

Utrechtseweg 48
3704 HE Zeist
Postbus 360
3700 AJ Zeist

www.tno.nl

T +31 88 866 60 00
F +31 88 866 87 28

TNO-rapport

TNO2016 R11817

Aantonen van blootstelling aan chroom-6 verbindingen middels analytisch laboratoriumonderzoek

Datum 4 april 2018

Auteur(s) E.R. Verheij
E.D. Kroese

Goedgekeurd door M.A.J. Rennen

Exemplaarnummer -
Oplage -
Aantal pagina's 32
Aantal bijlagen -

Opdrachtgever RIVM
Projectnaam Chroom-6 Defensie WP7.1
Projectnummer 060.20047

Alle rechten voorbehouden.

Niets uit deze uitgave mag worden vermenigvuldigd en/of openbaar gemaakt door middel van druk, fotokopie, microfilm of op welke andere wijze dan ook, zonder voorafgaande toestemming van TNO.

Indien dit rapport in opdracht werd uitgebracht, wordt voor de rechten en verplichtingen van opdrachtgever en opdrachtnemer verwezen naar de Algemene Voorwaarden voor opdrachten aan TNO, dan wel de betreffende terzake tussen de partijen gesloten overeenkomst.

Het ter inzage geven van het TNO-rapport aan direct belanghebbenden is toegestaan.

Dit rapport maakt onderdeel uit van een serie van tien rapporten over het onderzoek naar chroom-6 op de POMS-locaties van Defensie. Dit rapport bevat geen afzonderlijke publiekssamenvatting. Een overkoepelende publiekssamenvatting van de tien rapporten is te vinden op de website van het RIVM:

“Chroom-6 op de POMS-locaties van Defensie: gezondheidseffecten en verantwoordelijkheden. Bevindingen uit het onderzoek op hoofdlijnen (RIVM Rapport 2018-0061)”

Samenvatting

Dit rapport beschrijft de mogelijkheden om blootstelling aan chroom-6 verbindingen aan te tonen middels laboratoriumonderzoek, in het bijzonder de analyse van chroom of chroom-specifieke biomarkers in humane lichaamsvloeistoffen en weefsels (matrices). De matrices waar informatie over gevonden is zijn urine, bloed, haar/nagels, bot, speeksel, tanden, en de luchtwegen/longen. Deze matrices, met uitzondering van bot, tanden en longweefsel, zijn relatief eenvoudig en minimaal invasief te verkrijgen of te bemonsteren. Daarnaast is ook gekeken naar de mogelijkheden van het gebruik van andere weefsels die bijvoorbeeld tijdens operaties dan wel bij autopsie verkregen kunnen worden.

De belangrijkste beperkende factoren om arbeids-gerelateerde blootstelling aan chroom-6 verbindingen te kunnen meten zijn het feit dat chroom-6 verbindingen *in vivo* snel worden omgezet in chroom-3, en dat er sprake is van een significante achtergrondblootstelling aan chroom-3 verbindingen, en in mindere mate aan chroom-6 verbindingen. Hierdoor is het aantonen van chroom-6 in standaardmatrices als urine en bloed alleen mogelijk direct na blootstelling. Dit is waarschijnlijk ook het geval voor alle andere matrices.

Een andere benadering is de analyse van totaal chroom (voornamelijk chroom-3) in bijvoorbeeld bloed en urine waarbij het gehalte een maat is voor beroepsmatige blootstelling aan chroom, zeker als uit metingen blijkt dat chroom-6 bevattende verbindingen in de lucht zijn aangetoond. Chroom-6 verbindingen stapelen in rode en witte bloedcellen en worden daar onmiddellijk gereduceerd in chroom-3 verbindingen die de cel niet meer kunnen verlaten. Hierdoor is het totaal chroom gehalte in deze cellen een maat voor opname van chroom-6 verbindingen die gedurende de levensduur van deze cellen optreedt (voor witte bloedcellen is dit één maand en voor rode bloedcellen vier maanden). Deze analyses worden in de praktijk toegepast om de interne blootstelling van medewerkers te monitoren tijdens, of tot vier maanden na, (periodes van) blootstelling. Voor het aantonen van blootstelling lang (jaren) nadat deze heeft plaatsgevonden biedt de analyse van chroom in urine en bloed geen mogelijkheden.

Haar en nagels lijken potentieel interessante matrices om te gebruiken op een wat langere termijn, maanden tot een jaar na blootstelling, omdat blootstelling aan chroom-6 verbindingen resulteert in verhoging van het chroomgehalte van deze matrices. Het is echter niet mogelijk om een verband te leggen tussen het chroomgehalte in deze materialen en de mate van blootstelling. Hiervoor is te weinig onderzoek gedaan. Bot is mogelijk nog langer na blootstelling geschikt om verhoogde blootstelling aan te tonen. Er zijn gevallen bekend waarbij na 10 tot 15 jaar nadat de blootstelling was beëindigd nog verhoogde chroomgehalten zijn gevonden. Dit is ook het geval voor andere weefsels. Groot nadeel is dat het nemen van monsters van bot en weefsels bijzonder invasief is (biopten verkregen tijdens operaties of autopsie zijn vrijwel de enige mogelijkheid). Ook hier is het onmogelijk om uit gemeten gehalten kwantitatieve uitspraken te doen over de mate en duur van blootstelling.

Tanden zijn niet geschikt omdat bij volwassenen er in periodes van blootstelling niet of nauwelijks chroom in de tandmatrix wordt ingebouwd. Tijdens de vorming van het gebit vindt dat wel plaats. Dit gegeven wordt gebruikt in onderzoek naar blootstelling aan metalen, waaronder chroom, door bijvoorbeeld milieuverontreiniging tijdens de eerste levensjaren.

In het geval dat de blootstelling bestond uit chroom-6 bevattende deeltjes die in de longen onveranderd aanwezig blijven dan is het wellicht mogelijk om specifiek chroom-6 verbindingen aan te tonen. Bij werknemers zijn in ademluchtcondensaat,

verzameld aan het einde van de werkweek, verhoogde gehalten van chroom-3 en chroom-6 gevonden ten opzichte van niet beroepsmatig blootgestelde controle personen. Ademluchtcondensaat is in de toekomst mogelijk een niet-invasief alternatief voor het nemen van longweefselmonsters om ook lang na blootstelling nog chroom-6 verbindingen te kunnen meten. Hiervoor is echter meer onderzoek nodig.

Het toepassen van de analyse van biomarkers die gevormd worden bij interne blootstelling aan chroom-6 verbindingen is niet mogelijk omdat geen van de gerapporteerde biomarkers specifiek is voor blootstelling aan chroom-6. Ook blootstelling aan andere verbindingen kan leiden tot verhoging van deze biomarkers.

Uit bovenstaande kan geconcludeerd worden dat blootstelling aan chroom-6 verbindingen direct na de blootstelling aangetoond kan worden door metingen van totaal chroom in urine en bloed. Middels metingen van het chroomgehalte in erythrocyten is het mogelijk om blootstelling aan chroom-6 verbindingen tot een paar maanden na de blootstelling aan te tonen. Aantonen van blootstelling aan chroom-6 verbindingen jaren/decennia na de blootstelling is met gangbare methodes vooralsnog niet mogelijk.

Inhoudsopgave

Samenvatting	3
1 Inleiding	6
2 Onderzoeksmethode	8
3 Achtergrondinformatie over chroom-6 verbindingen	9
4 Analysetechnieken voor de bepaling van totaal chroom en chroom-6 verbindingen	12
5 Matrices	13
5.1 Achtergrondwaardes van chroom in het lichaam	13
5.2 Urine	15
5.3 Bloed.....	16
5.4 Haar en nagels	17
5.5 Bot.....	18
5.6 Tandem.....	19
5.7 Speeksel	20
5.8 Ademwegen en longen.....	21
5.9 Weefsels verkregen bij operaties of autopsie.....	22
6 Biomarkers	24
7 Conclusies	26
8 Literatuur	27
9 Ondertekening	32

1 Inleiding

Het ministerie van Defensie heeft aan het RIVM gevraagd om te onderzoeken wat de mogelijke effecten voor de gezondheid zijn voor (ex-) medewerkers van Defensie na gebruik van chroom-6 en Chemical Agent Resistant Coating (CARC): “Gezondheidsonderzoek gebruik gevaarlijke stoffen bij Defensie; POMS, chroom-6 en CARC”.

Alle belanghebbenden, zoals (ex-)medewerkers van Defensie, vakbonden, ministerie van Defensie, register-experts, letselschade-advocaten, Onderzoeksraad voor de Veiligheid en Nederlands Centrum voor Beroepsziekten, zijn uitgenodigd om hun vragen voor het onderzoek door te geven. Deze vragen vormen de basis van het onderzoek en zijn gebundeld in een kortere lijst van onderzoeksvragen.

Het RIVM coördineert het onderzoek en betreft op basis van de onderzoeksvragen bij het onderzoek ook andere organisaties en externe onderzoekers met relevante kennis voor zover nodig om het onderzoek zorgvuldig uit te voeren. De betrokken organisaties zijn:

- RIVM (Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu)
- Universiteit Utrecht
- TNO (Nederlandse Organisatie voor Toegepast Natuurwetenschappelijk Onderzoek)
- Universiteit Maastricht

Het onderzoek wordt begeleid door een Paritaire Commissie bestaande uit vier vertegenwoordigers van zowel werkgevers- als werknemerszijde, een onafhankelijk voorzitter en een onafhankelijk (wetenschappelijk) expert. De Paritaire Commissie stelt ook vast welke onderzoeksvragen onderzocht en beantwoord moeten worden. Het onderzoek wordt getoetst door een inhoudelijke klankbordgroep.

Deze rapportage geeft een overzicht van de relevante informatie voor de beantwoording van de volgende onderzoeksvraag:

“Kan blootstelling aan chroom-6 in het lichaam worden aangetoond/gemeten (zowel tijdens de blootstellingsperiode als achteraf)?”

Het gaat hierbij over het meten van beroepsmatige blootstelling aan chroom-6 verbindingen. Voor zover bekend gaat het vooral om verschillende verbindingen van chroom met zuurstof, de chromaten.

Idealiter wordt interne blootstelling aan (toxische) verbindingen uitgevoerd door het meten van de verbinding in biologische matrices als bijvoorbeeld bloed, urine of andere lichaamsvloeistoffen/weefsels. Als gevolg van de reductie van chroom-6 tot chroom-3 verbindingen is dit vaak niet mogelijk en wordt de (mate van) interne blootstelling bepaald door een specifieke metaboliet te meten. Voor het beantwoorden van de vraag of interne blootstelling aan chroom-6 verbindingen gemeten kan worden na blootstelling is het noodzakelijk te weten wat er met chroom-6 verbindingen in het lichaam gebeurt. Belangrijke aspecten zijn de opname van chroom-6 verbindingen, de verdeling over het lichaam, het metabolisme, en de

uitscheidingsroute en snelheid, en de invloed van de blootstellingsroute, oraal, dermaal en inhalatoir, op de kinetiek.

Dit onderzoek werd verricht in opdracht van het Ministerie van Defensie, in het kader van het "Gezondheidsonderzoek gebruik gevaarlijke stoffen bij Defensie; POMS, Chroom-6 en CARC".

2 Onderzoeksmethode

Dit rapport is tot stand gekomen door bestudering van literatuur:

- Documenten
 - ATSDR 2012 (Agency for Toxic Substances and Disease Registry, USA)
 - IPCS 2013 (International Programme on Chemical Safety)
 - NIOSH 2013 (The National Institute for Occupational Safety and Health, USA)
- Publicaties via zoeken in:
 - PubMed
 - Scopus

De gebruikte zoektermen zijn vermeld in de tekst. PubMed is als primaire database gebruikt, Scopus is alleen gebruikt om te toetsen of relevante hits globaal overeenstemmen. De gevonden publicaties zijn allemaal geëvalueerd op relevantie op basis van het abstract. Daarnaast is in PubMed en Scopus gezocht naar latere publicaties die de gevonden relevante hits als referentie hebben gebruikt om daarmee eventuele omissies uit de primaire zoekopdracht te vinden. Alleen voor heel recente publicaties kwam dit voor ('pre-press' die al wel in Scopus staan en nog niet in PubMed). Via deze werkwijze is een volledig beeld verkregen van alle relevante literatuur. Probleem daarbij is dat heel oude literatuur (<1980) niet in deze databases staat, dan wel onvolledig is. Hiervoor zijn de genoemde documenten gebruikt omdat daarin eerdere literatuur beschreven wordt.

Uit al deze bronnen is de relevante informatie gebruikt voor dit rapport. Conceptversies van dit rapport zijn beoordeeld door een deskundige van TNO op het gebied van analytische chemie, te weten Dr. W.H.J. Vaes, en door een panel van externe deskundigen op het gebied van chroom-toxiciteit en -monitoring, te weten:

- Prof. Gert van der Laan (voorheen Nederlands Centrum voor Beroepsziekten, Klinisch arbeidsgeneeskundige; Universiteit Milaan)
- Dr. Jos Rooijackers (Longarts; Nederlands Kenniscentrum Arbeid en Longaandoeningen)
- Prof.dr. Thomas Rustemeyer (Huidarts; Vrije Universiteit Medisch Centrum)
- Dr. ir. Paul Scheepers (Arbeidstoxicoloog/biomonitoring; Radboud UMC)
- Drs. Irma de Vries (internist, toxicoloog; Nationaal Vergiftigingen Informatie Centrum /UMC Utrecht)

In totaal heeft dit panel vier conceptversies van dit rapport becommentarieerd. Voor de eerste drie versies zijn commentaren en adviezen van individuele deskundigen plenair besproken alvorens door te voeren. Overleg met het deskundigen-panel heeft plaatsgevonden op 3 oktober 2016, 14 november 2016, 7 december 2016 en middels een schriftelijke ronde in week 6 van 2017. Tot slot heeft dit panel in maart 2017 het reactie document op de adviezen van de Klankbordgroep en de hierop gemaakte aanpassingen in dit rapport becommentarieerd.

3 Achtergrondinformatie over chroom-6 verbindingen

Hieronder staat een overzicht van een aantal relevante aspecten over chroom-6 (en daar waar nodig over andere vormen).

Nomenclatuur

- Met chroom, zonder verdere specificatie van de valentie (3 of 6), wordt totaal chroom bedoelt.
- Chroomgehalte in weefsels en lichaamsvloeistoffen, is het totale chroomgehalte

Blootstelling en opname van chroom-6

Chroom-6, als chromaat, dichromaat of chroomtrioxide, wordt in het bloed opgenomen bij orale, dermale en inhalatoire blootstelling en komt daardoor systemisch beschikbaar. De opname gaat via transport over celmembranen via chloride-fosfaat kanalen.

- Chroom-6 verbindingen worden beter opgenomen dan chroom-3 verbindingen.
- De niet arbeids-gerelateerde blootstelling aan chroom-6 verbindingen is voornamelijk via o.a. leidingwater, roken, inademing van lucht (milieuverontreiniging), voeding en consumentenproducten zoals bijvoorbeeld leer.
- De belangrijkste bron voor arbeids-gerelateerde blootstelling aan chroom-6 verbindingen is het verwerken van materialen waarin/waarop chroom-6 verbindingen zijn verwerkt of waarbij deze kunnen ontstaan, zoals lassen, slijpen, schuren, zagen/snijden, spuiten, etc. De belangrijkste industrieën zijn o.a. metaalproductie en -verwerking, leerbewerking, houtconservering, cementproductie.
- Blootstelling aan chroom-6 verbindingen via inhalatie is vrijwel altijd in de vorm van deeltjes van uiteenlopende grootte en samenstelling.
- Chroom-6 verbindingen worden in vivo niet significant gevormd uit andere vormen (metallisch chroom, chroom-3 verbindingen)

Metabolisme, verdeling en uitscheiding van chroom-6 verbindingen

- Chroom-6 verbindingen worden snel gereduceerd tot chroom-3 verbindingen. Dit gebeurt zowel intracellulair als extracellulair door een aantal endogene reducerende verbindingen. De halfwaardetijd van de intracellulaire reductie is in de orde van minuten.
- Chroom-6-houdende chromaten worden goed getransporteerd over celmembranen (chloride-fosfaat kanalen) en komen daardoor in bloedcellen, weefsels, organen, en bot. Chroom-3 wordt veel slechter opgenomen in cellen. Dit geldt ook voor de eliminatie van chroom-3 uit cellen.
- Chroom-6 verbindingen worden na opname in cellen omgezet in chroom-3 verbindingen. In deze vorm zit het chroom in zekere zin gevangen in de cel (zie vorige punt) waardoor er sprake is van stapeling bij blootstelling aan chroom-6 verbindingen. Het chroomgehalte in deze cellen vormt dan een afspiegeling van de systemische blootstelling aan chroom-6 verbindingen gedurende de levensduur van de cellen: één maand (witte bloedcellen), vier maanden (rode bloedcellen).

- De metaboliet chroom-3 in bloed wordt primair geklaard via de nieren (urine) en de lever (gal, ontlasting).

Kinetiek chroom-6 verbindingen

- De eliminatiesnelheid (en route) is afhankelijk van de toedieningsroute, chemische vorm van de chroom-6 verbinding en de dosering.
- De eliminatie uit plasma is relatief snel.
- De eliminatie uit weefsels is in de orde van dagen tot weken.
- De halfwaardetijd van chroom in plasma en urine is in de orde van 40 uur (uit onderzoeken waar orale toediening is toegepast).
- Bij inhalatie is de wateroplosbaarheid van de ingeademde deeltjes en de chromaatzouten een belangrijke factor. De verblijftijd in de longen is variabel en hangt af van waar in de longen de depositie plaatsvindt en de wateroplosbaarheid. Als de zouten/deeltjes langzaam oplossen is er gedurende een lange periode een opname van chroom-6 verbindingen in het bloed, en daardoor ook een langere eliminatietijd.
- Lekkage van chroom uit erythrocyten is in de orde van 1-2% per dag. De levensduur van erythrocyten is gemiddeld ~126 dagen. Erythrocyten fungeren als een depot.
- De trage eliminatie uit weefsels en erythrocyten en vertraagde opname uit slecht oplosbare deeltjes in de longen leiden tot langdurige verhoging van het chroomgehalte in urine.
- Chroomgehalten van weefsels waaronder longen zijn na (hoge chronische) blootstelling nog jaren verhoogd.

Blootstelling aan metallisch chroom en chroom-3 verbindingen

Dagelijks wordt de algemene bevolking blootgesteld aan chroom-3 verbindingen, voornamelijk via de voeding. Deze blootstelling is hoger dan die aan chroom-6 verbindingen. Chroom-3 wordt veel slechter opgenomen dan chroom-6. Opgenomen chroom-3 verbindingen worden in het lichaam niet omgezet tot chroom-6 verbindingen.

De blootstelling van de algemene bevolking aan metallisch chroom is laag. Mogelijke bronnen zouden kunnen zijn: slijtage van chroom-bevattende metalen voorwerpen (pannen, bestek), chroom-houdende legeringen in protheses (orthodontie, kunstheup, knieprotheses, etc). De mechanische verwerking van chroom en chroom-houdende legeringen leidt tot de vorming van deeltjes die metallisch chroom bevatten. Na inademen komen deze in de longen waar de deeltjes na oxidatie/oplossen leiden tot interne blootstelling aan niet-metallisch chroom. Het is niet bekend of dit proces voornamelijk leidt tot de vorming van chroom-3 verbindingen of een combinatie van chroom-3 en chroom-6 verbindingen. Dit laatste is echter niet waarschijnlijk onder fysiologische omstandigheden.

Hierdoor resulteert blootstelling aan metallisch chroom en chroom-3 verbindingen ook tot hogere chroomgehalten (ook weer voornamelijk chroom-3) in diverse biologische matrices. Dit betekent dat chroom-3 verbindingen als omzettingproducten van chroom-6 verbindingen, niet specifiek zijn voor blootstelling aan chroom-6 verbindingen.

Doorvertaling van de achtergrondinformatie naar de onderzoeksvraag

Samengevat betekent dit dat het chroomgehalte in weefsels en lichaamsvloeistoffen in de tijd een samenspel is van blootstelling aan verschillende vormen van chroom. Het ligt daardoor voor de hand dat het theoretisch onmogelijk is om, door het meten van verhoogd chroomgehalte in urine of bloed serum/plasma, een uitspraak te kunnen doen over de chroom-vorm waaraan iemand een verhoogde blootstelling heeft gehad. De focus van dit onderzoek is het vinden van bewijs in de literatuur dat het mogelijk is dit samenspel uiteen te rafelen.

De belangrijkste beperking voor het meten van blootstelling aan chroom-6 verbindingen is de snelle, nagenoeg volledige omzetting in chroom-3. Na blootstelling aan chroom-6 verbindingen zijn deze verbindingen in bloed, urine en faeces niet of in ieder geval lastig aan te tonen. Na orale toediening van 100 mg chroom-6-houdend natriumchromaat aan een konijn konden geen chroom-6 verbindingen in urine worden aangetoond [Nomiyama 1980]. In urine van arbeiders blootgesteld aan chroom-6 verbindingen werden deze stoffen niet aangetroffen [Minoia 1988]. In de recentere literatuur zijn wel een aantal publicaties gevonden waarin melding wordt gemaakt van specifieke bepalingen van chroom-6 verbindingen in urine [Soko 2002, Lee 2008, Wang 2010].

In het overgrote deel van alle publicaties waarin de bio-analyse van chroom wordt beschreven wordt totaal chroom, wat voornamelijk uit chroom-3 bestaat, gemeten. Ook in het kader van onderzoek naar blootstelling aan chroom-6 verbindingen wordt dit veelal gedaan door het totale chroomgehalte te bepalen en dit te vergelijken met normaalwaardes (achtergrondblootstelling aan chroom) dan wel met een persoonlijke referentiewaarde verkregen na een periode zonder beroepsmatige blootstelling (overnacht of na het weekend).

Er is onderzocht wat de mogelijkheden zijn om blootstelling aan chroom-6 verbindingen te meten, en in het bijzonder hoe lang dat na blootstelling nog kan. Als mogelijke matrices voor analyses zijn bloed, urine, haar/nagel, bot, tanden, speeksel/sputum, long (longspoeling en ademluchtcondensaat), en weefsels verkregen bij operatie/autopsie meegenomen.

Naast directe analyse van chroom is ook gekeken naar de mogelijkheden van het gebruik van analyse met behulp van (niet-chroom bevattende endogene) specifieke biomarkers die gevormd worden als reactie op de interne blootstelling aan chroom-6 verbindingen.

4 Analysetechnieken voor de bepaling van totaal chroom en chroom-6 verbindingen

Een publicatie van Gómez uit 2006 geeft een overzicht van de gebruikte technieken voor de analyse van chroom in publicaties tussen 2000 en 2006. De belangrijkste technieken voor de bepaling van lage concentraties chroom in biologische monsters zijn:

- AAS: atomic absorption spectroscopy
- ICP-MS: inductively coupled plasma mass spectrometry
- Spectrophotometry
- AES: atomic emission spectroscopy

Daarnaast noemt die publicatie nog een tiental andere technieken. Sinds 2006 is dit beeld niet veranderd en zijn AAS en ICP-MS nog steeds de dominante technieken (en dat waren ze ook voor 2000).

Met AAS en ICP-MS kunnen detectiegrenzen van 0,01-0,02 µg/l bereikt worden. Dit is toereikend voor de analyse van chroom in biologische matrices. De chroom concentraties bij de gemiddelde bevolking zijn 0,01 – 0,5 µg/l in serum, 0,24-1,8 µg/ml in urine, 200-5800 µg/kg in bot (ICPS 2013). Verhoging van deze gehalten door een hogere individuele blootstelling aan chroom zijn daarmee goed te meten met deze technieken.

Een belangrijk aspect bij de analyse van chroom is het kunnen onderscheiden van de verschillende relevante chroom-species: chroom-0, chroom-3, chroom-6. Met AAS en ICP-MS kan dit niet zonder gebruik te maken van aanvullende technieken. De specifieke analyse van chroom-6 verbindingen is essentieel in een aantal toepassingen waar een (wettelijke) limietwaarde van chroom-6 verbindingen gehanteerd wordt, zoals de bewaking van de drinkwaterkwaliteit, voeding, consumentenproducten. Gómez et al [2006] geven een overzicht van een aantal aanvullende technieken om dit te bereiken. Het is niet van belang deze hier allemaal in detail te bespreken. In algemene zin maakt het gros van deze technieken gebruik van de fysisch-chemische verschillen tussen de verschijningsvormen chroom-3 ($\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_4(\text{OH})_2^+$) en chroom-6 (CrO_4^{2-} , HCrO_4^- , $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$). Een bekende methode voor bepalen van chroom-6 is spectrofotometrie na reactie met di-fenylcarbazide (DPC) waarbij een gekleurd complex ontstaat (begin 20^{ste} eeuw werd de chromaat-DPC complex al toegepast). Een andere veel gebruikte methode is ion-chromatografie. Complexvorming van ofwel chroom-3 of chroom-6 verbindingen wordt ook gebruikt in combinatie met extractie om een van de twee vormen te isoleren. Daarna wordt chroom in het extract en het restant met bijvoorbeeld ICP-MS of AAS gekwantificeerd om zowel het chroom-3 en chroom-6 verbindingen als het totaal chroom-gehalte in een monster te bepalen. Van deze aanpak zijn vele varianten beschreven en vaak is de uitkomst van de analyse mede afhankelijk van de gekozen methode.

Deelconclusies:

- Er zijn een aantal technieken die voldoende gevoeligheid hebben om achtergrondniveaus van chroom in alle bovengenoemde matrices te kunnen bepalen
- Het is mogelijk om totaal chroom en specifiek chroom-3 en/of chroom-6 verbindingen te meten.

5 Matrices

Voor de geselecteerde matrices is aan de hand van literatuur het volgende onderzocht:

1. Is het chroomgehalte in de matrix een maat voor interne blootstelling aan chroom (in welke vorm dan ook)?
2. Is het mogelijk om specifiek chroom-6 verbindingen te meten?
3. Zijn er mogelijkheden om af te leiden dat het daadwerkelijk om blootstelling aan chroom-6 verbindingen gaat?
4. Hoe lang kan dit, voor 1 t/m 3, na blootstelling?

Opmerking bij de verdere tekst van hoofdstuk 5:

- Blootstelling aan chroom-6 verbindingen resulteert in een verhoogd chroomgehalte in weefsels en lichaamsvloeistoffen, echter dit betekent niet automatisch dat een verhoogd chroomgehalte een bewijs is voor, arbeidsgerelateerde blootstelling aan chroom-6 verbindingen is. Het verhoogde chroomgehalte kan ook het gevolg zijn van verhoogde achtergrondblootstelling van, niet alleen, chroom-6 verbindingen maar alle chroomverbindingen.

5.1 Achtergrondwaardes van chroom in het lichaam

Omdat chroom-6 verbindingen in het lichaam snel worden omgezet in chroom-3 verbindingen zijn de achtergrondwaardes van chroom-6 verbindingen in het lichaam verwaarloosbaar. De analyse van chroom in lichaamsvloeistoffen en weefsels bestaat in de regel uit een totaal chroom bepaling en is feitelijk het gehalte chroom-3 verbindingen omdat metallisch chroom, chroom-6-houdende verbindingen en chroom verbindingen met een andere oxidatietoestand van chroom normaliter niet aanwezig zijn in significante niveaus.

Tabel 1: De totaal chroomgehalten van weefsels en lichaamsvloeistoffen van de algemene bevolking (IPCS, 2013) zijn:

Weefsel/Vloeistof	Mediane/gemiddelde concentratie	Concentratie range	Bron
Serum	0,06 µg/L 0,1-0,5 µg/L	0,01 -0,17 µg/L	Sunderman et al. (1989) Brune et al. (1993)
Urine	0,4 µg/L	0,24 – 1,8 µg/L	Iyengar & Woittiez (1988)
Longen	201 µg/kg nat gewicht ~300 µg/kg nat gewicht	28-898 µg/kg nat gewicht	Raithel et al. (1987) Garcia et al. (2001)
Bot	330 µg/kg nat gewicht	200-5800 µg/kg nat gewicht	Garcia et al. (2001)
Hersenen, nieren		< 125 µg/kg nat gewicht	Garcia et al. (2001)
Moedermelk	0,30 µg/L	0,06 – 1,56 µg/L	Casey & Hambidge (1984)

Bovenstaande tabel 1 geeft aan dat de achtergrondwaardes grote variatie laten zien. Vooral bij longweefsel en bot is deze erg groot en voor de bovengrenzen is het onduidelijk of dit echte achtergrondwaardes (normale blootstelling aan chroom) zijn of dat deze afkomstig zijn van personen die toch op een of andere manier een sterk verhoogde blootstelling hebben gehad. De spreiding in de urine- en bloedwaarden lijkt heel erg groot, bij blootstelling aan chroom kan het gehalte in urine oplopen tot enige tientallen µg per liter (of zelfs daarboven) waardoor het verschil tussen 0,24 en 1,8 µg per liter niet relevant is. Tabel 2 hieronder geeft de gemiddelde concentraties van chroom in haren en nagels (en nogmaals moedermelk).

Tabel 2: Concentraties totaal chroom zoals gevonden in moedermelk, haren en nagels (IPCS, 2013).

Uitscheidingsroute	Gemiddelde concentratie totaal chroom	Bron
Moedermelk	0,3 µg/L 0,2 µg/L	Casey & Hambidge, 1984; in: IPCS, 2013
Haren	0,23 mg/kg (VS) 0,35 mg/kg (Canada) 0,27 mg/kg (Polen) 0,23 mg/kg (Japan) 1,02 mg/kg (India)	Anderson et al., 1993; in: IPCS, 2013 Takagi et al., 1986; in: IPCS, 2013
Nagels	0,52 mg/kg (VS) 0,82 mg/kg (Canada) 0,52 mg/kg (Polen) 1,4 mg/kg (Japan) 1,3 mg/kg (India)	Takagi et al., 1986; in: IPCS, 2013

5.2 Urine

Als uitgangspunt voor het bepalen van blootstelling aan chroom-6 door het bepalen van de uitscheiding van chroom-3 en chroom-6 verbindingen in urine is gebruik gemaakt van IPCS (2013, 7.4 Elimination and excretion). De meest recente publicatie die genoemd wordt in dat document dateert uit 2003 (Vanoirbeek). In aanvulling daarop is literatuuronderzoek uitgevoerd naar publicaties vanaf 2003. Daarin lag de focus op literatuur waarin analyse van chroom-3 en/of chroom-6 is uitgevoerd ten behoeve van het meten van (vermeende) blootstelling aan chroom bij werknemers in chroom-verwerkende industrie en de algemene bevolking in relatie tot milieuverontreiniging (bijvoorbeeld in de nabijheid van chroom-verwerkende industrie) en blootstelling via drinkwater en andere consumentenproducten. Uit al deze onderzoeken volgt dat bij blootstelling aan chroom in welke vorm dan ook het chroom-gehalte van urine toeneemt. Concentraties na blootstelling variëren van enkele tientallen tot honderden $\mu\text{g/g}$ creatinine wat significant hoger is dan de achtergrondwaarde (circa 0,5-2 $\mu\text{g/g}$ creatinine).

Chroom-6 verbindingen worden na omzetting in het lichaam met de urine uitgescheiden als chroom-3 verbindingen. Chroom-6 verbindingen in urine bleken niet aantoonbaar te zijn (IPCS 2013: Cavalleri & Minoia 1985 en Minoia & Cavaleri 1988). Meer recente studies hebben aangetoond dat urine wel degelijk voldoende chroom-6 verbindingen bevatten voor een analyse [Soko 2002, Lee 2008, Wang 2010] ook al is het overgrote deel in het lichaam omgezet in chroom-3 verbindingen.

De primaire halfwaardetijd van chroom-3 in urine is ca. 40 uur. Dit betekent dat, afhankelijk van de hoogte van de blootstelling, tot enkele dagen na de blootstelling verhoogde concentraties in urine meetbaar zijn. Bij extreem hoge blootstellingen duurt het langer voordat de concentratie weer terug is op de achtergrondwaarde van 0,5-2 $\mu\text{g/g}$ creatinine. Bij inhalatoire blootstelling aan deeltjes met een slechte wateroplosbaarheid is zelfs na 100 tot 300 dagen later nog verhoogd chroom in urine meetbaar (vertraagde afgifte uit een depot in de longen).

Ook zijn er een aantal publicaties waaruit blijkt dat het chroomgehalte in urine de blootstelling volgt. Aan het eind van de werkdag zijn de concentraties hoger dan de volgende ochtend. Urine is daarmee een geschikte matrix voor de monitoring van blootstelling, bijv. pre-shift en post-shift analyse, of begin en einde van de werkweek, waarmee elke medewerker zijn/haar eigen persoonlijke referentiewaarde heeft (o.a. Scheepers 2008). In Duitsland (BGI/GUV-I 504-15 März 2009) worden referentiewaarden beschreven voor chroomgehalten in urine in relatie tot de hoeveelheid chroom in de lucht, 40 $\mu\text{g/l}$ komt overeen met een blootstelling van 0,1 $\text{mg CrO}_3 / \text{m}^3$ (lineair verband, monsternamen direct na blootstellingsperiode dan wel post-shift). De gebruikte biologische referentiewaarde (Biologischer Arbeitsstoff-Referenzwert (BAR)) is 0,6 μg per liter urine. Dat komt overeen met circa 0,6 $\mu\text{g/g}$ creatinine.

Deelconclusies:

- Blootstelling aan chroomverbindingen, zowel chroom-3 als chroom-6, resulteert in een hoger chroomgehalte in urine.
- De periode waarin het chroomgehalte verhoogd is hangt af van hoogte, duur en aard van de blootstelling en ligt in de range van enkele dagen tot weken.

- Chroom-6 is kort na blootstelling aantoonbaar in urine, dus alleen heel snel na blootstelling is het mogelijk om blootstelling aan specifiek chroom-6 verbindingen aan te tonen. Daarna kan alleen aangetoond worden dat er blootstelling aan chroom heeft plaatsgevonden maar niet welke vorm dat is geweest.
- Na inademen van deeltjes die in de longen langzaam oplossen is er sprake van verlengde systemische blootstelling aan chroom die langer door analyse van chroom in urine kan worden aangetoond en is discriminatie tussen de chroomvalentie waaraan men is blootgesteld geweest niet meer te achterhalen.
- Alleen direct na blootstelling (zelfde dag) geeft een meting van het chroomgehalte in urine informatie over de hoogte van de blootstelling op die dag. Daarbij moet ook informatie over het gehalte van chroom-6 verbindingen in de lucht beschikbaar zijn. In alle andere gevallen geeft een meting van het chroomgehalte in urine geen informatie over de aard, mate en/of duur van de blootstelling.
- Het is niet mogelijk om middels metingen in urine na jaren verhoogde arbeidsgerelateerde blootstelling aan chroom-6 verbindingen vast te stellen.

5.3 Bloed

Voor biomonitoring van blootstelling aan chroom-6 verbindingen op basis van bloedanalyse is het van belang om onderscheid te maken tussen serum/plasma, erythrocyten en lymfocyten. Chroom-6 dat in de bloedbaan komt:

1. Reduceert tot chroom-3 (en wordt via o.a. de nieren geklaard)
2. Wordt opgenomen door weefsels en organen
3. Wordt opgenomen door erythrocyten en lymfocyten

De opname van chroom-3 door cellen, en dus ook erythrocyten en lymfocyten is bijzonder laag omdat de celmembraan voor deze vorm een barrière vormt (deze is bi-directioneel). Met name chroom-6-houdende chromaten worden snel opgenomen in deze cellen en meteen gereduceerd tot chroom-3 en in deze vorm zit het min of meer gevangen. De eliminatie uit cellen verloopt traag en pas bij afsterven van deze cellen komt het merendeel van chroom-3 weer vrij. De levensduur van erythrocyten is in de orde van 120 dagen. Dit betekent dat na blootstelling aan chroom-6 verbindingen het chroomgehalte van bloedcellen lang verhoogd is terwijl het gehalte in het bloedserum vrij snel weer normaal is. De verhouding $C_{\text{erythrocyten}} / C_{\text{plasma}}$ is daardoor een indicatie voor blootstelling aan chroom-6 verbindingen in de voorafgaande maanden.

Voor serum of plasma geldt min of meer hetzelfde als voor urine. Blootstelling is meetbaar tot enkele dagen na blootstelling, bij extreem hoge blootstelling is deze termijn een aantal weken.

In Duitsland (BGI/GUV-I 504-15 März 2009) worden referentiewaarden beschreven voor chroomgehalten in rode bloedcellen van 35 $\mu\text{g/l}$ komt overeen met een inhalatoire blootstelling van 0,1 $\text{CrO}_3 \text{ mg/m}^3$ (ca. lineair verband, monsternamen direct na een aantal shifts).

Deelconclusies:

- Blootstelling aan chroom, zowel chroom-3 als chroom-6 verbindingen, leidt tot een verhoogd chroomgehalte in het bloed. Dat bestaat voornamelijk uit chroom-3, ook na blootstelling aan chroom-6 verbindingen.

- Voor serum en plasma is de periode waarin het chroomgehalte in het bloed verhoogd is enkele dagen tot weken (afhankelijk van de hoogte, duur en aard van de blootstelling).
- Voor erythrocyten is deze periode langer, tot ca. vier maanden overeenkomstig de levensduur van deze cellen. Het chroomgehalte, ook weer voornamelijk als chroom-3, in erythrocyten is een goede indicator voor blootstelling aan chroom-6 houdende verbindingen
- De verhouding van het chroomgehalte in erythrocyten en bloedplasma is een geschikte indicator voor de blootstelling aan chroom-6 houdende chromaten.
- Na inademen van deeltjes die in de longen langzaam oplossen is er sprake van langdurige systemische blootstelling aan chroom-verbindingen die langer door analyse van chroom in bloed kan worden aangetoond.
- Alleen direct na blootstelling (zelfde dag) geeft een meting van het chroomgehalte in bloed informatie over de hoogte van de blootstelling op die dag. In alle andere gevallen geeft een meting van het chroomgehalte in bloed geen kwantitatieve informatie over de blootstelling.
- Het is niet mogelijk om middels bloedanalyse jaren na verhoogde arbeidsgerelateerde blootstelling, blootstelling aan chroom-6 verbindingen vast te stellen.

5.4 Haar en nagels

Chroom wordt, net als vele andere stoffen zoals andere metalen, geneesmiddelen, drugs, opgenomen in haar en nagels. De opname in de haar-matrix gebeurt in de haarzakjes tijdens de haargroei (aanmaak van keratine). Verbindingen aanwezig in bloed kunnen getransporteerd worden naar de haarvormende cellen. Dit betekent in principe voor alle blootstellingsroutes die leiden tot systemisch beschikbaarheid die bijdraagt aan de opname in haar. Daarnaast is het mogelijk dat bij blootstelling via de huid stoffen rechtstreeks beschikbaar komen voor inbouw in haar. Als een, niet-vluchtige, stof eenmaal is ingebouwd in haar dan spoelt deze niet of nauwelijks uit. De opname van stoffen in de haarvezel door directe blootstelling wordt niet gerapporteerd. Wel kunnen verbindingen hechten aan het haar met als gevolg een overschatting van het gehalte in het haar bij analyse. Om dit te voorkomen moeten effectieve was-procedures worden toegepast om deze externe contaminatie tegen te gaan. Deze was procedure kan ook aanleiding geven tot een onderschatting door het optreden van verliezen.

Hoofdhaar groeit met een snelheid van ca. 1,25 cm per maand. Daarmee is het mogelijk om afhankelijk van de haarlengte van een persoon terug te kijken in de tijd, bijv. 1 jaar bij een haarlengte van 15 cm. Door haar te segmenteren in stukjes van bijv. 1,25 cm kan gemeten worden wat de blootstelling per maand is geweest. Haar is daarom geschikt om de gemiddelde blootstelling over (langere) periodes in kaart te brengen. Voor het meten van recente blootstelling, bijvoorbeeld na een dag tot een week, is het minder geschikt. In plaats van hoofdhaar kan in principe ook lichaamshaar, schaamhaar of haar afkomstig van wenkbrauwen worden gebruikt. Daar zijn voor chroom geen publicaties over gevonden.

Voor chroom is de opname in haar geen significante uitscheidingsroute in vergelijking met urine. Het is niet bekend of de opname in haar wordt beïnvloed door de valentie (3 of 6). Chroomgehalten in haar en in nagels liggen in de orde 0,2-1,5 mg/kg (WP3, Takagi 1986, IPCS 2013) maar in welke vorm is niet bekend. Er zijn geen publicaties

gevonden waarin specifiek chroom-6 verbindingen in haar of nagels zijn gemeten. Als er al chroom-6 verbindingen in haar worden opgenomen, is niet bekend of het dan in die vorm blijft, of dat het in het haar uiteindelijk ook gereduceerd wordt tot chroom-3. Het gehalte van metalen en ook die van chroom in haar wordt gezien als een betrouwbare maat voor blootstelling over langere periodes (weken tot maanden).

Nagels zijn in vele van de bovenstaande aspecten vergelijkbaar met haar. De groeisnelheid van vingernagels is ca. 3 mm per maand. Na 3 tot 6 maanden is de hele vingernagel vervangen (de groeisnelheid van nagels hangt af van de vinger, wijsvingernagel groeit sneller dan pinknagel). Teenagels groeien trager, vervanging van een teennagel duurt 12 tot 18 maanden. Dat betekent dat het in principe mogelijk is om blootstelling aan verbindingen nog 1-1,5 jaar na dato te bepalen door analyse van nagels. Net als bij haar is het van groot belang om externe contaminatie en daarmee overschatting van het gevonden gehalte uit te sluiten.

Deelconclusies:

- Blootstelling aan alle chroomverbindingen resulteert in verhoogde chroomniveaus in haar en nagels.
- Door de relatief trage groei van haar en i.h.b. (teen)nagels is het mogelijk om na maanden tot 1 -1,5 jaar verhoogde blootstelling aan chroom te bepalen.
- Het is echter niet bekend in welke vorm chroom-6 uiteindelijk in het haar komt.
- Er zijn ook onvoldoende data om uit het chroomgehalte van haar en nagels een uitspraak te doen over de hoogte van de blootstelling.
- Het is dus niet bekend of het mogelijk en zinvol is om specifiek chroom-6 verbindingen in haar of nagels te meten om onomstotelijk te bewijzen dat er blootstelling aan chroom-6 verbindingen plaats heeft gevonden.

5.5 Bot

Zware metalen worden opgenomen in bot (cortical & spongy) en kraakbeen. Van dit gegeven wordt o.a. gebruik gemaakt in archeologisch onderzoek (hoge blootstelling aan lood in Rome tijdens het Romeinse Rijk), forensisch historisch onderzoek (bijv. arsenicum vergiftiging). Net als voor haar en nagels is het gehalte van zware metalen in botten een afspiegeling van de blootstelling over langere periodes. Een fundamenteel verschil tussen haar/nagels en bot is dat de opname in bot reversibel is. Als de blootstelling vermindert dan daalt het gehalte van zware metalen in botmateriaal. Dit is een langzaam proces dat vooral gedreven wordt door 'bone remodeling'. Bij volwassenen wordt jaarlijks ca. 10% van het bot vervangen. In dit proces komen metalen in de botmatrix weer vrij en verdelen zich over het lichaam, worden deels uitgescheiden en komen ook weer in nieuw gevormd bot. Bij vergiftiging met zware metalen en in het bijzonder radioactieve elementen wordt chelatietherapie toegepast waarbij met behulp van een chelator zoals EDTA de uitscheiding efficiënter is en de reductie van het gehalte in weefsels en bot versneld wordt.

In geen van de gepubliceerde onderzoeken is specifiek chroom-6 gemeten, altijd totaal chroom. Het is daardoor onbekend of chroom-6 verbindingen ook als chroom-6 verbindingen in de botmatrix terecht komen. Het is waarschijnlijker dat chroom-6 verbindingen in de botvormende cellen worden gereduceerd tot chroom-3 verbindingen. Mochten chroom-6 verbindingen in de botmatrix ingebouwd worden dan is het te verwachten dat deze verbindingen tijdens bone-remodeling beschikbaar komen voor reductie.

De halfwaardetijd van chroom in bot bij de mens is niet bekend. De halfwaardetijd van chroom in bot is >100 dagen bij de rat. In het geval dat de eliminatie uit bot met een snelheid van 10% per jaar volledig door 'bone remodeling' wordt verklaard, en de aanname dat vrijgekomen chroom niet weer in bot wordt ingebouwd, dan is de halfwaardetijd theoretisch ca. 5 jaar. Dit is aanzienlijk langer dan bij ratten. Het is bekend dat bone-remodeling periodes gerelateerd zijn aan de fylogenetische evolutie van de species: 3-6 maanden voor de mens, 3 maanden voor de hond, 6 weken voor een konijn [Roberts WE 1995]). Bij een voormalige werknemer in de chroom-verwerkende industrie werd 10 jaar na pensionering nog steeds een verhoogd chroomgehalte in bot gevonden [ATSDR 2012]. De periode waarover dit nog mogelijk is hangt af van de hoogte, aard en duur van de blootstelling en de halfwaardetijd.

Achtergrondwaarden van chroom in bot variëren van 200 tot 5800 µg/kg bot (nat) met een gemiddelde van ca. 330 µg/kg [IPCS 2013, Garcia 2001]. Deze gehalten zijn gemeten bij 78 mensen die niet beroepsmatig zijn blootgesteld aan chroom. Detectiegrenzen voor urine en plasma zijn in de orde van ~20 ng/l. Indien vergelijkbare niveaus ook bereikt worden voor bot-monsters dan is de hoeveelheid bot die nodig is voor een analyse in de orde van 100 mg.

In de literatuur is geen toepassing van chroom-analyse in bot gevonden voor het aantonen van blootstelling aan chroom-6 verbindingen. De variatie in de achtergrondwaarden is erg groot waardoor interpretatie van een gemeten gehalte lastig is. Daarbij is de monsternamen bijzonder invasief wat een belemmering is van onderzoek met vrijwilligers naar de mogelijkheden van botanalyse.

Deelconclusies:

- Hoewel blootstelling aan alle chroomverbindingen resulteert in verhoogde chroomniveaus in bot, is er geen informatie/methode om deze te vertalen naar blootstellingsniveaus.
- De halfwaardetijd is niet bekend, maar als deze bij de mens inderdaad een paar jaar is, dan betekent dit dat bot mogelijk een interessante matrix is om verhoogde blootstelling aan chroom nog vele jaren later aan te tonen.
- De modernste meettechnieken zijn gevoelig genoeg om een analyse in bot uit te voeren met 100 mg bot (of meer).
- Het is niet bekend of het mogelijk is om specifiek chroom-6 verbindingen in bot te meten om onomstotelijk te bewijzen dat er verhoogde blootstelling aan chroom-6 verbindingen plaats heeft gevonden.
- Achtergrondwaarden variëren veel, 200-5800 µg/kg, waardoor de interpretatie van meetresultaten voor het vaststellen van verhoogde blootstelling aan chroom bemoeilijkt wordt, zo niet onmogelijk is. Alleen in het geval van extreem hoge gehalten is dit misschien mogelijk.

5.6 Tand

PubMed geeft op de zoektermen 'chromium' AND ('tooth' OR 'teeth') (in titel/abstract) 294 hits echter geen van de resultaten was relevant voor de beantwoording van de onderzoeksvraag (nagenoeg alle hits gaan over tandheelkunde/orthodontie/protheses). Wel waren er 2 hits over het chroomgehalte (en dat van andere metalen) in melkgebit in relatie tot diabetes en passief roken. Een vergelijkbare zoekopdracht is in Scopus uitgevoerd en leverde geen extra relevante hits. Zoekopdrachten met cadmium of lood geeft wel een aantal hits over het

metaalgehalte in tanden als gevolg van milieu-gerelateerde blootstelling aan metalen beschrijven. Over het algemeen gaan deze publicaties over de analyse van metalen in het melkgebit. Het melk- en blijvende gebit worden in de eerste levensjaren aangemaakt waarbij ook zware metalen worden ingebouwd en waardoor het metaalgehalte van tanden een goede marker is voor blootstelling. Op latere leeftijd is de opname van metalen veel geringer, tandglazuur wordt niet (of nauwelijks) meer aangemaakt. Dentine wordt nog wel vervangen waarbij in het lichaam aanwezige metalen ingebouwd worden. In een onderzoek van Arruda-Neto waarin tanden zijn geanalyseerd op Pb, Cd, Fe, Zn, Mn, Ni en Cr bij 59 personen (van 7 tot 60 jaar, Sao Paulo) blijkt dat de concentraties het hoogst waren in de leeftijdsgroep 7-10 jaar. Het is niet duidelijk of metalen waaronder chroom direct van buitenaf het tandglazuur en/of dentine binnendringen (bijv. chroom in speeksel na blootstelling) zoals dat het geval is voor fluoride.

Eén van de beschreven mogelijke effecten van blootstelling aan chroom-6 verbindingen is erosie en verkleuring van tanden [NIOSH 2013 en 1975, ATSDR 2012, Gomes 1972]. Dit duidt er op dat chroom-6 verbindingen wordt opgenomen in tanden. Er is geen literatuur gevonden waarin de toepassing van chroom-analyse in tanden voor het aantonen van beroepsmatige blootstelling aan chroom beschreven is.

Deelconclusies:

- Blootstelling aan metalen leidt tot een verhoogd metaalgehalte in tanden (glazuur en dentine). De opname vindt voornamelijk plaats tijdens de groeifase van het gebit (prenataal en de eerste levensjaren). De opname van metalen in glazuur en dentine is op latere leeftijd gering. Om die reden is tandmateriaal voor het aantonen van blootstelling niet geschikt. Mogelijk leidt een sterk verhoogde blootstelling wel tot een significante toename van het gehalte in tanden. Het is echter niet mogelijk om een verband te leggen tussen het chroomgehalte in deze materialen en de mate van blootstelling. Hiervoor is te weinig onderzoek gedaan.
- Er is geen toepassing van de analyse van chroom in tanden beschreven voor onderzoek naar of het aantonen van arbeids-gerelateerde blootstelling aan chroom-6 verbindingen.

5.7 Speeksel

PubMed geeft op de zoektermen 'chromium' AND 'saliva' (in titel/abstract) 134 hits. Het merendeel van deze publicaties gaat over de analyse van chroom uit gebitsprothesen. Slechts 1 publicatie beschrijft de analyse van chroom in speeksel als marker voor werk-gerelateerde blootstelling. Junaid beschrijft verhoogde chroomconcentraties in speeksel bij werknemers die chirurgische instrumenten produceren. Deze zijn hoger dan bij de controlegroep (5,3 µg/l versus 2,5 µg/l). Verhoogde chroomconcentraties werden in deze groep ook gevonden in bloed en urine. Daarbij gaf urine het grootste verschil (58,2 µg/l versus 4,5 µg/l), en daaruit kan geconcludeerd worden dat urine aantrekkelijker lijkt dan speeksel om blootstelling te monitoren.

Er is geen informatie beschikbaar over hoe lang na blootstelling het chroomgehalte van speeksel verhoogd is. Er zijn vooralsnog geen redenen om aan te nemen dat dit langer is dan voor urine en bloed

Deelconclusies:

- Het chroomgehalte van speeksel is tijdens/na blootstelling aan chroom verhoogd. Er is geen informatie beschikbaar in welke vorm chroom aanwezig is in speeksel.
- Het is niet bekend hoe lang na blootstelling deze verhoging nog meetbaar is, en of dit langer is dan bijvoorbeeld voor bloed of urine. De toepassing van chroom-analyse in speeksel is mogelijk interessant voor monitoringdoeleinden direct na blootstelling, en niet voor het aantonen van blootstelling lang nadat deze heeft plaatsgevonden.

5.8 Ademwegen en longen

Van alle organen zijn longen wel meegenomen als mogelijke matrix in dit onderzoek. Blootstelling aan ingeademd chroom en ook chroom-6 is veelal in de vorm van deeltjes die in de longen komen. Uit de literatuur blijkt dat (voormalige) chromaat arbeiders verhoogde chroom levels in o.a. long en sternum (bot) hebben in vergelijking met controle groepen [ATSDR 2012, meerdere onderliggende publicaties]. De hoeveelheid chroom in longweefsel neemt af in de tijd, maar in één geval was zelfs 18 jaar na pensionering een verhoogde concentratie chroom in de longen te vinden. Als deze deeltjes een slechte oplosbaarheid hebben dan blijven ze lang aanwezig in de longen. Daarbij is het aannemelijk dat in deze vaste deeltjes geen/weinig omzettingen plaats vinden, m.a.w. chroom-6 blijft chroom-6. Een andere reden is dat er relatief goed uitvoerbare en weinig-invasieve methodes zijn om monstermateriaal te verzamelen. Deze zijn:

- sputum
- longspoeling of broncho-alveolaire lavage (BAL)
- uitgeademde lucht, i.h.b. exhaled breath condensate

Sputum

PubMed geeft op de zoektermen 'chromium' AND 'sputum' (in titel/abstract) 13 hits. Slechts één daarvan beschrijft de analyse van chroom in geïnduceerd sputum [Murgia 2006]. Bij werknemers in de verchromingsindustrie werd een verhoogd chroomgehalte in sputum gevonden (7,90 +/- 0,855 µg/l vs 1,78 +/- 0,075 µg/l ; $p < 0,001$).

Longspoeling

PubMed geeft op de zoektermen 'chromium' AND ('lung lavage' OR 'bronchoalveolar lavage') (in all fields) 61 hits. Corhay (1995) beschrijft de analyse van een aantal elementen in longspoeling bij 'blast furnace workers' en rapporteert verhoogde niveaus van chroom. Geen van deze hits beschrijft het gebruik van longspoeling/BAL voor het aantonen van arbeids-gerelateerde blootstelling aan specifiek chroom-6 verbindingen.

Adem – exhaled breath condensate (EBC)

Ademlucht-analyse is sterk in opkomst als niet-invasieve meettechniek in een aantal gebieden. De belangrijkste toepassing, na alcoholcontroles, is biomedisch onderzoek, o.a. diagnostiek, prognostiek en surveillance van patiënten. Deze techniek is ook interessant voor biomonitoring. Uitgeademde lucht bestaat uit twee fasen: de gasfase (stikstof/zuurstof/koolstofdioxide) met daarin vluchtige verbindingen (bijvoorbeeld alcohol, aceton, amines, alkanen) en de vloeistoffase.

Deze vloeistof bestaat uit gecondenseerde waterdamp in combinatie met vloeistof die in bekleding van de luchtwegen aanwezig is (longblaasjes en bronchi). Deze fractie wordt aangeduid als ademluchtcondensaat (exhaled breath condensate, EBC). Deze kleine druppels bevatten de minder vluchtige fractie met daarin metalen en metaaloxides, eiwitten, bacteriën, stofwisselingsproducten en ook kleine slecht oplosbare partikels. De vloeistoffase is interessant voor biomonitoring van blootstelling aan metalen en metaalverbindingen zoals dat bij chroom-6 verbindingen het geval is.

Aksellson (1976) beschreef dat het mogelijk was om metalen, waaronder chroom in uitgeademde lucht te meten, evenals de deeltjesgrootteverdeling en samenstelling van de deeltjes. De toepassing om blootstelling aan chroom-6 verbindingen te bepalen was geen onderdeel van dat onderzoek. Sindsdien zijn er een aantal publicaties verschenen waarin EBC analyse gebruikt is om blootstelling aan chroom te meten. Leese et al (2016a) beschrijven een methode om in EBC een speciatie uit te voeren van chroom-3 en chroom-6 verbindingen. In een andere publicatie van Leese (2016b) wordt deze methode succesvol toegepast om chroom-6 verbindingen te meten bij werknemers aan het begin en aan het einde van de werkweek. Voor personen die direct contact hadden met chroom-6-verbindingen maar ook voor personen die geen direct contact hadden maar in dezelfde productieruimtes werkten waren de gehalten chroom-3 en chroom-6 verbindingen verhoogd ten opzicht van controlepersonen. Er is geen bijdrage gevonden van roken.

Er zijn geen publicaties gevonden waarin EBC wordt toegepast om blootstelling na velen jaren/decennia aan te tonen. In case studies zijn in de long verhoogde chroom gevonden door toepassing van de analyse van longweefsel (verkregen na biopsie of autopsie). Het is niet bekend of het mogelijk is om heel lang na blootstelling het in de longen aanwezige chroom via EBC (en ook BAL) te bemonsteren. In algemene zin kan geconcludeerd worden dat er te weinig literatuur is waarin het gebruik van BAL en EBC is uitgezocht voor de beantwoording van vraag-29, en in het bijzonder de vraag of lang na blootstelling nog verhoogde chroom concentraties gevonden worden bij de toepassing van deze bemonsteringsmethodes.

Deelconclusies:

- Blootstelling aan chroomverbindingen leidt tot verhoogde chroomgehalten in sputum, BAL en EBC monsters.
 - Voor EBC is in de literatuur beschreven dat het mogelijk is om daarin chroom-6 te bepalen na blootstelling aan chroom-6 verbindingen.
 - Er is geen informatie beschikbaar over de aantoonbaarheid van chroom-6 in sputum of BAL monsters.
- In het geval dat er blootstelling is geweest aan slecht wateroplosbare deeltjes die chroom bevatten, en als deze deeltjes lang (jaren) in de longen aanwezig blijven dan is het wellicht mogelijk om via de analyse van BAL en EBC monsters blootstelling aan chroom en mogelijk ook specifiek aan chroom-6 verbindingen aan te tonen. Hiervoor is echter nog geen bewijs.

5.9 Weefsels verkregen bij operaties of autopsie

Er zijn meerdere publicaties (zie IPCS 2013) waaruit blijkt dat bij werknemers met een (hoge) blootstelling aan chroom verhoogde chroomconcentraties in een breed scala aan weefsels en organen aantoonbaar zijn lang na pensionering (en daarmee

beëindiging van de verhoogde beroepsmatige blootstelling). Deze weefsels omvatten o.a. longen, milt, lever, nieren, aorta, hersenen, beenmerg, etc.. Analyse van chroom in deze weefsels is praktisch bijzonder lastig/niet uitvoerbaar bij levende personen als gevolg van de extreem invasieve monstername. Tijdens operaties, waaronder ook het verwijderen van tumorweefsel, is het nemen van een bipt van deze weefsels/organen in principe wel mogelijk. Hierin kan chroom gemeten worden, en een verhoogd chroomgehalte in vergelijking met referentieweefsel, of referentiewaarden, is dan een indicatie dat in het verleden een verhoogde blootstelling aan chroom heeft plaatsgevonden. Het is niet duidelijk uit de literatuur bij welk blootstellingsniveau dit mogelijk is. Er is geen informatie gevonden of het ook mogelijk is om specifiek de blootstelling aan chroom-6 verbindingen aan te tonen.

Deelconclusies:

- Lang na beëindiging van langdurige hoge blootstelling aan chroom bevat een breed scala aan weefsels/organen nog verhoogde chroomgehalten. Weefsels verkregen bij operaties of autopsie zijn daarmee mogelijk geschikt voor het aantonen van een verhoogde beroepsmatige blootstelling aan chroom. Het is niet bekend bij welk blootstellingsniveau dit mogelijk is.
- Er is geen informatie beschikbaar of het mogelijk is om op deze wijze aan te tonen dat er blootstelling aan chroom-6 verbindingen is geweest.

6 Biomarkers

Voor het bepalen van blootstelling aan chroom-6 verbindingen kan ook gebruik worden gemaakt van biomarkers. PubMed gaf op de zoektermen 'chromium' AND 'biomarker' 118 hits. Daarvan zijn er ca. 30 relevant voor beantwoording van de onderzoeksvraag. Hieronder staat een overzicht van de biomarkers uit deze publicaties. Ordening van deze lijst is op basis van het jaar van publicatie (aflopend). Oudere publicaties voor een biomarker zijn toegevoegd aan de meest recente publicatie.

- KIM-1 (kidney injury molecule-1) in urine, gecorreleerd aan chroom(-6) inname via drinkwater bij kinderen (Mexico, 5-12 jaar) [Cárdenas-González M, 2016]. Daarnaast ook 2 miRNA moleculen die correleren met blootstelling aan chroom-6 verbindingen.
- Hypermethylering van CpG1, CpG31 en CpG32 in p16-gen, *in vitro* experimenten met 16HBE cellen (humane bronchiaal epitheel cellen) bij blootstelling aan chroom-6 [Hu G, 2016].
- Hypomethylering van mitochondriaal phenylalanine tRNA (MT-TF) en 12S RNA (MT-RNR1) bij arbeiders blootgesteld aan chroom, correlatie met chroom gehalte in bloed [Yang L, 2016].
- β 2-MG, 8-OHdG, en micronucleus, zijn verhoogd bij arbeiders blootgesteld aan chroom via de lucht (in de hoge blootstellingsgroep, bij lagere blootstelling geen effect) [Li P, 2015].
- Aspartaat aminotransferase (AST, SGOT) in bloed van ratten blootgesteld aan chroom-6 verbindingen, na 15 dagen afname van AST, langere blootstelling geeft verhoging (16%) [Najafi M, 2013].
- DNA-protein cross-linking (DPC), toename van DPC's in lymfocyten (rat) bij blootstelling aan chroom-6 verbindingen, [Xiao F, 2013], [Mattagajasingh SN, 1996, 1999]. Verder ook in [Zecevic A, 2010], [Kuykendall JR, 2009, zoetwatervissen], [Meideiros MG 2003], [Paustenbach DJ 1999], [Zhitkovich A 1998], [Kuykendall JR, 1996], [Taioli E 1995], [Costa M 1993], [Toniolo 1993].
- BNMN, binucleated cells with micronuclei, verhoogd door blootstelling aan chroom-6 verbindingen (arbeiders in metaalindustrie, boeren als controlegroep) [Xiaohua L, 2012].
- Micronuclei en andere nucleusafwijkingen, verhoogd bij arbeiders in chroom-verwerkende industrie (verchromen) [Sudha S. 2011], verder ook o.a. [Meideiros MG 2003].
- Aconitase-inhibitie in mitochondria van humane bronchiaal epitheel cellen bij blootstelling aan chroom-6 verbindingen, geen *in vivo* data [Myers CR, 2010].
- SOD (superoxide dismutase), GPx (glutathion peroxidase), en MT (metallothioneine), toename bij blootstelling van goudvissen aan chroom-6 verbindingen [Velma V, 2011].
- GPx (glutathione peroxidase) en GR inhibitie (glutathione reductase) in fetal human lung fibroblasts (HLF) [Asatiani N, 2010].
- DNA breuken (Comet assay), bij arbeiders in leerlooierij, correlatie met blootstelling aan chroom-3 verbindingen en correlatie met gehalten chroom-3 verbindingen in bloed [Zhang M, 2008], verder ook o.a. [Lee AJ, 2004].
- Upregulatie ApoJ/CLU expressie bij lassers blootgesteld aan chroom via de lucht, [Alexopoulos EC 2008].

- 8-OHdG, correlatie met arsenicum en chroom in urine bij gezonde mensen (Japan), [Kimura S, 2006], andere bronnen o.a. [Wong RH 2005], [Mukherjee S, 2004], [Kuo HW 2003], [Toraason M, 1999].
- p53 eiwit in bloed, toename bij werknemers blootgesteld aan chroom [Hanaoka T 1997]
- Malondialdehyde in urine, verhoogd bij arbeiders in chroom-verwerkende industrie (verchromen) [Huang YL 1999].

Deze lijst is waarschijnlijk niet volledig, in oudere literatuur (voor 1993) worden mogelijk nog andere biomarkers beschreven, maar geeft wel een accuraat beeld van biomarker-onderzoek van de afgelopen 20 jaar. De biomarkers zijn gerelateerd aan oxidatieve stress, DNA-schade en weefsel/orgaan schade. Geen van de biomarkers is specifiek voor de blootstelling aan chroom-6 verbindingen, en een toename kan door blootstelling aan heel veel andere stoffen veroorzaakt worden (bijv. roken). Via biomarker levels is het niet mogelijk om de blootstelling te kwantificeren, omdat deze in grote mate ook door genetische en andere factoren (gezondheidsstatus, lifestyle, leeftijd, etc) worden beïnvloed alsmede door de verbinding (onder andere oplosbaarheid) en blootstellingsroute.

Daarnaast zijn deze biomarkers niet persistent, na beëindiging van de blootstelling gaan deze terug naar normaalwaardes. De snelheid waarmee dat gebeurt varieert, maar geen van de biomarkers zal na jaren nog detecteerbaar zijn.

Deelconclusies:

- Blootstelling aan chroom-6 verbindingen leidt tot de vorming, of verhoging van het gehalte van een breed scala aan biomarkers.
- Een aantal van deze biomarkers is alleen onderzocht in diermodellen en celkweek.
- De meest gerapporteerde biomarker is DNA-protein cross-linking.
- Geen van deze biomarkers is specifiek voor blootstelling aan chroom-6 verbindingen, ook andere stoffen kunnen resulteren in verhoging van deze biomarkers. Daarom zijn deze biomarkers niet geschikt als bewijs voor blootstelling aan chroom-6 verbindingen.
- De meeste biomarkers verdwijnen na beëindiging van de blootstelling.

7 Conclusies

Uit bovenstaande kan geconcludeerd worden dat de onderzoeksvraag “*Kan blootstelling aan chroom-6 in het lichaam worden aangetoond/gemeten (zowel tijdens de blootstellingsperiode als achteraf)?*” niet eenduidig te beantwoorden is; er zijn verschillende antwoorden mogelijk die hieronder nader worden toegelicht.

Ten aanzien van de korte termijn, gedurende periodes van blootstelling, is het antwoord ja. Het chroomgehalte in urine en bloed geeft informatie over de blootstelling aan chroomverbindingen. Deze gehalten in urine en bloed kunnen worden gerelateerd aan de externe inhalatoire blootstelling, mits die relatie eerder is vastgesteld. Recente literatuur geeft aan dat in ademluchtcondensaat (EBC) chroom-3 en chroom-6 verbindingen apart bepaald kunnen worden. De verhoogde uitscheiding van chroom in urine kan langer aanhouden. Hiervoor zijn twee mechanismen bekend: het langzaam vrijkomen van een depot van chroomverbindingen in cellen zoals in bloedcellen en weefsels waaronder ook bot. Het tweede mechanisme is depotvorming van slecht wateroplosbare chromaten of chromaat-bevattende deeltjes in het lumen van de longen en het vrijkomen van chroom uit deze opslag over een periode van vele jaren. Voor dit tweede mechanisme en de stapeling van chroom in weefsels is het niet mogelijk om eenduidig te beantwoorden hoe lang dit leidt tot verhoogde uitscheiding van chroom in de urine. Dit hangt af van de chroomverbinding, de deeltjessamenstelling, en niveau en duur van de blootstelling.

Analyse van weefselbiopten, verkregen middels een punctie of tijdens operaties en autopsie, is mogelijk geschikt om na lange tijd (vele jaren) een verhoogde blootstelling aan chroomverbindingen vast te stellen (o.a. bot, longweefsel, maar ook nier, lever, milt, beenmerg en mogelijk ook tanden). Hiervoor zijn geen normaalwaardes beschikbaar waardoor de interpretatie van het gemeten chroomgehalte t.a.v. mogelijke arbeids-gerelateerde blootstelling niet eenduidig is. Uit geen van deze analyses kan worden geconcludeerd hoe lang geleden en over welke tijdsduur chroomverbindingen zijn opgenomen, en of het daarbij ging om chroom-6 houdende verbindingen. Dat laatste kan alleen als die nog worden aangetoond, zoals bijvoorbeeld met de onlangs gepubliceerde methode voor uitgeademde lucht (EBC).

Andere matrices, zoals haar en nagels, zijn niet geschikt voor het aantonen van blootstelling aan chroom-6 verbindingen kort (dagen) of heel lang (jaren) na blootstelling.

Biomarkers zijn niet geschikt voor het aantonen van blootstelling over een lange termijn. Op de korte termijn na blootstelling mogelijk wel, maar dat biedt geen voordelen t.o.v. de analyse van chroom zelf in bloed of urine.

8 Literatuur

Akselsson, K.R., Desaedeleer, G.G., Johansson, T.B., Winchester, J.W., Particle size distribution and human respiratory deposition of trace metals in indoor work environments, (1976) *Annals of Occupational Hygiene*, 19 (3-4), pp. 225-238.

Alexopoulos EC, Cominos X, Trougakos IP, Lourda M, Gonos ES, Makropoulos V., Biological monitoring of hexavalent chromium and serum levels of the senescence biomarker apolipoprotein J/Clusterin in welders., *Bioinorg Chem Appl*. 2008:420578. doi: 10.1155/2008/420578.

Arruda-Neto, J.D.T. , Geraldo, L.P., Prado, G.R., Garcia, F., Bittencourt-Oliveira, M.C., Sarkis, J.E.S., Martinez-Lusardo, F., Lima-Cazorla, L., Rosa-Medero, D., Rodrigues, T.E., Genofre, G.C. , Study of metals transfer from environment using teeth as biomonitor, *Environment International*, Volume 36, Issue 3, April 2010, Pages 243-246

Asatiani N, Abuladze M, Kartvelishvili T, Kulikova N, Asanishvili L, Holman HY, Sapojnikova N., Response of antioxidant defense system to chromium (VI)-induced cytotoxicity in human diploid cells., *Biometals*. 2010 Feb;23(1):161-72. doi: 10.1007/s10534-009-9276-6. Epub 2009 Nov 15.

ATSDR, 2012. Toxicological profile for chromium. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, TP7, September 2012. <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp7.pdf>

BGI/GUV-I 504-15 März 2009, Information: Handlungsanleitung für die arbeitsmedizinische Vorsorge nach dem Berufsgenossenschaftlichen Grundsatz G 15 „Chrom-VI-Verbindungen“, <http://publikationen.dguv.de/dguv/pdf/10002/i-504-15.pdf>.

Brandão MHT, Gontijo B (2012), Contact sensitivity to metals (chromium, cobalt and nickel) in childhood. *An Bras Dermatol*. 87(2): 269-76.

Cárdenas-González M, Osorio-Yáñez C, Gaspar-Ramírez O, Pavković M, Ochoa-Martínez A, López-Ventura D, Medeiros M, Barbier OC, Pérez-Maldonado IN, Sabbisetti VS, Bonventre JV, Vaidya VS., Environmental exposure to arsenic and chromium in children is associated with kidney injury molecule-1., *Environ Res*. 2016 Oct;150:653-62. doi: 10.1016/j.envres.2016.06.032. Epub 2016 Jul 15.

Cavalleri A, Minoia C (1985) Distribution in serum and erythrocytes and urinary elimination in workers exposed to chromium(VI) and chromium(III)., *Giornale Italiano di Medicina del Lavoro*, 7:35–38.

Corhay JL, Bury T, Delavignette JP, Baharloo F, Radermecker M, Hereng P, Fransolet AM, Weber G, Roelandts I., Nonfibrous mineralogical analysis of bronchoalveolar lavage fluid from blast-furnace workers., *Arch Environ Health*. 1995 Jul-Aug;50(4):312-9.

Garcia F, Ortega A, Domingo JL, Corbella J (2001), Accumulation of metals in autopsy tissues of subjects living in Tarragona County, Spain., *Journal of*

Environmental Science and Health., Part A, Toxic/Hazardous Substances & Environmental, Engineering, 36:1767–1786.

Gomes E. 1972. Incidence of chromium-induced lesions among electroplating workers in Brazil. *Ind Med* 41(12):21-25.

Gómez, V., Callao, M.P., Chromium determination and speciation since 2000, (2006) *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 25 (10), pp. 1006-1015.

Hu G, Li P, Li Y, Wang T, Gao X, Zhang W, Jia G., Methylation levels of P16 and TP53 that are involved in DNA strand breakage of 16HBE cells treated by hexavalent chromium., *Toxicol Lett.* 2016 May 13;249:15-21. doi: 10.1016/j.toxlet.2016.03.003. Epub 2016 Mar 19.

IPCS (2013) Concise international chemical assessment document 78. Inorganic chromium(VI) compounds.

Junaid M, Hashmi MZ, Malik RN., Evaluating levels and health risk of heavy metals in exposed workers from surgical instrument manufacturing industries of Sialkot, Pakistan., *Environ Sci Pollut Res Int.* 2016 Sep;23(18):18010-26. doi: 10.1007/s11356-016-6849-0.

Kuo HW, Chang SF, Wu KY, Wu FY., Chromium (VI) induced oxidative damage to DNA: increase of urinary 8-hydroxydeoxyguanosine concentrations (8-OHdG) among electroplating workers., *Occup Environ Med.* 2003 Aug;60(8):590-4.

Kuykendall JR, Kerger BD, Jarvi EJ, Corbett GE, Paustenbach DJ., Measurement of DNA-protein cross-links in human leukocytes following acute ingestion of chromium in drinking water., *Carcinogenesis.* 1996 Sep;17(9):1971-7.

Kuykendall JR, Miller KL, Mellinger KM, Cain AJ, Perry MW, Bradley M, Jarvi EJ, Paustenbach DJ., DNA-protein cross-links in erythrocytes of freshwater fish exposed to hexavalent chromium or divalent nickel., *Arch Environ Contam Toxicol.* 2009 Feb;56(2):260-7. doi: 10.1007/s00244-008-9175-9. Epub 2008 May 28.

Lee AJ, Hodges NJ, Chipman JK., Modified comet assay as a biomarker of sodium dichromate-induced oxidative DNA damage: optimization and reproducibility., *Biomarkers.* 2004 Mar-Apr;9(2):103-15.

Lee, C.-F., Chen, B.-H., Huang, Y.-L., Determining Cr(III) and Cr(VI) in urine using a flow injection on-line sorption separation system coupled with electrothermal atomic absorption spectrometry and a UV/nano-Au/TiO₂ photocatalysis reduction device, *Talanta* Volume 77, Issue 2, 15 December 2008, Pages 546-550.

Leese, E., poster at the “European Winter Conference on Plasma Spectrochemistry”, Münster, Germany. 22.02.2015 - 25.02.2015.

Leese, E., poster at “3rd UK & Ireland Exposure Science Meeting”, London, UK. 24.04.2015

Leese, E., Morton, J., Gardiner, P.H.E., and Carol, V.A., Development of a method for the simultaneous detection of Cr(III) and Cr(VI) in exhaled breath condensate samples using μ LC-ICP-MS *J. Anal. At. Spectrom.*, 2016a,31, 924-933

Leese E, Morton J, Gardiner PH, Carolan VA. The simultaneous detection of trivalent & hexavalent chromium in exhaled breath condensate: A feasibility study comparing workers and controls *Int J Hyg Environ Health*. 2016b Dec 6. pii: S1438-4639(16)30262-0. doi: 10.1016/j.ijheh.2016.12.003. [Epub ahead of print]

Li P, Li Y, Zhang J, Yu SF, Wang ZL, Jia G., Establishment of a reference value for chromium in the blood for biological monitoring among occupational chromium workers., *Toxicol Ind Health*. 2015 May 5. doi:pii: 0748233715580227. [Epub ahead of print]

Medeiros MG, Rodrigues AS, Batoréu MC, Laires A, Rueff J, Zhitkovich A., Elevated levels of DNA-protein crosslinks and micronuclei in peripheral lymphocytes of tannery workers exposed to trivalent chromium., *Mutagenesis*. 2003 Jan;18(1):19-24.

Minoia C, Cavalleri A (1988) Chromium in urine, serum and red blood cells in the biological monitoring of workers exposed to different chromium valency states. *Science of the Total Environment*, 71:323–327.

Mukherjee S, Palmer LJ, Kim JY, Aeschliman DB, Houk RS, Woodin MA, Christiani DC., Smoking status and occupational exposure affects oxidative DNA injury in boilermakers exposed to metal fume and residual oil fly ash., *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2004 Mar;13(3):454-60.

Mukherjee S, Rodrigues E, Aeschliman DB, Houk RS, Palmer LJ, Woodin MA, Weker R, Christiani DC., Urinary metal and polycyclic aromatic hydrocarbon biomarkers in boilermakers exposed to metal fume and residual oil fly ash., *Am J Ind Med*. 2005 Jun;47(6):484-93.

Murgia N, Muzi G, Dell' Omo M, Montuschi P, Melchiorri D, Ciabattini G, Abbritti EP, Orazi N, Sapia IE, Abbritti G., Induced sputum, exhaled breath condensate and nasal lavage fluid in electroplating workers exposed to chromium., *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2006 Oct-Dec;19(4 Suppl):67-71.

Myers CR, Antholine WE, Myers JM., The pro-oxidant chromium(VI) inhibits mitochondrial complex I, complex II, and aconitase in the bronchial epithelium: EPR markers for Fe-S proteins., *Free Radic Biol Med*. 2010 Dec 15;49(12):1903-15. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.020. Epub 2010 Sep 27.

Najafi M, Roustazadeh A, Moshtaghie AA, Ani M., Liver aspartate transaminase isoenzymes as biomarkers of chronic exposure to chromium(VI)., *Arh Hig Rada Toksikol*. 2013 Dec;64(4):547-52. doi:10.2478/10004-1254-64-2013-2358.

NIOSH. 1975 Criteria for a recommended standard: Occupational exposure to chromium(VI). U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control, National, Institute for Occupational Safety and Health, Washington D.C. HEW (NIOSH) publication no. 76–129.

NIOSH. 2013 Criteria for a Recommended Standard Occupational Exposure to Hexavalent Chromium. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control, National, Institute for Occupational Safety and Health, Washington D.C.

Nomiyama K, Nomiyama H, Yotoriyama M. 1982. Low-molecular-weight proteins in urine from rabbits given nephrotoxic compounds. *Ind Health* 20:1-10.

Roberts WE, et al., Fisiologia y metabolismo oseo. In: Misch C, editor: *Implantologia contemporanea*. Madrid: Mosby, 1995. ISBN 84-8086-384-6 pages 324-350

Scheepers P.T.J. , Heussen G.A.H., Peer P.G.M., Verbist K. , Anzion R., Willems J., Characterisation of exposure to total and hexavalent chromium, of welders using biological monitoring, *Toxicology Letters* 178 (2008) 185–190

Soko, L., Cukrowska, E. , Chimuka, L., Extraction and preconcentration of Cr(VI) from urine using supported liquid membrane, *Analytica Chimica Acta*, Volume 474, Issue 1-2, 9 December 2002, Pages 59-68.

Sudha S, Kripa SK, Shibily P, Shyn J. , Elevated Frequencies of Micronuclei and other Nuclear Abnormalities of Chrome Plating Workers Occupationally Exposed to Hexavalent Chromium., *Iran J Cancer Prev*. 2011 Summer;4(3):119-24.

Taioli E, Zhitkovich A, Kinney P, Udasin I, Toniolo P, Costa M., Increased DNA-protein crosslinks in lymphocytes of residents living in chromium-contaminated areas., *Biol Trace Elem Res*. 1995 Dec;50(3):175-80.

Takagi Y, Matsuda S, Imai S, Ohmori Y, Masuda T, Vinson JA, Mehra MC, Puri BK, Kaniewski A (1986) Trace elements in human hair: an international comparison., *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 36:793–800.

Toniolo P, Zhitkovich A, Costa M., Development and utilization of a new simple assay for DNA-protein crosslinks as a biomarker of exposure to welding fumes., *Int Arch Occup Environ Health*. 1993;65(1 Suppl):S87-9.

Toraason M., 8 Hydroxydeoxyguanosine as a biomarker of workplace exposures., *Biomarkers*. 1999;4(1):3-26. doi: 10.1080/135475099230967.

Vanoirbeek JA, Hoet PH, Nemery B, Verbeken EK, Haufroid V, Lison D, Dinsdale, D. Kinetics of an intratracheally administered chromium catalyst in rats., *J Toxicol Environ Health A*, 2003 Feb 28;66(4):393-409.

Velma V, Tchounwou PB., Hexavalent chromium-induced multiple biomarker responses in liver and kidney of goldfish, *Carassius auratus*., *Environ Toxicol*. 2011 Nov;26(6):649-56. doi: 10.1002/tox.20602. Epub 2010 May 20.

Wang, H.-J, Du, X.-M., Wang, M., Wang, T.-C., Ou-Yang, H., Wang, B., Zhu, M.-T., Wang, Y., Ji, G., Feng, W.-Y., Using ion-pair reversed-phase HPLC ICP-MS to simultaneously determine Cr(III) and Cr(VI) in urine of chromate workers, *Talanta* Volume 81, Issue 4-5, 15 June 2010, Pages 1856-1860.

Wong RH, Kuo CY, Hsu ML, Wang TY, Chang PI, Wu TH, Huang S., Increased levels of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine attributable to carcinogenic metal exposure among schoolchildren., *Environ Health Perspect*. 2005 Oct;113(10):1386-90.

Xiao F, Chen D, Luo L, Zhong X, Xie Y, Zou L, Zeng M, Guan L, Zhong C., Time-order effects of vitamin C on hexavalent chromium induced mitochondrial damage and DNA-protein crosslinks in cultured rat peripheral blood lymphocytes., *Mol Med Rep*. 2013 Jul;8(1):53-60. doi: 10.3892/mmr.2013.1462. Epub 2013 May 8.

Xiaohua L, Yanshuang S, Li W, Yuhui L, Ji Z, Yanhui M, Yun W, Wenjun M, Lei Y, Guang J., Evaluation of the correlation between genetic damage and occupational

chromate exposure through BNMN frequencies., *J Occup Environ Med.* 2012 Feb;54(2):166-70. doi: 10.1097/JOM.0b013e31823d86b4.

Yang L, Xia B, Yang X, Ding H, Wu D, Zhang H, Jiang G, Liu J, Zhuang Z., Mitochondrial DNA hypomethylation in chrome plating workers., *Toxicol Lett.* 2016 Jan 22;243:1-6. doi: 10.1016/j.toxlet.2015.11.031. Epub 2015 Dec 3.

Zecevic A, Hagan E, Reynolds M, Poage G, Johnston T, Zhitkovich A., XPA impacts formation but not proteasome-sensitive repair of DNA-protein cross-links induced by chromate., *Mutagenesis.* 2010 Jul;25(4):381-8. doi: 10.1093/mutage/geq017. Epub 2010 Apr 21.

Zhang M, Chen Z, Chen Q, Zou H, Lou J, He J., Investigating DNA damage in tannery workers occupationally exposed to trivalent chromium using comet assay., *Mutat Res.* 2008 Jun 30;654(1):45-51. doi: 10.1016/j.mrgentox.2008.04.011. Epub 2008 May 3.


9 Ondertekening

Zeist



Drs. M.A.J. Rennen
Research Manager

TNO



Dr. E.R. Verheij
Auteur