

Institut für Arbeitsmedizin

■ Direktor: Prof. Dr. Renate Wrbitzky

Tel.: 0511 / 532-9330 • E-Mail: wrbitzky.renate@mh-hannover.de • www.mh-hannover.de/210.html

Forschungsprofil

Das Institut für Arbeitsmedizin befasst sich mit aktuellen Themen der arbeits- und umweltmedizinischen Toxikologie, insbesondere mit der Entwicklung und Anwendung von Biomonitoring-Verfahren zur Etablierung arbeitsmedizinischer Grenzwerte. Besondere Schwerpunkte sind die Bestimmung von Proteinaddukten krebserzeugender Stoffe als Langzeit-Dosismarker sowie die Untersuchung neurotoxischer Organophosphate. Projektbegleitend können Gefahrstoffmessungen in der Luft und Materialproben durchgeführt werden. Weiterhin werden aktuelle arbeitsmedizinisch-klinische Fragestellungen bearbeitet, z.B. zur Rehabilitationsforschung und zum demographischen Wandel in der Arbeitswelt.

Forschungsprojekte

Untersuchungen zur Validität von N-Methylenvalin als Biomarker einer Formaldehydexposition

Einleitung

Formaldehyd (FA), IUPAC-Name: Methanal, CAS-Nr.: 50-00-0, wird seit 1889 im großtechnischen Maßstab durch katalytische Oxidation von Methanol weltweit produziert. FA ist nach wie vor eine wichtige Grundchemikalie in der Industrie mit einem breiten Anwendungsspektrum (z. B. Holzverarbeitende- und Möbelindustrie, Papier- sowie Textilherstellung, Kunststoff-, Farb- und Lackindustrie, Medizin).

Ein rechtsverbindlicher Grenzwert für die Formaldehydkonzentration in der Luft am Arbeitsplatz nach TRGS 900 liegt gegenwärtig nicht vor. Die Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe der Deutschen Forschungsgemeinschaft nennt einen MAK-Wert von 0,37 mg/m³ (0,30 ppm). FA gilt als sensibilisierend und hautresorptiv. Für die Innenraumluft wurde vom früheren Bundesgesundheitsamt im Jahre 1977 ein Richtwert von 0,1 ppm (124 µg/m³) empfohlen. Dies wurde im Rahmen einer toxikologischen Neubewertung durch das Bundesamt für Risikobewertung (BfR) 2006 bestätigt.

Insbesondere für hautresorptive Gefahrstoffe ist es wünschenswert, einen sowohl analytisch als auch diagnostisch selektiven und sensitiven Biomarker zu etablieren, um die arbeitsmedizinische Beurteilung berufsbedingter Expositionen möglichst umfassend zu gestalten. Da Formaldehyd im menschlichen Organismus in beträchtlichen Mengen endogen und nahrungsspezifisch gebildet und verstoffwechselt wird, ist die Suche nach einem geeigneten Biomarker schwierig. Eine Zielrichtung war die Bestimmung des Oxidationsproduktes Ameisensäure (Methansäure), welche überwiegend als Formiat renal eliminiert wird. Aufgrund der hohen und starken intra- und interindividuellen Schwankungen der Formiatausscheidung wird dieser Parameter nicht als geeignet angesehen. Ein weiterer Ansatz ist die Bestimmung von Albuminkonjugaten des Formaldehyds (human serum albumin conjugate, FA-HSA) unter Zuhilfenahme einer ELISA-Testanordnung. Hierbei wurden statistisch signifikante Hinweise hinsichtlich der Eignung dieses Parameters beobachtet. In der hier vorgestellten Arbeit wird die Untersuchung eines FA-Hämoglobinadduktes beschrieben.

Formaldehyd bindet unter Bildung von N-Methylenvalin (MEEV) als Schiff'sche Base an das endständige Valin des Hämoglobins an. Dieses Addukt ist dem modifizierten Edman-Abbau nicht direkt zugänglich, so dass die Bestimmung des MEEV-Gehaltes indirekt, nach der Reduktion zum Methylvalin (MEV) erfolgt. Hierzu wurde ein Verfahren zur Bestimmung von N-Methylenvalin weiterentwickelt, validiert und angewendet. Ziel dieser Studie war es, die Aussagekraft des MEEV als Biomarker für Formaldehyd (FA) nach kontrollierter Exposition von 34 männlichen Probanden

zu untersuchen. In der aktuellen Literatur liegen Hinweise vor, dass MEEV zumindest auf Gruppenbasis als Biomarker einer FA-Exposition geeignet sein könnte.

Methode

Expositionsbedingungen, Probenahme

Die 34 männlichen, beruflich nicht FA-exponierten Studienteilnehmer (Nichtraucher, Alter: 18-51, Durchschnitt: 32 Jahre) wurden an fünf aufeinander folgenden Tagen für jeweils 4 h gegenüber FA-Konzentrationen von $\leq 0,01$ ppm (Hintergrundbelastung) bis 0,70 ppm sowie Kurzzeitpeaks bis 0.80 ppm exponiert. Die Expositionshöhe an den fünf Tagen wurde für die verschiedenen Probandengruppen randomisiert. Die Gesamtdosis in der Expositionswoche betrug 8,3 ppm. Die Blutentnahmen zur Adduktbestimmung erfolgten jeweils unmittelbar vor der ersten und nach der letzten Exposition, wobei die Blutproben sofort gewaschen, lysiert und tiefgefroren wurden. Im Anschluss daran wurde das Globin durch eine sequentielle Fällung isoliert, getrocknet und anschließend in Formamid gelöst.

Analytik

In den Globinproben wurden die Hämoglobinaddukte Methylvalin und Methylenvalin (nach Reduktion zum Methylvalin) nach dem so genannten „modifizierten Edman-Abbau“ mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) quantitativ erfasst. Nach Zugabe von Natronlauge, Pentafluorphenylisothiocyanat und des internen Standards (ISTD, 13C2H3-MEV-addukttragendes Poolglobin) erfolgt eine selektive Abspaltung und Überführung der N-alkylierten terminalen Aminosäure in ein Thiohydantoin-Derivat. Nach Aufreinigung durch Extraktion mit Hydrogencarbonatlösung und Wasser wird die Probe im Stickstoffstrom zur Trockne eingeengt. Das Thiohydantoin-Derivat wird mittels GC-MS im Single-Ion-Monitoring-Modus (SIM) nach Elektronenstoßionisation (EI) quantitativ analysiert. Die externe Kalibrierung erfolgte unter Anwendung von Vergleichsstandards eines adduktmodifizierten Dipeptids, Methylvalin-Valin-Leucin-anilid.

Die Ermittlung des Methylenvalingehaltes erfolgt durch Differenzbildung aus der Methylvalin-Bestimmung vor und nach der Reduktion des jeweiligen Globins. Die Subtraktion der so ermittelten Methylenvalingehalte nach der Exposition von denen vor der Exposition soll die innere Belastung der Probanden mit FA während des Prüfkammerexperiments beschreiben. Zur Reduktion von MEEV zu MEV wurde das aus der Blutprobe isolierte Globin in Wasser gelöst und mit einer wässrigen Natriumcyanoborhydrid-Lösung versetzt. Anschließend wurde das entstandene Gemenge in salzsäurem 2-Propanol gelöst und das Globin durch Zugabe von Ethylacetat erneut ausgefällt. Nach dem Trocknen wurde das reduzierte Globin in Formamid gelöst und wie oben beschrieben aufgearbeitet und analysiert.

Die Analysen wurden mit einem Gaschromatograph (Agilent 6890) mit massenselektivem Detektor (MSD, Agilent 5973) durchgeführt. Zur chromatographischen Trennung wurde eine 30 m lange mittelpolare Kapillare (optima 17, innerer Durchmesser: 0,25 mm, Filmdicke: 0,25 μ m, Macherey & Nagel) eingesetzt. Jeweils 1 μ L Probe wurden mittels Kaltaufgabesystem durch ballistisches Aufheizen von 120 °C auf 300 °C verdampft. Als Trägergas diente Helium 5.0 mit einem konstanten Volumenstrom von 1,2 mL/min. Die chromatographische Trennung erfolgte bei folgenden Temperaturbedingungen im Säulenofen: 80 °C für 1,05 min, 1. Heizrate: 10 °C/min bis 220 °C, 2. Heizrate: 20 °C/min bis 300 °C. Zur Quantifizierung wurden die Signale der nach Anregung mit 70 eV im Massenspektrometer gebildeten Fragmente m/z 338 (Methylvalin) bzw. m/z 300 (Interner Standard) ausgewertet. Zur Identitätskontrolle dienen als Qualifier die Massenspuren m/z 296 (MEV) bzw. m/z 342 (ISTD).

Ergebnisse

Der MEV-Grundgehalt aller Probanden betrug im Mittel 545 pmol/g Globin (vor Exposition) bzw. 557 pmol/g Globin (nach Exposition). Die Konzentration an Methylenvalin lag vor der FA-Exposition im Mittel bei 34.600 pmol/g Globin (Median 26.250) („physiologischer Untergrund“) und nach der FA-Exposition bei 35.900 (Median 26.400). Von den 34 Probanden wurde bei 10 Personen ein Anstieg des MEEV-Gehaltes beobachtet. Bei 13 Teilnehmern konnte keine Veränderung im MEEV-Gehalt und bei 11 Probanden ein Rückgang der MEEV-Konzentration festgestellt werden. Die Expositionsreihenfolge der einzelnen Studienteilnehmer hatte keinen Einfluss auf die Adduktspiegeldifferenz.

Diskussion

Der Grundgehalt an MEV im Bereich von 500 pmol/g Globin ist als typisch zu bezeichnen. Nicht gegenüber methylierenden Substanzen exponierte Personen weisen einen vergleichbaren MEV-Spiegel auf. Die Differenz des MEEV-Gehaltes vor und nach der für alle Probanden identischen Gesamtexposition variiert stark, so dass dieser Parameter im Rahmen der hier vorgestellten Studie nicht als diagnostisch ausreichend zuverlässiger Biomarker für die Beurteilung einer Formaldehydbelastung angesehen werden kann. Hierbei ist insbesondere zu bedenken, dass im Rahmen dieser Untersuchung lediglich kurzzeitig exponierte Personen untersucht wurden. In einer bereits publizierten arbeitsmedizinischen Feldstudie wurden auf Gruppenbasis (nicht exponierte Personen (Mittelwert: 228.000 pmol/g Globin) vs. Arbeitern mit FA-Umgang (Mittelwerte: Fabrik 1: 425.000 pmol/g Globin und Fabrik 2: 390.000 pmol/g Globin) deutliche Unterschiede im MEEV-Gehalt festgestellt. Da die hier untersuchten Arbeiter regelmäßig exponiert waren, ist der ermittelte Adduktspiegel das Ergebnis einer längerfristigen Exposition (steady state), was auf die hier vorgestellte Expositions-kammer-Studie über fünf Tage mit Probanden ohne vorherige berufliche Exposition nicht zutrifft.

Eine weitere Ursache für die erheblichen Unterschiede der in beiden Studien ermittelten Adduktkonzentrationen ist in der unterschiedlichen Art der Kalibrierung zu sehen. Bono et al. verwendeten die freie Aminosäure zur Kalibrierung, in dieser Studie wurde der entsprechende Dipeptid-Standard eingesetzt. Die letztgenannte Vorgehensweise führt, wie auch bei anderen Adduktbestimmungen beobachtet worden war, zu vergleichsweise geringeren Addukt-Konzentrationen. Insofern ist ein direkter Vergleich beider Studien aufgrund der abweichenden Expositionsszenarien und der unterschiedlichen analytischen Vorgehensweise nur bedingt möglich. Die Aussagekraft des Biomarkers MEEV sollte an beruflich regelmäßig höher exponierten Beschäftigten unter Einbeziehung einer Kontrollgruppe weiter geprüft werden.

■ **Projektleitung:** Rosenberger, Wolfgang, Bader, Michael, (PD Dr.); Kooperationspartner: Universität Heidelberg, Institut für Arbeits- und Sozialmedizin, Prof. Triebig

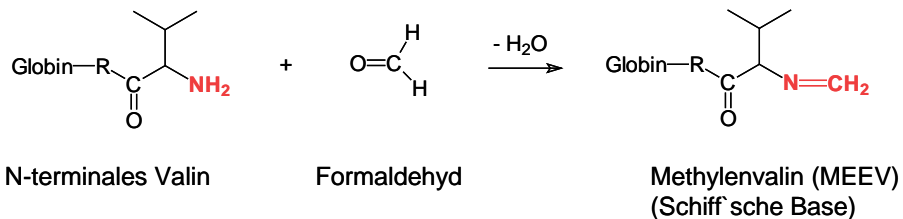


Abb. 1: Anbindung des Formaldehyds an das N-terminale Valin

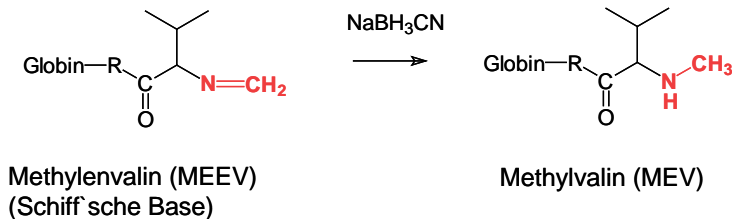


Abb. 2: Reduktion des Methylvalins mit Natriumcyanoborhydrid

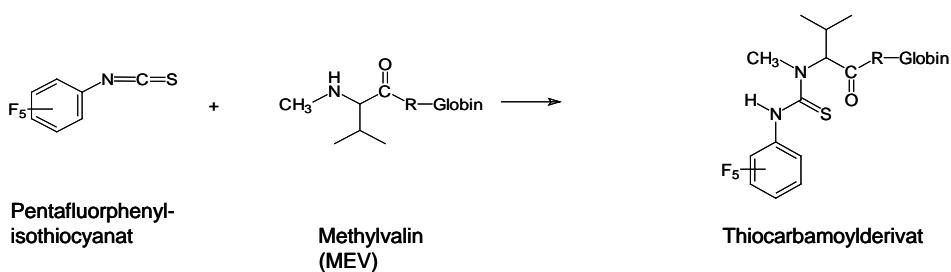


Abb. 3: Modifizierter Edman-Abbau

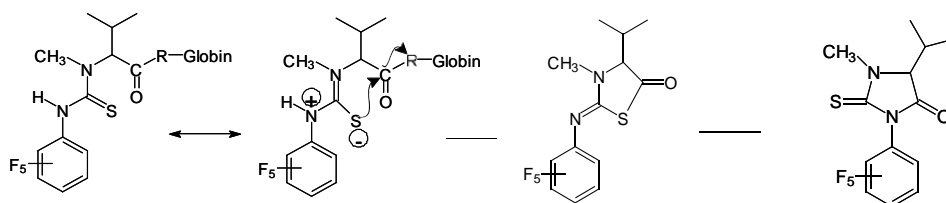


Abb. 4: Zyklisierungsreaktion unter Abspaltung des Globinrestes

Weitere Forschungsprojekte

Demografiemanagement in Klein- und Mittelunternehmen der Region: Innovationsplattform für alter(n) srelevantes Wissen (InnovAging)

■ Projektleitung: Gesamtprojekt: von Mitschke-Collande, Peter (Prof. Dr. rer. pol.), Fischer, Gisela (Prof. Dr. med.), Institut für Arbeitsmedizin: Rebe, Thomas (Dr. med.); Kooperationspartner: Leibniz Universität Hannover, Fachhochschule Hannover, Hochschule für Musik, Theater und Medien, Hannover Leibniz-Akademie Hannover, Stiftung Universität Hildesheim, Industrie- und Handelskammer Hannover, Bundesverband mittelständische Wirtschaft, Handwerkskammer Hannover, Förderverein Pro Hannover Region, Wirtschaftsclub Langenhagen e.V., Verein Deutscher Ingenieure e.V., Verband Deutscher Betriebs- und Werksärzte e.V., Verband deutscher Unternehmerinnen e.V. Landesgruppe Niedersachsen, Universal Design GmbH, Holtmann Messe+Event GmbH, Innovationsnetzwerk Niedersachsen, Sprengel Museum Hannover, Region Hannover, Projekt LernZeitAlter; Förderung: Europäische Union, Europäischer Fonds für regionale Entwicklung (EFRE)

Exposition und Belastung von Flugpersonal durch Organophosphate

■ Projektleitung: Rosenberger, Wolfgang, Bader, Michael (PD Dr. rer. nat.)

Entwicklung von Analysemethoden zur Bestimmung von Aluminium und anderen Metallen in der Luft am Arbeitsplatz

■ Projektleitung: Rosenberger, Wolfgang; Förderung: Sachmittelförderung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG)

Verbesserung der Schnittstelle zwischen Rehabilitationsklinik und Betrieb im Sinne einer arbeitsplatzorientierten Rehabilitation (JobReha)

■ Projektleitung: Wrbitzky, Renate (Prof. Dr. med.), Rebe, Thomas (Dr. med.); Kooperationspartner: Gutenbrunner, Christoph (Prof. Dr. med.), Schwarze, Monika (Dr. P.H.), Schröder, Thomas (Dipl.-Dokumentar), Ristel, Nina

(Dipl.-Psych.), Koordinierungsstelle Angewandte Rehabilitationsforschung (KoReFo); Noll, Nicole, Czernitzki, Andrea und Cordes, Norbert - Deutsche BKK, Eisenhauer, Anke, Rodewald, Jürgen und Moesch, Wilhelm (Dr. med.), Deutsche Rentenversicherung Braunschweig-Hannover, Jähnke, Markus - Postbeamtenkrankenkasse Bezirksstelle Hannover, Manecke, Ingra-A. (Dr. med.), Deutsche Post AG; Teumer, Frank (Dr. med.), Volkswagen Nutzfahrzeuge, Spallek, Michael (Dr. med.), EUGT e.V., Busche, Thilo (Dr. med.), Gesundheitszentrum Hannover, Kasprowski, Detlev (Dr. med.), Rehazentrum Bad Pyrmont, Heinz-Hubert Daalman (Dr. med.), Rehazentrum Bad Eilsen, Jacobs, Albrecht, Ambulantes Reha Centrum Braunschweig, Wehe, Heiko, Ambulantes Reha Centrum Wolfsburg; Förderung: Deutsche Rentenversicherung Braunschweig-Hannover

Originalpublikationen

Osterhage K, Bader M, Rebe T, Rosenberger W, Wrbitzky R. Arbeitsmedizinische Untersuchung der Belastung und Beanspruchung von Arbeitnehmern aus der Hartmetallproduktion durch Wolfram, Cobalt und Nickel. *Arbeitsmed Sozialmed Umweltmed* 2010;45(4):178-183

Tsikas D, Wolf A, Mitschke A, Gutzki FM, Will W, Bader M. GC-MS determination of creatinine in human biological fluids as pentafluorobenzyl derivative in clinical studies and biomonitoring: Inter-laboratory comparison in urine with Jaffe, HPLC and enzymatic assays. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2010;878(27):2582-2592

Buchbeiträge, Monografien

Bader M. N-(2-Carbamoylethyl)valin - Hämoglobin-Addukt von Acrylamid. In: Angerer J, Hartwig A. [Hrsg.]: Analytische Methoden zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe; Bd. 2; Analysen in biologischem Material; 6. Losebl.-Ausg., 19. Lfg Weinheim [u.a.]: Wiley-VCH [u.a.], 2010.

Bader M. N-(2-Carbamoylethyl)valine - haemoglobin adduct of acrylamide. In: Angerer J, Greim H. [Hrsg.]: The MAK-collection for occupational health and safety: Part IV, Biomonitoring methods; 12. Weinheim: Wiley-VCH, 2010. S.145-167

Bader M. N-methylpyrrolidon. In: Letzel S, Nowak D, Konietzko J, Dupuis H. [Hrsg.]: Handbuch der Arbeitsmedizin. Arbeitsphysiologie, Arbeitspsychologie, klinische Arbeitsmedizin, Prävention und Gesundheitsförderung. Losebl.-Ausg. Landsberg [u.a.]: ecomed Medizin, 2010.

Bader M, Barr D, Göen T, Schaller KH, Scherer G, Angerer J. Zuverlässigkeitskriterien einer analytischen Methode. In: Angerer J, Hartwig A. [Hrsg.]: Analytische Methoden zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe; Bd. 2; Analysen in biologischem Material; 6. Losebl.-Ausg., 19. Lfg Weinheim [u.a.]: Wiley-VCH [u.a.], 2010.

Bader M, Barr D, Göen T, Schaller KH, Scherer G, Angerer J. Reliability criteria for analytical methods. In: Angerer J, Greim H. [Hrsg.]: The MAK-collection for occupational health and safety: Part IV, Biomonitoring methods; 12. Weinheim: Wiley-VCH, 2010. S.55-101

Bader M, Will W, Tsikas D, Göen T. Interlaborvergleich zur Bestimmung von Kreatinin im Urin - Ergebnisse und Konsequenzen. In:

Griefahn B, Golka K, Hengstler JG, Bolt HM. [Hrsg.]: Dokumentationsband zur 50. Wissenschaftlichen Jahrestagung (16. - 19. Juni 2010) der Deutschen Gesellschaft für Arbeitsmedizin und Umweltmedizin. Aachen: DGAU, 2010. S.84-88

Göen T, Mach C, Broding HC, Bader M, Drexler H. Untersuchung der Triarylphosphat-Exposition von Fluggesellschaft nach „Fume Events“. In: Griefahn B, Golka K, Hengstler JG, Bolt HM. [Hrsg.]: Dokumentationsband zur 50. Wissenschaftlichen Jahrestagung (16. - 19. Juni 2010) der Deutschen Gesellschaft für Arbeitsmedizin und Umweltmedizin. Aachen: DGAU, 2010. S.652-654

Rebe T, Netz-Piepenbrink S, Johansson U, Bader M, Wrbitzky R. Verkehrsabhängige Katecholaminausscheidungen im Urin von Motorradfahrern. In: Griefahn B, Golka K, Hengstler JG, Bolt HM. [Hrsg.]: Dokumentationsband zur 50. Wissenschaftlichen Jahrestagung (16. - 19. Juni 2010) der Deutschen Gesellschaft für Arbeitsmedizin und Umweltmedizin. Aachen: DGAU, 2010. S.118-121

Rosenberger W, Wrbitzky R, Göen T, Bader M. Bestimmung von Organophosphat-Flammschutzmitteln in der Luft am Arbeitsplatz und in Innenräumen mittels GC-MS. In: Griefahn B, Golka K, Hengstler JG, Bolt HM. [Hrsg.]: Dokumentationsband zur 50. Wissenschaftlichen Jahrestagung (16. - 19. Juni 2010) der Deutschen Gesellschaft für Arbeitsmedizin und Umweltmedizin. Aachen: DGAU, 2010. S.609-613

Will W, Bader M, Cocker J, Göen T, Leng G. Interlaborvergleich zum Biomonitoring von Dimethylformamid und Dimethylacetamid - Ergebnisse und Konsequenzen für die analytische Praxis. In: Griefahn B, Golka K, Hengstler JG, Bolt HM. [Hrsg.]: Dokumentationsband zur 50. Wissenschaftlichen Jahrestagung (16. - 19. Juni 2010) der Deutschen Gesellschaft für Arbeitsmedizin und Umweltmedizin. Aachen: DGAU, 2010. S.640-641

Wrbitzky R. N,N-Dimethylformamid. In: Letzel S, Nowak D, Konietzko J, Dupuis H. [Hrsg.]: Handbuch der Arbeitsmedizin. Arbeitsphysiologie, Arbeitspsychologie, klinische Arbeitsmedizin, Prävention und Gesundheitsförderung. Losebl.-Ausg. Landsberg [u.a.]: ecomed Medizin, 2010.

Abstracts

2010 wurden 14 Abstracts publiziert.

Promotionen

Choitz, Georg-Friedrich (Dr. med.): Untersuchung zur Ermittlung der Tatbestände im Feststellungsverfahren zu obstruktiven Atemwegserkrankungen in der Bauwirtschaft.

Geißler, Anette (Dr. med.): Die medizinische Zusammenhangesbegutachtung in Berufskrankheitenverfahren obstruktiver Atemwegserkrankungen (BK 1315, BK 4301 und BK 4302) im Bereich der BG Bau Hannover.

Weitere Tätigkeiten in der Forschung

Bader, Michael (PD Dr. rer. nat.): Mitglied der Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) und deren Arbeitsgruppen „Analysen in biologischem Material“, „Aufstellung von Grenzwerten in biologischem Material“ und „Hautresorption“; Sachverständiger für das Biological Exposure Indices Committee der American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH); Mitglied der Arbeitsgruppen „Gefahrstoffe“ und „Klinische Umweltmedizin“ der Deutschen Gesellschaft für Arbeitsmedizin und Umweltmedizin e.V. (DGAUM).

Rosenberger, Wolfgang: Sachverständiger für den Arbeitskreis „Luftanalysen“ der Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG).