

## Abschlußbericht

|                                |   |
|--------------------------------|---|
| <b>Projekt-Nr:</b>             | Tox 1   |
| <b>Thema:</b>                  | PAK-Belastung am Arbeitsplatz – Reduzierung hoher innerer Belastung durch betriebliche Maßnahmen anhand von biochemischem Effekt-Monitoring   |
| <b>Projektleitung:</b>         | Dr. B. Marczyński   |
| <b>Beteiligte Mitarbeiter:</b> | R. Bramer (Arzt, Drittmittel-finanziert); Dipl.-Stat. M. Kappler; Dr. H. U. Käfferlein; Dr. T. Mensing; Dr. B. Pesch; Dipl.-Stat. S. Rabstein; PD Dr. M. Raulf-Heimsoth; Dr. H.-P. Rihs |
| <b>Initiierende BGen:</b>      | Bau-BG Rheinland und Westfalen (Dr. Hoffmann, Dr. Scherenberg); Südwestliche Bau-BG; Tiefbau-BG (Dr. Rumler, Dr. Schicker, Dr. Schott, Dr. Zoubek); Bau-BG Frankfurt                    |
| <b>Laufzeit:</b>               | 01/1999 – 12/2004   |

## Zusammenfassung

Auf Vorschlag des Arbeitsmedizinischen Dienstes der Bau-BG Rheinland und Westfalen sowie der Südwestlichen Bau-BG wurden Berufsgruppen, die direkten bzw. indirekten beruflichen Umgang mit polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAK) besitzen, mittels Methoden des sog. Biologischen Monitorings hinsichtlich ihrer Exposition gegenüber PAK und möglicher, daraus resultierender biochemischer sowie biologischer Effekte untersucht. Aus der Arbeit im Betreuungsbereich des AMD der Tiefbau-BG und Bau-BG Frankfurt hat sich darüber hinaus zusätzlich die Möglichkeit ergeben, Bitumen-exponierte Arbeiter auf eine Exposition gegenüber PAK zu untersuchen, da PAK ein Bestandteil von Bitumen sein kann.

Für die Untersuchungen wurden in einem ersten Schritt zunächst analytische Methoden entwickelt, die in der Lage sind, biochemische und biologische Effekte von PAK bei den exponierten Arbeitern zu erfassen. Die entwickelten Methoden erfassen dabei in den Blutzellen der untersuchten Arbeiterkollektive den Nachweis von

- (1) spezifischen Stoffwechselprodukten der PAK mit Hämoglobin (Hb) und der Erbsubstanz DNA (spezifisches Hb- und DNA-Adduktmonitoring)
- (2) reaktiven Sauerstoffspezies mit der DNA (unspezifisches DNA-Adduktmonitoring) und
- (3) DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüchen und
- (4) Chromosomenbrüchen sowie –umlagerungen

Die Untersuchungen wurden ergänzt durch die Bestimmung der sog. 16-EPA-PAK der amerikanischen Umweltbehörde und Bitumen in der Luft der Arbeitsplätze (durchgeführt durch das Berufsgenossenschaftliche Institut für Arbeitsschutz [BGIA] bzw. den einzelnen BGen) und durch ein Biologisches Monitoring der inneren Dosis (Stoffwechselprodukte der PAK im Urin der PAK- und Bitumenexponierten Arbeiter) seitens des Instituts und Poliklinik für Arbeits-, Sozial- und Umweltmedizin der Friedrich-Alexander-Universität und dem Biochemischen Institut für Umweltcarcinogene, Prof. Dr. Gernot Grimmer-Stiftung in Großhansdorf.

Im Vergleich zur Kontrollgruppe weisen PAK-exponierte Arbeiter sowohl eine signifikant erhöhte DNA-Strangbruchfrequenz als auch signifikant erhöhte 8-oxo-dG-Adduktraten auf. Ebenso konnten Unterschiede der Frequenz der DNA-Strangbrüche und die 8-oxo-dG-Rate zwischen Arbeitern, die in unterschiedlichen Gewerken beschäftigt waren, detektiert werden. So wurden die höchsten Raten an DNA-Strangbrüchen und 8-oxo-dG in Arbeitern der Graphitelektrodenproduktion gefunden. Beide genotoxikologischen Parameter weisen zusätzlich signifikante Zusammenhänge mit der äußeren Exposition (16 EPA-PAK in der Luft) und der inneren Exposition (PAK-Metabolite im Urin) auf, was darauf hindeutet, daß die beobachteten biochemischen und biologischen Effekt auf die Exposition gegenüber PAK zurückzuführen sind. Zusätzlich konnten signifikante Zusammenhänge zwischen der Rate an DNA-Strangbrüchen und der Bildung von 8-oxo-dG-Addukten gefunden werden. Die Bildung von 8-oxo-dG kann damit als eine wichtige Ursache für das Entstehen der DNA-Strangbrüche angesehen werden. Dies wiederum deutet darauf hin, dass PAK neben der Bildung spezifischer DNA-Addukte (z. B. denjenigen des B[a]P) ihre genotoxische Wirkung auch über Mechanismen des oxidativen Stresses entfalten können.

Im Gegensatz zu 8-oxo-dG konnte für ein B[a]p-spezifisches DNA-Addukt, das sog. *anti*-BPDE, keine Unterschiede zwischen exponierten und nicht-exponierten Personen festgestellt werden. Die Konzentrationen lagen jeweils zwischen <NWG (0,5 Addukte/10<sup>8</sup> Nukleotide) und 41,1 Addukten/10<sup>8</sup> Nukleotiden. Auch in bisher anderen publizierten Arbeiten konnten keine Unterschiede zwischen PAK-exponierten Personen und Kontrollpersonen gefunden werden. Bei

der getrennten Betrachtung der einzelnen Gewerke konnte ebenfalls kein Zusammenhang zwischen äußerer Exposition und der effektiven Dosis festgestellt werden. Innerhalb eines gut definierten Kollektivs aus einer Fabrik zur Herstellung feuerfester Materialien wurden vor und drei Monate nach einer betriebsbedingten Umstellung der PAK-haltigen Produktionsmaterialien (Bindepech) jeweils 17 Arbeiter hinsichtlich der Bildung von 8-oxo-dG, *anti*-BPDE und DNA-Strangbrüchen in Abhängigkeit von der äußeren Konzentration an PAK in der Luft untersucht. Die Umstellung führte einerseits zwar zu einer Abnahme der B[a]P-Konzentration, andererseits zu einer signifikanten Zunahme der Konzentrationen an Naphtalin und Phenanthren in der Luft. Nach der Umstellung konnte ein signifikanter Anstieg der DNA-Strangbrüche beobachtet werden. Die Ergebnisse geben Anlass zu der Hypothese, dass Expositionen gegenüber PAK-Gemischen mit höheren Anteilen von Naphtalin und/oder Phenanthren, aber trotz niedriger B[a]P-Anteile, DNA-Schädigungen verursachen und somit zur krebsinduzierenden Wirkung von PAK beitragen können. Dies ist vor dem Hintergrund der Tatsache, daß Naphtalin im Jahre 2000 ebenfalls als Kanzerogen im Tierversuch identifiziert werden konnte, nicht notwendigerweise überraschend.

Insgesamt weisen die Ergebnisse bei allen PAK-exponierten Arbeitern auf niedrige Konzentrationen an B[a]P in der Luft an den unterschiedlichen Arbeitsplätzen hin. Die Exposition über die Luft trägt auf Basis unserer Ergebnisse nicht wesentlich zu einer Erhöhung der Bildung von *anti*-BPDE bei. Dementsprechend ist der Anteil von *anti*-BPDE an PAK-induzierten Krebserkrankungen eher als gering einzuschätzen. Zukünftige Forschungen auf dem Gebiet der PAK-induzierten Krebserkrankungen sollten sich daher auf andere PAK (z. B. das Naphtalin) fokussieren.

Neben den Untersuchungen an PAK-exponierten Arbeitern wurden auch 66 Beschäftigte, die gegenüber Dämpfen und Aerosolen von Bitumen exponiert waren sowie 49 Kontrollen im sog. „Cross-Shift-Design“ (vor und nach der Schicht) untersucht. Hierzu wurden die exponierten Arbeiter auf Basis der ermittelten personenbezogenen Luftmessungen während der Schicht in zwei Gruppen eingeteilt ( $<10 \text{ mg/m}^3$ ,  $\geq 10 \text{ mg/m}^3$ ).

Die durchschnittliche Konzentration (Median) der Dämpfe und Aerosole von Bitumen betrug während der Schicht  $5,3 \text{ mg/m}^3$ . Die Konzentrationen von 1-OH-P und der Summe der OH-Ph im Urin dieser Arbeiter war nach der Schicht signifikant höher als vor der Schicht, während in der Kontroll-Gruppe im Urin keine Veränderungen während der Schicht beobachtet werden konnten. Raucher wiesen generell höhere Konzentrationen an 1-OH-P ( $P < 0,0001$ ) und OH-Ph im Urin auf als Nichtraucher. Die Ergebnisse zeigen, daß Bitumen-exponierte Arbeiter gegenüber PAK exponiert sind. Die gegenüber Bitumen exponierten Personen wiesen im Vergleich zur Kontrollgruppe sowohl vor als auch nach der Schicht höhere Konzentrationen an 8-oxo-dG auf. Der Anstieg an 8-oxo-dG während der Schicht war sowohl für die exponierten Personen als auch für die Kontrollpersonen signifikant, zeigte jedoch weder einen Zusammenhang mit der äußeren noch der inneren Exposition. Die im Comet-Assay bestimmten DNA-Strangbruchraten lagen bei den exponierten Arbeitern sowohl vor als auch nach der Schicht signifikant höher als in der Kontrollgruppe. Es konnte keine Assoziation zwischen den Variablen 8-oxo-dG und den DNA-Strangbruchfrequenzen festgestellt werden. Auch die DNA-Adduktraten an *anti*-BPDE lagen auf niedrigem Niveau und es wurden keine Unterschiede zwischen den Untersuchungszeitpunkten vor und nach Schicht gefunden. Die ermittelten Meßergebnisse weisen auf keine bzw. eine sehr niedrige B[a]P-Exposition über die Dämpfe und Aerosole von Bitumen hin. Die im untersuchten Kollektiv gemessenen B[a]P-Adduktraten sind auch denjenigen ähnlich, die nach PAK-Exposition gefunden werden. Letzteres weist wiederum – ähnlich wie bei den PAK – darauf hin, dass die geringen

Konzentrationen an *anti*-BPDE-DNA-Addukten nur mit einer geringen beruflichen Exposition gegenüber B[a]P in Zusammenhang stehen.

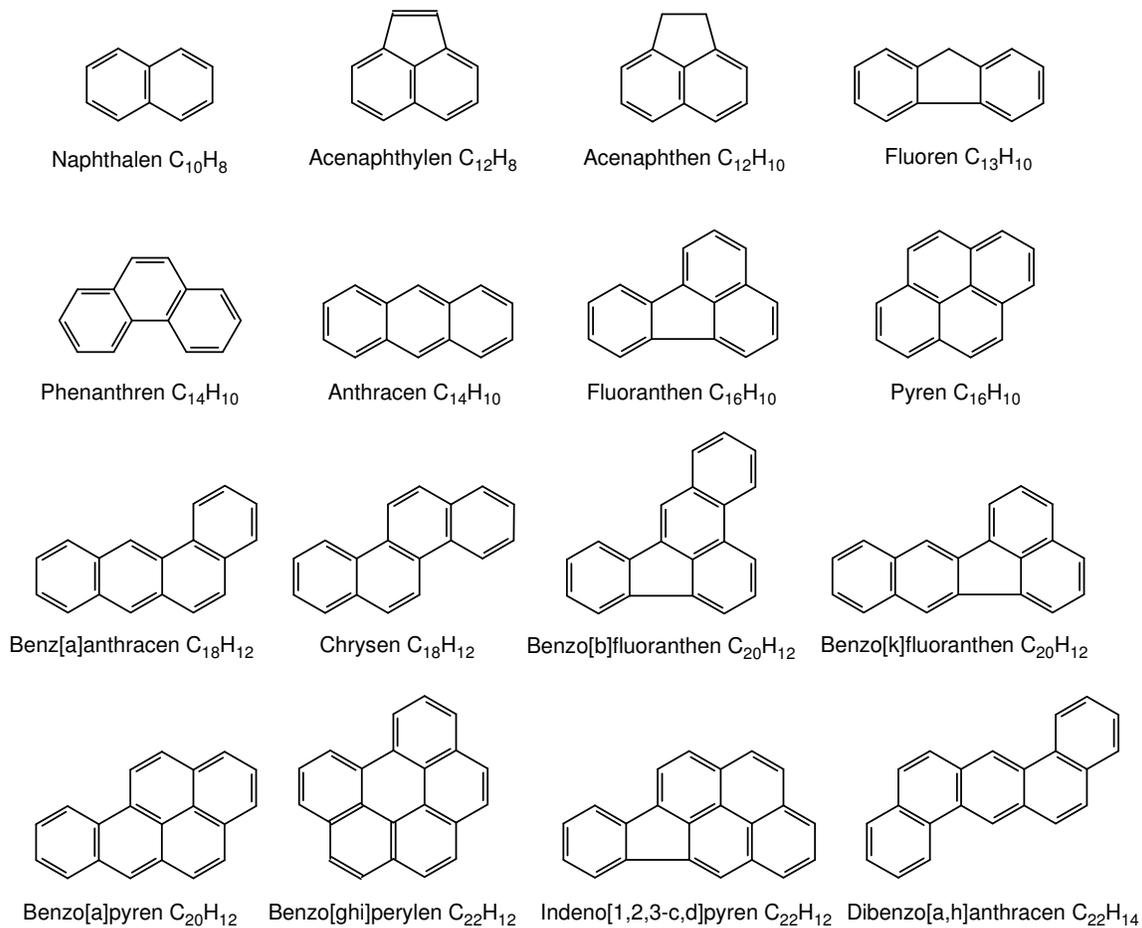
Zusammengefaßt weisen Bitumen-exponierte Arbeiter sowohl vor der Schicht als auch nach der Schicht höhere Werte an 8-oxo-dG und DNA-Strangbrüchen als nichtexponierte Arbeiter auf, jedoch läßt sich keine Assoziation zwischen diesen Parametern erkennen. Damit bleibt die Frage bestehen, welche Gründe es für die höheren DNA-Strangbruchraten in Bitumen-exponierten Personen gibt, die in dieser Pilotstudie klar nachgewiesen werden konnten. Da eine Exposition gegenüber PAK bei Bitumen-exponierten Arbeitern von untergeordneter Bedeutung zu sein scheint und kein Zusammenhang zwischen 8-oxo-dG und DNA-Strangbrüchen besteht, sollten im Falle von Bitumen die erhöhten Mengen an DNA-Strangbrüchen weder durch oxidativen Stress noch durch PAK verursacht werden. Da Bitumen aus vielen verschiedenen Substanzen besteht, rücken damit in zukünftigen Studien vor allem andere Gefahrstoffe in Bitumen in den Mittelpunkt des Interesses.

# Polyzyklische Aromatische Kohlenwasserstoffe

## Einleitung – Stand des Wissens

Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) sind organische Verbindungen, die aus mindestens zwei kondensierten Benzolringen bestehen. PAK werden bei der unvollständigen Verbrennung organischer Materie freigesetzt und treten stets in Gemischen aus mehreren hundert Einzelverbindungen auf. Sie können an verschiedenen Arbeitsplätzen (z.B. in der Graphitelektrodenproduktion oder bei der Herstellung und Vermauern von Feuerfeststeinen, in der Teerdestillation und Strangpechherstellung, etc. etc.) in der Luft auftreten. Viele dieser Verbindungen haben sich sowohl beim Menschen als auch im Tierversuch als krebserzeugend erwiesen (DFG 2004, IARC 1983). Als Zielorgan steht dabei an erster Stelle die Lunge, jedoch werden auch die Harnblase, die Haut und der Kehlkopf als Krebslokalisation diskutiert (Boffetta *et al.* 1997). Nach metabolischer Aktivierung durch enzymatische Systeme (z. B. CYP1A1, CYP1A2, mEH, etc.) entfalten PAK dabei ihre krebserzeugende Wirkung zumeist über einen direkt genotoxischen Mechanismus und – in Abhängigkeit von Ihrer Struktur – die Induktion von Mutationen in kritischen Genen (Nesnow *et al.* 1995; Tretyakova *et al.* 2002). Für derartige Gefahrstoffe kann nach bisherigen wissenschaftlich gesicherten Erkenntnissen keine Konzentration angegeben werden kann, unterhalb derer ein Umgang mit dieser Stoffgruppe oder Einzelsubstanzen als sicher anzunehmen ist (Zito 2001; Bolt *et al.* 2004). Die PAK stellen deshalb am Arbeitsplatz ein nicht zu unterschätzendes arbeitsmedizinisches Problem dar.

Als Leitsubstanz der PAK gilt das Benzo[a]pyren (kurz B[a]p). Die bis Ende 2004 gültige technische Richtkonzentration (TRK) lag bei 2 µg B[a]p pro m<sup>3</sup> Luft. Für die Strangpechherstellung sowie im Ofenbereich von Kokereien war ein TRK-Wert von 5 µg B[a]p pro m<sup>3</sup> gültig. Nach bisheriger Definition wurde durch die Einhaltung dieser TRK-Werte das Krebsrisiko auf das derzeit niedrigst-mögliche Niveau reduziert. Um dies zu gewährleisten wird dazu in der Luft am Arbeitsplatz durch ein sog. Ambient Monitoring die Konzentration von B[a]p, aber auch anderer PAK gemessen. Dabei wird sich oftmals aus konventionellen Gründen für die sog. 16-EPA-PAKs der amerikanischen Umweltbehörde entschieden, zu denen auch das B[a]p gehört (**Abb. 1**). Das Ambient Monitoring stellt eine unabdingbare Maßnahme der Primärprävention dar, mit der sich in geeigneter Weise die Quellen der PAK-Emission erfassen und gezielt reduzieren lassen.



**Abb. 1.** Die durch ein *Ambient Monitoring* erfaßten 16 polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe der amerikanischen Umweltbehörde (US-EPA).

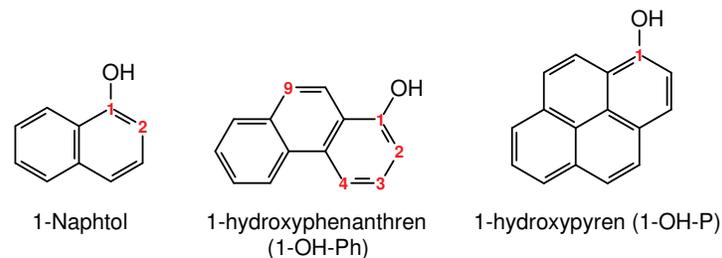
Die orale oder perkutane Aufnahme von PAK können jedoch durch ein *Ambient Monitoring* nicht abgeschätzt werden. Zusätzlich wird der Einfluß der Aufnahme an PAK durch Arbeiter, die interindividuell unterschiedliche Gewohnheiten im Umgang mit PAK am Arbeitsplatz pflegen, nicht berücksichtigt. Generell kann ein *Ambient Monitoring* auch die unterschiedlichen Atemzeitvolumina bei verschiedenen schweren Tätigkeiten nicht angemessen berücksichtigen.

Aus den genannten Gründen wird daher das *Ambient Monitoring* durch ein sog. *Biological Monitoring* ergänzt (DFG 2001). Darunter versteht man vor allem die Bestimmung der Exposition. Zu dieser gehören der Nachweis der inneren Dosis, d. h. die Bestimmung der Schadstoffe und ihrer Stoffwechselprodukte in den Körperflüssigkeiten des Menschen, sowie der Nachweis der effektiven Dosis, d. h. der Reaktion von Stoffwechselprodukten der Gefahrstoffe mit körpereigenen Makromolekülen (z. B. Hämoglobin oder der Erbsubstanz DNA). Ein *Biological Monitoring* kann jedoch auch die Bestimmung erster biologischer Effekte bzw. bereits veränderter Strukturen und Funktionen im Organismus des Menschen umfassen, der Gefahrstoffen am Arbeitsplatz ausgesetzt ist. Diese Bestimmung der Effekte ist jedoch oftmals unspezifisch für einen bestimmten Gefahrstoff, so daß ein gut organisiertes und durchgeführtes *Biological Monitoring* grundsätzlich immer sowohl die Exposition als auch die

Effekte bestimmt, um einen Zusammenhang zwischen beiden erkennen bzw. ausschließen zu können.<sup>1</sup>

Ein *Biological Monitoring* ist generell besonders sinnvoll bei direktem Hautkontakt mit Gefahrstoffen, vor allem wenn – wie im Falle der PAK – die Gefahrstoffe auch tatsächlich über die Haut aufgenommen werden. Damit ist anzunehmen, daß die tatsächliche Belastung der Arbeiter höher ist, als es durch ein *Ambient Monitoring* alleine festzustellen wäre.

Für die Bestimmung der *inneren Dosis* beruflich PAK-exponierter Personen wird heute vor allem die Bestimmung von 1-Hydroxypyren (1-OH-P) im Harn herangezogen (Jongeneelen 2001). Dies liegt in der Tatsache begründet, daß Pyren ein symmetrisches Molekül ist und damit lediglich ein einziger monohydroxylierter Metabolit (1-OH-P) entstehen kann. Dies ist für alle anderen PAK nicht der Fall. Dementsprechend liegt 1-OH-P – im Vergleich zu hydroxylierten Metaboliten anderer PAK – in relativ hohen Konzentrationen im Harn vor und läßt sich aus chemisch-analytischer Sicht dementsprechend „einfach“ im Harn sowohl von beruflich als auch über die Umwelt exponierten Personen nachweisen (Strickland und Kang 1999). Neben 1-OH-P können jedoch in der Zwischenzeit auch Metaboliten des Naphtalin und Phenanthren analytisch zuverlässig erfaßt werden (Angerer *et al.* 1997; Jacob und Seidel 2002; Preuss und Angerer 2004) (**Abb. 2**). In der Literatur liegen zusätzlich Verfahren zur Bestimmung von 3-hydroxy-B[a]p sowie 3-hydroxybenzo[a]anthrazen bei exponierten Arbeitern vor (Gündel und Angerer 2000), welche sich bisher jedoch nicht in der arbeitsmedizinischen Praxis durchsetzen konnten.

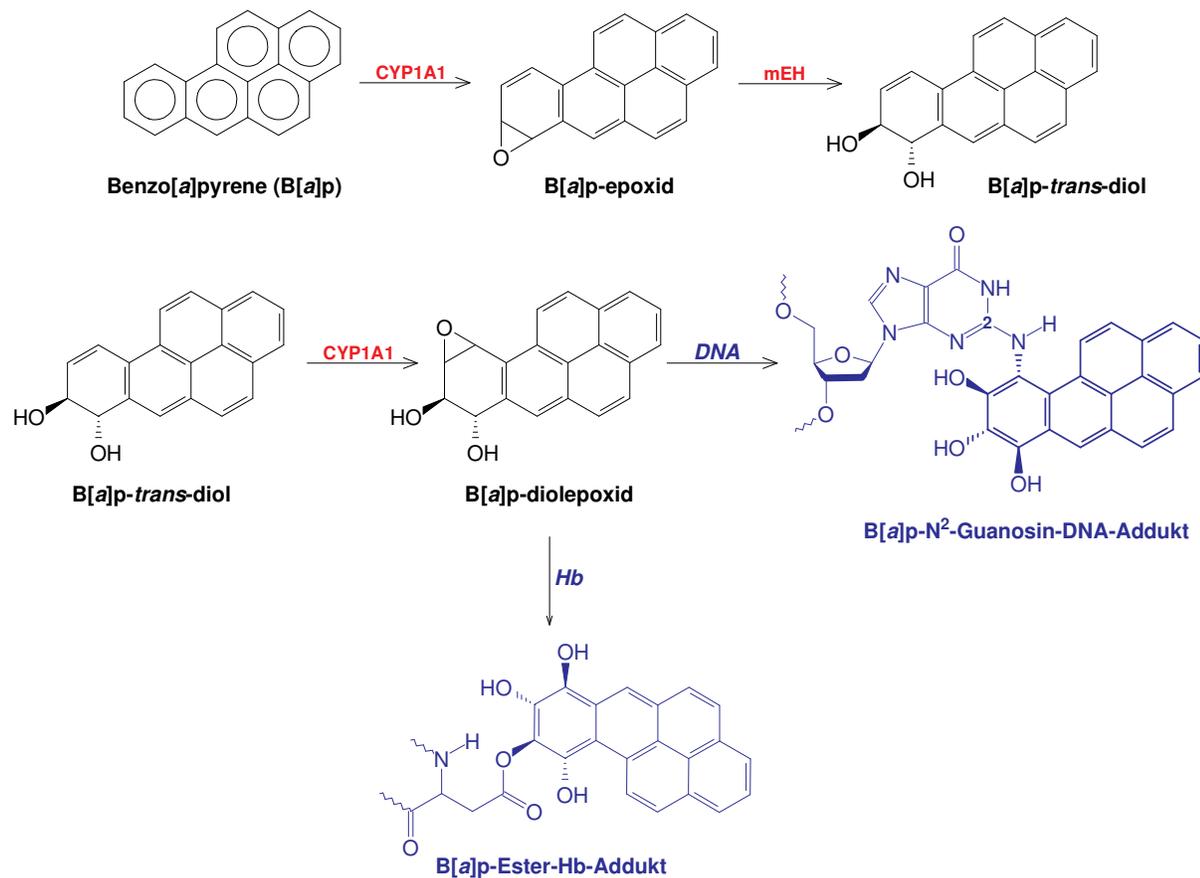


**Abb. 2.** Hydroxylierte Stoffwechselprodukte des Naphtalin, Phenanthren und Pyren. Weitere Isomere liegen sowohl für Naphtalin an der C2-Position (2-Naphtol) als auch für Phenanthren an den C2, C3, C4- und C9-Positionen (2-, 3-, 4- und 9-hydroxyphenanthren) vor. Darüber hinaus besitzt der Körper die Möglichkeit unterschiedliche Stoffwechselprodukte mit zwei (sog. Dirole) oder vier (sog. Tetrole) Hydroxygruppen zu bilden (nicht gezeigt).

Die Bestimmung der *effektiven Dosis* nach Exposition gegenüber PAK erfolgt durch ein sog. *biochemisches Effektmonitoring*, d. h. dem Nachweis von Reaktionsprodukten reaktiver Intermediate im Stoffwechsel der PAK mit Makromolekülen (z. B. der DNA) im Körper des Menschen. Die Bestimmung der effektiven Dosis geht dabei über das reine Dosismonitoring (PAK-Metabolite im Urin) hinaus, da es näher am ultimalen Wirkprinzip dieser krebserzeugenden Arbeitsstoffe steht. Die durch PAK gebildeten spezifischen DNA-Addukte werden als initiiierende Komponente der Krebsentstehung angesehen, die letztendlich für die Bildung von Mutationen in kritischen Genen (Onkogenen bzw. Tumorsuppressorgenen) verantwortlich sein können. Unter der Annahme, daß Verbindungen, die an die DNA anbinden, auch an Proteine anbinden können, kann auch das Hämoglobin als Surrogat für die DNA

<sup>1</sup> Im Rahmen dieses Abschlußberichts umfaßt per definitionem der Begriff „*Biological Monitoring*“ sowohl die Bestimmung der Exposition (innere Dosis, effektive Dosis) und die Bestimmung des Effekts (erste biologische Effekte, sowie veränderte Strukturen und Funktionen im Menschen) wohingegen z. B. der Nachweis der „inneren Dosis“ als Bestandteil der Bestimmung der Exposition explizit auch als solche bezeichnet wird.

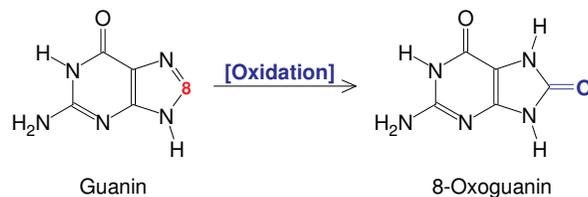
herangezogen werden. In Abhängigkeit vom jeweiligen Makromolekül spricht man letztendlich von einem *Hämoglobin- (Hb) bzw. DNA-Adduktmonitoring*. Das Prinzip des Metabolismus von PAK und deren Anbindung an Hämoglobin bzw. die Erbsubstanz DNA ist beispielhaft in **Abb. 3** für B[a]p gezeigt. Aus analytischer Sicht stellt die valide Bestimmung der Hb- und DNA-Addukte jedoch aufgrund der niedrigen Konzentrationen im Blut höchste Anforderungen an die Probenvorbereitung und die technische Ausstattung des durchführenden Labors. Derzeit liegen weltweit nur wenige Veröffentlichungen zur Bestimmung von Hb- und DNA-Addukten bei PAK-exponierten Beschäftigten vor, wobei die diagnostische Validität dieser Addukte, auch vor dem Hintergrund des Einflusses des Rauchens, interindividueller Unterschiede bei der Verstoffwechslung und der Anwendung unterschiedlicher analytischer Methoden zum Nachweis der jeweiligen Addukte noch nicht hinreichend belegt ist (Boysen und Hecht 2003, Phillips 2002).



**Abb. 3.** Metabolismus des Benzo[a]pyren (B[a]p) zum B[a]p-diolepoxid und dessen Reaktion mit einer Carboxylgruppe der Asparagin- oder Glutaminsäure zum entsprechenden Hämoglobin (Hb)-Addukt bzw. mit dem Guanin der Erbsubstanz DNA zum entsprechenden DNA-Addukt. Die angegebenen Hb- und DNA-Addukte sind die jeweiligen Hauptaddukte des B[a]p mit Hb (Naylor *et al.* 1990) und DNA (Stansbury *et al.* 1994). Beispiele aus CYP1A1, Cytochrom-P4501A1-Isoenzym; mEH, mitochondriale Epoxidhydrolase.

Neben den gefahrstoffspezifischen DNA-Addukten des B[a]p können PAK die DNA auch durch indirekte Mechanismen, sog. oxidativen Streß, schädigen, indem sie die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies wie Superoxidanionen, Hydroxyl- und Peroxyradikalen und chemisch angeregten Molekülen (z. B. sog. Singulett-Sauerstoff) fördern und damit das oxidative Gleichgewicht in der Zelle stören (Cadet *et al.* 2002). Eine wesentliche Rolle bei PAK-

induzierten oxidativen Streß spielen bestimmte Stoffwechselprodukte der PAK (*o*-Chinone), die innerhalb eines Redoxkreislaufs ständig reaktive Sauerstoffspezies produzieren, welche die DNA oxidieren und auf diese Weise indirekt zu Mutationen oder zu DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüchen führen können (Seike *et al.* 2003, Flowers *et al.* 1997). Analog der spezifischen DNA-Addukte des B[a]p läßt sich auch die oxidierte DNA mittels analytischer Verfahren im Blut oder Urin nachweisen. Zu diesem Zweck wird in aller Regel das Oxidationsprodukt des Guanin, das 8-oxoguanin, herangezogen (Nilsson *et al.* 2004). Da neben PAK aber auch eine Vielzahl anderer Gefahrstoffe zur Induktion reaktiver Sauerstoffspezies führen, ist 8-oxo-dG nicht spezifisch für eine Belastung gegenüber PAK am Arbeitsplatz oder über die Umwelt.



**Abb. 4.** Bildung von 8-Oxoguanin nach Einwirkung von reaktiven Sauerstoffbildnern auf Guanin

Im Gegensatz zum Biomonitoring der Exposition wird das Biomonitoring des Effekts in der arbeitsmedizinischen Praxis kaum eingesetzt, obwohl für den Nachweis *erster biologischer Effekte* im Rahmen eines *Biological Monitoring* für krebserzeugende Verbindungen am Arbeitsplatz oder über die Umwelt heutzutage eine Reihe unterschiedlicher Methoden zur Verfügung stehen. Dazu gehören vor allem Verfahren, die biologische Effekte auf der Ebene der DNA und der Chromosomen untersuchen, z. B. die Einzelzell-Gelelektrophorese (‘Comet-Assay’) zum Nachweis von DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüchen (Møller *et al.* 2000; Faust *et al.* 2004) und der Zytokinese-Block-Mikrokerntest zum Nachweis von Chromosomenbrüchen und –umlagerungen (Fenech 2000). Der Nachweis von DNA-Schädigungen durch den ‘Comet-Assay’ beruht dabei auf der Tatsache, daß fragmentierte (=geschädigte) DNA im elektrischen Feld schneller wandert als intakte DNA. Es bildet sich ein Schweif („Komet“) neben dem Zellkern, der – je nach Schädigung – mehr oder weniger stark ausgeprägt ist. Beim Mikrokerntest werden schadstoffinduzierte Fehler bei der Zellteilung untersucht. Finden Chromosomenbrüche aufgrund fehlerhafter Zellteilung statt, verbleiben Bruchstücke der Chromosomen in der Zelle und werden durch den Spindelapparat zu den Polen der Zelle gezogen. Diese Reste werden eingeschlossen und bilden die sog. Mikrokerne, die ebenfalls – je nach Schädigungsgrad – mehr oder weniger häufig auftreten. Andere Verfahren, z. B. der Austausch von Schwesterchromatiden (SCE), werden ebenfalls angewandt, gelten jedoch als weniger spezifisch und diagnostisch valide (Schwartz *et al.* 1990). Alle genannten Testverfahren erfassen nahezu ausschließlich reversible biologische Effekte und sind daher besonders für ein Biomonitoring des Effekts geeignet, da die durch einen Gefahrstoff verursachten höheren Werte (Beanspruchungen) in der Regel nach Beendigung der Exposition auf Normalwerte (d. h. ähnlich den Werten bei nichtexponierten Personen) zurückfallen. Damit bilden Sie ein ideales Instrument der Prävention gefahrstoffinduzierter Erkrankungen am Arbeitsplatz.

Bei der Bestimmung *veränderter Strukturen und Funktionen* werden zumeist irreversible Effekte erfaßt, die nach Beendigung der Exposition weiterhin bestehen bleiben. Für krebserzeugende Substanzen wird hierbei vor allem der Nachweis struktureller und zahlenmäßiger Veränderungen von Chromosomen mit der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung

(‘FISH’, Jiang und Katz 2002; Levsky und Singer 2003) herangezogen, während Gewinne und Verluste von genetischer Information durch die vergleichende genomische Hybridisierung (Weiss *et al.* 1999) bestimmt werden können. Die Methoden finden vor allem Anwendung in der Zytogenetik von Tumorerkrankungen, so auch bei potentiell durch PAK verursachten Krebserkrankungen der Lunge (Bubendorf *et al.* 2005, Chanin *et al.* 2004), des Kehlkopfs (Hardisson *et al.* 2004; Hermsen *et al.* 2001) und der Blase (Bubendorf und Grilli 2004; Hurst *et al.* 2004). Im *Biological Monitoring* werden sie hingegen nur vereinzelt eingesetzt. Im Falle der PAK liegt derzeit nur eine einzige Publikation aus dem umweltmedizinischen Bereich vor, die den Zusammenhang zwischen einer PAK-Exposition im Mutterleib und einem höheren Auftreten von Chromosomenaberrationen mittels FISH berichtet (Bocskay *et al.* 2005).

## Fragestellung und Ziele des Vorhabens

Die Prävention PAK-bedingter Krebserkrankungen an Arbeitsplätzen muß derzeit als unbefriedigend eingestuft werden. Dies liegt in erster Linie an der Tatsache, daß sich die Prävention heute weitgehend auf die Bestimmung von PAK bzw. B[a]p in der Luft an den unterschiedlichen Arbeitsplätzen stützt. Darüber hinaus sind die tatsächlich auftretenden Expositionen aufgrund der Tatsache, daß PAK gut über die Haut resorbiert werden können, höher als bisher angenommen. Zusätzlich gibt es den begründeten Verdacht, daß PAK auch systemische Krebserkrankungen, d. h. Krebserkrankungen in anderen Organen als dem Ort der Aufnahme (Lunge), hervorrufen können (Boffetta *et al.* 1997; Mastrangelo *et al.* 1996). Aufgrund der nicht standardisierten und in der Regel nicht vorhandenen spezifischen Untersuchungsverfahren besteht derzeit erhebliche Unsicherheit in der Früherkennung und Prävention PAK-verursachter Erkrankungen.

Ziel des Vorhabens war es, die Belastung und Beanspruchung bei beruflich PAK-exponierten Personen in Deutschland durch Verwendung verschiedener Verfahren des *Biological Monitoring* zu erfassen, um die Zusammenhänge zwischen äußerer Exposition (PAK in der Luft), innerer Exposition (innere und effektive Dosis) sowie die eventuell daraus resultierenden schädlichen Effekte (erste biologische Effekte) auf den Organismus der Beschäftigten untersuchen und abschätzen zu können. Auf Vorschlag des Arbeitsmedizinischen Dienstes der Bau-BG Rheinland und Westfalen sowie der Südwestlichen Bau-BG wurden dabei vor allem stark mit PAK exponierte Berufsgruppen untersucht. Dazu gehörten Beschäftigte aus Kokereien, dem Feuerfestbau, der Herstellung von Feuerfestmaterial, der Graphitelektrodenherstellung, der Produktion von Kohlenstoffspezialprodukten etc. etc. Die Ergebnisse wurden verglichen mit Beschäftigten, die nicht gegenüber PAK exponiert waren.

Um ein *Ambient Monitoring* und ein *Biological Monitoring* in seiner Gesamtheit durchführen zu können, wurde das Projekt in Form eines multizentrischen Forschungsprojektes unter Beteiligung des Berufsgenossenschaftlichen Instituts für Arbeitsschutz (BGIA), unterschiedlich betroffener Einzel-BGen, Hochschulinstituten und dem BGFA durchgeführt. Das *Ambient Monitoring* (PAK in der Luft, personenbezogen) wurde dabei durch das BGIA sowie die Einzel-BGen durchgeführt, während die Bestimmung der *inneren Dosis* (PAK-Metabolite im Urin)<sup>2</sup> durch das Institut und Poliklinik für Arbeits-, Sozial- und Umweltmedizin der Friedrich-Alexander Universität Erlangen (Arbeitsgruppe Prof. Dr. J. Angerer) und dem Biochemischen Institut für Umweltkarzinogene (Prof. Dr. Gernot Grimmer-Stiftung, Arbeitsgruppe PD Dr. A. Seidel) durchgeführt wurde. Die detaillierten Ergebnisse von diesen Arbeitsgruppen können den

<sup>2</sup> 1-Hydroxypyren (1-OH-P); 1- und 2-Naphthol (1- und 2-N); 1-, 2-, 3-, 4- und 9-Hydroxyphenanthren (1-, 2-, 3-, 4- und 9-OH-Ph); 1,2-, 3,4- und 9,10-Dihydroxydihydrophenanthren (1,2-, 3,4- und 9,10-DDPh).

jeweiligen Abschlußberichten an den Hauptverband der Berufsgenossenschaften (HVBG) entnommen werden. Im Folgenden wird lediglich auf die Arbeiten des BGFA im Detail eingegangen.

Der Schwerpunkt am BGFA im Rahmen des oben genannten multizentrischen Forschungsprojekts lag auf dem Nachweis möglicher Veränderungen bzw. Schädigungen der DNA im Zellkern der PAK exponierten Personen mittels Methoden zur Bestimmung der effektiven Dosis (DNA-Adduktmonitoring) und erster biologischer Effekte (DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüche und – teilweise – Chromosomenbrüche und –umlagerungen). Als Endpunkte der effektiven Dosis wurde  $\pm$ anti-B[a]P-7,8-diol-9,10-epoxide (*anti*-BPDE), ein spezifisches DNA-Addukt des B[a]p und 8-Oxo-2'-deoxyguanosin (8-oxo-dG), ein spezifisches DNA-Addukt für oxidativen Streß gemessen. Als toxikologischen Endpunkt für erste biologische Effekte wurden DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüche sowie alkali-labile Stellen in weißen Blutzellen mittels (alkalischer) Einzelzell-Mikrogelelektrophorese ('Comet-Assay') sowie – in einem Subkollektiv von 20 Kokereiarbeitern – Chromosomenabberationen mittels des Zytokinese-Mikrokerntests gemessen.

## Untersuchte Kollektive

Zwischen 1999 bis Ende 2004 wurden Untersuchungen an insgesamt 227 PAK-exponierten Berufstätigen und 49 Kontrollpersonen durchgeführt, die nicht gegenüber PAK exponiert waren (**Tab. 1**).

|                                |              | Kontrollgruppe<br><i>n</i> = 49 | PAK-Exponierte<br><i>n</i> = 227 |
|--------------------------------|--------------|---------------------------------|----------------------------------|
| Alter [Jahre; Median; Bereich] |              | 36 (19 - 61)                    | 39 (19 - 62)                     |
| Raucher aktuell                | <i>n</i> (%) | 20 (40,8)                       | 155 (68,6)                       |
| Nationalität Deutsch           | <i>n</i> (%) | 44 (89,8)                       | 163 (72,8)                       |

**Tab. 1.** Charakteristika der untersuchten PAK-exponierten Beschäftigten und Kontrollpersonen.

Die Arbeiter kamen dabei aus den Industriezweigen der Feuerfestprodukte (FF, *n* = 119), der Graphitelektrodenherstellung (GE, *n* = 30), der Kokerei (KK, *n* = 51) und der Konverterbetriebe (KV, *n* = 27). Zwanzig Berufstätige aus den Bereichen des Wasserbaus, der Brandsanierung und sog. Strahler wurden nicht in der Auswertung berücksichtigt, da für Sie keine personbezogenen Luftmessungen durchgeführt wurden. Neunundzwanzig Beschäftigte aus der Herstellung von Feuerfestprodukten und 14 Kokerei-Arbeiter wurden nachuntersucht.

## Methoden

### Isolierung der DNA

Die Bestimmung der DNA-Addukte wurde in weißen Blutzellen (WBZ) der exponierten Arbeiter durchgeführt, welche mittels einer Standardisolierung (Ficoll) aus dem Vollblut der Beschäftigten isoliert wurde.

Die DNA-Isolierung aus WBZ wurde einerseits mittels eines kommerziell erhältlichen DNA-Isolierungsverfahren der Fa. Quiagen, andererseits auch mit geringfügigen Modifikationen auf Basis der Beschreibung nach Dahlhaus und Appel (1993) durchgeführt. Im Rahmen des letztgenannten Verfahrens wurden die WBZ mit der achtfachen Menge an Extraktionspuffer (NaCl, Tris-HCl, EDTA, SDS, pH 7.4) verdünnt und für 30 min auf Eis gekühlt. Im Anschluß wurden eine Lösung bestehend aus Chloroform und Isoamylalkohol (12:1, v/v) zur Probe hinzugefügt. Nach Schütteln und zentrifugieren der Probe wurde die wäßrige Phase abgehoben. Die Extraktion mit Chloroform/Isoamylalkohol wurde wiederholt, die wäßrigen Phasen vereinigt und im Anschluß die DNA durch langsame Zugabe von eisgekühlten Ethanol gefällt. Die DNA wurde vorsichtig mit einer Pasteur-Pipette aus der Lösung entfernt und zweifach mit 70%-igen Ethanol gewaschen und der DNA-Gehalt mittels UV-Spektroskopie bestimmt.

### **Nachweis von 8-Hydroxydeoxyguanosin (8-oxo-dG)**

Der Nachweis von 8-oxo-dG in WBZ wurde auf Basis der Arbeiten von Marczynski *et al.* (1997) und der durch Pouget *et al.* (1999) beschriebenen Modifikation des Testverfahrens durchgeführt. Dazu wurde die isolierte DNA in Natriumacetatpuffer (pH 5,1) gelöst und bei 95°C inkubiert. Im Anschluß wurde die denaturierte DNA mittels Zugabe von DNA-Nuklease bei 37°C und alkalischer Phosphatase verdaut. Um die Nukleoside von Verunreinigungen durch die Enzyme zu trennen, wurden die Proben im Folgenden einer Mikrozentrifugation unterworfen. Die abschließende Analyse wurde mittels der Hochdruckflüssigkeitschromatographie und elektrochemischen Detektion (HPLC-ECD) unter Einhaltung der bei Floyd *et al.* (1986) und Pouget *et al.* (1999) beschriebenen Instrumenteneinstellungen durchgeführt.

### **Nachweis von $\pm$ anti-B[a]p-7,8-diol-9,10-epoxide (anti-BPDE)**

Zum Nachweis von *anti*-BPDE wurde die DNA ebenfalls in Natriumacetatpuffer (pH 5,1) gelöst und einer sauren Hydrolyse unterworfen. Abschließend wurde die Probe analog der Methoden von Rojas *et al.* (1998) und Pavanello *et al.* (1999) mittels 2-dimensionaler Hochdruckflüssigkeitschromatographie und Fluoreszenz-Detektion (2D-HPLC-FLD) detektiert und quantifiziert

### **Alkalische Einzelzell-Mikrogelelektrophorese (‘Comet-Assay’)**

Für die Durchführung des ‘Comet-Assays’ wurden  $\sim 2 \cdot 10^4$  Zellen (Lymphozyten) verwendet. Zu diesem Zweck wurde zunächst Standard Agarose auf einen Objektträger gegeben und an der Luft getrocknet. Im Anschluß wurden 10  $\mu$ L der Lymphozytenlösung mit Agarose vermischt und auf die bereits vorhandene Agaroseschicht auf den Objektträger gegeben. Die folgenden Schritte wurden unter Rotlicht durchgeführt, um Schädigungen der DNA während der Aufarbeitung zu unterdrücken. Nach dem Trocknen der Gele wurden diese in einen Lyse-Puffer getaucht und einer alkalischen Gelelektrophorese (pH 13) unterworfen. Die Proben werden mit Tris-HCl (pH 7.4) gewaschen und die Zellkerne mit Ethidiumbromid angefärbt. Die Auswertung erfolgt mittels Fluoreszenz-Mikroskopie.

### **Zytokinesblock-Mikrokernstest**

Die Frequenz von Mikrokernen in peripheren Lymphozyten wurde basierend auf einer Standardmethode (Fenech 2000) ermittelt. Dazu wurden die Lymphozyten zweimal mit HBSS gewaschen.  $10^6$  Zellen/mL wurden in 1 mL RPMI-Medium (supplementiert mit Glutamin,

fötalem Kälberserum, Penicillin/Streptomycin und Natriumpyruvat) in 24-Well-Platten mit Phytohämagglutinin (PHA, Endkonzentration 25 µg/mL Zellsuspension) zur Teilung angeregt und anschließend bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Nach 44 h wurden 4,5 µg Cytochalasin B/mL (Endkonzentration) zur Hemmung der Zytokinese zugegeben und die Zellen für weitere 28 h kultiviert. Die Zellen wurden geerntet und mittels Zytozentrifugation auf Objektträger aufgebracht, die luftgetrocknet wurden. Die Präparate wurden mit Pappenheim-Färbung (May-Grünwald – Giemsa) gefärbt und mit Entellan und Deckgläsern eingedeckelt. Die Auswertung erfolgte durch mikroskopische Auszählung von Mikronuklei und nukleoplasmatischen Brücken in 500 zweikernigen Lymphozyten bei 1000-facher Vergrößerung mittels Ölimmersionsobjektiv.

## Statistische Methoden

Die Ergebnisse wurden mit der statistischen Software SAS (SAS Institute, Cary, NC, USA) und SPSS (SPS Inc., Chicago, IL, USA) ausgewertet. Alle Variablen wurden auf Plausibilität, fehlende Werte und Resultate kleiner als die Nachweisgrenze überprüft. Ergebnisse kleiner Nachweisgrenze wurden zur statistischen Auswertung auf Werte halber Nachweisgrenze gesetzt. Die Verteilung der Variablen werden graphisch als 'Box-Plots' bzw. 'Whisker-Plots' präsentiert unter Angabe der Minima, Maxima, 25 und 75-Perzentile, Median und Mittelwerte in Abhängigkeit der Exposition und des exponierten Industriezweiges. Die Unterschiede zwischen den exponierten Arbeitern und denen der Kontrollgruppe wurden mittels Multivarianzanalyse untersucht. Zusätzlich zur Variable Exposition (+, -) wurden in die Modelle das Alter (<30, 30-<50, ≥50 Jahre), das Rauchverhalten (aktuell Raucher, aktuell Nichtraucher), das Vorliegen der deutsche Nationalität (+, -) und der Industriezweig (die Produktion feuerfester Materialien, Graphitelektroden, Kokerei und Konverterproduktion) einbezogen, um unterschiedliche Verteilungen dieser Variablen zwischen den exponierten Arbeitern und der Kontrollgruppe zu berücksichtigen. Die Ergebnisse werden präsentiert in Form der für mögliche Einflußfaktoren (Confounder) adjustierten Mittelwerte und mittels P-Werten.

## Ergebnisse und Diskussion

Im Vergleich zur Kontrollgruppe weisen PAK-exponierte Arbeiter sowohl eine signifikant erhöhte DNA-Strangbruchfrequenz sowie signifikant erhöhte 8-oxo-dG-Adduktraten auf. Ebenso konnten Unterschiede der Frequenz der DNA-Strangbrüche und die 8-oxo-dG-Rate zwischen Arbeitern, die in unterschiedlichen Gewerken beschäftigt waren, detektiert werden. So wurden die höchsten Raten an DNA-Strangbrüchen in Arbeitern der Graphitelektrodenproduktion gefunden, gefolgt von denjenigen in der Produktion feuerfester Materialien, den Kokereiarbeitern und den Beschäftigten in den Konverterbetrieben. Die niedrigsten DNA-Strangbruchraten lagen bei den nichtexponierten Personen (Kontrollen) vor. Ein ähnliches Bild ergab sich für die 8-oxo-dG-Adduktraten. Auch hier wurden mit Abstand die höchsten Adduktraten bei Personen aus der Graphitelektrodenproduktion gefunden. Lediglich die Arbeiter aus den Konverterbetrieben wiesen höhere Werte auf als die aus den Kokereien. Auch im Falle des 8-oxo-dG wurden die niedrigsten Adduktraten bei den nichtexponierten Personen gemessen.

Beide genotoxikologischen Parameter wiesen signifikante Zusammenhänge mit der äußeren Exposition in Form der Summe der Konzentrationen aller 16 gemessenen EPA-PAK, auf (**Tab. 2**,  $r_s = 0,20$ ;  $P = 0,002$ ,  $n = 228$  für 8-oxo-dG;  $r_s = 0,34$ ;  $P < 0,0001$ ,  $n = 226$  für DNA-Strangbrüche). Dies lässt zunächst den Schluss zu, dass diese Effekt auf die Exposition gegenüber PAK zurückzuführen sein könnten. Zusätzlich konnten signifikante Zusammenhänge

zwischen der Rate an DNA-Strangbrüchen und der Bildung von 8-oxo-dG-Addukten gefunden werden ( $r_S = 0,23$ ;  $P = 0,0002$ ,  $n = 271$ ). Die Bildung von 8-oxo-dG kann damit als eine wichtige Ursache für das Entstehen der DNA-Strangbrüche angesehen werden. Dies wiederum deutet darauf hin, dass PAK neben der Bildung spezifischer DNA-Addukte (z. B. denjenigen des B[a]P) ihre genotoxische Wirkung auch über Mechanismen des oxidativen Stresses entfalten können.

|                                       | 8-oxo-dG   | 1-OH-Pyren                        | $\Sigma$ OH-Ph                    | $\Sigma$ 16-EPA-PAK               | Pyren                             | Phenanthren                       |
|---------------------------------------|--|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| <b>Olive Tail Moment</b>              | 0.23 <sup>a</sup><br>$P = 0.0002^b$<br>$n = 271^c$ | 0.21<br>$P = 0.0007$<br>$n = 268$ | 0.24<br>$P < 0.0001$<br>$n = 268$ | 0.34<br>$P < 0.0001$<br>$n = 226$ | 0.28<br>$P < 0.0001$<br>$n = 226$ | 0.34<br>$P < 0.0001$<br>$n = 226$ |
| <b>8-oxo-dG</b>                       |  | 0.3<br>$P < 0.0001$<br>$n = 271$  | 0.23<br>$P < 0.0001$<br>$n = 271$ | 0.2<br>$P = 0.002$<br>$n = 228$   | 0.27<br>$P < 0.0001$<br>$n = 228$ | 0.24<br>$P = 0.0002$<br>$n = 228$ |
| <b>1-OH-Pyren</b>                     |  |                                   | 0.81<br>$P < 0.0001$<br>$n = 272$ | 0.71<br>$P < 0.0001$<br>$n = 227$ | 0.75<br>$P < 0.0001$<br>$n = 227$ | 0.73<br>$P < 0.0001$<br>$n = 227$ |
| <b><math>\Sigma</math> OH-Ph</b>      |  |                                   |                                   | 0.82<br>$P < 0.0001$<br>$n = 227$ | 0.71<br>$P < 0.0001$<br>$n = 227$ | 0.85<br>$P < 0.0001$<br>$n = 227$ |
| <b><math>\Sigma</math> 16 EPA-PAK</b> |  |                                   |                                   |                                   | 0.89<br>$P < 0.0001$<br>$n = 229$ | 0.95<br>$P < 0.0001$<br>$n = 229$ |
| <b>Pyren in der Luft</b>              |  |                                   |                                   |                                   |                                   | 0.85<br>$P < 0.0001$<br>$n = 229$ |

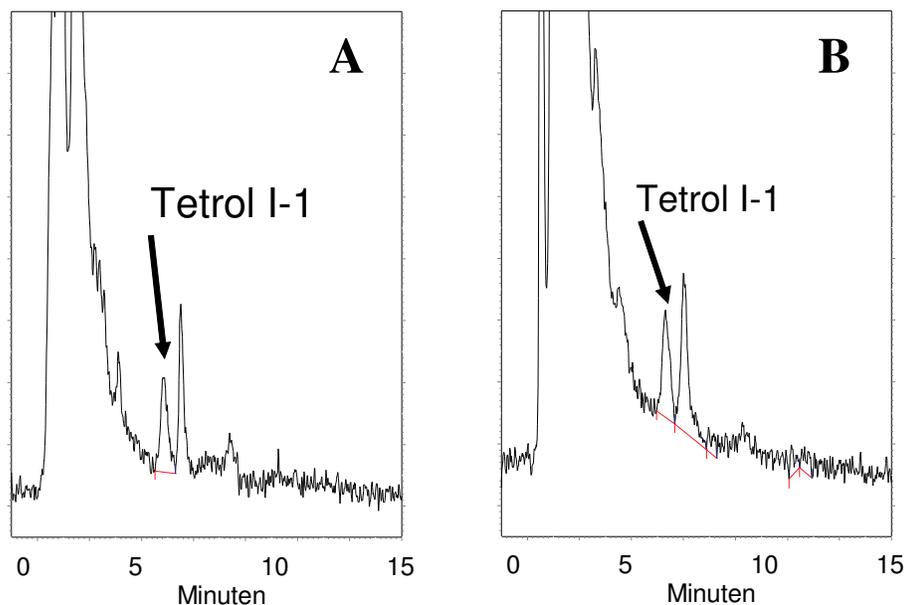
**Tab. 2.** Spearman-Rang-Korrelationen zwischen Biomarkern der Exposition, Effektmarkern, innerer Belastung und Luftbelastung des gesamten PAK-Kollektiv; <sup>a</sup> Spearman-Rangkorrelationskoeffizient; <sup>b</sup> P-Wert; <sup>c</sup> Anzahl der Proben

Bei der Auswertung der Ergebnisse des Biologischen Monitorings im Urin zeigten sich signifikant höhere Konzentrationen an 1-OH-P und der Summe der OH-Ph bei exponierten Arbeitern gegenüber der Kontrollgruppe (Tabelle 1). Sowohl die Ausscheidung des 1-OH-P als auch der fünf OH-Ph im Urin stieg mit zunehmenden Konzentrationen des Pyrens ( $r_S = 0,75$ ;  $P < 0,0001$ ;  $n = 227$ ) und des Phenanthrens ( $r_S = 0,85$ ;  $P < 0,0001$ ,  $n = 227$ ) in der Luft an. Alter und Nationalität hatten auf beide Parameter keinen Einfluss, während aktuelle Raucher gegenüber Nichtrauchern signifikant höhere Konzentrationen an 1-OH-P aufwiesen. Auch hier zeigten sich hinsichtlich der Urinparameter signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gewerken, wie sie bereits für die genotoxischen Parameter 8-OxodGuo und DNA-Strangbrüche beobachtet werden konnten. Als Reihenfolge ergibt sich: Graphitelektrodenbau > Konverterbetriebe > Feuerfestprodukte > Kokereiarbeiter > Kontrollen für 1-OH-P; Konverterbetriebe > Feuerfestprodukte > Graphitelektrodenbau > Kokereiarbeiter > Kontrollen für die Summe der OH-Ph. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass in verschiedenen Gewerken unterschiedliche PAK-Mischungsverhältnisse am Arbeitsplatz vorliegen und damit zu einer unterschiedlichen Gefährdung führen können.

Auch zwischen den Biomarkern der inneren Dosis im Urin (1-OH-P und OH-Ph) und den genotoxikologischen Parametern (8-oxo-dG und DNA-Strangbrüche) konnte ein Zusammenhang festgestellt werden. Die 8-oxo-dG-Adduktraten korrelierten signifikant mit 1-OH-P ( $r_S = 0,30$ ;  $P < 0,0001$ ,  $n = 271$ ) und der Summe der OH-Ph ( $r_S = 0,23$ ;  $P = 0,0001$ ,  $n = 271$ ) im Urin. Auch das Olive Tail Moment (Parameter für die DNA-Strangbruchfrequenz) korrelierte signifikant mit 1-OH-P ( $r_S = 0,21$ ;  $P = 0,0007$ ,  $n = 268$ ) und der Summe der OH-Ph ( $r_S = 0,24$ ;  $P < 0,0001$ ,  $n = 268$ ) im Urin.

Insgesamt weisen die Daten auf eine höhere Gefährdung der Arbeiter bei einer PAK-Exposition im Graphitelektrodenbau hin. Dies konnte vor kurzem auch durch Merlo *et al.* (2004) in Italien gezeigt werden. Die Autoren führten die höhere Krebsrate und Mortalität bei den Graphitelektrodenherstellern zusätzlich auf eine Quarzsand-Exposition zurück. Auch wir gehen davon aus, dass das in unserer Studie ermittelte höhere genotoxische Potential in weißen Blutzellen in Form des 8-oxo-dG und der DNA-Strangbrüche möglicherweise nicht ausschließlich durch eine PAK-Exposition verursacht wurde, sondern zusätzlich durch andere Faktoren wie Asbest, Quarz oder Metallexposition moduliert worden sein könnte, wie eine epidemiologische Studie von Merlo *et al.* (2004) zeigte.

In 69 Proben von exponierten Arbeitern wurde auch ein spezifisches DNA-Addukt des B[a]P, das sog. *anti*-BPDE, in weißen Blutzellen gemessen. Die Konzentrationen lagen zwischen <NWG (0,5 Addukte/10<sup>8</sup> Nukleotide) und 41,1 Addukten/10<sup>8</sup> Nukleotiden (**Abb. 1**). Die Resultate stehen in guter Übereinstimmung mit bisher veröffentlichten Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen (Brandt und Watson 2003), jedoch konnte hier kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Konzentration an B[a]P in der Luft und BPDE-DNA-Addukten gefunden werden. Auch bei der getrennten Betrachtung der einzelnen Gewerke konnte kein Zusammenhang zwischen äußerer Exposition und der effektiven Dosis festgestellt werden. In der Feuerfestherstellung lag der Median der B[a]P-Konzentration in der Luft bei 0,11 µg/m<sup>3</sup> (<NWG – 1,25 µg/m<sup>3</sup>; n = 31) und der Median der *anti*-BPDE-Addukt-Rate bei 0,7 Addukten/10<sup>8</sup> Nukleotiden (<NWG – 3,2/10<sup>8</sup>; n = 33). Für Kokereiarbeiter (n = 28) betrug der Median an B[a]P in der Luft 0,85 µg/m<sup>3</sup> (0,09 – 21,4 µg/m<sup>3</sup>), war also deutlich höher als in der Feuerfestherstellung. Dennoch lag der Median der *anti*-BPDE-Addukte unterhalb der Nachweisgrenze von <0,5 Addukten/10<sup>8</sup> Nukleotiden (<0,5 – 41,1/10<sup>8</sup>). Für Konverterarbeiter lag der Median der B[a]P-Konzentration sogar bei 13,7 µg/m<sup>3</sup> (Bereich 2,09 – 27,0; n = 6). Auch hier war der Median der *anti*-BPDE-Addukte jedoch unterhalb der Nachweisgrenze von <0,5 Addukten/10<sup>8</sup> Nukleotiden (<0,5 – 1,4/10<sup>8</sup>; n = 8).



**Abb. 1.** **A)** Chromatogramm einer Kalbsthymus-DNA-Lösung mit Zusatz von Tetrol I-1-Standard; **B)** Chromatogramm eines PAK-exponierten Probanden (2,8 Addukte/10<sup>8</sup> Nukleotide).

Siebzehn Arbeiter Innerhalb eines gut definierten Kollektivs aus einer Fabrik zur Herstellung feuerfester Materialien wurden vor und drei Monate nach einer betriebsbedingten Umstellung der PAK-haltigen Produktionsmaterialien (Bindepech) hinsichtlich der Bildung von 8-oxo-dG, *anti*-BPDE und DNA-Strangbrüchen in Abhängigkeit von der äußeren Konzentration an PAK in der Luft untersucht. Die Umstellung führte zur Abnahme der B[a]P-Konzentration in der Luft (von 0,165 auf <0,07 µg/m<sup>3</sup>, **Tab. 3**). Keine wesentlichen Unterschiede wurden in den Konzentrationen von Pyren in der Luft drei Monate nach der Umstellung der Bindepechsorte festgestellt (1,11 µg/m<sup>3</sup> vs. 1,23 µg/m<sup>3</sup>). Jedoch konnte nach der Umstellung ein höherer Anteil von Phenanthren (13,39 µg/m<sup>3</sup> vs. 49,53 µg/m<sup>3</sup>, *P* = 0,0013) und Naphthalin (5,15 µg/m<sup>3</sup> vs. 9,65 µg/m<sup>3</sup>, *P* = 0,0346) in der Luft beobachtet werden. Entsprechend der Luftmessungen konnte keine Veränderung der Ausscheidung an 1-OHPyren im Urin nachgewiesen werden (6,73 µg/g vs. 6,67 µg/g Kreatinin), während höhere Konzentrationen für 1-, 2-, 3-, 4- und 9-OH-Ph (11,75 µg/g vs. 58,03 µg/g, *P* < 0,0001) sowie 1- und 2-Naphthol (13,90 µg/g vs. 33,25 µg/g, *P* = 0,0072) im Urin festgestellt wurden. Nach der Umstellung wurde ein signifikanter Anstieg der DNA-Schädigung mittels Comet-Assay (*P* = 0,0042) sowie ein nicht signifikanter Trend zu höheren 8-oxo-dG-Werten (*P* > 0,05) beobachtet (**Tab. 3**) Vor der betriebsbedingten Umstellung lagen die *anti*-BPDE-DNA-Adduktraten zwischen <0,5 und 1,9 Addukten/10<sup>8</sup> Nukleotide und nach der Umstellung zwischen <0,5 und 0,9 *anti*-BPDE-DNA-Addukten/10<sup>8</sup> Nukleotiden (*P* < 0,0001; *n* = 16).

|   | 8-OxidGuo/<br>10 <sup>5</sup> dGuo                           | <i>anti</i> -BPDE      | Benzo[ <i>a</i> ]pyren | Pyren                  | Phenanthren            | Naphthalin             | Summe von 16 PAK       | 1-Hydroxy-<br>pyren    | Summe von 5<br>Hydroxyphenanthrenen | 1-+2-Naphthol          |
|---|--|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------------------|------------------------|
| <b>Olive Tail Moment</b>                      | 0,037 <sup>a</sup><br>0,8335 <sup>b</sup><br>34 <sup>c</sup> | -0,478<br>0,0056<br>32 | -0,046<br>0,7982<br>33 | -0,014<br>0,9414<br>30 | 0,391<br>0,0245<br>33  | 0,401<br>0,0209<br>33  | 0,434<br>0,0115<br>33  | -0,199<br>0,2578<br>34 | 0,314<br>0,0701<br>34               | 0,087<br>0,6312<br>33  |
| <b>8-OxidGuo/10<sup>5</sup> dGuo</b>          |  | -0,158<br>0,3891<br>32 | -0,020<br>0,9113<br>33 | 0,189<br>0,3186<br>30  | 0,122<br>0,4976<br>33  | 0,311<br>0,0781<br>33  | 0,173<br>0,3371<br>33  | -0,063<br>0,7255<br>34 | 0,111<br>0,5322<br>34               | 0,105<br>0,5629<br>33  |
| <b><i>anti</i>-BPDE</b>                       |  |                        | 0,516<br>0,0029<br>31  | -0,011<br>0,9531<br>29 | -0,460<br>0,0092<br>31 | -0,240<br>0,1927<br>31 | -0,553<br>0,0013<br>31 | 0,149<br>0,4142<br>32  | -0,598<br>0,0003<br>32              | -0,306<br>0,0938<br>31 |
| <b>Benzo[<i>a</i>]pyren</b>                   |  |                        |                        | -0,041<br>0,8293<br>30 | -0,326<br>0,0642<br>33 | -0,089<br>0,718<br>30  | -0,423<br>0,581<br>30  | 0,099<br>0,296<br>30   | -0,469<br>0,369<br>30               | -0,403<br>0,014<br>29  |
| <b>Pyren</b>                                  |  |                        |                        |                        | <0,0001<br>0,762<br>33 | 0,0014<br>0,556<br>30  | 0,0008<br>0,938<br>33  | 0,1121<br>0,214<br>33  | 0,0445<br>0,679<br>33               | 0,9434<br>0,171<br>32  |
| <b>Phenanthren</b>                            |  |                        |                        |                        |                        | <0,0001<br>0,775<br>33 | <0,0001<br>0,359<br>33 | 0,2312<br>0,0396<br>33 | <0,0001<br>0,516<br>33              | 0,3493<br>0,183<br>32  |
| <b>Naphthalin</b>                             |  |                        |                        |                        |                        |                        | 0,775<br>-0,0001<br>33 | 0,359<br>0,0396<br>33  | 0,516<br>0,0021<br>33               | 0,183<br>0,3167<br>32  |
| <b>Summe von 16 PAK</b>                       |  |                        |                        |                        |                        |                        |                        | 0,141<br>0,4348<br>33  | 0,720<br><0,0001<br>33              | 0,265<br>0,1420<br>32  |
| <b>1-Hydroxypyren</b>                         |  |                        |                        |                        |                        |                        |                        |                        | 0,408<br>0,0166<br>34               | 0,362<br>0,0386<br>33  |
| <b>Summe von 5 Hydroxy-<br/>phenanthrenen</b> |  |                        |                        |                        |                        |                        |                        |                        |                                     | 0,253<br>0,1562<br>33  |

**Tab. 3.** Spearman Korrelationskoeffizienten (<sup>a</sup>) und *P*-Werte (<sup>b</sup>) zwischen Biomarker der Exposition, Effektmarker, innerer Belastung und Luftbelastung nach der Umstellung von Produktionsmaterialien; <sup>c</sup> Anzahl der untersuchten Proben

Die Ergebnisse geben Anlass zu der Hypothese, dass Expositionen gegenüber PAK-Gemischen mit höheren Anteilen von Naphthalin und/oder Phenanthren, aber trotz niedriger B[a]P-Anteile, DNA-Schädigungen verursachen und somit zur krebsinduzierenden Wirkung von PAK beitragen können. Während B[a]P das am häufigsten untersuchte kanzerogene PAK darstellt, haben die Forschungsaktivitäten zur Untersuchung von Naphthalin zugenommen, seitdem im US National Toxicology Programm (2000) ebenfalls das kanzerogene Potential dieser Substanz im Tierversuch nachgewiesen wurde. Die hier gewonnenen Ergebnisse

unterstützen darüber hinaus die Hypothese, dass oxidative DNA-Schäden eine wichtige Rolle in der PAK-induzierten Kanzerogenese spielen können. Die vor kurzem veröffentlichten Ergebnisse der *in-vitro* von Ohnishi und Kawanishi (2002) und von Yu *et al.* (2002) sowie die *in-vivo* von Leng *et al.* (Biomarkers 2004, 9: 395-406) Untersuchungen unterstützen dabei die von uns erhaltenen *in-vivo* Ergebnisse an PAK-exponierten Arbeitern, da auch deren Ergebnisse zeigten, dass nicht nur spezifische DNA-Addukte (wie *anti*-BPDE-Addukte) alleine sondern zusätzlich auch oxidative DNA-Schädigungen eine wichtige Rolle in der Kanzerogenese von PAK spielen können.

Insgesamt weisen die Ergebnisse auf niedrige Konzentrationen an B[a]P in der Luft an den unterschiedlichen Arbeitsplätzen hin. Die Exposition über die Luft trägt auf Basis unserer Ergebnisse nicht wesentlich zu einer Erhöhung der Bildung von *anti*-BPDE bei. Die von uns gemessenen Werte an *anti*-BPDE lassen daher den Schluss zu, dass das DNA-Addukt zusätzlich zur Luftbelastung am Arbeitsplatz entweder durch eine Aufnahme von B[a]P über die Haut oder durch außerberufliche Faktoren verursacht wird. Diese Ergebnisse müssen wegen der geringen Probandenzahl allerdings mit Vorbehalt betrachtet werden.

Neben der Bestimmung von DNA-Strangbrüchen, 8-oxo-dG und *anti*-BPDE wurden bei 20 Kokereiarbeitern auch zusätzlich Chromosomenbrüche und Chromosomenverluste mittels Mikrokerntest untersucht und mit denjenigen Ergebnissen verglichen, die sich bei der entsprechenden Messung bei 20 beruflich nicht exponierten Personen ergaben. In der Gruppe der PAK-exponierten Arbeiter wurden höhere Olive Tail Momente (OTM, Median 2,12; Spannweite 1,28 – 7,08) als in der Gruppe der nichtexponierten Arbeiter gefunden (Median 1,47; Spannweite 0,84 – 2,63). Die Unterschiede waren statistisch signifikant ( $P < 0,0001$ ). Bei den exponierten Arbeitern wurden zwischen 0 und 9 Mikrokern/1000 zweikernige Lymphozyten gefunden (Median 4,5). Eine schwache Korrelation zwischen Mikronuklei und OTM ( $r_s = 0,48$ ;  $P < 0,05$ ) wurde beobachtet. Der Median der hier ermittelten Mikrokernraten liegt zwischen den in der Literatur publizierten Werten für Kokerei-Arbeiter und Kontrollprobanden ohne spezifische Exposition (Leng *et al.* 2004; Siwinska *et al.* 2004). Da für gegenüber genotoxischen Agentien exponierte Arbeiter in bisherigen Studien keine Erhöhung der Mikrokernraten durch Rauchen gefunden wurde (Bonassi *et al.* 2003), kann davon ausgegangen werden, daß der höhere Anteil der Raucher unter den exponierten Arbeitern die Ergebnisse nicht beeinflusst. Die hier beobachtete Korrelation zwischen Mikrokernen und OTM sollte aufgrund der geringen Fallzahl vorsichtig interpretiert werden.

# Bitumen

## Einleitung – Stand des Wissens

Bei Bitumen handelt es sich um hochmolekulare, kolloid-disperse Gemische verschiedener organischer Substanzen, die bei der schonenden Aufbereitung geeigneter Erdöle gewonnen werden (DIN 55946 1983). Der weltweite Verbrauch an Bitumina beläuft sich schätzungsweise auf mehr als 60 Millionen Tonnen pro Jahr (IARC 1985). Bitumen und bitumenhaltige Produkte werden vielfältig eingesetzt, so z. B. als Straßenbaumaterial, Anstrichstoffe, Isoliermaterial, Dachpappen, Dämpfungsfolien, im Bautenschutz, etc. Dabei kommen z. T. sehr unterschiedliche Anwendungs- und Verarbeitungstechniken zum Einsatz. Je nach Sorte enthalten die unterschiedlichen Bitumina einen mehr oder weniger hohen Anteil an aromatischen Kohlenwasserstoffen (Knecht 1999). In diesem Zusammenhang sind vor allem die polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe (PAK) von Interesse, weil viele Vertreter dieser Schadstoffgruppe als krebserzeugend für den Menschen angesehen werden (siehe auch Abschnitt „Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe“ dieses Abschlußberichts).

## Fragestellung

Inwiefern ein solches Problem mit PAK auch an denjenigen Arbeitsplätzen besteht, an denen mit Bitumen umgegangen wird, ist spätestens seit 2001 erneut in den Mittelpunkt des Interesses geraten. Nachdem Bitumen erstmals 1977 von der Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe (DFG) als kanzerogenverdächtig eingestuft wurde, kam es in der MAK- und BAT-Werteliste 2001 zu einer Neubewertung. Danach wurde „Bitumen (Dampf und Aerosol)“ in die Gruppe von Arbeitsstoffen eingestuft, die im Tierversuch krebserzeugend sind (Kategorie III-2). Weiterhin wurden Bitumendämpfe und -aerosole als hautresorptive Gefahrstoffe („H“) gekennzeichnet, was der Tatsache Rechnung trägt, dass die darin enthaltenen kanzerogenen Komponenten zu einem beträchtlichen Anteil über die Haut resorbiert werden (Knecht *et al.* 2001). Bis Ende 2004 galt in Deutschland eine Technische Richtkonzentration (TRK) von 10 mg „Bitumen, Dämpfe und Aerosole bei der Heißverarbeitung“ pro m<sup>3</sup> Raumluft. Die Neubewertung in Kategorie 2 gibt Anlass zu intensiven Forschungsaktivitäten auf diesem Gebiet. Die International Agency for Research on Cancer

(IARC) hat ihre Bewertung seit 1987 bislang nicht verändert. Aber auch hier werden die Begriffe für Bitumina sehr genau differenziert: „Bitumens“ werden in der zuletzt veröffentlichten Evaluation als „not classifiable as to their carcinogenicity to humans (Group 3)“ bewertet, wohingegen „extracts of steam-refined and air-refined bitumens“ in Gruppe 2B („possibly carcinogenic to humans“) aufgeführt werden. Letzteres ist vergleichbar mit der Kategorie 2 der MAK- und BAT-Werteliste. Von Wichtigkeit hierbei ist, daß die IARC eine Neuevaluierung von Bitumen durchführt, die Ende 2007 abgeschlossen sein soll. Seitens der IARC ist dabei bereits an die Aufnahme der Ergebnisse aus Tox 1 und der entsprechenden weiterführenden Studie BIT-Tox gedacht und damit auch auf die Berücksichtigung des bisher im Rahmen von Tox 1 durchgeführten *Biological Monitoring*.

Aus der Arbeit im Betreuungsbereich des AMD der Tiefbau-BG und Bau-BG Frankfurt hat sich die Möglichkeit ergeben, Bitumen-exponierte Arbeiter auf eine Exposition gegenüber PAK zu untersuchen. Dies ergab für das BGFA die Möglichkeit – analog der Durchführung eines Biological Monitorings bei den PAK – auch ein Biological Monitoring für Bitumenexponierte Arbeiter innerhalb eines multizentrischen Projektes durchzuführen. Das Projekt wurde entsprechend dem PAK-Projekt (siehe dort) organisiert, so daß der Schwerpunkt am BGFA wiederum auf dem Nachweis möglicher Veränderungen bzw. Schädigungen der DNA im Zellkern der Bitumen-exponierten Personen mittels Methoden zur Bestimmung der effektiven Dosis und erster biologischer Effekte lag. Als Endpunkt der effektiven Dosis wurde 8-Oxo-2'-deoxyguanosin (8-oxo-dG) gemessen, während für die ersten biologischen Effekte DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüche sowie alkali-labile Stellen in weißen Blutzellen bestimmt wurden.

## Untersuchte Kollektive

Insgesamt wurden 66 Beschäftigte, die gegenüber Dämpfen und Aerosolen von Bitumen exponiert waren im Rahmen eines sog. Cross-Shift Designs untersucht, d. h. den Beschäftigten wurden Urin- und Blutproben sowohl vor als auch nach der Schicht angenommen. Die Ergebnisse wurden mit denjenigen von 49 nichtexponierten Personen verglichen (**Tab. 4**).

|  | Kontrollgruppe<br><i>n</i> = 49 | Bitumen-Exponierte<br><i>n</i> = 66 |
|--|---------------------------------|-------------------------------------|
| Alter [Jahre; Median; Bereich]                 | 36 (19 - 61)                    | 40 (17 - 63)                        |
| Raucher aktuell                                | <i>n</i> (%) 20 (40,8)          | 44 (66,7)                           |
| Nationalität Deutsch                           | <i>n</i> (%) 44 (89,8)          | 38 (57,6)                           |
| Dauer der Exposition [Monate, Median, Bereich] | 0                               | 84 (0,5 - 456)                      |
| Medikation                                     | <i>n</i> (%) 10 (20,4)          | 16 (24,2)                           |

**Tab. 4.** Charakteristika der untersuchten Bitumen-exponierten Probanden

## Methoden

Die Untersuchungen wurden mit den identischen Methoden durchgeführt, wie Sie im Kapitel zu „Polyzyklischen Aromatischen Kohlenwasserstoffen“ beschrieben sind.

## Ergebnisse und Diskussion

Die exponierten Arbeiter wurden auf Basis der ermittelten personenbezogenen Luftmessungen während der Schicht in zwei Gruppen eingeteilt ( $<10 \text{ mg/m}^3$ ,  $\geq 10 \text{ mg/m}^3$ ). Ein gemischt lineares Modell unter Berücksichtigung der Exposition, des Untersuchungszeitpunktes (Vor- bzw. Nachschicht), des Raucherstatus, der ethnischen Herkunft und des Alters als feste Parameter und des einzelnen Arbeiters als Zufallsfaktor wurde für die Auswertung angewandt. Die Ergebnisse sämtlicher Parameter können der **Tab. 5** entnommen werden.

Die durchschnittliche Konzentration (Median) der Dämpfe und Aerosole von Bitumen betrug während der Schicht  $5,3 \text{ mg/m}^3$  ( $0,2 - 80,2 \text{ mg/m}^3$ ). Die Konzentrationen von 1-OH-P und der Summe der OH-Ph im Urin dieser Arbeiter war nach der Schicht signifikant höher als vor der Schicht ( $P < 0,0001$ ), während in der Kontroll-Gruppe im Urin keine Veränderungen während der Schicht beobachtet werden konnten. Vor der Schicht konnten hinsichtlich der Biomarker im Urin keine Unterschiede zwischen den exponierten und den nichtexponierten Arbeitern festgestellt werden. Raucher wiesen generell höhere Konzentrationen an 1-OH-P ( $P < 0,0001$ ) und OH-Ph ( $P = 0,002$ ) im Urin auf als Nichtraucher. Ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen 1-OH-P und OH-Ph konnte nachgewiesen werden, d. h. je höher die Konzentration an 1-OH-P im Urin auf individueller Basis war, desto höher war auch die Konzentration an OH-Ph ( $r_s = 0,78$ ;  $P < 0,0001$ ). Die Ergebnisse zeigen, daß Bitumen-exponierte Arbeiter gegenüber PAK exponiert sind, die Halbwertszeit der Urinmetabolite jedoch kurz ist, so dass zu Beginn der Schicht vergleichbare Ausgangswerte bei den exponierten und bei den nicht exponierten Personen sowohl für 1-OH-P als auch für die Summe der OH-Ph vorliegen.

| Parameter                   | Gruppe    | Vor-Schicht             |        |          | Nach-Schicht            |        |          | Während der Schicht |          |
|-----------------------------|-----------|-------------------------|--------|----------|-------------------------|--------|----------|---------------------|----------|
|                             |           | Mittelwert <sup>b</sup> | Effekt | P        | Mittelwert <sup>b</sup> | Effekt | P        | Effekt              | P        |
| 1-OH-P [ng/L]               | Referenz  | 178                     | 1.00   | -        | 216                     | 1.00   | -        | 1.21                | 0.2      |
|                             | Exponiert | 202                     | 1.13   | 0.62     | 444                     | 2.05   | 0.005    | 2.19                | < 0.0001 |
|                             | Niedrig   | 155                     | 0.87   | 0.62     | 296                     | 1.37   | 0.26     | 1.90                | 0.0002   |
|                             | Hoch      | 263                     | 1.48   | 0.21     | 666                     | 3.08   | 0.0004   | 2.53                | < 0.0001 |
| 1-OH-P [ng/g Krea]          | Referenz  | 148                     | 1.00   | -        | 179                     | 1.00   | -        | 1.21                | 0.11     |
|                             | Exponiert | 165                     | 1.12   | 0.59     | 296                     | 1.66   | 0.02     | 1.79                | < 0.0001 |
|                             | Niedrig   | 145                     | 0.98   | 0.94     | 218                     | 1.22   | 0.38     | 1.51                | 0.003    |
|                             | Hoch      | 189                     | 1.28   | 0.34     | 402                     | 2.25   | 0.002    | 2.13                | < 0.0001 |
| $\Sigma$ OH-Ph [ng/L]       | Referenz  | 1015                    | 1.00   | -        | 1150                    | 1.00   | -        | 1.13                | 0.33     |
|                             | Exponiert | 997                     | 0.98   | 0.91     | 2372                    | 2.06   | < 0.0001 | 2.38                | < 0.0001 |
|                             | Niedrig   | 933                     | 0.92   | 0.65     | 1645                    | 1.43   | 0.05     | 1.76                | 0.0002   |
|                             | Hoch      | 1064                    | 1.05   | 0.82     | 3421                    | 2.98   | < 0.0001 | 3.22                | < 0.0001 |
| $\Sigma$ OH-Ph [ng/g Krea]  | Referenz  | 894                     | 1.00   | -        | 945                     | 1.00   | -        | 1.06                | 0.47     |
|                             | Exponiert | 850                     | 0.95   | 0.67     | 1556                    | 1.65   | < 0.0001 | 1.83                | < 0.0001 |
|                             | Niedrig   | 876                     | 0.98   | 0.88     | 1190                    | 1.26   | 0.08     | 1.36                | 0.0007   |
|                             | Hoch      | 825                     | 0.92   | 0.58     | 2034                    | 2.15   | < 0.0001 | 2.47                | < 0.0001 |
| 8-oxo-dG/10 <sup>6</sup> dG | Referenz  | 2.99                    | 1.00   | -        | 3.5                     | 1.00   | -        | 1.17                | 0.001    |
|                             | Exponiert | 3.47                    | 1.16   | 0.01     | 3.85                    | 1.10   | 0.11     | 1.11                | 0.01     |
|                             | Niedrig   | 3.85                    | 1.29   | 0.0002   | 4.09                    | 1.17   | 0.02     | 1.06                | 0.24     |
|                             | Hoch      | 3.14                    | 1.05   | 0.51     | 3.61                    | 1.03   | 0.66     | 1.15                | 0.03     |
| OTM <sup>a</sup>            | Referenz  | 1.21                    | 1.00   | -        | 1.5                     | 1.00   | -        | 0.87                | 0.13     |
|                             | Exponiert | 1.83                    | 1.52   | < 0.0001 | 1.66                    | 1.59   | < 0.0001 | 0.91                | 0.23     |
|                             | Niedrig   | 1.72                    | 1.42   | 0.001    | 1.71                    | 1.63   | < 0.0001 | 1.00                | 0.98     |
|                             | Hoch      | 1.96                    | 1.62   | < 0.0001 | 1.61                    | 1.54   | 0.0002   | 0.82                | 0.12     |

**Tab. 5.** Adjustierte Mittelwerte und Effektfaktoren des gemischten Modells mit Individuen als Zufallsfaktor und Schicht-Exponierten sowie Interaktion zwischen beiden als feste Faktoren

Die gegenüber Bitumen exponierten Personen wiesen im Vergleich zur Kontrollgruppe sowohl vor als auch nach der Schicht höhere Konzentrationen an 8-oxo-dG auf, wobei die

Unterschiede vor Schicht signifikant ( $P = 0,01$ ) aber nach der Schicht statistisch nicht signifikant waren ( $P = 0,11$ ). Der Anstieg an 8-oxo-dG während der Schicht war sowohl für die exponierten Personen ( $P = 0,01$ ) als auch für die Kontrollpersonen ( $P = 0,001$ ) signifikant, zeigte jedoch weder einen Zusammenhang mit der äußeren Exposition (Dämpfe und Aerosole von Bitumen in der Luft) noch mit der inneren Exposition (PAK-Metabolite im Urin). Raucherstatus, Alter und Nationalität hatten keinen Einfluß auf die Höhe der 8-oxo-dG-Konzentrationen in den weißen Blutzellen. Die im Comet-Assay bestimmten DNA-Strangbruchraten lagen bei den exponierten Arbeitern sowohl vor als auch nach der Schicht signifikant höher als in der Kontrollgruppe ( $P < 0.0001$ ). Nach der Arbeitsschicht war die DNA-Strangbruchfrequenz, gemessen als Olive Tail Moment in beiden Gruppen leicht erniedrigt. Die Unterschiede waren jedoch nicht statistisch signifikant (bei den exponierten Arbeitern:  $P = 0,23$ ; bei den Kontrollen:  $P = 0,13$ ). Ebenso wie bei 8-oxo-dG hatten der Raucherstatus, das Alter und die Nationalität keinen Einfluß auf die DNA-Strangbruchfrequenz. Es konnte keine Assoziation zwischen den Variablen 8-oxo-dG und den DNA-Strangbruchfrequenzen sowohl vor ( $r_s = -0,02$ ;  $P = 0,80$ ) als auch nach der Schicht ( $r_s = 0,13$ ;  $P = 0,18$ ) festgestellt werden.

Arbeiter, die mit Bitumen umgehen, können gegenüber B[a]P exponiert sein. Da nur wenige Studien zu B[a]P-DNA-Addukten bei Bitumen-exponierten Arbeitern vorliegen, wurden in einem Teilkollektiv ( $n = 37$ ) die DNA-Adduktraten (*anti*-BPDE) vor und nach der Schicht bestimmt und mit der äußeren Belastung (Dämpfe und Aerosole von Bitumen in der Luft) sowie der inneren Belastung (1-OH-P im Urin) verglichen. Der Median der äußeren Exposition betrug  $3,8 \text{ mg/m}^3$  ( $0,2 - 25,8 \text{ mg/m}^3$ ). Der Median der 1-OH-P-Konzentration betrug  $192,7 \text{ ng/l}$  ( $<16,0 - 2499,8 \text{ ng/l}$ ) vor und  $473,9 \text{ ng/l}$  ( $<16,0 - 9443,6 \text{ ng/l}$ ) nach der Schicht ( $P = 0,06$ ). Die DNA-Adduktraten an *anti*-BPDE lagen auf niedrigem Niveau und es wurden keine Unterschiede zwischen den Untersuchungszeitpunkten vor ( $<0,5 - 2,3 \text{ Addukte}/10^8 \text{ Nukleotide}$ ) und nach Schicht ( $<0,5 - 5,0 \text{ Addukte}/10^8 \text{ Nukleotide}$ ) gefunden. Die *anti*-BPDE-DNA-Adduktraten weisen auf keine bzw. eine mit diesen Methoden nicht nachweisbare, sehr niedrige B[a]P-Exposition über die Dämpfe und Aerosole von Bitumen hin. Die im untersuchten Kollektiv gemessenen spezifischen B[a]P-Adduktraten stehen in Übereinstimmung mit den in der Literatur beschriebenen Werten bei Bitumen-exponierten Arbeitern (Fuchs *et al.* 1996) und sind auch ähnlich denjenigen, die nach PAK-Exposition gefunden werden. Letzteres weist wiederum – ähnlich wie bei den PAK – darauf hin, dass die geringen Konzentrationen an *anti*-BPDE-DNA-Addukten nur mit einer geringen beruflichen Exposition gegenüber B[a]P in Zusammenhang stehen.

Zusammengefaßt weisen Bitumen-exponierte Arbeiter sowohl vor der Schicht als auch nach der Schicht höhere Werte an 8-oxo-dG und DNA-Strangbrüchen als nichtexponierte Arbeiter auf. Diese, zumindest für den Untersuchungszeitpunkt vor der Schicht überraschenden Ergebnisse, wurden im Falle der DNA-Strangbrüche bereits in einer früheren Studie von Fuchs *et al.* (1996) gezeigt. Im Vergleich zu einer direkten Exposition gegenüber PAK (z. B. in Kokereien, etc.) sind die Konzentrationen an 1-OH-P und der Summe an OH-Ph im Urin bei Bitumen-exponierten Personen wesentlich niedriger. Dies läßt den Schluß zu, dass eine Exposition gegenüber PAK bei Arbeiten mit Bitumen nur von untergeordneter Bedeutung ist. Diese Schlussfolgerung wird dadurch plausibel, dass der in der heutigen Zeit angewendete Bitumen im Vergleich zu früheren Zeiten keinerlei Teer mehr enthält und damit eine wesentliche Quelle von PAK in Bitumen, von der angenommen werden kann, daß sie früher ein Risikopotential für exponierte Arbeiter darstellte, eliminiert werden konnte. Damit entfällt bei Bitumen-exponierten Arbeitern auch derjenige Beitrag der PAK zur Bildung von 8-oxo-dG, der bei rein PAK-exponierten Arbeitern zu einem klaren Anstieg an oxidativem Stress und – in dessen Folge – zu einem Anstieg an DNA-Strangbrüchen geführt hat. Dies wird darin deutlich, daß – im Gegensatz zu PAK-exponierten Arbeitern – bei bitumenexponierten Arbeitern kein

Zusammenhang mehr zwischen der 8-oxo-dG Konzentration und den DNA-Strangbrüchen gefunden werden konnte. Dennoch bleibt die Frage bestehen, welche Gründe es für die höheren DNA-Strangbruchraten in Bitumen-exponierten Personen gibt, die in dieser Pilotstudie klar nachgewiesen werden konnten. Da eine Exposition gegenüber PAK bei Bitumen-exponierten Arbeitern von untergeordneter Bedeutung zu sein scheint und kein Zusammenhang zwischen 8-oxo-dG und DNA-Strangbrüchen besteht, sollten im Falle von Bitumen die erhöhten Mengen an DNA-Strangbrüchen weder durch oxidativen Stress noch durch PAK verursacht werden. Da Bitumen aus vielen verschiedenen Substanzen besteht, rücken damit in zukünftigen Studien vor allem andere Gefahrstoffe in Bitumen in den Mittelpunkt des Interesses, die u. U. ihre DNA-schädigende Wirkung über DNA-Addukte entfalten.

## Publikationen im Rahmen von Tox 1

1. Baur X, Wieners D, Marczyński B: Late asthmatic reaction caused by naphthylene-1,5 diisocyanate. *Scand J Work Environ Health* 2000; 26: 78-80
2. Marczyński B, Scherenberg M, Hölzer J, Schlösser S, Hoffmann G, Wilhelm M: Untersuchungen genotoxischer Effekte in weißen Blutzellen bei PAK-exponierten Arbeitern. *Verh. Dt. Ges. Arbeitsmed. Umweltmed.*, Rindt-Druck Fulda, 2000; 486-490
3. Allmers H, Chen Z, Barbinova L, Marczyński B, Kirschmann V, Baur X: Challenge from methacholine, natural rubber latex, or 4,4'-diphenylmethane diisocyanate in workers with suspected sensitization affects exhaled nitric oxide (change in exhaled NO levels after allergen challenges) *Int Arch Occup Environ Health* 2000; 73 181-186
4. Baur X, Marczyński B: Erkrankungen durch 1,5-Naphthylendiisocyanat (NDI) unter besonderer Beachtung eines neuen arbeitsplatzbezogenen Expositionstests. *Allergologie* 2000; 23: 471-474
5. Merget R, Marczyński B, Raulf-Heimsoth M, Chen Z, Baur X: Berufsbedingte exogen-allergische Alveolitis mit ulzeröser Bronchitis und Makrohämoptoe durch Naphthylen-1,5-Diisocyanat. *Verh. Dt. Ges. Arbeitsmed. Umweltmed.*, Rindt-Druck Fulda, 2000; 447-449
6. Barbinova L, Baur X, Degens P, Huber H, Marczyński B, Czuppon AB: Exposition gegenüber verschiedenen Isozyanaten und Asthmaentwicklung. *Atemw-Lungenkrkh* 2000; 26: 364-366
7. Marczyński B, Hölzer J, Wilhelm M: Untersuchungen zum 8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosin – ein Biomarker für eine oxidative DNA-Schädigung in vivo? In: *Biological Monitoring Heutige und künftige Möglichkeiten in der Arbeits- und Umweltmedizin*, Deutsche Forschungsgemeinschaft, WILEY-VCH, DFG 2001; 70-79
8. Baur X, Chen Z, Marczyński B: Respiratory diseases caused by occupational exposure to 1,5-Naphthalene-diisocyanate (NDI): Results of workplace-related challenge tests and antibody analyses. *Am J Ind Med* 2001; 39: 369-372.
9. Bolognesi C, Baur X, Marczyński B, Norppa H, Sepai O, Sabbioni G, Carcinogenic risk of toluene diisocyanate and 4,4'-methylenediphenyl diisocyanate: epidemiological and experimental evidence. *Crit Rev Toxicol* 2001; 31: 737-772.
10. Marczyński B, Wilhelm M: Zur Validität von 8-Oxo-2'-deoxyguanosin-Addukten in weißen Blutzellen im Rahmen des Human Biomonitorings. *Umweltmed Forsch Prax* 2001; 6: 251-256.
11. Marczyński B, Hölzer J, Rossbach B, Scherenberg M, Angerer J, Hoffmann G, Wilhelm M: Oxidative DNA Schädigung in weißen Blutzellen bei PAK-exponierten Arbeitern. *Verh. Dt. Ges. Arbeitsmed. Umweltmed.*, Rindt-Druck Fulda, 2001; 41: 163-165.

12. Merget R, Marczyński B, Raulf-Heimsoth M, Chen Z, Willroth PO, Remberger K, Baur X: Berufsbedingte exogen-allergische Alveolitis mit Makrohämoptoe durch Naphthylen-1,5-Diisocyanat. *Allergologie* 2001; 24: 164.
13. Merget R, Marczyński B, Chen Z, Remberger K, Raulf-Heimsoth M, Willroth PO, Baur X: Berufsbedingte exogen-allergische Alveolitis mit Makrohämoptoe durch Naphthylen-1,5-Diisocyanat. *Atemw.-Lungenkrkh* 2001; 27: 349-350.
14. Baur X, Marczyński B, Barbinova L, Degens P: Arbeitsplatzbezogene Expositionsteste mit dem Diisocyanat MDI. *Atemw.-Lungenkrkh* 2001, 27: 346-348.
15. Marczyński B, Rihs H-P, Rossbach B, Hölzer J, Angerer J, Scherenberg M, Hoffmann G, Brüning T, Wilhelm M: Analysis of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine and DNA strand breaks in white blood cells of occupationally exposed workers: comparison with ambient monitoring, urinary metabolites and enzyme polymorphisms. *Carcinogenesis* 2002; 23: 273-281
16. Merget R, Marczyński B, Chen Z, Remberger K, Raulf-Heimsoth M, Willroth PO, Baur X: Haemorrhagic hypersensitivity pneumonitis due to naphthylene-1,5-diisocyanate. *Eur Respir J* 2002; 19: 377-380
17. Marczyński B, Rihs H-P, Rossbach B, Hölzer J, Scherenberg M, Angerer J, Hoffmann G, Bräu-Dümler Ch, Etzler K, Kahl K, Brüning T, Wilhelm M: Vergleich zwischen Effektmarkern in weißen Blutzellen, Ergebnissen des Ambient Monitoring, Biomonitoring und Enzym polymorphismen bei PAK-exponierten Arbeitern. Dokumentationsband 42. Jahrestagung Dt Ges Arbeitsmed u. Umweltmed e. V. Rindt-Druck Fulda 2002; 488-491
18. Marczyński B, Hölzer J, Wilhelm M: Studies of 8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosine: A Biomarker for Oxidative DNA Damage *in vivo*? In: Biological Monitoring, Prospects in Occupational and Environmental Medicine, Deutsche Forschungsgemeinschaft, WILEY-VCH, Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany 2002
19. Marczyński B, Merget R, Teschner B, Korn M, Rabstein S, Brüning T: Changes in low molecular weight DNA fragmentation in white blood cells after diisocyanate exposure of workers. *Arch Toxicol* 2003; 77: 470-476
20. Mensing T, Marczyński B, Chilian B, Bracht A, Brüning T, Wilhelm M: Etablierung einer Methode zur Messung der DNA-Addukte von Benzo[a]pyren im Blut. *Atemwegs- und Lungenkrankheiten* 2003; 8: 380-382
21. Hölzer J, Marczyński B, Eberwein G, Rossbach B, Gladtko D, Kraft M, Sibai M, Angerer J, Ranft U, Wilhelm M: DNA-Strangbrüche in Lymphozyten bei Müttern und Kindern aus einem Wohngebiet in Kokerei-Nähe – ein Vergleich der Ergebnisse des Comet Assays mit Daten aus Ambient Monitoring, Biomonitoring und anamnestischer Erhebungen. Dokumentationsband über die 43. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Arbeitsmedizin und Umweltmedizin e. V., Rindt-Druck, Fulda 2003; 436-441
22. Raul-Heimsoth M, Schott K, Schicker H-J, Rihs H-P, Marczyński B, Zoubek G, Angerer J, Pesch B, Pierl C, Rumler R, Rühl R, Merget R, Brüning T: Chemisch-irritative und genotoxische Wirkung von Dämpfen und Aerosolen aus Bitumen bei der Heiverarbeitung: Erste Ergebnisse einer „Cross-shift“ Untersuchung von Gussasphaltarbeitern. Dokumentationsband über die 43. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Arbeitsmedizin und Umweltmedizin e. V., Rindt-Druck, Fulda 2003; 262-265
23. T, Brüning, Käfferlein HU, Marczyński B, Korn M: Die besondere Bedeutung des Biological Monitorings in der arbeitsmedizinischen Vorsorge. Dokumentationsband über die 43. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Arbeitsmedizin und Umweltmedizin e. V., Rindt-Druck, Fulda 2003; 738-742
24. Marczyński B, Merget R, Teschner B, Korn M, Rabstein S, Brüning Th: Changes in white blood cell DNA fragmentation after chamber exposure of workers to diisocyanates. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 2003; 367: R158
25. Mensing T, Marczyński B, Wilhm M, Preuss R, Müller J, Broding C, Merz T, Angerer J, Müller F, Brüning Th: Determination of DNA-adducts of benzo[a]pyrene (B[a]P) in white

- blood cell DNA of occupationally exposed workers to different concentrations of B[a]P. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology 2003; 367: R 164
26. Raulf-Heimsoth M, Schott K, Schicker H-J, Rihs H-P, Marczynski B, Zoubek G, Angerer J, Pesch B, Pierl C, Rumler R, Rühl R, Merget R, Brüning Th: Chemisch-irritative und genotoxische Wirkung von Dämpfen und Aerosolen aus Bitumen bei der Heiverarbeitung: Erste Ergebnisse einer cross-shift Untersuchung von Gussasphaltarbeitern. *Arbeitsmed Sozialmed Umweltmed* 2003; 38: 133-134
  27. Marczynski B, Mensing T, Preuss R, Wilhelm M, Müller J, Broding C, Merz T, Angerer J, Müller F, Brüning Th: DNA-adducts of benzo[a]pyrene (B[a]P) in white blood cell DNA of workers occupationally exposed to different B[a]P concentrations. *Toxicol Lett* 2003; 144: 158
  28. Marczynski B, Merget R, Chilian B, Korn M, Rabstein S, Brüning Th: Changes in low molecular DNA fragmentation of white blood cells after chamber exposure of workers to aromatic and aliphatic diisocyanates. *Toxicol Lett* 2003; 144: S159
  29. Käfferlein HU, Marczynski B, Brüning T: Biologisches Monitoring von Kanzerogenen. *Arbeitsmed Sozialmed Umweltmed* 2004; 7: 376-388
  30. Marczynski B, Preuss R, Mensing T, Angerer J, Seidel A, El Mourabit A, Wilhelm M, Brüning T: Genotoxische Risikoabschätzung in wessen Blutzelle von PAK-exponierten Arbeitern nach der Umstellung von Produktionsmaterialien: Vergleich mit Urinmetaboliten und Luftmessungen. Dokumentationsband über die 44. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Arbeitsmedizin und Umweltmedizin e. V. gemeinsam mit der Österreichischen Gesellschaft für Arbeitsmedizin, Athesia-Tyrolia Druck GmbH, Innsbruck 2004; 599-601
  31. Mensing T, Marczynski B, Preuss R, Wilhelm M, Angerer J, Brüning T: Bestimmung der DNA-Addukte des Benzo[a]pyrens in weissen Blutzelle von PAK-exponierten Arbeitern. Dokumentationsband über die 44. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Arbeitsmedizin und Umweltmedizin e. V. gemeinsam mit der Österreichischen Gesellschaft für Arbeitsmedizin, Athesia-Tyrolia Druck GmbH, Innsbruck 2004; 547-548
  32. Marczynski B, Preuss R, Mensing T, Angerer J, Seidel A, El Mourabit A, Wilhelm M, Brüning T: Genotoxic risk assessment in white blood cells of occupationally exposed workers before and after altering the PAH profile in the production material: comparison with PAH air and urinary metabolite levels. *Int Arch Occup Environ Health* 2005 (im Druck)
  33. Mensing T, Marczynski B, Engelhardt B, Wilhelm M, Preuss R, Kappler M, Angerer J, Käfferlein HU, Scherenberg M, Seidel A, Brüning T: DNA adduct formation of benzo[a]pyrene in white blood cells of workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Int J Hygiene Environ Health* 2005 (im Druck)
  34. Marczynski B, Merget R, Mensing T, Rabstein S, Kappler M, Bracht A, Haufs MG, Käfferlein HU, Brüning T: DNA strand breaks in lymphocytes of workers exposed to diisocyanates: indications of individual differences in susceptibility after low-dose and short-term exposure. *Arch Toxicol* 2005 (im Druck)

## Literatur

Boffetta P, Jourenkova N, Gustavsson P (1997) Cancer risk from occupational and environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Cancer Causes Control* 8: 444-472.

Bolt HM, Foth H, Hengstler JG, Degen GH (2004) Carcinogenicity categorization of chemicals – New aspects to be considered in a European perspective. *Toxicol. Lett.* 151: 29-41.

Bonassi S, Neri M, Lando C, Ceppi M, Lin YP, Chang WP, Holland N, Kirsch-Volders M, Zeiger E, Fenech M; HUMN collaborative group (2003) Effect of smoking habit on the frequency of micronuclei in human lymphocytes: results from the Human MicroNucleus project. *Mutat. Res.* 543: 155-166.

Brandt HC, Watson WP (2003) Monitoring human occupational and environmental exposures to polycyclic aromatic compounds. *Ann. Occup. Hyg.* 47: 349-378.

Dahlhaus M, Appel KE (1993) *N*-nitrosodimethylamine, *N*-nitrosodiethylamine, and *N*-nitrosomorpholine fail to generate 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in liver DNA of male F344 rats, *Mutat. Res.* 285: 295-302.

DIN-Norm 55946 (1983). Bitumen und Steinkohlenteerpech. Teil 1: Begriffe für Bitumen und Zubereitungen für Bitumen. Hrsg.: Deutsches Institut für Normung. Berlin: Beuth-Verlag 1983.

DFG (2001) Biological Monitoring. Heutige und künftige Möglichkeiten in der Arbeits- und Umweltmedizin, Wiley-VCH, Weinheim.

DFG (2004) MAK und BAT-Werte-Liste 2004, Wiley-VCH, Weinheim.

Fenech M (2000) The in vitro micronucleus technique. *Mutat. Res.* 455: 81-95.

Floyd RA, Watson JJ, Wong PK, Altmiller DH, Rickard RC (1986) Hydroxyl free radical adduct of deoxyguanosine: sensitive detection and mechanisms of formation, *Free Radic. Res. Commun.* 1: 163-172.

Fuchs J, Hengstler JG, Boettler G, Oesch F (1996) Primary DNA damage in peripheral mononuclear blood cells of workers exposed to bitumen-based products. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* 68: 141-146.

IARC (1983) Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Vol. 32, Polynuclear aromatic compounds (Part 1) Chemicals, environmental and experimental data, Lyon.

IARC (1985) Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Vol. 35, Polynuclear Aromatic Compounds (Part 4) Bitumens, Coal-tars and Derived Products, Shale-oils and Soots. Summary of Data Reported and Evaluation, Lyon.

Knecht U (1999) Handelsübliche Bitumensorten: PAH-Massegehalte und temperaturabhängiges Emissionsverhalten unter standardisierten Bedingungen. *Gefahrstoffe – Reinhaltung der Luft* 59: 429-434.

Knecht U, Walter D, Weitowitz HJ (2001) Human-experimentelle Untersuchungen zur dermalen Resorption von Bitumen-Emissionen. *Gefahrstoffe – Reinhaltung der Luft* 61: 503-506.

Leng S, Dai Y, Niu Y, Pan Z, Li X, Cheng J, He F, Zheng Y (2004) Effects of genetic polymorphisms of metabolic enzymes on cytokinesis-block micronucleus in peripheral blood lymphocyte among coke-oven workers. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 13: 1631-1639.

Marczynski B, Rozynek P, Elliehausen HJ, Korn M, Baur X (1997) Detection of 8-hydroxydeoxyguanosine, a marker of oxidative DNA damage, in white blood cells of workers occupationally exposed to styrene, *Arch. Toxicol.* 71: 496-500.

Mastrangelo G, Fadda E, Marzia V (1996) Polycyclic aromatic hydrocarbons and cancer in man. *Environ. Health Perspect.* 104: 1166-1170.

Merlo DF, Garattini S, Gelatti U, Simonati C, Covolo L, Ceppi M, Donato F (2004) A mortality cohort study among workers in a graphite electrode production plant in Italy. *Occup. Environ. Med.* 61: e9.

Naylor S, Gan LS, Day BW, Pastorelli R, Skipper PL, Tannenbaum SR (1990) Benzo[a]pyrene diol epoxide adduct formation in mouse and human hemoglobin: physicochemical basis for dosimetry. *Chem. Res. Toxicol.* 3: 111-117.

Nesnow S, Ross JA, Stoner GD, Mass MJ (1995) Mechanistic linkage between DNA adducts, mutations in oncogenes and tumorigenesis of carcinogenic environmental polycyclic aromatic hydrocarbons in strain A/J mice. *Toxicology* 105: 403-413.

Ohnishi S, Kawanishi S (2002) Double base lesions of DNA by a metabolite of carcinogenic benzo[a]pyrene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290: 778-782.

Pavanello S, Gabbani G, Mastrangelo G, Brugnone F, Maccacaro G, Clonfero E (1999) Influence of *GSTM1* genotypes on *anti*-BPDE-DNA adduct levels in mononuclear white blood cells of humans exposed to PAH, *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 72: 238-246.

Pouget JP, Ravanat JL, Douki T, Richard MJ, Cadet J (1999) Measurement of DNA base damage in cells exposed to low doses of  $\gamma$ -radiation: comparison between the HPLC-EC and comet assays. *Int. J. Radiat. Biol.* 75: 51-58.

Rojas M, Alexandrov K, Cascorbi I, Brockmüller J, Likhachev A, Pozharisski K, Bouvier G, Auburtin G, Mayer L, Kopp-Schneider A, Roots I, Bartsch H (1998) High benzo[a]pyrene diol-epoxide DNA adduct levels in lung and blood cells from individuals with combined CYP1A1 *MspI/Msp-GSTM1\*0\*0* genotypes, *Pharmacogenetics* 8: 109-118.

Siwinska E, Mielzynska D, Kapka L (2004) Association between urinary 1-hydroxypyrene and genotoxic effects in coke oven workers. *Occup. Environ. Med.* 61: e10.

Stansbury KH, Flesher JW, Gupta RC (1994) Mechanism of aralkyl-DNA adduct formation from benzo[a]pyrene in vivo. *Chem. Res. Toxicol.* 7: 254-259.

Tretyakova N, Matter B, Jones R, Shallop A (2002) Formation of benzo[a]pyrene diol epoxide-DNA adducts at specific guanines within *K-ras* and *p53* gene sequences: stable isotope-labeling mass spectrometry approach. *Biochemistry* 41: 9535-9544.

Yu D, Berlin JA, Penning TM, Field J (2002) Reactive oxygen species generated by PAH *o*-quinones cause change-in-function mutations in p53. *Chem. Res. Toxicol.* 15: 832-842.

Zito R (2001) Low doses and thresholds in genotoxicity: from theories to experiments. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 20: 315-325.