden die Proben gevortext und für 30 Minuten bei -80 °C belassen. Danach folgte eine Zentrifugation bei 4 °C und 4500 x g für weitere 30 Minuten. Anschließend wurden die Proben durch Zugabe von 1 ml eiskaltem 70%igem Ethanol gewaschen und nach Vortexen zentrifugiert (4 °C; 45 00 x g; 10 min). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet 10 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Danach erfolgte die Resuspension der DNA in PBS und das Versetzen mit internem Standard ([¹⁵N₅]-OH-PdG; 25 ng/ml), sodass die gewünschte DNA-Konzentration von 0,5 mg/ml erreicht wurde. Im Anschluss daran sollte mittels enzymatischer Hydrolyse Addukte aus der DNA isoliert werden. Dafür wurden die Proben zunächst für 30 Minuten auf 100°C erhitzt und danach auf Raumtemperatur abgekühlt. Anschließend wurden sie zur Hydrolyse der DNA-Addukte aus der DNA mit 75 units *Micococcal* Nuklease und 0,45 units Phosphodiesterase II versetzt und im Thermo Mixer für 6 h bei 37°C inkubiert. Nach dieser Zeit wurden 150 units Alkaline Phosphatase zupipettiert und die Proben im Thermo Mixer über Nacht bei 37°C inkubiert [Zhang *et al.*, 2007]. Nach der enzymatischen Hydrolyse erfolgte die Anreicherung und Aufkonzentrierung der Proben mittels Festphasenextraktion. Dazu wurde eine Strata-X-Säule (33 µm, 30 mg) verwendet.

Zunächst erfolgte die Konditionierung mit 9 ml 60%igem MeOH und anschließend die Äquilibration mit 6 ml H₂O. Nach Probenaufgabe wurde mit 1 ml H₂O und 1 ml 10%igen MeOH gewaschen. Danach wurden die Säulen unter mäßigem Vakuum (-10 kPa) getrocknet, bevor die Analyten mit 1 ml 60%igem MeOH eluiert werden Tabelle 42.

Tabelle 42 Optimierte Probenvorbereitungsmethode zur Aufreinigung von DNA mittels Strata-Säulen (30 mg)

30 mg-Säulenmaterial	
Konditionieren	9ml 60% MeOH
Äquilibrieren	6ml H ₂ O
Probenaufgabe	1ml Probe (in PBS)
Waschen	1ml H ₂ O 1ml 10% MeOH
Trocknen	Mittels gemäßigttem Wasserstrahl-Vakuum
Elution der Analyten	1 ml 60% MeOH

Mittels Vakuumzentrifuge wurden die Proben anschließend auf ein Volumen von ca. 100 µl aufkonzentriert und mit MeOH auf ca. 300 µl aufgefüllt. Anschließend wurden die Proben mittels HPLC-ESI-MS/MS vermessen [Klesen, 2010]. Die verwendeten HPLC- und MS-Parameter sind in Tabellen in Kapitel 4.1.1.2 angegeben.

6.5.2.3 Untersuchung zur Reaktionskinetik der DNA-Adduktbildung

Für die Untersuchung der Reaktionskinetik wurden 200 µg der Salmon Testes-DNA mit einer Acrolein-Konzentration von 200 µM bei einem Endvolumen von 1 ml über einen Zeitraum von jeweils 0,5 h, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 16 h bis 24 h im Thermo Mixer bei 37 °C inkubiert. Die Aufarbeitung und Messung der Proben erfolgte wie unter Abschnitt 6.5.2.2 beschrieben.

6.6 *In vivo* Experimente

6.6.1 Tierstudie

Im Rahmen der Tierstudie „Holistic study on genotoxic efficacy of acrylamide in rats: single dose threshold, modulatory effects due to continuous exposure and preventive effects due to coffee consumption“ wurde weiblichen SD-Ratten radioaktives 1-¹⁴C-AA mit einer spezifischen Aktivität von 25 mCi/mmol verabreicht. Sowohl die Behandlung der Versuchstiere als auch die Durchführung der Probenaufarbeitung zur analytischen Bestimmung der Biomarker erfolgten in speziellen Laboratorien der TU Kaiserslautern (Radionuclidlabor und Freigrenzenlabor). Aufgrund der verwendeten spezifischen Aktivität

betrug das Verhältnis von nicht-radioaktivem zu radioaktivem Acrylamid etwa 2,5. Daher erfolgte die Analytik der Biomarker jeweils an den nicht radioaktiv markierten Molekülen, da somit eine höhere Empfindlichkeit und damit eine bessere Nachweisgrenze gewährleistet werden konnte.

6.6.1.1 Herstellung eines Acrylamid-armen Rattenfutters

Um die Hintergrundbelastung der Versuchstiere mit Acrylamid so gering wie möglich zu halten, wurde ein Acrylamid-armes Rattenfutter entwickelt. Aus Glucose (175 g/kg), Stärke (175 g/kg), Vollkornmehl (200 g/kg), gekochten Kartoffeln (200 g/kg), Lactose-reduziertem Quark (175 g/kg), Tofu (50 g/kg), Sojaproteinpulver (10 g/kg), Maiskeimöl (15 g/kg) und einem Nager-Vitamin-Mix (6 g/kg) wurde ein pastöser Teig geformt, der kurz an der Luft getrocknet und anschließend portionsweise luftdicht verschlossen wurde. Dieses Futter wurde in regelmäßigen Abständen frisch hergestellt und bei -20 °C gelagert. Den Versuchstieren wurde täglich frisch aufgetautes Futter zur Verfügung gestellt. Die Tiere nahmen pro Woche 19 ± 5 g ($10 \pm 3\%$ des Körpergewichts) zu. Der Acrylamidgehalt des Futters lag unter der Nachweisgrenze von $0,5 \mu\text{g/kg}$ [Böhm, 2011].



Abbildung 85 Fotografie des Rattenfutters

6.6.1.2 Konditionierung der Tiere

Die weiblichen Sprague-Dawley Ratten (rund 50 Tage alt; Körpergewicht 150-170 g) wurden nach Eintreffen und Anpassung an die Umgebungsbedingungen (Tag-Nacht-Rhythmus; 20-22 °C) für zwei Wochen bis zum Versuchsbeginn mit einer speziellen Acrylamid-armen Diät gefüttert. Die Versuchstiere wurden in fünf Gruppen (vier Behandlungsgruppen und eine unbehandelte Kontrollgruppe (TW)) bestehend aus jeweils acht Tieren (Körpergewicht: 150-

170 g) randomisiert. Vor Versuchsbeginn wurden die zu behandelnden Tiere an den Aufenthalt im Ganzglas-Stoffwechselkäfig (siehe Abbildung 86) an vier Tagen für jeweils acht Stunden gewöhnt.

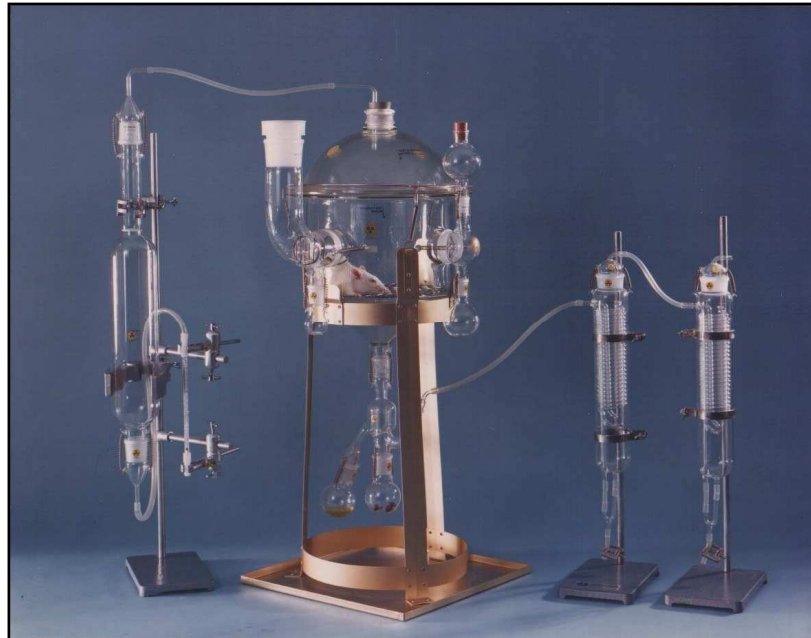


Abbildung 86 Fotografie einer Ratte im Ganzglas-Stoffwechselkäfig

6.6.1.3 Behandlung der Versuchstiere

Vor der Behandlung wurden die Versuchstiere gewogen, um die zu verabreichende Menge an Acrylamidlösung für die exakte Dosierung ermitteln zu können.

Tabelle 43 Übersicht über die Behandlungsgruppen

	Kontrolle (TW)	Gruppe I	Gruppe II	Gruppe III	Gruppe IV
¹⁴ C-Acrylamidgehalte [µg/kg KG]		0,1	1,0	10,0	100,0
Behandlung im Ganzglas- Stoffwechselkäfig	Trinkwasser und Acrylamid-arme Diät ad libitum				

Die Behandlung sämtlicher Tiere mittels Schlundsonde erfolgte unter leichter Isofluran-Narkose (60 s). Nach Applikation der entsprechenden Acrylamiddosis wurden die Tiere zum Sammeln von Urin und Fäces in den Ganzglas-Stoffwechselkäfig verbracht und erhielten

Acrylamid-armes Futter und Trinkwasser ad libitum. Um ausgeatmetes CO₂ zu binden, wurde die abgeatmete Luft durch drei hintereinandergeschaltete CO₂-Fallen (zwei Ethanolamin- und eine Bariumhydroxid-Falle) mit einem konstanten Luftfluss von 350 l/h geleitet. Nach 16 Stunden wurden die Versuchstiere durch cervikale Dislokation getötet und Organe (Nieren, Lunge und Leber) entnommen (Abbildung 87). Die entnommenen Gewebe wurden in DMSO (20%; V/V) gegeben und bis zur Untersuchung der DNA-Adduktbildung bei -80 °C gelagert.

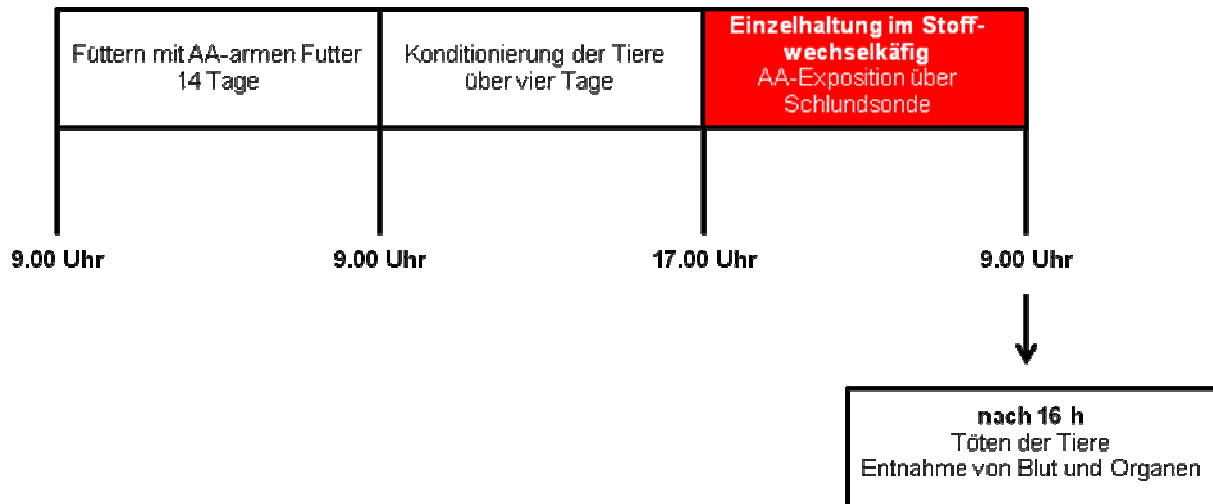


Abbildung 87 Darstellung des Behandlungsschemas zur Tierstudie

6.6.1.4 Bestimmung von AAMA, GAMA und 3-HPMA

Die Bestimmung von AAMA, GAMA, 3-HPMA und CEMA erfolgte wie in Kapitel 6.5.1.1.8 beschrieben. Den aufgetauten Urinroben der *in vivo* Studie wurden 2 ml Urin entnommen und mit 6 ml Ammoniumformiat-Puffer (50 mM) versetzt. Danach wurden die stabilisotopenmarkierten Standardverbindungen (AAMA: $c = 10 \mu\text{g/ml}$, $V = 20 \mu\text{l}$; GAMA: $c = 12,9 \mu\text{g/ml}$, $V = 20 \mu\text{l}$; 3-HPMA: $c = 10 \mu\text{g/ml}$, $V = 10 \mu\text{l}$) zugegeben. Anschließend wurden die Proben auf pH 2-3 durch Zugabe von 4 N Salzsäure eingestellt und mittels SPE aufgereinigt und aufkonzentriert (Durchführung siehe Kapitel 6.5.1.1.8).

Die Messung der MA erfolgte anhand der in den Kapiteln 6.4.2.1.1 und 6.4.2.1.2 beschriebenen Methoden mittels HPLC-ESI-MS/MS.

6.6.1.5 Bestimmung von *N7*-GA-Gua-Addukten

Die Bestimmung von *N7*-GA-Gua erfolgte aus der DNA von Leber, Niere und Lunge von mit $1\text{-}^{14}\text{C}_1$ -Acrylamid (0,1-100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG) behandelten weiblichen SD-Ratten. Die Isolation der DNA erfolgte aus den Geweben durch Verwendung von Stücken (insgesamt rund 500 mg) eines jeden Leberlappens, der ganzen mit einer Schere zerkleinerten Lunge und einer ganzen Niere durch Verwendung der in Kapitel 6.5.1.1.9 beschriebenen Methode. Die DNA-Konzentration wurde mittels Nanodrop bestimmt und mit Phosphatpuffer auf 1 mg/ml eingestellt ($V = 1$ ml), mit $^{15}\text{N}_5$ -GA-Gua versetzt und mittels SPE aufgereinigt und aufkonzentriert.

Die SPE-Säulen (Isolute ENV⁺; 100 mg) wurden mit 5 ml Methanol konditioniert und durch zweimalige Zugabe von je 2 ml bidestilliertem Wasser äquilibriert. Nach der Probenaufgabe wurde das Säulenmaterial durch Zugabe von 2 ml bidestilliertem Wasser und 1 ml verdünntem Methanol-Gemisch (10% V/V; pH 2,5) gewaschen. Danach wurden die Säulen unter gemäßigttem Vakuum getrocknet (1 min, -10 kPa), wonach die Analyten mit 1 ml Methanol-Lösung (60%; V/V) in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß eluiert wurden (Tabelle 44) [Böhm, 2011].

Die Quantifizierung erfolgte mit einem Injektionsvolumen von 100 μl per HPLC-ESI-MS/MS anhand einer in der Arbeitsgruppe etablierten Methode [Watzek, 2009].

Tabelle 44 Optimierte Probenvorbereitungsmethode zur Aufreinigung von DNA mittels ENV⁺-Säulen (100 mg) [Böhm, 2011]

100 mg-Säulenmaterial	
Konditionieren	5 ml MeOH
Äquilibrieren	2 x 2 ml bidest. H ₂ O
Probenaufgabe	DNA-Probe in PBS
Waschen	2 ml H ₂ O _{bidest.} 1 ml 10% MeOH
Trocknen	unter gemäßigttem Vakuum
Elution des Analyten	1 ml 60% MeOH Einengen unter gemäßigttem Stickstoffstrom (~ 100 μl) und mit PBS auf etwa 200 μl auffüllen Säulen mit 5-10 ml 60% MeOH (V/V) waschen

Tabelle 45 LOD (S/R: 3) und LOQ (S/R: 6) der Bestimmung von *N7-GA-Gua* und Lauf-zu-Lauf und Tag-zu-Tag-Variabilität [%] während der Bestimmung von *N7-GA-Gua* (API 5500 QTRAP)

	Kalibrierfunktion	LOD [fmol]	LOQ [fmol]	Lauf-zu-Lauf- Variabilität	Tag-zu-Tag- Varabilität
<i>N7-GA-Gua</i>	$y = 1,75305 x - 0,01266$	1,0	2,0	< 4%	< 4%

Eine Übersicht über die verwendete Säule, die HPLC-Methode und die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen sowie die gerätespezifischen Parameter sind in Tabelle 44 bis Tabelle 46 wiedergegeben. Die dazugehörigen Kalibriergeraden sind im Anhang (siehe Kapitel 8.1.7) abgebildet.

Tabelle 46 Gerätespezifische Parameter zur Bestimmung von *N7-GA-Gua* aus der DNA mittels SIVA (API 5500 QTRAP)

DP: Declustering Potential; EP: Entrance Potential; CEP: Cell Entrance Potential; CXP: Cell Exit Potential; CE: Collision Energie CUR: Curtain Gas; CAD: Collisionally Activated Dissociation; IS: Ion Spray Voltage; TEM: Temperature; GS1: Gas 1; GS2: Gas 2

	<i>N7-GA-Gua</i>	<i>N7-GA-[¹⁵N₅]-Gua</i>
Q1 [amu]	239,2	244,2
Q3 [amu]	152,1	157,1
Dwell [ms]	150	150
Parameter		
DP [V]	86	86
EP [V]	10	10
CE [V]	27	27
CEP [V]	27	27
CXP [V]	8	8
Source/gas		
CUR [psi]		30
CAD		7
IS [V]		5500
TEM [°C]		400
GS1		30
GS2		30

6.6.2 Bestimmung der Ausscheidungskinetik von Acrolein im Menschen nach Aufnahme einer Einzeldosis

6.6.2.1 Durchführung der Studie

Um die Toxikokinetik von Acrolein nach Aufnahme gelöst in Trinkwasser und mögliche Wechselwirkungen auf Giftung und Entgiftung von Acrylamid und Glycidamid zu untersuchen, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit zunächst die Ausscheidung der Mercaptursäuren 3-HPMA und CEMA, sowie AAMA und GAMA im Urin betrachtet.

Für die Studie wurde ein gesunder kaukasischer Proband im Alter von 70 Jahren mit einem Body Mass Index (BMI) von 23,7 kg/m² rekrutiert. Der Studienplan sah vor, dass der

Proband 48 Stunden vor bis 24 Stunden nach der Aufnahme von Acrolein auf den Verzehr von gebratenen oder trocken erhitzten Lebensmittel verzichtete, um die Hintergrundbelastung an Acrolein so gering wie möglich zu halten. Vor der Applikation wurde der Proband angehalten genau 24 h Urin zu sammeln (vor Aufnahme). Nach Aufnahme von 615 µg Acrolein (7,5 µg/kg KG) in 200 ml Trinkwasser wurde in den Zeiträumen 0-2, 2-4, 4-6, 6-8, 8-12 und 12-24 h Urin gesammelt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Mercaptursäuren von Acrolein, sowie Acrylamid und Glycidamid im Urin zu den angegebenen Zeitpunkten mittels HPLC-ESI-MS/MS untersucht.

6.6.2.2 Bestimmung von AAMA, GAMA, 3-HPMA und CEMA

Die Bestimmung von AAMA, GAMA, 3-HPMA und CEMA erfolgte wie in Kapitel 6.5.1.1.8 beschrieben. Den aufgetauten Urinproben der *in vivo* Studie wurden 2 ml Urin entnommen und mit 6 ml Ammoniumformiat-Puffer (50 mM) versetzt. Danach wurden die stabilisotopenmarkierten Standardverbindungen (AAMA: $c = 10 \mu\text{g/ml}$, $V = 20 \mu\text{l}$; GAMA: $c = 12,9 \mu\text{g/ml}$, $V = 20 \mu\text{l}$; 3-HPMA: $c = 10 \mu\text{g/ml}$, $V = 10 \mu\text{l}$; CEMA: $c = 10 \mu\text{g/ml}$, $V = 10 \mu\text{l}$) zugegeben. Anschließend wurden die Proben auf pH 2-3 durch Zugabe von 4 N Salzsäure eingestellt und mittels SPE aufgereinigt und aufkonzentriert (Vergleich: Kapitel 6.5.1.1.8). Die Messung der MA erfolgte anhand der in den Kapiteln 6.4.2.1.1 und 6.4.2.1.2 beschriebenen Methoden mittels HPLC-ESI-MS/MS.

6.6.2.3 Bestimmung von Kreatinin

Da die Ausscheidung von Kreatinin unabhängig von der Bildung des Primärharns ist, lässt es sich als Bezugsgröße von im Urin bestimmten Biomarkern, wie die MA, heranziehen. Die Bestimmung des Kreatinins im Urin erfolgte im Rahmen dieser Arbeit mittels HPLC-ESI-MS unter Verwendung der SIVA. Die Etablierung der entsprechenden analytischen Methode und die verwendeten Kalibriergeraden sind in Kapitel 6.4 aufgeführt.

Die Probenvorbereitung erfolgte durch Verdünnung der aufgetauten Urinproben (1:1000) und Versetzen mit D₃-Kreatinin ($V = 10 \mu\text{l}$; $c = 100 \mu\text{g/ml}$). Sämtliche in der vorliegenden Arbeit bestimmten Kreatininwerte wurden unter Verwendung dieser Methode bestimmt.

6.6.3 Bestimmung der Ausscheidungskinetik von Acrolein und Acrylamid im Menschen nach Aufnahme von selbst hergestellten Kartoffelchips

6.6.3.1 Durchführung der Studie

Im Rahmen der humanen Verzehrsstudie „Bedeutung der CYP450 2E1-Aktivität für die Toxikokinetik von Acrylamid beim Menschen“ (Studien-Nr. KPUK-03-ACR/PIL-01) wurde in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Uwe Fuhr vom Institut für Pharmakologie der Universität Köln die Ausscheidungskinetik der Mercaptursäuren von Acrylamid und Glycidamid im Vergleich zu Acrolein im Urin nach Aufnahme Acrylamid-reicher Nahrung (Kartoffelchips) untersucht. Das Ziel dieser Studie war es, die Rolle der CYP450 2E1-Aktivität bei der Toxikokinetik von Acrylamid beim Menschen zu charakterisieren und daneben sollten Informationen zur Bedeutung der Glutathion-S-Transferasen beim Phase-II-Metabolismus von Acrylamid und Glycidamid gewonnen werden. In dieser Studie wurde der Konzentrations-Zeit-Verlauf von Acrylamid und seinen Metaboliten Glycidamid, AAMA und GAMA in Plasma und Urin, sowie von den Hämoglobin-Addukten nach Gabe von Kartoffelchips jeweils bei unbeeinflusster (R-Phase), gehemmter (T1-Phase) und induzierter (T2-Phase) CYP450 2E1-Aktivität bestimmt. Des Weiteren wurde der Einfluss genetischer Varianten für CYP450 2E1 und Glutathion-S-Transferasen auf den Acrylamidmetabolismus nach vorhergehender Phänotypisierung untersucht (P-Phase).

Für die Studie wurden 16 gesunde kaukasische Probanden (8 Männer; 8 Frauen) im Alter von 20-45 Jahren ($29,8 \pm 5,9$ Jahre) mit einem BMI von $22,9 \pm 2,0$ kg/m² rekrutiert. Der Studienplan sah vor, dass die Probanden 72 Stunden vor bis 48 Stunden nach einer Studienphase auf Acrylamid-reiche und Methylxanthin-haltige Lebensmittel sowie Alkohol und jegliche Komedikation verzichteten. Die Probanden wurden 11 Stunden vor jeder Studienphase bis 24 Stunden im Anschluss stationär aufgenommen. Während des stationären Aufenthalts erfolgte eine standardisierte Nahrungs- und Flüssigkeitsaufnahme. Das Studienprotokoll sah vor, dass 11 Stunden vor bis 6 Stunden nach Aufnahme der Kartoffelchips gefastet werden sollte. Zusätzlich sollte 1 Stunde vor bis 6 Stunden nach der Aufnahme der Chips keine Flüssigkeit aufgenommen werden und die Flüssigkeitsaufnahme wurde bis 72 Stunden nach Administration auf maximal 3 Liter beschränkt. Die gesamte klinische Studie wurde in Form eines offenen, monozentrischen und randomisierten „change-over“ Designs durchgeführt. Zwischen den einzelnen Studienphasen erfolgte jeweils eine 14-tägige Auswaschphase.

In den drei Studienphasen R, T1 und T2 wurden den Probanden 957-1000 µg Acrylamid (14,8 µg/kg KG) über Kartoffelchips (150 g, 6230 ± 990 µg Acrylamid/kg) in Verbindung mit

240 ml Trinkwasser mit oder ohne Komedikation zur Bestimmung der Toxikokinetik von Acrylamid verabreicht.

In der P-Phase wurde den Probanden das CYP450 2E1-Substrat Chlorzoxazon zur Bestimmung der CYP450 2E1-Aktivität verabreicht. Die Hemmung der CYP450 2E1-Aktivität erfolgte durch einmalige orale Gabe von 500 mg Disulfiram (Antabus® 0,5 Dispergetten) 10 Stunden vor Aufnahme der Kartoffelchips. Zur CYP450 2E1-Induktion tranken die Probanden über einen Zeitraum von 7 Tagen jeweils abends ca. 48 ml Ethanol in Form von Bier (Reissdorf Kölsch, Privatbrauerei Heinrich Reissdorf & Co). Zur Bestimmung der Mercaptursäuren wurden in der R-Phase, T1-Phase und T2-Phase jeweils vor Aufnahme (vor Aufnahme) der Kartoffelchips sowie in den Zeiträumen 0-2, 2-4, 4-6, 6-8, 8-10, 10-12, 12-16, 16-24, 24-36, 36-48 und 48-72 Stunden nach Aufnahme Urinproben gesammelt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Mercaptursäuren von Acrylamid (AAMA), Glycidamid (GAMA) und Acrolein (3-HPMA) im Urin von 13 Probanden der R-Phase zu den angegebenen Zeitpunkten mittels HPLC-ESI-MS/MS untersucht.

6.6.3.2 Bestimmung von AAMA, GAMA und 3-HPMA

Die Bestimmung der MA erfolgte analog zu Kapitel 6.6.1.4.

6.6.4 Bestimmung der Ausscheidungskinetik von Acrolein und Acrylamid im Menschen nach Aufnahme von kommerziell erhältlichen Kartoffelchips

6.6.4.1 Durchführung der Studie

Um die Ergebnisse der Studie aus Kapitel 6.6.2.2 zu bestätigen wurde im Rahmen einer kleinen Humanstudie unter ähnlichen Studienbedingungen erneut eine Intervention durchgeführt. Hierbei wurden im Gegensatz zur vorherigen Studie kommerziell erhältliche Kartoffelchips mit einem Acrylamidgehalt von $249 \pm 12 \mu\text{g}/\text{kg}$ verwendet. Der Acroleingehalt wurde von Dr. Michael Granvogl an der Universität München nach der Methode von Ewert und Mitarbeiter mittels Headspace-GC-MS durch bestimmt und betrug $26,5 \pm 2,1 \mu\text{g}/\text{kg}$ [Ewert *et al.*, 2011].

Für die Studie wurden fünf gesunde männliche kaukasische Probanden im Alter von 20-45 Jahren ($28,8 \pm 4,1$ Jahre) mit einem BMI von $23,1 \pm 2,1 \text{ kg}/\text{m}^2$ rekrutiert. Der Studienplan (Bearbeitungsnummer Ethikkommission Rheinland-Pfalz: 837.445.11 (7987)) sah vor, dass

die Probanden elf Stunden vor jeder Studienphase bis sechs Stunden im Anschluss auf Nahrungsaufnahme verzichteten. Im Allgemeinen waren die Probanden angehalten 48 Stunden vor bis 24 Stunden nach der Studie die Aufnahme von gebratenen oder trocken erhitzten Lebensmittel vermied, um die Hintergrundbelastung an Acrolein und Acrylamid so gering wie möglich zu halten. Während der Studienphase erfolgte eine standardisierte Nahrungs- und Flüssigkeitsaufnahme. Die Flüssigkeitsaufnahme wurde bis 24 Stunden nach Administration auf maximal drei Liter beschränkt.

Zur Bestimmung der Mercaptursäuren wurde jeweils vor Aufnahme (vor Aufnahme) der kommerziell erhältlichen Kartoffelchips sowie in den Zeiträumen 0-2, 2-4, 4-6, 6-8, 8-12 und 12-24 Stunden nach Aufnahme Urinproben gesammelt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Mercaptursäuren von Acrylamid (AAMA), Glycidamid (GAMA) und Acrolein (3-HPMA und CEMA) im Urin der Probanden mittels HPLC-ESI-MS/MS untersucht.

6.6.4.2 Bestimmung von AAMA, GAMA, 3-HPMA und CEMA

Die Bestimmung der MA erfolgte analog zu Kapitel 6.6.2.2.

7 Literaturverzeichnis

- Abraham, K., Andres, S., Palavinskas, R., Berg, K., Appel, K. E. & Lampen, A. (2011) Toxicology and risk assessment of acrolein in food. *Mol Nutr Food Res.* 55, 1277-1290.
- ABSciex (2008) API 3200/4000/5000 LC-MS/MS System Basic Training, Darmstadt.
- Aitio, A. & Kallio, A. (1999) Exposure and effect monitoring: a critical appraisal of their practical application. *Toxicol Lett.* 108, 137-147.
- Anderson, M. M., Hazen, S. L., Hsu, F. F. & Heinecke, J. W. (1997) Human neutrophils employ the myeloperoxidase-hydrogen peroxide-chloride system to convert hydroxy-amino acids into glycolaldehyde, 2-hydroxypropanal, and acrolein. A mechanism for the generation of highly reactive alpha-hydroxy and alpha,beta-unsaturated aldehydes by phagocytes at sites of inflammation. *J Clin Invest.* 99, 424-432.
- Ayers, P. W., Parr, R. G. & Pearson, R. G. (2006) Elucidating the hard/soft acid/base principle: a perspective based on half-reactions. *J Chem Phys.* 124, 194107.
- Barlow, S., Renwick, A. G., Kleiner, J., Bridges, J. W., Busk, L., Dybing, E., Edler, L., Eisenbrand, G., Fink-Gremmels, J., Knaap, A., Kroes, R., Liem, D., Muller, D. J., Page, S., Rolland, V., Schlatter, J., Tritscher, A., Tueting, W. & Wurtzen, G. (2006) Risk assessment of substances that are both genotoxic and carcinogenic report of an International Conference organized by EFSA and WHO with support of ILSI Europe. *Food Chem Toxicol.* 44, 1636-1650.
- 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, R. N., Thielen, S. & Eisenbrand, G. (2008) Genotoxicity of glycidamide in comparison to 3-N-nitroso-oxazolidin-2-one. *J Agric Food Chem.* 56, 5989-5993.

- Becalski, A., Lau, B. P., Lewis, D. & Seaman, S. W. (2003) Acrylamide in foods: occurrence, sources, and modeling. *J Agric Food Chem.* 51, 802-808.
- Berger, F. I. (2010) Metabolismus und Bioverfügbarkeit der Lebensmittelkontaminante Acrylamid in Ratte und Mensch. Dissertation, Technische Universität Kaiserslautern, Kaiserslautern.
- Berger, F. I., Feld, J., Bertow, D., Eisenbrand, G., Fricker, G., Gerhardt, N., Merz, K. H., Richling, E. & Baum, M. (2011) Biological effects of acrylamide after daily ingestion of various foods in comparison to water: a study in rats. *Mol Nutr Food Res.* 55, 387-399.
- Bergmark, E., Calleman, C. J., He, F. & Costa, L. G. (1993) Determination of hemoglobin adducts in humans occupationally exposed to acrylamide. *Toxicol Appl Pharmacol.* 120, 45-54.
- Besaratinia, A. & Pfeifer, G. P. (2005) DNA adduction and mutagenic properties of acrylamide. *Mutat Res.* 580, 31-40.
- Boettcher, M. I. & Angerer, J. (2005) Determination of the major mercapturic acids of acrylamide and glycidamide in human urine by LC-ESI-MS/MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 824, 283-294.
- Boettcher, M. I., Bolt, H. M., Drexler, H. & Angerer, J. (2006) Excretion of mercapturic acids of acrylamide and glycidamide in human urine after single oral administration of deuterium-labelled acrylamide. *Arch Toxicol.* 80, 55-61.
- Böhm, N. (2011) persönliche Mitteilung, Kaiserslautern.
- Bolger, P. M., Leblanc, J. C. & Setzer, R. W. (2010) Application of the Margin of Exposure (MoE) approach to substances in food that are genotoxic and carcinogenic. Example: Acrylamide (CAS No. 79-06-1). *Food Chem Toxicol.* 48 Suppl 1, S25-33.
- Boysen, G., Pachkowski, B. F., Nakamura, J. & Swenberg, J. A. (2009) The formation and biological significance of N7-guanine adducts. *Mutat Res.* 678, 76-94.

- Brown, T. A. (1996) *Gentechnologie für Einsteiger. 2. Auflage*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 298.
- BVL (2010) Ergebnisse der 8. Signalwert-Berechnung mit statistischen Kennzahlen, Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, www.bvl.bund.de.
- Calleman, C. J., Bergmark, E., Stern, L. G. & Costa, L. G. (1993) A nonlinear dosimetric model for hemoglobin adduct formation by the neurotoxic agent acrylamide and its genotoxic metabolite glycidamide. *Environ Health Perspect.* 99, 221-223.
- Cammann, K. (2001) *Instrumentelle Analytische Chemie. 1. Auflage*, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, 664.
- Carmella, S. G., Chen, M., Zhang, Y., Zhang, S., Hatsukami, D. K. & Hecht, S. S. (2007) Quantitation of acrolein-derived (3-hydroxypropyl)mercapturic acid in human urine by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry: effects of cigarette smoking. *Chem Res Toxicol.* 20, 986-990.
- Chen, H. J. & Lin, W. P. (2009) Simultaneous quantification of 1,N2-propano-2'-deoxyguanosine adducts derived from acrolein and crotonaldehyde in human placenta and leukocytes by isotope dilution nanoflow LC nanospray ionization tandem mass spectrometry. *Anal Chem.* 81, 9812-9818.
- Chen, L., Wang, M., Villalta, P. W. & Hecht, S. S. (2007) Liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry analysis of 7-ethylguanine in human liver DNA. *Chem Res Toxicol.* 20, 1498-1502.
- Cheng, G., Wang, M., Villalta, P. W. & Hecht, S. S. (2010) Detection of 7-(2'-carboxyethyl)guanine but not 7-carboxymethylguanine in human liver DNA. *Chem Res Toxicol.* 23, 1089-1096.
- Cohen, S. M., Garland, E. M., St John, M., Okamura, T. & Smith, R. A. (1992) Acrolein initiates rat urinary bladder carcinogenesis. *Cancer Res.* 52, 3577-3581.
- Collin, S., Osman, M., Delcambre, S., El-Zayat, A. I. & Dufour, J.-P. (1993) Investigation of volatile flavor compounds in fresh and ripened Domiati cheeses. *J. Agric. Food Chem.* 41, 1659-1663.

- David, H. (1979) Quantitative and qualitative changes in the mitochondria in hepatocytes during postnatal development of male rats. *Exp Pathol (Jena)*. 17, 359-373.
- De Bont, R. & van Larebeke, N. (2004) Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data. *Mutagenesis*. 19, 169-185.
- de los Santos, C., Zaliznyak, T. & Johnson, F. (2001) NMR characterization of a DNA duplex containing the major acrolein-derived deoxyguanosine adduct gamma-OH-1,-N2-propano-2'-deoxyguanosine. *J Biol Chem*. 276, 9077-9082.
- DeWoskin, R. S., Greenberg, M., Pepelko, P. & Strickland, J. (2003) Toxicological Review of Acrolein, US Environmental Protection Agency, Washington, D.C.
- Ding, Y. S., Blount, B. C., Valentin-Blasini, L., Applewhite, H. S., Xia, Y., Watson, C. H. & Ashley, D. L. (2009) Simultaneous determination of six mercapturic acid metabolites of volatile organic compounds in human urine. *Chem Res Toxicol*. 22, 1018-1025.
- Doerge, D. R., da Costa, G. G., McDaniel, L. P., Churchwell, M. I., Twaddle, N. C. & Beland, F. A. (2005a) DNA adducts derived from administration of acrylamide and glycidamide to mice and rats. *Mutat Res*. 580, 131-141.
- Doerge, D. R., Twaddle, N. C., Boettcher, M. I., McDaniel, L. P. & 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, 34-42.
- Doerge, D. R., Young, J. F., McDaniel, L. P., Twaddle, N. C. & Churchwell, M. I. (2005b) Toxicokinetics of acrylamide and glycidamide in Fischer 344 rats. *Toxicol Appl Pharmacol*. 208, 199-209.
- Doroshenko, O., Fuhr, U., Kunz, D., Frank, D., Kinzig, M., Jetter, A., Reith, Y., Lazar, A., Taubert, D., Kirchheiner, J., Baum, M., Eisenbrand, G., Berger, F. I., Bertow, D., Berkessel, A., Sorgel, F., Schomig, E. & Tomalik-Scharte, D. (2009) In vivo role of cytochrome P450 2E1 and glutathione-S-transferase activity for acrylamide toxicokinetics in humans. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 18, 433-443.
- Durling, L. J. & Abramsson-Zetterberg, L. (2005) A comparison of genotoxicity between three common heterocyclic amines and acrylamide. *Mutat Res*. 580, 103-110.

- Eisenbrand, G., Metzler, M. & Hennecke, F. J. (2005) Toxikologie für Naturwissenschaftler. 3. Auflage, Wiley-VCH, Weinheim, 376.
- Eisenbrand, G. & Schreier, P. (2006) RÖMPP Lexikon Lebensmittelchemie. 2. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1300.
- Epe, B. (2002) Role of endogenous oxidative DNA damage in carcinogenesis: what can we learn from repair-deficient mice? *Biol Chem.* 383, 467-475.
- Esterbauer, H., Schaur, R. J. & Zollner, H. (1991) Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med.* 11, 81-128.
- Ewert, A., Granvogl, M. & Schieberle, P. (2011) Development of two stable isotope dilution assays for the quantitation of acrolein in heat-processed fats. *J Agric Food Chem.* 59, 3582-3589.
- Farmer, P. (2008) Significance for risk assessment of increases in background levels of carcinogen-derived protein and DNA adducts. *Toxicol Lett.* 180, S24-S24.
- Farmer, P. B. (2004) DNA and protein adducts as markers of genotoxicity. *Toxicol Lett.* 149, 3-9.
- Feld, J. (2010) Charakterisierung der DNA-schädigenden Wirkung von Acrylamid in Lebensmitteln am Modell der Ratte, Dissertation. Technische Universität Kaiserslautern, Kaiserslautern.
- Feng, Z., Hu, W., Hu, Y. & Tang, M. S. (2006) Acrolein is a major cigarette-related lung cancer agent: Preferential binding at p53 mutational hotspots and inhibition of DNA repair. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103, 15404-15409.
- Fennell, T. R. & Friedman, M. A. (2005) Comparison of acrylamide metabolism in humans and rodents. *Adv Exp Med Biol.* 561, 109-116.
- Fennell, T. R., Sumner, S. C., Snyder, R. W., Burgess, J., Spicer, R., Bridson, W. E. & Friedman, M. A. (2005) Metabolism and hemoglobin adduct formation of acrylamide in humans. *Toxicol Sci.* 85, 447-459.

- Feron, V. J., Til, H. P., de Vrijer, F., Woutersen, R. A., Cassee, F. R. & van Bladeren, P. J. (1991) Aldehydes: occurrence, carcinogenic potential, mechanism of action and risk assessment. *Mutat Res.* 259, 363-385.
- Field, E. A., Price, C. J., Sleet, R. B., Marr, M. C., Schwetz, B. A. & Morrissey, R. E. (1990) Developmental toxicity evaluation of acrylamide in rats and mice. *Fundam Appl Toxicol.* 14, 502-512.
- Foiles, P. G., Akerkar, S. A., Miglietta, L. M. & Chung, F. L. (1990) Formation of cyclic deoxyguanosine adducts in Chinese hamster ovary cells by acrolein and crotonaldehyde. *Carcinogenesis.* 11, 2059-2061.
- Forth, W., Henschler, D., Rummel, W. & Starke, K. (1996) Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 7. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 1258.
- Friedberg, E. C., Walker, G. C., Siede, W., Wood, R. D., Schulz, R. A. & Ellenberger, T. (2005) DNA Repair and Mutagenesis Vol. 2, ASM Press, New York, 1118.
- Friedman, M. (2003) Chemistry, biochemistry, and safety of acrylamide. A review. *J Agric Food Chem.* 51, 4504-4526.
- Friedman, M. A., Dulak, L. H. & Stedham, M. A. (1995) A lifetime oncogenicity study in rats with acrylamide. *Fundam Appl Toxicol.* 27, 95-105.
- Fu, P. P., Chou, M. W., Churchwell, M., Wang, Y., Zhao, Y., Xia, Q., Gamboa da Costa, G., Marques, M. M., Beland, F. A. & Doerge, D. R. (2010) High-performance liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry for the detection and quantitation of pyrrolizidine alkaloid-derived DNA adducts in vitro and in vivo. *Chem Res Toxicol.* 23, 637-652.
- Fuhr, U., Boettcher, M. I., 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.

- Galliani, G. & Pantarotto, C. (1983) The reaction of guanosine and 2'-deoxyguanosine with acrolein. *Tetrahedron Letters*. 24, 4491-4492.
- Gamboa da Costa, G., Churchwell, M. I., Hamilton, L. P., Von Tungeln, L. S., Beland, F. A., Marques, M. M. & Doerge, D. R. (2003) DNA adduct formation from acrylamide via conversion to glycidamide in adult and neonatal mice. *Chem Res Toxicol*. 16, 1328-1337.
- Gates, K. S., Nooner, T. & Dutta, S. (2004) Biologically relevant chemical reactions of N7-alkylguanine residues in DNA. *Chem Res Toxicol*. 17, 839-856.
- Gertz, C. S. K. (2002) Analysis of acrylamide und mechanisms of its formation in deep-fried products. *Eur J Lipid Sci Technol*. 104, 762-771.
- Ghanayem, B. I., McDaniel, L. P., Churchwell, M. I., Twaddle, N. C., Snyder, R., Fennell, T. R. & Doerge, D. R. (2005) Role of CYP2E1 in the epoxidation of acrylamide to glycidamide and formation of DNA and hemoglobin adducts. *Toxicol Sci*. 88, 311-318.
- Giannerini, F., Giustarini, D., Lusini, L., Rossi, R. & Di Simplicio, P. (2001) Responses of thiols to an oxidant challenge: differences between blood and tissues in the rat. *Chem Biol Interact*. 134, 73-85.
- Glatt, H., Schneider, H. & Liu, Y. (2005) V79-hCYP2E1-hSULT1A1, a cell line for the sensitive detection of genotoxic effects induced by carbohydrate pyrolysis products and other food-borne chemicals. *Mutat Res*. 580, 41-52.
- Gomes, R., Meek, M. E. & Eggleton, M. (2002) Concise International Chemical Assessment Document No. 43, World Health Organization, Geneva, Switzerland, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 49.
- Gottwald, W. (1992) RP-HPLC für Anwender. Vol. 1. Auflage, Wiley-VCH.
- Groopman, J. D., Wogan, G. N., Roebuck, B. D. & Kensler, T. W. (1994) Molecular biomarkers for aflatoxins and their application to human cancer prevention. *Cancer Res*. 54, 1907s-1911s.

- Gutierrez-Espeleta, G. A., Hughes, L. A., Piegorsch, W. W., Shelby, M. D. & Generoso, W. M. (1992) Acrylamide: dermal exposure produces genetic damage in male mouse germ cells. *Fundam Appl Toxicol.* 18, 189-192.
- Harris, C. C. (1991) Chemical and physical carcinogenesis: advances and perspectives for the 1990s. *Cancer Res.* 51, 5023s-5044s.
- Hashimoto, K. & Tanii, H. (1985) Mutagenicity of acrylamide and its analogues in *Salmonella typhimurium*. *Mutat Res.* 158, 129-133.
- Hashmi, M., Vamvakas, S. & Anders, M. W. (1992) Bioactivation mechanism of S-(3-oxopropyl)-N-acetyl-L-cysteine, the mercapturic acid of acrolein. *Chem Res Toxicol.* 5, 360-365.
- Hobson, W. (1939) Urinary output of creatine and creatinine associated with physical exercise, and its relationship to carbohydrate metabolism. *Biochem J.* 33, 1425-1431.
- IARC (1994) IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Some Industrial Chemicals, In IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Lyon, 568, www.monographs.iarc.fr.
- IARC (1995) Acrolein. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans.* 63, 337-372, www.monographs.iarc.fr.
- Irwin, R. D. (2006) NTP Technical Report on the comparative toxicity studies of allyl acetate (CAS No. 591-87-7), allyl alcohol (CAS No. 107-18-6) and acrolein (CAS No. 107-02-8) administered by gavage to F344/N rats and B6C3F1 mice. *Toxic Rep Ser.* 1-73, A71-H10.
- Jarabek, A. M., Pottenger, L. H., Andrews, L. S., Casciano, D., Embry, M. R., Kim, J. H., Preston, R. J., Reddy, M. V., Schoeny, R., Shuker, D., Skare, J., Swenberg, J., Williams, G. M. & Zeiger, E. (2009) Creating context for the use of DNA adduct data in cancer risk assessment: I. Data organization. *Crit Rev Toxicol.* 39, 659-678.
- JECFA (2010) Summary report of the seventy-second meeting of JECFA, In 72. meeting, JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES, Rome, 1-12.

- Jeong, Y. C., Nakamura, J., Upton, P. B. & Swenberg, J. A. (2005) Pyrimido[1,2-a]-purin-10(3H)-one, M1G, is less prone to artifact than base oxidation. *Nucleic Acids Res.* 33, 6426-6434.
- Johansson, F., Lundell, T., Rydberg, P., Erixon, K. & Jenssen, D. (2005) Mutagenicity and DNA repair of glycidamide-induced adducts in mammalian cells. *Mutat Res.* 580, 81-89.
- Johnson, K. A., Gorzinski, S. J., Bodner, K. M., Campbell, R. A., Wolf, C. H., Friedman, M. A. & Mast, R. W. (1986) Chronic toxicity and oncogenicity study on acrylamide incorporated in the drinking water of Fischer 344 rats. *Toxicol Appl Pharmacol.* 85, 154-168.
- Kim, S. I., Pfeifer, G. P. & Besaratinia, A. (2007) Lack of mutagenicity of acrolein-induced DNA adducts in mouse and human cells. *Cancer Res.* 67, 11640-11647.
- Klesen, K. (2010) Entwicklung von Methoden zur Bestimmung von Acrolein-DNA-Addukten in biologischen Proben. Diplomarbeit, Technische Universität Kaiserslautern, Kaiserslautern.
- Konsue, N. & Ioannides, C. (2008) Tissue differences in the modulation of rat cytochromes P450 and phase II conjugation systems by dietary doses of phenethyl isothiocyanate. *Food Chem Toxicol.* 46, 3677-3683.
- Kopp, E. K. & Dekant, W. (2009) Toxicokinetics of acrylamide in rats and humans following single oral administration of low doses. *Toxicol Appl Pharmacol.* 235, 135-142.
- Kromidas, S. (2006) HPLC richtig optimiert. Wiley-VCH, Weinheim, 786.
- Kunz, C., Saito, Y. & Schar, P. (2009) DNA Repair in mammalian cells: Mismatched repair: variations on a theme. *Cell Mol Life Sci.* 66, 1021-1038.
- Kurebayashi, H. & Ohno, Y. (2006) Metabolism of acrylamide to glycidamide and their cytotoxicity in isolated rat hepatocytes: protective effects of GSH precursors. *Arch Toxicol.* 80, 820-828.

- La, D. K. & Swenberg, J. A. (1997) Carcinogenic alkylation agents. *Vol. 12*, Pergamon Press, Oxford, 111-140.
- Lane, R. H. & Smathers, J. L. (1991) Monitoring aldehyde production during frying by reversed-phase liquid chromatography. *J Assoc Off Anal Chem.* 74, 957-960.
- Langley-Evans, S. C., Phillips, G. J. & Jackson, A. A. (1996) Sulphur dioxide: a potent glutathione depleting agent. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol.* 114, 89-98.
- Li, J. & Ho, C. T. (2005) Generation of aldehydes from maillard reaction of glucose and amino acids. *Special Publication - Royal Society of Chemistry.* 300, 213-218.
- Li, L., Jiang, L., Geng, C., Cao, J. & Zhong, L. (2008) The role of oxidative stress in acrolein-induced DNA damage in HepG2 cells. *Free Radic Res.* 42, 354-361.
- Lindl, T. (2002) Zell- und Gewebekultur. 5. Auflage, überarbeitete und erweiterte Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 316.
- Linhart, I., Frantik, E., Vodickova, L., Vosmanska, M., Smejkal, J. & Mitera, J. (1996) Biotransformation of acrolein in rat: excretion of mercapturic acids after inhalation and intraperitoneal injection. *Toxicol Appl Pharmacol.* 136, 155-160.
- Liu, X. Y., Zhu, M. X. & Xie, J. P. (2010) Mutagenicity of acrolein and acrolein-induced DNA adducts. *Toxicol Mech Methods.* 20, 36-44.
- MacDougall, D. & Crummett, W. B. (1980) Guidelines for data acquisition and data quality evaluation in environmental chemistry. *Analytical Chemistry.* 52, 2242-2249.
- Marquardt, H. & Schäfer, S. (2008) Lehrbuch der Toxikologie. 2. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 318.
- Marsden, D. A., Jones, D. J., Lamb, J. H., Tompkins, E. M., Farmer, P. B. & Brown, K. (2007) Determination of endogenous and exogenously derived N7-(2-hydroxyethyl)guanine adducts in ethylene oxide-treated rats. *Chem Res Toxicol.* 20, 290-299.

- Martins, C., Oliveira, N. G., Pingarilho, M., Gamboa da Costa, G., Martins, V., Marques, M. M., Beland, F. A., Churchwell, M. I., Doerge, D. R., Rueff, J. & Gaspar, J. F. (2007) Cytogenetic damage induced by acrylamide and glycidamide in mammalian cells: correlation with specific glycidamide-DNA adducts. *Toxicol Sci.* 95, 383-390.
- Miller, M. J., Carter, D. E. & Sipes, I. G. (1982) Pharmacokinetics of acrylamide in Fisher-344 rats. *Toxicol Appl Pharmacol.* 63, 36-44.
- Minko, I. G., Kozekov, I. D., Kozekova, A., Harris, T. M., Rizzo, C. J. & Lloyd, R. S. (2008) Mutagenic potential of DNA-peptide crosslinks mediated by acrolein-derived DNA adducts. *Mutat Res.* 637, 161-172.
- Nath, R. G. & Chung, F. L. (1994) Detection of exocyclic 1,N2-propanodeoxyguanosine adducts as common DNA lesions in rodents and humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91, 7491-7495.
- Nestmann, E. R., Bryant, D. W. & Carr, C. J. (1996) Toxicological significance of DNA adducts: summary of discussions with an expert panel. *Regul Toxicol Pharmacol.* 24, 9-18.
- NTP (2006) Technical Report on the comparative toxicity studies of allyl acetate, allyl alcohol, and acrolein. Administered by Gavage to F344/N Rats and B6C3F1 Mice. (Services, N. I. o. H. P. H., Ed.), U.S. Department of Health and Human Services. *Tox. Rep. Ser.* 48, 1-73
- Osorio, V. M. & de Lourdes Cardeal, Z. (2011) Determination of acrolein in french fries by solid-phase microextraction gas chromatography and mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 1218, 3332-3336.
- Pan, J. & Chung, F. L. (2002) Formation of cyclic deoxyguanosine adducts from omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids under oxidative conditions. *Chem Res Toxicol.* 15, 367-372.
- Panosyan, A. G., Mamikonyan, G. V., Torosyan, M. & Gabrielyan, E. S. (2001) Determination of the composition of volatiles in cognac (brandy) by headspace gas chromatography-mass spectrometry. *J. Anal. Chem.* 56, 945-952.

- Parent, R. A., Caravello, H. E., Christian, M. S. & Hoberman, A. M. (1993) Developmental toxicity of acrolein in New Zealand white rabbits. *Fundam Appl Toxicol.* 20, 248-256.
- Parent, R. A., Caravello, H. E. & Harbell, J. W. (1991) Gene mutation assay of acrolein in the CHO/HGPRT test system. *J Appl Toxicol.* 11, 91-95.
- Parent, R. A., Caravello, H. E. & Long, J. E. (1992) Two-year toxicity and carcinogenicity study of acrolein in rats. *J Appl Toxicol.* 12, 131-139.
- Parent, R. A., Caravello, H. E. & Sharp, D. E. (1996) Metabolism and distribution of [2,3-14C]acrolein in Sprague-Dawley rats. *J Appl Toxicol.* 16, 449-457.
- Parent, R. A., Paust, D. E., Schrimpf, M. K., Talaat, R. E., Doane, R. A., Caravello, H. E., Lee, S. J. & Sharp, D. E. (1998) Metabolism and distribution of [2,3-14C]acrolein in Sprague-Dawley rats. II. Identification of urinary and fecal metabolites. *Toxicol Sci.* 43, 110-120.
- Patel, J. M., Wood, J. C. & Leibman, K. C. (1980) The biotransformation of allyl alcohol and acrolein in rat liver and lung preparations. *Drug Metab Dispos.* 8, 305-308.
- Paulsson, B., Athanassiadis, I., Rydberg, P. & Tornqvist, M. (2003) Hemoglobin adducts from glycidamide: acetonization of hydrophilic groups for reproducible gas chromatography/tandem mass spectrometric analysis. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 17, 1859-1865.
- Pawlowicz, A. J., Munter, T., Zhao, Y. & Kronberg, L. (2006) Formation of acrolein adducts with 2'-deoxyadenosine in calf thymus DNA. *Chem Res Toxicol.* 19, 571-576.
- Pottenger, L. H., Carmichael, N., Banton, M. I., Boogaard, P. J., Kim, J., Kirkland, D., Phillips, R. D., van Benthem, J., Williams, G. M. & Castrovinci, A. (2009) ECETOC workshop on the biological significance of DNA adducts: Summary of follow-up from an Expert Panel Meeting. *Mutat Res.* 678, 152-157.
- Pottenger, L. H. & Gollapudi, B. B. (2010) Genotoxicity testing: moving beyond qualitative "screen and bin" approach towards characterization of dose-response and thresholds. *Environ Mol Mutagen.* 51, 792-799.

- Puppel, N., Tjaden, Z., Fueller, F. & Marko, D. (2005) DNA strand breaking capacity of acrylamide and glycidamide in mammalian cells. *Mutat Res.* 580, 71-80.
- Routledge, M. N., McLuckie, K. I., Jones, G. D., Farmer, P. B. & Martin, E. A. (2001) Presence of benzo[a]pyrene diol epoxide adducts in target DNA leads to an increase in UV-induced DNA single strand breaks and supF gene mutations. *Carcinogenesis.* 22, 1231-1238.
- Rychlik, M. & Asam, S. (2008) Stable isotope dilution assays in mycotoxin analysis. *Anal Bioanal Chem.* 390, 617-628.
- Sanchez, A. M., Minko, I. G., Kurtz, A. J., Kanuri, M., Moriya, M. & Lloyd, R. S. (2003) Comparative evaluation of the bioreactivity and mutagenic spectra of acrolein-derived alpha-HOPdG and gamma-HOPdG regioisomeric deoxyguanosine adducts. *Chem Res Toxicol.* 16, 1019-1028.
- Sander, M., Cadet, J., Casciano, D. A., Galloway, S. M., Marnett, L. J., Novak, R. F., Pettit, S. D., Preston, R. J., Skare, J. A., Williams, G. M., Van Houten, B. & Gollapudi, B. B. (2005) Proceedings of a workshop on DNA adducts: biological significance and applications to risk assessment Washington, DC, April 13-14, 2004. *Toxicol Appl Pharmacol.* 208, 1-20.
- Sanduja, R., Ansari, G. A. & Boor, P. J. (1989) 3-Hydroxypropylmercapturic acid: a biologic marker of exposure to allylic and related compounds. *J Appl Toxicol.* 9, 235-238.
- SCF (2002) Opinion of the Scientific Committee on Food on new findings regarding the presence of acrylamide in food, (Commission, E., Ed.); http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/index_en.html, 1-16
- Scharer, O. D. (2003) Chemistry and biology of DNA repair. *Angew Chem Int Ed Engl.* 42, 2946-2974.
- Scherbl, D. (2011) Entwicklung von Methoden zur Bestimmung von AA- und GA-Glutathion-Addukten in biologischen Proben. Diplomarbeit, Technische Universität Kaiserslautern, Kaiserslautern.

- Schettgen, T., Musiol, A. & Kraus, T. (2008) Simultaneous determination of mercapturic acids derived from ethylene oxide (HEMA), propylene oxide (2-HPMA), acrolein (3-HPMA), acrylamide (AAMA) and N,N-dimethylformamide (AMCC) in human urine using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 22, 2629-2638.
- Schettgen, T., Rossbach, B., Kutting, B., Letzel, S., Drexler, H. & Angerer, J. (2004) 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.
- Schmidt, B. F. (1989) Die Synthese Steroid-verknüpfter Derivate des Cyclophosphamids und Untersuchungen zu ihrem Verhalten in biologischen Systemen, In Chemistry, University of Kaiserslautern, Kaiserslautern.
- Schug, M., Heise, T., Bauer, A., Storm, D., Blaszkewicz, M., Bedawy, E., Brulport, M., Geppert, B., Hermes, M., Follmann, W., Rapp, K., Maccoux, L., Schormann, W., Appel, K. E., Oberemm, A., Gundert-Remy, U. & Hengstler, J. G. (2008) Primary rat hepatocytes as in vitro system for gene expression studies: comparison of sandwich, Matrigel and 2D cultures. *Arch Toxicol.* 82, 923-931.
- Schwobel, J. A., Wondrousch, D., Koleva, Y. K., Madden, J. C., Cronin, M. T. & Schuurmann, G. (2010) Prediction of Michael-Type Acceptor Reactivity toward Glutathione. *Chem Res Toxicol.* 23, 1576–1585.
- Segerback, D., Calleman, C. J., Schroeder, J. L., Costa, L. G. & Faustman, E. M. (1995) Formation of N-7-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)guanine in DNA of the mouse and the rat following intraperitoneal administration of [14C]acrylamide. *Carcinogenesis.* 16, 1161-1165.
- Shuker, D. E. (2002) The enemy at the gates? DNA adducts as biomarkers of exposure to exogenous and endogenous genotoxic agents. *Toxicol Lett.* 134, 51-56.

- Singh, R., Teichert, F., Verschoyle, R. D., Kaur, B., Vives, M., Sharma, R. A., Steward, W. P., Gescher, A. J. & Farmer, P. B. (2009) Simultaneous determination of 8-oxo-2'-deoxyguanosine and 8-oxo-2'-deoxyadenosine in DNA using online column-switching liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 23, 151-160.
- SKLM (2005) Lebensmittel und Gesundheit II / Food and Health II. Vol. Mitteilung 7 / Report 7, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- SKLM (2007) Thermal Processing of Food: Potential Health Benefits and Risks. Wiley VCH, Weinheim, 283.
- Smela, M. E., Currier, S. S., Bailey, E. A. & Essigmann, J. M. (2001) The chemistry and biology of aflatoxin B(1): from mutational spectrometry to carcinogenesis. *Carcinogenesis.* 22, 535-545.
- Smith, C. J., Perfetti, T. A., Rumble, M. A., Rodgman, A. & Doolittle, D. J. (2000) "IARC group 2A Carcinogens" reported in cigarette mainstream smoke. *Food Chem Toxicol.* 38, 371-383.
- Smith, R. A., Cohen, S. M. & Lawson, T. A. (1990) Acrolein mutagenicity in the V79 assay. *Carcinogenesis.* 11, 497-498.
- Solomon, J. J., Fedyk, J., Mukai, F. & Segal, A. (1985) Direct alkylation of 2'-deoxynucleosides and DNA following in vitro reaction with acrylamide. *Cancer Res.* 45, 3465-3470.
- Sorgel, 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, 267-274.
- Sponholz, W. R. (1982) Analyse und Vorkommen von Aldehyden in Weinen. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 174, 458-462.

- Stevens, J. F. & Maier, C. S. (2008) Acrolein: sources, metabolism, and biomolecular interactions relevant to human health and disease. *Mol Nutr Food Res.* 52, 7-25.
- Sumner, S. C., Fennell, T. R., Moore, T. A., Chanas, B., Gonzalez, F. & Ghanayem, B. I. (1999) Role of cytochrome P450 2E1 in the metabolism of acrylamide and acrylonitrile in mice. *Chem Res Toxicol.* 12, 1110-1116.
- Svensson, K., Abramsson, L., Becker, W., Glynn, A., Hellenas, K. E., Lind, Y. & Rosen, J. (2003) Dietary intake of acrylamide in Sweden. *Food Chem Toxicol.* 41, 1581-1586.
- Swenberg, J. A., Lu, K., Moeller, B. C., Gao, L., Upton, P. B., Nakamura, J. & Starr, T. B. (2011) Endogenous versus exogenous DNA adducts: their role in carcinogenesis, epidemiology, and risk assessment. *Toxicol Sci.* 120 Suppl 1, S130-145.
- Talhout, R., Opperhuizen, A. & van Amsterdam, J. G. (2006) Sugars as tobacco ingredient: Effects on mainstream smoke composition. *Food Chem Toxicol.* 44, 1789-1798.
- Tareke, E., Heinze, T. M., Gamboa da Costa, G. & Ali, S. (2009) Acrylamide formed at physiological temperature as a result of asparagine oxidation. *J Agric Food Chem.* 57, 9730-9733.
- Tareke, E., Lyn-Cook, B., Robinson, B. & Ali, S. F. (2008) Acrylamide: a dietary carcinogen formed in vivo? *J Agric Food Chem.* 56, 6020-6023.
- Tareke, E., Rydberg, P., Karlsson, P., Eriksson, S. & Tornqvist, M. (2002) Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. *J Agric Food Chem.* 50, 4998-5006.
- Thielen, S., Baum, M., Hoffmann, M., Loeppky, R. N. & 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.
- Tompkins, E. M., McLuckie, K. I., Jones, D. J., Farmer, P. B. & Brown, K. (2009) Mutagenicity of DNA adducts derived from ethylene oxide exposure in the pSP189 shuttle vector replicated in human Ad293 cells. *Mutat Res.* 678, 129-137.

- Tyl, R. W. & Friedman, M. A. (2003) Effects of acrylamide on rodent reproductive performance. *Reprod Toxicol.* 17, 1-13.
- Umano, K. & Shibamoto, T. (1987) Analysis of acrolein from heated cooking oils and beef fat. *J. Agric. Food Chem.* 35, 909-912.
- VanderVeen, L. A., Harris, T. M., Jen-Jacobson, L. & Marnett, L. J. (2008) Formation of DNA-protein cross-links between gamma-hydroxypropanodeoxyguanosine and EcoRI. *Chem Res Toxicol.* 21, 1733-1738.
- Wang, M., Yu, N., Chen, L., Villalta, P. W., Hochalter, J. B. & Hecht, S. S. (2006) Identification of an acetaldehyde adduct in human liver DNA and quantitation as N2-ethyldeoxyguanosine. *Chem Res Toxicol.* 19, 319-324.
- Waters, L. S., Minesinger, B. K., Wiltout, M. E., D'Souza, S., Woodruff, R. V. & Walker, G. C. (2009) Eukaryotic translesion polymerases and their roles and regulation in DNA damage tolerance. *Microbiol Mol Biol Rev.* 73, 134-154.
- Watzek, N. (2009) Bestimmung von Biomarkern für Acrylamid und Glycidamid in vitro. Diplomarbeit, Technische Universität Kaiserslautern, Kaiserslautern.
- Watzek, N., Boehm, N., Feld, J., Scherbl, D., Berger, F. I., Merz, K. H., Lampen, A., Reemtsma, T., Tannenbaum, S., Skipper, P. L., Baum, M., Richling, E. & Eisenbrand, G. (2012) N7-Glycidamide-guanine DNA adduct formation by orally ingested acrylamide in rats: a dose response study encompassing human diet-related exposure levels. *Chem Res Toxicol.*, Epub ahead of print
- WHO (2002) Health Implications of Acrylamide in Food, In Joint FAO/WHO consultation, Geneva, Switzerland.
- Wise, L. D., Gordon, L. R., Soper, K. A., Duchai, D. M. & Morrissey, R. E. (1995) Developmental neurotoxicity evaluation of acrylamide in Sprague-Dawley rats. *Neurotoxicol Teratol.* 17, 189-198.
- Yang, I. Y., Chan, G., Miller, H., Huang, Y., Torres, M. C., Johnson, F. & Moriya, M. (2002a) Mutagenesis by acrolein-derived propanodeoxyguanosine adducts in human cells. *Biochemistry.* 41, 13826-13832.

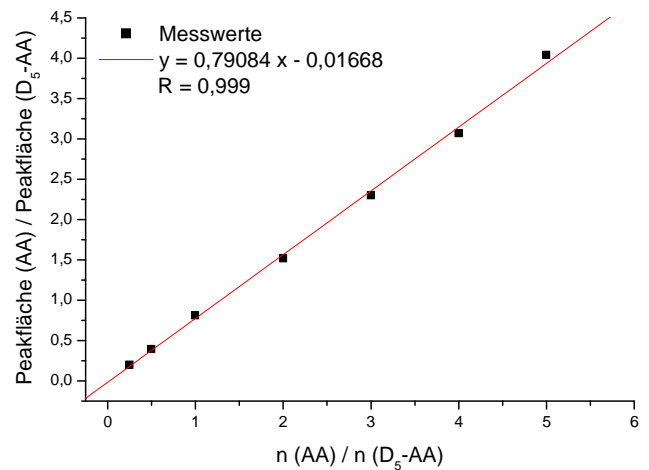
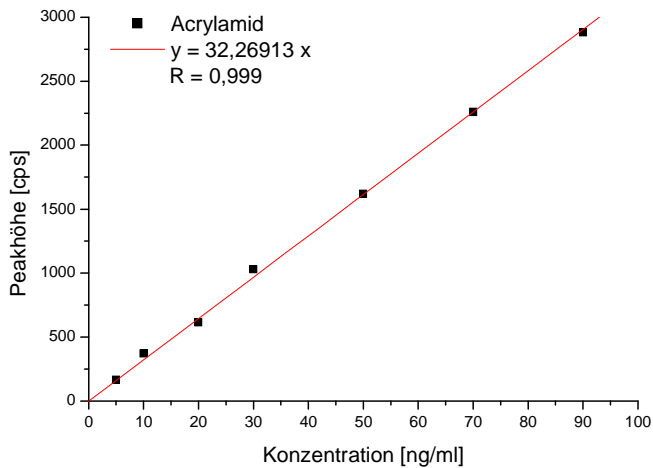
- Yang, I. Y., Johnson, F., Grollman, A. P. & Moriya, M. (2002b) Genotoxic mechanism for the major acrolein-derived deoxyguanosine adduct in human cells. *Chem Res Toxicol.* 15, 160-164.
- Yaylayan, V. A., Harty-Majors, S. & Ismail, A. A. (1999) Monitoring carbonyl-amine reaction and enolization of 1-hydroxy-2-propanone (Acetol) by FTIR spectroscopy. *J Agric Food Chem.* 47, 2335-2340.
- Yaylayan, V. A. & Keyhani, A. (2000) Origin of carbohydrate degradation products in L-Alanine/D-[(13)C]glucose model systems. *J Agric Food Chem.* 48, 2415-2419.
- Young, J. F., Luecke, R. H. & Doerge, D. R. (2007) Physiologically based pharmacokinetic/pharmacodynamic model for acrylamide and its metabolites in mice, rats, and humans. *Chem Res Toxicol.* 20, 388-399.
- Zenick, H., Hope, E. & Smith, M. K. (1986) Reproductive toxicity associated with acrylamide treatment in male and female rats. *J Toxicol Environ Health.* 17, 457-472.
- Zerilli, A., Lucas, D., Amet, Y., Beauge, F., Volant, A., Floch, H. H., Berthou, F. & Menez, J. F. (1995) Cytochrome P-450 2E1 in rat liver, kidney and lung microsomes after chronic administration of ethanol either orally or by inhalation. *Alcohol Alcohol.* 30, 357-365.
- Zhang, S., Balbo, S., Wang, M. & Hecht, S. S. (2011) Analysis of acrolein-derived 1,N2-propanodeoxyguanosine adducts in human leukocyte DNA from smokers and nonsmokers. *Chem Res Toxicol.* 24, 119-124.
- Zhang, S., Villalta, P. W., Wang, M. & Hecht, S. S. (2006) Analysis of crotonaldehyde- and acetaldehyde-derived 1,n(2)-propanodeoxyguanosine adducts in DNA from human tissues using liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Chem Res Toxicol.* 19, 1386-1392.
- Zhang, S., Villalta, P. W., Wang, M. & Hecht, S. S. (2007) Detection and quantitation of acrolein-derived 1,N2-propanodeoxyguanosine adducts in human lung by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *Chem Res Toxicol.* 20, 565-571.

Zyzak, D. V., Sanders, R. A., Stojanovic, M., Tallmadge, D. H., Eberhart, B. L., Ewald, D. K., Gruber, D. C., Morsch, T. R., Strothers, M. A., Rizzi, G. P. & Villagran, M. D. (2003) Acrylamide formation mechanism in heated foods. *J Agric Food Chem.* 51, 4782-4787.

8 Anhang

8.1 Regressions- und Kalibriergeraden zur Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen (Linearität)

8.1.1 Acrylamid



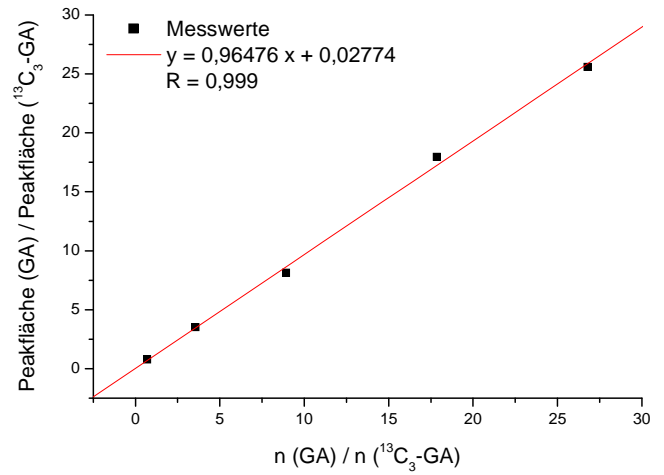
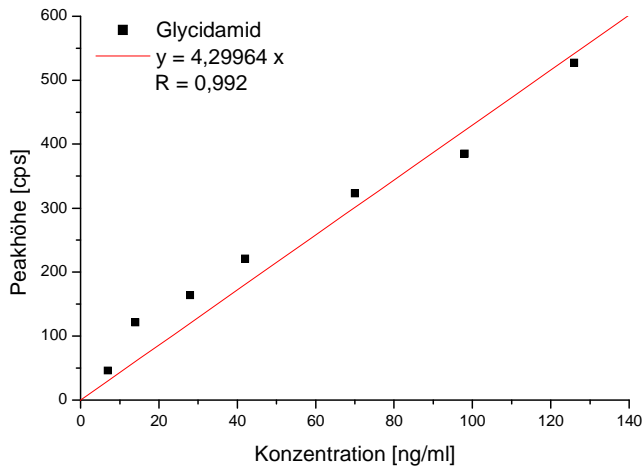
Konzentration [ng/ml]	Peakhöhe [cps]
-----------------------	----------------

5	167
10	372
20	615
30	1030
50	1620
70	2260
90	2880

n (Analyt) / n (IS)	Area (Analyt) / Area (IS)
---------------------	---------------------------

0,25	0,20
0,5	0,40
1,0	0,81
2,0	1,52
3,0	2,30
4,0	3,07
5,0	4,04

8.1.2 Glycidamid



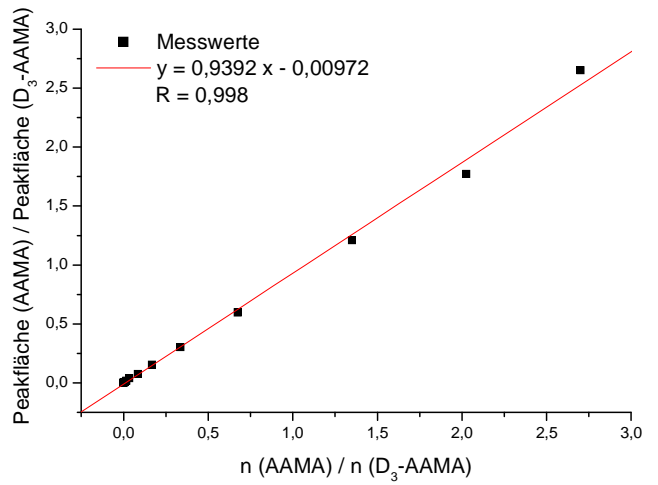
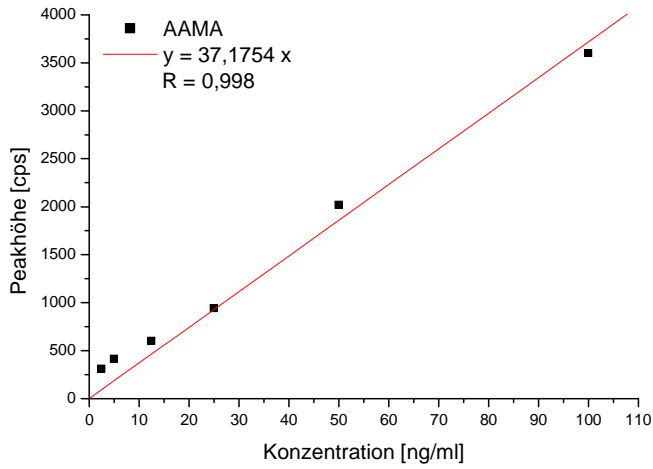
Konzentration [ng/ml]	Peakhöhe [cps]
-----------------------	----------------

7	46
14	121
28	164
42	221
70	323
98	385
126	527

n (Analyt) / n (IS)	Area (Analyt) / Area (IS)
---------------------	---------------------------

0,71	0,79
3,57	3,51
8,93	8,13
17,86	17,96
26,79	25,57

8.1.3 AAMA



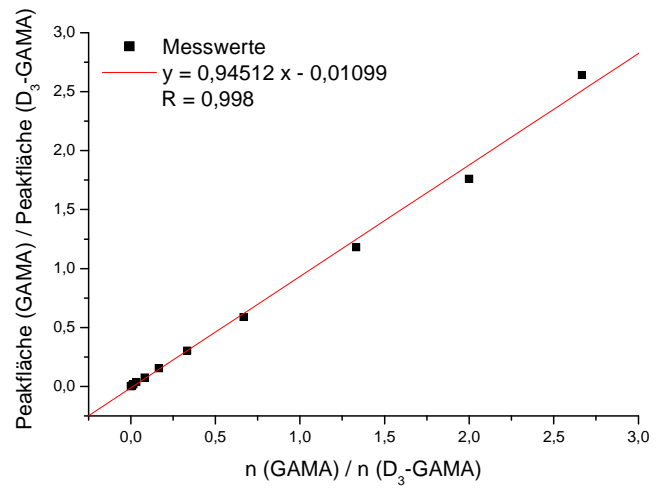
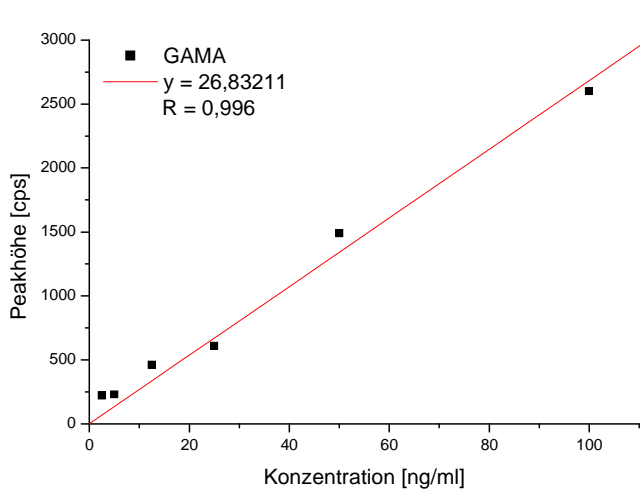
Konzentration [ng/ml] Peakhöhe [cps]

2,5	312
5	416
12,5	601
25	941
50	2020
100	3600

n (Analyt) / n (IS) Area (Analyt) / Area (IS)

0,001	0,0014
0,002	0,0036
0,004	0,0038
0,008	0,01
0,017	0,02
0,034	0,04
0,084	0,08
0,17	0,15
0,34	0,30
0,68	0,60
1,35	1,21
2,03	1,77
2,70	2,65

8.1.4 GAMA



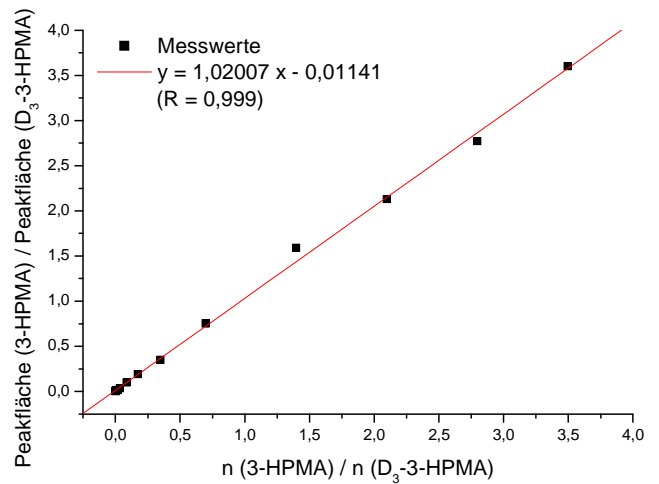
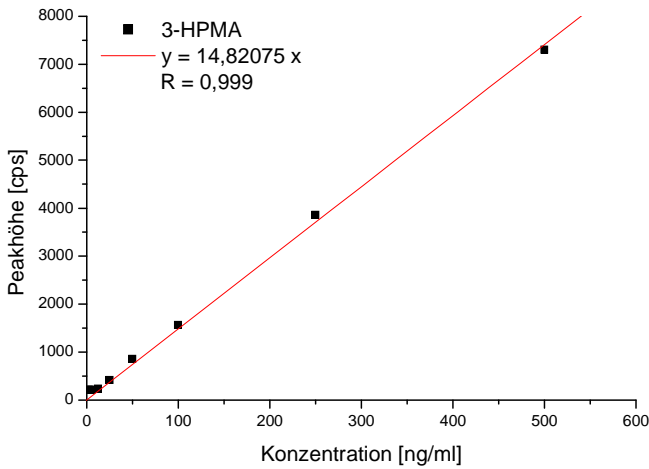
Konzentration [ng/ml]	Peakhöhe [cps]
-----------------------	----------------

2,5	221
5	230
12,5	462
25	609
50	1490
100	2600

n (Analyt) / n (IS)	Area (Analyt) / Area (IS)
---------------------	---------------------------

0,001	0,0018
0,002	0,0017
0,004	0,0037
0,008	0,0073
0,017	0,018
0,033	0,038
0,083	0,075
0,17	0,15
0,33	0,30
0,67	0,59
1,33	1,18
2,00	1,76
2,67	2,64

8.1.5 3-HPMA



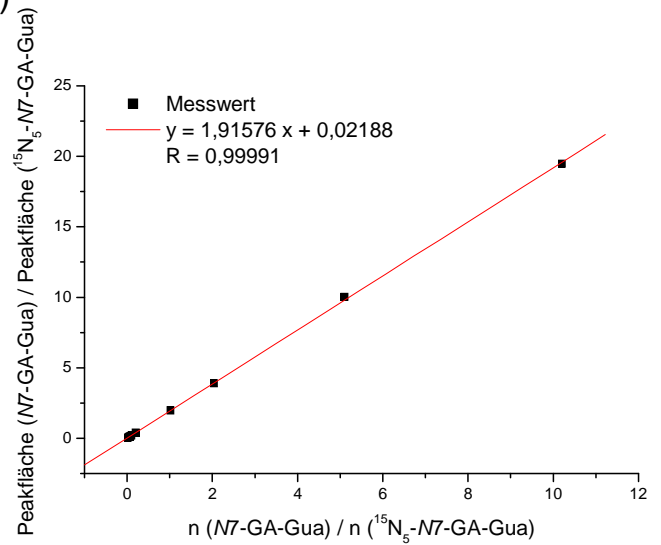
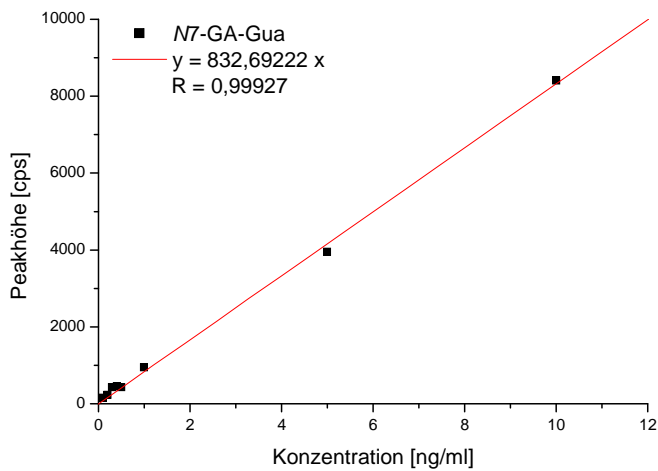
Konzentration [ng/ml] Peakhöhe [cps]

2,5	214
5	215
12,5	236
25	419
50	855
100	1560
250	3860
500	7300

n (Analyt) / n (IS) Area (Analyt) / Area (IS)

0,001	0,005
0,002	0,004
0,004	0,004
0,009	0,009
0,018	0,017
0,035	0,034
0,087	0,097
0,18	0,19
0,35	0,35
0,70	0,75
1,40	1,59
2,10	2,13
2,80	2,77
3,50	3,60

8.1.6 N7-GA-Gua (API 3200)



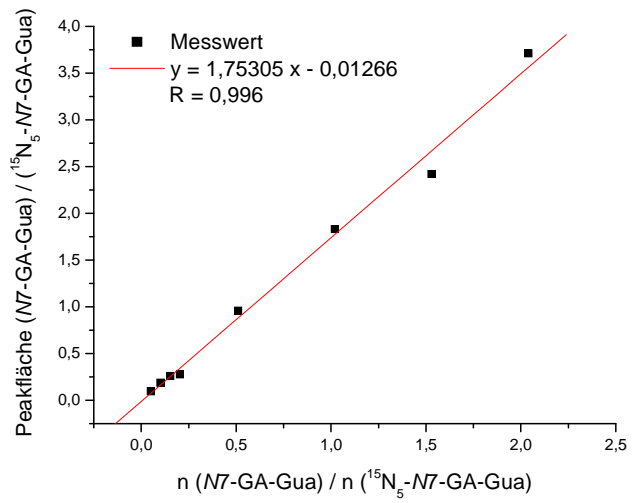
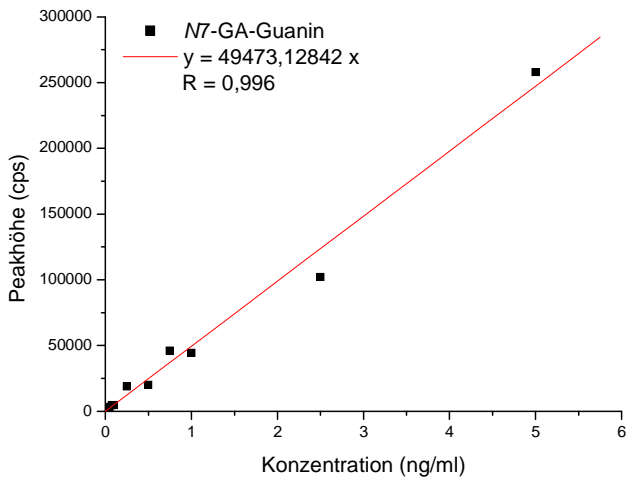
Konzentration [ng/ml]	Peakhöhe [cps]
-----------------------	----------------

0,1	154
0,2	234
0,3	429
0,4	447
0,5	429
1,0	943
5,0	3950
10,0	8410

n (Analyt) / n (IS)	Area (Analyt) / Area (IS)
---------------------	---------------------------

0,02	0,04
0,04	0,09
0,06	0,13
0,08	0,17
0,10	0,20
0,20	0,39
1,02	1,99
2,04	3,90

8.1.7 N7-GA-Gua (API 5500 QTRAP)



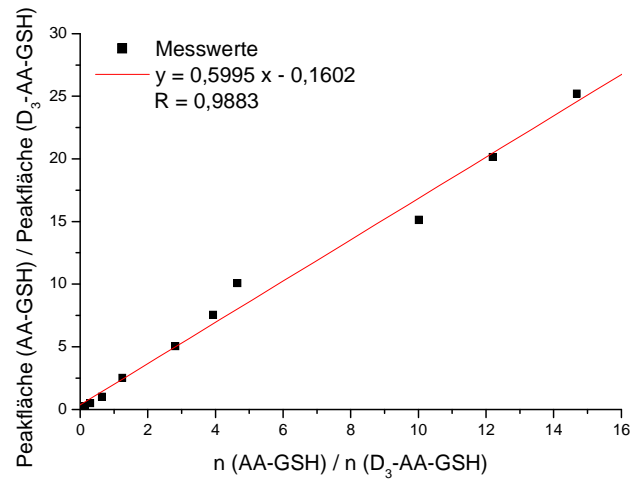
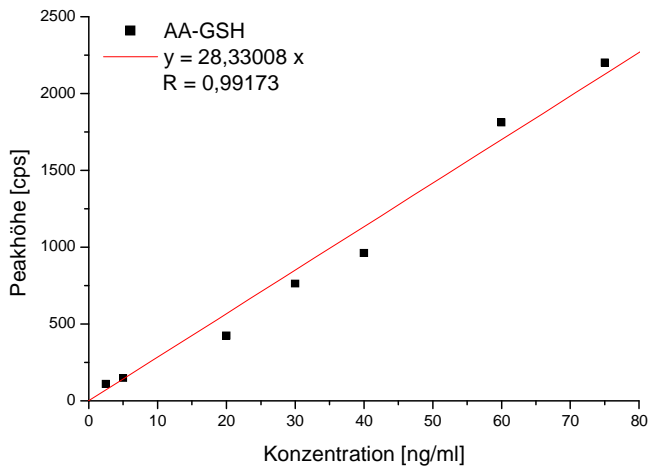
Konzentration [ng/ml] Peakhöhe [cps]

0,025	1760
0,05	3160
0,075	4360
0,1	4710
0,25	18900
0,5	20000
0,75	46000
1,0	44500
2,5	102000
5,0	258000

n (Analyt) / n (IS) Area (Analyt) / Area (IS)

0,05	0,04
0,10	0,18
0,15	0,26
0,20	0,28
0,51	0,96
1,02	1,83
1,53	2,42
2,04	3,71

8.1.8 AA-GSH



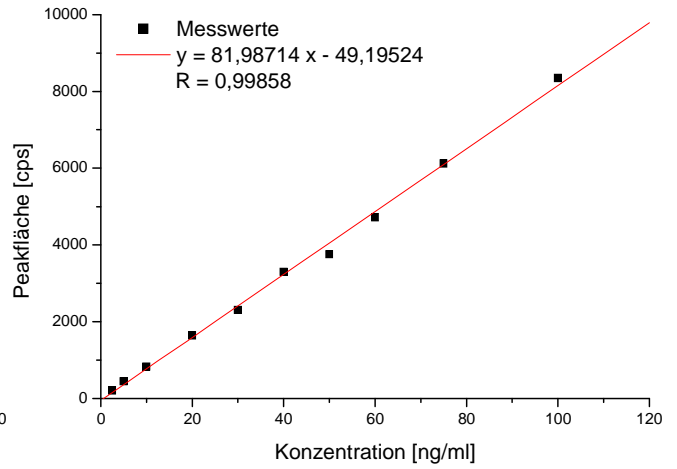
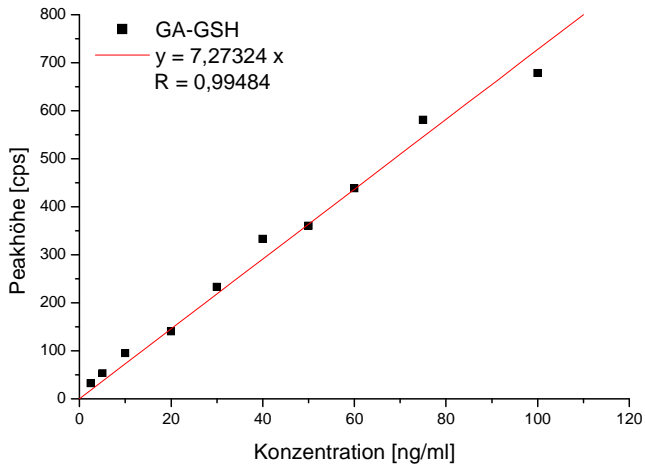
Konzentration [ng/ml]	Peakhöhe [cps]
-----------------------	----------------

2,5	109
5	147
20	424
30	762
40	961
60	1810
75	2200

n (Analyt) / n (IS)	Area (Analyt) / Area (IS)
---------------------	---------------------------

0,10	0,07
0,25	0,14
0,50	0,30
1,01	0,65
2,52	1,25
5,04	2,81
7,56	3,93
10,08	4,65
15,12	10,02
20,16	12,20
25,20	14,69

8.1.9 GA-GSH



Konzentration [ng/ml] Peakhöhe [cps]

0,025	1760
0,05	3160
0,075	4360
0,1	4710
0,25	18900
0,5	20000
0,75	46000
1,0	44500
2,5	102000
5,0	258000

Konzentration [ng/ml] Peakfläche [cps]

2,5	208
5	447
10	833
20	1640
30	2310
40	3300
50	3760
60	4720
75	6120
100	8350

8.2 Verwendete Formeln

Die Datenanalyse und Prüfung auf Signifikanzniveaus in dieser Arbeit erfolgte durch den ungepaarten, zweiseitigen t-Test. Lineare und nicht lineare Kurvenanpassung wurde mittels Microcal Origin Software 6.0 durchgeführt (Northampton, MA, USA).

Zur Berechnung der statistischen Kenngrößen wurden folgende Formeln herangezogen:

- lineare Regression

$$y = bx + a$$

mit a = y-Achsenabschnitt

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

mit m_a = Fehler des y-Achsenabschnitts

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

mit b = Steigung

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

mit m_b = Fehler der Steigung

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

mit N = Nenner

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

mit $S =$ Fehlerquadratsumme

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

- arithmetischer Mittelwert

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

- Standardabweichung

$$\sigma_{n-1} = \pm \sqrt{\frac{1}{n-1} \cdot \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

- Median

$$x_{med} = \frac{x_{n+1}}{2} \quad \text{mit } n = \pm 2k$$

$$x_{med} = \frac{1}{2} \left(x_{\frac{n}{2}} + x_{\frac{n+1}{2}} \right) \quad \text{mit } n = \pm 2k-1$$

Danksagung

Mit diesem Kapitel möchte ich mich bei allen bedanken, die durch Ihre Unterstützung zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben

- Prof. Dr. Elke Richling und Prof. Dr. Gerhard Eisenbrand für die Überlassung des interessanten Themas, die zahlreichen Diskussionen und das entgegengebrachte Vertrauen
- dem Institute for Scientific Information on Coffee (ISIC) für die finanzielle Unterstützung
- Prof. Dr. Dr.-Ing. h.c. Helmut J. Schmidt, dem Präsidenten der TU Kaiserslautern, für die Gewährung eines Promotionsstipendiums
- Prof. Dr. Helmut Sitzmann für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes
- Dr. Matthias Baum und Dr. Karl Heinz Merz für die stete Diskussionsbereitschaft und die Unterstützung bei der ein oder anderen Synthese
- Prof. Dr. Thorsten Reemtsma, Marilyn Menden und Volker Happel vom Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin für die Unterstützung bei den DNA-Adduktmessungen im Rahmen der ISIC-Studie
- Prof. Dr. Jan G. Hengstler und Dr. Markus Schug für die Isolierung und Bereitstellung der primären Rattenhepatozyten und für die Durchführung der Leberperfusion
- Prof. Dr. med. Uwe Fuhr für die Bereitstellung der Urinproben zur Untersuchung der Mercaptursäuren im Anschluss an das DFG-Projekt „Bedeutung der CYP2E1-Aktivität für die Toxikokinetik von Acrylamid beim Menschen“ (Studiennummer: KPUK-03-ACR/PIL-01)
- Dr. Michael Granvogel für die Durchführung der Acroleinanalysen
- den Mitarbeitern des Arbeitskreises von Prof. Dr. Dr. Dieter Schrenk und Juniorprof. Dr. Melanie Esselen für die technische und materielle Unterstützung
- Ingrid Hemm für die Hilfe bei sämtlichen administrativen Aufgaben und das immer offene Ohr
- allen ehemaligen Doktoranden des Arbeitskreises von Prof. Dr. Elke Richling und Prof. Dr. Gerhard Eisenbrand für die stete Hilfe im Labor
- Denise Scherbl, Julia Feld, Franz Berger und Nadine Böhm für die Hilfsbereitschaft bei allen großen und kleinen Problemen, die netten Stunden im gemeinsamen Büro und die entgegengebrachte Freundschaft

Lebenslauf

Angaben zur Person

Name Nico Watzek

Hochschulausbildung

04.2009 - 10.2011 Promotion im Fachbereich Chemie, Fachrichtung Lebensmittelchemie und Toxikologie an der Technischen Universität Kaiserslautern, Prof. Dr. Elke Richling

Thema: „Acrylamid vs. Acrolein: Toxikokinetik hitzeinduzierter Kontaminanten in Lebensmitteln“

10.2004 - 03.2009 Studium der Lebensmittelchemie und Toxikologie an der Technischen Universität Kaiserslautern, Diplomarbeit im Arbeitskreis von Prof. Dr. Gerhard Eisenbrand

Thema: „Acrylamid und Glycidamid: Dosimetrie der Bildung von DNA-Addukten und Mercaptursäuren *in vitro*“

Abschluss: Diplom-Lebensmittelchemiker

Stipendien / Auszeichnungen

06.2009 - 05.2011 Promotionsstipendium der Technischen Universität Kaiserslautern
02.2010 Preisträger der Prof. Dr. Drs. h.c. Adolf Steinhofer-Stiftung für ein herausragendes Diplom

Berufstätigkeit

seit 11.2011 BASF SE, Tätigkeit im Bereich Regulatory Toxicology, Chemicals

Weiterbildung

seit 09.2009 Weiterbildung zum Fachtoxikologen der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT)
Kurse: Lebensmitteltoxikologie, molekulare Zelltoxikologie, Versuchstierkunde und Biostatistik I, Versuchstierkunde II (praktischer Teil), Grundlagen der Organtoxikologie und -pathologie I

Wehrdienst

07.2003 - 03.2004 Grundwehrdienst im Fallschirmjägerbataillon 263 in Zweibrücken

Schulbildung

1994 - 2003 Otfried-von-Weißenburg-Gymnasium Dahn, Allgemeine Hochschulreife

1991 - 1994 Grundschule Dahn

1990 - 1991 Hermann-Matern-Schule Luckenwalde

Erklärung zur eigenständigen Durchführung

Hiermit erkläre ich, dass ich die Dissertation sowie die vorliegende schriftliche Ausarbeitung eigenständig, ohne fremde Hilfe und nur mit den angegebenen Quellen und Hilfsmitteln durchgeführt habe.

Kaiserslautern, den 19.03.2012



(Nico Watzek)