

Bundesgesundheitsbl 2017 · 60:761–767
 DOI 10.1007/s00103-017-2558-1
 Online publiziert: 17. Mai 2017
 © Der/die Autor(en) 2017. Dieser Artikel ist
 eine Open-Access-Publikation.



Klaus Abraham · Bernhard Monien · Alfonso Lampen

Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin, Deutschland

Biomarker der internen Exposition gegenüber toxikologisch relevanten Kontaminanten in Lebensmitteln

Einleitung

Die aussagekräftige Risikobewertung von Inhaltsstoffen und Kontaminanten in Lebensmitteln erfordert eine quantitative Aussage über das Gefährdungspotenzial (engl. hazard) der Substanz – idealerweise einen abgeleiteten Wert für die akzeptable bzw. tolerierbare tägliche Aufnahmedosis (ADI bzw. TDI) oder eine Wirkdosis aus einer tierexperimentellen Langzeitstudie im Fall von gentoxischen Kanzerogenen. Diese Dosis wird bei der Risikobewertung der realen Expositionsdosis des Menschen gegenübergestellt (ohne Exposition gibt es kein Risiko). Klassisch werden Expositionsdaten aus Gehaltsdaten der Substanz in Lebensmitteln und den Verzehrdaten dieser Lebensmittel erhoben. Idealerweise muss dazu eine valide analytische Methode für alle relevanten Lebensmittelmatrizes etabliert sein, und es muss für die relevanten Lebensmittel ein entsprechend großer, aktueller und möglichst repräsentativer Datensatz erhoben worden sein. Bei den Verzehrdaten werden zurzeit in Deutschland üblicherweise die Daten der Nationalen Verzehrstudie II (NVS II) verwendet. Sie wurden zwischen November 2005 und Januar 2007 erhoben und sind mit einem Alter von nun mehr als 10 Jahren nur bedingt aktuell. Aus beiden Datensätzen lässt sich mit modernen statistischen Verfahren, die sowohl die Variationen bei den Gehaltsdaten als auch bei den Verzehrdaten berücksichtigen, ein Bild der Verteilung der Exposition innerhalb einer Bevölkerungsgruppe

erstellen („populationsbezogene Expositionsschätzung“). Die Risikobewertung nimmt dann insbesondere auf die mittlere Exposition sowie die hohe Exposition (95. Perzentile) Bezug [1].

Ein vergleichsweise neuer Ansatz zur Ermittlung der Exposition bei der Lebensmittelsicherheit ist die Bestimmung der sogenannten internen Exposition. Dabei wird angestrebt, die tatsächliche aufgenommene Dosis der betreffenden Substanz durch eine Analyse von Körperflüssigkeit(en) eines Menschen (Blut, Urin, ggf. Speichel, Muttermilch und andere Matrizes) zu ermitteln. Dies ist für viele Substanzen erst durch die rasante technologische Entwicklung der analytischen Verfahren in den letzten 20 Jahren möglich geworden.

Nach Erläuterung von grundlegenden Aspekten bei der Ermittlung der internen Exposition beschäftigt sich dieser Artikel schwerpunktmäßig mit potenziell gentoxischen und kanzerogenen Kontaminanten in Lebensmitteln. Für diese besonders problematischen Substanzen gilt grundsätzlich das Minimierungsprinzip (ALARA: „As Low As Reasonably Achievable“). Sie werden gegenwärtig nach dem Margin-of-Exposure (MoE)-Konzept bewertet [2]. Der MoE-Wert ist eine dimensionslose Zahl, die das Verhältnis einer Wirkdosis im Tierversuch zur Expositionsdosis beim Menschen angibt. Mit diesem Konzept wird versucht, das Ausmaß möglicher Risiken verschiedener gentoxischer Kanzerogene vergleichend darzustellen unter der Annahme, dass der Kurvenverlauf der

Beziehung zwischen krebsauslösender Wirkung und Dosis bei verschiedenen Substanzen vergleichbar ist. Daten zur internen Exposition können dabei helfen, die relevante Exposition gegenüber der Ursprungssubstanz bzw. ihrer gentoxischen Metaboliten genauer zu erfassen und so zu einer verbesserten Risikobewertung beizutragen.

Ermittlung der internen Exposition: Möglichkeiten und Grenzen

Sollte die Ermittlung der tatsächlich aufgenommenen Dosis durch eine Analyse von Körperflüssigkeit für eine konkrete Substanz möglich sein, würden sich zahlreiche Vorteile gegenüber der externen Expositionsschätzung ergeben:

- Einige relevante Inhaltsstoffe von Lebensmitteln werden nicht nur oral aufgenommen, sondern es kann eine zusätzliche inhalative und/oder dermale Exposition bestehen. Beispielsweise ist Cumarin Inhaltsstoff von Cassiazimt, Duftstoff und Bestandteil zahlreicher kosmetischer Produkte. Alle Routen würden bei der Ermittlung der internen Exposition mit berücksichtigt werden.
- Ermittelt würde nur die resorbierte Dosis, die tatsächlich den Körper erreicht und damit relevant ist in Bezug auf ein mögliches Risiko (Unsicherheit in Bezug auf die Resorptionsrate würde entfallen). Im Fall von reaktiven Metaboliten würde die effektive Dosis bestimmt werden,

Infobox 1 Mercaptursäuren

Zur Überwachung einer kurzfristigen Exposition gegenüber toxischen Substanzen, die elektrophile Metabolite bilden, bietet sich die Analyse von spezifischen Mercaptursäuren im Urin an. In der Leber werden reaktive Metabolite durch Konjugation mit dem Tripeptid Glutathion detoxifiziert. Die resultierenden Glutathionkonjugate werden nach enzymatischen Modifikationen als Mercaptursäuren im Harn ausgeschieden. Sie sind in der Regel innerhalb weniger Stunden nach Aufnahme der toxischen Substanz nachweisbar. Dementsprechend sind Mercaptursäuren geeignete nichtinvasive Biomarker zur Überwachung einer kurzfristigen Exposition [30]

die z. B. einen gentoxischen Effekt auslösen kann.

- Die Ermittlung der Exposition in der Bevölkerung würde durch Untersuchung einer entsprechend großen Zahl von repräsentativ ausgewählten Personen möglich sein. Auch Untergruppen in der Bevölkerung könnten so vergleichsweise einfach untersucht und mit anderen Gruppen verglichen werden. Zudem könnte ein angestrebter Rückgang der Exposition relativ einfach überwacht und dokumentiert werden.
- Nur durch die Bestimmung der internen Exposition könnte auch eine Quantifizierung der Exposition einzelner Personen erfolgen. Ein solcher Wert könnte in epidemiologischen Studien (z. B. zur Krebsentstehung) wesentlich zuverlässiger die individuelle Exposition repräsentieren als die klassische Ermittlung über Fragebögen oder Wiegeprotokolle, bei der die tatsächlichen Gehalte in verzehrten Lebensmitteln ohnehin nicht erfasst werden können.
- Erheblicher Aufwand für die Bereitstellung eines aussagekräftigen und aktuellen Satzes von Gehaltsdaten der relevanten Lebensmittel würde entfallen.

Ob eine Bestimmung der internen Exposition für eine bestimmte Substanz tatsächlich möglich bzw. sinnvoll ist, hängt jedoch von zahlreichen Bedingungen ab:

- Zumindest qualitative Daten über die Kinetik der Substanz im menschl-

chen Organismus müssen vorhanden sein, um zu entscheiden, welcher „Biomarker“ der Exposition – die unverstoffwechelte Substanz oder ein Metabolit – in welcher biologischen Matrix am ehesten in Frage kommt. Eine endogene Bildung des Biomarkers sollte möglichst ausgeschlossen sein.

- Analytische Verfahren zur zuverlässigen Quantifizierung dieses Biomarkers in der ausgewählten Matrix sind zu entwickeln und zu validieren.
- In einer Humanstudie muss mit dieser Methodik die Eignung als Biomarker geklärt werden. Dabei sind insbesondere kontrollierte Proof-of-Principle-Untersuchungen wertvoll, bei denen nach Lebensmittelverzehr mit bekanntem (hohen) Gehalt der Substanz der Biomarker in einer kleinen Gruppe von Menschen gemessen wird. Das Ergebnis gibt Aufschluss darüber, inwieweit die gemessenen Biomarkerwerte tatsächlich die externe Studienexposition abbilden können; unter Umständen ist dabei die Unterstützung durch eine kinetische Modellierung vorteilhaft. Nachfolgend sollte sich eine Studie zur Untersuchung der interindividuellen Variabilität in einer größeren Gruppe von Menschen unterschiedlichen Alters und Geschlechts anschließen. Möglicherweise ist diese unerwartet groß, sodass nur mit hoher Unsicherheit von einem Biomarkerergebnis auf die individuelle externe Exposition geschlossen werden kann.

Der Faktor Zeit

Der Faktor Zeit ist in Bezug auf zwei Fragen sehr wichtig. Erstens: Wie schnell wird die betrachtete Substanz nach der Aufnahme vom Körper wieder ausgeschieden? Die allermeisten Inhaltsstoffe bzw. Kontaminanten, die wir mit Lebensmitteln aufnehmen, werden im Körper schnell verstoffwechselt und/oder wieder ausgeschieden. Die interne Exposition nach einmaliger Aufnahme besteht also möglicherweise nur kurz: Die Konzentrationen in Blut und Geweben steigen bis zu einem Maximalwert an und fallen

anschließend kontinuierlich ab. So lässt sich beispielsweise die Cumarinaufnahme in den ersten Stunden nach Verzehr von zimthaltigen Lebensmitteln sehr gut durch die Messung seines Hauptmetaboliten 7-Hydroxy-Cumarin im Blut verfolgen, erfordert aber mehrere Blutentnahmen. Der Metabolit wird jedoch im Urin ausgeschieden; seine Quantifizierung im über 8 h gesammelten Urin ist ein gutes Maß für die insgesamt aufgenommene Cumarinmenge [3]. Eine Messung im Morgenurin des nächsten Tages würde jedoch keine Exposition mehr nachweisen können, wenn die Mahlzeit mit Zimt am Mittag des Vortages verzehrt wurde. Für das individuelle Monitoring der Cumarinexposition würde nur die Komplettsammlung des Urins über 8 h nach Verzehr ein valides Ergebnis bei der Biomarkermessung ergeben. Mit Blick auf den Einsatz in großen Studien (z. B. Nationale Kohorte) würde die Analyse von 7-Hydroxy-Cumarin nur im 24-h-Sammelurin sinnvoll sein, um ein aussagekräftiges Ergebnis für die allgemeine Exposition gegenüber Cumarin in einer Bevölkerungsgruppe erhalten zu können.

Die zweite Frage beim Faktor Zeit ist die nach dem Zeitfenster, innerhalb dessen ein möglicher toxischer Effekt auftreten kann. Mit Blick auf mögliche perakute oder akute Effekte, die innerhalb von Minuten bis Tagen auftreten können, wäre ein Monitoring der Exposition, die diesen Effekt auslöst, noch relativ einfach mit einer Studie zu realisieren. So hat das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) zur Frage der relativen Bioverfügbarkeit von Cyanid (Blausäure) nach Verzehr von Lebensmitteln mit cyanogenen Glykosiden (bittere Aprikosenkerne, Cassava [Maniok], Leinsamen und Persipan) eine Studie durchgeführt, bei der die nach Verzehr gemessenen Spitzenspiegel im Blut große Unterschiede zwischen den genannten Lebensmitteln zeigten [4]. Bei möglichen subchronischen und chronischen Effekten ist es jedoch oft schwieriger, die über eine deutlich längere Zeitspanne relevante Exposition zu erfassen, beispielsweise mit Blick auf epidemiologische Studien zu möglichen Krankheitsursachen. Eine einfache Bestimmung, z. B. durch eine Blutentnahme, ist nur bei Substanzen möglich, die

eine extrem lange Halbwertszeit (im Bereich von Jahren) haben und im Körper des Menschen akkumulieren. Dies sind insbesondere manche Schwermetalle und persistente organische Verbindungen wie Dioxine und polychlorierte Biphenyle (PCBs). Mit Blick auf gentoxische Kanzerogene, die üblicherweise eine kurze biologische Halbwertszeit haben, eröffnet sich mit dem Nachweis von Addukten im Körper jedoch eine weitere Möglichkeit, eine Exposition im mittelfristigen Bereich nachzuweisen.

Proteinaddukte und Mercaptursäuren als Biomarker der effektiven Dosis

Fremdstoffe können reaktiv sein oder durch den Stoffwechsel in reaktive Metaboliten umgewandelt werden. Zum Teil bilden diese kovalente Bindungen mit zellulären Makromolekülen, z. B. RNA, DNA und Proteinen, oder sie werden zu sog. Mercaptursäuren (■ **Infobox 1**) detoxifiziert. Diese werden im Harn ausgeschieden und können mit Hilfe chromatographischer und massenspektrometrischer Methoden quantifiziert werden. Sie sind als Biomarker der effektiven Dosis nutzbar, um z. B. eine kurzfristige Exposition zu untersuchen. Die aus der Reaktion von elektrophilen Metaboliten und DNA, RNA oder Proteinen resultierenden Modifikationen (Addukte) können ebenfalls quantifiziert und als Biomarker der effektiven Dosis verwendet werden. Sie geben die interne Belastung über einen Zeitraum von Tagen bis hin zu mehreren Wochen wieder, da die Addukte in den Makromolekülen akkumulieren, bis sie durch Abbau (Proteine) oder Reparatur (DNA) wieder entfernt werden. In diesem Zusammenhang haben DNA-Addukte als Biomarker eine direkte, biologisch plausible Beziehung zur Genotoxizität. Trotzdem sind entsprechende Studien im Rahmen des Humanbiomonitorings vergleichsweise selten, weil DNA vom Menschen meist nicht in ausreichender Menge zur Verfügung steht [5]. Die effektive Dosis wird deswegen durch die Quantifizierung von substanzspezifischen Proteinaddukten (■ **Infobox 2**) in Hämoglobin (Hb) oder Serumalbumin

Bundesgesundheitsbl 2017 · 60:761–767 DOI 10.1007/s00103-017-2558-1
© Der/die Autor(en) 2017. Dieser Artikel ist eine Open-Access-Publikation.

K. Abraham · B. Monien · A. Lampen

Biomarker der internen Exposition gegenüber toxikologisch relevanten Kontaminanten in Lebensmitteln

Zusammenfassung

Die Bewertung der gesundheitlichen Risiken, die aus der Aufnahme gentoxischer Kanzerogene in Nahrungsmitteln resultieren, hängt wesentlich von einer validen Abschätzung der Exposition ab. Die Zuverlässigkeit der Schätzung der externen Exposition wird eingeschränkt, z. B. durch ungenaue Angaben in Ernährungsprotokollen und Variationen von Gehaltsdaten in Lebensmitteln. Als Alternative kann der Nachweis der individuellen, internen Exposition gegenüber gentoxischen Substanzen durch die Analyse von spezifischen Biomarkern in unterschiedlichen Matrices dienen. So bilden sich nach Entgiftung durch Glutathionkonjugation substanzspezifische Mercaptursäuren, die sich im Urin nachweisen lassen. Sie reflektieren die Exposition gegenüber der Ausgangssubstanz in einem Zeitraum von 1 bis 2 Tagen. Die Bestimmung von Proteinaddukten in den Blutproteinen Serumalbumin (SA) und Hämoglobin (Hb) erlauben Rückschlüsse auf die externe Exposition innerhalb der letzten 3 Wochen (SA) oder innerhalb der letzten 4 Monate

(Hb). Besonders in der Arbeitsmedizin ist es Routine, Proteinaddukte als Biomarker der internen Exposition gegenüber Substanzen am Arbeitsplatz zu nutzen. Die Verfügbarkeit von immer sensitiveren chemisch-analytischen Techniken ermöglicht es mittlerweile, in Proteinen aus humanen Blutproben auch zahlreiche Addukte zu detektieren, die nach kontinuierlicher Aufnahme sehr geringer Dosen von toxikologisch bedenklichen Substanzen aus Lebensmitteln gebildet werden. Hier stellen wir den Stand der Forschung anhand von Proteinaddukten der Lebensmittelkontaminanten Acrylamid, Aflatoxin B₁ und Glycidol vor. Diese können in der Zukunft dazu dienen, bislang unbekannt Zusammenhänge zwischen der internen Exposition und Krankheitsinzidenzen zu untersuchen.

Schlüsselwörter

Biomarker · Gentoxische Kanzerogene · Mercaptursäuren · Proteinaddukte · Interne Exposition

Biomarkers of internal exposure to toxicologically relevant contaminants in food

Abstract

The assessment of health risks resulting from the intake of genotoxic carcinogens in food depends essentially on a valid exposure assessment. The reliability of the external exposure estimation is restricted by various factors, e. g. inaccurate data from dietary protocols and variations of food contaminant contents. As an alternative, the individual internal exposure to genotoxic substances may be described by specific biomarkers in different matrices. For example, mercapturic acids formed after glutathione conjugation of electrophilic metabolites can be detected in the urine. This typically reflects the exposure to the parent compound over a period of one to two days. The determination of adducts in the blood proteins serum albumin (SA) and hemoglobin (Hb) allows for conclusions to be drawn about the external exposure within the last three weeks (SA) or within the last four months (Hb). Protein adducts are

used routinely in occupational medicine as biomarkers of internal exposure to substances in the ambient air of the workplace. The availability of increasingly sensitive analytical techniques also makes it possible to detect numerous adducts in proteins from human blood samples that are formed after the continuous intake of very small doses of toxic substances from foods. Here, we present the current state of science exemplified by protein adducts of the food contaminants acrylamide, aflatoxin B₁ and glycidol. The biomarker can be used in the future to investigate previously unknown relationships between internal exposure and disease incidences.

Keywords

Biomarker · Genotoxic carcinogens · Mercapturic acids · Protein adducts · Internal exposure

Infobox 2 Proteinaddukte

Zur Bestimmung von Proteinaddukten werden die Blutproteine Hämoglobin (Hb) und Serumalbumin (SA) herangezogen. Besonders Thiolgruppen freier Cysteinreste und die Aminogruppen der Seitenketten von Histidin und Lysin sowie die α -Aminogruppe des N-terminalen Valins (in Hb) reagieren durch Addition und nukleophile Substitution mit elektrophilen Zentren der Metabolite. Die resultierenden Addukte sind Parameter, welche die tatsächliche Aufnahme einer Substanz innerhalb einer bestimmten Zeitspanne unabhängig von der Quelle und dem Aufnahmeweg widerspiegeln. Die Adduktspiegel werden ferner durch substanzspezifische, interindividuelle Variationen der Toxikokinetik des Menschen beeinflusst, was zur Folge hat, dass ähnliche (externe) Expositionen bei verschiedenen Personen zu unterschiedlichen internen Belastungen gegenüber reaktiven Metaboliten führen können. In diesem Sinne sind Proteinadduktkonzentrationen geeignete Surrogatbiomarker für genotoxische Effekte, die aus der globalen effektiven Dosis gegenüber einem reaktiven Metaboliten resultieren

(SA) bestimmt, die für die Analyse der Adduktbelastung beim Menschen besonders geeignet sind. Beide Proteine sind in relativ großen Mengen (ca. 150 mg Hb/ml Vollblut, ca. 45 mg SA/ml Serum) verfügbar. Die meisten Proteinaddukte sind chemisch stabil und werden nicht durch physiologische Reparaturmechanismen entfernt. Ferner reflektieren sie die interne Exposition gegenüber elektrophilen Verbindungen über einen relativ langen Zeitraum hinweg, der durch die Lebensdauer der Erythrozyten (120 Tage) und die Halbwertszeit von SA ($t_{1/2} = 20$ Tage) bestimmt wird.

Für Langzeitstudien, beispielsweise zur Krebsentstehung, ist jedoch der genannte Zeitrahmen von Wochen bis Monaten zu kurz, um eine verlässliche Antwort auf die Frage nach der kumulativen Exposition über einen Zeitraum von Jahren oder sogar Jahrzehnten zu erhalten. Hier gibt es nur die aufwendige und bisher kaum genutzte Möglichkeit, Adduktbestimmungen in regelmäßigen Abständen zu wiederholen. Möglicherweise ist ein solcher Aufwand nicht nötig, wenn die Gehalte eines problematischen Inhaltsstoffes in den Lebensmitteln im Mittel konstant bleiben und sich in-

dividuelle Verzehrsgewohnheiten nicht ändern. Bisher gibt es keine aussagekräftigen Untersuchungen dazu, wie individuell stabil ein Adduktlevel für bestimmte Inhaltsstoffe über einen längeren Zeitraum im Vergleich zu seiner Variabilität in der Bevölkerung ist.

Proteinaddukte in der Arbeitsmedizin

Analytische Techniken zur Adduktquantifizierung wurden zunächst zur Überwachung der beruflichen Exposition gegenüber vermutlich kanzerogenen Arbeitsstoffen, z. B. zu Ethylenoxid [6] und Anilin [7], entwickelt. Die Ständige Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe (MAK-Kommission) der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) hat für die Konzentrationen von Proteinaddukten einiger Industriechemikalien Referenzwerte abgeleitet. So wurden gesundheitsbezogene Parameter, z. B. Biologische Arbeitsstoff-Referenzwerte (BAR-Werte), für die Auswertung von Biomonitoringergebnissen für Addukte von Acrylamid (50 pmol/g Hb), Acrylnitril (10 pmol/g Hb), 1,2-Epoxypropan (10 pmol/g Hb), 4-Aminobiphenyl (nach Freisetzung aus Hb, 15 ng/l) und 4,4'-Methyldianilin (nach Freisetzung aus Hb, <5 ng/l) bestimmt [8]. Allerdings orientieren sich die BAR-Werte an der Hintergrundbelastung von Proteinaddukten in einer Referenzpopulation, die den entsprechenden Substanzen beruflich nicht ausgesetzt ist. Somit kann man vom Verhältnis zwischen gemessenen Adduktspiegeln und BAR-Werten nicht unmittelbar auf ein Gesundheitsrisiko schließen.

Die Ableitung der äußeren Exposition durch die Messungen eines Biomarkerspiegels ist in einigen Fällen häufig verwendeter Industriechemikalien möglich, weil eine Datenbasis zur inhalativen Exposition am Arbeitsplatz und der Höhe der Adduktkonzentrationen im Blut vorhanden ist. Diese sog. *Expositionsäquivalente für krebserzeugende Arbeitsstoffe* (EKA-Werte) erlauben es, die Höhe der äußeren Exposition gegenüber den krebserregenden Substanzen aus den Werten der Hb-Adduktspiegel

abzuschätzen. Dies bezieht sich auf eine ausschließlich inhalative Stoffaufnahme während 40 h/Woche am Arbeitsplatz. So gibt es EKA-Werte für die Addukte von Acrylamid und Acrylnitril, aber auch für andere kanzerogene Arbeitsstoffe, bei denen die Raumluftkonzentration mit denen im Harn ausgeschiedenen Mengen der Stoffe oder eines ihrer Metaboliten korreliert werden [8].

Proteinaddukte als Biomarker der internen Exposition gegenüber Lebensmittelkontaminanten

Im Bereich der Lebensmitteltoxikologie ist die in der Arbeitsmedizin etablierte Vorgehensweise zur Bestimmung der internen Exposition wenig verbreitet. Das hat mehrere Gründe. Zum einen sind in der Nahrung, einer äußerst komplexen Mischung von Substanzen, nur vergleichsweise wenige Inhaltsstoffe toxikologisch relevant. Diese sind in der Regel nur in geringen Mengen vorhanden, sodass Biomarkeranalysen auch mit der heutigen Technik an die Grenzen des Machbaren stoßen. Zum anderen schwankt die individuelle Exposition aufgrund der Variation der Gehalte von Inhaltsstoffen im Lebensmittel und der Variation des Verzehrs über die Zeit. Es ist daher eine Herausforderung, mögliche Zusammenhänge zwischen der Aufnahme einzelner toxikologisch relevanter Lebensmittelkontaminanten und gesundheitlichen Risiken zu erforschen. Dabei kann die Bestimmung von Proteinaddukten als Biomarker der Exposition gegenüber toxikologisch relevanten Lebensmittelkontaminanten nützlich sein. Beispiele für solche Substanzen sind Acrylamid, Aflatoxin B₁ und Glycidol.

Acrylamid

Acrylamid ist eine erhitungsbedingte Lebensmittelkontaminante, die bei der Zubereitung von kohlenhydratreichen Lebensmitteln bei Temperaturen über 120 °C entsteht. Nach Langzeitgabe von hohen Dosen wurden Tumoren in unterschiedlichen Geweben in Nagern beobachtet. Die empfindlichsten Endpunkte sind Neoplasien in Brust- und Schild-

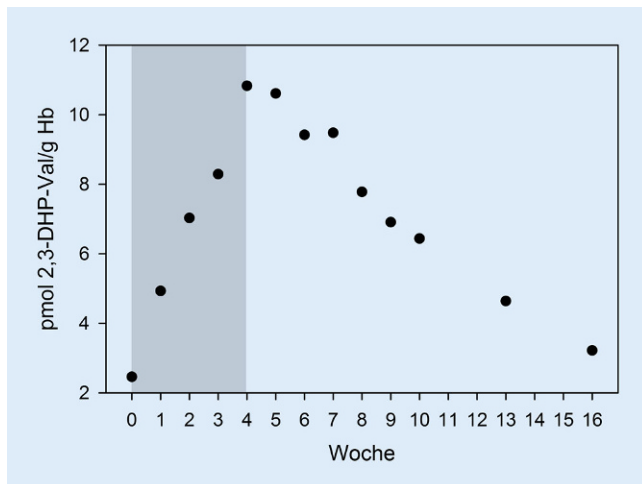


Abb. 1 ◀ Anstieg und Abfall des 2,3-DHP-Val-Spiegels im Hämoglobin einer Versuchsperson bei täglicher Aufnahme von 50 g eines vergleichsweise hoch belasteten Palmfetts (8,9 mg estergebundenes Glycidol/kg Fett) über 4 Wochen

drüsen der Ratten sowie in den Harder-Drüsen der Mäuse. Die bisher durchgeführten epidemiologischen Studien geben keinen konsistenten Hinweis auf einen möglichen Zusammenhang zwischen der Acrylamidexposition durch die Nahrung oder durch Inhalation am Arbeitsplatz und der Entstehung von Tumoren beim Menschen. Die Schätzungen der durchschnittlichen täglichen Aufnahme liegen im Bereich 0,4–0,9 µg/kg Körpergewicht (KG) für Erwachsene und 0,5–1,9 µg/kg KG für Kinder [9]. Allerdings ist die Abschätzung der Exposition eines einzelnen Menschen ungenau, weil Ernährungsprotokolle mit großen Unsicherheiten behaftet sind, die Gehalte im Lebensmittel variieren und Acrylamid auch durch Inhalation aufgenommen werden kann. Es ist außerdem möglich, dass interindividuelle Unterschiede von toxikokinetischen Parametern insbesondere bei der Detoxifizierung durch Glutathion-S-Transferasen und Epoxidhydrolasen Einfluss auf die interne Exposition gegenüber Acrylamid und Glycidamid nehmen. Diese kann durch zwei Klassen von Biomarkern bestimmt werden.

Die kurzfristige Belastung wird durch harnpflichtige Stoffwechselprodukte ermittelt. Acrylamid wird im Wesentlichen durch Cytochrom P450 (CYP)2E1 zum reaktiveren Glycidamid umgesetzt. Nach der Detoxifizierung durch Konjugation mit Glutathion entstehen die Mercaptursäuren von Acrylamid (AAMA) und von Glycidamid (GAMA), die im Urin ausgeschieden werden. Durch Analysen von

AAMA- und GAMA-Spiegeln in Urinproben von Probanden wurde gezeigt, dass die Parameter mit der Aufnahmemenge von Acrylamid durch Lebensmittel, aber auch durch Zigarettenrauch korrelieren [9].

Die mittelfristige interne Exposition wird durch die Addukte des Acrylamids und des Glycidamids am N-terminalen Valin in Hb, AA-Hb bzw. GA-Hb als Biomarker abgebildet. Mehrere Studien weisen auf eine hohe Variation der internen Hintergrundexposition in der Bevölkerung durch Acrylamid hin. Zum Beispiel variierten die Adduktspiegel bei Probanden der EPIC-Studie (European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition) aus 9 verschiedenen Ländern ($n = 510$) in den Bereichen 15–623 pmol AA-Hb/g Hb und 8–377 pmol GA-Hb/g Hb mit signifikanten Einflüssen der Faktoren Herkunft, Geschlecht und Raucherstatus [10]. Unterschiedliche Studien zeigten, dass die Spiegel der Proteinaddukte AA-Hb und GA-Hb nur schwach mit der geschätzten Acrylamidaufnahme durch die Nahrung korrelierten, was an Schwächen der Abschätzung, an alternativen Quellen der Acrylamidaufnahme und an interindividuellen Unterschieden der Toxikokinetik liegen kann [9].

Aflatoxin B₁

Aflatoxine sind Mykotoxine, die von einigen *Aspergillus* spp. produziert werden. Sie sind häufig Kontaminanten in Erdnüssen, Getreide, Hülsenfrüchten und Mais (s. auch *Mykotoxine in Le-*

bensmitteln in diesem Heft). In einer Langzeitkanzerogenitätsstudie wurden nach Gabe von Aflatoxin B₁ (AFB₁) insbesondere Tumoren in der Leber von Ratten beobachtet [11]. Ferner existiert ein Zusammenhang zwischen der Exposition des Menschen gegenüber AFB₁ und der Inzidenz von hepatozellulärem Karzinom, was insbesondere für unterschiedliche Regionen Afrikas und Asiens gut belegt wurde [12]. Die Wirkung des AFB₁ beruht auf der CYP3A4-vermittelten Bioaktivierung zum reaktiven AFB₁-8,9-Epoxid, das kovalent an DNA und Proteine binden kann. Die Bildung von AFB₁-Addukten mit 2'-Desoxyguanosin in hepatischer DNA führt zu Mutationen in Schlüsselgenen (z. B. *p53*) und ist vermutlich für die kanzerogene Wirkung verantwortlich.

Als valide Biomarker der Exposition gegenüber AFB₁ dienen die im Harn gemessenen Spiegel des AFM₁, ein Metabolit von AFB₁, oder des AFB₁-N⁷-Guanin [13]. Resultate solcher Messungen belegen, dass die AFB₁-Exposition in einigen Regionen Asiens und Afrikas bedenklich, in westlichen Industrieländern aber verhältnismäßig gering ist [14]. In keiner der Urinproben von erwachsenen Probanden in Deutschland konnte AFM₁ detektiert werden [15]. Als Biomarker einer mittelfristigen Exposition kommen spezifische Addukte in DNA-Proben bzw. in SA in Frage. Da die Bildung des AFB₁-Adduktes an der N⁷-Position des 2'-Desoxyguanosins zu einer verhältnismäßig leichten Hydrolyse der glycosidischen Bindung führt, kann z. B. das Purinaddukt AFB₁-N⁷-Guanin im Harn von AFB₁-exponierten Personen nachgewiesen werden [16]. Weiter verbreitet ist die Methode zur Messung des AFB₁-Adduktes in SA mittels eines ELISA [17]. Wegen der größeren Spezifität der Detektion wird die interne Exposition heute über eine Isotopenverdünnungstechnik zur Quantifizierung des AFB₁-Lysinadduktes in SA (AFB₁-Lys) mittels LC-MS/MS bestimmt [18]. In einer Querschnittstudie mit 600 Probanden in Kenia wurde AFB₁-Lys in 78 % aller Blutproben mit Werten zwischen 0,02 (Detektionslimit) und 9,52 ng AFB₁-Lys/ml detektiert. Im Gegensatz dazu zeigten nur 1,3 % aller

Blutproben von 2104 US-Einwohnern messbare Konzentrationen von AFB₁-Lys zwischen 0,02 und 0,2 ng AFB₁-Lys/ml [19]. Durch Bestimmung der Lysinaddukte mittels ELISA oder LC-MS/MS wurden Zusammenhänge zwischen der Aufnahme von AFB₁ und dem Auftreten von Tumoren in der Leber [20] und der Gallenblase [21] sowie einem verminderten Wachstum von Kindern gezeigt [22].

Glycidol

Fettsäureester von Glycidol (Glycidylester) sind erhitungsbedingte Kontaminanten, die bei der Desodorierung von Pflanzenölen entstehen. Aus diesen wird Glycidol durch lipasenkatalysierte Hydrolyse im Magen-Darm-Trakt aus Glycidylestern freigesetzt. Es induziert nach Gabe hoher Dosen unterschiedliche Tumoren in Nagern, insbesondere in Hoden und Peritoneum der männlichen und Brustdrüsen der weiblichen Ratten sowie in den Harderschen Drüsen von Mäusen beider Geschlechter [23]. Die mittlere tägliche Glycidolaufnahme bei Erwachsenen wird in der Europäischen Union auf 0,1–0,5 µg/kg KG geschätzt. Anlass zu Bedenken gibt insbesondere die Exposition der nichtgestillten Säuglinge, die ausschließlich mit Säuglingsmilchnahrung gefüttert werden (bis zu 4,9 µg/kg KG) [24]. Unsicherheiten bestehen bei der Expositionsschätzung insbesondere in Bezug auf den Umfang der bisher durchgeführten Gehaltsanalysen von Lebensmitteln und die mögliche Bildung der Glycidylester bei der Speisenzubereitung im Haushalt.

Das Problem der ungenauen Abschätzung der externen Exposition kann möglicherweise durch die Verwendung eines Humanbiomarkers der internen Exposition gelöst werden. Die mittelfristige Glycidolexposition lässt sich z. B. durch das Hb-Addukt N-(2,3-Dihydroxypropyl)-Valin (2,3-DHP-Val) bestimmen. In einem Versuch mit männlichen Ratten führte die Applikation von 4 verschiedenen Glycidoldosen zu einer annähernd linearen Erhöhung der 2,3-DHP-Val-Konzentrationen in Blutproben [25]. In einer aktuellen Untersuchung des Bundesinstituts für Risikobewertung (BfR)

wurde erstmals gezeigt, dass die kontrollierte Intervention mit einem höher belastetem Speisefett in einer Person über 28 Tage zu einem Anstieg des Adduktspiegels von 2,5 auf 10,8 pmol 2,3-DHP-Val/g Hb führte (Abb. 1, Selbstversuch des ärztlichen Studienleiters). Dieses Ergebnis wurde inzwischen in einer Studie mit 12 Probanden betätigt (Ethikvotum der Charité EA4/120/16, Publikation in Vorbereitung). Mithilfe eines kinetischen Modells, das die Lebensdauer von Erythrozyten berücksichtigt, wird es möglich sein, aus einer einzelnen Messung dieses Adduktspiegels auf die durchschnittliche Glycidolexposition der vergangenen Monate zu schließen.

Perspektive: Simultane Analyse mehrerer Proteinaddukte

Bisher wurden nur wenige Korrelationen zwischen der durch Biomarker beschriebenen internen Exposition gegenüber einzelnen genterischen Substanzen in Lebensmitteln und spezifischen Ätiologien beschrieben. Das ist zum Teil darauf zurückzuführen, dass das relative Risiko der Krankheitsinzidenz in nur wenigen Fällen mit der Exposition gegenüber einzelnen Substanzen korreliert. Es ist vielmehr wahrscheinlich, dass die interne Exposition gegenüber der Gesamtheit aller elektrophilen Verbindungen, dem sog. *Exposom*, und der sich daraus ergebenden globalen toxischen Belastung die Ätiologie von Tumoren sowie kardiovaskulären und neurodegenerativen Erkrankungen beeinflusst [26]. In diesem Sinne wäre es angebracht, die effektiven Dosen einer größeren Anzahl von elektrophilen Verbindungen, z. B. durch Proteinadduktkonzentrationen, zu bestimmen. Erste Proof-of-Principle-Studien konzentrieren sich auf die Addukte einzelner Aminosäurehotspots in Hb (das N-terminale Valin) oder SA (Cystein 34). Li et al. beschrieben ein massenspektrometrisches Verfahren zur Detektion von Addukten des Cystein 34 in SA aus humanen Blutproben [27], während Carlsson et al. eine Strategie für die Untersuchung unbekannter Hb-Addukte unter Verwendung eines modifizierten Edman-Abbaus für das N-terminale Valin entwickelten [28].

Ein grundsätzliches Problem dieser Ansätze besteht darin, dass unterschiedliche nukleophile Aminosäurereste in einem Protein mit unterschiedlichen Klassen von Elektrophilen reagieren. Somit ist die Bestimmung der Exposition gegenüber allen elektrophilen Verbindungen durch eine ausgewählte Technik der Adduktisolierung nicht möglich. Der Edman-Abbau zur Analyse von Addukten am N-Terminus des Hb bietet sich an, da dies die Methode mit der größten Verbreitung ist [29].

Fazit

Die Untersuchung der internen Exposition kann bei einzelnen Inhaltsstoffen in Lebensmitteln einen relevanten Beitrag zur Verbesserung der Expositionsschätzung leisten. Wie erfolgreich ein solcher Ansatz sein kann, hängt von mehreren Faktoren ab, insbesondere von der Kinetik der Substanz und ihrer Variabilität beim Menschen, von den zur Verfügung stehenden analytischen Messmethoden und von dem für einen möglichen Effekt relevanten Zeitfenster, für das die Exposition erfasst werden muss. Bei der Etablierung von analytischen Methoden zur Bestimmung von Biomarkern der internen Exposition sind insbesondere kontrollierte Proof-of-Principle-Untersuchungen wichtig, mit denen der quantitative Zusammenhang zwischen Exposition und Biomarker gezeigt werden muss. Von diesen Entwicklungen besonders profitieren kann die individuelle Expositionserfassung, die bislang in Studien nur sehr aufwendig mit sog. Duplikatuntersuchungen (Analyse der Substanz im tatsächlich verzehrten Lebensmittel) und nur innerhalb einer vergleichsweise kurzen Zeitspanne möglich war. Hier eröffnen sich auch neue Möglichkeiten für epidemiologische Studien, bei denen ein möglicher Zusammenhang zwischen Exposition und Effekt/Erkrankung untersucht werden soll. Dies gilt insbesondere für die Bestimmung von Adduktmarkern genterischer Kanzerogene, bei der die Erfassung der effektiven Dosis des jeweiligen reaktiven Metaboliten möglich ist. Darüber hinaus wird es zukünftig möglich sein, die Exposition der Bevöl-

kerung mithilfe bestimmter Biomarker durch Untersuchung eines repräsentativen Probensatzes besser abzuschätzen, als dieses durch die klassische Methode unter Verwendung von Gehaltsbestimmungen und Verzehrdaten möglich ist.

Korrespondenzadresse

Dr. B. Monien

Bundesinstitut für Risikobewertung
Max-Dohrn-Straße 8–10, 10589 Berlin,
Deutschland
bernhard.monien@bfr.bund.de

Einhaltung ethischer Richtlinien

Interessenkonflikt. K. Abraham, B. Monien und A. Lampen geben an, dass kein Interessenkonflikt besteht.

Dieser Beitrag beinhaltet keine von den Autoren durchgeführten Studien an Tieren.

Open Access. Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>) veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden.

Literatur

1. EFSA (European Food Safety Authority), Panel on Plant Protection Products and their Residues (2012) Guidance on the use of probabilistic methodology for modelling dietary exposure to pesticide residues. *EFSA J* 10:2839
2. European Food Safety Authority (2005) Opinion of the Scientific Committee on a request from EFSA related to a harmonised approach for risk assessment of substances which are both genotoxic and carcinogenic. *EFSA J* 282:1–31
3. Abraham K, Wohrlin F, Lindtner O, Heinemeyer G, Lampen A (2010) Toxicology and risk assessment of coumarin: focus on human data. *Mol Nutr Food Res* 54:228–239
4. Abraham K, Buhrke T, Lampen A (2016) Bioavailability of cyanide after consumption of a single meal of foods containing high levels of cyanogenic glycosides: a crossover study in humans. *Arch Toxicol* 90:559–574
5. Monien BH (2014) Mass spectrometric DNA adduct quantification by multiple reaction monitoring and its future use for the molecular epidemiology of cancer. *Adv Exp Med Biol* 806:383–397
6. Calleman CJ, Ehrenberg L, Jansson B, Osterman-Golkar S, Segerback D, Svensson K et al (1978) Monitoring and risk assessment by means of alkyl groups in hemoglobin in persons occupationally exposed to ethylene oxide. *J Environ Pathol Toxicol* 2:427–442
7. Lewalter J, Korallus U (1985) Blood protein conjugates and acetylation of aromatic amines. New findings on biological monitoring. *Int Arch Occup Environ Health* 56:179–196
8. Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) (2016) MAK- und BAT-Werte-Liste 2016. Wiley-VCH, Weinheim
9. EFSA (European Food Safety Authority), CONTAM Panel (Panel on Contaminants in the Food Chain) (2015) Scientific opinion on acrylamide in food. *EFSA J* 13:321
10. Vesper HW, Slimani N, Hallmans G, Tjonneland A, Agudo A, Benetou V et al (2008) Cross-sectional study on acrylamide hemoglobin adducts in subpopulations from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) Study. *J Agric Food Chem* 56:6046–6053
11. Wogan GN, Pagliarunga S, Newberne PM (1974) Carcinogenic effects of low dietary levels of aflatoxin B1 in rats. *Food Cosmet Toxicol* 12:681–685
12. Kensler TW, Roebuck BD, Wogan GN, Groopman JD (2011) Aflatoxin: a 50-year odyssey of mechanistic and translational toxicology. *Toxicol Sci* 120(Suppl 1):S28–48
13. Turner PC, Flannery B, Isitt C, Ali M, Pestka J (2012) The role of biomarkers in evaluating human health concerns from fungal contaminants in food. *Nutr Res Rev* 25:162–179
14. Ali N, Blaszkewicz M, Hossain K, Degen GH (2016) Determination of aflatoxin M1 in urine samples indicates frequent dietary exposure to aflatoxin B1 in the Bangladeshi population. *Int J Hyg Environ Health*. doi:10.1016/j.ijheh.2016.10.11.1002
15. Gerding J, Ali N, Schwartzbord J, Cramer B, Brown DL, Degen GH et al (2015) A comparative study of the human urinary mycotoxin excretion patterns in Bangladesh, Germany, and Haiti using a rapid and sensitive LC-MS/MS approach. *Mycotoxin Res* 31:127–136
16. Qian GS, Ross RK, Yu MC, Yuan JM, Gao YT, Henderson BE et al (1994) A follow-up study of urinary markers of aflatoxin exposure and liver cancer risk in Shanghai, People's Republic of China. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 3:3–10
17. Chapot B, Wild CP (1991) ELISA for quantification of aflatoxin-albumin adducts and their application to human exposure assessment. In: Warhol M, van Velzen D, Bullock GR (Hrsg) *Techniques in diagnostic pathology*. Academic Press, San Diego CA, S 135–155
18. McCoy LF, Scholl PF, Schleicher RL, Groopman JD, Powers CD, Pfeiffer CM (2005) Analysis of aflatoxin B1-lysine adduct in serum using isotope-dilution liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 19:2203–2210
19. Yard EE, Daniel JH, Lewis LS, Rybak ME, Paliakov EM, Kim AA et al (2013) Human aflatoxin exposure in Kenya, 2007: a cross-sectional study. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 30:1322–1331
20. Chen CJ, Wang LY, Lu SN, Wu MH, You SL, Zhang YJ et al (1996) Elevated aflatoxin exposure and increased risk of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 24:38–42
21. Nogueira L, Foerster C, Groopman J, Egner P, Koshiol J, Ferreccio C (2015) Association of aflatoxin with gallbladder cancer in Chile. *JAMA* 313:2075–2077
22. Gong YY, Egal S, Hounsa A, Turner PC, Hall AJ, Cardwell KF et al (2003) Determinants of aflatoxin exposure in young children from Benin and Togo, West Africa: the critical role of weaning. *Int J Epidemiol* 32:556–562
23. National Toxicology Program (1990) NTP toxicology and carcinogenesis studies of glycidol (CAS no. 556-52-5) in F344/N rats and B6C3F1 mice (Gavage studies). *Natl Toxicol Program Tech Rep Ser* 374:1–229
24. EFSA (European Food Safety Authority), CONTAM Panel (Panel on Contaminants in the Food Chain) (2016) Risks for human health related to the presence of 3- and 2-monochloropropanediol (MCPD), and their fatty acid esters, and glycidyl fatty acid esters in food. *EFSA J* 14:159
25. Honda H, Tornqvist M, Nishiyama N, Kasamatsu T (2014) Characterization of glycidol-hemoglobin adducts as biomarkers of exposure and in vivo dose. *Toxicol Appl Pharmacol* 275:213–220
26. Rappaport SM, Li H, Grigoryan H, Funk WE, Williams ER (2012) Adductomics: characterizing exposures to reactive electrophiles. *Toxicol Lett* 213:83–90
27. Li H, Grigoryan H, Funk WE, Lu SS, Rose S, Williams ER et al (2011) Profiling Cys34 adducts of human serum albumin by fixed-step selected reaction monitoring. *Mol Cell Proteomics* 10:M110.004606
28. Carlsson H, von Stedingk H, Nilsson U, Tornqvist M (2014) LC-MS/MS screening strategy for unknown adducts to N-terminal valine in hemoglobin applied to smokers and nonsmokers. *Chem Res Toxicol* 27:2062–2070
29. Tornqvist M, Fred C, Haglund J, Helleberg H, Paulsson B, Rydberg P (2002) Protein adducts: quantitative and qualitative aspects of their formation, analysis and applications. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 778:279–308
30. Mathias PI, B'Hymer C (2014) A survey of liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of mercapturic acid biomarkers in occupational and environmental exposure monitoring. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 964:136–145