

Eine hohe Arbeitsplatzbelastung mit Inhalationsanästhetika ist mit einer vermehrten Bildung von Schwesterchromatidaustauschen assoziiert

- Eine Untersuchung zur Genotoxizität von Inhalationsanästhetika -

A high occupational exposure to inhaled anaesthetics is associated with an increased formation of sister chromatid exchanges - A study on the genotoxicity of inhaled anaesthetics

G. Wiesner¹, K. Schrögendorfer², K. Hörauf², P. Sobczynski³, M. Harth¹, K. Taeger¹ und H.-W. Rüdiger⁴

¹ Klinik für Anästhesiologie der Universität Regensburg (Direktor: Prof. Dr. K. Taeger)

² Universitätsklinik für Anästhesie und Allgemeine Intensivmedizin (B) der Universität Wien, Österreich (Direktor: Prof. Dr. H.-G. Kress)

³ Klinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie der Universität Posen, Polen (Direktor: Prof. Dr. R. Szulc)

⁴ Klinische Abteilung Arbeitsmedizin der Universitätsklinik für Innere Medizin IV der Universität Wien, Österreich (Abteilungsleiter: Prof. Dr. H.-W. Rüdiger)

Zusammenfassung: Der Schwesterchromatidaustausch-Assay ist ein Standardverfahren zum Nachweis einer Exposition gegenüber genotoxischen Substanzen. Kürzlich wurde eine Studie zum Schwesterchromatidaustausch bei OP-Personal veröffentlicht, das niedrigen Konzentrationen von Inhalationsanästhetika ausgesetzt war. Sie kam zu dem Ergebnis, daß die Rate an Schwesterchromatidaustauschen (SCE) um 1 SCE / Zelle höher war als in einer entsprechenden Kontrollgruppe. In der vorliegenden Studie kamen wir zu dem Ergebnis, daß der Anstieg für das hochexponierte Anästhesiepersonal einer osteuropäischen Universitätsklinik (mit Arbeitsplatzkonzentrationen von 170 ppm N₂O und 4 ppm Halothan und Isofluran) 2,8 SCE / Zelle betrug. Wir schließen daraus, daß zwischen der Höhe der Exposition und der Entstehung von Schwesterchromatidaustauschen eine Dosis-Wirkungs-Beziehung besteht.

Summary: The sister chromatid exchange-assay is a standard procedure to assess an exposure to genotoxic

agents. Recently, a study was published on sister chromatid exchanges in operating room personnel exposed to low concentrations of waste anaesthetic gases. It was demonstrated that the fraction of sister chromatid exchanges (SCE) was increased by 1 SCE / cell versus the matched control group. In the present study we demonstrate that the increase was 2.8 SCE / cell in anaesthetists and anaesthetic nurses of an East European university hospital (exposed to 170 ppm N₂O and 4 ppm halothane and isoflurane). We conclude that there is a dose-response relationship between exposure levels and the formation of sister chromatid exchanges.

Key-words:

Sister chromatid exchange;
Occupational exposure;
Personnel, hospital;
Anaesthetics.

Einleitung

Das von der Arbeitsplatzbelastung mit Inhalationsanästhetika ausgehende Gesundheitsrisiko wird seit vielen Jahren kontrovers diskutiert. Neuere epidemiologische Untersuchungen an OP-Personal und zahnärztlichem Personal kamen zu dem Ergebnis, daß die Rate reproduktionstoxischer Ereignisse wie Infertilität, Fehlgeburten und kongenitale Mißbildungen bei Exposition gegenüber N₂O (16, 17) bzw. N₂O und volatilen Anästhetika (7) erhöht war. Obwohl die positiven Ergebnisse in diesen Untersuchungen mit einer

häufigen Exposition, z.T. ohne Verwendung von Abzugssystemen, in Verbindung gebracht wurden, fehlen genaue Angaben über die tatsächliche Höhe der Exposition. Vom Gesetzgeber wurden trotz des Fehlens einer gesicherten wissenschaftlichen Basis Grenzwerte für die Höhe der Exposition erlassen. Diese liegen in Deutschland für eine durchschnittliche Exposition von acht Stunden pro Tag und 40 Stunden pro Woche bei 100 ppm N₂O, 5 ppm Halothan, 20 ppm Enfluran und 10 ppm Isofluran. Daneben sind Kurzzeitgrenzwerte und weitere gesetzliche Bestimmungen einzuhalten (3). In den USA werden vom National



Abbildung 1: Schwesterchromatidaustausch-Assay
Dargestellt sind die 46 Chromosomen eines humanen Lymphozyten der 2. Generation in der Metaphase. Durch Zugabe des Thymidinanalogs 5-Bromdesoxyuridin zur Lymphozytenkultur färben sich die beiden Schwesterchromatide in der 2. Generation unterschiedlich an. Der Pfeil rechts unten markiert beispielhaft einen dieser Schwesterchromatidaustausche, deren Gesamtzahl in den 46 Chromosomen bestimmt und als Zahl der Schwesterchromatidaustausche (SCE) / Zelle angegeben wird.

Institute of Occupational Safety and Health (NIOSH) für die Dauer der Exposition 25 ppm N_2O und 2 ppm für volatile Anästhetika gefordert, wobei sich der Grenzwert für die volatilen Anästhetika bei gleichzeitiger Verwendung von N_2O reduziert (15).

In engem Zusammenhang mit der Reproduktionstoxizität steht die Frage nach der Gentoxizität der Arbeitsplatzbelastung mit Inhalationsanästhetika. Ein etabliertes Verfahren zur Erfassung gentoxischer Effekte ist der Schwesterchromatidaustausch-Assay (Abb. 1). Bei einem Schwesterchromatidaustausch handelt es sich um den Austausch von genetischem Material zwischen genetisch identischen Schwesterchromatiden eines Chromosoms. Man nimmt an, daß den Schwesterchromatidaustauschen Fehler bei der DNA-Replikation zugrunde liegen (20). In einer kürzlich veröffentlichten Studie an einer deutschen Universitätsklinik kam unsere Arbeitsgruppe zu dem Ergebnis, daß die geringe Arbeitsplatzbelastung des OP-Personals mit 11,8 ppm N_2O und 0,5 ppm Isofluran zu einem Anstieg um 1 Schwesterchromatidaustausch (SCE) / Zelle gegenüber der Kontrollgruppe führte (9). Ziel der vorliegenden Untersuchung war es nun festzustellen, ob im Sinne einer Dosis-Wirkungs-Beziehung der Anstieg deutlicher ausfällt, wenn die Untersuchung an dem hoch-exponierten Anästhesiepersonal einer osteuropäischen Universitätsklinik durchgeführt wird.

Methodik

Ablauf der Studie

Nach Zustimmung durch die örtliche Ethikkommissi-

on und nach schriftlicher Einverständniserklärung wurden 50 Beschäftigte einer osteuropäischen Universitätsklinik untersucht: 25 gehörten dem Anästhesiepersonal an (Expositionsgruppe) und bei den anderen 25 handelte es sich um Ärzte und Schwestern, die nicht gegenüber Inhalationsanästhetika exponiert waren (Kontrollgruppe). Alle Studienteilnehmer erhielten einen Fragebogen, der im wesentlichen die Einflußfaktoren für den Schwesterchromatidaustausch, nämlich Alter, Geschlecht und Rauchgewohnheiten, umfaßte. Daneben wurden folgende Ausschlußkriterien überprüft: akute Erkrankung (z.B. grippaler Infekt), Einnahme potentiell gentoxischer Medikamente (z.B. Antibiotika), bekannte maligne Erkrankung, ggf. mit Chemo- oder Strahlentherapie und regelmäßiger beruflicher Umgang mit Röntgenstrahlen (z.B. als Radiologe) oder gentoxischen Substanzen (z.B. Zytostatika).

Höhe der Exposition

Die Exposition des Anästhesiepersonals lag im Schnitt bei 170 ppm N_2O und 4 ppm Halothan und Isofluran. Genauere Angaben zur Höhe der Exposition finden sich in der entsprechenden Publikation (21). Die Blutproben für den Schwesterchromatidaustausch-Assay wurden nach Abschluß der ersten Messung der Arbeitsplatzbelastung mit Inhalationsanästhetika gewonnen, zu einem Zeitpunkt also, zu dem die überwiegende Zahl der Operationssäle nicht mit Narkosegasabsaugungen und Klimaanlage ausgestattet war (21).

Schwesterchromatidaustausch-Assay

0,5 ml heparinisiertes Vollblut (NH_4 -Heparin Monovetten, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) wurden zu 5 ml Chromosomenmedium 1A (Gibco, Wien, Österreich), das 10 μ l/ml Phytohämagglutinin und 15 μ g/ml 5-Bromdesoxyuridin (Serva, Heidelberg, Deutschland) enthielt, gegeben und bei 37° C inkubiert. Nach 70 h Inkubationszeit wurde den Lymphozytenkulturen 0,1 μ g/ml Colcemid (Gibco, Wien, Österreich) zugegeben. Nach 72 h wurden die Lymphozytenkulturen geerntet, 25 min. mit hypotoner, 0,075 M KCl-Lösung behandelt, mit Methanol / Eisessig (3:1 v/v) fixiert und auf Objektträger aufgebracht. Anschließend erfolgte die Färbung mit Bisbenzimid (Riedel - de Haen, Seelze, Deutschland) und die Bestrahlung mit UV-Licht. Abschließend wurden die Präparate mit Giemsa (Merck, Darmstadt, Deutschland) gefärbt. Weitere Angaben zur Vorschrift für den Schwesterchromatidaustausch-Assay finden sich auf der Internetseite http://www.univie.ac.at/Innere-Med-4/Arbeitsmedizin/L_SCE.HTM.

Alle Präparate wurden codiert, so daß die Gruppenzugehörigkeit nicht erkennbar war, und vom gleichen Untersucher ausgewertet. Pro Präparat wurden 15 Metaphasen der 2. Generation auf die Zahl von Schwesterchromatidaustauschen (SCE) in mindestens 40 auswertbaren Chromosomen hin untersucht. Für die Datenanalyse wurde der Mittelwert aus den 15 Metaphasen gebildet und als Zahl der SCE / Zelle angegeben.

Klinische Anästhesie

Tabelle 1: Demographische Daten in der Expositions- und Kontrollgruppe (Das Alter ist als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben).

	Expositions- gruppe	Kontroll- gruppe
N	25	25
Alter (Jahre)	36 \pm 8	34 \pm 11
Geschlecht (männlich / weiblich)	4 / 21	1 / 24
Raucher (ja / nein)	10 / 15	11 / 14

Datenanalyse und Statistik

Die Verteilung der Merkmale Alter, Geschlecht und Rauchgewohnheiten zwischen der Expositions- und Kontrollgruppe wurde mittels t-Test für unabhängige Stichproben bzw. Chi-Quadrat-Test untersucht. Der Unterschied in der Zahl der SCE / Zelle zwischen der Expositions- und Kontrollgruppe wurde für das Gesamtkollektiv und für die beiden Untergruppen Raucher und Nichtraucher ermittelt. Da die Zahl der SCE / Zelle nicht in allen Untergruppen normalverteilt war, erfolgte die statistische Auswertung für die Zahl der SCE / Zelle mittels Mann-Whitney U-Test. Das Signifikanzniveau wurde mit $p < 0,01$ festgelegt. Für die Datenanalyse und Statistik wurde das SPSS für Windows, Version 10.0, Softwarepaket (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) verwendet.

Die posthoc berechnete Power für den Mann-Whitney U-Test lag bei 90% (GPOWER für MS-DOS, Franz Faul & Edgar Erdfelder, Bonn, Deutschland).

Ergebnisse

Die Verteilung von Alter, Geschlecht und Rauchgewohnheiten in der Expositions- und Kontrollgruppe ist in Tabelle 1 dargestellt. Zwischen den beiden Gruppen bestanden keine signifikanten Unterschiede. Dagegen war die Zahl der SCE / Zelle in der Expositionsgruppe signifikant höher. Der Unterschied betrug im Median 2,8 SCE / Zelle für das Gesamtkollektiv, 3,2 SCE / Zelle für die Raucher und 3,1 SCE / Zelle für die Nichtraucher (Abb. 2).

Diskussion

Die vorliegende Untersuchung zeigt, daß eine hohe Arbeitsplatzbelastung mit Inhalationsanästhetika mit einer vermehrten Bildung von Schwesterchromatidaustauschen einhergeht. Während niedrige Spurenkonzentrationen von Inhalationsanästhetika zu einem Anstieg um 1 SCE / Zelle führten (9) betrug dieser bei hohen Konzentrationen 3 SCE / Zelle (Abb. 2).

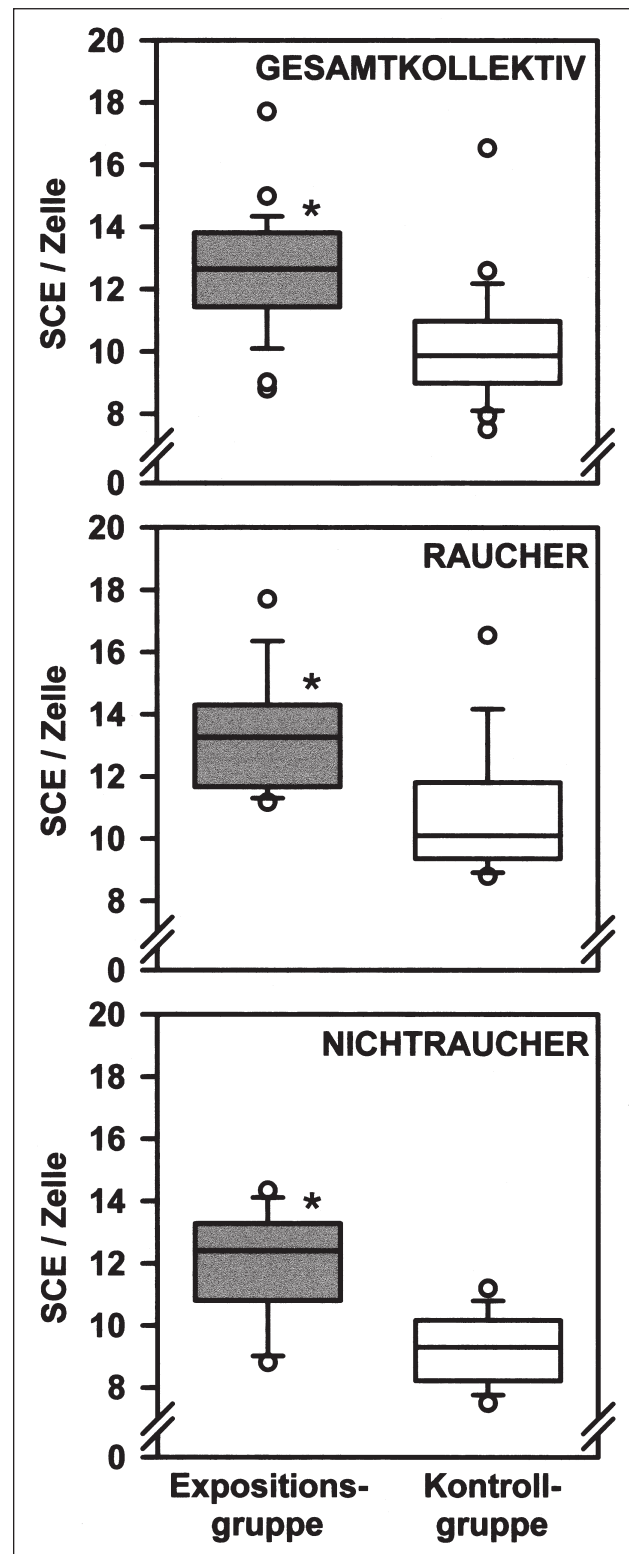


Abbildung 2: Zahl der SCE / Zelle in der Expositions- und Kontrollgruppe für das Gesamtkollektiv (oben) und die Untergruppen Raucher (Mitte) und Nichtraucher (unten) * $p < 0,01$ vs. Kontrollgruppe
Box-and-Whiskers-Plots: Der Kasten (Box) umfaßt den Bereich zwischen der 25. und 75. Perzentile, die Linie darin ist der Median. Die Linien vom Kasten nach unten und oben (Whiskers) kennzeichnen die 10. und 90. Perzentile. Die Kreise stellen Werte außerhalb dieses Bereichs dar.

Beim Vergleich der beiden Studien sind folgende Einschränkungen zu berücksichtigen: In der Studie von Hörauf et al. (9) wurden nur Nichtraucher untersucht und der Prozentsatz an Männern war deutlich höher als in der vorliegenden Untersuchung. Rauchen ist der wichtigste Einflußfaktor, den es beim Schwesterchromatidaustausch-Assay zu berücksichtigen gilt (2). Um den Effekt des Rauchens mit einzubeziehen, wurden Raucher und Nichtraucher getrennt ausgewertet. Dabei zeigte sich in Übereinstimmung mit der Literatur (2), daß sowohl in der Expositions- als auch in der Kontrollgruppe die Zahl der SCE / Zelle um etwa 1 bei den Rauchern höher war. Der Unterschied zwischen der Expositions- und Kontrollgruppe war jedoch bei Rauchern und Nichtrauchern gleich und betrug wie im Gesamtkollektiv etwa 3 SCE / Zelle (Abb. 2). Von deutlich geringerer Bedeutung als das Rauchen dürfte das Geschlecht sein. Angaben in der Literatur sprechen von einem Unterschied zwischen Frauen und Männern von 3%, was mit dem zweiten weiblichen X-Chromosom in Verbindung gebracht wird (2). Hinsichtlich des dritten Einflußfaktors, dem Alter, waren die Probanden in der vorliegenden Untersuchung (Tabelle 1) und der von Hörauf et al. (9) vergleichbar. Ein weiterer Unterschied zwischen den beiden Studien besteht darin, daß in der osteuropäischen Universitätsklinik nicht nur Isofluran, sondern auch Halothan verwendet wurde (21). Gegenwärtig fehlen jedoch Daten, die eindeutig belegen, daß Halothan stärker genotoxisch wirkt als die anderen volatilen Anästhetika. Dies gilt übrigens auch für N₂O, für das durch die Hemmung Vitamin B12-abhängiger Enzyme zumindest ein Pathomechanismus existieren würde (1). Eine weitere Einschränkung beim Vergleich der beiden Studien ist, daß nicht ausgeschlossen werden kann, daß das Anästhesiepersonal der osteuropäischen Universitätsklinik in stärkerem Maße anderen genotoxischen Substanzen wie z.B. Äthylenoxid ausgesetzt war. Obwohl dies nicht im einzelnen überprüft wurde, fehlen andererseits auch Hinweise darauf. Abschließend läßt sich also feststellen, daß die vorliegende Untersuchung trotz der unterschiedlichen Kollektive mit der von Hörauf et al. (9) verglichen werden kann und daß sich das Ergebnis im Sinne einer Dosis-Wirkungs-Beziehung interpretieren läßt.

Frühere Untersuchungen zur Entstehung von Schwesterchromatidaustauschen bei Anästhesie- und OP-Personal lieferten unterschiedliche Ergebnisse. Positiven Befunden (11, 14, 18) mit einem Anstieg zwischen 0,8 und 2,4 SCE / Zelle stehen negative Befunde (10, 12) gegenüber. Leider fehlen in allen Untersuchungen Angaben zur Höhe der Exposition oder sind zumindest unvollständig. Die Herkunftsländer der Studien, die zu positiven Ergebnissen führten (Tschechoslowakei, Indien, Türkei), lassen jedoch eine hohe Arbeitsplatzbelastung vermuten. Auch andere zytogenetische Verfahren, wie Chromosomenaberrationen, Mikrokernassay und Kometassay führten sowohl zu positiven (4, 11, 14, 19) als auch zu negativen (10, 12) Ergebnissen. In einer eigenen Untersuchung fanden wir eine vermehrte Entstehung von Mikrokernen bei dem hoch-exponierten Anästhesiepersonal

der osteuropäischen Universitätsklinik, nicht jedoch bei dem niedrig-exponierten Anästhesiepersonal der deutschen Universitätsklinik (22). Auch diese Studie stützt somit die Hypothese, daß die Höhe der Arbeitsplatzbelastung für das Auftreten bzw. die Ausprägung genotoxischer Effekte von Bedeutung ist.

Während der Stellenwert des Schwesterchromatid-Assays in Lymphozyten zum Nachweis einer Exposition gegenüber genotoxischen Substanzen unbestritten ist, wird der Krankheitswert einer erhöhten Rate an Schwesterchromatidaustauschen angezweifelt (20). In einer prospektiven Studie konnten Hagmar et al. (8) keinen Zusammenhang zwischen einer erhöhten Rate an Schwesterchromatidaustauschen und dem späteren Auftreten maligner Erkrankungen nachweisen. Bei Frauen mit einer oder mehreren Fehlgeburten in der Anamnese war die Rate an Schwesterchromatidaustauschen nicht höher als in einer entsprechenden Kontrollgruppe (13). Wurde der Schwesterchromatidaustausch-Assay dagegen zum Zeitpunkt der Erkrankung durchgeführt, konnte sowohl bei Frauen mit Ovarialkarzinom (6) als auch bei Schwangeren mit drohender Fehlgeburt (5) eine erhöhte Rate an Schwesterchromatidaustauschen nachgewiesen werden.

Zusammenfassend zeigt die vorliegende Studie, daß eine hohe Arbeitsplatzbelastung mit Inhalationsanästhetika mit einer vermehrten Bildung von Schwesterchromatidaustauschen einhergeht. Ob der genotoxische Effekt dabei durch N₂O, volatile Anästhetika oder die Kombination aus beiden verursacht wird, ist ungeklärt. Durch den zunehmend kritischer gesehenen Einsatz von N₂O geben möglicherweise zukünftige Studien an Personal, das nur gegenüber (einzelnen) volatilen Anästhetika exponiert ist, darüber Aufschluß.

Literatur

1. Baden JM, Rice SA: Metabolism and toxicity of inhaled anesthetics. In: Miller RD (Hrsg.): Anesthesia, 5. Aufl. S. 147, Churchill Livingstone, Philadelphia, Pennsylvania, USA 2000
2. Barale R, Chelotti L, Davini T, Del Ry S, Andreassi MG, Ballardini M, Bulleri M, He J, Baldacci S, Di Pede F, Gemignani F, Landi S: Sister chromatid exchange and micronucleus frequency in human lymphocytes of 1,650 subjects in an Italian population: II. Contribution of sex, age, and lifestyle. *Environ Mol Mutagen* 1998, 31: 228
3. Biermann E, Erb T, Hack G, Hagemann H, Hobbahn J, Mertens E, Pothmann W, Schäffer R, Wendt M: Umsetzung der Gefahrstoffverordnung. (Literaturstelle beim Verfasser)
4. Chang WP, Lee S, Tu J, Hseu S: Increased micronucleus formation in nurses with occupational nitrous oxide exposure in operating theaters. *Environ Mol Mutagen* 1996, 27: 93
5. Dedonyte V, Domza B, Lazutka JR, Lekevicius RK: Sister chromatid exchanges and lymphocyte hyperploidy in women with a history of reproductive wastage. *Hereditas* 1991, 114: 277
6. Dhar PK, Devi S, Rao TR, Kumari U, Joseph A, Kumar MR, Nayak S, Shreemati Y, Bhat SM, Bhat KR: Significance of lymphocytic sister chromatid exchange frequencies in ovarian cancer patients. *Cancer Genet Cytogenet* 1996, 89: 105

Klinische Anästhesie

7. *Guirguis SS, Pelmeur PL, Roy ML, Wong L*: Health effects associated with exposure to anaesthetic gases in Ontario hospital personnel. *Br J Ind Med* 1990, 47: 490
8. *Hagmar L, Bonassi S, Stromberg U, Brogger A, Knudsen LE, Norppa H, Reuterwall C*: Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer: a report from the European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health (ESCH). *Cancer Res* 1998, 58: 4117
9. *Hoerauf KH, Wiesner G, Schroegendorfer KF, Jobst BP, Spacek A, Harth M, Sator-Katzenschlager S, Ruediger HW*: Waste anaesthetic gases induce sister chromatid exchanges in lymphocytes of operating room personnel. *Br J Anaesth* 1999, 82: 764
10. *Husum B, Niebuhr E, Wulf HC, Norgaard I*: Sister chromatid exchanges and structural chromosome aberrations in lymphocytes in operating room personnel. *Acta Anaesthesiol Scand* 1983, 27: 262
11. *Karelava J, Jablonicka A, Gavora J, Hano L*: Chromosome and sister-chromatid exchange analysis in peripheral lymphocytes, and mutagenicity of urine in anesthesiology personnel. *Int Arch Occup Environ Health* 1992, 64: 303
12. *Lamberti L, Bigatti P, Ardito G, Armellino F*: Chromosome analysis in operating room personnel. *Mutagenesis* 1989, 4: 95
13. *Landi S, Barale R*: Sister chromatid exchanges, chromosome aberrations and micronuclei in female lymphocytes: correlations with biological rhythms, miscarriages and contraceptive pill use. *Mutagenesis* 1999, 14: 581
14. *Natarajan D, Santhiya ST*: Cytogenetic damage in operation theatre personnel. *Anaesthesia* 1990, 45: 574
15. National Institute of Occupational Safety and Health: Criteria for a recommended standard: occupational exposure to waste anesthetic gases and vapors. US Department of Health, Education, and Welfare (DHEW publication no. 77-140), Cincinnati, Ohio, USA 1977
16. *Rowland AS, Baird DD, Weinberg CR, Shore DL, Shy CM, Wilcox AJ*: Reduced fertility among women employed as dental assistants exposed to high levels of nitrous oxide. *N Engl J Med* 1992, 327: 993
17. *Rowland AS, Baird DD, Shore DL, Weinberg CR, Savitz DA, Wilcox AJ*: Nitrous oxide and spontaneous abortion in female dental assistants. *Am J Epidemiol* 1995, 141: 531
18. *Sardas S, Cuhruk H, Karakaya AE, Atakurt Y*: Sister-chromatid exchanges in operating room personnel. *Mutat Res* 1992, 279: 117
19. *Sardas S, Aygun N, Gamli M, Unal Y, Unal N, Berk N, Karakaya AE*: Use of alkaline comet assay (single cell gel electrophoresis technique) to detect DNA damages in lymphocytes of operating room personnel occupationally exposed to anaesthetic gases. *Mutat Res* 1998, 418: 93
20. *Tucker JD, Preston RJ*: Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges, and cancer risk assessment. *Mutat Res* 1996, 365: 147
21. *Wiesner G, Harth M, Hoerauf K, Szulc R, Jurczyk W, Sobczynski P, Hobbahn J, Taeger K*: Occupational exposure to inhaled anaesthetics: a follow-up study on anaesthetists of an eastern European university hospital. *Acta Anaesthesiol Scand* 2000, 44: 804
22. *Wiesner G, Hoerauf K, Schroegendorfer K, Sobczynski P, Harth M, Ruediger HW*: High level, but not low-level, occupational exposure to inhaled anesthetics is associated with genotoxicity in the micronucleus assay. *Anesth Analg* 2001, 92: 118.

Korrespondenzadresse:

Dr. med. *Gunther Wiesner*, DEAA
 Klinik für Anästhesiologie
 Universität Regensburg
 Franz-Josef-Strauß-Allee 11
 D-93053 Regensburg.