

Aus der Klinik und Poliklinik für Hals- Nasen- und Ohrenkrankheiten
der Universität Würzburg

Direktor:
Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h. c. J. Helms

Auswirkungen von Passivrauchen auf Kinder:
Biomonitoring mit biochemischen und genotoxischen Markern;
Vergleich des Zytokineblock-Mikrokernassays
an frischen und kryokonservierten Blutlymphozyten

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde der Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg
vorgelegt von
Mathias Heinrich Krockenberger
aus
Sulzbach-Laufen

Würzburg, Februar 2005

Referentenblatt

Referent: Herr Priv.-Doz. Dr. med. G. Baier (Universitätsklinik für Hals-Nasen-Ohren Krankheiten der Universität Würzburg)

Koreferentin: Frau Univ.-Prof. Dr. rer.nat. H. Stopper (Institut für Toxikologie der Universität Würzburg)

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. med. G. Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 12.07.2005

Der Promovend ist Arzt

Inhaltsverzeichnis

	Seite(n)
1 Einleitung	1-13
1.1 Fragestellung der vorliegenden Arbeit	1-2
1.2 Entstehung und Inhaltsstoffe des Tabakrauches	2-4
1.3 Folgen des aktiven Rauchens für die Gesundheit	4-6
1.3.1 Entzündliche Erkrankungen des Respirationstraktes	5
1.3.2 Arterielle Verschlusskrankheiten	5
1.3.3 Malignomkrankheiten	5-6
1.4 Environmental Tobacco Smoke: Verbreitung und Gefahrenpotential	6-8
1.5 Environmental Tobacco Smoke: Folgen für die Gesundheit	8-9
1.5.1 Entzündliche Erkrankungen des Respirationstraktes	8
1.5.2 Arterielle Verschlusskrankheiten	8
1.5.3 Malignomkrankheiten	9
1.6 Environmental Tobacco Smoke: Folgen für die Gesundheit bei Kindern	10-11
1.7 Vorstellung der verwendeten Testsysteme	11-13

	Seite(n)	
1.7.1	Massenspektrometrische Analyse von Hämoglobinaddukten der tabakrauchspezifischen aromatischen Amine 3- und 4-Aminobiphenyl	11-12
1.7.2	Zytokineseblock-Mikrokernassay	13
2	Material und Methoden	14-26
2.1	Arbeitsgeräte und Chemikalien	14-15
2.1.1	Allgemeine Laborchemikalien und Verbrauchsmaterialien	14
2.1.2	Verwendete Arbeitsgeräte	14-15
2.2	Medien und Substanzen zur Aufarbeitung und Kultivierung der Blutproben	15-17
2.2.1	Trennmedium	15
2.2.2	Lymphozytenmedium	15
2.2.3	Zellzyklusstimulator	16
2.2.4	Zytokinesehemmer	16
2.2.5	Einfriermedium und Einfriermaterialien	16
2.2.6	Erythrozytenwaschung	16

	Seite(n)
2.2.7 Hämoglobin-Fällung	17
2.2.8 Hämoglobin-Hydrolyse	17
2.2.9 Gaschromatographie/Massenspektrometrie	17
2.3 Aufarbeitung der Vollblutproben und der einzelnen Blutbestandteile	18-24
2.3.1 Aufarbeitung der Vollblutproben	18
2.3.2 Aufarbeitung, Kultivierung und Beurteilung der Lymphozyten ohne deren Einfrierung mit dem Zytokineseblock-Mikrokernassay	19-20
2.3.3 Aufarbeitung, Kultivierung und Beurteilung der tiefgefrorenen Lymphozyten mit dem Zytokineseblock-Mikrokernassay	20-21
2.3.4 Aufarbeitung der Erythrozyten	21-24
2.3.4.1 Fällung des Hämoglobins aus den Erythrozyten	21-22
2.3.4.2 Hydrolyse des Hämoglobins	22-23
2.3.4.3 Analyse der eluierten Aminoaromaten	23-24
2.4 Klinische Untersuchung, Fragebögen	24-25
2.5 Statistik und Datendarstellung	25-26

	Seite(n)
3 Ergebnisse	27-50
3.1 Biochemische Marker	27-30
3.2 Marker für Genomschädigung	30-31
3.3 Korrelation der Hämoglobinaddukte von 4-ABP mit den Mikrokernen bei exponierten Kindern	32
3.4 Altersabhängige Verteilung der Hämoglobinaddukte bei exponierten Kindern	33-35
3.5 Altersabhängige Differenz der Mikrokernraten	35-39
3.6 Zytokineseblock-Mikrokernassay mit tiefgefrorenen Lymphozyten	39-42
3.7 Epidemiologische Auswertung der Fragebögen	42-47
3.7.1 Atopische Erkrankungen	43-44
3.7.2 Paukenergüsse und Otitiden	44
3.7.3 Rachenmandelhyperplasie und Erkrankungen der Gaumenmandeln	45-46
3.7.4 Chronische Bronchitis	46
3.7.5 Asthma	47

	Seite(n)
3.7.6 Rezidivierende Infekte	47
3.8 Evaluation möglicher Störgrößen anhand der Fragebögen	47-50
4 Diskussion	51-64
4.1 Biochemische Marker	51-54
4.2 Marker für Genomschädigung	54-57
4.3 Korrelation der Hämoglobinaddukte von 4-Aminobiphenyl mit den Mikrokernen exponierter Kinder	58
4.4 Ergebnisse des Vergleichs des Mikrokernassays mit frischen und eingefrorenen Lymphozyten	58-60
4.5 Ergebnisse der Fragebogenauswertung	60-62
4.6 Evaluation möglicher Störgrößen	63-64
5 Zusammenfassung	65-67
7 Zitate	68-78
8 Anhang	79-88
9 Abkürzungsverzeichnis	

1 Einleitung

1.1 Fragestellung der vorliegenden Arbeit

Im Jahre 1998 rauchten weltweit etwa 70% aller Männer und ca. 34% aller Frauen. In Deutschland zählten 40% aller männlichen Erwachsenen und 30% aller weiblichen Erwachsenen zu den aktiven Rauchern (Gesundheitssurvey 1998). Die Auswirkungen des aktiven Rauchens werden intensiv erforscht. Doch angesichts solch hoher Raucherprävalenzen stellte sich die Frage, ob sich aktive Raucher nur selbst schädigen oder ob die nichtrauchende Bevölkerung ebenfalls die Gesundheitsgefahr durch passives Rauchen mitzutragen hat.

Bisherige Arbeiten zum Thema Passivrauchen und Gesundheit untersuchten vor allem die schädlichen Auswirkungen auf Erwachsene. Die Bevölkerungsgruppe der Kinder und Jugendlichen, die oft keine Möglichkeit hat, sich häuslichem Tabakrauch in der Raumluft (engl. Environmental Tobacco Smoke, abgekürzt ETS) – verursacht zum Beispiel durch rauchende Eltern – zu entziehen, wurde bisher kaum untersucht.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit Kindern beziehungsweise Jugendlichen zwischen zwei und 16 Jahren, die im häuslichen Milieu Tabakrauch ausgesetzt waren, und untersucht diese Exposition zum einen mit einem biochemischen Marker, den Hämoglobinaddukten (abgekürzt Hb-Addukten) der aromatischen Amine 3- und 4-Aminobiphenyl (abgekürzt 3- und 4-ABP), die im Tabakrauch enthalten waren. Die Bestimmung der Menge der gebildeten Hb-Addukte erfolgte mit einem massenspektrometrischen Analyseverfahren. Zum anderen wurde die Exposition gegenüber Passivrauch mit einem Verfahren zur Feststellung gentoxischer Schäden – dem in-vitro Zytokineseblock-Mikrokernassay – überprüft. Dabei dienten Mikrokerne (abgekürzt MK) in Lymphozyten des peripheren Blutes als Marker für eine Genomschädigung. Die Grundlage dieser Untersuchungen bildete eine Elternbefragung mit Fragebögen, in denen auch die Rauchgewohnheiten der Eltern erhoben wurden.

Anhand der gewonnenen Ergebnisse erfolgte eine Einteilung der teilnehmenden Kinder in eine Gruppe mit Tabakrauch-Exposition und eine Gruppe ohne Tabakrauch-Exposition. Die Fragebögen dienten außerdem der Erfassung der Prävalenzen von Passivrauchassoziierten Krankheiten beim Probandenkollektiv.

Ein weiterer Teil dieser Arbeit verglich den Zytokineseblock-Mikrokernassay mit frischen und vor Aufarbeitung tiefgefrorenen Lymphozyten. Damit sollte überprüft werden, ob sich der Mikrokernassay in vergleichbarer Qualität auch mit tiefgefrorenen Lymphozyten durchführen lässt. Dies würde eine größere Flexibilität hinsichtlich der Blutprobenentnahme und dem Aufarbeitungsort sowie dem Aufarbeitungszeitpunkt gewährleisten, da kryokonservierte Lymphozyten gegenüber Umwelteinflüssen resistenter sind als frische Zellen und deshalb vor Verarbeitung wesentlich länger zwischengelagert und transportiert werden könnten.

1.2 Entstehung und Inhaltsstoffe des Tabakrauches

Beim Rauchen von Tabak entsteht so genannter Hauptstromrauch, – vom Raucher willentlich inhaliert, mit der Absicht, die Wirkung des Hauptalkaloids des Tabakrauches, das Nikotin, zu verspüren – sowie Nebenstromrauch, der in den Rauchpausen durch Abbrand des Tabaks entsteht (siehe Abb. 1.1).

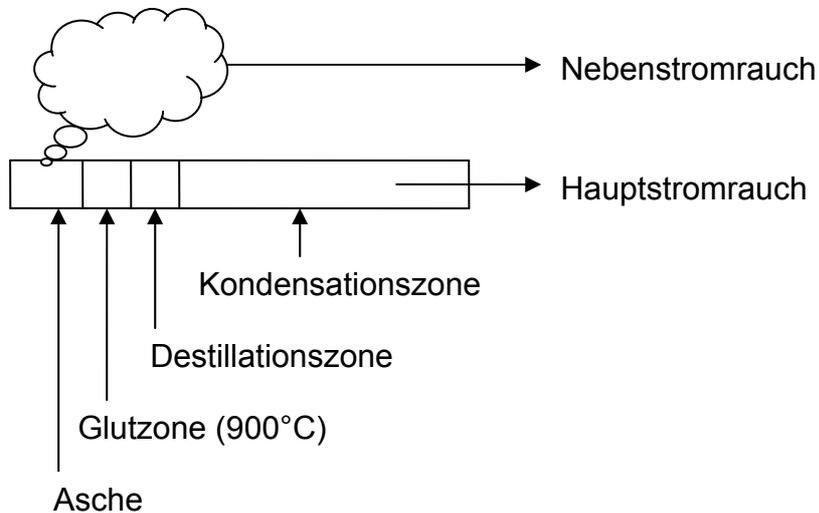


Abb.1.1: Schematische Darstellung einer Zigarette und der beim Rauchen entstehenden unterschiedlichen Reaktionszonen

Nach Entzünden der Zigarette wird durch das Inhalieren ein Sog erzeugt, der in der Glutzone Temperaturen von bis zu 900°C entstehen lässt, so dass es zur thermischen Zersetzung organischer und anorganischer Materialien kommt. Die gasförmigen Reaktionsprodukte destillieren mit freiwerdendem Wasserdampf in der Destillationszone. Durch Abkühlung entsteht dann ein Aerosol, das sich mit sinkender Temperatur in der Kondensationszone absetzt. Dieses Aerosol schlägt sich bei Abrauchen der Zigarette immer wieder in der Kondensationszone nieder und wird bei weiteren Zügen an der Zigarette erneut freigesetzt und über den Hauptstromrauch inhaliert, wobei zum Mund hin die Konzentration der Rauchinhaltsstoffe im Destillat immer mehr zunimmt. Deshalb ist die absolute Menge der inhalierten Schadstoffe umso höher, je weiter die Zigarette abgeraucht wird.

In den Rauchpausen erfolgt eine Abdestillation nach außen, die jedoch unter wesentlich geringeren Temperaturen erfolgt, weshalb die Zusammensetzung des Haupt- und Nebenstromrauches variieren. Die totale Nikotinkonzentration im Nebenstromrauch ist höher als im Hauptstromrauch. Aufgrund von Verdünnung des Nebenstromrauches in der Raumluft wird jedoch mehr Nikotin über die direkte Rauchinhalation aufgenommen (Dekant et al. 2001). Dieser Nebenstromrauch sowie der vom aktiven Raucher wieder ausgeatmete Rauch bilden den ETS. Tabakrauch ist ein Gemisch von Gasen und Aerosolen. Bisher wurden mehr als 5000 verschiedene Rauchinhaltsstoffe charakterisiert. Besondere Beachtung verdienen das Nikotin, Kohlenstoffmonoxid, Stickstoffmono- und dioxid, verschiedene Reizgase und diverse Kanzerogene. Bei den Kanzerogenen galt das Interesse insbesondere dem Benzo[*a*]pyren und anderen polyzyklischen Kohlenwasserstoffen, den Nitrosaminen und aromatischen Aminen sowie einigen Schwermetallen wie Kupfer, Arsen und Chrom. Das besondere Augenmerk dieser Arbeit lag bei den aromatischen Aminen, von denen das 3- und 4-ABP als Hb-Addukte nachgewiesen wurden (Dekant et al. 2001).

1.3 Folgen des aktiven Rauchens für die Gesundheit

Die Häufigkeit von Erkrankungen durch Rauchen hatte bis heute diejenige der Erkrankungen durch mikrobielle Erreger erreicht, dennoch waren die Zahlen der Raucher in der Gesamtbevölkerung keineswegs rückläufig. Der Grund hierfür ist in dem hohen Abhängigkeitspotential des Nikotins – dem Hauptwirkstoff des Tabakrauches – zu sehen (Dekant et al. 2001). Die mit dem aktiven Rauchen assoziierten Krankheiten wurden vor allem durch eine follow-up-Studie über einen Zeitraum von 40 Jahren an britischen Ärzten (Doll et al. 1994) dargestellt. Doll et al. 1994 untersuchten hauptsächlich drei große Krankheitsgruppen und ihre Assoziation mit dem Rauchen, nämlich entzündliche Erkrankungen des Respirationstraktes, arterielle Verschlusskrankheiten und Malignom-erkrankungen.

Dazu unterteilten Doll et al. 1994 die teilnehmenden Probanden in Raucher, Ex-Raucher und Personen, die noch nie geraucht hatten (Nie-Raucher).

1.3.1 Entzündliche Erkrankungen des Respirationstraktes

Hier wurden für die chronisch obstruktive Lungenkrankheit (abgekürzt COPD) – die Pneumonie sowie die Lungentuberkulose – die höchsten Mortalitätsraten bei den Rauchern gefunden, vor der Gruppe der Ex-Raucher und den Personen, die noch nie geraucht hatten. Nur bei Asthmaerkrankungen lagen die Mortalitätsraten der Ex-Raucher höher als die der Raucher. Beide übertrafen jedoch die Raten der Nie-Raucher.

1.3.2 Arterielle Verschlusskrankheiten

Besonders stark war die koronare Herzkrankheit (KHK) mit dem Rauchen assoziiert. Die Mortalität der Raucher an KHK betrug demnach 892/100 000 gegenüber 678/100 000 bei den Ex-Rauchern und 572/100 000 bei den Nie-Rauchern. Desweiteren wiesen die Raucher die höchsten Mortalitätsraten an Herzinsuffizienz, Aortenaneurysma, Arteriosklerose und Hypertonie sowie cerebralen Gefäßkrankheiten wie ischämischem oder hämorrhagischem Hirninfarkt auf, jeweils vor den Ex-Rauchern und den Nie-Rauchern.

1.3.3 Malignomkrankheiten

Die Mortalität an neoplastischen Erkrankungen betrug für Raucher 656/100 000, für Ex-Raucher 384/100 000 und für Nie-Raucher 305/100 000. Raucher starben häufiger an bösartigen Tumoren des oberen Resprationstraktes, der Lunge, des Ösophagus, des Pankreas und des Magens, der Leber, der Niere und der Prostata.

Hier waren jeweils die Ex-Raucher am zweithäufigsten betroffen vor den Nie-Rauchern. Zu ähnlichen Ergebnissen in Bezug auf Malignome und Tabakrauch kam auch die International Agency for Research on Cancer 1986, die das Rauchen als mögliche Ursache für 80-90% aller Lungenmalignome, 70-80% aller Ösophaguskarzinome, 80-90% aller Larynxkarzinome, 30% aller Pankreaskarzinome, 40-50% aller Blasenkarzinome, zehn bis 50% aller Nieren- und 30% aller Zervixkarzinome anführte. Doll et al. 1994 fanden bei britischen Ärzten eine klare Verkürzung der Lebensdauer unter den Rauchern, die direkt mit der Anzahl der Zigaretten pro Tag korrelierte.

In der Langzeitbeobachtung über 40 Jahre zeigten die Ergebnisse, dass von den Nie-Rauchern bis zum 70. Lebensjahr noch 80% von der ursprünglichen Gruppe am Leben waren. Wurden eine bis 14 Zigaretten pro Tag geraucht, sank der Anteil der Überlebenden bis zum 70. Lebensjahr auf 70%, bei einem Konsum von 15-24 Zigaretten täglich lebten im 70. Lebensjahr nur noch 60%, bei einem Konsum von mehr als 25 Zigaretten pro Tag lebten nur noch 50% der ursprünglichen Gruppe.

Noch deutlicher trat die Lebenszeitverkürzung durch Rauchen bei Beobachtung bis zum 85. Lebensjahr hervor. Hier lebten von den Nie-Rauchern noch 33%. Falls eine bis 14 Zigaretten pro Tag geraucht wurden, lebten noch ca. 18%. Bei einem Konsum von 15-24 Zigaretten täglich lebten bis zum 85. Lebensjahr noch ca. 15%, beim Konsum von mehr als 25 Zigaretten täglich nur noch acht Prozent der ursprünglichen Beobachtungseinheit.

1.4 Environmental Tobacco Smoke: Verbreitung und Gefahrenpotenzial

Steigende Raucherzahlen – vor allem unter der jungen Bevölkerung und unter Frauen und Mädchen – brachten gleichzeitig auch eine höhere Belastung der nichtrauchenden Bevölkerung durch ETS mit sich. Umfragen zufolge rauchten 58% der unter 19-jährigen Mädchen und jungen Frauen sowie über 70% der gleichaltrigen Jungen und jungen Männer in Ostdeutschland. In Westdeutschland lagen diese Zahlen zwar niedriger, aber auch hier stellten die unter 19-jährigen den größten Anteil der Raucher.

In Gesamtdeutschland waren 85% der unter 19-jährigen Raucher Einsteiger, bei den 20-29-jährigen waren es sogar über 90% (Gesundheitssurvey 1998).

Da ETS mehrere tausend Chemikalien, darunter mindestens 43 bekannte Kanzerogene enthält, ist von einer Gefährdung durch ETS auszugehen. Eriksen et al. 1988 erkannten Nebenstromrauch als Hauptbestandteil des ETS.

Passivraucher wurden aufgrund von Verdünnungseffekten durch die Raumluft zwar niedrigeren Tabakrauchkonzentrationen ausgesetzt als aktive Raucher, dadurch war die Gesundheitsgefährdung aber keinesfalls geringer. Im Nebenstromrauch befand sich beispielsweise doppelt so viel Nikotin wie im Hauptstromrauch. Das bekannte Karzinogen 4-ABP kam im Nebenstromrauch sogar in 30-fach höherer Konzentration vor (Haley et al. 1989).

Hinzu kam, dass viele der ETS-Bestandteile von solch geringer Größe waren, dass sie sehr leicht eingeatmet wurden, wie Lefcoe et al. 1983 herausfanden. ETS stellt deshalb ein großes Gesundheitsrisiko für die nichtrauchende Bevölkerung dar und kann als Klasse A Karzinogen – also ein hinreichend bekanntes Karzinogen – angesehen werden (Myers et al. 1996; US Environmental Protection Agency 1993). Zudem ist ETS sehr weit verbreitet. So lebten in den USA im Jahr 1996 Fragebögen zufolge 43% aller Kinder zwischen zwei Monaten und elf Jahren in einem Haushalt mit mindestens einem Raucher und 37% aller erwachsenen Nichtraucher waren entweder im Haushalt oder am Arbeitsplatz Passivrauch-exponiert. Außerdem konnten bei 87,9% aller Nichtraucher messbare Urin-Cotininspiegel gefunden werden (National Research Council 1986). Da in Gesamtdeutschland durchschnittlich 40% der männlichen und 30% der weiblichen Bevölkerung aktiv rauchten (Gesundheitssurvey 1998), ist auch hierzulande eine Hintergrundbelastung der Bevölkerung mit ETS vorhanden.

Die Belastung mit ETS war höher unter Personen, die Arbeiter- und Dienstleistungstätigkeiten ausführten, sowie unter Niedrigverdienern und weniger gebildeten Personen (Curtin et al. 1998; Vainio et al. 1989). Die vermuteten Folgen des Passivrauchens sind weiterhin intensiver Forschungsgegenstand.

Als akute Folgen des ETS beschrieben Eriksen et al. 1988 Kopfschmerzen, Übelkeit sowie Reizerscheinungen an den Augen und der Nasenschleimhaut. Eine chronische ETS-Exposition konnte aber auch zu solchen Gesundheitsrisiken führen, wie sie für aktive Raucher bestanden.

1.5 Environmental Tobacco Smoke: Folgen für die Gesundheit

1.5.1 Entzündliche Erkrankungen des Respirationstraktes

Aktives Rauchen war einer der wichtigsten Risikofaktoren für die Entwicklung einer COPD. Aber auch die Innenraumluftverschmutzung, für die als wichtigster Faktor ETS verantwortlich war, trug zur Entwicklung einer COPD bei (US Environmental Protection Agency 1993). Vor allem die ETS-Belastung am Arbeitsplatz war mit Beschwerden wie Asthmaattacken, bronchialer Hyperreagibilität und Reizerscheinungen an den Atemwegen assoziiert (Janson et al. 2001).

1.5.2 Arterielle Verschlusskrankheiten

Hier gab es vor allem für die ETS-assoziierte Erhöhung des Risikos für KHK in vielen Studien ähnliche Ergebnisse. Durch ETS-Exposition konnte eine Risikoerhöhung um 30% für die Entwicklung einer KHK gefunden werden (Law et al. 1997), die sogar einer Dosis-Wirkungsbeziehung folgte (He et al. 1999). Es gab auch Hinweise darauf, dass sich das Risiko für zerebrale Schlaganfälle durch ETS-Exposition erhöhte. So waren in einer neuseeländischen Studie 13% aller Schlaganfälle in Zusammenhang mit ETS zu sehen (Bonita et al. 1999).

1.5.3 Malignomerkrankungen

Anhand von Cotininmessungen im Urin von Versuchspersonen konnten Rückschlüsse auf eine mögliche Exposition gegenüber ETS gezogen werden. Hier war es möglich, einen Durchschnittswert für Cotinin bei exponierten Personen zu ermitteln, der etwa ein Prozent der Werte aktiver Raucher betrug (Haley et al. 1989).

Daraus schlossen Vainio und Partanen 1989, dass das Risiko von Passivrauchern für rauchassoziierte Krankheiten ebenfalls ein Prozent des Risikos aktiver Raucher betrug, und leiteten eine Risikoerhöhung um 23% für Lungenmalignome bei ETS-exponierten Nichtrauchern gegenüber nicht ETS-exponierten Nichtrauchern ab. Hackshaw et al. 1997 kamen auf eine Risikoerhöhung um ca. 24% und entdeckten gleichzeitig eine Dosis-Risikobeziehung, wonach die Exposition gegenüber dem ETS aus 10 Zigaretten täglich zu einer Risikoerhöhung um 23%, gegenüber dem ETS aus 30 Zigaretten pro Tag dagegen bereits zu einer Erhöhung des Risikos um 88% führte. Da die histologischen Typen der Tumoren der ETS-exponierten Nichtraucher vor allem das kleinzellige Bronchialkarzinom und das Plattenepithelkarzinom waren und damit den Typen aktiver Raucher entsprachen, zogen Hackshaw et al. 1997 den Schluss, dass die Exposition gegenüber ETS ungefähr der Belastung durch leichtes aktives Rauchen entsprach. Bartsch et al. 1990, Hammond et al. 1995 und Maclure et al. 1989 fanden bei Passivrauchexponierten Personen dieselben tabakrauchspezifischen DNA- und Hb-Addukte wie bei aktiven Rauchern.

Aufgrund der prinzipiell gleichartigen Zusammensetzung von Haupt- und Nebenstromrauch wurde ETS als humanes Lungenkarzinogen klassifiziert (Cardenas et al. 1997). Denisenko et al. 1995 fanden einen kausalen Zusammenhang zwischen Lungenkarzinom und dem Kanzerogen Benzo[*a*]pyren, das sowohl im Passiv- als auch im Aktivrauch vorkommt. Mohtashamipir et al. 1990 beschrieben eine höhere Kanzerogenität von Teer im Nebenstrom- als im Hauptstromrauch.

1.6 Environmental Tobacco Smoke: Folgen für die Gesundheit bei Kindern

Kinder wurden vor allem häuslichem ETS – verursacht durch rauchende Eltern und andere Haushaltsmitglieder – ausgesetzt (National Research Council 1986). Daraus ergaben sich ebenfalls Folgen für die Gesundheit.

Strachan und Cook 1997 fanden einen kausalen Zusammenhang zwischen elterlichem Rauchen und akuten Erkrankungen der unteren Atemwege bei Kindern, wobei mütterliches Rauchen stärkere Auswirkungen hatte.

Außerdem gab es eine statistisch signifikante Beziehung zwischen der Anzahl der Raucher beziehungsweise der Anzahl gerauchter Zigaretten, und der Häufigkeit der Atemwegserkrankungen sowie einen kausalen Zusammenhang zwischen bronchialer Hyperreagibilität und ETS. Exponierte Kinder erkrankten zudem öfter an Bronchitis, wobei sowohl die Inzidenz als auch das Wiederauftreten von Bronchitis erhöht war.

Darüber hinaus zeigten Kinder mit atopischem Asthma eine größere Anzahl an lebensbedrohlichen Asthmaanfällen sowie ein höheres Maß an asthmatischen Symptomen, woraus abgeleitet wurde, dass ETS ein Triggerfaktor für Asthmaanfälle bei Kindern ist (Cook und Strachan 1997; Strachan und Cook 1997 und 1999). Auch auf Lungenfunktionsparameter und die Lungenentwicklung bei Kindern zeigte ETS Einfluss, wobei mütterliches Rauchen bei den Kindern mit zwar geringen, aber statistisch signifikanten Reduktionen des maximalen forcierten Expirationsvolumen (FEV) – einem Marker für bronchiale Obstruktion – und der totalen Lungenkapazität (TLC) vergesellschaftet war (Cook und Strachan 1997).

Die East Boston Study von Tager et al. 1983 fand bei Kindern, deren Mütter rauchten, ein Lungenwachstum, das um 7% geringer war als bei nicht ETS-exponierten Kindern.

Strachan und Cook postulierten auch einen kausalen Zusammenhang zwischen sowohl akuten als auch chronischen Mittelohrerkrankungen bei Kindern und ETS-Exposition durch die Eltern (Strachan und Cook 1998).

Auch auf die oberen Atemwege schien ETS bei Kindern Auswirkungen zu haben.

Eine echte allergische Rhinitis konnte nicht mit ETS in Verbindung gebracht werden, aber bei ETS-exponierten Kindern wurde eine veränderte Zellpopulation der nasalen Schleimhaut gefunden. Die Zellzahl insgesamt war erhöht und der einzige Unterschied zur Nasenschleimhaut von Kindern mit allergischer Rhinitis lag darin, dass Immunglobulin E-positive Mastzellen bei den ETS-exponierten Kindern fehlten (Vinke et al. 1999). Einen weiteren Beweis für die Schädlichkeit des ETS bei Kindern erbrachten Blair et al. 1996. Sie zeigten eine deutliche Zunahme des Risikos für den plötzlichen Kindstod, wenn eine postnatale Tabakrauchexposition bestand. Nach Blair et al. 1996 wären 66% der Todesfälle durch plötzlichen Kindstod vermeidbar, wenn Eltern nicht in Gegenwart ihrer Säuglinge rauchen würden.

Larsson et al. 2001 fanden als Spätfolgen der kindlichen ETS-Exposition eine signifikante Erhöhung des Risikos für die Entwicklung von Asthma im Erwachsenenalter und das Risiko, zum aktiven Raucher zu werden, erhöhte sich um den Faktor drei, wenn eine kindliche ETS-Exposition vorlag.

1.7 Vorstellung der verwendeten Testsysteme

1.7.1 Massenspektrometrische Analyse von Hämoglobinaddukten der tabakrauchspezifischen aromatischen Amine 3- und 4- Aminobiphenyl

Bei dem hier verwendeten Verfahren handelte es sich um eine gaschromatographisch-massenspektrometrische Analyse, die es erlaubte, Amine als Hb-Addukte nach vorheriger Hydrolyse und Derivatisierung in einem Größenbereich von Nano- bis Picogramm (abgekürzt ng bzw. pg) zu erfassen (Miller et al. 1961). Hb-Addukte wurden bereits zuvor als Biomarker für eine Exposition gegenüber aromatischen Aminen verwendet (Neumann et al. 1995, Zwirner-Baier und Neumann 1998).

Sie spiegelten die Exposition während der vergangenen ca. 3 Monate wieder und dienten als Marker für eine Exposition im Körperinnern und die metabolische Aktivierung von aromatischen Aminen. Ihr Nachweis zeigte die Bioverfügbarkeit von Metaboliten des aromatischen Mutteramines – dem N-hydroxy arylamin – in solchen Geweben, in denen die aromatischen Amine toxische und gentoxische Wirkung entfalten konnten. Dieser aktive Metabolit war in der Lage, mit DNA und Proteinen zu reagieren. Die daraus resultierende Schädigung des Biomoleküles war Grundlage für die toxische oder gentoxische Wirkung des aromatischen Amins.

Die arylamin-induzierte Karzinogenese beinhaltet die metabolische Aktivierung über N-Hydroxylierung, bei der reaktive Elektrophile entstanden, die kovalent an DNA und Hb binden konnten (Doerge et al. 1999), was man sich für das Biomonitoring zunutze machte.

Diese Hb-Addukte der aktiven Metaboliten sind im neutralen pH-Bereich – also auch im Erythrozyten – stabil, bei milder basischer Hydrolyse jedoch leicht instabil und können so einer weiteren Aufarbeitung zugeführt werden (Birner et al. 1990).

Die hier untersuchten aromatischen Amine waren das 3- und 4-ABP. 4-ABP gilt als bekanntes menschliches Blasenkanzerogen, das im Hauptstromrauch in Größenordnungen von einigen ng pro Zigarette auftritt, im Nebenstromrauch jedoch Konzentrationen von mehr als 100 ng pro Zigarette erreicht (Maclure et al. 1989).

Hohe 4-ABP-Adduktspiegel in Rauchern konnten bereits nachgewiesen werden (Bryant et al. 1987; Mohtashamipir 1990). Auch bei Nichtrauchern fanden Bryant et al. 4-ABP-Hb-Addukte, die von ETS verursacht sein könnten. Hecht et al. 1993 gingen davon aus, dass höhere Hb-Adduktspiegel auch mit höheren DNA-Adduktkonzentrationen assoziiert waren, weshalb die Höhe der Hb-Adduktspiegel helfen konnte, das Ausmaß eines möglichen Karzinomrisikos abzuschätzen.

1.7.2 Zytokineseblock-Mikrokernassay

Dieses Verfahren war ein in-vitro Test auf mögliche Gentoxizität (Stopper und Müller 1997). MK entstehen aus azentrischen Chromosomenfragmenten oder ganzen Chromosomen in Zellen, die nicht an der – einer DNA-Schädigung folgenden – mitotischen Teilung teilnehmen.

Die Schädigung wurde durch verschiedene externe Einflüsse hervorgerufen, zu denen auch Strahlung und gentoxische Substanzen gehörten (Fenech 1997). Sie wurden definiert als chromatinhaltige Strukturen im Zytoplasma, umhüllt von einer Membran und ohne eine Verbindung zum eigentlichen Zellkern (Schiffmann und de Boni 1991).

Eine Zelle, die einen DNA-Schaden erlitten hatte, konnte diesen Schaden als MK sichtbar machen, falls sie nach der Schädigung noch in der Lage war, wenigstens einen weiteren Zellzyklus bis kurz vor die mitotische Teilung durchzuführen (Fenech und Morley 1986).

Um nun eine Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Zellpopulationen und den von ihnen exprimierten MK zu erreichen, war es nötig sicherzustellen, dass alle Zellen, die sich teilen, nur eine DNA-Replikationsphase, also nur eine S-Phase vor ihrer Untersuchung durchlaufen. Außerdem durften die Zellen keine mitotische Teilung vor ihrer Untersuchung durchführen. Andernfalls kam es dadurch zu einer erhöhten Zellzahl.

Dies hatte dann eine Abnahme der Mikrokernrate (abgekürzt MK-Rate) pro 1000 gezählte Zellen zur Folge. Deshalb musste der Mikrokernassay in Zytokineseblock-Technik durchgeführt werden, also unter Zugabe von Cytochalasin B als Zytokinesehemmer vor der ersten mitotischen Teilung der kultivierten Zellen (Fenech und Morley 1986). So durchgeführt lieferte der Mikrokernassay verlässliche Parameter zur Erkennung von Chromosomenschäden in vivo (McGregor et al. 1983), der für Untersuchungen zur Gentoxizität aufgrund seiner Geschwindigkeit, einfachen Durchführbarkeit und Möglichkeit zur Automatisierung schon oft bevorzugt wurde (Miller et al. 1997). Die Erhöhung von MK-Raten in aktiven Rauchern konnte nachgewiesen werden (Holmen et al. 1995).

2 Material und Methoden

2.1 Arbeitsgeräte und Chemikalien

2.1.1 Allgemeine Laborchemikalien und Verbrauchsmaterialien

Allgemeine Laborchemikalien und Verbrauchsmaterialien wurden bezogen von den Firmen:

- A. Hartenstein, Laborbedarf, Würzburg
- S. Klein, Laborbedarf, Würzburg

Allgemeine Materialien für Zellkulturen wurden bezogen von:

- Firma (abgekürzt Fa.) Greiner, Nürtingen

Reinstes Wasser wurde aus einer Millipore-Reinstwasseranlage entnommen.

2.1.2 Verwendete Arbeitsgeräte

- Autoklav Melag Typ 28, Fa. Melag, Nürtingen
- Brutschrank Heraeus Typ B50/60 BK-CO₂, Fa. Heraeus, Hanau
- Cytospin 3-System zur Zellpräparation, Fa. Shandon, Astmoor, England
- Fluoreszenzmikroskop, Fa. Zeiss, Oberkochen
- Lichtmikroskop Leitz Labovert, Fa. Leitz, Wetzlar
- Pipettierhilfe Pipetus-Akku, Fa. Flow Laboratories, Meckenheim
- Pipetten 100 µl Typ Gilson, Fa. Gilson, Frankreich
- Sterile Werkbank Gelaire BH 26, Fa. Flow Laboratories, Meckenheim
- Wasserbad, Fa. GFL, Burgwedel
- Zentrifuge Hettich Universal K2/S, Fa. Hettich, Tuttlingen
- Zentrifuge Heraeus Labofuge 400 e, Fa. Heraeus, Hanau

- Universal Vacuum System Plus mit Vapor Net Typ UVS 400 A, Fa. Savant, Egelsbach. mit einer Speed-Vac Vakuum-Zentrifuge Typ SVC 100, Fa. Savant, Egelsbach
- Gaschromatographie-Säulen Rtx-5MS w/Integra-Guard, 30m, 25mm ID, 25µm df, Fa. Restek Corporation, Bellefonte, USA
- Gaschromatographie-Massenspektrometriesystem Typ HP GC 5890: MS 5988 A Fa. Hewlett Packard, Niederlassung Deutschland. Waldbronn

2.2 Medien und Substanzen zur Aufarbeitung und Kultivierung der Blutproben

2.2.1 Trennmedium

- Histopaque, Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen

2.2.2 Lymphozytenmedium

- RPMI-1640-Medium als Basismedium, Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Zusätze:

- 75 ml fetales Kälberserum (FKS) K 125, hitzeinaktiviert (30 min bei 65°C), Fa. Biochrom, Berlin
- 5 ml MEM (100% Lösung an „non essential amino acids“) Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen
- 5 ml L-Glutamin-Lösung, Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen
- 5 ml Na-Pyruvat, Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen
- 2ml Penicillin-Streptomycin-Lösung, Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen

2.2.3 Zellzyklusstimulator

- Phytohämagglutinin aus *Phaseolus vulgaris* (PHA), Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen gelöst in:
PBS-CMF-Lösung aus 8,00 g NaCl, 0,20 g KCL, 0,57 g Na₂HPO₄, 0,20 g KH₂PO₄ in 1000 ml aqua bidest

2.2.4 Zytokinesehemmer

- Cytochalasin B aus *Helminthosporium dermatioideum* Fa. Sigma Aldrich, Taufkirchen gelöst in:
Dimethylsulfoxid (abgekürzt DMSO), Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen

2.2.5 Einfriermedium und Einfriermaterialien

- 10 ml Lymphozytenkulturmedium mit 10% DMSO
- Einfrierrondell Fa. Nunc, Deutschland
- Gefrierschrank Fa. Heraeus, Hanau, Einfriertemperatur -20 °C

2.2.6 Erythrozytenwaschung

- 0,9% NaCl-Lösung zum Waschen der Erythrozyten

2.2.7 Hämoglobin-Fällung

- Ethylendiamintetraessigsäure-Puffer (abgekürzt EDTA-Puffer) zur Lyse der Zellen, Fa. Serva, Heidelberg
- Ethanol absolut, Fa. J.T. Baker, Deventer, Holland
- Diethylether, Fa. Merck, Darmstadt

2.2.8 Hämoglobin-Hydrolyse

- 4-ABP-d9 als interner Standard, Fa. Cambridge Isotope Laboratories inc, Andover, USA
- Natronlauge 1 N, Fa. Merck, Darmstadt
- n-Hexan, Fa Merck, Darmstadt
- 2-Propanol, Fa. Merck, Darmstadt
- Methanol, Fa. Merck, Darmstadt

2.2.9 Gaschromatographie/Massenspektrometrie

- Diethylether, Fa. Merck, Darmstadt
- Pentafluoropropionic Anhydride, Fa. Sigma, Deisenhofen
- 4-ABP-d9, Fa. Cambridge Isotope Laboratories inc, Andover,USA
- 4-ABP, Fa. Sigma, Deisenhofen
- 2- Aminofluorene-d11, Fa. IC Chemikalien, Ismaning

2.3 Aufarbeitung der Vollblutproben und der einzelnen Blutbestandteile

2.3.1 Aufarbeitung der Vollblutproben

Die Gewinnung von ca. 10 ml venösem Probandenblut erfolgte aus einer Cubitalvene in sterile Monovettenröhrchen mit NH_4^+ zur Gerinnungshemmung der Fa. Braun, Melsungen durch ärztliche Mitarbeiter der HNO-Universitätsklinik Würzburg. Von diesen Proben gab man je drei ml Vollblut langsam auf – in 15 ml Zentrifugenröhrchen vorgelegtes – Histopaque-Trennmedium (Lösung aus Polysaccharose und Natriumdiatrizoat), das auf 37°C erwärmt worden war. Dabei war eine Vermischung von Blut und Trennmedium strikt zu vermeiden.

Pro Proband waren zwei Zentrifugenröhrchen vorzubereiten, um diese dann mit 1700 Umdrehungen pro Minute (= rounds per minute = rpm) bei 20°C Zentrifugentemperatur 30 Minuten (min) zu zentrifugieren, wobei für eine scharfe Phasentrennung der Zentrifugetrieb ohne zusätzliche Bremse notwendig war (siehe Abb. 2.1).

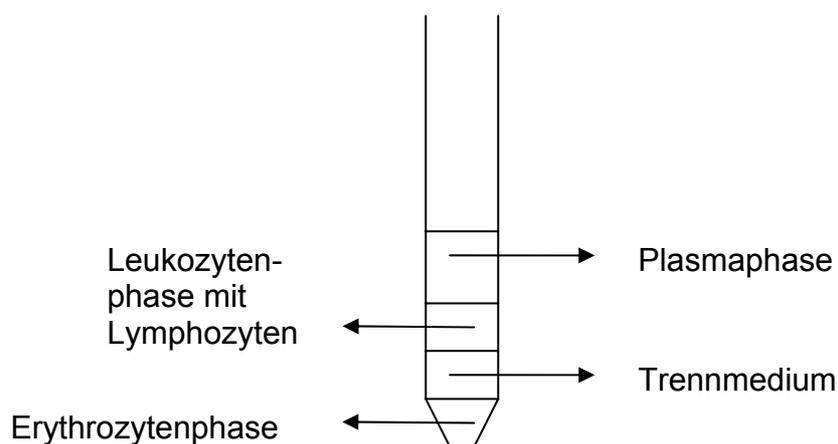


Abb.2.1: Zentrifugenröhrchen nach Zentrifugation von Vollblut auf Histopaque-Trennmedium

Danach wurde mit einer Pasteurpipette die Lymphozytenphase abgenommen und in ein weiteres Zentrifugenröhrchen überführt. Die Plasma- und Histopaque-Phasen verwarf man und arbeitete die Erythrozyten wie unter 2.3.4 beschrieben auf.

2.3.2 Aufarbeitung, Kultivierung und Beurteilung der Lymphozyten ohne deren Einfrierung mit dem Zytokineseblock-Mikrokernassay

Im nächsten Schritt erfolgte die Suspension der Lymphozyten in zehn ml Lymphozytenmedium. Nach Zentrifugation dieses Gemischs mit 1300 rpm bei 20°C für zehn min und Verwerfen des Überstandes schloss sich die sorgfältige Resuspension eines der beiden Pellets mit fünf ml Medium an, um die Suspension anschließend in das zweite Röhrchen des jeweiligen Probanden zu überführen.

Unter Zugabe von weiteren fünf ml Medium resuspendierte man auch das zweite Pellet. Daran schloss sich nochmals eine Zentrifugation der Lösung mit 1300 rpm bei 20°C für zehn min und das Verwerfen des Überstandes an.

Anschließend wurde das Röhrchen mit ca. drei ml Kulturmedium aufgefüllt und damit das Pellet wieder gut in Suspension genommen. Eine davon – mit einer Pasteurpipette – entnommene Probe diente zur Bestimmung der Zelldichte in einer Neubauerkammer. In einer Filterkulturflasche der Fa. Greiner, Nürtingen wurde die Lymphozytenzahl nun so mit Kulturmedium eingestellt, dass die Zelldichte eine Million (abgekürzt Mio) Lymphozyten/ml Kulturflüssigkeit betrug.

Die anschließende Zugabe von zehn μ l PHA-Lösung pro zehn ml Zellsuspension in die Filterkulturflasche diente dazu, die Lymphozyten zum Übertritt von der G₀-Phase in die Phasen des Zellzyklus zu stimulieren. Danach erfolgte die Bebrütung der Kultur für 42-44 Stunden (abgekürzt h) im Brutschrank bei fünf Prozent CO₂-Sättigung und 37°C Umgebungstemperatur. Nach dieser Zeit konnte davon ausgegangen werden, dass die meisten Zellen die S-Phase durchlaufen hatten und sich kurz vor der Zellteilung befanden. Um diese zu verhindern, gab man nach 42-44 h zehn μ l Cytochalasin B-Lösung (ein mg/ml DMSO) pro zehn ml Zellsuspension zu. Durch dieses Vorgehen konnten die Zellen einen chromosomalen Schaden nur einmal als MK exprimieren. Falls die weitere Zellteilung und damit auch die weitere DNA-Replikation nicht verhindert wurde, war es möglich, dass zwar die Anzahl an doppelkernigen Zellen zunahm, sich die MK-Zahl aber entsprechend verringerte, da dann die gleiche Anzahl von MK auf eine höhere Zellzahl bezogen werden musste.

Zudem stellte der Zytokineseblock sicher, dass in allen Ansätzen die Zellen nur einmal eine DNA-Replikation durchliefen. Dies ergab die Voraussetzung für eine Vergleichbarkeit von Zellkulturen verschiedener Probanden. Nach Zugabe des Zytokinesehemmers wurde für weitere 24-26 h unter gleichbleibenden Bedingungen bebrütet. Nach insgesamt 66-70 h Bebrütung der Kultur im Brutschrank erfolgte die Präparation der Lymphozyten auf Objektträger mittels Zytozentrifugation unter Verwendung eines Cytospin 3-System der Fa. Shandon, England. Nun schloss sich die Fixierung der Zellen auf den Objektträgern in einer methanolgefüllten Küvette bei -20°C für mindestens eine Stunde an.

Um die Auszählung der Präparate vornehmen zu können, mussten diese zuvor mit einer Acridinorangefärbelösung gefärbt werden. Die Färbelösung setzte sich aus 4,50 ml einer 0,1%igen Acridinorangestammlösung in 67,50 ml Sörensenpuffer (5,84 g Na_2HPO_4 und 4,61 g KH_2PO_4 in 1000ml aqua bidest, ph 6,10) zusammen.

Bei der Auszählung mit dem Fluoreszenzmikroskop zählte man pro Proband je dreimal tausend doppelkernige Zellen, wobei auch einkernige Zellen und Zellen mit mehr als zwei Kernen zum Vergleich der Stimulierbarkeit von frischen und eingefrorenen Lymphozyten erfasst wurden.

2.3.3 Aufarbeitung, Kultivierung und Beurteilung der tiefgefrorenen Lymphozyten mit dem Zytokineseblock-Mikrokernassay

Nach der Auftrennung der Vollblutproben und der Isolation der Lymphozyten erfolgte zunächst deren zweimalige Waschung mit Kulturmedium wie bei den frischen Zellen. Nach Abgießen des Überstandes im Anschluss an den zweiten Waschgang resuspendierte man das Lymphozytenpellet mit ca. 1,5 ml einer 10%igen DMSO-Lösung in Kulturmedium und überführte diese Suspension anschließend in ein Kryoröhrchen um sie in einem – mit Propanol gefüllten – Einfrierrondell der Firma Nunc bei -20°C einzufrieren. Zu einem beliebigen späteren Zeitpunkt erfolgte die Kultivierung dieser Lymphozyten.

Hierzu wurde die gefrorene Lymphozytenlösung im Kryoröhrchen aus dem Nunc-Rondell entnommen und möglichst schnell im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Während des Auftauens waren in ein 15ml Zentrifugenröhrchen zehn ml Kulturmedium vorzulegen (vorgewärmt auf 37°C) um anschließend die aufgetaute Lymphozytenlösung zugeben zu können. Nach Zentrifugation der Lösung mit 1300 rpm für zehn min, konnte der Überstand verworfen werden. Im Anschluss an eine sorgfältige Resuspension des Pellets mit fünf ml Kulturmedium wurde wieder mit 1300 rpm für fünf min zentrifugiert und dieser letzte Schritt der Lymphozytenwaschung nochmals wiederholt, um das Röhrchen dann mit einer solchen Menge Kulturmedium aufzufüllen, dass sich ca. drei ml Lösung im Röhrchen befanden. Die nochmalige Resuspension des Pellets mit Kulturmedium schloss diesen Schritt ab.

Das weitere Vorgehen einschließlich Kultivierung, Präparation und Auswertung der Präparate erfolgte analog dem bei den frischen Lymphozyten.

2.3.4 Aufarbeitung der Erythrozyten

2.3.4.1 Fällung des Hämoglobins aus den Erythrozyten

Parallel zur Aufarbeitung der Lymphozyten erfolgte die Waschung der Erythrozyten. Dieser Arbeitsschritt begann mit der Resuspension der Erythrozytenphase, die sich nach Trennung des Vollblutes ergab (siehe Abb.2.1), mit ungefähr der doppelten Menge NaCl 0,9% und wurde mit der Zentrifugation der Suspension mit 3400 rpm bei 20°C für drei min fortgesetzt. Den NaCl-Überstand nahm man sodann mit einer Pasteurpipette ab und verwarf diesen. Nach insgesamt dreimaliger Durchführung dieses Vorgehens waren die Erythrozyten bei -20°C ohne weitere Zusätze einzufrieren. Im weiteren Verlauf taute man die so konservierten Erythrozyten wieder auf, um sie in Reagenzgläser zu überführen. Anschließend erfolgte die Zelllyse mit EDTA-Puffer bei pH 7, wobei die Erythrozyten mit EDTA-Lösung unter Verwendung eines Vortexgerätes gut zu durchmischen waren.

Danach wurde die Suspension in die ca. doppelte Menge reinen Ethanols überführt und wieder mit dem Vortexgerät gut durchmischt.

Sodann erfolgte die Zentrifugation der Suspension bei 3000-4000 rpm für etwa drei min. Den Überstand verwarf man anschließend und rührte das Sediment mit einem Ethanol/H₂O-Gemisch (Verhältnis vier zu eins) unter Zuhilfenahme eines Glasspatels auf. Nach nochmaliger Zentrifugation unter analogen Bedingungen und Verwerfen des Überstandes schlossen sich weitere Waschungen mit je einem Ethanol-Diethylether-Gemisch (Verhältnis 70:30) und schließlich reinem Diethylether mit jeweiliger Zentrifugation an. Nach Verwerfen des letzten Überstandes hatte man aus den lysierten und gewaschenen Erythrozyten das Hb gewonnen. Dieses trocknete dann für 72 h unter dem Abzug.

2.3.4.2 Hydrolyse des Hämoglobins

Das getrocknete Hb wurde in je zwei Reagenzgläser pro Proband so eingewogen, dass jedes Glas 100 mg Hb enthielt. Zur Ermittlung des 4-ABP-Gehalts des Hb setzte man den Proben je 100 pg deuteriertes 4-ABP-D9 zu. Die anschließende Hydrolyse diente zur Freisetzung des 3- und 4-ABPs aus der Bindung an Hb. Dazu erfolgte die Zugabe von 500 µl des Detergens Sodiumdodecylsulfat und anschließend 5 ml 1 N NaOH zum Hb um das gefällte Hb danach durch Vortex-Vermischung, ein Ultraschallbad und ein Magnet-Rührsystem weitestgehend in Lösung zu bringen. Auf diese Weise ließen sich die Aminoaromate als Spaltprodukte freisetzen. Zur Isolierung der Aminoaromate aus der Lösung erfolgte eine Festphasenextraktion an Polysorb-Säulen. Zur Konditionierung der Säulen gab man auf diese nacheinander Hexan, Isopropanol und Methanol auf. Nach dem Durchlaufen dieser Flüssigkeiten wurden die Säulen etwa zur Hälfte mit verdünnter Natronlauge befüllt und dann die Probenlösung nach und nach vollständig aufgetragen. Die Elution der Aminoaromate aus dem Adsorptionsmaterial erfolgte anschließend durch Ethylacetatgabe auf die Säulen.

Die so wieder gewonnenen Aminoaromate derivatisierte man durch Zugabe von Pentafluorpropionsäureanhydrid.

Zum besseren Nachweis erfolgte die Aufkonzentration dieser Lösung durch Vakuumextraktion bis zur Trockenheit und anschließend die erneute Lösung der so gewonnenen Aminoaromate in ca. 50 μl Ethylacetat.

2.3.4.3 Analyse der eluierten Aminoaromaten

An die Aufkonzentration und erneute Lösung der Aminoaromate in Ethylacetat schloss sich deren Nachweis im Konzentrat durch gaschromatographische Auftrennung und nachfolgende massenspektrometrische Analyse im negativen chemischen Ionisationsmodus mit Methan als Reaktandengas an. Das hierzu verwendete Meßsystem war ein GC/MS-System der Fa. Hewlett-Packard, Waldbronn (GC: 5890, MS: 5988A). Das zur Messung verwendete Software-Paket war HP 59970 MS Chem Station, MS Pascal 3.2. Zur gaschromatographischen Auftrennung wurden Gaschromatographie-Säulen der Fa. Restek (Restek Corporation, Bellefonte, USA, Typ Rtx-5MS w/Integra-Guard 30m Länge, 0,25mm ID, 25 μm d) benutzt. Im verwendeten Analysenprogramm betrug die Injektortemperatur 50°C, die Quelltemperatur 240°C und die Temperatur an der Transferlinie 280°C. Ausgehend von 50°C Starttemperatur, war die Endtemperatur von 270°C bei einer Heizrate von 15°C/min nach etwa 15 min erreicht.

Vor der Probenanalyse erfolgte zur Tagesfaktorbestimmung an jedem Messtag die Messung von je zwei Standards von 3- und 4-ABP in einer Konzentration von 1 pg/ μl und 5 pg/ μl . Sowohl von diesen Standards als auch von den nachfolgend zu analysierenden Proben gab man mit einer feinen Spritze 1 μl auf ein On-Column-Injektionssystem, um den Messvorgang dann manuell zu starten. Von jedem Probanden analysierte man zwei Proben, um einen systematischen Fehler zu erkennen. Anhand der Massenverhältnisse und der Retentionszeiten der einzelnen Probenbestandteile liessen sich Peaks für den internen Standard sowie das 3- und 4-ABP bestimmen, aus denen man anschließend durch Integration die Fläche unter der Kurve (= area under curve = auc) errechnete.

Zur Berechnung der tatsächlichen ABP-Menge pro Gramm Hb diene folgende Formel:

$$\text{Menge an ABP (pg/}\mu\text{l)} = \frac{\text{auc ABP}}{\text{auc ABP-d9}} \times 100 \text{ pg}$$

Daraus:

$$\text{Menge ABP (pg/g Hb)} = [\text{Menge ABP (pg/}\mu\text{l)} \times 50 \mu\text{l}] \times 10$$

Die so erhaltenen Rohwerte für die ABPs mussten nun noch auf den Tagesfaktor bezogen werden, um eine Vergleichbarkeit der einzelnen Messtage zu erhalten. Die Berechnung des Tagesfaktors aus den Kalibrierungsstandards erfolgte nach:

$$\text{Tagesfaktor} = \frac{(\text{ABP-Peak 5 pg} - \text{ABP-Peak 1 pg}) : 4}{(\text{ABP-d9-Peak 5 pg} - \text{ABP-d9-Peak 1 pg}) : 4}$$

Die ermittelten Rohwerte dividierte man nun durch ihren korrespondierenden Tagesfaktor. Als Endergebnis diene der Mittelwert der beiden Proben von jedem Probanden.

2.4 Klinische Untersuchung, Fragebögen

Zu Beginn der Studie wurden die teilnehmenden Kinder nach Aufklärung und Einverständniserklärung der Eltern HNO-ärztlich untersucht und der HNO-Status dokumentiert. Falls Verdacht auf eine allergische Erkrankung bestand, sollten Prick-Tests, in Einzelfällen auch nasale Provokationstests weitere Klärung einer möglichen allergischen Erkrankung erbringen. Zur Erfassung zusätzlicher Daten diene ein modifizierter umweltmedizinischer Fragebogen der Universität Gießen, um mögliche Stör- und Risikofaktoren zu spezifizieren, der den Eltern vorgelegt wurde (siehe Anlage). Insbesondere interessierten Gesundheitsprobleme wie Reizhusten oder Augenreizungen.

Außerdem sollten die Eltern Fragen nach ärztlich diagnostizierten Erkrankungen wie Pseudokrapp, Bronchitis, Asthma, Heuschnupfen, Neurodermitis oder Nahrungsmittelinverträglichkeiten seitens der Kinder beantworten. Einen zentralen Punkt für die vorliegende Arbeit nahm die Frage nach den Rauchgewohnheiten ein. Dies umfasste sowohl die Rauchgewohnheiten der Eltern wie auch etwaiger weiterer Personen im Haushalt, in dem das betreffende Kind lebte. Detailliert wurde nach bisheriger Dauer sowie Menge und Art des täglichen Tabakkonsums gefragt.

Desweiteren war die Familienanamnese, die Wohnsituation und die mögliche Nähe zu anderen umweltmedizinisch interessanten Quellen für gesundheitsbeeinträchtigende Einflüsse, sowie die Ernährungs- und Stillgewohnheiten des Kindes bzw. der Mutter von Interesse. Die Angaben zu den Rauchgewohnheiten der Eltern und sonstiger Personen im Haushalt waren die Grundlage für die Einteilung der Kinder in eine ETS- und eine nicht ETS-exponierte Gruppe.

2.5 Statistik und Datendarstellung

Zur statistischen Bewertung der Daten wurden für parametrische Ergebnisse der Students-t-Test und der Pearson'sche Korrelationskoeffizient, für nicht-parametrische Daten der Mann-Whitney-Test und die Spearman-Korrelation angewendet. Falls der p-Wert der getesteten Daten kleiner als 0,05 betrug, bedeutete dies ein signifikantes Ergebnis.

Für die Darstellung und nähere Auswertung der Ergebnisse benutzte man das Programm Slide Write Version 2.1. Dabei waren Box-whiskers die am meisten verwendete Darstellungsform (siehe Abb. 2.2). Die Box enthielt 50% der Werte, die Oberkante markierte die 75. Perzentile, die Unterkante die 25. Perzentile. Die unterste und oberste Linie markierten das fünf- bis 95%-Intervall. Der Querbalken der Boxen entsprach dem Median. Die Punkte stellten die einzelnen Messwerte dar.

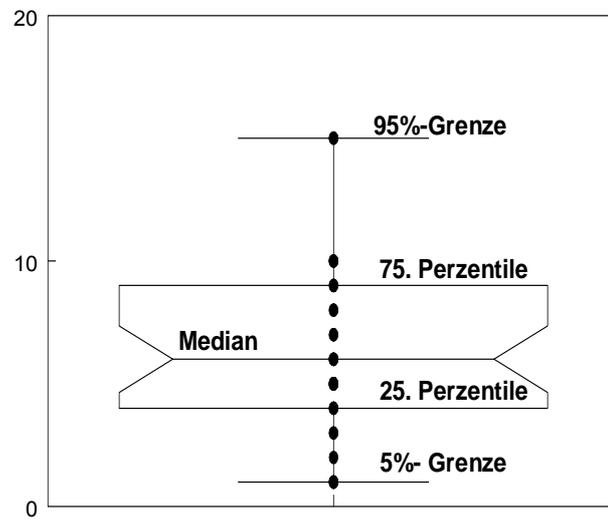


Abb. 2.2: Beispiel für die Darstellungsform Box-whisker

3 Ergebnisse

3.1 Biochemische Marker

Als biochemische Marker zur Überprüfung der Belastung Passivrauchexponierter Kinder dienen Hb-Addukte von 3- und 4-ABP. Nach der Auftrennung der Hb-Fractionen im Ionisationsspektrometer ergab sich ein charakteristisches Chromatogramm (siehe Abb. 3.1)

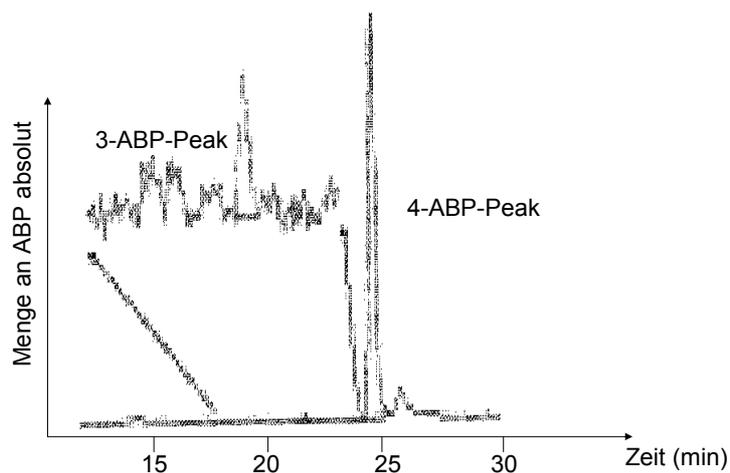


Abb. 3.1: Chromatogramm nach Auftrennung der Proben im Ionisationsspektrometer

Von 66 Probanden wurden die Hb-Adduktspiegel von 4-ABP untersucht (siehe Abb. 3.2). Für die nicht ETS-exponierten Kinder (n=33) ergab sich ein Mittelwert von 46,0 pg/g Hb für 4-ABP.

Für die exponierten Kinder (n=33) lag der Mittelwert bei 56,5 pg/g Hb. Die Hb-Adduktspiegel von 4-ABP waren mit einem p-Wert von 0,004 bei den exponierten Kindern gegenüber nicht exponierten Kindern signifikant erhöht.

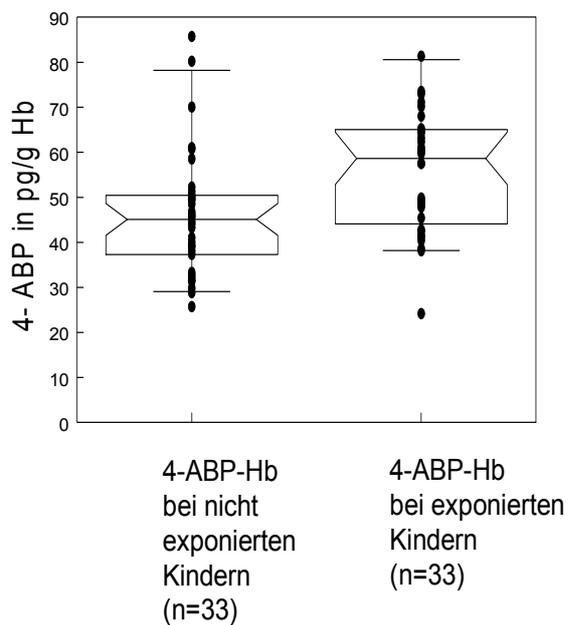


Abb.3.2: 4-ABP-Hb-Adduktspiegel bei ETS-exponierten Kindern im Vergleich mit nicht ETS-exponierten Kindern

Um einen möglichen zweiten biochemischen Marker für eine ETS-Exposition zu untersuchen, erfolgte bei diesen 66 Probanden auch die Bestimmung der Spiegel von 3-ABP-Hb-Addukten. Diese Untersuchung ließ sich im gleichen Schritt wie die Bestimmung der 4-ABP-Addukte durchführen. Die 3-ABP-Addukte waren bei 48 der 66 Probanden bestimmbar.

Für Kinder, die nicht ETS-exponiert waren (n=20), ergab sich ein Mittelwert von 17,4 pg/g Hb, die exponierten Kinder (n=28) zeigten einen Mittelwert von 19,9 pg/g Hb (siehe Abb. 3.3). Diese Unterschiede waren im t-Test mit einem p-Wert von 0,55 nicht signifikant, zeigten aber ebenfalls eine Tendenz zu höheren 3-ABP-Hb-Adduktspiegeln bei Exposition gegen ETS.

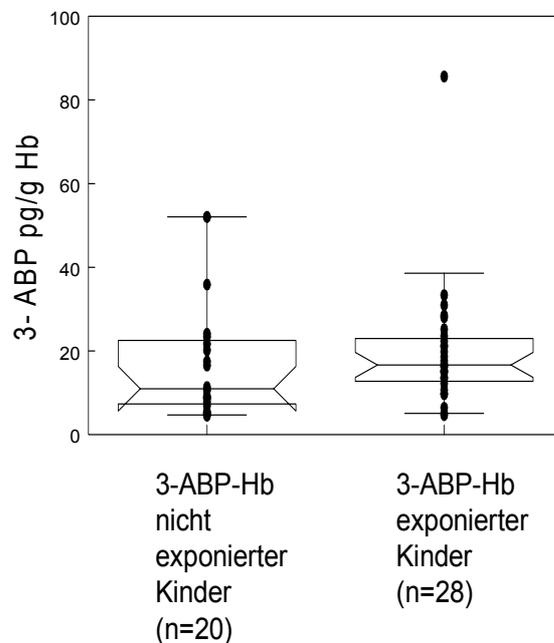


Abb.3.3: 3-ABP-Hb-Adduktspiegel bei ETS-exponierten Kindern im Vergleich mit nicht ETS-exponierten Kindern

Außerdem wurden die ETS-exponierten Kinder aufgrund der unterschiedlichen Anzahl an Zigaretten, die täglich in ihrer Umgebung geraucht wurden, in zwei Gruppen eingeteilt. Eine Gruppe schloss alle Kinder ein, die dem ETS aus bis zu zehn Zigaretten täglich ausgesetzt waren, die andere Gruppe schloss alle Kinder ein, die dem ETS aus mehr als zehn Zigaretten pro Tag exponiert waren.

Dabei konnte kein Unterschied in der Höhe der Hb-Addukte von 4-ABP in Abhängigkeit von der Anzahl der in Gegenwart der Kinder gerauchten Zigaretten gefunden werden.

3.2 Marker für Genomschädigung

Um eine mögliche Genotoxizität des ETS zu überprüfen und – wenn möglich – zu quantifizieren, fand das Verfahren des in-vitro Mikrokernassay in Zytokineseblocktechnik Anwendung.

Hier standen die Lymphozyten von 46 Probanden zur Kultivierung und Analyse zur Verfügung. Es ergab sich für nicht ETS-exponierte Kinder (n=21) ein Mittelwert der MK pro 1000 Zellen von 3,3. Die exponierten Kinder (n=25) zeigten demgegenüber einen Mittelwert von 5,8 MK pro 1000 Zellen. Der Students t-Test ergab mit einem p-Wert von $< 0,005$ eine signifikant erhöhte MK-Zahl in ETS-exponierten Kindern gegenüber nicht ETS-exponierten Kindern (siehe Abb. 3.4).

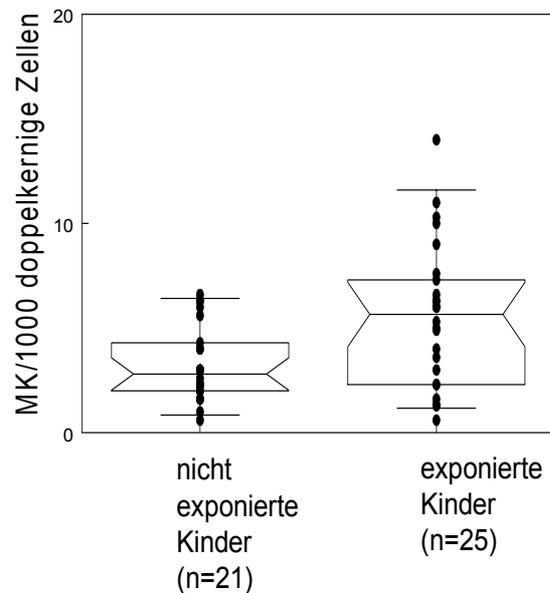


Abb.3.4: Vergleich von MK-Raten bei ETS-exponierten Kindern und nicht ETS-exponierten Kindern

Auch hier wurde eine Einteilung in zwei Gruppen entsprechend der Anzahl der pro Tag in Gegenwart der Kinder gerauchten Zigaretten vorgenommen. Jedoch lag auch hier kein Unterschied bezüglich der MK-Rate zwischen der Gruppe der Kinder, die täglich dem Rauch aus bis zu zehn Zigaretten ausgesetzt waren und der Gruppe, die dem ETS aus mehr als zehn Zigaretten pro Tag ausgesetzt waren, vor.

3.3 Korrelation der Hämoglobinaddukte von 4-Aminobiphenyl mit den Mikrokernen bei ETS-exponierten Kindern

Hier trug man die Werte der Hb-Addukte von 4-ABP bei ETS-exponierten Kindern gegen die entsprechenden MK-Raten auf. Dabei zeigte sich eine positive Korrelation zwischen der Höhe der 4-ABP-Hb-Adduktspiegel und den MK-Raten (siehe Abb. 3.5).

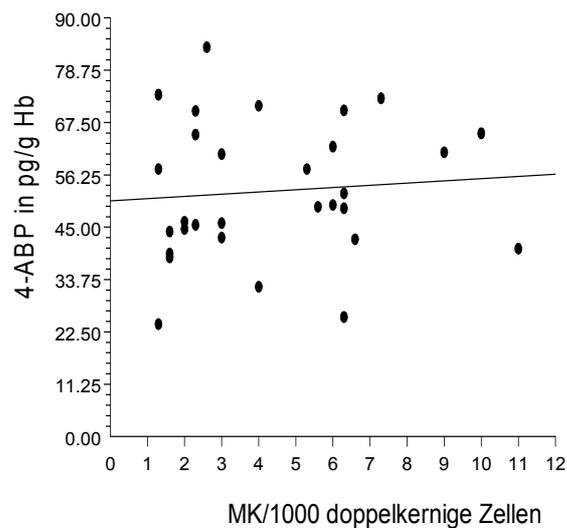


Abb. 3.5: Korrelation der MK-Raten mit den Hb-Addukten von 4-ABP bei ETS-exponierten Kindern

3.4 Altersabhängige Verteilung der Hämoglobinaddukte bei ETS-exponierten Kindern

Um festzustellen, ob bei den ETS-exponierten Kindern, die sich vermutlich längere Zeit in der näheren Umgebung der rauchenden Eltern und anderer rauchender Familienmitglieder aufhielten, auch mehr Hb-Addukte nachweisbar waren, wurde eine Aufteilung in zwei Altersgruppen vorgenommen.

Als plausibel erschien es hierbei, eine Gruppeneinteilung in zwei- bis sechsjährige Kinder und sieben- bis 16-jährige Kinder zu wählen, da Säuglinge, Kleinkinder und Vorschulkinder sich wahrscheinlich längere Zeit in der Wohnung oder der Nähe der Eltern befanden als ältere Kinder.

Für die Hb-Addukte von 4-ABP ergab sich in der Gruppe von zwei bis sechs Jahren (n=12) ein Mittelwert von 54,1 pg/g Hb. Dem stand ein Mittelwert von 55,4 pg/g Hb in der Altersgruppe der sieben- bis 16-jährigen (n=19) gegenüber. Mit einem p-Wert von 0,80 war dieser Unterschied nicht signifikant (siehe Abb. 3.6).

Für das 3-ABP lag der Mittelwert in der Gruppe der zwei- bis sechsjährigen (n=10) bei 18,9 pg/g Hb gegenüber einem Mittelwert der sieben- bis 16-jährigen (n=14) von 18,2 pg/g Hb. Ein signifikanter Unterschied bestand auch für das 3-ABP nicht ($p=0,88$); (siehe Abb. 3.7).

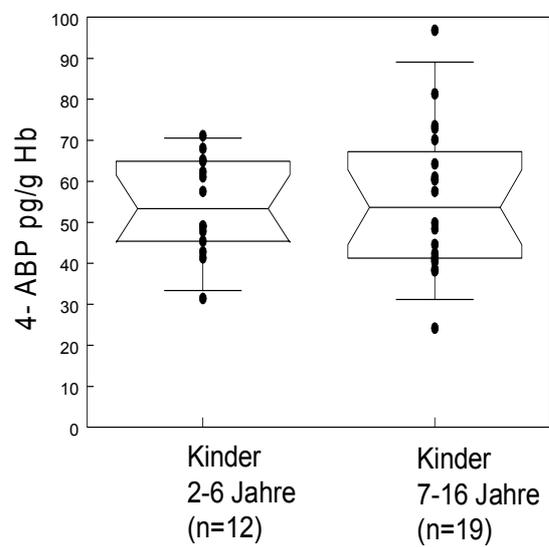


Abb. 3.6: Altersabhängige Verteilung der 4-ABP-Hb-Adduktspiegel bei ETS-exponierten Kindern

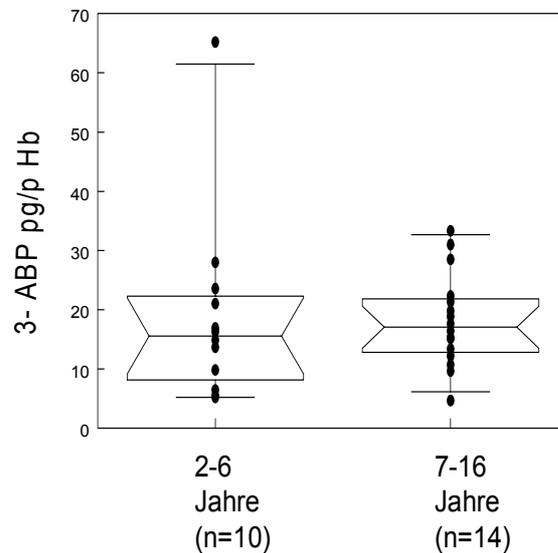


Abb. 3.7: Altersabhängige Verteilung der 3-ABP-Hb-Adduktspiegel bei ETS-exponierten Kindern

3.5 Altersabhängige Differenz der Mikrokernraten

Um die Altersabhängigkeit für die MK-Raten bei ETS-exponierten Kindern zu analysieren, wurden diese ebenfalls in zwei Altersgruppen von zwei bis sechs Jahren und von sieben bis 16 Jahren unterteilt.

Jedoch ergab sich nur ein geringer Unterschied zwischen den beiden Altersgruppen. Der Mittelwert von zwei- bis sechs-jährigen Kindern (n=15) lag bei 5,2 MK/1000 doppelkernige Zellen gegenüber 5,1 MK/1000 doppelkernige Zellen bei sieben- bis 16-jährigen Kindern (n=10). Der p-Wert betrug 0,98 (siehe Abb. 3.8).

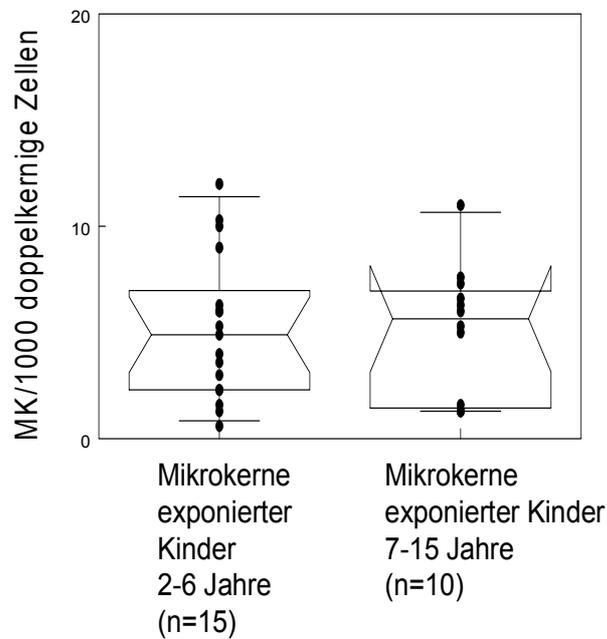


Abb. 3.8: Altersabhängige Verteilung der MK-Raten bei ETS-exponierten Kindern

Für Erwachsene waren geschlechtsspezifische Unterschiede der MK-Raten bekannt. Mädchen in der Gruppe von zwei bis sechs Jahren zeigten im untersuchten Kollektiv durchschnittliche MK-Raten von 6,4 MK/1000 doppelkernige Zellen und Jungen derselben Altersgruppe 4,6 MK/1000 doppelkernige Zellen bei einem p-Wert von 0,28. In der Altersgruppe von sieben bis 16 Jahren lagen die MK-Raten bei durchschnittlich 5,4 MK/1000 doppelkernige Zellen bei Mädchen und 4,8 MK/1000 doppelkernige Zellen bei Jungen ($p = 0,76$).

Zur Untersuchung der – bei Erwachsenen festgestellten – großen interindividuellen Streubreite der MK-Raten wurden zunächst die nicht ETS-exponierten Kinder zudem in zwei Altersgruppen von zwei bis zehn Jahren und von elf bis 16 Jahren eingeteilt. Auch hier erfolgte zusätzlich eine Trennung in weibliche und männliche Probanden. Dabei ergaben sich für weibliche Probanden zwischen den beiden Altersgruppen signifikante Unterschiede in der MK-Zahl. Mädchen von zwei bis zehn Jahren hatten durchschnittlich 2,3 MK/1000 doppelkernige Zellen gegenüber 4,6 MK/1000 doppelkernigen Zellen bei Mädchen von elf bis 16 Jahren bei einem p-Wert von 0,007. Für männliche Probanden bestand kein signifikanter Unterschied zwischen diesen beiden Altersgruppen. Jungen von zwei bis zehn Jahren hatten durchschnittlich 3,7 MK/1000 doppelkernige Zellen und Jungen von elf bis 16 Jahren durchschnittlich 3,2 MK/1000 doppelkernige Zellen ($p=0,65$). Innerhalb der beiden Altersgruppen zeigten sich keine geschlechtsspezifischen Unterschiede in den MK-Raten, der p-Wert in der Altersgruppe von zwei bis zehn Jahren betrug beim Vergleich von Mädchen und Jungen 0,16, in der Altersgruppe von elf bis 16 Jahren lag der p-Wert bei 0,26 (siehe Abb. 3.9).

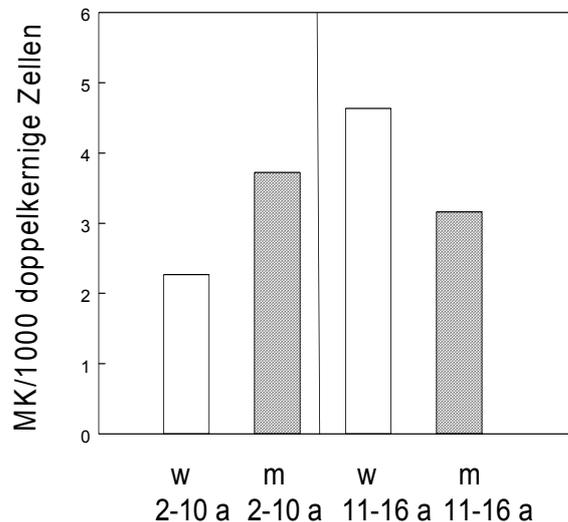


Abb. 3.9: Alters- und geschlechtsabhängige Verteilung der MK-Raten bei nicht ETS-exponierten Kindern

Bei den ETS-exponierten Kindern konnten keine alters- und geschlechtsspezifischen Unterschiede in der MK-Zahl nach Einteilung der Kinder in Gruppen analog zu den nicht ETS-exponierten Kindern gefunden werden. Der Mittelwert für Mädchen lag sowohl in der Gruppe von zwei bis zehn Jahren als auch in der Gruppe von elf bis 16 Jahren bei 6,3 MK/1000 doppelkernige Zellen. Für zwei bis zehnjährige Jungen lag der Mittelwert bei 4,5 MK/1000 doppelkernige Zellen, für elf- bis 16-jährige Jungen bei 3,7 MK/1000 doppelkernige Zellen ($p=0,72$). Auch ein geschlechtsspezifischer Unterschied war nicht vorhanden, da der p-Wert beim Vergleich von Mädchen und Jungen in der Altersgruppe von zwei bis zehn Jahren bei 0,19 und in der Altersgruppe von elf bis 16 Jahren bei 0,56 lag (siehe Abb. 3.10).

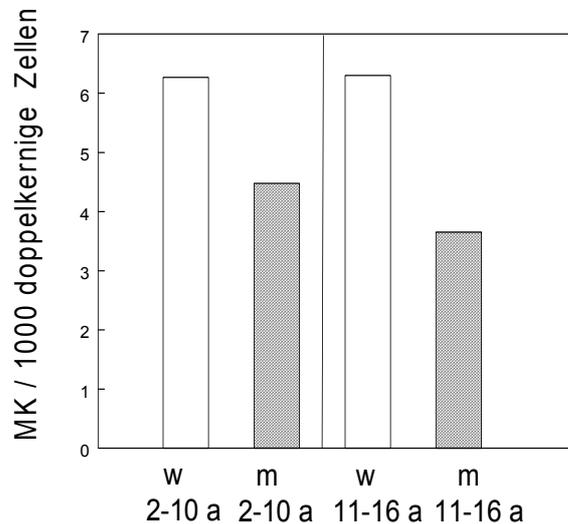


Abb. 3.10: Alters- und geschlechtsabhängige Verteilung der MK-Raten bei ETS-exponierten Kindern

3.6 Zytokineblock-Mikrokernassay mit tiefgefrorenen Lymphozyten

Bei dieser Untersuchung lag ebenfalls die Fragestellung zugrunde, ob sich die MK-Raten von ETS-exponierten Kindern von denen nicht ETS-exponierter Kinder unterscheiden. Außerdem war ein Ziel dieser Untersuchung festzustellen, ob es generell möglich ist, den Mikrokernassay in vergleichbarer Qualität auch mit kryokonservierten Lymphozyten durchzuführen.

Diese Analyse wurde an insgesamt 27 Proben durchgeführt, wovon 14 zu der Gruppe der ETS-exponierten und 13 zur Gruppe der nicht ETS-exponierten Kinder gehörten. Die MK-Raten von ETS-exponierten und nicht ETS-exponierten Kindern lagen dabei sehr eng beieinander. So betrug der Mittelwert für exponierte Kinder 2,9 MK/1000 doppelkernige Zellen, der Mittelwert für nicht exponierte Kinder 2,6 MK/1000 doppelkernige Zellen. Dieser geringe Unterschied war nicht signifikant ($p=0,68$). Im Vergleich von frischen und tiefgefrorenen Lymphozyten der nicht ETS-exponierten Kinder lagen die MK-Raten ebenfalls relativ nahe beieinander. Für die Raten aus sofort aufgearbeiteten Lymphozyten ergab sich ein Mittelwert von 3,2 MK/1000 doppelkernige Zellen. Demgegenüber betrug der Mittelwert der vor Verarbeitung kryokonservierten Lymphozyten 2,9 MK/1000 doppelkernige Zellen. Damit lagen die durchschnittlichen MK-Raten von sofort aufgearbeiteten Proben bei nicht ETS-exponierten Kindern höher als bei tiefgefrorenen Proben.

Hingegen zeigten die MK-Raten von ETS-exponierten Kindern sehr deutliche Unterschiede zwischen den sofort kultivierten und den zuvor gefrorenen Lymphozyten. Die frischen Lymphozyten zeigten einen Mittelwert von 5,8 MK/1000 doppelkernige Zellen, der Mittelwert der tiefgefrorenen Lymphozyten lag bei 2,9 MK/1000 doppelkernige Zellen. Dieser Unterschied war mit einem p -Wert von 0,006 signifikant (siehe Abb. 3.11).

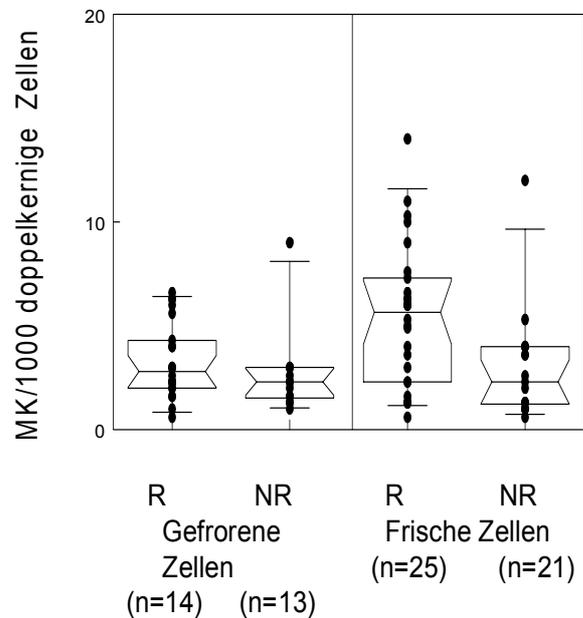


Abb. 3.11: Vergleich der MK-Raten in frisch und gefroren verarbeiteten Zellen von nicht ETS-exponierten und exponierten Kindern

Desweiteren war in dieser Versuchsreihe auffällig, dass sich die durchschnittlichen prozentualen Anteile an doppelkernigen Zellen in den Auszählungen deutlich unterscheiden. Hierbei zog man die Auszählprotokolle von 73 Proben heran und berechnete aus den jeweils drei Zählungen pro Proband, die je 1000 Zellen umfassten, den Mittelwert der prozentualen Anteile der doppelkernigen Zellen. Eine Unterscheidung erfolgte in frische und tiefgefrorene Lymphozytenkulturen. Hierbei ergab sich ein Mittelwert für die sofort verarbeiteten Zellen von 64,5% doppelkernigen Zellen pro 1000 gezählten Zellen mit einem Median von 66,6%.

Die kryokonservierten Zellen wiesen einen Mittelwert von 58,6% doppelkernigen Zellen pro 1000 gezählten Zellen mit einem Median von 61,3% auf. Dieser Unterschied war mit einem p-Wert von 0,014 signifikant (siehe Abb. 3.12).

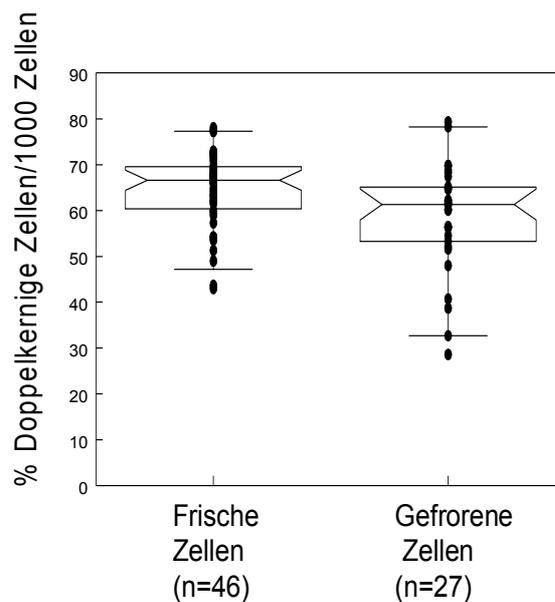


Abb. 3.12: Anteile doppelkerniger Zellen bei der Auswertung von frisch und tiefgefroren verarbeiteten Lymphozyten

3.7 Epidemiologische Auswertung der Fragebögen

Man bewertete die Aussagen aus insgesamt 143 Fragebögen. Hierbei war vor allem die Verteilung von Erkrankungen des HNO-ärztlichen Bereichs in den Gruppen der ETS-exponierten und nicht ETS-exponierten Kinder relevant.

Genauer untersucht wurde die Verteilung von folgenden Erkrankungen in den beiden Gruppen:

1. Atopische Erkrankungen
2. Paukenergüsse und Otitiden
3. Rachenmandelhyperplasie und Erkrankungen der Gaumenmandeln
4. Chronische Bronchitis mit chronischem Husten
5. Asthma
6. Rezidivierende Infekte

3.7.1 Atopische Erkrankungen

Nach Beurteilung aller 143 Fragebögen konnten 65 der Kinder als ETS-exponiert und 78 als nicht ETS-exponiert klassifiziert werden. Von den exponierten Probanden zeigten 27,7% eine Allergie mit unterschiedlichen Manifestationsarten. In der nicht ETS-exponierten Gruppe waren 26,6% aller Kinder von einer allergischen Krankheit betroffen.

Nach Ausschluss von Allergien mit Hautmanifestationen wie z.B. Neurodermitis oder Kontaktallergie war der Unterschied deutlicher. Von den exponierten Kindern waren hier 23,1% betroffen, vom nicht exponierten Kollektiv 17,7%. Dieser Unterschied war nicht signifikant (siehe Abb. 3.13).

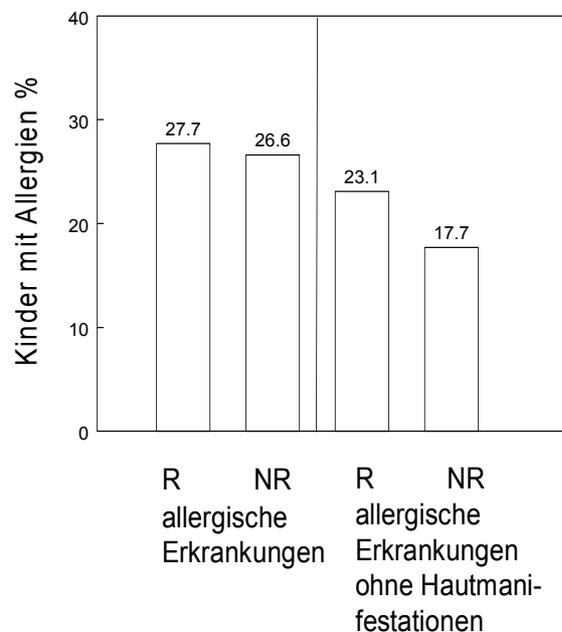


Abb. 3.13: Verteilung allergischer Erkrankungen bei ETS-exponierten und nicht ETS-exponierten Kindern mit und ohne Einschluss von Hautmanifestationen

3.7.2 Paukenergüsse und Otitiden

Probanden mit Paukenergüssen in ihrer Anamnese waren in der Gruppe ETS-exponierter Kinder mit 26% gegenüber 30,4% in der nicht ETS-exponierten Gruppe vertreten. Auch hier war der Unterschied nicht signifikant.

Für die entzündlichen Erkrankungen des Gehörorgans – die Otitiden – fanden sich sogar höhere Werte in der nicht ETS-exponierten Gruppe. Hier hatten 32,3% der ETS-exponierten Kinder in der Anamnese eine Otitis gegenüber 34,6% in der nicht ETS-exponierten Gruppe.

3.7.3 Rachenmandelhyperplasie und Erkrankungen der Gaumenmandeln

Diese Krankheitsgruppe wurde bei ETS-exponierten Kindern mit einer Häufigkeit von 18,6% gegenüber 18,9% in der Gruppe der nicht ETS-exponierten Kinder gefunden. In den Fragebögen wurde auch die Behandlungsbedürftigkeit dieser Erkrankungsgruppe erfragt. Hier zeigte sich für die Adenotomie als Therapieansatz bei Polypen, dass die ETS-exponierten Kinder mit einem Anteil von 56,9% deutlich häufiger einer Adenotomie unterzogen werden mussten als die nicht ETS-exponierten Kinder mit 49,4%.

Umgekehrte Verhältnisse lagen für die Tonsillektomie zur Therapie der Tonsillitis vor. ETS-exponierte Kinder wurden nur zu 20% tonsillektomiert. Demgegenüber wurden 24% der nicht ETS-exponierten Probanden auf diese Weise versorgt (siehe Abb. 3.14).

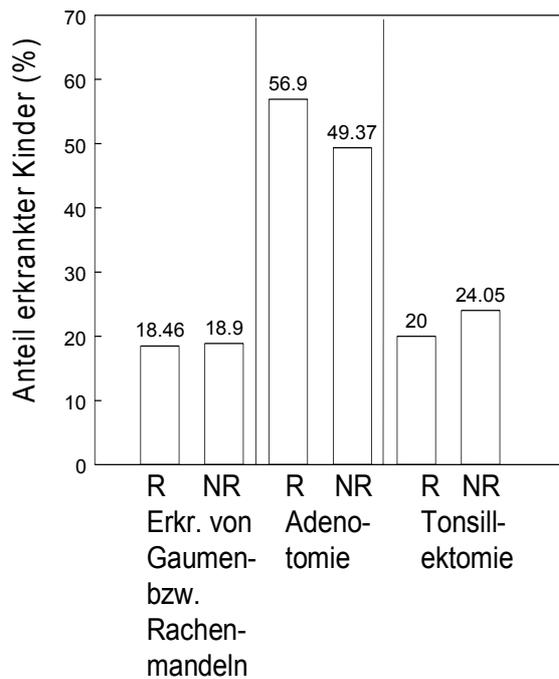


Abb. 3.14: Häufigkeitsverteilung von Rachenmandelhyperplasien und Erkrankungen der Gaumenmandeln und deren Therapie durch Tonsillektomie und Adenotomie bei ETS-exponierten und nicht ETS-exponierten Kindern

3.7.4 Chronische Bronchitis

Eine chronische Bronchitis fand sich bei 13,9% der ETS-exponierten Kinder gegenüber 16,7% bei nicht ETS-exponierten Kindern. Das Symptom des chronischen Hustens zeigten 29,2% aus der ETS-exponierten Gruppe und 29% aus der nicht ETS-exponierten Gruppe. Es war unklar, ob der Husten immer der chronischen Bronchitis zugeordnet werden durfte oder ob dieser nicht auch auf die Reizwirkung des Tabakrauches oder anderer reizender Stoffe zurückgeführt werden konnte.

3.7.5 Asthma

Kinder mit Asthma fanden sich in der ETS-exponierten Gruppe zu 7,6%. Demgegenüber litten in der Gruppe der nicht ETS-exponierten Kinder 5,1% an Asthma.

3.7.6 Rezidivierende Infekte

Als rezidivierende Infekte wurden mehr als 6 Infektionserkrankungen innerhalb eines Jahres gewertet. In die Fragebögen gingen fieberhafte Erkältungskrankheiten und Magen-Darmbeschwerden sowie Durchfälle ein. Von den ETS-exponierten Kindern zeigten 7,7% solche rezidivierenden Beschwerden, in der nicht ETS-exponierten Gruppe waren es 12,7%.

3.8 Evaluation möglicher Störgrößen anhand der Fragebögen

Um mögliche Confounder der Versuchsergebnisse durch Umwelteinflüsse zu erkennen und dadurch die Interpretation der Ergebnisse zu verbessern, berücksichtigte man in den Fragebögen vor allem die Wohnverhältnisse der Kinder. Von Interesse waren hier Faktoren wie Wohnort in der Stadt oder auf dem Land, Nähe der Wohnung zu Hauptverkehrsstraßen, Autobahnen, industriellen Betrieben, Tankstellen und Müllverbrennungsanlagen sowie eine mögliche Abgasbelastung der Wohnung durch Einzelöfen. Außerdem wurden die Ernährungsgewohnheiten der Kinder vor dem Hintergrund erhoben, dass vor allem der Verzehr von geräucherten und gegrillten Fleisch- und Wurstwaren zu einer Erhöhung der Hb-Addukte von aromatischen Aminen führen kann. Hierbei zeigte sich eine gewisse Heterogenität der Häufigkeitsverteilungen in der nicht ETS-exponierten und der ETS-exponierten Gruppe.

Von den ETS-exponierten Kindern lebten 24,2% im Stadtgebiet gegenüber 18,8% der nicht ETS-exponierten Gruppe. Als Stadtgebiet galten hier Orte mit mehr als 10000 Einwohnern. Die Nähe zu Hauptverkehrsstraßen und Tankstellen wurde angenommen, wenn diese laut den elterlichen Angaben in einer Entfernung von bis zu einem Kilometer von der Wohnung lagen, für Autobahnen, Müllverbrennungsanlagen und Industriebetriebe wurde die Grenze mit drei Kilometern Entfernung zum Wohnort bemessen. Hierbei ergab sich, dass von den ETS-exponierten Kindern 54,5% in der Nähe einer Hauptverkehrsstraße lebten sowie 31,8% in der Nähe einer Tankstelle. In der nicht ETS-exponierten Gruppe lebten 45% in der Nähe von Hauptverkehrsstraßen und 16,3% in der Nähe von Tankstellen. 18,2% der ETS-exponierten Probanden lebten in der Nähe von Autobahnen gegenüber 25% der nicht ETS-exponierten Probanden. Der Wohnort von 19,7% der ETS-exponierten Kinder und von 21,3% der nicht ETS-exponierten Kinder lag in der Nähe eines Industriebetriebes, in der Nähe von Müllverbrennungsanlagen lebten 6,1% der Kinder von Rauchern und 10% der Kinder von Nichtraucher.

Die Frage nach Einzelöfen in der Wohnung beantworteten 31,8% der rauchenden Eltern mit „ja“ gegenüber 18,8% der nichtrauchenden Eltern.

Außerdem nahmen Kinder, die ETS-exponiert waren, mehr gegrillte oder geräucherte Fleisch- und Wurstwaren zu sich. Für die gegrillten Nahrungsmittel waren es 21% bei den ETS-exponierten Kindern gegenüber 13% bei nicht ETS-exponierten Kindern. Geräucherte Fleisch- und Wurstwaren nahmen 13,6% der ETS-exponierten Kinder und 12,5% der nicht ETS-exponierten Kinder häufig zu sich (siehe Abb. 3.15 und 3.16).

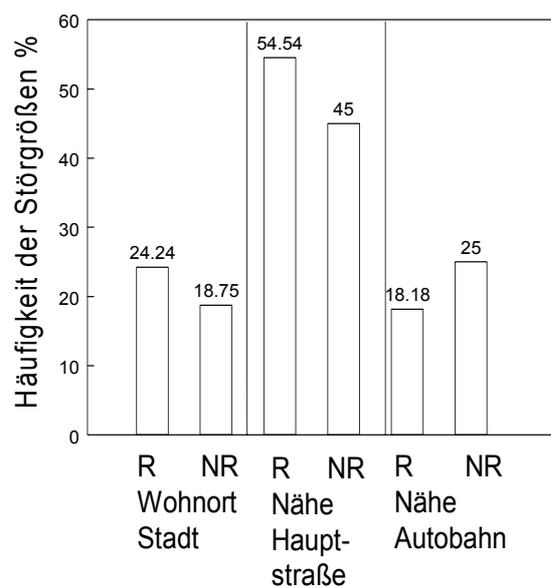


Abb. 3.15: Häufigkeitsverteilung möglicher Störgrößen, die sowohl die MK-Rate als auch die Höhe der Hb-Adduktspiegel beeinflussen konnten

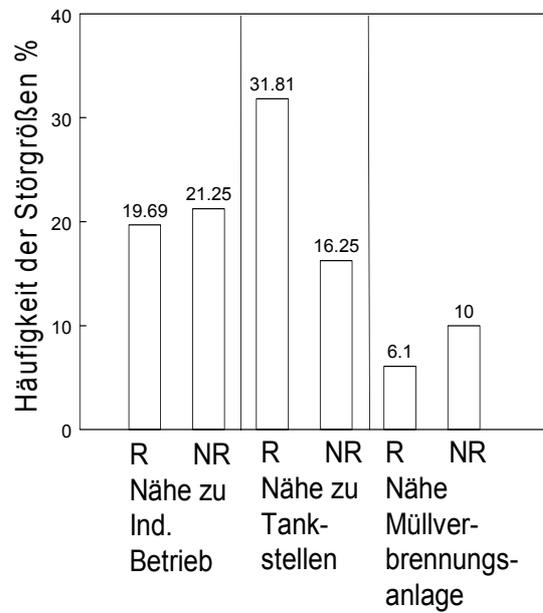


Abb. 3.16: Häufigkeitsverteilung möglicher Störgrößen, die sowohl die MK-Rate als auch die Höhe der Hb-Adduktspiegel beeinflussen konnten

4 Diskussion

4.1 Biochemische Marker

4-ABP bot sich als Marker für eine Exposition gegenüber ETS an, da es im ETS um den Faktor 30 höher konzentriert vorkommt als im Hauptstromrauch (Hammond et al. 1993). Dallinga et al. 1998 fanden zunächst für Raucher höhere 4-ABP-Hb-Adduktspiegel als für Nichtraucher. Benowitz et al. 1999 wiesen kurz darauf auch höhere 4-ABP-Hb-Adduktspiegel bei ETS-exponierten Erwachsenen verglichen mit nicht ETS-exponierten Erwachsenen nach.

Ergebnissen von Bryant et al. 1987 zufolge, wird das 4-ABP im menschlichen Organismus am 93- β -Cystein des Hb kovalent gebunden. Diese Bindung blieb in vivo stabil, ließ sich aber im Versuch durch Hydrolyse lösen, so dass der massenspektrometrische Nachweis nach vorheriger chromatographischer Isolierung möglich war. Das Addukt bildete sich dosisabhängig über den gesamten Zeitraum der Erythrozytenlebensdauer von ca. 120 Tagen. Bei aktiven Rauchern nahmen die Adduktspiegel innerhalb von 6-8 Wochen wieder ab, falls mit dem Rauchen aufgehört wurde.

Voraussetzung für die Adduktbildung war die Metabolisierung der Ursprungsverbindung durch N-Hydroxylierung. Zwar gab es noch andere Umgebungsquellen für das 4-ABP wie zum Beispiel bestimmte Speisefarbstoffe, jedoch war davon auszugehen, dass ein beträchtlicher Teil der bei ETS-exponierten nichtrauchenden Personen nachweisbaren 4-ABP-Hb-Adduktspiegel durch das 4-ABP aus Tabakwaren verursacht wurde (Bryant et al. 1987). Baier et al. 2001 zogen weitere Hintergrundbelastungen mit 4-ABP durch Dieselabgase oder geräuchertes bzw. gegrilltes Fleisch in Erwägung.

Hier konnte nachgewiesen werden, dass ETS-exponierte Kinder signifikant höhere 4-ABP-Hb-Adduktspiegel aufwiesen als nicht ETS-exponierte Kinder. Zwar zeigten auch die nicht ETS-exponierten Kinder deutlich nachweisbare Adduktspiegel, was aber auf andere Umweltbelastungen mit 4-ABP zurückzuführen war.

Auch die ETS-exponierten Kinder waren diesen Belastungen ausgesetzt, so dass die ETS-Exposition den signifikanten Unterschied zu begründen schien. Wie in zahlreichen anderen Studien erwies sich auch in der vorliegenden Arbeit die Verwendung von 4-ABP-Hb-Addukten zur Expositionsüberprüfung gegenüber ETS als aussagekräftig. Jedoch lag hier ebenfalls eine hohe interindividuelle Varianzbreite der Adduktspiegel vor. So betrug der kleinste Wert der exponierten Kinder 24,2 pg 4-ABP/g Hb, der größte 96,8 pg 4-ABP/g Hb. Bei den nicht ETS-exponierten Kindern reichten die Adduktspiegel von einem Minimum von 25,7 pg 4-ABP/g Hb bis zu einem Maximum von 85,7 pg 4-ABP/g Hb. Eine denkbare Ursache für diese große Streuung war möglicherweise der interindividuell unterschiedliche Metabolismus für das 3- und 4-ABP. Nach Baier et al. 2001 bestand die Möglichkeit, dass hierfür vor allem hepatische Enzyme verantwortlich waren, die genetischen Polymorphismen unterliegen. Vor allem handelte es sich um Enzyme wie die Cytochrom-P-450-gekoppelten Oxygenasen, die N-Acetyltransferasen und Glutathiontransferasen (GSTT 1 und GSTT 2), die für die Entgiftung der aromatischen Amine verantwortlich waren. Die verschiedenen Genotypen dieser Enzyme im Individuum führten zu unterschiedlichen Metabolisierungsgeschwindigkeiten und damit auch zu unterschiedlich hohen Adduktspiegeln. Für Geschwisterpaare wurden bei nahezu identischen äußeren Bedingungen identische Adduktspiegelhöhen beschrieben. Diese genetisch determinierten Unterschiede in der Metabolisierungsgeschwindigkeit und – damit verknüpft – den Adduktspiegelhöhen machten auch andere Studien für die hohe interindividuelle Schwankungsbreite verantwortlich (Maclure et al. 1980). Für das 3-ABP ergaben sich erhöhte Werte bei ETS-exponierten Kindern im Vergleich mit nicht ETS-exponierten Kindern. Diese Unterschiede waren jedoch nicht signifikant, so dass die Verwendbarkeit von 3-ABP-Hb-Addukten für die Beurteilung einer Exposition gegenüber ETS anhand der gefundenen Ergebnisse nicht abschließend beurteilt werden konnte. Hierfür wären vor allem größere Fallzahlen notwendig. Jedoch gelang Tannenbaum et al. 2003 der Nachweis, dass Hb-Addukte von 3-ABP in Patienten mit Blasenkrebs signifikant höher vorhanden waren als in Kontrollpersonen.

Andere 3-ABP-Quellen als Tabakrauch konnten dieses Ergebnis nicht erklären, so dass von einem Zusammenhang zwischen der 3-ABP-Exposition aus Tabakrauch und ETS-assoziiertem Blasenkrebs auszugehen war.

Die Untersuchung von Hb auf Addukte von 4-ABP und 3-ABP wurde an insgesamt 66 Blutproben durchgeführt. Daraus ergab sich für das 4-ABP, dass ETS-exponierte Kinder signifikant höhere Adduktspiegel aufwiesen als nicht ETS-exponierte Kinder. Der gleichzeitige Nachweis von 3- und 4-ABP-Hb-Adduktspiegeln ließ darauf schließen, dass eine Bindung dieser aromatischen Amine gleichzeitig auch an andere Strukturen wie DNA erfolgte.

Laut Birner et al. 1990 war von einer sicheren gleichzeitigen Bindung an die DNA auszugehen, da beiden Adduktbildungsmechanismen gemeinsame Metabolisierungsschritte zugrunde lagen. Diese Bindung von 4-ABP an DNA ist eine Grundlage für Mutagenität.

Durch die Ergebnisse ließ sich belegen, dass ETS-exponierte Kinder kanzerogenen Stoffen ausgesetzt waren, die im Vergleich zu nicht ETS-exponierten Kindern in erhöhtem Maße im Körper dieser Kinder nachgewiesen werden konnten.

Spengler et al. 1999 fanden in einer Studie zur Verteilung des ETS heraus, dass die höchsten ETS-Konzentrationen in Bars, Gaststätten und Nachtclubs vorlagen, gefolgt vom häuslichen Milieu und Büros. Deshalb erschien es plausibel, dass bei ETS-exponierten Kindern, die viel Zeit zu Hause verbrachten, mit einer besonders hohen ETS-Exposition zu rechnen war.

Da vor allem Kleinkinder und Kinder im Vorschulalter besonders viel Zeit zuhause verbringen, wurden die exponierten Kinder in zwei Altersgruppen von zwei bis sechs Jahren und von sieben bis 16 Jahren unterteilt. Die Erwartung, dass die jüngere Altersgruppe höhere Werte an ABP-Hb-Addukten aufweisen müsste, bestätigte sich allerdings nicht, da sowohl für das 3- als auch für das 4-ABP die Mengen gefundener Hb-Addukte sehr nahe beieinander lagen und nur nicht signifikante Unterschiede vorlagen. Für das 4-ABP zeigte die ältere Altersgruppe sogar geringgradig höhere Werte als die jüngere Gruppe.

Diese nur geringen Unterschiede waren vor allem auf die geringe Probenzahl zurückzuführen, da nur von 33 exponierten Kindern die 4-ABP-Hb-Addukte und von 28 Kindern die 3-ABP-Hb-Addukte nachgewiesen werden konnten.

Auch eine Studie von Hammond et al. 1995 ging von einer hohen ETS-Belastung im häuslichen Milieu aus, die zwar nicht die Werte wie an Arbeitsplätzen erreichte, aber dennoch deutlich zur Belastung der Bevölkerung mit ETS beitrug. Da die ETS-exponierten Kinder hier erhöhte Adduktspiegel für 4-ABP und 3-ABP aufwiesen, war die Belastung von Kindern mit ETS ernst zu nehmen.

Baier et al. 2001 konnten nachweisen, dass die 4-ABP-Hb-Adduktspiegel umso höher lagen, je mehr Zigaretten pro Tag in der Nähe der Kinder geraucht wurden. Eine solche Beziehung lag in dieser Arbeit nicht vor. Als Grund dafür kann die zu geringe Fallzahl gesehen werden, da nur 20 Elternpaare der exponierten Kinder die erforderlichen Angaben zur Zahl der pro Tag gerauchten Zigaretten machten.

4.2 Marker für Genomschädigung

Die Verwendung des Zytokineseblock-Mikrokernassay als Untersuchungsverfahren für eine Genomschädigung erfolgte zuvor bereits häufig (Benner et al. 1993, Fenech 1990). Nach Bonassi et al. 2001 kommt es vor allem durch die umweltbedingte Exposition gegenüber genotoxischen Agenzien zu einer Zunahme der MK-Rate. Zu solchen Agenzien ist auch ETS zu zählen (Sorsa et al. 1989). Nach Tucker und Preston 1996 konnten MK zum Nachweis einer Exposition gegenüber Chemikalien und Strahlen verwendet werden.

Erhöhte MK-Raten fanden sich bei Kindern mit einer Strahlenexposition durch die Katastrophe von Tschernobyl, bei denen in der Zwischenzeit ein Schilddrüsenkarzinom aufgetreten war (Migliore et al 1999). Demnach zeigten erkrankte Kinder aus der Region Gomel in Weißrussland signifikant höhere MK-Raten als gesunde Kontrollkinder aus Pisa.

In der vorliegenden Studie fand man bei ETS-exponierten Kindern eine signifikant erhöhte MK-Rate gegenüber nicht ETS-exponierten Kindern. Zu demselben Ergebnis kamen auch Baier et al 2001, wobei in dieser Untersuchung die Mittelwerte der MK-Raten bei ETS-exponierten und nicht ETS-exponierten Kindern höher lagen als in der vorliegenden Arbeit.

Diese Variabilitäten der MK-Raten zwischen verschiedenen Arbeiten wurden von Bonassi et al. 2001 im Rahmen des Human Micronucleus Projects untersucht. Bonassi et al. 2001 kamen zu dem Schluss, dass der wichtigste Faktor, der die Unterschiede der MK-Raten beeinflusst, die interindividuellen Methoden bei der Zählung von MK sind.

Bei den methodischen Unterschieden in verschiedenen Labors fanden Bonassi et al. 2001 Unterschiede in den verwendeten Konzentrationen von Cytochalasin B, wonach eine Konzentration von 6 µg/ml zwar effektiver die Zellteilung hemmte als 3 µg/ml, aber die höhere Cytochalasin-B-Konzentration auch zu niedrigeren MK-Raten führte.

Unterschiede in den verwendeten Nährmedien und deren Zusätzen beeinflussten laut Bonassi et al. 2001 die MK-Raten nicht. Außerdem postulierten Fenech und Morley 1985 eine alters- und geschlechtsabhängige Differenz in der Spontanrate von MK. So sollte mit dem Alter die spontane MK-Rate kontinuierlich ansteigen, wobei Frauen generell höhere Raten aufwiesen.

Allerdings fanden Bonassi et al. 2001 durch Vergleiche einer Vielzahl von Studien aus verschiedenen Labors heraus, dass diese Alters- und Geschlechtsabhängigkeit erst ab dem 20. Lebensjahr statistisch signifikant zum Tragen kam, wogegen für Kinder und Jugendliche bis zum 20. Lebensjahr keine signifikanten Unterschiede zu erwarten waren. Dies wurde auch in der vorliegenden Arbeit überprüft, wobei die Unterschiede spontaner MK-Raten bei nicht ETS-exponierten Kindern fast immer nicht signifikant waren. Der signifikante Unterschied zwischen zwei- bis zehnjährigen und elf- bis 16-jährigen Mädchen ließ sich durch die geringen Fallzahlen erklären, da in der älteren Gruppe nur drei Mädchen vertreten waren gegenüber sechs in der jüngeren Gruppe. Allgemein schränkten die sehr geringen Gruppengrößen die Aussagekraft der gefundenen Ergebnisse ein.

Dennoch entsprachen die Resultate für spontane MK-Raten, also die Raten bei nicht ETS-exponierten Kindern, denen des Human Micronucleus Projects. Demnach bestand kein geschlechtsspezifischer Unterschied in den einzelnen Altersgruppen. Außerdem lag kein signifikanter Unterschied zwischen männlichen Probanden der beiden Altersgruppen vor.

Um die Aussagekraft des signifikanten Unterschiedes der MK-Zahlen zwischen nicht ETS-exponierten und ETS-exponierten Kindern zu erhöhen, wurde die Alters- und Geschlechtsabhängigkeit auch bei ETS-exponierten Kindern analysiert. Dabei handelte es sich hier nicht um spontan entstandene MK, sondern um von außen durch den Einfluss genotoxischer Stoffe, also dem ETS, induzierte MK. Doch auch hier ergaben sich keine signifikanten Hinweise für alters- oder geschlechtsspezifische Einflüsse. Mädchen zeigten in beiden Altersgruppen nahezu identische Mittelwerte für die MK, bei Jungen war der altersabhängige Unterschied etwas deutlicher als bei Mädchen. Die geschlechtsspezifischen Unterschiede in den einzelnen Altersgruppen waren zwar deutlich ausgeprägt, aber ebenfalls nicht signifikant.

Auch hier schien die geringe Gruppengröße für die gefundenen Unterschiede verantwortlich zu sein. Daraus konnte abgeleitet werden, dass bei ähnlichen spontanen MK-Raten sowohl Mädchen als auch Jungen gleichermaßen durch ETS genetischer Schaden in Form von MK zugefügt werden konnte.

Für Kinder besteht hauptsächlich im häuslichen Milieu eine Gefährdung durch ETS. Andere Gefahrenquellen, wie sie von Spengler et al. 1999, Jenkins und Counts 1999 oder Hammond et al. 1995 genannt wurden, also die Exposition am Arbeitsplatz, in Bars, Restaurants oder Nachtclubs, spielten für das Probandenkollektiv, das in dieser Arbeit untersucht wurde, keine Rolle. Die Exposition im häuslichen Milieu durch den von Familienmitgliedern erzeugten ETS stellte daher die Hauptquelle für die Kinder dar. Da sich Kinder verschiedener Altersgruppen meist unterschiedlich lange zu Hause befanden, erschien es sinnvoll zu untersuchen, ob Kinder, die sich wahrscheinlich länger zu Hause oder in näherer Umgebung zu rauchenden Familienmitgliedern (vor allem den Eltern) aufhielten, auch höhere MK-Raten zeigten als solche, die wahrscheinlich weniger Zeit zu Hause verbrachten.

Vermutlich waren es Kinder im Kleinkindes-, Kindergarten- und Vorschulalter, die mehr Zeit in der Wohnung verbrachten als Kinder im Schulalter oder Jugendliche.

Die in dieser Altersgruppeneinteilung gefundenen Ergebnisse erlaubten jedoch keine sichere Interpretation, da die zwei bis sechsjährigen nur geringgradig höhere MK-Zahlen als die sieben- bis 16-jährigen Kinder aufwiesen.

Die dabei festgestellten geschlechtsspezifischen Unterschiede entsprachen in ihrer Aussage der Einteilung in die Altersgruppen von zwei bis zehn Jahren und von elf bis 16 Jahren, da Mädchen in der Gruppe von zwei bis sechs Jahren durchschnittlich nur wenig mehr MK aufwiesen als gleichaltrige Jungen.

In der älteren Gruppe wurden bei Mädchen ebenfalls nur geringgradig höhere MK-Raten nachgewiesen als bei gleichaltrigen Jungen. Dies deutete darauf hin, dass Jungen und Mädchen gleiche Empfindlichkeiten gegenüber ETS hatten.

Wie mit den Hb-Addukten von 4-ABP wurde auch hier nach einer Abhängigkeit der MK-Raten von der Anzahl der pro Tag in der Nähe der Kinder gerauchten Zigaretten gesucht. Eine solche Abhängigkeit lag aber nicht vor. Aufgrund der fehlenden Angaben der Eltern, konnten jedoch auch hier nur sehr wenige Kinder den jeweiligen Gruppen zugeordnet werden. Erhöhte MK-Raten hatten laut Duffaud et al. 1997 Auswirkungen auf die Gesundheit. Diese Studie fand im Vergleich von gesunden Personen mit allgemeinen Krebspatienten signifikant erhöhte MK-Raten bei Krebspatienten.

Bei gesunden Personen erhöhte Tabakkonsum die MK-Raten und Duffaud et al 1997 verwiesen in diesem Zusammenhang darauf, dass Rauchen mit Tumoren des oberen und unteren Respirationstraktes und der Harnblase kausal assoziiert war, so dass die tabakinduzierten MK einen Anhaltspunkt für die Gefahr, an einem Tumor zu erkranken, gaben.

Desweiteren fanden Tucker und Preston 1996 heraus, dass es einen kausalen Zusammenhang zwischen MK und Karzinomen gab, da praktisch alle Tumore strukturelle Chromosomenaberrationen aufwiesen.

Benner et al. 1994 konnten darüber hinaus nachweisen, dass die erhöhte MK-Rate in oralen prä-malignen Veränderungen durch Behandlung mit chemopräventiven Substanzen gesenkt werden konnte.

4.3 Korrelation der Hämoglobinaddukte von 4-Aminobiphenyl mit den Mikrokernen exponierter Kinder

Beim Vergleich von Hb-Adduktspiegeln von 4-ABP bei ETS-exponierten Kindern mit den entsprechenden MK-Raten zeigte sich eine positive Korrelation zwischen den Hb-Addukten von 4-ABP und den MK-Raten bei ETS-exponierten Kindern, so dass bei den Kindern mit erhöhten 4-ABP-Hb-Adduktspiegeln auch die MK-Raten erhöht waren. Dies galt als Hinweis auf einen kausalen Zusammenhang zwischen der Exposition gegenüber ETS und erhöhten MK-Raten. Die Tatsache, dass die Störfaktorenanalyse keinen Anhalt dafür erbrachte, dass mögliche andere 4-ABP-Quellen in der Gruppe der ETS-exponierten Kinder deutlich überrepräsentiert waren, bestärkte diesen Hinweis. Somit war zu vermuten, dass die Exposition gegenüber ETS bei den untersuchten Kindern zu erhöhten MK-Raten und damit zu mehr genetischen Schäden führte. Dies deckte sich mit Ergebnissen von Neumann et al. 1995, die beschrieben, dass das Ausmaß an DNA-Schäden umso höher war, je höher die Hb-Adduktspiegel von 4-ABP lagen.

4.4 Ergebnisse des Vergleichs des Mikrokernassays mit frischen und eingefrorenen Lymphozyten

Eine Orientierung an, bzw. ein Vergleich mit anderen Arbeiten war aufgrund fehlender Literatur nicht möglich, was die Interpretation der gefundenen Ergebnisse erschwerte. Der Zytokineseblock-Mikrokernassay mit frischen und eingefrorenen Lymphozyten wurde für beide Versuchsgruppen nach dem Auftauen der bei -20°C tiefgefrorenen Lymphozyten fast identisch durchgeführt.

Die einzigen Unterschiede bestanden darin, dass die tiefgefrorenen Zellen vor dem Einfriervorgang mit einer Lösung aus Kulturmedium und DMSO versetzt, sodann kryokonserviert und zu einem späteren Zeitpunkt im Wasserbad zügig wieder aufgetaut wurden. Nach Waschen der Lymphozyten mit Kulturmedium nahm man sie ebenfalls in Kultur. Im folgenden Mikrokernassay zeigte sich dann ein nur geringer Unterschied zwischen den MK-Raten in tiefgefrorenen Lymphozyten von ETS-exponierten und nicht ETS-exponierten Kindern.

Das Einfrieren der Lymphozyten schien diese Zellen so zu beeinflussen, dass der Effekt des ETS, der bei den frischen Lymphozyten nachgewiesen werden konnte, hier nicht mehr zum Tragen kam. Der Vergleich der Ergebnisse von tiefgefrorenen und frischen Lymphozyten nicht ETS-exponierter Kinder bestärkte diese Vermutung, da für frische Zellen die durchschnittliche MK-Rate bei 3,20 MK/1000 Zellen, für gefrorene Zellen bei 2,90 MK/1000 Zellen lag. Weitere Hinweise auf die Richtigkeit der Vermutung, dass durch das Einfrieren der ETS-Effekt auf die Lymphozyten verloren geht, ergaben sich auch aus dem Vergleich frischer mit gefrorenen Lymphozyten von ETS-exponierten Kindern.

Dieses Ergebnis war zudem mit einem p-Wert von 0,016 signifikant, so dass womöglich die Kryokonservierung oder ein Arbeitsschritt in der hier verwendeten Methode zum Verlust/zur Abschwächung des Effekts von ETS auf die Lymphozyten führte.

Ein Hinweis auf die mögliche Ursache dieses vermuteten Effekts konnte durch den Vergleich der prozentualen Anteile der doppelkernigen Zellen auf den ausgezählten Objektträgern gefunden werden. Die Anteile der doppelkernigen Zellen fasste man als Kriterium für die Stimulierbarkeit der Zellen zur Teilung auf. Es ergab sich, dass tiefgefrorene Lymphozyten signifikant schlechter zur Teilung angeregt werden konnten als frisch verarbeitete Lymphozyten. Demnach wiesen die MK-Raten von nicht ETS-exponierten Kindern in frischen und eingefrorenen Lymphozyten kaum Unterschiede auf. Dies fiel auch beim Vergleich von ETS-exponierten und nicht ETS-exponierten Kindern auf, deren Zellen tiefgefroren waren.

Gleichzeitig fanden sich jedoch signifikant unterschiedliche MK-Zahlen bei frischen und tiefgefrorenen Zellen exponierter Kinder sowie eine schlechtere Stimulierbarkeit von tiefgefrorenen Zellen gegenüber frischen Zellen.

Die Beeinflussung der Stimulierbarkeit könnte ursächlich dafür sein, dass bei tiefgefrorenen Zellen ETS seine genotoxische Wirkung nicht im gleichen Maß wie bei frischen Zellen entfalten konnte. Ein Vergleich der gefundenen Ergebnisse mit anderen Studien konnte nicht angestellt werden, jedoch deckten sich die Ergebnisse mit mündlichen Mitteilungen (Prof. Stopper).

Aufgrund dieser Ergebnisse waren tiefgefrorene Lymphozyten nicht für die Fragestellung zur Exposition gegenüber ETS mit dem beschriebenen Vorgehen zu verwenden. Gleichwohl ist einmal mehr auf die geringen Fallzahlen zu verweisen, die die Aussagekraft der Ergebnisse beeinflussten.

4.5 Ergebnisse der Fragebogenauswertung

In diesem Teil der vorliegenden Arbeit untersuchte man, ob bestimmte Krankheiten bzw. Krankheitsgruppen bei ETS-exponierten Kindern gehäuft auftraten. Insgesamt waren die Ergebnisse sehr ausgeglichen und ETS-exponierte Kinder nur selten deutlich häufiger betroffen als nicht ETS-exponierte Kinder. Bei atopischen Erkrankungen wurde zwischen Erkrankungen mit und Erkrankungen ohne Hautmanifestationen unterschieden.

Hierbei zeigte sich, dass ETS-exponierte Probanden geringgradig häufiger betroffen waren als nicht ETS-exponierte. Asthma lag bei ETS-exponierten Kindern ebenfalls etwas häufiger vor als bei nicht ETS-exponierten Kindern. Beide Ergebnisse waren nicht signifikant. Dementsprechend sind bei den untersuchten Kindern die betreffenden Krankheiten zwar bei ETS-exponierten Kindern häufiger als bei nicht ETS-exponierten Kindern, was jedoch nur als Hinweis auf einen möglichen kausalen Zusammenhang gesehen werden konnte.

Strachan und Cook 1998 hielten es für unwahrscheinlich, dass Rauchen der Eltern das Risiko für allergische Sensibilisierungen bei den Kindern erhöhte. In Bezug auf Asthma und eine ETS-Exposition stellten Lindfors et al. 1999 jedoch fest, dass ETS bei asthmatischen Kindern die Sensibilisierung gegenüber Katzenhaaren erhöhte, besonders wenn sich Kinder in schlecht belüfteten Wohnräumen aufhielten.

Das höchste Risiko, ein atopisches Asthma durch Exposition gegen Katzenhaare zu entwickeln, bestand demnach, wenn das Allergen in Verbindung mit ETS und hoher Raumluftheuchtigkeit auftrat. Ferner bezeichneten Lindfors et al. 1999 ETS als einen allseits bekannten Trigger für Asthmaanfälle.

Dieselbe Aussage machten auch Strachan und Cook 1998 und betonten die Assoziation zwischen kindlicher ETS-Exposition und erhöhter Schwere von Asthmaanfällen.

Über die Hustenerkrankungen, die in dieser Arbeit als chronische Bronchitis mit dem Symptom chronischer Husten untersucht wurden, schrieben Strachan und Cook 1999, dass deren Häufigkeit unter – in Raucherhaushalten lebenden – Kindern, deutlich erhöht war, allerdings lediglich für nicht-atopische Hustenerkrankungen.

In dieser Arbeit hatten nicht ETS-exponierte Kinder häufiger chronische Bronchitis als ETS-exponierte Kinder. Husten fand sich dagegen in beiden Gruppen gleich häufig. Wie bereits erwähnt, konnte die Frage nach dem Ursprung des Hustens nicht genauer beantwortet werden, da dieser bei ETS-exponierten Kindern wohl auch zu einem beträchtlichen Ausmaß auf die direkte Reizwirkung des ETS zurückgeführt werden konnte.

Diese Reizwirkung selbst löste möglicherweise eine chronische Bronchitis bei exponierten Kindern aus. Die nahezu gleiche Häufigkeit von Hustenerkrankungen bei nicht ETS-exponierten Kindern konnte wie auch bei ETS-exponierten Kindern durch vielfältige andere Umweltfaktoren begründet werden.

Auch für entzündliche Erkrankungen des Ohrs lagen keine Ergebnisse vor, die eine Assoziation mit ETS nahelegten. Strachan und Cook 1998 dagegen fanden für rezidivierende otitis media eine odds ratio von 1,48, falls die Kinder ETS ausgesetzt waren und für Tubenbelüftungsstörungen eine odds ratio von 1,38.

Strachan und Cook sahen deshalb eine kausale Beziehung zwischen ETS und akuter bzw. chronischer Mittelohrentzündung.

Dagegen kamen die Autoren im selben Artikel in Bezug auf rezidivierende Schwellungen und Entzündungen von Gaumen- und Rachenmandeln und deren Therapie durch Adenotonsillektomie zu Ergebnissen, die denen im untersuchten Probandenkollektiv sehr ähnlich waren, nämlich auf ein etwa gleich häufiges Auftreten mit und ohne Exposition gegenüber ETS. Dem entsprachen die hier gefundenen Ergebnisse, da kein Unterschied in der Häufigkeit dieser Erkrankungen bei ETS-exponierten und nicht ETS-exponierten Kindern gefunden werden konnte. Auch für die Therapien dieser Erkrankungen durch Adenotomie und Tonsillektomie bestand ein recht ausgewogenes Verhältnis zwischen beiden Gruppen.

Mit dem Mikrokernassay erfolgte der Nachweis, dass ETS-exponierte Kinder signifikant mehr MK in untersuchten Blutlymphozyten ausbilden als nicht ETS-exponierte Kinder. Als Folge wurde eine Abwehrschwäche exponierter Kinder mit gehäuften Infekten in Betracht gezogen, falls Lymphozyten mit MK ihre Funktion nicht mehr vollständig erfüllen konnten. Deshalb untersuchte man auch die Häufigkeit von rezidivierenden Infekten in beiden Gruppen, wobei als rezidivierende Infekte mehr als sechs fieberhafte Infekte pro Jahr galten. Exponierte Kinder wiesen jedoch nicht mehr rezidivierende Infekte auf als nicht ETS-exponierte Kinder. Die Erhebung dieser Daten erfolgte durch Fragebögen, die die Eltern der Kinder beantworteten.

Die Interpretation der Ergebnisse wurde dadurch erschwert, dass Raucher generell weniger gesundheitsbewusst leben als Nichtraucher. Deshalb musste man eine mögliche subjektive Fehlbeurteilung in Betracht ziehen, da rauchende Eltern die Beschwerden ihrer Kinder eventuell seltener als Krankheit einstufen als nichtrauchende Eltern. Im Gegenzug war aber gleichzeitig zu berücksichtigen, dass nichtrauchende Eltern mögliche Beschwerden ihrer Kinder wahrscheinlich eher als krankheitsbedingt ansahen als rauchende Eltern.

4.6 Evaluation möglicher Störgrößen

Die Untersuchung der Lebens- und Ernährungsumstände der beobachteten Kinder diente dazu, mögliche andere Einflüsse auf die MK-Entstehung und die Ausbildung von Hb-Addukten mit aromatischen Aminen zu erkennen. Einflüsse anderer Umweltfaktoren auf die MK-Rate waren wahrscheinlicher als auf Hb-Addukte, da eine Vielzahl externer gentoxischer Einflüsse die MK-Rate verändern konnten (Fenech und Morley 1986; Fenech 1999 und 1997).

Zwar war zu vermuten, dass auch überprüfte Störgrößen wie die Nähe der Wohnung zu Hauptverkehrsstraßen, Autobahnen, Industrie oder Müllverbrennungsanlagen und Tankstellen Quellen für gentoxische Agenzien darstellen konnten, jedoch war die genaue bzw. ungefähre individuelle Belastung nicht zu quantifizieren.

Im überprüften Kollektiv lebten die nicht ETS-exponierten Kinder deutlich häufiger als ETS-exponierte Kinder in der Nähe von Tankstellen. Darum konnte die Nähe zu Tankstellen ein möglicher Störfaktor sein, der die MK-Rate, aber auch die Menge der gefundenen Hb-Addukte erhöhte, weil auch Dämpfe an Tankstellen gentoxische Stoffe enthielten. Hier musste jedoch berücksichtigt werden, dass aufgrund der an Tankstellen seit einiger Zeit eingerichteten Absauganlagen nur noch geringe Konzentrationen von Benzindämpfen in die Umwelt austreten.

Die Nähe der Wohnung zu Hauptverkehrsstraßen könnte vor allem die Adduktspiegel beeinflussen, da nach Zwirner-Baier und Neumann 1998 die Exposition gegenüber Dieselsabgasen bei britischen Arbeitern zu erhöhten Hb-Addukten von aromatischen Aminen führte. Deshalb interessierte hier die Nähe des Wohnortes zu Hauptverkehrsstraßen und Autobahnen sowie ein Wohnort in einer Stadt. Jedoch konnten hinsichtlich der Verteilung dieser Confounder keine wesentlichen Häufigkeitsunterschiede zwischen beiden Gruppen gefunden werden. Auch die Belastung mit Industrieabgasen, die gesundheitsschädliche Stoffe enthielten, oder die Exposition gegenüber den Verbrennungsprodukten von Müllverbrennungsanlagen konnte möglicherweise einen Einfluss auf die hier verwendeten Marker zur Überprüfung der ETS-Exposition haben.

Allerdings war die Verteilung dieser Störgrößen in beiden Gruppen ähnlich, so dass die Ergebnisse keine Hinweise auf eine Beeinflussung der MK-Rate oder Hb-Addukte ergaben.

Nach Baier et al. 2001 bestand ein Zusammenhang zwischen geräucherten und gegrillten Nahrungsmitteln und der Höhe der 4-ABP-Adduktspiegel. ETS-exponierte Kinder nahmen vor allem mehr gegrillte Fleisch- und Wurstwaren zu sich als nicht ETS-exponierte Kinder. Bei Analyse des Verzehrs geräucherter Fleisch- und Wurstwaren waren diese Unterschiede geringer. Damit erschien vor allem ein Einfluss von gegrillten Fleisch- und Wurstwaren auf die 4-ABP-Hb-Adduktspiegel möglich.

Interessant war außerdem, dass deutlich mehr rauchende Eltern angaben, Einzelraumheizungen zu haben als nichtrauchende Eltern. Ob Einzelraumöfen einen Einfluss auf MK und Hb-Addukte hatten, blieb dennoch unklar.

Von diesen Störgrößen waren nur die Nähe des Wohnortes zu einer Tankstelle und die Verwendung von Einzelraumöfen in der Gruppe der ETS-exponierten Kinder überrepräsentiert. Hiervon war die dauerhafte Belastung der näheren Umgebung der Wohnung mit Benzindämpfen am wahrscheinlichsten als Störgröße zu beurteilen, wobei die genaue individuelle Belastung unbekannt blieb. Außerdem verhindern die bereits erwähnten Absauganlagen an Tankstellen die Freisetzung von Benzindämpfen weitestgehend, so dass durch diese Einrichtung die Beeinflussung von Hb-Adduktspiegeln und MK-Raten fraglich erscheint.

Die zu berücksichtigenden Confounder mit Effekt auf die Höhe der ABP-Hb-Adduktspiegel und der MK-Raten – beispielsweise Nähe des Wohnortes zu Hauptverkehrsstrassen, Industriebetrieben und Müllverbrennungsanlagen, oder der Verzehr von viel Gegrilltem und Geräuchertem – zeigten keine Häufigkeitsunterschiede in der ETS-exponierten und der nicht ETS-exponierten Gruppe. Als wesentlicher Faktor, der die ABP-Hb-Adduktspiegel und die MK-Raten beeinflussen konnte, blieb ETS.

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit untersuchte die Exposition von Kindern im Alter von zwei bis 16 Jahren gegenüber ETS, die sich zur Behandlung in der HNO-Universitätsklinik Würzburg vorstellten. Hierzu verwendete man einen biochemischen Marker – nämlich die Hb-Addukte von 4- und 3-ABP – sowie einen gentoxischen Marker - die MK-Rate in peripheren Blutlymphozyten.

Die Hb-Addukte wurden mit Gaschromatographie/Massenspektrometrie nach vorheriger flüssigkeitschromatographischer Isolierung der aromatischen Amine quantifiziert. Für die Untersuchung der MK-Rate benutzte man den Zytokinesblock-Mikrokernassay. Mit umfangreichen umweltmedizinischen Fragebögen erfolgte die Analyse der Verteilung von Krankheiten und – die Marker beeinflussenden – Störgrößen in den beiden Probandengruppen, ETS-exponierten und nicht ETS-exponierten Kindern. Die Hb-Adduktspiegel von 4-ABP waren bei 66 Probanden (33 nicht ETS-exponierte und 33 ETS-exponierte Kinder) nachweisbar. Hier zeigten sich signifikant höhere 4-ABP-Hb-Adduktspiegel bei ETS-exponierten Kindern gegenüber nicht ETS-exponierten Kindern. (55,8 pg 4-ABP/g Hb gegenüber 45,7 pg 4-ABP/g Hb; $p=0,005$).

Das 3-ABP war bei 48 der Probanden nachweisbar (20 nicht ETS-exponierte und 28 ETS-exponierte Kinder). Der Mittelwert bei ETS-exponierten Kindern war höher als bei nicht ETS-exponierten Kindern (18,4 pg 3-ABP/g Hb, gegenüber 16,1 pg 3-ABP/g Hb; $p=0,42$).

Bei 46 Kindern ließen sich MK in Lymphozyten des peripheren Blutes nachweisen (25 ETS-exponierte Kinder, 21 nicht ETS-exponierte Kinder). ETS-exponierte Kinder wiesen durchschnittlich signifikant höhere MK-Raten als nicht ETS-exponierte Kinder auf (5,8 MK/1000 Lymphozyten gegenüber 3,2 MK/1000 Lymphozyten; $p=0,0047$).

Bei ETS-exponierten Kindern zeigte sich darüber hinaus, dass ein erhöhter 4-ABP-Adduktspiegel mit erhöhten MK-Raten korreliert war.

Die untersuchten Kinder wurden in zwei Altersgruppen von zwei bis sechs Jahren und von sieben bis 16 Jahren unterteilt. Hier ergab sich zwischen beiden Gruppen keine Altersabhängigkeit der untersuchten Marker.

In beiden Probandengruppen untersuchte man auch die Geschlechtsabhängigkeit der MK-Raten. Es konnte nachgewiesen werden, dass nicht ETS-exponierte Mädchen von zwei bis zehn Jahren signifikant niedrigere MK-Zahlen aufwiesen als nicht ETS-exponierte Mädchen im Alter von elf bis 16 Jahren. Eine Geschlechtsabhängigkeit der MK-Raten lag jedoch nicht vor.

Ein weiterer Teil dieser Arbeit umfasste die Evaluation des Zytokineblock-Mikrokernassays mit tiefgefrorenen Lymphozyten, der aufgrund zeitunabhängiger Verarbeitung Vorteile gegenüber dem Assay mit frischen Lymphozyten haben konnte. Bei 27 Probanden waren tiefgefrorene Lymphozyten verfügbar. Hier zeigte sich, dass die MK-Raten in tiefgefrorenen Zellen ETS-exponierter gegenüber Zellen nicht ETS-exponierter Kinder kaum erhöht waren (2,9 MK/1000 Zellen gegenüber 2,6 MK/1000 Zellen; $p=0,68$). Zudem blieb der Mittelwert von MK in kryokonservierten Zellen exponierter Kinder signifikant unter dem in frischen Zellen (5,8 MK/1000 Zellen; $p=0,016$). Neben diesem Unterschied erbrachte ein Vergleich von Anteilen der doppelkernigen Zellen an den auszuwertenden Zellen, der als Maß für die Stimulierbarkeit zur Zellteilung angesehen wurde, dass frische Zellen signifikant mehr doppelkernige Zellen pro 1000 Zellen aufwiesen als tiefgefrorene Lymphozyten.

Als Grundlage für die Auswertung HNO-typischer Krankheiten wie atopischen Allergien, Paukenergüssen, Otitiden, Schwellungen oder Entzündungen von Polypen und Mandeln, chronische Bronchitis mit dem Symptom chronischen Hustens, Asthma und rezidivierende Infekte im Zusammenhang mit ETS-Belastung dienten 147 Fragebögen.

Hierbei konnten zwischen den ETS-exponierten und nicht ETS-exponierten Kindern nur bei zwei Parametern deutlichere Unterschiede gefunden werden. Dies waren zum einen die Rachenmandelhyperplasien, die bei 56,9% der ETS-exponierten Kinder, aber nur bei 49,3% der nicht ETS-exponierten Kinder mit einer Adenotomie behandelt werden mussten.

Zum anderen hatten ETS-exponierte Kinder nach Ausschluss von Hautmanifestationen in 23,1% der Fälle Allergien gegenüber 17,7% der nicht ETS-exponierten Kinder.

Die weiteren Krankheitsgruppen waren in den beiden Kollektiven in ähnlicher Häufigkeit vertreten.

Zur Erkennung möglicher Confounder, die sowohl die MK-Raten als auch die Hb-Addukte beeinflussen konnten, wurden mit den epidemiologischen Fragebögen zudem die Wohn- und Ernährungsbedingungen der Kinder untersucht. Auffällig war, dass 31,8% aller ETS-exponierten Kinder in der Nähe von Tankstellen lebten, aber nur 16,2% der nicht ETS-exponierten Kinder. Eine Beeinflussung der Mikrokernraten und der ABP-Hb-Adduktspiegel schien aufgrund der seit einiger Zeit eingeführten Dampfabsaugereinrichtungen an Zapfanlagen unwahrscheinlich. Die übrigen untersuchten Wohnumstände erbrachten keine deutlichen Unterschiede zwischen den beiden Gruppen.

Bei den Ernährungsbedingungen zeigte sich, dass ETS-exponierte Kinder deutlich häufiger gegrillte Fleisch- und Wurstwaren zu sich nahmen als nicht ETS-exponierte Kinder (31,8% gegenüber 18,8%). Die bei passivrauchenden Kindern gefundenen, gegenüber nicht-ETS-exponierten Kindern höheren ABP-Hb-Adduktspiegel könnten durch den häufigen Verzehr von Geräuchertem und Gegrilltem verstärkt worden sein.

Grundsätzlich musste jedoch davon ausgegangen werden, dass dem ETS als Quelle für 4- und auch 3-ABP eine wesentliche Rolle bei der Erhöhung von 3- und 4-Hb-Adduktspiegeln und MK-Raten bei ETS-exponierten gegenüber nicht ETS-exponierten Kindern zukam.

6. Literatur

Baier G, Stopper H, Zwirner-Baier I, Kopp C, Winkler U

Erkrankungen der oberen Atemwege und Genotoxizität bei tabakrauchexponierten Kindern.

Laryngo-Rhino-Otol 2002; 81: 217-225

Bartsch H, Caporaso N, Coda M, Kadlubar F, Malaveille C, Skipper PL, Talaska G, Tannenbaum SR, Vineis P

Carcinogen hemoglobin adducts, urinary mutagenicity and metabolic phenotype in active and passive cigarette smokers.

J. Natl Cancer Inst 1990; 82: 1826-1831

Bellach BM, Knopf H, Thefeld W

Der Bundes-Gesundheitssurvey 1997/98. Gesundheitswesen 60; Sonderheft 2: S 59-S 68,

Thieme, Stuttgart

Benner ES, Wargovich MJ, Lippman SM, Hong WK

Micronuclei: A potential intermediate marker for chemoprevention of aerodigestive tract cancer.

J Cell Biochem 1993; 17 F: 250-254

Benner ES, Lippmann SM, Wargovich MJ

Micronuclei: A Biomarker for Chemopreventive Trials: Results of a Randomized Study in oral Pre-Malignancy.

Int Journal Cancer 1994; 59: 457-459

Benowitz NL

Biomarkers of Environmental Tobacco Smoke Exposure.

Environ Health Perspect 1999; 107, Suppl.2: 349-355

Birner G, Albrecht W, Neumann HG

Biomonitoring of aromatic amines III: Hemoglobin binding of benzidine and some benzidine congeners.

Arch Toxicol 1990; 64: 97-102

Blair P, Fleming P, Bensley D, Smith I, Bacon C, Taylor E, Berry J, Golding J, Tripp, J

Smoking and the sudden infant death syndrome: results from 1993-1995 case-control study for confidential inquiry into stillbirths and deaths in infancy.

BMJ 1996; 313:195-198

Bonassi S et al.

Human Micronucleus Project: International Database Comparison for Results with the Cytokinesis-Block Micronucleus Assay in Human Lymphocytes: 1. Effect of Laboratory Protocol, Scoring Criteria, and Host Factors on the Frequency of Micronuclei.

Environ Mol Mutagen 2001; 37: 31-45

Bonita R, Duncan J, Truelsen T, Jackson RT, Beaglehole R

Passive Smoking as well as active smoking increases the risk of acute stroke.

Tob Control 1999; 8: 156-160

Bryant MS, Skipper PL, Tannenbaum SR, Maclure M

Hemoglobin adducts of 4-aminobiphenyl in smokers and nonsmokers.

Cancer Res 1987; 47: 602-608

Cardenas VM, Thun MJ, Austin H, Lally CA, Clark WS, Greenberg S
Environmental Tobacco Smoke and lung cancer mortality in the American Cancer Society's cancer prevention study 2.
Cancer Causes Control 1997;8: 57-64

Cook DG, Strachan DP
Parental smoking, bronchial reactivity and peak flow variability in children.
Thorax 1998; 53: 2954-301

Curtin F, Morabia A, Bernstein M
Lifetime exposure to environmental tobacco smoke among urban women: differences by socioeconomic class.
Am J Epidemiol 1998; 148: 1040-1047

Dallinga JW, Pachen DMF, Wijnhofen SW, Breedijk A, van't Ver L, Wigbout G, van Zandwijk N, Maas LM, van Agen E, Kleinjans J, van Schooten, F
The use of 4-Aminobiphenyl-Hemoglobin Adducts and Aromatic DNA Adducts in Lymphocytes of Smokers as Biomarkers of Exposure.
Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 1998; 7: 571-577

Dekant W, Vamvakas S, Henschler D. in: Forth W, Henschler D, Rummel W, Förstermann U, Starke K
Lehrbuch der Allgemeinen und Speziellen Pharmakologie und Toxikologie, 8. Auflage 2001, Urban und Fischer, 1088-1097

Denissenko M, Tang M, Pfeifer G
Preferential formation of Benzo(á)pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in p 53.
Science 1996; 274: 430-432

Doerge DR, Churchwell MI, Marques MM, Jefferson AR
Quantitative analysis of 4-aminobiphenyl-C 8-deoxyguanosyl DNA adducts produced in vitro and in vivo using HPLC-ES-MS.
Carcinogenesis 1999; 20:1055-1061

Doll R, Peto R, Wheatley K, Gray R, Sutherland I
Mortality in relation to smoking: 40 years` observation on male British doctors.
BMJ 1994; 309: 901-911

Duffaud F, Orsiere T, Villani P, Pelissier AL, Volot F, Favre R, Botta A
Comparison between micronucleated lymphocyte rates observed in healthy subjects and cancer patients.
Mutagenesis 1997; 12: 227-231

Eriksen MP, LeMaistre CA, Newell GR
Health hazards of passive smoking.
Annu Rev Public Health 1988; 9: 47-70

Fenech M, Morley A
Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of in vivo ageing and low dose X-irradiation.
Mutat Res 1986; 161: 193- 198

Fenech M
The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method.
Mutat Res 1997; 392: 11-18

Fenech M
The cytokinesis block micronucleus assay in micronucleated cells.
Prog Clin Biol Res 1990; 340B: 195-206

Fenech M, Morley A

The effect of donor age and induced micronuclei.

Mutat Res 1985; 148: 99- 105

Hackshaw AK, Law MR, Wald NJ

The accumulated evidence on lung cancer and environmental tobacco smoke.

BMJ 1997; 315: 980-988

Haley NJ, Sepkovic DW, Hoffmann D

Elimination of cotinine from body fluids: disposition in smokers and nonsmokers.

Am. J. Public Health 1989; 79(8):1046-1048

Hammond SK, Sorensen G, Youngstrom R, Ockene JK

Occupational exposure to environmental tobacco smoke.

JAMA 1995; 275: 441-442

Hammond SK, Coghlin J, Gann PH, Paul M, Taghizadeh K, Skipper PL, Tannenbaum SR

Relationship between environmental tobacco smoke exposure and carcinogen-hemoglobin adduct levels in nonsmokers.

J. Natl Cancer Inst 1993;85 (6): 474-478

He J, Vupputuri S, Allen K, Prerost M, Hughes J, Whelton P

Passive smoking and the risk of coronary heart disease; a meta-analysis of epidemiologic studies.

N Engl J of Med 1999; 340: 920-926

Hecht SS, Carmella SG, Foiles PG, Murphy SE, Peterson LA

Tobacco-specific nitrosamine adducts: studies in laboratory animals and humans.

Environ Health Perspect 1993; 99: 57-63

Holmen A, Karlsson A, Bratt I, Högstedt B

Increased frequencies of micronuclei in T8-lymphocytes of smokers.

Mutat Res 1995; 334: 205-208

IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans:
Tobacco Smoking.

International Agency for the Research on Cancer 1986; 38: 37-375

Janson C, Chinn S, Jarvis D, Zock JP, Toren K, Burney P

Effects of passive smoking on respiratory symptoms, bronchial responsiveness, lung function and total serum IgE in the European Community Respiratory Health Survey: a cross-sectional study.

Lancet 2001; 358: 2103-2109

Jenkins RA, Counts RW

Occupational Exposure to Environmental Tobacco Smoke: Results of two Personal Exposure Studies.

Environ Health Perspect 1999; 107 Suppl. 2: 341-348

Larsson M, Frisk M, Hallström J, Kiviloog J, Lundbäck B

Environmental tobacco smoke exposure during childhood is associated with increased prevalence of asthma in adults.

Chest 2001; 120: 711-717

Law MR, Morris, JK, Wald NJ

Environmental tobacco smoke exposure and ischaemic heart disease: an evaluation of the evidence.

BMJ 1997; 315: 973-979

Lefcoe NM, Ashley MJ, Pederson LL, Keays JJ

The health risks of passive smoking. The growing case for control measures in enclosed environments.

Chest 1983; 84: 90-95

Lindfors A, van Hage-Hamsten M, Rietz H, Wickmann M, Nordvall SL Influence of interaction of environmental risk factors and sensitization in young asthmatic children.

J Allergy Clin Immunol 1999; 104: 755-762

MacGregor JT, Wehr CM, Gould DH

Clastogen-induced micronuclei in peripheral blood erythrocytes: the basis of an improved micronucleus test.

Environ Mutagen 1980; 2: 509-514

Maclure M, Katz RB, Bryant MS, Skipper PL, Tannenbaum SR

Elevated blood levels of carcinogens in passive smokers.

Am J of Public Health 1989; 79: 1381-1384

Migliore L, Zotti-Martelli L, Panasiuk G, Barale R

Micronucleus frequency in Gomel (Belarus) children affected and not affected by thyroid cancer.

Mutat Res 1999; 440: 35-43

Miller B, Albertini S, Locher F, Thybaud V, Lorge E

Comparative evaluation of the in vitro micronucleus test and the in vitro chromosome aberration test: industrial experience.

Mutat Res 1997; 392: 45-59

Miller JA, Wyatt CS, Mille EC, Hartman HA

The N-hydroxylation of 4-acetylamino-biphenyl by the rat and dog and the strong carcinogenicity of N-hydroxy-4-acetyl-aminobiphenyl in the rat.

Cancer Res 1961; 21:1465-1474

Mohtashamipir WMA, German PG, Ernst H, Norpoth K, Mohr U

Comparative evaluation of cigarette mainstream and sidestream smoke condensates on the mouse skin.

J Cancer Res Clin Oncol 1990; 116: 604-608

Myers SR, Spinnato JA, Pinorini- Godly MT

Characterization of 4-Aminobiphenyl-Hemoglobin Adducts in maternal and fetal blood samples.

J Toxicol Environ Health 1996; 47: 553-566

National Research Council, National Academy of Sciences

Environmental Tobacco Smoke: Measuring Exposures and Assessing Health Effects.

Washington DC: National Academy Press 1986

Neumann HG, van Dorp C, Zwirner-Baier I

The Implications for risk assessment of measuring the relative contribution to exposure from occupation, environment and lifestyle: hemoglobin adducts for amino- and nitro-arenes.

Toxicol Lett 1995; 82/83: 771-778

Schiffmann D, De Boni U

Dislocation of chromatin elements in prophase induced by diethylstilbestrol: a novel mechanism by which micronuclei can arise

Mutat Res 1991; 246: 113-122

Skipper PL, Tannenbaum SR, Ross, RK, Yu MC

Nonsmoking-related arylamine exposure and bladder cancer risk

Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2003; 12: 503-507

Sorsa M, Husgafvel-Pursiainen K, Järventaus H, Koskimies K, Salo H, Vainio H

Cytogenetic effects of tobacco smoke exposure among involuntary smokers.

Mutat Res 1989; 222: 111-116

Spengler JD

Buildings Operations and ETS Exposure.

Environ Health Persp. 1999; 107, Suppl. 2: 313-317

Stopper H, Müller SH

Micronuclei as a biological endpoint for genotoxicity: A minireview.

Toxicol in vitro 1997; 11: 661-667

Strachan DP, Cook DG

Parental smoking, middle ear disease and adenotonsillectomy in children.

Thorax 1998; 53: 50-56

Strachan DP, Cook DG

Summary of effects of parental smoking on the respiratory health of children and implications for research.

Thorax 1999; 54: 357-366

Strachan DP, Cook DG

Parental smoking and childhood asthma: longitudinal and case-control studies.

Thorax 1998; 53: 204-212

Strachan DP, Cook DG

Parental smoking and lower respiratory illness in infancy and early childhood.

Thorax 1997; 52: 905-914

Tager IB, Weiss ST, Munoz A, Rosner B, Speizer FE

Longitudinal study of the effects of maternal smoking on pulmonary function in children.

New Engl J Medicine 1983; 309: 699-703

Tucker JD, Preston RJ

Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges and cancer risk assessment.

Mutat Res 1996; 365: 147-159

US Environmental Protection Agency

Respiratory health effects of passive smoking: lung cancer and other disorders.

Monograph 4, National Institute of Health No 93-3605.

Bethesda, MD, USA: National Institute of Health, 1993

Vainio H, Partanen T

Population burden of lung cancer due to environmental tobacco smoke.

Mutat Res 1989; 222: 137-140

Vinke L, Kleinjan A, Severijen L, Fokken W

Passive smoking causes an allergic cell infiltrate in the nasal mucosa of non-atopic children.

Int J of Pediatr Otorhinolaryngol 1999; 51: 73-81

Zwirner-Baier I, Neumann HG

Biomonitoring of aromatic amines V: acetylation and deacetylation in the metabolic activation of aromatic amines as determined by Hb-binding.

Mol Toxicol 1998; 72: 499-50

7. Anhang

Tabelle 7.1: Rohwerte, die der Expositionsüberprüfung mit Hb-Addukten und MK zugrunde lagen

Codierung	frisch	Eingefroren	Vater raucht	Mutter raucht	Nicht ETS-Exp.	3-ABP	4-ABP	Mikrokerne	% dk Zellen
öma 2	1		1	1				4,90	67,40
ala 6	1				1	23,37	52,27	6,3	66
sia 4	1				1	4,53	32,20	4	59
alb 4	1				1	52	70	2,30	67,70
lub 3		1	1				47,80	2,30	67,40
tab 15		1		1				1,30	62,20
meb 6		1		1				1	40,70
jeb 15		1	1					1	39,70
mab 6	1				1	21,67	44,07	1,60	77,20
yab 13	1		1	1		6,48	40,40	11	48,60
alb 7	1				1		61		
lub 7		1			1	5,51	41,02	1,30	
lab 6		1		1		28,50	68	12	54,50
olc 3	1		1	1				2,30	72,60
and 10	1				1	6,91	60,73	3	69,60
and 7		1			1	35,89	85,70	2,30	64,90
tid 11		1	1				81,30	1	52,10
and 12		1			1	7,85	31,53	2,60	60,20
roe 12		1			1	9,20	48,48	3	28,60
sae 5	1		1					10,30	54,20
sae 3		1			1		28,81	3	69,80
lse 11	1				1			4	72,20
mae 4	1		1			31	57,50	5,30	77,4
sef 5		1	1	1		13,41	45,39		62,60
maf 8		1			1	17,53	46,80		78,20
chf 9		1			1	20,19	37,30	1	65

Fortsetzung von Tabelle 7.1

Codierung	frisch	Eingefroren	Vater raucht	Mutter raucht	Nicht ETS-Exp.	3-ABP	4-ABP	Mikrokerne	% dk Zellen
kaf 7		1	1			9,85	96,80	5,30	68,10
rig 9	1				1	52,08	80,19	1	
chg 9/1	1				1	8,84	25,71	6,3	43,1
chg 9/2	1				1		32,70		43,10
dag 11		1			1		63,15		69,80
pah 12	1		1	1		19,80	24,17	1,30	63,40
mah 11	1				1	5,20	49,40	5,60	72,40
phh 5		1	1			25,20	59,71	1,30	64,60
pah 15	1				1			2,30	63,10
krh 7		1	1			4,69	38,12	0,60	61,60
klh 7		1			1			1,60	56,50
nah 5	1		1			14,88	49,10	6,30	59,50
keh 4	1				1		40,05		
paj 8	1			1		15,16	72,90	7,30	59,80
svk 12	1			1		17,67	49,80	6	71,40
flk 7	1				1			0,60	68,50
evk 3		1			1		31,40	3	
rok5	1		1	1		13,69	42,75	3	64,80
efk 5	1		1			16,95	61,10	9	57,60
tak 6	1			1		5,19	64,90	2,30	67,60
ank 4	1				1			3	62,60
bak ?	1				1		50,30		
mak 3	1		1	1		16,30	71,10	4	70,20
kel 5	1			1		23,59	62,30	6	
jol 3	1		1					14	51,30
gil 8	1				1			2,30	69
mam 7	1		1	1		9,67	38,53	2,60	72,90
mam 4	1		1	1				3,60	
dam 10	1		1					7,60	67,50
mam 10	1		1			85,56	48,37		

Fortsetzung von Tabelle 7.1

Codierung	frisch	Eingefroren	Vater raucht	Mutter raucht	Nicht ETS-Exp.	3-ABP	4-ABP	Mikrokerne	% dk Zellen
stm 7		1		1		16,43	41,41	4	32,90
mam 4/2		1	1					4	61,10
fan 6		1		1				3,60	59,80
pao11	1				1			2,62	57,20
seo 7	1		1	1				5	66,60
too 14	1				1	11,40	44,60	2	71,90
mip 4	1			1		28	49		
tip 4	1			1				0,60	78,10
frp 5	1		1					6	53,60
nip 2		1		1		21,05	41,30	1,30	3,10
map 11	1				1			6,60	53,30
lep 4	1		1	1			65,20	10	63,90
par ?	1				1		50,40		0,50
rei ?	1				1		29,88		
tor 7	1				1	10,62	45,90	3	66,4
rie ?	1				1		39		
mar 10		1			1			1,30	53,40
anr 12		1		1		12,21	60,36	2	48
str 3	1				1		38,07		
dos 7	1				1		58,50		57,80
ams 5		1			1	24,16	51,25	2,30	61,50
jes 8/1	1				1			6	42,90
jes 8/2		1	1			18,65	60,39		
kes 16	1				1			4,30	65,90
sos 8		1	1			10,74	64,25	2,60	66,10
jos 15	1				1	4,90	45,52	2,30	66,90
pas 9	1		1	1		33,34	57,50	1,30	67,40
mat 4	1				1		43,28		
jet 13	1			1		22,34	42,42	6,60	62
anw 8	1				1	16,51	46,20	2	61,50

Fortsetzung von Tabelle 7.1

Codierung	Frisch Zellen	gefr. Zellen	Vater raucht	Mutter raucht	Keine ETS-Expos	3-ABP	4-ABP	MK	% dk. Zellen
juw 7	1		1	1		21,38	70,10	6,33	66,60
juw 7/1		1			1	8,65	49,63	1,60	56,30
juw 7/2	1				1		39,30		56,30
taw 10		1			1			9	56,30
jew ?	1				1		33,30		
ahy 16	1		1			15,29	73,50		

Tabelle 7.2: Rohwerte, die der Untersuchung von verschiedenen Krankheitsentitäten und der Überprüfung der Verteilung möglicher Confounder zugrunde lagen.

Untersuchte Erkrankungen und mögliche Confounder	Anteile exponierter Kinder (gesamt 65)	Anteile nicht exponierter Kinder (gesamt 78)
atop. Erkrankungen mit Hautbeteiligung	27,70%	26,60%
atop. Erkrankungen ohne Hautbeteiligung	23,10%	17,70%
Paukenergüsse	23,10%	30,40%
Otitiden	32,30%	34,60%
Schwellung/Entzündung von Polypen/ Mandeln	18,60%	18,90%
Adenotomie	56,90%	49,40%
chron. Bronchitis	13,90%	16,70%
chron. Husten	29,20%	29%
Asthma	7,70%	5,10%
rezidivierende Infekte	7,70%	12,70%

Fortsetzung von Tabelle 7.2

häufiger Verzehr von gegrilltem/r Fleisch/Wurst	21%	13,80%
Wohnort in der Stadt	24,20%	18,80%
Wohnort in Nähe zu Hauptverkehrsstraßen	54,50%	45%
Wohnort in Nähe zu Autobahnen	18,18%	25%
Wohnort in Nähe zu Industriebetrieben	19,70%	21,30%
Untersuchte Erkrankungen und mögliche Confounder	Anteile exponierter Kinder (gesamt 65)	Anteile nicht exponierter Kinder (gesamt 78)
Wohnort in Nähe zu Tankstellen	31,80%	16,30%
Wohnort in Nähe zu Müllverbrennungsanlagen	6,10%	10%
Angabe von Öleinzelföfen in der Wohnung	31,80%	18,80%

**JULIUS-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT
 KLINIK UND POLIKLINIK FÜR
 HALS-, NASEN- UND OHRENKRANKE**
 DIREKTOR: Univ. PROF. DR. MED. J. HELMS



Fragebogen

Allergologie und Umweltmedizin

Abteilung für Allergologie

Josef-Schneider-Str.11
 D-97080 Würzburg
 Tel.: +49-(0)931/201-2204
 Fax: +49-(0)931/201-2321

Bitte beantworten Sie die Fragen möglichst genau und vollständig.
 Ihre Angaben unterliegen der ärztlichen Schweigepflicht; die datenschutzrechtlichen Bestimmungen werden streng eingehalten.

Nr.:

Personalangaben:

Ausgefüllt am:

Name: Vorname:
 Geb.-Datum: Geschlecht:
 Schule: Schulabschluß:
 Bei Kindern: Berufsabschluß von Vater und / oder Mutter:
 Jetzige Tätigkeit:

1 Leitanamnese

1.1 Aufgrund welcher Beschwerden ist Ihr Kind in der Klinik? Geben Sie bitte mit eigenen Worten eine kurze Beschreibung der jetzigen Beschwerden

.....

Bestehen oder bestanden folgende Krankheitserscheinungen:

- 1.1.1 Milchschorf, häufige Hautentzündungen im Windelbereich, Ekzem ja nein
- 1.1.2 Nesselsucht, Qaddeln und Rötungen der Haut, Juckreiz ja nein
- 1.1.3 Schwellung der Augenlider, der Augenpartie, des Mundbereichs ja nein
- 1.1.4 Häufiger Husten als Säugling/Kleinkind, Bronchitis, Krupphusten ja nein
- 1.1.5 Pfeifen und Röcheln in den Bronchien, Atemnot, Asthma ja nein
- 1.1.6 Häufiger Schnupfen, verstopfte Nase, Heuschnupfen ja nein
- 1.1.7 Niesanfälle (mehr als 3 mal hintereinander) ja nein
- 1.1.8 Stockschnupfen (verstopfte Nase) ja nein
- 1.1.9 Polypen im Nasenrachenraum ja nein
- 1.1.10 Vergrößerte Mandeln ja nein
- 1.1.11 Mandelentzündungen / mehr als 2 mal pro Jahr ja nein
- 1.1.12 Mehr als 6 mal fieberhafte Erkältungskrankheiten pro Jahr ja nein
- 1.1.13 Magen-, Darmbeschwerden, Durchfälle mehr als 6 mal pro Jahr ja nein
- 1.1.14 Bestehen oder bestanden Wurmerkrankungen ja nein

1.2 Wann sind die Beschwerden am ausgeprägtesten? (mehrere Antworten möglich)

- | | | |
|-----------------------------------|---|--|
| <input type="checkbox"/> Frühjahr | <input type="checkbox"/> morgens | <input type="checkbox"/> bei feuchtem Wetter |
| <input type="checkbox"/> Sommer | <input type="checkbox"/> abends | <input type="checkbox"/> im Freien |
| <input type="checkbox"/> Herbst | <input type="checkbox"/> beim Einschlafen | <input type="checkbox"/> am Wochenende |
| <input type="checkbox"/> Winter | <input type="checkbox"/> nachts | <input type="checkbox"/> werktags |

13 in geschlossenen Räumen? **Wenn ja:** in welchen?.....

14 bei bestimmten Tätigkeiten? **Wenn ja:** bei welchen?.....

1.3 Wie verlaufen die Beschwerden?

- | | |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> bestehen dauernd | <input type="checkbox"/> haben sich verschlechtert seit: |
| <input type="checkbox"/> verlaufen schubweise | <input type="checkbox"/> an bestimmte Tätigkeiten gebunden: |
| <input type="checkbox"/> haben sich gebessert seit:..... | |

1.4 Besteht zeitweilige oder völlige Beschwerdefreiheit? ja nein

- | | | |
|--|---|--|
| <input type="checkbox"/> in bestimmten Zimmern:..... | | |
| <input type="checkbox"/> in bestimmten Gebäuden: | | |
| <input type="checkbox"/> an der See | <input type="checkbox"/> im Hochgebirge | <input type="checkbox"/> an feuchten Tagen |
| <input type="checkbox"/> bei Regen | <input type="checkbox"/> bei längerer Trockenheit | |

1.5 Bestehen regelmäßige Tierkontakte? ja nein

Wenn ja, welche:

1.6 Treten bei oder nach Tierkontakten deutliche Beschwerden auf? ja nein**1.7 Bestehen Unverträglichkeiten gegen bestimmte Nahrungsmittel?** ja nein

Wenn ja, welche:

1.8 Gab es vermehrt Schwellungen / Rötungen / Jucken bei Insektenstichen? ja nein**2 Anamnese****2.1 Welche der folgenden Erkrankungen sind bei Ihrem Kind ärztlich festgestellt worden?****2.1.1 Allergien** ja nein

2.1.1.1. Wenn ja, welche:

2.1.2 Hals, Nasen- und Ohrenerkrankungen oder Operationen ja nein

- | | |
|---|---|
| <input type="checkbox"/> Paukenerguß | <input type="checkbox"/> Mandelentzündung |
| <input type="checkbox"/> Ohrenentzündung | <input type="checkbox"/> Operation: Adenotomie(Polypenentfernung) |
| <input type="checkbox"/> Schwerhörigkeit | <input type="checkbox"/> Operation: Tonsillektomie (Mandelentfernung) |
| <input type="checkbox"/> Ohrgeräusch/ Tinnitus | <input type="checkbox"/> Operation: Paukendrainage |
| <input type="checkbox"/> Nasennebenhöhlenentzündung | <input type="checkbox"/> andere |

2.1.3 Lungen- und Bronchialerkrankungen ja nein

- | | | |
|--|---------------------------------|---------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> chronische Bronchitis | <input type="checkbox"/> Asthma | <input type="checkbox"/> andere |
|--|---------------------------------|---------------------------------------|

2.1.4 Hautkrankheiten ja nein

- | | | |
|--|--|---------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> Neurodermitis | <input type="checkbox"/> Nesselsucht (Urticaria) | <input type="checkbox"/> andere |
|--|--|---------------------------------------|

2.1.5 Hatte Ihr Kind Unfälle, sonstige schwere Erkrankungen oder Operationen? ja nein

2.1.5.1 Wenn ja, geben Sie bitte Art des Unfalls der Erkrankung bzw. der Operation und den Zeitpunkt an:

.....

2.2 Nimmt Ihr Kind Medikamente/Vitamine oder Sonstiges ein? ja nein

2.2.1 Wenn ja, geben Sie bitte den Namen, die Dosis und die Einnahmedauer an:

.....

2.3 Wie groß ist Ihr Kind? cm

2.4 Wieviel wiegt Ihr Kind? kg

2.5 Ist Ihr Kind gestillt worden? ja nein

Wenn ja, wie lange:(Monate)

2.6 Besucht / besuchte Ihr Kind einen Kindergarten ja nein

3 Familienanamnese

3.1 Hat Ihr Kind Geschwister? ja neinBrüder/.....Schwester/n

3.2 Haben andere Mitglieder Ihrer Lebensgemeinschaft ähnliche Beschwerden
wie Ihr Kind? ja nein

3.2.1 Wenn ja, bitte nähere Angaben:

.....

3.3 Sind in Ihrer Familie folgende Erkrankungen aufgetreten?

	nein	ja	wer?
1 chronische Bronchitis/Lungenkrankheiten	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
2 Allergien/Neurodermitis	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
9 sonstige.....		

4 Wohnbereich

4.1 Geben Sie bitte Ihren derzeitigen Wohnhaustyp an:

1 1-2 Familienhaus Hochhaus
 2 Mehrfamilienhaus sonstiges

4.2 In welcher Etage wohnen Sie?Etage

4.3 Wie groß ist die Wohnung, in der Sie leben? ca.....qm

4.4. Wie viele Räume hat Ihre Wohnung? Räume

4.5 Wie alt ist das Gebäude? ca.....Jahre

4.6 Seit wieviel Jahren leben Sie dort?Mo./Jahre

4.7 In welchem Wohnumfeld liegt Ihre Wohnung?

1 Stadt (mehr als 10000 Einwohner) auf dem Land (weniger als 10000 Einwohner)

4.8 Gibt es in Ihrem Wohnumfeld...

Entfernung (km)?

1 Hauptverkehrsstraßen?	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein
2 Autobahnen?	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein
3 Grünanlagen?	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein
4 Landwirtschaftliche Nutzflächen?	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein
5 Industrie?	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein
6 Tankstellen?	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein
7 Müllverbrennungsanlage?	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein

4.9 Wie viele Stunden hält sich Ihr Kind
durchschnittlich pro Tag in Ihrer Wohnung auf? Std./Tag

4.10 Fühlen Sie sich in Ihrer Wohnung belästigt (z.B. Lärm, Gerüche, Staub)? ja nein

4.10.1 Wenn ja, geben Sie bitte an wodurch:

6.1.2.2 Wenn nein:1 wie lange sind Sie Nichtraucher/-in 1 schon immer 2 Raucher/-in vonbis.....

2 was haben Sie damals geraucht?

3 wieviel haben Sie geraucht? Stück täglich

6.1.3 Sonstige Personen (Großeltern, Geschwister, Freunde, etc.) ja nein**6.1.3.1 Wenn ja:**

Was und durchschnittlich wieviel rauchen diese Personen in Ihrem Haushalt?

1 Zigaretten:Stück/ täglich 2 Zigarren: Stück/ täglich 3 Pfeifen:.....Stück täglich**6.2 Wie viele Zigaretten werden insgesamt durchschnittlich pro Tag bei Ihnen zu Hause geraucht?.....Stück****6.3 Wird in Ihrem Auto geraucht?.....** ja nein**7 Ernährung****7.1. Trinkt Ihr Kind Milch?** ja nein**7.2 Wieviel trinkt es im Durchschnitt täglich davon?**1 keine 2 wenig (bis 0,5 l) 3 viel (ab 0,5 l)**7.3 Wieviel Mineralwasser trinkt Ihr Kind im Durchschnitt täglich?**1 keine 2 wenig (bis 0,5 l) 3 viel (ab 0,5 l)**7.4 Wieviel Fruchtsaft trinkt Ihr Kind im Durchschnitt täglich?**1 keine 2 wenig (bis 0,5 l) 3 viel (ab 0,5 l)**7.5 Wieviel Eier (auch in zubereiteten Speisen; Rühreier usw.) ißt es im Durchschnitt?**1 keine 2 wenig (1-3 Eier/Monat) 3 viel (mehr als 3 Eier/Woche)**7.6 Wie oft in der Woche ißt Ihr Kind Salat und Gemüse?**1 nie 2 1-3 mal 5 (fast) täglich**7.7 Ernähren Sie sich vegetarisch, d.h. ohne Fleisch, Wurst, Fisch?** ja nein**7.8 Nimmt Ihr Kind Fleisch, Wurst zu sich?** wenig (1-2 mal pro Woche) viel (täglich)**7.9 Nimmt Ihr Kind Fisch zu sich?** wenig (1-2 mal pro Woche) viel (täglich)**7.10 Nimmt Ihr Kind Geflügel zu sich?** wenig (1-2 mal pro Woche) viel (täglich)**7.11 Nimmt Ihr Kind Käse zu sich?** wenig (1-2 mal pro Woche) viel (täglich)**7.12 Ißt Ihr Kind viel gegrillte/s Wurst/ Fleisch (mehr als 1x pro Woche)?** ja nein**7.13 Ißt Ihr Kind viel geräucherte Wurst/ Fleisch, Fisch(mehr als 1x pro Woche)?** ja nein**7.14 Welche der folgenden Nahrungsmittel nimmt Ihr Kind zu sich?****7.14.1 Süßwasserfische**1 gar nicht 2 etwa einmal die Woche 3 einmal im Monat oder seltener**7.14.2 Meeresfische**1 gar nicht 2 etwa einmal die Woche 3 einmal im Monat oder seltener**7.14.3 Pilze**1 gar nicht 2 etwa einmal die Woche 3 einmal im Monat oder seltener

8. Abkürzungsverzeichnis

- 4- und/oder 3-ABP-Hb-Addukte: Hämoglobinaddukte von 3- und/oder 4- Aminobiphenyl
- 3-ABP: 3-Aminobiphenyl
- 4-ABP: 4-Aminobiphenyl
- auc: area under curve = Fläche unter der Kurve
- COPD: chronic obstructive pulmonary disease = chronisch obstruktive Lungenerkrankung
- DMSO: Dimethylsulfoxid
- EDTA: Ethylendiamintetraessigsäure
- ETS: Environmental Tobacco Smoke
- Fa: Firma
- FEV_{max}: maximales forciertes Expirationsvolumen
- g: Gramm
- h: Stunde(n)
- Hb-Addukte: Hämoglobinaddukte
- KHK: koronare Herzkrankheit
- mg: Milligramm
- min: Minuten
- Mio: Million
- MK: Mikrokern(e)
- MK-Rate: Mikrokernrate
- MK-Zahl: Mikrokernzahl
- ml: Milliliter
- ng: Nanogramm
- pg: Picogramm
- rpm: rounds per minute = Umdrehungen pro Minute
- TLC: totale Lungenkapazität
- µl: Mikroliter

- Abkürzungen in den Abbildungen des Ergebnisteils:
- a: Jahr(e)
- m: männlich
- w: weiblich
- R: rauchende Eltern, also ETS-exponiert
- NR: nicht rauchende Eltern, also nicht ETS-exponiert

Danksagung

Ich möchte mich hiermit bei all den Personen bedanken, die mir ihre Unterstützung bei der Entstehung dieser Arbeit gewährten.

Allen voran möchte ich meinem Doktorvater Herrn Priv.-Doz. Dr. med. G. Baier sowie Frau Univ.-Prof. Dr. rer. nat. H. Stopper und Frau Dr. rer. nat. I. Zwirner Baier für die gute und stets konstruktive Zusammenarbeit und hervorragende Anleitung danken. Vor allem Frau Dr. rer. nat. I. Zwirner-Baier und ihrem großen auch zeitlichen Engagement gilt mein herzlicher Dank.

Mein besonderer Dank gilt der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Stopper für die freundliche Aufnahme in ihrer Mitte und die gute Zusammenarbeit. Vor allem bedanke ich mich bei Herrn Michael Kessler der mich mit seinem großen Fachwissen und seiner großen Hilfsbereitschaft sehr unterstützt hat.

Von der Universitäts-HNO-Klinik möchte ich besonders Frau Petra Grünsfelder danken.

Ebenso danke ich Herrn Rainer Zube und Herrn Martin Zube, die mich mit ihren fundierten EDV-Kenntnissen mehr als einmal tatkräftig unterstützten.

Desweiteren geht mein Dank an Frau Doris Benz, Herr Martin Schäfer und Herr Dieter Hofmann für ihre konstruktiven Kritiken.

Frau Sonja Zube danke ich von Herzen dafür, dass sie mich während der ganzen Zeitperiode in der diese Arbeit entstand stets unterstützt hat.

Den beiden Personen ohne die diese Arbeit nie möglich gewesen wäre, meinen Eltern, möchte ich diese Arbeit widmen.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Krockenberger
Vorname: Mathias
Geburtsdatum/-ort: 10.08.1977, Schwäbisch Hall
Anschrift: Am Neuen Weg 2, 97236 Randersacker/Lindelbach
Familienstand: ledig

Schulbildung

08/1983 - 06/1987 Grundschule Sulzbach-Laufen
09/1987 - 06/1996 Schenk-von-Limpurg Gymnasium Gaildorf mit Abschluss Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst

07/1996 - 08/1997 Evangelisches Diakoniekrankenhaus Schwäbisch Hall, Hol- und Bringendienst und Notaufnahme/Chirurgische Ambulanz

Praktikum

10/1997 - 03/1998 freiwilliges Pflegepraktikum Graf-Pückler-Heim, Gaildorf

Hochschulbildung

04/1998 - 10/1998 Eberhard-Karls-Universität, Tübingen
10/1998 - 11/2004 Bayerische Julius-Maximilians-Universität, Würzburg
04/2000 ärztliche Vorprüfung
03/2001 erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
09/2003 zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
11/2004 dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
09/2000 - 02/2003 insgesamt 18 Wochen Famulaturen in den Fachgebieten Chirurgie, Innere Medizin, Allgemeinmedizin sowie Frauenheilkunde und Geburtshilfe
10/2003 - 02/2004 erstes PJ-Tertial in der hämato-onkologischen Therapieambulanz der Medizinischen Poliklinik der Universität Würzburg
02/2004 – 05/2004 zweites PJ-Tertial an der Universitäts-Frauenklinik der Universität Würzburg
06/2004 – 09/2004 drittes PJ-Tertial im Fach Chirurgie am kantonalen Spital Wil Ostschweiz

Promotionsarbeit

04/2001 Beginn der Promotionsarbeit am Institut für Toxikologie der Universität Würzburg in Kooperation mit der HNO-Universitätsklinik der Universität Würzburg

Berufliche Tätigkeit

seit 16.12. 2004 Tätigkeit als wissenschaftlicher Assistent an der Universitätsfrauenklinik Würzburg

Eibelstadt, 21. Februar 2005