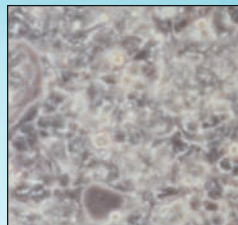
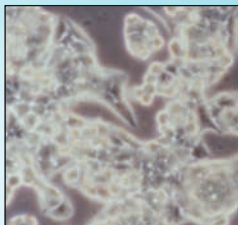
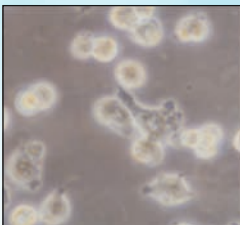


Untersuchungen zur Genotoxizität von Acrylamid in Abhängigkeit von der Cytochrom P450 2E1 Aktivität in humanen Hepatomzellen

YVONNE VÖLKE

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines **Doktors der Medizin**
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2012

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2012

© 2012 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

**Untersuchungen zur Genotoxizität von Acrylamid in
Abhängigkeit von der Cytochrom P450 2E1 Aktivität
in humanen Hepatomzellen**

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Yvonne Völkel

aus Haltern jetzt Haltern am See

Gießen 2011

Aus dem Institut für Innenraum- und Umwelttoxikologie
der Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH
Standort Gießen
unter Prof. Dr. Mersch-Sundermann

Gutachter: Prof. Dr. Mersch-Sundermann

Gutachter: Prof. Dr. Bräuninger

Tag der Disputation: 19.11.2012

Diese Dissertation ist
meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
2	MATERIAL UND METHODEN	3
2.1	Materialien	3
2.1.1	Acrylamid	3
2.1.2	Ethanol	6
2.1.3	Benzo[a]pyren: Positivkontrolle	7
2.1.4	Chemikalien und Reagenzien	7
2.1.5	Lösungen	9
2.1.6	Geräte und Verbrauchsmaterialien	10
2.1.7	Merkmale der humanen Hepatomzelllinie (HepG2)	10
2.2	Methoden	15
2.2.1	Vorbereitung der Proben	15
2.2.2	Methodik der Zellkultur	15
2.2.3	Alkalische Einzelzellgelelektrophorese (Cometassay)	17
2.2.4	Cytochrom P450 als Entgiftungssystem des Körpers	24
2.2.5	Glutathion als wichtiges Antioxidanz	25
2.2.6	Glutathion Messung	26
2.2.7	Apoptose-Messung	30
3	ERGEBNISSE	33
3.1	Ergebnisse der Einzelzellgelelektrophorese	33
3.1.1	DNA schädigender Effekt von Acrylamid	34
3.1.2	DNA schädigender Effekt von Ethanol	37
3.1.3	Verstärkung des DNA schädigenden Potenzials von Acrylamid durch Ethanol	41
3.2	Ergebnisse der Glutathion-Messung	45

3.2.1	Auswirkungen von Ethanol auf die GSH-Konzentration in HepG2-Zellen	45
3.2.2	Auswirkungen von Ethanol und Acrylamid auf die GSH-Konzentration in HepG2-Zellen	47
3.3	Ergebnisse der Apoptose-Messung (ssDNA)	49
3.3.1	Auswirkungen von Acrylamid und Ethanol auf die Apoptoseinduktion von HepG2-Zellen	49
4	DISKUSSION	52
4.1	Einführung	52
4.2	Einfluss der Cytochrom P450 Aktivität auf die Gentoxizität von Acrylamid	53
4.2.1	Der First-Pass-Effekt der Leber	53
4.2.2	Wirkung und direkter Nachweis von Cytochrom P450 2E1	53
4.3	Beeinflussung der intrazellulären Glutathionkonzentration durch Acrylamid	56
4.4	Beeinflussung der Apoptose durch Acrylamid	58
4.4.1	Apoptose	58
4.4.2	Stellung der Apoptose im Rahmen der gentoxikologischen Testungen	58
4.5	Auswirkungen einer Exposition mit Acrylamid auf Leberzellen	60
4.6	Risikobewertung	63
5	ZUSAMMENFASSUNG	68
6	ABSTRACT	70
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	72
8	TABELLENVERZEICHNIS	72
9	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	74

10	LITERATURVERZEICHNIS	76
11	PUBLIKATIONSVERZEICHNIS	87
12	EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG	88
13	DANKSAGUNGEN	89
14	ANHANG	90

1 Einleitung

Im Jahr 2006 erkrankten nach neuesten Schätzungen des Robert-Koch-Instituts und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister e.V. in Deutschland ca. 229.000 Männern, ca. 198.000 Frauen und ca. 1.800 Kinder unter 15 Jahren erstmals an Krebs. Bis zum Jahr 2010 ist mit einem Anstieg auf 450.000 Neuerkrankungen zu rechnen [RKI und GEKID 2010]. Die Entstehung einer Krebserkrankung beruht in der Regel nicht auf einer einzigen Ursache, sie ist vielmehr multifaktorieller Genese. Neben genetischer Determination spielen vor allem vermeidbare Risikofaktoren, wie zum Beispiel das Rauchen, eine wichtige Rolle. Ein nur schwer einschätzbarer, jedoch mit wahrscheinlich 30 – 35 % sehr hoher Anteil aller Krebstodesfälle ist auf eine falsche Ernährung zurückzuführen [DIFE 1999]. Präventiv stehen hier eine ausreichende Zufuhr von frischem Obst und Gemüse und die Vermeidung einer einseitigen, lediglich auf Fertigprodukten basierenden Ernährung im Mittelpunkt.

Seit vielen Jahren werden aus diesem Grunde zunehmend Bestandteile, die aus Lebensmitteln isoliert werden können, auf ihr chemopräventives oder karzinogenes Potenzial untersucht. Eine dieser Substanzen ist Acrylamid. Die hauptsächliche Expositionsquelle für den Menschen liegt in kohlenhydratreichen und asparaginhaltigen Speisen, welche während der Zubereitung über 175 °C erwärmt werden. Relevante Konzentrationen von Acrylamid werden zum Beispiel bei der Herstellung von Chips, Knäckebrot, Pommes Frites und anderen frittierten Speisen, aber auch bei der Kaffeeröstung gebildet. Das Bundesinstitut für Risikobewertung geht derzeit von einer mittleren täglichen Belastung von circa 0,3 µg Acrylamid pro Kilogramm Körpergewicht aus. Darüber hinaus ist es ein Bestandteil des Zigarettenrauches. So nehmen Raucher täglich etwa 0,5 bis 2 µg Acrylamid pro Kilogramm Körpergewicht auf [BfR 2011]. Acrylamid ist eine synthetische Chemikalie, die in der heutigen Industrie weitläufige Verwendung findet. Es ist ein wichtiges Ausgangsmaterial für die Polymerisation. Polyacrylamid wird vor allem in der Wasseraufbereitung als Flockungsmittel eingesetzt. Andere Anwendungsmöglichkeiten sind zum Beispiel die Verwendung in Dichtungsmaterialien, sowie in der Papier- und Kunststoffindustrie. Des Weiteren ist das Polymer des Acrylamids ein Inhaltsstoff von Reinigungs- und Kosmetikprodukten. Das monomere Acrylamid, welches die toxische Form dieser

Verbindung darstellt, kann ebenfalls als Rückstand in solchen Produkten nachgewiesen werden. Demnach kommt der Mensch mit der Chemikalie Acrylamid täglich auf vielfältigste Art und Weise in Kontakt.

In vielen in-vivo-Studien mit Nagetieren konnte Acrylamid ein karzinogenes Potenzial nachgewiesen werden, wobei verschiedene Organsysteme betroffen waren. Eine Klärung des Risikos für den Menschen wurde durch diese Ergebnisse forciert. Auch in der Bevölkerung wuchs die Verunsicherung in Bezug auf acrylamidhaltige Lebensmittel. Spätestens seit dem durch die Medien propagierten Kartoffel-Chipsskandal im Jahre 2003, bei dem erhöhte Acrylamidkonzentrationen in Chips verschiedenster Hersteller gemessen wurden, rückt Acrylamid regelmäßig in den Blickpunkt des öffentlichen Interesses.

Ziel der vorliegenden Dissertation ist es einerseits, die genotoxische Wirkung von Acrylamid auf humane, metabolisch kompetente, Hepatomzellen zu untersuchen. Die Auswahl der Zellen erfolgte vor dem Hintergrund, dass Acrylamid im Rahmen des First-Pass-Effektes in der Leber zu Glycidamid metabolisiert wird. Andererseits sollen zugrunde liegende Mechanismen dieser DNA-Schädigung beleuchtet werden. Zu diesem Zweck wurde die alkalische Einzelzellgelelektrophorese (Cometassay) als genotoxikologisches Testverfahren gewählt. Ergänzend wurde die Verstärkung der gemessenen acrylamidinduzierten genotoxischen Effekte durch Ethanol untersucht, da Ethanol eine Induktion des Cytochrom P450 2E1 zur Folge hat. Dieser Regelmechanismus führt zu einer erhöhten Toxifizierung von Acrylamid zu Glycidamid. Erweiternd wurden die intrazelluläre Glutathionkonzentration und die Apoptoseinduktion in den Testzellen gemessen. Ebenso wurde der Einfluss des Ethanols, in Kombination mit Acrylamid, auf die Glutathionkonzentration und auf die Induktion der Apoptose beurteilt.

Da die Kombination von acrylamidhaltigen Kartoffel-Chips oder Pommes frites und Alkohol heutzutage keine Seltenheit ist, muss diese Dissertation auch vor einem ernährungstoxikologischen Hintergrund gesehen werden. Daraus sich die weiterführende Frage, welchen Stellenwert Acrylamid bzw. die Kombination von Acrylamid und Ethanol bei der ernährungsbedingten Karzinogenese bei Menschen einnehmen.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Acrylamid

Acrylamid (CAS-Nummer: 79-06-1) gehört zur chemischen Gruppe der Amide (siehe Abbildung 2.1). Es findet in der Industrie vielseitig Verwendung, die Hauptexpositionsquelle für den Menschen ist jedoch die Nahrung. Die Bildung von Acrylamid wird hierbei von verschiedenen Faktoren beeinflusst. Neben der Temperatur spielen auch die Erhitzungsdauer, der Wasser-, Zucker- und Asparagingehalt der Lebensmittel und deren Lagerung eine wichtige Rolle. Insbesondere kohlenhydratreiche, stark erhitzte Speisen weisen einen hohen Acrylamidgehalt auf [TAREKE et al. 2002]. Dies ist durch die hohe Konzentration von Zucker und der Aminosäure Asparagin zu erklären, da beide Substanzen bei Hitzezufuhr nach der so genannten Maillard-Reaktion reagieren (siehe Abbildung 2.2). Der Chemiker L. C. Maillard beschrieb die Bräunungsreaktion von Aminosäuren mit reduzierenden Zuckern unter Bildung einer Schiff'schen Base zu einer großen Anzahl an Reaktionsprodukten. Bei Verwendung von Asparagin als Edukt entstehen durch die Maillard-Reaktion signifikante Acrylamidmengen [STADLER et al. 2002].

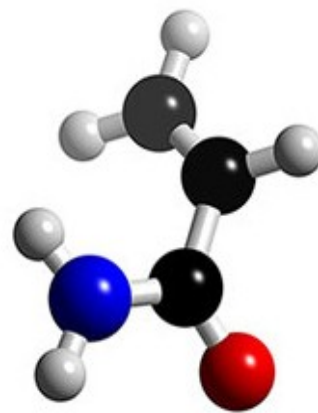


Abbildung 2.1: Strukturelle Darstellung von Acrylamid

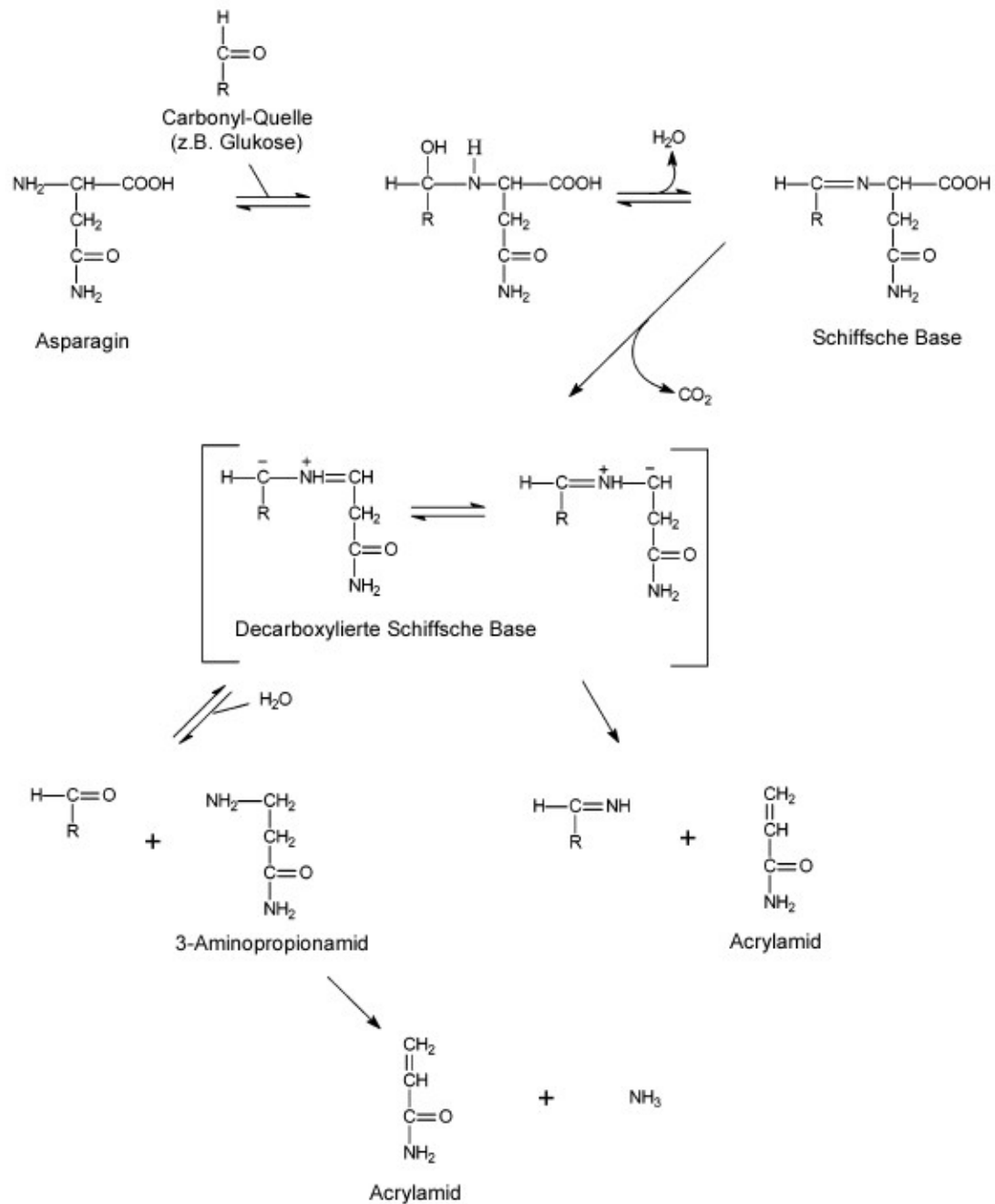


Abbildung 2.2: Maillard-Reaktion von Asparagin zu Acrylamid (verändert nach Zyzak et al. 2003)

Da Acrylamid eine gut wasserlösliche Substanz ist, wird es vom Körper gleichmäßig aufgenommen. In diesem Zusammenhang scheint der First-Pass-Effekt von großer Bedeutung zu sein.

Bereits 1994 stufte die International Agency for Research on Cancer (IARC) und später auch die US Environmental Protection Agency (US EPA) Acrylamid in die Gruppe 2 A

ein. Diese Kategorie umfasst Substanzen, die möglicherweise für den Menschen karzinogen sind.

Acrylamid wurde in in-vitro- und in-vivo-Studien ein genotoxisches Potenzial nachgewiesen, welches sich sowohl auf somatische, als auch auf Keimzellen auswirkte. Acrylamid induzierte Mikrokerne, Schwesterstrangchromatidaustausch, Einzelstrangbrüche, Mutationen an spezifischen Genloci, unkontrollierte DNA-Synthese, chromosomale Abberationen, Polyploidie, Aneuploidie und andere mitotische Störungen [DEARFIELD et al. 1995]; [WORLD HEALTH ORGANISATION (WHO) 2002].

Die Genotoxizität und Karzinogenität von Acrylamid lässt sich bislang auf drei unterschiedliche Mechanismen zurückführen. Der erste Mechanismus ist die Polymerisation von Acrylamid, welche durch Radikale vermittelt wird. Der zweite Reaktionsmechanismus von Acrylamid ist die sogenannte Michael-Addition. Hierbei reagieren Carbanionen mit α,β -ungesättigten Carbonylverbindungen und bilden Kohlenstoff-Kohlenstoff-Einzelbindungen aus. Die dritte Reaktion ist die Cytochrom P450 vermittelte Oxidation von Acrylamid zu dem Epoxid Glycidamid [DEARFIELD et al. 1995]. In diesem Zusammenhang unterstrichen Studien mit Mäusen, die in unterschiedlichem Maße CYP 450 2E1 exprimierten, die Schlüsselrolle dieses Enzyms [SUMNER et al. 1999]; [GHANAYEM et al. 2005].

Das karzinogene Potenzial von Acrylamid war bereits mehrfach Gegenstand von Tierversuchen. Hierbei wurde Mäusen, wie auch Ratten acrylamidhaltiges Wasser angeboten. In Mäusen konnte, bei Acrylamidgesamtdosen von 75 – 300 mg/kg, die vermehrte Entwicklung von alveolären Lungentumoren und, nach dermalen Applikation, die Entstehung von Hauttumoren beobachtet werden [BULL et al. 1984b]; [BULL et al. 1984a]. Bei Ratten induzierte Acrylamid, nach Verabreichung von 0,5 -2,0 mg Acrylamid / kg Körpergewicht / Tag über zwei Jahre, peritestikuläre Mesotheliome, follikuläre Schilddrüsenkarzinome, Mammakarzinome und Hirntumore. Außerdem wurde die Bildung von Phäochromozytomen, Papillomen der Mundhöhle und Adenokarzinomen des Uterus beobachtet [JOHNSON et al. 1986].

Welche Rolle eine Ernährung mit hoher Acrylamidkonzentration, bis zu 1200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Lebensmittel, auf die Krebsentstehung beim Menschen hat, sollten epidemiologische Studien klären [MUCCI et al. 2003]; [MUCCI et al. 2004]; [MUCCI et al. 2005]; [MUCCI, ADAMI 2006]. 1991 bis 2002 wurde eine Fall-Kontroll-Studie an

italienischen und schweizer Krankenhäusern durchgeführt. Mit Hilfe des Odds Ratios wurde die Wahrscheinlichkeit von Mund- bzw. Pharynx-, Larynx-, Oesophagus-, Kolorektal-, Mamma-, Prostata- und Ovarialkarzinomen in Abhängigkeit von der Acrylamidaufnahme berechnet [PELUCCHI et al. 2006]. Keine der Studien konnte jedoch eine signifikante Korrelation zwischen Acrylamidkonsum und einem erhöhten Krebsrisiko nachweisen.

2.1.2 Ethanol

Ethanol (CAS-Nummer: 64-17-5) ist ein n-Alkanol (siehe Abbildung 2.3), welches in vielen Bereichen zur Anwendung kommt. Die Hauptexpositionsquelle für den Menschen stellen alkoholhaltige Getränke dar.

In der Kosmetikindustrie wird Ethanol als Lösungsmittel und Geruchsstoffträger bei der Herstellung von Parfüms und Deodorants eingesetzt. Im Haushalt oder in der Industrie dient es als Brennstoff, Reinigungs- oder Frostschutzmittel. Auch medizinische Desinfektionslösungen weisen einen hohen Anteil an Ethanol auf.

Der Organismus metabolisiert Ethanol, indem es als Substrat für das Cytochrom P 450 2E1 dient und durch dieses zu Acetaldehyd oxidiert wird [YANG, CEDERBAUM 1997]. Aus diesem Grunde induziert Ethanol die Aktivität der CYP 2E1 [DAI et al. 1993].

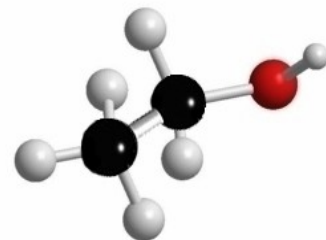


Abbildung 2.3:
Strukturelle Darstellung
von Ethanol

2.1.3 Benzo[a]pyren: Positivkontrolle

Benzo[a]pyren (CAS-Nummer 50-32-8) gehört zu der Substanzgruppe der polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe (Abbildung 2.4). Es entsteht bei der unvollständigen Verbrennung organischer Stoffe und ist damit in Auto- und Industrieabgasen und im Zigarettenrauch enthalten [LUCH 2005]. Des Weiteren finden sich polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) in Mineralölen und deren Produkten, wie zum Beispiel Teer, Bitumen, Pech und Ruß.

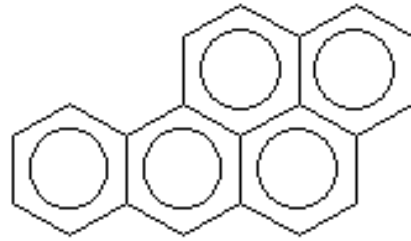


Abbildung 2.4: Strukturformel von Benzo[a]pyren

Da sich PAKs aerogen an Pollen und Staub gebunden ausbreiten, sind Spuren von Benzo[a]pyren auch in Gemüse, Obst und Getreide nachweisbar. Die wichtigste Aufnahmequelle für den Menschen stellen jedoch Brat-, Grill- und Räuchergut dar [PHILLIPS 1999].

Durch das Cytochrom P450 1A1 wird Benzo[a]pyren zu Benzo[a]pyren-Dihydrodiolepid metabolisiert, welches kovalent an zelluläre Makromoleküle wie die DNA bindet. Daraus resultieren Mutationen und Störungen in der DNA-Replikation, was letztlich zu kanzerogenen Veränderungen führt [MELENDEZ-COLON et al. 1999]. Aufgrund dieser Genotoxizität und der Notwendigkeit der Toxifizierung über ein metabolisch kompetentes System wird B[a]P in humanen Hepatomzellen als Positivkontrolle in genotoxikologischen Testverfahren verwendet [LAMY et al. 2004]; [UHL et al. 2003].

2.1.4 Chemikalien und Reagenzien

Alle Reagenzien, Chemikalien und Test-Kits, die bei der Durchführung des Cometassay, der GSH-Messung, des Apoptose-Tests und der Zellkultur benötigt wurden sind zusammen mit den Herstellerfirmen in den Tabellen 2.1 und 2.2 aufgelistet.

Tabelle 2.1: Reagenzien, Chemikalien mit Reinheitsangabe [%] soweit vorhanden

Reagenzien/ Chemikalien	Hersteller
Aceton, > 99%	Merck, Darmstadt
Acrylamid	Merck, Darmstadt
Agarose LMP (low melting point)	Serva, Heidelberg
Agarose NMP (normal melting point)	Merck, Darmstadt
Benzo[a]pyren, 98 %	Sigma Aldrich, Steinheim
DMEM (Dulbecco´s minimal essential medium)	PAA, Pasching (Austria)
DMSO (Dimethylsulfoxid), > 99%	Sigma Aldrich, Steinheim
EDTA-Titriplex, 100 %	Merck, Darmstadt
Erytrosin-B, 95 %	Merck, Darmstadt
Ethanol, > 99 %	Sigma Aldrich, Steinheim
Ethidium-Bromid	Sigma Aldrich, Steinheim
FKS (fetales Kälberserum)	PAA, Pasching (Austria)
Gentamycin	Sigma Aldrich, Steinheim
HCl, 37 %	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
NaCl, \geq 99,5 %	Roth, Karlsruhe
NaOH, >99 %	Roth, Karlsruhe
PBS (Phosphate buffered saline)	PAA, Pasching (Austria)
S 1 Nuklease	Invitrogen, Karlsruhe
Triethylamin	Merck, Darmstadt
Tris, 100 %	AppliChem, Darmstadt
Triton X-100	Sigma Aldrich, Steinheim
Trypsin, 2,5 %	PAA, Pasching (Austria)

Tabelle 2.2: Bezeichnung der verwendeten Test-Kits und ihre Hersteller

Test-Kits	Hersteller
Apoptosis Elisa Kit, ssDNA	Chemicon Germany
Glutathion Assay Kit	Cayman, Grünberg

2.1.5 Lösungen

Die verwendeten Lösungen und Puffer und ihre Zusammensetzung sind in Tabelle 2.3 dargestellt.

Tabelle 2.3: Quantitative Zusammensetzung der verwendeten Lösungen

Lösung / Puffer	Zusammensetzung	Volumenangaben
Agarose	NMP (1 %)	0,1 g/10 ml PBS
	NMP (0,7 %)	0,07 g/10 ml PBS
	LMP (0,5 %)	0,05 g/10 ml PBS
EDTA-PBS-Lösung	EDTA	100 mg
	PBS	500 ml
Elektrophoresepuffer	NaOH (0,3 M)	12 g/l Aqua dest.
	EDTA-Titriplex (1 mM)	0,372 g/l Aqua dest.
Erytrosin-B-Lösung	Eytrosin-B	20 mg
	PBS	50 ml
Ethidium-Bromid-Lösung	Stammlösung: Ethidium-Bromid / Aqua dest.	1 mg/1 ml
	Gebrauchslösung: Stammlösung / Aqua dest.	100 µl/900 µl
Fixationslösung	Methanol	16 ml
	PBS	4 ml
Kulturmedium	DMEM	424,5 ml
	FCS	75 ml
	Gentamycin	500 µl
Lyselösung	NaCl (2,5 M)	146,1 g/l Aqua dest.
	EDTA-Titriplex (0,1 M)	37,22 g/l Aqua dest.
	NaOH (0,2 M)	8,0 g/l Aqua dest.
	Triton X-100 (1 %)	2 ml/198 ml Lyselösung
	NaOH (> 99%) HCl (37%)	pH-Werteinstellung auf pH 10

Neutralisationspuffer	Tris (0,4 M) HCl (37 %)	48,44 g/l Aqua dest. pH-Werteinstellung auf pH 7,5
Trypsin 0,05 %	Trypsin (2,5%) EDTA-PBS-Lösung	1 ml 49 ml

2.1.6 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Neben den für die Laborarbeit üblichen Geräten und Verbrauchsmaterialien wurden die in Tabelle 2.4 zusammengefassten Hilfsmittel verwendet.

Tabelle 2.4: Verwendete Geräte

Laborgerät	Typbezeichnung und Hersteller
Autosampler	Combipal (CTC), PAL System
Elektrophoresekammer	Hoefer HE 100 SuperSub, Pharmacia Biotech
Elektrophoresestromversorgungsgerät	EPS 300, Pharmacia Biotech
ELISA-Lesegerät	Infinite M 200, Tecan
Fluoreszenzmikroskop	DMLS, Leica
Kühlanlage für Elektrophoresekammer	MultiTemp III, Pharmacia Biotech
Zentrifuge	Universal 30 F, Hettich

2.1.7 Merkmale der humanen Hepatomzelllinie (HepG2)

Die Zelllinie HepG2 wurde 1972 von Aden et al. aus einem primären Hepatoblastom eines 11-jährigen argentinischen Jungen isoliert [ADEN et al. 1979]. Die Morphologie der HepG2-Zellen ist mit ihrem flachen, polygonalen Erscheinungsbild charakteristisch für Leberparenchymzellen (siehe Abbildung 2.5). Auch Gallenkanäle, Mikrovilli, das

raue endoplasmatische Retikulum und Golgi Apparate konnten bereits elektronenmikroskopisch identifiziert werden [BOUMA et al. 1989].

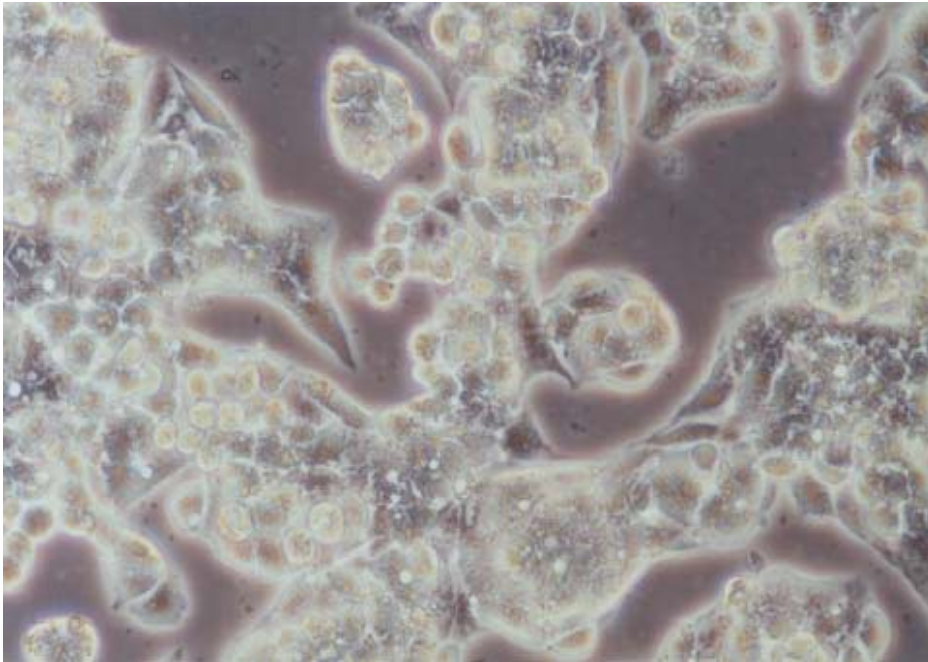


Abbildung 2.5: Lichtmikroskopische Darstellung von HepG2-Zellen

HepG2-Zellen besitzen einen aneuploiden Karyotyp mit durchschnittlich 52 Chromosomen. Die tatsächliche Chromosomenzahl schwankt aufgrund von Trisomien zwischen 48 und 54. Die Generationszeit beträgt 20-28 Stunden (siehe Abbildung 2.6), wobei die Wachstumsgeschwindigkeit jedoch stark von der Zelldichte abhängig ist. Die Kultivierung der Zellen kann in Standardmedien (z.B. DMEM mit 10-15% FCS Zusatz) erfolgen. [ADEN et al. 1979]; [NATARAJAN, DARROUDI 1991]; [KNASMÜLLER et al. 1998].

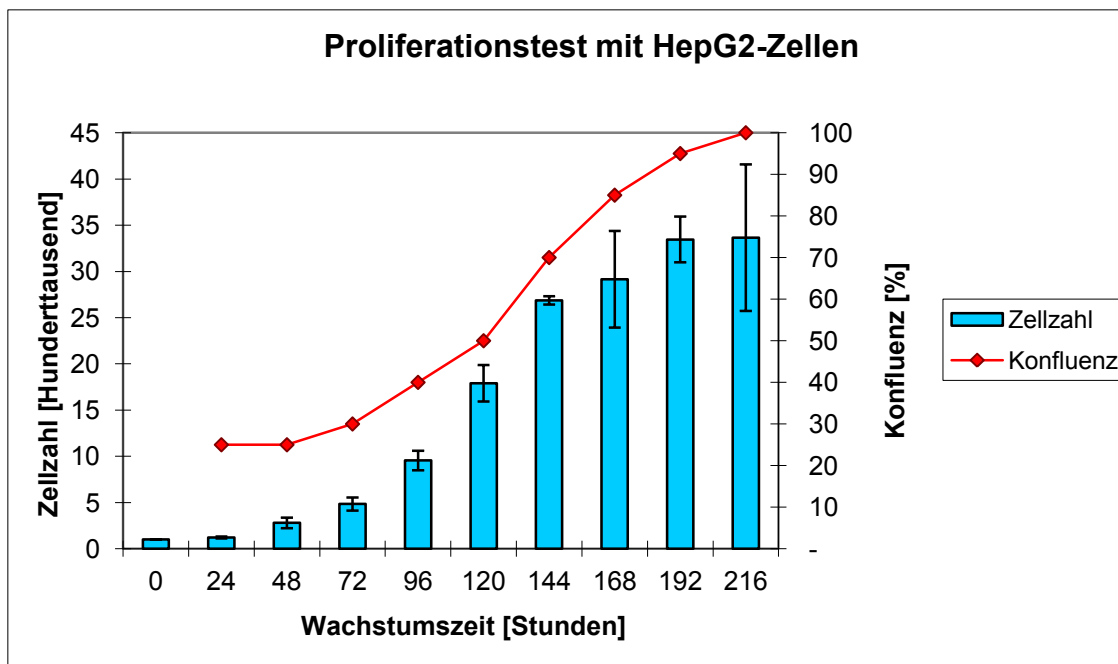


Abbildung 2.6: Proliferation von HepG2-Zellen (n=2)

HepG2-Zellen produzieren und sezernieren für humane Leberparenchymzellen charakteristische Plasmaproteine wie Albumin, Transferin, Alpha-Fetoprotein und Fibrinogen [KNOWLES et al. 1980], sowie Lipide, Apolipoproteine und Lipoproteine [DASHTI, WOLFBAUER 1987]. Des Weiteren werden Phase I und Phase II Enzyme exprimiert, die für die Aktivierung und Detoxifizierung von Fremdstoffen eine wichtige Rolle spielen [KNASMÜLLER et al. 2004]. Eine Auswahl der in HepG2-Zellen exprimierten Enzyme ist in Tabelle 2.5 dargestellt.

Die Aktivität der jeweiligen Enzyme kann jedoch durch die Zusammensetzung des Nährmediums erheblich beeinflusst werden. So führt eine Kultivierung der Zellen in „Williams E medium“ oder „Eagle’s minimum essential medium“ annähernd zu einer Enzymaktivität, wie sie in humanen Hepatozyten zu finden ist [DOOSTDAR et al. 1988]. Daher wurde für diese Arbeit „Dulbecco’s modified Eagle medium“ verwendet, welches eine nährstoffreichere Variante des „Eagle’s minimum essential medium“ ist.

Tabelle 2.5: Auswahl metabolischer Enzyme in HepG2-Zellen (modifiziert nach Knasmüller et al. 1998)

Enzym	Substrat	Anmerkung	Referenz
Phase-I-Enzyme			
Cytochromo P-450 (CYP)	B[a]P	2,5 pmol/mg	SASSA et al. (1987)
CYP 1A	B[a]P		LIMBOSCH (1983)
CYP 2E1	Acetaminophen, Ethoxyresorufin		ROE et al. (1993)
Cytochrom P450 Reduktase		Gleiche Aktivität wie in humanen Hepatozyten	GRANT et al. (1988)
Peroxidase	Purpurogallin	Aktivität im Überstand	DUVERGER VAN BOGAERT (1993)
Phase-II-Enzyme			
Epoxidhydrolase	B[a]P-4,5-Oxid		DEARFIELD et al. (1983)
Sulfotransferase	L-Tyrosin		SAKAKIBARA et al. (1994)
Glutathion-S-Transferase	1-Chloro-2,4-Dinitrobenzen	Gleiche Aktivität wie in humanen Hepatozyten	DOOSTDAR et al. (1988)
Glutathion-S-Transferase	2,4-Dinitrophenol		DUVERGER VAN BOGAERT (1993)
N-Acetyltransferase	p-Aminobenzoesäure, Anisidine		CORONEOS et al. (1993)

Die Mehrzahl karzinogener Substanzen entwickelt erst durch Verstoffwechslung in den Zellen ihr toxisches Potenzial. Metabolisch inkompetenten Zellen (z.B. V79- oder CHO-Zellen) müssen somit exogene Aktivierungssysteme, meist Leberenzymfraktionen (z.B. S9), zugesetzt werden [DEARFIELD et al. 1983]. In-vitro-Studien haben gezeigt, dass gentoxische Effekte in HepG2-Zellen auch bei jenen karzinogenen Substanzen detektiert werden können, die bei konventionellen Indikatorzellen lediglich falsch

negative Testergebnisse erbringen (z.B. Safrol und Hexamethylphosphoramid) [KNASMÜLLER et al. 1998]. Ebenso können Verbindungen, die in Tierversuchen zu falsch positiven Ergebnissen führen (z.B. Tamoxifen), in HepG2-Testsystemen als nicht karzinogen identifiziert werden [UHL et al. 2000].

Neben diesen metabolischen Fähigkeiten bringt die HepG2-Zelllinie noch weitere Vorteile für die genetische Toxikologie mit sich. Mit ihr können verschiedenste biologische Endpunkte untersucht werden. Hierzu zählen unter anderem Zytotoxizität, Lipidperoxidation, die Induktion von Mikrokernen, Schwesterchromatidaustausch, DNA-Strangbrüche und die Bildung von DNA-Addukten [MERSCH-SUNDERMANN et al. 2004].

Des Weiteren können mit HepG2-Zellen strukturverwandte mutagene und nicht-mutagene Verbindungen, wie zum Beispiel Benzo[a]pyren und Pyren, differenziert werden [NATARAJAN, DARROUDI 1991].

Außerhalb dieser Anwendungsgebiete ist die HepG2-Zelllinie auch bei der Detektion von zytopräventiven und antigentoxischen Effekten von Nutzen. Chemopräventive Substanzen zeigen in HepG2-Zellen eine Inhibition der Cytochrom P450 Enzyme, sowie die Bindung von freien Radikalen und reaktiven Sauerstoffspezies [MERSCH-SUNDERMANN et al. 2004].

Auch die Induktion antioxidativ wirkender Enzymsysteme, wie der Glutathion-S-Transferase, UDP-Glucuronyltransferase, Superoxiddismutase, Katalase, Glutathion-Peroxidase und Glutathion-Reduktase ist in HepG2-Zellen nachzuweisen [LEE et al. 2002]; [BACON et al. 2003].

2.2 Methoden

2.2.1 Vorbereitung der Proben

Nach der Herstellung der verschiedenen Testkonzentrationen wurden alle Probesubstanzen sterilfiltriert und bei – 20 °C gelagert.

Acrylamid

Die Acrylamidproben wurden entsprechend der in der Zellkultur vorliegenden Endkonzentrationen von 1,25 mmol/L, 2,5 mmol/L, 5 mmol/L und 10 mmol/L hergestellt. Die Lösungen wurden demnach 100-fach konzentrierter angesetzt. Als Lösungsmittel diente Aqua dest..

Ethanol

Auch das Ethanol wurde in Aqua dest. gelöst und Proben mit Endkonzentrationen von 15 mmol/L, 30 mmol/L, 60 mmol/L, 120 mmol/L und 240 mmol/L erstellt.

Benzo[a]pyren

Im Cometassay wurde als Positivkontrolle 50µM Benzo[a]pyren verwendet. Diese Konzentration wurde durch Testung von verschiedenen Verdünnungen als optimale Wirkkonzentration ermittelt (Originaldaten siehe Anhang). Als Lösungsmittel diente DMSO.

2.2.2 Methodik der Zellkultur

Die für diese Arbeit verwendeten HepG2-Zellen wurden von Dr. Firouz Darroudi vom Leiden University Medical Center (LUMC) in den Niederlanden zur Verfügung gestellt.

Kultivierung der Zellen

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem Brutschrank bei einer Temperatur von 37°C und einer CO₂-Konzentration von 5%. Die Zellkulturarbeit wurde in einer sterilen Umgebung durchgeführt.

Auftauen der Zellkulturen

Die HepG2-Zellen wurden bis zu ihrer Verwendung in Cryoröhrchen in DMSO-haltigem Kulturmedium bei einer Temperatur von -180°C in der Dampfphase von flüssigem Stickstoff gelagert.

Zum Auftauen der Zellen wurde zuerst das sterilfiltrierte Kulturmedium in einem Wasserbad auf 37°C erwärmt. Danach wurden 10 ml des Mediums in ein Zentrifugenröhrchen vorgelegt und ein Aliquot der Zelllinie schnell, innerhalb von 1 - 2 Minuten, bei 37°C im Wasserbad aufgetaut. Die flüssige Zellsuspension wurde in das vorbereitete Zentrifugenröhrchen überführt und bei 1200 U/min bei 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Zellpellet in 15 – 20 ml Kulturmedium resuspendiert. Das Medium mit den HepG2-Zellen wurde in eine Polystyren-Zellkulturflasche (75 cm²) überführt und in den Wärmeschrank gelegt. Nach 24 Stunden erfolgte ein Wechsel des Kulturmediums.

Kultivierung und Passagierung

Vor Arbeitsbeginn wurden das Kulturmedium, Trypsin und PBS im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Mikroskopisch wurden Wachstumsdichte und Morphologie der Zellen beurteilt, ebenso wurde die Kulturflasche optisch auf Verunreinigung und pathologische Mikroorganismen untersucht. Je nach Zelldichte wurden die Zellen gewaschen oder passagiert.

Für das Waschen wurde das Medium abgesaugt und die Zellkultur zweimal mit 10 ml PBS gereinigt. Anschließend wurde neues Kulturmedium zu den Zellen pipettiert.

Um die Zellen zu passagieren wurden diese wie beim Waschvorgang mit PBS gereinigt. Je nach Flaschengröße (75 cm² / 175 cm²) wurden 1-3 ml Trypsin hinzugefügt und die Zellen für 5 Minuten im Brutschrank inkubiert. Danach wurde die Ablösung der Zellen unter dem Mikroskop kontrolliert. Um die Reaktion des Trypsins zu unterbrechen, wurden 10 ml Kulturmedium zugefügt und die Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zentrifugation erfolgte mit 1200 U/min bei

Raumtemperatur für 5 Minuten. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 10 ml Kulturmedium resuspendiert. Um die Bildung von Zellinseln zu verhindern, wurden die Zellen mit einer 20 ml Einmalspritze und einer 0,80 x 40mm 21G Kanüle vereinzelt. Danach wurde eine Probe für die Zellzahlbestimmung entnommen. Dazu wurde zu der Probe Erytrosin B im Verhältnis 1:1 hinzugefügt und die so gefärbten Zellen in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Die Zellzahl pro ml wurde mit folgender Formel berechnet:

Ausgezählte Zellen x Verdünnungsfaktor x Kammervolumen x ml Zellsuspension

Je nach Zellzahl wurden Aliquots der Zellsuspension in mit Medium vorbereitete Kulturflaschen überführt und in den Inkubator gelegt. Die Konzentration der eingesäten Zellen richtete sich nach der Anzahl der vorhandenen und für Versuche benötigten Zellen.

Das Waschen der Zellen mit PBS und die Erneuerung des Kulturmediums erfolgte an jedem zweiten Tag. Die Passagierung richtete sich nach der mikroskopischen Beurteilung und wurde etwa alle 3 – 5 Tage durchgeführt.

2.2.3 Alkalische Einzelzellelektrophorese (Cometassay)

Grundlagen

Der Cometassay ist ein elektrophoretisches Verfahren, mit dem DNA-Schäden und DNA-Reparaturen auf zellulärer Ebene detektiert werden können [FAIRBAIRN et al. 1995]; [COLLINS 2004].

Die zuvor einer genotoxischen Substanz ausgesetzten Zellen werden mit Hilfe von Agaroselösungen auf Objektträger aufgebracht. Bei der alkalischen Einzelzellelektrophorese werden die Zellen in einer alkalischen Lösung (pH 10-12) lysiert und in einem ebenfalls alkalischen Elektrophoresepuffer (pH >13) gelagert. Das stark alkalische Milieu bewirkt eine Auflösung der Wasserstoffbrückenbindungen und eine damit verbundene Entspiralisierung der DNA. Die durch die Lyse mobilisierten DNA-Bruchstücke können nun während der Elektrophorese aus dem Zellkern in

Richtung der Anode wandern. Ungeschädigte DNA-Anteile können aufgrund ihrer Molekulargröße nicht aus dem Zellkern migrieren. Die gewaschenen und mit einem fluoreszierenden Farbstoff angefärbten Zellen können mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops begutachtet werden. Durch die Migration der DNA ähneln geschädigte Zellen in ihrer Form einem Kometen. Der Zellkern entspricht dem Kometenkopf, während die DNA-Bruchstücke den Schweif bilden (siehe Abbildung 2.8). Der DNA-Anteil in dem Kometenschweif und die Schweiflänge sind ein Maß für die DNA-Schädigung durch die genotoxische Substanz. Dabei steigt insbesondere die Schweiflänge zunächst proportional mit der DNA-Schädigung an. Dann wird jedoch ein Maximum erreicht, welches von den Elektrophoresebedingungen und nicht von der Größe der DNA-Bruchstücke abhängig ist. Nicht geschädigte Zellen bilden keine Kometen aus (siehe Abbildung 2.7). Abzugrenzen sind hier jedoch sogenannte Hedgehog-Zellen, apoptotische Zellen, mit dementsprechend großer Schweiflänge und kleinem Kometenkopf.

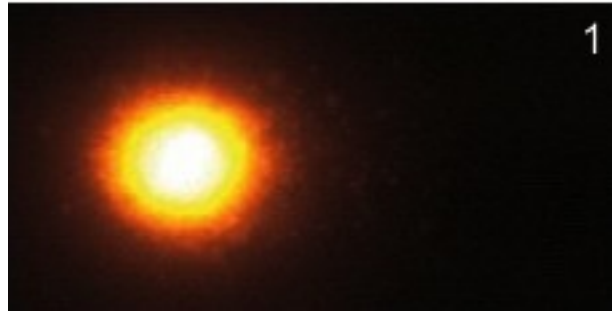


Abbildung 2.7: Mit Ethidiumbromid angefärbte HepG2-Zellen im Cometassay. Es ist keine DNA-Migration erkennbar.

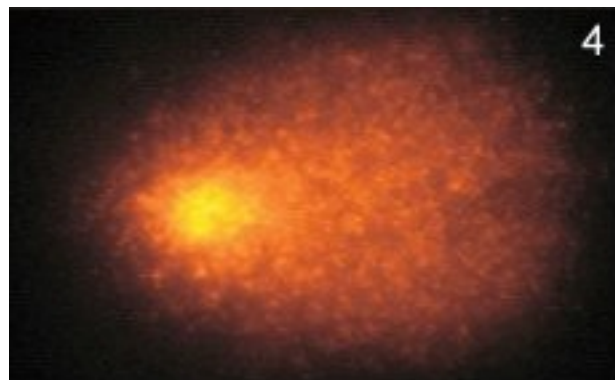
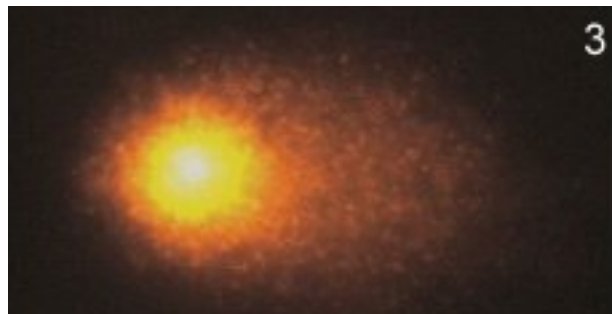


Abbildung 2.8: Mit Ethidiumbromid angefärbte HepG2-Zellen im Cometassay. Die Kometen zeigen eine zunehmende Ausprägung der DNA-Migration.

Die Sensitivität des Cometassays hängt von den pH-Bedingungen bei der Durchführung ab. In einem neutralen Milieu (pH 7-8) lassen sich lediglich Doppelstrangbrüche und Crosslinks nachweisen [ÖSTLING, JOHANSON 1984]; [FAIRBAIRN et al. 1995]. Bei einem pH-Wert zwischen 12,1 und 12,5 lassen sich Doppelstrangbrüche, Crosslinks, Einzelstrangbrüche und Exisions-Reparaturstellen detektieren [SINGH et al. 1988]. Durch eine weitere Anhebung auf einen pH-Wert größer 13 können zusätzlich alkalilabile Stellen erfasst werden, da abasische Abschnitte der DNA erst unter alkalischen Elektrophoresebedingungen Strangbrüche aufweisen [COLLINS et al. 1997]; [BRENDLER-SCHWAAB et al. 2005]. Strangbrüche, alkalilabile Stellen und Exisions-Reparaturstellen führen zu einer gesteigerten DNA-Migration [TICE et al. 2000]; [BRENDLER-SCHWAAB et al. 2005]. Quervernetzungen zwischen DNA und DNA bzw. Proteinen und DNA weisen hingegen eine verminderte Migration auf [TICE et al. 2000]; [SPEIT, HARTMANN 2004].

Je nach Elektrophoresebedingungen unterscheidet sich auch die Beschaffenheit der Kometen. Unter alkalischen Bedingungen werden die Kometen aus freien DNA-Fragmenten gebildet [KLAUDE et al. 1996]. In einem neutralen Milieu entstehen die Kometen aus gelockerten, negativ geladenen DNA-Schleifen, die sich in Richtung der Anode ausstrecken. Mit steigender Dosis der genotoxischen Substanz bilden sich Bruchstücke, die in den Kometenschweif migrieren. Hierbei ändert sich die Schweiflänge nicht signifikant, die gemessene Intensität des Schweifs nimmt jedoch zu. Insbesondere bei der neutralen Version des Cometassay erreicht die Schweiflänge ein Maximum, das trotz zunehmender DNA-Schädigung nicht überschritten wird [FAIRBAIRN et al. 1995].

Auch die Phase des Zellzyklus beeinflusst die Schweifbildung im Cometassay. In der alkalischen Einzelzellgelelektrophorese zeigen S-Phase-Zellen eine größere DNA-Migration als G1- und G2-Zellen. In dem neutralen Assay verhält sich dieser Sachverhalt umgekehrt [OLIVE, BANÁTH 1993]; [OLIVE, DURAND 2005].

Der alkalische Cometassay wird aus folgenden Gründen zunehmend in genotoxikologischen Untersuchungen eingesetzt. Mit einer relativ geringen Anzahl an Testzellen können auch geringste DNA-Schäden auf zellulärem Niveau detektiert werden. Außerdem können alle eukaryotischen Zellen für den Cometassay verwendet werden [TICE, STRAUSS 1995]; [TICE et al. 2000]; [BRENDLER-SCHWAAB et al. 2005]. Des Weiteren zeichnet sich der Cometassay als schnell durchführbares,

kostengünstiges und einfach zu handhabendes Testverfahren aus [TICE, STRAUSS 1995].

Apoptotische Zellen können mit Hilfe der Einzelzellelektrophorese nicht detektiert werden. Es lassen sich zwar Kometen mit sehr kleinem Kopf und weit gefächertem Schweif darstellen, diese sogenannten Igel-Zellen (engl. hedgehogs) besitzen jedoch die Fähigkeit, ihre DNA-Defekte zu reparieren. Sie durchlaufen also nicht den programmierten Zelltod [COLLINS 2004]. Nekrotische Zellen weisen einen großen Kopf und schmalen Schweif auf und sind nur schwer von genotoxisch geschädigten Zellen zu unterscheiden [TICE et al. 2000]. Aus diesem Grund ist eine zusätzliche Testung der eingesetzten Substanz auf Zytotoxizität sinnvoll [BRENDLER-SCHWAAB et al. 2005].

In der vorliegenden Arbeit wurde die Einzelzellelektrophorese wie von SINGH et al. (1988) beschrieben, unter Berücksichtigung der Richtlinien von KLAUDE et al. (1996) und TICE et al. (2000) und mit Modifikationen nach LAMY et al. (2004) durchgeführt.

Durchführung

Vorbereitung der Zellkultur für den Cometassay

Für die Durchführung des Cometassays wurden die HepG2-Zellen in 12er-Multiwellplatten eingesät. Dazu wurden optisch kontrollierte Zellen wie bei der Passagierung mit PBS gewaschen, mit Trypsin mobilisiert und die Reaktion mit Kulturmedium unterbrochen. Die Zellen wurden vereinzelt und anschließend die Zellzahl bestimmt. In die Vertiefungen der Multiwellplatte wurden jeweils 3×10^5 Zellen mit 2 ml Kulturmedium eingesät. Danach erfolgte die Inkubation der Platte für 24 Stunden im Wärmeschrank.

Exposition der Zellen

Für die Versuchsreihen mit Acrylamid (1,25 mM – 10 mM) und Ethanol (15 mM – 240 mM) wurden die Zellen für 24 Stunden mit je 20 µl Acrylamid bzw. je 200 µl Ethanol bei 37°C inkubiert und dann geerntet. Als Positivkontrolle wurden 20 µl Benzo[a]pyren (50 µM), als Negativkontrolle 20 µl Aqua bidest verwendet.

Bei der Kombination von Acrylamid und Ethanol erfolgte zunächst eine 24 stündige Exposition gegenüber 200 µl Ethanol (15 mM – 240 mM) und je 200 µl Aqua bidest. (Negativ-, Positiv- und Referenzkontrolle).

Nach der Entfernung des ethanolhaltigen Mediums und dem einmaligen Waschen der Zellen mit PBS wurden nochmals 2 ml Kulturmedium vorgelegt und die Zellen mit 20 µl Acrylamid (5 mM), 20 µl Benzo[a]pyren (Positivkontrolle) und 20 µl Aqua bidest. (Negativkontrolle) inkubiert. Die Exposition der Referenzkontrolle erfolgte mit 20 µl Acrylamid (5 mM). Nach weiteren 24 Stunden wurden die Zellen geerntet.

Vorbereitung der Objektträger

Zur Herstellung der Agarose-Lösungen wurde die Agarose (NMP 1%, NMP 0,7% und LMP 0,5%) unter Rühren in 120°C warmem PBS-Puffer gelöst (Volumenangaben siehe Tabelle 2.3). Vor der Verwendung wurde die jeweilige Agarose-Lösung auf 40°C temperiert.

Die angerauten Objektträger wurden zunächst gereinigt und entfettet, dazu wurden sie mehrmals mit einem Gemisch aus Ethanol und Aceton im Verhältnis 1:1 abgespült. Die vorbereitete 1% NMP-Agarose wurde auf die Objektträger aufgebracht, die anschließend für 24 Stunden in einem Inkubator bei 37°C getrocknet wurden. Die weitere Lagerung der beschichteten Objektträger erfolgte bei Raumtemperatur.

Für die zweite Agaroseschicht wurden 100µl der NMP-Agarose 0,7% auf einen Objektträger pipettiert und mit einem Deckgläschen zur besseren Verteilung abgedeckt. Die so präparierten Objektträger wurden bis zu ihrem Gebrauch, jedoch mindestens für 15 Minuten, bei 4°C aufbewahrt.

Aufarbeitung der Zellkultur

Das Kulturmedium in den Multiwellplatten wurde abgesaugt und die exponierten Zellen zweimal mit je 1 ml PBS gewaschen. Danach wurden 250 µl Trypsin in jedes Well pipettiert und die Kulturplatte für 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach mikroskopischer Kontrolle der abgelösten Zellen wurde die enzymatische Reaktion mit 750µl Kulturmedium gestoppt. Die Zellsuspensionen wurden in 10ml Kunststoffreagenzgläser überführt und durch wiederholtes Aufziehen in 2 ml Einmalspritzen mit Injektionskanüle vereinzelt.

Die folgenden Schritte der Präparation wurden unter Rotlicht durchgeführt, um weitere DNA-Schäden der Zellen durch UV-Licht zu vermeiden.

Zur Bestimmung der Zellvitalität wurde je eine Aliquot von 50µl in einem Eppendorf-Cup mit 50µl Erytrosin-B-Lösung (Volumenangaben siehe Tabelle 2.3) versetzt. Die

Zellen wurden anschließend in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Der prozentuale Anteil der ungefärbten Zellen (Erytrosin-B negative Zellen) berechnet sich wie folgt und wurde als Indikator für die Zellvitalität (% lebende Zellen) interpretiert:

$$\% \text{ lebende Zellen} = \frac{\text{Erytrosin-B negative Zellen}}{\text{Summe der ausgezählten Zellen}} \times 100$$

Um falsch positive Ergebnisse im Cometassay zu vermeiden, wurden nur Konzentrationen der Testsubstanzen untersucht, die eine Zellvitalität > 60% aufwiesen. Die verbliebene Zellsuspension wurde in den Reagenzröhrchen bei 1200 U/min und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. Danach wurde der Überstand dekantiert und das Zellpellet in 150µl LMP-Agarose (0,5%) resuspendiert. Von den vorbereiteten Objektträgern wurden die Deckgläschen entfernt und 100µl der Suspension auf die oberste Agaroseschicht pipettiert. Zur besseren Verteilung wurde diese nochmals mit Deckgläschen abgedeckt. Zur Aushärtung der LMP-Agarose wurden die Objektträger für mindestens 15 Minuten auf eine Kühlplatte mit 4°C gelegt.

Lyse

Die Deckgläschen wurden von den Objektträgern entfernt, welche dann in eine Schiefferdecker-Kammer einsortiert und mit kalter Lyse-Lösung (siehe Tabelle 2.3) versetzt wurden. Die Kammer wurde für mindestens eine Stunde im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

Elektrophorese

Die Elektrophoresekammer wurde durch ein Kühlsystem vorgekühlt und mit kaltem alkalischem Elektrophoresepuffer (Volumenangaben siehe Tabelle 2.3) gefüllt. Nach der Lyse wurden die Objektträger mit kaltem Aqua dest. abgespült und in die vorbereitete Elektrophoresekammer einsortiert.

Nach 20 Minuten erfolgte die Elektrophorese mit 300 mA und 25 V für 25 Minuten bei ca. 0°C. Die Stromstärke und die Spannung wurden durch Zugabe bzw. Entnahme des Elektrophoresepuffers eingestellt.

Neutralisation

Nach der Elektrophorese wurden die Objektträger erneut in die Schiefferdecker-Kammer, die mit Neutralisationspuffer (Tabelle 2.3) gefüllt wurde, einsortiert. Die Lagerung erfolgte im Kühlschrank bei 4°C für 10 Minuten. Danach wurden die Objektträger mit Aqua dest. gewaschen und getrocknet.

Färbung

Die Färbung erfolgte mit Ethidium-Bromid-Lösung (siehe Tabelle 2.3). Hierzu wurden je 80µl der Substanz auf die Objektträger gegeben, die wiederum mit einem Deckgläschen abgedeckt wurden. Um ein Austrocknen des Agarosegeels zu verhindern, wurden die Objektträger in einer feuchten Kammer bei 4°C gelagert und innerhalb von maximal zwei Tagen ausgewertet.

Auswertung

Die Auswertung der Objektträger wurde an einem Fluoreszenzmikroskop bei 400facher Vergrößerung vorgenommen. Dieses Mikroskop wurde mit Hilfe einer Kamera mit einem Computer verbunden, sodass die Analysierung der DNA-Schädigung durch eine Software (Comet 3.1 Europe, Kinetic Imaging) erfolgen konnte. Von jedem Objektträger wurden 102 Zellen vermessen und die ermittelten Daten in den Parametern Olive Tail Moment, Schweiflänge [µm] und Anteil der DNA im Schweif [%] erstellt.

2.2.4 Cytochrom P450 als Entgiftungssystem des Körpers

Da die Leber das Organ mit der höchsten Phase I und Phase II Enzymaktivität darstellt, wurde für die vorliegende Arbeit die humane Hepatomzelllinie HepG2 verwendet. Diese Zelllinie zeichnet sich durch ihre Enzymkompetenz unter anderem auf der Ebene der Cytochrom P450 Enzyme aus.

Cytochrome P450 (siehe Abbildung 2.9) sind Enzyme, die praktisch in allen Lebensformen vorkommen. Sie gehören zu den Hämproteinen, welche eine enzymatische oxidoreduktase Aktivität besitzen. Die unterschiedlichen Isoenzyme sind unter anderem an biosynthetischen Prozessen beteiligt. So spielen sie bei der Steroid-,

Prostaglandin-, Retinoid- und Vitamin D₃-Synthese eine Rolle. Eine besondere Bedeutung kommt ihnen jedoch in der Metabolisierung von Pharmaka oder Xenobiotika zu. Hierbei wird durch die Oxidation von Giftstoffen eine bessere Löslichkeit und damit eine leichtere Ausscheidung ermöglicht. Die Cytochrom P450 Proteine bestehen aus etwa 500 Aminosäuren. Die zentrale Struktur des Moleküls bildet das Fe-Protoporphyrin IX, das sogenannte Häm, welches als prosthetische Gruppe für das Redox-Potenzial und die Lichtabsorption bei 450 nm verantwortlich ist. Aufgrund ihrer Vielfalt erfolgt die Einteilung der Superfamilie der Cytochrome in Untergruppen. Hierbei sind vor allem CYP 1A1, CYP 1A2, CYP 2E1, CYP 2D6 und CYP 3A4 für den Menschen von besonderer Bedeutung.

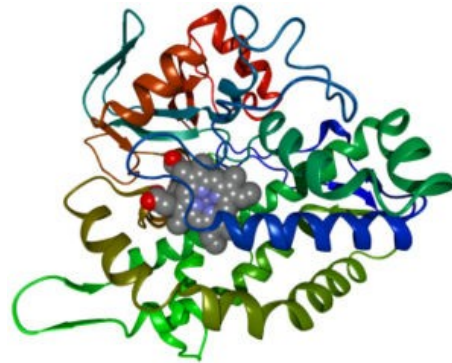


Abbildung 2.9: Cytochrom P450

2.2.5 Glutathion als wichtiges Antioxidanz

Glutathion, oder auch γ -L-Glutamyl-L-Cysteinylglycin, ist ein Peptid, welches aus den drei Aminosäuren L-Glutaminsäure, L-Cystein und Glycin synthetisiert wird. Es gehört zu den wichtigsten Antioxidantien des menschlichen Organismus und ist in den meisten Zellen in einer hohen Konzentration vorhanden. Der Synthetisierungsprozess von Glutathion verläuft in zwei Stufen, wobei beide Schritte mit einem ATP-Verbrauch einhergehen. Generell sind alle menschlichen Zellen dazu in der Lage Glutathion zu bilden, in der Leber ist dies jedoch ein wesentlicher Biosyntheseweg. In HepG2-

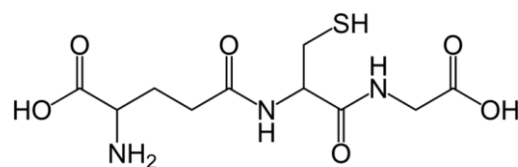
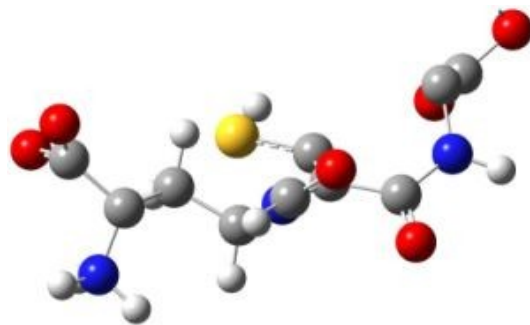


Abbildung 2.10: Schematische Darstellung der chemischen Struktur von Glutathion

Zellen können GSH-Konzentrationen von etwa 5 mM erreicht werden.

Um die spezifische Rolle des in der Leber produzierten GSH zu erfassen, wurden in-vivo-Experimente mit Gclc Knockout-Mäusen durchgeführt. Das Gclc-Gen ist essentiell für die Synthese von Glutathion. Der Ausfall der GSH-Produktion führte zu einer fortschreitenden Steatosis hepatis, mitochondrialen Schäden und letztendlich zum Leberversagen, so dass die untersuchten Mäuse nach etwa einem Monat starben [CHEN et al. 2007].

Glutathion dient als Antioxidanz zum Schutz von zellulären Makromolekülen wie Membranlipiden oder Proteinen. Es reagiert mit reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), indem es durch diese oxidiert wird. Die Reduktion von ROS erfolgt über die freie Thiolgruppe des Glutathions. Unter Ausbildung einer Disulfidbrückenbindung verbinden sich zwei oxidierte GSH-Moleküle zu Glutathion-Disulfid (GSSG). Dieses wird wiederum durch die Glutathion-Reduktase unter NADPH Verbrauch zu zwei GSH-Molekülen reduziert. Durch die Aktivität der Glutathion-Reduktase liegt GSH zu 90 % in reduzierter Form vor.

Ebenso spielt Glutathion bei der Konjugation und Detoxifikation von Fremdstoffen eine wichtige Rolle. Durch Bindung an GSH werden diese Stoffe hydrophiler und können somit besser über die Niere ausgeschieden werden. Als Antioxidans reagiert GSH besonders leicht mit elektrophilem Kohlenstoff, wobei diese Reaktion durch die im Zytosol vorliegende Glutathion-S-Transferase katalysiert wird. Bei der Reduktion können sowohl Halogen-, Sulfat-, Sulfonat-, Phosphat- als auch Nitro-Gruppen durch Glutathion substituiert werden. Des Weiteren kann GSH an Doppelbindungen additiv binden und so zum Beispiel Epoxidringstrukturen öffnen.

Glutathion hat also als konzentriertestes, zelluläres Antioxidans eine Schlüsselfunktion in der Abwehr von Zellschäden durch oxidativen Stress.

2.2.6 Glutathion Messung

Grundlagen

Glutathion (GSH), auch γ -L-Glutamyl-L-Cysteinylglycin, ist ein Tripeptid, das in fast allen Zellen der Flora und Fauna vorhanden ist [ARIAS 1976]. GSH dient der

Glutathion-S-Transferase als Co-Substrat für die Detoxifikation von Fremdstoffen. Als Antioxidans fungiert Glutathion als Abwehrmechanismus gegen oxidativen Stress [INOUE et al. 1987]. Es ist ein essentieller Elektronendonator für die Reduktion von Hydroperoxiden durch die Glutathionperoxidase und ist beteiligt an dem Transport von Aminosäuren. Leberzellen gehören zu den Zellen mit der höchsten Glutathionkonzentration [WENDEL, CIKRYT 1981]; [LASH, JONES 1985].

Für die Messung der Glutathionkonzentration wurde ein Test-Kit eingesetzt. Das Testsystem basiert auf der Bestimmung der GSH-Konzentration durch Verwendung der Glutathionreduktase. Die Sulphydrylgruppe des Glutathions reagiert mit 5,5'-Dithiobis-2-Nitrobenzoesäure (DTNB) zu 5-Thio-2-Nitrobenzoesäure (TNB), welche eine gelbe Farbe aufweist. Bei dieser Reaktion entsteht zunächst in einem Zwischenschritt das Disulfid GSTNB, welches sich aus GSH und TNB bildet. Dieses GSTNB wird durch die Glutathionreduktase zu GSH und TNB reduziert (siehe Abbildung 2.11). Bei der Reduktion von Hydroperoxiden durch die Glutathionperoxidase entsteht Glutathiondisulfid (GSSG), welches durch die Glutathionreduktase zu GSH reduziert wird. Das Testsystem erfasst demnach die Gesamtkonzentration von Glutathion.

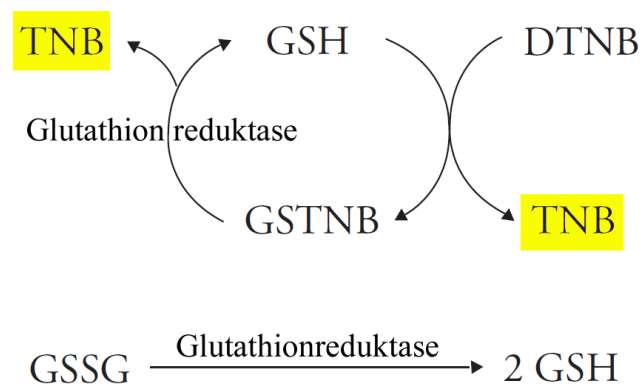


Abbildung 2.11: Schematische Darstellung der GSH-Methodik

Die Durchführung der GSH-Messung erfolgte nach Anleitung des Herstellers. Die verwendeten Chemikalien waren Bestandteil des Test-Kits und wurden nach Anweisung zum Teil mit Aqua dest. versetzt.

Die einzelnen Testungen wurden unabhängig voneinander durchgeführt.

Durchführung

Vorbereitung der Zellkultur für die GSH-Messung

Die Zellen wurden wie bei den Vorbereitungen für den Cometassay behandelt. Für die GSH-Messung wurden jedoch 1×10^6 Zellen mit 5 ml Kulturmedium in eine Zellkulturflasche T₂₅ (25 cm²) eingesät und ebenfalls für 24 Stunden bei 37°C inkubiert.

Exposition der Zellen

Für die Glutathion-Messung wurden die 15 mM, 60 mM und 240 mM Ethanollösungen und die Kombination dieser Konzentrationen mit Acrylamid 5 mM verwendet. Analog zum Cometassay wurden die Kontrollen gewählt und die Exposition der Zellen durchgeführt.

Probenaufbereitung

Die Zellen wurden mit Hilfe eines weichen Zellschabers geerntet und zusammen mit dem Kulturmedium in Kunststoffreagenzgläser überführt. Diese wurden mit 2.000 U/min bei 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Zellpellet in 300 µl kaltem PBS resuspendiert. Die Suspension wurde in ein Eppendorf-Cup überführt und auf Eis mit Ultraschallimpulsen über einen Zeitraum von 50 Sekunden lysiert. Anschließend wurde die Suspension mit 16.000 U/min bei 4°C für 20 Minuten zentrifugiert und 250µl des Überstandes in ein neues Eppendorf-Cup pipettiert.

Deproteinierung der Proben

Zu den auf Eis gelagerten Proben wurde je 250µl Metaphosphorsäurelösung hinzupipettiert und anschließend gemischt. Die Inkubation erfolgte für 5 Minuten bei Raumtemperatur. Danach wurden die Proben für 5 Minuten mit 2.000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut in ein Eppendorf-Cup überführt.

Messung

Zur Durchführung der Messung wurden zunächst die Standards mit einer Glutathionkonzentration von 0 µmol/L, 0,5 µmol/L, 2 µmol/L, 8 µmol/L und 16 µmol/L hergestellt und 50 µl in je ein Well pipettiert und abgedeckt. 47,5 µl jeder Probe wurden mit je 2,5 µl Triethylamin (4M) versetzt und gemischt. Danach wurden die Negativkontrolle und die 15 mM Ethanol-Probe im Verhältnis 1:4, alle anderen Proben

im Verhältnis 1:2 mit dem MES-Puffer verdünnt. Nun wurden ebenfalls 50 µl der Proben in die Wells überführt. Aus den mitgelieferten Chemikalien (MES-Puffer, Cofaktor-Mix, Enzym-Mix und DTNB) und Aqua dest. wurde nach Anleitung der Assay-Cocktail hergestellt. Es wurden 150µl des Assay-Cocktails pro Well zu den Standards und den Proben hinzugefügt. Anschließend wurde die Absorbtion bei 410nm über 30 Minuten alle 5 Minuten gemessen.

Für die Auswertung der Messergebnisse wurde mit dem 0 µM GSH-Standard ein Hintergrundwert ermittelt. Dieser wurde vor den weiteren Berechnungen von den Absorbtionswerten der Standards und der Proben subtrahiert.

Aus den Absorbtionsmittelwerten der Standards mit definierten GSH-Konzentrationen wurde eine Kalibrierfunktion (Abbildung 2.9) für die Auswertung der Messergebnisse erstellt. Hierzu wurden die 2 µM, 8 µM und 16 µM Standards verwendet, da diese das Absorbtionsspektrum der Proben abdeckten. Das Bestimmtheitsmaß lag bei $R^2=1$.

Für die weitere Auswertung wurde zunächst die GSH-Konzentration der verdünnten Proben mit Hilfe der Kalibrierfunktion ermittelt. Danach wurde die tatsächliche GSH-Konzentration unter Berücksichtigung der Verdünnungsfaktoren berechnet.

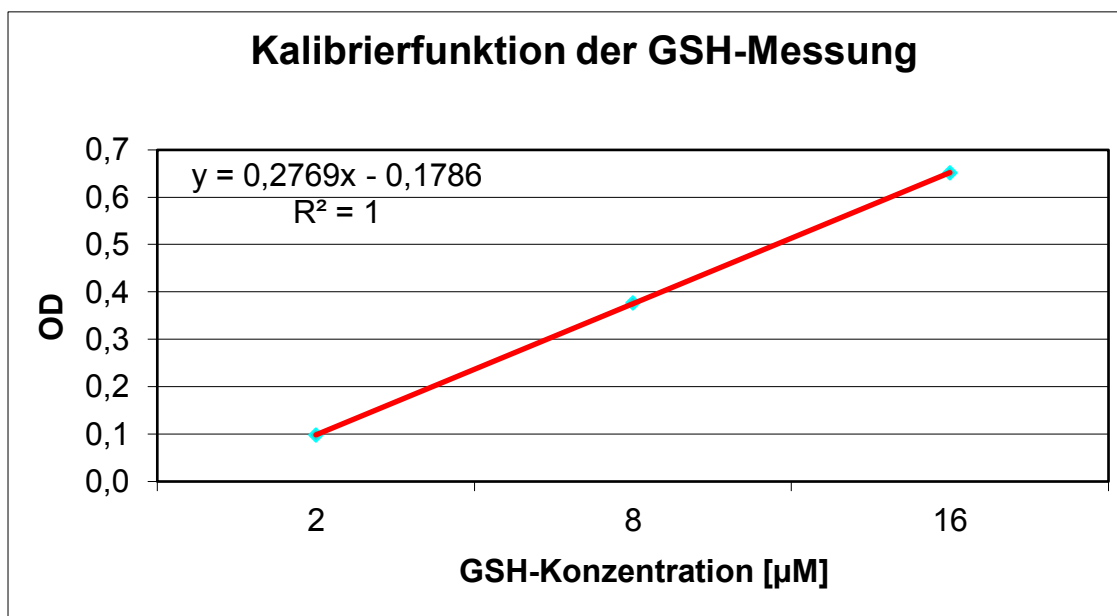


Abbildung 2.12 : Kalibrierfunktion der Gluthationmessung (n=3)

2.2.7 Apoptose-Messung

Grundlagen

Für die Apoptose-Messung wurde ein ssDNA (engl. single stranded DNA) Test-Kit verwendet. Das Testprinzip basiert auf der selektiven Denaturierung von DNA in apoptotischen Zellen durch Formamid. Die DNA von nekrotischen Zellen oder von Zellen mit nicht-apoptotischen Strangbrüchen wird von Formamid nicht denaturiert. Diese Differenzierung ist aufgrund apoptosetypischer Veränderungen des Chromatins möglich. Hierbei stehen vor allem die Chromatinkondensation und die Digestion von DNA stabilisierenden Proteinen im Vordergrund [FRANKFURT, KRISHAN 2001b]. Diese denaturierte Einzelstrang-DNA (ssDNA) wird mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers detektiert [FRANKFURT, KRISHAN 2001a].

Die Durchführung der ssDNA-Apoptose-Messung erfolgte nach Anleitung des Herstellers. Substanzen, die nicht in der obigen Chemikalienliste aufgeführt sind, stammen aus dem Test-Kit.

Die Testungen erfolgten unabhängig voneinander.

Durchführung

Vorbereitung der Positivkontrolle

Für die Positivkontrolle wurden je 100µl der mitgelieferten Kontrolllösung in ein Well einer 96er-Wellplatte pipettiert. Danach erfolgte die Trocknung der Platte in einem Inkubator bei 37°C für mindestens 12 Stunden.

S1 Nuklease als Kontrolle

Da bei allen Zellen, auch bei unbehandelten, die Möglichkeit der spontanen Apoptose besteht, sollte bei den Versuchsreihen eine S1-Kontrolle zusätzlich zur Lösungsmittelkontrolle angesetzt werden. Die S1 Nuklease ist eine Unspezifische Endonuklease, welche den Abbau einzelsträngiger Nukleinsäuren zu Oligonukleotiden und 5'-Mononukleotiden katalysiert. Dies stellt die ssDNA-Spezifität des monoklonalen Antikörpers sicher.

Vorbereitung der Zellkultur für die Apoptose-Messung

Die Vorbereitung der Zellen erfolgte analog zum Cometassay. Es wurden jedoch 1×10^5 Zellen mit 100 μ l Kulturmedium pro Well einer 96er Wellplatte eingesät und für 24 Stunden bei 37 °C inkubiert.

Exposition der Zellen

Die Messung der Apoptose erfolgte bei Acrylamidkonzentrationen von 1,25 mmol/L, 2,5 mmol/L, 5 mmol/L und 10 mmol/L sowie der Kombination von 5 mM Acrylamid mit 15 mM, 60 mM und 240 mM Ethanollösungen. Die Wahl der Negativ- und Referenzkontrollen sowie die Exposition der Zellen erfolgte dem Cometassay entsprechend.

Probenaufbereitung

Nach Ende der Expositionszeit wurden die Zellen in einer Ultrazentrifuge bei 200 G für 5 Minuten zentrifugiert. Danach wurde das Kulturmedium abgesaugt und je 200 μ l der Fixationslösung (siehe Tabelle 2.3) in die Wells gegeben. Die anschließende Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur für 30 Minuten. Das Fixiermedium wurde entfernt und die Platte für mindesten zwei Stunden bei Raumtemperatur getrocknet. Danach wurden je 50 μ l Formamid in die Wells gegeben und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Denaturierung der DNA erfolgte die weitere Lagerung in einem Wärmeschrank bei 75°C für 20 Minuten. Nach einer fünfminütigen Inkubation im Kühlschrank wurde das Formamid wieder entfernt. Auf die für die S1-Kontrolle vorgesehenen Zellen wurden nun je 100 μ l S 1 Nuklease gegeben und für 30 Minuten bei 37 °C exponiert. An dieser Stelle wurde die Positivkontrolle parallel zu den anderen Proben aufbereitet. Die Positivkontrolle wurde einmalig, alle anderen Wells wurden drei Mal mit PBS gewaschen. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren wurden in alle Wells 200 μ l der Milchlösung (siehe Tabelle 2.3) pipettiert und für 1 Stunde bei 37 °C gelagert. Danach wurde die Milch abgesaugt und je 100 μ l der Antikörpermixtur in die Wells gegeben. Eine weitere Inkubation erfolgte für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Zellen dreimalig mit je 250 μ l des Waschpuffers behandelt. Nach der Zugabe von je 100 μ l ABTS-Lösung und 30minütiger Inkubation im Dunkeln wurde die Reaktion durch Zufügen von 100 μ l der Stop-Lösung unterbrochen.

Messung

Die Erfassung der Apoptose erfolgte mit Hilfe eines ELISA, wobei die Absorption bei 410 nm gemessen wurde.

3 Ergebnisse

Die Ergebnisse der Untersuchungen zur Gentoxizität von Acrylamid in Abhängigkeit von der Cytochrom P450 2E1 Aktivität werden nachfolgend im Einzelnen vorgestellt. Die Darstellung erfolgt größtenteils in Form von Balkendiagrammen, welche mit Hilfe des Microsoft Programms Excel 2000 und 2007 erstellt wurden. Die Berechnungen der arithmetischen Mittelwerte, der Standardabweichungen und die Ermittlungen der Signifikanzniveaus wurden ebenfalls mit dieser Software durchgeführt. Für den Nachweis der statistischen Signifikanz wurde der t-Test nach Student herangezogen, welcher beidseitig angewendet wurde. Ein Signifikanzniveau $\leq 0,05$ wurde mit * , ein Signifikanzniveau $\leq 0,01$ mit ** gekennzeichnet.

Parallel zur graphischen Darstellung erfolgte die tabellarische Aufarbeitung der Versuchsergebnisse. Die Tabellen beinhalten demnach die in den Diagrammen dargestellten Mittelwerte, Standardabweichungen und Ergebnisse des t-Tests.

3.1 Ergebnisse der Einzelzellelektrophorese

Für den Cometassay wurden drei Versuchsreihen unabhängig voneinander durchgeführt. Die erfassten Endpunkte der alkalischen Einzelzellelektrophorese sind sowohl der Olive Tail Moment (OTM), welcher parallel mit der Zellvitalität dargestellt wurde, als auch die Schweiflänge (tail length, TL).

Der OTM ist das Produkt aus Schweiflänge und relativer Schweifintensität [OLIVE et al. 1990]:

$$| m_K m_S | \times DNA_{\text{Schweif}}$$

$| m_K m_S |$ beschreibt den Abstand zwischen Massenmittelpunkt des Kometenkopfes und Massenmittelpunkt des Schweifes (vgl. Abbildung 3.1).

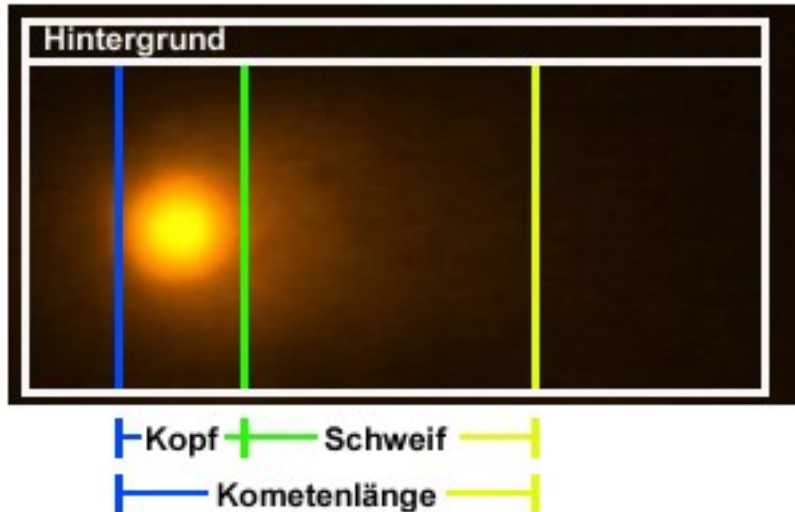


Abbildung 3.1: Auswertung der Kometen mit der Software Comet 3.1 Europe, Kinetic Imaging. Einteilung des Kometen in Kopf und Schweif, sowie Definition des Hintergrundes

Der OTM kombiniert folglich Informationen über die Schweiflänge und Schweifintensität.

Als Referenzpunkt für die Berechnung der Signifikanz diente in den Einzeltestungen die Negativ- bzw. Lösungsmittelkontrolle, in den Kombinationstestungen die Referenzkontrolle.

3.1.1 DNA schädigender Effekt von Acrylamid

Das Balkendiagramm der Abbildung 3.2 stellt den OTM nach 24stündiger Exposition der HepG2-Zellen gegenüber Acrylamid dar. Die Acrylamidproben (1,25 mM – 10 mM) zeigten einen konzentrationsabhängigen Anstieg der DNA-Migration in den HepG2-Zellen. Dieser Anstieg war ab einer Konzentration von 2,5 mM Acrylamid signifikant gegenüber der Negativkontrolle. Die höchste Acrylamidkonzentration (10 mM) induzierte eine 8-fach erhöhte DNA-Migration im Vergleich zu Aqua dest. (siehe Tabelle 3.1).

Tabelle 3.1: OTM nach 24stündiger Exposition der HepG2-Zellen gegenüber Acrylamid 1,25 mM - 10 mM (n=3)

	Mittelwert	Standardabweichung	t-Test
Aqua dest.	0,611	0,220	
1,25 mM AA	1,074	0,258	0,079
2,5 mM AA	1,940	0,546	0,037
5 mM AA	2,791	0,256	0,000
10 mM AA	4,988	0,477	0,001
B[a]P 50µM	4,302	0,781	0,010

Die in Abbildung 3.2 dargestellte Linie zeigt die Zellvitalität und damit auch die Zytotoxizität der Acrylamidproben nach 24stündiger Exposition der HepG2-Zellen. Es ließ sich eine konzentrationsabhängige Abnahme der lebenden Zellen nachweisen. Die stärkste Zyotoxizität wies Acrylamid in der Konzentration 10 mM auf. Hierbei lebten nach der Exposition noch $69,03 \% \pm 2,71 \%$ der Zellen. Die Standardabweichungen der unabhängigen Messungen lagen unter $\pm 5 \%$ (vgl. Tabelle 3.2).

Tabelle 3.2: Zellvitalität [%] nach 24stündiger Exposition der HepG2-Zellen gegenüber Acrylamid 1,25 mM – 10 mM (n=3)

	Mittelwert	Standardabweichung
Aqua dest.	94,33	0,71
1,25 mM AA	86,10	4,04
2,5 mM AA	76,50	2,10
5 mM AA	72,27	3,67
10 mM AA	69,03	2,71
B[a]P 50µM	82,27	2,03

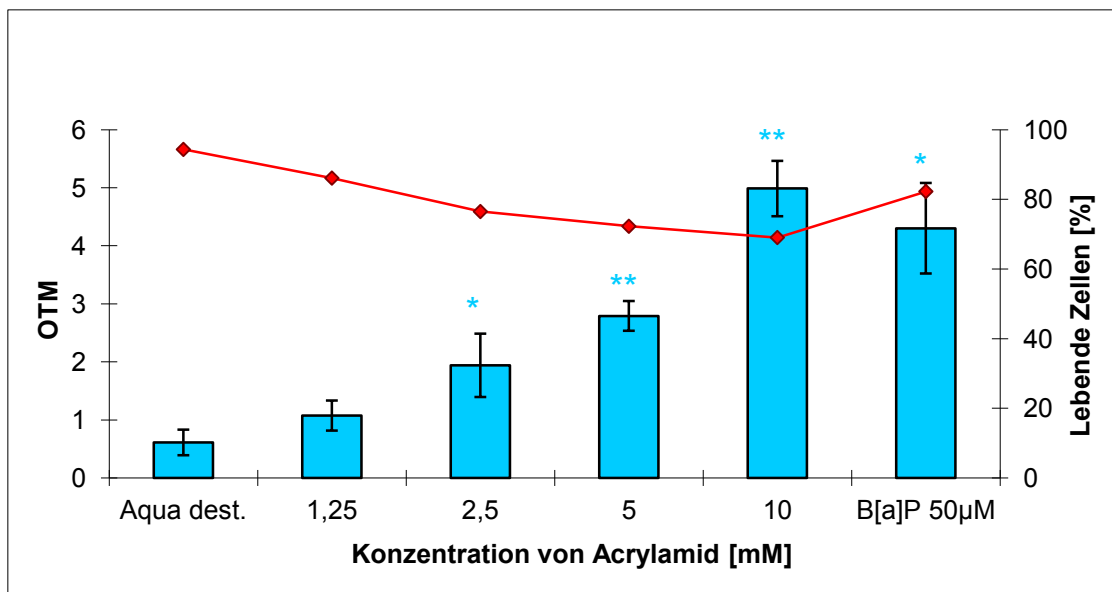


Abbildung 3.2: DNA schädigende Effekte von Acrylamid 1,25 mM – 10 mM nach 24stündiger Exposition der HepG2-Zellen. Darstellung der Parameter OTM (Balken) und Zellvitalität (Linie) (n=3, * p≤0,05, ** p≤0,01).

Auch der Parameter tail length (TL) zeigte einen konzentrationsabhängigen Verlauf (siehe Abbildung 3.3). So ließ sich bei einer Acrylamidkonzentration von 10 mM eine mit $46,85 \mu\text{M} \pm 3,01 \mu\text{M}$ 4-fach erhöhte Schweiflänge im Vergleich zur Negativkontrolle messen (Tabelle 3.3). Ab einer Konzentration von 2,5 mM Acrylamid konnte ein signifikanter Anstieg der Schweiflänge in Bezug auf Aqua dest. nachgewiesen werden.

Tabelle 3.3: Tail length, TL [μm] nach 24stündiger Exposition der HepG2-Zellen gegenüber Acrylamid 1,25 mM – 10 mM (n=3)

	Mittelwert	Standardabweichung	t-Test
Aqua dest.	10,598	2,039	
1,25 mM AA	14,592	2,799	0,123
2,5 mM AA	27,307	3,746	0,006
5 mM AA	33,585	2,832	0,001
10 mM AA	46,846	3,012	0,000
B[a]P 50µM	50,415	5,768	0,003

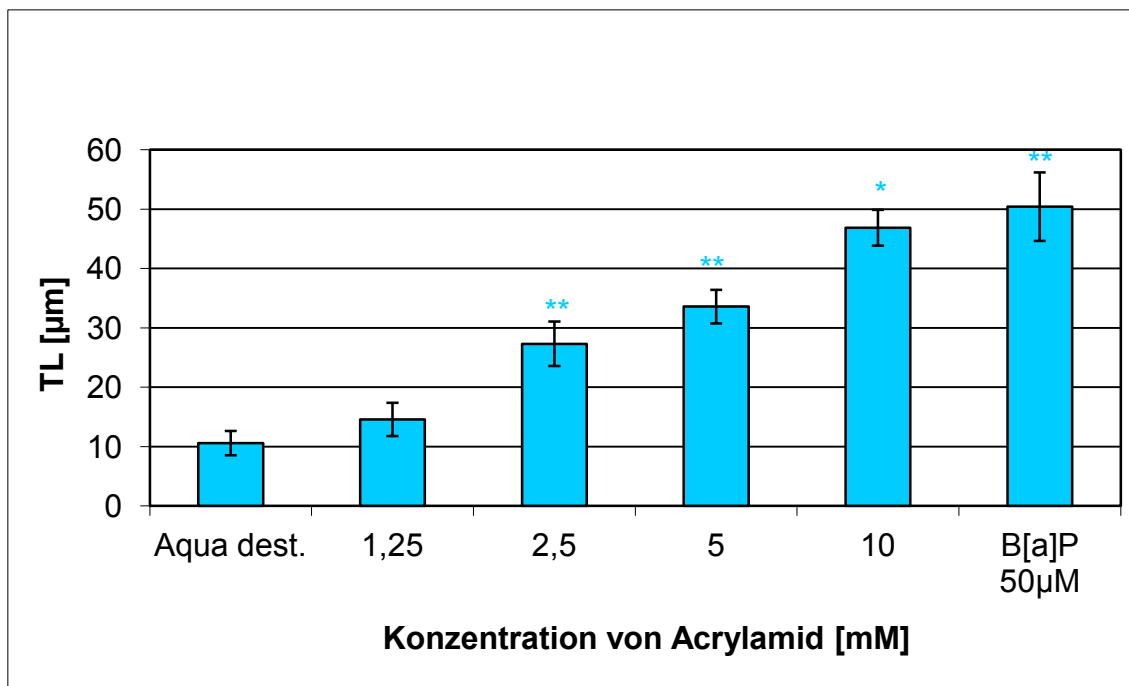


Abbildung 3.3: Einfluss von Acrylamid 1,25 mM – 10 mM auf die im Cometassay gemessene Schweiflänge nach 24stündiger Exposition der HepG2-Zellen (n=3, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$).

3.1.2 DNA schädigender Effekt von Ethanol

In Abbildung 3.4 wird der OTM nach 24stündiger Exposition der HepG2-Zellen mit Ethanol als Balkendiagramm dargestellt. Ethanol zeigte in den Konzentrationen 15 mM – 240 mM eine marginale, konzentrationsunabhängige Induktion der DNA-Migration. Das höchste DNA schädigende Potenzial wies eine Ethanolkonzentration von 120 mM auf. Der OTM lag bei $0,95 \pm 0,16$ im Vergleich zu einem OTM von $0,53 \pm 0,09$ bei der Negativkontrolle und einem OTM von $4,66 \pm 0,65$ bei der Positivkontrolle (siehe Tabelle 3.4). Die abgebildeten Signifikanzen lassen sich durch die sehr geringen Standardabweichungen erklären.

Tabelle 3.4: OTM nach 24stündiger Exposition der HepG2-Zellen gegenüber Ethanol 15 mM – 240 mM (n=3)

	Mittelwert	Standardabweichung	t-Test
Aqua dest.	0,535	0,098	
15 mM EtOH	0,777	0,069	0,030
30 mM EtOH	0,867	0,087	0,012
60 mM EtOH	0,899	0,086	0,009
120 mM EtOH	0,959	0,168	0,029
240 mM EtOH	0,815	0,011	0,037
B[a]P 50 µM	4,667	0,650	0,007

Die Zellvitalität der Ethanolproben nach 24stündiger Exposition der HepG2-Zellen wurde in Abbildung 3.4 als Linie dargestellt, es zeigte sich ein konzentrationsabhängiger Verlauf. Die höchste Ethanolkonzentration wies mit 68,10 % \pm 1,35 % die stärkste Zytotoxizität auf. Die Standardabweichungen der Messungen lagen unter \pm 3 % (vgl. Tabelle 3.5).

Tabelle 3.5: Zellvitalität [%] nach 24stündiger Exposition der HepG2-Zellen gegenüber Ethanol 15 mM – 240 mM (n=3)

	Mittelwert	Standardabweichung
Aqua dest.	94,37	0,67
15 mM EtOH	88,37	2,21
30 mM EtOH	85,37	0,50
60 mM EtOH	76,10	0,98
120 mM EtOH	70,27	1,89
240 mM EtOH	68,10	1,35
B[a]P 50 µM	81,10	2,44

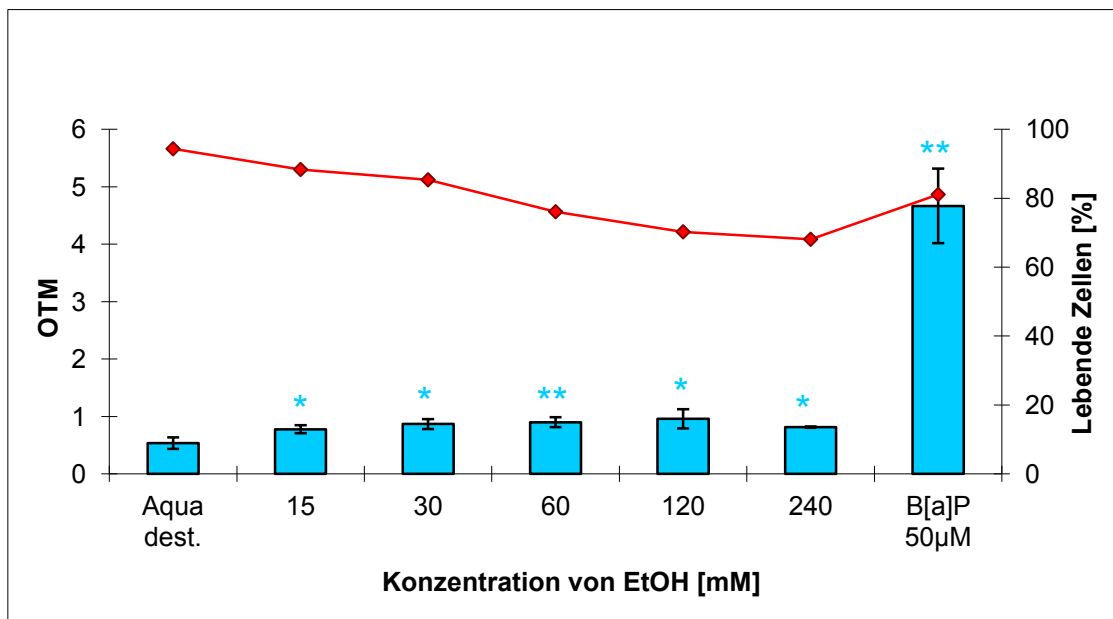


Abbildung 3.4: DNA schädigende Effekte von Ethanol 15 mM – 240 mM nach 24stündiger Exposition der HepG2-Zellen. Darstellung der Parameter OTM (Balken) und Zellvitalität (Linie) (n=3, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$).

Der Parameter tail length wies, ebenso wie der OTM, einen konzentrationsunabhängigen Verlauf auf (siehe Abbildung 3.5). Den größten Einfluss auf die Schweiflänge hatte mit $13,27 \mu\text{m} \pm 0,73 \mu\text{m}$ eine Ethanolkonzentration von 120 mM. Die Negativkontrolle zeigte eine Schweiflänge von $10,18 \mu\text{m} \pm 1,42 \mu\text{m}$ während die Positivkontrolle mit $52,41 \mu\text{m} \pm 4,62 \mu\text{m}$ einen 5-fach höheren Wert erzielte (vgl. Tabelle 3.6). Signifikanzen ließen sich, bei minimalen Standardabweichungen, erst ab einer Ethanolkonzentration von 120 mM nachweisen.

Tabelle 3.6: Tail length, TL [μm] nach 24stündiger Exposition der HepG2-Zellen gegenüber Ethanol 15 mM – 240 mM (n=3)

	Mittelwert	Standardabweichung	t-Test
Aqua dest.	10,176	1,419	
15 mM EtOH	11,830	1,075	0,188
30 mM EtOH	12,225	0,509	0,117
60 mM EtOH	12,559	1,114	0,088
120 mM EtOH	13,271	0,726	0,044
240 mM EtOH	13,232	1,085	0,045
B[a]P 50 μM	52,405	4,623	0,002

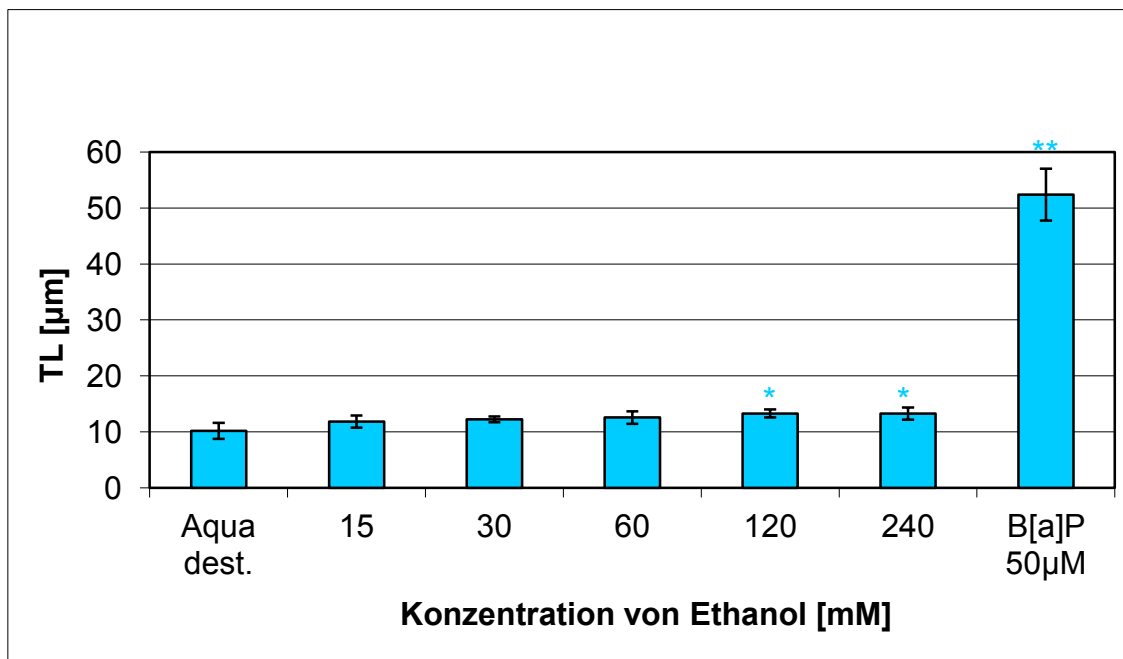


Abbildung 3.5: Einfluss von Ethanol 15 mM – 240 mM auf die im Cometassay gemessene Schweiflänge nach 24stündiger Exposition der HepG2-Zellen (n=3, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$).

3.1.3 Verstärkung des DNA schädigenden Potenzials von Acrylamid durch Ethanol

Die Vorbehandlung der HepG2-Zellen mit Ethanol erhöhte die Genotoxizität von Acrylamid, wobei diese Verstärkung eine Abhängigkeit von der Ethanolkonzentration aufwies. Wie in Abbildung 3.6 dargestellt, zeigten HepG2-Zellen, die 24 Stunden gegenüber 120 mM Ethanol und weitere 24 Stunden mit Acrylamid 5 mM exponiert wurden, einen OTM von $4,32 \pm 0,45$. Verglichen mit den Zellen der Referenzkontrolle, welche lediglich mit Acrylamid exponiert wurden (OTM $1,91 \pm 0,33$), ließ sich ein mehr als 2-facher Anstieg der DNA-Migration nachweisen. Nach einer Vorbehandlung der HepG2-Zellen mit 240 mM Ethanol ließ sich, mit einem OTM von $3,80 \pm 0,59$, ein leichter Rückgang der DNA-Migration beobachten. Die Negativ- und Positivkontrolle induzierten einen OTM von $0,59 \pm 0,11$ bzw. $3,81 \pm 0,62$ (siehe Tabelle 3.7). Ab einer Ethanolkonzentration von 60 mM zeigte sich eine signifikante Induktion der DNA-Migration im Vergleich zur Referenzkontrolle.

Tabelle 3.7: OTM nach 24stündiger Exposition der HepG2-Zellen gegenüber Ethanol 15 mM – 240 mM und anschließender Inkubation mit Acrylamid 5 mM für weitere 24 Stunden (n=3)

	Mittelwert	Standardabweichung	t-Test
Aqua dest.	0,594	0,110	0,013
Referenz AA 5mM	1,908	0,325	
15 mM EtOH + AA 5mM	2,447	0,689	0,312
30 mM EtOH + AA 5mM	3,255	0,812	0,087
60 mM EtOH + AA 5mM	3,750	0,307	0,002
120 mM EtOH + AA 5mM	4,324	0,448	0,002
240 mM EtOH + AA 5mM	3,861	0,593	0,014
B[a]P 50µM	3,803	0,624	0,018

Es zeigte sich eine konzentrationsabhängige Zunahme der Zytotoxizität (vgl. Abbildung 3.6). Die Referenzkontrolle mit einer Acrylamidkonzentration von 5 mM ließ eine Zellvitalität von $82,47 \% \pm 8,46 \%$ beobachten. Die niedrigste Zellvitalität wies mit

70,17 % ± 11,21 % eine kombinierte Exposition mit 240 mM Ethanol und 5 mM Acrylamid auf (Tabelle 3.8).

Tabelle 3.8: Zellvitalität [%] nach 24stündiger Exposition der HepG2-Zellen gegenüber Ethanol 15 mM – 240 mM und anschließender Inkubation mit Acrylamid 5 mM für weitere 24 Stunden (n=3)

	Mittelwert	Standardabweichung
Aqua dest.	95,33	1,31
Referenz AA 5mM	82,47	8,46
15 mM EtOH + AA 5mM	80,03	10,58
30 mM EtOH + AA 5mM	77,30	9,70
60 mM EtOH + AA 5mM	75,47	10,03
120 mM EtOH + AA 5mM	72,70	8,80
240 mM EtOH + AA 5mM	70,17	11,21
B[a]P 50µM	82,27	1,86

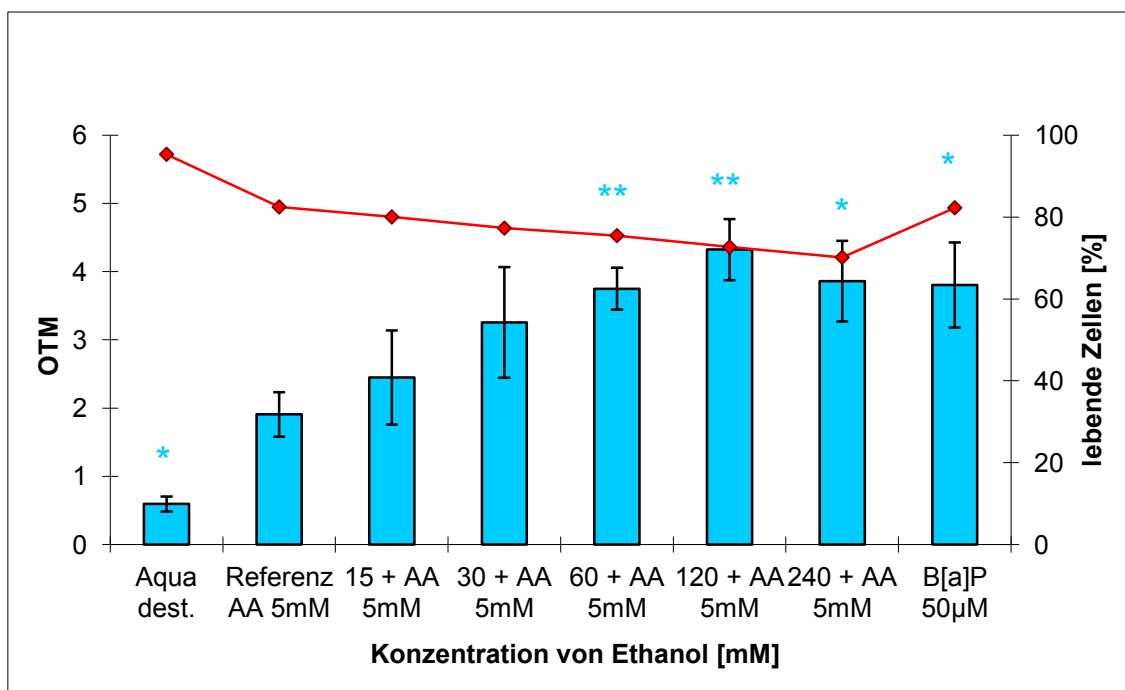


Abbildung 3.6: Verstärkung des DNA schädigenden Effekts von 5 mM Acrylamid durch 24stündige Vorbehandlung der HepG2-Zellen mit Ethanol 15 mM – 240 mM. Darstellung der Parameter OTM (Balken) und Zellvitalität (Linie) (n=3, * p ≤ 0,05, ** p ≤ 0,01).

Wie auch bei der Betrachtung des OTM und der Zellvitalität zeigte sich eine von der Ethanolkonzentration abhängige Zunahme der Schweiflänge (Abbildung 3.7). Den größten Einfluss, verglichen mit der tail length der Referenzkontrolle, hatte eine Vorbehandlung der HepG2-Zellen mit 120 mM Ethanol. Hierbei konnte eine Schweiflänge von $41,53 \mu\text{m} \pm 6,59 \mu\text{m}$ im Gegensatz zu $23,75 \mu\text{m} \pm 6,45 \mu\text{m}$ bei der Referenzkontrolle gemessen werden (siehe Tabelle 3.9). Dies entspricht einer Zunahme der Schweiflänge von etwa 75 % und ist damit signifikant größer als die Referenz.

Tabelle 3.9: Tail length, TL [μm] nach 24stündiger Exposition der HepG2-Zellen gegenüber Ethanol 15 mM – 240 mM und anschließender Inkubation mit Acrylamid 5 mM für weitere 24 Stunden (n=3)

	Mittelwert	Standardabweichung	t-Test
Aqua dest.	10,180	2,461	0,053
Referenz AA 5mM	23,748	6,448	
15 mM EtOH + AA 5mM	29,654	10,298	0,456
30 mM EtOH + AA 5mM	34,569	9,511	0,188
60 mM EtOH + AA 5mM	37,520	6,556	0,060
120 mM EtOH + AA 5mM	41,533	6,582	0,029
240 mM EtOH + AA 5mM	39,729	7,800	0,054
B[a]P 50μM	38,078	8,013	0,076

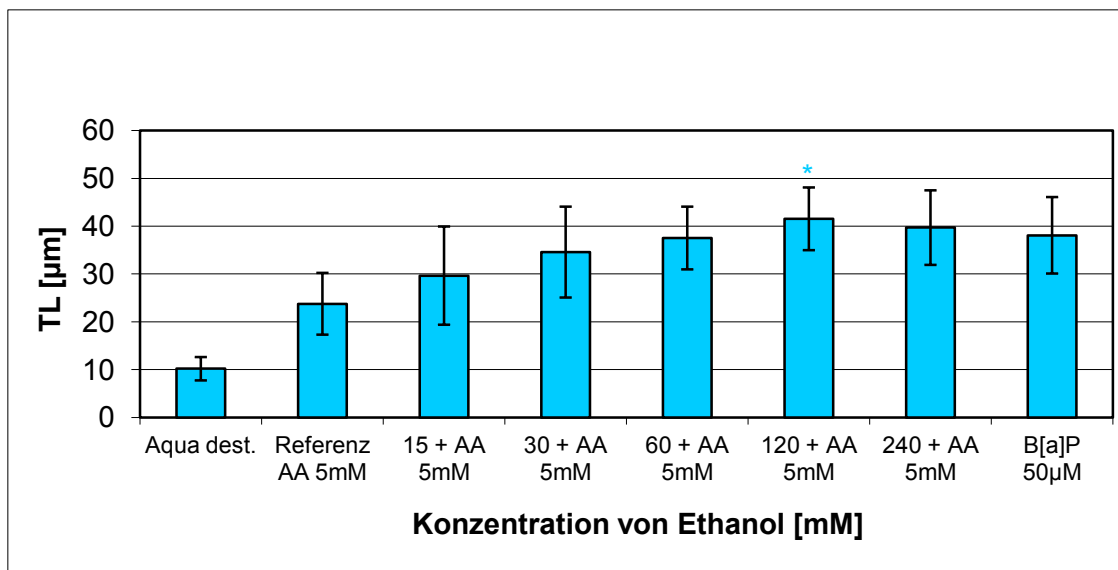


Abbildung 3.7: Zunahme der im Cometassay gemessenen Schweiflänge durch 24stündige Vorbehandlung der HepG2-Zellen mit Ethanol 15 mM – 240 mM, verglichen mit 5 mM Acrylamid (n=3, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$)

3.2 Ergebnisse der Glutathion-Messung

Im Rahmen der Glutathion-Messung wurden drei unabhängige Testreihen in Doppelbestimmung untersucht. Aus den mit dem ELISA gemessenen Absorptionswerten wurden mit Hilfe der Kalibrierfunktion (siehe Abbildung 2.9) die GSH-Konzentrationen der Proben bestimmt.

Die Berechnung der Signifikanzniveaus wurde in den Einzeltestungen gegen die Negativ- bzw. Lösungsmittelkontrolle, in den Kombinationstestungen gegen die Referenzkontrolle durchgeführt.

3.2.1 Auswirkungen von Ethanol auf die GSH-Konzentration in HepG2-Zellen

Die Modulation des intrazellulären GSH-Levels durch Ethanol ist in Tabelle 3.10 dargestellt. In den Zellen der Negativkontrolle lag die Glutathionkonzentration bei $4,87 \mu\text{M} \pm 0,99 \mu\text{M} / 10^6$ Zellen. Eine Exposition gegenüber 240 mM Ethanol reduzierte das GSH-Level um zwei Drittel, auf $1,25 \mu\text{M} \pm 0,56 \mu\text{M} / 10^6$ Zellen.

Tabelle 3.10: GSH-Konzentration [$\mu\text{M} / 10^6$ Zellen] nach 24stündiger Exposition der HepG2-Zellen gegenüber Ethanol 15 mM – 240 mM (n=3)

	Mittelwert	Standardabweichung
Aqua dest.	4,865	0,989
15 mM EtOH	3,892	1,005
60 mM EtOH	2,216	0,541
240 mM EtOH	1,254	0,558

Die Abbildung 3.8 veranschaulicht die Depletion der Glutathionkonzentration durch Ethanol 15 mM – 240 mM in prozentualem Bezug auf die Negativkontrolle. Das GSH-Level wurde in Abhängigkeit von der Ethanolkonzentration signifikant gesenkt. Die

Exposition mit 240 mM Ethanol reduzierte die GSH-Konzentration um etwa die Hälfte auf 46 %, verglichen mit der Negativkontrolle (siehe Tabelle 3.11).

Tabelle 3.11: GSH-Konzentration [% zur Negativkontrolle] nach 24stündiger Exposition der HepG2-Zellen gegenüber Ethanol 15 mM – 240 mM (n=3)

	Mittelwert	Standardabweichung	t-Test
Aqua dest.	100%	0%	
15 mM EtOH	86%	2%	0,010
60 mM EtOH	64%	7%	0,012
240 mM EtOH	46%	9%	0,008

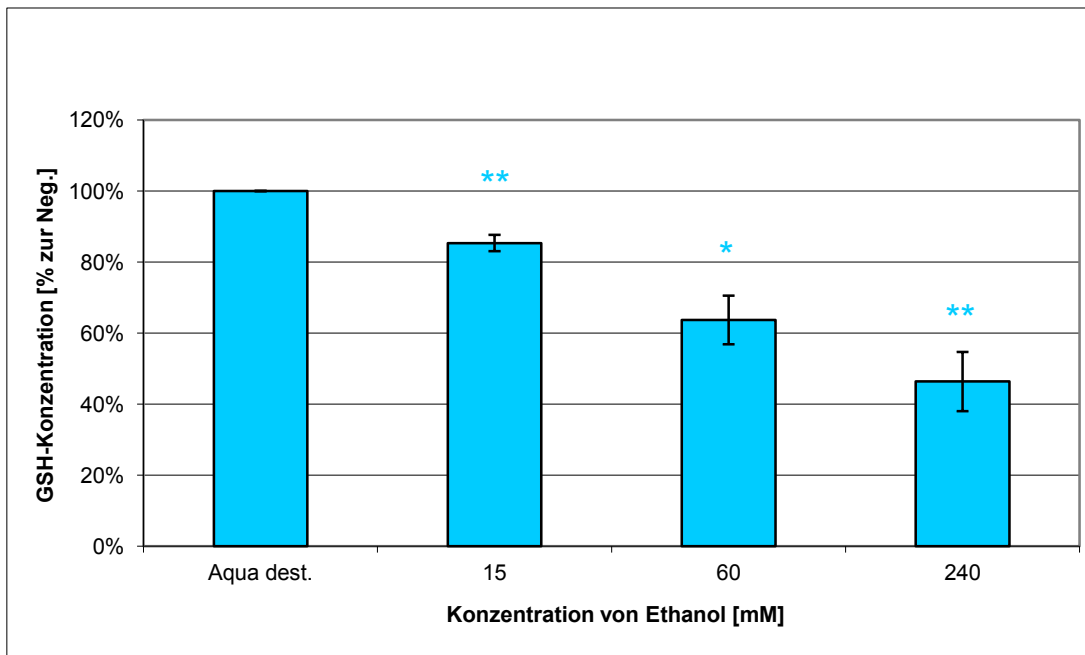


Abbildung 3.8: Depletion des GSH-Levels [% zur Negativkontrolle] nach 24stündiger Exposition der HepG2-Zellen gegenüber Ethanol 15 mM – 240 mM (n=3, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$)

3.2.2 Auswirkungen von Ethanol und Acrylamid auf die GSH-Konzentration in HepG2-Zellen

Der Einfluss von Ethanol in Kombination mit Acrylamid auf das GSH-Level in den Zellen wird in Tabelle 3.12 veranschaulicht. Die Inkubation der HepG2-Zellen mit 5 mM Acrylamid senkte die GSH-Konzentration auf $2,09 \mu\text{M} \pm 0,78 \mu\text{M} / 10^6$ Zellen. Nach einer Vorbehandlung mit 240 mM Ethanol und einer anschließenden Exposition mit 5 mM Acrylamid wurde das GSH-Level auf $0,41 \mu\text{M} \pm 0,38 \mu\text{M} / 10^6$ Zellen gemindert.

Tabelle 3.12: GSH-Konzentration [$\mu\text{M} / 10^6$ Zellen] nach 24stündiger Exposition der HepG2-Zellen gegenüber Ethanol 15 mM – 240 mM und anschließender Inkubation mit Acrylamid 5 mM für weitere 24 Stunden (n=3)

	Mittelwert	Standardabweichung
Aqua dest.	4,865	0,989
Referenz 5 mM AA	2,086	0,776
15 mM EtOH + AA 5 mM	1,077	0,385
60 mM EtOH + AA 5 mM	1,214	0,602
240 mM EtOH + AA 5 mM	0,408	0,378

Zur besseren Vergleichbarkeit wurden diese Werte in Abbildung 3.9 ebenfalls in Bezug zur Negativkontrolle gesetzt. Die Signifikanzen wurden jedoch gegen die Referenzkontrolle 5 mM Acrylamid berechnet. Es zeigte sich eine konzentrationsabhängige Verminderung des GSH-Spiegels in den HepG2-Zellen. Das Maximum der Glutathiondepletion zeigte eine Exposition der Zellen mit 240 mM Ethanol und anschließend mit 5 mM Acrylamid. Die so behandelten HepG2-Zellen wiesen $27 \% \pm 3 \%$ der GSH-Konzentration im Vergleich zur Negativkontrolle auf (vgl. Tabelle 3.13). Die alleinige Inkubation mit 240 mM Ethanol senkte das GSH-Level lediglich auf $46 \% \pm 9 \%$.

Tabelle 3.13: GSH-Konzentration [% zur Negativkontrolle] nach 24stündiger Exposition der HepG2-Zellen gegenüber Ethanol 15 mM – 240 mM und anschließender Inkubation mit Acrylamid 5 mM für weitere 24 Stunden (n=3)

	Mittelwert	Standardabweichung	t-Test
Aqua dest.	100%	0%	0,001
Referenz 5 mM AA	55%	2%	
15 mM EtOH + AA 5 mM	38%	2%	0,001
60 mM EtOH + AA 5 mM	38%	6%	0,028
240 mM EtOH + AA 5 mM	27%	3%	0,001

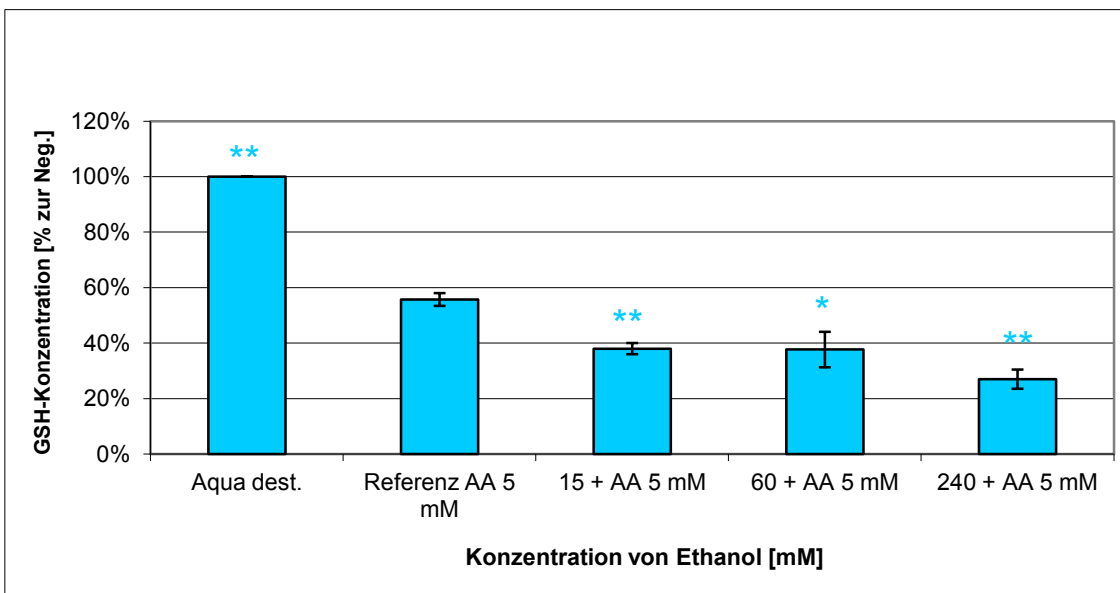


Abbildung 3.9: Depletion der Glutathionkonzentration [% zur Negativkontrolle] nach 24stündiger Exposition der HepG2-Zellen gegenüber Ethanol 15 mM – 240 mM und anschließender Inkubation mit 5 mM Acrylamid für 24 Stunden. Statistische Signifikanzen bezogen auf die Referenzkontrolle (n=3, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$)

3.3 Ergebnisse der Apoptose-Messung (ssDNA)

Für die Messung der Apoptose nach dem ssDNA-Verfahren wurden drei unabhängige Testreihen in Doppelbestimmung durchgeführt. Bei der Durchführung der Apoptosetestung wurde auf die Einzeluntersuchung von Ethanol verzichtet. Der Einfluss der verschiedenen Ethanolkonzentrationen auf die Apoptose wurde in der Kombination mit Acrylamid, welches keine Apoptose induzierte, beurteilt. Danach erfolgte die Umrechnung der Messwerte in einen Apoptoseindex, wobei die Negativkontrolle mit einem Apoptoseindex von 1 definiert wurde.

3.3.1 Auswirkungen von Acrylamid und Ethanol auf die Apoptoseinduktion von HepG2-Zellen

Die Auswirkungen von Acrylamid auf die Apoptoseinduktion werden in Abbildung 3.10 dargestellt. Die Testungen mit Acrylamid ergaben keine konzentrationsabhängige oder signifikante Änderung des Apoptoseindex, während die Positivkontrolle einen Index von $5,21 \pm 0,50$ aufwies (siehe Tabelle 3.14).

Tabelle 3.14: Apoptoseindex nach 24stündiger Exposition der HepG2-Zellen gegenüber Acrylamid 1,25 mM – 10 mM (n=3)

	Mittelwert	Standardabweichung	t-Test
Aqua dest.	1,000	0,000	
1,25 mM AA	0,930	0,062	0,189
2,5 mM AA	0,985	0,031	0,498
5 mM AA	0,938	0,055	0,192
10 mM AA	1,035	0,049	0,339
Positivkontrolle (ssDNA)	5,212	0,504	0,005

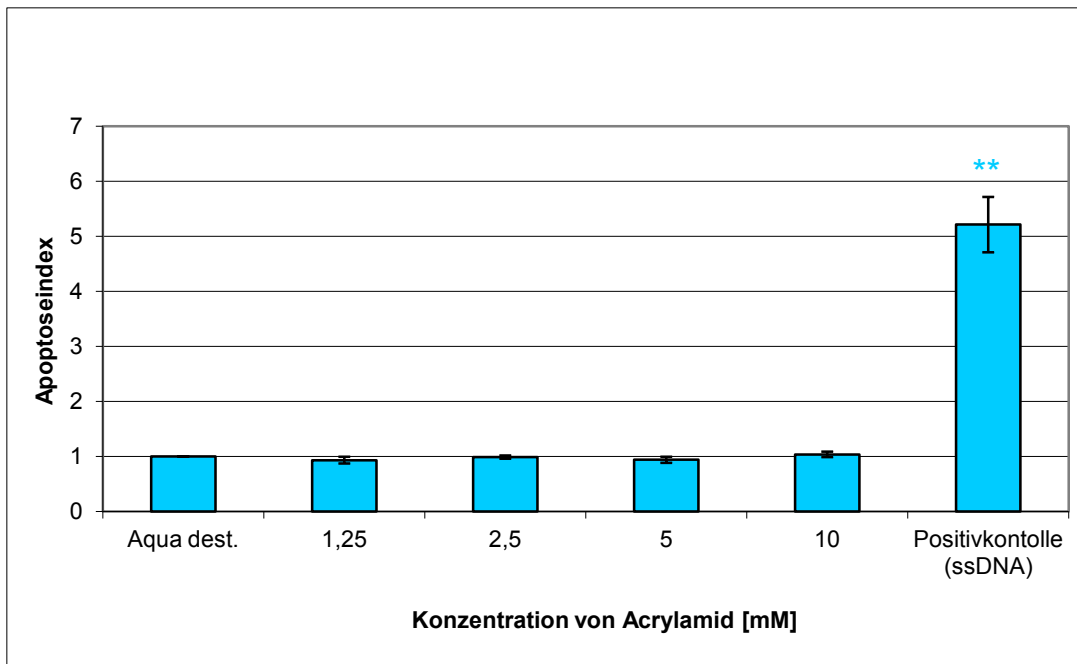


Abbildung 3.10: Apoptoseinduktion bezogen auf die Negativkontrolle nach 24stündiger Exposition der HepG2-Zellen gegenüber Acrylamid 1,25 mM – 10 mM (n=3, * p ≤ 0,05, ** p ≤ 0,01)

Auch die Kombination von Acrylamid 5 mM mit Ethanol (15 mM – 240 mM) führte, wie aus Abbildung 3.11 ersichtlich, zu keiner signifikanten oder konzentrationsabhängigen Änderung des Apoptoseindex. Lediglich die Positivkontrolle zeigte mit $4,35 \pm 0,70$ eine signifikante Steigerung der Apoptose (vgl. Tabelle 3.15). Die Berechnung des Apoptoseindex erfolgte im Vergleich zur Negativkontrolle, der t-Test wurde gegen die Referenzkontrolle durchgeführt.

Tabelle 3.15: Apoptoseindex nach 24stündiger Exposition der HepG2-Zellen gegenüber Ethanol 15 mM – 240 mM und anschließender Inkubation mit Acrylamid 5 mM für 24 Stunden (n=4)

	Mittelwert	Standardabweichung	t-Test
Aqua dest.	1,000	0,000	0,963
Referenz 5 mM AA	0,997	0,137	
15 mM EtOH + AA 5 mM	1,002	0,148	0,961
60 mM EtOH + AA 5 mM	0,924	0,222	0,602
240 mM EtOH + AA 5 mM	0,712	0,345	0,202
Positivkontrolle (ssDNA)	4,350	0,701	0,002

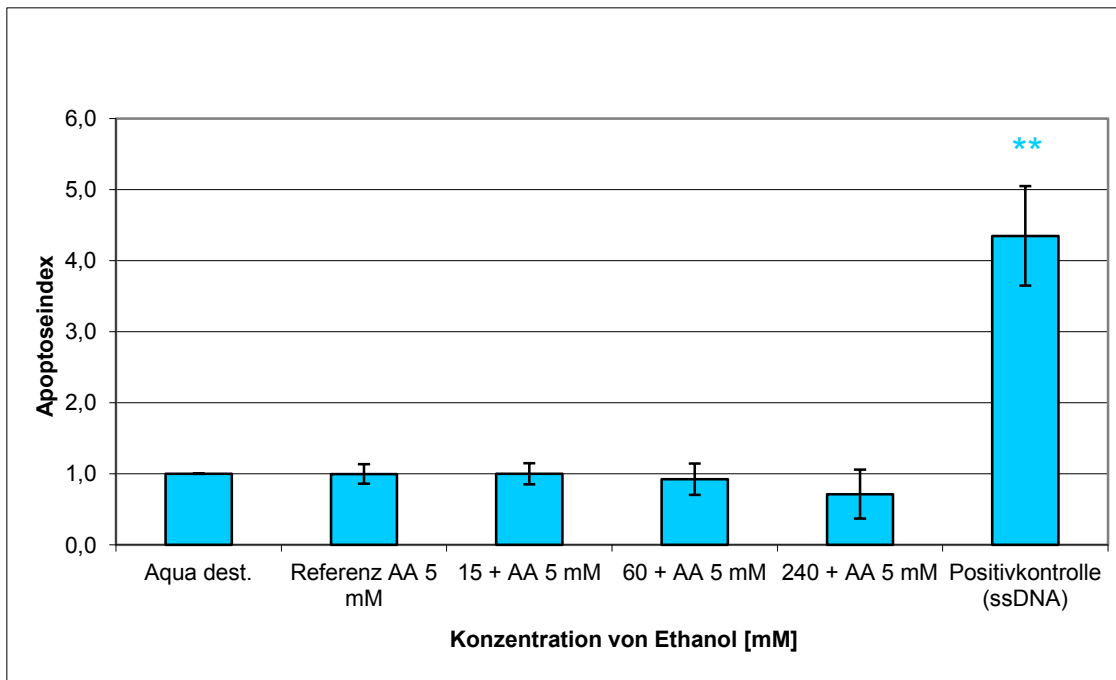


Abbildung 3.11: Apoptoseinduktion bezogen auf die Negativkontrolle nach 24stündiger Exposition der HepG2-Zellen gegenüber Ethanol 15 mM – 240 mM und anschließender Inkubation mit Acrylamid 5 mM für 24 Stunden. Statistische Signifikanzen bezogen auf die Referenzkontrolle (n=3, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$)

4 Diskussion

4.1 Einführung

In letzter Zeit wurden zahlreiche in-vivo- und in-vitro-Studien zur Abschätzung des gentoxischen Potenzials von Acrylamid durchgeführt. Die meisten Daten deuten darauf hin, dass der Hauptbestandteil der Gentoxizität von Acrylamid seinem Metabolit Glycidamid zuzuschreiben ist. Glycidamid ist ein Epoxid, welches Cytochrom P450 2E1 vermittelt aus Acrylamid metabolisiert wird. In der vorliegenden Untersuchung wird die Frage bearbeitet, inwieweit das gentoxische Potenzial von Acrylamid durch Ethanol verstärkt werden kann. Es ist bereits bekannt, dass Ethanol die Aktivität von Cytochrom P450 2E1 induziert [DAI et al. 1993]. Ein CYP2E1 vermittelter Synergismus von Ethanol und Acrylamid bezogen auf DNA schädigende Effekte ist insofern als durchaus wichtig anzusehen, als dass beide Substanzen dem Organismus häufig zusammen zugeführt werden. Hier ist zum Beispiel der Genuss von Alkohol und Kartoffel-Chips zu nennen.

4.2 Einfluss der Cytochrom P450 Aktivität auf die Gentoxizität von Acrylamid

4.2.1 Der First-Pass-Effekt der Leber

Der First-Pass-Effekt beschreibt die Metabolisierung von Stoffen während der ersten Leberpassage. Peroral aufgenommene Substanzen wie z.B. Nährstoffe oder Medikamente werden zunächst über die Darmschleimhaut resorbiert und gelangen somit in den Blutkreislauf. Über die Vena portae wird das Blut der Leber zugeführt. Hier erfolgt die Metabolisierung, wobei ein wirksamer, aber auch ein unwirksamer Metabolit entstehen kann. Ziel dieser Reaktion ist es Fremdstoffe zu inaktivieren und ihre Hydrophilie zu erhöhen, um die Ausscheidung dieser Stoffe zu verbessern.

Der First-Pass-Effekt führt bei Acrylamid zur Bildung des gentoxischen Epoxids Glycidamid.

4.2.2 Wirkung und direkter Nachweis von Cytochrom P450 2E1

Als ein biologischer Endpunkt der Arbeit diente die DNA-Migration. Diese wurde mit Hilfe der alkalischen Einzelzellgelelektrophorese bestimmt und gilt als Indikator für DNA-Schädigungen. In diesem Zusammenhang spielte auch die Betrachtung von Cytochrom P450 2E1 eine entscheidende Rolle, da die Vermutung nahe lag, dass eine Induktion der CYP 2E1 zu einer Zunahme der DNA-Schäden führt. Diese Annahme konnte in unserer Arbeitsgruppe mit Hilfe eines Westernblots zum Nachweis von CYP 2E1 untermauert werden.

Nach Acrylamidexposition konnte in den HepG2-Zellen ein konzentrationsabhängiger Anstieg der DNA-Migration beobachtet werden. Unter denselben Bedingungen konnte jedoch keine CYP 2E1-Induktion nachgewiesen werden.

Nach der Behandlung der Zellen mit Ethanol und anschließender Inkubation mit Acrylamid konnte eine verstärkte DNA-Migration beobachtet werden. Verglichen mit Zellen nach alleiniger Acrylamidexposition stieg die DNA-Migration auf das Doppelte an. In Kongruenz zu den im Cometassay erhobenen Daten erhöhte die Inkubation der Zellen mit Ethanol, wie erwartet, die Aktivität der CYP 2E1 (siehe Abbildung 4.2). Dies deutet darauf hin, dass die CYP 2E1 vermittelte Metabolisierung von Acrylamid zu Glycidamid auch in den vorliegenden Testungen eine Rolle spielt. Da die CYP 2E1-Induktion durch Ethanol relativ schwach war, kann dieser Mechanismus nicht als alleinige Ursache für den Ethanolvermittelten Anstieg des genotoxischen Potenzials von Acrylamid verantwortlich gemacht werden.



Abbildung 4.1: Westernblot zum Nachweis von CYP 2E1 nach Exposition mit Ethanol (25 mM – 100 mM) in HepG2-Zellen (modifiziert nach Lamy et al. 2007)

SUMNER et al. untersuchten die Rolle des Cytochrom P450 2E1 auf die Metabolisierung von Acrylamid. Zu diesem Zweck wurde Mäusen mit unterschiedlichem, unter anderem auch fehlendem CYP 2E1 Enzymstatus radioaktiv markiertes Acrylamid zugeführt. Der Urin dieser Mäuse wurde danach massenspektrometrisch untersucht. In den Urinproben konnten Glycidamid, dessen Hydrolyseprodukt 2,3-Dihydroxypropionamid und Produkte der Konjugation von Glycidamid mit GSH, N-acetyl-S-(3-amino-2-hydroxy-3-oxopropyl)cystein und N-acetyl-S-(1-carbamoyl-2-hydroxyethyl)cystein, nachgewiesen werden. Bei den Mäusen, die nicht in der Lage waren Cytochrom P450 2E1 zu synthetisieren, wurden weder Glycidamid noch dessen Metabolite massenspektrometrisch im Urin erfasst. Es liegt

also die Vermutung nahe, dass das Cytochrom P450 Isoenzym 2E1 eine Hauptrolle in der in-vivo-Metabolisierung von Acrylamid spielt. Außerdem scheinen andere Enzyme der Cytochrom P450 Familie diese Stoffwechsellistung nicht übernehmen zu können [SUMNER et al. 1999].

Untersuchungen zur Toxikokinetik von Acrylamid und Glycidamid in B6C3F₁ Mäusen führten DOERGE et al. durch. Die Mäuse wurden intravenös, über Sondenernährung und über die physiologische Nahrungsaufnahme gegenüber Acrylamid exponiert.

Dieses wurde zügig absorbiert und über die CYP 2E1 zu Glycidamid metabolisiert.

Nach vollständiger Elimination aus dem Serum zeigte sich ein Anstieg von N-7 -(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)-guanin, einem DNA-Addukt des Glycidamid (siehe Abbildung 4.3), in der Leber. Die Exposition der Mäuse mit einer äquimolaren Menge Glycidamid führte zu einem 40 % höheren Anstieg der DNA-Addukte im Vergleich zur Exposition mit

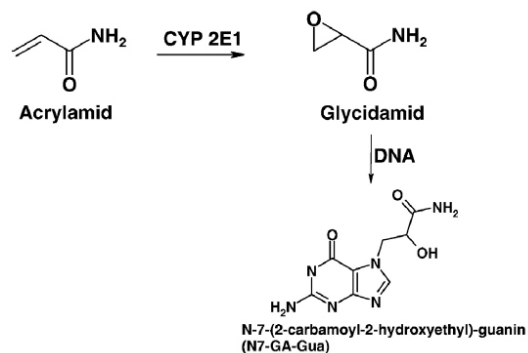


Abbildung 4.2: Schematische Darstellung der Metabolisierung von Acrylamid (modifiziert nach Doerge et al. 2005)

Acrylamid. Obwohl die Bioverfügbarkeit durch die orale Verabreichungsform verringert wurde, konnte, verglichen mit der intravenösen Darreichung, eine relativ erhöhte Glycidamidexposition gemessen werden. Diese Beobachtung muss einem kinetischen Effekt wie dem Firstpass-Effekt zugeschrieben werden. Bei Exposition mit niedrigeren Konzentrationen von Acrylamid konnte eine verhältnismäßig höhere Glycidamidkonzentration, verglichen mit hohen Acrylamiddosen, erfasst werden. Dies legt eine Sättigung des Enzyms Cytochrom P450 2E1 und somit, bei fehlenden Ausgleichsmechanismen, eine ineffizientere Metabolisierung nahe [DOERGE et al. 2005a].

4.3 Beeinflussung der intrazellulären Glutathionkonzentration durch Acrylamid

Die Behandlung der HepG2-Zellen mit Acrylamid, Ethanol und einer Kombination aus beiden Substanzen führte zu einer signifikanten Reduktion der Glutathionkonzentration in den Zellen. Vor dem Hintergrund der Oxidation von GSH durch reaktive Sauerstoffspezies dient diese Konzentrationsabnahme als Hinweis für den Anstieg des oxidativen Stresses. Man kann also annehmen, dass die nachgewiesene Senkung des totalen, zellulären Glutathionspiegels eine wichtige Rolle im Rahmen der DNA schädigenden Wirkung von Acrylamid bzw. der Kombination aus Acrylamid und Ethanol spielt.

Acrylamid seinerseits ist sehr nukleophil und reagiert deshalb leicht mit Thiolgruppen wie GSH. Es wird davon ausgegangen, dass Acrylamid selbst, und nicht nur sein Metabolit Glycidamid, durch seine Reaktion mit dem oxidativen Abwehrsystem zytotoxische und genotoxische Eigenschaften besitzt.

PARK et al. (2002) führte eine Studie zu acrylamidinduzierter, zellulärer Transformation in syrischen Hamster Embryozellen (SHE) durch. In den Untersuchungen wurde zudem die Auswirkung von Acrylamid auf die intrazelluläre GSH-Konzentration dieser Zelllinie beobachtet. Es konnte eine durch Acrylamid bedingte Reduktion von Glutathion nachgewiesen werden. Bei der Kombination von Acrylamid mit N-Acetyl-L-Cystein, einem Sulfhydrylgruppendonator, wurde die GSH-Depletion inhibiert. Ebenso wurde eine Kombinationsexposition von Acrylamid mit dem unspezifischen Cytochrom P450-Inhibitor 1-Aminobenzotriazol vorgenommen. Ein präventiver Effekt auf die GSH-Reduktion konnte nach dieser Behandlung jedoch nicht nachgewiesen werden. Daraus ließ sich schlussfolgern, dass Acrylamid und nicht Glycidamid an der zellulären Transformation beteiligt war, wobei die zelluläre Thiolkonzentration diesen Mechanismus beeinflusste [PARK et al. 2002].

Auch PUPPLE et al. (2005) untersuchten die DNA schädigenden Eigenschaften von Acrylamid und Glycidamid. Beobachtet wurde der Einfluss der CYP 2E1-Expression und der intrazellulären GSH-Depletion durch DL-Buthionin-[S,R]-Sulfoxim (BSO) auf

die Genotoxizität. Zu diesem Zweck wurde der Cometassay mit primären Rattenhepatozyten, V79- und Caco-2-Zellen durchgeführt. Diese verschiedenen Zellpopulationen zeichnen sich vor allem durch einen unterschiedlichen Cytochrom P450 2E1 Status aus. V79- und Caco-2-Zellen weisen nur eine geringe Expression von CYP 2E1 auf, Rattenhepatozyten synthetisieren jedoch große Mengen dieses Enzyms. Bei den Untersuchungen mit Acrylamid zeigten sowohl V79- als auch Caco-2-Zellen lediglich einen marginalen Anstieg der DNA-Schädigung. Erstaunlich war jedoch, dass auch die primären Rattenhepatozyten keine wesentliche Zunahme der DNA-Schädigung aufwiesen. Daraus ließ sich schlussfolgern, dass das Auftreten von DNA-Strangbrüchen nicht zwangsläufig mit dem CYP 2E1 Status der Zellen übereinstimmt. Vielmehr zeigte sich in allen drei Zelllinien eine Korrelation zwischen der Genotoxizität und dem Grad der Glutathionreduktion, die ebenso zu einer Verstärkung der Zytotoxizität führte. Der Ursprung dieses zytotoxischen Effekts wurde jedoch nicht weiter untersucht [PUPPEL et al. 2005].

4.4 Beeinflussung der Apoptose durch Acrylamid

4.4.1 Apoptose

Unter Apoptose versteht man die aktive Selbstzerstörung einer Zelle in Form des programmierten Zelltodes. Die Apoptose kann sowohl von außen angeregt (extrinsischer Weg, Typ I), als auch durch zellinterne Prozesse (intrinsischer Weg, Typ II) ausgelöst werden. Sie unterliegt in ihrem Ablauf strengen Kontrollen, da nur auf diese Weise die Unversehrtheit des Nachbargewebes gewährleistet werden kann. Eine zentrale Rolle nehmen proteolytisch aktive Enzyme, die sogenannten Caspasen, ein. Diese Enzyme aktivieren einerseits weitere Enzyme durch limitierte Proteolyse, andererseits sind sie aktiv am Abbau von Laminin und Aktin beteiligt. Des Weiteren kommt es zu einer caspasevermittelten Unterdrückung der DNA-Reparaturmechanismen. Während der Apoptose kommt es morphologisch zu einer Schrumpfung der Zellen, die mit einem Abbau der DNA durch Endonukleasen einhergeht. Diese Enzyme zerlegen die DNA an definierten Stellen, sodass die Bruchstücke als DNA-Leiter mittels einer Elektrophorese nachweisbar sind. (Aufgrund der negativen Testergebnisse wird auf den detaillierten Ablauf der Apoptose an dieser Stelle nicht näher eingegangen.)

4.4.2 Stellung der Apoptose im Rahmen der gentoxikologischen Testungen

Aufgrund der Untersuchungsergebnisse von Blasiak et al. (siehe unten) und der Tatsache, dass die beginnende apoptotische DNA-Fragmentation im Cometassay als Kometen in Erscheinung treten kann und somit falsch positive Ergebnisse liefert, wurde die Ursache des aufgetretenen, zytotoxischen Effekts untersucht [CHOUCROUN et al. 2001].

Nach der Behandlung der Zellen mit Acrylamid und Ethanol bzw. nach alleiniger Acrylamidexposition zeigte sich ein Anstieg der Zytotoxizität auf etwa 30 %. Mit Hilfe der ssDNA-Messung konnte, selbst bei höheren Konzentrationen, keine Apoptoseinduktion in HepG2-Zellen beobachtet werden. Es liegt also nahe, dass der Grund für den Abfall der Vitalität in unspezifischen Effekten und nicht im programmierten Zelltod zu sehen ist.

BLASIAK et al. (2004) untersuchten das DNAschädigende Potenzial von Acrylamid an peripheren humanen Lymphozyten. Zu diesem Zweck wurden die Zellen mit 0,5 μM – 50 μM Acrylamid exponiert. Die hauptsächlich beobachteten DNA-Schäden an alkalilabilen Stellen wurden innerhalb von 60 Minuten von den Zellen repariert. Eine vorherige Behandlung der Zellen mit N-tert-butyl- α -phenylnitro, einem Radikalfänger (engl. spin trap), wie auch die Gabe der Vitamine C und D führte zu einer Verminderung der Schädigung durch Acrylamid. Dies lässt vermuten, dass reaktive Sauerstoffspezies (ROS) an der Ausbildung der DNA-Schäden beteiligt sind. Diese Beobachtungen legen die Beteiligung eines ROS induzierten Apoptosemechanismus nahe [BLASIAK et al. 2004].

In primären Rattenhepatozyten konnte nach Exposition mit Acrylamid keine DNA-Migration im Cometassay nachgewiesen werden. Die verwendeten Konzentrationen waren mit den Acrylamidkonzentrationen der vorliegenden Arbeit vergleichbar. Erst nach Senkung der Glutathionkonzentration durch DL-Buthionin-[S,R]-Sulfoxim konnte eine signifikante DNA-Schädigung und ein Anstieg in der Zytotoxizität beobachtet werden [PUPPEL et al. 2005].

4.5 Auswirkungen einer Exposition mit Acrylamid auf Leberzellen

Acrylamid wurde ein karzinogenes Potenzial für viele Organe in Versuchen mit Ratten und Mäusen nachgewiesen. Eine Schädigung der Leber wurde jedoch nur in sehr hohen Konzentrationen beobachtet. Obwohl diese der Ort der CYP 2E1 Produktion und Biotransformation ist, scheint Acrylamid keine karzinogenen und nur geringe zytotoxische Auswirkungen auf die Leber zu haben.

Die Ergebnisse von BUTTERWORTH et al. zeigen eine gewebe- und speziesabhängige Aktivität, Detoxifikation und somit auch Karzinogenität von Acrylamid. Es induzierte in-vivo eine ungerichtete DNA-Synthese in Spermatozyten von Ratten. In Hepatozyten konnte dieser Effekt jedoch weder nach einmaliger noch nach wiederholter Acrylamidexposition nachgewiesen werden. Auch die meisten anderen in-vivo-Studien mit Acrylamid sowie die vorliegende in-vitro-Studie zeigten genotoxische Effekte in der Leber nur bei sehr hohen Konzentrationen. Des Weiteren konnten in-vivo-DNA-Reparaturnachweise keine Induktion von Reparaturmechanismen in Hepatozyten aufzeigen. Durch diese mangelnde DNA-Reparaturaktivität wird die Beobachtung untermauert, dass Acrylamid in Leberzellen von Ratten keinen karzinogenen Effekt aufwies. Im Gegensatz zu Acrylamid führte eine Exposition von Hepatozyten mit Glycidamid jedoch zu ungerichteter DNA-Synthese. Rattenhepatozyten sind dementsprechend entweder nicht in der Lage Acrylamid zu Glycidamid zu metabolisieren oder sie müssen über spezifische Detoxifizierungsmechanismen verfügen [BUTTERWORTH et al. 1992].

Auch MANIÈRE et al. konnten in den Hepatozyten von Ratten keine signifikante DNA-Schädigung nach 24-stündiger Einmalexposition mit Acrylamid feststellen. Für die Testungen wurden Ratten gegenüber 18, 36, und 54 mg Acrylamid / kg Körpergewicht exponiert und die peripheren Leukozyten, das Gehirn, das Knochenmark, die Leber, die Hoden und die Nebennieren nach unterschiedlichen Inkubationszeiten untersucht. Hierzu wurde zum einen der Cometassay, zum anderen der Nachweis von Glycidamid-DNA-Addukten durch Massenspektrometrie verwendet. Die durchschnittliche Konzentration der DNA-Addukte und auch ihre Halbwertszeiten waren in allen

Organen identisch, wobei die Adenosin-Addukte schneller abgebaut wurden als Guanin-Addukte. Der Cometassay zeigte lediglich in der höchsten Dosis nach 5-stündiger Exposition einen leichten Anstieg der DNA-Schädigung [MANIÈRE et al. 2005].

Unterstützt werden diese Ergebnisse von den Untersuchungen von DOERGE et al.. In Fischer 344 Ratten wurden nach Acrylamidexposition die Glycidamidkonzentrationen in Leber-, Gehirn-, Muskel-, Hoden- oder Mammazellen erfasst. Acrylamid konnte in all diesen Geweben nachgewiesen werden. Die Glycidamidkonzentration lag jedoch sowohl in den Hoden- als auch in den Leberzellen unterhalb der Nachweisgrenze. Dies, obwohl die Konzentration des zirkulierenden Glycidamids im Serum der Tiere sehr hoch war [DOERGE et al. 2005b].

MANJANATHA et al. untersuchten die Gentoxizität von Acrylamid und Glycidamid in transgenen Big Blue Mäusen. Das Trinkwasser der Mäuse wurde mit 100 mg/l und 500 mg/l Acrylamid bzw. mit äquimolaren Mengen an Glycidamid versetzt. Danach wurde die Mutationsfrequenz verschiedener Zelltypen bestimmt, wobei spezifische Testverfahren zur Anwendung kamen. Für die Einschätzung der gentoxischen Effekte von Acrylamid und Glycidamid in-vivo wurde die Mikrokernbildung in peripheren Retikulozyten gemessen. Des Weiteren wurde ein hprt-Mutagenitätstest mit peripheren Lymphozyten und eine cll Mutagenitätstestung mit isolierten Hepatozyten durchgeführt. Die Retikulozyten zeigten einen signifikanten Anstieg der Mikrokernbildung nach Exposition mit 500 mg/l Acrylamid bzw. 600 mg/l Glycidamid. Im Lymphozyten Hprt Test zeigte sich nach der Darreichung von niedrigen Acrylamid- und Glycidamiddosen eine signifikante Zunahme der Mutationsfrequenz um das 3- bzw. 8-fache im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe. Eine Exposition mit hohen Dosen beider Substanzen führte zu einem hochsignifikanten Anstieg auf das 16- und 25-fache der Spontanmutationsrate. Der Leber-cll-Mutagenitätstest wies hingegen erstaunliche Ergebnisse auf. Trotz des hohen enzymatischen Potenzials der Hepatozyten und insbesondere ihrer Cytochrom P450 2E1 Aktivität wurde keine signifikante Erhöhung der Mutationsfrequenz in niedrigen Acrylamid- und Glycidamiddosen festgestellt. Selbst die Zugabe von 500 mg Acrylamid und 600 mg Glycidamid pro Liter Trinkwasser zeigte in den Leberzellen lediglich einen Anstieg der Gentoxizität auf das

2- bzw. 2,5-fache im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dosierungen in dieser Höhe rufen bei Tieren bereits toxische Symptome hervor.

Des Weiteren wurden im Rahmen dieser Untersuchung die Mutationen der Leberzellen genauer analysiert und quantifiziert. In den Hepatozyten der Kontrollgruppe konnte die Transition, insbesondere des Basenpaares G:C zu A:T, als führende Mutation (48 %) beobachtet werden. Unter Transition versteht man den Austausch einer Purinbase gegen die jeweils andere Purinbase bzw. der Pyrimidinbasen untereinander. In 13 % wurde eine Transversion der Basen G:C zu T:A detektiert, wobei Transversion die Substitution einer Purinbase durch eine Pyrimidinbase oder umgekehrt beschreibt. Leserasterverschiebungen (engl. frameshifts) konnten in 19 % der Mutationen innerhalb der Kontrollgruppe nachgewiesen werden. In den Testgruppen, die mit der jeweils höheren Dosis von Acrylamid bzw. Glycidamid behandelt wurden, zeigte sich eine prozentuale Verschiebung der Mutationstypen. So konnte in beiden Gruppen die Leserasterverschiebung als führende Mutation (35 %) detektiert werden. Die genauere Analyse zeigte insbesondere eine hochsignifikante Zunahme der frameshifts zwischen Basenpaar 179 und 184. Auch die Transversion G:C zu T:A konnte mit 25 % in der Acrylamid- bzw. 27 % in der Glycidamidgruppe häufiger beobachtet werden als in der Kontrollgruppe. Die Transition G:C zu A:T wurde hingegen mit 10 % bzw. 7 % seltener detektiert als bei den unbehandelten Tieren [MANJANATHA et al. 2006].

Eine mögliche Erklärung für die vorgestellten Resultate liegt in einer hoch effizienten, leberzellvermittelten Acrylamid- bzw. Glycidamidentgiftung. Wie bereits dargestellt und durch diese Dissertation untermauert, kommen in diesem Zusammenhang der enzymatischen Metabolisierung von Acrylamid durch Cytochrom P450 2E1 und der Konjugation von Glycidamid mit Glutathion wichtige Rollen in der Detoxifikation von Acrylamid zu. In Nagetieren stellt die Konjugation von Glycidamid mit Glutathion sogar den wichtigsten Eliminationsmechanismus für Acrylamid, unabhängig von dessen Darreichungsform, dar [SUMNER et al. 2003]. Wobei insbesondere Hepatozyten hohe Konzentrationen von Glutathion aufweisen.

4.6 Risikobewertung

Acrylamid ist eine Substanz, mit der Menschen auf vielfältige Art und Weise im Alltag in Kontakt kommen. Die Hauptexpositionsquellen sind jedoch Nahrungsmittel. Wie bei vielen anderen in Lebensmitteln enthaltenen Karzinogene, z.B. polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, wird auch Acrylamid bei der Erwärmung der Speisen gebildet. Hierbei sind vor allem proteinarme, kohlenhydrat- und asparaginreiche Lebensmittel wie Kartoffelprodukte zu nennen.

Die World Health Organisation (WHO) schätzte die diätetische Aufnahme von Acrylamid in der durchschnittlich exponierten Bevölkerung auf 0,3 – 2 µg/kg Körpergewicht pro Tag. Menschen mit einem hohen Acrylamidkonsum (90. – 97,5. Perzentile) wiesen eine tägliche Acrylamidaufnahme von 0,6 – 3,5 µg/kg Körpergewicht auf, für die höchstexponierte Gruppe (oberhalb der 99. Perzentile) wurde der Konsum sogar auf bis zu 5,1 µg/kg Körpergewicht pro Tag geschätzt. Die tägliche Acrylamidexposition bei Kindern wurde aufgrund des geringeren Körpergewichtes auf das zwei- bis dreifache eines Erwachsenen eingestuft. Durchschnittlich geht die WHO von einer täglichen Acrylamidaufnahme in der Bevölkerung von 1 µg/kg Körpergewicht aus. Lediglich bei hochexponierten Personen wird ein durchschnittlicher Konsum von 4 µg/kg Körpergewicht angenommen [WORLD HEALTH ORGANISATION (WHO) 2005].

Die International Agency for Research on Cancer teilte 1994 Acrylamid in die IARC Gruppe 2 A ein. Später schloss sich auch die US Environmental Protection Agency dieser Einstufung an. Die Gruppe 2 A umfasst Substanzen, die möglicherweise für den Menschen karzinogen sind. Wie bereits mehrfach durch Studien belegt werden konnte, weist Acrylamid in Tierversuchen ein hohes karzinogenes Potenzial auf. Hiervon können prinzipiell alle Organe betroffen sein (siehe Kapitel 2.1.1). Auffällig ist jedoch, dass die Leber kein Zielorgan für acrylamidinduzierte Karzinogenese zu sein scheint [BUTTERWORTH et al. 1992]; [MANIÈRE et al. 2005].

FUHR et al. studierten die Toxikokinetik von Acrylamid im Menschen. Hierzu nahmen gesunde, junge Probanden eine Mahlzeit mit 0,94 mg Acrylamid zu sich. In den folgenden 72 Stunden wurde der Urin der Freiwilligen gesammelt. Anschließend

erfolgte eine qualitative und quantitative flüssigkeitschromatographische bzw. massenspektrometrische Untersuchung des Urins. Von besonderer Bedeutung war hierbei der Nachweis von Acrylamid und seinem Metabolit N-acetyl-S-(2-carbamoyl-ethyl)cystein sowie die Messung von Glycidamid und seinem Glycidamid-GSH-Konjugat N-acetyl-S-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)cystein (siehe Abbildung 4.5).

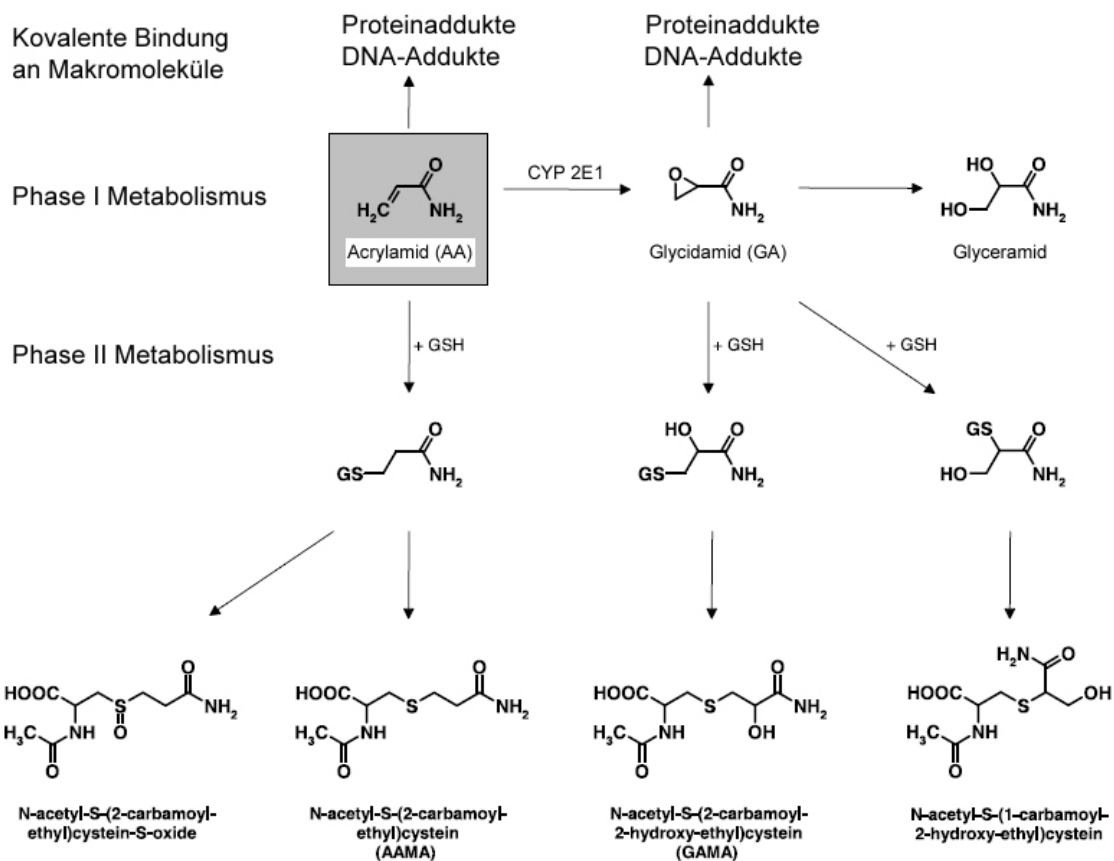


Abbildung 4.3: Metabolisierung von Acrylamid und im Urin nachweisbare Metabolite (modifiziert nach Fuhr et al. 2005)

Es zeigte sich, dass durchschnittlich 60,3 % der aufgenommenen Acrylamiddosis im Urin nachgewiesen werden konnten. 4,4 % des Acrylamids wurden unverändert ausgeschieden. 50 %, und damit der größte Anteil, wurden zu N-acetyl-S-(2-carbamoyl-ethyl)cystein (AAMA) und nur 5,9 % zu N-acetyl-S-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)cystein (GAMA) metabolisiert. Glycidamid konnte nicht in den Proben nachgewiesen werden. Aus diesen erhobenen Daten wurde das Verhältnis aus GAMA zu AAMA mit 0,12 berechnet [FUHR et al. 2006]. Bei Mäusen und Ratten betrug der Quotient 0,2 bzw. 0,5 und war damit zwei- und fünffach höher als beim Menschen

[BESARATINIA, PFEIFER 2007]. Diese Beobachtung impliziert, dass Nagetiere Acrylamid mit Hilfe des Phase-I-Enzyms CYP 2E1 effizienter metabolisieren als Menschen. In diesem Zusammenhang sind auch die Ergebnisse von MUCCHI et al. und PELLUCHI et al. zu sehen, bei denen keine Erhöhung der Krebsinzidenz durch Acrylamid belegt werden konnte.

Neben der karzinogenen Eigenschaft von Acrylamid konnte in Tierversuchen zusätzlich ein neurotoxisches Potenzial beobachtet werden [EXON 2007]. Bei Ratten führte bereits eine tägliche Verabreichung von 1 mg Acrylamid / kg Körpergewicht zu einer elektronenmikroskopisch nachweisbaren nervalen Degeneration. Klinische Symptome konnten bei einer Konzentration von 20 mg Acrylamid / kg Körpergewicht beobachtet werden [BUREK et al. 1980]. Die Neurotoxizität ließ sich durch Fallstudien nach Arbeitsexposition auch beim Menschen bestätigen. 1997 gerieten schwedisch Tunnelarbeiter in einen Unfall, bei dem ein Behälter mit acrylamidhaltiger Dichtungsmasse auslief. Einige Arbeiter zeigten infolgedessen reversible und geringe periphere neurologische Schäden [SHARP 2003]. Pathophysiologisch scheint eine Störung in der Freisetzung der Neurotransmitter aus den Nervenendigungen vorzuliegen [LOPACHIN 2006]. Des Weiteren scheint die neuronale Glutathiondepletion ein wichtiger Faktor bei der Entstehung der acrylamidinduzierten Neuropathie zu sein [ZHU et al. 2008].

Im Rahmen zahlreicher Diskussionen über den Acrylamidgehalt in Nahrungsmitteln wurden quantitative Lebensmittelanalysen durchgeführt. Diese Analysen ergaben, dass sowohl die mehrfache Messung eines Produktes als auch die Messungen mehrerer Chargen eines Herstellers extremen Schwankungsbreiten in der Acrylamidkonzentration unterlagen (siehe Tabelle 4.1). Diese Sachlage erschwert die Kontrolle des tatsächlich in einer Verpackungseinheit vorliegenden Acrylamidgehalts von industriell hergestellten Nahrungsmitteln.

Tabelle 4.1: Acrylamidgehalt verschiedener Lebensmittel (aus Besaratinia et a. 2007)

Produkt	Anzahl der Proben	Durchschnittliche Acrylamidkonzentration [µg/kg]	Maximale Acrylamidkonzentration [µg/kg]
Kartoffel-Chips	874	752	4080
Kaffe (nicht aufgebrüht)	205	288	1291
Plätzchen/Kekse	1270	350	7834
Babykekse	32	181	1217

Wie in den meisten anderen Studien wurden auch in der vorliegenden Arbeit hohe Acrylamidkonzentrationen für die Exposition der Zellkulturen verwendet. Um einen Eindruck über die Dimensionen zu vermitteln, wird eine Testkonzentration im Folgenden mit der Acrylamidkonzentration von Kartoffel-Chips verglichen. Wobei diese mit Chips aufgenommene Acrylamidkonzentration jedoch nicht der Konzentration im Blutserum entspricht. Daher dient diese Berechnung lediglich der Veranschaulichung.

Die niedrigstdosierte Probe, die im Cometassay bereits eine signifikante Zunahme des OTM zeigte, war 2,5 mM Acrylamid. Daher wird diese Konzentration den weiteren Berechnungen zu Grunde gelegt.

Die molare Masse von Acrylamid beträgt 71,08 g/mol. In einer 2,5 mM Lösung liegen somit 177,7 mg Acrylamid vor. Da ein Kilogramm Kartoffel-Chips einen durchschnittlichen Acrylamidanteil von 752 µg/kg aufweist, entspricht die verwendete Testkonzentration einem Gegenwert von etwa 236 kg Kartoffel-Chips. Demnach kommen 1180 Tüten Kartoffel-Chips á 200 g dem Acrylamidgehalt der 2,5 mM Testsubstanz gleich. Selbst bei einer Acrylamidkonzentration von 4080 µg/kg Kartoffel-Chips entspricht dies noch einer Menge von 218 Tüten á 200 g.

Da Ethanol die Gentoxizität von Acrylamid in HepG2-Zellen überadditiv verstärkt hat, wird die Konzentration einer Probe auf den Konsum von alkoholischen Genussmitteln bezogen. Die niedrigste Konzentration in der Kombination mit Acrylamid, die im Cometassay signifikante Ergebnisse zeigte, war 60 mM Ethanol. Diese Konzentration wird für die Berechnungen als Ausgangswert angesehen.

Ethanol besitzt eine Molmasse von 46 g/mol. Eine 60 mM Lösung enthält demnach 2,76g Ethanol pro Liter. Mit Hilfe der Dichte kann nun das entsprechende Volumen des Ethanols berechnet werden. Indem man die Masse von 2,76 g durch die Dichte 0,79 g/cm³ dividiert, erhält man das äquivalente Volumen von 3,5 ml. Demnach liegt der prozentuale Volumenanteil des Ethanols, bezogen auf einen Liter, bei 0,35 % oder 3,5 ‰. Eine annähernde Blutalkoholkonzentration lässt sich mit dem Genuss von etwa 5,5 l Bier (5 Vol.%), 2,5 l Rotwein (10,5 Vol.%) oder 600 ml Rum (45 Vol.%) erreichen. Wobei jedoch Blutalkoholkonzentrationen über 3 Promille bereits als letale Dosis angesehen werden können.

Wie beide Berechnungen nochmals verdeutlichen, zeigten die Testkonzentrationen der vorliegenden Arbeit erst in sehr hohen Konzentrationen einen Effekt.

Auch das erhebliche karzinogene Potenzial, das Acrylamid in den meisten Tierversuchen aufweist, scheint beim Menschen aufgrund ineffektiver Metabolisierung zu Glycidamid nicht bestätigt werden zu können. Groß angelegte epidemiologische Studien blieben diesbezüglich ergebnislos. Selbst bei beträchtlicher, meist arbeitsbedingter, Exposition wiesen Geschädigte in erster Linie leichte neurotoxische Schädigungen auf.

Trotz alledem ist die acrylamidinduzierte Karzinogenese kritisch zu betrachten. Denn wie bei jeder karzinogenen Substanz darf auch bei Acrylamid nicht von einem Schwellenwert bei der Krebsentstehung ausgegangen werden.

Eine Auseinandersetzung mit den Konsequenzen einer acrylamidhaltigen Ernährung und gleichzeitigem Genuss von Alkohol ist demnach kritisch, jedoch nicht undifferenziert zu bedenken.

5 Zusammenfassung

Acrylamid ist eine von der IARC als möglicherweise karzinogen eingestufte Substanz, welche vor allem über Zigarettenrauch und kohlenhydratreiche Nahrungsmittel vom Menschen aufgenommen wird.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Genotoxizität von Acrylamid in HepG2-Zellen mit Hilfe der Einzelzellgelelektrophorese (Cometassay) untersucht.

Weiterhin wurde der Einfluss von Ethanol, welches Cytochrom P 450 2E1 induziert, auf die durch Acrylamid hervorgerufene DNA-Migration betrachtet. Acrylamidkonzentrationen von 1,25 mM bis 10 mM induzierten eine konzentrationsabhängige DNA-Migration (OTM) in HepG2-Zellen. Die Exposition mit 10 mM Acrylamid führte zu einem 8-fachen Anstieg der DNA-Schädigung verglichen mit der Negativkontrolle. Für die Kombination von Ethanol und Acrylamid wurden die Hepatomzellen mit Ethanol für 24 Stunden inkubiert und anschließend mit 5 mM Acrylamid für weitere 24 Stunden exponiert. Eine Inkubation mit 120 mM Ethanol und 5 mM Acrylamid verstärkte die DNA-Migration um mehr als das Doppelte in Bezug zur Referenzkontrolle 5 mM Acrylamid. Für die Klärung der zugrundeliegenden Mechanismen wurde die Modulation der Cytochrom P 450 2E1 Aktivität und die Depletion von Glutathion in derselben Zelllinie erforscht. Im Westernblot zeigte sich ein ethanolinduzierter Anstieg des Enzyms Cytochrom P450 2E1, dem eine wichtige Rolle in der Metabolisierung und damit Toxifizierung von Acrylamid zukommt. Es zeigte sich zusätzlich, dass die intrazelluläre Glutathionkonzentration durch Ethanol- oder Acrylamidexposition signifikant gesenkt wurde. In den Kombinationsexperimenten mit Ethanol und Acrylamid konnte ein überadditiver Effekt der einzelnen Testsubstanzen in der GSH-Depletion beobachtet werden. Bei im Cometassay beobachteter Abnahme der Zellvitalität konnte eine apoptotische Ursache mit Hilfe eines Apoptose-Tests ausgeschlossen werden. Daher lässt sich die Vitalitätsabnahme bei steigender Konzentration der beiden Testkomponenten auf nekrotische Effekte zurückführen. Die erhobenen Daten zeigen ein deutlich erhöhtes genotoxisches Potenzial der Kombination von Acrylamid mit Ethanol, verglichen mit alleiniger Acrylamidexposition. In der Zusammenschau der Ergebnisse erklären sowohl die ethanolvermittelte Induktion des Enzyms Cytochrom P450 2E1 als auch die

Depletion des Glutathionspiegels den überadditiven Effekt von Ethanol und Acrylamid. Die Acrylamidkonzentrationen in dieser Arbeit zeigten erst in sehr hohen Konzentrationen, ab 2,5 mM, einen Effekt. Eine solche Konzentration ist über die Ernährung nicht zu erreichen. Dennoch sollten die Konsequenzen einer Kombination aus acrylamidhaltigen Nahrungsmitteln und Alkoholgenuss auf den Menschen kritisch diskutiert werden.

6 Abstract

Acrylamide is an agent which is classified by the IARC as probably being carcinogenic to humans. Carbohydrate-rich food and cigarette smoke present the main exposure sources for the general public.

In the analysis at hand, the genotoxicity of acrylamide in HepG2-cells was examined. For this purpose the Commetassay was used. In addition to that, the impact of ethanol on the modulation of the cytochrome P 450 2E1 activity and, therefore, of the DNA-migration induced by acrylamide was analysed. Furthermore, the depletion of glutathione in the same cell line was examined.

For the combination of ethanol and acrylamide the hepatocytes were incubated with ethanol for 24 hours and afterwards exposed with 5 mM acrylamide for yet another 24 hours. Concentrations of acrylamide between 1,25 mM and 10 mM induced DNA-migration (OTM) in HepG2-cells dependent on concentration. The exposition with 10 mM acrylamide led to an octuple rise of the DNA impairment compared to negative control. An incubation with 120 mM ethanol and 5 mM acrylamide led to an increase of the DNA-migration which was twice as much as the reference value of 5 mM acrylamide.

Due to ethanol the immunoblot showed an explicit rise of the enzyme cytochrome P450, which plays an important role in the process of metabolism and toxification of acrylamide. In addition to that, the intracellular concentration of glutathione could be significantly reduced by the exposition of ethanol and acrylamide. In the combination experiment with ethanol and acrylamide an ancillary effect of the individual test substances in the GSH-depletion could be observed. Using ssDNS-tests, apoptosis could not be identified and was thus ruled out. Therefore, the detected decrease of cell activity along with the rise of the concentration of both test components at the same time cannot be ascribed to necrotic effects. The collected data showed a strikingly increased genotoxic Potenzial in the case of the combination of acrylamid and ethanol compared to the sole exposition of acrylamide.

In summary, both the induction interfered by ethanol of the enzyme cytochrome P450 2E1 and the depletion of the level glutathione explain the high additive effect of ethanol and acrylamid.

In the analysis at hand, relatively high concentrations of acrylamide were used. Usually such concentrations are not found in common nutrition. Nevertheless the consumption of alcohol in combination with nutrition which contains is to be critically looked at and to be discussed.

7 Abkürzungsverzeichnis

AA	Acrylamid
AAMA	N-acetyl-S-(2-carbamoylethyl)cystein
B[a]P	Benzo[a]pyren
BSO	DL-Buthionin-[S,R]-Sulfoxim
CAS	Chemical Abstracts Service
CHO	Chinese hamster ovary
CLL	Chronisch lymphatische Leukämie
CYP	Cytochrom P 450
DfE	Deutsche Gesellschaft für Ernährungsforschung
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMEM	Dulbecco's minimal essential medium
DTNB	5,5'-Dithiobis-2-Nitrobenzoesäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EPA	Environmental Protection Agency
EtOH	Ethanol
FKS	fötales Kälberserum
GA	Glycidamid
GAMA	N-acetyl-S-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)cystein
Gclc	Glutamate-cysteine ligase, catalytic subunit
GEKID	Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister e.V.
GSSG	Glutathiondisulfid

GSTNB	Disulfidverbindung aus GSH und TNB
GSH	Glutathion
HCl	Salzsäure
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
IARC	International Agency for Research on Cancer
INH	Isoniazid
LMP	Low melting point
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
NMP	Normal melting point
OTM	Olive tail moment
PAK	Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
PBS	Phosphate buffered saline
RKI	Robert-Koch-Institut
ROS	Reactive oxygen species
SHE	Syrische Hamster Embryonalzellen
SS	Single stranded
TL	Tail length
TNB	5-Thio-2-Nitrobenzoesäure
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UDP	Uridindiphosphat
WHO	World Health Organisation

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Reagenzien, Chemikalien mit Reinheitsangabe [%] soweit vorhanden.....	8
Tabelle 2.2: Bezeichnung der verwendeten Test-Kits und ihre Hersteller	8
Tabelle 2.3: Quantitative Zusammensetzung der verwendeten Lösungen.....	9
Tabelle 2.4: Verwendete Geräte.....	10
Tabelle 2.5: Auswahl metabolischer Enzyme in HepG2-Zellen (modifiziert nach Knasmüller et al. 1998)	13
Tabelle 3.1: OTM nach 24stündiger Exposition der HepG2-Zellen gegenüber Acrylamid 1,25 mM - 10 mM (n=3)	35
Tabelle 3.2: Zellvitalität [%] nach 24stündiger Exposition der HepG2-Zellen gegenüber Acrylamid 1,25 mM – 10 mM (n=3).....	35
Tabelle 3.3: Tail length, TL [μm] nach 24stündiger Exposition der HepG2-Zellen gegenüber Acrylamid 1,25 mM – 10 mM (n=3).....	36
Tabelle 3.4: OTM nach 24stündiger Exposition der HepG2-Zellen gegenüber Ethanol 15 mM – 240 mM (n=3)	38
Tabelle 3.5: Zellvitalität [%] nach 24stündiger Exposition der HepG2-Zellen gegenüber Ethanol 15 mM – 240 mM (n=3).....	38
Tabelle 3.6: Tail length, TL [μm] nach 24stündiger Exposition der HepG2-Zellen gegenüber Ethanol 15 mM – 240 mM (n=3).....	40
Tabelle 3.7: OTM nach 24stündiger Exposition der HepG2-Zellen gegenüber Ethanol 15 mM – 240 mM und anschließender Inkubation mit Acrylamid 5 mM für weitere 24 Stunden (n=3).....	41
Tabelle 3.8: Zellvitalität [%] nach 24stündiger Exposition der HepG2-Zellen gegenüber Ethanol 15 mM – 240 mM und anschließender Inkubation mit Acrylamid 5 mM für weitere 24 Stunden (n=3).....	42
Tabelle 3.9: Tail length, TL [μm] nach 24stündiger Exposition der HepG2-Zellen gegenüber Ethanol 15 mM – 240 mM und anschließender Inkubation mit Acrylamid 5 mM für weitere 24 Stunden (n=3).....	43
Tabelle 3.10: GSH-Konzentration [μM / 10^6 Zellen] nach 24stündiger Exposition der HepG2-Zellen gegenüber Ethanol 15 mM – 240 mM (n=3)	45

Tabelle 3.11: GSH-Konzentration [% zur Negativkontrolle] nach 24stündiger Exposition der HepG2-Zellen gegenüber Ethanol 15 mM – 240 mM (n=3).....	46
Tabelle 3.12: GSH-Konzentration [μ M / 106 Zellen] nach 24stündiger Exposition der HepG2-Zellen gegenüber Ethanol 15 mM – 240 mM und anschließender Inkubation mit Acrylamid 5 mM für weitere 24 Stunden (n=3)	47
Tabelle 3.13: GSH-Konzentration [% zur Negativkontrolle] nach 24stündiger Exposition der HepG2-Zellen gegenüber Ethanol 15 mM – 240 mM und anschließender Inkubation mit Acrylamid 5 mM für weitere 24 Stunden (n=3).....	48
Tabelle 3.14: Apoptoseindex nach 24stündiger Exposition der HepG2-Zellen gegenüber Acrylamid 1,25 mM – 10 mM (n=3).....	49
Tabelle 3.15: Apoptoseindex nach 24stündiger Exposition der HepG2-Zellen gegenüber Ethanol 15 mM – 240 mM und anschließender Inkubation mit Acrylamid 5 mM für 24 Stunden (n=3)	50
Tabelle 4.1: Acrylamidgehalt verschiedener Lebensmittel (aus Besaratinia et a. 2007)	66

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1: Strukturelle Darstellung von Acrylamid	3
Abbildung 2.2: Maillard-Reaktion von Asparagin zu Acrylamid (verändert nach Zyzak et al. 2003).....	4
Abbildung 2.3: Strukturelle Darstellung von Ethanol.....	6
Abbildung 2.4: Strukturformel von Benzo[a]pyren	7
Abbildung 2.5: Lichtmikroskopische Darstellung von HepG2-Zellen	11
Abbildung 2.6: Proliferation von HepG2-Zellen (n=2)	12
Abbildung 2.7: Mit Ethidiumbromid angefärbte HepG2-Zellen im Cometassay. Es ist keine DNA-Migration erkennbar.	19
Abbildung 2.8: Mit Ethidiumbromid angefärbte HepG2-Zellen im Cometassay. Die Kometen zeigen eine zunehmende Ausprägung der DNA-Migration.	19
Abbildung 2.9: Cytochrom P450	25
Abbildung 2.10: Schematische Darstellung der chemischen Struktur von Glutathion.....	25
Abbildung 2.11: Schematische Darstellung der GSH-Methodik.....	27
Abbildung 2.12 : Kalibrierfunktion der Glutathionmessung (n=3).....	29
Abbildung 3.1: Auswertung der Kometen mit der Software Comet 3.1 Europe, Kinetic Imaging. Einteilung des Kometen in Kopf und Schweif, sowie Definition des Hintergrundes	34
Abbildung 3.2: DNA schädigende Effekte von Acrylamid 1,25 mM – 10 mM nach 24stündiger Exposition der HepG2-Zellen. Darstellung der Parameter OTM (Balken) und Zellvitalität (Linie) (n=3, * p≤0,05, ** p≤0,01).....	36
Abbildung 3.3: Einfluss von Acrylamid 1,25 mM – 10 mM auf die im Cometassay gemessene Schweiflänge nach 24stündiger Exposition der HepG2-Zellen (n=3, * p ≤ 0,05, ** p ≤ 0,01).....	37
Abbildung 3.4: DNA schädigende Effekte von Ethanol 15 mM – 240 mM nach 24stündiger Exposition der HepG2-Zellen. Darstellung der Parameter OTM (Balken) und Zellvitalität (Linie) (n=3, * p ≤ 0,05, ** p ≤ 0,01).....	39

Abbildung 3.5: Einfluss von Ethanol 15 mM – 240 mM auf die im Cometassay gemessene Schweiflänge nach 24stündiger Exposition der HepG2-Zellen (n=3, * p ≤ 0,05, ** p ≤ 0,01).....	40
Abbildung 3.6: Verstärkung des DNA schädigenden Effekts von 5 mM Acrylamid durch 24stündige Vorbehandlung der HepG2-Zellen mit Ethanol 15 mM – 240 mM. Darstellung der Parameter OTM (Balken) und Zellvitalität (Linie) (n=3, * p ≤ 0,05, ** p ≤ 0,01).....	42
Abbildung 3.7: Zunahme der im Cometassay gemessenen Schweiflänge durch 24stündige Vorbehandlung der HepG2-Zellen mit Ethanol 15 mM – 240 mM, verglichen mit 5 mM Acrylamid (n=3, * p ≤ 0,05, ** p ≤ 0,01).....	44
Abbildung 3.8: Depletion des GSH-Levels [% zur Negativkontrolle] nach 24stündiger Exposition der HepG2-Zellen gegenüber Ethanol 15 mM – 240 mM (n=3, * p ≤ 0,05, ** p ≤ 0,01).....	46
Abbildung 3.9: Depletion der Glutathionkonzentration [% zur Negativkontrolle] nach 24stündiger Exposition der HepG2-Zellen gegenüber Ethanol 15 mM – 240 mM und anschließender Inkubation mit 5 mM Acrylamid für 24 Stunden. Statistische Signifikanzen bezogen auf die Referenzkontrolle (n=3, * p ≤ 0,05, ** p ≤ 0,01).....	48
Abbildung 3.10: Apoptoseinduktion bezogen auf die Negativkontrolle nach 24stündiger Exposition der HepG2-Zellen gegenüber Acrylamid 1,25 mM – 10 mM (n=3, * p ≤ 0,05, ** p ≤ 0,01).....	50
Abbildung 3.11: Apoptoseinduktion bezogen auf die Negativkontrolle nach 24stündiger Exposition der HepG2-Zellen gegenüber Ethanol 15 mM – 240 mM und anschließender Inkubation mit Acrylamid 5 mM für 24 Stunden. Statistische Signifikanzen bezogen auf die Referenzkontrolle (n=3, * p ≤ 0,05, ** p ≤ 0,01).....	51
Abbildung 4.2: Westernblot zum Nachweis von CYP 2E1 nach Exposition mit Ethanol (25 mM – 100 mM) in HepG2-Zellen (modifiziert nach Lamy et al. 2007).....	54
Abbildung 4.3: Schematische Darstellung der Metabolisierung von Acrylamid (modifiziert nach Doerge et al. 2005)	55
Abbildung 4.5: Metabolisierung von Acrylamid und im Urin nachweisbare Metabolite (modifiziert nach Fuhr et al. 2005)	64

10 Literaturverzeichnis

Aden, D P; Fogel, A; Plotkin, S; Damjanov, I; Knowles, B B (1979): Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. In: **Nature**, Jg. 282, H. 5739, S. 615–616.

Arias, Irwin M. (1976): Glutathione. Metabolism and function. New York: **Raven Press** (Kroc Foundation series, 6).

Bacon, James R; Williamson, Gary; Garner, R Colin; Lappin, Graham; Langouët, Sophie; Bao, Yongping (2003): Sulforaphane and quercetin modulate PhIP-DNA adduct formation in human HepG2 cells and hepatocytes. In: **Carcinogenesis**, Jg. 24, H. 12, S. 1903–1911. Online verfügbar unter doi:10.1093/carcin/bgg157.

Besaratinia, Ahmad; Pfeifer, Gerd P (2007): A review of mechanisms of acrylamide carcinogenicity. In: **Carcinogenesis**, Jg. 28, H. 3, S. 519–528. Online verfügbar unter doi:10.1093/carcin/bgm006.

Blasiak, Janusz; Gloc, Ewa; Wozniak, Katarzyna; Czechowska, Agnieszka (2004): Genotoxicity of acrylamide in human lymphocytes. In: **Chemico-biological interactions**, Jg. 149, H. 2-3, S. 137–149. Online verfügbar unter doi:10.1016/j.cbi.2004.08.002.

Bouma, M E; Rogier, E; Verthier, N; Labarre, C; Feldmann, G (1989): Further cellular investigation of the human hepatoblastoma-derived cell line HepG2: morphology and immunocytochemical studies of hepatic-secreted proteins. In: **In vitro cellular & developmental biology** : journal of the Tissue Culture Association, Jg. 25, H. 3 Pt 1, S. 267–275.

Brendler-Schwaab, Susanne; Hartmann, Andreas; Pfuhler, Stefan; Speit, Günter (2005): The in vivo comet assay: use and status in genotoxicity testing. In: **Mutagenesis**, Jg. 20, H. 4, S. 245–254. Online verfügbar unter doi:10.1093/mutage/gei033.

Bull, R J; Robinson, M; Laurie, R D; Stoner, G D; Greisiger, E; Meier, J R; Stober, J (1984a): Carcinogenic effects of acrylamide in Sencar and A/J mice. In: **Cancer research**, Jg. 44, H. 1, S. 107–111.

Bull, R J; Robinson, M; Stober, J A (1984b): Carcinogenic activity of acrylamide in the skin and lung of Swiss-ICR mice. In: **Cancer letters**, Jg. 24, H. 2, S. 209–212.

Burek J, Albee R, Beyer J et al. (1980) Subchronic toxicity of acrylamide administered to rats in the drinking water followed by up to 144 days of recovery. In: **Journal of Environmental Pathology & Toxicology**, H. 4: S.157–182

Butterworth, B E; Eldridge, S R; Sprankle, C S; Working, P K; Bentley, K S; Hurtt, M E (1992): Tissue-specific genotoxic effects of acrylamide and acrylonitrile. In: **Environmental and molecular mutagenesis**, Jg. 20, H. 3, S. 148–155.

Chen, Ying; Yang, Yi; Miller, Marian L; Shen, Dongxiao; Shertzer, Howard G; Stringer, Keith F et al. (2007): Hepatocyte-specific Gclc deletion leads to rapid onset of steatosis with mitochondrial injury and liver failure. In: **Hepatology** (Baltimore, Md.), Jg. 45, H. 5, S. 1118–1128. Online verfügbar unter doi:10.1002/hep.21635.

Choucroun, P; Gillet, D; Dorange, G; Sawicki, B; Dewitte, J D (2001): Comet assay and early apoptosis. In: **Mutation research**, Jg. 478, H. 1-2, S. 89–96.

Collins, A R; Dobson, V L; Dusinská, M; Kennedy, G; Stětina, R (1997): The comet assay: what can it really tell us? In: **Mutation research**, Jg. 375, H. 2, S. 183–193.

Collins, Andrew R (2004): The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. In: **Molecular biotechnology**, Jg. 26, H. 3, S. 249–261. Online verfügbar unter doi:10.1385/MB:26:3:249.

Dai, Y; Rashba-Step, J; Cederbaum, A I (1993): Stable expression of human cytochrome P4502E1 in HepG2 cells: characterization of catalytic activities and

production of reactive oxygen intermediates. In: **Biochemistry**, Jg. 32, H. 27, S. 6928–6937.

Dashti, N; Wolfbauer, G (1987): Secretion of lipids, apolipoproteins, and lipoproteins by human hepatoma cell line, HepG2: effects of oleic acid and insulin. In: **Journal of lipid research**, Jg. 28, H. 4, S. 423–436.

Dearfield, K L; Douglas, G R; Ehling, U H; Moore, M M; Sega, G A; Brusick, D J (1995): Acrylamide: a review of its genotoxicity and an assessment of heritable genetic risk. In: **Mutation research**, Jg. 330, H. 1-2, S. 71–99.

Dearfield, K L; Jacobson-Kram, D; Brown, N A; Williams, J R (1983): Evaluation of a human hepatoma cell line as a target cell in genetic toxicology. In: **Mutation research**, Jg. 108, H. 1-3, S. 437–449.

Doerge, Daniel R; Young, John F; McDaniel, L Patrice; Twaddle, Nathan C; Churchwell, Mona I (2005a): Toxicokinetics of acrylamide and glycidamide in B6C3F1 mice. In: **Toxicology and applied pharmacology**, Jg. 202, H. 3, S. 258–267. Online verfügbar unter doi:10.1016/j.taap.2004.07.001.

Doerge, Daniel R; Young, John F; McDaniel, L Patrice; Twaddle, Nathan C; Churchwell, Mona I (2005b): Toxicokinetics of acrylamide and glycidamide in Fischer 344 rats. In: **Toxicology and applied pharmacology**, Jg. 208, H. 3, S. 199–209. Online verfügbar unter doi:10.1016/j.taap.2005.03.003.

Doostdar, H; Duthie, S J; Burke, M D; Melvin, W T; Grant, M H (1988): The influence of culture medium composition on drug metabolising enzyme activities of the human liver derived Hep G2 cell line. In: **FEBS letters**, Jg. 241, H. 1-2, S. 15–18.

Exon, J H (2007): A review of the toxicology of acrylamide. In: **Journal of toxicology and environmental health**. Part B, Critical reviews, Jg. 9, H. 5, S. 397–412. Online verfügbar unter doi:10.1080/10937400600681430.

Fairbairn, D W; Olive, P L; O'Neill, K L (1995): The comet assay: a comprehensive review. In: **Mutation research**, Jg. 339, H. 1, S. 37–59.

Frankfurt, O S; Krishan, A (2001a): Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the specific detection of apoptotic cells and its application to rapid drug screening. In: **Journal of immunological methods**, Jg. 253, H. 1-2, S. 133–144.

Frankfurt, O S; Krishan, A (2001b): Identification of apoptotic cells by formamide-induced dna denaturation in condensed chromatin. In: **The journal of histochemistry and cytochemistry** : official journal of the Histochemistry Society, Jg. 49, H. 3, S. 369–378.

Fuhr, Uwe; Boettcher, Melanie I; Kinzig-Schippers, Martina; Weyer, Alexandra; Jetter, Alexander; Lazar, Andreas et al. (2006): Toxicokinetics of acrylamide in humans after ingestion of a defined dose in a test meal to improve risk assessment for acrylamide carcinogenicity. In: **Cancer epidemiology, biomarkers & prevention** : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology, Jg. 15, H. 2, S. 266–271. Online verfügbar unter doi:10.1158/1055-9965.EPI-05-0647.

Ghanayem, B I; Witt, K L; Kissling, G E; Tice, R R; Recio, L (2005): Absence of acrylamide-induced genotoxicity in CYP2E1-null mice: evidence consistent with a glycidamide-mediated effect. In: **Mutation research**, Jg. 578, H. 1-2, S. 284–297. Online verfügbar unter doi:10.1016/j.mrfmmm.2005.05.004.

Inoue, M; Nobukuni, Y; Ando, Y; Hirota, M; Hirata, E; Morino, Y (1987): Interorgan metabolism of glutathione as the defence mechanism against oxidative stress. In: **Developments in toxicology and environmental science**, Jg. 14, S. 51–60.

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. In: **Toxicology and applied pharmacology**, Jg. 85, H. 2, S. 154–168.

Kirman, Christopher R; Gargas, Michael L; Deskin, Randy; Tonner-Navarro, Lisa; Andersen, Melvin E (2003): A physiologically based pharmacokinetic model for acrylamide and its metabolite, glycidamide, in the rat. In: **Journal of toxicology and environmental health**. Part A, Jg. 66, H. 3, S. 253–274.

Klaude, M; Eriksson, S; Nygren, J; Ahnström, G (1996): The comet assay: mechanisms and technical considerations. In: **Mutation research**, Jg. 363, H. 2, S. 89–96.

Knasmüller, S; Mersch-Sundermann, V; Kevekordes, S; Darroudi, F; Huber, W W; Hoelzl, C et al. (2004): Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants; current state of knowledge. In: **Toxicology**, Jg. 198, H. 1-3, S. 315–328. Online verfügbar unter doi:10.1016/j.tox.2004.02.008.

Knasmüller, S; Parzefall, W; Sanyal, R; Ecker, S; Schwab, C; Uhl, M et al. (1998): Use of metabolically competent human hepatoma cells for the detection of mutagens and antimutagens. In: **Mutation research**, Jg. 402, H. 1-2, S. 185–202.

Knowles, B B; Howe, C C; Aden, D P (1980): Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. In: **Science** (New York, N.Y.), Jg. 209, H. 4455, S. 497–499.

Lamy, Evelyn; Kassie, Fekadu; Gminski, Richard; Schmeiser, Heinz H; Mersch-Sundermann, Volker (2004): 3-Nitrobenzanthrone (3-NBA) induced micronucleus formation and DNA damage in human hepatoma (HepG2) cells. In: **Toxicology letters**, Jg. 146, H. 2, S. 103–109.

Lash, L H; Jones, D P (1985): Distribution of oxidized and reduced forms of glutathione and cysteine in rat plasma. In: **Archives of biochemistry and biophysics**, Jg. 240, H. 2, S. 583–592.

Lee, Yuk-Young; Kim, Hong-Gyum; Jung, Haeng-Im; Shin, Youn Hee; Hong, Sung Min; Park, Eun-Hee et al. (2002): Activities of antioxidant and redox enzymes in human

normal hepatic and hepatoma cell lines. In: **Molecules and cells**, Jg. 14, H. 2, S. 305–311.

LoPachin, Richard M (2006): Acrylamide neurotoxicity: neurological, morphological and molecular endpoints in animal models. In: **Advances in experimental medicine and biology**, Jg. 561, S. 21–37.

Luch, Andreas (2005): Nature and nurture - lessons from chemical carcinogenesis. In: **Nature reviews. Cancer**, Jg. 5, H. 2, S. 113–125. Online verfügbar unter doi:10.1038/nrc1546.

Manière, Isabelle; Godard, Thierry; Doerge, Daniel R; Churchwell, Mona I; Guffroy, Magali; Laurentie, Michel; Poul, Jean-Michel (2005): DNA damage and DNA adduct formation in rat tissues following oral administration of acrylamide. In: **Mutation research**, Jg. 580, H. 1-2, S. 119–129. Online verfügbar unter doi:10.1016/j.mrgentox.2004.10.012.

Manjanatha, Mugimane G; Aidoo, Anane; Shelton, Sharon D; Bishop, Michelle E; McDaniel, Lea P; Lyn-Cook, Lascelles E; Doerge, Daniel R (2006): Genotoxicity of acrylamide and its metabolite glycidamide administered in drinking water to male and female Big Blue mice. In: **Environmental and molecular mutagenesis**, Jg. 47, H. 1, S. 6–17. Online verfügbar unter doi:10.1002/em.20157.

Melendez-Colon, V J; Luch, A; Seidel, A; Baird, W M (1999): Cancer initiation by polycyclic aromatic hydrocarbons results from formation of stable DNA adducts rather than apurinic sites. In: **Carcinogenesis**, Jg. 20, H. 10, S. 1885–1891.

Mersch-Sundermann, Volker; Knasmüller, Siegfried; Wu, Xin-Jiang; Darroudi, Firouz; Kassie, Fekadu (2004): Use of a human-derived liver cell line for the detection of cytoprotective, antigenotoxic and cogenotoxic agents. In: **Toxicology**, Jg. 198, H. 1-3, S. 329–340. Online verfügbar unter doi:10.1016/j.tox.2004.02.009.

Mucci, L A; Dickman, P W; Steineck, G; Adami, H-O; Augustsson, K (2003): Dietary acrylamide and cancer of the large bowel, kidney, and bladder: absence of an association in a population-based study in Sweden. In: **British journal of cancer**, Jg. 88, H. 1, S. 84–89. Online verfügbar unter doi:10.1038/sj.bjc.6600726.

Mucci, Lorelei A; Adami, Hans-Olov (2006): The role of epidemiology in understanding the relationship between dietary acrylamide and cancer risk in humans. In: **Advances in experimental medicine and biology**, Jg. 561, S. 39–47.

Mucci, Lorelei A; Lindblad, Per; Steineck, Gunnar; Adami, Hans-Olov (2004): Dietary acrylamide and risk of renal cell cancer. In: **International journal of cancer**. Journal international du cancer, Jg. 109, H. 5, S. 774–776. Online verfügbar unter doi:10.1002/ijc.20011.

Mucci, Lorelei A; Sandin, Sven; Bälter, Katarina; Adami, Hans-Olov; Magnusson, Cecilia; Weiderpass, Elisabete (2005): Acrylamide intake and breast cancer risk in Swedish women. In: **JAMA** : the journal of the American Medical Association, Jg. 293, H. 11, S. 1326–1327. Online verfügbar unter doi:10.1001/jama.293.11.1326.

Natarajan, A T; Darroudi, F (1991): Use of human hepatoma cells for in vitro metabolic activation of chemical mutagens/carcinogens. In: **Mutagenesis**, Jg. 6, H. 5, S. 399–403.

Olive, P L; Banáth, J P (1993): Detection of DNA double-strand breaks through the cell cycle after exposure to X-rays, bleomycin, etoposide and 125IdUrd. In: **International journal of radiation biology**, Jg. 64, H. 4, S. 349–358.

Olive, P L; Banáth, J P; Durand, R E (1990): Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet" assay. In: **Radiation research**, Jg. 122, H. 1, S. 86–94.

Olive, Peggy L; Durand, Ralph E (2005): Heterogeneity in DNA damage using the comet assay. In: **Cytometry**. Part A : the journal of the International Society for

Analytical Cytology, Jg. 66, H. 1, S. 1–8. Online verfügbar unter doi:10.1002/cyto.a.20154.

Östling, O.; Johanson, K J (1984): Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. In: **Biochemical and biophysical research communications**, Jg. 123, H. 1, S. 291–298.

Park, Joungjoa; Kamendulis, Lisa M; Friedman, Marvin A; Klaunig, James E (2002): Acrylamide-induced cellular transformation. In: **Toxicological sciences** : an official journal of the Society of Toxicology, Jg. 65, H. 2, S. 177–183.

Pelucchi, Claudio; Galeone, Carlotta; Levi, Fabio; Negri, Eva; Franceschi, Silvia; Talamini, Renato et al. (2006): Dietary acrylamide and human cancer. In: **International journal of cancer**. Journal international du cancer, Jg. 118, H. 2, S. 467–471. Online verfügbar unter doi:10.1002/ijc.21336.

Phillips, D H (1999): Polycyclic aromatic hydrocarbons in the diet. In: **Mutation research**, Jg. 443, H. 1-2, S. 139–147.

Puppel, Nicole; Tjaden, Zeina; Fueller, Florian; Marko, Doris (2005): DNA strand breaking capacity of acrylamide and glycidamide in mammalian cells. In: **Mutation research**, Jg. 580, H. 1-2, S. 71–80. Online verfügbar unter doi:10.1016/j.mrgentox.2004.11.009.

Sharp, David (2003): Acrylamide in food. In: **Lancet**, Jg. 361, H. 9355, S. 361–362. Online verfügbar unter doi:10.1016/S0140-6736(03)12442-7.

Singh, N P; McCoy, M T; Tice, R R; Schneider, E L (1988): A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. In: **Experimental cell research**, Jg. 175, H. 1, S. 184–191.

Speit, Günter; Hartmann, Andreas (2004): The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage. In: **Methods in molecular biology** (Clifton, N.J.), Jg. 291, S. 85–95.

Stadler, Richard H; Blank, Imre; Varga, Natalia; Robert, Fabien; Hau, Jörg; Guy, Philippe A et al. (2002): Acrylamide from Maillard reaction products. In: **Nature**, Jg. 419, H. 6906, S. 449–450. Online verfügbar unter doi:10.1038/419449a.

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. In: **Chemical research in toxicology**, Jg. 12, H. 11, S. 1110–1116.

Sumner, Susan C J; Williams, Carla C; Snyder, Rodney W; Krol, Wojciech L; Asgharian, Bahman; Fennell, Timothy R (2003): Acrylamide: a comparison of metabolism and hemoglobin adducts in rodents following dermal, intraperitoneal, oral, or inhalation exposure. In: **Toxicological sciences** : an official journal of the Society of Toxicology, Jg. 75, H. 2, S. 260–270. Online verfügbar unter doi:10.1093/toxsci/kfg191.

Tareke, Eden; Rydberg, Per; Karlsson, Patrik; Eriksson, Sune; Törnqvist, Margareta (2002): Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. In: **Journal of agricultural and food chemistry**, Jg. 50, H. 17, S. 4998–5006.

Tice, R R; Agurell, E; Anderson, D; Burlinson, B; Hartmann, A; Kobayashi, H et al. (2000): Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. In: **Environmental and molecular mutagenesis**, Jg. 35, H. 3, S. 206–221.

Tice, R R; Strauss, G H (1995): The single cell gel electrophoresis/comet assay: a Potenzial tool for detecting radiation-induced DNA damage in humans. In: **Stem cells** (Dayton, Ohio), Jg. 13 Suppl 1, S. 207–214.

Uhl, M; Helma, C; Knasmüller, S (2000): Evaluation of the single cell gel electrophoresis assay with human hepatoma (Hep G2) cells. In: **Mutation research**, Jg. 468, H. 2, S. 213–225.

Uhl, Maria; Laky, Brenda; Lhoste, Evelyn; Kassie, Fekadu; Kundi, Michael; Knasmüller, Siegfried (2003): Effects of mustard sprouts and allylthiocyanate on benzo(a)pyrene-induced DNA damage in human-derived cells: a model study with the single cell gel electrophoresis/Hep G2 assay. In: **Teratogenesis, carcinogenesis, and mutagenesis**, Jg. Suppl 1, S. 273–282. Online verfügbar unter doi:10.1002/tcm.10051.

Wendel, A; Cikryt, P (1981): The level and half-life of glutathione in human plasma. In: **FEBS letters**, Jg. 120, H. 2, S. 209–211.

World Health Organisation (WHO) (2002): WHO to hold urgent expert consultation on acrylamide in food after findings of Swedish National Food Administration. In: **Central European journal of public health**, Jg. 10, H. 4, S. 162–173.

World Health Organisation (WHO) (2005): Summary Report of the Sixty-Fourth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additive (JECFA), H. **The ILSI Press International Life Sciences Institute**, Washington D.C., S. 1–47.

Yang, M X; Cederbaum, A I (1997): Characterization of cytochrome P4502E1 turnover in transfected HepG2 cells expressing human CYP2E1. In: **Archives of biochemistry and biophysics**, Jg. 341, H. 1, S. 25–33. Online verfügbar unter doi:10.1006/abbi.1997.9907.

Zhu, Ying-Jian; Zeng, Tao; Zhu, Ying-Biao; Yu, Su-Fang; Wang, Qing-Shan; Zhang, Li-Ping et al. (2008): Effects of Acrylamide on the Nervous Tissue Antioxidant System and Sciatic Nerve Electrophysiology in the Rat. In: **Neurochemical research**. Online verfügbar unter doi:10.1007/s11064-008-9730-9.

Internetquellen / Internetbildquellen:

Seite „Cometassay“. In: German medical science. (Abgerufen: 20. Juli 2009)

URL: <http://www.egms.de/egms/servlet/Figure?id=cto000003&figure=f1&vol=2004-3>

Seite „Entsorgungstechnik relevanter Stoffgruppen“. In: Fachhochschule Gießen Friedberg. (Abgerufen: 20. Juli 2009)

URL: <http://homepages.fh-giessen.de/~hg8941/organikws98.html>

Seite „Cytochrom P450“. In: Wikipedia, Die freie Enzyklopädie.

Bearbeitungsstand: 9. Mai 2009, (Abgerufen: 20. Juli 2009)

URL: http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Cytochrom_P450&oldid=5986834

Seite „Krebs in Deutschland“ In: Robert Koch Institut (Abgerufen: 04. Dezember 2011)

URL: [http://edoc.rki.de\(dokuments/rki_fv/re2vZ21t28Ir8Y/PDF/22aJOdYnmXV0I.pdf](http://edoc.rki.de(dokuments/rki_fv/re2vZ21t28Ir8Y/PDF/22aJOdYnmXV0I.pdf)

Seite “Fragen und Antworten zur Acrylamid”. In: Bundesinstitut für Risikobewertung (Abgerufen 04. Dezember 2011)

URL:

http://www.bfr.bund.de/de/fragen_und_antworten_zu_acrylamid1955.html#topic_1279

36

11 Publikationsverzeichnis

Lamy E, **Völkel Y**, Schröder J, Roos PH, Kassie F, Mersch-Sundermann V (2008)
Ethanol enhances the Acrylamide-mediated genotoxicity in human, metabolically
HepG2 cells by CYP2E1-modulation and glutathione depletion. International Journal of
Hygiene and Environmental Health 211, 74-81

Lamy E, **Völkel Y**, Schröder JF, Roos PH, Mersch-Sundermann V (2006):
Enhancement of acrylamide-mediated DNA-migration by ethanol in a human hepatoma
(HepG2) cell line. 22. Kongress der Gesellschaft für Umwelt-Mutationsforschung
(GUM), Darmstadt, Germany (2006).

Lamy E, Schröder J, **Völkel Y**, Mersch-Sundermann V, Untersuchungen des
chemopräventiven (antigentoxischen) Effektes von Eruca Sativa (Rucola) und seinen
Isothiocyanaten in humanen Zellsystemen, presented at the 47th. Congress of the
DGPT, Mainz, Germany (2006)

Lamy E, Schröder J, **Völkel Y**, Mersch-Sundermann V: Studies on the chemopreventive
effects of Eruca Sativa (Rucola) and its Isothiocyanates in Human Cell Systems,
presented at the 45th Congress of the Society of Toxicology (SOT), San Diego, USA
(2006) and at the 22. Congress of the Gesellschaft für Umwelt-Mutationsforschung
(GUM), Darmstadt, Germany (2006).

Lamy E, **Völkel Y**, Schröder JF, Roos PH, Mersch-Sundermann V (2005): Beer and
potato chips: Ethanol enhances the genotoxicity of acrylamide in human, metabolically
competent HepG2 cells by CYP2E1 induction. 13. Kongress der Gesellschaft für
Hygiene und Umweltmedizin (GHU), 9. Kongress der International Society of
Environmental Medicine (ISEM), LGL Kongress des Öffentlichen Gesundheitsdienstes
(ÖGD), Erlangen, Germany (2005).

12 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfsmittel oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

Datum: 20.12.2011

Yvonne Völkel

13 Danksagungen

Hiermit möchte ich allen danken, die an dem Zustandekommen dieser Arbeit beteiligt waren.

An erster Stelle sei Herrn Prof. Dr. Volker Mersch-Sundermann herzlichst für die Überlassung der interessanten Aufgabenstellung, die sehr gute Betreuung und Geduld gedankt.

Mein ganz besonderer Dank geht an meine Betreuerin, Frau Dr. Evelyn Lamy, die die Einarbeitung in die Methodik ausgezeichnet begleitete und für jede komplexe Fragestellung zu jeder Zeit eine Anregung zur Lösung fand. Ohne ihre Anleitung und unermüdliche Geduld wäre eine Fertigstellung meiner Arbeit nicht denkbar gewesen.

Ferner danke ich Anja Schnecko für die Begleitung der ersten ungewohnten Schritte im Labor, insbesondere bei der Arbeit mit Zellkulturen, sowie Herrn Dr. Firouz Darroudi (LUMC, Niederlande) für die Bereitstellung der HepG2-Zellen.

Insbesondere möchte ich auf diesem Wege meinen Eltern, denen diese Dissertation gewidmet ist, danken. Sie haben mir das Hochschulstudium ermöglicht und mich in jeder Hinsicht unterstützt. In Gedenken an meinen Vater, Helmut Völkel, verstorben am 17.05.2012.

Ein weiterer Dank gilt meiner langjährigen Studienkollegin Julia Schröder; in Gesellschaft macht Laborarbeit noch mehr Freude. Abschließend möchte ich all meinen Freunden danken, die mir jederzeit zur Seite standen: Alexandra Keck, Stephanie Habermehl, Daniela Stöckel, Hildrun Einert, Alexandra Wegmann ... und meinem Bruder René Völkel.

14 Anhang

Olive Tail Moment, OTM nach 24stündiger Exposition der HepG2-Zellen gegenüber Acrylamid 1,25 mM - 10 mM (n=3)

				MW	Stand.abw.	t-Test
Aqua dest.	0,857	0,434	0,541	0,611	0,220	
AA 1,25 mM	1,155	0,785	1,281	1,074	0,258	0,079
AA 2,5 mM	1,688	1,566	2,567	1,940	0,546	0,037
AA 5 mM	2,718	2,579	3,075	2,791	0,256	0,000
AA 10 mM	5,536	4,750	4,677	4,988	0,477	0,001
B(a)P 50µM	3,766	3,942	5,199	4,302	0,781	0,010

Zellvitalität [%] nach 24stündiger Exposition der HepG2-Zellen gegenüber Acrylamid 1,25 mM – 10 mM (n=3)

				MW	Stand.abw.
Aqua dest.	93,70	94,20	95,10	94,33	0,71
AA 1,25 mM	83,10	84,50	90,70	86,10	4,04
AA 2,5 mM	75,00	78,90	75,60	76,50	2,10
AA 5 mM	75,70	68,40	72,70	72,27	3,67
AA 10 mM	66,70	68,40	72,00	69,03	2,71
B(a)P 50µM	82,90	83,90	80,00	82,27	2,03

Tail length, TL [µm] nach 24stündiger Exposition der HepG2-Zellen gegenüber Acrylamid 1,25 mM – 10 mM (n=3)

				MW	Stand.abw.	t-Test
Aqua dest.	12,716	8,647	10,431	10,598	2,039	
AA 1,25 mM	14,167	12,029	17,578	14,592	2,799	0,123
AA 2,5 mM	28,108	23,225	30,588	27,307	3,746	0,006
AA 5 mM	30,676	33,745	36,333	33,585	2,832	0,001
AA 10 mM	46,176	44,225	50,137	46,846	3,012	0,000
B(a)P 50µM	46,431	47,784	57,029	50,415	5,768	0,003

Olive Tail Moment, OTM nach 24stündiger Exposition der HepG2-Zellen gegenüber Ethanol 15 mM – 240 mM (n=3)

				MW	Stand.abw.	t-Test
Aqua dest.	0,434	0,541	0,630	0,535	0,098	
EtOH 15 mM	0,746	0,855	0,729	0,777	0,069	0,030
EtOH 30 mM	0,844	0,794	0,963	0,867	0,087	0,012
EtOH 60 mM	0,878	0,825	0,994	0,899	0,086	0,009
EtOH 120 mM	1,130	0,793	0,953	0,959	0,168	0,029
EtOH 240 mM	0,811	0,807	0,828	0,815	0,011	0,037
B(a)P 50µM	3,942	5,199	4,861	4,667	0,650	0,007

Zellvitalität [%] nach 24stündiger Exposition der HepG2-Zellen gegenüber Ethanol 15 mM – 240 mM (n=3)

				MW	Stand.abw.
Aqua dest.	94,20	95,10	93,80	94,37	0,67
EtOH 15 mM	90,80	86,50	87,80	88,37	2,21
EtOH 30 mM	84,90	85,30	85,90	85,37	0,50
EtOH 60 mM	75,00	76,40	76,90	76,10	0,98
EtOH 120 mM	68,80	69,60	72,40	70,27	1,89
EtOH 240 mM	69,40	68,20	66,70	68,10	1,35
B(a)P 50µM	83,90	80,00	79,40	81,10	2,44

Tail length, TL [µm] nach 24stündiger Exposition der HepG2-Zellen gegenüber Ethanol 15 mM – 240 mM (n=3)

				MW	Stand.abw.	t-Test
Aqua dest.	8,647	10,431	11,451	10,176	1,419	
EtOH 15 mM	11,422	13,049	11,020	11,830	1,075	0,188
EtOH 30 mM	12,069	11,814	12,794	12,225	0,509	0,117
EtOH 60 mM	11,353	12,775	13,549	12,559	1,114	0,088
EtOH 120 mM	13,304	12,529	13,980	13,271	0,726	0,044
EtOH 240 mM	12,118	14,284	13,294	13,232	1,085	0,045
B(a)P 50µM	47,784	57,029	52,402	52,405	4,623	0,002

Olive Tail Moment, OTM nach 24stündiger Exposition der HepG2-Zellen gegenüber Ethanol 15 mM – 240 mM und anschließender Inkubation mit Acrylamid 5 mM für weitere 24 Stunden (n=3)

				MW	Stand.abw.	t-Test
Aqua dest.	0,710	0,581	0,490	0,594	0,110	0,013
Referenz AA 5 mM	1,780	2,278	1,666	1,908	0,325	
EtOH 15 mM + AA 5 mM	1,876	3,212	2,254	2,447	0,689	0,312
EtOH 30 mM + AA 5 mM	2,361	3,947	3,456	3,255	0,812	0,087
EtOH 60 mM + AA 5 mM	3,447	4,061	3,743	3,750	0,307	0,002
EtOH 120 mM + AA 5 mM	4,698	4,447	3,828	4,324	0,448	0,002
EtOH 240 mM + AA 5 mM	4,509	3,726	3,347	3,861	0,593	0,014
B(a)P 50µM	4,395	3,861	3,151	3,803	0,624	0,018

Zellvitalität [%] nach 24stündiger Exposition der HepG2-Zellen gegenüber Ethanol 15 mM – 240 mM und anschließender Inkubation mit Acrylamid 5 mM für weitere 24 Stunden (n=3)

				MW	Stand.abw.
Aqua dest.	94,10	96,70	95,20	95,33	1,31
Referenz AA 5 mM	87,50	72,70	87,20	82,47	8,46
EtOH 15 mM + AA 5 mM	89,80	68,80	81,50	80,03	10,58
EtOH 30 mM + AA 5 mM	87,50	68,20	76,20	77,30	9,70
EtOH 60 mM + AA 5 mM	86,40	66,70	73,30	75,47	10,03
EtOH 120 mM + AA 5 mM	82,80	66,70	68,60	72,70	8,80
EtOH 240 mM + AA 5 mM	82,70	61,10	66,70	70,17	11,21
B(a)P 50µM	81,40	81,00	84,40	82,27	1,86

Tail length, TL [μm] nach 24stündiger Exposition der HepG2-Zellen gegenüber Ethanol 15 mM – 240 mM und anschließender Inkubation mit Acrylamid 5 mM für weitere 24 Stunden (n=3)

				MW	Stand.abw.	t-Test
Aqua dest.	12,471	10,490	7,578	10,180	2,461	0,053
Referenz AA 5 mM	19,735	31,186	20,324	23,748	6,448	
EtOH 15 mM + AA 5 mM	21,922	41,343	25,696	29,654	10,298	0,456
EtOH 30 mM + AA 5 mM	26,529	45,069	32,108	34,569	9,511	0,188
EtOH 60 mM + AA 5 mM	32,637	44,971	34,951	37,520	6,556	0,060
EtOH 120 mM + AA 5 mM	37,039	49,088	38,471	41,533	6,582	0,029
EtOH 240 mM + AA 5 mM	34,029	48,618	36,539	39,729	7,800	0,054
B(a)P 50μM	41,794	43,559	28,882	38,078	8,013	0,076

GSH-Konzentration [μM / 10^6 Zellen] nach 24stündiger Exposition der HepG2-Zellen gegenüber Ethanol 15 mM – 240 mM (n=3)

GSH-Konzentration [μM / 106 Zellen] nach 24stündiger Exposition der HepG2-Zellen gegenüber Ethanol 15 mM – 240 mM und anschließender Inkubation mit Acrylamid 5 mM für weitere 24 Stunden (n=3)

					MW	Stand.abw.
Negativkontrolle	3,6244	4,3149	5,6952	6,0231	4,865	0,989
EtOH 15 mM	2,8480	4,8530	3,9762		3,892	1,005
EtOH 60 mM	1,9711	1,8400	2,8357		2,216	0,541
EtOH 240 mM	1,1398	0,7620	1,8606		1,254	0,558
Referenz AA 5mM		1,2994	2,8516	2,1073	2,086	0,776
EtOH 15 mM + AA 5mM		1,4987	0,7429	0,9906	1,077	0,385
EtOH 60 mM + AA 5 mM		1,8458	0,6475	1,1499	1,214	0,602
EtOH 240 mM + AA 5 mM		0,7678	0,0137	0,4431	0,408	0,378

GSH-Konzentration [% zur Negativkontrolle] nach 24stündiger Exposition der HepG2-Zellen gegenüber Ethanol 15 mM – 240 mM (n=3)

					MW	Stand.abw.	t-Test
Negativkontrolle	100%	100%	100%	100%	100%	0%	
EtOH 15 mM	84%	88%	84%	86%	86%	2%	0,010
EtOH 60 mM	66%	56%	69%	64%	64%	7%	0,012
EtOH 240 mM	49%	37%	53%	46%	46%	9%	0,008

GSH-Konzentration [% zur Negativkontrolle] nach 24stündiger Exposition der HepG2-Zellen gegenüber Ethanol 15 mM – 240 mM und anschließender Inkubation mit Acrylamid 5 mM für weitere 24 Stunden (n=3)

				MW	Stand.abw.	t-Test
Negativkontrolle	100%	100%	100%	100%	0%	0,001
Referenz AA 5mM	53%	57%	57%	55%	2%	
EtOH 15 mM + AA 5mM	36%	38%	40%	38%	2%	0,001
EtOH 60 mM + AA 5 mM	35%	33%	45%	38%	6%	0,028
EtOH 240 mM + AA 5 mM	23%	29%	29%	27%	3%	0,001

Apoptoseindex nach 24stündiger Exposition der HepG2-Zellen gegenüber Acrylamid 1,25 mM – 10 mM (n=3)

				MW	Stand.abw.	t-Test
Aqua dest.	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	
AA 1,25 mM	0,911	0,999	0,881	0,930	0,062	0,189
AA 2,5 mM	0,989	0,953	1,014	0,985	0,031	0,498
AA 5 mM	0,985	0,953	0,877	0,938	0,055	0,192
AA 10 mM	1,071	1,056	0,979	1,035	0,049	0,339
Positivkontrolle (ssDNA)	4,727	5,733	5,175	5,212	0,504	0,005

Apoptoseindex nach 24stündiger Exposition der HepG2-Zellen gegenüber Ethanol 15 mM – 240 mM und anschließender Inkubation mit Acrylamid 5 mM für 24 Stunden (n=4)

					MW	Stand.abw.	t-Test
Aqua dest.	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,963
Referenz AA 5mM	1,090	1,063	0,794	1,039	0,997	0,137	
EtOH 15 mM + AA 5mM	1,136	1,064	0,792	1,015	1,002	0,148	0,961
EtOH 60 mM + AA 5 mM	1,199	0,819	0,688	0,991	0,924	0,222	0,602
EtOH 240 mM + AA 5 mM	1,120	0,276	0,731	0,722	0,712	0,345	0,202
Positivkontrolle (ssDNA)	3,638	4,290	4,158	5,312	4,350	0,701	0,002



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-5962-0



9 783835 959620

Cover Photo: © Sergey Nivens - Fotolia.com