

Abschlussbericht zum Verbundprojekt

***Abgrenzung und Differenzierung  
,irritativer' und ,belästigender' Effekte  
von Gefahrstoffen - Fortsetzung***

November 2010

Autoren:  
Meinolf Blaszkewicz  
Kathrin Hey  
Ernst Kiesswetter  
Stefan Kleinbeck  
Michael Schäper  
Christoph van Thriel

## Zusammenfassung

Im FP 267 wurden im Verlauf von drei Jahren, wie geplant, fünf experimentelle Expositionsstudien mit den Arbeitsstoffen Acetaldehyd, Ethylacrylat, Schwefelwasserstoff, Methylmethacrylat und 2-Ethylhexanol durchgeführt. Weiter wurden in zwei psychophysischen Experimenten (a) alternative Techniken zur Bestimmung von Geruchs- und Reizschwellen bei leichtflüchtigen Arbeitsstoffen entwickelt und (b) verschiedene physiologische Readouts (Atemparameter, elektrische Hautleitfähigkeit (EDA)) zur Objektivierung von Reiz- und Geruchswirkungen in olfaktometrischen Screeningexperimenten erprobt.

Beim Reizstoff Acetaldehyd zeigte das Experiment keine adversen Effekte bis zum aktuellen MAK-Wert von 50 ppm. Aus dem Studiendesign (fünf Bedingungen, 3 Stunden Nachbeobachtungszeitraum) können jedoch NOAEC (No Observed Adverse Effect Concentration) oder LOAEC (Lowest Observed Adverse Effect Concentration) humanstudienbasiert abgeleitet und mit einem Benchmarkdosis-Ansatz die Dosis-Wirkungsbeziehung modelliert und extrapoliert werden. Das Experiment mit Ethylacrylat ergab konvergente Hinweise aus den untersuchten Effektebenen (Erleben, Verhalten, Physiologie) auf adverse Wirkungen im Bereich des aktuellen MAK-Wertes. Dabei hatten die Expositionsspitzen mit ihren lokalen Schwankungen der effektiven Dosis am Zielorgan (chemosensorische Rezeptoren in der Nase/ am Auge) eine deutlich effektverstärkende Wirkung sowohl auf die subjektive Wahrnehmung des Reizstoffes wie auch auf den physiologischen Marker der Lidschlussfrequenz. Diese Ergebnisse bestätigten die Vermutung aus den Screeningergebnissen der statischen Olfaktometrie, dass Ethylacrylat ein hohes Potential für sensorische Irritation besitzt. An diesem Experiment konnte exemplarisch die Validität der Gesamtstrategie des Forschungsprojektes dokumentiert werden.

Um gruppenbezogene Unterschiede in den Dosis-Wirkungsbeziehungen für verschiedene Reizstoffe zu untersuchen, wurden in den Experimenten mit Methylmethacrylat (MMA) und 2-Ethylhexanol (2-EH) die Modulatoren Alter und Geruchsfunktion systematisch variiert. Während MMA bei Expositionen im Bereich des MAK-Wertes nur schwache, physiologisch nicht messbare Effekte auslöste, war bei 2-EH-Expositionen von 20 ppm die Lidschlussfrequenz signifikant erhöht. Dieser konzentrationsabhängige Reizeffekt wurde nicht durch das Alter der Probanden verstärkt oder abgeschwächt. Eine Generalisierung dieses Befundes ist momentan nur eingeschränkt möglich und das Ergebnis sollte in weiteren Studien überprüft werden.

Die Studie zu Schwefelwasserstoff (H<sub>2</sub>S) lieferte nicht die erhofften Erkenntnisse zu Ablenkungen auf sekundärer Ebene - für den UA III des AGS waren jedoch die Resultate sehr wichtig, um den AGW für H<sub>2</sub>S festlegen zu können.

Die neu- und weiterentwickelten Screeningverfahren sind prinzipiell in der Lage, wesentliche Basisinformationen für den überwiegenden Teil der lokalen Reizstoffe zu liefern; die Kosten-Nutzen-Relation ist jedoch teilweise ungünstig. Die einfache und kostengünstige Technik der „Riechflaschen“ ist für viele Reizstoffe ausreichend, um qualitätsgesichert Geruchs- und Irritationsschwellen zu bestimmen. Nur bei Arbeitsstoffen mit (a) niedrigen oder (b) hohen Siedepunkten sollte von Fall zu Fall entschieden werden, ob die neu entwickelte Technik mit gasdichten Tedlar®-Beuteln eher geeignet ist, die chemosensorischen Schwellen zu messen.

Die untersuchten Parameter der Atmung und der EDA konnten bei der Modellsubstanz Mercaptoethanol valide konzentrationsabhängige Veränderungen nachweisen. Diese Biosignale sind jedoch anfällig für Artefakte, so dass dieses Screening personal- und zeitintensiv bei Durchführung und Auswertung ist. Nur eine optimale apparative Ausstattung kann diesen Aufwand reduzieren und dazu führen, dass ein Screening mit diesen Effektmarkern sinnvoll ist, um Frühindikatoren gesundheitsrelevanter Effekte konzentrationsabhängig zu messen.

Das Forschungsprojekt unterstreicht erneut, dass die Methode der experimentellen Expositionen als „Goldstandard“ zur Untersuchung chemosensorischer Effekte im Humanbereich zu bezeichnen ist. Nur mit diesem realitätsnahen Paradigma können Geruchs- und Reizeffekte differenziert erfasst, qualitativ bewertet und Dosis-Wirkungsbeziehungen quantifiziert werden.

## Abstract

Over the past three years, five experimental exposure studies on different chemical agents – acetaldehyde, ethyl acrylate, hydrogen sulfide, methyl methacrylate, and 2-ethylhexanol were conducted under the scope of FP267. Furthermore, in two psychophysical experiments (a) alternative procedures for assessing odour and nasal irritation thresholds for highly volatile working substances were developed, and (b) different physiological readouts (parameters of breathing, electrodermal activity (EDA)) were tested in experimental olfactometric screenings to derive more objective irritant and olfactory effects from screening experiments.

The irritant acetaldehyde did not show any adverse effect up to the current MAK-value of 50 ppm. However, the design (5 conditions, 3 hours of post-experimental observation) allowed for derivation of a NOEAC (No Observed Adverse Effect Concentration) or LOAEC (Lowest Observed Adverse Effect Concentration) based on studies in human and for modelling a benchmarkdose approach.

The investigation of ethyl acrylate revealed converging hints of adverse effects at the current MAK-value concerning the three investigated effect levels (sensation, behaviour, and physiology). Exposure peaks producing varying effective concentrations at the target organs (chemosensory receptors of nose and eyes) aggravated subjective sensations and the physiological marker blink frequency considerably. These results support our hypothesis of high potential for sensory irritation in ethyl acrylate, which was derived from static olfactometry. Thus, this substance is a model for the rationale of the research project.

The modulators age and ability to smell were varied systematically investigating methyl methacrylate (MMA) and 2-ethylhexanol (2-EH) in order to analyse group-related differences in dose-effect relationships for different irritants. While MMA at the concentration of MAK-value triggered only weak effects that were incapable of physiological measurement, blink frequency was increased significantly at 20 ppm of 2-EH. This concentration-dependent effect of irritation was not modulated by the age of the subjects. At present, only limited generalizations of these findings are possible. Further studies should review the result.

The study using hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) did not demonstrate interference on the secondary level – for the UA III of AGS however, these results were important to determine the OEL for H<sub>2</sub>S.

In principle, the newly developed and refined screening methods are capable of generating basic information on irritants; however, the cost-benefit ratio is unfavourable in some cases. The simple and cost-efficient method of using glass vessels for stimulus delivery is sufficient to measure quality assured odour and nasal irritation thresholds for many irritants. Whether the procedure with gas-tight Tedlar® bags is advisable to measure chemosensory thresholds for working substances with (a) low or (b) high boiling points, has to be decided individually for each substance. The investigated parameters of breathing and EDA provided evidence for valid concentration-dependent changes investigating the model substance mercaptoethanol. But these biosignals are prone to artifacts; so screening is demanding with respect to workforce and time in conducting and analysing. These operating expenses can only be reduced by improvement in technical equipment. After that, these effect markers seem to be reasonable for measuring leading indicators of health-based effects depending on concentration.

This research project again emphasizes the method of experimental exposures to be the gold standard for investigating chemosensory effects in human. Only this paradigm that is close to reality allows odour and nasal irritation effects to be assessed in a sophisticated manner, to be evaluated qualitatively, and furthermore, dose-effect relationships to be quantified.

## Inhalt

Inhalt.....	4
1. Titel und Laufzeit des Vorhabens .....	5
2. Problemstellung .....	5
3. Forschungszweck/ -ziel.....	5
3.1 Substanzbezogene Basis- und Effektdaten lokaler Reizstoffe (ASP 1.1 - 1.3).....	5
3.2. Prävention kognitiver Effekte als Folge der chemosensorischen Reizstoffwahrnehmung (ASP 2.1 und 2.2) .....	6
4. Methodik und Zeitabläufe der ASPs 1.1 bis 2.2 .....	7
4.1 Expositionslabor: Indikatoren primärer Effekte.....	8
4.2 Expositionslabor: Indikatoren sekundärer Effekte (ASP 1.3, 2.1, 2.2) .....	10
4.3 Screeningverfahren: Erweiterung auf rein gasförmige Proben (ASP 1.1).....	10
4.4 Screeningverfahren: Erweiterung um physiologische Methoden (ASP 1.2).....	11
4.5 Arbeits- und Zeitabläufe.....	11
5. Ergebnisse des Gesamtvorhabens .....	13
5.1 Praxistaugliche Erweiterung der statischen Olfaktometrie (ASP 1.1 Screening) .....	13
5.2 Dynamische Olfaktometrie: Erweiterung um physiologische Methoden (ASP 1.2) .....	14
5.3 Substanzbezogene Basis- und Effektdaten lokaler Reizstoffe (ASP 1.3 ExpoLab) .....	15
Acetaldehyd.....	16
Ethylacrylat.....	16
5.4 Prävention kognitiver Effekte als Folge der chemosensorischen Reizstoffwahrnehmung (ASP 2.1 ExpoLab "Wirkung") .....	17
Schwefelwasserstoff.....	17
5.5 Alterungseffekte in Kombination mit olfaktorischen Defiziten (ASP 2.2 ExpoLab "Altern") .....	18
Methylmethacrylat.....	18
2-Ethylhexanol.....	18
6. Veröffentlichungen.....	20
7. Bewertung der Ergebnisse .....	21
8. Umsetzungs- und Verwertungsplan .....	23
Literatur.....	24

## 1. Titel und Laufzeit des Vorhabens

Abgrenzung und Differenzierung ‚irritativer‘ und ‚belästigender‘ Effekte von Gefahrstoffen – Fortsetzung (Kurztitel: „Irritative Effekte – Fortsetzung“)

Laufzeit: 2007 bis 2010

Mit dem vorliegenden Abschlussbericht werden die Arbeiten im Projekt abgeschlossen und die Ergebnisdarstellung komplettiert. Über die gesamte Projektlaufzeit wurden die DGUV und der Forschungsbegleitkreis (FBK) kontinuierlich über die Ergebnisse der Experimente der fünf Arbeitsschwerpunkte (ASP) durch Zwischenberichte (vorgelegt im März 2008, März 2009, März 2010) informiert. Diese detaillierte Ergebnisdarstellung wird nun durch ein Addendum zum Abschlussbericht ergänzt, in dem Ergebnisse der biochemischen Analysen der nasalen Lavageflüssigkeit aus den vier Experimenten der ASPs 1.3 und 2.2 dargestellt werden. Darüber hinaus werden im Addendum die Ergebnisse der experimentellen Arbeiten zum ASP 1.2 dargestellt und die Ergebnisse und Methoden kritisch beleuchtet.

## 2. Problemstellung

Viele lokale Reizstoffe besitzen chemische Eigenschaften (z.B. Fettlöslichkeit etc.), die für betriebliche Anwendungen oder die Produktqualität unverzichtbar sind. Alternativen stehen kaum zur Verfügung und in der adäquaten Grenzwertsetzung kommt damit der Gruppe der lokalen Reizstoffe eine besondere Bedeutung zu. Für die Präventionsarbeit der DGUV, die u.a. durch die Festlegung gesundheitsbasierter Arbeitsplatzgrenzwerte im Ausschuss für Gefahrstoffe (AGS UA III „Gefahrstoffbewertung“) erfolgt, sollten daher die im Verbundprojekt „Abgrenzung und Differenzierung ‚irritativer‘ und ‚belästigender‘ Effekte von Gefahrstoffen“ begonnenen Forschungsanstrengungen für die Gruppe der lokalen Reizstoffe weitergeführt und in Teilaspekten vertieft werden.

## 3. Forschungszweck/ -ziel

Die Projektziele des Forschungsvorhabens waren in zwei Forschungsebenen gegliedert. Innerhalb dieser Ebenen wurden Experimente in mehreren Arbeitsschwerpunkten (ASP) durchgeführt.

### 3.1 Substanzbezogene Basis- und Effektdaten lokaler Reizstoffe (ASP 1.1 - 1.3)

In Anbetracht der weit verbreiteten Verwendung von lokalen Reizstoffen in der Arbeitswelt müssen dringend weitere Arbeitsstoffe in dem integrativen Ansatz von Screeningverfahren und vertiefenden Messungen (Schichtsimulation), der im vorangegangenen Forschungsprojekt entwickelt wurde, systematisch untersucht werden. Darüber hinaus verfolgte das Projekt die Ziele, im Bereich der Screeningverfahren alternative Applikationstechniken für sehr flüchtige Reizstoffe zu entwickeln und physiologische Methoden in die Effektebene der Screeningexperimente zu integrieren.

Für die Experimente des **Arbeitsschwerpunkts 1.3 (ASP 1.3)** sollten möglichst hoch priorisierte Arbeitsstoffe ausgewählt werden. Ziel dieses ASP ist es, belastbare Daten für die Grenzwertsetzung zu liefern. Zu diesem Zweck wurde der FBK konsultiert und für **zwei Experimente im Expositionslabor des IfADO** wurden die Arbeitsstoffe Acetaldehyd und Ethyl-

acrylat ausgewählt. Für Acetaldehyd liegen trotz hoher Arbeitsplatzrelevanz bisher kaum Humandaten vor und für Ethylacrylat war aus den Experimenten der vorherigen Projektphasen bekannt, dass die Irritationsschwelle unterhalb des gültigen AGWs bzw. des empfohlenen MAK-Wertes liegt.

Weiter sollten auf dieser Forschungsebene die für die grundlegende Stoffbeurteilung genutzten Screeningverfahren der „statischen Olfaktometrie“ durch Modifikationen und Erweiterungen in ihrer Praxisrelevanz, der allgemeinen Anwendbarkeit und letztlich für die Verwendung im Grenzwertfindungsprozess gestärkt werden, da im Vorgängerprojekt Defizite an zwei Stellen des Screenings erkannt worden waren:

- (a) teilweise stoffbedingte Probleme bei Reizpräsentationen in „Riechflaschen“ aus Glas,
- (b) Beschränkung auf rein subjektive Angaben beim Screening mittels dynamischer Olfaktometrie.

Lösungen hierzu sollten in ASP 1.1 und ASP 1.2 entwickelt werden:

**ASP 1.1** zielt auf eine **praxistaugliche Erweiterung des bisherigen Verfahrens der statischen Olfaktometrie (Screening)** ab, die die Darbietung der flüssigen Reizstoffe in rein gasförmiger Form gestattet. Damit wird es dann möglich sein, auch bei bisher verfahrenstechnisch problematischen Stoffen schnell und zuverlässig in einem ersten Screening - ohne aufwendige und komplizierte technische Apparaturen - Geruchs- und Reizschwellen präzise bestimmen zu können. In den entsprechenden Versuchen wurden 2-Butanol, Acetaldehyd, Methylmethacrylat, Dimethylsuccinat, Pyrrolidin und 2-Ethylhexylacrylat eingesetzt (siehe *Zwischenbericht 2008*).

Die nächstfolgende Stufe des Screeningprozesses (**dynamische Olfaktometrie, Screening**) sollte im **ASP 1.2** erweitert werden und **zukünftig auch physiologische Methoden** enthalten, damit Ergebnisse daraus besser für die Ableitung von Grenzwerten genutzt werden können. Bisher liegen auf dieser Stufe „nur“ subjektive Angaben vor, die beschreiben, wie der Konzentrationsbereich zwischen Geruchs- und Reizschwelle von Versuchspersonen wahrgenommen wird. Es sollte geprüft werden, ob der Übergang von Geruchs- zu Reizeffekten durch objektiv messbare physiologische Prozesse wie zum Beispiel die Veränderung der Atemtiefe, die Verengung der Nasenhöhle oder autonome Reaktionen wie Hautwiderstand erfasst werden kann (siehe *Addendum zum Abschlussbericht 2010*).

### **3.2. Prävention kognitiver Effekte als Folge der chemosensorischen Reizstoffwahrnehmung (ASP 2.1 und 2.2)**

Vor dem Hintergrund des unzureichenden Wissens über kognitive Folgeeffekte durch lokale Reizstoffe sollten auf einer **wirkungsbezogenen Forschungsebene** Bedingungen und Mechanismen für mögliche Verhaltenseffekte näher untersucht werden. Ziel war die **Identifizierung grundlegender Abläufe und von Moderatoren für Verhaltenseffekte (ASP 2.1, ExpoLab "Wirkung")** wie etwa Stress, Überforderung und emotionale Geruchsverarbeitung, um in der Prävention entsprechende Maßnahmen (z.B. Arbeitsplatzgestaltung, Information über Arbeitsstoffgerüche) ergreifen zu können. In diesem ASP wurden Schwefelwasserstoffexpositionen eingesetzt, um zu prüfen, ob (a) der extrem unangenehme Geruch von H<sub>2</sub>S emotionale Reaktionen wie z. B. Ekel auslöst, die physiologisch messbar sind, (b) die Ausrichtung der expositionsbezogenen Aufmerksamkeit diese Prozesse und kognitive Ablenkeffekte

verstärkt und (c) schwierige Aufgaben im Sinne der Überforderung der kognitiven Ressourcen eher durch Ablenkeffekte beeinträchtigt werden.

In einem zweiten Experiment sollten in diesem Forschungsschwerpunkt mit Hinblick auf ihre zunehmende gesellschaftspolitische Relevanz **Alterungseffekte in Kombination mit olfaktorischen Defiziten** systematisch untersucht werden (**ASP 2.2, ExpoLab "Altern"**), um auch in diesem Bereich die Präventionsarbeit der DGUV mit belastbarem Datenmaterial zu unterstützen, da es zu diesem Thema keine gesicherten Erkenntnisse gibt. In diesem ASP wurden in Abstimmung mit dem FBK die Arbeitsstoffe Methylmethacrylat- und 2-Ethylhexanol untersucht.

#### 4. Methodik und Zeitabläufe der ASPs 1.1 bis 2.2

Ausführliche und vollständige Darstellungen der in den jeweiligen Experimenten im Expositions-labor des IfADo verwendeten Verfahren und der verwendete Methodik bzw. der Messinstrumente finden sich in den *Zwischenberichten 2008, 2009 und 2010* sowie im *Addendum zum Abschlussbericht*.

Bei den Versuchen zur Methodenerweiterung bei Geruchs- und Irritationsschwellenbestimmung (ASP 1.1) wurden 2 Gruppen von je 36 Probanden vollständig randomisiert in Bezug auf je 3 Stoffe untersucht.

An den Versuchen zur Einbeziehung physiologischer Methoden bei der dynamischen Olfaktometrie (ASP 1.2) nahmen 20 Probanden (Männer und Frauen) - teilweise in Wiederholungsdesigns - teil.

Die Experimente im ASP 1.3 *ExpoLab „Substanzen“* umfassten 4-stündige Ganzkörperexpositionen mit Vor- und Nachbereitungszeiten (Gesamtdauer 6-8 Stunden), die in vollständig randomisierten Wiederholungsdesigns mit konstanten und alternierenden Expositionen (bei alternierenden Expositionen jeweils 4 Spitzen) durchgeführt wurden. Es wurden in beiden Experimenten jeweils fünf Expositionsszenarien untersucht. Die angestrebten Anzahlen von Probanden in diesem ASP, die zur gesicherten Überprüfung der jeweiligen Hypothesen notwendig waren, sind 20 Probanden je Experiment (Acetaldehyd und Ethylacrylat), 10 Männer und 10 Frauen.

Die Experimente im ASP 2.1 *ExpoLab „Wirkung“* umfassten 4-stündige Ganzkörperexpositionen gegenüber Schwefelwasserstoff (H<sub>2</sub>S) mit Vor- und Nachbereitungszeiten (Gesamtdauer 6 Stunden). Es wurden zwei unterschiedliche Durchschnittskonzentrationen von 0,5 und 5 ppm verwendet, die durch „unvorhersehbare“ Expositionsspitzen (kein sinusförmiger Verlauf mit festen Zeitabständen zwischen den Expositionsspitzen) gekennzeichnet waren. Durch die systematische Variation der Aufmerksamkeit in diesem Experiment wurden die Expositionsbedingungen zweimal appliziert, wobei jeweils unterschiedliche Instruktionen gegeben wurden. Insgesamt wurden somit vier unterschiedliche Expositionsszenarien untersucht. Die angestrebte Anzahl von Probanden in diesem ASP, die zur gesicherten Überprüfung der jeweiligen Hypothesen notwendig waren, sind 16 Probanden, 8 Männer und 8 Frauen.

Die Experimente im ASP 2.2 *ExpoLab „Altern“* umfassten 4-stündige Ganzkörperexpositionen

mit Vor- und Nachbereitungszeiten (Gesamtdauer 6 Stunden). Das Experiment untersuchte, in Absprache mit dem FBK, die beiden Reizstoffe Methylmethacrylat und 2-Ethylhexanol in jeweils zwei Konzentrationen. Die hohen Expositionsbedingungen orientierten sich am jeweiligen MAK-Wert, die niedrigen Expositionen an den Geruchsschwellen. Die Bedingungen wurden von den Probanden im randomisierten Wiederholungsdesign durchlaufen. Die angestrebte Anzahl von Probanden in diesem ASP, die zur gesicherten Überprüfung der jeweiligen Hypothesen notwendig waren, sind 32 Probanden, 16 Männer und 16 Frauen, jeweils zur Hälfte jüngere bzw. ältere Probanden.

#### 4.1 Expositionslabor: Indikatoren primärer Effekte

**Tabelle 1:** Indikatoren der primären Effekte in den einzelnen Arbeitsschwerpunkten (ASP).

		ASP				
		1.1	1.2	1.3	2.1	2.2.
<b>Erleben</b>						
<i>Empfindungsstärken (LMS)</i>			✓	✓	✓	✓
<i>Akute Symptome (SPES)</i>				✓	✓	✓
<b>Physiologische Methoden</b>						
<i>Anteriore Rhinomanometrie</i>				✓	✓	✓
<i>Lidschlussfrequenz</i>				✓	✓	✓
<i>Elektrodermale Aktivität (EDA)</i>			✓		✓	
<i>Schwellenmessung</i>						
<i>Geruch</i>	<i>Flaschen</i>	✓				
	<i>Beutel</i>	✓				
<i>Irritation</i>	<i>Flaschen</i>	✓				
	<i>Beutel</i>	✓				
<b>Kontrollvariablen</b>						
<i>Elektrokardiogramm (EKG)</i>				✓	✓	✓
<i>Atemfrequenz</i>			✓	✓	✓	✓
<i>Geruchsfunktion (Sniffin' Sticks)</i>		✓			✓	
<b>Biochemische Indikatoren</b>						
<i>Neurogene Entzündung (Substanz P, CGRP)</i>				✓		✓
<i>Neurotrophine (NGF)</i>				✓		✓
<i>proinflammatorische Zytokine (TNF-<math>\alpha</math>, IL-6)</i>				✓		✓
<i>Epithelzellaktivierung (15(S)-HETE)</i>				✓		✓

#### Erleben

##### a) *Empfindungsstärken, Labeled magnitude scale (LMS)*

8 chemosensorische Empfindungen (z. B. Lästigkeit, Ekelerregend)

##### b) *Akute Symptome (Erweiterung des Swedish Performance Evaluation System, SPES)*

29 Symptome, 7 Symptombereiche (z.B. Geruchssymptome)

### Physiologische Methoden

a) *Anteriore Rhinomanometrie*

Atem-Luftstrom pro Zeit (Flow [ml/sec]) in der Nasenhaupthöhle, vor/nach Exposition.

b) *Lidschlussfrequenz*

Standardisierte Aufzeichnung: Abschnitte während 1. und 2. IOR-Test.

c) *Elektrodermale Aktivität (EDA)*

Kontinuierlich während der gesamten Expositionsphase.

### Kontrollvariablen

a) *Elektrokardiogramm (EKG)*

b) *Atemfrequenz*

### Biochemische Indikatoren

a) *Neurogene Entzündung:*

Substanz P

CGRP; calcitonin gene-related peptide.

b) *Neurotrophine:*

NGF; nerve growth factor

c) *proinflammatorische Zytokine (Immunabwehr):*

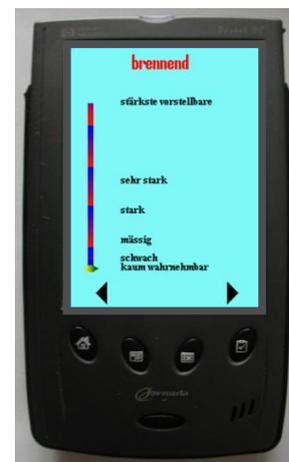
TNF- $\alpha$ ; tumor necrosis factor  $\alpha$ .

IL-6; interleukin-6

d) *Epithelzellaktivierung:*

15(S)-HETE; 15-hydroxyeicosatetraenoic acid.

Bei verschiedenen Kooperationspartnern (Institut für Hygiene und Arbeitsmedizin, Universität Duisburg-Essen, Prof. Rettenmeier; Institut für Prävention und Arbeitsmedizin der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung, Bochum, Prof. Brüning) laufen momentan die Auswertungsarbeiten zu (a) Proteinanalysen der Tränenflüssigkeit, (b) biochemische Analysen des Atemkondensats und (c) Stickoxidmessung in der Ausatemluft. Diese Analysen besitzen hauptsächlich explorativen Charakter und dienen der Identifizierung relevanter Wirkmechanismen bei akuten Reizwirkungen.



**Abbildung 1:** links: Expositionslabor des IfADo (4 Probandenarbeitsplätze), rechts: Pocket-PC™ mit LMS Skala.

## 4.2 Expositionslabor: Indikatoren sekundärer Effekte (ASP 1.3, 2.1, 2.2)

**Tabelle 2:** Indikatoren sekundärer Effekte in den Arbeitsschwerpunkten 1.3, 2.1 und 2.2.

		ASP		
		1.3	2.1	2.2
<i>Arbeitsgedächtnisaufgabe (AG)</i>				
<i>Objekte</i>	<i>2-back</i>	✓	✓	✓
	<i>3-back</i>	✓	✓	✓
<i>Positionen</i>	<i>2-back</i>	✓	✓	✓
	<i>3-back</i>	✓	✓	✓
<i>Aufgabe zur Geteilten Aufmerksamkeit (GA)</i>		✓	✓	✓
<i>Flankierreizaufgabe (FR)</i>		✓	✓	✓
<i>Inhibition of Return (IOR)</i>			✓	✓
<i>Einfache Reaktion (Quadrattest)</i>				✓

a) *Arbeitsgedächtnisaufgabe (AG)*

Sequentielle Materialdarbietung (Punktpositionen, Objekte). Reaktion bei Übereinstimmung mit vorletzter (2-back Aufgabe) bzw. drittletzter (3-back Aufgabe) Darbietung.

b) *Aufgabe zur Geteilten Aufmerksamkeit (GA)*

Reaktionsverhalten bei gleichzeitig ablaufenden visuellen und akustischen Aufgaben.

c) *Flankierreizaufgabe (FR)*

Reaktionen mit rechter und linker Hand gemäß angezeigter Pfeilrichtung. Störung durch flankierende Hinweisreize.

d) *Inhibition of Return (IOR)*

Reaktionen auf Zielreize, die mit Hinweisreizen in der Position kongruent oder inkongruent sind.

e) *Einfache Reaktion (Quadrattest)*

Reaktion, sobald ein Quadrat auf dem Bildschirm erscheint.

## 4.3 Screeningverfahren: Erweiterung auf rein gasförmige Proben (ASP 1.1)

Bisher wurden in der Literatur keine Untersuchungen beschrieben, die Geruchs- und Irritationsschwellen mit rein gasförmigen Proben aus „Beuteln“ ermittelt haben. Das am IfADo entwickelte und eingesetzte Verfahren der Kombination aus „two-alternative, forced choice (2-AFC) modified up-down staircase procedure“ und der Reizdarbietung in Beuteln (s. *Zwischenbericht 2008, p.2-4*) stellt eine Neuentwicklung dar. Daher wurden die vorliegenden Ergebnisse aus den Versuchen mit Beuteltechnik sowohl für sich allein als auch im Vergleich mit den entsprechenden Ergebnissen aus einem etablierten Verfahren - in diesem Fall dem Flaschenverfahren - beurteilt.



**Abbildung 2:** statische Olfaktometrie, links: Reizdarbietung mit Reichflaschen, rechts: Reizdarbietung mit Beuteln.

Dazu wurden aus den Daten der exakt parallel durchgeführten Beutel- und Flaschenversuchsreihen Parameter extrahiert und verglichen, die Informationen zu den Punkten (1) Sicherheit / Unsicherheit eines individuellen Schwellenergebnisses einer Versuchsperson, (2) durchschnittlicher Zeitumfang einer individuellen Schwellenermittlung und (3) Effizienz des gesamten Testverfahrens liefern (vgl. *Zwischenbericht 2008*, p 15-16).

#### **4.4 Screeningverfahren: Erweiterung um physiologische Methoden (ASP 1.2)**

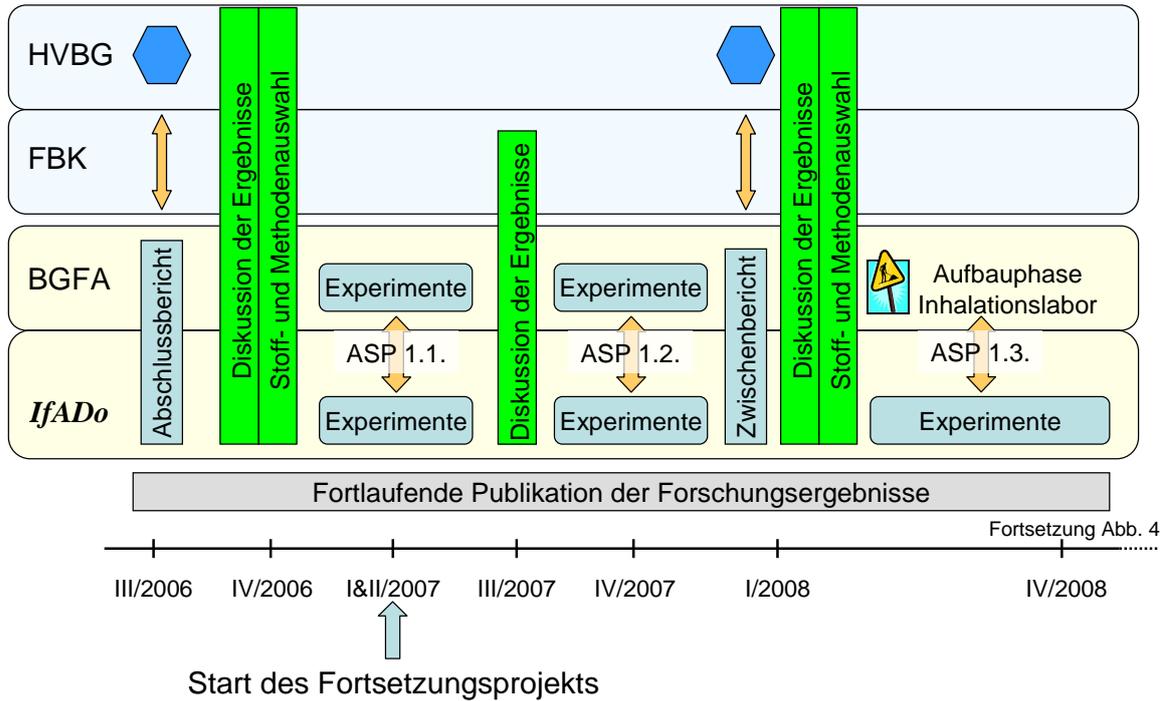
Während der Reizdarbietungen mit dem Flow-Olfaktometer TO-7 wurden in mehreren Experimenten mit unterschiedlichen Substanzen verschiedene physiologische Reaktionen bei den Probanden untersucht. Diese Messungen hatten teilweise explorativen Charakter und dienten hauptsächlich der Methodenentwicklung. Die verwendeten Messgrößen waren: (1) endonasale Schwellung (optische Rhinometrie mit RHINOLUX-Sensorbrille, z.B. bei Acetaldehyd), (2) Atemtiefe (Atemgurt und Logger-System Becker Meditec, z.B. bei SO<sub>2</sub> und Mercaptoethanol) und elektrodermale Aktivität (EDA-Elektroden und Logger-System Becker Meditec bei Mercaptoethanol). In den Vorversuchen mit Acetaldehyd zeigte sich, dass die optische Rhinometrie nicht geeignet ist, um unterschiedliche Konzentrationsstufen miteinander zu vergleichen. Damit können mit dieser Technik keine Dosis-Wirkungsbeziehungen bei kurzfristigen Reizstoffprovokationen abgeleitet werden. Die Atemtiefe und die elektrodermale Aktivität eigneten sich für diese Zwecke und im Addendum zu diesem Abschlussbericht findet sich die ausführliche Methoden- und Ergebnisbeschreibung für den Versuch mit der Modellsubstanz Mercaptoethanol.

#### **4.5 Arbeits- und Zeitabläufe**

Die Abbildungen 3 und 4 stellen die geplanten Zeitachsen für die Arbeitsschritte der zwei Forschungsebenen des Verbundprojektes und die enge Verzahnung mit dem FBK dar.

**Forschungsebene**

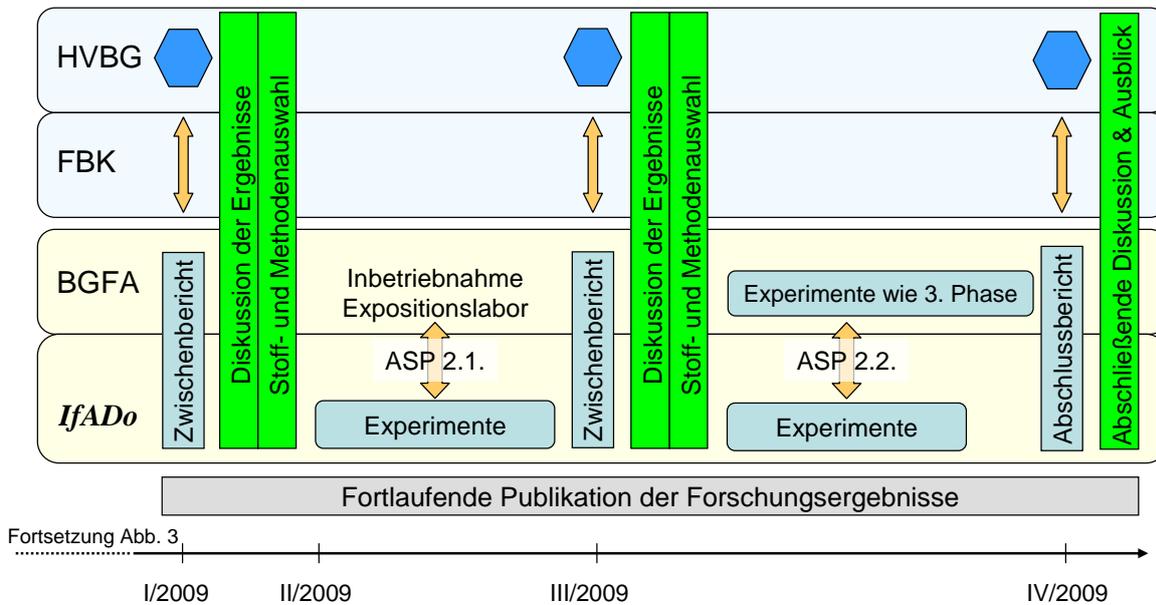
**(1) substanzbezogene Basis- und Effektdaten lokaler Reizstoffe**



**Abbildung 3:** geplante Zeitachse der Forschungsebene 1: substanzbezogene Basis- und Effektdaten lokaler Reizstoffe (ASP 1.1 - 1.3).

**Forschungsebene**

**(2) Prävention kognitiver Effekte als Folge der chemosensorischen Reizstoffwahrnehmung**



**Abbildung 4:** geplante Zeitachse der Forschungsebene 2: Prävention kognitiver Effekte als Folge der chemosensorischen Reizstoffwahrnehmung (ASP 2.1 und 2.2).

Tabelle 3 gibt die zur Durchführung der ASPs genutzten Zeiträume zusammen mit den jeweils beteiligten Kooperationspartnern an. Die Experimente fanden ausnahmslos im IfADo

statt. Probennahme und Analysen von Atemkondensat und NO im Exhalat wurden von Mitarbeitern des IPA (früher BGFA) durchgeführt.

**Tabelle 3:** Zeiträume (Quartale) der jeweiligen Versuchsdurchführungen und beteiligte Kooperationspartner.

Zeitraum	ASP	Arbeitsstoffe	Kooperationspartner	sonstige Vorhaben
I - III 2007	ASP 1.1	2-Butanol, Acetaldehyd, Methylmethacrylat, Dimethylsuccinat, Pyrrolidin, 2-Ethylhexylacrylat	IfADo	
IV 2007	ASP 1.2	Machbarkeitsstudie optische Rhinometrie mit Acetaldehyd	IfADo	Aufbau- phase des ExpoLab im IPA
I - IV 2008	ASP 1.3	Acetaldehyd, Ethylacrylat	IfADo, IPA	
I 2009	ASP 1.2	Machbarkeitsstudie Atemtiefe mit SO <sub>2</sub>	IfADo	
II – III 2009	ASP 2.1	H <sub>2</sub> S	IfADo	
III 2009 - I 2010	ASP 2.2	Methylmethacrylat, 2-Ethylhexanol	IfADo	
IV 2009 - I 2010	ASP 1.2	Mercaptoethanol	IfADo	

Der Vergleich von Tabelle 3 und Abbildungen 3 und 4 verdeutlicht, dass die Experimente der ASPs 1.1, 1.3, 2.1 und 2.2 wie geplant durchgeführt wurden. Es ergaben sich lediglich Verzögerungen bei der Durchführung der Experimente des ASP 1.2, was durch die methodischen Probleme bei der Auswahl der physiologischen Parameter verursacht wurde.

## 5. Ergebnisse des Gesamtvorhabens

Gemäß der Vorgaben für einen Abschlussbericht der DGUV werden im Folgenden die Kernergebnisse dargestellt. Details finden sich in den Zwischenberichten.

### 5.1 Praxistaugliche Erweiterung der statischen Olfaktometrie (ASP 1.1 Screening)

Ausgangspunkt dieses ASPs waren Beobachtungen aus der ersten Förderphase, die zeigten, dass chemosensorische Schwellen teilweise nur mit erheblichen Schwierigkeiten und starken inter-individuellen Schwankungen gemessen werden konnten (vor allem für Stoffe wie Ammoniak und Ethylacrylat). Es sollte daher eine alternative und optimierte Applikationsform gesucht werden, die ohne den technischen Aufwand eines modifizierten Flow-Olfaktometers (Smeets et al., 2007) Geruchs- und Reizschwellen für Chemikalien mit unterschiedlichsten physikalisch-chemischen Eigenschaften liefert. Gasdichte Beutel mit vollständig verdampften Arbeitsstoffen in unterschiedlichen Konzentrationen sollten als Alternative zu den „Riechflaschen“ erprobt werden.

Die Ergebnisse der Flaschen- und Beutel-Experimente mit den ausgewählten Arbeitsstoffen (siehe *Zwischenbericht 2008*) zeigten, dass die Messung von chemosensorischen Schwellen auch mit dem alternativen Verfahren möglich ist und bis auf wenige Ausnahmen vergleich-

bare Ergebnisse liefert. In einigen kritischen Fällen konnten durch das alternative Verfahren die Ergebnisse verbessert werden. So konnte zum Beispiel beim „Niedrigsieder“ Acetaldehyd (Siedepunkt 20°C, GESTIS Datenbank des IFA) der Anteil der Personen, die bis zur dargebotenen Maximalkonzentration sicher lateralisiert werden konnten, erhöht werden, obwohl in den Beuteln niedrigere Konzentrationen zur Bewertung präsentiert wurden als in den Flaschen. Für die Substanzklasse der „Niedrigsieder“ sind die Gasbeutel möglicherweise besser geeignet, um stabile Reizstoffproben zum Paarvergleich intranasal zu applizieren.

Für andere Substanzen (z.B. 2-Butanol, Dimethylsuccinat) wurden jedoch erhebliche Unterschiede bei der Ableitung chemosensorischer Schwellen aus den beiden untersuchten Verfahren deutlich. Die Ursachen für diese Unterschiede liegen zum einen in den verschiedenen Konzentrationen, die tatsächlich auf den einzelnen Konzentrationsstufen präsentiert wurden (siehe *Anhang Zwischenbericht 2008*), zum anderen gelten die dargestellten Unterschiede für Reizstoffe mit besonderen physikalisch-chemischen Eigenschaften (z. B. Siedepunkt, Reaktivität, etc.). Mit einem Siedepunkt von 196°C (GESTIS Stoffdatenbank des IFA) gehört Dimethylsuccinat eher zu den sog. „Hochsiedern“, also den wenig flüchtigen Substanzen, so dass es unter normalen Temperaturbedingungen auch in den Beuteln zu Re-Kondensierungsprozessen kommen kann. So ist die notwendige zeitliche Stabilität der Reizstoffkonzentration in den Applikationsbehältern (Beutel oder Flasche) von vornherein nur schwer sicherzustellen. Ähnliches gilt auch für die Ergebnisse des Arbeitsstoffes 2-Ethylhexylacrylat. Sie ist mit einem Siedepunkt von 214°C ebenfalls eine wenig flüchtige Substanz, die darüber hinaus noch die Tendenz zur Polymerisation besitzt. Für die betriebliche Prävention ist es in diesen Fällen angebracht, zunächst die Maximalkonzentrationen unter „Normalbedingungen“ zu messen, um diese anschließend auf mögliche adverse Effekte hin zu untersuchen (z.B. durch experimentelle Expositionen).

Systematische Unterschiede, die eine eindeutige Empfehlung für das eine oder andere Verfahren rechtfertigen würden, ergaben sich aus den Daten nicht. Bei der Etablierung eines Screeningverfahrens sollte auf eine ausgewogene Kosten-Nutzen Kalkulation geachtet werden. Dem enormen Aufwand bei der Herstellung der Beutel steht nach den Ergebnissen des ASP 1.1 kein entsprechender Nutzen im Sinne der angestrebten Optimierung gegenüber. Sollten nicht entsprechende Substanzcharakteristika (siehe „Niedrigsieder“) eine Nutzung der Riechflaschen einschränken, sollte unter ökonomischen Gesichtspunkten die Bestimmung chemosensorischer Schwellen mit der „Flaschen“-Technik erfolgen. Dabei ist eine exakte, chemisch-analytische Bestimmung der Kopfraumkonzentrationen von herausragender Bedeutung. Nur mit exakten Messwerten und hohen Standards in der Analytik können gesicherte Ableitungen aus den psychophysischen Schwellenbestimmungen erzielt werden. Die Daten und Erkenntnisse dieses Arbeitsschwerpunkts sollten bereits bei der Planung weiterer Substanzscreenings berücksichtigt werden, damit Aussagen zu Konzentrationsbereichen möglich sind, in denen mit (a) Geruchs- und (b) Reizeffekten zu rechnen ist.

## **5.2 Dynamische Olfaktometrie: Erweiterung um physiologische Methoden (ASP 1.2)**

Bisher waren die Dosis-Wirkungsbeziehungen, die auf Experimenten der dynamischen Olfaktometrie beruhen (i.d.R. neun Konzentration, fünfmal für 2 Sekunden intranasal appliziert), auf rein subjektive Effekte (Ratings) beschränkt. Diese Daten sind für die Ableitung von Grenzwerten nur eingeschränkt geeignet. Um dieses Screeningverfahren auch für die be-

triebliche Prävention durch gesundheitsbasierte Grenzwerte nutzen zu können, sollten „objektive“, physiologische Variablen integriert werden.

Bei der Auswertung von drei unterschiedlichen physiologischen Variablen (intranasale Schwellung, Atemtiefe und EDA), deren Daten während mehrerer Vorversuche am dynamischen Olfaktometer TO7 erfasst worden waren, ergab sich das folgende Bild:

- (1) Bei mehreren potenten Reizstoffen (u.a. Acetaldehyd) zeigte sich im Bereich der Konzentrationen, die bei den bisherigen Versuchen im IfADo eingesetzt und vorher von der zugehörigen Ethikkommission genehmigt worden waren, keine Blutvolumenzunahme durch einen Schwellungsprozess, der durch die Reizstoffapplikation an den intranasalen Schleimhäuten ausgelöst wurde. Obwohl bei der Behandlung von Allergieklienten (Bestimmung von allergie-auslösenden Substanzen) mit dieser Messmethodik (RHINOLUX-Sensorbrille) bereits sehr gute Resultate erzielt wurden (Mittenzwey et al., 2007; Wustenberg et al., 2007), musste der Einsatz dieser zunächst sehr vielversprechenden, kontinuierlich und nicht-invasiv messenden Methodik beim Screening von Reizstoffen verworfen werden.
- (2) In einem weiteren Vorversuch, in dem die Atemtiefe bei Reizstoffexposition ( $\text{SO}_2$ ) am Flow-Olfaktometer als abhängige Variable erhoben wurde, zeigten sich hohe interindividuelle Unterschiede in den Daten der freiwilligen, gesunden Probanden. Die Ermittlung belastbarer und allgemeingültiger Aussagen aus derartigem Datenmaterial ist damit aus statistischer Sicht sehr schwierig und erfordert höhere Stichprobenumfänge. Bei der Erfassung der Messdaten sind zudem - bedingt durch Olfaktometer und momentan vorhandenes Atem-Messsystem - sehr artifizielle Versuchsbedingungen notwendig, die eine Extrapolation der Resultate auf die Arbeitswelt zusätzlich erschweren. Im Versuch mit der Modellsubstanz Mercaptoethanol (siehe *Addendum zum Abschlussbericht*) waren die auswertbaren Atemsignale im Einzelversuch erfassbar und es zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen niedrigster und höchster bzw. zweitniedrigster und höchster Konzentration. Eine mathematische Modellierung der Daten zur Ableitung kritischer Konzentrationen (z.B. Reduktion der Atemtiefe um 10%) war jedoch nicht möglich.
- (3) Dagegen zeigte sich bei der Einbeziehung der elektrischen Hautleitfähigkeit (EDA) in den Screeningprozess der dynamischen Olfaktometrie bei Mercaptoethanol, einer sehr unangenehm riechenden Substanz, ein signifikanter dosisabhängiger Verlauf (vgl. *Addendum 2010*), der zudem im Sinne der konvergenten Validität den parallel abgefragten subjektiven Einschätzungen (z.B. ekelerregend) der Expositionssituationen entsprach.

Die Ergebnisse des abschließenden Experiments dieses ASPs mit der Modellsubstanz Mercaptoethanol verdeutlichten auch, dass bei wiederholter Konfrontation mit dem Reizstoff eine Reduktion der Effekte zu beobachten war.

### **5.3 Substanzbezogene Basis- und Effektdaten lokaler Reizstoffe (ASP 1.3 ExpoLab)**

Die beiden Experimente des ASPs komplettierten (a) für Ethylacrylat die abgestufte Untersuchung von Reizstoffen mittels Screeningverfahren und experimentellen Expositionen und

(b) lieferten für Acetaldehyd belastbare Daten für die Ableitung gesundheitsbasierter Grenzwerte.

### Acetaldehyd

Die primären Effekte von Acetaldehyd beschränken sich auf schwache bis mäßige Geruchseffekte, die subjektiv von den Probanden als schwache Geruchsbelästigung berichtet wurden. Irritative Effekte konnten weder auf Erlebensebene noch auf physiologischer Ebene beobachtet werden. Der nasale Atemwiderstand war nach dem Verlassen des Expositionslabors generell erhöht. Über die Expositionsbedingungen hinweg betrachtet, besteht kein systematischer Zusammenhang zwischen diesem physiologischen Marker primärer Reizwirkungen und der Acetaldehyd-Konzentration. Ein ähnliches, expositionsunabhängiges Reversionsmuster konnte für die Lidschlussfrequenz festgestellt werden. Auf sekundärer Ebene fanden sich, passend zur geringen Belästigung und der damit unwahrscheinlichen Ablenkung der Aufmerksamkeit von den verschiedenen Leistungstests, keine dosisabhängigen Leistungsveränderungen.

Das BMD Modell wurde exemplarisch bezüglich zweier Endpunkte angewendet, die signifikant mit der Expositionshöhe anstiegen (LMS Ratings Geruchsintensität und Lästigkeit). Legt man willkürlich die Einschätzung ‚stark‘ auf der LMS-Skala als mögliches Kriterium adverser Geruchseffekte fest, so ergeben sich untere kritische Grenzen (BMDLs), die noch deutlich über dem untersuchten Expositionsbereich und damit oberhalb des aktuellen MAK-Wertes von 50 ppm liegen. Die Analyse der auswertbaren biochemischen Indikatoren (Substanz P und 15-HETE) zeigte keine expositionsbezogenen Zusammenhänge, so dass auch auf dieser Nachweisebene primäre Reizeffekte durch Acetaldehyd ausgeschlossen werden konnten.

### Ethylacrylat

Das Experiment untersuchte Geruchs- und Reizeffekte von Ethylacrylat unter 2 konstanten und 2 variablen Expositionsbedingungen, mit vergleichbaren, zeitgemittelten Konzentrationen ( $C_{TWA}$ ) von 2,5 und 5 ppm. Als primäre Effekte zeichnen sich auf subjektiver Ebene ein intensives Geruchserleben und differenzierte Reizungswahrnehmungen ab. Vor allem während der beiden variablen Expositionsbedingungen waren, trotz Unterschieden in der  $C_{TWA}$ , Ratings der olfaktorisch vermittelten Empfindungen (z.B. ekelerregend) deutlich erhöht. Die Ergebnisse der Ratings (primäre Effekte, subjektiv) verdeutlichten vor allem in den 5 ppm  $C_{TWA}$ -Bedingungen eine Zunahme trigeminal vermittelter Effekte (z. B. Augenreizungen) mit zunehmender Expositionsdauer (zeitliche Effektkumulation). Vor allem im Szenario mit Expositionsspitzen von 10 ppm berichteten die Probanden auf der LMS Skala starke Augenreizungen.

Während die Rhinomanometrie keine systematischen Effektmuster zeigt, finden sich in der Lidschlussfrequenz Veränderungen, die zu den Expositionsmustern und den eben beschriebenen, subjektiven Einschätzungen passen. Bei der variablen 5 ppm Expositionsbedingung ist die Lidschlussfrequenz im Vergleich zur Kontrollbedingung mit  $23,2 \text{ min}^{-1}$  gegenüber  $17,7 \text{ min}^{-1}$  signifikant erhöht. Die Expositionsspitze am Ende dieser Bedingung führte zu einer Erhöhung der mittleren Lidschlussfrequenz auf fast  $30 \text{ min}^{-1}$ . Die Ergebnisse der Analysen der nasalen Lavageflüssigkeit unterstützen die Vermutung, dass bei 5 ppm mit physiologisch verifizierbaren Reizeffekten gerechnet werden muss.

Auf sekundärer Ebene fanden sich keine systematischen dosisabhängigen Leistungsveränderungen. Jedoch zeigt sich auch hier über alle Aufgabenparameter hinweg eine Tendenz zur

Leistungsminderung bei den höchsten Expositionen. Beim der schwierigsten Version des Arbeitsgedächtnistest (3-back) machen die Probanden bei den 5 ppm C<sub>TWA</sub> Bedingungen signifikant mehr Fehler als in der Kontrollbedingungen.

In Tabelle 4 sind die Resultate der bei den Versuchen in ASP 1.3 überprüften Effekte aufgelistet, um eine Gesamtzusammenfassung und einen Vergleich zu ermöglichen.

**Tabelle 4:** Primäre und sekundäre Effekte für Acetaldehyd und Ethylacrylat (ASP.1.3 ).

	Acetaldehyd (50 ppm)	Ethylacrylat (10 ppm)
<b>Primäre Indikatoren</b>		
Belästigung	(-)	+
trigeminale Empfindungen	-	(+)
akute Symptome	-	(+)
Zeitverlauf	-	+
Rhinomanometrie	-	-
Lidschlussfrequenz	-	+
nasale Lavageflüssigkeit	-	(+)
<b>Sekundäre Indikatoren</b>		
Arbeitsgedächtnis	-	(+)
Flankierreizaufgabe	-	(+)

Die beiden experimentellen Expositionen führten bei den untersuchten Konzentrationen zu einem deutlich unterschiedlichen Erleben und Verhalten. Während bei Acetaldehyd im Wesentlichen Geruchseffekte beobachtet wurden, zeigten sich bei Ethylacrylat vermehrt irritative Wirkungen auf subjektiver und physiologischer Ebene. Eine potentielle, sekundäre Ablenkungswirkung auf Testleistungen deutet sich bei den höchsten Expositionen von Ethylacrylat an.

In der Acetaldehyduntersuchung wurde die Benchmark-Dosis-Methode (BMD) zur Berechnung eines kritischen Lower Confidence Limits der Adversität eingesetzt, so wie es bei vielen anderen toxikologischen Endpunkten ebenfalls gemacht wird. Die Daten und das Studiendesign lassen bei Acetaldehyd eine BMD-Analyse zu, das Verfahren lässt sich aber nur sinnvoll einsetzen, wenn allgemein akzeptierte Adversitätskriterien die Effekte, in diesem Fall für subjektive Ratingverfahren, angewendet werden.

#### **5.4 Prävention kognitiver Effekte als Folge der chemosensorischen Reizstoffwahrnehmung (ASP 2.1 ExpoLab "Wirkung")**

##### Schwefelwasserstoff

Das Experiment untersuchte Effekte unregelmäßig variierender Schwefelwasserstoffexpositionen in niedriger (0-1 ppm) und hoher Expositionsstufe (0-10 ppm) (vgl. Zwischenbericht 2010, p-9-11 und p 16-22). Die primären Effekte von Schwefelwasserstoff beschränken sich im 4h-Mittel auf schwache Geruchswirkungen, die von einer extrem schnellen Abnahme der Empfindungsstärken in den ersten 60 Minuten der Exposition begleitet waren. Die Ratings der olfaktorisch vermittelten Empfindungen (z.B. ekelerregend) waren nur zu Beginn der Exposition zwischen den beiden Konzentrationsstufen zu unterscheiden; im weiteren Verlauf der Exposition näherten sich die Ratings der verschiedenen Bedingungen einander an und es gab kaum Unterschiede zwischen den Expositionsszenarien. Irritative Effekte konnten weder auf Erlebensebene noch auf physiologischer Ebene beobachtet werden. Somit bestätigte

sich die Erwartung, dass es sich bei H<sub>2</sub>S um einen reinen Geruchsstoff handelt. Ein möglicher Einfluss der Expositionsbedingung zeigte sich nur in der Lidschlussfrequenz bei Frauen. Ein Einfluss der Instruktion, Konzentrationsspitzen zu zählen (Expositionssituation ‚beachtet‘) wurde nur in den Skalierungen der Empfindungen ‚Lästigkeit‘ und ‚Ekeleregend‘ beobachtet. Auf sekundärer Ebene wurden keine generalisierbaren, dosisabhängigen Leistungsveränderungen beobachtet. Wechselwirkungen mit dem Aufmerksamkeitsfaktor treten nicht systematisch in Erscheinung. Da keine biochemischen Indikatoren für die Stimulation olfaktorischer Rezeptorneurone existieren und trigeminale Effekte beim Geruchsstoff Schwefelwasserstoff nicht erwartet wurden, wurde auf die nasale Lavage zu Gunsten einer Geruchsfunktionsprüfung verzichtet. In der Funktion der Geruchsdiskrimination veränderte sich durch die akute Exposition gegenüber H<sub>2</sub>S nicht, Leistungen blieben konstant, so dass keine messbarer Effekt auf die generelle Geruchswahrnehmung der Probanden festzustellen war.

### **5.5 Alterungseffekte in Kombination mit olfaktorischen Defiziten (ASP 2.2 ExpoLab "Altern")**

#### Methylmethacrylat

Das Experiment untersuchte Effekte einer systematisch alternierenden hohen Exposition (0-100 ppm) gegenüber einer konstant niedrigen Exposition (5 ppm) unter Berücksichtigung von Alter und Geruchsfunktion (vgl. Zwischenbericht 2010, p 12-15 und 23-28). Die primären Effekte von Methylmethacrylat beschränken sich auf mäßige Geruchswirkungen und schwache irritative Wirkungen auf der Erlebensebene. Auf physiologischer Ebene bilden sich geringfügige Irritationseffekte über den Zeitfaktor ab, sie werden aber nicht über die Konzentrationsunterschiede moderiert. Es zeigt sich hinsichtlich der Lidschlussfrequenz eine unerwartete, möglicherweise zufällige Wechselwirkung zwischen Geruchsfunktion und Konzentration. Der Faktor Alter moderiert Empfindungsverläufe während der Exposition, den nasalen Durchfluss und Leistungsparameter. Ältere Untersuchungsteilnehmer zeigen in neuropsychologischen Leistungstests mäßige Schnelligkeit, aber hohe Genauigkeit. Der Faktor Geruchsfunktion zeigt nur vereinzelt Effekte: im Zusammenhang mit der Geruchsbewertung (‚Ekeleregend‘), mit der IOR-Leistung und eventuell mit der Lidschlussfrequenz. Diese Effekte sind nicht bewertungsrelevant.

Die Analyse biochemischer Indikatoren, die in der nasalen Lavageflüssigkeit analysiert werden konnten, zeigte keine expositionsbezogenen Zusammenhänge, so dass MMA eine deutlich geringere Potenz zur Auslösung von Reizeffekten besitzt als das ebenfalls untersuchte Acrylat, Ethylacrylat.

#### 2-Ethylhexanol

Das Experiment untersuchte Effekte einer konstanten, hohen Exposition (20 ppm) gegenüber einer konstanten, niedrigen Exposition (1,5 ppm) unter Berücksichtigung von Alter und Geruchsfunktion. Die primären Effekte von 2-Ethylhexanol sind durch mäßige Geruchswirkungen, aber auch durch leichte irritative Wirkungen geprägt. Die Irritationseffekte werden signifikant über die Faktoren Konzentration und Expositionsdauer moderiert. Die Lidschlussfrequenz steigt gering, aber hoch signifikant mit der Konzentration an. Der Nasendurchfluss ist bei der Nach-Expositionsmessung vermindert, hängt aber nicht von der Konzentration ab. Der Faktor Alter moderiert Empfindungsverläufe und Leistungsparameter während der Ex-

position. Der Faktor Geruchsfunktion zeigt vereinzelt Effekte auf Leistungsparameter, die aber komplex und schwer zu systematisieren sind. Die Analysen der nasalen Lavageflüssigkeit zeigen für 2-Ethylhexanol einen konzentrationsabhängigen Anstieg der prozentualen Veränderung der Substanz P-Konzentration, der statistisch jedoch nicht signifikant ist. Dennoch legen die konvergenten Ergebnisse der Lidschlussfrequenz, der biochemischen Indikatoren und subjektiven Empfindungen Reizeffekte bei 2-Ethylhexanol-Expositionen im Bereich des aktuellen MAK-Wertes nahe.

In Tabelle 5 sind die Resultate der drei Versuche der ASPs 2.1 und 2.2 in Übersichtsform aufgelistet, um eine Gesamtzusammenfassung und einen Vergleich zu ermöglichen.

**Tabelle 5:** Schematische Darstellung primärer und sekundärer Effekte der drei untersuchten lokalen Reizstoffe der ASPs 2.1 und 2.2.

	H <sub>2</sub> S (0-10 ppm)	MMA (0-100 ppm)	2-EH (20 ppm)
<b>Primäre Indikatoren</b>			
Belästigung	(-)	(-)	(+)
trigeminale Empfindungen	-	(+)	+
akute Symptome	-	(+)	+
Zeitverlauf	-	(+)	+
Rhinomanometrie	-	-	-
Lidschlussfrequenz	-	(+)	+
Geruchsfunktion	-		
nasale Lavageflüssigkeit		-	(+)
<b>Sekundäre Indikatoren</b>			
Arbeitsgedächtnis	-	(+)	(+)
Flankierreizaufgabe	-	(+)	(+)
Inhibition of Return	-	(+)	(+)
Einfache Reaktion (Quad.)	-	-	-
<b>Moderatoren</b>			
Aufmerksamkeit	(-)		
Alter		+	+
Geruchsfunktion		(+)	(+)

Die drei experimentellen Laborstudien führten in Abhängigkeit von den untersuchten Expositionsszenarien zu unterschiedlichen Effekten auf Erleben und Verhalten.

Während bei Schwefelwasserstoff im Wesentlichen Geruchseffekte beobachtet wurden, zeigten sich bei Methylmethacrylat minimale und bei 2-Ethylhexanol mäßige irritative Wirkungen auf subjektiver und physiologischer Ebene.

Die Moderatorvariable ‚Aufmerksamkeitsrichtung‘ zeigte im Zusammenhang mit der nicht-irritativ wirkenden Schwefelwasserstoffexposition nur wenig Wirkung auf Erlebens- und Leistungsvariablen. Von den beiden Moderatorvariablen Alter und Geruchsfunktion, untersucht in Wechselwirkung mit den leicht bis mäßig irritativ wirkenden Arbeitstoffen MMA und 2-EH, wies der Altersfaktor die konsistenteren Effekte auf.

Die Ergebnisse für 2-EH belegen unter anderem die in früheren Experimenten bei Expositionen bis 40 ppm festgestellte, relativ hohe trigeminale Potenz von 2-EH (Kiesswetter et al., 2005; van Thriel et al., 2005). Obwohl in der vorliegenden Studie auf die effektverstärkenden Expositionsspitzen verzichtet wurde, führte auch die konstante 20 ppm Exposition noch zu messbaren irritativen Effekten auf subjektiver und physiologischer Ebene.

## 6. Veröffentlichungen

Neben den Zwischenberichten an den Forschungsbegleitkreis, die diesem Abschlussbericht beigelegt sind, konnten aus dem laufenden Projekt bisher die folgenden Veröffentlichungen erzielt werden:

- Hey, K., Kleinbeck, S., Schäper, M., Kiesswetter, E., Blaszkewicz, M., Zimmermann, A., et al. (2009). Gibt es eine Veränderung der kognitiven Leistung durch lokale Reizstoffe?: experimentelle Untersuchung zu Acetaldehyd. In: *Arbeit, Beschäftigungsfähigkeit und Produktivität im 21. Jahrhundert: Bericht zum 55. Kongress der Gesellschaft für Arbeitswissenschaft vom 4.-6. März 2009, Dortmund* (S. 715-718) / hrsg. von der Gesellschaft für Arbeitswissenschaft e.V.; Schriftlgt.: Martin Schütte. Dortmund: GfA-Press.
- Hey, K., Kleinbeck, S., Schäper, M., Kiesswetter, E., Blaszkewicz, M., Zimmermann, A., et al. (2009). Beeinflusst die chemosensorische Wahrnehmung von Acetaldehyd die kognitive Leistung? In: *Krank und trotzdem arbeiten? Der chronisch Kranke im Erwerbsleben: Dokumentation Deutsche Gesellschaft für Arbeitsmedizin und Umweltmedizin e.V. , 49. Wissenschaftliche Jahrestagung, 11.-14. März 2009 in Aachen* (S. 739-742) / Hrsg. von Thomas Kraus ... Deutsche Gesellschaft für Arbeitsmedizin und Umweltmedizin e.V.. Lübeck: DGAUM.
- Hey, K., Kleinbeck, S., Schäper, M., Kiesswetter, E., Blaszkewicz, M., Zimmermann, A., et al. (2010). Ablenkung am Arbeitsplatz durch Geruch?: Experimentelle Untersuchung am Beispiel von Ethylacrylat. In: *Transport und Verkehr: Dokumentation der Deutschen Gesellschaft für Arbeitsmedizin und Umweltmedizin e.V. ; 50. wiss. Jahrestagung, 16.-19. Juni 2010 in Dortmund* (S. 144-147) / hrsg. von Barbara Griefahn, Klaus Golka, Jan G. Hengstler, Hermann M. Bolt. Lübeck: DGAUM.
- Kleinbeck, S., Kiesswetter, E., Schäper, M., Blaszkewicz, M., Lehmann, M.-L., Golka, K., et al. (2010). Schwefelwasserstoff: Adaptation und Einfluss auf die Funktion der Nase. In: *Transport und Verkehr: Dokumentation der Deutschen Gesellschaft für Arbeitsmedizin und Umweltmedizin e.V. ; 50. wiss. Jahrestagung, 16.-19. Juni 2010 in Dortmund* (S. 139-143) / hrsg. von Barbara Griefahn, Klaus Golka, Jan G. Hengstler, Hermann M. Bolt. Lübeck: DGAUM.
- Schäper, M., Kleinbeck, S., Kiesswetter, E., Blaszkewicz, M., & van Thriel, C. (2008). Bewertung von Reizstoffen durch Irritationsschwellen - methodische Variationen. In: *Ethische Fragen in der Arbeitsmedizin: Dokumentation Deutsche Gesellschaft für Arbeitsmedizin und Umweltmedizin e.V. , 48. Wissenschaftliche Jahrestagung, 12.-15. März 2008 in Hamburg* (S. 631-633) / Hrsg. von Xaver Baur, Evelyn Glensk. Deutsche Gesellschaft für Arbeitsmedizin und Umweltmedizin e.V.. Aachen: DGAUM.
- Schäper, M., Kleinbeck, S., Kiesswetter, E., Blaszkewicz, M., Lehmann, M.-L., Golka, K., et al. (2010). Sensorische Irritationswirkungen versus emotionale Reaktion: Ergebnisse aus experimentellen Schwefelwasserstoffexpositionen. In: *Transport und Verkehr: Dokumentation der Deutschen Gesellschaft für Arbeitsmedizin und Umweltmedizin e.V. ; 50. wiss. Jahrestagung, 16.-19. Juni 2010 in Dortmund* (S. 148-152) / hrsg. von Barbara Griefahn, Klaus Golka, Jan G. Hengstler, Hermann M. Bolt. Lübeck: DGAUM.
- van Thriel, C., Bünger, J., & Brüning, T. (2008). Reizstoffe in der aktuellen Grenzwertdiskussion: Gemeinschaftsprojekt zu Reizstoffen generiert Daten zur Aufstellung von gesundheitsbasierten Grenzwerten. *BGFA-Info*, 1, 21-23.
- van Thriel, C., Schäper, M., Kleinbeck, S., Kiesswetter, E., Zimmermann, A., Golka, K., et al. (2010). Reizwirkungen durch Ethylacrylat: Ergebnisse experimenteller Expositionen. In: *Transport und Verkehr: Dokumentation der Deutschen Gesellschaft für Arbeitsmedizin*

*und Umweltmedizin e.V. ; 50. wiss. Jahrestagung, 16.-19. Juni 2010 in Dortmund (S. 134-138) / hrsg. von Barbara Griefahn, Klaus Golka, Jan G. Hengstler, Hermann M. Bolt. Lübeck: DGAUM.*

Die Publikation der Ergebnisse in internationalen, „peer-reviewten“ Zeitschriften ist geplant und die Manuskripterstellung wird nach der Abgabe dieses Abschlussberichts beginnen.

## 7. Bewertung der Ergebnisse

Die gesetzten Forschungsziele konnten, bis auf wenige Ausnahmen, in vollem Umfang erreicht werden. Die Ergebnisse des Forschungsprojektes liefern (a) dringend benötigte Humandaten für die Ableitung gesundheitsbasierter Grenzwerte für mehrere Arbeitsstoffe und (b) erste Erkenntnisse zu möglichen Modulatoren von Dosis-Wirkungsbeziehungen in der Reizstoff-Forschung.

Für leicht flüchtige Reizstoffe wie z.B. Ammoniak, für das keine zufrieden stellende Geruchs- und Irritationsschwelle mit der Riechflaschen-Technik bestimmt werden konnte (van Thriel et al., 2006), steht mit der neuentwickelten Beutel-Technik ein valides Verfahren zur Verfügung, das orientierende Messungen bei Arbeitsstoffen mit unklaren chemosensorischen Effekten ermöglicht. Existieren bei der gesundheitlichen Bewertung von Arbeitsstoffen keine oder nur unzureichende Informationen, um die fragliche Chemikalie als Reizstoff zu klassifizieren, so kann mit diesem psychophysischen Verfahren in relativ kurzer Zeit diese Wissenslücke geschlossen werden. Basierend auf diesen Informationen können umfassendere Studien initiiert werden und den betroffenen ArbeitnehmerInnen können erste Informationen über die Potenz des kritischen Arbeitsstoffes gegeben werden. Stellt sich bei diesem Screening heraus, dass der extrem flüchtige Arbeitsstoff eine niedrige Irritationsschwelle besitzt, so können für die betriebliche Praxis (a) alternative Arbeitsstoffe mit geringerem chemosensorischen Effektpotential gesucht werden oder (b) das Tragen von persönlicher Schutzausrüstung (PSA) bei Gefahrstoffkontakt empfohlen werden.

Für eine bessere Bewertung der potentiellen Gesundheitseffekte von Reizstoffen sind vertiefende Messungen nötig. Die im Verbundprojekt weiterentwickelte Methode der experimentellen Expositionen (ExpoLab Versuche) stellt momentan im Humanbereich ein alternativloses Verfahren dar, um ohne bzw. mit weniger Sicherheitsfaktoren Arbeitsplatzgrenzwerte aufstellen zu können. Im Hinblick auf die Lidschlussfrequenz (LSF) konnten frühere Ergebnisse zum Arbeitsstoff 2-Ethylhexanol (Kiesswetter et al., 2005) an einem alters- und geschlechtsheterogenem Kollektiv repliziert werden. Somit wurde die Sensitivität der LSF für „objektiv-messbare“ Reizeffekte belegt. Auch die statistisch zwar nicht signifikante Erhöhung der Substanz P-Konzentration in der Nasallavageflüssigkeit ist ein konvergenter Hinweis auf die Reizwirkung dieser Substanz. Die Konvergenz der unterschiedlichen Effektebenen zeigt sich in beeindruckender Weise im ExpoLab-Versuch mit Ethylacrylat. In den höchsten  $C_{TWA}$  Bedingungen (5 ppm) ist (a) die Lidschlussfrequenz erhöht, sind (b) die subjektiven Angaben zu Augenreizungen erhöht und zeigen einen steigenden Trend über die Expositionsdauer und legen (c) die erhöhten Fehlerraten in der schwierigen Arbeitsgedächtnisaufgabe sekundäre Effekte durch chemosensorische Ablenkung nahe. Einzelne, hoch spezifische Effektmarker für sensorische Irritationen existieren im Humanbereich nicht und werden in absehbarer Zeit auch nicht zur Verfügung stehen. Der Mehr-Ebenen-Ansatz, der im Laufe der bisherigen Förderphasen entwickelt und nun nochmals verfeinert wurde, stellt augenblicklich die einzi-

ge Möglichkeit dar, die gesundheitsrelevanten Effekte durch Reizstoffe zu detektieren und ihre Adversität zu bewerten.

Bei der systematischen Untersuchung sekundärer Effekte durch reine Geruchsstoffe (ASP 2.1 ExpoLab „Wirkung“) ist es mit Schwefelwasserstoff (H<sub>2</sub>S) nicht gelungen, die ausreichend starke und zeitlich stabile Geruchsbelästigung zu induzieren, die potentiell in der Lage wäre, kognitive Effekte auszulösen. Die postulierte Re-Adaptation des olfaktorischen Systems während der niedrigen Expositionsphasen blieb aus, oder war nicht ausreichend, um unangenehme Emotionen wie Ekel längerfristig zu induzieren. Unsere Ergebnisse decken sich mit einer US-amerikanischen Studie (Fiedler et al., 2008), die ebenfalls keine kognitiven Leistungseinbußen bei akuten H<sub>2</sub>S Expositionen von 5 ppm finden konnten.

Im abgeschlossenen Verbundprojekt wurde erstmals der gesellschaftlich hoch relevante Faktor *Alter* als möglicher Modulator akuter Reizstoffeffekte untersucht. Diese systematische Variation des Faktors *Alter* in experimentellen Reizstoffuntersuchungen ist - nach unserem Wissen - weltweit einzigartig. Die bisherigen Ergebnisse verdeutlichen, dass ältere ArbeitnehmerInnen nicht empfindlicher auf akute Reizstoffexpositionen reagieren als jüngere ArbeitnehmerInnen. Dies gilt insbesondere für die physiologischen und „objektiven“ Effektmarker. Auch eine erhöhte Ablenkbarkeit durch chemosensorische Reize aus der Umgebungsluft konnte bei den älteren StudienteilnehmerInnen nicht gefunden werden. Altersbedingte Defizite in kognitiven Leistungen, die den exekutiven Funktionen zugeordnet sind, sind in der Literatur beschrieben (Wild-Wall et al., 2008) und konnten in unseren Untersuchungen repliziert werden. Unsere Experimente zeigen aber auch, dass sich auch die älteren ProbandInnen trotz dieser altersbedingten Veränderungen gegen belästigende Gerüche und schwache sensorische Reizungen „abschirmen“ können und teilweise genauer arbeiten als die jüngeren StudienteilnehmerInnen. In einer flexibilisierten Arbeitswelt, in der auch ältere ArbeitnehmerInnen neue Tätigkeiten übernehmen oder den Arbeitsplatz wechseln müssen, sind diese Studienergebnisse, auch wenn sie in weiteren Studien belegt werden müssen, von herausragender Bedeutung, da sie verdeutlichen, dass keine zusätzlichen Präventionsmaßnahmen notwendig sind, wenn ältere ArbeitnehmerInnen erstmals mit Reizstoffen in Kontakt kommen. Die Rolle der Geruchsfunktion als Modulator akuter Reiz- und Geruchseffekt konnte in den vorliegenden Experimenten nicht eindeutig beantwortet werden, da (a) die untersuchten Gruppen durch die gleichzeitige Variation des Faktors Alter recht klein waren und (b) die tatsächlichen Unterschiede in den Geruchsfunktionen eher gering waren. Dass vor allem die Geruchsdiskriminationsfähigkeit Einfluss auf die Reizstoffwahrnehmung nimmt, konnte in früheren Experimenten gezeigt werden (van Thriel et al., 2008) und es erscheint sinnvoll, sich in weiteren Experimenten speziell auf diesen Funktionsbereich zu konzentrieren und Gruppen auszuwählen, die in ihren Leistungen deutlicher auseinander liegen. Darüber hinaus erscheint die parallele Untersuchung von angenehmen und unangenehmen Gerüchen sinnvoll, um diesen potentielle Modulator von Dosis-Wirkungsbeziehung bei akuten Reizstoffexpositionen genauer zu untersuchen.

Die Erweiterung der dynamischen Olfaktometrie um „objektivierende“, physiologische Methoden ist, wie die Ergebnisse der Experimente im ASP 1.2 gezeigt haben, prinzipiell möglich, die Durchführung und Auswertung ist jedoch extrem zeit- und personalaufwendig. Prinzipiell sind beide Variablen (EDA und Atemtiefe) in der Lage, physiologische Reaktionen von Probanden auf die Modellsubstanz Mercaptoethanol zu erfassen. Durch die erhebliche interindividuelle Variation dieser Parameter sind jedoch „hohe“ Konzentrationen notwendig, um

Substanzeffekte statistisch abgesichert messen zu können. Als erweitertes Screening für mögliche gesundheitliche Effekte durch Reiz- oder Geruchsstoffe kann dieses Verfahren mit der aktuell verfügbaren Technik nicht eingesetzt werden. Es existieren jedoch neuere Messmethoden und robustere Techniken, die es ermöglichen, reflexartige Reaktionen (trigeminal vermittelt) des Atemsystem und autonome Reaktionen (olfaktorisch vermittelt), wie die Erhöhung des Sympathikotonus bei emotional-affektiven Reaktionen, differenzierter und genauer zu messen.

## 8. Umsetzungs- und Verwertungsplan

Mit der Verwertung der Ergebnisse wurde bereits begonnen, da der Studienleiter am IfADo (Dr. van Thriel) und der Projektverantwortliche am IPA (Prof. Brüning) Mitglieder in den nationalen Gremien der Gefahrstoffregulation (MAK-Kommission, UA III des Ausschuss für Gefahrstoffe) sind. So wurden die Ergebnisse zu Schwefelwasserstoff zeitnah in die Beratungen des UA III über die Übernahme des MAK-Wertes von 5 ppm als Arbeitsplatzgrenzwert (AGW) eingebracht. Auf der Sitzung im Herbst 2010 wurde dann der AGW auf 5 ppm festgelegt. Auch für die anderen Arbeitsstoffe (Acetaldehyd, 2-Ethylhexanol) haben die Studienergebnisse die Ableitung gesundheitsbasierter Grenzwerte entschieden beeinflusst. So können durch die Zwischenberichte und wissenschaftlichen Publikationen die Präventionsbemühungen der DGUV auf regulatorischer Ebene aktiv unterstützt werden. Die Ergebnisse zu Ethylacrylat (siehe Zwischenbericht 2009 und Addendum zu Abschlussbericht) legen eine Überprüfung des MAK-Wertes nahe. Daher ist geplant, bis zum 1. Quartal 2011 ein Manuskript über die Ergebnisse in einem toxikologischen Journal einzureichen. Auch die Ergebnisse zu 2-Ethylhexanol sollen möglichst zeitnah publiziert werden. Die Publikation der Studienergebnisse und der entwickelten Methoden in der wissenschaftlichen Literatur kann eine breitere und internationale Diskussion über die gesundheitliche Bewertung von Reiz- und Geruchseffekten initiieren, um diesem arbeitsplatzrelevanten Problembereich ausreichend wissenschaftliche Aufmerksamkeit zu schenken. Vor dem Hintergrund der enormen Menge lokal wirkender Reizstoffe am Arbeitsplatz ist es notwendig, die bisherigen Ergebnisse so zu bewerten, dass die Ideen und Methoden aufgegriffen werden und andere Arbeitsgruppen ähnliche Experimente durchführen können, um Datenlücken zu Einzelstoffen oder allgemeingültigen Mechanismen zu füllen.

Um die Ergebnisse des Forschungsprojektes in der betrieblichen Praxis besser umzusetzen, wird für 2011 ein Workshop mit VertreterInnen der BG angestrebt (erweiterter Forschungsbegleitkreis), um Strategien zu diskutieren, wie die Ergebnisse des Forschungsprojekts für die Verantwortlichen vor Ort (z.B. Fachkräfte für Arbeitssicherheit, Betriebsärzte) nutzbar gemacht werden können. Neben den regelmäßigen Beiträgen zu den Jahrestagungen der DGAUM streben wir einen Wissenstransfer in weitere, nicht-wissenschaftliche Anwenderkreise an und erhoffen uns dabei die Unterstützung der DGUV-Gremien, insbesondere der Präventionsabteilungen.

## Literatur

- Fiedler, N., Kipen, H., Ohman-Strickland, P., Zhang, J., Weisel, C., Laumbach, R., et al. (2008). Sensory and cognitive effects of acute exposure to hydrogen sulfide. *Environ Health Perspect*, 116(1), 78-85.
- Kiesswetter, E., van Thriel, C., Schaper, M., Blaszkewicz, M., & Seeber, A. (2005). Eye blinks as indicator for sensory irritation during constant and peak exposures to 2-ethylhexanol. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 19(3), 531-541.
- Smeets, M. A. M., Bulsing, P. J., van Rooden, S., Steinmann, R., de Ru, J. A., Ogink, N. W. M., et al. (2007). Odor and irritation thresholds for ammonia: A comparison between static and dynamic olfactometry. *Chemical Senses*, 32(1), 11-20.
- van Thriel, C., Kiesswetter, E., Schaper, M., Blaszkewicz, M., Golka, K., & Seeber, A. (2005). An integrative approach considering acute symptoms and intensity ratings of chemosensory sensations during experimental exposures. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 19(3), 589-598.
- van Thriel, C., Kiesswetter, E., Schaper, M., Juran, S. A., Blaszkewicz, M., & Kleinbeck, S. (2008). Odor annoyance of environmental chemicals: sensory and cognitive influences. *J Toxicol Environ Health A*, 71(11-12), 776-785.
- van Thriel, C., Schaper, M., Kiesswetter, E., Kleinbeck, S., Juran, S., Blaszkewicz, M., et al. (2006). From chemosensory thresholds to whole body exposures-experimental approaches evaluating chemosensory effects of chemicals. *Int Arch Occup Environ Health*, 79(4), 308-321.
- Wild-Wall, N., Falkenstein, M., & Hohnsbein, J. (2008). Flanker interference in young and older participants as reflected in event-related potentials. *Brain Res*, 1211, 72-84.

Addendum zum Verbundprojekt

***Abgrenzung und Differenzierung  
,irritativer' und ,belästigender' Effekte  
von Gefahrstoffen - Fortsetzung***

Biochemische Analysen

zu

ASP 1.3 (Acetaldehyd, Ethylacrylat),  
ASP 2.2 (Methylmethacrylat, 2-Ethylhexanol)

und

ASP 1.2 (Olfaktometer „Erweiterung“)

November 2010

Autoren:  
Meinolf Blaszkewicz  
Kathrin Hey  
Ernst Kiesswetter  
Stefan Kleinbeck  
Michael Schäper  
Christoph van Thriel

## Inhalt

Inhalt.....	2
Biochemische Analysen der ASPs 1.3, 2.1 und 2.2.....	3
Parameterauswahl .....	3
Explorative Datenanalyse.....	3
Datenaufbereitung und –auswertung:.....	5
Ergebnisse: .....	5
ASP 1.3 ExpoLab „Substanzen“ Acetaldehyd .....	5
ASP 1.3 ExpoLab „Substanzen“ Ethylacrylat .....	7
ASP 2.2 ExpoLab „Altern“ Methylmethacrylat.....	8
ASP 2.2 ExpoLab „Altern“ 2-Ethylhexanol.....	9
Zusammenfassung.....	9
Literatur – Biochemische Analysen .....	10
ASP 1.2 Olfaktometrie „Erweiterung“ .....	11
Hintergrund .....	11
Methode.....	11
Stimulusdarbietung und Datenerfassung .....	12
Empfindungsstärken - Datenerfassung.....	12
Atemtiefe - Datenerfassung .....	12
EDA - Datenerfassung.....	12
Statistik.....	13
Ergebnisse .....	13
Empfindungsstärken - Skalierung der Stoffbewertungen.....	13
Physiologische Parameter - Atemtiefe.....	14
Physiologische Parameter - EDA .....	15
Zusammenfassung und Bewertung.....	15
Literatur – ASP1.2 Olfaktometrie „Erweiterung“ .....	17

## Biochemische Analysen der ASPs 1.3, 2.1 und 2.2

Im Addendum zu den Zwischenberichten 2009 und 2010 werden die Ergebnisse der biochemischen Analysen des nasalen Lavagefluid (NALF) für die experimentellen Expositionen des Arbeitsschwerpunktes (ASP) 1.3 ExpoLab „Substanzen“ (Arbeitsstoffe: Acetaldehyd, Ethylacrylat) und des ASP 2.2 ExpoLab „Altern“ (2-Ethylhexanol, Methylmethacrylat) dargestellt. Im ASP 2.1 ExpoLab „Wirkung“ (Schwefelwasserstoff) wurden keine biochemischen Analysen vorgenommen, da es sich bei diesem Arbeitsstoff nicht um einen trigeminal-wirksamen Reizstoff handelt.

### Parameterauswahl

In allen Experimenten wurden biochemische Indikatoren verschiedener biologischer Funktionen (z.B. Abwehrreaktionen des Immunsystems) untersucht, die als physiologische Reaktion des Organismus auf akute Reizstoffexpositionen denkbar sind. Im Einzelnen wurden die folgenden Bereiche und Parameter untersucht:

#### **(1) trigeminale Stimulation, neurogene Entzündung**

- a. *Calcitonin Gene-Related Peptide* (CGRP; blutgefäßrelaxierende Substanz)
- b. *Substanz P* (SP, Neurokinin, das u.a. die Durchlässigkeit der Gefäßwände steigert)

#### **(2) neuronale Plastizität/ Modulation trigeminaler Rezeptoren**

- a. *Nerve Growth Factor* (NGF, Wachstumsfaktor des Nervensystems, der möglicherweise mit Sensitivierungsprozessen in Verbindung steht)

#### **(3) Lokale und systemische Entzündungsprozesse/ Immunreaktion**

- a. *Interleukin-6* (IL-6, Zytokin des Immunsystems bei lokalen und systemischen Entzündungen; wichtiger Transkriptionsfaktor: NF- $\kappa$ B)
- b. *Tumornekrosefaktor alpha* (TNF- $\alpha$ , Zytokin des Immunsystems bei lokalen und systemischen Entzündungen)

#### **(4) Aktivierung von Epithelzellen der nasalen Schleimhäute**

- a. *15-Hydroxyeicosatetraenoic acid* (15-HETE, Indikator der Aktivierung von Epithelzellen zur Abwehr von Fremdstoffen)

Die Gewinnung der NALF-Proben erfolgte nach einem standardisierten Protokoll (siehe Anhang) jeweils vor der Exposition (prä-Messung) und direkt nach der Exposition (post-Messung). Im ersten Experiment (ASP 1.3. „Substanzen“ Acetaldehyd) wurden auch 3 Stunden nach Expositionsende NALF-Proben gewonnen, um etwaige Kinetikunterschiede in den verschiedenen Effektebenen abzudecken. Die Proben wurden unmittelbar nach der Gewinnung bei -80°C eingefroren und nach Abschluss aller Experimente gemeinsam analysiert.

### Explorative Datenanalyse

Bei den verwendeten Parametern handelt es sich um biochemische Variablen, deren Bestimmung in verschiedenen biologischen Matrices (z.B. Plasma, Urin) möglich ist. Dabei ist es a priori häufig nicht möglich, sicherzustellen, dass alle Proben Werte (Konzentrationen) oberhalb der Nachweisgrenze (NWG) liefern. Vor der eigentlichen statistischen Analyse möglicher Expositionseffekte ist es daher notwendig, die Anzahl der auswertbaren Proben mit Werten oberhalb der NWG zu prüfen. Zu diesem Zweck gibt Tabelle 1 eine Übersicht über die Anzahl der (1) analysierbaren Proben, (2) fehlenden Messungen (durch Fehltage der Probanden) und (3) Proben unterhalb der Nachweisgrenze des jeweiligen Analyse-Kits (Herstel-

lerangaben).

**Tabelle 1:** Anzahl der (1) analysierbaren Proben, (2) fehlenden Messungen (durch Fehltag der Probanden) und (3) Proben unterhalb der Nachweisgrenze des jeweiligen Analyse-Kits.

Parameter	Experiment (Substanz)	Anzahl der Proben	fehlende Daten	Proben < NWG <sup>#</sup>
CGRP	Acetaldehyd	228	12	228 (100%)
	Ethylacrylat	180	20	180 (100%)
	Methylmethacrylat	127	1	125 (98%)
	2-Ethylhexanol	119	9	114 (97%)
SP	Acetaldehyd	230	10	16 (7%)
	Ethylacrylat	181	19	36 (20%)
	Methylmethacrylat	126	2	18 (14%)
	2-Ethylhexanol	117	11	8 (7%)
NGF	Acetaldehyd	231	9	163 (71%)
	Ethylacrylat	182	18	123 (68%)
	Methylmethacrylat	127	1	103 (81%)
	2-Ethylhexanol	118	10	75 (64%)
IL-6	Acetaldehyd	231	9	229 (99%)
	Ethylacrylat	182	17	162 (89%)
	Methylmethacrylat	127	1	112 (88%)
	2-Ethylhexanol	119	9	107 (90%)
TNF- $\alpha$	Acetaldehyd	230	10	229 (99%)
	Ethylacrylat	182	18	180 (99%)
	Methylmethacrylat	127	1	127 (100%)
	2-Ethylhexanol	119	9	119 (100%)
15-HETE	Acetaldehyd	228	12	93 (40%)
	Ethylacrylat	177	20	80 (45%)
	Methylmethacrylat	126	2	59 (47%)
	2-Ethylhexanol	113	12	67 (59%)

Anmerkungen: <sup>#</sup>NWG: Nachweisgrenze des Herstellers

Aus Tabelle 1 wird deutlich, dass nur zwei Indikatoren, nämlich SP und 15-HETE in mehr als 50% der Proben nachgewiesen werden konnten. Die beiden Marker einer Immunreaktion (TNF- $\alpha$  und IL-6) konnten nur in einzelnen Proben nachgewiesen werden und auch für das Peptid CGRP waren nahezu alle Messungen unterhalb der Nachweisgrenze. Somit können diese Parameter keiner statistischen Analyse unterzogen werden.

Für das Neurotrophin NGF waren in 19 bis 36% der Proben Werte oberhalb der Nachweisgrenze zu messen. Die Daten wurden einer explorativen Datenanalyse unterzogen, um zu überprüfen, ob (a) verstärkt nach den Expositionen und (b) vor allem nach den hohen Expositionen Messwerte oberhalb der Nachweisgrenze gefunden wurden. Dazu wurden für die vier Experimente  $\chi^2$ -Tests auf Gleichverteilung der Anzahl der analysierbaren Proben (>NWG) berechnet.

Im **Acetaldehyd**-Experiment ergab sich bei der Auswertung der Verteilung dieser Messungen im verwendeten  $\chi^2$ -Test ein p-Wert von  $p=0.07$  ( $\chi^2_{14}=22,64$ ). Damit wird die Gleichverteilungshypothese aus statistischer Sicht zwar noch nicht abgelehnt - sie ist aber durch den gefundenen p-Wert in der Nähe des üblichen Signifikanzniveaus von  $p=0.05$  nicht sehr wahrscheinlich. Es zeigte sich eine gewisse Häufung von Proben > NWG bei vier Personen in der 37,5 ppm Bedingung. Die Mittelwerte der gemessenen Konzentrationen für NGF waren jedoch mit 0,05 ng/ml nur sehr knapp oberhalb der NWG (0,03 ng/ml) und dieser Wert wurde sowohl bei Messungen vor als auch nach der Exposition gefunden. Eine Erhöhung dieses

Parameters konnte daher nicht auf die Exposition zurückgeführt werden.

Für die Daten des **Ethylacrylat**-Experiments waren die Messungen mit Werten oberhalb der Nachweisgrenze über die 10 Messzeitpunkte nicht gleichverteilt ( $\text{CHI}^2_9=20,49$ ;  $p=0,02$ ). Hier lagen in den 5 ppm (konstant) und 0-5 ppm (variabel) Bedingungen deutlich mehr Messwerte oberhalb der NWG. Aber auch hier waren die Messwerte extrem niedrig und es gab keine bedeutsame Erhöhung der Messwerte von der prä- zur post-Messung. Somit ist auch hier ein Bezug der Variation zur Exposition unwahrscheinlich.

Für die Daten des **Methylmethacrylat**-Experiments ergab sich im verwendeten  $\text{CHI}^2$ -Test ein p-Wert von  $p=0,1$  ( $\text{CHI}^2_3=6,33$ ), so dass auch hier der statistische Test die Gleichverteilungshypothese auf den 4 Messpunkten zwar nicht ablehnte, sie aber durch den vorgefundenen p-Wert in der Nähe des üblichen Signifikanzniveaus von  $p=0,05$  nicht sehr wahrscheinlich war.

Bei **2-Ethylhexanol** ergab sich bei der Gleichverteilungsprüfung der Daten oberhalb der Nachweisgrenze ein p-Wert von  $p=0,2$  ( $\text{CHI}^2_3=4,72$ ). Damit liegt eine Gleichverteilung über die 4 Messpunkte nahe.

Die Daten für SP und 15-HETE wurden einer statistischen Datenanalyse unterzogen, wobei verschiedene Schritte zur Datenaufbereitung und –auswertung notwendig waren.

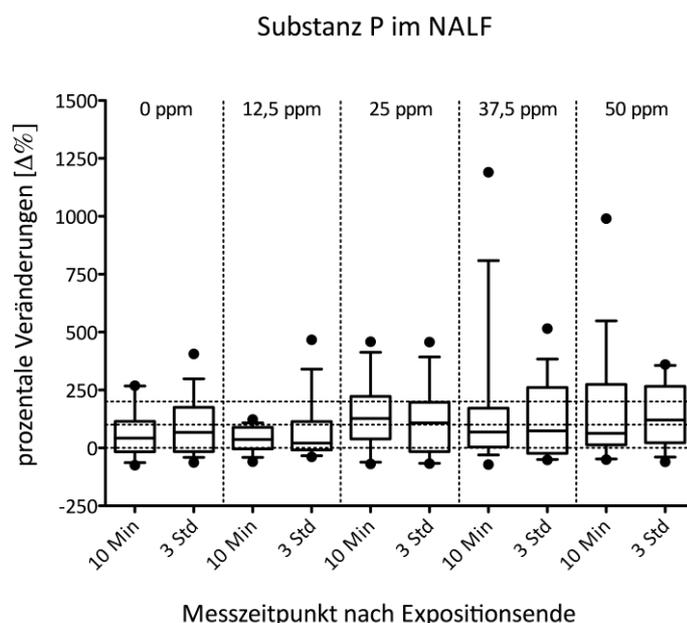
#### **Datenaufbereitung und –auswertung:**

Im ersten Schritt wurden für jeden Probanden die Werte  $< \text{NWG}$  durch das individuelle Minimum der verbleibenden Messungen ersetzt. Anschließend wurde eine Ausreißeranalyse vorgenommen und Werte oberhalb des individuellen Mittelwertes plus der doppelten Standardabweichung wurden durch den individuellen Maximalwert (ohne Ausreißer) ersetzt. Fehlende Werte einer Person wurden durch lineare Regressionen geschätzt. Da die NALF-Konzentrationen der biochemischen Variablen bereits vor den Expositionen erhebliche interindividuelle Unterschiede aufwiesen, wurden zur Normierung die prozentualen Veränderungen zwischen Vor- und Nach-Messungen [ $\Delta\% = ((\text{NALF}_{\text{nach}} - \text{NALF}_{\text{vor}}) / \text{NALF}_{\text{vor}}) * 100$ ] berechnet und statistisch analysiert. Diese normierten Veränderungen wurden mittels nicht-parametrischer Verfahren auf Signifikanz geprüft.

#### **Ergebnisse:**

##### **ASP 1.3 ExpoLab „Substanzen“ Acetaldehyd**

In Abbildung 1 sind die prozentualen Veränderungen der Substanz P-Konzentrationen im NALF der Probanden dargestellt. Da in diesem Experiment zwei Messungen nach

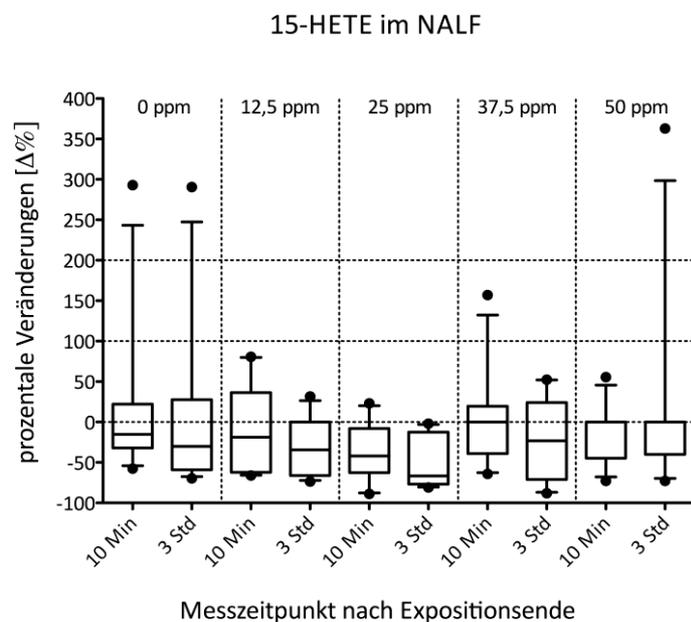


**Abbildung 1:** Box-Whisker-Plot der prozentualen Veränderungen der Substanz P-Konzentrationen im NALF der Probanden nach den fünf Bedingungen des Acetaldehyd-Experiments.

den 4-stündigen Expositionsphasen erhoben wurden, sind in Abbildung 1 zwei  $\Delta\%$  Werte pro Bedingung aufgeführt. Es zeigte sich in allen Bedingungen und zu beiden Messzeitpunkten eine Zunahme der Substanz P-Konzentrationen, die im Mittel unter 100% lag. Die statistischen Analysen (Friedmann-Tests) ergaben sowohl für den Messzeitpunkt 10 min nach Expositionsende ( $\text{CHI}^2_4=5,25$ ;  $p=0,26$ ) als auch für die Messung nach 3 Stunden ( $\text{CHI}^2_4=4,35$ ;  $p=0,36$ ) keine signifikanten Unterschiede zwischen den Expositionsbedingungen. Im Sinne einer positiven Effektkinetik zeigt sich nur bei der höchsten Bedingung eine Zunahme der prozentualen Veränderung über die Nachbeobachtungsdauer. Dieser Effekt ist jedoch statistisch nicht signifikant.

Abbildung 2 verdeutlicht, dass die Konzentration von 15-Hydroxyeicosatetraenoic acid (15-HETE) im NALF nach den Expositionen abnimmt (negatives  $\Delta\%$ ). Für die Messungen direkt nach der Exposition ergab sich kein signifikanter Expositionseffekt ( $\text{CHI}^2_4=5,25$ ;  $p=0,26$ ). Betrachtet man nur die Werte des späteren Messzeitpunktes (nach 3 Std.), so ergaben sich signifikante Unterschiede ( $\text{CHI}^2_4=13,19$ ;  $p=0,01$ ) zwischen den Bedingungen. Dieser Effekt wurde von der stärkeren Abnahme der 15-HETE Konzentration im NALF nach der 25 ppm Bedingung verursacht. Da es sich (a) um eine Reduktion des Parameters und (b) eine singuläre Beobachtung bei der mittleren Expositionsbedingung handelt, ergibt sich kein überzeugender Hinweis auf einen adversen Expositionseffekt. Die Beobachtung einer Abnahme der 15-HETE-Konzentration nach einer chemischen Stimulation bei gesunden Probanden deckt sich mit Ergebnissen einer Studie zur hyperosmolaren Provokation mit Mannitolpulver (Koskela et al., 2000).

Zusammenfassend ergeben sich aus den Analysen der biochemischen Parameter keine Hinweise auf physiologische Dysregulationen durch Acetaldehyd in Konzentrationen bis 50 ppm.



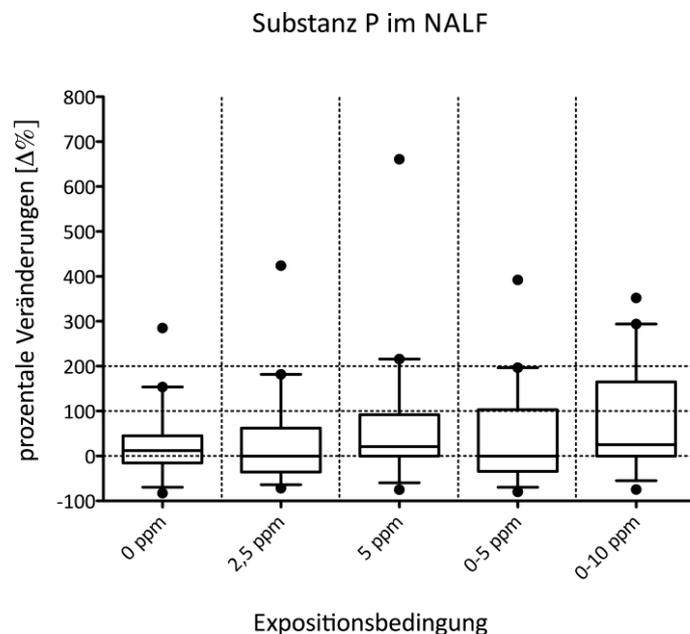
**Abbildung 2:** Box-Whisker-Plot der prozentualen Veränderungen der 15-HETE Konzentrationen im NALF der Probanden nach den fünf Bedingungen des Acetaldehyd-Experiments.

### ASP 1.3 ExpoLab „Substanzen“ Ethylacrylat

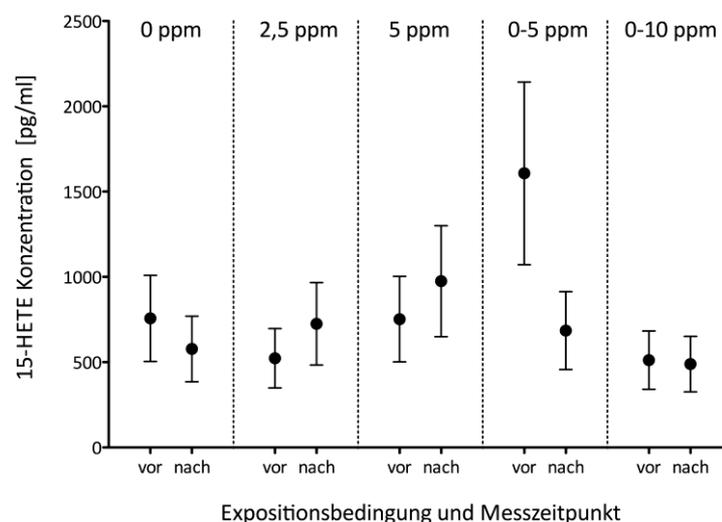
Abbildung 3 zeigt die Veränderungen der Substanz P-Konzentrationen im NALF nach den verschiedenen Expositionsbedingungen des zweiten Experiments des ASP 1.3. Auch hier ergibt die statistische Prüfung keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsbedingungen ( $\text{CHI}_4^2=4,36$ ;  $p=0,36$ ). Aus der Abbildung wird jedoch deutlich, dass vor allem während der beiden Expositions-szenarien mit einer  $C_{TWA}$  von 5 ppm die stärksten Anstiege der Substanz P-Konzentration zu beobachten waren. Es ist somit nicht auszuschließen, dass bei anhaltenden Expositionen gegenüber Ethylacrylat im Bereich des aktuellen MAK-Wertes erste Anzeichen neurogener Entzündungen auftreten, da beim überwiegenden Teil der Probanden (siehe Lage der Boxen in Abbildung 3) erhöhte Substanz P-Konzentrationen gemessen wurden.

Trotz der relativ hohen Anzahl an auswertbaren Proben für den Parameter 15-HETE konnte eine statistische Auswertung nicht vorgenommen werden, da diese Proben bei nur neun der insgesamt 20 Probanden zu finden waren. Zur Deskription der Ergebnisse sind in Abbildung 4 die Mittelwerte und Standardfehler der 15-HETE Konzentrationen im NALF dieser Probanden dargestellt. Es zeigt sich kein systematischer Einfluss der Expositionshöhe auf die Konzentration des biochemischen Effektmarkers im NALF der Probanden.

Zusammenfassend ergeben sich für Ethylacrylat schwache Hinweise darauf, dass bei Konzentrationen im Bereich des MAK-Wertes die Stimulation trigeminaler Rezeptoren einen Axonreflex auslöst, der zu einer erhöhten Ausschüttung des Neurokinins Substanz P führt. Bei mittleren Konzentrationen ( $C_{TWA}$ ) von 2,5 ppm waren derartige Effekte noch nicht zu beobachten. Es ist jedoch unklar, ob sich aus dieser chemosensorischen Reaktion eine neuro-



**Abbildung 3:** Box-Whisker-Plot der prozentualen Veränderungen der Substanz P-Konzentrationen im NALF der Probanden nach den fünf Bedingungen des Ethylacrylat-Experiments.

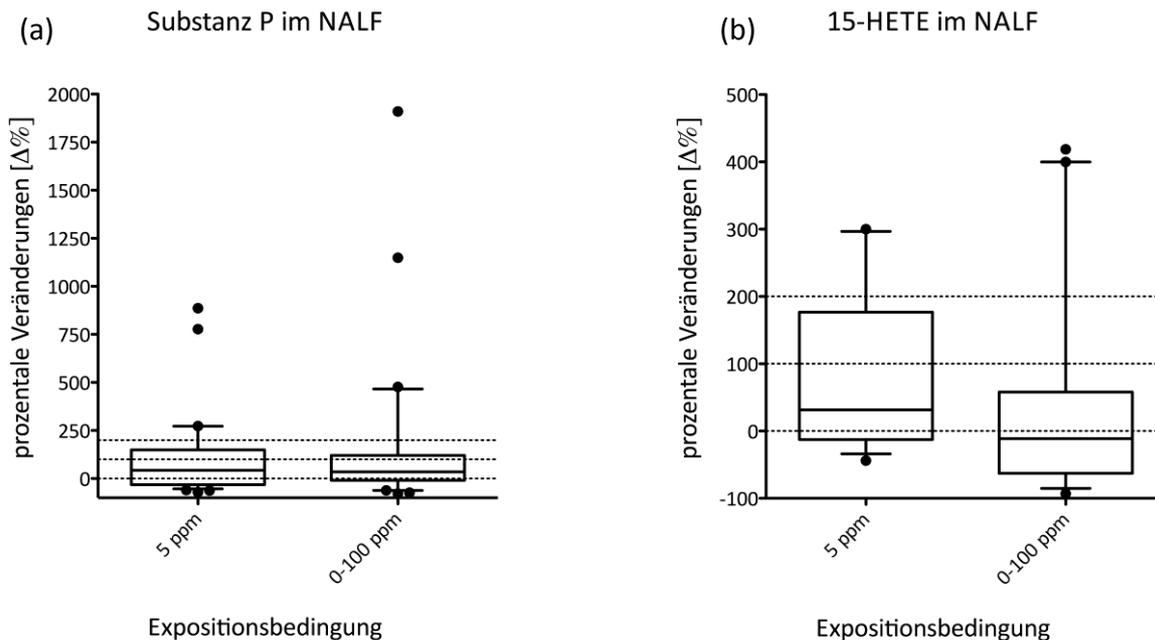


**Abbildung 4:** Mittelwerte und Standardabweichungen der 15-HETE-Konzentrationen im NALF der Probanden vor und nach den fünf Bedingungen des Ethylacrylat-Experiments.

gene Inflammation entwickelt, die als Ausgangspunkt weiterer Entzündungsprozesse angesehen werden kann (Beuerman & Stern, 2005).

### ASP 2.2 ExpoLab „Altern“ Methylmethacrylat

Auch in diesem Experiment war nach beiden Expositionsszenarien ein Anstieg der Substanz P-Konzentration zu beobachten (siehe Abbildung 5 (a)). Wie beim Experiment mit Acetaldehyd zeigte sich auch bei MMA-Expositionen eine geringe Abnahme der 15-HETE Konzentration im NALF (siehe Abbildung 5 (b)).



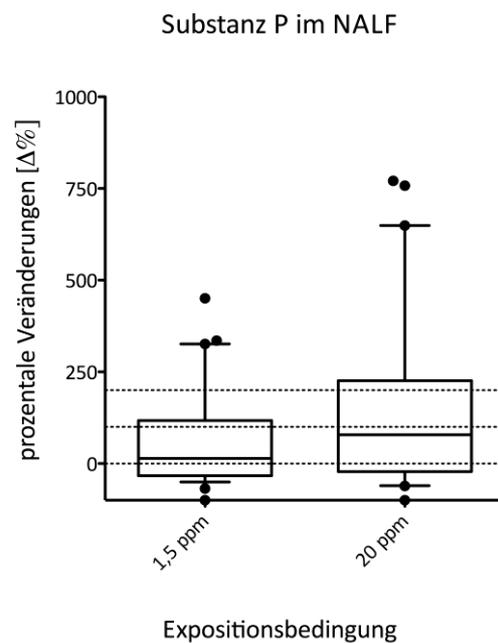
**Abbildung 5:** Box-Whisker-Plot der prozentualen Veränderungen im NALF der Probanden nach den beiden Bedingungen des Methylmethacrylat-Experiments; links: Substanz P, rechts: 15-HETE.

Die statistischen Vergleiche auf etwaige konzentrationsabhängige Unterschiede waren weder für Substanz P ( $W=34$ ;  $p=0,76$ ) noch für 15-HETE ( $W=60$ ;  $p=0,24$ ) signifikant.

Zusammenfassend ergeben die biochemischen Analysen keine Hinweise auf physiologisch messbare Reizeffekte. Das Alter der Probanden beeinflusste die Ergebnisse nicht. Weder unterschied sich das Niveau der NALF-Konzentrationen der beiden Parameter noch war die prozentuale Veränderung vom Alter abhängig.

### ASP 2.2 ExpoLab „Altern“ 2-Ethylhexanol

Da für diese Experiment mehr als die Hälfte der Messdaten für den Parameter 15-HETE fehlten (siehe Tabelle 1), wurde nur die Substanz P-Konzentration ausgewertet. Abbildung 6 zeigt für diesen Marker neurogener Entzündungen einen konzentrationsabhängigen Anstieg der prozentualen Veränderung, der statistisch jedoch nicht signifikant ist ( $W=-103$ ;  $p=0,27$ ). Vor dem Hintergrund früherer Publikationen unserer Arbeitsgruppe zu dieser Substanz (van Thriel et al., 2003) und der Ergebnisse für die Lidchlussfrequenz (siehe Zwischenbericht 2010) sind sensorische Irritationen durch 2-Ethylhexanol im Bereich des MAK-Wertes physiologisch messbar. Ob diese sensorischen Veränderungen der Ausgangspunkt pathophysiologischer Veränderungen durch Entzündungsprozesse sind, kann durch die aktuellen „Kurzzeit“-Experimente nicht beantwortet werden. Wie schon beim ersten Experiment des ASP 2.2 waren die auswertbaren, biochemischen Parameter nicht durch das Alter der Probanden beeinflusst.



**Abbildung 6:** Box-Whisker-Plot der prozentualen Veränderungen der Substanz P-Konzentrationen im NALF der Probanden nach den beiden Bedingungen des 2-Ethylhexanol-Experiments

### Zusammenfassung

Die Auswahl der biochemischen Parameter war bewusst breit angelegt, um möglichst viele Reaktionsebenen des Organismus zu erfassen, mit denen er auf sensorische Reizungen reagieren kann. Für keine der vier untersuchten Substanzen konnten Immunreaktionen gefunden werden, die als Hinweis auf inflammatorische Prozesse interpretiert werden könnten. Die ausgewählten Parameter IL-6 und TNF- $\alpha$  sind, trotz ausreichender Empfindlichkeit der Analysemethode, in fast keiner der gewonnenen Proben zu bestimmen. Während diese Parameter bei *in vitro* Experimenten (Brieger et al., 2008; Gosepath et al., 2006, 2007) zumindest auf mRNA-Ebene durch Reizstoffe induziert wurden, zeigen auch andere „Kurzzeit“-Expositionsexperimente (Muttray et al., 2002) keine Effekte auf dieser Reaktionsebene.

Die Induktion des Neurotrophins NGF durch akute Capsaicin-Provokationen wurde bisher hauptsächlich bei Personen mit sensorischer Hyperreagibilität (SHR) beschrieben (Millqvist et al., 2005). Dieser biochemische Parameter wird mit Sensitivierungsprozessen des trigeminalen Systems in Verbindung gebracht, da Neurotrophine an der Ausbildung zusätzlicher Rezeptoren auf den Nervenfasern des Trigemini beteiligt sind. In unseren Experimenten wurden keine „empfindlichen Personen“ untersucht, was möglicherweise das Ausbleiben expositionsbezogener Effekte in diesem Parameter erklären kann. Die Ergebnisse verdeutlichen auch, dass die wiederholte Exposition der Probanden, wie sie in unseren Versuchsdesigns üblich ist, nicht zu Sensitivierungen führt.

Auch wenn das Neuropeptid CGRP nicht induziert wurde, so zeigen doch die Ergebnisse für die Substanz P recht deutlich, dass die neurogene Reaktion der empfindlichste Indikator sensorischer Reizwirkungen ist. Hier zeigt sich eine gewisse Konvergenz der Ergebnisse mit dem

anderen, äußerst sensitiven Marker für sensorische Reizungen, der Lidschlussfrequenz. Sowohl für Ethylacrylat (siehe Zwischenberichte 2009), als auch für 2-Ethylhexanol (siehe Zwischenberichte 2010) wurden signifikante Zunahmen der Lidschlussfrequenz in den höchsten Expositionsbedingungen gefunden. In diesen Bedingungen zeigten sich auch die stärksten Anstiege der Substanz P-Konzentration im NALF. Daher erscheint diese Reaktionsebene und vor allem der Parameter Substanz P geeignet, um erste, biochemische Reaktionen auf akute Reizstoff-Expositionen abzubilden. Da es sich bei der Freisetzung von Substanz P um einen trigeminalen Axonreflex handelt, ist dieser Parameter auch am engsten mit der sensorischen Wirkung von Reizstoffen verknüpft und es erscheint sinnvoll, diese Reaktionsebene als „first line of defense“ (Beuerman & Stern, 2005) zu verwenden und in den präventiven Arbeitsschutz zu integrieren.

Die Rolle respiratorischer Epithelzellen bei der Reaktion auf Reizstoffe ist auch nach diesen Experimenten relativ unklar. Zwar lässt sich der biochemische Parameter 15-HETE in den NALF Proben recht gut messen; um zuverlässige Ausgaben zu erhalten, muss möglicherweise die Probengewinnung und –aufbereitung optimiert werden.

## Literatur – Biochemische Analysen

- Beuerman, R. W., & Stern, M. E. (2005). Neurogenic inflammation: a first line of defense for the ocular surface. *Ocul Surf*, 3(4 Suppl), 203-206.
- Brieger, J., Muttray, A., Jung, D., Letzel, S., Mann, W. J., & Gosepath, J. (2008). Early stress response of human nasal respiratory epithelia after exposure to 1-methoxypropanol-2. *Toxicol Lett*, 177(2), 138-143.
- Gosepath, J., Brieger, J., Muttray, A., Best, S., Pourianfar, M., Jung, D., et al. (2006). mRNA induction and cytokine release of inflammatory mediators during in vitro exposure of human nasal respiratory epithelia to acetaldehyde. *Inhal Toxicol*, 18(14), 1083-1090.
- Gosepath, J., Brieger, J., Muttray, A., Best, S., Pourianfar, M., Jung, D., et al. (2007). mRNA-induction and cytokine release during in vitro exposure of human nasal respiratory epithelia to methyl methacrylate. *Toxicol Lett*, 171(1-2), 29-37.
- Koskela, H., Di Sciascio, M. B., Anderson, S. D., Andersson, M., Chan, H. K., Gadalla, S., et al. (2000). Nasal hyperosmolar challenge with a dry powder of mannitol in patients with allergic rhinitis. Evidence for epithelial cell involvement. *Clin Exp Allergy*, 30(11), 1627-1636.
- Millqvist, E., Ternesten-Hasseus, E., Stahl, A., & Bende, M. (2005). Changes in levels of nerve growth factor in nasal secretions after capsaicin inhalation in patients with airway symptoms from scents and chemicals. *Environ Health Perspect*, 113(7), 849-852.
- Muttray, A., Jung, D., Klimek, L., & Kreiner, C. (2002). Effects of an external exposure to 200 ppm methyl ethyl ketone on nasal mucosa in healthy volunteers. *Int Arch Occup Environ Health*, 75(3), 197-200.
- van Thriel, C., Seeber, A., Kiesswetter, E., Blaszkewicz, M., Golka, K., & Wiesmuller, G. A. (2003). Physiological and psychological approaches to chemosensory effects of solvents. *Toxicol Lett*, 140-141(1-3), 261-271.

## ASP 1.2 Olfaktometrie „Erweiterung“

Screeningverfahren sind orientierende Messungen, die zur Charakterisierung und Kategorisierung von chemischen Arbeitsstoffen genutzt werden. Sie liefern Basisdaten, um einen Arbeitsstoff als Reiz-/ Geruchsstoff zu klassifizieren und eignen sich zur Priorisierung von Reizstoffen für vertiefende Experimente, die zur Ableitung von Grenzwertempfehlungen genutzt werden können (z.B. experimentelle Expositionen). Olfaktometrische Verfahren, die in den ersten beiden Projektphasen des Forschungsprojekts FP-228A zu Screeningverfahren entwickelt wurden, bieten weitere Möglichkeiten, gesundheitliche Effekte durch Reizstoffe zu erfassen und zu bewerten. Im Arbeitsschwerpunkt 1.2 wurde untersucht, ob psychophysiologische Variablen in olfaktometrische Experimente integriert werden können.

### Hintergrund

Das übliche Reizstoff-Screening mittels dynamischer Olfaktometrie liefert momentan ausschließlich subjektive Angaben und keine objektiven Daten über physiologische Reaktionen des Organismus. Bisher wurde die dynamische Olfaktometrie fast ausschließlich zur Etablierung psychophysischer Funktionen genutzt, mit denen die chemosensorische Potenz lokaler Reizstoffe auf der Ebene der Empfindungen zuverlässig beschrieben und verschiedene Reizstoffe miteinander verglichen werden können (z.B. van Thriel et al., 2006). Die dynamische Olfaktometrie erlaubt aber neben der Untersuchung psychophysischer Funktionen auch die Anwendung physiologischer Messungen, die mit Konzentrationsunterschieden in Beziehung gesetzt werden können. Ein etabliertes Verfahren dafür existiert jedoch bisher noch nicht.

Im ASP 1.2 wurden daher Erweiterungen an dieser Applikationsform vorgenommen, so dass physiologische Parameter in diese Methode der Reizstoffbewertung integriert werden können. Die Messung der Atemtiefe als physiologischer Parameter trigeminaler Stimulation oder Geruchsbelästigungen (Danuser, 2001; Walker et al., 2001) wurde bereits in einem Experiment des Vorgängerprojektes am IfADo getestet. Trotz suboptimaler Signalerfassung legen die Ergebnisse eine dosisabhängige Abnahme der Atemtiefe bei den Skalierungsexperimenten mit Cyclohexylamin nahe (Schäper et al., 2005). So könnten mit diesem Parameter trigeminale Effekte deutlich unterhalb der Lateralisierungsschwelle physiologisch abgesichert werden.

Neben der Atemtiefe wurde die Messung der elektrodermalen Aktivität (EDA, Hautleitfähigkeit) verwendet, die autonome Reaktionen auf Geruchsreize erfassbar macht (Moller & Dijksterhuis, 2003). Am IfADo wurde in einer Art „Pilotstudie“ zunächst die Modellsubstanz Mercaptoethanol mit diesen Erweiterungen exemplarisch untersucht. Diese Substanz hat einen ähnlich unangenehmen Geruch wie Schwefelwasserstoff ( $H_2S$ ), besitzt allerdings im Gegensatz zu  $H_2S$  auch eine starke trigeminale Komponente.

### Methode

Mit dem ECOMA TO7 Vier-Platz-Olfaktometer (s. Abbildung 7) wurde den Probanden der Arbeitsstoff im interessierenden Konzentrationsbereich auf neun genau definierten Konzentrationsstufen wiederholt, standardisiert und systematisch variiert dargeboten, wie es zur Ableitung von Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen notwendig ist. Im Prinzip ist dieses Olfaktometer ein Verdünnungssystem, in dem eine



Abbildung 7: Vier-Platz-Olfaktometer ECOMA TO7.

riechende Luftprobe mit nicht riechender Reinluft verdünnt wird. Aus einem Probenbeutel mit einer definierten und konstanten Arbeitsstoffkonzentration können mithilfe dieser Technik in einem Durchgang neun Konzentrationen in geometrischen Abstufungen von 1/2,5 bis 1/640 generiert werden. Während dieser standardisierten Reizstoff-Applikation wurden Atemtiefe und EDA der Probanden kontinuierlich erfasst und nach der vollständigen Präsentation einer jeweiligen Konzentrationsstufe erfolgten Empfindungseinschätzungen gemäß der Magnitude Estimation oder mittels LMS-Skalierung (vgl. Phase 2 des vorangegangenen Projekts).

### **Stimulusdarbietung und Datenerfassung**

Die Personen atmeten im Versuch durch die Nase aus einem anatomisch geformten Nasen-trichter genau definierte Mischungen von Luft und Mercaptoethanol ein, die mit Hilfe des Flow-Olfaktometers in ebenfalls genau definierten Zeitfenstern (5 mal 2 sec pro Konzentrationsstufe) bereitgestellt wurden. Dazu wurde in Tedlar®-Beuteln (25 l) eine hoch konzentrierte, homogenisierte Mercaptoethanol-Stickstoff-Mischung hergestellt und mit Hilfe der Verdünnungseinrichtung auf 9 unterschiedliche Konzentrationsstufen herunter verdünnt, indem Reinluft mit der gasförmigen Substanz aus dem Beutel gemischt wurde. Die Stufen bildeten eine geometrische Reihe und umfassten die Konzentration 1/640 (niedrigste Konzentration) bis 1/2,5 (höchste Konzentration).

Die neun Konzentrationsstufen wurden den Probanden in jeweils anderen zufälligen Reihenfolgen präsentiert. Die Präsentation einer Konzentrationsstufe begann mit vier Reinluft-Atemzügen, damit sich die Probanden an den Atemrhythmus gewöhnen konnten, der durch das Olfaktometer vorgegeben war. In der dann folgenden eigentlichen Expositionsphase wurde die zu beurteilende Konzentrationsstufe von Mercaptoethanol den Probanden fünfmal im direkten Wechsel mit Reinluft dargeboten (2 sec. Inhalation Mercaptoethanol, 2 sec. Exhalation, 2 sec. Inhalation Reinluft, 2 sec. Exhalation).

#### ***Empfindungsstärken - Datenerfassung***

Nach jeder kompletten Stufenpräsentation wurde der Stoff im Hinblick auf die Intensität olfaktorischer und trigeminaler Wahrnehmungen beurteilt. Die Urteile wurden auf einem PocketPC™ abgegeben. Dieses Verfahren ist bereits mehrfach in vorangegangenen Berichten dargestellt worden. Zwischen 2 Konzentrationsstufen gab es mindestens eine Pause von 1 Minute. Um die intraindividuelle Stabilität der Ergebnisse zu überprüfen, wurde diese Prozedur zu einem zweiten Termin wiederholt, der mindestens eine Woche nach dem ersten Termin stattfand.

#### ***Atemtiefe - Datenerfassung***

Die Atemtiefe wurde mit Hilfe der respiratorischen induktiven Plethysmography (respiratory inductive plethysmography, RIP) während der Präsentation jeder Konzentrationsstufe gemessen. Die Bewegungen des Brustkorbes der Probanden wurden dabei mit flexiblen Gurten erfasst, abgespeichert und vor der Auswertung inter- und intraindividuell (Zeitpunkt T1 bzw. T2) standardisiert, indem jeweils die Atemtiefe bei der geringsten Konzentration zur Normierung der Daten einer individuellen Sitzung verwendet wurde.

#### ***EDA - Datenerfassung***

Die elektrodermale Aktivität (EDA) wurde kontinuierlich während der Expositionsphasen durch die Messung der tonischen Hautleitfähigkeit mittels Oberflächenelektroden an den

mittleren Gliedern von Zeige- und Mittelfinger (mediale Phalanx) der nicht-dominanten Hand erfasst. Sie stellt ein Maß für die allgemeine Aktivierung eines Probanden dar. Eine höhere Aktivierung ist mit einer größeren Schweißproduktion in der Haut verbunden und bildet sich in einem höheren Wert der Hautleitfähigkeit ab. Die EDA kann - außer durch emotionale Reaktionen auf Reize aus der Umgebung - auch durch Temperatur, Luftfeuchtigkeit und Muskelaktivität beeinflusst sein. Die Temperatur im Versuchsraum lag an allen Tagen bei 20 - 21 °C, die Luftfeuchtigkeit bei 30 - 35% und die Hände der Probanden ruhten entspannt auf der Tischplatte. Um die EDA-Reaktion der Probanden auf genau die jeweils dargebotene Konzentrationsstufe abzubilden, wurden zur Auswertung *baseline-korrigierte* EDA-Werte, d.h. die Differenz zwischen der EDA der Vp's unmittelbar vor der jeweiligen Reizpräsentation und der EDA bei / unmittelbar nach der Präsentation der Konzentrationsstufe, ausgewertet.

### **Statistik**

Die Einschätzungen olfaktorischer und trigeminaler Empfindungen via LMS wurden an psychophysische Funktionen (Stevens-Potenzfunktion:  $\Psi(I) = kI^a$ ; Stevens, 1957) angepasst.

$\Psi$  beschreibt die wahrgenommene Intensität des physikalischen Stimulus (hier z.B. *ekelerregend*),  $I$  steht für die Intensität des physikalischen Stimulus (in diesem Fall die Konzentration von Mercaptoethanol),  $k$  ist eine Proportionalitätskonstante, und der Exponent  $a$  bestimmt die Steigung der psychophysischen Funktion. Je höher  $a$  ist, desto steiler ist die psychophysische Funktion.

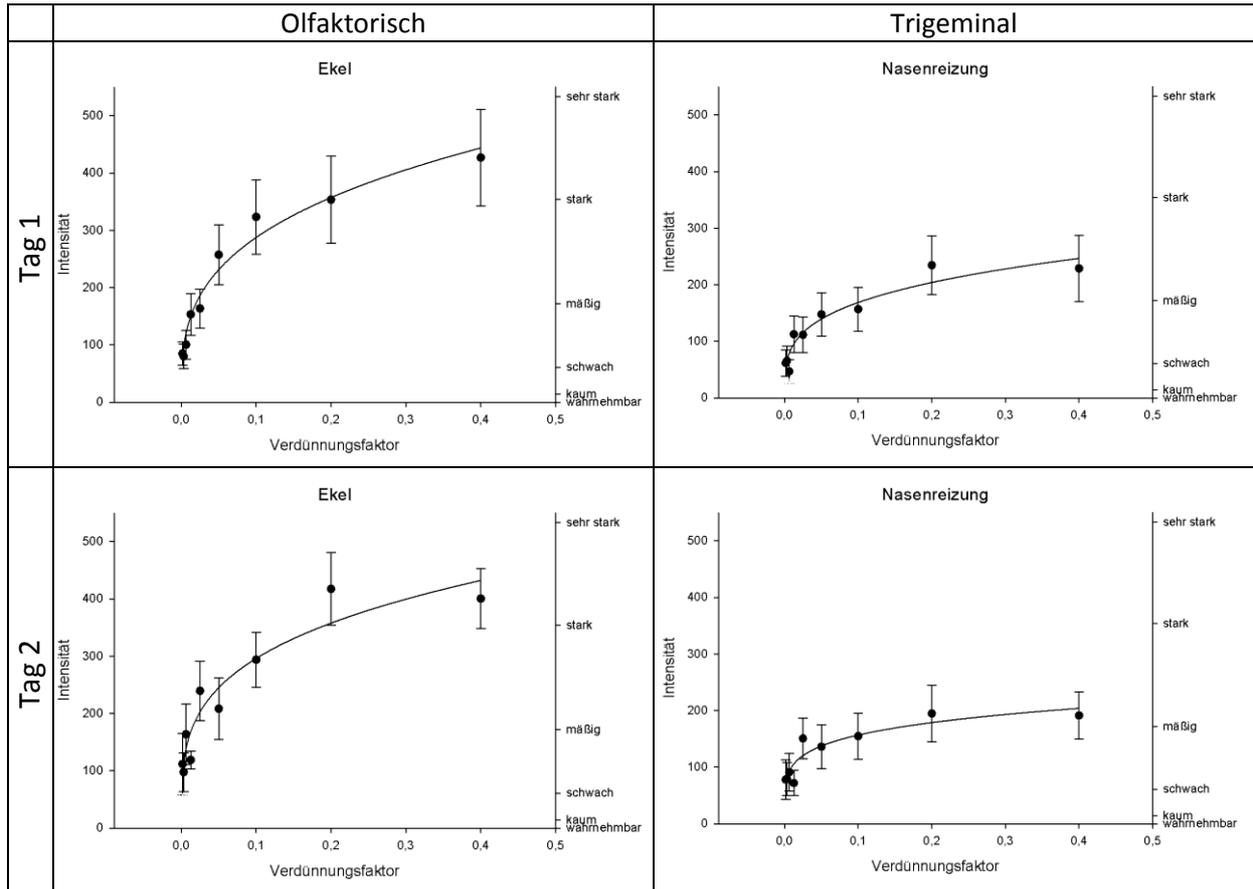
Die Daten zur Atemtiefe und zur EDA der Vp's wurden in Varianzanalysen mit Messwiederholungsdesign (2 Zeitpunkte, 9 Konzentrationsstufen) ausgewertet.

## **Ergebnisse**

### **Empfindungsstärken - Skalierung der Stoffbewertungen**

Es werden beispielhaft eine olfaktorische Empfindung (ekelerregend) und eine trigeminale Empfindung (Nasenreizung) in Abhängigkeit der Konzentrationsstufen zusammen mit den angepassten psychophysischen Funktionen dargestellt (vgl. Abb. 8).

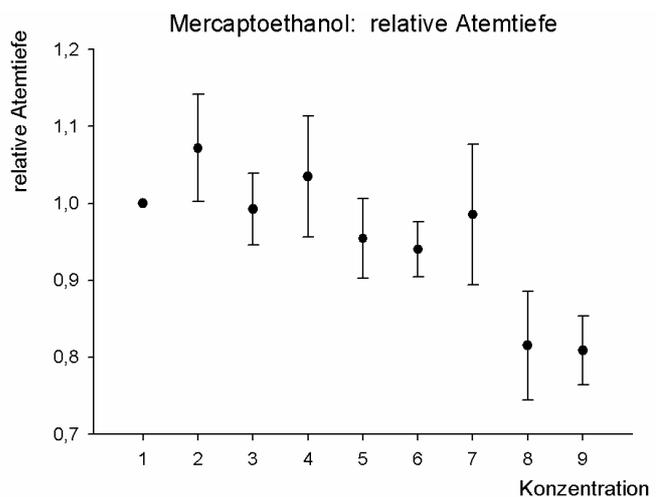
Der adjustierte Indikator der Anpassungsgüte ( $\text{adj}R^2$ ) zeigt, dass die psychophysischen Funktionen gut auf die beobachteten Daten passen ( $\text{adj}R^2$ : bei Ekel 0,97 bzw. 0,89; bei Nasenreizung 0,91 bzw. 0,85). Während die Ekeleinschätzung an beiden Tagen einen steilen Verlauf aufweist ( $a = 0,27$  bzw.  $a = 0,31$ ), zeigt sich bei der Einschätzung der Nasenreizung vor allem am zweiten Tag ein flacherer Anstieg ( $a = 0,27$  bzw.  $a = 0,18$ ) auf niedrigerem Niveau. Während die höchste Konzentration von Mercaptoethanol zu starken bis sehr starken Ekelempfindungen führt, werden nur mäßige Empfindungen von Nasenreizung berichtet.



**Abbildung 8:** Psychophysische Funktionen der Empfindungen von Ekel und Nasenreizung zu beiden Messzeitpunkten (Tag 1 bzw. Tag 2).

**Physiologische Parameter - Atemtiefe**

In den Daten zur Atemtiefe der 18 Versuchspersonen, die an beiden Versuchsterminen teilnahmen, zeigte sich eine konzentrationsabhängige Abnahme ( $p=0.017$ , Greenhouse-Geisser- Korrektur, vgl. Abbildung 9). Die relative Atemtiefe ging von Stufe 1 (niedrigste Konzentration) bis zur Stufe 9 (höchste Konzentration) auf etwa 80 % zurück. Diese Differenz sowie die zwischen Stufe 2 und Stufe 9 ist auch im direkten Paarvergleich signifikant ( $p=0,019$  bzw.  $p=0,042$ , Bonferroni-korrigiert).

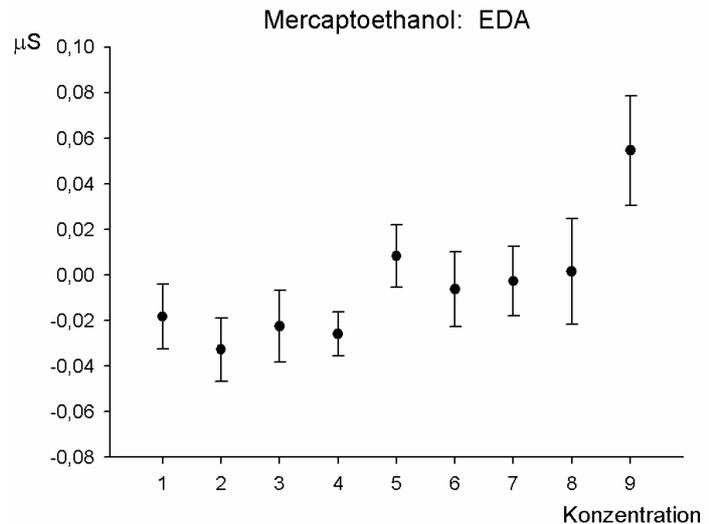


**Abbildung 9:** Relative Atemtiefe der Probanden bei den 9 eingesetzten Mercaptoethanolkonzentrationen (n=18, Mittelwerte und Standardfehler).

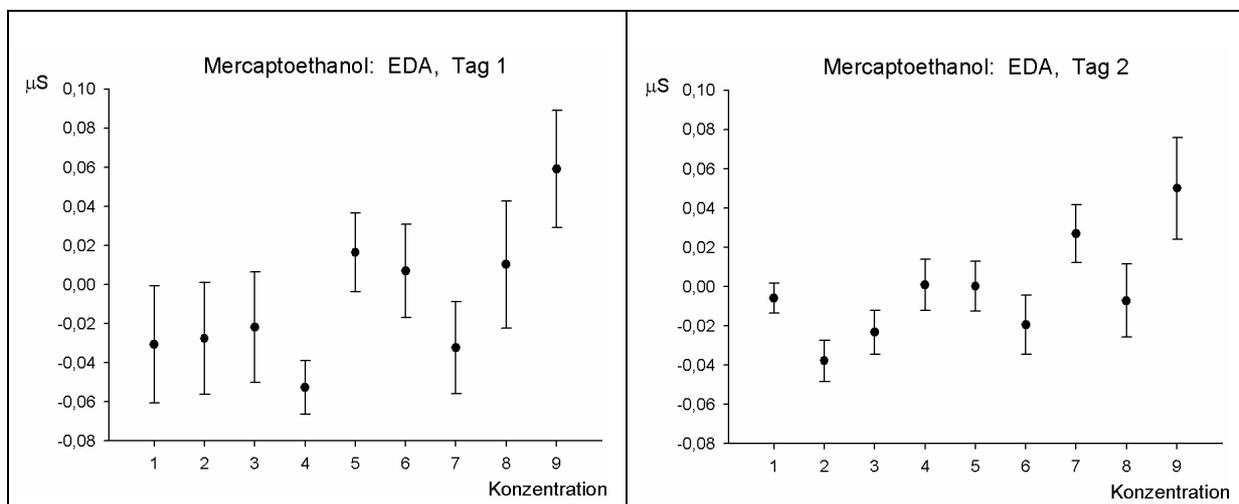
### Physiologische Parameter - EDA

Die elektrodermale Aktivität der Vp's zeigte einen konzentrationsabhängigen, ansteigenden Verlauf ( $p=0,014$ , Greenhouse-Geisser- Korrektur, s. Abbildung 10), d.h. die Ergebnisse legen eine konzentrationsbedingte Erhöhung der EDA im Sinne der Induktion negativer Emotionen durch Mercaptoethanol nahe, die bereits bei diesen kurzen Expositionsintervallen (10 sec pro Konzentrationsstufe) in der EDA sichtbar wird.

Weiterhin zeigt sich ein zwar nicht-signifikantes, aber dennoch interessantes Resultat beim Vergleich der Homogenität der EDA-Daten je Konzentrationsstufe (vgl. Abbildung 11): Die Standardfehler der EDA-Daten auf einer jeweiligen Stufe sind am Untersuchungstag 2 nur etwa halb so groß wie am Tag 1, d.h. die interindividuelle Streuung nimmt im Zeitverlauf deutlich ab und die Reaktionen der Probanden auf einer Konzentrationsstufe gleichen sich an. Ein Grund dafür könnte in den Erfahrungen aus Tag 1 liegen: ein exploratives Verhalten findet nicht mehr statt, sondern die Probanden stellen sich in ihrem Atemverhalten auf eine bereits bekannte, in Teilen belästigende und reizende Situation ein.



**Abbildung 10:** Baseline-korrigierte EDA-Werte der Probanden bei den 9 eingesetzten Mercaptoethanolkonzentrationen ( $n=18$ , Mittelwerte und Standardfehler).



**Abbildung 11:** Baseline-korrigierte EDA-Werte der Probanden bei den 9 eingesetzten Mercaptoethanolkonzentrationen, links Tag 1, rechts Tag 2 ( $n=18$ , Mittelwerte und Standardfehler).

### Zusammenfassung und Bewertung

Zusammenfassend verdeutlichen die Ergebnisse, dass es im Prinzip möglich ist, die existierende Screeningmethode der dynamischen Olfaktometrie um physiologische Variablen zu erweitern. Sowohl die Atemtiefe als auch die EDA zeigen konzentrationsabhängige Veränderungen.

Verringerungen der Atemtiefe entstehen z.B. durch trigeminal ausgelöste protektive Atemreflexe (z. B. Arzi et al., 2010; Tizzano et al., 2010; Walker et al., 2001). Mercaptoethanol wurde im vorliegenden Experiment bei den höheren Konzentrationen eher als *mäßig* reizend angesehen. Dazu passt, dass die Atemtiefe auch erst bei den höheren untersuchten Konzentrationen reduziert wird. Möglicherweise kommt es hier weniger zu einer reflexhaften (durch trigeminale Reizung ausgelösten) Reduktion des Atemvolumens, als zu einer unbewussten, möglicherweise gelernten Reaktion auf den unangenehmen Geruch (*starker* empfundener Ekel).

Über die elektrodermale Aktivität wird eher eine emotionale Komponente eines Geruchs gemessen (Moller & Dijksterhuis, 2003). Die zugehörige emotionale Bewertung des Geruchs wurde über die Empfindung Ekel abgefragt. Hier scheinen *starke* Ekel-Empfindungen mit einer erhöhten elektrodermalen Aktivität verknüpft zu sein.

Beide physiologischen Parameter sind dazu geeignet, mit Hilfe eines Benchmarkdosis-Ansatzes zur Gefährdungsabschätzung (risk assessment) eingesetzt zu werden. Dazu müssten sinnvolle kritische Werte für beide Parameter bestimmt werden. Allerdings zeigen sich für beide Parameter erst bei recht hohen Konzentrationen Effekte, so dass empfindlichere Parameter bevorzugt werden sollten.

Eine Klassifizierung in Arbeitsstoffe, die stärker oder weniger stark die Atemtiefe beeinflussen können, ist mit Hilfe der Messung der Atemtiefe möglich. Allerdings scheint dafür die Untersuchung sehr hoher Konzentrationen nötig. Ähnliches gilt für die Klassifizierung von Arbeitsstoffen anhand der elektrodermalen Aktivität. Auch hier scheint eine Untersuchung höherer Konzentrationen notwendig zu sein - selbst bei stark unangenehm riechenden Stoffen wie Mercaptoethanol.

Eine Integration der beiden Verfahren in die Olfaktometrie ist prinzipiell möglich. Ob sich ein derart aufwändiger Messaufbau für ein Screening von Arbeitsstoffen lohnt, muss von Fall zu Fall entschieden werden - insbesondere, weil beide Verfahren anscheinend erst bei hohen Konzentrationen Effekte zeigen. Existieren zum Beispiel Hinweise auf sensorische Irritationen aus Tierversuchen, so könnte es sinnvoll sein, die Humanrelevanz dieser Ergebnisse durch ein derartiges psychophysikalisches Experiment am Flow-Olfaktometer zu überprüfen.

Mit der aktuellen Hardware sind Untersuchungen, wie sie im ASP 1.2 durchgeführt wurden, extrem zeitaufwändig, da (a) während der Messungen Re-Kalibrierungen der Atemgurte und (b) aufwändige Artefaktbereinigungen vor der statistischen Auswertung vorgenommen werden müssen. Durch die gezielte Verbesserung der Erfassungssysteme (Nachfolgeneration der Atemgurte) erscheint es jedoch möglich, diese Schwierigkeiten zu reduzieren und bessere Biosignale zu erhalten. Generell ist die Erfassung ereigniskorrelierter physiologischer Reaktionen auf bestimmte Reizstoffkonzentrationen weniger ein Screeningverfahren, als vielmehr eine weitere experimentelle Methode, um Reiz- und Geruchseffekte von chemischen Arbeitsstoffen objektiv zu messen.

## Literatur – ASP1.2 Olfaktometrie „Erweiterung“

- Arzi, A., Sela, L., Green, A., Givaty, G., Dagan, Y., & Sobel, N. (2010). The Influence of Odorants on Respiratory Patterns in Sleep. *Chem Senses*, 35, 31-40.
- Danuser, B. (2001). Candidate physiological measures of annoyance from airborne chemicals. *Chem Senses*, 26, 333-337.
- Moller, P., & Dijksterhuis, G. (2003). Differential human electrodermal responses to odours. *Neurosci Lett*, 346, 129-132.
- Schäper, M., Kiesswetter, E., & van Thriel, C. (2005). Breathing changes - a physiological measure of annoyance from airborne chemicals. In: Meeting of the International Neurotoxicology Association <10, 2005, Haikko, Finland>: 26 June - 1 July 2005. Book of Abstracts (p. 88). Haikko, Finland: Finnish Institute of Occupational Health.
- Stevens, S. S. (1957). On the psychophysical law. *Psychol Rev*, 64, 153-181.
- Tizzano, M., Gulbransen, B. D., Vandenbeuch, A., Clapp, T. R., Herman, J. P., Sibhatu, H.M., et al. (2010). Nasal chemosensory cells use bitter taste signaling to detect irritants and bacterial signals. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 3210-3215.
- van Thriel, C., Schäper, M., Kiesswetter, E., Kleinbeck, S., Juran, S., Blaszkewicz, M., et al. (2006). From chemosensory thresholds to whole body exposures-experimental approaches evaluating chemosensory effects of chemicals. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 79, 308-321.
- Walker, J. C., Kendal-Reed, M., Hall, S. B., Morgan, W.T., Polyakov, V. V., & Lutz, R. W. (2001). Human responses to propionic acid. II. Quantification of breathing responses and their relationship to perception. *Chem Senses*, 26, 351-358.

## Zwischenbericht zum Verbundprojekt

# ***Abgrenzung und Differenzierung ,irritativer' und ,belästigender' Effekte von Gefahrstoffen - Fortsetzung***

März 2010

Autoren:  
Meinolf Blaszkewicz  
Kathrin Hey  
Ernst Kiesswetter  
Stefan Kleinbeck  
Michael Schäper  
Christoph van Thriel

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	2
Einleitung .....	3
Auswahl der Substanzen für die Arbeitsschwerpunkte 2.1 und 2.2 .....	4
Methoden und Ergebnisse zu den ASPs 2.1 und 2.2 .....	4
Neue (und alte) Untersuchungsinstrumente in den ASPs 2.1 und 2.2 .....	5
Kurzübersicht der Messinstrumente (Glossar) .....	7
Indikatoren primärer Effekte .....	7
Indikatoren sekundärer Effekte .....	8
Signifikanz .....	8
Generelle reizstoffbezogene Hypothesen .....	9
ASP 2.1 ExpoLab ‚Wirkung‘: Untersuchungsablauf und spezifische Hypothesen .....	9
ASP 2.1 Stichprobe.....	9
Studiendesign .....	10
Exposition und Testverteilung.....	10
Stoffbezogene Hypothese.....	11
Moderatorbezogene Hypothese .....	11
ASP 2.2 ExpoLab ‚Altern‘: Alterseffekte und olfaktorische Moderatoren.....	12
ASP 2.2 Stichprobe.....	12
Moderatorbezogene Hypothese für beide Stoffe .....	13
Methylmethacrylat .....	13
Stoffbezogene Hypothesen .....	14
Moderatorbezogene Hypothesen .....	14
2-Ethylhexanol.....	14
Stoffbezogene Hypothesen .....	15
Moderatorbezogene Hypothesen .....	15
Darstellung der Ergebnisse der Arbeitsschwerpunkte 2.1 und 2.2 .....	16
ASP 2.1 Experimentelle Exposition mit Schwefelwasserstoff.....	16
Primäre Effekte .....	16
Physiologie: Rhinomanometrie, Lidschlussfrequenz.....	17
Sekundäre Effekte.....	21
Zusammenfassung (Schwefelwasserstoff).....	22
ASP 2.2 ExpoLab ‚Altern‘ – Experimentelle Exposition mit Methylmethacrylat.....	23
Primäre Effekte .....	23
Physiologie: Rhinomanometrie, Lidschlussfrequenz.....	24
Sekundäre Effekte.....	26
Zusammenfassung (Methylmethacrylat).....	28
ASP 2.2 ExpoLab ‚Altern‘ – Experimentelle Exposition mit 2-Ethylhexanol .....	29
Primäre Effekte .....	29
Physiologie: Rhinomanometrie, Lidschlussfrequenz.....	30
Sekundäre Effekte.....	31
Zusammenfassung (2-Ethylhexanol).....	33
Zusammenfassung der ASPs 2.1 und 2.2.....	34
Literatur zum Zwischenbericht .....	35
Publikation und Verbreitung.....	36

## Einleitung

Das Forschungsprojekt ‚Irritative Effekte‘ (IRRE) gliedert sich in **zwei Forschungsebenen**, die ihrerseits in verschiedene Arbeitsschwerpunkte (ASP) eingeteilt sind:

### 1. Forschungsebene: substanzbezogene Basis- und Effektdaten lokaler Reizstoffe.

ASP 1.1 Optimierung psychophysischer ‚Schwellenbestimmungen‘

(Zwischenbericht 2008)

ASP 1.2 Olfaktometrie ‚Erweiterung‘: physiologische Variablen im olfaktometrischen Experiment

ASP 1.3 ExpoLab ‚Substanzen‘: Acetaldehyd und Ethylacrylat im 4h Experiment, Daten zur Grenzwertsetzung

(Zwischenbericht 2009)

### 2. Forschungsebene: Prävention kognitiver Effekte als Folge der chemosensorischen Reizstoffwahrnehmung.

ASP 2.1 ExpoLab ‚Wirkung‘: Schwefelwasserstoff im 4h Experiment

Variation: Aufmerksamkeitsfokus Exposition

ASP 2.2 ExpoLab ‚Altern‘: Methylmethacrylat und 2-Ethylhexanol im 4h Experiment

Variation: Alter, Geruchsempfindlichkeit

(Zwischenbericht 2010)

In den beiden vorliegenden Zwischenberichten wurden vor allem die Experimente der ASPs 1.1 und 1.3 dargestellt. Die Daten des ASP 1.2 werden zurzeit ausgewertet und die Ergebnisse im Endbericht dargestellt.

Im Berichtszeitraum 2009 wurden drei umfangreiche Expositionsstudien durchgeführt, deren Durchführungszeiträume in Tabelle 1 dargestellt sind.

**Tabelle 1:** Übersicht über die Durchführungszeiträume experimenteller Expositionen der ASPs 2.1 und 2.2. im IfAdo.

<b>Schwefelwasserstoff</b>	
Trainingsphase	25.05. bis 04.06.2009
experimentelle Expositionen	08.06. bis 03.07.2009
<b>Methylmethacrylat und 2-Ethylhexanol</b>	
Trainingsphase (1. Exp.)	31.08. bis 10.09.2009
experimentelle Expositionen (1. Exp.)	14.09. bis 09.10.2009
Trainingsphase (2. Exp.)	19.10. bis 29.10.2009
experimentelle Expositionen (2. Exp.)	09.11. bis 03.12.2009

Der **aktuelle Zwischenbericht 2010 umfasst die Ergebnisse dieser Laboruntersuchungen**, soweit es sich um psychologische und physiologische Daten handelt. Die Analyseergebnisse biologischer Irritationsparameter werden zum Abschlussbericht zur Verfügung stehen. Die vorliegende Ergebnisbeschreibung stellt einen Abschluss der Experimente des Forschungsvorhabens dar. Der noch folgende Abschlussbericht wird eine zusammenfassende Darstellung und eine Komplettierung der Ergebnisse bieten.

## Auswahl der Substanzen für die Arbeitsschwerpunkte 2.1 und 2.2

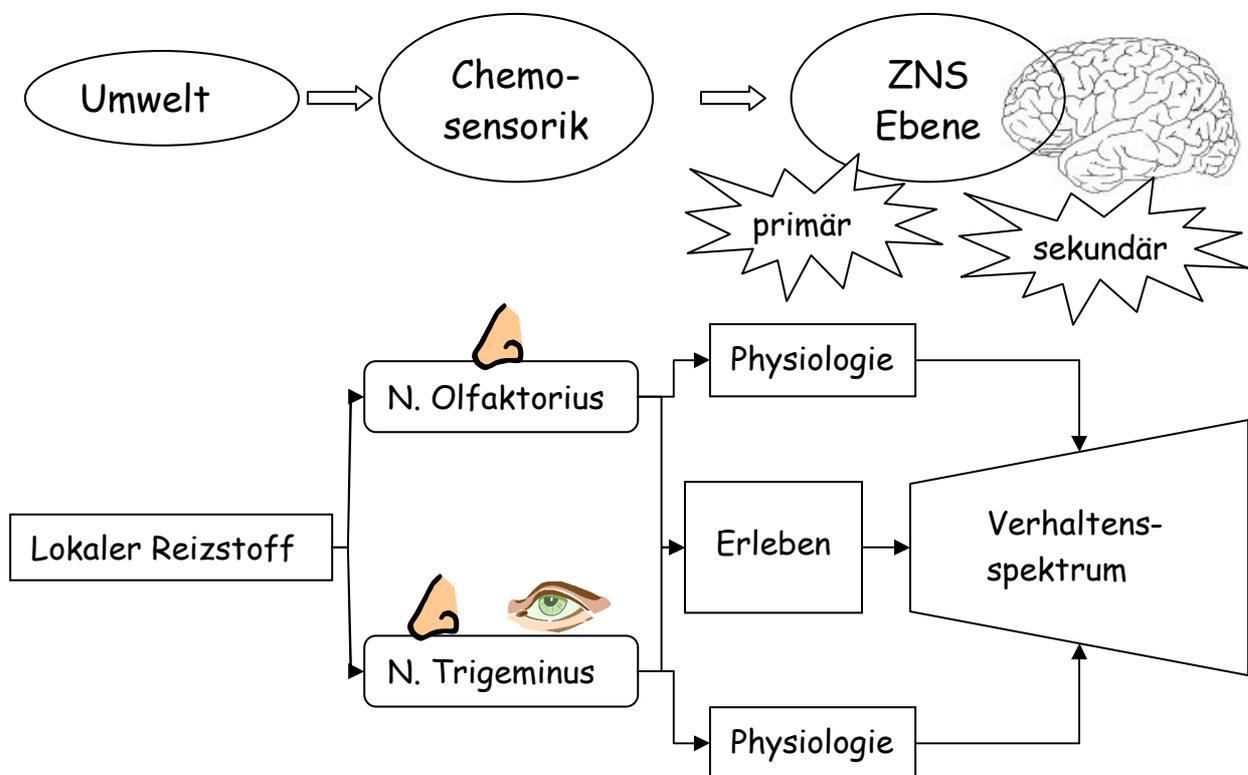
Die Auswahl der Substanzen erfolgte gemäß der vom Forschungsbegleitkreis (FBK) festgelegten Prioritätenliste, die die Arbeitsplatzrelevanz der Reizstoffe in den Vordergrund stellte (Schwefelwasserstoff [H<sub>2</sub>S], Methylmethacrylat [MMA], 2-Ethylhexanol [2-EH]).

Darüber hinaus war es für die Fragestellung in ASP 2.1 wichtig, einen relevanten Arbeitsstoff zu verwenden, der seine Wirkung hauptsächlich über erhebliche Geruchsbelästigungen entfaltet, da die Induktion unangenehmer Geruchsempfindungen einen wesentlichen Aspekt der postulierten Mechanismen (Emotionswirkung, Überforderung) darstellt, die im ASP 2.1 experimentell geprüft werden sollten.

Für den ASP 2.2 wurde MMA ausgewählt, da es nach Aussagen von Herrn Dr. Neumeister in der Zahntechnik verwendet wird und der Altersfaktor in diesem Arbeitsfeld von Bedeutung ist.

## Methoden und Ergebnisse zu den ASPs 2.1 und 2.2

Die Studien in den ASPs der 2. Forschungsebene setzen, bezogen auf unser Wirkungs-Modell (Abb. 1), das in den vorangegangenen Zwischenberichten und im Antrag ausführlich beschrieben wurde, an zwei Stellen an. Einerseits an der Basis: es werden drei ausgewählte lokale Reizstoffe (Arbeitsstoffe) in ihrer Wirkung auf physiologische Parameter, Erleben und Verhalten in einer Schichtsimulation untersucht. Andererseits im Moderatorbereich: es werden Faktoren variiert, die besonders für die sekundäre Reizverarbeitung als relevant erachtet werden (expositionsbezogene Aufmerksamkeit, Alter, Geruchsempfindlichkeit). In diesem Projektabschnitt wird somit geprüft, welche kognitiven und individuellen Faktoren, in Wechselwirkung mit Reizstoffen, das Erleben und Verhalten negativ beeinflussen können.



**Abbildung 1:** Wirkungsmodell lokaler Reizstoffe bei realitätsnaher Simulation von Expositionen am Arbeitsplatz.

## Neue (und alte) Untersuchungsinstrumente in den ASPs 2.1 und 2.2

Die Untersuchungsmethoden stimmen weitgehend mit den im 2. Zwischenbericht (*Zwischenbericht 2009*, S. 6-9) beschriebenen Verfahren überein.

Neu hinzugekommene Untersuchungsverfahren sind in der Übersicht (Tabelle 2) fett gedruckt und werden hier kurz vorgestellt:

a) Geruchsstifte („Sniffin´ Sticks“<sup>TM</sup>; vgl. Hummel et al. 2007) wurden eingesetzt, um nicht nur - wie bisher - sicherzustellen, dass die Geruchsfunktion der Untersuchungsteilnehmer im altersgemäßen Normbereich liegt, sondern zusätzlich, um (1) Extremgruppen mit guter und schlechter Geruchsfunktion zu bilden und um (2) die olfaktorische Funktionsveränderung durch die Exposition zu erfassen (Vergleich vorher / nachher). Während die Gruppenbildung im ASP 2.2 anhand der Gesamtleistung in diesem Verfahren (Schwellenbestimmungen mit Hilfe von n-Butanol, Geruchs-Diskriminationsleistung, Identifikation von 16 Alltagsgerüchen) vorgenommen wurde, wurden mögliche expositionsbedingte Funktionsveränderungen im ASP 2.1 anhand der Geruchs-Diskriminationsleistung bestimmt.

b) Die elektrodermale Aktivität (EDA) wurde als zusätzlicher, objektiver physiologischer Parameter aufgenommen, um emotionale Veränderungen während der Expositionsphase zu erfassen. Dabei wird angenommen, dass vor allem der unangenehme Geruch von H<sub>2</sub>S (nach faulen Eiern) Veränderungen in diesem physiologischen Parameter induziert. Als Indikator dieser ‚Emotionsinduktion‘ wurde die tonische Hautleitfähigkeit, die sich mit zunehmender Schweißproduktion vergrößert, an der nicht-dominanten Hand gemessen.

c) Inhibition of Return (IOR)

Bei diesem Test werden auf dem Bildschirm durch Hinweisreize (Cues) nachfolgende Zielreize (Targets) angekündigt. Auf den Zielreiz soll durch schnellstmögliches Drücken einer Reaktionstaste reagiert werden. Die Zielreize werden in Relation zum Hinweisreiz in der gleichen Position (kongruent) oder in der alternativen Position (inkongruent) dargeboten, wobei auch das zeitliche Intervall zwischen Hinweis- und Zielreizen systematisch variiert wird. Paradoxerweise wirken sich bei diesem Aufgabentyp ‚positions-kongruente‘ Reize bei Verzögerungsintervallen von mehr als 500 ms deutlich negativ auf die Reaktionszeiten aus, während ‚positions-inkongruente‘ Reizkombinationen schneller beantwortet werden. Die Reaktionszeitdifferenz wird dadurch erklärt, dass ein Hinweisreiz die Aufmerksamkeit auf eine bestimmte Position zieht (sehr kurze Intervalle führen bei kongruenten Reizen zu schnelleren Reaktionen). Kommt der Zielreiz aber nicht sehr kurz nach dem Hinweisreiz, wird diese Position durch ‚Kontrollfunktionen‘ aktiv gehemmt (längere Intervalle führen bei inkongruenten Reizen zu schnelleren Reaktionen).

Bei der Testaufgabe werden die Reaktionszeitdifferenzen zwischen positions-kongruenten und positions-inkongruenten Reizen ausgewertet. Die Darstellung der Differenzen über das Intervallspektrum (50-1300 ms) hinweg zeigt dieses, vom Modell vorhergesagte, charakteristische Reaktionsmuster (s. z.B. Abb. 20, alte Untersuchungsteilnehmer).

d) Einfache Reaktion (Quadratstest)

Bei diesem einfachen Reaktionstest soll so schnell wie möglich reagiert werden, wenn ein Quadrat auf dem Bildschirm erscheint.

**Tabelle 2:** Übersicht über die Untersuchungsmethodik zur Erfassung primärer und sekundäre Effekte in der Projektphase 2 (experimentelle Expositionen im *IfADo*).

Wirkebene	Erleben ( <i>Ratings</i> )	Physiologie ( <i>Messung</i> )	Verhalten ( <i>Tests</i> )
Geruch (N. Olfactorius)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Empfindungsstärken (<i>LMS Skalierung</i>)</li> <li>• olfaktorische Symptome (<i>SPES Symptomfragebogen</i>)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Geruchsstifte: Diskriminationstest (vor, nach Exposition)</b></li> <li>• <b>Elektrodermale Aktivität (<i>Analyse der tonischen Hautleitfähigkeit</i>)</b></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• selektive Aufmerksamkeit (Hemmung dominanter Reaktionen)</li> <li>• Doppelaufgabe/ geteilte Aufmerksamkeit (Aufmerksamkeitsressourcen)</li> <li>• Arbeitsgedächtnis</li> <li>• <b>Inhibition of Return (IOR)</b></li> <li>• <b>Einfache Reaktion</b></li> </ul>
Reizung (N. Trigeminus)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Empfindungsstärken (<i>LMS Skalierung</i>)</li> <li>• Symptome für Nasen- und Augenreizungen (<i>SPES Symptomfragebogen</i>)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Blinzelfrequenz (<i>elektromyographische Analyse der Kontraktionen des M. orbicularis oculi</i>)</li> <li>• Atemfrequenz (<i>Analyse der Atembewegung mittels Respiratory Inductive Plethysmography, RIP</i>)</li> <li>• Veränderungen in der Nasenhaupthöhle nasaler Atemwiderstand (<i>anteriore Rhinomanometrie</i>) neurogene Entzündungen (<i>ELISA Substanz P</i>) Aktivierung der Epithelzellen (<i>ELISA 15-HETE</i>)</li> <li>• biochemische Indikatoren in der Tränenflüssigkeit</li> </ul>	

## Kurzübersicht der Messinstrumente (Glossar)

Ausführliche Beschreibungen finden sich im *Zwischenbericht 2009* auf den Seiten 6-9.

### **Indikatoren primärer Effekte**

Erleben

- a) *Empfindungsstärken, Labeled magnitude scale (LMS)*.  
8 chemosensorische Empfindungen (z. B. Lästigkeit, Ekelerregend)
- b) *Akute Symptome (Erweiterung des Swedish Performance Evaluation System, SPES)*  
29 Symptome, 7 Symptombereiche (z.B. Geruchssymptome)

Physiologische Methoden

- a) *Anteriore Rhinomanometrie*  
Atem-Luftstrom pro Zeit (Flow [ml/sec]) in der Nasenhaupthöhle, vor/nach Exposition.
- b) *Lidschlussfrequenz*  
Standardisierte Aufzeichnung: Abschnitte während 1. und 2. IOR-Test (s. Abb. 2-4).
- c) *Elektrodermale Aktivität (EDA)*  
Kontinuierlich während der gesamten Expositionsphase

Kontrollvariablen

- a) *Elektrokardiogramm (EKG)*
- b) *Atemfrequenz*

Biochemische Indikatoren

Die Beschreibung und Auswertung der biochemischen Daten (u.a. Lavage) erfolgt im Endbericht. Die laufenden Analysen untersuchen verschiedene biologische *Reaktionsebenen* und beziehen sich auf die folgenden Parameter:

- a) *Neurogene Entzündung:*  
Substanz P  
CGRP; calcitonin gene-related peptide
- b) *Neurotrophine:*  
NGF; nerve growth factor
- c) *proinflammatorische Zytokine (Immunabwehr):*  
TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor  $\alpha$   
IL-6; interleukin-6
- d) *Epithelzellaktivierung:*  
15(S)-HETE; 15-hydroxyeicosatetraenoic acid

Die ausstehenden Analysen umfassen alle experimentellen Expositionsstudien der ASPs 1.3, 2.1 und 2.2. Die Proben werden gemeinsam ausgewertet, um eine Variation durch verschiedene Analysekits (batch to batch variation) zu vermeiden. Insgesamt liegen über 750 Einzelproben vor, die mittels Doppelbestimmung analysiert werden. So wird eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse über die verschiedenen Reizstoffe hinweg sichergestellt.

Durch die Betrachtung der unterschiedlichen *Reaktionsebenen* können die verschiedenen Reizstoffe möglicherweise nach ihren primären Wirkmechanismen klassifiziert werden.

**Indikatoren sekundärer Effekte****a) Arbeitsgedächtnisaufgabe (AG)**

Sequentielle Materialdarbietung (Punktpositionen, Objekte). Reaktion bei Übereinstimmung mit vorletzter (2-back Aufgabe) bzw. drittletzter (3-back Aufgabe) Darbietung.

**b) Aufgabe zur Geteilten Aufmerksamkeit (GA)**

Reaktionsverhalten bei gleichzeitig ablaufenden visuellen und akustischen Aufgaben.

**c) Flankierreizaufgabe (FR)**

Reaktionen mit rechter und linker Hand gemäß angezeigter Pfeilrichtung. Störung durch flankierende Hinweisreize.

**d) Inhibition of Return (IOR)**

Reaktionen auf Zielreize, die mit Hinweisreizen in der Position kongruent oder inkongruent sind (s.o.).

**e) Einfache Reaktion (Quadratetest)**

Reaktion, sobald ein Quadrat auf dem Bildschirm erscheint.

**Signifikanz**

Der Begriff Signifikanz wird verwendet, wenn  $p \leq .05$ .

## Generelle reizstoffbezogene Hypothesen

Tabelle 3 gibt eine Übersicht über die erwarteten Effekte auf den drei Nachweisebenen Erleben, Physiologie und Verhalten.

Allgemein werden in beiden ASPs signifikante Unterschiede zwischen den Kontroll- und Experimentalbedingungen erwartet, wobei die deutlichsten Effekte auf der Nachweisebene ‚Erleben‘ erwartet werden.

**Tabelle 3:** Allgemeine Effektmatrix für die Versuche der ASPs 2.1 und 2.2.

Nachweisebene	Expositionsbedingungen	
	Kontrollbedingung (Geruchsschwelle)	Experimentalbedingung (Grenzwert)
Erleben	schwache bis keine Effekte	Starke Geruchsbelästigung? Deutliche trigeminale Empfindungen? Symptome von Augen- und Nasenreizungen?
Physiologie	kein Effekt	Deutliche Zunahme der Lid-schlussfrequenz? Behinderung der Nasen-atmung? Zunahme der Hautleitfähigkeit?
Verhalten	kein Effekt	Deutliche Reaktionsverlangsamung? Starke Fehlerzunahme? Auffällig mehr Probleme bei schwierigen Aufgaben?

Neben diesen generellen Unterschieden zwischen Kontroll- und Experimentalbedingungen erwarten wir Veränderungen über den Verlauf der 4-stündigen Expositionsphasen, die in den folgenden Verlaufshypothesen zusammengefasst sind:

- Expositionsspitzen verstärken die Effekte generell
- Geruchswirkungen nehmen mit der Zeit ab (Adaptation)
- Reizwirkungen nehmen über die Zeit zu („temporal summation“)
- Verhaltenseffekte, vor allem zu Beginn der Exposition, weisen auf chemosensorische Ablenkungsprozesse hin

Im Folgenden werden spezifische Methoden Aspekte (Stichprobe, Exposition, Hypothesen) der beiden ASPs detaillierter beschrieben.

### ASP 2.1 ExpoLab ‚Wirkung‘: Untersuchungsablauf und spezifische Hypothesen

Im ASP 2.1 wurde durch die Verwendung des Arbeitsstoffes Schwefelwasserstoff geprüft, ob (a) der unangenehme Geruch von H<sub>2</sub>S emotionale Prozesse auslöst, die u. a. in der EDA beobachtbar sind, (b) die Ausrichtung der expositionsbezogenen Aufmerksamkeit diese Prozesse und kognitive Ablenkeffekte verstärkt und (c) schwierige Aufgaben (2-back vs. 3-back) im Sinne der Überforderung der kognitiven Ressourcen eher durch Ablenkeffekte beeinträchtigt werden.

#### ASP 2.1 Stichprobe

Die Untersuchungs-Stichprobe setzte sich aus gesunden, jungen Frauen und Männern zusammen (Tab. 4).

**Tabelle 4:** Stichprobe der Laboruntersuchung zu Schwefelwasserstoff.

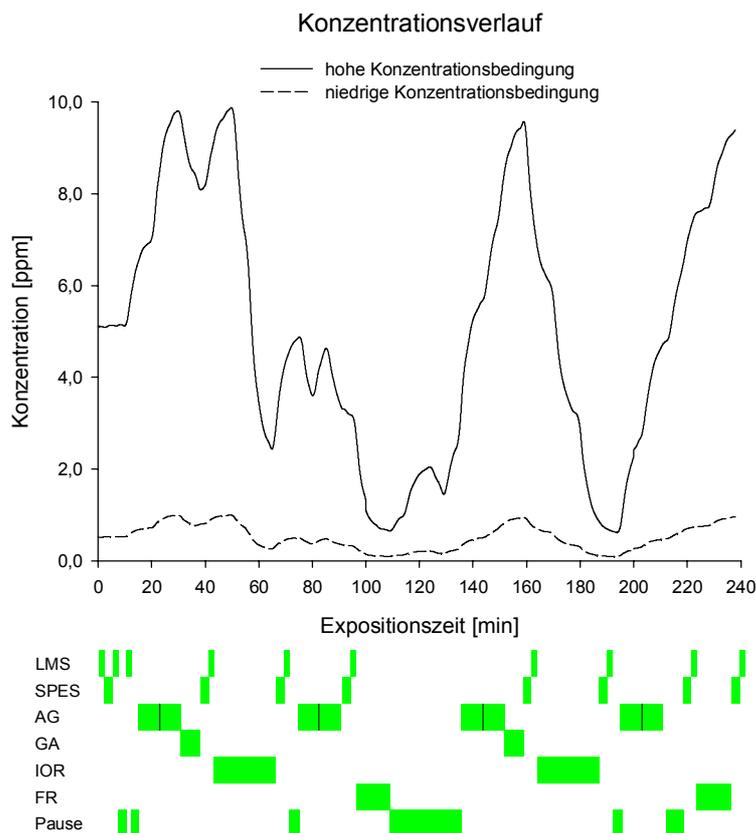
Arbeitsstoff	Geschlecht	n	Alter	
			M	SD
Schwefelwasserstoff	Frauen	7	21,7	1,4
	Männer	8	25,0	3,9

### Studiendesign

Jeder Untersuchungsteilnehmer wurde viermal exponiert: gegenüber zwei Expositionsstufen des Reizstoffs bei jeweils zwei Aufmerksamkeitsstufen (2\*2 Wiederholungsmessungen; s. moderatorbezogene Hypothese).

### Exposition und Testverteilung

Vornehmlich auf der Basis von tierexperimentellen Studien wurde im Jahr 2007 der MAK-Wert für Schwefelwasserstoff auf 5 ml/m<sup>3</sup> (ppm) reduziert und der Spitzenwertbegrenzungskategorie 1 mit Überschreitungsfaktor 2 zugeordnet. Orientiert an dieser Maßgabe, wurden im Experiment zwei variierende Konzentrationen um 0,5 (0-1) ppm und 5 (1-10) ppm realisiert.



**Abbildung 2:** Expositionsverlauf Schwefelwasserstoff und Verteilung der Leistungstests über den Untersuchungszeitraum.

Abbildung 2 zeigt die zwei im Experiment eingesetzten, unregelmäßigen und nicht vorhersagbaren Expositionsverläufe, deren zeitlicher Ablauf genau gleich ist. Der niedrige Expositionsverlauf ist lediglich gegenüber dem hohen Expositionsverlauf um den Faktor 10 gedämpft. Beide Kurven besitzen vier relative Maxima, die im Fall der hohen Exposition die MAK-Begrenzungen voll ausschöpfen.

Die Verteilung der Erlebenseinschätzungen und Testdurchführungen über die 4-stündige Expositionsphase führte zu 8-10 Einschätzungen und 2 Tests pro Testtyp. Die zweimalige 25-minütige Phase des IOR-Tests diente als Standardbedingung für die Untersuchung der Lid-schlussfrequenz und der elektrodermalen Aktivität.

Vor und nach der Expositionsphase wurden rhinomanometrische Messungen vorgenommen.

### ***Stoffbezogene Hypothese***

Eine aktuelle Studie (Fiedler et al., 2008) hat u. a. eine Exposition von 5 ppm Schwefelwasserstoff untersucht. Belästigungsangaben wurden allerdings nicht berichtet und es wurden in dieser Studie keine Spitzenexpositionen untersucht. Fiedler et al. (2008) haben keine konzentrationsabhängigen Einbußen bei kognitiven Tests finden können. Ob allerdings Expositionsspitzen mit beruflichen Tätigkeiten interferieren oder andere adverse Effekte mit sich bringen, ist nicht geklärt. Zu einer angemessenen Bewertung der Lästigkeit von Schwefelwasserstoff sind daher die Untersuchungen von Expositionsspitzen und deren Ablenkungseffekten notwendig.

### ***Moderatorbezogene Hypothese***

*Moderator: Aufmerksamkeitsrichtung (‚beachtet‘ vs. ‚ignoriert‘)*

Schwefelwasserstoff ist ein intensiv riechender Stoff. Die Untersuchungsteilnehmer wurden vor Untersuchungsbeginn instruiert, die Konzentrationswechsel im Untersuchungsverlauf zu zählen (Aufmerksamkeitsrichtung: *beachtet*) oder diesen keine Beachtung zu schenken (Aufmerksamkeitsrichtung: *ignoriert*). Es wurde erwartet, dass die stärkere Beachtung der Expositionswechsel Erleben und Leistungsparameter beeinflusst.

Die Aufgabenschwierigkeit (*Überforderung/Beanspruchung*) wurde durch die beiden Aufgabentypen der Arbeitsgedächtnisaufgabe (Objekte, Punktposition) und die Aufgabenschwierigkeit (2-back vs. 3-back) systematisch variiert. Es wurde erwartet, dass kognitive Effekte als sekundäre Folgeeffekte der chemosensorischen Reizstoffwahrnehmung eher bei den schwierigen Arbeitsgedächtnisaufgaben (3-back) und beim Erinnern von Punktpositionen auftreten.

## ASP 2.2 ExpoLab ‚Altern‘: Alterseffekte und olfaktorische Moderatoren

In der wissenschaftlichen Literatur existieren kaum Studien, die die Rolle des Lebensalters im Kontext von Reizstoffwirkungen untersucht haben. Durch den demographischen Wandel erhält diese Frage zusätzliche Bedeutung für die Präventionsarbeit der Deutschen gesetzlichen Unfallversicherung (DGUV). Im ASP 2.2 erfolgte die Auswahl der Stichprobe anhand vordefinierter Kriterien. Am Tag der Voruntersuchung wurde die Geruchsfunktion der potentiellen Teilnehmern mit den Geruchsstiften („Sniffin’ Sticks<sup>TM</sup>“) erhoben. Es wurden nur Teilnehmer in die Studie aufgenommen, die eine überdurchschnittlich gute Geruchsfunktion (**gut**: oberes Quartil der alterskorrigierten Normwerte) bzw. eine unterdurchschnittlich schlechte Geruchsfunktion (**schlecht**: unteres Quartil der alterskorrigierten Normwerte) aufwiesen. Es wurden die folgenden Altersgruppen untersucht: **jung**: 18-35 Jahre, **alt**: 45-67 Jahre.

Den Untersuchungen der Stoffe Methylmethacrylat und 2-Ethylhexanol liegen eine identische Stichprobe und ein gemeinsames Untersuchungskonzept zugrunde (Tab. 5).

### ASP 2.2 Stichprobe

Die Gesamtstichprobe umfasst 17 Frauen und 15 Männer, die an beiden Laboruntersuchungen teilnahmen. Die Tabelle zeigt die Aufteilung der Versuchsteilnehmer hinsichtlich Geruchsfunktion (Vortest), Altersklasse und Geschlecht.

**Tabelle 5:** Stichprobe der Laboruntersuchung zu Methylmethacrylat und 2-Ethylhexanol.

Arbeitsstoff	Geruchsfunktion	Altersklasse	Geschlecht	n	Alter	
					M	SD
Methylmethacrylat 2-Ethylhexanol	schlecht	jung	Frauen	5	22,6	1,1
			Männer	4	25,0	4,9
		alt	Frauen	5	59,0	5,9
			Männer	5	59,6	4,9
	gut	jung	Frauen	5	23,0	1,9
			Männer	3	24,3	4,0
alt	Frauen	2	62,5	0,7		
	Männer	3	56,3	8,4		

### Studiendesign

Jeder Untersuchungsteilnehmer wurde gegenüber beiden Reizstoffen in jeweils zwei Expositionsstufen exponiert. Die Untersuchungsdaten werden getrennt für die beiden Reizstoffe analysiert. Das jeweilige Untersuchungsmodell schließt die moderatorbezogenen Klassifikationsfaktoren Alter und Geruchsfunktion (s. Tab. 5) ein.

### ***Moderatorbezogene Hypothese für beide Stoffe***

Es ist bekannt, dass Alterungsprozesse olfaktorische Funktionen (Doty 2006) verändern und zu einer messbar reduzierten Geruchswahrnehmung führen (Hummel et al. 2007). Ob diese sensorische Leistungsminderung auch chemosensorische Effekte der Arbeitsstoffe verändert, ist offen. Diese Fragen sind unter demographischen und präventiven Aspekten von Interesse.

Moderatoren: Alter (jung/alt), Geruchsfunktion (gut/schlecht)

Es wird angenommen, dass Alter und die Fähigkeit der Geruchswahrnehmung einen Einfluss auf die subjektive Beurteilung der Reizstoffwahrnehmung sowie das Leistungsverhalten haben.

Dabei sollten - wie bereits in vorangegangenen Experimenten - die subjektiven Einschätzungen des Geruchs von Personen mit höheren Geruchsdiskriminationsleistungen (gute Geruchsfunktion) differenzierter und nicht durchgängig so hoch sein wie die subjektive Einschätzung von Personen mit niedrigeren Geruchsdiskriminationsleistungen (schlechte Geruchsfunktion; vgl. Kleinbeck et al. 2005).

Chemosensorische Irritationseffekte bleiben möglicherweise unbeeinflusst von altersbedingten Veränderungen der Geruchsfähigkeit.

Die Bedeutung der Moderatoren kann in Abhängigkeit von Reizstoffen variieren. Es wurden zwei Reizstoffe gewählt, die sich in ihrer trigeminalen Wirksamkeit unterscheiden. 2-Ethylhexanol wird gegenüber Methylmethacrylat als trigeminal wirksamer angesehen (Kiesswetter et al. 2005, van Thriel et al. 2005).

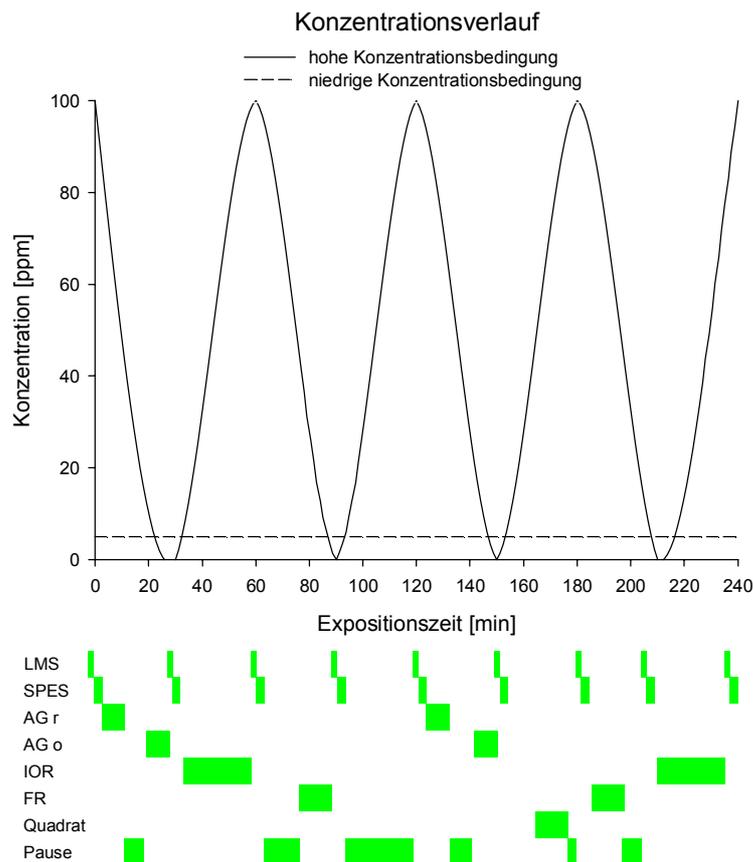
### ***Methylmethacrylat***

Exposition und Testverteilung

Der MAK-Wert für Methylmethacrylat liegt bei  $50 \text{ ml/m}^3$  (ppm) bei einer Spitzenwertbegrenzungskategorie 1 und einem Überschreitungsfaktor 2. Das Experiment realisiert eine konstante Niedrig-Expositionsbedingung (5 ppm) und eine variable Hoch-Konzentrationsbedingung (0 - 100 ppm, regelmäßig alternierend; vgl. Abb. 3).

Die Verteilung der Messinstrumente über die 4-stündige Expositionsphase umfasst eine systematische Abfolge von neun Einschätzungen sowie zwei Tests pro Testtyp (Quadratstest nur einmal; vgl. Abb.3). Die zweimalige 25-minütige Testphase des IOR diente auch hier als Standardbedingung für die Untersuchung der Lidschlussfrequenz.

Vor und nach der Expositionsphase wurden rhinomanometrische Messungen vorgenommen.



**Abbildung 3:** Expositionsverlauf Methylmethacrylat und Verteilung der Leistungstests über den Untersuchungszeitraum.

### Stoffbezogene Hypothesen

Nach tierexperimentellen Untersuchungen und Untersuchungen an Arbeitern mit Methylmethacrylat-Exposition hat der Stoff zumindest unterhalb  $50 \text{ ml/m}^3$  (ppm) kaum irritative Wirkung bei inhalativer Aufnahme. Systematische Untersuchungen aus der Mainzer Arbeitsgruppe um Prof. Muttray (2007) legen vorwiegend Geruchseffekte nahe. Expositionsspitzen wurden nicht untersucht, so dass geringe Effekte im erlaubten Spitzenexpositionsbereich (100 ppm) daher nicht ausgeschlossen werden können.

### Moderatorbezogene Hypothesen

Vgl. ‚Moderatorbezogene Hypothesen für beide Stoffe‘.

### 2-Ethylhexanol

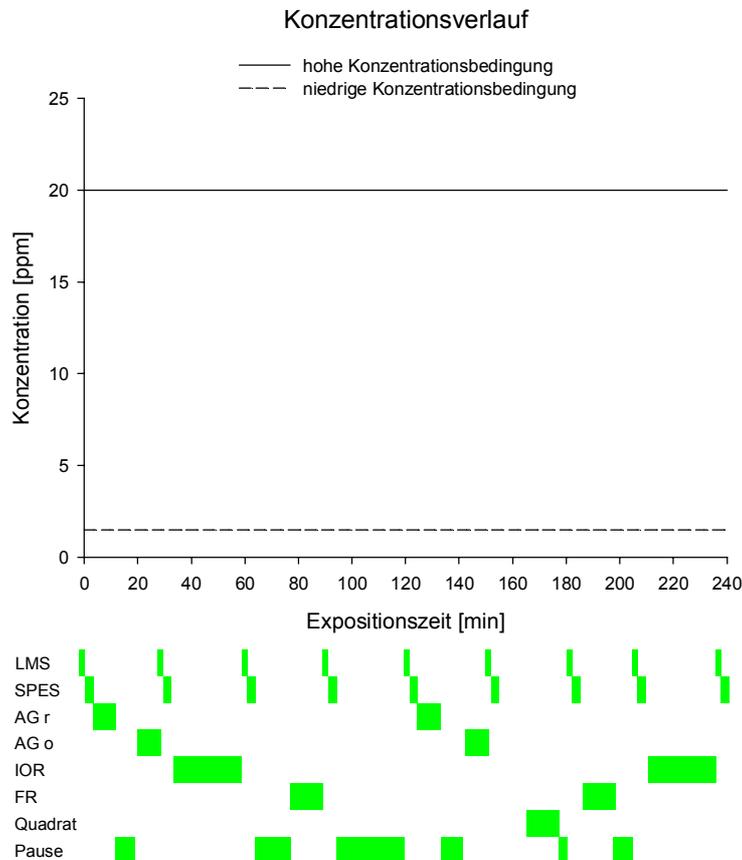
#### Exposition und Testverteilung

Der MAK-Wert für 2-Ethylhexanol wurde 2005 auf  $20 \text{ ml/m}^3$  (ppm) bei einer Spitzenwertbegrenzungskategorie 1 und einem Überschreitungsfaktor 1 herabgesetzt, da bei höheren Expositionen lokale Reizwirkungen berichtet worden waren. Im Experiment wurde eine konstante Niedrig-Konzentrationsbedingung (1,5 ppm) und eine konstante Hoch-Konzentrationsbedingung (20 ppm) realisiert (Abb. 4).

Die Verteilung der Messungen über die 4-stündige Expositionsphase (Abb. 4) entspricht genau dem Methylmethacrylat-Experiment. Sie umfasste eine systematische Abfolge von neun Ein-

schätzungen, zwei Tests pro Testtyp (Quadrattest nur einmalig) sowie Lidschlussfrequenzmessungen während der IOR-Tests.

Vor und nach der Expositionsphase wurden rhinomanometrische Messungen vorgenommen.



**Abbildung 4:** Expositionsverlauf 2-Ethylhexanol und Verteilung der Leistungstests über den Untersuchungszeitraum.

### Stoffbezogene Hypothesen

Da 2-Ethylhexanol eine trigeminal potente Substanz ist, war nicht auszuschließen, dass auch geringe Expositionsbelastungen nachweisbare irritative Effekte hervorrufen.

### Moderatorbezogene Hypothesen

Vgl. ‚Moderatorbezogene Hypothesen für beide Stoffe‘.

## Darstellung der Ergebnisse der Arbeitsschwerpunkte 2.1 und 2.2

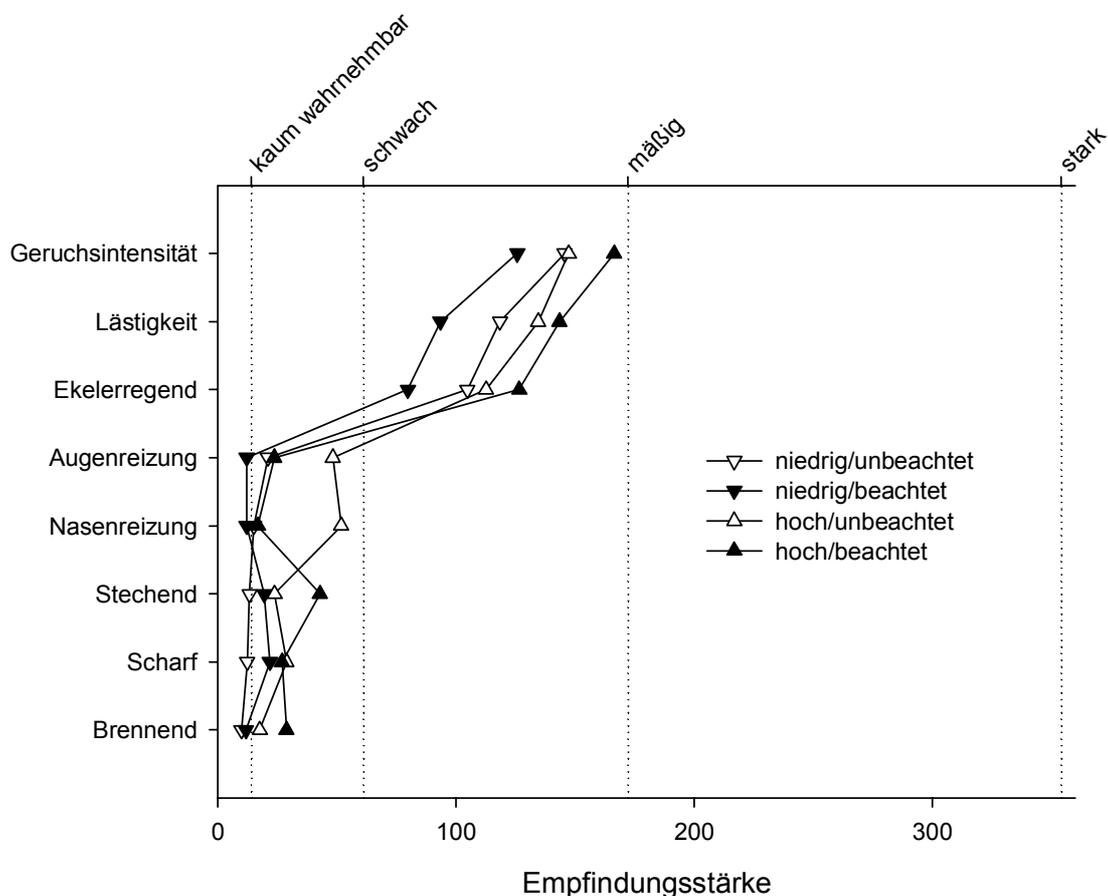
Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt getrennt für die in den beiden ASPs untersuchten Substanzen und behandelt aufeinanderfolgend primäre und sekundäre Effekte.

### ASP 2.1 Experimentelle Exposition mit Schwefelwasserstoff

#### Primäre Effekte

##### Empfindungsstärke (LMS)

Zur Charakterisierung der beiden untersuchten Expositionsbedingungen und der beiden Instruktionen sind in Abbildung 5 die Mittelwerte der acht untersuchten chemosensorischen Empfindungen als Profile dargestellt. Für diese Darstellung wurden die zehn Beurteilungen während der 4-stündigen Expositionsphase zusammengefasst.



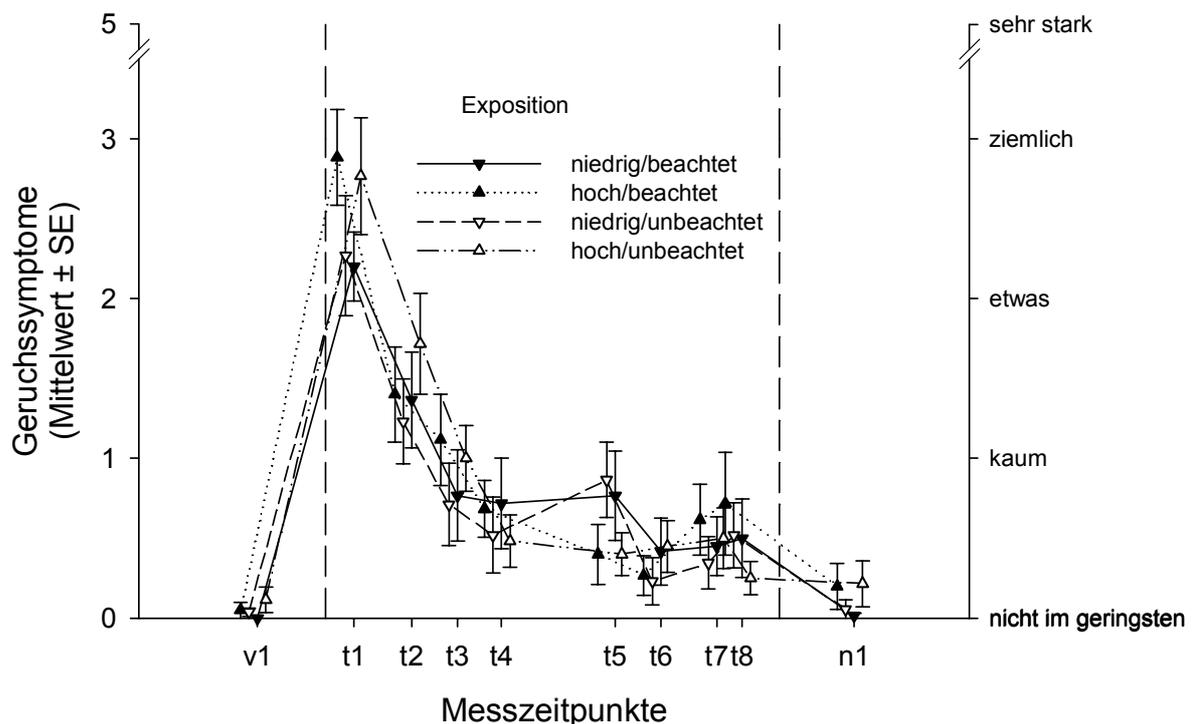
**Abbildung 5:** Profil der mittleren Intensität der acht chemosensorischen Empfindungsstärken für die Schwefelwasserstoffexpositionen (▽: niedrig/unbeachtet, ▼: niedrig/beachtet, △: hoch/unbeachtet, ▲: hoch/beachtet,  $M \pm SE$ ).

Lediglich die Intensitätsangaben der Einschätzungen olfaktorischer Empfindungen überschreiten im 4-Stunden-Mittel die Einschätzung ‚schwach‘. Die Konzentrationsunterschiede lassen sich statistisch nachweisen. Zwischen den Instruktionsbedingungen (unbeachtet vs. beachtet) sind leichte Unterschiede sichtbar, die Mittelwertsunterschiede lassen sich jedoch nicht statistisch absichern. Die trigeminalen Empfindungen werden geringer als ‚schwach‘ eingeschätzt und scheinen, wie für den ‚Geruchsstoff‘  $H_2S$  erwartet, als unproblematisch erlebt zu werden. Es existiert eine marginale Wechselwirkung zwischen den Faktoren Konzentration und Instruktion für die Skala ‚Ekelerregend‘. Bei niedrigen  $H_2S$  Konzentrationen führt die ‚Nicht-Beachtung‘

zu höheren Einschätzungen, während bei den hohen H<sub>2</sub>S Konzentrationen die erwartete Verstärkung der Geruchswirkung durch die Aufmerksamkeitsrichtung beobachtet wurde.

#### *Symptome: olfaktorisch, trigeminal (SPES)*

Der nächste Auswertungsschritt beantwortet die Frage, in welchem Umfang akute Symptome auftraten und wie sich diese Beschwerden über die 4-stündige Expositionsphase veränderten. In sechs der sieben Symptombereiche wurden ‚kaum‘ Symptome (mittlere Bewertung  $\leq 1$ ) verspürt. Abbildung 6 verdeutlicht, dass ‚Geruchssymptome‘ bei höheren Expositionsbedingungen verstärkt berichtet wurden, in ihrer Intensität aber unterhalb der Intensitätskategorie ‚etwas‘ blieben. Dennoch war der Haupteffekt Exposition signifikant ( $p \leq .05$ ).



**Abbildung 6:** Höhe und Verläufe der Geruchssymptome für die Schwefelwasserstoffexpositionen.

Vom Beginn der Exposition bis zum Ende nimmt die Stärke der Geruchs-Symptomangaben ab ( $p \leq .001$ ), was auf Adaptationsprozesse hinweist. Die Symptome der Nachmessung unterscheiden sich nicht mehr signifikant vom Ausgangsniveau vor der Exposition. Die Zeitverläufe der mittels LMS erfassten Empfindungsstärken sind vergleichbar und legen, auch bei differenzierterer Erfassung der olfaktorischen Wahrnehmung, Adaptationsprozesse nahe.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass sich die primären Effekte auf Beschreibungen olfaktorischer Wahrnehmungen während der Exposition beschränken.

#### **Physiologie: Rhinomanometrie, Lidschlussfrequenz**

##### *Rhinomanometrie*

Bei der Rhinomanometrie werden die Durchflussraten der Nase als Flow in ml/s dargestellt (Tab. 6).

**Tabelle 6:** Veränderung des Nasendurchflusses von der Vor- (Flow<sub>1</sub>) zur Nachmessung (Flow<sub>2</sub>).

		Flow <sub>1</sub> [ml/s]	Flow <sub>2</sub> [ml/s]	ΔFlow [ml/s]
niedrig	ignoriert	656	632	-24
	beachtet	592	559	-33
hoch	ignoriert	728	622	-106
	beachtet	654	632	-22

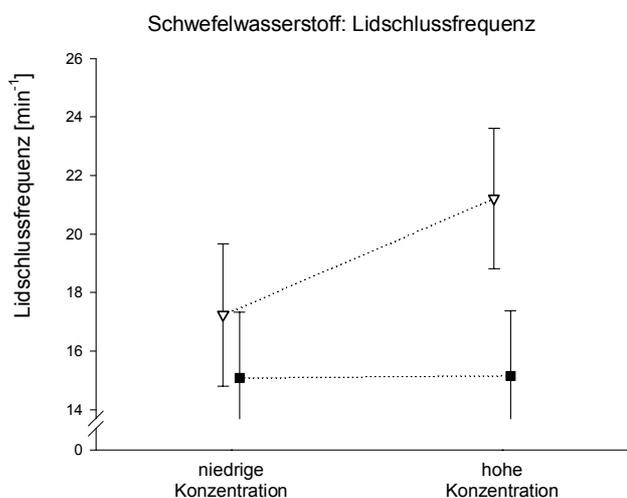
Obwohl die Mittelwerte des nasalen Atemflusses in der Nachmessung geringer sind, lässt sich ein Unterschied zwischen den Bedingungen statistisch nicht nachweisen.

### Lidschlussfrequenz

Die Lidschlussfrequenz (Tab. 7) stieg konzentrationsabhängig an (16,2 vs. 18,2 min<sup>-1</sup>,  $p \leq .05$ ), und es zeigte sich eine Wechselwirkung zwischen Expositionshöhe und Geschlecht ( $p \leq .05$ ): die Blinzelrate der Männer blieb nahezu gleich (15,1 vs. 15,2 min<sup>-1</sup>), die der Frauen stieg an (17,3 vs. 21,2 min<sup>-1</sup>; vgl. Abb. 7).

**Tabelle 7:** Mittlere Lidschlussfrequenz während der Expositionsphasen.

		Lidschlussfrequenz [min <sup>-1</sup> ]
niedrig	ignoriert	15,8
	beachtet	16,5
hoch	ignoriert	18,0
	beachtet	18,4

**Abbildung 7:** Lidschlussfrequenz (M ± SE) für Männer (■) und Frauen (▽) bei niedriger und hoher Schwefelwasserstoff-Konzentration.

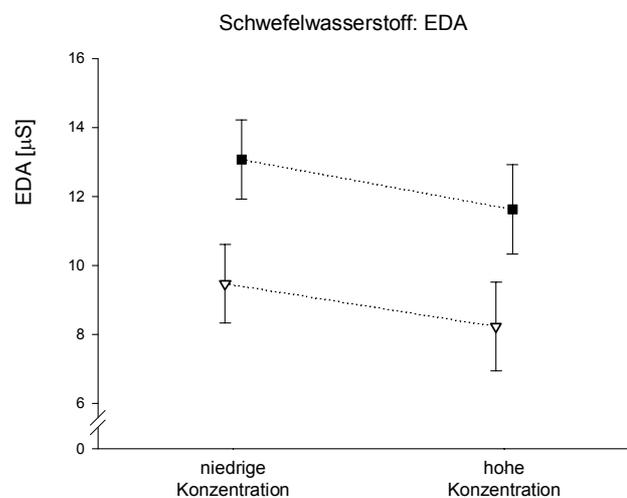
Überraschenderweise zeigen die Ergebnisse einen konzentrationsabhängigen Anstieg der Lidschlussfrequenz bei Frauen, der für einen geruchsintensiven Arbeitsstoff wie H<sub>2</sub>S nicht erwartet wurde. Im Vergleich zur normalen Variation dieses physiologischen Parameters (vgl. entsprechender Standardfehler) ist die Signifikanz des beobachteten Anstiegs eher auf die Sensitivität des Versuchsdesigns (Detektion geringster Unterschiede) als auf eine tatsächliche und adverse Arbeitsstoffwirkung zurückzuführen.

*Elektrodermale Aktivität (EDA)*

Effekte der Expositionshöhe oder der Aufmerksamkeitslenkung wurden bei der EDA nicht beobachtet (Tab. 8). Die EDA-Daten von Frauen und Männern zeigten signifikante Unterschiede ( $p \leq .05$ ): die mittlere Hautleitfähigkeit der Männer war höher als die der Frauen (12,4 vs. 8,9  $\mu\text{S}$ ; vgl. Abb. 8).

**Tabelle 8:** Mittlere EDA-Werte während der Expositionsphasen.

		Hautleitfähigkeit [ $\mu\text{S}$ ]
niedrig	ignoriert	12,4
	beachtet	10,2
hoch	ignoriert	8,9
	beachtet	11,0

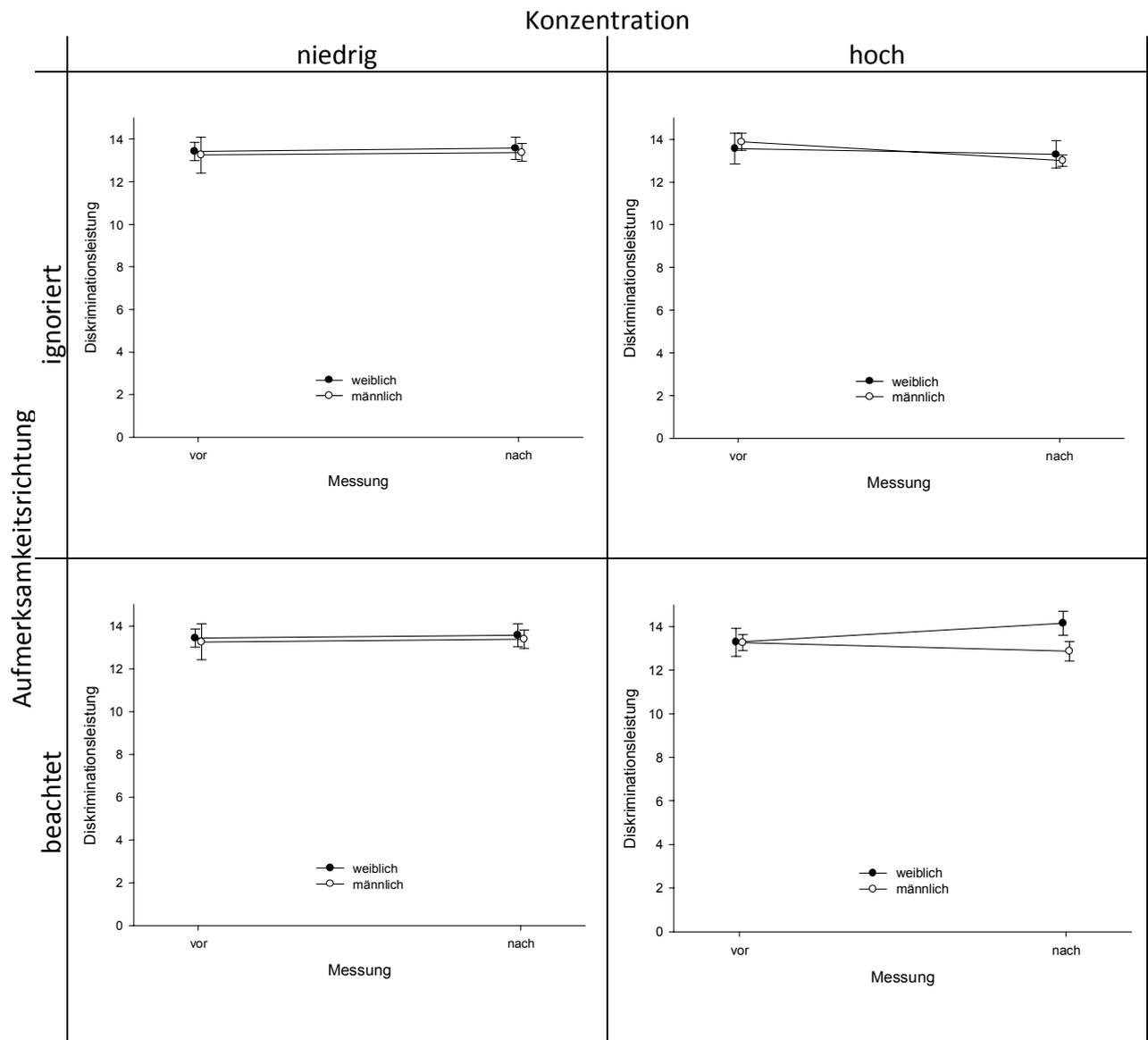


**Abbildung 8:** Elektrodermale Aktivität ( $M \pm SE$ ) für Männer (■) und Frauen (▽) bei niedriger und hoher Schwefelwasserstoff-Konzentration.

Diese Ergebnisse legen keine Induktion negativer Emotionen durch  $\text{H}_2\text{S}$  nahe. Durch die Gewöhnung an den Geruch (siehe Abb. 6) werden solche autonomen Reaktionen möglicherweise über die 4-stündige Expositionsphase reduziert bzw. kompensiert.

*Physiologie: Diskriminationstest mit Geruchsstiften (vor, nach Exposition)*

Das Verfahren erwies sich als nicht-sensitiv hinsichtlich der untersuchten Variablen (siehe Abb. 9).

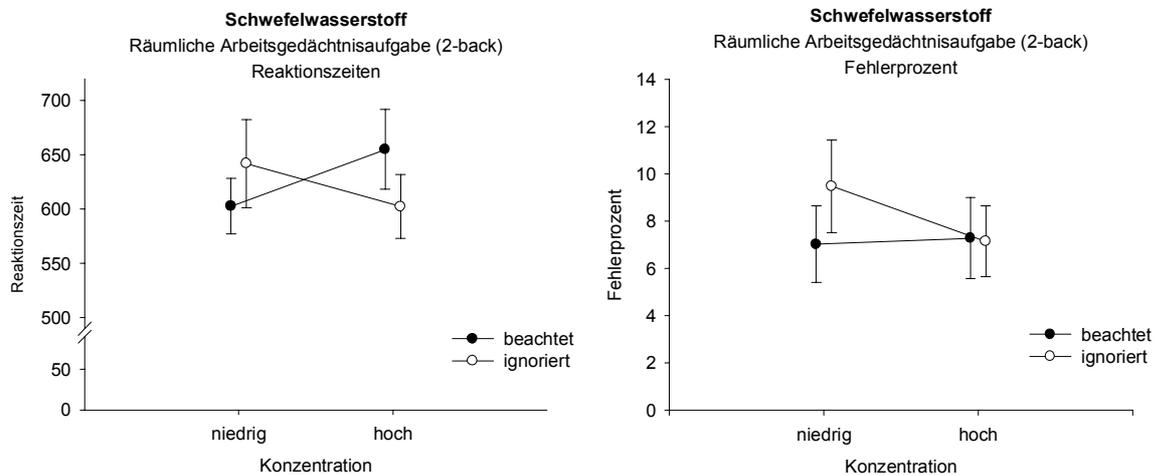


**Abbildung 9:** Diskriminationsleistung vor und nach der Exposition unter Berücksichtigung des Geschlechts in den vier Experimentbedingungen ( $M \pm SE$ ).

## Sekundäre Effekte

### Verhalten: Arbeitsgedächtnisaufgabe (AG)

Die Wechselwirkung Konzentration\*Aufmerksamkeitslenkung wurde bei der räumlichen 2-back Arbeitsgedächtnisaufgabe ‚Punktposition‘ signifikant (Abb. 10). Ein ähnlicher systematischer Effekt konnte bei den übrigen Aufgabenvarianten ( Objekte, 3-back Objekte, 3-back Punktposition) nicht beobachtet werden.

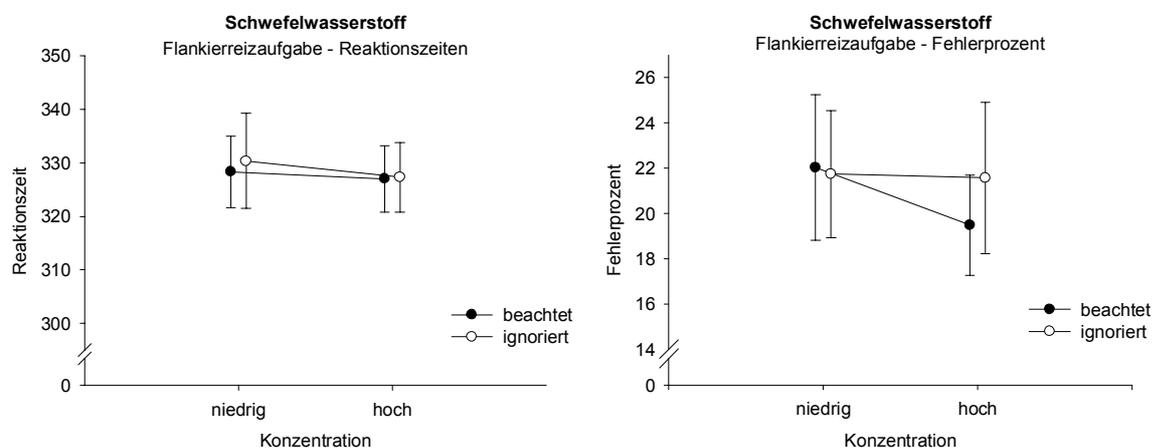


**Abbildung 10:** Reaktionszeiten und Anteil der Fehler (Fehlerprozent) der räumlichen 2-back Arbeitsgedächtnisaufgabe ‚Punktposition‘ für alle vier Expositionsbedingungen ( $M \pm SE$ ).

Abbildung 10 zeigt, dass die Reaktionszeiten (Abb. 10 links) bei hohen Expositionen länger sind als bei niedrigen Konzentrationen, wenn der Geruch des Arbeitsstoffes beachtet wird. Das Reaktionszeitmuster entspricht nur dieser Aufgabenvariante der Ablenkungshypothese. Es ist jedoch nicht konsistent in allen Aufgabentypen dieses Testverfahrens zu beobachten. Die Variation der Aufgabenschwierigkeit, die durch verschiedene Versionen der AG-Aufgabe operationalisiert wurde, zeigte keine Interaktion mit der Exposition oder der Aufmerksamkeitsvariation. Auch bei deutlicher Beanspruchung kognitiver Ressourcen lenkte der unangenehme Geruch von  $H_2S$  nicht von der ‚Arbeitstätigkeit‘ der Untersuchungsteilnehmer ab.

### Verhalten: Flankierreizaufgabe (FR)

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen keine signifikanten systematischen Einflüsse von Konzentration und Aufmerksamkeitsrichtung (Abb. 11).

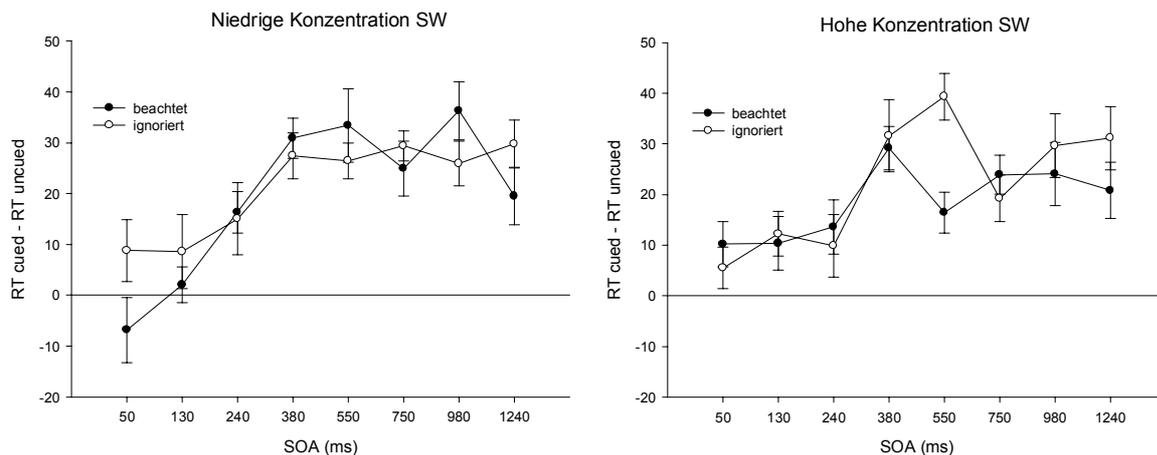


**Abbildung 11:** Reaktionszeiten und Anteil der Fehler (Fehlerprozent) der Flankierreizaufgabe für alle vier Expositionsbedingungen ( $M \pm SE$ ), Wechselwirkung nicht signifikant.

Im Gegensatz zur Ablenkungshypothese deutet sich in den Ergebnissen in Abbildung 11 ein genaueres Reaktionsverhalten bei höheren Arbeitsstoffkonzentrationen an.

### Verhalten: Inhibition of Return (IOR)

Bei der IOR-Aufgabe wurde eine signifikante Dreifach-Wechselwirkung zwischen Konzentration, Aufmerksamkeitsfokus und Reizintervall ( $p \leq .05$ ) beobachtet. Abbildung 12 zeigt, dass das Reaktionsverhalten (s. Aufgabenbeschreibung IOR) im Bereich längerer Intervalle zwischen Hinweis- und Zielreiz relativ instabil ist.



**Abbildung 12:** Reaktionszeitdifferenzen ( $M \pm SE$ ) zwischen inkongruenten und kongruenten Reizdarbietungen in der IOR-Aufgabe (SOA = Zeitintervall zwischen Hinweis- und Zielreiz). Unter beiden Schwefelwasserstoff-Konzentrationen wurde die Aufmerksamkeitsrichtung variiert.

Basierend auf den Ergebnissen aller kognitiven Leistungstests muss jedoch die Hypothese einer modulierten oder generellen Ablenkung durch den unangenehmen Geruch von  $H_2S$  abgelehnt werden. Die Ergebnisse zu den sekundären Effekten sind (a) uneinheitlich (siehe Ergebnisse AG), (b) teilweise entgegen der Hypothesen (siehe Abb. 11) und (c) im Ausmaß sehr gering (siehe Abb. 10 und 12).

### Zusammenfassung (Schwefelwasserstoff)

Das Experiment untersuchte Effekte unregelmäßig variierender Schwefelwasserstoffexpositionen in niedriger (0-1 ppm) und hoher Expositionsstufe (0-10 ppm).

Die primären Effekte von Schwefelwasserstoff beschränken sich auf schwache Geruchswirkungen. Systematische irritative Effekte konnten weder auf Erlebensebene noch auf physiologischer Ebene beobachtet werden. Ein möglicher Einfluss der Expositionsbedingung zeigte sich nur in der Lidschlussfrequenz bei Frauen. Ein Einfluss der Instruktion, Konzentrationsspitzen zu zählen (‚beachtet‘) wurde nur in den Skalierungen der Empfindungen ‚Lästigkeit‘ und ‚Ekelregend‘ beobachtet.

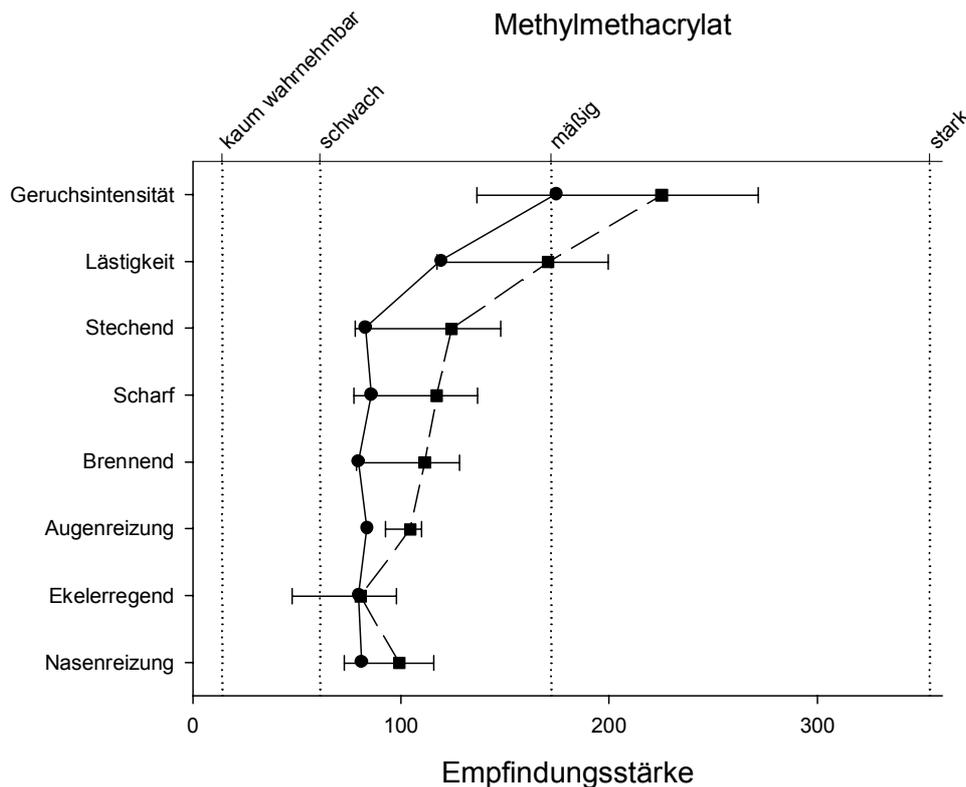
Auf sekundärer Ebene wurden keine generalisierbaren, dosisabhängigen Leistungsveränderungen beobachtet. Wechselwirkungen mit dem Aufmerksamkeitsfaktor treten nicht systematisch in Erscheinung.

## ASP 2.2 ExpoLab ‚Altern‘ – Experimentelle Exposition mit Methylmethacrylat

### Primäre Effekte

Empfindungsstärke (LMS) und Symptome (SPES): olfaktorisch, trigeminal

Zur Charakterisierung der beiden untersuchten Expositionsbedingungen sind in Abbildung 13 die Mittelwerte der acht chemosensorischen Empfindungen (LMS) als Profile dargestellt. Für diese Darstellung wurden die neun Beurteilungen während der 4-stündigen Expositionsphase zusammengefasst.



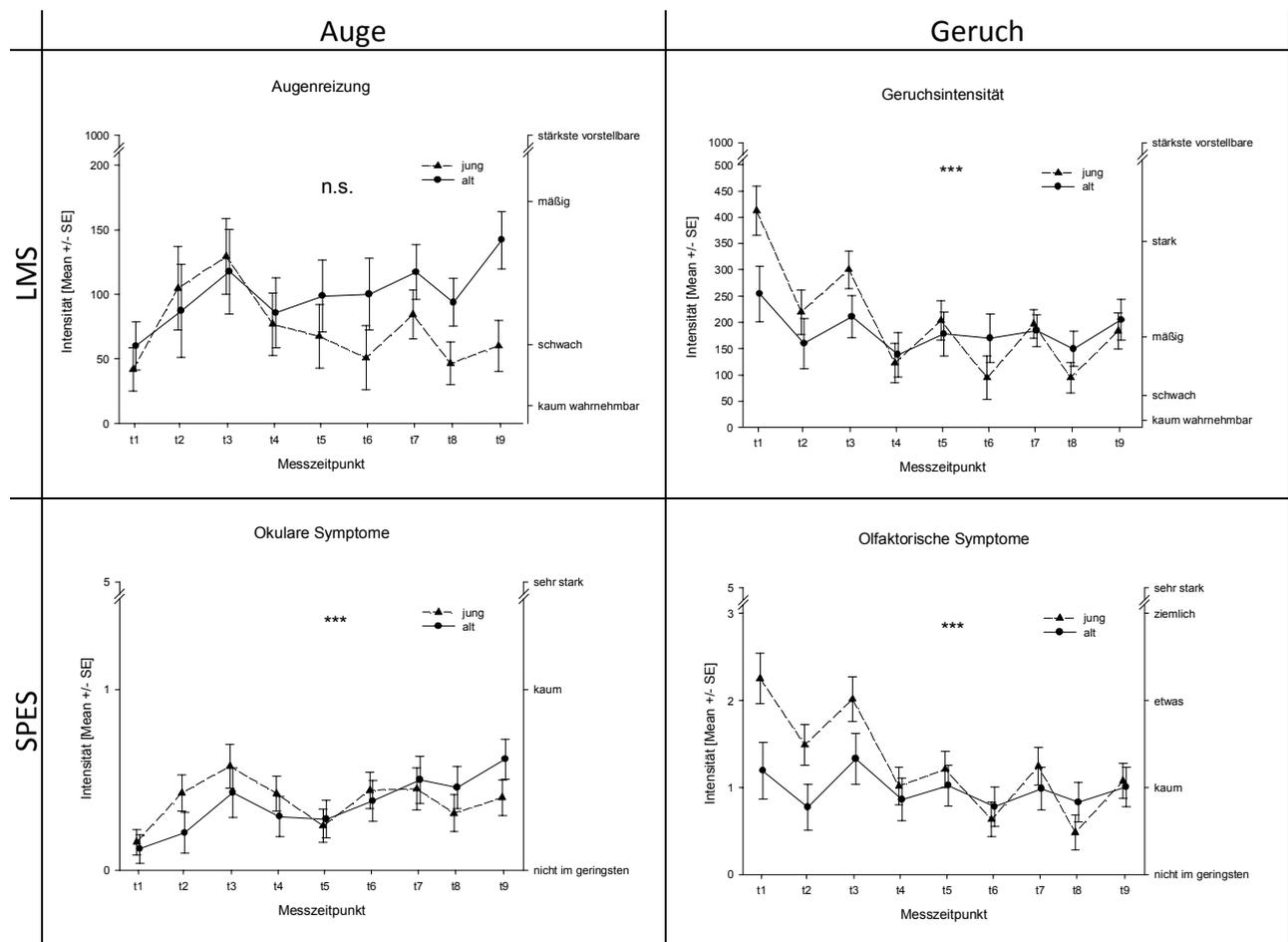
**Abbildung 13:** Profil der mittleren Intensität der acht chemosensorischen Empfindungsstärken für die beiden Konzentrationsbedingungen (●: 5 ppm, ■: 0-100 ppm); die Endpunkte der horizontalen Balken zeigen die jeweiligen Mittelwerte von Konzentrationsspitzen (n=5, 100 ppm) und -tälern (n=4, 0 ppm).

Die stärksten Empfindungen werden für ‚Geruchsintensität‘ und ‚Lästigkeit‘ abgegeben. Lediglich die ‚Ekelerregend‘-Einschätzung unterscheidet nicht zwischen den beiden Konzentrationsbedingungen (Abb. 13).

Die durchschnittlichen Bewertungen der variierenden, hohen Konzentrationsbedingung unterschreiten nur bei den olfaktorischen Empfindungen ‚Ekelerregend‘ und ‚Geruchsintensität‘ in den Konzentrationstälern (0 ppm, siehe Balken in der Abb. 13) die Bewertungen der konstant niedrigen Konzentrationsbedingung (5 ppm) deutlich. Trigemurale Empfindungen persistieren dagegen auch in den Wellentälern und unterschreiten im Durchschnitt das Empfindungs-Niveau der niedrigen Konzentrationsbedingung nicht.

Analysiert man den Zeitverlauf der Empfindungs- (LMS) und Symptomeinschätzungen (SPES) unter Berücksichtigung von Alter (jung, alt) und olfaktorischer Wahrnehmungsfähigkeit (niedrig, hoch), so zeigen sich neben Konzentrations- und Zeiteffekten vor allem signifikante Interaktionen ( $p \leq .05$ ) zwischen dem Messzeitpunkt und dem Alter (LMS: Stechend, Brennend, Nasenreizung, Geruchsintensität, Lästigkeit; SPES: prä-narkotische, olfaktorische, nasale und okuläre

Symptome). Abbildung 14 zeigt beispielhaft olfaktorische und irritative Einschätzungen in Abhängigkeit von der Altersgruppe im Zeitverlauf.



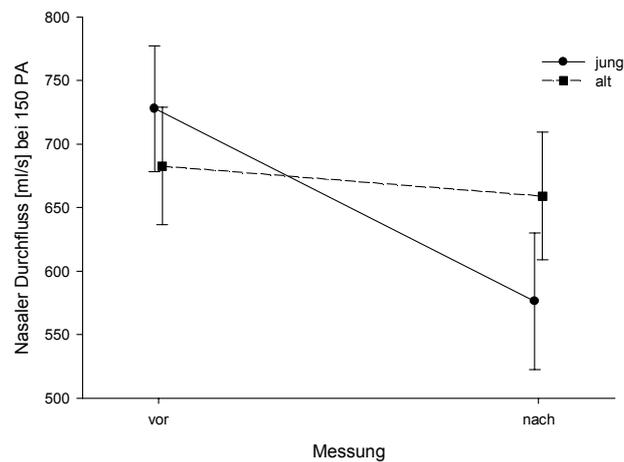
**Abbildung 14:** Höhe und Verläufe der Einschätzung der Augenreizung (LMS)/okularen Symptome (SPES) bzw. der Geruchseinschätzungen (LMS)/Geruchssymptome (SPES) bei Methylmethacrylat (gemittelt über die beiden Konzentrationsbedingungen) für junge und alte Untersuchungsteilnehmer (▲: jung, ●: alt,  $M \pm SE$ ).

Jüngere Untersuchungsteilnehmer zeigen sowohl stärkere Veränderungen im Gesamttrend über die Expositionszeit als auch bezogen auf kurzfristige Expositionsveränderungen (Expositionsspitzen).

### Physiologie: Rhinomanometrie, Lidschlussfrequenz

#### Rhinomanometrie

Für Methylmethacrylat zeigt sich allgemein, dass sich der durchschnittliche nasale Durchfluss von der Vor- zur Nachmessung signifikant reduziert ( $p \leq .01$ ). Die Interaktion zwischen Alter und dem Messzeitpunkt (vor bzw. nach der Exposition) im Hinblick auf den Nasendurchfluss ist signifikant ( $p \leq .05$ ; vgl. Abbildung 15). Ältere Versuchspersonen weisen geringere Einbußen der Nasendurchgängigkeit auf als jüngere Versuchspersonen.



**Abbildung 15:** Mittlerer nasaler Durchfluss jüngerer und älterer Versuchspersonen im Vergleich von Vor- und Nachmessung bei MMA ( $M \pm SE$ ).

Die in Abbildung 14 dargestellte erhöhte Reagibilität der jüngeren Untersuchungsteilnehmer führt allerdings nicht zu konzentrationsabhängigen Effekten in dieser Gruppe, da die Interaktion des Modulators Alter mit der Konzentration nicht signifikant wird.

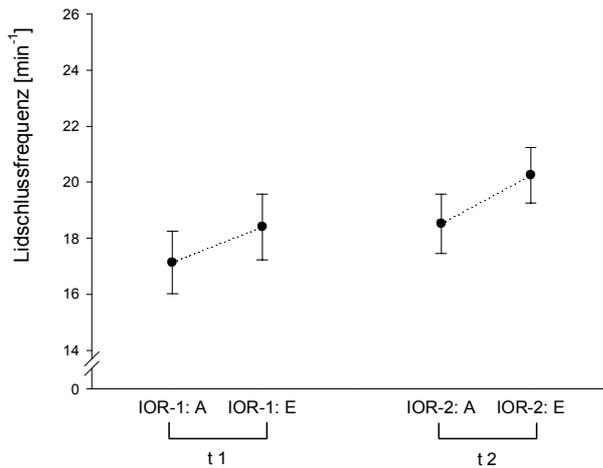
#### *Physiologie: Lidschlussfrequenz*

Bei der Lidschlussfrequenz zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontroll- und der Experimentalbedingung (Tab. 9).

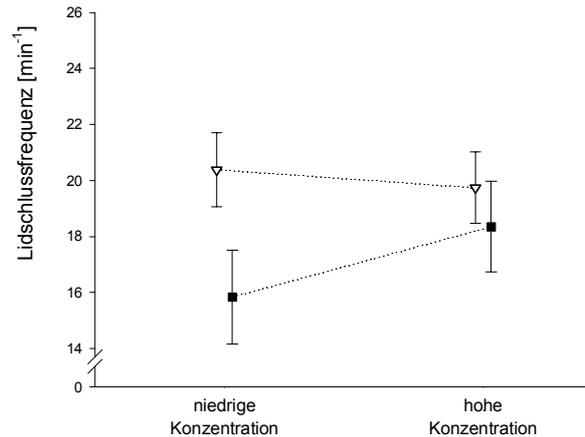
**Tabelle 9:** Mittlere Lidschlussfrequenz während der MMA-Expositionsphasen.

	Lidschlussfrequenz [ $\text{min}^{-1}$ ]
5 ppm	18,1
0-100 ppm	19,0

Es zeigten sich jedoch signifikante Unterschiede im Zeitablauf des Experiments. Zum einen stieg während eines jeweiligen IOR-Tests die Blinzelrate geringfügig an ( $p \leq .05$ ), zum anderen stieg die Blinzelhäufigkeit generell im Ablauf der vierstündigen Expositionsphase an ( $p \leq .05$ ), vgl. Abbildung 16. Weiterhin zeigte sich eine signifikante Wechselwirkung zwischen MMA-Konzentration und der Geruchsfunktion der Probanden auf die Lidschlussfrequenz ( $p \leq .05$ ), vgl. Abbildung 17. Personen mit guter Geruchsfunktion zeigen insgesamt eine geringere Lidschlussfrequenz, aber einen deutlichen dosismäßigen Anstieg.



**Abbildung 16:** Lidschlussfrequenz ( $M \pm SE$ ) während beider IOR-Tests (t1, t2), am Anfang (A) und Ende (E) des Tests gemessen.



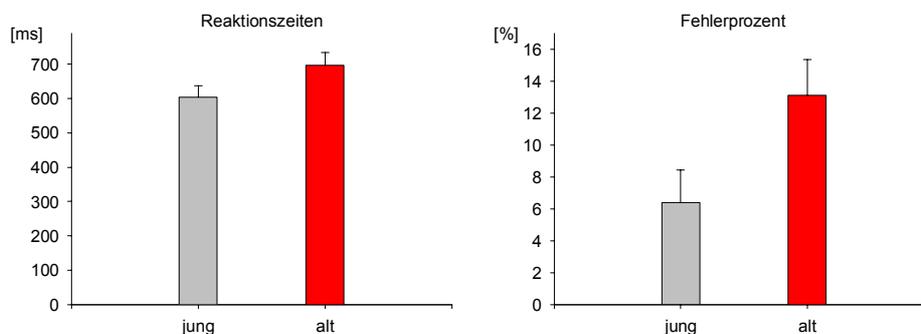
**Abbildung 17:** Lidschlussfrequenz für Versuchspersonen mit guter (■) und schlechter Geruchsfunktion (▽) bei niedriger und hoher MMA-Konzentration.

## Sekundäre Effekte

### Verhalten: Arbeitsgedächtnisaufgabe (AG)

Konzentrationsabhängige Effekte traten bei den beiden untersuchten Arbeitsgedächtnisaufgaben nicht auf.

In der räumlichen 2-back Aufgabe ‚Punktposition‘ unterscheiden sich die beiden Altersgruppen hinsichtlich der Fehler ( $p \leq .05$ ) und tendenziell hinsichtlich der Reaktionszeiten ( $p \leq .10$ , Abb. 18).

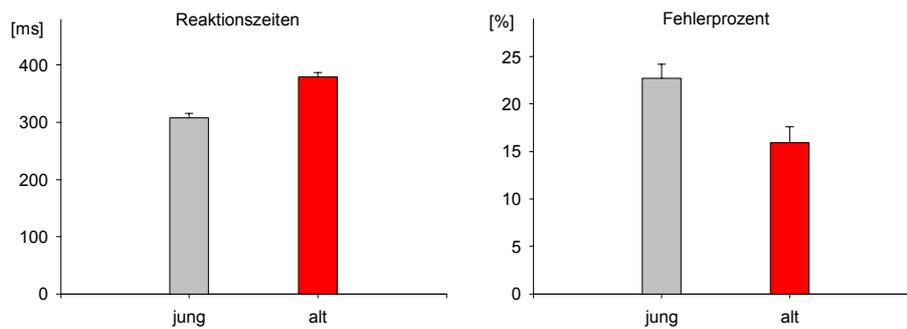


**Abbildung 18:** Reaktionszeiten und Anteil der Fehler (Fehlerprozent) nach Altersgruppen für die räumliche Arbeitsgedächtnisaufgabe ‚Punktposition‘ ( $M \pm SE$ ).

In der 2-back Aufgabe ‚Objekte‘ zeigt sich analog ein geringfügig erhöhter Fehleranteil bei den älteren Untersuchungsteilnehmern ( $p \leq .10$ ).

### Verhalten: Flankierreizaufgabe (FR)

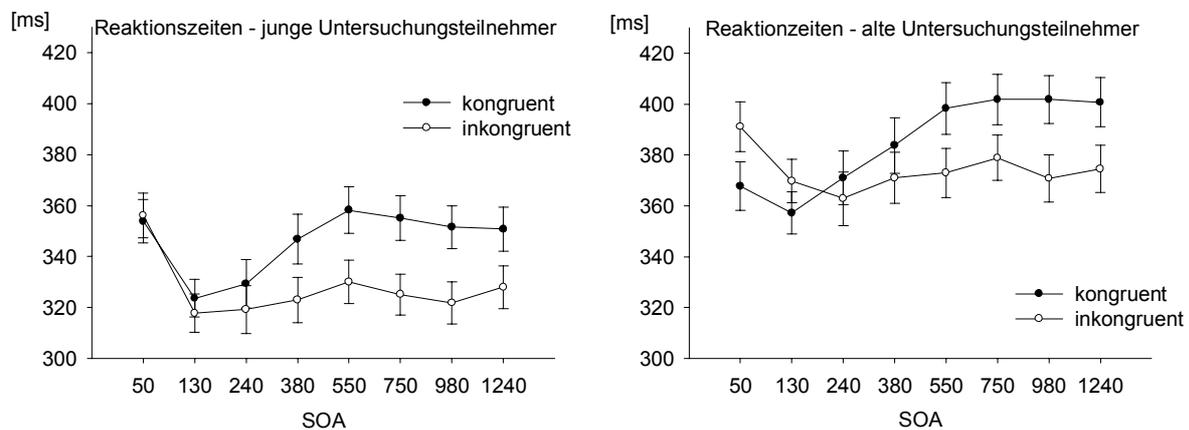
Die Reaktionszeit ist, wie in Abbildung 19 dargestellt, bei den älteren Untersuchungsteilnehmern länger als bei den jüngeren ( $p \leq .05$ ). Ältere machen jedoch bei dieser Aufgabe signifikant weniger Fehler ( $p \leq .05$ ), vorwiegend unter den schwierigeren (inkompatiblen) Reizbedingungen.



**Abbildung 19:** Reaktionszeiten und Anteil der Fehlerprozent für die jungen und alten Versuchsteilnehmer ( $M \pm SE$ ).

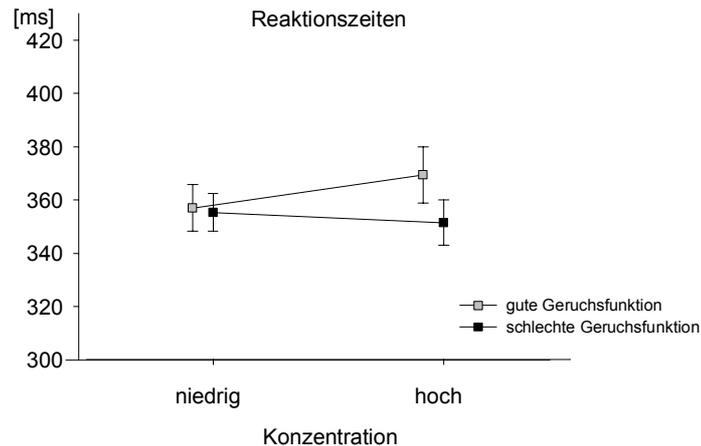
### Verhalten: Inhibition of Return (IOR)

Der Faktor Alter moderiert auch das Reaktionsverhalten in der IOR-Aufgabe. Es zeigt sich eine signifikante Wechselwirkung Alter\*Intervall (SOA)\*Kongruenz ( $p \leq .05$ ; vgl. Abb. 20). Ältere Untersuchungsteilnehmer reagieren langsamer und zeigen ein anderes Reaktionsverhalten bei sehr kurzen Intervallen zwischen Hinweis- und Zielreiz ( $< 240$  ms).



**Abbildung 20:** IOR-Reaktionszeiten, kongruent vs. inkongruent, über alle Zeitintervalle (SOA). Links die Reaktionszeiten der jüngeren Gruppe, rechts die der älteren Gruppe ( $M \pm SE$ ).

Es wurde eine signifikante Wechselwirkung Konzentration\*Geruchsfunktion beobachtet ( $p \leq .05$ ). Personen mit guter Geruchsfunktion zeigen gegenüber Personen mit schlechter Geruchsfunktion eine Leistungsver schlechterung bei Konzentrationserhöhung (Abb. 21).



**Abbildung 21:** IOR-Reaktionszeiten in Abhängigkeit von Konzentration und Geruchsfunktion

#### *Verhalten: Quadrattest*

Bei diesem Test traten keine signifikanten Alters-, Geruchsfunktions- oder Konzentrationseffekte auf.

#### **Zusammenfassung (Methylmethacrylat)**

Das Experiment untersuchte Effekte einer systematisch alternierenden hohen Exposition (0-100 ppm) gegenüber einer konstant niedriger Exposition (5 ppm) unter Berücksichtigung von Alter und Geruchsfunktion.

Die primären Effekte von Methylmethacrylat beschränken sich auf mäßige Geruchswirkungen und schwache irritative Wirkungen auf der Erlebensebene. Auf physiologischer Ebene bilden sich geringfügige Irritationseffekte über den Zeitfaktor ab, sie werden aber nicht über die Konzentrationsunterschiede moderiert. Es zeigt sich hinsichtlich der Lidschlussfrequenz eine unerwartete, möglicherweise zufällige Wechselwirkung zwischen Geruchsfunktion und Konzentration.

Der Faktor Alter moderiert Empfindungsverläufe während der Exposition, den nasalen Durchfluss und Leistungsparameter. Ältere Untersuchungsteilnehmer zeigen in neuropsychologischen Leistungstests mäßige Schnelligkeit, aber hohe Genauigkeit.

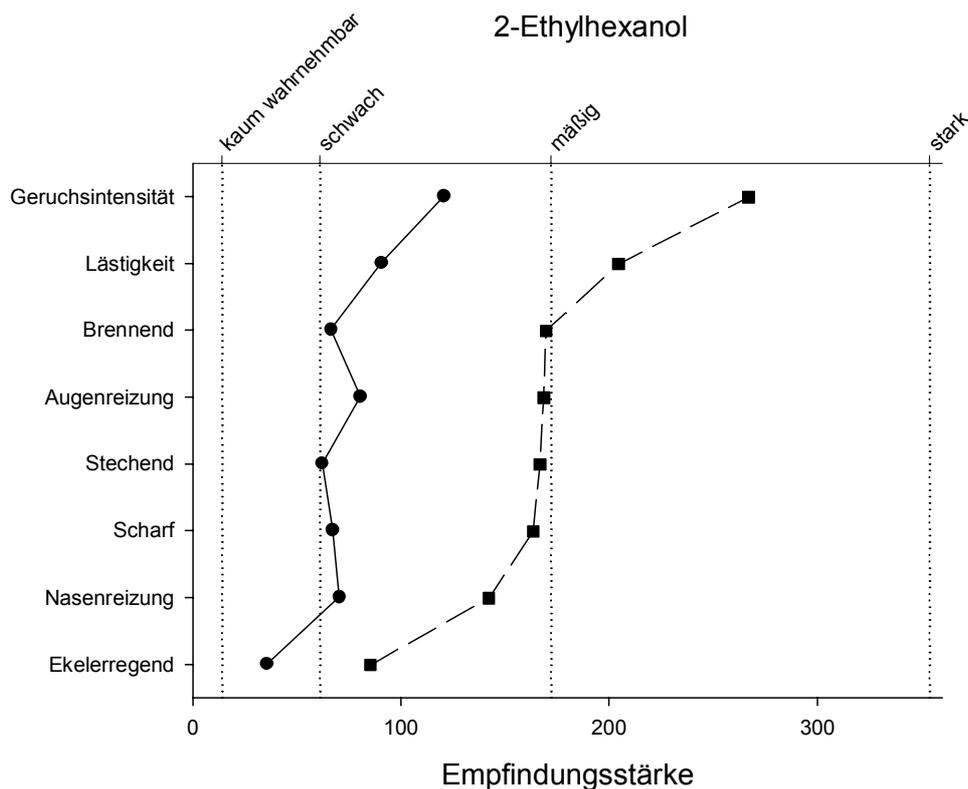
Der Faktor Geruchsfunktion zeigt nur vereinzelt Effekte: im Zusammenhang mit der Geruchsbewertung (‚Ekeleregend‘), mit der IOR-Leistung und eventuell mit der Lidschlussfrequenz (s.o.).

## ASP 2.2 ExpoLab ‚Altern‘ – Experimentelle Exposition mit 2-Ethylhexanol

### Primäre Effekte

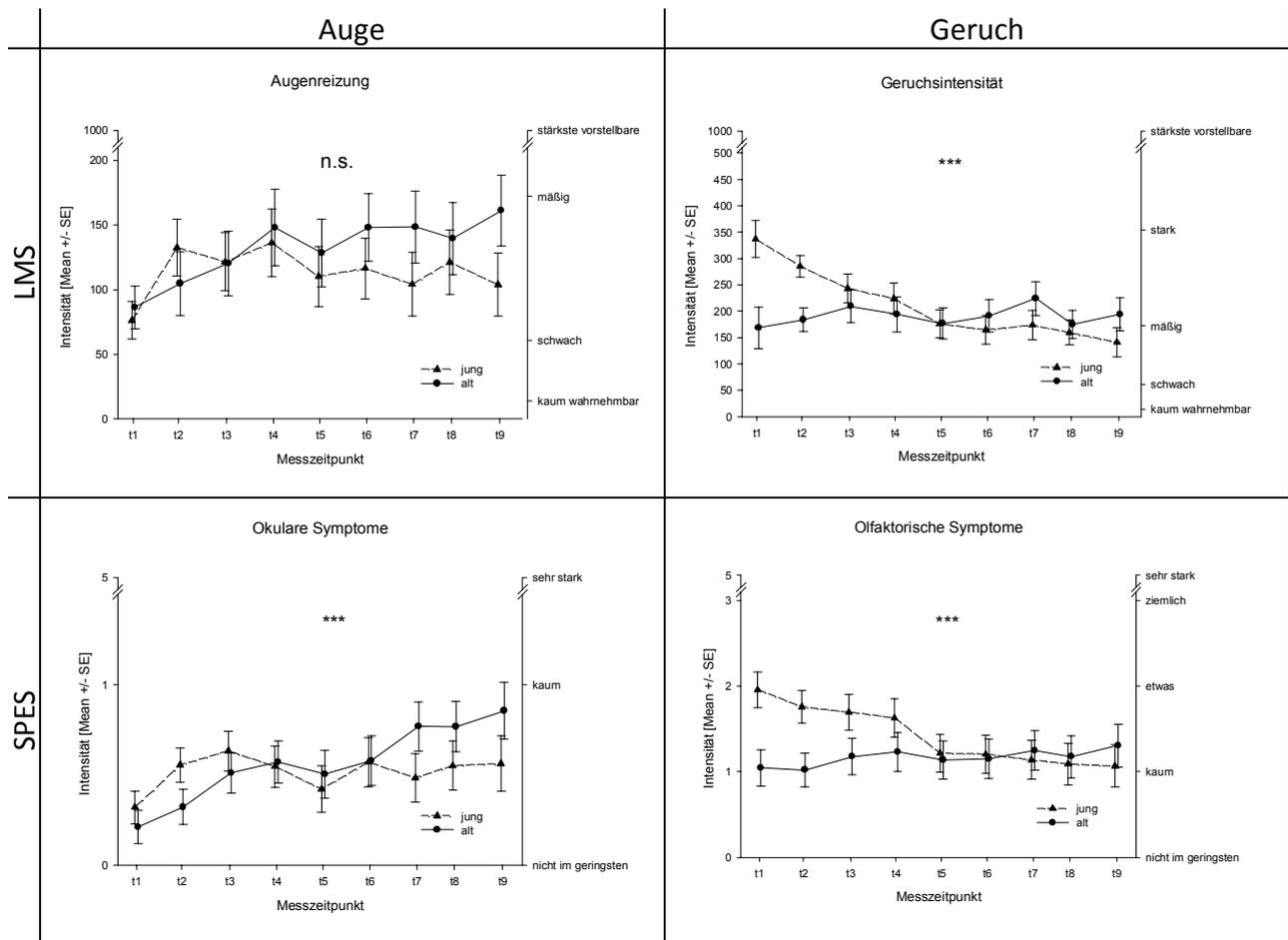
*Empfindungsstärke (LMS) und Symptome (SPES): olfaktorisch, trigeminal*

Zur Charakterisierung der beiden untersuchten Expositionsbedingungen sind in Abbildung 22 die Mittelwerte der acht chemosensorischen Empfindungen (LMS) als Profile dargestellt. Für diese Darstellung wurden die neun Beurteilungen während der 4-stündigen Expositionsphase zusammengefasst.



**Abbildung 22:** Profil der mittleren Intensität der acht chemosensorischen Empfindungsstärken für die beiden Konzentrationsbedingungen (●: 1,5 ppm, ■: 20 ppm).

Während die stärksten Empfindungen für ‚Geruchsintensität‘ und ‚Lästigkeit‘ angegeben werden, ist die olfaktorische Empfindung ‚Ekelerregend‘ nur gering ausgeprägt. In allen Empfindungen, auch in den trigeminalen, spiegeln sich systematisch Konzentrationsunterschiede wider. Analysiert man den Zeitverlauf der Empfindungsratings (LMS) und Symptomeinschätzungen (SPES) unter Berücksichtigung von Alter (jung, alt) und olfaktorischer Wahrnehmungsfähigkeit (niedrig, hoch), so zeigen sich neben Konzentrations- und Zeiteffekten auch bei 2-Ethylhexanol signifikante Interaktionen ( $p \leq .05$ ) zwischen Messzeitpunkt und Alter (LMS: Ekelerregend, Brennend, Nasenreizung, Geruchsintensität, Lästigkeit; SPES: olfaktorische Symptome, okuläre Symptome). Abbildung 23 zeigt beispielhaft olfaktorische und irritative Einschätzungen in Abhängigkeit von der Altersgruppe im Zeitverlauf.



**Abbildung 23:** Höhe und Verläufe der Einschätzung der Augenreizung (LMS)/okularen Symptome (SPES) bzw. der Geruchseinschätzungen (LMS)/Geruchssymptome (SPES) bei 2-Ethylhexanol (gemittelt über die beiden Konzentrationsbedingungen) für junge und alte Untersuchungsteilnehmer (▲: jung, ●: alt, M ± SE).

Ähnlich wie bei MMA zeigen jüngere Untersuchungsteilnehmer in den meisten subjektiven Variablen stärkere Veränderungen im Gesamttrend über den Expositionszeitraum. Irritative Empfindungen zeigen eher bei älteren Untersuchungsteilnehmern eine ansteigende Tendenz.

**Physiologie: Rhinomanometrie, Lidschlussfrequenz**

*Rhinomanometrie*

Für 2-Ethylhexanol wird in Bezug auf den Nasendurchfluss lediglich der Haupteffekt Messzeitpunkt signifikant ( $p \leq .01$ ). In der Nachmessung ist der Nasendurchfluss geringer (Tab. 10).

**Tabelle 10:** Mittlerer Nasendurchfluss (Flow) bei Vor- und Nachmessung in beiden untersuchten Konzentrationsbedingungen

Konzentration	Flow [ml/s]		$\Delta$ Flow [ml/s]
	vor	nach	
1,5 ppm	752	619	-133
20,0 ppm	719	610	-106

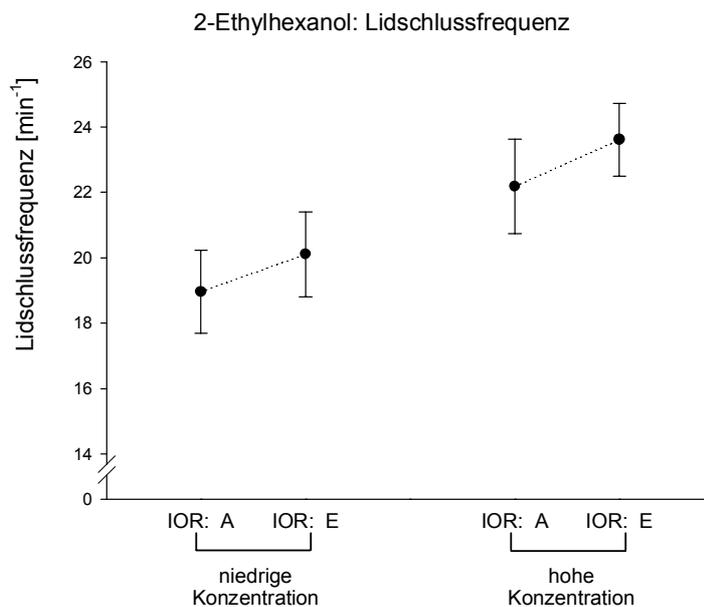
Es gibt keine signifikante Interaktion des Messzeitpunktes mit der Konzentration, der olfaktorischen Wahrnehmungsfähigkeit oder dem Geschlecht.

*Physiologie: Lidschlussfrequenz*

Bei der Lidschlussfrequenz (Tab. 11) zeigte sich ein hoch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Konzentrationsstufen ( $p \leq .001$ ). Darüber hinaus wurde ein signifikanter Anstieg ( $p \leq .01$ ) während der IOR-Tests beobachtet (Abb. 24).

**Tabelle 11:** Mittlere Lidschlussfrequenz während der 2-EH-Expositionsphasen.

Lidschlussfrequenz [ $\text{min}^{-1}$ ]	
1,5 ppm	19,5
20,0 ppm	22,9



**Abbildung 24:** Lidschlussfrequenz ( $M \pm SE$ ) bei niedriger und hoher 2-EH-Konzentration am Anfang (A) und am Ende (E) des IOR-Tests (gemittelt über beide Testdurchführungen der Expositionsphase).

In beiden Bedingungen nimmt die Lidschlussfrequenz über die Dauer des visuellen Aufmerksamkeitstests zu, wobei diese Zunahme in der 20 ppm Bedingung auf einem höheren Niveau erfolgt. Eine erhöhte Reagibilität der älteren Untersuchungsteilnehmer, wie sie durch die Verläufe der Augenreizungs-Beurteilungen nahe gelegt wird, zeigte sich in diesem physiologischen Parameter nicht.

**Sekundäre Effekte***Verhalten: Arbeitsgedächtnisaufgabe (AG)*

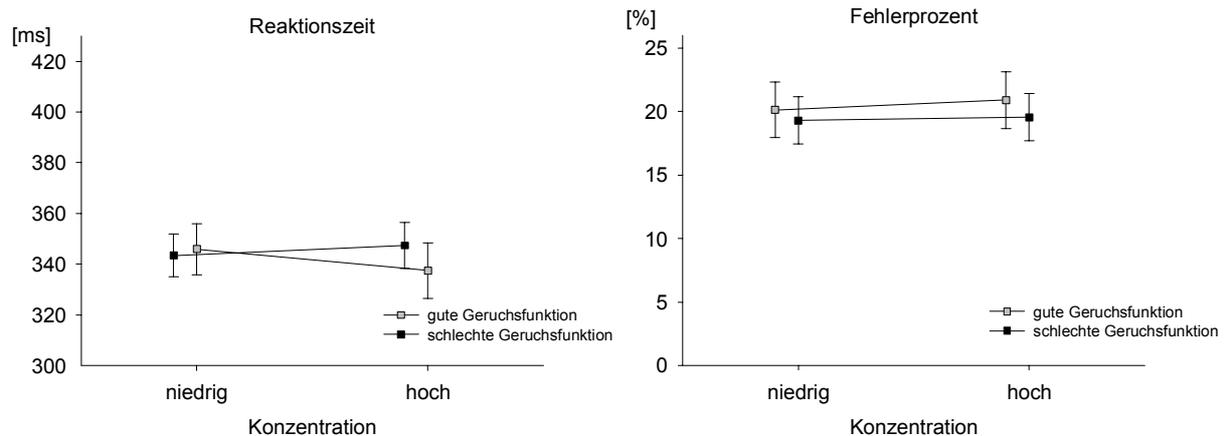
In den 2-back-Aufgaben ‚Punktposition‘ und ‚Objekte‘ traten keine konzentrationsabhängigen Haupteffekte auf. In beiden Aufgaben beeinflusst die Geruchsfunktion nur in komplexen Interaktionen mit Konzentration und Messzeitpunkt die Leistungsveränderung während der Exposition.

*Verhalten: Flankierreizaufgabe (FR)*

Unter 2-Ethylhexanol-Exposition zeigen sich bei der Flankierreiz-Aufgabe die gleichen signifikanten Alterseffekte, wie sie schon für MMA in Abb. 19 dargestellt wurden.

Hinsichtlich der Reaktionszeit zeigt sich eine signifikante Interaktion Geruchsfunktion\*Konzentration ( $p \leq .05$ ). Die Untersuchungsteilnehmer mit guter Geruchsleistung reagierten

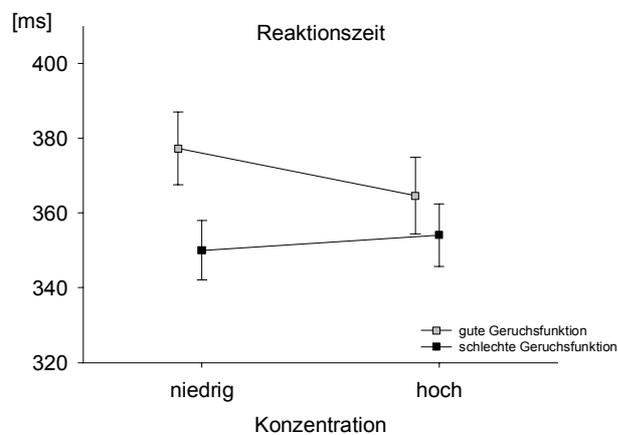
bei der hohen Konzentration schneller als die Untersuchungsteilnehmer mit schlechter Geruchsleistung, machten aber tendenziell auch mehr Fehler (Abb. 25).



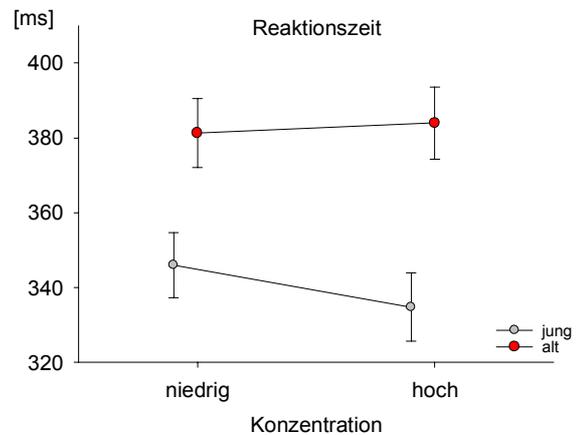
**Abbildung 25:** Reaktionszeiten und Anteil der Fehlerprozent der Flankierreizaufgabe in Abhängigkeit von der Geruchsfunktion.

#### Verhalten: Inhibition of Return (IOR)

Es wurden signifikante Wechselwirkungen Konzentration\*Geruchsfunktion und Konzentration\*Alter beobachtet. Während sich die Reaktionsleistungen bei höherer Konzentration in Abhängigkeit von der Geruchsfunktion annäherten, differierten sie in Abhängigkeit vom Alter stärker (Abb. 27).



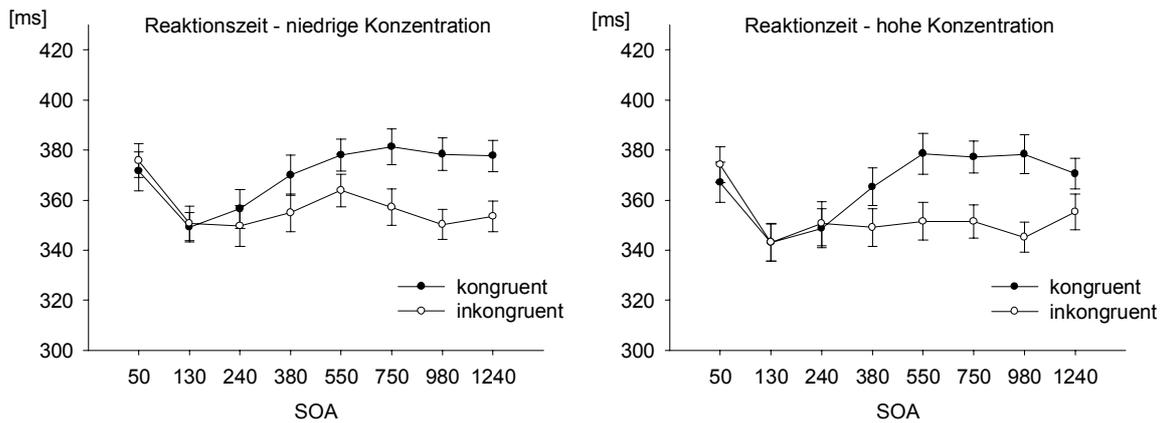
**Abbildung 26:** IOR-Reaktionszeit Konzentration\*Geruchsfunktion (M ± SE).



**Abbildung 27:** IOR-Reaktionszeit Konzentration\*Alter (M ± SE).

Der Altersfaktor zeigt unter 2-Ethylhexanol-Exposition den gleichen signifikanten, moderierenden Einfluss auf die IOR-Reaktionszeiten wie schon für MMA (vgl. Abb. 20).

Unter 2-Ethylhexanol-Exposition wurde auch der Einfluss der Wechselwirkung zwischen Konzentration und Aufgabenparametern (Kongruenz, Intervall (SOA)) auf das Reaktionsverhalten signifikant (Abb. 28).



**Abbildung 28:** IOR-Reaktionszeit: Konzentration\*Kongruenz\*Intervall (SOA).

#### *Verhalten: Quadrattest*

Bei diesem Test traten keine signifikanten Alters-, Geruchsfunktions- oder Konzentrationseffekte auf.

#### **Zusammenfassung (2-Ethylhexanol)**

Das Experiment untersuchte Effekte einer konstanten, hohen Exposition (20 ppm) gegenüber einer konstanten, niedrigen Exposition (1,5 ppm) unter Berücksichtigung von Alter und Geruchsfunktion.

Die primären Effekte von 2-Ethylhexanol sind durch mäßige Geruchswirkungen, aber auch durch leichte irritative Wirkungen geprägt. Die Irritationseffekte werden signifikant über die Faktoren Konzentration und Expositionsdauer moderiert. Die Lidschlussfrequenz steigt gering, aber hoch signifikant mit der Konzentration an. Der Nasendurchfluss ist bei der Nach-Expositionsmessung vermindert, hängt aber nicht von der Konzentration ab.

Der Faktor Alter moderiert Empfindungsverläufe und Leistungsparameter während der Exposition. Der Faktor Geruchsfunktion zeigt vereinzelt Effekte auf Leistungsparameter, die aber komplex und schwer zu systematisieren sind.

## Zusammenfassung der ASPs 2.1 und 2.2

Die Ergebnisse der drei Laborexperimente sind in Tabelle 12 zusammenfassend dargestellt.

**Tabelle 12:** Schematische Darstellung primärer und sekundärer Effekte der drei untersuchten lokalen Reizstoffe.

	H <sub>2</sub> S (0-10 ppm)	MMA (0-100 ppm)	2-EH (20 ppm)
<b>Primäre Indikatoren</b>			
Belästigung	(-)	(-)	(+)
trigeminale Empfindungen	-	(+)	+
akute Symptome	-	(+)	+
Zeitverlauf	-	(+)	+
Rhinomanometrie	-	-	-
Lidschlussfrequenz	-	(+)	+
<b>Sekundäre Indikatoren</b>			
Arbeitsgedächtnis	-	(+)	(+)
Flankierreizaufgabe	-	(+)	(+)
Inhibition of Return	-	(+)	(+)
Einfache Reaktion (Quad.)	-	-	-
<b>Moderatoren</b>			
Aufmerksamkeit	(-)		
Alter		+	+
Geruchsfunktion		(+)	(+)
<b>Biochem. Indikatoren</b>			

Die drei experimentellen Laborstudien führten in Abhängigkeit von den untersuchten Expositionsszenarien zu unterschiedlichen Effekten auf Erleben und Verhalten.

Während bei Schwefelwasserstoff im Wesentlichen Geruchseffekte beobachtet wurden, zeigten sich bei Methylmethacrylat minimale und bei 2-Ethylhexanol mäßige irritative Wirkungen auf subjektiver und physiologischer Ebene.

Die Moderatorvariable ‚Aufmerksamkeitsrichtung‘ zeigte im Zusammenhang mit der nicht-irritativ wirkenden Schwefelwasserstoffexposition nur wenig Wirkung auf Erlebens- und Leistungsvariablen.

Von den beiden Moderatorvariablen Alter und Geruchsfunktion, untersucht in Wechselwirkung mit den leicht bis mäßig irritativ wirkenden Arbeitstoffen MMA und 2-EH, wies der Altersfaktor die konsistenteren Effekte auf.

Die Ergebnisse belegen unter anderem die in früheren Experimenten bei Expositionen bis 40 ppm festgestellte, relativ hohe trigeminale Potenz von 2-EH (Kiesswetter et al. 2005, van Thriel et al. 2005). Die vorliegende Studie führte auch bei 20 ppm noch zu merklichen, allerdings mäßigen, irritativen Effekten auf subjektiver und physiologischer Ebene.

Die für die abschließende Interpretation notwendige Analyse biochemischer Indikatoren wird aktuell durchgeführt, und die Ergebnisse werden Bestandteil des Endberichts sein.

## Literatur zum Zwischenbericht

- Doty RL (2006) Olfactory dysfunction and its measurement in the clinic and workplace. *Int Arch Occup Environ Health* 79:268-82.
- Fiedler N, Kipen H, Ohman-Strickland P, Zhang J, Weisel C, Laumbach R, Kelly-McNeil K, Olejeme K, Liou P (2008) Sensory and Cognitive Effects of Acute Exposure to Hydrogen Sulfide. *Environ Health Perspect* 116:78–85.
- Hummel T, Kobal G, Gudziol H, Mackay-Sim A, (2007) Normative data for the “Sniffin’ Sticks” including tests of odor identification, odor discrimination, and olfactory thresholds: an upgrade based on a group of more than 3,000 subjects. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 264:237-43.
- Kleinbeck S, Juran SA, Schäper M, Kiesswetter E, van Thriel C (2005) Belästigung durch chemische Arbeitsstoffe – psychophysische Funktionen trigeminaler und olfaktorischer Empfindungen. In: Packebusch L, Weber B, Laumen S (Hrsg.): *Psychologie der Arbeitssicherheit und Gesundheit. Prävention und Nachhaltigkeit*. 13. Workshop 2005 (S. 335-338). Kröning: Asanger.
- Kiesswetter E, van Thriel C, Schäper M, Blaszkewicz M and Seeber A (2005) Eye blinks as indicator for sensory irritation during constant and peak exposures to 2-ethylhexanol. *Environ Toxicol and Pharmacol* 19:531-541.
- Muttray A, Gosepath J, Brieger J, Faldum A, Zagar C, Mayer-Popken O, Roßbach B, Jung D, Scherhag H, Mann W, Letzel S, (2007) Zur Wirkung von 50 ppm Methylmethacrylat auf die oberen Atemwege gesunder Probanden. In: *Wie lange können wir gesund arbeiten? - Wiss. Antworten der Arbeitsmedizin: Dokumentation*, Deutschen Gesellschaft für Arbeitsmedizin und Umweltmedizin e.V., 47. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Arbeitsmedizin und Umweltmedizin e.V. vom 21. – 24. März 2007 in Mainz (S. 149-153) Hrsg. Letzel, S, Löffler, I, Seitz, C. Dt. Ges. Arbeitsmed. Umweltmed. Lübeck: DGAUM, 2007.
- van Thriel C, Kiesswetter E, Schäper M, Blaszkewicz M, Golka K, Seeber A (2005) An integrative approach considering acute symptoms and intensity ratings of chemosensory sensations during experimental exposures. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 19:589-598.

## Publikation und Verbreitung

Der DGUV und der Forschungsbegleitkreis des Verbundprojekts wurden regelmäßig über den Stand der Forschungsarbeiten durch Berichte informiert und in die laufenden Entscheidungsprozesse eingebunden.

### Publikationsliste

- Altmann, L.; Berresheim, H.; Krüll, H.; Fricke, J.; van Thriel, C.; Schäper, M.; Merget, R.; Brüning, T.: Olfaktorische und irritative Wirkungen von Ammoniak bei Kurzzeitexposition. In: Arbeitsmedizin in Landwirtschaft, Gartenbau und Forstwirtschaft. "Gender Medicine" in der Arbeitsmedizin: Dokumentation Deutsche Gesellschaft für Arbeitsmedizin und Umweltmedizin e.V. , 46. Jahrestagung, 22.-25. März 2006 in Hannover (S. 492-494) / Hrsg. von Renate Wrbitzky ; Michael Bader. Dt. Ges. Arbeitsmed. Umweltmed.. Lübeck: DGAUM, 2007.
- Brüning, T.; van Thriel, C.: Lokal reizende Stoffe zwischen Belästigung und adversen Effekten. In: Arbeitsmedizin in Landwirtschaft, Gartenbau und Forstwirtschaft. "Gender Medicine" in der Arbeitsmedizin: Dokumentation Deutsche Gesellschaft für Arbeitsmedizin und Umweltmedizin e.V. , 46. Jahrestagung, 22.-25. März 2006 in Hannover (S. 693-694) / Hrsg. von Renate Wrbitzky ; Michael Bader. Dt. Ges. Arbeitsmed. Umweltmed.. Lübeck: DGAUM, 2007.
- Hey, K.; Juran, S.; Schäper, M.; Kleinbeck, S.; Kiesswetter, E.; Blaszkewicz, M.; Golka, K.; van Thriel, C.: Neurobehavioral effects during exposures to propionic acid - and indicator of chemosensory distraction? *NeuroToxicology* 30:1223-1232 (2009).
- Hey, K.; Kleinbeck, S.; Schäper, M.; Kiesswetter, E.; Blaszkewicz, M.; Zimmermann, A.; Golka, K.; van Thriel, C.: Gibt es eine Veränderung der kognitiven Leistung durch lokale Reizstoffe?: experimentelle Untersuchung zu Acetaldehyd. In: Arbeit, Beschäftigungsfähigkeit und Produktivität im 21. Jahrhundert: Bericht zum 55. Kongress der Gesellschaft für Arbeitswissenschaft vom 4.-6. März 2009, Dortmund (S. 715-718) / hrsg. von der Gesellschaft für Arbeitswissenschaft e.V.; Schriftltg.: Martin Schütte. Dortmund: GfA-Press, 2009.
- Hey, K.; Kleinbeck, S.; Schäper, M.; Kiesswetter, E.; Blaszkewicz, M.; Zimmermann, A.; Golka, K.; van Thriel, C.: Beeinflusst die chemosensorische Wahrnehmung von Acetaldehyd die kognitive Leistung? In: Krank und trotzdem arbeiten? Der chronisch Kranke im Erwerbsleben: Dokumentation Deutsche Gesellschaft für Arbeitsmedizin und Umweltmedizin e.V. , 49. Wissenschaftliche Jahrestagung, 11.-14. März 2009 in Aachen (S. 739-742) / Hrsg. von Thomas Kraus ... Deutsche Gesellschaft für Arbeitsmedizin und Umweltmedizin e.V.. Lübeck: DGAUM, 2009.
- Kleinbeck, S.; Juran, S. A.; Kiesswetter, E.; Schäper, M.; Blaszkewicz, M.; Brüning, T.; van Thriel, C.: Evaluation of ethyl acetate on three dimensions: investigation of behavioral, physiological and psychological indicators of adverse chemosensory effects. *Toxicol Lett* 182:102-109 (2008).
- Kleinbeck, S.; Juran, S. A.; Kiesswetter, E.; Schäper, M.; van Thriel, C.: Differenzierung von Geruchs- und Reizeffekten durch Verlaufsbetrachtungen subjektiver Symptomangaben. In: Wie lange können wir gesund arbeiten? - Wiss. Antworten der Arbeitsmedizin: Dokumentation Deutsche Gesellschaft für Arbeitsmedizin und Umweltmedizin e.V. , 47. Wissenschaftliche Jahrestagung, 21.-24. März 2007 in Mainz (S. 374-377) / Hrsg. von S Letzel, I. Löffler, C. Seitz, Deutsche Gesellschaft für Arbeitsmedizin und Umweltmedizin e.V.. Lübeck: DGAUM, 2007.

- Schäper, M.; Kleinbeck, S.; Kiesswetter, E.; Blaszkewicz, M.; van Thriel, C.: Bewertung von Reizstoffen durch Irritationsschwellen - methodische Variationen. In: Ethische Fragen in der Arbeitsmedizin: Dokumentation Deutsche Gesellschaft für Arbeitsmedizin und Umweltmedizin e.V. , 48. Wissenschaftliche Jahrestagung, 12.-15. März 2008 in Hamburg (S. 631-633) / Hrsg. von Xaver Baur, Evelyn Glensk. Deutsche Gesellschaft für Arbeitsmedizin und Umweltmedizin e.V.. Aachen: DGAUM, 2008.
- van Thriel, C.: Essigsäure: Nachtrag 2008. In: Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe: toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründungen von MAK-Werten (Maximale Arbeitsplatzkonzentrationen). Bd 1-9 (S. 1-7 (E-H), 44. Lfg. 2008) / bearbeitet von den Arbeitsgruppen "Aufstellung von MAK Werten" ... Hrsg. ... Helmut Greim. Weinheim: Wiley-VCH.
- van Thriel, C.; Blaszkewicz, M.; Juran, S.; Kiesswetter, E.; Kleinbeck, S.; Schäper, M.; Altmann, L.; Berresheim, H.: Chemosensorische Eigenschaften und Effekte des lokalen Reizstoffes Ethylacetat: ein integrativer Ansatz zur Bewertung von Reizstoffen. In: Arbeitsmedizin in Landwirtschaft, Gartenbau und Forstwirtschaft. "Gender Medicine" in der Arbeitsmedizin: Dokumentation Deutsche Gesellschaft für Arbeitsmedizin und Umweltmedizin e.V. , 46. Jahrestagung, 22.-25. März 2006 in Hannover (S. 200-204) / Hrsg. von Renate Wrbitzky ; Michael Bader. Dt. Ges. Arbeitsmed. Umweltmed.. Lübeck: DGAUM, 2007.
- van Thriel, C.; Blaszkewicz, M.; Juran, S. A.; Kiesswetter, E.; Kleinbeck, S.; Schäper, M.; Brüning, T.: Reizwirkungen durch organische Carbonsäuren - Ergebnisse experimenteller Expositionsstudien. In: Ethische Fragen in der Arbeitsmedizin: Dokumentation Deutsche Gesellschaft für Arbeitsmedizin und Umweltmedizin e.V. , 48. Wissenschaftliche Jahrestagung, 12.-15. März 2008 in Hamburg (S. 511-514) / Hrsg. von Xaver Baur, Evelyn Glensk. Deutsche Gesellschaft für Arbeitsmedizin und Umweltmedizin e.V.. Aachen: DGAUM, 2008.
- van Thriel, C.; Bünger, J.; Brüning, T.: Reizstoffe in der aktuellen Grenzwertdiskussion: Gemeinschaftsprojekt zu Reizstoffen generiert Daten zur Aufstellung von gesundheitsbasierten Grenzwerten. BGFA-Info : 21-23 (Nr. 1) (2008).
- van Thriel, C.; Juran, S. A.; Kleinbeck, S.; Kiesswetter, E.; Schäper, M.: Reizwirkungen durch Cyclohexylamin: Ergebnisse einer experimentellen Expositionsstudie  
In: Wie lange können wir gesund arbeiten? - Wiss. Antworten der Arbeitsmedizin: Dokumentation Deutsche Gesellschaft für Arbeitsmedizin und Umweltmedizin e.V. , 47. Wissenschaftliche Jahrestagung, 21.-24. März 2007 in Mainz (S. 599-601) / Hrsg. von Stephan Letzel ... Deutsche Gesellschaft für Arbeitsmedizin und Umweltmedizin e.V.. Lübeck: DGAUM, 2007.
- van Thriel, C.; Kiesswetter, E.; Schäper, M.; Juran, S. A.; Blaszkewicz, M.; Kleinbeck, S.: Odor annoyance of environmental chemicals: sensory and cognitive influences  
J. Toxicol. Environ. Health 71A: 776-785 (2008).

Zwischenbericht zum Verbundprojekt

***Abgrenzung und Differenzierung  
,irritativer' und ,belästigender' Effekte  
von Gefahrstoffen - Fortsetzung***

März 2009

Autoren:

Meinolf Blaszkewicz

Kathrin Hey

Ernst Kiesswetter

Stefan Kleinbeck

Michael Schäper

Christoph van Thriel

## Zwischenbericht zum Verbundprojekt „Irritative Effekte“ (IRRE)

### Einleitung

Das Forschungsprojekt „Irritative Effekte“ (IRRE) ist in zwei Forschungsebenen gegliedert:

1. Forschungsebene: substanzbezogene Basis- und Effektdaten lokaler Reizstoffe.
2. Forschungsebene: Prävention kognitiver Effekte als Folge der chemosensorischen Reizstoffwahrnehmung.

Die Forschungsebenen sind ihrerseits in verschiedene Arbeitsschwerpunkte (ASP) unterteilt. Nachdem der Arbeitsschwerpunkt 1.1 (Olfaktometrie „Optimierung“), in dem die Optimierung der psychophysischen Schwellenbestimmungen im Vordergrund stand, im Jahr 2007 abgeschlossen werden konnte (siehe 1. Zwischenbericht), wurden im Berichtszeitraum 2008 die Arbeitsschwerpunkte 1.2 (Olfaktometrie „Erweiterung“) und 1.3 (ExpoLab „Substanzen“) bearbeitet. Die Arbeitsschwerpunkte der 2. Forschungsebene werden aktuell, 2009, bearbeitet und sind für den Endbericht vorgesehen.

Im ASP 1.2 (Olfaktometrie „Erweiterung“) wird das Ziel verfolgt, (psycho-)physiologische Variablen auf ihre Verwendbarkeit in olfaktometrischen Experimenten zu testen. Erste Ergebnisse zu Pilotstudien sind am Ende des Zwischenberichts dargestellt.

Im ASP 1.3 (ExpoLab „Substanzen“) wurden im Berichtszeitraum zwei 4-stündige Experimente im Expositionslabor des *IfADo* durchgeführt und die Reizstoffe **Acetaldehyd** und **Ethylacrylat** untersucht. Die Darstellung der Untersuchungsergebnisse ist Schwerpunkt des Zwischenberichtes. Ziel dieses ASP ist, belastbare Daten für die Grenzwertsetzung zu liefern.

### Auswahl der Substanzen für den Arbeitsschwerpunkt 1.3

Bereits auf der ersten Sitzung des Forschungsbegleitkreises (FBK) nach der Fortsetzung des FP267 am 23.02.2007 in Bochum wurde eine Prioritätenliste der Reizstoffe erstellt, die im weiteren Projektverlauf bearbeitet werden sollten. Dabei wurden ebenfalls Vorschläge für die Zuordnung der Reizstoffe zu den verschiedenen Arbeitsschwerpunkten gemacht. Im Laufe der Diskussion am 23.02.2007 wurde Acetaldehyd sehr schnell als Reizstoff mit höchster Priorität für den ASP 1.3 ermittelt, da zu diesem Zeitpunkt keine Humandaten zu Reiz- und Geruchseffekten für diesen Stoff vorlagen. Die Relevanz am Arbeitsplatz wurde von Herrn Dr. Nies eindrucksvoll durch Messdaten aus der MEGA-Datenbank dokumentiert (1981-2006: 7376 Messungen, 2000-2006: 4584 Messungen). Durch weitere Kommentare von Frau Dr. Beth-Hübner, Herrn Dr. Bartsch, Herrn Dr. Nies und Herrn Dr. Neumeister konnte bis zum 20.4.2007 eine überarbeitete Prioritätenliste aufgestellt werden, anhand derer die Substanzauswahl für den ASP 1.1 (siehe Zwischenbericht März 2008) vorgenommen wurde.

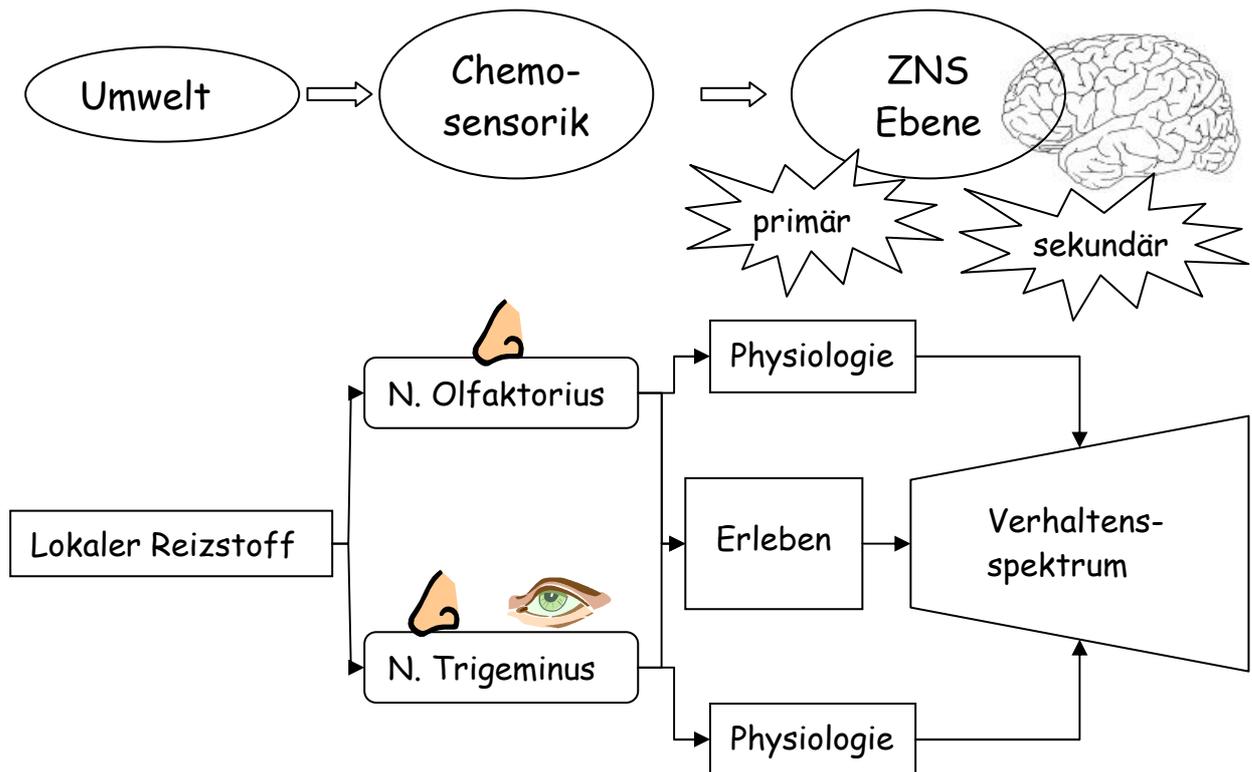
Im Sommer 2008 wurde der Forschungsbegleitkreis über die Planung des zweiten Experiments im ASP 1.3 informiert. Dabei wurde Ethylacrylat als zweite zu untersuchende Substanz vorgeschlagen, da sie nach den Ergebnissen der ersten Förderphase (van Thriel et al. 2006), eine extrem niedrige Geruchschwelle besitzt und die Irritationsschwelle mit ca. 4 ppm (statische Olfaktometrie) unterhalb des gültigen MAK-Wertes liegt. Der FBK stimmte dieser Substanzauswahl zu.

Im Berichtszeitraum wurden somit die Experimente des ASP 1.3 (ExpoLab „Substanzen“) mit den Reizstoffen **Acetaldehyd** und **Ethylacrylat** durchgeführt. Der Zwischenbericht stellt die wichtigsten Ergebnisse dar. Einige biochemische Analysen (u. a. zur nicht-invasiven Methodik des BGFA) sind noch nicht abgeschlossen und werden im Abschlussbericht dargestellt.

## Methoden und Ergebnisse zum ASP 1.3 (ExpoLab „Substanzen“)

### Wirkungsmodell lokaler Reizstoffe (Grundlage des ASP 1.3)

Wie in der 3. Phase des Vorgängerprojekts wurden realitätsnahe Expositionen über 4 Stunden simuliert. Die untersuchten, vielschichtigen Wirkungen sind in Abbildung 1 schematisch dargestellt.



**Abbildung 1:** Wirkungsmodell lokaler Reizstoffe bei realitätsnaher Simulation von Expositionen am Arbeitsplatz.

Das postulierte Wirkungsmodell beschreibt die Reaktionskette vom lokalen Reizstoff in der Arbeitsumgebung über die peripheren Strukturen der chemosensorischen Sinne zu verschiedenen Ebenen im zentralen Nervensystem (ZNS). Weiterhin unterscheidet das Modell auf ZNS Ebene primäre und sekundäre Effekte. Primäre Effekte sind vor allem im sinnesspezifischen Erleben und in physiologischen Indikatoren zu beobachten, sekundäre Effekte zeigen sich vorwiegend in komplexen Verhaltensänderungen.

#### *Primäre Effekte (Erleben und Physiologie):*

Durch den Kontakt des lokalen Reizstoffs mit physiologischen Strukturen der oberen Atemwege treten unmittelbar Effekte im Erleben auf. Die Exponierten nehmen olfaktorische (ekelerregender Geruch, Lästigkeit) und trigeminale Empfindungen (Brennen, Stechen) wahr und aus diesen Wahrnehmungen können akute Symptome, wie *tränennde Augen*, *laufende Nase* oder *Empfinden schlechter Luft*, entstehen. Auch physiologische Prozesse werden direkt durch den Kontakt mit dem Reizstoff ausgelöst. Durch zelluläre Prozesse und Entzündungsprozesse können die Schleimhäute in der Nasenhöhle anschwellen und dadurch die nasale Atmung vermindert werden. An der Bindehaut (Konjunktiva) der Augen können Reizstoffe zu physiologischen Dysregulationen führen, da auch dieses empfindliche Gewebe über eine ausgeprägte sensible Innervation aus Ästen des N. Trigeminius verfügt. Reaktionen auf olfaktorische Effekte betreffen auf

physiologischer Ebene meist viszerale Prozesse und können so über subkortikale Verschaltungen Übelkeit oder ähnliche Phänomene auslösen. Auch physiologische Indikatoren emotionaler Reaktionen können auf Geruchsreize ansprechen. Generell sind olfaktorisch vermittelte Effekte auf der physiologischen Ebene unspezifischer und nur schwer messbar.

#### *Sekundäre Effekte (Verhalten):*

Durch die weitere Verarbeitung der chemosensorischen Arbeitsstoffwahrnehmung im ZNS zeigen sich im Verhalten sekundäre Effekte der Exposition. Der Mensch bewertet die Wahrnehmung des Reizstoffes und muss ggf. sein Verhalten an die Expositionssituation anpassen. Im Fall der beruflichen oder experimentellen Exposition gegenüber lokalen Reizstoffen sind solche Verhaltenseffekte häufig unbewusst. Sie können jedoch durch Ablenkungs- oder Interferenzprozesse Leistungsparameter (Reaktionszeiten, Fehlerraten) in neuropsychologischen Funktionsprüfungen (Arbeitsgedächtnis, Doppelaufgabe, etc.) verändern.

Wie Abbildung 1 verdeutlicht, sind auf dieser Ebene olfaktorisch oder trigeminal vermittelte Wirkungen nur bedingt voneinander zu trennen, da vor allem höhere kortikale Strukturen an diesen Effekten beteiligt sind und durch diese „Aufwärts-Verschaltung“ der Einfluss der primären Wirkebene unschärfer wird.

Aus dem dargestellten Wirkungsmodell wurde die Untersuchungsmethodik des Arbeitsschwerpunktes 1.3 abgeleitet.

### Untersuchungsmethoden des Arbeitsschwerpunktes 1.3 (ExpoLab Substanzen)

Für die Bewertung chemosensorischer Effekte ist eine Untersuchungsmethodik notwendig, die (a) auf verschiedenen Ebenen misst (siehe Abb. 1) und (b) in diesen Ebenen verschiedene Verfahren einsetzt. Durch diesen Ansatz kann zum einen die Übereinstimmung der Ergebnisse auf den verschiedenen Ebenen geprüft werden, zum anderen kann die Konvergenz der Ergebnisse auf den drei Ebenen betrachtet werden. Vor allem für die Bewertung möglicher chemosensorischer Effekte ist dieser Ansatz punktuellen Betrachtungen (z.B. nur subjektive Angaben zu Beschwerden) überlegen. Im Vergleich zur 3. Projektphase wurden die physiologischen Messungen im Experiment mit Ethylacrylat um die Analyse der Tränenflüssigkeit erweitert, die in Kooperation mit Prof. Rettenmeier, Universität Duisburg-Essen, durchgeführt wird.

Tabelle 1 gibt eine Übersicht über die abhängigen Variablen und die entsprechenden Erfassungsmethoden (Operationalisierungen) für primäre und sekundäre Effekte während der experimentellen Expositionen im *IfADo*.

**Tabelle 1:** Übersicht über die Untersuchungsmethodik zur Erfassung primärer und sekundäre Effekte in der Projektphase ASP 1.3 (experimentelle Expositionen, *IfAdo*).

Wirkebene	Erleben ( <i>Ratings</i> )	Physiologie ( <i>Messung</i> )	Verhalten ( <i>Tests</i> )
Geruch (N. Olfactorius)	(a) Empfindungsstärken ( <i>LMS Skalierung</i> )	• keine Messungen	
	(b) olfaktorische Symptome ( <i>SPES Symptomfragebogen</i> )		
Reizung (N. Trigemini)	(a) Empfindungsstärken ( <i>LMS Skalierung</i> )	(a) Blinzelfrequenz ( <i>elektromyographische Analyse der Kontraktionen des M. orbicularis oculi</i> )	<ul style="list-style-type: none"> <li>• selektive Aufmerksamkeit (Hemmung dominanter Reaktionen)</li> <li>• Doppelaufgabe/ geteilte Aufmerksamkeit (Aufmerksamkeitsressourcen)</li> <li>• Arbeitsgedächtnis</li> </ul>
	(b) Symptome für Nasen- und Augenreizungen ( <i>SPES Symptomfragebogen</i> )	(b) Atemfrequenz ( <i>Analyse der Atembewegung mittels Respiratory Inductive Plethysmography, RIP</i> )	
		(c) Veränderungen in der Nasenhaupthöhle nasaler Atemwiderstand ( <i>anteriore Rhinomanometrie</i> ) neurogene Entzündungen ( <i>ELISA Substanz P</i> ) Aktivierung der Epithelzellen ( <i>ELISA 15-HETE</i> )	
		(d) biochemische Indikatoren in der Tränenflüssigkeit	
		(e) Atemkondensat und NO-Messung	

Die meisten Verfahren wurden am *IfAdo* bereits in früheren Experimenten eingesetzt und können als valide und reliabel eingestuft werden. Die biochemischen Analysen der nasalen Lavage (ELISA) sind noch nicht abgeschlossen. Die Ergebnisse werden im Abschlussbericht dargestellt. Aus den nicht-invasiven Methoden (NIM), die am BGFA etabliert wurden, kamen in den Experimenten biochemische Analysen des Atemkondensats und die Stickoxidmessung in der Ausatemluft zum Einsatz (Hoffmeyer, Harth et al. 2007). Die Auswertungen laufen noch und die Ergebnisse werden im Abschlussbericht dargestellt. Die Analyse der Tränenflüssigkeit (Prof. Rettenmeier/ Universität Duisburg-Essen) ist zum Berichtszeitpunkt noch nicht abgeschlossen.

### Stichprobe, Exposition

Im Dezember 2008 wurden die Versuche im Expositionslabor für die Arbeitsstoffe Acetaldehyd und Ethylacrylat abgeschlossen. Aufgrund des größeren Interesses für Acetaldehyd seitens des Forschungsbegleitkreises war auf die im Fortsetzungsantrag „Irritative Effekte - Fortsetzung“ vorgeschlagene Untersuchung von Trimethylamin verzichtet worden. In Tabelle 2 sind die beiden Stichproben der 2008 durchgeführten Experimente beschrieben.

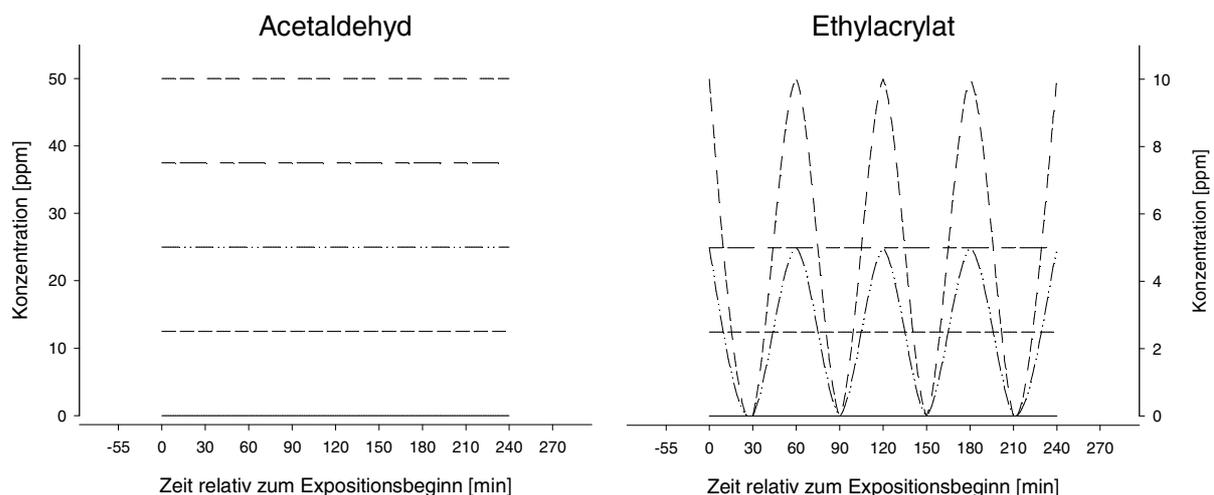
**Tabelle 2:** Demographische Stichprobenbeschreibung der beiden Expositionsversuche im *IfADo*.

Arbeitsstoff	Geschlecht	n	M	SD
Acetaldehyd (31.3.-6.5.2008)	Frauen	8	23,4	4,5
	Männer	10	23,3	4,3
Ethylacrylat (10.11.-12.12.2008)	Frauen	10	22,4	3,6
	Männer	9	25,2	3,0

Die Experimentplanung sah pro Experiment eine Teilnahme von 20 Personen (10 Frauen und 10 Männer) vor. Kurzfristige Ausfälle von Versuchspersonen konnten jedoch nicht mehr kompensiert werden.

Jeder Proband wurde vor der Versuchsteilnahme an einem 6-stündigen Trainingstag medizinisch untersucht, in den Leistungstests trainiert und mit den Versuchsaapparaturen vertraut gemacht. Probanden mit chronischen Erkrankungen der Atemwege, Verdacht auf andere Erkrankungen (z.B. Hypertonie) oder neurologischen Störungen wurden vom Versuch ausgeschlossen.

Die 4 Stunden-Experimente wurden nach dem Prinzip der Mehrebenenmessung durchgeführt. In beiden Experimenten wurden fünf Expositionsbedingungen untersucht und die Effekte miteinander verglichen. In beiden Experimenten wurde eine Nullbedingung verwendet, in der der Arbeitsstoff nicht im Expositionslabor vorhanden war. Für Acetaldehyd wurden vier konstante Konzentrationsstufen verglichen. Dieses Vorgehen ermöglicht die Abschätzung einer Benchmarkdosis für Acetaldehyd (s. *Modell Benchmark Dose; Benchmarkdosis der Empfindensstärke*). Für Ethylacetat hingegen wurden auch alternierende Konzentrationsverläufe untersucht, da Reizerscheinungen verstärkt bei Spitzenexpositionen vorkommen. Dabei orientierten sich die verwendeten Konzentrationen an den jeweiligen MAK-Werten. Abbildung 2 gibt eine Übersicht über die intendierten Konzentrationsverläufe der jeweiligen Expositionsbedingungen für die beiden untersuchten Stoffe.



**Abbildung 2:** Zeitlicher Verlauf der Konzentration der unterschiedlichen Expositionsbedingungen für die 2 Experimente des Arbeitsschwerpunktes 1.3 (ExpoLab Substanzen).

Während der Untersuchungen erfolgten chemische Analysen der Raumluft mittels photoakustischer Spektroskopie (Photoacoustic Spectroscopy, PAS). Als Messgerät wurde ein Photoacoustic Field Gas-Monitor 1412 (INNOVA, Inc.) verwendet, der für beide Substanzen entsprechend kalibriert worden war. Die Messungen erfolgten quasi-kontinuierlich und Tabelle 3 zeigt die Ergebnisse dieser Messungen im Überblick.

**Tabelle 3:** Ergebnisse der Messungen der Raumluftkonzentrationen der verschiedenen Bedingungen der vier Expositionsversuche (alle Angaben in ppm).

<b>Arbeitsstoff</b>	<b>Bedingung / Soll</b>	<b>C<sub>TWA</sub></b>	<b>C<sub>min.</sub></b>	<b>C<sub>max.</sub></b>
Acetaldehyd	Kontrolle / 0 ppm	0,00	0,00	0,00
	12,5 ppm	12,52	11,70	13,80
	25,0 ppm	24,97	24,00	26,30
	37,5 ppm	37,38	32,80	39,10
	50,0 ppm	49,78	47,60	51,60
Ethylacrylat	Kontrolle / 0 ppm	0,01	0,00	0,27
	2,5 ppm	2,50	2,22	2,80
	0-5 ppm	2,49	0,00	5,40
	5,0 ppm	5,00	4,53	5,43
	0-10 ppm	5,08	0,02	11,37

Anmerkungen: C<sub>TWA</sub>: mittlere Konzentration; C<sub>min.</sub>: minimale Konzentration; C<sub>max.</sub>: maximale Konzentration.

Die chemischen Analysen bestätigten die intendierten Expositionshöhen. Auch die alternierenden Expositionsverläufe konnten chemisch-analytisch abgesichert werden.

## Indikatoren primärer Effekte

Im Bereich des Erlebens (siehe Tab. 1) wurden Skalierungen zu

- a) Empfindungsstärke und
- b) Symptomen

untersucht.

### a) Empfindungsstärken (LMS)

Die Skalierung der „Empfindungsstärken“ ist identisch mit dem Vorgehen der 3. Projektphase des ersten Projektes. In diesem Ratingverfahren bewerten die Probanden die Intensität von 11 chemosensorischen Empfindungen auf einer sog. Labeled magnitude scale (LMS). Bei diesen Ratings werden sowohl olfaktorische Empfindungen (Geruchsintensität, Lästigkeit, ekelerregend) als auch trigeminale Empfindungen (z.B. stechend, brennend, scharf) im Bereich von Auge und Nase hinsichtlich der Stärke beurteilt.

### b) Akute Symptome (SPES)

Das Ratingverfahren zu „akuten Symptomen“ umfasst 29 Symptome, die bei Expositionen gegenüber chemischen Arbeitsstoffen auftreten können (Erweiterung der SPES Symptom-Skalen; Swedish Performance Evaluation System). Dazu gehören sowohl spezifische Reizwirkungen (z.B. Rötungen der Augen), als auch unspezifische Symptome (z.B. Unwohlsein, Kopfschmerzen). Die Probanden bewerten das Ausmaß der jeweiligen Symptome anhand einer sechsstufigen Skala (0: nicht im geringsten ... 5: sehr stark). Die 29 Symptome gliedern sich in sieben Symptombereiche (z.B. Geruchssymptome, untere Atemwege, Augenreizungen), die jeweils von drei bis sechs Einzelsymptomen repräsentiert werden. In der Ergebnisdarstellung werden die Mittelwerte dieser Symptombereiche verwendet und dargestellt.

## Verteilung der Erlebenseinschätzungen über den Untersuchungszeitraum

Generell wurden Ratings vor, während und nach den 4-stündigen Expositionsphasen erhoben. Bei Acetaldehyd gab es eine Vormessung (60 min vor Expositionsbeginn), vier Messungen während der Exposition (0, 55, 190 und 235 min nach Expositionsbeginn) und als Besonderheit zwei Nachmessungen (140 min und 265 min nach Expositionsende). Häufigere Messungen während der Exposition waren insofern nicht notwendig, als bei Acetaldehyd konstante Konzentrationen untersucht wurden.

Bei Ethylacrylat wurden eine Vor- und eine Nachmessung (60 min vor Expositionsbeginn und 45 min nach Expositionsende) durchgeführt. Während der Exposition korrespondierten die neun Messungen zeitlich mit den minimalen und maximalen Raumluftkonzentrationen der wechselnden Expositionsbedingung. Durch dieses Muster konnten die Effekte der Expositionsspitzen, aber auch Adaptationsprozesse erfasst werden (siehe Abb. 2).

## Physiologische Methoden

Primäre Reizstoffwirkungen wurden auf physiologischer und biochemischer Ebene ebenfalls mit verschiedenen Methoden erfasst (Tab. 1). Zum jetzigen Zeitpunkt können Ergebnisse der anterioren Rhinomanometrie und der Lidschlussfrequenz dargestellt werden.

### a) Anteriore Rhinomanometrie

Lokale Reizstoffe können durch verschiedene pathophysiologische Prozesse Schwellungen an den Schleimhäuten in der Nasenhaupthöhle hervorrufen. Durch diese Veränderung nimmt der nasale Atemwiderstand zu. Die Rhinomanometrie dient der objektiven Bestimmung des nasalen Atemwiderstandes. Das in den Experimenten verwendete Rhinomanometer erfasst den Luftstrom pro Zeit (Flow, ml/sec). Der Vergleich von Messungen vor und nach der 4-stündigen Expositionsphase dient zur Beurteilung von Volumenveränderungen im Expositionszeitraum. Für Acetaldehyd wurden zwei Nachmessungen durchgeführt, so dass für diesen Stoff auch Prozesse nach der Exposition beurteilt werden können.

### b) Lidschlussfrequenz

Die Lidschlussfrequenz, die mittels elektromyographischer (EMG) Analyse der Kontraktionen des M. orbicularis oculi gemessen wurde, erfasst Reizerscheinungen an den Augen. Diese physiologische Variable wurde kontinuierlich während der 4-stündigen Expositionsphase gemessen. Um Konfundierungen mit anderen visuellen Belastungen zu vermeiden, wurden zur Auswertung dieser Variablen nur Zeitbereiche gewählt, in denen die Probanden einen langandauernden und gleichförmigen Vigilanztest, die Mackworth-Uhr, bearbeiteten. Dieser Test dauert 25 Minuten und lief zweimal in jeder Expositionsphase ab - einmal zu Beginn und einmal am Ende. Zusätzlich fand im Acetaldehydversuch eine Nachmessung 125 Minuten nach Expositionsende statt.

Im Ethylacrylatversuch, in dem es neben zwei konstanten Konzentrationsbedingungen auch zwei alternierende Konzentrationsbedingungen gab, waren die Zeitbereiche, in denen die Lidschlussfrequenzen ausgewertet wurden, zeitlich so angeordnet worden, dass sowohl Effekte der ansteigenden Expositionen als auch der Expositionsspitzen erfasst werden konnten. Die entsprechenden Mackworth-Tests fanden dazu jeweils während aufsteigender Flanken der Konzentration statt. Somit konnten bei den alternierenden Konzentrationsbedingungen auch Vergleiche zwischen den niedrigsten und den höchsten Konzentrationen durchgeführt werden.

## Indikatoren sekundärer Effekte

Potentielle sekundäre Effekte der Exposition auf Aufmerksamkeits- und Kontrollfunktionen können für moderne Arbeitsumgebungen von großer Bedeutung sein. Zur Überprüfung der Effekt-Hypothese auf der *Nachweisebene Verhalten* wurden drei Testverfahren ausgewählt: Geteil-

te Aufmerksamkeit, Arbeitsgedächtnisaufgabe (beide aus Testbatterie zur Aufmerksamkeitsprüfung, TAP; Zimmermann & Fimm 1993) und Flankierreizaufgabe (Kopp, Mattler et al. 1996).

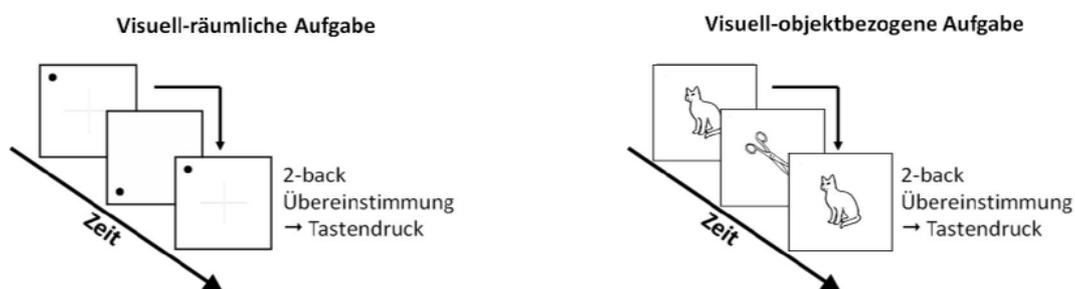
*a) Aufgabe zur Geteilten Aufmerksamkeit (GA)*

Der Test überprüft Funktionen der Aufmerksamkeitskapazität bei einer Doppelaufgabe. Der Begriff Aufmerksamkeit beschreibt eine erhöhte Wahrnehmungsbereitschaft und zielgerichtete Hinwendung auf äußere (oder auch innere) Reize. In der Aufgabe zur Geteilten Aufmerksamkeit wird im Besonderen die Fähigkeit erfasst, mit konkurrierenden Informationen umzugehen. Eine visuelle Aufgabe, bei der in einer variierenden Konfiguration von Kreuzen eine bestimmte symmetrische Anordnung entdeckt werden soll, steht in Konkurrenz mit einer gleichzeitig ablaufenden auditiven Aufgabe, bei der ein spezifischer hoher und tiefer Ton in variierenden Sequenzen dargeboten wird. Die kritischen Reize, auf die der Proband möglichst schnell mit Knopfdruck reagieren soll, stellen quadratische Anordnungen von vier Kreuzen oder Paare gleich hoher Töne dar. Die beiden Reiztypen können zeitfern und zeitnah zueinander auftreten.

Es wurde erwartet, dass die Anzahl nicht erkannter kritischer Reize und verlangsamter Reaktionen zunimmt, wenn die Ablenkung durch chemosensorische Reize stärker wird.

*b) Arbeitsgedächtnisaufgabe (AG)*

Der Test fordert ein fortlaufendes Erinnern und Vergleichen des auf dem Computer-Bildschirm sequentiell dargestellten Bildmaterials. Drei Bildsequenztypen wurden verwendet: einstellige Ziffern, Punktpositionen und Objekte. Die Testdurchführung folgte dem *n*-back Paradigma, wobei *n* für die Anzahl der Schritte steht, die zurückerinnert werden müssen. Für unsere Untersuchung wurden zwei Schwierigkeitsgrade ausgewählt, die *2-back* und die *3-back* Aufgabe. Bei der *2-back* Aufgabe sollte dann mit Knopfdruck reagiert werden, wenn die aktuell präsentierte einstellige Ziffer mit der vorletzten einstelligen Ziffer (bzw. vorvorletzten Ziffer bei der *3-back* Aufgabe) übereinstimmte. Eine Bildsequenz umfasste 100 Bilder mit 30 Erinnerungstreizen.

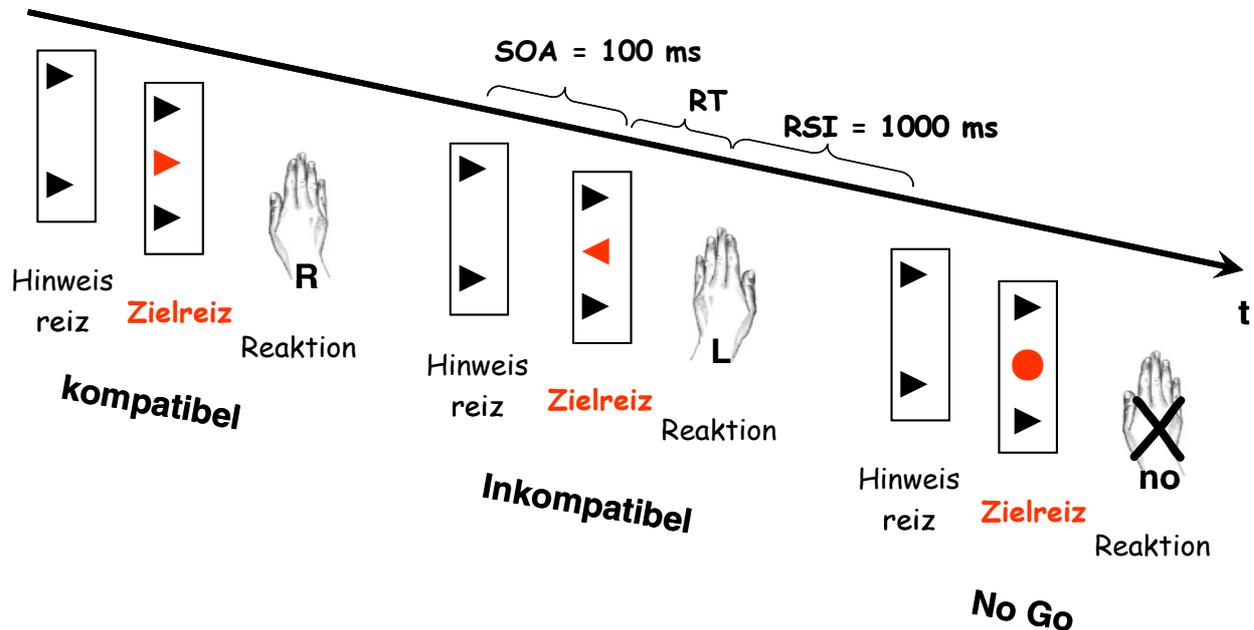


**Abbildung 3:** Darstellung der räumlichen und der objektbezogenen Arbeitsgedächtnisaufgabe für den Schwierigkeitsgrad *2-back*.

In der TAP von Zimmermann und Fimm (1993) wird diese Aufgabe in der Ziffern-Variante vorgestellt. Unsere zusätzlich entwickelten Varianten ‚visuell-räumlich‘ und ‚visuell-objektbezogen‘ erfordern die Erinnerung des Punktores auf dem Bildschirm beziehungsweise eines Objektes (s. Abb. 3). Es wird angenommen, dass chemosensorische Reize das Arbeitsgedächtnis beeinträchtigen und zu einer Zunahme der Reaktionszeiten und Fehler führen. Bei schwierigeren Aufgaben, wie der visuell-räumlichen Gedächtnisaufgabe (Punkte), wird eine stärkere Beeinträchtigung erwartet.

c) Flankierreizaufgabe (FR)

Bei der Flankierreizaufgabe handelt es sich um eine Reaktionszeitaufgabe, bei der zusätzlich zu dem Zielreiz (Pfeil oder Punkt in der Mitte des Bildschirms) Flankierreize (Pfeile) oberhalb und unterhalb des Zielreizes präsentiert werden (Abb. 4).



**Abbildung 4:** Die drei Bedingungen der Flankierreizaufgabe. Das rot dargestellte mittlere Symbol bestimmt, ob und mit welcher Hand reagiert werden soll. SOA= Stimulus Onset Intervall (Abstand zwischen Hinweisreiz und Zielreiz), RT=Reaktionszeit, RSI=Response Stimulus Intervall (Intervall bis zum nächsten Hinweisreiz). Aufteilung: 60% kompatibel, 20% inkompatibel, 20% No Go.

Es werden drei unterschiedliche Kombinationen präsentiert: (1) *Kompatible Bedingung*: Pfeilrichtung der Flankierreize stimmt mit der Pfeilrichtung des Zielreizes überein, (2) *Inkompatible Bedingung*: Pfeilrichtung der Flankierreize stimmt nicht mit der Pfeilrichtung des Zielreizes überein und (3) *No-Go Bedingung*: Punkt als Zielreiz. Die Pfeilrichtungen von Flankierreizen und analogen Hinweisreizen variieren zwischen Rechts- und Links-Richtung, woraus sich im Zusammenspiel mit den Zielreizen sechs Kombinationsmöglichkeiten ergeben.

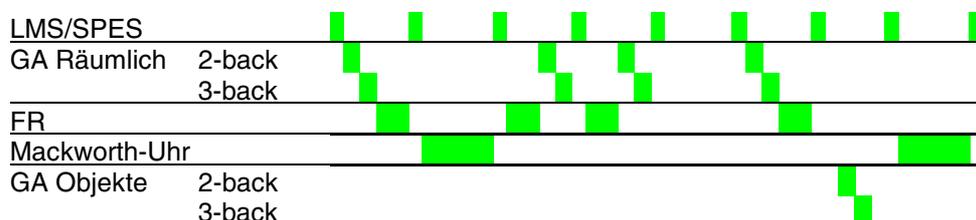
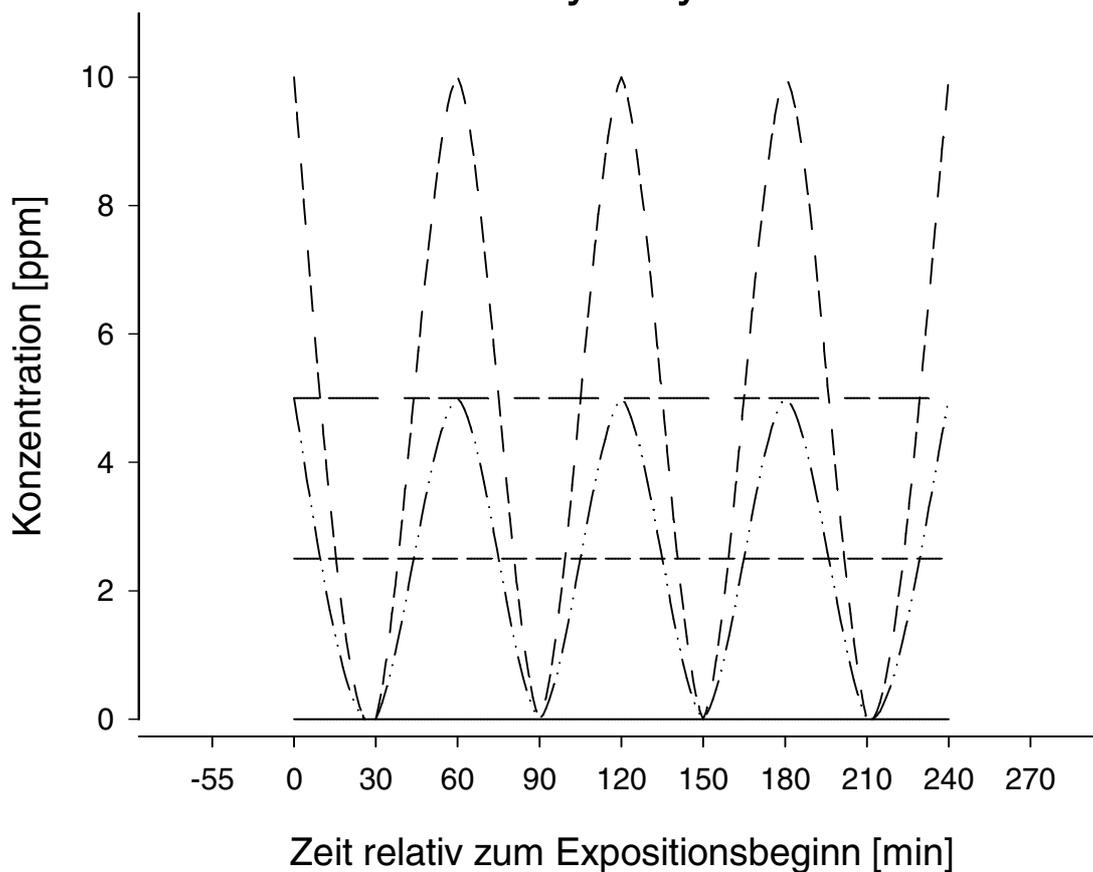
Maßgeblich für die richtige Reaktion ist ausschließlich die Beachtung des Zielreizes. Zeigt der mittlere Pfeil nach rechts, soll mit der rechten Hand die rechte Taste gedrückt werden, zeigt der mittlere Pfeil nach links, mit der linken Hand die linke Taste. Erscheint der Punkt, soll keine Reaktion erfolgen.

Die Hinweisreize werden 100 ms vor der Bildschirmanzeige mit der kombinierten Präsentation aus Zielreiz und zwei Flankierreizen gezeigt. Dies kann neuromotorische Bahnungen einleiten, die sich - je nach vorliegender Kompatibilitäts- bzw. Inkompatibilitätsbedingung - zum Vor- oder Nachteil für den Probanden auswirken und zu verkürzten bzw. verlängerten Reaktionszeiten und weniger bzw. mehr Fehlern führen können. Eine Hemmung der Bahnungen gelingt nur schwer. Unter Einfluss chemosensorischer Reize werden, besonders für die inkompatible Flankierreizaufgabe, verlängerte Reaktionszeiten und erhöhte Fehlerzahlen erwartet.

Die zeitliche Verteilung der Testaufgaben in den Expositionsexperimenten ist in Abbildung 5 für Acetaldehyd und in Abbildung 6 für Ethylacrylat dargestellt.



# Ethylacrylat



**Abbildung 6:** Verteilung der Leistungstests über den Untersuchungszeitraum (Ethylacrylat).

## Hypothesen als Effektmatrix

Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über die erwarteten Effekte auf den drei Nachweisebenen Erleben, Physiologie und Verhalten in Relation zur mittleren Raumluftkonzentration der untersuchten Expositionsszenarien.

**Tabelle 4:** Effektmatrix für die Versuche des Arbeitsschwerpunktes 1.3.

Nachweisebene	Kontrollbedingung Bedingung 0	Expositionsstufen	
		Mittel Bedingungen 2 und 3	Hoch Bedingungen 4 und 5
Erleben	schwache bis keine Effekte	Geruchsbelästigung? Einsetzen trigeminaler Empfindungen? Symptome (olfaktorisch vermittelt)?	Starke Geruchsbelästigung? Deutliche trigeminale Empfindungen? Symptome von Augen- und Nasenreizungen?
Physiologie	kein Effekt	Zunahme der Lidschlussfrequenz? Verengung der Nasenhaupthöhle?	Deutliche Zunahme der Lidschlussfrequenz? Behinderung der Nasenatmung?
Verhalten	kein Effekt	Reaktionsverlangsamung? Fehlerzunahme? Mehr Probleme bei schwierigen Aufgaben?	Deutliche Reaktionsverlangsamung? Starke Fehlerzunahme? Auffällig mehr Probleme bei schwierigen Aufgaben?

## Weitere Hypothesen

### I. Verlaufshypothesen

- (a) Expositionsspitzen verstärken die Effekte generell
- (b) Geruchswirkungen nehmen mit der Zeit (4 Stunden) ab (Adaptation)
- (c) Reizwirkungen nehmen über die Zeit zu
- (d) Verhaltenseffekte, vor allem zu Beginn der Exposition, weisen auf chemosensorische Ablenkungsprozesse hin

### II. Nachphase (nur Acetaldehyd)

- (e) Reversibilität in Abhängigkeit von der Expositionsstärke

## Modell Benchmark Dose

Im Arbeitsschwerpunkt 1.3 (ExpoLab Substanzen) wurden für Acetaldehyd 5 konstante Konzentrationsstufen untersucht, um Dosis-Wirkungsbeziehungen nach dem Ansatz der Benchmark Dose (BMD) Analysis (Arts, Rennen et al. 2006) analysieren zu können (vgl. Fortsetzungsantrag). Das BMD-Konzept wird von der U.S. Environmental Protection Agency als Alternative und Ergänzung zur No-observed-adverse-effect-level (NOAEL)-Methode (Filipsson, Sand et al. 2003; Nielsen and Ovrebo 2008; Sand, Victorin et al. 2008) vorgeschlagen und angewandt. Während der NOAEL die höchste Dosis darstellt, bei der experimentell keine adversen Effekte gefunden wurden, passt die BMD-Methode ein mathematisch-statistisches Modell an Untersuchungsdaten an und prüft, welche Expositionsausprägung zu einer im Vorfeld als kritisch definierten Effekthöhe führen wird (USEPA 1995). Eine solche als kritisch angesehene Effekthöhe kann etwa eine fünf- oder zehnpromtente Abweichung vom allgemeinen Hintergrundeffekt sein (USEPA online). Die BMD Methode wurde zur Beurteilung nicht-cancerogener Gesundheitsrisiken (USEPA 1995), Müdigkeitsphänomenen (Suwazono, Dochi et al. 2008) und Augenirritation (Arts, Rennen et al. 2006) als geeignet angesehen.

Ein Vorteil gegenüber etwa einer Datenmodellierung per Regression liegt darin, dass eine BMD-Analyse als Antwort auf die interessierende Fragestellung nicht nur einen singulären Wert an-

gibt, bei dem keine Informationen zur Variabilität - und damit Zuverlässigkeit der Aussage - vorliegen, sondern einen Bereich liefert, der die gesuchte Expositionsausprägung mit einer vorgegebenen Sicherheit, z. B. 95%, einschließt (Konfidenzintervall für BMD). Wichtig für eine konservative Risikoabschätzung ist dann insbesondere die untere Grenze dieses Bereiches (BMDL, Benchmark Dose Lower Confidence Limit), da sie die kleinste Expositionsmenge angibt, die - im Rahmen der gewählten Modellierung - zu der im Vorfeld als kritisch definierten Effekthöhe führen würde - und dies alles mit einer statistischen Sicherheitsabschätzung von üblicherweise 95 Prozent.

## Darstellung der Ergebnisse des Arbeitsschwerpunktes 1.3

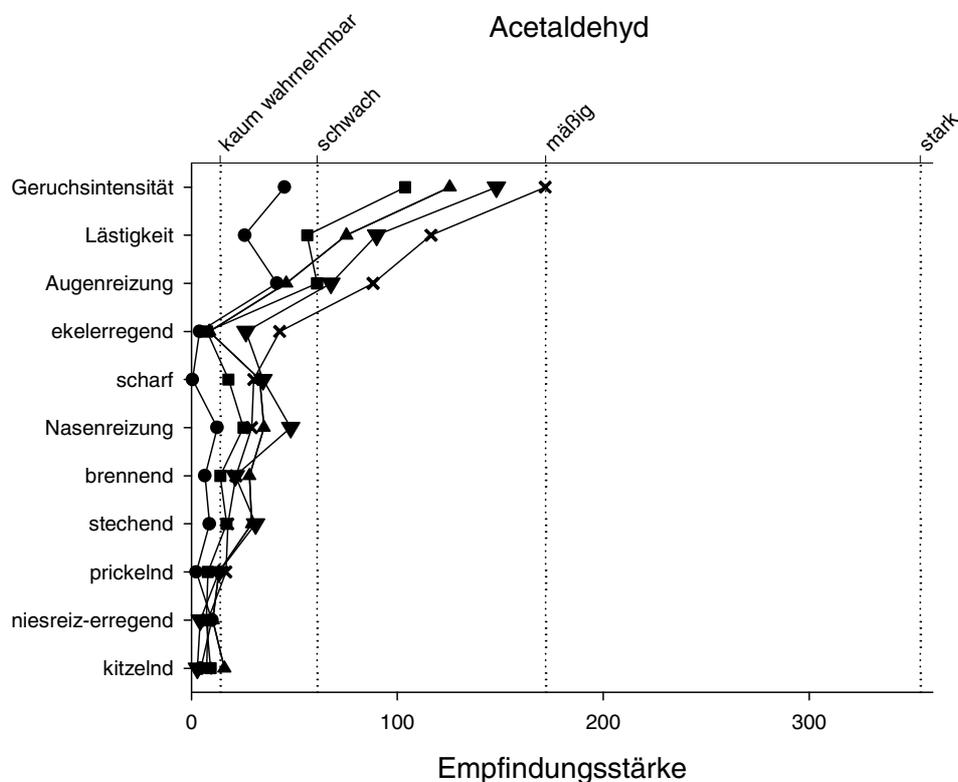
Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt im Weiteren getrennt für die beiden untersuchten Substanzen und behandelt aufeinanderfolgend primäre und sekundäre Effekte.

### 1. Experiment: Acetaldehyd

#### Acetaldehyd: primäre Effekte

##### Empfindensstärke (LMS)

Zur Charakterisierung der vier untersuchten Expositionsbedingungen und der Kontrollbedingung sind in Abbildung 3 die Mittelwerte der 11 chemosensorischen Empfindungen als Profile dargestellt. Für diese Darstellung wurden die vier Ratings während der 4-stündigen Expositionsphase zusammengefasst.

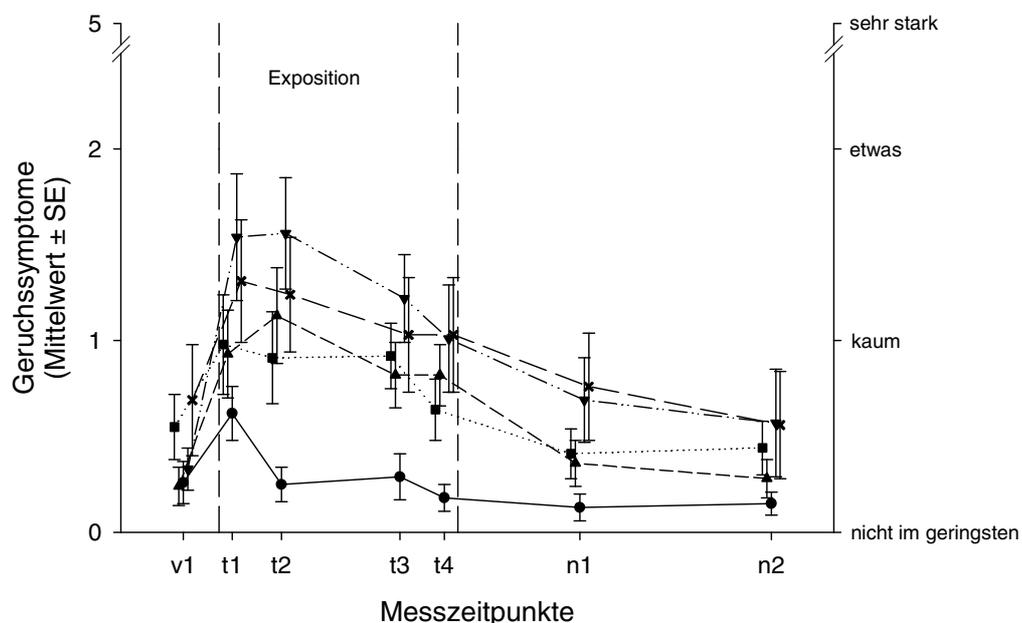


**Abbildung 7:** Profil der mittleren Intensität der 11 chemosensorischen Empfindungsstärken für die fünf Ethylacetatexpositionen (●: 0 ppm, ■: 12,5 ppm, ▲: 25 ppm, ▼: 37,5 ppm, X: 50 ppm, M ± SE).

Eine konzentrationsabhängige Zunahme der Intensitätsangaben (mittleres Rating  $\leq$  mäßig) ist lediglich für die Geruchsintensität ( $p \leq 0,05$ ) und für die Lästigkeit grenzwertig ( $p \leq 0,10$ ) zu beobachten. Augenreizungen werden in den höheren Konzentrationen als ‚schwach‘ bis ‚mäßig‘ wahrgenommen ( $p > 0,10$ ), außerdem gibt es hier keine monotone Dosis-Wirkungsbeziehung. Die anderen Empfindungen, auch die trigeminalen, werden bei allen Konzentrationen geringer als ‚schwach‘ eingeschätzt und scheinen als unproblematisch erlebt zu werden.

*Symptome: olfaktorisch, trigeminal (SPES)*

Der nächste Auswertungsschritt beantwortet die Frage, in welchem Umfang akute Symptome auftraten und wie sich diese Beschwerden über die 4-stündige Expositionsphase veränderten. In sechs der sieben Symptombereiche wurden ‚kaum‘ Symptome (mittleres Rating  $\leq 1$ ) verspürt. Abbildung 4 verdeutlicht, dass Geruchssymptome bei höheren Expositionsbedingungen verstärkt berichtet wurden, in ihrer Intensität aber unter ‚etwas‘ blieben. Dennoch war der Haupteffekt Exposition signifikant ( $p \leq 0,05$ ).



**Abbildung 8:** Höhe und Verläufe der Geruchssymptome für die fünf Acetaldehydexpositionen (●: 0 ppm, ■: 12,5 ppm, ▲: 25 ppm, ▼: 37,5 ppm, X: 50 ppm, M ± SE).

Bei den Geruchssymptomen zeigte sich, anders als bei den vorher berichteten Geruchsintensitätseinschätzungen, keine Dosis-Wirkungsbeziehung. Vom Beginn der Exposition bis zum Ende nimmt die Stärke der Geruchs-Symptomangaben ab ( $p \leq 0,05$ ), was auf Adaptationsprozesse hinweist. Die Symptome der Nachphase unterscheiden sich nicht mehr signifikant vom Ausgangsniveau vor der Exposition.

Die primären Effekte beschränken sich auf olfaktorische Erlebnisbeschreibungen während der Exposition.

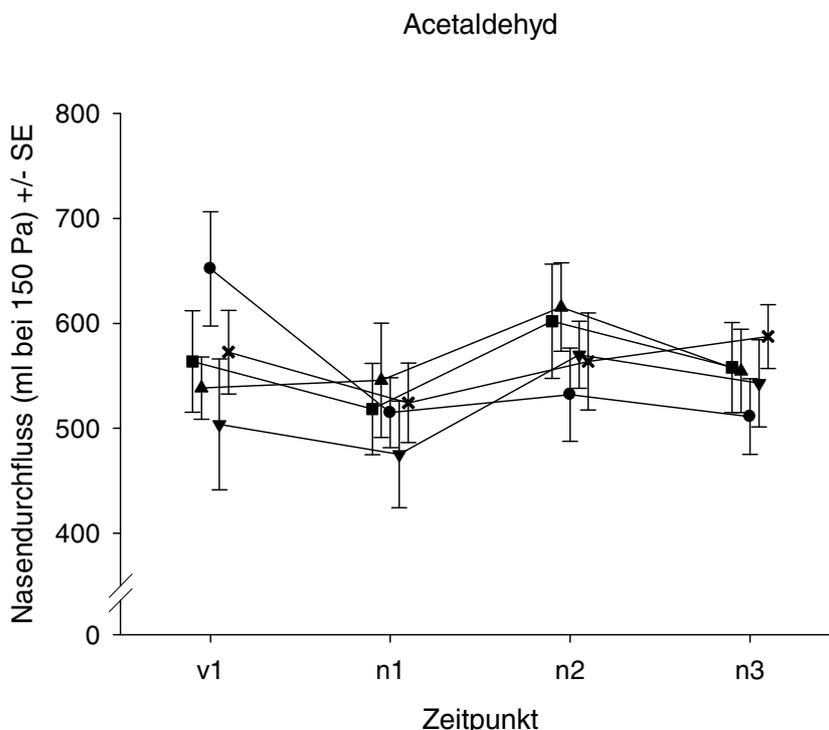
Rhinomanometrie

Bei der Rhinomanometrie werden die Differenzen zwischen der Messung vor und den Messungen nach der Exposition als  $\Delta\text{Flow}$  in ml/s dargestellt.  $\Delta\text{Flow}_1$ ,  $\Delta\text{Flow}_2$  und  $\Delta\text{Flow}_3$  beschreiben die Differenzen zwischen Vormessung und den drei Nachmessungen (0, 60, 180 min) nach Expositionsende (Tabelle 5).

**Tabelle 5:** Veränderung des Atemwiderstandes ( $\Delta\text{Flow}$ ); drei Nachmessungen im Vergleich zur Vormessung (s. Text), jeweils Mittelwerte.

	$\Delta\text{Flow}_1$ [ml/s]	$\Delta\text{Flow}_2$ [ml/s]	$\Delta\text{Flow}_3$ [ml/s]
0 ppm	-137	-120	-140
12,5 ppm	-45	38	-6
25,0 ppm	7	77	16
37,5 ppm	-29	66	39
50,0 ppm	-48	-9	15

Der nasale Atemwiderstand nahm in der expositionsfreien Bedingung deutlich stärker als unter irgendeiner Acetaldehydexposition zu. Diese Ergebnisstruktur ist eine Funktion des ungewöhnlich niedrigen Atemwiderstandes (hohe Flow-Werte; v1, Abb. 9), der in der Voruntersuchung vor dem Betreten des Expositionslabors in der expositionsfreien Bedingung gemessen wurde. Über die Expositionsbedingungen hinweg betrachtet besteht kein systematischer Zusammenhang zwischen der Konzentration von Acetaldehyd in der Raumluft und der Veränderung des Atemwiderstandes. Die weiteren Nachmessungen (n2, n3, Abb. 9) zeigen bei Nicht-Exposition kaum Veränderungen, aber unter Exposition eine Veränderung mit deutlicher Widerstandsreduktion (n2) und anschließender Normalisierung der Werte (n3), vergleichbar mit der Ausgangslage (v1).



**Abbildung 9:** Nasendurchfluss ( $M \pm SE$ ) in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Messung für die fünf Acetaldehydexpositionen (●: 0 ppm, ■: 12,5 ppm, ▲: 25 ppm, ▼: 37,5 ppm, X: 50 ppm).

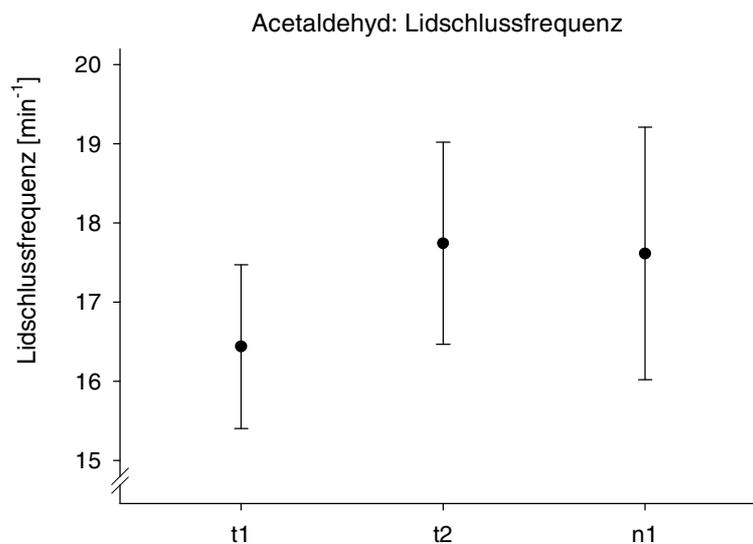
### Lidschlussfrequenz

Die Lidschlussfrequenz ist während der höchsten Expositionsbedingung leicht, aber nicht statistisch bedeutsam, erhöht.

**Tabelle 6:** Mittlere Lidschlussfrequenz während der Expositionsphasen.

	Lidschlussfrequenz [ $\text{min}^{-1}$ ]
0 ppm	17,2
12,5 ppm	16,8
25,0 ppm	15,2
37,5 ppm	17,6
50,0 ppm	19,5

Es wurden kein Expositionseffekt und keine signifikante Wechselwirkung zwischen Expositionshöhe und Zeit (expositionsbedingte Trendunterschiede im Zeitverlauf) gefunden. Bei der Lidschlussfrequenz zeigte sich, gemittelt über alle Bedingungen, ein signifikanter Anstieg der Messwerte vom Beginn bis zum Ende der vierstündigen Expositionsphase ( $p=0.036$  für den Kontrast der Messungen von Zeitpunkt t1 zu t2). Bei der Nachmessung zwei Stunden nach Expositionsende wurde dann wiederum ein leichter, nicht signifikanter Abfall der Messwerte beobachtet (vgl. Abbildung 10).



**Abbildung 10:** Lidschlussfrequenz zu den drei Messzeitpunkten im Acetaldehydversuch:  
t1: Beginn der Expositionsphase, t2: Ende der Expositionsphase und n: Nachmessung zwei Stunden nach Expositionsende, ( $M \pm SE$ ).

Ein weiterer signifikanter Anstieg der Lidschlagfrequenzen zeigte sich über die Zeitdauer der beiden 25-minütigen Auswertungsintervalle während der Durchführung des Mackworth-Tests. Die Messwerte stiegen von anfänglich  $16,8 \pm 4,7$  auf  $17,7 \pm 5,7$  ( $p \leq 0,05$ ). Auch hier wurde keine expositionsabhängige Veränderung der Lidschlagfrequenz beobachtet.

## Acetaldehyd: sekundäre Effekte

### *Verhalten: Arbeitsgedächtnis (AG)*

Im Acetaldehyd-Experiment wurde die Expositionswirkung auf die Leistungen in den drei unterschiedlichen Arbeitsgedächtnisaufgaben (Objekte, Punkte, Ziffern) geprüft (s. Abb. 5). In der Abbildung 11 sind die mittleren Reaktionszeiten bei richtigen Antworten und die Anteile ausgelassener Antworten bei der Bearbeitung (Fehleranteil bei 30 kritischen Reizen insgesamt) im Dosiszusammenhang dargestellt. In den Mittelungsansatz gingen die Daten der Messwiederholung (2 Messungen in der Expositionsphase, s. Untersuchungsplan) sowie beider Schwierigkeitsgrade der Arbeitsgedächtnisaufgabe ein. Die Daten wurden in einem varianzanalytischen Modell mit den Messwiederholungsfaktoren Konzentration (0, 12,5, 25, 37,5, 50 ppm), Zeitpunkt (1. und 2. Gedächtnistestung), Aufgabenschwierigkeit (2-back Aufgabe vs. 3-back Aufgabe) und Aufgabentyp (Objekte vs. Punkte vs. Ziffern) analysiert.

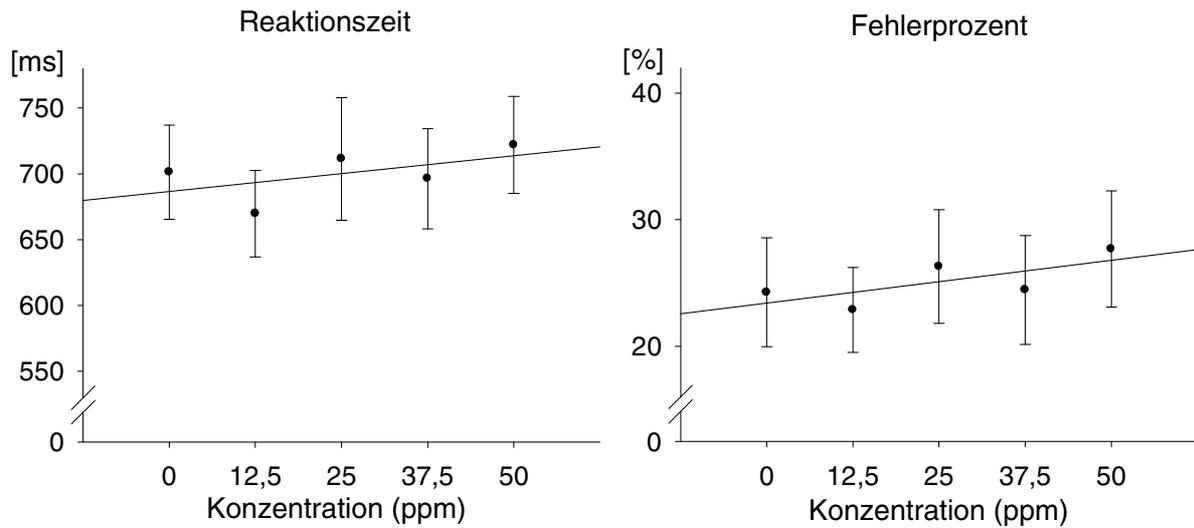
Es ist nicht auszuschließen, dass auch unterhalb des geltenden MAK-Wertes für Acetaldehyd (50 ppm) dosisabhängige chemosensorische Einflüsse auf Aufmerksamkeit- und Kontrollfunktionen auftreten. Ein signifikanter Wiederholungsfaktor Zeitpunkt könnte Aufschluss über eine Veränderung der Ablenkung durch chemosensorische Reize (z.B. olfaktorische Wahrnehmung, Lästigkeit) im Verlauf einer 4-stündigen Exposition geben.

Hinsichtlich der Haupteffekte Konzentration und Zeitpunkt zeigten sich aber für die vorliegenden Daten keine signifikanten Unterschiede. Jedoch gab es einen Hinweis auf eine Wechselwirkung zwischen Konzentration und Aufgabentyp für die Reaktionszeit ( $p=0.066$ ). Der Vergleich der Arbeitsgedächtnisaufgaben (Abbildung 11) zeigt, dass sich bei den objektbezogenen und räumlichen Aufgaben ein ansteigender Trend der Reaktionszeit andeutet, der bei der Ziffernaufgabe nicht vorhanden ist. Jedoch zeigt sich auch bei den objektbezogenen und räumlichen Aufgaben keine systematische dosisabhängige Leistungsveränderung.

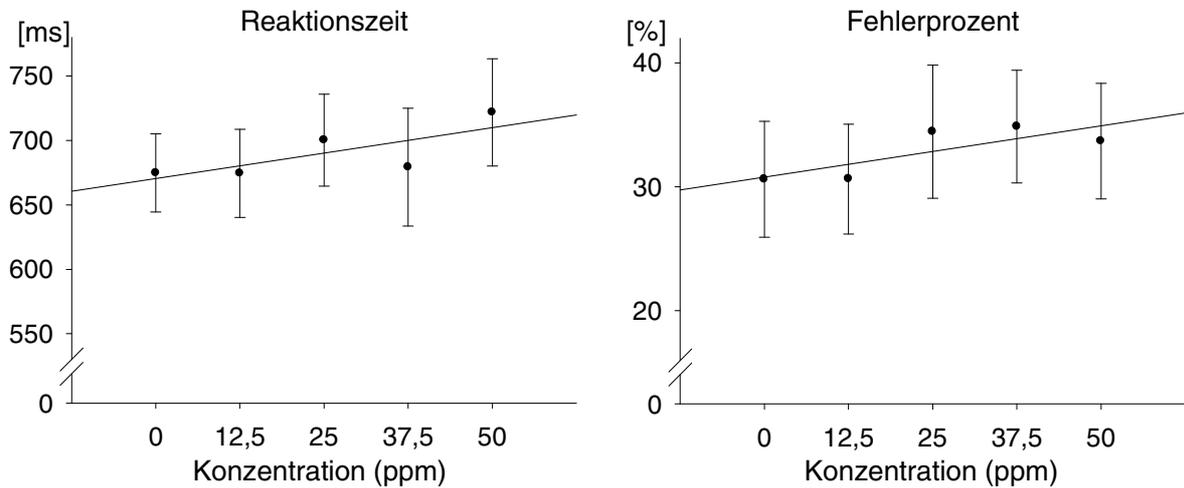
Alle drei Arbeitsgedächtnisaufgaben zeigen einen leichten tendenziellen Anstieg des Fehleranteils über die fünf Konzentrationen (Abb. 11). Der etwas höhere Fehleranteil der räumlichen Arbeitsgedächtnisaufgabe bei gleichzeitigen, tendenziellen Konzentrationseffekten in den Reaktionszeiten veranlasste uns, speziell diesen Aufgabentyp für das folgende Experiment mit Ethylacrylat einzusetzen, mit dem Ziel, olfaktorische Distractionseffekte zu identifizieren.

Wie zu erwarten, erwies sich die 3-back Aufgabe gegenüber der 2-back Aufgabe als signifikant schwieriger, was sich sowohl in erhöhten Reaktionszeiten als auch Fehleranteilen ausdrückte. Bezogen auf den Objekt-, Punktraum- und Zifferntyp liegt der Fehleranteil der 2-back und 3-back Aufgaben bei 17,7%, 21,6%, 18,3% und 32,5%, 44,1%, 27,2% (Abb. 12). Die Unterschiede in den Fehleranteilen der 2-back und 3-back Aufgaben variieren mit dem Aufgabentyp und sind für den räumlichen Typ am größten und für den Zifferntyp am kleinsten (Abb. 12). Entsprechend wurde bezüglich der Fehlerprozente, aber auch bezüglich der Reaktionszeiten, eine signifikante Wechselwirkung zwischen Aufgabentyp und Aufgabenschwierigkeit (2-, 3-back) beobachtet.

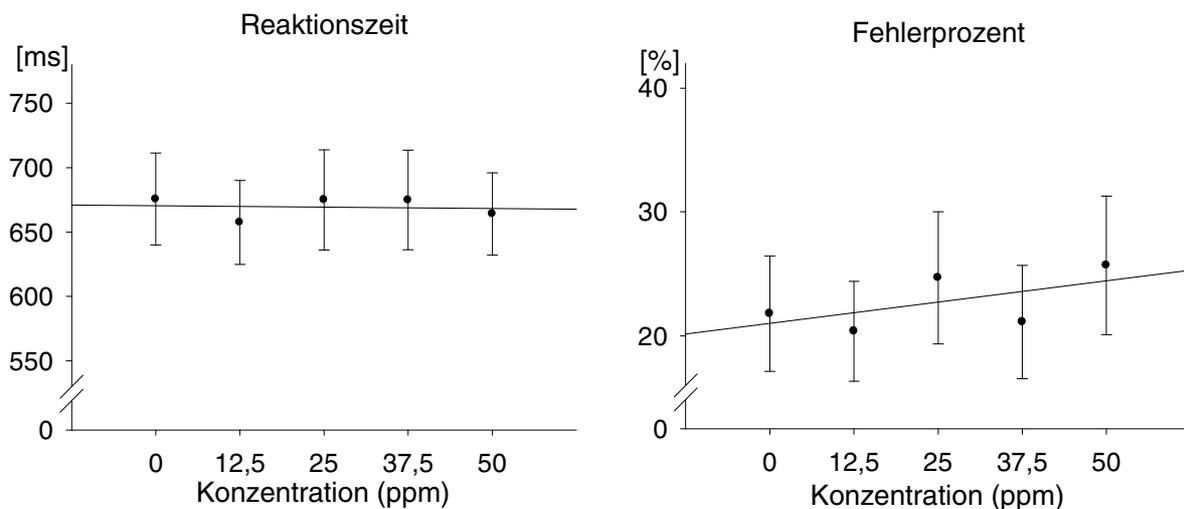
## Objektbezogene Arbeitsgedächtnisaufgabe



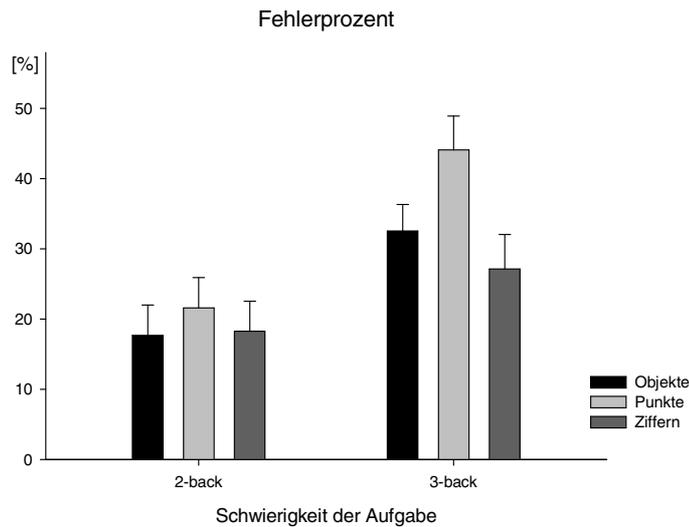
## Räumliche Arbeitsgedächtnisaufgabe



## Arbeitsgedächtnisaufgabe mit Ziffern



**Abbildung 11:** Reaktionszeiten und Anteil der Fehler (Fehlerprozent) der drei unterschiedlichen Arbeitsgedächtnisaufgaben für alle Expositionsbedingungen, ( $M \pm SE$ ).



**Abbildung 12:** Fehlerprozent für die drei Arbeitsgedächtnisaufgaben (Objekt = objektbezogene Aufgabe, Punkte = räumliche Aufgabe, Ziffern = Arbeitsgedächtnisaufgabe mit Ziffern), aufgeteilt nach Schwierigkeit der Aufgabe, ( $M \pm SE$ ).

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die verschiedenen Arbeitsgedächtnisaufgaben keinen eindeutigen Hinweis auf konzentrationsabhängige Einflüsse liefern, die die Ablenkungshypothese bei diesem speziellen Stoff stützen könnten.

*Verhalten: Flankierreiz (FR)*

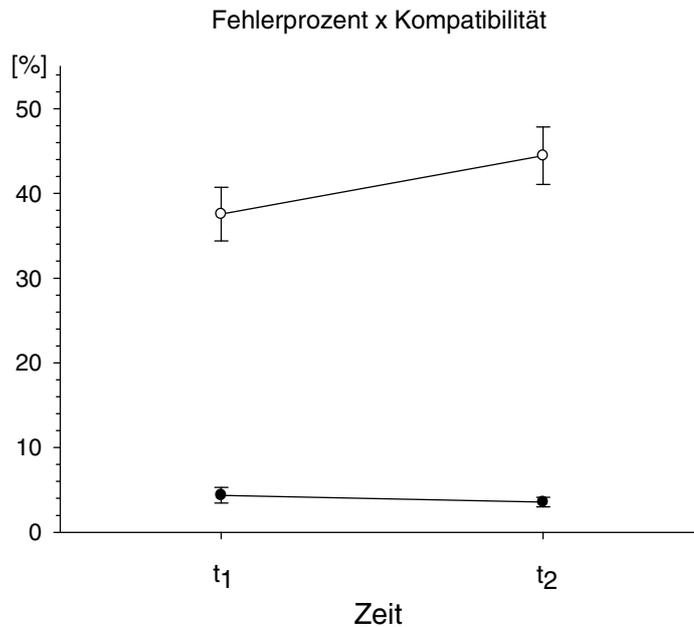
Bei der Analyse der Reaktionszeiten konnte weder ein signifikanter Haupteffekt für den Faktor Exposition gefunden werden noch eine Wechselwirkung mit dem Faktor Zeit. In Tabelle 7 sind die Mittelwerte für alle Konzentrationen dargestellt. Zwar reagierten die Probanden am schnellsten unter der Nullbedingung, aber eine konzentrationsabhängige Veränderung über die unterschiedlichen Expositionshöhen wird nicht erkennbar.

Unabhängig von der Exposition machten die Probanden bei der inkompatiblen Bedingung mehr Fehler ( $p \leq 0,001$ ) und reagierten langsamer ( $p \leq 0,001$ ) als bei der kompatiblen Bedingung (Abb. 13).

Ebenfalls unabhängig von der Exposition zeigte sich eine signifikante Wechselwirkung Zeitpunkt x Kompatibilität ( $p \leq 0,001$ ), wobei ausschließlich in der Inkompatibilitätsbedingung der Fehleranteil zunahm. Diese Wechselwirkung zeigte sich nicht für die Reaktionszeiten.

**Tabelle 7:** Reaktionszeiten bei der Flankierreizaufgabe, gemittelt über den jeweiligen Untersuchungsverlauf.

Expositionsbedingung	RT
0 ppm	304,9
12,5 ppm	311,4
25,0 ppm	313,8
37,5 ppm	311,0
50,0 ppm	309,2



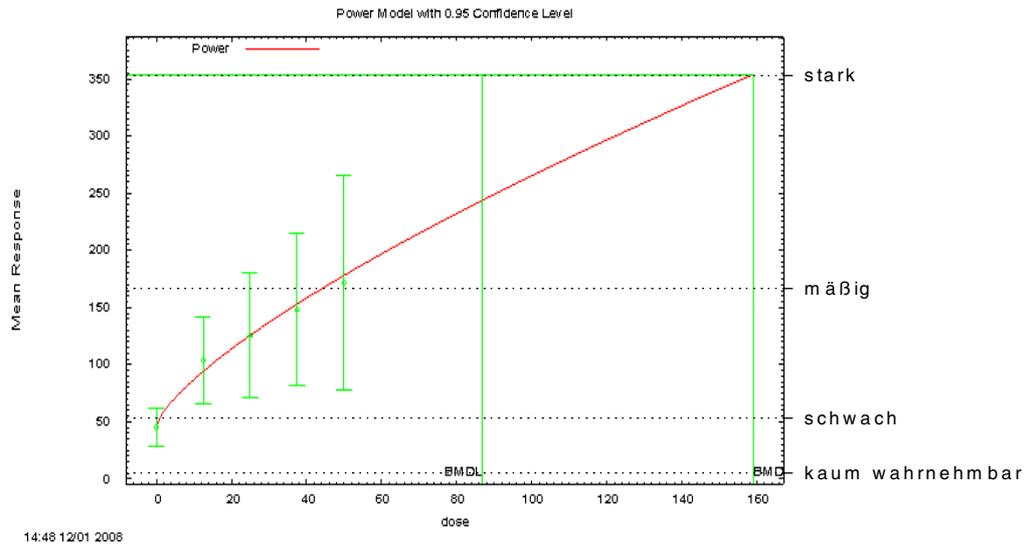
**Abbildung 13:** Veränderung des Fehleranteils bei der Flankierreiz-Aufgabe während des Untersuchungsverlaufs, getrennt nach kompatibler (●) und inkompatibler (○) Bedingung (Untersuchungen mit und ohne Exposition zusammengefasst), ( $M \pm SE$ ).

#### *Benchmarkdosis der Empfindensstärke (LMS)*

Das Untersuchungsdesign war mit seinen vier konstanten Expositionsbedingungen plus der Nullbedingung im Vorfeld so angelegt worden, dass eine Risikoabschätzung, basierend auf einem beliebigen untersuchten Endpunkt, mit Hilfe der Benchmark-Dosis (BMD) Methode möglich war.

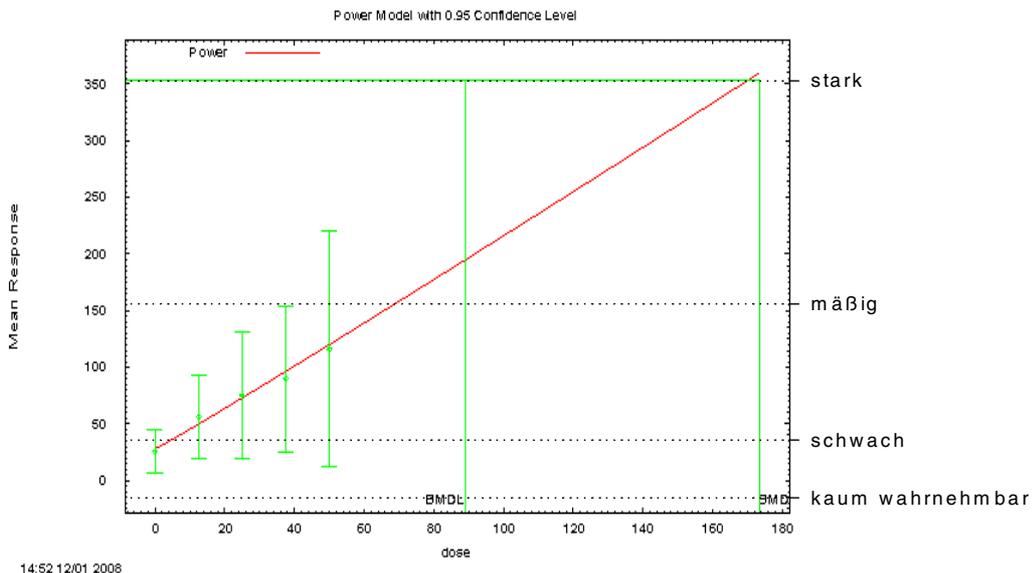
Sinnvoll anwendbar ist die BMD Methode im Bereich der LMS-Skalierung in diesem Experiment nur für die Skalen Geruchsintensität und Lästigkeit, da nur dort die Ratings eine Dosis-Wirkungsbeziehung nahe legen.

Die Modellierungen der USEPA definieren 5- oder 10-prozentige Abweichung von der Nullbedingung bereits als adverse Effekte. Da in unserem Fall bei der Nullbedingung weder mit erheblicher Lästigkeit noch erheblicher Geruchsintensität zu rechnen ist, sollten hier andere kritische Endpunkte Berücksichtigung finden. Es gibt derzeit keine Vorschläge, bei welcher Einschätzung ein Geruch als advers gelten sollte. So könnte eine Konzentration, die im Durchschnitt von einer Population als ‚stark‘ eingeschätzt wird, als adverse Konzentration gelten. Zur Modellierung des Dosis-Wirkungszusammenhangs wurde eine Power-Funktion angepasst, da sich psychophysische Zusammenhänge mit dieser Funktion beschreiben lassen (vgl. 2. Teil des Projekts). Abbildung 14 zeigt die Kurvenanpassung für die Einschätzung der Geruchsintensität zusammen mit einer Bestimmung der BMD und des BMDL (Benchmark Dose Lower Confidence Limit) für die Einschätzung ‚stark‘. Dabei stellt der BMDL-Wert eine sehr konservative Schätzung für die Konzentration dar, die in der untersuchten Population zu der kritischen Einschätzung führen könnte. Der BMDL-Wert stellt die untere Grenze des 95-Prozent Konfidenzintervalls dar und ist in dem Geruchsintensitäts-Modell fast um den Faktor 2 kleiner als der BMD.



**Abbildung 14:** Benchmark-Dosis Modell zur Bestimmung des Lower Confidence Limits der Geruchsintensitätsfunktion (BMDL, kritische Grenze).

Man erkennt in der Abbildung, dass zur Bestimmung eines BMDL-Wertes (87 ppm) eine Extrapolation weit über den untersuchten Bereich notwendig ist. Dieses und das folgende Beispiel stellen somit nur exemplarisch das Prinzip der Bestimmung einer Benchmark-Dosis dar. Eine ähnliche Analyse wie für die Skala Geruchsintensität wurde für die Lästigkeit durchgeführt (Abbildung 15).



**Abbildung 15:** Benchmark-Dosis Modell zur Bestimmung des Lower Confidence Limits der Lästigkeitsfunktion (BMDL, kritische Grenze).

Obwohl dem Anpassungsalgorithmus allgemeine Power-Funktionen zur Modellierung zur Verfügung standen, ist das entstandene Modell nahezu linear. Das ist eine für eine psychophysische Funktion unerwartete Modellierung, da für die untersuchten Empfindungen eher Sättigungskurven angemessen sein sollten. Auch bei dieser Empfindung muss weit extrapoliert werden, um ein BMDL für die Einschätzung ‚stark‘ zu bestimmen. Unter Zugrundelegung des beobachteten, niedrigen Lästigkeitsniveaus kommt das Modell zu einer kritischen Konzentrationsgrenze (90 ppm), die weit oberhalb des untersuchten Expositionsbereiches liegt.

## Acetaldehyd Zusammenfassung

Das Experiment untersuchte Effekte konstanter Acetaldehydexpositionen in 4 Expositionsstufen plus einer Nullbedingung sowie potentielle Nachwirkungen. Die primären Effekte von Acetaldehyd beschränken sich auf schwache Geruchswirkungen. Irritative Effekte konnten weder auf Erlebensebene noch auf physiologischer Ebene beobachtet werden. Veränderungen nasaler Druck-Flussverhältnisse traten generell nach Verlassen des Expositionslabors auf und waren nicht expositionsmoduliert. Ein ähnliches expositionsunabhängiges Reversionsmuster konnte für die Blinzelfrequenz festgestellt werden. Auf sekundärer Ebene fanden sich, passend zur geringen Aufmerksamkeits-Ablenkung, keine dosisabhängigen Leistungsveränderungen. Eine der Arbeitsgedächtnisaufgaben (räumlicher Aufgabentyp) wurde für den Einsatz in der nächsten Untersuchung ausgewählt, da sie am stärksten zwischen Expositionssituationen zu diskriminieren scheint.

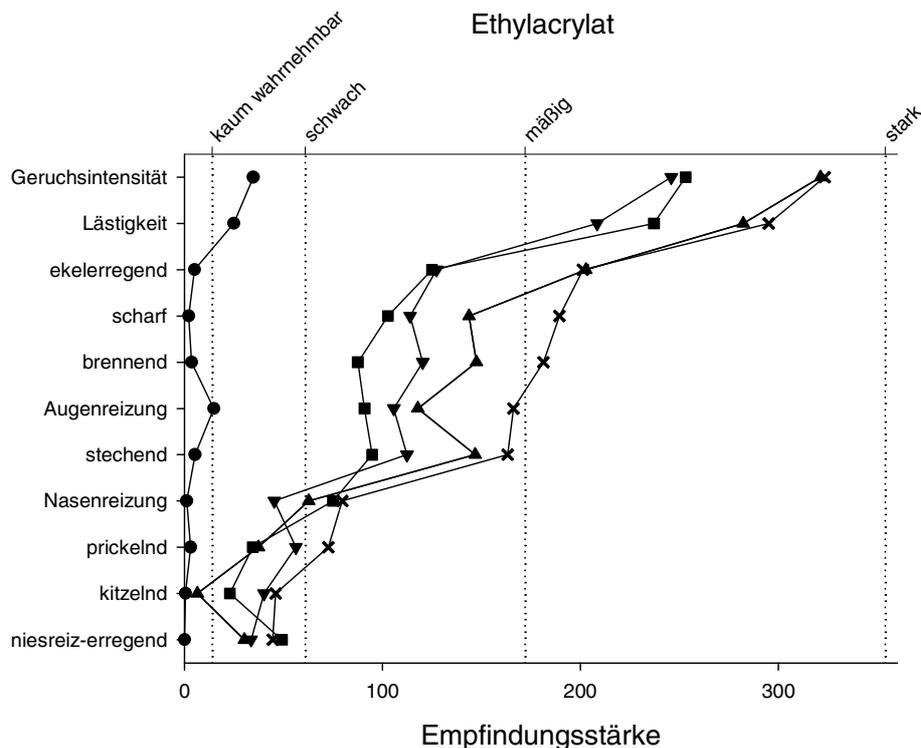
Das BMD Modell wurde exemplarisch bezüglich zweier Endpunkte angewendet. Legt man willkürlich die Einschätzung ‚stark‘ auf der LMS-Skala als mögliches Adversitätskriterium fest, so ergeben sich untere kritische Grenzen (BMDLs), die noch deutlich über dem untersuchten Expositionsbereich liegen.

## 2. Experiment: Ethylacrylat

### Ethylacrylat: primäre Effekte

#### Empfindensstärke (LMS)

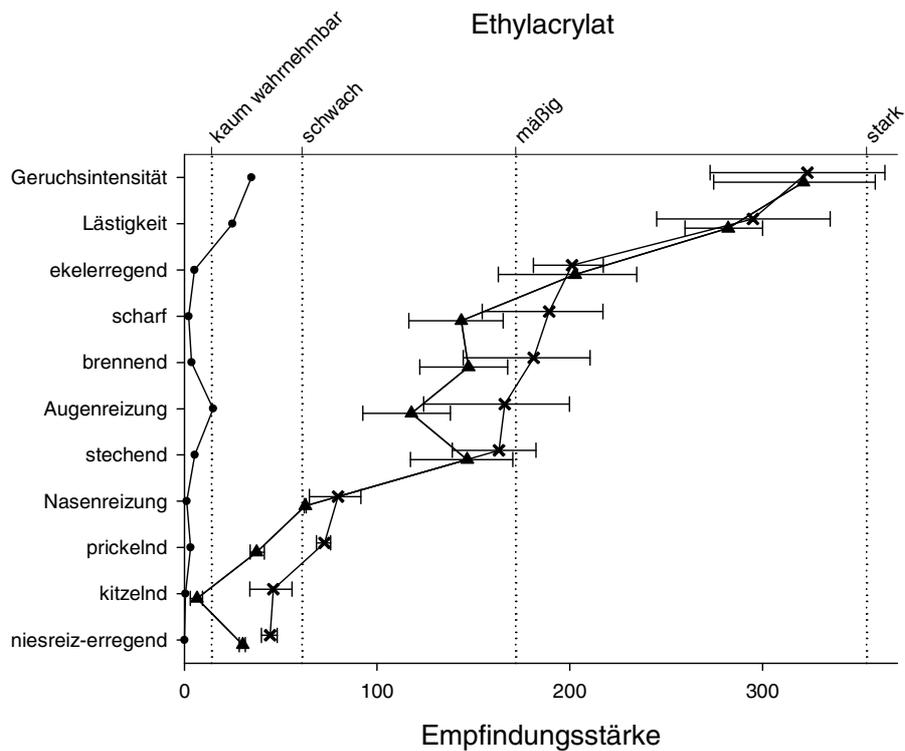
Abbildung 16 zeigt das Profil der Empfindungen, die während der vier Ethylacrylatexpositionen und der Kontrollbedingung berichtet wurden.



**Abbildung 16:** Profil der mittleren Intensität der 11 chemosensorischen Empfindungsstärken für die fünf Ethylacrylatexpositionen (●: 0 ppm, ■: 2,5 ppm, ▲: 0-5 ppm (variabel), ▼: 5 ppm, X: 0-10 ppm (variabel)).

Die Kontrollbedingung unterscheidet sich deutlich von allen Expositionsbedingungen ( $p \leq 0,05$ ). Es zeigt sich jedoch kein dosisabhängiger Effekt, wenn man auch für die variablen Expositionen die mittlere Konzentration zugrunde legt. Vielmehr bilden die Einschätzungen der beiden konstanten und der beiden variablen Bedingungen Paare. Der variierende Konzentrationsverlauf scheint deutlichere Auswirkungen auf die Geruchs- bzw. Lästigkeitseinschätzung zu haben als die tatsächliche mittlere Konzentration (2,5 ppm bzw. 5 ppm). Im irritativen Erleben werden die Bedingungen besser als im Geruchserleben differenziert (Abb. 16), was sich aber nicht in den statistischen Kennwerten ausdrückt.

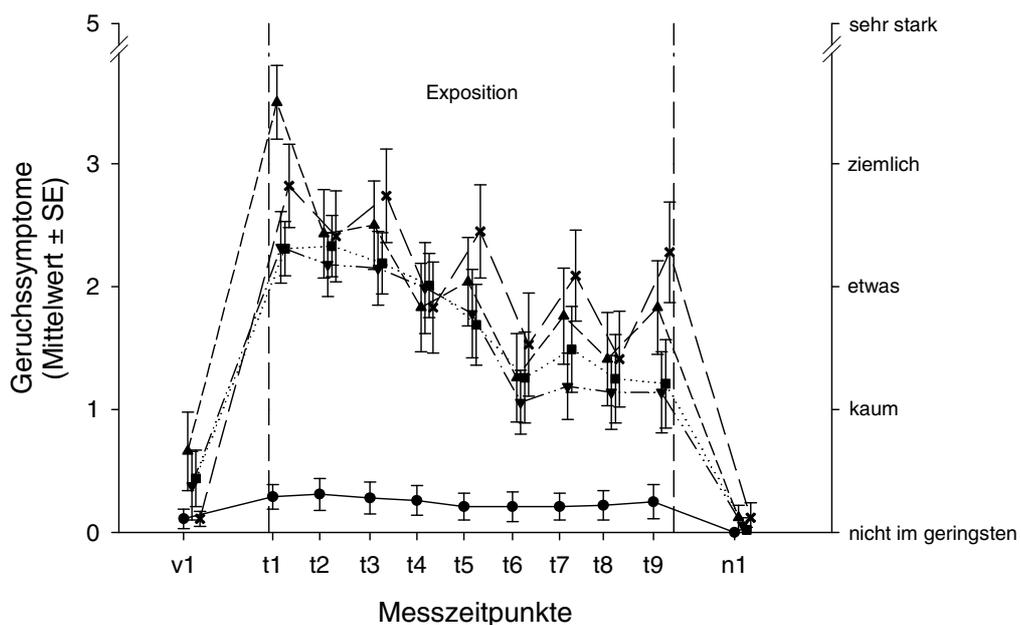
In der folgenden Abbildung 17 sind die Einschätzungen während der Expositionsspitzen und -täler dargestellt (Balkenenden). Nur im irritativen Erleben, nicht im Geruchserleben, zeigt sich eine Differenzierung zwischen den beiden variablen Expositionsbedingungen, die sich auch in unterschiedlichen Variationsbreiten manifestiert.



**Abbildung 17:** Profil der mittleren Intensität der 11 chemosensorischen Empfindungsstärken für die drei Ethylacrylatexpositionen (●: 0 ppm, ▲: 0-5 ppm, X: 0-10 ppm). Für die variierenden Expositionsbedingungen sind die Expositionsminima und -maxima (Balkenenden) angegeben.

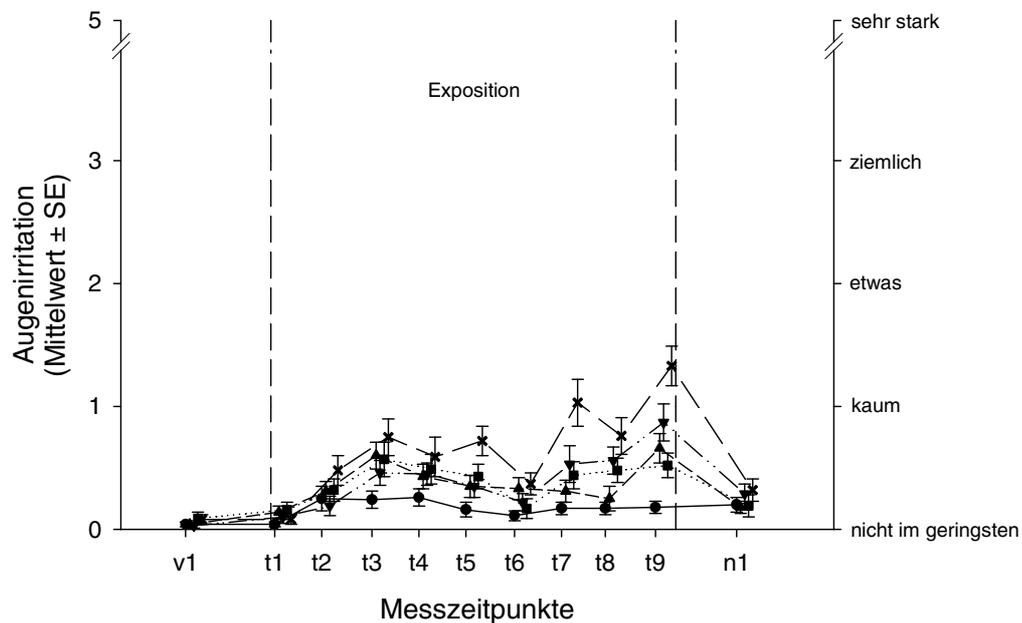
*Symptome: olfaktorisch, trigeminal (SPES)*

Die Symptomanangaben in der Kontrollbedingung und den Expositionsbedingungen unterscheiden sich deutlich voneinander ( $p \leq 0,01$ ). Die folgende Abbildung 18 zeigt die Geruchssymptomeinschätzungen für die fünf Bedingungen. Tendenziell kommt es bei den Geruchssymptomen zu einer Adaptation während der Exposition ( $p \leq 0,01$ ).



**Abbildung 18:** Höhe und Verläufe der Geruchssymptome für die fünf Ethylacrylatexpositionen (0 ppm, ■: 2,5 ppm, ▲: 5 ppm, ▼: 5 ppm, X: 0-10 ppm, M ± SE).

Der Trend für Symptome der Augenirritation ist bei höheren Konzentrationen eher ansteigend ( $p \leq 0,001$ ).



**Abbildung 19:** Höhe und Verläufe der Augenirritationssymptome für die fünf Ethylacrylatexpositionen (0 ppm, ■: 2,5 ppm, ▲: 0-5 ppm, ▼: 5 ppm, X: 0-10 ppm,  $M \pm SE$ ).

In fünf anderen Symptombereichen liegen die eingeschätzten Symptome niedriger als ‚kaum‘ (Rating < 1).

#### *Physiologie: Rhinomanometrie*

Die primären Effekte, die in den Parametern der physiologischen Variablen nasaler Atemwiderstand gefunden wurden, sind in Tabelle 8 dargestellt.

**Tabelle 8:** Mittlere Veränderung des Atemwiderstandes ( $\Delta$ Flow) beim Vergleich von Nachmessung zu Vormessung.

	$\Delta$ Flow [ml/s]
0 ppm	-21
2,5 ppm	-106
0-5 ppm	-38
5,0 ppm	-36
0-10 ppm	-95

Auch bei Ethylacrylat ist eine Verringerung des nasalen Flow durch die Exposition zu beobachten. Es gibt allerdings keinen Hinweis auf systematische, konzentrationsabhängige Unterschiede in der Abnahme.

#### *Physiologie: Lidschlagfrequenz*

Bezüglich der Lidschlussfrequenz zeigt sich ein signifikanter Effekt der Exposition ( $p \leq 0,01$ , s. Tab. 9), des Zeitfaktors ( $p \leq 0,001$ , t1 und t2, Abb. 20) sowie ein signifikanter Anstieg der Blinzelfrequenz während der 25-minütigen Ausführung eines jeweiligen Mackworth-Uhr-Tests

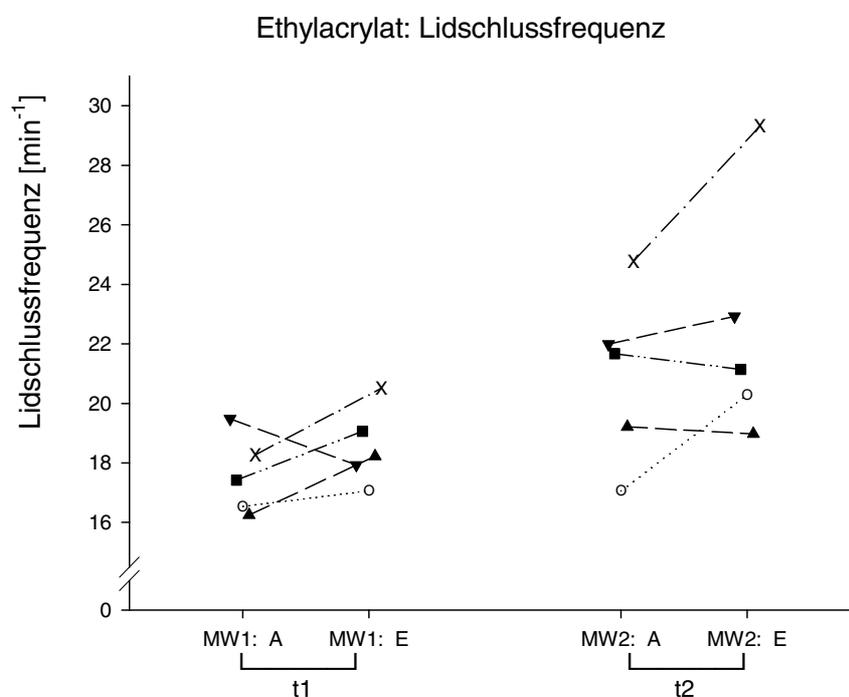
( $p \leq 0,05$ ). Auch die Interaktion dieser drei Faktoren war signifikant. Die Daten sind in Abbildung 20 dargestellt. Sie verdeutlichen, dass vor allem in der Expositionsbedingung mit Spitzen von 10 ppm über die 4-stündige Expositionsphase eine deutliche Zunahme der Lidschlussfrequenz von 18 auf  $28 \text{ min}^{-1}$  beobachtet wurde. In den anderen Bedingungen ist diese Interaktion von Exposition und Zeitfaktoren deutlich schwächer ausgeprägt.

Im Einzelnen zeigte sich: Der Anstieg der Blinzelfrequenz während der Durchführung der Mackworth-Aufgabe fällt bei der alternierenden Exposition von 0-5 ppm am geringsten aus und ist unter den anderen Expositionsbedingungen deutlich höher (Tab. 9, Abb. 20) - am stärksten unter der alternierenden Expositionsbedingung von 0-10 ppm. Die Unterschiede im Grad des Anstieges sind statistisch abgesichert zwischen der hohen alternierenden Bedingung (0-10 ppm) und der niedrigeren alternierenden Bedingung (0-5 ppm) mit  $p \leq 0,036$  und zwischen der hohen alternierenden Bedingung (0-10 ppm) und der dosisgleichen hohen Konstantbedingung (5 ppm konstant) mit  $p \leq 0,030$ . Verstärkenden Einfluss hat hier möglicherweise die Expositionszunahme bis zum zulässigen Spitzenwert, da die Mackworth-Aufgaben bewusst genau in den aufsteigenden Flanken der Exposition platziert worden waren (s. Abb. 6).

**Tabelle 9:** Mittelwerte der Lidschlussfrequenz während der jeweiligen Untersuchungszeiträume.

Lidschlussfrequenz [ $\text{min}^{-1}$ ]	
0 ppm	17,7
2,5 ppm	19,8
0-5 ppm	18,2
5,0 ppm	20,6
0-10 ppm	23,2

Vergleichbar zu den subjektiven Augenreizungen zeigt auch die Lidschlussfrequenz bei zunehmender Expositionsdauer chemisch-irritative Effekte durch Ethylacrylat. Besonders in der höchsten Expositionsbedingung wirken die Expositionsspitzen effektverstärkend.

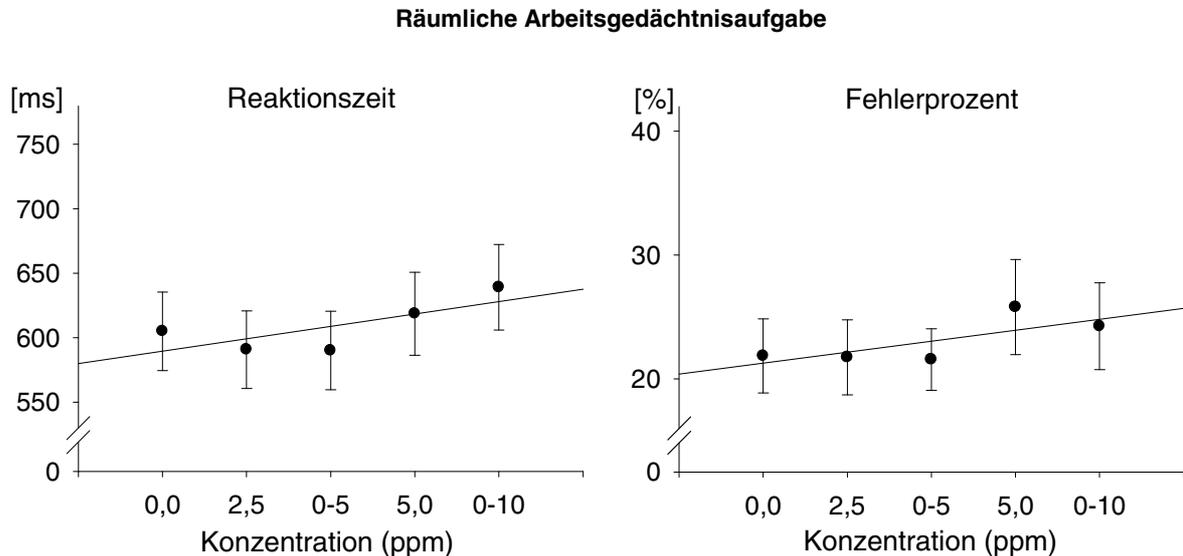


**Abbildung 20:** Verlauf der mittleren Lidschlussfrequenz vom Anfang (A) bis zum Ende (E) der zwei jeweils 25-minütigen Untersuchungszeiträume Mackworth-Uhr-Test 1 und 2 (MW 1 und MW 2) unter den fünf verschiedenen Expositionsbedingungen (0: 0 ppm, ■: 2,5 ppm, ▲: 0-5 ppm, ▼: 5 ppm, X: 0-10 ppm).

## Ethylacrylat: sekundäre Effekte

Verhalten: Arbeitsgedächtnis (AG)

Die räumliche Arbeitsgedächtnisaufgabe (Punkt) wurde in den Schwierigkeitsstufen 2-back und 3-back viermal durchgeführt (s. Abb. 6).



**Abbildung 21:** Reaktionszeit und Fehlerprozent der räumlichen Arbeitsgedächtnisaufgabe für alle Expositionsbedingungen, (M ± SE).

In Abbildung 21 ist zu erkennen, dass sich sowohl für die Reaktionszeiten als auch für die Fehleranteile insgesamt eine leichte Anstiegstendenz ergibt, die durch die beiden höchsten Konzentrationsstufen hervorgerufen wird. Nur für die Reaktionszeiten wurde ein signifikanter Haupteffekt Konzentration gefunden ( $p \leq 0,01$ ). Bei der Bewertung dieses Effektes ist zu berücksichtigen, dass er durch die Leistungen in den beiden niedrigen Expositionsstufen (2,5, 0-5 ppm) mitbedingt wird, die besser sind als die in der Nullbedingung ohne Exposition (Abb. 21). Entsprechend wurden keine signifikanten Kontraste zwischen einzelnen Expositionsbedingungen und der Nullbedingung gefunden. Nur die Reaktionszeit der höchsten, variablen Exposition (0-10 ppm) unterschied sich tendenziell von der Nullbedingung ( $p \leq 0,06$ ).

Eine Irrtumswahrscheinlichkeit knapp oberhalb der Signifikanz-Entscheidungsgrenze wurde auch für den Faktor Zeitpunkt gefunden ( $p \leq 0,06$ ). Darin drückt sich aus, dass tendenziell zu Beginn der Exposition - bei der ersten Aufgabendurchführung - die schwächsten Leistungen gezeigt wurden.

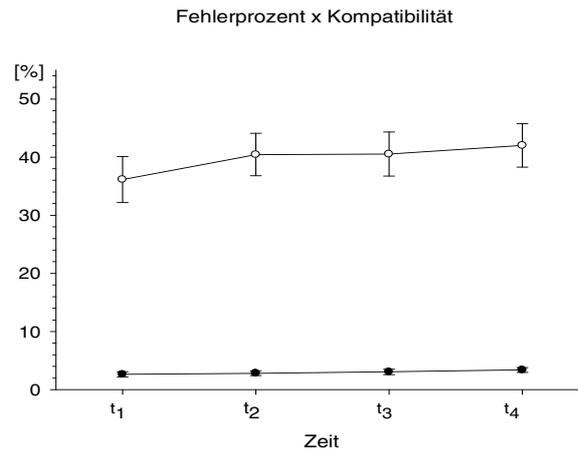
Analog zur Acetaldehyd-Untersuchung bestätigt sich sowohl in der Reaktionszeit als auch im Fehleranteil, dass die 3-back Version schwieriger als die 2-back Version ist ( $p \leq 0,001$ ).

Die Analyse der Fehleranteile ergab keinen signifikanten Haupteffekt der Exposition und keine signifikante Wechselwirkung zwischen Exposition und Zeit. Allerdings zeigte eine Einzelkontrastprüfung, dass sich der Fehleranteil der höheren konstanten Exposition (5,0 ppm) von der Nullbedingung unterschied ( $p \leq 0,05$ ). Signifikant wurden die Haupteffekte Zeit ( $p \leq 0,001$ ) und Kompatibilität ( $p \leq 0,001$ ). Die Reaktionszeit der Versuchspersonen nahm generell über die Anzahl der Testdurchgänge ab.

### Verhalten: Flankierreizaufgabe (FR)

Die Analyse der Flankierreizaufgabe zeigte keine signifikanten Effekte in den Reaktions- und Fehlerparametern, die sich auf Ethylacrylateinflüsse zurückführen ließen. Ebenso ergaben sich keine signifikanten Wechselwirkungen Exposition x Zeit.

Generell ist ein Unterschied im Fehleranteil zu erkennen, der auf die Aufgabenschwierigkeit zurückzuführen ist ( $p \leq 0,001$ , Abb. 22) sowie eine Wechselwirkung von Zeitpunkt und Kompatibilität ( $p \leq 0,01$ ). Während sich der Fehleranteil in kompatiblen Testsituationen kaum ändert, steigt er bei inkompatiblen Testsituationen von 36% auf 42% an. Der Anstieg ist am Anfang der Untersuchungssituation etwas stärker als später (Abb. 22).



**Abbildung 22:** Fehleranteile im Zeitverlauf bei der inkompatiblen (○) und der kompatiblen (●) Version der Flankierreiz-Aufgabe, jeweils gemittelt über alle Konzentrationsbedingungen, ( $M \pm SE$ ).

### Ethylacrylat Zusammenfassung

Das Experiment untersuchte Effekte von Ethylacrylatexpositionen unter 2 konstanten und 2 variablen Expositionsbedingungen. Als primäre Effekte zeichnen sich auf subjektiver Ebene ein intensives Geruchserleben und differenzierte Reizungswahrnehmungen ab. Während die Rhinomanometrie keine systematischen Effektmuster zeigt, finden sich in der Lidschlagfrequenz Veränderungen, die zu den Expositionsmustern und den subjektiven Einschätzungen passen. Insbesondere in der höchsten variablen Konzentration finden sich auf einem etwas geringeren Effektniveau Zusammenhänge, die in einer früheren Untersuchung bei dem noch stärker irritativ wirkenden Ethylhexanol beobachtet wurden (Kiesswetter et al. 2005).

Auf sekundärer Ebene fanden sich keine systematischen dosisabhängigen Leistungsveränderungen. Jedoch zeigt sich auch hier über alle Aufgabenparameter hinweg eine Tendenz zur Leistungsminderung bei den höchsten Expositionen.

## Gesamtzusammenfassung

Die Ergebnisse der beiden Experimente des Arbeitsschwerpunktes 1.3 sind in Tabelle 10 zusammenfassend dargestellt.

**Tabelle 10:** Zusammenfassende Darstellung primärer und sekundärer Effekte für die beiden lokalen Reizstoffe, die im Arbeitsschwerpunkt 1.3 des Verbundprojekts untersucht wurden.

	Acetaldehyd (50 ppm)	Ethylacrylat (10 ppm)
<b>Primäre Indikatoren</b>		
Belästigung	(-)	+
trigeminale Empfindungen	-	(+)
akute Symptome	-	(+)
Zeitverlauf	-	+
Rhinomanometrie	-	-
Lidschlagfrequenz	-	+
<b>Sekundäre Indikatoren</b>		
Arbeitsgedächtnis	-	(+)
Flankierreizaufgabe	-	(+)

Die beiden experimentellen Expositionen führten bei den untersuchten Konzentrationen zu einem deutlich unterschiedlichen Erleben und Verhalten. Während bei Acetaldehyd im Wesentlichen Geruchseffekte beobachtet wurden, zeigten sich bei Ethylacrylat vermehrt irritative Wirkungen auf subjektiver und physiologischer Ebene. Eine potentielle, sekundäre Ablenkungswirkung auf Testleistungen deutet sich bei den höchsten Expositionen von Ethylacrylat an.

In der Acetaldehyduntersuchung wurde die Benchmark-Dosis-Methode (BMD) zur Berechnung eines kritischen Lower Confidence Limits der Adversität eingesetzt. Dieser Ansatz konnte für Acetaldehyd angewendet werden, da in diesem Experiment die Voraussetzung konstanter Expositionen gegeben war. Die Modelle machen deutlich, dass die Ergebnisse relativ willkürlich sind, solange kein gut begründetes Adversitätskriterium angegeben werden kann.

## Ergebnisse zum ASP 1.2 (Olfaktometrie „Erweiterung“)

Bei der Planung des Forschungsprojekts war deutlich geworden, dass die Ergebnisse der psychophysischen Screeningverfahren (dynamische Olfaktometrie) um (psycho-)physiologische Methoden erweitert werden sollten, damit sie besser für die Ableitung von Grenzwerten genutzt werden können. Bisher liegen „nur“ subjektive Angaben vor, die beschreiben, wie der Konzentrationsbereich zwischen Geruchs- und Reizschwelle wahrgenommen wird. Daher sollte geprüft werden, ob der Übergang von Geruchs- zu Reizeffekten durch physiologisch messbare Prozesse, wie zum Beispiel die Veränderung der Atemtiefe, die Verengung der Nasenhaupthöhle oder autonome Reaktionen erfasst werden kann.

Beim Screening von Reizstoffen mittels dynamischer Olfaktometrie konnten bereits in der ersten Förderphase des Projektes umfassende Informationen zur subjektiven olfaktorischen und trigeminalen Wahrnehmung der jeweils untersuchten Substanzen ermittelt werden. Das zugehörige Instrument waren psychophysische Funktionen mit ihren Dosis-Wirkungsbeziehungen. Physiologische Effekte wurden jedoch bei diesen Kurzzeitapplikationen bisher nicht standardmäßig und mit objektiven Messmethodiken ermittelt. Dies soll durch Forschungsarbeiten im Arbeitsschwerpunkt 1.2 der aktuellen Förderphase geändert werden.

Zunächst wurde im Rahmen dieser Arbeiten versucht, eine nicht-invasive Messmethodik aus der Allergieforschung, die sogenannte optische Rhinometrie (Rhios GmbH, Deutschland) in den bestehenden Screeningprozeß zu integrieren. Bei der optischen Rhinometrie wird bei einem Probanden mit einer Art von Brillengestell (RHINOLUX-Sensorbrille) eine winzige Infrarotlichtquelle zusammen mit dem zugehörigen Empfänger so an den Außenseiten der Nasenmuscheln platziert, dass die untere und mittlere Nasenmuschel horizontal mit einer sehr geringen und gewebeunschädlichen Menge von Infrarotlicht durchstrahlt wird. Findet nun durch eine Exposition gegenüber Reizstoffen ein endonasaler Schwellungsprozess mit zugehöriger Blutvolumenzunahme statt, so kann durch die Veränderungen der Lichtmenge, die der Empfänger misst, die Stärke dieses Schwellungsprozesses kontinuierlich beobachtet und eine sogenannte Schwellungskurve errechnet werden. Bei der Behandlung von Allergiepationen (Bestimmung von allergieauslösenden Substanzen) konnten mit dieser Messmethodik bereits sehr gute Resultate erzielt werden (Wüstenberg et al., 2004). Jedoch zeigten sich in Vorversuchen am Flow-Olfaktometer mit mehreren potenten Reizstoffen und einer vom Hersteller zur Verfügung gestellten RHINOLUX-Sensorbrille im Bereich der Reizstoffkonzentrationen, die bei den bisherigen Versuchen im *IfADo* eingesetzt und zuvor von der zugehörigen Ethikkommission genehmigt worden waren, keine Veränderungen in der Schwellkurve. Damit musste der Einsatz dieser zunächst sehr vielversprechenden, kontinuierlich und nicht-invasiv messenden Methodik beim Screening von Reizstoffen verworfen werden.

Ein weiterer Vorversuch, in dem die Atemtiefe bei Reizstoffexposition am Flow-Olfaktometer als abhängige Variable erhoben wurde, zeigte hohe interindividuelle Unterschiede in den Daten der 39 freiwilligen, gesunden Probanden (interindividueller Varianzanteil etwa 70%). Die Ermittlung belastbarer und allgemeingültiger Aussagen aus derartigem Datenmaterial ist aus statistischer Sicht sehr schwierig, zumal bei der Erfassung der Messdaten sehr artifizielle Versuchsbedingungen notwendig sind, die eine Extrapolation der Resultate auf die Arbeitswelt zusätzlich erschweren.

Zur Zeit finden zu diesem Arbeitsschwerpunkt weitere Vorversuche statt, die darauf abzielen, die Messung des Hautwiderstandes der Probanden als ein objektives Kriterium der Reizung in die bestehende Screeninganordnung zu integrieren.

## Publikation und Verbreitung

Der HVBG und der Forschungsbegleitkreis des Verbundprojekts wurden regelmäßig über den Stand der Forschungsarbeiten durch Berichte informiert und in die laufenden Entscheidungsprozesse eingebunden.

## Publikationsliste

- Altmann L, Berresheim H, Krüll H, Fricke H, van Thriel C, Schäper M, Merget R, Brüning T: Olfaktorische und irritative Wirkungen von Ammoniak bei Kurzzeitexposition. In: Wrbitzky R, Bader M (Hrsg.): Arbeitsmedizin in Landwirtschaft, Gartenbau und Forstwirtschaft. „Gender Medicine“ in der Arbeitsmedizin. Dokumentation der Deutschen Gesellschaft für Arbeitsmedizin und Umweltmedizin e.V., 46. Jahrestagung, 22.-25. März 2006 in Hannover (S 492-494). Lübeck: DGAUM, 2006 (2007)
- Brüning T, van Thriel C: Lokal reizende Stoffe zwischen Belästigung und adversen Effekten. In: Wrbitzky R, Bader M (Hrsg.): Arbeitsmedizin in Landwirtschaft, Gartenbau und Forstwirtschaft. „Gender Medicine“ in der Arbeitsmedizin. Dokumentation der Deutschen Gesellschaft für Arbeitsmedizin und Umweltmedizin e.V., 46. Jahrestagung, 22.-25. März 2006 in Hannover (S 693-694). Lübeck: DGAUM, 2006 (2007)
- Hey K, Juran SA, van Thriel C: Neurobehavioral effects during exposures to propionic acid. In: EPICOH, NEUREOH 2008. 20<sup>th</sup> International Conference on Epidemiology in Occupational Health, EPICOH, June 9-11, 2008; 10<sup>th</sup> International Symposium on Neurobehavioral Methods and Effects in Environmental and Occupational Health, NEUREOH, June 11-13, 2008 “Multiple exposures, multiple effects”, Heredia, Costa Rica (p 213). Costa Rica, 2008
- Hey K, Juran S, van Thriel C: Gibt es eine Veränderung der kognitiven Leistung durch lokale Reizstoffe? – Experimentelle Untersuchung zu Acetaldehyd. In: Marks A, Griefahn B (Hrsg.): 12. Symposium Arbeitsmedizin für Nachwuchswissenschaftler, 14.-16. Nov. 2008, Schwerte. Institut für Arbeitsphysiologie an der Technischen Universität Dortmund und Forum Arbeitsphysiologie (S 26-27). Dortmund: IfADo, 2008
- Juran SA, Kiesswetter E, Kleinbeck S, Schäper M, van Thriel C: Kognitive Effekte chemosensorischer Exposition: Ein Ansatz zur funktionsorientierten Parametrisierung. In: Wender KF, Mecklenbräucker S, Rey GD, Wehr T (Hrsg.): Beiträge zur 49. Tagung experimentell arbeitender Psychologen, 26.-28. März 2007 in Trier (S 179). Lengerich: Pabst Science Publ., 2007
- Juran SA, Kiesswetter E, Kleinbeck S, Schäper M, van Thriel C: Examining cognitive effects of chemosensory exposure using functional parameterization and psychophysiological methods. In: Fechter, L, Ascher M, Fox D, Pessah I: The 11<sup>th</sup> Meeting of the International Neurotoxicology Association, June 10-15, 2007, Pacific Grove, California (p 26). Pacific Grove, 2007
- Kleinbeck S, Juran SA, Kiesswetter E, Schäper M, Blaszkewicz M, Brüning T, van Thriel C: Evaluation of ethyl acetate on three dimensions: Investigation of behavioral, physiological and psychological indicators of adverse chemosensory effects. Toxicol Lett 182: 102-109 (2008), DOI 10.1016/j.toxlet.2008.09.001

- Kleinbeck S, Juran SA, Kiesswetter E, Schäper M, van Thriel C: Differenzierung von Geruchs- und Reizeffekten durch Verlaufsbetrachtungen subjektiver Symptomangaben. *Arbeitsmed Sozialmed Umweltmed* 42: 126 (abstr no V71) (2007)
- Kleinbeck S, Juran SA, Kiesswetter E, Schäper M, van Thriel C: Die Rolle der Emotionalität beim Riechen: Empfindungen unangenehmer Geruchsstoffe. In: Wender KF, Mecklenbräuker S, Rey GD, Wehr T (Hrsg.): Beiträge zur 49. Tagung experimentell arbeitender Psychologen, 26.-28. März 2007 in Trier (S 238). Lengerich: Pabst Science Publ., 2007
- Schäper M, Kleinbeck S, Kiesswetter E, Blaszkewicz M, van Thriel C: Bewertung von Reizstoffen durch Irritationsschwellen – methodische Variationen. *Arbeitsmed Sozialmed Umweltmed* 43: 161 (2008)
- van Thriel C: Essigsäure. Nachtrag 2008. In: Greim H (Hrsg.): Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe. Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründungen von MAK-Werten (Maximale Arbeitsplatzkonzentrationen). 44. Lfg. S. 1-7 (E-H). Weinheim: Wiley-VCH, 2008
- van Thriel C: Psychology and olfaction. In: Wascher E, Falkenstein M, Rinkebar G, Grosjean M (Hrsg.): Psychologie und Gehirn 2007. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Psychophysiology und ihre Anwendung (DGPA), in Dortmund, vom 07.06.-09.06.2007 (S 5). Dortmund: Institut für Arbeitsphysiologie, 2007
- van Thriel C, Blaszkewicz M, Juran S, Kiesswetter E, Kleinbeck S, Schäper M, Altmann L, Berresheim H, Brüning T: Chemosensorische Eigenschaften und Effekte des lokalen Reizstoffes Ethylacetat – ein integrativer Ansatz zur Bewertung von Reizstoffen. In: Wrbitzky R, Bader M (Hrsg.): Arbeitsmedizin in Landwirtschaft, Gartenbau und Forstwirtschaft. „Gender Medicine“ in der Arbeitsmedizin. Dokumentation der Deutschen Gesellschaft für Arbeitsmedizin und Umweltmedizin e.V., 46. Jahrestagung, 22.-25. März 2006 in Hannover (S 200-204). Lübeck: DGAUM, 2006 (2007)
- van Thriel C, Juran SA, Kiesswetter E, Kleinbeck S, Schäper M: Reizwirkungen durch organische Carbonsäuren – Ergebnisse experimenteller Expositionsstudien. *Arbeitsmed Sozialmed Umweltmed* 43: 142-143 (2008)
- van Thriel C, Juran SA: Chemoreception and cognitive performance. In: Wascher E, Falkenstein M, Rinkebar G, Grosjean M (Hrsg.): Psychologie und Gehirn 2007. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Psychophysiology und ihre Anwendung (DGPA), in Dortmund, vom 07.06.-09.06.2007 (S 7). Dortmund: Institut für Arbeitsphysiologie, 2007
- van Thriel C, Juran SA, Kleinbeck S, Kiesswetter E, Schäper M: Reizwirkungen durch Cyclohexylamin: Ergebnisse einer experimentellen Expositionsstudie. *Arbeitsmed Sozialmed Umweltmed* 42: 157 (abstr no P62) (2007)
- van Thriel C, Kiesswetter E, Schäper M, Juran SA, Blaszkewicz M, Kleinbeck S: Odor annoyance of environmental chemicals: sensory and cognitive influences. *J Toxicol Environ Health A* 71: 776-785 (2008)
- van Thriel C, Kiesswetter E, Schäper M, Juran S, Kleinbeck S: Odor annoyance of environmental chemicals: sensory and cognitive influences. In: EnTox 2007. Scientific Symposium, Dortmund, May 10-11, 2007. Environmental toxicology in North Rhine-Westphalia, Germany – Interdisciplinary research activities in toxicology, statistics, hy-

giene and medicine. Umwelttoxikologie in Nordrhein-Westfalen – Interdisziplinäre Forschung in Toxikologie, Statistik, Hygiene und Medizin. Abstracts (o. Pag.). Dortmund: Univ., IfADo; Bochum: Univ., 2007

van Thriel C, Schaeper M, Kiesswetter E, Kleinbeck S, Juran SA: Neurobehavioral and chemosensory effects of local irritants. In: Fechter, L, Ascher M, Fox D, Pessah I: The 11<sup>th</sup> Meeting of the International Neurotoxicology Association, June 10-15, 2007, Pacific Grove, California (p 69). Pacific Grove, 2007

## Literatur

- Arts J H, Rennen M A and de Heer C: Inhaled formaldehyde: evaluation of sensory irritation in relation to carcinogenicity. *Regul Toxicol Pharmacol* 44(2): 144-60 (2006)
- Filipsson A F, Sand S, Nilsson J and Victorin K: The benchmark dose method--review of available models, and recommendations for application in health risk assessment. *Crit Rev Toxicol* 33(5): 505-42 (2003)
- Hoffmeyer, F, Harth, V, Merget, R, Goldscheid, N, Hainze, E, Degens, P, Pesch, B, Bunger, J, Bruning, T and Raulf-Heimsoth, M: Exhaled breath condensate analysis: evaluation of a methodological setting for epidemiological field studies. *J Physiol Pharmacol* 58 (Suppl 5): 289-298 (2007)
- Kiesswetter E, van Thriel C, Schäper M, Blaszkewicz M and Seeber A: Eye blinks as indicator for sensory irritation during constant and peak exposures to 2-ethylhexanol. *Environm. Toxicol. and Pharmacol.* 19: 531-541 (2005)
- Kopp B, Mattler U, Goertz R and Rist F: N2, P3 and the lateralized readiness potential in a nogo task involving selective response priming. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 99(1): 19-27 (1996)
- Nielsen G D and Ovrebo S: Background, approaches and recent trends for setting health-based occupational exposure limits: a minireview. *Regul Toxicol Pharmacol* 51(3): 253-69 (2008)
- Sand S, Victorin K and Filipsson A F: The current state of knowledge on the use of the benchmark dose concept in risk assessment. *J Appl Toxicol* 28(4): 405-21 (2008)
- Suwazono Y, Dochi M, Kobayashi E, Oishi M, Okubo Y, Tanaka K and Sakata K: Benchmark Duration of Work Hours for Development of Fatigue Symptoms in Japanese Workers with Adjustment for Job-Related Stress. *Risk Anal* 28(6): 1689-1698 (2008)
- USEPA (1995). The use of the benchmark dose method in health risk assessment. Report EPA/630/R-94/007. USEPA. Washington, DC.
- USEPA: Benchmark dose (BMD) methodology.  
[http://www.epa.gov/NCEA/bmds/bmds\\_training/methodology/intro.htm](http://www.epa.gov/NCEA/bmds/bmds_training/methodology/intro.htm) (online)
- van Thriel C, Schäper M, Kiesswetter E, Kleinbeck S, Juran S, Blaszkewicz M, Fricke H H, Altmann L, Berresheim H and Brüning T: From chemosensory thresholds to whole body exposures-experimental approaches evaluating chemosensory effects of chemicals. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*: 1-14 (2006)
- Wüstenberg E G, Hüttenbrink B, Hauswald U, Hampel E and Schleicher E: Die optische Rhinomanometrie - Kontinuierliche, direkte Messung der Schwellung der Nasenschleimhaut bei ALLergenprovokation. *HNO* 52: 798-806 (2004)
- Zimmermann P and Fimm B: Testbattery for attentional performance (TAP). Freiburg, Psytest (1993)

Zwischenbericht zum Verbundprojekt

***Abgrenzung und Differenzierung  
,irritativer' und ,belästigender' Effekte  
von Gefahrstoffen - Fortsetzung***

März 2008

Autoren:  
Meinolf Blaszkewicz  
Kathrin Hey  
Ernst Kiesswetter  
Stefan Kleinbeck  
Michael Schäper  
Christoph van Thriel

## Wissenschaftlicher Hintergrund

Zur Ableitung gesundheitsbasierter Grenzwerte für lokale Reizstoffe sind Humandaten notwendig, da valide Bioassays im Augenblick weder ‚in vitro‘ (Zellen) noch ‚in vivo‘ (Tiermodell) zur Verfügung stehen. Für die Vielzahl der Reizstoffe, die an den unterschiedlichsten Arbeitsplätzen eingesetzt werden, können keine aufwendigen Inhalationsstudien durchgeführt werden. Somit werden Screeninginstrumente benötigt, die „grobe“ Anhaltspunkte über die chemosensorischen Wirkungen eines Arbeitsstoffes und den Konzentrationsbereich geben, in dem sie zu erwarten sind. In der ersten Förderphase wurden psychophysische Methoden für diesen Zweck getestet und mit Einschränkungen als anwendbar bewertet. Zwei Defizite, die erkannt wurden, waren (a) Probleme bei der Reizpräsentation in „Riechflaschen“ aus Glas und (b) Beschränkung auf rein subjektive Angaben beim Screening mittels dynamischer Olfaktometrie. In zwei Arbeitsschwerpunkten (ASPs) des Fortsetzungsprojekts sollen diese Probleme behandelt werden. Im Berichtszeitraum wurden die Arbeiten zum ersten Arbeitsschwerpunkt abgeschlossen.

### ASP 1.1 Optimierung der psychophysischen Schwellenbestimmungen

Die Ziele des ASP 1.1 lassen sich grob in zwei Bereiche aufteilen:

- (a) Optimierung/ Erweiterung der Reizdarbietung
- (b) Optimierung/ Erweiterung der Parametrisierung

zu (a): Die bisher in der Literatur beschriebene (Dalton et al., 2000) und im Verbundprojekt verwendete (van Thriel et al., 2006) „Flaschentechnik“ (siehe Abb. 1) erscheint teilweise störanfällig gegenüber:

- (1) Temperatureffekten (z. B. Handwärme, Raumklima, etc.)
- (2) Reaktionen mit Lösemitteln (z. B. chemische Zerfallsprozesse durch die Anwesenheit von Wasser)
- (3) Störgerüche/ -empfindungen (z. B. durch Feuchtigkeitseffekte)
- (4) Verdünnung der Kopfraumkonzentration durch nachströmende Luft



Abb. 1. Darstellung der Olfaktometrie mit Riechflaschen

Eine technische Möglichkeit, diese „Störeinflüsse“ besser kontrollieren zu können, und eine alternative Applikationsform zur Verfügung zu haben, liegt in der Verwendung von Probenbehältern, in denen die „Geruchsproben“ bereits vollständig verdampft sind. Diese rein gasförmigen Proben können in 25 Liter Tedlar™-Beuteln hergestellt werden, in denen die flüssigen Reizstoffe vor der Reizpräsentation kontrolliert verdampft werden.



o: falsche Entscheidung, Level: Konzentrationsstufe). Nach fünf sog. Umkehrpunkten, also einem Wechsel von einer falschen auf eine richtige Antwort oder umgekehrt, wird die Schwellenbestimmung beendet. Das geometrische Mittel der Konzentrationsstufen der letzten vier Umkehrpunkte ergibt die jeweilige Geruchs- bzw. Irritationsschwelle für den Probanden. Die Zuverlässigkeit dieser Art der Schwellenbestimmung ist vor allem von der Anzahl der Umkehrpunkte (Doty et al., 1995) – und damit vom erforderlichen zeitlichen Aufwand – abhängig. Durch weitere statistische Parametrisierung des Antwortverhaltens der Versuchspersonen sollen Prozeduren gefunden werden, mit denen die Schwellenbestimmungen in Zukunft zuverlässig und ökonomisch durchgeführt werden können. Weiterhin wird geprüft, ob bei der neuen „Beutel“-Technik Ergebnisse erzielt werden, die mit dem etablierten Verfahren der Riechflaschen vergleichbar sind.

### ASP 1.1 - Substanzauswahl

In einer vergleichenden Studie – Geruchsflaschen vs. Tedlar™-Beutel – wurden Geruchs- und Lateralisierungsschwellen für sechs lokale Reizstoffe bestimmt. Die Auswahl der Reizstoffe erfolgte anhand einer Prioritätenliste, die gemeinsam mit dem Forschungsbegleitkreis aufgestellt wurde. Tabelle 1 zeigt diese Substanzliste, die Prioritätensetzung und die mögliche Zuordnung der Reizstoffe zu den verschiedenen Arbeitsschwerpunkten des Projekts.

Tabelle 1. Substanzliste/ Prioritätenliste nach Abschluss der Beratungen durch den FBK.

Priorität <sup>1</sup>	Substanz (Synonyme)	ASP <sup>2</sup>	Daten zur systemischen Wirkung	relevante Mengen	MEGA-Datenbank: Anzahl Analysen 1981-2006/ 2000-2006	analytische Messbarkeit/ Atmosphären-generierung <sup>3</sup>
1	Acetaldehyd	1.1, 1.3	vorhanden	ja	7376/4584	1
1	2-Butanol (systemisch: Methylethylketon)	1.1, 1.2	vorhanden	ja	2897/843	1
1	Methylmethacrylat [80-62-6]	1.1, 2.2	vorhanden	ja	2945/877	1
1	Glyoxal (40%-ige wässrige Lösung) [107-22-2] (Oxalaldehyd, Ethandial)	1.1, 1.2	vorhanden	ja	520/204	2
1	ε-Caprolactam [105-60-2]	1.1, 1.2	vorhanden	ja	429/133	3
1	Isophorondiamin [2855-13-2]	1.1, 1.2	vorhanden	ja	0/0	3
1	Dibasische Ester: Bernsteinsäuredimethylester/ Dimethylsuccinat [106-65-0] Glutarsäuredimethylester [1119-40-0] Adipinsäuredimethylester [627-93-0] Carbonsäure (C4-C6) dimethylester Gemisch	1.1, 1.2	vorhanden	offen	13/13 13/13 15/15 0/0	2
1	Tetrahydrothiophen [110-01-0]	1.1, 1.2, 2.1	vorhanden	offen	26/7	1
1	2-Ethylhexylacrylat [103-11-7]	1.1, 1.2, 1.3	vorhanden	offen	68/68	2
2	Wasserstoffperoxid [7722-84-1]	1.1, 1.2	vorhanden	offen	472/137	3 (?)
2	Hydroxyessigsäureethylester [623-50-7] Hydroxyessigsäuremethylester [95-35-5]	1.1, 1.2	vorhanden	relevanter als Hydroxyessigsäurebutylester	0/0 0/0	2
2	Methyl-2-cyanoacrylat [137-05-3] Ethyl-2-cyanoacrylat [7085-85-0] Butyl-2-cyanoacrylat [25154-80-7]	1.1, 1.2	vorhanden	ja, in Klebstoffen	0/0 48/40 0/0	3

Priorität <sup>1</sup>	Substanz (Synonyme)	ASP <sup>2</sup>	Daten zur systemischen Wirkung	relevante Mengen	MEGA-Datenbank: Anzahl Analysen 1981-2006/2000-2006	analytische Messbarkeit/ Atmosphären-generierung <sup>3</sup>
3	3-Methoxy-n-butylacetat [4435-53-4]	1.1, 1.2	vorhanden	nicht im RTECS; in Lacken	1/0	2
3	1,3-Dimethylbutylacetat [108-84-9]	1.1, 1.2	vorhanden	nicht im RTECS; in Lacken	0/0	1
3	tert-Butylamin [75-64-9]	1.1, 1.2	keine Daten	eher wenig	49/5	1
3	Pyrrolidin [123-75-1]	1.1, 1.2	keine Daten	ja	0/0	2
keine	Hydroxyessigsäurebutylester		vorhanden	nicht im RTECS	0/87	
keine	Acrolein (2-Propanal) Kat. 3B		vorhanden	eher wenig		
keine	Epoxide (möglicherweise kanzerogen): Ethylenoxid (kanz.) Propylenoxid Heptachlorepid Epichlorhydrin (kanz.)		keine Daten	Technische Produkte, Exposition fraglich		
keine	Trichloramin		kein MAK-Stoff			

<sup>1</sup>: 1: hohe Priorität, 2: mittlere Priorität, 3: niedrige Priorität

<sup>2</sup>: ASP: Arbeitsschwerpunkt

<sup>3</sup>: Schwierigkeitsgrade: 1: leicht, 2: mittel, 3: schwierig

Während der Vorbereitung der Experimente ergaben Vorversuche weitere Einschränkungen bei der Auswahl der Reizstoffe der Prioritätenliste für die Arbeitsschwerpunkte 1.1 und 1.2.

Tabelle 2 zeigte Stoffe der Prioritätenliste, die als nicht geeignet identifiziert wurden.

Tabelle 2. Ausschluss von Reizstoffen aufgrund von Vorversuchen

Substanz	Problem
Glyoxal (40%-ige wässrige Lösung)	olfaktorisch kaum wahrnehmbar
ε-Caprolactam	Feststoff, nur sehr schwer dosierbar
Isophorondiamin	schwacher Geruch
Tetrahydrothiophen	Verwendung nur als Gasodorierung, möglicherweise Ersatz durch schwefelfreie Odoriermittel
...-cyanoacrylate	nicht lieferbar/ schwer erhältlich

### ASP 1.1 - Versuchsdurchführung

Die Versuche des ASP 1.1 wurden in zwei Serien mit je 36 Versuchspersonen (Vpn) durchgeführt und es wurden die folgenden Substanzen untersucht:

#### 1. Serie (30.5.-18.6. und 19.6.-9.7.2007):

- (a) 2-Butanol
- (b) Acetaldehyd
- (c) Methylmethacrylat (MMA)

#### 2. Serie (17.9. -2.10. und 8.10.-29.10.2007):

- (d) Bernsteinsäuredimethylester/ Dimethylsuccinat
- (e) Pyrrolidin
- (f) 2-Ethylhexylacrylat

Aus diesen Vorgaben ergab sich für jede Serie ein 3x2-faktorielles Messwiederholungsdesign mit den Faktoren (a) Substanz und (b) Darbietungsform (Beutel vs. Flaschen). Da die VPn sechs verschiedene Bedingungen absolvieren mussten, wurde der Versuch auf zwei Tage verteilt. An jedem Tag wurden Geruchs- und Irritationschwellen für die drei Reizstoffe bestimmt, wobei an einem Versuchstag zweimal die Flaschen- und einmal die Beuteltechnik verwendet wurde (Tag FFB) und an einem anderen Tag die jeweils andere Darbietungsform (Tag BBF). Abbildung 4 verdeutlicht diesen Versuchsablauf für die 1. Serie der Experimente.

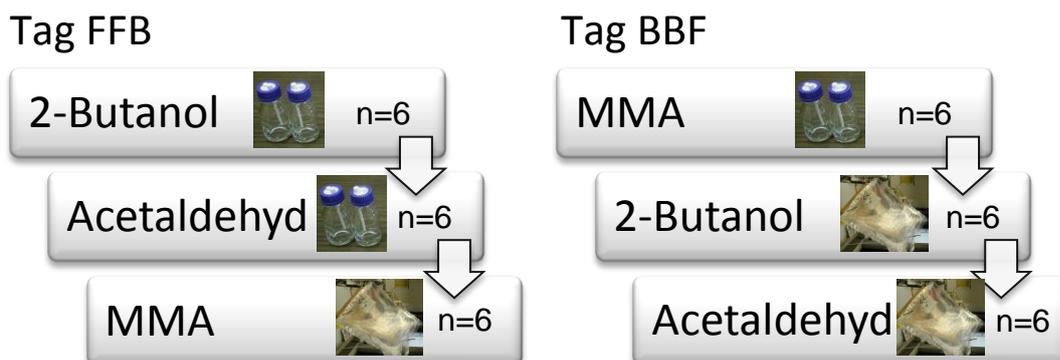


Abb. 4. Versuchsablauf der zwei Versuchstage der 1. Serie und Anzahl der VPn.

Um Reihenfolgeeffekte zu vermeiden, wurden die 36 VPn zweistufig aufgesplittet und durch den Versuchsablauf geführt:

- 1) 18 VPn begannen mit einem Tag FFB, die anderen 18 VPn mit einem Tag BBF.
- 2) Jede dieser zwei Gruppen von 18 VPn wurde wiederum in drei Untergruppen von je sechs VPn aufgeteilt und dadurch einer anderen „Startsubstanz“ in der Abfolge der drei Stoffe an einem Versuchstag zugeordnet.

### ASP 1.1 – Stichproben

Tabelle 3 zeigt die Geschlechter- und Altersgruppenverteilung der Stichproben für die beiden Serien.

Tabelle 3. Geschlechter- und Altersgruppenverteilung der beiden Stichproben für die vergleichende Olfaktometrie.

	1. Serie			2. Serie		
	♂	♀	Σ	♂	♀	Σ
18-35 Jahre	11	12	23	10	11	21
≥ 45 Jahre	7	6	13	8	7	15
Σ	18	18	36	18	18	36

In beiden Experimenten war die Verteilung der Altersgruppen nicht gleichmäßig, da nicht genügend ältere Probanden rekrutiert werden konnten. Dennoch war je ein Drittel der VPn älter als 45 Jahre.

Der Altersbereich und das Durchschnittsalter der beiden Stichproben sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4. Durchschnittsalter und Altersbereich der beiden Altersgruppen für die Stichproben der beiden Serien.

	1. Serie			2. Serie		
	M	Min.	Max.	M	Min.	Max.
18-35 Jahre	27,9	20	35	28,2	21	36
≥ 45 Jahre	56,8	48	65	56,3	46	65

In beiden Serien war der Altersunterschied zwischen den Gruppen, wie beabsichtigt, signifikant.

### **ASP 1.1 - Herstellung der Gasbeutel/ Riechflaschen und chemische Analysen**

Vor jedem Versuchstag wurden die erforderlichen Gasbeutel und Riechflaschen, insgesamt 45 Behälter mit definierten Reizstoffkonzentrationen und mehrere Nullproben mit Luft bzw. Vergleichsflaschen mit dem verwendeten Lösemittel, von der ZE „Analytische Chemie“ des *IfADo* hergestellt. Der erforderliche Konzentrationsbereich der 15 Reizstoffkonzentrationen, der benötigt wurde, um sowohl Geruchs- als auch Reizeffekte auszulösen, war zuvor für jeden Reizstoff in Vorversuchen durch die ProjektmitarbeiterInnen ermittelt worden. Für die Riechflaschen der 1. Serie wurden alle Substanzen mit Wasser verdünnt, um die vorgesehenen 15 Konzentrationsstufen in den Kopfräumen der Riechflaschen zu erzeugen. Da die Substanzen der 2. Serie nicht oder nur schwer wasserlöslich sind, wurden sie in Polyethylenglykol (PEG 600) gelöst.

Die Vorbereitung der Gasbeutel war erheblich aufwändiger. Es wurde Ausgangsmaterial in unterschiedlichen Aggregatzuständen verwendet, um die Gasbeutel für die olfaktometrischen Versuche zu erzeugen. Dabei mussten die niedrigeren Konzentrationen (niedrige Beutelnummern) teilweise mit anderen Methoden angesetzt werden als die höheren Konzentrationen. Bei Dimethylsuccinat und 2-Ethylhexylacrylat war es sogar notwendig die hohen Konzentrationen am Tag vor dem jeweiligen Versuchstag anzusetzen, da sich das Gasgleichgewicht erst nach mehreren Stunden in den Beuteln einstellte. Abbildung 5 verdeutlicht einen Bearbeitungsschritt zur Herstellung der Gasbeutel. Auf dem „Rührgerät“ wurden die Gasbeutel kontinuierlich gedreht um die Gasgleichgewichtsherstellung zu optimieren und zu beschleunigen. Diese Prozedur musste teilweise am Tag vor dem eigentlichen Versuchstag begonnen werden (siehe Tabelle 5).

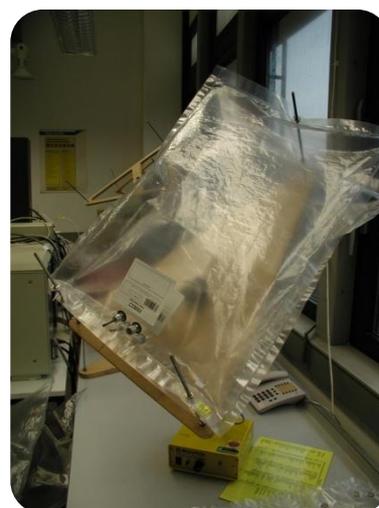


Abb. 5. "Rührgerät" zur Herstellung des Gasgleichgewichts in den Beutel.

Tabelle 5 gibt eine Übersicht über die Vorbereitungsschritte und -arbeiten bei der Herstellung der 15 Konzentrationsstufen in Gasbeuteln.

Tabelle 5. Notwendige Vorbereitungsarbeiten für die Herstellung der Versuchsanordnung zur Bestimmung von Geruchs- und Irritationsschwellen mit Hilfe von Gasbeuteln.

Substanz	Beutel-Nr.	Ausgangsmaterial	Beladung	Einstellung des Gleichgewichts	Zeitpunkt der Beutelzubereitung
2-Butanol	1 - 8	wässrige Lösung	flüssig	30 min	am Versuchstag
	9 - 15	reiner Stoff	flüssig	30 min	am Versuchstag
Acetaldehyd	1 - 15	Gas-Stammbeutel	gasförmig	15-20 min	am Versuchstag
Methylmethacrylat	1 - 8	wässrige Lösung	flüssig	30 min	am Versuchstag
	9 - 15	reiner Stoff	flüssig	30 min	am Versuchstag
Dimethylsuccinat	1 - 7	Gas-Stammbeutel	gasförmig	10 min	am Versuchstag
	8 - 15	reiner Stoff	flüssig	mehrere Std.	am Tag vorher
Pyrrolidin	1 - 15	wässrige Lösung	flüssig	30 min	am Versuchstag
2-Ethylhexylacrylat	1 - 13	Gas-Stammbeutel	gasförmig	10 min	am Versuchstag
	14 - 15	reiner Stoff	flüssig	mehrere Std.	am Tag vorher

Für die chemischen Analysen wurden von der ZE „Analytische Chemie“ des *IfADo* unterschiedliche Methoden eingesetzt, um die Konzentrationen in den Gasbeuteln und den Riechflaschen zu messen. Tabelle 6 gibt eine Übersicht über diese Methoden und die jeweiligen Konzentrationsbereiche, die mit diesen Verfahren gemessen werden mussten.

Tabelle 6. Konzentrationsbereiche und analytische Methoden zur Bestimmung der verwendeten Konzentrationen für die vergleichende Untersuchung von Riechflaschen und Gasbeuteln bei der Ermittlung der chemosensorischen Schwellen.

Substanz	Gasbeutel		Riechflaschen	
	Konzentrationsbereich	analytische Methode	Konzentrationsbereich	analytische Methode
2-Butanol	2 - 33000	PAD <sup>1</sup>	0,06 – 9400	GC-FID
Acetaldehyd	0,05 - 2200	PAD	0,22 – 2300	GC-FID
Methylmethacrylat	1 - 17000	PAD	1,5 – 35500	GC-FID
Dimethylsuccinat	0,06 - 700	GC-FID <sup>2</sup>	0,07 – 475	GC-FID
Pyrrolidin		GC-MS <sup>3</sup>		GC-MS
2-Ethylhexylacrylat	0,003 - 17	GC-FID	0,02 - 55	GC-FID

Anmerkungen. <sup>1</sup>Photoakustischer Detektor (Prinzip: Infrarotspektroskopie); <sup>2</sup>Gaschromatographie mit Flammenionisationsdetektor; <sup>3</sup>Gaschromatographie mit Massenspektrometrie

Die Ergebnisse der vorliegenden Messungen sind im Anhang aufgeführt.

## ASP 1.1 – Ergebnisse der Schwellenbestimmungen

Für beide Serien erfolgt die Ergebnisdarstellung getrennt für die Irritations- und Geruchsschwellen. Die statistischen Analysen basieren auf Varianzanalysen, wobei zur Veranschaulichung der Effekte die prozentualen Varianzanteile an der Gesamtvarianz dargestellt werden.

### 1. Serie: Irritationsschwellen

Die folgende Tabelle zeigt die Irritationsschwellen für 2-Butanol, Acetaldehyd und Methylmethacrylat, die mit der Riechflaschen- und Gasbeutelmethode bestimmt wurden.

Tabelle 7. Mediane und Interquartilsbereiche [jeweils in ppm] der Irritationsschwellen für die Reizstoffe der 1. Serie.

	Substanz	Median	IQR <sup>1</sup>	% Lat. <sup>2</sup>
	2-Butanol	1351	1549	77,8
<b>Flasche</b>	Acetaldehyd	682	806	41,7
	MMA	5278	11848	86,1
	2-Butanol	3460	3469	94,4
<b>Beutel</b>	Acetaldehyd	409	735	63,9
	MMA	4381	4278	77,8

Anmerkungen: <sup>1</sup> Interquartilsrange (Q75-Q25); <sup>2</sup> Anteil der VPn, die die Reizstoffe im Bereich bis zur dargebotenen Maximalkonzentration lateralisieren konnten.

Für alle drei Substanzen zeigen sich Unterschiede zwischen den beiden Methoden, die jedoch nicht systematisch zu höheren oder niedrigeren Irritationsschwellen bei dem einen oder anderen Verfahren führen. Auch die Variabilität (IQR) der Irritationsschwellen war nicht systematisch durch die Darbietungsform der Reizstoffproben beeinflusst. Der deutlichste Unterschied zwischen den beiden Verfahren findet sich bei 2-Butanol. Hier ist die Irritationsschwelle, die mit den Beuteln bestimmt wurde 2,6-mal höher als die Schwelle, die aus den Riechflaschen abgeleitet wurde. Beim Acetaldehyd zeigten die Verfahren nahezu vergleichbare Schwellen, wobei deutlich mehr VPn Acetaldehyd lateralisieren konnten, wenn die Substanz in Beuteln dargeboten wurde (64 vs. 42%). Für 2-Butanol fällt auf, dass bei fast 95% der Probanden mit der Beuteltechnik eine Lateralisierungsschwelle bestimmt werden konnte. Dabei wurden allerdings teilweise höhere Konzentrationen (Maximalkonzentration der Beutel: 11000 ppm) verwendet als bei Schwellenbestimmung mittels Riechflaschen (Maximalkonzentration der Flaschen: 9300 ppm). Ähnliche Ergebnisse ergaben sich auch für MMA.

Die statistischen Analysen basieren auf einem 2x2x2-faktoriellen Design mit dem Messwiederholungsfaktor „Darbietungsform“ (Flasche vs. Beutel) und den Zwischen-Subjekt-Faktoren Alter und Geschlecht (siehe Tabelle 3). Tabelle 8 zeigt die relativen Varianzanteile an der Gesamtvariation in den Daten, die durch diese Faktoren oder deren Wechselwirkung erklärt werden konnten. Darüberhinaus ist auch der Varianz-

anteil aufgeführt, der unabhängig von Alter und Geschlecht auf die Versuchspersonen zurückzuführen ist (interindividuelle Variation). Die letzte Zeile zeigt die nicht durch das Model erklärte Residualvarianz. Wenn, wie bei Acetaldehyd, nur in einem kleinen Teil der Stichprobe mit beiden Verfahren eine Lateralisierungsschwelle bestimmt werden konnte, wurden Interaktionen der Faktoren Alter und Geschlecht nicht im Model berücksichtigt.

Tabelle 8. Relative Anteile der Faktoren des varianzanalytischen Modells an der Gesamtvarianz der Irritationsschwellenmessungen.

Varianzquelle	Varianzanteile		
	2-Butanol	Acetaldehyd	MMA
Flasche vs. Beutel	21.4% **	19.0%	10.5% *
Geschlecht	1.1%	5.1%	1.8%
Alter	3.1%	3.2%	2.5%
Geschlecht × Alter	1.2%		3.1%
Flasche vs. Beutel × Alter	0.1%	0.1%	0.3%
Flasche vs. Beutel × Geschlecht	0.0%	0.5%	0.6%
Flasche vs. Beutel × Alter × Geschlecht	0.0%		4.7%
Person (VPn)	39.8%	23.3%	43.9%
Residualvarianz (Fehler)	33.2%	48.9%	32.6%
<b>Anzahl der VPn für die Analysen</b>	24	10	25

Anmerkungen: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$

Für 2-Butanol und MMA sind die Unterschiede zwischen „Flaschen“- und „Beutel“-Irritationsschwellen signifikant. Wie schon bei der Beschreibung der Ergebnisse in Tabelle 7 sichtbar wurde, ist dieser Unterschied für 2-Butanol besonders groß und entsprechend stark trägt dieser Faktor zur Varianzaufklärung bei. Beim MMA ist der Varianzanteil, der durch diesen Faktor erklärt wird, deutlich geringer. Aufgrund der geringen Anzahl von VPn, die Acetaldehyd in Flaschen **und** Beuteln lateralisieren konnten (n=10), war die 19%-ige Varianzaufklärung durch die Darbietungsform nicht signifikant. Der Varianzanteil, der durch interindividuelle Unterschiede erklärt wird (Person), liegt für 1-Butanol und MMA bei knapp einem Drittel, wobei die „Personenfaktoren“ Alter und Geschlecht geringfügig zur Varianzaufklärung beitragen. Die interindividuelle Variation kann also nicht mit diesen demographischen Faktoren reduziert werden.

Die Ergebnisse für Acetaldehyd sind durch die geringe Anzahl an VPn, für die Schwellenwerte vorlagen, nur eingeschränkt interpretierbar. Über 50% der Variation in den Daten sind auf interindividuelle Unterschiede zwischen den VPn zurückzuführen. Knapp 5% der Varianz werden durch das Geschlecht der VPn aufgeklärt und es zeigt sich, dass die vier Frauen niedrigere Geruchsschwellen aufweisen als die sechs Männer. Für diese niedrige Anzahl von Personen, die Acetaldehyd lateralisieren konnten, sind möglicherweise Substanzeigenschaften mitverantwortlich. In einer elektrophysiologischen Studie wurde für Acetaldehyd (800 ppm) eine Topographie der EEG-Signale berichtet, die eher einer rein olfaktorischen Stimulation entsprachen

(Hummel & Kobal, 1992). Betrachtet man die Maximalkonzentrationen der Beutel (1830 ppm) und Flaschen (2290 ppm), die zur Lateralisierung dargeboten wurde, so liegen diese nicht deutlich oberhalb dieser Konzentration und es erscheint fraglich, ob eine zur Lateralisierung notwendige trigeminale Stimulation bei allen Probanden erreicht werden konnte.

Die Rangkorrelationen zwischen den beiden Verfahren waren mit  $\rho=0,26$  (2-Butanol) und  $\rho=0,25$  (MMA) niedrig und nicht signifikant. Für Acetaldehyd war die Korrelation zwischen den Verfahren mit  $\rho=-0,34$  negativ. Diese negative Korrelation basiert nur auf Daten von 10 VPn und war statistisch nicht signifikant.

Im Vergleich zu einer anderen Untersuchung, die vergleichend zwei Methoden zur Bestimmung von Lateralisierungsschwellen untersucht hat (Smeets et al., 2007) und Korrelationen von  $\rho=-0,06$  bzw.  $-0,08$  berichtet, sind die positiven Korrelationen für 2-Butanol und MMA zumindest ein schwacher Hinweis, dass eine gewisse Übereinstimmung zwischen den beiden Verfahren besteht.

### 1. Serie: Geruchsschwellen

Analog zu den Irritationsschwellen sind die Ergebnisse der Geruchsschwellen in Tabelle 9 aufgeführt.

Tabelle 9. Mediane und Interquartilsbereiche der Geruchsschwellen [jeweils in ppm] für die Reizstoffe der 1. Serie.

	Substanz	Median	IQR <sup>1</sup>	n<1 <sup>2</sup>
	2-Butanol	1,24	1,94	4
<b>Flasche</b>	Acetaldehyd	0,44	0,61	4
	MMA	5,48	7,4	1
	2-Butanol	17,84	30,99	1
<b>Beutel</b>	Acetaldehyd	1,12	2,74	4
	MMA	6,11	7,26	3

Anmerkungen.<sup>1</sup>: Interquartilsrange (Q75-Q25); <sup>2</sup>: Anzahl der VPn, die auch die niedrigste Konzentrationsstufe (1) richtig erkennen konnten.

Für 2-Butanol zeigt sich wiederum ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Darbietungsformen. Wieder ist der Schwellenwert, der mit der „Beutel“-Technik gemessen wurde, deutlich höher als der Wert, der aus dem Flaschenversuch abgeleitet wurde. Darüberhinaus gab es bei der „Beutel“-Technik eine erhebliche Streuung der Schwellenwerte für 2-Butanol (siehe IQR). Für die beiden anderen Substanzen unterscheiden sich die Geruchsschwellen kaum voneinander. Wie bei den Lateralisierungsschwellen zeigen auch diese Ergebnisse keinen systematischen Einfluss der Darbietungsform auf die Geruchsschwellenmedian oder die Variation dieser Schwellenwerte. Es gab für alle Substanzen Personen, die auch die niedrigste Flaschen- bzw. Beutelkonzentration (siehe Anhang) sicher erkennen konnten. Dabei gab es allerdings keine überzufällige Häufung auf einzelne VPn. Nur eine der 36 VPn war in der Lage bei drei Geruchsschwellenbestimmungen immer die niedrigste Konzentration sicher zu benennen.

Die Ergebnisse der statistischen Prüfung der untersuchten Einflussfaktoren finden sich in Tabelle 10.

Tabelle 10. Relative Anteile der Faktoren des varianzanalytischen Modells an der Gesamtvarianz der Geruchsschwellenmessungen (1. Serie).

Varianzquelle	Varianzanteile		
	2-Butanol	Acetaldehyd	MMA
Flasche vs. Beutel	8.2%*	4.3%	0.0%
Geschlecht	1.1%	2.3%	4.5%
Alter	1.9%	0.1%	6.0%*
Geschlecht × Alter	0.9%	0.7%	5.7%*
Flasche vs. Beutel × Alter	1.5%	0.0%	3.0%
Flasche vs. Beutel × Geschlecht	1.1%	2.3%	0.0%
Flasche vs. Beutel × Alter × Geschlecht	1.1%	0.4%	4.0%
Person	44.0%	45.0%	40.6%
Residualvarianz (Fehler)	40.0%	45.0%	36.1%

Anmerkungen: \*  $p \leq 0,05$

Der deutliche Unterschied der Geruchsschwellen für 2-Butanol ist in einer signifikanten Varianzaufklärung von gut 8% beim Vergleich der beiden Verfahren (Flasche vs. Beutel) reflektiert. Für diesen Reizstoff und auch für Acetaldehyd klären die anderen Faktoren oder deren Interaktionen kaum zusätzliche Varianz auf. Einzig bei MMA, wo es fast keinen Unterschied zwischen den Geruchsschwellen der beiden Verfahren gab, tragen Alter und Geschlecht in geringen Umfang - aber signifikant - zur Varianzaufklärung bei. Die Geruchsschwelle der älteren VPn war mit durchschnittlich 9 ppm höher als die Schwelle der jüngeren Probanden (ca. 6 ppm). Die signifikante Interaktion zwischen Alter und Geschlecht verdeutlicht, dass vor allem die älteren Frauen höhere Geruchsschwellen für MMA aufwiesen. Durch diesen signifikanten Beitrag zur Varianzaufklärung ist die Personen- und Residualvarianz bei MMA niedriger als bei den anderen beiden Reizstoffen. Interindividuelle Unterschiede, reflektiert durch den Faktor Person, erklären bei den Geruchsschwellen von 2-Butanol und Acetaldehyd deutlich über 40% der Varianz.

Im Gegensatz zu den Irritationsschwellen gibt es bei den Geruchsschwellen eine gute Übereinstimmung zwischen den Verfahren. Die Rangkorrelationen zwischen den beiden Verfahren waren mit  $\rho=0,36$  (2-Butanol),  $\rho=0,33$  (Acetaldehyd) und  $\rho=0,36$  (MMA) relativ niedrig, aber alle Korrelationen sind statistisch signifikant. Die Übereinstimmung der beiden Verfahren liegt etwas unterhalb der Test-Retest-Reliabilitäten von  $r=0,45$ , die wir in der ersten Förderphase für die Flaschentechnik ermitteln konnten (van Thriel et al., 2006).

## 2. Serie: Irritationsschwellen

Für die Reizstoffe der 2. Serie können zum jetzigen Zeitpunkt nur für Dimethylsuccinat und 2-Ethylhexylacrylat Ergebnisse berichtet werden. Die chemischen Analysen der Flaschen und Beutel für die Schwellenbestimmungen von Pyrrolidin konnten zum jetzigen Zeitpunkt nicht abgeschlossen werden. In Tabelle 11 sind die deskriptiven Angaben für die beiden verbleibenden Substanzen aufgeführt.

Tabelle 11. Mediane und Interquartilsbereiche [jeweils in ppm] der Irritationsschwellen für die Reizstoffe der 2. Serie.

	Substanz	Median	IQR <sup>1</sup>	% Lat. <sup>2</sup>
Flasche	Dimethylsuccinat	287	147	69%
	2-Ethylhexylacrylat	13	15	61%
Beutel	Dimethylsuccinat	118	106	47%
	2-Ethylhexylacrylat	3	11	44%

Anmerkungen: <sup>1</sup> Interquartilsrange (Q75-Q25); <sup>2</sup> Anteil der VPn, die die Reizstoffe im Bereich bis zur dargebotenen Maximalkonzentration lateralisieren konnten.

Für beide Substanzen gilt, dass Irritationsschwellen, die mit der „Beutel“-Technik bestimmt wurden, niedriger waren als die Werte, die aus der „Flaschen“-Technik abgeleitet wurden. Allerdings basieren diese Schwellen auf einer kleineren Stichprobe, da nur knapp die Hälfte der VPn die beiden Substanzen in den Beuteln bis zur dargebotenen Maximalkonzentration lateralisieren konnten. Dabei muss berücksichtigt werden, dass auch diese Maximalkonzentrationen zwischen den beiden Verfahren für beide Substanzen deutlich unterschiedlich waren (siehe Anhang). In den Beuteln wurden insgesamt deutlich niedrigere Konzentrationen angeboten, was sowohl die unterschiedlichen Mediane der Irritationsschwellen, als auch den unterschiedlichen Anteil an VPn, die lateralisieren konnten, mit erklären kann. Die statistische Analyse der Schwellenwerte ist in Tabelle 12 aufgeführt.

Tabelle 12. Relative Anteile der Faktoren des varianzanalytischen Modells an der Gesamtvarianz der Irritationsschwellenmessungen (2. Serie).

Varianzquelle	Varianzanteile	
	Dimethylsuccinat	2-Ethylhexylacrylat
Flasche vs. Beutel	48.3%**	15.2%**
Geschlecht	0.1%	1.0%
Alter	3.0%	17.7%
Flasche vs. Beutel × Alter	0.6%	17.6%**
Flasche vs. Beutel × Geschlecht	0.0%	0.3%
Person	32.0%	47.2%
Residualvarianz (Fehler)	15.9%	1.1%
<b>Anzahl der VPn für die Analysen</b>	13	10

Anmerkungen: \* p≤0,05; \*\* p≤0,01

Die Analysen verdeutlichen, dass die Unterschiede zwischen den Verfahren statistisch hoch signifikant sind und für Dimethylsuccinat fast 50% der Varianz durch diesen Faktor erklärt wird. Für 2-Ethylhexylacrylat verdeutlichen diese Analysen, dass die beiden Verfahren in den beiden Altersgruppen zu unterschiedlichen Ergebnissen führten. Abbildung 6 zeigt die Schwellenwerte der beiden Altersgruppen getrennt nach den beiden Darbietungsformen.

Bei der „Flaschen“-Technik hatten die älteren VPn deutlich höhere Irritationsschwellen als die jüngeren VPn. In der „Beutel“-Technik zeigte sich dieser Unterschied nicht. Es muss jedoch auch hier berücksichtigt werden, dass dieser Effekt nur auf einer kleinen Stichprobe beruht.

Die Rangkorrelationen zwischen den beiden Verfahren waren mit  $\rho=0,33$  (Dimethylsuccinat), und  $\rho=0,61$  (2-Ethylhexylacrylat) deutlich höher als in der ersten Serie, aber auch für diese Substanzen waren die Korrelationen nicht signifikant. Eine generelle Übereinstimmung zwischen den Verfahren kann aus diesen Korrelationen dennoch abgeleitet werden.

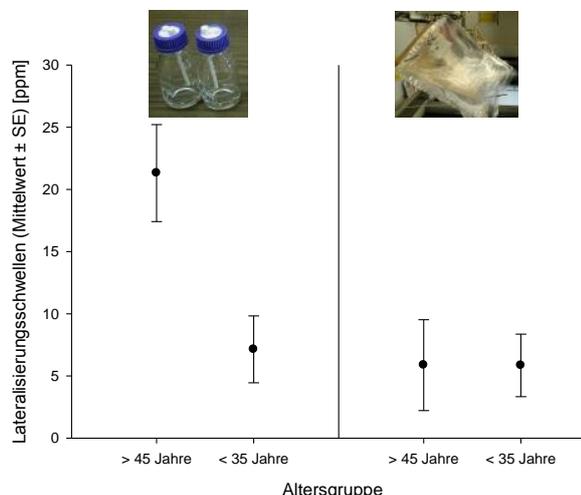


Abb. 6. Mittelwerte und Standardfehler der Irritationsschwellen für 2-Ethylhexylacrylat, getrennt nach Altersgruppen und Darbietungsform.

## 2. Serie: Geruchsschwellen

Analog zu den Irritationsschwellen sind die Ergebnisse der Geruchsschwellen in Tabelle 13 aufgeführt.

Tabelle 13. Mediane und Interquartilsbereiche der Geruchsschwellen [jeweils in ppm] für die Reizstoffe der 2. Serie.

	Substanz	Median	IQR <sup>1</sup>	N<1 <sup>2</sup>
Flasche	Dimethylsuccinat	0.80	1.51	9
	2-Ethylhexylacrylat	0.13	0.12	7
Beutel	Dimethylsuccinat	0.16	0.42	15
	2-Ethylhexylacrylat	0.02	0.04	3

Anmerkungen.<sup>1</sup> Interquartilsrange (Q75-Q25); <sup>2</sup> Anzahl der VPn, die auch die niedrigste Konzentrationsstufe (1) richtig erkennen konnten.

Die deskriptiven Statistiken der Geruchsschwellen ähneln prinzipiell den Ergebnissen der Irritationsschwellen (Tabelle 11). Die Schwellen, die aus dem „Beutel“-Verfahren abgeleitet wurden, sind niedriger als die Daten, die mit Hilfe der „Flaschen“-Technik generiert wurden. Auch die Streuung der Daten zeigt dieses Muster. Für beide Substanzen und beide Verfahren war ein großer Anteil der VPn in der Lage auch die niedrigste Konzentrationsstufe sicher zu erkennen. Wurde Dimethylsuccinat im Beutel präsentiert, so waren 42% der VPn in der Lage auch 0,04 ppm zu riechen. Die statistischen Analysen in Tabelle 14 verdeutlichen allerdings, dass der Unterschied

zwischen den beiden Verfahren nicht signifikant ist und nur sehr geringe Varianzanteile durch diese methodische Variation der Schwellenbestimmung erklärt werden konnten.

Tabelle 14. Relative Anteile der Faktoren des varianzanalytischen Modells an der Gesamtvarianz der Geruchsschwellenmessungen (2. Serie).

Varianzquelle	Varianzanteile	
	Dimethylsuccinat	2-Ethylhexylacrylat
Flasche vs. Beutel	1.1%	2.4%
Geschlecht	0.4%	0.0%
Alter	1.1%	0.5%
Geschlecht × Alter	0.4%	0.9%
Flasche vs. Beutel × Alter	0.2%	0.8%
Flasche vs. Beutel × Geschlecht	3.3%	1.6%
Flasche vs. Beutel × Alter × Geschlecht	1.4%	0.1%
Person	45.8%	44.1%
Residualvarianz (Fehler)	46.2%	49.6%

Anmerkungen: \* p≤0,05; \*\* p≤0,01

Auch die anderen Faktoren des Modells erklären nur geringe Anteile an der Gesamtvarianz. Mehr als 40% der Varianz in den Daten ist auf interindividuelle Unterschiede zurückzuführen und kann mit einer Vielzahl von Faktoren verknüpft sein, die im bisherigen Modell nicht berücksichtigt wurden.

Die Rangkorrelationen zwischen den beiden Verfahren sind mit  $\rho = -0,15$  (Dimethylsuccinat) und  $\rho = 0,09$  (2-Ethylhexylacrylat) nahe null und verdeutlichen keine Übereinstimmungen zwischen den Geruchsschwellen, die mit den beiden Verfahren ermittelt wurden.

### **ASP 1.1 – Parametrisierung der Schwellenmessungen**

Bisher wurden in der Literatur keine Untersuchungen beschrieben, die Geruchs- und Irritationsschwellen mit rein gasförmigen Proben aus „Beuteln“ ermittelt haben. Das eingesetzte Verfahren stellt eine völlige Neuentwicklung dar. Daher müssen die vorliegenden Ergebnisse aus den Versuchen mit Beuteltechnik sowohl für sich allein als auch im Vergleich mit den Ergebnissen aus einem etablierten Verfahren - in diesem Fall dem Flaschenverfahren - beurteilt werden.

Es wurden zu diesem Zweck aus den individuellen Testverläufen der Probanden in beiden Verfahren Kennwerte extrahiert, die Informationen zu den Punkten

- Sicherheit / Unsicherheit des einzelnen Ergebnisses,
- Länge der einzelnen Testdurchführung und
- Effizienz des gesamten Testverfahrens

liefern.

Hier sollen die Ergebnisse aus der Auswertung der Variablen "Anteil der sicheren Erkennungen in einem Testverlauf", "Bereichsbreite der Punkte zur Schwellenberechnung" und "Anzahl der individuell benötigten Darbietungen zur Schwellenbestimmung" vorgestellt werden.

Bei der Bestimmung der individuellen Schwellen der Probanden wird ein adaptives Approximationsverfahren, d.h. ein Verfahren, welches das Antwortverhalten des Probanden aktiv aufgreift, eingesetzt. Dadurch ergeben sich immer unterschiedliche Versuchsverläufe mit individueller Länge und andersartigen Charakteristika, bis das Abbruchkriterium des Verfahrens (5 Umkehrpunkte plus einer zusätzlichen Anforderung zur Sicherheit der Erkennung) erfüllt ist (vgl. Abb. 3).

Als "sichere Erkennung" wird bei der Geruchsschwelenermittlung eine Folge von vier direkt aufeinanderfolgenden richtigen Erkennungen einer Konzentrationsstufe angesehen. Bei der Irritationsschwellenbestimmung reduziert sich diese Zahl - bedingt durch den höheren Schwierigkeitsgrad der Aufgabe - auf drei richtige Erkennungen. Die Rolle des Anteils der sicheren Erkennungen ist damit unmittelbar einsichtig bei der Beurteilung eines individuellen Testverlaufs.

Die "Bereichsbreite der Punkte zur Schwellenberechnung" bezeichnet den Bereich von Konzentrationen, die zur individuellen Schwellenbestimmung verwendet werden. Dies sind die letzten vier Umkehrpunkte, die in einem Testverlauf eines Probanden beobachtet werden (vgl. Beschreibung der 2-AFC - Prozedur). Bei dieser Bereichsbreite ist es wünschenswert, dass sie möglichst klein ist. Im Idealfall hat sie - verfahrensbedingt - den Wert 2.

Die "Anzahl der benötigten Darbietungen zur Ermittlung der individuellen Schwelle" sollte idealerweise in einem mittleren Bereich liegen. Ist sie deutlich zu groß oder extrem klein, deutet dies auf einen schlecht gewählten Startpunkt der Approximation oder im anderen Fall auf einen hohen Zufallsanteil im betrachteten Verlauf hin.

Die Ergebnisse bezüglich der ausgewerteten Variablen werden im Folgenden getrennt für die Irritations- und Geruchsschwellenbestimmungen dargestellt. Boxplots geben dabei einen Überblick über die Daten und ermöglichen erste Vergleiche. Dazu werden jeweils die signifikanten Ergebnisse aus Varianzanalysen angegeben, die die beiden Darbietungsformen pro Stoff und Schwellenbestimmung miteinander vergleichen.

### ***Irritationsschwellen (beide Serien)***

Die folgenden Abbildungen enthalten die Boxplots, die sich bei der Auswertung der individuellen Verläufe bei der Bestimmung der Irritationsschwellen der 6 untersuchten Stoffe ergeben. Dabei werden die Grenzen der Box gebildet aus dem 25%- und dem 75%-Perzentil der Daten. Der Strich innerhalb der Box bezeichnet den Median und der quadratische Punkt das arithmetische Mittel. Die Enden der Striche, die von den Boxen ausgehen, bezeichnen das 10%- und das 90%-Perzentil und die einzelnen Punkte, die außerhalb dieses Bereichs eingezeichnet sind, die Datenpunkte, die au-

ßerhalb dieses Bereichs liegen. Abbildung 7 zeigt die Daten für den Parameter „Anteil sichere Erkennungen“.

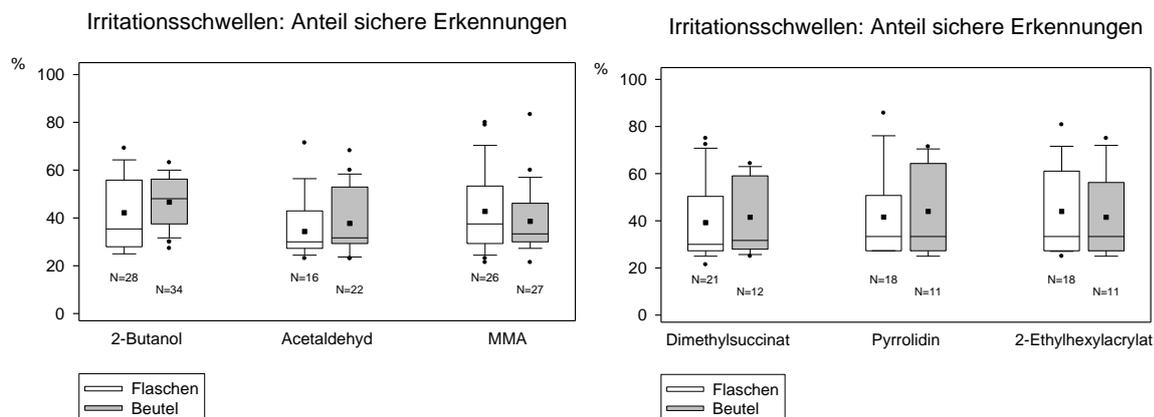


Abb. 7. Anteil der sicheren Erkennungen in den individuellen Irritationsschwellen-Testabläufen, links: Stoffe der Serie 1, rechts: Stoffe der Serie 2. Die Zahlen geben die zugrundeliegenden Anzahlen von individuellen Verläufen an.

Bei diesem Parameter bewegen sich die Mittelwerte zwischen 36,5% (Acetaldehyd, Flaschen) und 46,6 % (2-Butanol, Beutel), die Standardabweichungen nehmen Werte von 10,3% (2-Butanol, Beutel) bis 18,7% (2-Ethylhexylacrylat, Flaschen) an. Es zeigt sich, dass für beide Verfahren das dreimalige, richtige Zuordnen der Probe zum „gereizten“ Nasenloch (Sicherheitswahrscheinlichkeit von 87,5%) und somit der Wechsel auf eine niedriger Konzentrationsstufe im Durchschnitt weniger als die Hälfte eines Messverlaufes einer Versuchsperson ausmacht. Mehr als 50% des individuellen Ablaufs bei einer Versuchsperson besteht aus weniger „sicheren“ Anteilen.

Abbildung 8 zeigte die Daten des zweiten Parameters, der den individuellen Approximationsprozess beschreibt.

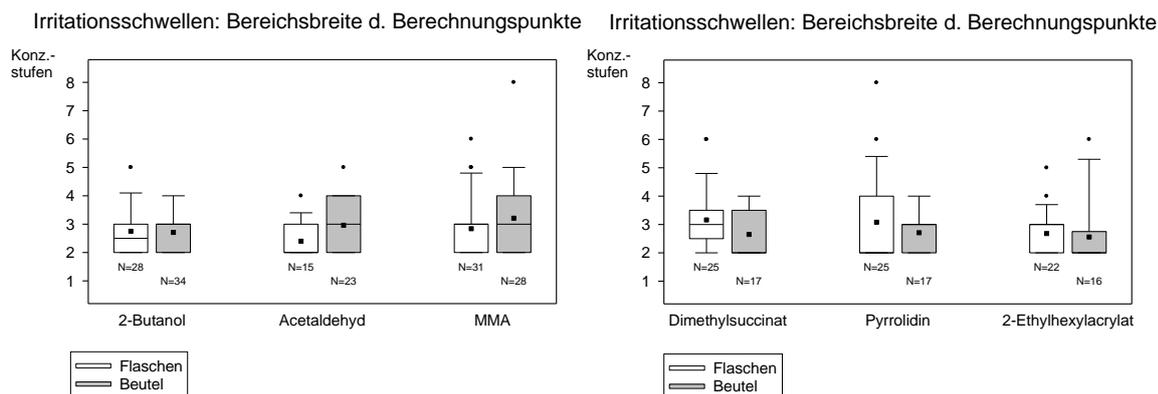


Abb. 8. Bereichsbreite der Umkehrpunkte, die in die Berechnung der individuellen Irritationsschwellen eingegangen sind, links: Stoffe der Serie 1, rechts: Stoffe der Serie 2. Die Zahlen geben die zugrundeliegenden Anzahlen von individuellen Verläufen an.

Die Mittelwerte befinden sich im Bereich von 2,4 (Acetaldehyd, Flaschen) bis 3,2 (MMA, Beutel), die Standardabweichungen nehmen Werte von 0,6 (Acetaldehyd, Flaschen) bis 1,6 (Pyrrolidin, Flaschen) an. Die Werte liegen damit recht nahe am Idealwert von 2.

Die Daten zur Anzahl der Darbietungen, die benötigt wurden, bis die fünf Umkehrpunkte erreicht wurden, sind in Abbildung 9 dargestellt.

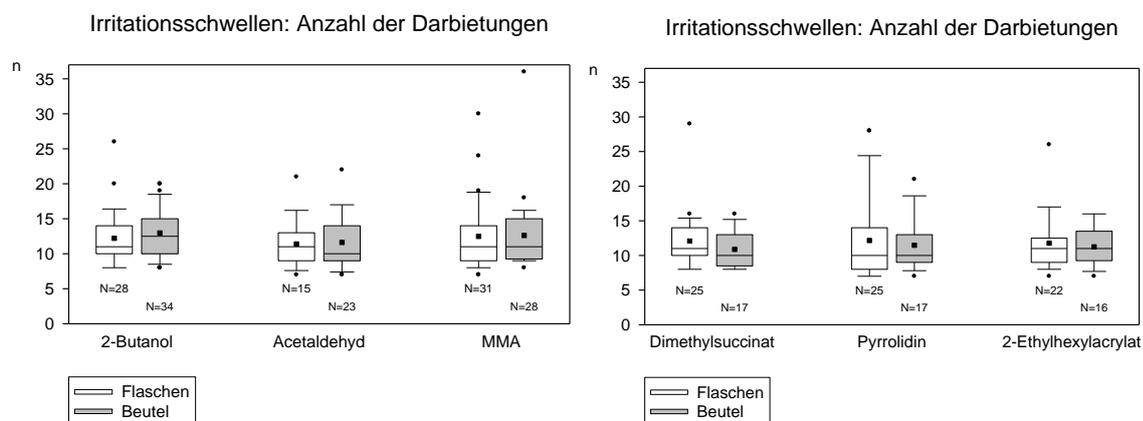


Abb. 9: Anzahl der Darbietungen, die in die Berechnung der individuellen Irritationsschwellen eingegangen sind, links: Stoffe der Serie 1, rechts: Stoffe der Serie 2. Die Zahlen geben die zugrundeliegenden Anzahlen von individuellen Verläufen an.

Die Mittelwerte liegen für diese Kenngröße im Bereich von 10,9 (Dimethylsuccinat, Beutel) bis 13,0 (2-Butanol, Beutel) und die Standardabweichungen nehmen Werte von 2,7 (Dimethylsuccinat, Beutel) bis 6,1 (Pyrrolidin, Flaschen) an.

Beutel- und Flaschenverfahren zeigen keine deutlich unterschiedlichen Resultate bei den betrachteten Variablen. Die Boxplots überlappen sich immer sehr ausgeprägt und haben oftmals eine ähnliche Gestalt. Es ist auf Grundlage der Boxplots bei den sechs untersuchten Substanzen keine Systematik in den Daten zu erkennen, die eine generelle Bevorzugung einer bestimmten Darbietungsform bei der Ermittlung der Irritationsschwellen nahelegt.

Bei den Varianzanalysen ergaben sich bei der Bestimmung der Irritationsschwellen signifikante Unterschiede zwischen den Kennwerten der beiden Methoden bei den Stoffen Acetaldehyd (Anteil sichere Erkennungen,  $F_{(1,12)}=5,2$ ;  $p=0,042$ ) und 2-Ethylhexylacrylat (Bereichsbreite der Berechnungspunkte,  $F_{(1,9)}=6,0$ ;  $p=0,037$  und Anzahl der Darbietungen,  $F_{(1,9)}=6,517$ ;  $p=0,031$ ). Nach einer p-Wert-Korrektur aufgrund multipler Tests ist jedoch für keine der drei Differenzen mehr die Signifikanz auf dem 5%-Niveau abgesichert, so dass diese Ergebnisse nur als Hinweise auf mögliche Differenzen zu sehen sind.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Kennwerte der "neuen" Beutel-Methode bei der Ermittlung der Irritationsschwellen bei den sechs bisher untersuchten Stoffen vergleichbar sind zu denen aus der etablierten Flaschenmethode.

### Geruchsschwellen (beide Serien)

Die folgenden Abbildungen enthalten - analog zu denen im vorangegangenen Abschnitt - die Boxplots, die sich bei der Auswertung der individuellen Verläufe bei der Bestimmung der Geruchsschwellen der sechs untersuchten Stoffe ergeben. Dabei sind zusammengehörige Abbildungen gleich skaliert, um direkte Vergleiche zwischen den Kennwerten aus der Bestimmung der Geruchsschwellen und denen der Irritati-

onsschwellen zu ermöglichen. Abbildung 10 zeigt den prozentualen Anteil der sicheren Erkennungen (viermal richtig, d.h. Sicherheitswahrscheinlichkeit von 93,8%) für die Geruchsschwellenbestimmungen mit Beuteln und Flaschen.

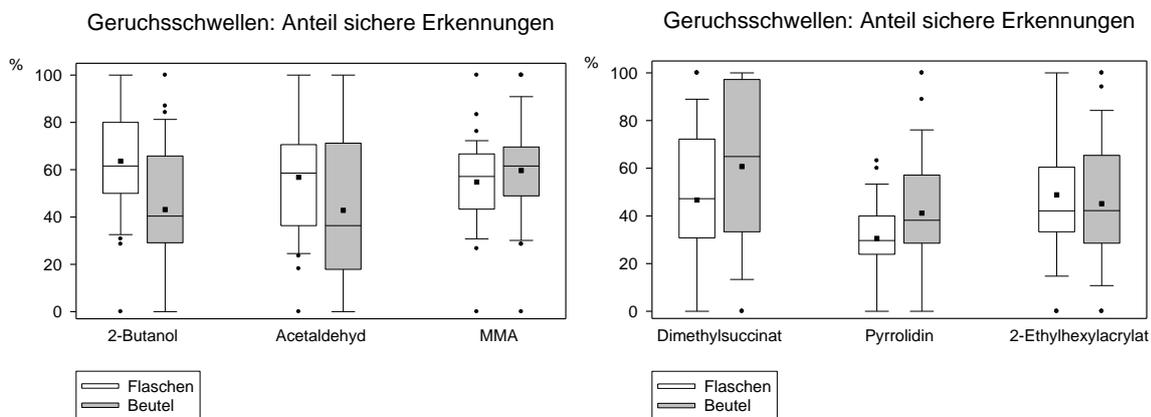


Abb. 10. Anteil der sicheren Erkennungen in den individuellen Geruchsschwellen-Testabläufen, links: Stoffe der Serie 1, rechts: Stoffe der Serie 2.

Die Mittelwerte für den Anteil der sicheren Erkennungen liegen im Bereich von 30,5% (Pyrrolidin, Flaschen) bis 63,6% (2-Butanol, Flaschen), die Standardabweichungen haben Werte von 15,8% (Pyrrolidin, Flaschen) bis 33,9% (Acetaldehyd, Beutel). In der 1. Serie (links) liegen vier Mittelwerte oberhalb 50%. Werden die Geruchsschwellen für 2-Butanol oder Acetaldehyd mit der „Beutel“-Technik bestimmt, so liegen diese Werte unter 50%. Die Stoffe der 2. Serien liegen mit Ausnahme von Dimethylsuccinat (Beutel) knapp unter 50% im Anteil sicherer Erkennungen.

Abbildung 11 verdeutlicht die Bereichsbreite der Umkehrpunkte für die Geruchsschwellenbestimmungen mit den beiden Verfahren.

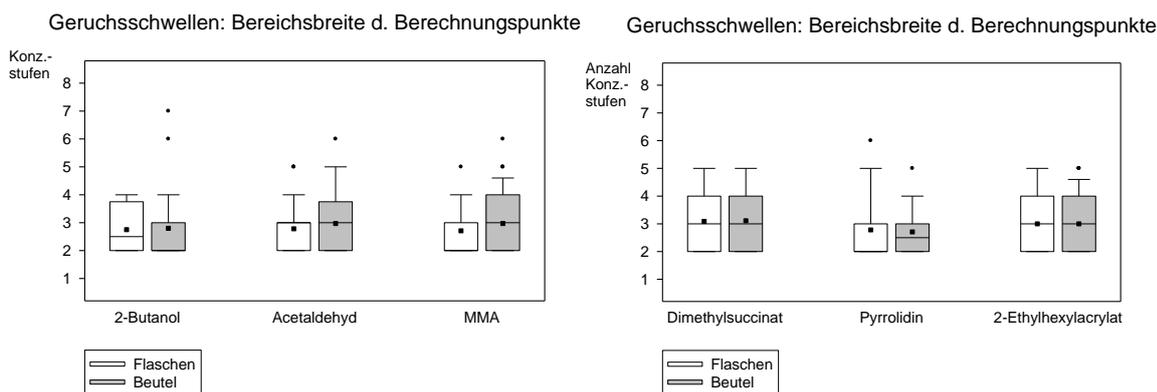


Abb. 11. Bereichsbreite der Umkehrpunkte, die in die Berechnung der individuellen Geruchsschwellen eingegangen sind, links: Stoffe der Serie 1, rechts: Stoffe der Serie 2.

Die Mittelwerte der Bereichsbreiten bewegen sich von 2,7 (MMA, Flaschen und Pyrrolidin, Beutel) bis 3,1 (Dimethylsuccinat, Beutel), die Standardabweichungen von 0,8 (2-Butanol, Flaschen und Pyrrolidin, Beutel) bis 1,2 (Dimethylsuccinat, Beutel). Hier zeigen sich kaum nennenswerte Unterschiede zwischen den Substanzen und Verfahren.

Die Daten zur Anzahl der benötigten Darbietungen bis zum Erreichen der fünf Umkehrpunkte, sind in Abbildung 12 dargestellt.

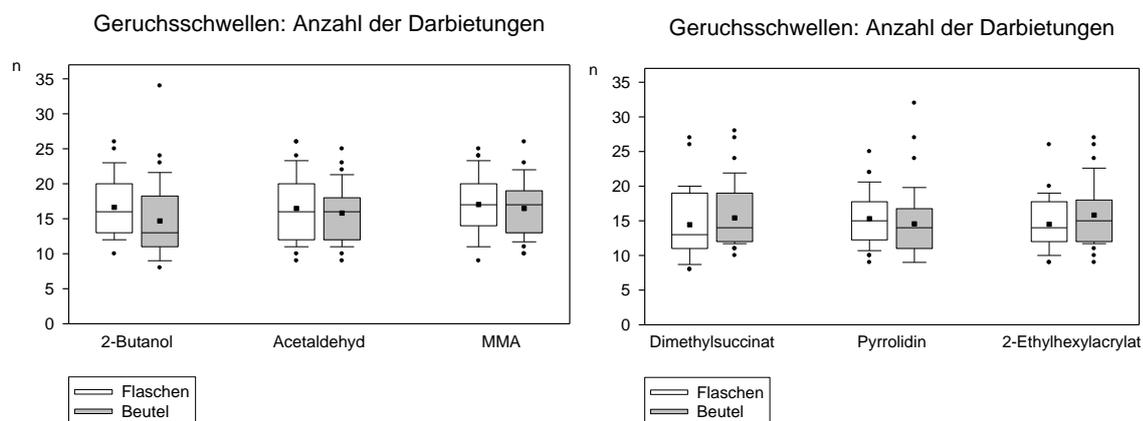


Abb. 12. Anzahl der Darbietungen, die in die Berechnung der individuellen Geruchsschwellen eingegangen sind, links: Stoffe der Serie 1, rechts: Stoffe der Serie 2.

Die Darbietungszahlen haben im Mittel Werte von 14,4 (Dimethylsuccinat, Flasche) bis 17,0 (MMA, Flasche), die Standardabweichungen Werte von 3,7 (Pyrrolidin, Flasche) bis 5,2 (2-Butanol, Beutel). Auch hier zeigen sich kaum nennenswerte Unterschiede zwischen den Substanzen und Verfahren.

Auch die Kennwerte der Geruchsschwellentests mit Beutel- und Flaschenverfahren zeigen keine voneinander abgegrenzten Resultate. Die Boxplots überlappen sich auch hier in allen Fällen weiträumig und haben oftmals eine ähnliche Gestalt. Allerdings sind bei den Anteilen der sicheren Erkennungen Unterschiede in der Lage und der Streuung bei einzelnen Substanzen erkennbar. Weiterhin werden Unterschiede zwischen den Verläufen von Irritations- und Geruchsschwellenbestimmungen deutlich. Die Verteilungen der Anteile der sicheren Erkennungen sind für die Geruchsschwellen-Verläufe tendenziell weiter gespreizt. Sie liegen in ihrer zentralen Tendenz etwas höher und erreichen für einzelne Personen den Wert 100% (VPn, die auch die niedrigste Konzentrationsstufe (1) richtig erkennen konnten). Dazu liegt die Anzahl der Darbietungen bei der Geruchsschwellenermittlung generell etwas höher - ein Resultat, das mit der hier möglichen und verwendeten schärferen Definition von "sicherer Erkennung" zusammenhängt (vier statt drei richtige Erkennungen in Folge, vgl. Erklärung der verwendeten 2-AFC -Prozedur). Zusammenfassend ist auch hier auf Grundlage der Boxplots bei den 6 untersuchten Substanzen keine Systematik zu erkennen, die eine generelle Bevorzugung einer bestimmten Darbietungsform bei der Ermittlung der Geruchsschwelle nahelegt.

Wie schon in den Boxplots deutlich wurde, ergaben die Varianzanalysen für die Geruchsschwellen nur signifikante Unterschiede für den Parameter „Anteil sichere Erkennungen“. Zwischen den Kennwerten der beiden Methoden bestanden signifikante Unterschiede bei den Stoffen 2-Butanol ( $F_{(1,35)}=16,562$ ;  $p=0,000$ ), Acetaldehyd ( $F_{(1,35)}=4,651$   $p=0,038$ ) und Pyrrolidin ( $F_{(1,35)}=4,451$ ,  $p=0,042$ ). Nach einer p-Wert-Korrektur aufgrund multipler Tests bleibt die erste dieser 3 Differenzen auf dem 5%-Niveau abgesichert. Bei den 18 durchgeführten Vergleichen für die Analysen der Ge-

ruchsschwellen-Kennwerten entspricht dies dem zu erwartenden Anteil beim Testniveau von 5%, so dass auch die Ergebnisse im Geruchsschwellenbereich nur als leichte Hinweise auf mögliche Differenzen zu sehen sind.

Damit kann auch hier - analog zu den Ergebnissen bei den Irritationsschwellen - festgestellt werden, dass die Kennwerte der "neuen" Beutel-Methode zur Ermittlung der Irritationsschwellen bei den 6 bisher untersuchten Stoffen vergleichbar sind zu denen aus der etablierten Flaschenmethode.

### **ASP 1.1 – Zusammenfassung der Ergebnisse**

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass die Messung von Geruchs- und Irritationsschwellen prinzipiell mit beiden Verfahren möglich ist. Bisher wurde in der wissenschaftlichen Literatur die ‚2-AFC modified up-down staircase procedure‘ nicht mit der Reizstoffpräsentation aus Gasbeuteln kombiniert. Unsere Ergebnisse verdeutlichen, dass diese Kombination durchaus geeignet ist chemosensorische Schwellen abzuleiten, die die gleichen Qualitätskriterien aufweisen wie die weit verbreitete „Riechflaschentechnik“. Für einzelne Substanzen (z.B. 2-Butanol, Dimethylsuccinat) wurden erhebliche Unterschiede bei der Ableitung chemosensorischer Schwellen aus den beiden untersuchten Verfahren deutlich. Die Ursachen für diese Unterschiede liegen zum einen in den verschiedenen Konzentrationen, die tatsächlich auf den einzelnen Konzentrationsstufen präsentiert wurden (siehe Anhang), zum anderen gelten die dargestellten Unterschiede meist für einzelne Reizstoffe. So liegt die Schlussfolgerung nahe, dass auch physikalisch-chemische Eigenschaften der Reizstoffe (z. B. Siedepunkt, Relativität, etc.) für diese Differenzen mitverantwortlich sind.

Beim „Niedrigsieder“ Acetaldehyd konnte der Anteil der Personen, die bis zur dargebotenen Maximalkonzentration sicher lateralisieren konnten, erhöht werden, obwohl in den Beutel niedrigere Konzentrationen zur Bewertung präsentiert wurden (siehe Anhang). Für diese Einzelsubstanz oder die Substanzklasse der „Niedrigsieder“ sind die Gasbeutel möglicherweise besser geeignet, um stabile Reizstoffprobe zum Paarvergleich intranasal zu applizieren. Für Ammoniak, einen sehr flüchtigen Reizstoff der ersten Projektphase (van Thriel et al., 2006), bei dem erhebliche methodische Schwierigkeiten mit den Riechflaschen auftraten, wäre die „Beutel“-Technik in Kombination mit der ‚2-AFC modified up-down staircase procedure‘ eine denkbare Alternative zur Bestimmung von Geruchs- und Reizschwellen.

Für die „Hochsieder“ (z. B. Dimethylsuccinat, 2-Ethylhexylacrylat) ist die Vorbereitung der Beutel mit erheblichem Aufwand verbunden (siehe Tabelle 5). Eine substantielle Verbesserung der Ergebnisse konnte durch diese Mehrarbeit nicht erzielt werden. Für beide Substanzen waren die Irritationsschwellen, die mit den Beuteln gemessen wurden, niedriger als die Werte, die aus den Riechflaschen abgeleitet wurden. Im Gegensatz zu Acetaldehyd erhöhte sich aber durch die „Beutel“-Technik der Anteil der Personen, für die überhaupt eine Reizschwelle bestimmt werden konnte, nicht.

Systematische Unterschiede, die eine eindeutige Empfehlung für das eine oder andere Verfahren rechtfertigen würden, ergaben sich aus den präsentierten Daten nicht. Bei der Etablierung eines Screeningverfahrens sollte auf eine ausgewogene Kosten-Nutzen Kalkulation geachtet werden. Dem enormen Aufwand bei der Herstellung der Beutel steht nach den Ergebnissen des ASP 1.1 kein entsprechender Nutzen im Sinne der angestrebten Optimierung gegenüber. Sollten nicht entsprechende Substanzcharakteristika (siehe „Niedrigsieder“) eine Nutzung der Riechflaschen einschränken, sollte unter ökonomischen Gesichtspunkten die Bestimmung chemosensorischer Schwellen mit der „Flaschen“-Technik erfolgen. Dabei ist eine exakte, chemisch-analytische Bestimmung der Kopfraumkonzentrationen von herausragender Bedeutung. Nur mit exakten Messwerten und hohen Standards in der Analytik können gesicherte Ableitungen aus den psychophysischen Schwellenbestimmungen gemacht werden. Die Daten und Erkenntnisse dieses Arbeitsschwerpunkts sollten bereits bei der Planung weiterer Substanzscreening berücksichtigt werden, damit Aussagen zu Konzentrationsbereichen möglich sind, in denen mit (a) Geruchs- und (b) mit Reizeffekten zu rechnen ist.

### **Ausblick auf die ASP's 1.2 und 1.3**

Zum ASP 1.2 Olfaktometrie „Erweiterung“ wurden erste Vorarbeiten abgeschlossen. Dabei wurde die Möglichkeit geprüft, physiologische Veränderungen an der nasalen Schleimhaut mit der optischen Rhinometrie zu messen. Von der Firma RHINOS wurde der Projektgruppe das RHINOLUX-System leihweise zur Verfügung gestellt, mit dem die Blutvolumenzunahme während eines Schwellungsprozesses kontinuierlich beobachtet werden kann. Mit dieser optischen Messvorrichtung wird das Nasengewebe mit Infrarotlicht durchstrahlt. Das Infrarotlicht durchdringt die Gewebestrukturen des Nasenraumes, insbesondere die untere und die mittlere Nasenmuschel, und wird dort am Blutfarbstoff Hämoglobin absorbiert. Die Absorptionsstärke ist dabei proportional zum Blutvolumen und damit auch zum Ausmaß der Schwellung der endonasalen Schleimhäute. Das Verfahren wird vor allem in der Allergologie eingesetzt, doch auch Reizwirkungen sollten ähnliche Effekte zeigen.

In Vorversuchen am Flow-Olfaktometer konnte bei nasaler Inhalation von Acetaldehyd auch oberhalb der gemessenen Irritationsschwelle keine Zunahme der Durchblutung gemessen werden. Das Verfahren erscheint somit nicht für die Experimente des ASP 1.2 geeignet zu sein. Weitere Vorversuche zu diesem ASP laufen momentan.

Zum ASP 1.3 ExpoLab „Substanzen“ wurden die Vorbereitungen des Expositionsversuches mit Acetaldehyd abgeschlossen. Am 31.3.2008 starten die 4-stündigen Expositionen mit 20 Versuchspersonen, 10 Frauen und 10 Männer. Die medizinischen Voruntersuchungen und das Training der Tests und physiologischen Messungen wurden bereits abgeschlossen. Neben der Raumluftbedingung (0 ppm) werden Konzentrationen von 12,5 ppm, 25 ppm, 37,5 ppm und 50 ppm verwendet und Messungen auf den Ebenen Erleben, Verhalten und Physiologie durchgeführt werden.

Vor allem bei den physiologischen Messungen wird die Expertise des BGFA im Bereich der entzündlichen Prozesse an den oberen Atemwegen die bisherige Methodik erweitern. Um Verlaufsprozesse besser erfassen zu können, wurde die Zeit, in der die VPn am *IfADo* sind, auf neun Stunden erhöht, so dass Messungen bis zu drei Stunden nach Expositionsende möglich sind. Diese zusätzlichen Messungen ermöglichen sowohl Aussagen über die Reversibilität möglicher Effekte, als auch Einblicke über verzögerte physiologische Prozesse, die direkt nach der Exposition noch nicht messbar sind.

## Literatur

- Dalton, P. H., Dilks, D. D., Banton, M. I. (2000). Evaluation of odor and sensory irritation thresholds for methyl isobutyl ketone in humans. Am Ind Hyg Assoc J, 61, 340-50.
- Doty, R. L., McKeown, D. A., Lee, W. W., Shaman, P. (1995). A study of the test-retest reliability of ten olfactory tests. Chem Senses, 20, 645-56.
- Hummel, T. & Kobal, G. (1992). Differences in human evoked potentials related to olfactory or trigeminal chemosensory activation. Electroencephalogr Clin Neurophysiol, 84, 84-9.
- Smeets, M. A., Bulsing, P. J., van Rooden, S., Steinmann, R., de Ru, J. A., Ogink, N. W., van Thriel, C., Dalton, P. H. (2007). Odor and irritation thresholds for ammonia: a comparison between static and dynamic olfactometry. Chem Senses, 32, 11-20.
- van Thriel, C., Schaper, M., Kiesswetter, E., Kleinbeck, S., Juran, S., Blaszkewicz, M., Fricke, H. H., Altmann, L., Berresheim, H., Bruning, T. (2006). From chemosensory thresholds to whole body exposures-experimental approaches evaluating chemosensory effects of chemicals. Int Arch Occup Environ Health, 79, 308-21.

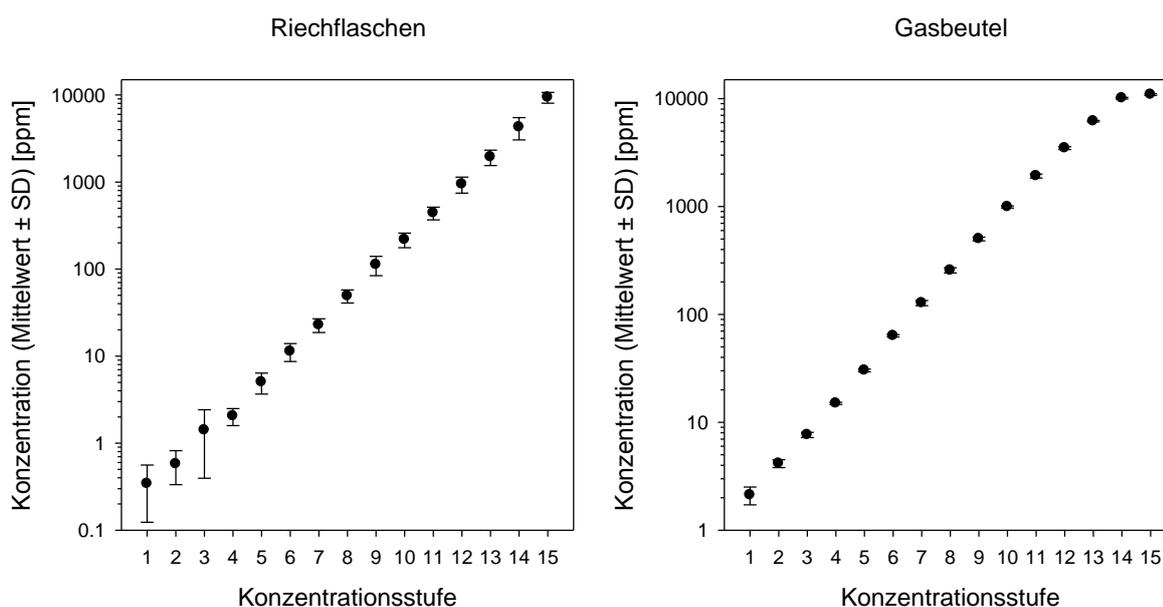
## Anhang

### Ergebnisse der Analysen der Riechflaschen und Gasbeutel

Alle Mittelwerte und die dazugehörigen Standardabweichungen (SD) basieren auf mindestens 6 Einzelmessungen.

#### A – 2-Butanol

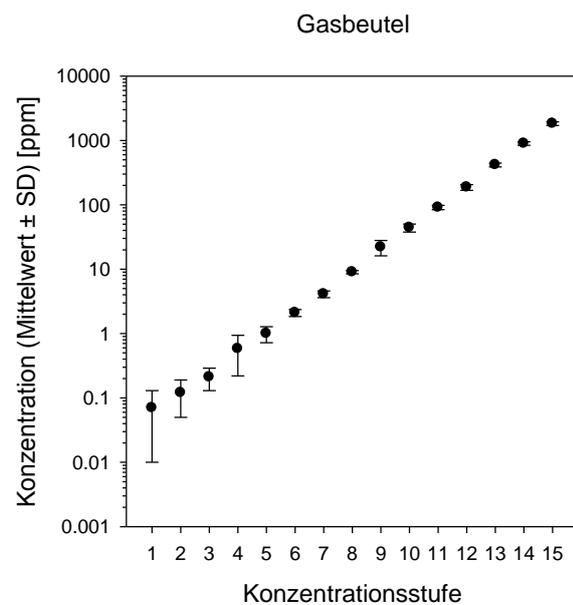
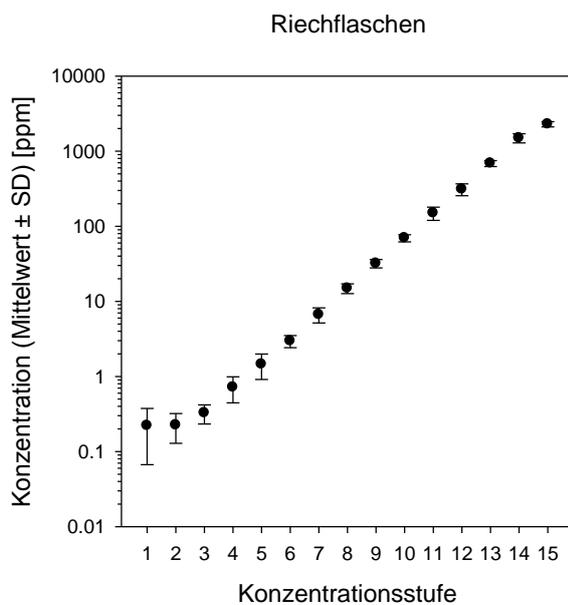
Konzentrationsstufe	Riechflaschen		Gasbeutel	
	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD
1	0,342	0,22	2,1	0,40
2	0,577	0,24	4,2	0,35
3	1,41	1,01	7,6	0,42
4	2,05	0,45	15	0,35
5	5,03	1,36	30	0,9
6	11,3	2,63	63	1,6
7	22,7	4,1	128	7,2
8	49,2	8,4	256	14
9	112	28	501	20
10	218	42	992	24
11	441	74	1917	81
12	943	197	3478	106
13	1936	388	6179	104
14	4270	1217	10093	173
15	9368	1321	10904	194



## Anhang

### B – Acetaldehyd

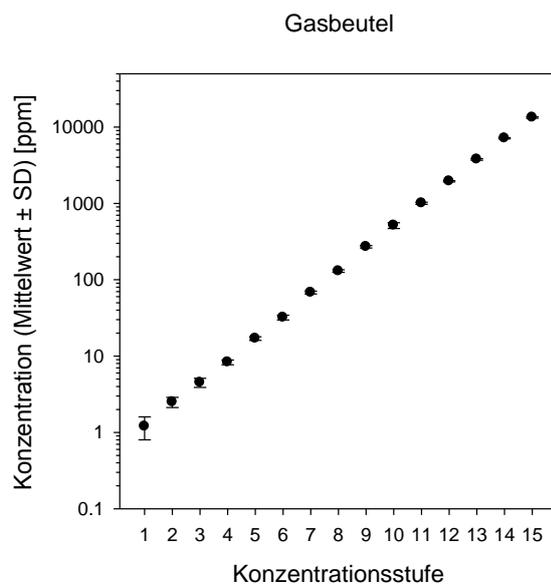
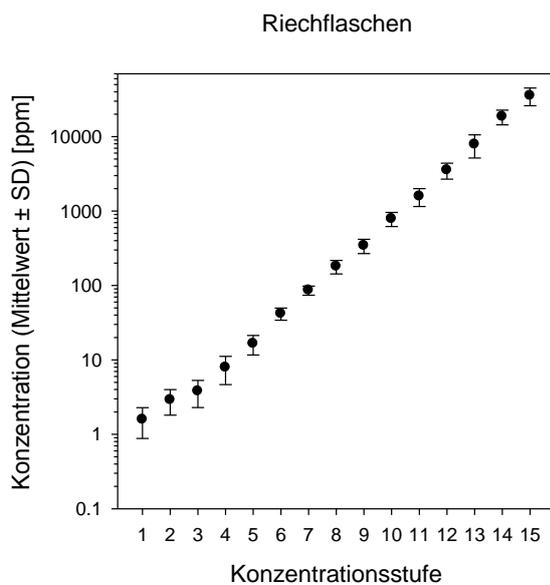
Konzentrationsstufe	Riechflaschen		Gasbeutel	
	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD
1	0,221	0,154	0,07	0,06
2	0,225	0,096	0,12	0,07
3	0,326	0,093	0,21	0,08
4	0,717	0,272	0,58	0,36
5	1,45	0,538	1,0	0,28
6	2,96	0,543	2,1	0,26
7	6,67	1,52	4,1	0,49
8	14,9	2,20	9,0	0,5
9	32,0	4,07	22	5,9
10	69,6	7,6	44	6,2
11	150	30	91	6,9
12	311	56	187	19
13	687	63	416	29
14	1495	208	896	56
15	2289	181	1830	119



## Anhang

### C – Methylmethacrylat (MMA)

Konzentrationsstufe	Riechflaschen		Gasbeutel	
	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD
1	1,58	0,70	1,2	0,40
2	2,90	1,09	2,5	0,38
3	3,80	1,51	4,5	0,61
4	7,91	3,25	8,3	0,6
5	16,5	4,83	17	0,9
6	41,9	7,8	32	2,3
7	86,1	12	68	2,9
8	180	37	130	5,1
9	343	74	270	10
10	788	169	514	44
11	1575	426	1005	30
12	3540	858	1950	41
13	7869	2709	3770	89
14	18544	4170	7138	142
15	35496	9481	13352	287

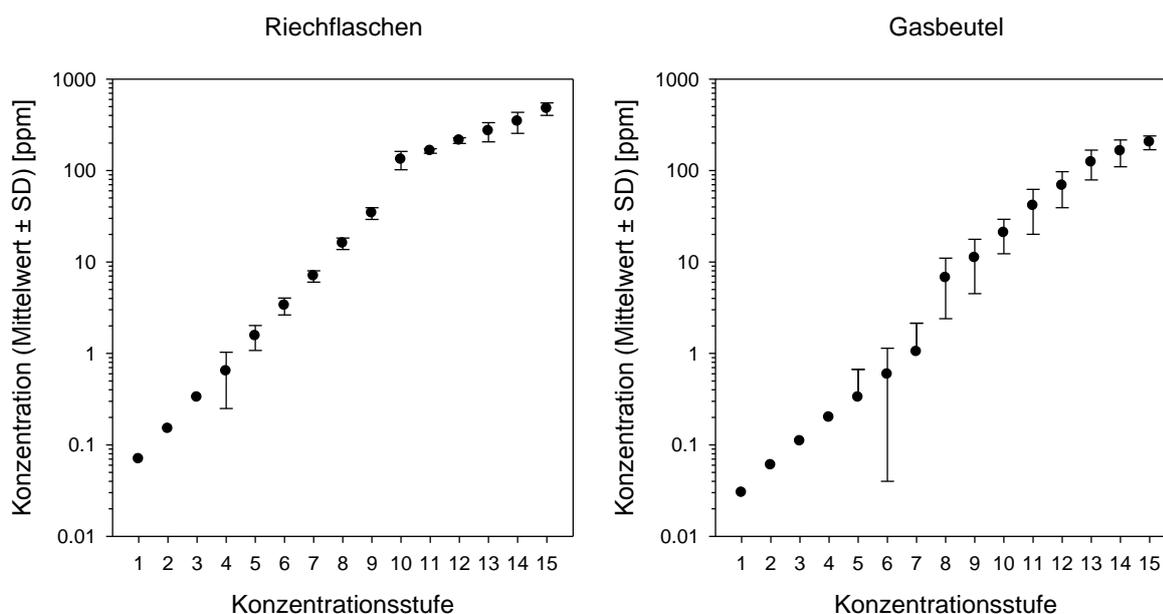


## Anhang

### D – Dimethylsuccinat

Konzentrationsstufe	Riechflaschen		Gasbeutel	
	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD
1	0,07		0,03	
2	0,15		0,06	
3	0,33		0,11	
4	0,64	0,39	0,20	
5	1,55	0,47	0,33	0,34
6	3,34	0,70	0,59	0,55
7	7,02	1,0	1,04	1,10
8	16,0	2,3	6,7	4,3
9	34,2	5,0	11,1	6,6
10	132	30	20,8	8,5
11	164	9,5	41,2	21,1
12	213	15	68,3	29,0
13	270	64	123	44
14	344	89	163	53
15	475	74	204	35

Anmerkung: rot: durch lineare Regression extrapolierte Werte



Um den aus den Voruntersuchungen gewonnenen Ergebnissen über die „Riechbarkeit“ und „Lateralisierbarkeit“ gerecht zu werden, wurden für Dimethylsuccinat Konzentrationssprünge bei Flasche 8 und Beutel 10 eingebaut.

## Anhang

### F – 2-Ethylhexylacrylat

Konzentrationsstufe	Riechflaschen		Gasbeutel	
	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD
1	0,020		0,0033	
2	0,036		0,0058	
3	0,063		0,0103	
4	0,113		0,019	0,01
5	0,155	0,10	0,036	0,02
6	0,363	0,16	0,063	0,03
7	0,700	0,21	0,091	0,05
8	1,06	0,31	0,19	0,1
9	2,06	0,60	0,30	0,1
10	3,54	0,6	0,52	0,2
11	5,98	0,9	0,72	0,3
12	10,1	1,5	1,25	0,2
13	17,7	2,6	2,35	1
14	30,7	3,8	9,24	1
15	55,1	5,9	16,76	2

Anmerkung: rot: durch lineare Regression extrapolierte Werte

