

Aus der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten,
plastische und ästhetische Operationen
der Universität Würzburg

Direktor: Univ.-Professor Dr. med. Dr. h. c. Rudolf Hagen

***In vitro*-Exposition von Glycerin als Bestandteil des Shisha-Tabaks an
humanen Nasenschleimhautzellen und Lymphozyten**

Inaugural – Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Lukas Uebelacker

aus Bimbach

Würzburg, Juli 2019



Referent: Univ.-Professor Dr. med. Norbert Kleinsasser

Korreferent: Univ.-Professor Dr. rer. nat. Helga Stopper

Dekan: Univ.-Professor Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 15.07.2019

Der Promovend ist Arzt.

Meinen Eltern in Dankbarkeit

Inhaltsverzeichnis:

1. Einleitung	1
1.1 Die Wasserpfeife – Lifestyle-Objekt oder Gesundheitsgefahr?	1
1.1.1 Allgemeines, Aufbau & Funktionsprinzip	1
1.1.2 Epidemiologie des Shisha-Rauchens	3
1.1.3 Zusammensetzung von Tabak und Rauch	5
1.2 Eigenschaften und toxikologisches Profil des Glycerins	8
1.2.1 Glycerin – obligat für Stoffwechsel und Industrie	8
1.2.2 Toxikologische Beurteilung des Glycerins	10
1.3 Gesetzliche Beschränkungen der Tabakzusammensetzung	12
1.3.1. Tabakverordnung	12
1.3.2. Tabakerzeugnisverordnung	13
1.4 Ziele der Arbeit	14
2. Material und Methoden	16
2.1. Versuchs-Übersicht	16
2.2 Probanden-Auswahl	17
2.3 Zell-Isolierung	17
2.3.1 Isolierung von Lymphozyten aus Vollblut	17
2.3.2 Isolierung einzelner Nasenschleimhautzellen	19
2.4 Zellzählung im Casy-Messgerät	20
2.5 Schadstoff-Exposition	21
2.5.1 Verwendete Fremdstoffe	21
2.5.2 Erstellen der Ansätze	21
2.6 Trypanblau-Ausschlusstest	23

2.7 Einzelzellgelelektrophorese	24
2.7.1 Grundlagen	24
2.7.2 Puffer und Lösungen	24
2.7.3 Durchführung	26
2.7.4 Auswertung	27
2.8 Mikrokern-Test	28
2.8.1 Grundlagen	28
2.8.2 Puffer und Lösungen	30
2.8.3 Durchführung	30
2.8.4 Auswertung	31
2.9 Grafische Darstellung und statistische Verfahren	32
3. Ergebnisse	35
3.1 Ergebnisse des Trypanblau-Ausschlusstests	35
3.1.1 Trypanblau-Ausschlusstest bei Nasenschleimhautzellen	35
3.1.2 Trypanblau-Ausschlusstest bei Lymphozyten	37
3.2 Ergebnisse der Einzelzellgelelektrophorese	39
3.2.1 Einzelzellgelelektrophorese bei Nasenschleimhautzellen	39
3.2.2 Einzelzellgelelektrophorese bei Lymphozyten	41
3.3 Ergebnisse des Mikrokern-Tests	43
3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse	45
4 Diskussion	46
4.1. Diskussion der Methodik	46
4.1.1 Auswahl der Zielzellen und Expositionsart	46
4.1.2 Beurteilung der ausgewählten Testverfahren	48

4.2 Diskussion der Ergebnisse	51
4.2.1 Zytotoxizität bei hohen Konzentrationen	51
4.2.2 Nachweis von Genotoxizität	53
4.3 Tabakkontrollpolitik in Deutschland	57
4.3.1 Einschätzung aktueller Tabakkontrollmaßnahmen	57
4.3.2 Handlungsbedarf für eine effektivere Tabakkontrolle	59
4.4 Bedeutung der Ergebnisse und Ausblick	62
<u>5. Zusammenfassung</u>	<u>64</u>
<u>6. Anhang</u>	<u>66</u>
6.1 Abkürzungsverzeichnis	66
6.2 Geräte & Verbrauchsmaterialien	68
6.2.1 Geräte	68
6.2.2 Verbrauchsmaterialien	69
6.3 Daten-Anhang	70
6.4 Abbildungsnachweis	79
6.5 Literaturverzeichnis	80
Kongressbeiträge und Publikationen	
Danksagung	
Lebenslauf	

1. Einleitung

Während sich das Zigaretten-Rauchen in den letzten Jahren rückläufig entwickelt [Lampert et al. 2013] [Kuntz et al. 2017], hat sich die Wasserpfeife zweifelsohne als Alternative des Tabakkonsums in Deutschland etabliert. Insbesondere die Einschätzung möglicher gesundheitsschädlicher Effekte durch das Shisha-Rauchen ist von gesellschaftlicher Relevanz und soll am Beispiel des Glycerins Gegenstand dieser Dissertationsarbeit sein.

1.1 Die Wasserpfeife – Lifestyle-Objekt oder Gesundheitsgefahr?

1.1.1 Allgemeines, Aufbau & Funktionsprinzip

Die Shisha, auch bekannt als Wasserpfeife, Narghile oder Hookha, hat ihren Ursprung im alten Indien [Aigner 2016; Gültekin et al. 2015]. Damals wurden unter anderem Kokosnüsse und Bambusstäbe genutzt, um ganze Tabakblätter zu rauchen. Zwischen dem 16. und 17. Jahrhundert wurde die Wasserpfeife auch in Arabien und Nordafrika verbreitet. Dort wurde die heutige Form der Wasserpfeife entwickelt. Insbesondere im arabischen und nordafrikanischen Raum erreichte die Shisha, über den eigentlichen Tabakkonsum hinaus, einen besonderen Stellenwert als Ritual im Rahmen sozialer Interaktionen. Sie gilt seit jeher als das orientalische Sinnbild von Gastfreundschaft und Geselligkeit, welches eine Abkehr vom alltäglichen Stress und den weltlichen Belangen ermöglicht. Zu einem Rückgang der Shisha-Kultur kam es im 19. und 20. Jahrhundert durch die Erfindung der Zigarette und ihrer rasanten, globalen Verbreitung. Erst in den letzten Jahrzehnten erlebte die Wasserpfeife eine Art Renaissance: Nicht nur im Orient, sondern auch in westlichen Ländern kam es zu einer gehäuftten Eröffnung von Shisha-Cafés sowie der Etablierung eines massentauglichen Wirtschaftszweiges rund um die Shisha. Dabei erfreut sich die Wasserpfeife vor allem im Kreise Jugendlicher und junger Erwachsener zunehmender Beliebtheit. Die Wasserpfeife wird dabei zum Lifestyle-Objekt und bildet einen Gegenpol zur Leistungsgesellschaft des 21. Jahrhunderts. Insbesondere die soziale



Abbildung 1: Zusammensetzung einer Shisha aus den vier Hauptbestandteilen: Bowl (1); Rauchsäule (2); Kopf (3); Schlauch (4)

Komponente des Shisha-Rauchens stellt einen wesentlichen Grund für den globalen Aufschwung der Wasserpfeife dar [Maziak et al. 2015].

Für den Aufbau der Wasserpfeife sind grundsätzlich vier Bestandteile unerlässlich (siehe Abbildung 1): Die Bowl (1), welche meist aus Glas besteht und mit diversen Mustern verziert sein kann, stellt das Behältnis für das Wasser dar. Auf der Bowl wird die Rauchsäule (2) luftdicht befestigt. Dabei sollte die untere Öffnung der vertikalen Rauchsäule etwa 2 cm in das Wasser hineinragen. Auf der oberen Öffnung wird nun ebenfalls luftdicht der Kopf (3) montiert. Dieser besteht häufig aus Ton oder Keramik und hat oben eine mittige Einkerbung, die als Grube für den Tabak fungiert. Darüber hinaus besitzt sie

mehrere Löcher, die einen Luftstrom in das Innere der Rauchsäule ermöglichen. Umrundet wird die Einkerbung durch einen erhabenen äußeren Wall des Kopfes, über den beim Zubereiten der Shisha zumeist Alu-Folie gespannt wird. Diese wird wiederum mit einigen Löchern versehen und dient beim Rauchen als Ablage für die erhitzte Kohle. Alternativ zur Alu-Folie ist auch die Nutzung eines Kohlesiebs möglich. Seitlich an der Rauchsäule kann ein Schlauch (4), bei manchen Wasserpfeifen auch mehrere, über einen Adapter befestigt werden. So wird eine Verbindung zwischen der Außenluft und der Luft im ansonsten geschlossenen Bowl-System hergestellt. Neben diesen Grundbestandteilen kann die Wasserpfeife um weitere Vorrichtungen wie Kohleteller, Windschutz, o. ä. erweitert werden, auf die an dieser Stelle nicht näher eingegangen wird.

Vor dem Rauchen der Wasserpfeife wird die Bowl zunächst mit Wasser gefüllt. Während der Erhitzung der Kohle, man unterscheidet Naturkohle und selbstzündende Kohle, erfolgt parallel die Zubereitung des Kopfes: Dieser wird mit 5 bis 10 g Shisha-Tabak gefüllt und wahlweise mit diversen Substanzen angefeuchtet (siehe 1.1.3). Die erhitzte Kohle wird auf die Alu-Folie des Kopfes gelegt.

Wird nun am Mundstück des Schlauches inspiriert, so wird die Luft aus der Bowl gesaugt und es entsteht ein Unterdruck. Dieser Unterdruck bewirkt einen Luftstrom von der erhitzten Kohle aus durch den mit Tabak gefüllten Kopf sowie durch die Rauchsäule. Die Luft gelangt aus der unteren Öffnung der Rauchsäule in das Wasser der Bowl und steigt der Auftriebskraft folgend auf. Das Wasser fängt zu blubbern an. Aufgrund des Unterdruckes wird die Luft nun durch den Schlauch in die Atemwege des Rauchenden gezogen. Der Luftstrom durch den Shisha-Kopf bewirkt weiterhin, dass mehr Sauerstoff an die glühende Kohle gelangt und es so zu einer zusätzlichen Erhitzung der Kohle sowie der eingezeichneten Luft kommt. Der Tabak selbst ist von der Kohle getrennt und verbrennt nicht, sondern verschwelt. In der Literatur wird die Temperatur der Kohle auf etwa 450 °C quantifiziert [Shihadeh 2003], die durchschnittliche Tabaktemperatur hingegen auf lediglich 70 120 °C [Shihadeh 2003] bzw. 100 160 °C [Monn et al. 2007]. Somit liegen signifikant geringere Temperaturen als beim Zigarettenrauchen mit etwa 900 °C vor [McAdam et al. 2016]. Inwiefern die Passage des Rauches durch das Wasser neben einem kühlenden Effekt auch als Filter für Schadstoffe wirkt, gilt als umstritten [Bundesinstitut für Risikobewertung 2009] [WHO 2005].

1.1.2 Epidemiologie des Shisha-Rauchens

Der tägliche, globale Shisha-Gebrauch wird bereits im Jahr 2003 von einer österreichischen Studie auf über 100 Mio. Menschen eingeschätzt [Wolfram et al. 2003]. Die amerikanischen *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) haben weltweite epidemiologische Daten der letzten Jahre zusammengetragen, welche die gewachsene Popularität der Wasserpfeife eindrucksvoll belegen [CDC zitiert am 06.04.2018]. In Zeiten von Globalisierung und interkultureller Orientierung hat sich der Hype um die Wasserpfeife weltweit verbreitet und so in der vergangenen

Dekade bspw. in Südostasien [Ramachandra und Yaldrum 2015] oder auch in den USA [Amrock et al. 2014; Soule et al. 2015] einen enormen Anstieg erfahren. Nicht nur in den Vereinigten Staaten sind die Hauptträger dieser Entwicklung die Jugendlichen und jungen Erwachsenen. In manchen Ländern des Nahen und Mittleren Ostens erfolgte sogar bereits eine Ablösung der Zigarette als bevorzugte Tabakkonsumform der Jugendlichen durch die Shisha [Akl et al. 2011; Maziak et al. 2015]. Auch in der deutschen Tabakszene ist die Wasserpfeife fest verankert. Die Thoraxklinik am Universitätsklinikum Heidelberg hat eine lokale Umfrage zum Rauchverhalten an 3045 Jugendlichen durchgeführt und kam zu dem Ergebnis, dass 24% der Befragten in ihrem Leben bereits Shisha geraucht haben [Herth et al. 2009]. Ähnliche Ergebnisse weist auch die KiGGS-Studie (Studie zur Gesundheit von Kindern und Jugendlichen in Deutschland) des Robert-Koch-Instituts auf, bei der 4543 deutsche Jugendliche im Alter von 12 bis 17 Jahren telefonisch befragt wurden [Kuntz und Lampert 2015; Kuntz und Lampert 2016]: 28,6% geben an, in ihrem Leben bereits schon mindestens einmal Wasserpfeife geraucht zu haben, 20,6% sogar innerhalb des letzten Jahres und 10% innerhalb der letzten 30 Tage. Dabei rauchen Jungen signifikant häufiger als Mädchen (siehe Abbildung 2).

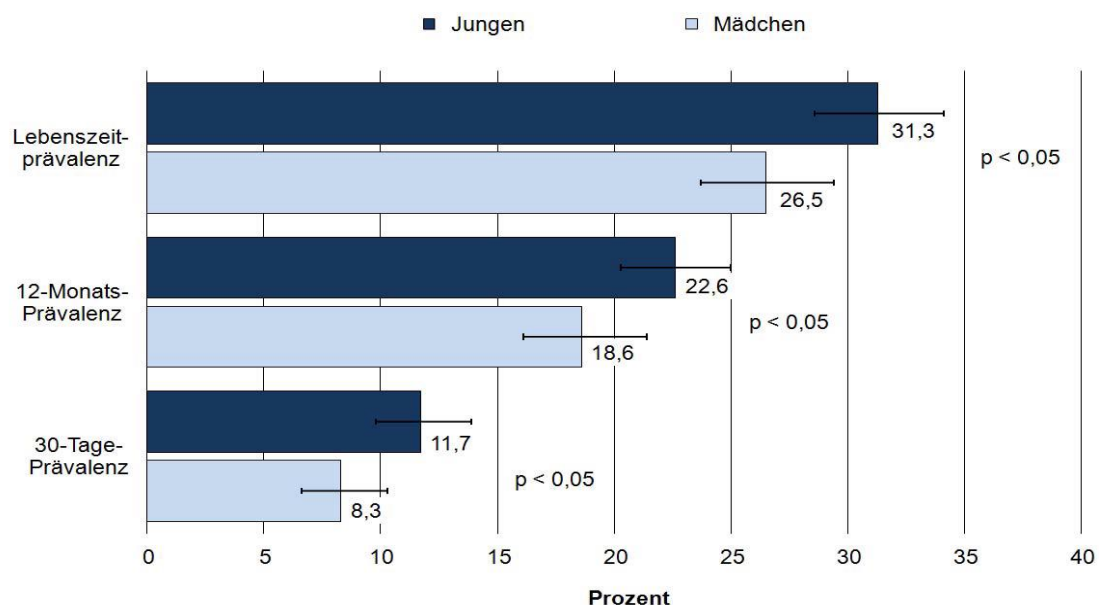


Abbildung 2: Verbreitung des Wasserpfeifenkonsums bei 12- bis 17-jährigen Jugendlichen in Deutschland nach Geschlecht. Ergebnisse aus KiGGS Welle 1 (2009–2012). [Kuntz und Lampert 2016]

Die Raucher-Prävalenzen steigen bei beiden Geschlechtern mit zunehmendem Alter, eine Abhängigkeit vom sozioökonomischen Status der Jugendlichen lässt sich nicht nachweisen. Dabei sehen sich viele Wasserpfeifen-Raucher selber als Nicht-Raucher an [Schwarzer et al. 2015], was auf eine weit verbreitete Unterschätzung möglicher Gesundheitsschäden durch das Shisha-Rauchen schließen lässt.

Betrachtet man das Rauchverhalten der einzelnen Shisha-Raucher, so fallen eklatante Unterschiede zum Zigaretten-Raucher auf: 68,5% der Zigaretten-Raucher greifen täglich zur Zigarette [Piontek D et al. 2016]. Aus der Gruppe der Jugendlichen, die in den letzten 30 Tagen mindestens einmal Shisha geraucht haben, rauchten hingegen nur 0,6% täglich [Kuntz und Lampert 2015]. Von der Gesamtheit der 12- bis 17-jährigen rauchen in einem Zeitintervall von 30 Tagen weniger als 0,1% der Jugendlichen täglich, 2,8% an mindestens drei Tagen, 2,5% an zwei Tagen und 4,7% an einem der letzten 30 Tage Shisha [Kuntz und Lampert 2015]. Die Wasserpfeife wird in Deutschland also nicht täglich geraucht, vielmehr kann von einem gelegentlichen Konsum, oft auch im Zuge sozialer Interaktion, ausgegangen werden. Neben den Abweichungen in der Frequenz des Rauchverhaltens müssen aber auch Parameter wie Zugvolumina oder Dauer des Wasserpfeife-Rauchens berücksichtigt werden. So sind für das Zugvolumen beim Shisha-Rauchen in diversen Studien Werte zwischen 530 ml [Shihadeh et al. 2004] und 1000 ml [Monn et al. 2007] pro Zug beschrieben. In letztgenannter Studie wird die durchschnittliche Dauer eines Zuges auf 5 s quantifiziert, wobei die Zeitintervalle zwischen den einzelnen Zügen im Schnitt 25,5 s betragen [Monn et al. 2007]. Für die Anzahl der Züge pro Sitzung kann von Werten zwischen 100 [Shihadeh 2003] und 170 [Shihadeh et al. 2004] ausgegangen werden, die Dauer des Rauchens eines Shisha-Kopfes beläuft sich dabei auf etwa eine Stunde [Shihadeh et al. 2004]. Diese Parameter beschreiben das spezifische Raucherprofil der Wasserpfeife und weisen auf die Problematik des Vergleichs zum Zigarettenrauch hin.

1.1.3 Zusammensetzung von Tabak und Rauch

Wasserpfeifen-Tabak setzt sich aus normalem Rauchtobak zusammen, welcher zusätzlich mit Aromen, Melasse und Feuchthaltemitteln vermischt wird. Der in Europa gebräuchliche Shisha-Tabak hebt sich dabei primär in zwei Punkten vom

typischen Zigaretten-Tabak ab: Einerseits erfolgt durch Zugabe von Sirupen, Früchten oder Fruchtessenzen eine enorme Aromatisierung des Tabaks, andererseits ermöglichen erhöhte Feuchthaltemittel-Anteile eine gesteigerte Feuchtigkeit des Tabaks [Bundesinstitut für Risikobewertung 2009]. Die durch die Aromatisierung erzielten Geschmacksrichtungen sind mannigfaltig und reichen von Minze, Traube, Wassermelone über den beliebten Doppel-Apfel bis hin zu exotischen Geschmäckern wie Cola oder Eisbonbon. Eine entscheidende Rolle spielen die ebenfalls angesprochenen Feuchthaltemittel. Da der Shisha-Tabak verschwelt wird, stellen diese den entscheidenden Faktor der Rauchentwicklung dar und verhindern das Anbrennen des Tabaks. Die beliebtesten Feuchthaltemittel sind Glycerin und 1,2-Propandiol (=1,2-Propylenglykol). Neben ihnen wird auch Melasse zum Anfeuchten des Tabaks genutzt. Bei Melasse handelt es sich um einen honigartigen Zuckersirup, zu welchem häufig zusätzlich Wasser, Glycerin und ggf. Aromen hinzugegeben werden.

Der Nikotingehalt des Shisha-Tabaks in einem Kopf übertrifft den Nikotingehalt einer Zigarette (etwa 6 mg Nikotin/Zigarette [Schumacher und Vagts 2007]) deutlich. So wurde der Gehalt an Nikotin in jordanischen aromatisierten Tabaksorten auf durchschnittlich 67 mg pro 20 g -Tabak-Kopf quantifiziert [Hadidi und Mohammed 2004]. Da in Deutschland eher 5 bis 10 g Tabak für einen Kopf verwendet werden [Bundesinstitut für Risikobewertung 2009], sollte von einem Nikotin-Gehalt pro Kopf von etwa 17 bis 35 mg ausgegangen werden.

Bei Betrachtung der Zusammensetzung des Hauptstromrauches der Shisha lässt sich zunächst nicht mehr klar differenzieren, ob eine Komponente direkt aus dem Tabak oder aus der glühenden Kohle stammt. Die folgenden Werte wurden in unterschiedlichen Studien mit 10 g Tabak pro Kopf erhoben: So wurden 2,94 mg Nikotin, 802 mg Teer und 145 mg Kohlenstoffmonoxid in einem Kopf nachgewiesen [Shihadeh und Saleh 2005]. Bei Ersetzen der Kohle durch ein elektrisches Erhitzungsverfahren ließ sich die Kohlenmonoxid-Entstehung hingegen um 90% reduzieren [Monzer et al. 2008]. Dies verdeutlicht, dass neben dem Tabak das Schadstoffprofil der verwendeten Kohle eine wichtige Rolle spielt. Auch die Werte von diversen Schwermetallen wie z. B. Blei, Chrom oder Nickel waren im Vergleich zum Zigaretten-Rauch ebenso deutlich erhöht [Shihadeh 2003] wie die

Anteile von Formaldehyd und Acrolein [Rashidi et al. 2008], einem krebserregendem Oxidationsprodukt des Glycerins [DFG 2012a]. Ebenfalls zahlreich nachweisbar im Wasserpfeifen-Rauch sind die polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe (PAK): Sepetdjian, Shihadeh et al. schätzen den Anteil an 4- und 5-ringigen, karzinogenen PAK im Hauptstrom der Shisha als 50-mal höher als beim Rauchen einer Zigarette ein. Auch vertreten in der Gruppe der PAK ist das karzinogene Benzo[a]pyren, welches auf 307 ng pro Shisha-Sitzung quantifiziert wurde [Sepetdjian et al. 2008]. Bei Benzo[a]pyren handelt es sich um eine der am besten erforschten Substanzen in der Krebsentstehung durch Rauchen.

In einer Biomonitoring-Studie aus dem Jahr 2011 wurden im Blut nach Wasserpfeife-Rauchen deutlich höhere Werte an Carboxyhämoglobin, der mit Kohlenmonoxid beladenen Form des Hämoglobins, nachgewiesen als nach Zigaretten-Rauchen (17,1% vs. 3,4%). In der gleichen Studie waren die Blut-Werte von Nikotin sowie die 24-Stunden-Urin-Werte von Cotinin, dem als Rauchmarker fungierenden Stoffwechselprodukt des Nikotins, nach Wasserpfeife-Rauchen wesentlich geringer als nach Zigaretten-Rauchen (Nikotin: 11,4 µg/l vs. 41 µg/l; Cotinin: 251 µg/24h vs. 1238 µg/24h) [Schubert et al. 2011]. Dies lässt den Rückschluss zu, dass nur ein Teil der Tabakkomponenten in den Hauptrauchstrom aufgenommen werden. Zu welchen Anteilen die schädlichen Substanzen in den Nebenrauchstrom gelangen oder durch das Wasser gefiltert werden ist zunächst unklar.

Ebenfalls enthalten im Wasserpfeifenrauch sind Partikel, deren Größe von 10 nm bis zu mehreren Mikrometern variieren kann [Bundesinstitut für Risikobewertung 2009]. Diese Partikel stellen nicht nur eine Gefährdung für den Raucher selbst, sondern durch die Verschmutzung der Umgebungsluft auch für Mitmenschen im Sinne des Passiv-Rauchens dar. Angesichts der hohen Raucher-Dichte und den oft unzureichenden Lüftungsbedingungen muss bei Shisha-Cafés von einem besonderen Gefährdungspotenzial ausgegangen werden. So wurden aus unterschiedlichen Studien die gemessenen PM_{2,5}-Fraktionen (particulate matter – Feinstaubgehalt mit 2,5 µm Durchmesser) in Shisha-Cafés mit folgenden Durchschnitts-Ergebnissen zusammengetragen [Fromme und Schober 2016]: 476 µg/m³ in 40 Shisha-Cafés in Katar [Al Mulla et al. 2015], 1419 µg/m³ in 12 Shisha-Cafés in

Kanada [Zhang et al. 2015] , 363 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ in 10 Shisha-Bars in den USA [Zhou et al. 2017]. Im Hinblick auf den von Europäischer Union (EU) und Weltgesundheitsorganisation (WHO) vorgegebenen Langzeit-Grenzwert der $\text{PM}_{2,5}$ -Fraktion von 25 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ sollten die ermittelten Werte als bedrohlich eingestuft werden [WHO 2006]. Betrachtet man die ultrafeinen Partikel, so scheinen diese insbesondere im Hauptstromrauch mit einer Durchschnittsgröße von 0,04 μm stark vertreten zu sein [Monn et al. 2007] und so ebenfalls eine Gesundheitsgefahr für Lungengewebe und Blutkreislauf des Rauchers darzustellen.

An dieser Stelle sei abschließend auch auf Formen des nikotinfreien Shisha-Konsums verwiesen: So kann der Rauchtobak durch nikotinfreien Tabak aus Zuckerrohr ersetzt werden. Eine weitere Alternative ist die Verwendung von speziellen Dampfsteinen, die in Aromastoffen getränkt werden. Bei Erhitzung geben diese einen aromatisierten Dampf ab. Auch wenn bei diesen Formen die Wirkung des Nikotins wegfällt, dürfen gesundheitsschädliche Wirkungen durch Verbrennungsprodukte der Kohle (wie z. B. Kohlenmonoxid) nicht vernachlässigt werden.

1.2 Eigenschaften und toxikologisches Profil des Glycerins

1.2.1 Glycerin – obligat für Stoffwechsel und Industrie

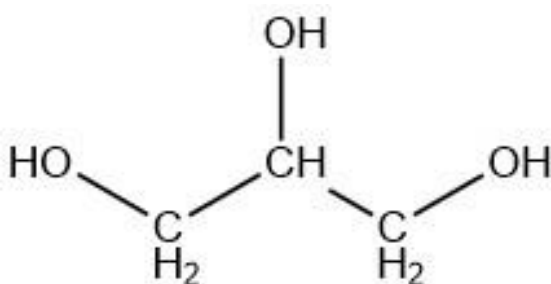


Abbildung 3: Strukturformel des Glycerins

Glycerin, auch unter dem Synonym Glycerol bekannt, ist nicht nur das bedeutsamste Feuchthaltemittel im Shisha-Tabak, sondern spielt auch als Metabolit im körpereigenen Fettstoffwechsel eine zentrale Rolle. Gemäß der Nomenklatur der International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) wird Glycerin als Propan-1,2,3-triol bezeichnet, es handelt sich folglich um einen dreiwertigen Zuckeralkohol (siehe Abbildung 3). Reines Glycerin liegt bei Raumtemperatur als farb- und geruchlose Flüssigkeit

Glycerin, auch unter dem Synonym Glycerol bekannt, ist nicht nur das bedeutsamste Feuchthaltemittel im Shisha-Tabak, sondern spielt auch als Metabolit im körpereigenen Fettstoffwechsel eine zentrale Rolle. Gemäß der Nomenklatur der International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) wird Glycerin als Propan-1,2,3-triol bezeichnet, es handelt sich folglich um einen dreiwertigen Zuckeralkohol (siehe Abbildung 3). Reines Glycerin liegt bei Raumtemperatur als farb- und geruchlose Flüssigkeit

vor, die eine sehr hohe Viskosität aufweist. Bei Erhitzung des Glycerins auf Temperaturen über 100 °C kommt es zur Bildung eines weißen Dampfes.

Die technische Synthese von Glycerin kann auf unterschiedlichen Wegen erfolgen. Neben biotechnologischen Verfahren und der Glycerin-Synthese aus Propen werden in den letzten Jahren erhebliche Massen an Glycerin als Nebenprodukt aus der Biodieselherstellung generiert [Quispe et al. 2013].

Im menschlichen Körper stellt Glycerin das Grundgerüst der meisten Fette dar. Seine drei Hydroxygruppen können im Zuge der Lipogenese jeweils in Kondensationsreaktionen mit den Carboxygruppen von Fettsäuren zu Triacylglyceriden verestert werden [Horn 2012]. Das Glycerin steht dafür frei im Plasma zur Verfügung, seine Konzentration kann durch Noradrenalin-Ausschüttung gesteigert, durch Insulin-Ausschüttung hingegen gesenkt werden [DFG 2012b]. Über den Verdauungstrakt kann Glycerin aufgenommen werden und in der Leber sowie der Niere durch die Glycerokinase zu Glycerin-3-phosphat (= α -Glycerophosphat) phosphoryliert werden. Dieses kann nach Dehydrierung durch die Glycerophosphat-Dehydrogenase zu Dihydroxyacetonphosphat in den Glucose-Stoffwechselweg eingeschleust werden [Löffler und Petrides 2006].

Neben dieser zentralen Bedeutung im endogenen Stoffwechsel hat Glycerin auch in der industriellen Chemie vielfältige Verwendung [OECD 2002]: So findet es sich in vielen kosmetischen Erzeugnissen zur Feuchthaltung der Haut wieder. Diese auch im Tabak gewünschte Funktion als Feuchthaltemittel wird durch die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Wassermolekülen und den Hydroxygruppen des Glycerins ermöglicht. Auch als feuchthaltender Lebensmittelzusatz (E 422) ist es zugelassen und wird zum Beispiel Fleischprodukten, Kaugummis oder Schokolade zugegeben. Es ist als Zwischenprodukt Grundlage der Synthese multipler anderer Substanzen und findet in der Industrie ebenfalls Anwendung als Gleitmittel, Weichmacher oder Frostschutzmittel [Steinberner und Preuss 1987]. Seine Eigenschaft, bei Erhitzung weißen Dampf zu bilden, macht man sich bei der Verwendung in Nebelfluiden, E-Zigarettenliquids und Shisha-Tabak zu Nutze.

In der Medizin wird Glycerin zur osmotischen Therapie des Hirnödems eingesetzt. Auch bei Verstopfungsbeschwerden oder schmerzhafter Stuhlentleerung kann es in Form von Einläufen oder Zäpfchen als Abführmittel verabreicht werden. Darüber hinaus ist es als pharmazeutischer Hilfsstoff Bestandteil vieler weiterer Medikamente.

1.2.2 Toxikologische Beurteilung des Glycerins

Mögliche toxische Effekte des Glycerins wurden auf verschiedenen Ebenen in diversen Studien untersucht. Im Folgenden wird ein Überblick über den aktuellen Forschungsstand gegeben:

Bei wiederholter oraler sowie intravenöser Gabe von Glycerin zur Behandlung von Hirnödemen beim Menschen ergaben sich bisher keine Hinweise auf toxische Effekte durch das Glycerin [Meyer et al. 1971; OECD 2002].

Bei oraler Glycerin-Applikation an Ratten und Mäusen wurden hingegen letale Folgen beobachtet. So sind für Mäuse ein LD₅₀-Wert von >25,3 g/kg Körpergewicht sowie für Ratten ein LD₅₀-Wert von 37,95 g/kg Körpergewicht beschrieben. Der LD₅₀-Wert entspricht der Konzentration, die für die Hälfte der exponierten Tiere letal ist. Dabei traten zunächst Symptome wie Zittern, Krämpfe und Muskelspasmen auf. [Bartsch et al. 1976]

Untersuchungen der *in vitro*-Genotoxizität von Glycerin an chinesischen Hamsterzellen mit dem Chromosomenaberrationstest und dem Schwesterchromatidaustausch erbrachten insgesamt unauffällige Ergebnisse, lediglich bei einer Konzentration von 200 µg/ml und metabolischer Aktivierung konnten vermehrte Aberrationen nachgewiesen werden. Da keine Konzentrationsabhängigkeit vorlag, ist die wissenschaftliche Aussagekraft der Auffälligkeit stark limitiert. [Doolittle et al. 1988]

Renne et al. exponierten in zwei Versuchsreihen Ratten mit Glycerin-Aerosolen unterschiedlicher Konzentrationen für je 2 bzw. 13 Wochen. Während auf systemischer Ebene vereinzelte Abnahmen des Glukose-Spiegels und Zunahmen der Plasmatriglyceridkonzentrationen beobachtet wurden, kam es in

beiden Versuchsreihen bei steigenden Konzentrationen lokal zur gehäuften Bildung von minimalen bis leichten Plattenepithelmetaplasien der Epiglottis. Die höchste exponierte Konzentration, bei der keine toxischen Effekte beobachtet wurden, bezeichnet man als NOAEC. Dieser war für die Plattenepithelmetaplasien bei der 2-wöchigen Studie mit höheren Expositions-Konzentrationen kleiner als 1000 mg/m^3 , bei der 7-wöchigen Studie betrug der NOAEC 165 mg/m^3 . [Renne et al. 1992]

Ein möglicher Erklärungsansatz für die beschriebene Entstehung von Metaplasien stellt neben irritativ-entzündlichen Prozessen die Bildung von Acrolein (=Propenal) aus Glycerin dar (siehe Abbildung 4).

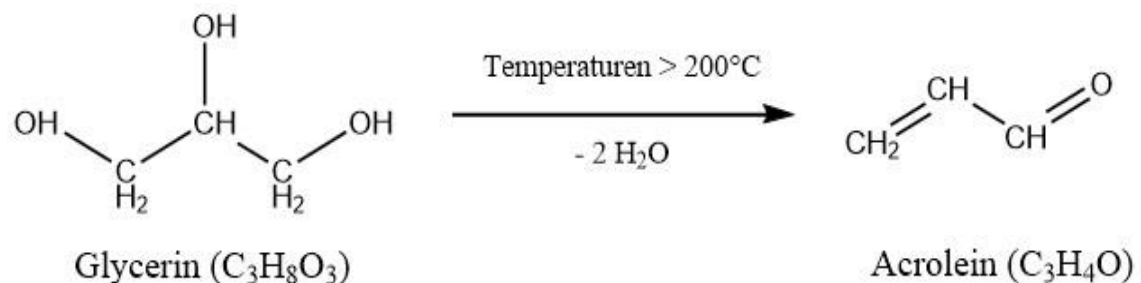


Abbildung 4: Reaktionsgleichung zur Bildung von Acrolein aus Glycerin

Acrolein ist ein ungesättigtes und hochreaktives Aldehyd, welches von der Maximalen Arbeitsplatz Konzentration (MAK)-Kommission der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) als krebserzeugend eingestuft wird [DFG 2012a]. Auf zellulärer Ebene entfaltet es vielfältige toxische Wirkungen, zum Beispiel die Bildung von Desoxyribonukleinsäure (DNA)- und Protein-Addukten, oxidativen Stress oder Membranschäden [Moghe et al. 2015]. Neben den DNA- und Protein-Addukten sind genotoxische Effekte durch Punktmutationen sowie eine Einschränkung der Basenexzisions-Reparaturmechanismen beschrieben [Hille-Rehfeld 2007].

Genotoxikologische Studien des Glycerins wurden bisher *in vivo* an Ratten und *in vitro* an chinesischen Hamsterzellen durchgeführt. Auch wurde Glycerin als Bestandteil von Zigaretten tabak in verschiedenen Konzentrationen untersucht. Hierbei konnten zyto- und genotoxische Effekte des resultierenden Hauptstromrauches nicht nachgewiesen werden. Bei der Analyse der

Rauchzusammensetzung war auffällig, dass bei Verwendung von 10- sowie 15-prozentigen-Glyceringehältern im Tabak verdünnende Effekte durch höhere Wasser- und Glycerin-Anteile im Rauch für andere Rauchbestandteile, wie bspw. Nikotin, Stickoxide, Acetaldehyd und weitere, auftraten. Eine Erhöhung der Acrolein-Werte war bei diesen Glycerin-Konzentrationen ebenfalls zu beobachten. [Carmines und Gaworski 2005]

Trotz der ubiquitären Verwendung des Glycerins ist die Datenlage hinsichtlich Untersuchungen menschlicher Zellen nach Glycerin-Exposition auf genotoxikologische Endpunkte unzureichend.

1.3 Gesetzliche Beschränkungen der Tabakzusammensetzung

1.3.1. Tabakverordnung

Die Verordnung über Tabakerzeugnisse, kurz Tabakverordnung (TabakV), wurde am 20. Dezember 1977 zur Regulierung der Tabakzusatzstoffe verfasst und hat jahrzehntelang den gesetzlichen Rahmen für sämtliche Tabakprodukte am deutschen Markt gesetzt. Diese mehrfach überarbeitete Verordnung hat die zugelassenen Bestandteile des Tabaks streng definiert: Nur die im Gesetz aufgeführten Substanzen durften im Tabak vorkommen. Darüber hinaus wurden auch quantitative Limitationen gesetzt. So wurden für die Gruppe der Feuchthaltemittel sowohl alle genehmigten Substanzen explizit aufgelistet, als auch deren Gesamtanteil am Trockentabak auf maximal 5 Prozent limitiert (siehe Anlage 1 Teil A Nr. 2 zu § 1 der TabakV). Diese Limitationsklausel wurde für Zigaretten, Zigarren und Rauchtobak eingeführt und sollte den Verbraucher vor einer Streckung des Tabaks mit schweren Feuchthaltemitteln schützen. Ebenfalls betroffen von dieser Regelung war der damals in Deutschland noch nicht populäre Shisha-Tabak, bei dessen Verschwelung ein erhöhter Feuchthaltemittelgehalt für eine adäquate Rauchbildung sogar erforderlich ist. Während in anderen Ländern Feuchthaltemittelgehalte von 20 bis 30%, bei Edeltobak oft sogar noch mehr, üblich sind, entstand für den deutschen Markt ein separater Produktions-Zweig mit reduzierten Gehältern an Feuchthaltemitteln. In den letzten Jahren wurden bei Kontrollproben des Zolls oder des Bayrischen

Landesamtes für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit gehäufte Überschreitungen der vorgeschriebenen Beschränkungen der Feuchthaltemittel im Shisha-Tabak beobachtet [Osiander-Fuchs 2015]. Auch dies heizte die gesellschaftspolitische Debatte um eine Anpassung der Feuchthaltemittelbeschränkung der Tabakverordnung an. Für eine Reihe von Anträgen auf eine Ausnahmegenehmigung für Feuchthaltemittel in Shisha-Tabak wurde vom Bundesamt für Risikobewertung aufgrund möglicher Acrolein-Bildung aus Glycerin eine Ablehnung empfohlen [Bundesinstitut für Risikobewertung 2009]. Angesichts dieser langen Zeit festgefahrenen Konstellation entwickelte sich der Gebrauch von Honig-Melasse und reinem Glycerin zur nachträglichen Befeuchtung des Shisha-Tabaks durch den Endnutzer als gängige Praxis in Deutschland.

1.3.2. Tabakerzeugnisverordnung

Seit Mai 2014 besteht die europäische Tabak-Produktrichtlinie zur Anpassung der Tabakvorschriften in den einzelnen EU-Staaten [Europäisches Parlament und Europäischer Rat 2014]. Diese Richtlinie wurde ab dem 20.05.2016 in Deutschland durch das „Gesetz zur Umsetzung der Richtlinie über Tabakerzeugnisse und verwandte Erzeugnisse“, kurz Tabakerzeugnisgesetz, und der darauf gestützten „Verordnung über Tabakerzeugnisse und verwandte Erzeugnisse“, kurz: Tabakerzeugnisverordnung, umgesetzt. Sie haben die Tabakverordnung als geltende Rechtsgrundlage abgelöst und einige Neuerungen mit sich gebracht: So müssen zukünftig 65% der Vorder- und Rückseite der Verpackung von Rauchtabakerzeugnissen mit Warnhinweisen in Text- und Bildform versehen sein. Die Rückverfolgbarkeit von Tabakprodukten wird intensiviert und auch neue Trendprodukte wie elektronische Zigaretten werden in der Fassung berücksichtigt. Neben vielen weiteren Änderungen steht jedoch für diese Arbeit die künftig EU-einheitliche Regelung der Tabak-Inhalts- und Zusatzstoffe im Vordergrund. Während in der alten Tabakverordnung nur im Gesetz aufgelistete Stoffe als Zusatz erlaubt waren, darf nun alles, was nicht verboten ist, dem Tabak zugegeben werden. Koffein, Taurin sowie Vitamine sind als Tabakzusatzstoffe gänzlich verboten. Darüber hinaus wird eine Prioritätenliste mit potenziell gefährlichen Stoffen von der EU erstellt. Sollte das Tabakerzeugnis einen dieser

Stoffe beinhalten, so ist der Produzent zu ausführlichen Studien hinsichtlich möglicher toxischer Effekte des Zusatzstoffes verpflichtet. Ansonsten sind keine quantitativen Limitationen der Tabakzusammensetzung genannt.

Für die Feuchthaltemittel bedeutet dies einerseits eine Aufhebung der 5%-Limitation und andererseits eine Öffnung des Marktes für neue Feuchthaltemittel, die über die in der Tabakverordnung genannten hinausgehen und deren toxikologisches Profil oft noch nicht hinreichend untersucht ist.

Insgesamt geht mit der neuen Gesetzesänderung ein Kontrollverlust der Shisha-Tabakzusammensetzung einher. Wie sich dies auf die Zusammensetzung der Endprodukte auswirkt, bleibt abzuwarten. Eine enorme Zunahme des Glycerin-Gehalts im Tabak gilt als wahrscheinlich.

1.4 Ziele der Arbeit

In Deutschland sind etwa 110.000 Todesfälle pro Jahr allein durch Folgen des Rauchens verursacht [Barnes et al. 2016; Mons 2011], ebenso lassen sich 72.000 Krebserkrankungen pro Jahr auf Tabakkonsum zurückführen [Wienecke et al. 2014]. Neben der Zigarette hat die Wasserpfeife als weitere Form des Tabakkonsums hierzulande an Bedeutung gewonnen [Fromme und Schober 2016]: Laut statistischem Bundesamt ist der Absatz des Pfeifentabaks 2017 mit 3245 Tonnen mehr als viermal so hoch wie 2010 (755 t) [Statistisches Bundesamt 2018] - hauptverantwortlich für diesen Trend: der Shisha-Tabak. Gleichermaßen nimmt die Anzahl an Shisha-Bars in deutschen Großstädten in den letzten Jahren enorm zu. In einer Studie des Robert-Koch-Instituts aus dem Jahr 2015 gibt fast jeder zweite (46,6%) der befragten männlichen 17-Jährigen an, in den letzten 30 Tagen mindestens einmal Shisha geraucht zu haben [Kuntz und Lampert 2015].

Durch das Inkrafttreten der Tabakerzeugnisverordnung ab Mai 2016 haben sich für den Tabak der insbesondere bei Jugendlichen aufstrebenden Shisha viele Neuerungen ergeben: Neben der Zulassung neuer Substanzen für den Tabak, ist insbesondere der Wegfall der langen Zeit angefochtenen Feuchthaltemittelgehaltlimitierung von zentraler Bedeutung. Frühere Anträge zur Anhebung der Feuchthaltemittel im Shisha-Tabak, unter Gültigkeit der

vorherigen Tabakverordnung, wurden vom Bundesinstitut für Risikobewertung (=BfR) noch abgelehnt, nun muss unter neuer Gesetzeslage aber mit einem relevanten Anstieg der Glycerin-Gehälter im Shisha-Tabak gerechnet werden.

Trotz dieser Entwicklungen ist das Glycerin auf toxische Effekte an menschlichen Zellen noch nicht hinreichend untersucht (siehe 1.2.2). Ziel dieser Dissertationsarbeit ist es daher, das toxikologische Profil des Glycerins im Shisha-Tabak auf zellulärer Ebene zu eruieren. Vor diesem Hintergrund stellen sich zunächst folgende Fragen:

- Führt die Exposition humaner Lymphozyten und Nasenschleimhautzellen mit Glycerin zu zytotoxischen Effekten?
- Lassen sich in humanen Lymphozyten und Nasenschleimhautzellen durch Glycerin verursachte genotoxische Schäden nachweisen?
- Welche Bedeutung haben diese Ergebnisse für das Gefährdungspotenzial durch das Feuchthaltemittel Glycerin im Shisha-Tabak?

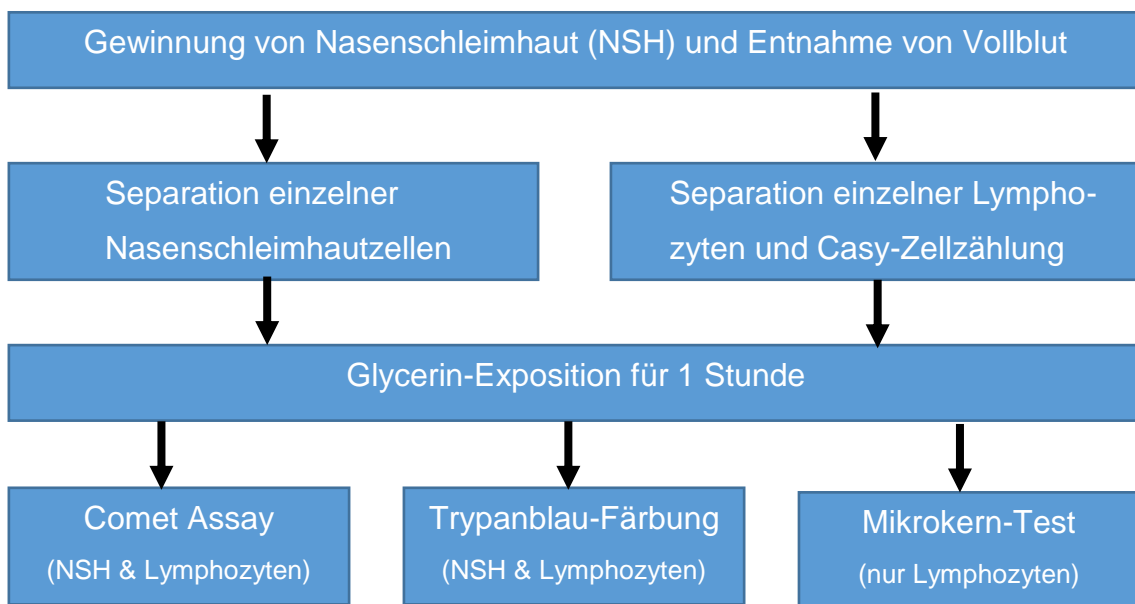
Auf Grundlage dieser Ergebnisse sollen folgende gesellschaftspolitisch relevanten Fragestellungen diskutiert werden:

- Wie ist die gegenwärtige Situation der Tabakkontrollpolitik in Deutschland einzuschätzen?
- An welchen Stellen der deutschen Tabakprävention besteht, sowohl generell als auch insbesondere im Bereich des Shisha-Konsums, konkret Nachbesserungsbedarf?

2. Material und Methoden

2.1. Versuchs-Übersicht

Um den Fragestellungen nachgehen zu können, wurde dieser Versuchsaufbau etabliert:



Auf die Entnahme von Nasenschleimhautgewebe und Vollblut von 10 Patienten der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten, plastische und ästhetische Operationen der Universitätsklinik Würzburg folgte die Isolierung von Nasenschleimhautzellen und Lymphozyten. Diese wurden für eine Stunde unterschiedlichen Glycerin-Konzentrationen exponiert. Um mögliche zyto- und genotoxische Effekte zu erfassen, folgte sowohl für die exponierten Nasenschleimhautzellen, als auch die Lymphozyten, eine Trypanblau-Vitalitätstestung sowie die Durchführung der Einzelzellgelelektrophorese (Comet Assay).

Die Auswertung der Einzelzellgelelektrophorese veranlasste eine zweite Versuchsreihe zur näheren Testung genotoxischer Effekte. Dazu wurde mit den Lymphozyten von 10 weiteren Patienten ein Mikrokern-Test durchgeführt, um so auch weitere genotoxische Endpunkte zu erfassen.

2.2 Probanden-Auswahl

Bei den Spendern der Nasenschleimhautzellen und der Lymphozyten für die Studien im Rahmen dieser Dissertations-Arbeit handelt es sich ausschließlich um Patienten der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten, plastische und ästhetische Operationen der Universitätsklinik Würzburg. Die Entnahme von Nasenschleimhaut im Zuge von Operationen der Nase oder der Nasennebenhöhlen war bei den Patienten aus gesundheitlichen Gründen indiziert, eine Studienteilnahme brachte somit keine potenziellen Nachteile für die Patienten mit sich. Es erfolgte sowohl eine schriftliche als auch mündliche Aufklärung der Patienten über die Verwendung ihrer Biopsate und Blutproben zu Forschungszwecken gemäß des Ethikkommissionsantrages (16/06).

So wurden für die Vorversuche insgesamt Blut- und Schleimhautproben von 5 Personen entnommen. Die Patienten der Hauptversuchsreihe mit $n = 10$ rekrutierten sich aus einer Gruppe von 6 männlichen und 4 weiblichen Patienten im Alter zwischen 21 und 72 Jahren, wobei das mittlere Alter 46 Jahre betrug.

Für die zweite Versuchsreihe zur Durchführung des Mikrokern-Tests wurde eine neue Patientenkohorte mit $n = 10$ herangezogen. Auch für die Patienten dieser Kohorte galten o. g. Kriterien. Das Alter der 6 männlichen und 4 weiblichen Patienten erstreckte sich von 31 bis 65 Jahre bei einem mittleren Alter von 47 Jahren. Nähere epidemiologische Informationen über die Patienten-Kollektive finden sich im Datenanhang (siehe Tabelle 12.1 und 12.2).

2.3 Zell-Isolierung

2.3.1 Isolierung von Lymphozyten aus Vollblut

Die Separation von Lymphozyten aus dem Vollblut der Patienten erfolgte nach dem Prinzip der Dichtegradienten-Zentrifugation. Dazu wurden 12 ml-Leucosep-Röhrchen (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D) verwendet, welche mit einer Polyethylen-Trennscheibe versehen sind. Nach der Zentrifugation (Centrifuge 5810R, Eppendorf AG, Hamburg, D) des mit heparinisierten Blut und Separationsmedium gefüllten Röhrchens kommt es zur Bildung unterschiedlicher

Phasen: Ein Pellet aus Erythrozyten und Granulozyten sowie Separationsmedium setzt sich unterhalb der Trennscheibe ab. Oberhalb der Trennscheibe liegt eine Plasmaphase und eine milchig-trübe Interphase aus Lymphozyten und Monozyten vor, welche mit Hilfe einer Pasteurpipette aus Glas (BRAND GMBH + CO KG, Wertheim, D) isoliert und anschließend gewaschen wurde.

Durch Venenpunktion wurde das Blut in 9 ml-Heparin-Monovetten (Blutentnahmesystem, Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, D) entnommen. Zunächst wurde das Leucosep-Röhrchen mit 3 ml Separationsmedium Biocoll (Biocoll-Trennlösung, Biochrom GmbH, Berlin, D) befüllt und bei 1000 g und Raumtemperatur für eine Minute zentrifugiert, so dass sich das Biocoll nun unterhalb der Trennscheibe befand. Das antikoagulierte Blut wurde anschließend mit einer Pasteurpipette in die Leucosep-Röhrchen hinzugegeben. Es erfolgte eine Zentrifugation bei 1000 g für 10 Minuten ohne Bremse, nach der sich die oben beschriebene Phasenaufteilung bildete. Die Lymphozyten der Interphase wurden mit Hilfe einer Pasteurpipette in ein frisches 15 ml-Zentrifugenröhrchen (Greiner Bio-One GmbH) pipettiert. Dabei verhinderte die Trennscheibe eine erneute Kontamination mit den Erythrozyten und Granulozyten. Zu den isolierten Lymphozyten wurden nun 10 ml Phosphat-gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline, PBS, Roche Diagnostics, Mannheim, D) gegeben. Nach Resuspendierung wurden die Zellsuspensionen bei 250 g zentrifugiert und der Flüssigkeitsüberschuss bis auf das Zellpellet abgesaugt. Dieser Waschschrift wurde 2 weitere Male mit 5 ml PBS wiederholt.

Die gewaschenen Lymphozyten wurden nun in 10 ml des Lymphozytenmediums RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium, Biochrom GmbH) aufgenommen. Dabei wurden pro 500 ml Medium folgende Zusätze hinzugegeben: 50 ml fetales Kälberserum (fetal calf serum, FCS, Linaris Biologische Produkte GmbH, Wertheim, D), 5 ml Penicillin-Streptomycin-Lösung (Biochrom GmbH), 5 ml Natrium-Pyruvat (100 mM, Biochrom GmbH) und 5 ml nicht-essentielle Aminosäuren (NEA, Biochrom GmbH). Nach Resuspendierung erfolgte die Zählung der isolierten Lymphozyten im Casy-Messgerät (siehe 2.4).

2.3.2 Isolierung einzelner Nasenschleimhautzellen

Die gewonnenen Nasenschleimhaut-Biopsate (siehe 2.2) wurden in physiologischer Kochsalz-Lösung (0,9%-Natrium-Chlorid, Merck KGaA, Darmstadt, D) direkt in den angeschlossenen Labortrakt transportiert und dort in der Werkbank (Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold, D) in eine Petrischale (100x20 mm, Greiner Bio-One GmbH) überführt und mit Minimum Essential Medium (MEM, Sigma-Aldrich, Steinheim, D) gespült. Auf 500 ml MEM kamen dabei folgende Zusätze: 5 ml L-Glutamin (200 mM, Biochrom GmbH), 5 ml Penicillin-Streptomycin-Lösung, 500 µl Gentamicin (Sigma-Aldrich) und 500 µl Fungizone (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D). Noch vorhandene Blutkoagel oder Knochenstücke wurden mit einem sterilen Einmal-Skalpell (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D) abgetragen. Das Schleimhaut-Biopsat wurde nun mit einer sterilen Pinzette in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Dann wurden sowohl 9 ml MEM als auch 100 µl aliquotierter Enzyme hinzugegeben. Dabei setzten sich die aliquotierten Enzyme aus 0,1 g Protease (Sigma-Aldrich) und 1 mg Desoxyribonuklease (Roche Diagnostics) gelöst in 10 ml PBS zusammen. Das Zentrifugenröhrchen wurde nun für 24 Stunden bei 4 °C im Kühlschrank (Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberach an der Riß, D) lichtgeschützt auf einem Schüttler (IKA Works Inc, Wilmington, US) gelagert.

Am nächsten Tag wurde das Medium mit dem Zellstück in eine Petrischale überführt und 2 ml aufgetautes FCS hinzugegeben. Oberflächlich liegende Schleimhautzellen wurden durch schonendes Abkratzen mit einem Skalpell mechanisch vom Zellstück gelöst. Das gesamte Medium wurde durch eine sterile Komresse (Lohmann & Rauscher, Rengsdorf, D) gefiltert in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen (Greiner Bio-One GmbH) überführt und so von größeren Zellrückständen befreit. Es folgte die Zentrifugation bei 500 g und 4 °C für 5 Minuten. Nach Absaugen des Überstandes wurde Bronchial epithelial growth medium (BEGM plus Supplement, PromoCell GmbH, Heidelberg, D) hinzugegeben, wobei vorher 5 ml Penicillin-Streptomycin-Lösung auf 500 ml BEGM-Medium beigefügt wurden.

2.4 Zellzählung im Casy-Messgerät

Um die Zellanzahl und Vitalität der isolierten Lymphozyten zu ermitteln, erfolgte eine Zellzählung mithilfe des Zellzählgerätes Casy Innovatis (Innovatis AG, Reutlingen, D). Dafür wurden vor der Messung 50 μl Zellsuspension in einen mit 10 ml Casy-Ton (Innovatis AG) gefüllten Casy-Cup (Cellcountergefäß, Innovatis AG) pipettiert. Die Bestimmung der Zellzahl und Vitalität basiert auf dem Prinzip des Stromausschlussverfahrens. Bei der Messung werden die einzelnen Zellen mit Unterdruck durch eine Messpore gesaugt, der ein elektrisches Niederspannungsfeld (1 Mhz) anliegt. [Schärfe 2004]

Lebende Zellen weisen eine funktionierende Zellmembran auf, welche verhindert, dass das elektrische Signal ins Zellinnere gelangt. Bei toten Zellen hingegen ist die Membranintegrität aufgehoben, der elektrische Impuls durchdringt das Zytoplasma (siehe Abbildung 5). Folglich werden bei der vom Gerät durchgeführten Pulsflächenanalyse verschiedene Zellmatrixgrößen für vitale und avitale Zellen erfasst. [Glauner 2006]

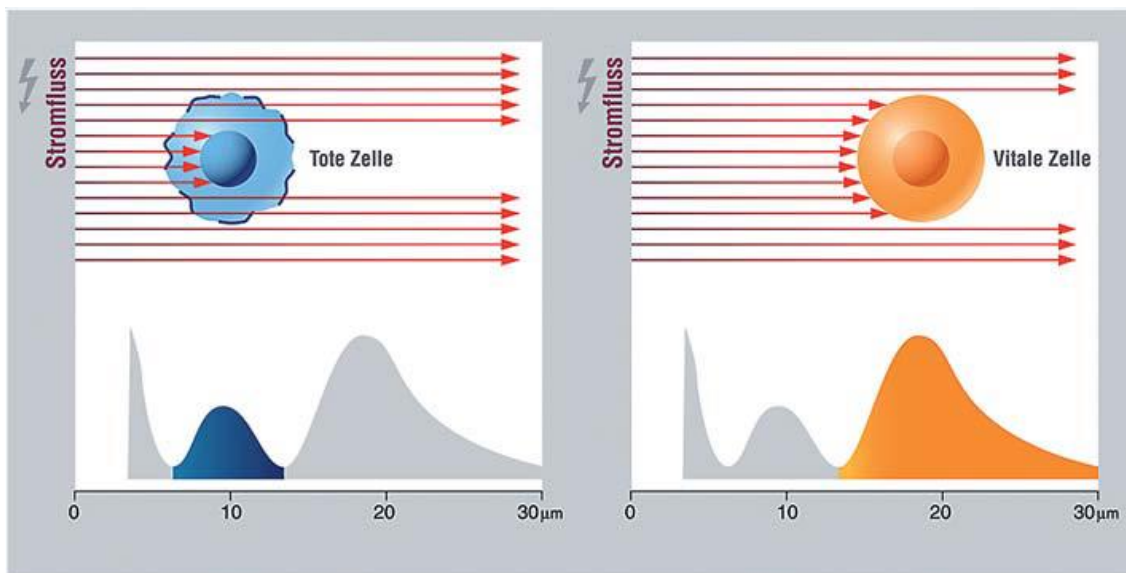


Abbildung 5: Schema des Stromausschlussverfahrens. Lebende Zellen (rechts) schließen den Strom aus und werden als größere Zellen erfasst. Bei toten Zellen (links) gelangt der Strom ins Zytoplasma und die Zellen werden als kleinere Zellen erkannt

[Glauner 2006].

2.5 Schadstoff-Exposition

2.5.1 Verwendete Fremdstoffe

In dieser Dissertationsarbeit wurde beim Comet Assay und der Trypanblau-Färbung mit je 8 verschiedenen Ansätzen gearbeitet. Diese setzen sich zusammen aus einer Negativkontrolle (Medium ohne Fremdstoff), 6 verschiedenen Glycerin-Konzentrationen von 0,001 bis zu 6 mol/l und einer Positivkontrolle.

Als Glycerin wurde 99,5-prozentiges, wasserfreies und zweifach destilliertes Glycerin (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D) verwendet. Weitere Informationen zum Glycerin sind Kapitel 1.2 zu entnehmen.

Für die Positivkontrolle bei Comet-Assay und Trypanblau-Färbung wurde Methylmethansulfonat (MMS, Sigma-Aldrich) verwendet. MMS entfaltet seine genotoxische Wirkung durch Alkylierung der DNA. Über den Mechanismus der nucleophilen Substitution (S_N2) entsteht in 83% der Fälle N⁷-Methylguanin und in 11% N³-Methyladenin [Beranek 1990]. In Vorversuchen stellten sich bei einer Konzentration von 200 μ M bei einstündiger Exposition ideale Schädigungsmuster dar.

Bei den Mikrokern-Tests wurde das zytotoxische Antibiotikum Mitomycin C (MMC, AppliChem GmbH, Darmstadt, D) als Positivkontrolle eingesetzt. Nach metabolischer Aktivierung entsteht ein mono- und bifunktionelles Alkylans, welches irreversibel DNA-Stränge verknüpft und Strangbrüche induziert [Endres 2003; Paz et al. 1999]. Eine Konzentration von 1 μ g/ml MMC wurde in Vorversuchen festgelegt.

2.5.2 Erstellen der Ansätze

Die isolierten Lymphozyten bzw. Nasenschleimhautzellen wurden auf je 8 Ansätze einer Zellkulturplatte (24-Well-Format, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, D) aufgeteilt. In Vorversuchen erwies sich eine Zellzahl von 200.000 Lymphozyten pro Ansatz methodisch als ideal. Zur entsprechenden Aufteilung der Zellen wurde zunächst die Zellanzahl in 10 ml Ausgangsmedium bestimmt.

Mittels Dreisatz-Rechnung konnte das benötigte Volumen bestimmt werden, in dem sich 1,6 Mio. Lymphozyten für die 8 Ansätze befinden sollten:

$$\text{gesuchtes Volumen} = \text{Ausgangsvolumen} \times \frac{\text{gewünschte Zellzahl}}{\text{ursprüngliche Zellzahl}}$$

Es wurde das berechnete Volumen in ein neues Zentrifugen-Röhrchen pipettiert, dieses dann bei 285 g für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und 8 ml neues RPMI-Medium hinzupipettiert. Nach Resuspendierung wurden je 1 ml in einen Well der 24 Wellplatte gegeben. Alle isolierten Nasenschleimhautzellen eines Patienten wurden nach mikroskopischer Beurteilung (Lichtmikroskop, Carl Zeiss AG, Oberkochen, D) ohne vorherige Zellzählung in 8 ml BEGM-Medium gelöst und anschließend auch zu je 1 ml auf 8 Wells verteilt.

Für die folgende Expositionsphase wurden für Lymphozyten und Nasenschleimhautzellen jeweils 8 Ansätze erstellt (siehe Tabelle 1). Bei den Lymphozyten wurde als Verdünnungsmedium RPMI, bei den Nasenschleimhautzellen BEGM verwendet. Die Exposition erfolgte dann für 60 Minuten im Brutschrank (Binder GmbH, Tuttlingen, D) bei 37,0 °C und 5% CO₂.

Tabelle 1: Expositionskonzentrationen und -zusammensetzungen

Ansatz	Konzentration des Glycerins	Medium-Volumen in µl	Glycerin-Volumen in µl
1	Negativkontrolle	2000	0
2	0,001 mol/l	2000	0,147
3	0,01 mol/l	2000	1,47
4	0,1 mol/l	1985,3	14,7
5	1,0 mol/l	1853	147
6	3,0 mol/l	1559	440,9
7	6,0 mol/l	1118,3	881,9
8	Positivkontrolle (200 µM MMS)	2000	0

2.6 Trypanblau-Ausschlusstest

Der Trypanblau-Ausschlusstest wurde nach der einstündigen Exposition von Lymphozyten und Nasenschleimhautzellen zur Vitalitätsbestimmung bei den verschiedenen Konzentrationen angewandt. Ziel dieser Methode ist es, anhand der ermittelten Vitalitäten, Rückschlüsse auf mögliche zytotoxische Effekte des Fremdstoffs zu ziehen. Gleichermäßen hat auch der Comet-Assay nur bei hinreichender Vitalität der verwendeten Zellen eine adäquate Aussagekraft.

Für die Trypanblau-Färbung wurde eine Neubauer-Zählkammer (Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, D) verwendet. Auf dieser liegen 2 Zählkammern mit je 4 großen Kästchen, welche sich wiederum in je 16 kleine Quadrate unterteilen lassen. Es wurden zunächst zu 10 µl Zellsuspension ebenfalls 10 µl 0,4%-Trypanblau (Trypan 0,4% Blue Solution, Sigma-Aldrich) gegeben. Aus diesem Gemisch wurden 10 µl in eine Zählkammer pipettiert.

Der anionische Farbstoff Trypanblau kann die Membran vitaler Zellen nicht passieren und diese daher nicht anfärben. Bei apoptotischen oder nekrotischen

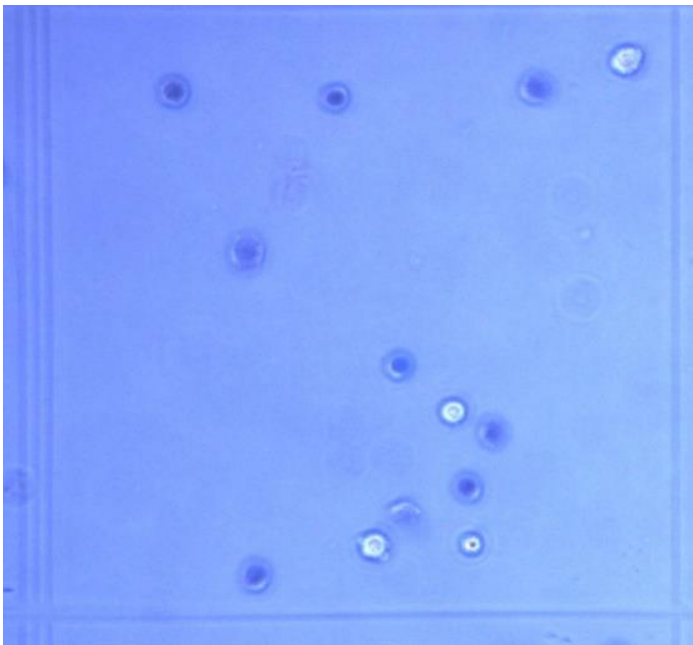


Abbildung 6: Trypanblau-Färbung von Lymphozyten bei 3,0 mol/l Glycerin. Bei den weißen Zellen handelt es sich um lebendige, bei den blau angefärbten um tote Zellen.

Zellen ist die Integrität der Zellmembran aufgehoben, der Farbstoff kann ins Zytoplasma diffundieren und färbt die avitalen Zellen folglich blau (siehe Abbildung 6). Lichtmikroskopisch wurde die Anzahl der vitalen, ungefärbten Zellen sowie der avitalen, blauen Zellen gezählt. Die Vitalität ergibt sich aus dem Quotienten von vitalen Zellen und der Gesamtzellanzahl.

2.7 Einzelzellgelelektrophorese

2.7.1 Grundlagen

Die auch als Comet Assay bekannte Einzelzellgelelektrophorese stellt eine etablierte und gängige Screeningmethode zur Erfassung von Fremdstoff-induzierten DNA-Schäden dar. Die Methode geht ursprünglich auf Ostling und Johanson zurück, die mit einer pH-neutralen Variante des Comet Assays zunächst nur Doppelstrangbrüche der DNA beurteilen konnten [Ostling und Johanson 1984]. Singh und Kollegen etablierten 1988 die alkalische Einzelzellgelelektrophorese, bei der die Denaturierung und Elektrophorese unter stark alkalischen Bedingungen ($\text{pH} > 13$) durchgeführt wurden [Singh et al. 1988]. Diese basischen Bedingungen ermöglichen nun neben den Doppelstrangbrüchen auch die Berücksichtigung von Einzelstrangbrüchen, alkalilabilen Stellen, DNA-Vernetzungen im Sinne von DNA-DNA- und DNA-Protein-Addukten sowie von Stellen unvollständiger Exzisionsreparatur [Tice et al. 2000].

Zur Durchführung des Comet Assays werden die zuvor isolierten und exponierten Zellen auf mit Agarose beschichteten Objektträgern aufgetragen und die Zellmembranen in einem alkalischen Lysepuffer aufgelöst. Der ebenfalls alkalische Elektrophoresepuffer bewirkt anschließend die Entspiralisierung der DNA sowie die Auftrennung des DNA-Doppelstrangs in Einzelstränge. Bei der folgenden Gelelektrophorese wird die negativ-geladene DNA von der Anode angezogen. Während große DNA-Stränge kaum bis gar nicht im elektrischen Feld wandern, weisen kleinere DNA-Fragmente eine Migration zur Anode auf, welche sich nach der DNA-Färbung bei der mikroskopischen Auswertung als Bild eines Kometenschweifes darstellen kann. Die Länge und Dichte des Schweifes korrelieren dabei mit dem Schädigungsausmaß des Erbmaterials.

2.7.2 Puffer und Lösungen

Zur Durchführung des Comet Assays wurden folgende Puffer und Lösungen angesetzt:

- NaOH (5 M): Es wurden 200 g Natrium-Hydroxid-Plätzchen (NaOH, Merck KGaA) mit zweifach destilliertem Wasser (Aqua bidestillata) auf 950 ml aufgefüllt. Nach Lösen der Plätzchen erfolgte die Auffüllung mit Aqua bidestillata auf 1 l.
- EDTA-Stammlösung (0,2 M): Es wurden 14,89 g Ethylendiamintetraacetat (EDTA, Sigma-Aldrich) mit Aqua bidestillata auf 180 ml aufgefüllt. Mit Hilfe von NaOH wurde ein pH-Wert von 10,0 eingestellt, die Lösung anschließend mit Aqua bidestillata auf 200 ml aufgefüllt. Nach Autoklavierung (SHP Steriltechnik AG, Magdeburg, D) erfolgte die lichtgeschützte Lagerung bei Raumtemperatur.
- Lysepuffer: Es wurden 67 ml N-Lauroylsarcosin-Natriumsalz (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, D), 292,8 g Natriumchlorid (NaCl, Merck KGaA), 2,4 g Trishydroxymethylaminomethan (TRIS, Merck KGaA) und 74,4 g EDTA gemischt und in 1,8 l Aqua bidestillata gelöst. Durch Zugabe von NaOH-Plätzchen und 5 M NaOH wurde der pH-Wert auf 10,0 eingestellt, ehe die Lösung mit Aqua bidestillata auf 2 l aufgefüllt wurde.
- TRIS-Neutralisationspuffer (0,4 M): Es wurden 97 g TRIS mit Aqua bidestillata auf 1950 ml aufgefüllt. Mit Hilfe von 10 M Salzsäure (HCL, Merck KGaA) wurde ein pH-Wert von 7,5 eingestellt, die Lösung dann mit Aqua bidestillata auf 2 l aufgefüllt. Es folgte das Abfüllen in 1 l-Glasflaschen, die Autoklavierung und die Lagerung bei Raumtemperatur.
- Lyselösung: Die Lyselösung wurde immer frisch angesetzt und anschließend im Kühlschrank gelagert. Es wurden 0,75 ml Triton X-100 (Sigma-Aldrich), 7,5 ml Dimethyl-sulfoxid (99,5% DMSO, Sigma-Aldrich) und 66,75 ml Lysepuffer gemischt.
- Elektrophorese-Puffer: Der Elektrophorese-Puffer wurde immer frisch angesetzt und anschließend im Kühlschrank gelagert. Es wurden 120 ml 5 M NaOH und 10 ml EDTA-0,2-Stammlösung gemischt und diese Lösung mit Aqua bidestillata auf 2 l aufgefüllt.
- Agaroselösung Typ 1 für Objektträger: Es wurden 1,5 g Normal-Melting-Temperature-Agarose (1,5% NMP-Agarose Typ 1, Carl Roth GmbH + Co. KG) in 100 ml PBS aufgeköcht.

- Agaroselösung Typ 2 für Zellen: 50 mg Low-Melting-Temperature-Agarose (0,5% LMP-Agarose Typ 2, Sigma-Aldrich) wurden in 10 ml PBS gelöst und erwärmt.
- GelRed-Farbstoff: Es wurden 10 µl GelRed (GelRed Nucleic Acid Gel Stain, Biotium Inc., Fremont, US) und 990 µl Aqua bidestillata in einem ersten Ansatz vermischt. In einem zweiten Ansatz wurden 2,5 g DABCO (1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan, Carl Roth GmbH + Co. KG), 25 ml PBS und 75 ml Glycerin (>99,5%, Carl Roth GmbH + Co. KG) vermischt und gelöst. Zu dem ersten Ansatz wurden nun 3 ml des zweiten Ansatzes gegeben.

2.7.3 Durchführung

Zunächst erfolgte die Beschichtung der Objektträger mit Agaroselösung 1. Dazu wurden seitlich mattierte Objektträger (76x26 mm, R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen, D) in die aufgekochte Agaroselösung 1 getaucht und nach Reinigung der Objektträger-Rückseite anschließend über Nacht getrocknet. Die frisch beschichteten Objektträger konnten lichtgeschützt bis zu einem Monat gelagert und verwendet werden.

Nach frischem Ansetzen des Lysepuffers und des Elektrophoresepuffers, wurden die zuvor einstündig exponierten Zellen geerntet: Dazu wurden die einzelnen Ansätze in je frische 2 ml-Reaktionsgefäße (Sarstedt AG & Co) pipettiert, diese bei 250 g für 5 min zentrifugiert und die Überstände bis auf 50 µl pro Ansatz abgesaugt, so dass nach gründlichem Resuspendieren hoch konzentrierte Zellsuspensionen vorlagen. Nun wurden pro Ansatz in einem Reaktionsgefäß 180 µl der vorher aufgekochten und im Wasserbad gewärmten Agaroselösung 2 mit 20 µl der resuspendierten Zellsuspension vermischt. Aus jenem Gemisch wurden dann jeweils 60 µl auf 2 beschichtete Objektträger pro Ansatz aufgetragen und mit einem Deckglas (24x32 mm, Paul Marienfeld GmbH & Co. KG) bedeckt. Pro Versuch lagen also 16 Objektträger mit Lymphozyten und 16 Objektträger mit Nasenschleimhautzellen vor, welche zur Verblindung mit unterschiedlichen Ziffern versehen wurden. Das Deckglas wurde nach 3-5 Minuten entfernt und die Objektträger in einer mit Lysepuffer gefüllten Glas-Küvette für mindestens eine Stunde lichtgeschützt im Kühlschrank gelagert.

Nach der Lyse-Phase wurden die Objektträger in eine Elektrophoresekammer (Renner GmbH, Dannstadt, D) gelegt, welche sich wiederum in einer mit Eis gefüllten Wanne befand. Zunächst wurden 1,8 l des Elektrophoresepuffers in die Kammer gegeben, so dass die Objektträger leicht mit Puffer bedeckt waren. Nach Auffüllen der freien Plätze der Kammer mit leeren Objektträgern erfolgte eine 20-minütige lichtgeschützte Inkubationszeit der Objektträger im alkalischen Elektrophoresepuffer zur Entwindung und Trennung der DNA-Doppelstränge. Erst dann wurde das Elektrophoresenetzgerät (EV202, Consort BVBA, Turnhout, Be) eingeschaltet und die eigentliche Elektrophorese bei einer Spannung von 25 V für wiederum 20 min durchgeführt. Die Stromstärke wurde über die Zugabe von zusätzlichem Elektrophoresepuffer auf 300 mA feinreguliert. Nach dem Abtropfen der Objektträger wurden diese für 5 min in eine Küvette mit TRIS-Neutralisationspuffer gegeben. Im Anschluss an diese Neutralisation wurden die Objektträger kurz in eine Küvette mit PBS getaucht und dann direkt für 8 min in einer Küvette mit -20 °C kaltem Methanol (Sigma-Aldrich) gelagert. Daraufhin erfolgte die Trocknung und Lagerung der Objektträger für maximal eine Woche. Vor der Auswertung wurden auf die Objektträger je 20 µl der GelRed-Färbelösung pipettiert und diese mit einem Deckglas bedeckt.

2.7.4 Auswertung

Die Auswertung des Comet Assays erfolgte am Fluoreszenzmikroskop (Leica DM4000B, Leica Microsystems, Wetzlar, D) bei 400-facher Vergrößerung mit Hilfe der Software Comet 5.5 (Kinetic Imaging, Liverpool, GB). Pro Ansatz wurden auf zwei Objektträgern computerassistent je 50 Zellen ausgezählt. Bei geschädigten Kernen mit starker DNA-Fragmentierung zeigte sich das Bild eines



Abbildung 7: Lymphozytenkerne im Comet Assay: Links Negativkontrolle ohne erkennbaren Schweif, Mitte: Lymphozytenkern bei 1,0 mol/l Glycerin mit leichter Schädigung: Rechts: Positivkontrolle (200 µM MMS) mit prominentem Schweif.

Kometen mit Schweif (siehe rechter Kern in Abbildung 7). Im Kopf des Kometen fanden sich die unfragmentierten Teile der DNA wieder, während die fragmentierten DNA-Bestandteile im elektrischen Feld weiterwanderten und so das Bild eines Schweifes erzeugten. Bei hohem Schädigungsausmaß wurden die DNA-Fragmente kleiner, wanderten weiter Richtung Anode und es entstand ein größerer Schweif. Zur Quantifizierung der beschriebenen Effekte wurden folgende Parameter ermittelt und deren arithmetische Mittelwerte berechnet:

- <i>Tail-Length:</i>	Länge des DNA-Schweifes
- <i>Tail-DNA:</i>	Anteil der DNA im Schweif
- <i>Olive Tail Moment:</i>	Dimensionslos angegebenes Maß der DNA-Schädigung, welches sich aus dem Produkt von Schweiflänge und dem Anteil der Tail-DNA an der Gesamt-DNA bildet.

2.8 Mikrokern-Test

2.8.1 Grundlagen

Der Mikrokern-Test ist ein etabliertes Verfahren zur Beurteilung genotoxischer Effekte von Fremdstoffen. Boller und Schmid entwickelten 1970 erstmals den Mikrokern-Test als *in vivo*-Methode an Knochenmarks- und peripheren Blutzellen des chinesischen Hamsters [Boller und Schmid 1970]. Countryman und Heddle etablierten in der Folge dessen *in vitro*-Anwendung für humane Lymphozyten als Zielzellen [Countryman und Heddle 1976]. Die weit verbreitete, und auch hier angewandte Variante des Mikrokern-Tests mit Cytochalasin B zur Inhibierung der Zytokinese, geht letztlich auf Fenech und Morley im Jahr 1985 zurück [Fenech und Morley 1985]. Der Mikrokern-Test erlaubt einerseits die Beurteilung klastogener, d. h. strangbrechender, und aneugener, d. h. eine Veränderung der Chromosomenzahl in Tochterzellen betreffender, Effekte. Andererseits ist auch das Einsehen von Zellereignissen wie Mitosen, Apoptosen oder Nekrosen möglich. Somit ist durch

den Mikrokern-Test eine deutliche Erweiterung der durch den Comet Assay bereits erfassten genotoxischen Endpunkte gegeben. Ein vermehrtes Auftreten von Mikrokernen korreliert hierbei mit steigendem Risiko für Krebsentstehung [Fenech et al. 1999].

Grundsätzlich ist die Durchführung des Mikrokern-Tests mit epithelialen Zellen zwar möglich, wissenschaftlich hat sich jedoch insbesondere die Anwendung des Mikrokern-Tests mit Lymphozyten etabliert [Fenech et al. 1999]. Für eine aussagekräftige Anwendung des Mikrokern-Tests bei nasalen Mukosazellen werden zunächst standardisierte Protokolle gefordert [Knasmueller et al. 2011], so dass hier die Mikrokern-Untersuchungen lediglich mit Lymphozyten durchgeführt wurden.

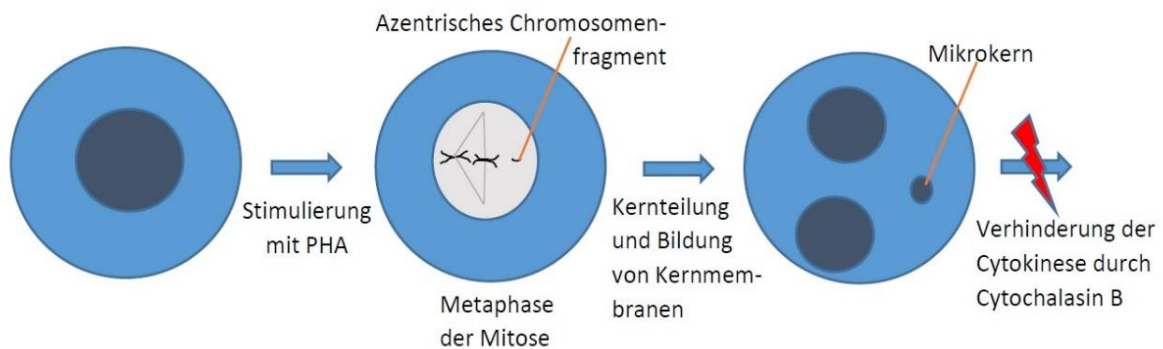


Abbildung 8: Schema der Mikrokern-Entstehung

Für den Mikrokern-Test werden die Lymphozyten zunächst mit dem Mitogen Phytohämagglutinin (PHA) zur Teilung stimuliert. Während es zur Teilung des Zellkerns kommt, verhindert die Zugabe von Cytochalasin B jedoch die Zellkörperteilung, so dass eine doppelkernige Zelle resultiert. Werden in der Metaphase der Mitose Chromosomen oder Chromosomenbruchstücke nicht vom Spindelapparat erfasst, so können diese in der Anaphase nicht zu einem der beiden Spindelpole gezogen werden. Die zurückbleibenden Chromatinstrukturen kondensieren und werden von einer eigenen Kernmembran umgeben. In diesem Falle spricht man vom Vorliegen sog. „Mikrokerne“ neben den beiden Hauptkernen (siehe Abbildung 8). Nach DNA-Färbung können diese ausgezählt werden, wobei die Frequenz ihres Auftretens mit dem klasto- und aneugenem Schädigungseinfluss des exponierten Stoffes korreliert [Albertini et al. 2000].

2.8.2 Puffer und Lösungen

Zur Durchführung des Mikrokern-Tests wurden folgende Puffer und Lösungen angesetzt:

- Soerensen-Puffer (pH 6,8): Es wurden 2,92 g Natriumdihydrogenphosphat (Na_2HPO_4 , Merck KGaA) und 2,3 g Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4 , Merck KGaA) in 1 l Aqua bidestillata gelöst. Anschließend erfolgte eine Autoklavierung.
- Phytohämagglutinin-Lösung (PHA, 240 $\mu\text{g}/\text{ml}$): In jedem PHA-Fläschchen (Biochrom GmbH) befinden sich 1,2 g PHA-Pulver. Das Pulver wurde durch Zugabe von 5 ml sterilen Aqua bidestillata gelöst, so dass nun eine PHA-Stammlösung von 240 $\mu\text{g}/\text{ml}$ vorlag.
- Cytochalasin B (1 mg/ml): Es wurden 2 mg Cytochalasin B (Sigma-Aldrich) in 2 ml DMSO gelöst. Die Lagerung erfolgte bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$.
- 0,006% Acridinorange-Färbelösung: Zunächst wurde eine 0,1-% Stammlösung durch Lösen von 100 mg Acridinorange (SERVA Electrophoresis GmbH) in 100 ml Aqua bidestillata hergestellt. Von dieser wurden nun 4,5 ml mit 67,5 ml Sörensenpuffer vermischt.
- Mitomycin C (MMC): Als Positivkontrolle wurde das Zytostatikum MMC (AppliChem GmbH) in einer Dosierung von 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ genutzt.

2.8.3 Durchführung

Nach Darstellung fraglicher genotoxischer Effekte in der Comet-Assay Versuchsreihe, wurde zur Untersuchung auf weitere chromosomale Endpunkte eine neue Patienten-Kohorte ($n = 10$) für eine Mikrokern-Versuchsreihe rekrutiert. Insgesamt wurde beim Mikrokern-Test pro Patient mit folgenden 5 Ansätzen gearbeitet: Negativkontrolle, 0,001 mol/l, 0,1 mol/l, 1,0 mol/l Glycerin sowie einer Positivkontrolle (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ MMC). Pro Ansatz wurden etwa 3,0 Mio. Lymphozyten benötigt.

Es erfolgte zunächst die Isolierung von Lymphozyten aus dem Spender-Vollblut gemäß Kapitel 2.3.1. Nach einer Zellzählung im Casy-Messgerät, wurden je

3,0 Mio. Lymphozyten auf die 5 Ansätze verteilt. Es erfolgte die einstündige Exposition der Lymphozyten in Zentrifugenröhrchen bei 37,0 °C. Im Anschluss wurden die Ansätze bei 285 g für 5 min zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und je Ansatz 4 ml frisches RPMI-Medium hinzugefügt. Es folgte die Überführung der in den 4 ml Medium gelösten Lymphozyten in 50 ml-Kulturflaschen (Greiner Bio-One GmbH). In diese wurden dann je 160 µl PHA-Lösung zugegeben. Die Kulturflaschen wurden nun aufrecht stehend für 42 h im Brutschrank bei 37 °C gelagert, dann wurden pro Ansatz 20 µl Cytochalasin B (1 mg/ml) hinzupipettiert und die Lagerung der Kulturflaschen für weitere 24 h im Brutschrank fortgesetzt. Danach erfolgte das Aufbringen der Zellen auf Objektträger mittels Zytozentrifugation (Cellspin I, Tharmac GmbH, Waldsolms, D) bei 145 g für 5 min. Die Zellen wurden durch Lagerung der Objektträger in -20 °C kaltem Methanol fixiert.

2.8.4 Auswertung

Zur Färbung der Zellen wurden drei Küvetten benötigt. Die erste Küvette wurde mit der angesetzten 0,006% Acridinorange-Färbelösung gefüllt, die anderen beiden jeweils mit Soerensen-Puffer. Die Objektträger wurden für 3 min in die Acridin-Lösung der ersten Küvette zur Färbung der Nukleinsäuren getaucht. Anschließend wurden die Objektträger durch je 5-minütige Lagerung in den Küvetten 2 und 3 von überschüssigem Farbstoff entfärbt, ehe das Zellareal der Objektträger mit Deckgläsern versehen wurde.

Nun folgte die Auswertung am Fluoreszenzmikroskop bei 400-facher Vergrößerung und Blaulicht-Anregung gemäß der von Fenech im Jahr 2007 festgelegten Richtlinien [Fenech 2007]. Dazu wurden in einem ersten Zähl Durchlauf pro Ansatz zunächst 1000 Zellen auf das Vorliegen von je einem, zwei oder mehreren Kernen untersucht. In diesem Durchgang wurden ebenfalls vorliegende Mitosen, Nekrosen oder Apoptosen berücksichtigt. In einem zweiten Durchlauf wurde die Anzahl von Mikrokernen auf 1000 doppelkernige Zellen bestimmt.

2.9 Grafische Darstellung und statistische Verfahren

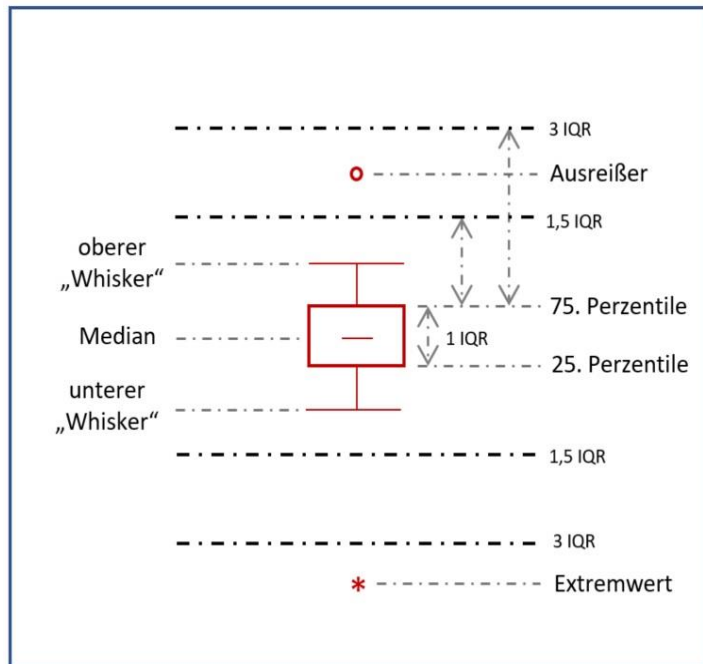


Abbildung 9: Schemazeichnung Boxplot; IQR = die Verteilung einer Interquartilsabstand

darzustellen. In Abbildung 9 ist der Aufbau eines Boxplots schematisch illustriert. Ein Boxplot setzt sich aus einem Kasten, Box, sowie zwei Antennen, Whiskern, zusammen. Die Kastenhöhe wird nach oben durch das 75%-Perzentil und nach unten durch das 25%-Perzentil begrenzt und entspricht somit dem Interquartilsabstand (IQR), innerhalb dessen sich 50% aller Werte befinden. Durch einen horizontalen Strich innerhalb der Box wird der Median markiert. Die Werte außerhalb der Box werden durch die Antennen verkörpert. Dabei wird die Höhe einer Antenne durch den höchsten oder tiefsten Wert vorgegeben, der allerdings max. den 1,5-fachen IQR-Abstand vom jeweiligen Kastenrand haben darf. Werte, die sich zwischen dem 1,5- und 3-fachen IQR vom jeweiligen Kastenrand aus befinden, werden als Ausreißer bezeichnet und sind als Kreis markiert. Extremwerte hingegen liegen sogar mehr als den 3-fachen IQR entfernt und sind sternförmig dargestellt.

Die statistische Auswertung der Versuchsergebnisse erfolgte mithilfe der Softwares STATISTICA 13.0 und GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, Inc.,

Die Ergebnisse dieser
Dissertationsarbeit wurden
unter Nutzung der Statistik-
Software STATISTICA
13.0 (StatSoft GmbH,
Tulsa, US) in Form von
Box-Whisker-Plots, im
Folgenden Boxplots
genannt, veranschaulicht.
Boxplots, auf Deutsch
Kastengrafiken, gehen
zurück auf John W. Tukey
[Tukey 1977] und ermöglichen

die Verteilung einer
Datenmenge übersichtlich

La Jolla, US). Da man angesichts der Anzahl der erhobenen Werte pro Versuch ($n = 10$) nicht von einer Gaußschen Normalverteilung ausgehen kann, wurden die zwei nicht-parametrischen Verfahren Wilcoxon-Test und Friedman-Test angewandt. Für beide Verfahren wird die Nullhypothese so definiert, dass die verglichenen Proben zur selben Grundgesamtheit gehören und zwischen ihnen somit kein Unterschied besteht. Die Alternativhypothese besagt hingegen, dass zwischen den geprüften Proben ein Unterschied besteht. Als Signifikanzniveau wird $\alpha = 0,05$ festgelegt. Dies bedeutet, dass bei einem ermitteltem p-Wert von $< 0,05$ die Nullhypothese verworfen wird und somit von einem signifikanten Unterschied ausgegangen werden kann.

Der Wilcoxon-Test ist ein Verfahren, bei dem zwei verbundene Stichproben auf einen möglichen signifikanten Zusammenhang untersucht werden. Verglichen werden hierbei immer die ermittelten Werte, bspw. Olive Tail Moment, Vitalität oder Anzahl der Mikrokerne, bei einer bestimmten Glycerin-Konzentration mit denen der Ausgangslösung (Medium). Aus den jeweiligen Wertepaaren werden die Differenzen bestimmt und diesen dann in Abhängigkeit von ihrem Betrag ein gewisser Rang zugeordnet. Unterschreiten die ermittelten Rangsummen einen gewissen kritischen Wert, welcher von der Versuchsanzahl n abhängig ist, so kann die Alternativhypothese als richtig angenommen werden.

$$\alpha_1 = \frac{\alpha_{global}}{k}$$

$$\alpha_2 = \frac{\alpha_{global}}{k - 1}$$

$$\alpha_3 = \frac{\alpha_{global}}{k - 2}$$

$$\dots$$

$$\alpha_k = \frac{\alpha_{global}}{k - k + 1} = \alpha_{global}$$

Da beim Wilcoxon-Test jeweils nur zwei Stichproben miteinander verglichen werden können, müssen folglich mehrere Tests pro Datensatz durchgeführt werden. Dies birgt die Gefahr, dass es zu einer Kumulierung des α -Fehlers kommen kann. Durch eine Korrektur des Signifikanzniveaus nach Bonferroni-Holm wurde jene Kumulierung bei den Wilcoxon-Tests ausgeglichen. Bei diesem

Verfahren wird jedem einzelnen Test ein lokales α -Niveau zugeordnet, so dass

für den gesamten Datensatz keine Überschreitung des globalen Signifikanzniveaus von $\alpha_{\text{global}} = 0,05$ erfolgt. Zunächst werden die im Wilcoxon-Test ermittelten p-Werte ihrer Größe nach aufsteigend sortiert. Nun wird in dieser Reihenfolge jeder p-Wert mit einem berechneten lokalen α -Niveau verglichen: der kleinste p-Wert p_1 mit dem kleinsten lokalen α -Niveau α_1 , usw. Die einzelnen lokalen α -Niveaus ergeben sich dabei aus den im Kasten aufgeführten Formeln. Dabei entspricht k der Anzahl der mit der Negativkontrolle verglichenen Proben und somit auch der Anzahl der durchgeführten Wilcoxon-Tests.

Der Friedman-Test ist ein Verfahren, mit dem mehr als zwei verbundene Stichproben miteinander verglichen werden können. Er ermöglicht somit die Beurteilung, ob sich die Verteilung der erhobenen Werte in den verschiedenen Gruppen bzw. Konzentrationen unterscheidet oder nicht. Rückschlüsse, bei welchen Konzentrationen diese Unterschiede auftreten, sind nicht möglich. Auch dieser Test funktioniert nach den Prinzipien der Rangzuordnung und der Rangsummenbildung. Aus den Rangsummen lässt sich gemäß der von Friedman entwickelten Formel eine Prüfgröße berechnen, welche zur Signifikanzprüfung wiederum mit einem festgelegten kritischen Wert verglichen werden muss.

3. Ergebnisse

In diesem Teil der Arbeit sind die Ergebnisse der durchgeführten Versuche (siehe 2.1) sowie deren statistische Auswertung aufgeführt.

Die Ergebnisse werden in Form von Boxplots-Diagrammen veranschaulicht, die dazugehörigen p-Werte des Wilcoxon- und Friedman-Tests werden tabellarisch dargestellt. Im Anhang finden sich die ausführlichen Wertetabellen (siehe 6.3).

3.1 Ergebnisse des Trypanblau-Ausschlusstests

3.1.1 Trypanblau-Ausschlusstest bei Nasenschleimhautzellen

Der Trypanblau-Ausschlusstest wurde angewandt, um Rückschlüsse auf mögliche zytotoxische Effekte durch die Glycerin-Exposition zu ziehen. In Abbildung 10 werden die ermittelten Vitalitäten bei Nasenschleimhautzellen dargestellt. Bei der Negativkontrolle sowie den niedrigen Glycerin-Konzentrationen (0,001 mol/l, 0,01 mol/l, 0,1 mol/l) lagen die Vitalitätswerte auf einem Plateau, die entsprechenden Mediane betragen zwischen 96-98%. Bei der Glycerin-Konzentration von 1,0 mol/l ergab sich ein Median von 94,25%, ehe bei den höheren Konzentrationen von 3,0 mol/l bzw. 6,0 mol/l eine Abnahme der Vitalitäts-Mediane auf 87,2% bzw. 73,25% zu beobachten war. Dementsprechend wurde im Friedman-Test (siehe Tabelle 2) nachgewiesen, dass sich die Werteverteilungen der einzelnen Stichproben unterscheiden. Betrachtet man nun die einzelnen Stichproben, so konnten im Wilcoxon-Test (siehe Tabelle 3) für die Glycerin-Konzentrationen 1,0 mol/l, 3,0 mol/l und 6,0 mol/l Unterschiede zur Negativkontrolle nachgewiesen werden. Für die restlichen Glycerin-Konzentrationen sowie die Positivkontrolle mit Methylmethansulfonat (MMS) wurde hingegen die Nullhypothese angenommen.

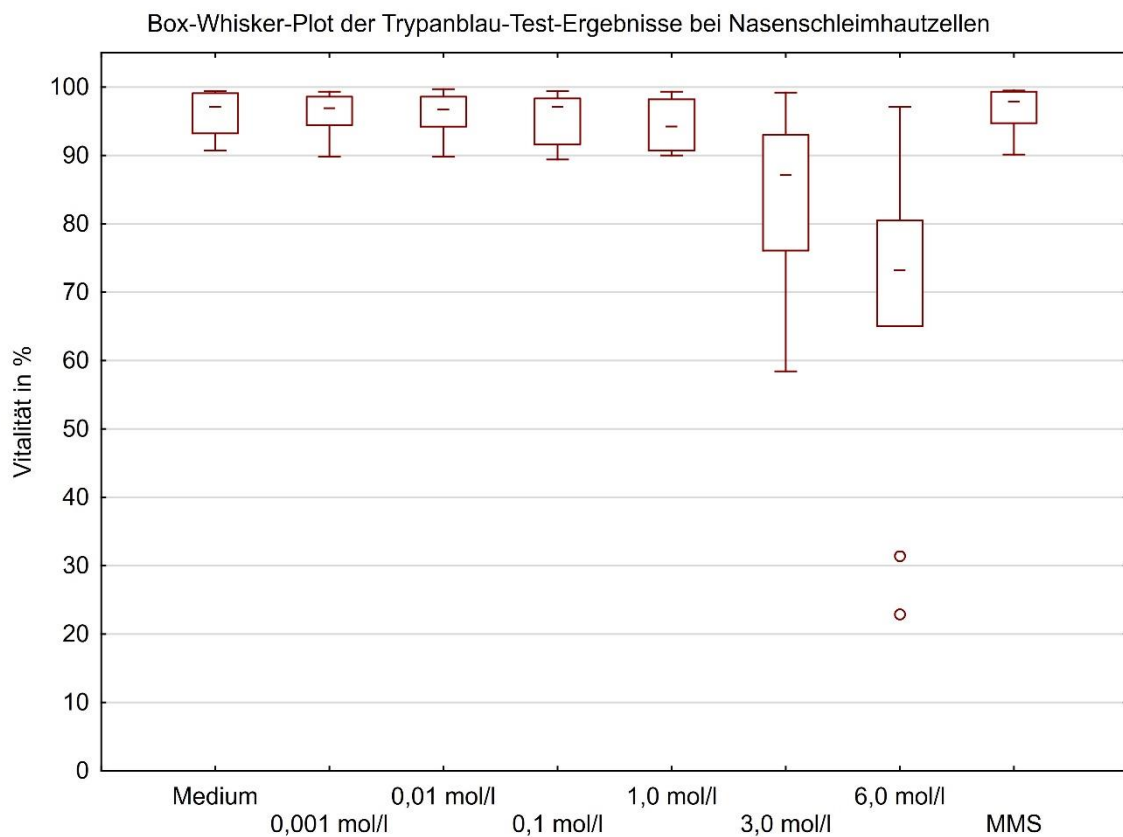


Abbildung 10: Darstellung der Ergebnisse des Trypanblau-Ausschlusstests bei Nasenschleimhautzellen nach einstündiger Exposition mit Glycerin in Form eines Boxplot-Diagramms. Medium entspricht der Negativkontrolle, MMS der Positivkontrolle

Tabelle 2: Friedman-Test der Ergebnisse des Trypanblau-Ausschlusstests bei Nasenschleimhautzellen (=NSH)

Friedman-Test	p-Wert	Signifikanzniveau	Signifikanz
Trypanblau-Test bei NSH	<0,0001	0,05	ja

Tabelle 3: Wilcoxon-Test der Ergebnisse des Trypanblau-Ausschlusstests bei Nasenschleimhautzellen; Globales Signifikanzniveau = 0,05

Wilcoxon-Test	p-Wert	Lokales α -Niveau	Signifikanz
0,001 mol/l vs. Negativkontrolle	0,7223	0,0500	nein
0,01 mol/l vs. Negativkontrolle	0,2845	0,0167	nein
0,1 mol/l vs. Negativkontrolle	0,2026	0,0125	nein
1,0 mol/l vs. Negativkontrolle	0,0069	0,0083	ja
3,0 mol/l vs. Negativkontrolle	0,0077	0,0100	ja
6,0 mol/l vs. Negativkontrolle	0,0051	0,0071	ja
Positivkontrolle vs. Negativkontrolle	0,3590	0,0250	nein

3.1.2 Trypanblau-Ausschlusstest bei Lymphozyten

Die Ergebnisse des Trypanblau-Ausschlusstests bei Lymphozyten werden in Abbildung 11 veranschaulicht. Die Vitalitäten bei der Negativkontrolle und den Glycerin-Konzentrationen 0,001 mol/l, 0,01 mol/l und 0,1 mol/l lagen immer über 95%. Bei der Glycerin-Konzentration von 1,0 mol/l war bei den Lymphozyten ein erster Abfall des Medians und Mittelwerts zu erkennen. Die Vitalitäten betragen hierbei, abgesehen von zwei Ausreißer-Werten, jedoch mehr als 95%. Ebenso konnten Vitalitäts-Abnahmen bei den beiden höchsten Konzentrationen beobachtet werden: Während bei 3,0 mol/l noch ein Median von 68,9% vorlag, fiel der Median bei 6,0 mol/l auf 7,95% ab. Die Positivkontrolle mit 200 µM MMS erreichte bei einem Median von 99,05% wiederum sehr hohe Vitalitätswerte.

Der Friedman-Test (siehe Tabelle 4) zeigte Unterschiede in den Werteverteilungen zwischen den einzelnen Konzentrationen.

Es ließen sich im Wilcoxon-Test (siehe Tabelle 5) für die Konzentrationen 1,0 mol/l, 3,0 mol/l sowie 6,0 mol/l Unterschiede gegenüber der Negativkontrolle nachweisen. Für alle anderen Glycerin-Konzentrationen sowie die Positivkontrolle lagen im Wilcoxon-Test keine signifikanten p-Werte vor.

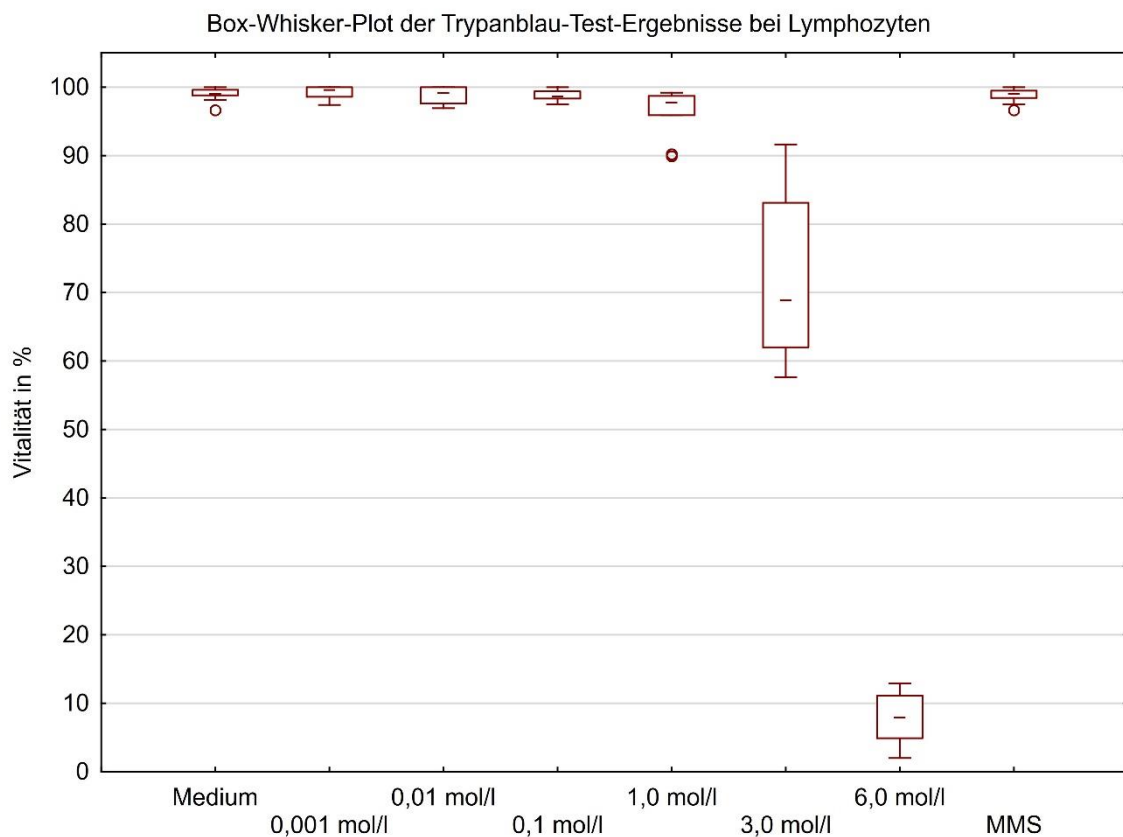


Abbildung 11: Darstellung der Ergebnisse des Trypanblau-Ausschlusstests bei Lymphozyten nach einstündiger Exposition mit Glycerin in Form eines Boxplot-Diagramms. Medium entspricht der Negativkontrolle, MMS der Positivkontrolle

Tabelle 4: Friedman-Test der Ergebnisse des Trypanblau-Ausschlusstests bei Lymphozyten

Friedman-Test	p-Wert	Signifikanzniveau	Signifikanz
Trypanblau bei Lymphozyten	<0,0001	0,05	ja

Tabelle 5: Wilcoxon-Test der Ergebnisse des Trypanblau-Ausschlusstests bei Lymphozyten; Globales Signifikanzniveau = 0,05

Wilcoxon-Test	p-Wert	Lokales α -Niveau	Signifikanz
0,001 mol/l vs. Negativkontrolle	0,3743	0,0125	nein
0,01 mol/l vs. Negativkontrolle	0,7263	0,0500	nein
0,1 mol/l vs. Negativkontrolle	0,5076	0,0250	nein
1,0 mol/l vs. Negativkontrolle	0,0051	0,0071	ja
3,0 mol/l vs. Negativkontrolle	0,0051	0,0083	ja
6,0 mol/l vs. Negativkontrolle	0,0051	0,0100	ja
Positivkontrolle vs. Negativkontrolle	0,4755	0,0167	nein

3.2 Ergebnisse der Einzelzellgelelektrophorese

Anhand der Einzelzellgelelektrophorese sollen Rückschlüsse auf mögliche genotoxische Effekte ermöglicht werden. Dazu wurden in den folgenden Grafiken und Diagrammen die dimensionslosen Olive Tail Moment (OTM) -Werte berücksichtigt, die OTM-Werte sowie die Tail-Length- und Tail-DNA-Werte sind den Tabellen im Daten-Anhang zu entnehmen (siehe 6.3).

3.2.1 Einzelzellgelelektrophorese bei Nasenschleimhautzellen

In Abbildung 12 sind die Ergebnisse des Comet Assays bei Nasenschleimhautzellen grafisch aufgetragen. Auch hier belegt der Friedman-Test (siehe Tabelle 6) Unterschiede in der Werteverteilung zwischen den verschiedenen Glycerin-Konzentrationen. Die Glycerin-Konzentrationen von 0,001 mol/l und 0,01 mol/l lagen mit ihren Medianen von 0,8 und 0,79 im Bereich der Negativkontrolle (Median: 0,68). Bei der Konzentration von 0,1 mol/l erfolgte ein Werteanstieg, der mit einem p-Wert von $p = 0,0367$ im Wilcoxon-Test (siehe Tabelle 7) bei einem lokalen Signifikanzniveau von $\alpha = 0,0167$ nicht als signifikant einzustufen ist. Deutlicher manifestierte sich die Wertzunahme bei 1,0 mol/l mit einem Median von 3,66, ehe bei den noch höheren Konzentrationen von 3,0 mol/l und 6,0 mol/l Mediane und Mittelwerte über 10 erreicht wurden. Dabei war der Median bei 3,0 mol/l geringer als der bei 6,0 mol/l (10,7 im Vgl. zu 10,84), der Mittelwert bei 6,0 mol/l hingegen mit 13,13 höher als 10,21 bei 3,0 mol/l. Die Positivkontrolle lag bei einem Median von 12,34 und einem Mittelwert von 13,38. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde die Skalierung des OTM's auf der Ordinatenachse bis 20 limitiert. Die obere Antenne der Positivkontrolle, welche folglich in der Boxplot-Darstellung abgeschnitten ist, beträgt 24,78. Mit p-Werten von jeweils $p = 0,0051$ im Wilcoxon-Test konnten für die Konzentrationen 1,0 mol/l, 3,0 mol/l, 6,0 mol/l sowie für die Positivkontrolle ein signifikanter Unterschied zur Negativkontrolle nachgewiesen werden.

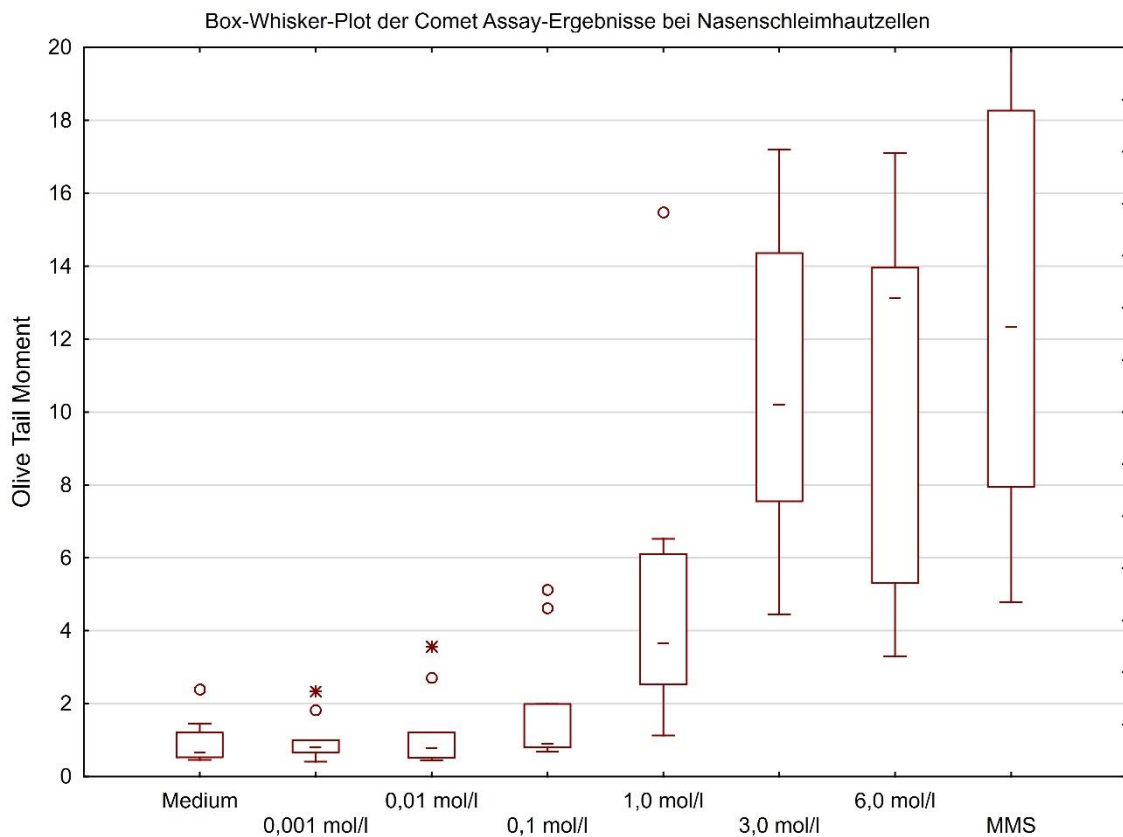


Abbildung 12: Darstellung der Ergebnisse des Comet Assays bei Nasenschleimhautzellen nach einstündiger Exposition mit Glycerin in Form eines Boxplot-Diagramms. Medium entspricht der Negativkontrolle, MMS der Positivkontrolle

Tabelle 6: Friedman-Test der Ergebnisse des Comet Assays bei Nasenschleimhautzellen (=NSH)

Friedman-Test	p-Wert	Signifikanzniveau	Signifikanz
Comet Assay bei NSH	<0,0001	0,05	ja

Tabelle 7: Wilcoxon-Test der Olive Tail Moment-Ergebnisse des Comet Assays bei Nasenschleimhautzellen; Globales Signifikanzniveau = 0,05

Wilcoxon-Test	p-Wert	Lokales α -Niveau	Signifikanz
0,001 mol/l vs. Negativkontrolle	0,8785	0,0500	nein
0,01 mol/l vs. Negativkontrolle	0,3863	0,0250	nein
0,1 mol/l vs. Negativkontrolle	0,0367	0,0167	nein
1,0 mol/l vs. Negativkontrolle	0,0051	0,0071	ja
3,0 mol/l vs. Negativkontrolle	0,0051	0,0083	ja
6,0 mol/l vs. Negativkontrolle	0,0051	0,0100	ja
Positivkontrolle vs. Negativkontrolle	0,0051	0,0125	ja

3.2.2 Einzelzellgelelektrophorese bei Lymphozyten

Eine Veranschaulichung der Ergebnisse des Comet Assays bei Lymphozyten findet sich in Abbildung 13. Die ermittelten OTM-Werte der Negativkontrolle sowie der Glycerin-Konzentrationen 0,001 mol/l, 0,01 mol/l und 0,1 mol/l präsentierten sich auf einem Plateau mit Medianen zwischen 0,36 und 0,49. Bei den mit 1,0 mol/l Glycerin exponierten Lymphozyten kam es zunächst zu einem leichten Werteanstieg (Median: 1,43), ehe bei den Konzentrationen 3,0 mol/l und 6,0 mol/l weitere Zunahmen des OTM's zu beobachten waren. Hierbei war der Median bei 3,0 mol/l mit 6,43 größer als die Mediane bei 6,0 mol/l mit 6,1 sowie bei der Positivkontrolle mit 3,72. Der Friedman-Test (siehe Tabelle 8) ließ auch hier auf unterschiedliche Werteverteilungsmuster zwischen den verschiedenen Konzentrationsansätzen schließen. Während für die Konzentrationen 0,001 mol/l, 0,01 mol/l und 0,1 mol/l im Wilcoxon-Test (siehe Tabelle 9) die Nullhypothese angenommen wurde, unterschieden sich die Konzentrationen 1,0 mol/l, 3,0 mol/l und 6,0 mol/l sowie die Positivkontrolle signifikant von der Negativkontrolle.

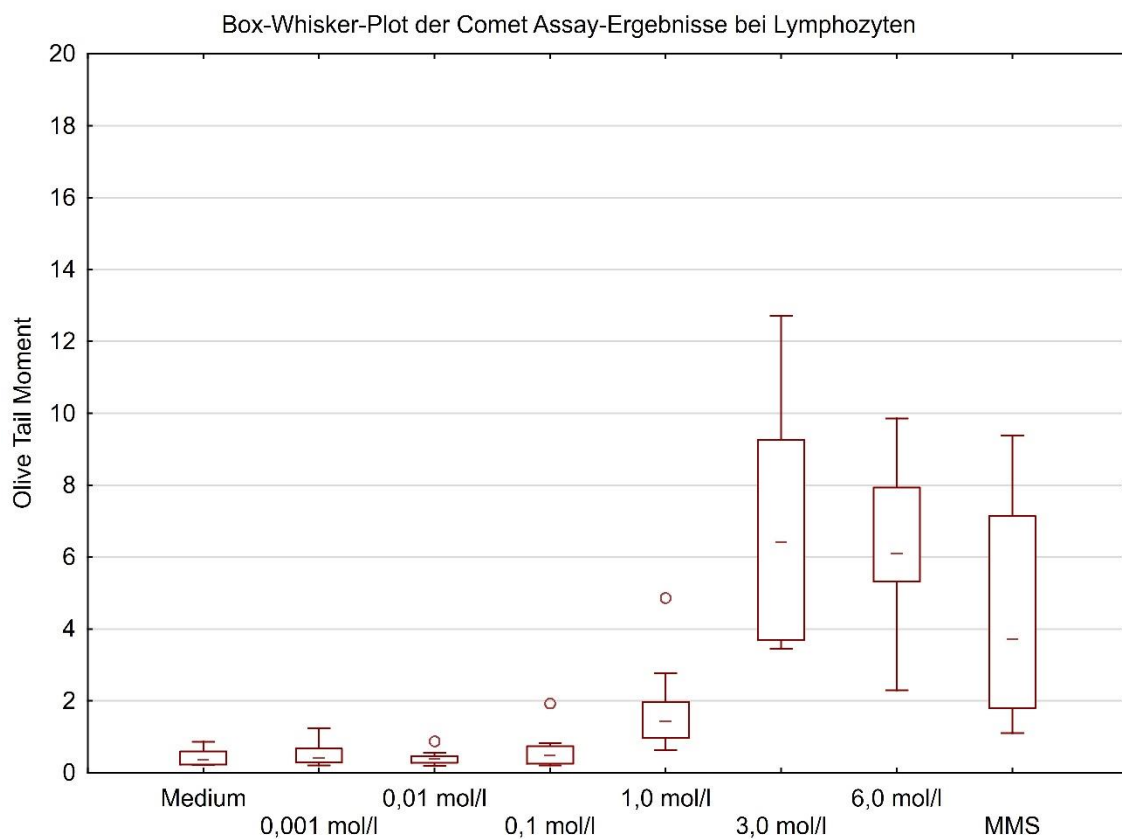


Abbildung 13: Darstellung der Ergebnisse des Comet Assays bei Lymphozyten nach einstündiger Exposition mit Glycerin in Form eines Boxplot-Diagramms. Medium entspricht der Negativkontrolle, MMS der Positivkontrolle

Tabelle 8: Friedman-Test der Ergebnisse des Comet Assays bei Lymphozyten

Friedman-Test	p-Wert	Signifikanzniveau	Signifikanz
Comet Assay bei Lymphozyten	<0,0001	0,05	ja

Tabelle 9: Wilcoxon-Test der Olive Tail Moment-Ergebnisse des Comet Assays bei Lymphozyten; Globales Signifikanzniveau = 0,05

Wilcoxon-Test	p-Wert	Lokales α -Niveau	Signifikanz
0,001 mol/l vs. Negativkontrolle	0,6465	0,0250	nein
0,01 mol/l vs. Negativkontrolle	0,8785	0,0500	nein
0,1 mol/l vs. Negativkontrolle	0,1141	0,0167	nein
1,0 mol/l vs. Negativkontrolle	0,0051	0,0071	ja
3,0 mol/l vs. Negativkontrolle	0,0051	0,0083	ja
6,0 mol/l vs. Negativkontrolle	0,0051	0,0100	ja
Positivkontrolle vs. Negativkontrolle	0,0051	0,0125	ja

3.3 Ergebnisse des Mikrokern-Tests

Der Mikrokern-Test wurde nur bei Lymphozyten durchgeführt (siehe 2.8.1). In den aufgeführten Diagrammen und statistischen Berechnungen wurden primär die Anzahl der Mikrokerne pro 1000 doppelkernige Zellen berücksichtigt. Weitere ermittelte Parameter sind dem Datenanhang zu entnehmen (siehe 6.3).

In Abbildung 14 ist die jeweilige Mikrokern-Anzahl bei den verschiedenen Glycerin-Konzentrationen aufgetragen. Die Anzahl der Mikrokerne bezieht sich bei den folgenden Ausführungen immer auf eine Grundmenge von 1000 doppelkernigen Zellen. Die Mediane befanden sich bei der Negativkontrolle sowie den Konzentrationen 0,01 mol/l, 0,1 mol/l und 1,0 mol/l im Bereich zwischen 5,0 und 6,5 Mikrokernen. Abgesehen von insgesamt drei Ausreißern bei 0,1 mol/l und 1,0 mol/l präsentierten sich die ermittelten Werte bei o. g. Konzentrationen auf einem Plateau. Der Median der Positivkontrolle betrug 34 Mikrokerne.

Auf Grundlage des Friedman-Tests (siehe Tabelle 10) wurde bei einem p-Wert von $p = 0,7641$ die Nullhypothese beibehalten. Auch im Wilcoxon-Test (siehe Tabelle 11) konnte für die verwendeten Glycerin-Konzentrationen keine signifikanten Unterschiede zur Negativkontrolle nachgewiesen werden, wohingegen sich die Positivkontrolle signifikant von der Negativkontrolle unterschied.



Abbildung 14: Darstellung der Ergebnisse des Mikrokern-Tests bei Lymphozyten nach einstündiger Exposition mit Glycerin in Form eines Boxplot-Diagramms. Medium entspricht der Negativkontrolle, MMC der Positivkontrolle

Tabelle 10: Friedman-Test der Ergebnisse des Mikrokern-Tests bei Lymphozyten

Friedman-Test	p-Wert	Signifikanzniveau	Signifikanz
Mikrokern bei Lymphozyten	0,7641	0,05	nein

Tabelle 11: Wilcoxon-Test der Ergebnisse des Mikrokern-Tests bei Lymphozyten; Globales Signifikanzniveau = 0,05

Wilcoxon-Test	p-Wert	Lokales α -Niveau	Signifikanz
0,01 mol/l vs. Negativkontrolle	0,2626	0,0167	nein
0,1 mol/l vs. Negativkontrolle	0,9594	0,0500	nein
1,0 mol/l vs. Negativkontrolle	0,3454	0,0250	nein
Positivkontrolle vs. Negativkontrolle	0,0051	0,0125	ja

3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Mittels des Trypanblau-Ausschlusstests wurden Lymphozyten und nasale Mukosazellen auf mögliche zytotoxische Effekte durch Glycerin untersucht. Dabei konnten bei beiden Zellgruppen signifikante Vitalitätsabfälle für die Glycerin-Konzentrationen 1,0 mol/l, 3,0 mol/l und 6,0 mol/l im Vergleich zur Negativkontrolle nachgewiesen werden. Der Vitalitätsabfall bei diesen Konzentrationen gestaltete sich bei den Lymphozyten drastischer als bei den Nasenschleimhautzellen. Die ermittelten Vitalitäten bei den Glycerin-Konzentrationen 0,001 mol/l, 0,01 mol/l sowie 0,1 mol/l unterschieden sich nicht signifikant von der Negativkontrolle.

Zur Einschätzung möglicher genotoxischer Effekte durch Glycerin wurde zunächst der Comet Assay durchgeführt. Auch hier zeigten sich bei Lymphozyten und Nasenschleimhautzellen für die Glycerin-Konzentrationen 1,0 mol/l, 3,0 mol/l sowie 6,0 mol/l signifikante Anstiege der OTM-Werte im Vergleich zur Negativkontrolle. Die OTM-Werte lagen bei den nasalen Mukosazellen vergleichsweise höher als bei den Lymphozyten. Berücksichtigt man, dass bei den nasalen Mukosazellen für 6,0 mol/l sowie bei den Lymphozyten für 3,0 mol/l und 6,0 mol/l Vitalitätsmediane unter 75% nachgewiesen wurden, so können die bei diesen Konzentrationen erfolgten Genotoxizitätsnachweise als nur eingeschränkt aussagekräftig erachtet werden.

Im Mikrokern-Test wurden die Glycerin-Konzentrationen 0,01 mol/l, 0,1 mol/l und 1,0 mol/l bei Lymphozyten auf weitere mögliche genotoxische Endpunkte untersucht. Hierbei konnte für keine der genannten Konzentrationen eine im Vergleich zur Negativkontrolle erhöhte Mikrokern-Anzahl nachgewiesen werden.

4 Diskussion

Bei wachsender Bedeutung des Shisha-Rauchens als Tabakkonsumform, soll in dieser Arbeit das toxikologische Risikoprofil des Glycerins als wesentlicher Bestandteil des Shisha-Tabaks eruiert werden. Dazu wurden als Zielzellen humane Lymphozyten sowie Nasenschleimhautzellen gewählt, welche nach *in vitro*-Exposition mit verschiedenen Glycerin-Konzentrationen mittels Trypanblau-Ausschlusstest, Einzelzellgelelektrophorese und Mikrokern-Tests auf mögliche zyto- und genotoxische Effekte untersucht wurden. An dieser Stelle folgt eine Diskussion des gewählten Versuchsaufbaus sowie der damit ermittelten Ergebnisse. Auf dieser Grundlage soll eine Risikoeinschätzung sowie Beurteilung der aktuellen Tabak-Limitierungen erfolgen.

4.1. Diskussion der Methodik

4.1.1 Auswahl der Zielzellen und Expositionsart

Lymphozyten sind geeignete und etablierte humane Testzellen zur Untersuchung möglicher Xenobiotika-bedingter zyto- und genotoxischer Effekte [Albertini et al. 2000; Spitz et al. 2003]. Dabei ermöglichen Lymphozyten als Untergruppe der Leukozyten eine Einschätzung der systemischen Folgen einer Exposition. Vorteilhaft ist hierbei die vergleichsweise unaufwändige Gewinnung des Vollblutes durch venöse Blutentnahme sowie die praktikable Isolierung der Lymphozyten durch Dichtegradienten-Zentrifugation (siehe 2.3.1). Die isolierten Zellen weisen dabei regelhaft hohe Zellzahlen und eine hohe Vitalität auf.

Als zweite Zellart wurden nasale Mukosazellen gewählt. Diese gehören zum Gewebe des oberen Aerodigestivtrakts und sind Schadstoffen, wie in diesem Fall dem Glycerin im Shisha-Rauch, als direktes Kontaktorgan in hoher Konzentration ausgesetzt. Da es sich um respiratorisches Flimmerepithel handelt, lassen sich auch Rückschlüsse auf die Wirkung im weiteren Respirationstrakt schließen. Die Nasenschleimhautzellen wurden aus Operationsbiopsaten der inneren Nase

gewonnen und gemäß der in Kapitel 2.3.2 geschilderten Methodik isoliert. Es handelt sich folglich um die Exposition an einzelnen Nasenschleimhautzellen, nicht an Miniorgankulturen. Berücksichtigt werden sollte hierbei, dass die Isolierung der Einzelzellen aus dem dreidimensionalen Zellverband eine gesteigerte Vulnerabilität der Zellen für die Schädigung durch Fremdstoffe bedingen kann [Kleinsasser et al. 2004]. Da es sich bei den Lymphozyten und nasalen Mukosazellen nicht um Zellen aus typischen Zelllinien handelt, ist das Auftreten gewisser Abweichungen zwischen den jeweiligen Versuchen zu erwarten. Insbesondere interindividuelle Unterschiede der Probanden hinsichtlich Geschlecht, Alter und dem vorherigen Schadstoffexpositionsverhalten spielen hierbei eine Rolle.

Die Exposition der o. g. Zellen mit Glycerin erfolgte in flüssiger Form gelöst im Zellmedium für 60 Minuten bei 37 °C. Diese flüssige Expositionsform spiegelt für die Lymphozyten, welche physiologisch im Blut ebenfalls in flüssiger Umgebung dem Glycerin ausgesetzt werden, realistisch die *in vivo*-Situation wider. Die Nasenschleimhautzellen hingegen treten gewöhnlich mit dem Glycerin als Aerosol in Kontakt. Daher kann die flüssige Expositionsform als Limitation der Arbeit angesehen werden, wenn auch durch Retention von Aerosol-Bestandteilen in den Nasensekreten und auf den Oberflächen des Flimmerepithels eine Teilexposition in flüssiger Form erfolgt.

Die Expositionszeit von einer Stunde entspricht der Dauer einer durchschnittlichen Shisha-Sitzung [Shihadeh et al. 2004]. Dieser Versuchsaufbau ermöglicht folglich primär Rückschlüsse auf die Effekte nach einmaligem Shisha-Rauchen. Auch wenn in Deutschland eher von einem gelegentlichen Shisha-Konsumverhalten ausgegangen werden kann (siehe 1.1.2), wären zukünftig auch Versuche mit repetitiven Expositionen über einen längeren Zeitraum interessant. Diese würde eine bessere Beurteilung des Risikos von maligner Entartung in Folge von Shisha-Rauchen ermöglichen.

4.1.2 Beurteilung der ausgewählten Testverfahren

Zur Beurteilung zytotoxischer Effekte wurde der Trypanblau-Ausschlusstest angewandt. Bei diesem wird der applizierte Farbstoff von avitalen Zellen aufgrund ihrer aufgehobenen Membranintegrität aufgenommen. Es resultiert eine Blaufärbung des Zytoplasmas, welche bei vitalen Zellen hingegen nicht auftritt. Die Anzahl an vitalen und avitalen Zellen kann lichtmikroskopisch ausgezählt werden. Verfälschungen der Ergebnisse können bei diesem Test durch toxische Wirkung des Trypanblau-Farbstoffs auf bereits vorgeschädigte Zellen sowie durch Wechselwirkungen des Farbstoffs mit Proteinen der Zellen oder des Mediums auftreten [Glauner 2006]. Weiterhin können avitale Zellen nicht in apoptotisch oder nekrotisch differenziert werden [Aysun et al. 2016]. Trotz der aufgeführten Einschränkungen handelt es sich beim Trypanblau-Ausschlusstest um einen etablierten Vitalitätstest [Avelar-Freitas et al. 2014; Aysun et al. 2016], der ein Screening auf mögliche zytotoxische Effekte des Glycerins ermöglicht. Alternative Vitalitätstests sind bspw. der Neutralrot-Test sowie der 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid-Test (MTT-Test), wobei bei diesen Tests jeweils die vitalen Zellen gefärbt werden.

Als Nachweisverfahren möglicher genotoxischer Effekte durch Glycerin wurden die Einzelzellgelelektrophorese sowie der Mikrokern-Test gewählt.

Das Funktionsprinzip der Einzelzellgelelektrophorese, im Folgenden Comet Assay genannt, ist in Kapitel 2.7.1 beschrieben. Beim Comet Assay handelt es sich um ein etabliertes *in vitro*-Verfahren zur Beurteilung von Genotoxizität in der Ökogenotoxikologie. Das Verfahren ist nahezu bei jeder eukaryontischen Zellpopulation und bereits bei geringer Zellzahl anwendbar sowie relativ schnell und kostengünstig durchführbar [Moller 2005; Tice et al. 1991]. Die Bandbreite der dabei nachweisbaren DNA-Schädigungen umfasst Einzel- und Doppelstrangbrüche, alkalilabile Stellen, DNA-Vernetzungen im Sinne von DNA-DNA- und DNA-Protein-Addukten sowie Stellen unvollständiger Exzisionsreparatur [Tice et al. 2000]. In dieser Arbeit wurden die Parameter Tail Length, Tail DNA und Olive Tail Moment (OTM) erhoben, wobei letzteres bei der Auswertung als Maß der DNA-Schädigung berücksichtigt wurde. Beim quantitativen Vergleich der ermittelten

Werte mit Ergebnissen aus anderen Studien ist darauf zu achten, dass aufgrund uneinheitlicher Bedingungen bei Versuchsdurchführung sowie Unterschieden bei Software- und Mikroskopeinstellungen in den verschiedenen Laboratorien Abweichungen entstehen können [Faust et al. 2004]. Auch die Interpretation nachgewiesener DNA-Schädigungen ist komplex. So resultiert nicht jede nachgewiesene DNA-Schädigung zwangsläufig aus dem genotoxischen Potenzial der Testsubstanz: Auch Schäden der Zellmembran oder der Mitochondrien können die Einleitung von Apoptose oder Nekrose induzieren und somit eine Fragmentierung des Erbguts provozieren [Olive und Banath 2006]. Um zuverlässige Ergebnisse zu generieren und aus diesen richtig schlussfolgern zu können, wurden folgende Aspekte berücksichtigt: Zunächst wurden avital imponierende Zellen bei der fluoreszenzmikroskopischen Auswertung der Ansätze nicht erfasst. Auch sollten alle ermittelten Werte unter besonderer Berücksichtigung der Ergebnisse von Positiv- und Negativkontrollen gesehen werden. Um ermittelte OTM-Werte als valide einstufen zu können, wurde weiterhin für die untersuchten Zellpopulationen ein Vitalitäts-Mittelwert im Trypanblau-Ausschlusstest von über 75% gefordert [Henderson et al. 1998]. Dies dient bei erfolgtem Genotoxizitätsnachweis der Differenzierung zwischen direkter genotoxischer Wirkung des Stoffes und einem aufgrund simultaner zytotoxischer Wirkung durch das Glycerin verursachten falsch-positiven Nachweises von Genotoxizität.

Es stellt sich außerdem die Frage, welche biologische Konsequenz mit dem Nachweis von DNA-Schädigungen einhergeht. Läsionen des Erbguts treten täglich in jeder menschlichen Zelle auf, nur in den seltensten Fällen sind sie für die Karzinogenese bedeutsam. *In vivo* existieren eine Reihe von Kompensations- und Reparaturmechanismen des Gewebes, welche im gewählten *in vitro*-Versuchsaufbau nur bedingt berücksichtigt werden. So können induzierte DNA-Schäden durch verschiedene Reparatursysteme, wie bspw. Basen-Exzisions- oder Mismatch-Reparatur, wieder behoben werden. Auf diesem Wege kann die Kontinuität der Basensequenz gewährleistet werden. Bei irreversiblen Schädigungen kann die Zelle in Form von Apoptose oder Zellzyklus-Arrest

inaktiviert werden und der Organismus so vor möglichen Mutationsfolgen geschützt werden.

Der Mikrokern-Test wurde durchgeführt, um das Spektrum genotoxikologisch erfasster Endpunkte zu erweitern. So ist der Nachweis klastogener, d. h. , strangbrechender, und aneugener, d. h. , die Veränderung der Chromosomenzahl in Tochterzellen betreffender, Effekte möglich. Während Klastogene meist direkt mit der DNA wechselwirken, entfalten Aneugene ihre Wirkung über Hemmung des Spindelapparates [Albertini et al. 2000]. Auch die Identifikation von Vorgängen wie Mitose, Apoptose und Nekrose sind mit dem Mikrokern-Test möglich. Nähere Erläuterungen zu den Grundlagen und der Methodik des Mikrokern-Tests finden sich in Kapitel 2.8.1.

Mikrokerne sind Zeichen stattgefundener Chromosomenaberrationen, welche im Rahmen von Fehlern bei der mitotischen Segregation oder fehlerhafter Reparatur von DNA-Brüchen entstehen [Knasmueller et al. 2011]. Diese erfolgten Schäden sind weiteren Prozessen der DNA-Reparatur nicht zugänglich und sind somit als gravierender einzuschätzen als potenziell reversible Schäden, die durch den Comet Assay nachgewiesen werden können. So lässt sich ein vermehrtes Vorhandensein von Mikrokernen auch als Zeichen genomischer Instabilität interpretieren [Inoue et al. 1997]. Außerdem zeigten Bonassi und Kollegen, dass sie bei Tumorpatienten unterschiedlicher Entitäten ein erhöhtes Auftreten von Mikrokernen in unbehandelten peripheren Lymphozyten im Vergleich zu tumorfreien Kontrollgruppen beobachten konnten [Bonassi et al. 2011]. Der Mikrokern-Test kann folglich als ein geeignetes Verfahren angesehen werden, um das genotoxikologische Profil des Glycerins fundierter beurteilen zu können. Nichtsdestotrotz lassen sich nur Rückschlüsse auf die untersuchten Lymphozyten ziehen, andere Zusammenhänge bei Epithelien des oberen Aerodigestivtrakts sind vorstellbar.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 Zytotoxizität bei hohen Konzentrationen

Im Trypanblau-Ausschlusstest bei Nasenschleimhautzellen nach einstündiger Glycerin-Exposition zeigten sich im Friedman-Test signifikante Unterschiede in der Werteverteilung der einzelnen Stichproben. Durch Vergleich der jeweiligen Stichproben mit der Negativkontrolle konnten im Wilcoxon-Test Signifikanzen für die Vitalitäten der Ansätze 1,0 mol/l, 3,0 mol/l und 6,0 mol/l nachgewiesen werden. Der Mittelwert des Ansatzes 6,0 mol/l lag mit 67,85% unter den für eine valide Beurteilung des Comet Assays geforderten 75%.

Bei den Lymphozyten waren die Vitalitäten der Ansätze mit den niedrigeren Glycerin-Konzentrationen (Negativkontrolle, 0,001 mol/l, 0,01 mol/l, 0,1 mol/l) etwas höher als die entsprechenden Vitalitäten bei den Nasenschleimhautzellen. Wohingegen bei den Konzentrationen von 3,0 mol/l und 6,0 mol/l ein stärkerer Abfall der Vitalitäten auf Werte unter 75% beobachtet werden konnte. Diese nachgewiesenen zytotoxischen Effekte des Glycerins auf Lymphozyten bei den Konzentrationen 3,0 mol/l und 6,0 mol/l können falsch-positive Ergebnisse beim Comet Assay hervorrufen. Die Ergebnisse des Comet Assays mit Lymphozyten bei diesen beiden Glycerin-Konzentrationen können folglich nicht als valide erachtet werden. Auch beim Versuchsaufbau des Mikrokern-Tests wurden beide Ansätze nicht mehr berücksichtigt.

Bezüglich zytotoxischer *in vitro*-Untersuchungen des Glycerins lassen sich in der Literatur bisher keine Voruntersuchungen finden. In den hier durchgeführten Untersuchungen ließen sich sowohl bei Lymphozyten als auch bei den nasalen Mukosazellen signifikante Vitalitätsabfälle ab einer Glycerin-Konzentration von 1,0 mol/l nachweisen. Dieser gestaltete sich bei 1,0 mol/l noch sehr gering, fiel bei den Konzentrationen 3,0 mol/l und 6,0 mol/l aber deutlicher aus. Ob die beschriebenen Beobachtungen auf ein direktes zytotoxisches Potenzial des Glycerins zurückzuführen sind, ist unklar. Ein möglicher Erklärungsansatz für die Effekte bei höheren Konzentrationen könnte folgender sein: Carlsen und Kollegen wiesen nach, dass Glycerin bei humanen Erythrozyten über erleichterte

Diffusion durch Kanäle sowie durch einfache Diffusion direkt durch die Membran von extra- nach intrazellulär gelangt [Carlsen und Wieth 1976]. Analoge Transportmechanismen dürfen auch für Lymphozyten und nasale Mukosazellen angenommen werden. Bei der Exposition der Zellen mit hohen Glycerin-Konzentrationen liegt zunächst eine sehr hohe extrazelluläre Osmolarität vor. Glycerin wird, insbesondere über konzentrationsabhängige erleichterte Diffusion, nach intrazellulär transportiert und kumuliert. Um den osmotischen Stress weiter zu reduzieren, kommt es auch zur Diffusion von Wasser nach extrazellulär und somit zur Zellschrumpfung.

Nach der einstündigen Expositionsphase wurden von den ursprünglichen 2 ml Glycerin-Medium-Gemischen pro Ansatz der Überstand nach Zentrifugation auf 40 µl abgesaugt. Zur Vitalitäts-Bestimmung wurden davon 10 µl mit weiteren 10 µl Trypanblau-Farbstoff versetzt. Die extrazelluläre Glycerin-Konzentration sank durch diese Prozesse im Vergleich zur Expositionsphase stark ab. Es kam zur Umkehr des anfänglichen osmotischen Druckgradienten. Durch das intrazellulär kumulierte Glycerin wurde nun ein Wassereinstrom bedingt, der zur Zellschwellung führte. Verstärkt werden diese Effekte durch die hygroskopischen Eigenschaften des Glycerins: Die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Hydroxygruppen des Glycerins und den Wassermolekülen stabilisieren die intrazellulären Wasseranreicherungen.

Die unterschiedlich starken Vitalitätsabfälle zwischen Nasenschleimhautzellen und Lymphozyten bei 3,0 mol/l und 6,0 mol/l können durch diese Hypothese hingegen nicht erklärt werden. Vorstellbar wäre, dass aus unterschiedlichen Zusammensetzungen der Zellmembranen eine veränderte Permeabilität dieser für das Glycerin resultiert. Um die beobachteten Vitalitätsabfälle bei hohen Glycerin-Konzentrationen sicher erklären zu können, wären in Zukunft weitergehende Untersuchungen erforderlich. In dieser Arbeit konnten zytotoxische Effekte für Glycerin-Konzentrationen nachgewiesen werden, die die tatsächlichen *in vivo*-Expositionsverhältnisse deutlich überschreiten. Ein Schwerpunkt sollte daher in zukünftigen Untersuchungen auf der repetitiven Exposition von subtoxischen Glycerin-Konzentrationen liegen. Da die zytotoxischen Effekte des Glycerins in Lymphozyten und nasalen Mukosazellen

unterschiedlich stark ausfielen, wären auch weitere Zytotoxizitätstestungen in anderen Zelllinien, wie bspw. in Mundschleimhaut- oder Speicheldrüsenzellen, interessant.

4.2.2 Nachweis von Genotoxizität

In einigen Studien konnten bei Shisha-Rauchern bereits genotoxische Effekte in deren Lymphozyten [Alsatari et al. 2012; Khabour et al. 2011] sowie in aus Abstrichen der Wangenschleimhaut gewonnenen Epithelien [Eker et al. 2016] im Vergleich zu Nichtraucher-Kollektiven nachgewiesen werden. Während aus dem Gesamtprozess des Shisha-Rauchens zweifelsfrei Genotoxizität resultiert, ist die genotoxische Einschätzung des Feuchthaltemittels Glycerins weiter unklar und soll anhand der Comet Assays sowie des Mikrokern-Tests an humanen Zielzellen näher eruiert werden.

Beim Comet Assay mit Nasenschleimhautzellen konnten im Wilcoxon-Test signifikante Unterschiede jeweils zwischen den OTM-Werten der Glycerin-Ansätze 1,0 mol/l, 3,0 mol/l sowie 6,0 mol/l und der Negativkontrolle nachgewiesen werden. Angesichts eines Vitalitätsmittelwertes des Ansatzes 6,0 mol/l von 67,85%, wird dieser für die folgende Auswertung nicht weiter berücksichtigt. Der Median der ermittelten OTM-Werte des Ansatzes 3,0 mol/l ist mit einem Betrag von 10,21 im Bereich des Medians der Positivkontrolle (12,34) und somit stark erhöht.

Auch bei den Lymphozyten unterschieden sich die OTM-Werte der Ansätze 1,0 mol/l, 3,0 mol/l sowie 6,0 mol/l signifikant von der Negativkontrolle. Im Vergleich fielen die ermittelten OTM-Werte bei den Lymphozyten geringer aus als bei den Nasenschleimhautzellen. Da bei den Lymphozyten die im Trypanblau-Ausschlusstest ermittelten Vitalitäten der Ansätze 3,0 mol/l und 6,0 mol/l niedriger als 75% waren, werden diese beiden Ansätze aufgrund möglicher falsch-positiver Ergebnisse nicht weiter berücksichtigt.

Dementsprechend wurden für die Lymphozyten im Mikrokern-Test lediglich die Konzentrationen 0,01 mol/l, 0,1 mol/l und 1,0 mol/l näher untersucht. Hierbei

zeigten sich für die Mikrokerne im Friedman-Test keine signifikanten Unterschiede in der Werteverteilung.

Der bisherige Wissensstand in der Literatur bezüglich der genotoxischen Beurteilung des Glycerins ist uneinheitlich. Auf der einen Seite konnten in folgenden *in vitro*-Studien an Bakterien und Säugetierzellen keine genotoxischen Effekte nachgewiesen werden: Doolittle und Kollegen konnten weder mithilfe des Ames-Tests bei Salmonellen, des unscheduled DNA synthesis (UDS) -Tests bei Ratten-Hepatozyten noch des Chromosomen-Aberrationstests sowie des Schwesterchromatid-Austauschtests bei chinese hamster ovary (CHO)-Zellen Genotoxizität feststellen [Doolittle et al. 1988]. Ebenso fielen Chromosomen-Aberrationstests bei CHO-Zellen negativ aus [Galloway et al. 1987; OECD 2002]. Demgegenüber steht insbesondere eine Publikation von Renne und Kollegen, in der bei mit Glycerin-Aerosolen repetitiv exponierten Ratten die Bildung von minimal bis leichten Plattenepithelmetaplasien des Kehlkopfs nachgewiesen werden konnte [Renne et al. 1992]. Eine genotoxische Genese ist damit nicht sicher nachgewiesen, die Autoren interpretieren die Metaplasien vielmehr als Adaptationsprozess des Gewebes an die irritierenden Effekte durch die Glycerin-Inhalation [Renne et al. 1992].

Anhand der durchgeführten Comet Assays konnten genotoxische Effekte des Glycerins ab einer Konzentration von je 1,0 mol/l in Lymphozyten und Nasenschleimhautzellen nachgewiesen werden. Diese fielen bei den nasalen Mukosazellen quantitativ höher aus als bei den Lymphozyten. Der Umstand, dass der durch ein Xenobiotikum in intraindividuell unterschiedlichen Gewebetypen hervorgerufene DNA-Schaden variiert, ist bereits bekannt und kann z. B. durch unterschiedliche DNA-Reparaturmechanismen der einzelnen Gewebearten erklärt werden [Kleinsasser et al. 2000]. Der Nachweis des höheren DNA-Schädigungsausmaßes bei Nasenschleimhautzellen belegt die Vulnerabilität des respiratorischen Gewebes gegenüber Schadstoffen.

Um das Risikoprofil des Glycerins beim Shisha-Rauchen realitätsnah charakterisieren zu können, ist die Einschätzung der realen Glycerin-Belastung für den Konsumenten unerlässlich. Schubert und Kollegen untersuchten die

Menge des Glycerins, die bei einer Shisha-Sitzung unverändert in den Hauptstromrauch übergeht. Sie ermittelten bei einer Tabakmenge von 10 g, einer Rauchdauer von 57 min und einem Gesamtzugvolumen von 90,6 l eine Glycerin-Menge von 423 mg im Hauptstromrauch. Dies entspricht einer Belastung von 4,7 mg Glycerin pro Liter Shisha-Hauptstromrauch [Schubert et al. 2011]. Die weiter oben beschriebenen Kehlkopfmetaplasien bei Ratten traten bereits nach Inhalation von deutlich niedrigeren Glycerin-Konzentrationen auf: Sie konnten bereits bei 1,0 mg/l, 1,93 mg/l und 3,91 mg/l bei 2-wöchiger sowie bei 0,662 mg/l bei 13-wöchiger Exposition¹ beobachtet werden [Renne et al. 1992]. Zugegebenermaßen spiegeln die in diesem Experiment vorliegenden Expositionszeiten (30 h/Woche) nicht das typische Shisha-Konsumverhalten wider, dennoch muss angesichts der hohen Glycerin-Inhalation durch den Hauptstromrauch von einer ernstzunehmenden Gefährdungssituation durch die hohen Feuchthaltemittelanteile im Shisha-Tabak ausgegangen werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden genotoxische Effekte im Comet Assay bei Glycerin-Konzentrationen von 1,0 mol/l nachgewiesen. Da das Glycerin in flüssiger Form exponiert wurde, ist eine Übertragung auf die oben aufgeführten Aerosol-Belastungen erschwert. Während bei einer kompletten Shisha-Sitzung insgesamt 423 mg Glycerin aufgenommen und auf den gesamten Respirationstrakt verteilt werden, sind im Versuchsansatz mit 1,0 mol/l hingegen 147 µl 99,5-prozentiges Glycerin in lediglich 1853 µl Medium gelöst. So wird deutlich, dass die nachgewiesene Genotoxizität bei der Konzentration 1,0 mol/l die tatsächlich zu erwartende Glycerin-Belastung deutlich übersteigt. Eine genotoxische Belastung durch Glycerin bei realen Shisha-Bedingungen konnte durch diese Studie für Nasenschleimhautzellen folglich nicht nachgewiesen werden. Nichtsdestotrotz handelt es sich bei Genotoxizität um ein stochastisches Risiko. Nachgewiesene Genotoxizität tritt nicht erst beim Erreichen bestimmter Schwellenwerte auf, sondern bereits bei geringeren Konzentrationen besteht ein Risiko für genotoxische Effekte.

¹ Exposition jeweils an 5 d/Woche für 6 h/d

Bezüglich der Glycerin-Konzentrationen im Blut, die während und nach dem Shisha-Rauchen auftreten, lassen sich in der Literatur leider keine Biomonitoring-Studien finden. Offensichtlich ist jedoch, dass die Konzentration des exogenen Glycerins im Blut geringer ist als in den direkten Kontaktorganen des Respirationstrakts. Demzufolge gilt auch für die Lymphozyten, dass durch den Versuchsaufbau keine genotoxischen Effekte durch beim Shisha-Rauchen auftretende Glycerin-Konzentrationen aufgezeigt werden konnten.

Bei erfolgtem Genotoxizitätsnachweis für höhere Glycerin-Konzentrationen, muss angesichts des stochastischen Risikos für genotoxische Effekte dennoch von einer Gefährdung durch Glycerin im Shisha-Tabak ausgegangen werden. Weiterhin müssen vorhandene Limitationen der Expositionsverhältnisse, wie z. B. die flüssige Exposition des Glycerins an den nasalen Mukosazellen, die Temperatur von 37,0 °C oder die einstündige Expositionsdauer, berücksichtigt werden. Weitere Untersuchungen bei anderen Expositionsverhältnissen sind indiziert, insbesondere eine Aerosol-Exposition mit einhergehender Erhitzung des Glycerins sollte erfolgen. Auch Wechselwirkungen des Glycerins mit anderen Inhaltsstoffen des Shisha-Tabaks müssen untersucht werden.

Ebenso beachtet werden sollte, dass durch die durchgeführten Versuche nur reines Glycerin auf zyto- und genotoxische Effekte untersucht wurde. Die Wirkung möglicher Abbauprodukte des Glycerins, die im Zuge der Verschmelzung des Shisha-Tabaks entstehen können, fanden keine Berücksichtigung. Im Rahmen der Pyrolyse kommt es zu unvollständigen Oxidationsprozessen, deren Produkte karzinogene Wirkungen haben können.

Entscheidend dafür, welche Produkte in welcher Menge bei der Pyrolyse entstehen, sind die Umgebungsbedingungen. Stein und Kollegen wiesen nach, dass die wesentlichen Pyrolyse-Produkte von Glycerin in Wasserdampf bei 650 °C Acetaldehyd und Acrolein seien [Stein et al. 1983]. Bei Pyrolyse-Studien, die den dynamischen Prozess und die Verhältnisse des Zigarettenrauchens imitierten, konnte nachgewiesen werden, dass 99,8% des Glycerins unverändert in den Hauptstromrauch übergehen, während weder Acetaldehyd noch Acrolein nachweisbar waren [Baker und Bishop 2004]. Für die Wasserpfeife hingegen konnten

Rashidi und Kollegen mittels Chromatographie den Gehalt an Acetaldehyd auf 2520 µg sowie an Acrolein auf 892 µg im Shisha-Hauptstromrauch pro Shishasitzung mit 10 g Tabak quantifizieren [Rashidi et al. 2008].

Insbesondere Acrolein gilt als hochreaktive und karzinogene Substanz [DFG 2012b], die über vielfältige und gewebespezifische Wirkungsmechanismen seine toxischen Effekte entfaltet [Moghe et al. 2015]. Typische Angriffspunkte und Wirkungsweisen sind bspw. die Bildung von Protein-Addukten, oxidativer Stress, mitochondriale Dysfunktionen, Entzündung und Immunmodifikationen, Deregulierung von Signaltransduktionswegen und weitere [Moghe et al. 2015].

Inwiefern die Menge des Acroleins im Hauptstromrauch von der Menge des Glycerins im Shisha-Tabak abhängt, sollte in weiteren Versuchen mittels Gaschromatographie untersucht werden.

4.3 Tabakkontrollpolitik in Deutschland

4.3.1 Einschätzung aktueller Tabakkontrollmaßnahmen

Laut einer Schätzung der WHO werden weltweit bis zu 7 Millionen Todesfälle pro Jahr durch den Konsum von Tabakprodukten verursacht [WHO 2015], das Rauchen gilt als größtes vermeidbares Gesundheitsrisiko unserer Zeit [WHO 2002]. Um diesem Umstand entgegenzuwirken, wurde von der WHO im Jahr 2003 das Rahmenübereinkommen zur Eindämmung des Tabakgebrauchs (Framework Convention on Tobacco Control, FCTC) als zwischenstaatlicher Gesundheitsvertrag ins Leben gerufen. Als Ziele werden hierbei der Schutz vor gesundheitlichen, gesellschaftlichen, ökologischen und wirtschaftlichen Folgen des Tabakkonsums sowie des Passivrauchens ausgegeben [WHO 2003]. Durch ihre Unterschrift und Ratifizierung sind Deutschland, seit März 2005, sowie 179 weitere Staaten rechtlich an die Vertragsinhalte des FCTC gebunden [Pötschke-Langer 2015]. Im WHO-Bericht zur globalen Tabakepidemie aus dem Jahr 2008 werden durch das MPOWER-Paket 6 konkrete Strategien zur Eindämmung des Tabakkonsums vorgestellt [WHO 2008]. Diese 6 zentralen Säulen sind das Monitoring von Tabakkonsum und Kontrollmaßnahmen, Schutz vor Tabakrauch,

Hilfe bei der Tabakentwöhnung, Warnhinweise vor Tabak, Verbote für Tabakwerbung sowie die Erhöhung von Tabaksteuern.

Einige dieser Säulen wurden in Deutschland bereits durch tiefgreifende Tabakkontrollmaßnahmen in den Jahren 2002 bis 2007 aufgegriffen und umgesetzt. Stellvertretend seien hier mehrere relevante jährliche Tabaksteuererhöhungen um jeweils min. 10% (2002-2005), Vergrößerungen der Warnungen auf Tabakverpackungen (2003), Verbot der Tabakwerbung in Printmedien und im Internet (2007), Heraufsetzung des Mindestalters zum Erwerb von Tabakwaren auf 18 Jahre (2007) sowie die Einführung des Bundesnichtraucherschutzgesetzes (2007) und der Landesnichtraucherschutzgesetze (2007, 2008) aufgeführt [Schaller und Pötschke-Langer 2016].

In den Folgejahren erfolgten hingegen kaum noch für die Tabaklimitierung wegweisende Interventionen, zentrale Forderungen des MPOWER-Paketes wurden vernachlässigt. Widergespiegelt wird diese Entwicklung auch im Abschneiden Deutschlands in der Tabakkontrollskala, einer Skala zur Quantifizierung der Umsetzung und Effektivität von Tabakkontrollmaßnahmen der einzelnen europäischen Staaten [Joossens und Raw 2006]. Seit 2007 wird Deutschland in diesem Score kontinuierlich herabgestuft und belegt bei den letzten beiden Erhebungen in den Jahren 2013 und 2016 jeweils den vorletzten Platz im europäischen Vergleich [Joossens und Raw 2014; Joossens und Raw 2017; Schaller und Pötschke-Langer 2016]. Handlungsbedarf besteht aktuell folglich in vielen Säulen der deutschen Tabakkontrollpolitik. Als ein markantes Beispiel sei die Regulierung von Tabakwerbung genannt: Deutschland ist nun mehr das letzte Land der EU, in dem Tabakaußenwerbung noch zulässig ist [Mons 2017]. Ein „Entwurf für ein Gesetz zur Änderung des Tabakerzeugnisgesetzes“, welches den Tabakaußenwerbeverbot ab dem 01.07.2020 umfasste, wurde in der vergangenen Legislaturperiode vom Ministerium für Ernährung und Landwirtschaft erarbeitet und vom Kabinett am 20.04.2016 bereits abgesehen. Zur Verabschiedung des Gesetzes fehlte lediglich die Lesung im Bundestag, welche jedoch von Teilen der CDU/CSU-Fraktion bis zum Ende der restlichen Legislaturperiode im Oktober 2017 blockiert wurde [Mons 2017]. Inwiefern dies mit der Sponsoring-Aktivität der Tabaklobby in Zusammenhang steht, kann nur gemutmaßt werden.

Nichtsdestotrotz konnte im Jahr 2016 ein kleiner Aufschwung der Tabakkontrollmaßnahmen verzeichnet werden. Die EU-Richtlinie für Tabakerzeugnisse (2014/40/EU) [Europäisches Parlament und Europäischer Rat 2014], welche 2014 zur Vereinheitlichung der Tabakvorschriften innerhalb der EU verabschiedet wurde, wurde in Deutschland 2016 in Form des Tabakerzeugnisgesetzes sowie der Tabakerzeugnisverordnung umgesetzt. Resultierende Änderungen, wie bspw. die Intensivierung der Verpackungskennzeichnung durch Text-Bild-Warnhinweise und weitere, sind in Kapitel 1.3.2 näher beschrieben.

Aus den o. g. Ausführungen geht deutlich hervor, dass Tabakkontrollpolitik in einem polyvalenten Umfeld stattfindet. Einerseits wird der Rahmen der deutschen Tabakkontrollpolitik auf verschiedenen Ebenen durch globale (FCTC, MPOWER-Paket) und europäische (EU-Richtlinien) Abkommen und Gesetze gebildet. Andererseits ist die Tabakkontrollpolitik selbst stets ein Pendel zwischen gesellschaftlicher Maximierung der primären Gesundheitsprävention auf der einen und Bevormundung des Endverbrauchers auf der anderen Seite, ein Spielball zwischen Gesundheitsinstitutionen und Interessenverbänden der Tabakindustrie. Während in den Jahren 2002 bis 2007 eine Reihe relevanter nationaler Tabakkontrollmaßnahmen erlassen wurde, folgten in den Folgejahren kaum relevante Maßnahmen zur Eindämmung des Tabakkonsums. Dieser Umstand wird durch das wiederholte desolate Abschneiden Deutschlands in der europäischen Tabakkontrollskala belegt.

4.3.2 Handlungsbedarf für eine effektivere Tabakkontrolle

Neben wissenschaftlichem Erkenntnisgewinn ergibt sich aus Studien über mögliche Gesundheitsfolgen von Tabakkonsum auch gesellschafts- und gesundheitspolitische Verantwortung. Vor dem Hintergrund der oben skizzierten tabakkontrollpolitischen Versäumnisse der vergangenen Jahre, bestehen aktuell eine Vielzahl an Missständen in der Tabakprävention. Eine Auswahl dieser Missstände soll, zunächst generelle Aspekte der Tabakkontrolle, dann die Regulierung des Shisha-Konsums im Besonderen betreffend, an dieser Stelle mit möglichen Lösungsansätzen aufgezeigt werden.

Neben Tabaksteuererhöhungen, die im MPOWER-Paket als wirksamste Strategie der Tabakkontrolle aufgeführt werden [WHO 2008], gibt es eine Reihe weiterer vernachlässigter Präventionsmaßnahmen. Nachholbedarf besteht unter anderem bei der Durchführung flächendeckender Informationskampagnen über die gravierenden Folgen des Tabakkonsums. Eindrucksvoll kann dieser Missstand durch Zahlen untermauert werden: Den Bundeseinnahmen aus der Tabaksteuer im Jahr 2016 in Höhe von 14,19 Milliarden Euro [Statistisches Bundesamt 2017], stehen lediglich ein Pool von jährlich ein bis vier Millionen Euro für Aufklärungskampagnen gegenüber [Pötschke-Langer 2015]. Um den Anteil jugendlicher Raucher weiter zu reduzieren und das Einstiegsalter in den Tabakkonsum anzuheben, sind weitreichendere finanzielle Förderung von innovativen und altersgerechten Informationskampagnen erforderlich. Klare Zielgruppe dieser Intervention müssen insbesondere Jugendliche und junge Erwachsene sein. Als Angriffspunkt gelten neben Schulen vor allem digitale Medien. Des Weiteren sollte das Angebot an Tabakentwöhnungsmaßnahmen weiter ausgebaut werden. Ziel muss es hier sein, zum Rauchstopp motivierte Raucher besser zu erreichen und durch strukturierte Entwöhnungshilfen deren Erfolgsaussichten zu maximieren. Eine besondere Verantwortung liegt im Feld der Tabakentwöhnung auch bei Ärzten, die durch motivierende Gesprächsführung das Bestreben zur Tabakabstinenz beim Patienten erheblich beeinflussen können. Ärzte sind naturwissenschaftlichen Ergebnissen, wie hier angeboten, gegenüber offen und können durch gezielte Informationsweitergabe den Patienten in seinem Rauchstopp-Bestreben stärken. Motivationsbehandlungen und Kurzinterventionen gelten als wesentlicher Bestandteil der S3-Leitlinie zur Behandlung des Tabakkonsums [Batra et al. 2016]. Als problematisch anzusehen sind weiterhin die Einkünfte der deutschen Parteien durch Zuwendungen der Tabaklobby. Dabei werden die gesetzlich strengen Regulierungen von Parteispenden meist durch den Umweg des Partei-Sponsorings umgangen: Für bspw. Stände an Parteitagen oder Anzeigen in Parteiblättern werden überhöhte Kosten berechnet, die in den Rechenschaftsberichten der Parteien nicht einzeln aufgeführt werden müssen [Jazbinsek 2015]. Gefordert werden sollte eine Offenlegung aller Sponsoren-Aktivitäten der Tabaklobby zugunsten deutscher Parteien oder Politiker, noch

besser ein gesetzliches Verbot solcher Zuwendungen, um die Unabhängigkeit und Glaubwürdigkeit der Tabakkontrollpolitik zu gewährleisten. Ein weiterer Ansatzpunkt ist die bundesweite Vereinheitlichung der Landesnichtraucherschutzgesetze. So gelten momentan lediglich in Bayern, Nordrhein-Westfalen und im Saarland absolute Rauchverbote in Gaststätten. In allen anderen Bundesländern sind gewisse Ausnahmeregelungen hinterlegt. Zur Intensivierung des Schutzes vor den Folgen des Passiv-Rauchens sollten auch in den üblichen Bundesländern strengere Rauchverbote in Gaststätten verabschiedet werden.

An dieser Stelle sollen nun konkrete Missstände und Forderungen im Bereich des Shisha-Konsums benannt werden. Die o. g. Nichtraucherschutzgesetze konstatieren in manchen Bundesländern ein absolutes Rauchverbot in allen Gaststätten, inbegriffen sind hierbei auch Shisha-Cafés. Formell scheint dies dem Untergang der Shisha-Café-Szene zu gleichen, tatsächlich ist der Trend der Shisha-Bars auch in Nordrhein-Westfalen oder Bayern ungebrochen. Die Gesetzgebung wird von Betreibern der Shisha-Bars simpel umgangen: Manchmal werden Raucher-Vereine gegründet und das Lokal als Vereinsheim deklariert, oft werden die Shishas auch mit Tabak-Ersatzstoffen wie den tabakfreien Shiaz-Dampfsteinen gefüllt. Es kann von einem Versagen der Behörden hinsichtlich eines konsequenten Durchsetzens der Nichtraucherschutzgesetze gesprochen werden. Aber auch in den Bundesländern, in denen kein absolutes Gastronomie-Rauchverbot besteht, sollten Richtlinien zum Luftmanagement in Shisha-Bars bzw. in Raucherbereichen generell erlassen werden. Studien belegen, dass Gäste und insbesondere Mitarbeiter von Shisha-Cafés den erhöhten Schadstoffkonzentrationen in der Innenraumluft der Cafés ausgesetzt sind und daraus gesundheitsschädliche Folgen resultieren können [Fromme und Schober 2016; Zhou et al. 2017]. Um diese Schadstoffbelastung zu reduzieren, sollten Belüftungssysteme für Raucher-Cafés vorgeschrieben werden sowie klare Grenzwerte für Schadstoffe, wie bspw. das geruchs- und farblose Kohlenmonoxid, definiert werden. Auch die verpflichtende Installation von Kohlenmonoxid-Meldern in geschlossenen Raucherbereichen stellt eine Option dar. Nach der Einführung der Tabakerzeugnisverordnung wird es ferner von zentraler Bedeutung sein, die Tabakzusammensetzung unter neuem geltendem

Recht zu beobachten. Nach Paragraph 6 der Tabakerzverordnung sind die Tabak-Hersteller nun zur Mitteilung von Inhaltsstoffen und Emissionswerten neuer Tabakprodukte an die Behörden verpflichtet. Auch wenn dies ein Schritt in die richtige Richtung ist, wurde es versäumt auch für den Endnutzer eine höhere Transparenz, durch Einführen einer Kennzeichnungspflicht der Inhaltsstoffe mit Mengenangaben auf den Produktverpackungen, zu schaffen. Im Sinne des Verbraucherschutzes sollte hier unbedingt nachkorrigiert werden. Ebenso sind regelmäßige Kontrollen durch die Behörden, ob die Angaben der Inhaltsstoffe den tatsächlichen Konzentrationen im Endprodukt entsprechen, durchzuführen und Verstöße strenger als in der Vergangenheit zu ahnden. Weiterhin sollten die Forschungsbemühungen zu den gesundheitsschädlichen Folgen des Rauchens von Wasserpfeifentabak unter Berücksichtigung des lokalen Rauchverhaltens intensiviert werden. Die ermittelten Ergebnisse sollten durch eine Ausdehnung von Aufklärungskampagnen adäquat an die Gesellschaft und insbesondere an Jugendliche weitervermittelt werden.

Die deutsche Tabakkontrollpolitik konnte in den vergangenen Jahren nur wenige wegweisende Fortschritte erzielen. Um eine effiziente Tabakkontrolle zu gewährleisten und die im FCTC gesteckten Ziele zu verwirklichen, sollten von Seiten der Politik weitere Maßnahmen erlassen werden. Mögliche Ansatzpunkte politischer Intervention sind den obigen Ausführungen zu entnehmen. Hierbei ist es auch Aufgabe der medizinischen Wissenschaft, diese Diskussion durch objektive Daten zu unterstützen.

4.4 Bedeutung der Ergebnisse und Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen ein genotoxisches Potenzial des Glycerins in humanen Lymphozyten sowie nasalen Mukosazellen ab Konzentrationen von 1,0 mol/l bei flüssiger Expositionsform. Für Glycerin-Konzentrationen, die bei realen Shisha-Bedingungen zu erwarten sind, konnten keine genotoxischen Effekte nachgewiesen werden. Dennoch ist die Einschätzung des Gefährdungspotenzials durch Glycerin im Shisha-Tabak auf Grundlage der erfolgten Untersuchungen als kritisch und diffizil anzusehen. Einerseits aufgrund des stochastischen Risikos für genotoxische Effekte, andererseits weil bei realer

Exposition mit höheren Temperaturen, Wechselwirkungen des Glycerins mit anderen Tabak- und Rauchbestandteilen sowie der Aerosol-Exposition des Glycerins im oberen Aerodigestivtrakt eine stärkere genotoxische Wirkung des Glycerins denkbar ist. Vor diesem Hintergrund wird der Wegfall der Feuchthaltemittelgehaltslimitierung im Rahmen der Tabakerzeugnisverordnung als problematisch erachtet. In jedem Fall sollten durch die Behörden oder auch das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) zukünftig präzise Analysen der Glycerin-Gehälter im Shisha-Tabak erfolgen. Dies soll eine valide Einschätzung ermöglichen, inwiefern die neue Gesetzgebung tatsächlich Änderungen in der Zusammensetzung des Shisha-Tabaks bedingt.

Eine umfassende und abschließende Beurteilung des Glycerins im Shisha-Tabak ist auf Grundlage der durchgeführten Versuche nicht möglich. Im Hinblick auf das stochastische Risiko für genotoxische Effekte sowie einem zu erwartenden Anstieg der Feuchthaltemittelgehalter im Shisha-Tabak unter neuer Gesetzgebung, wird weiterer Forschungsbedarf in diesem Bereich gesehen.

In folgenden Untersuchungen sollten Aerosol-Expositionen des Glycerins auf humane Schleimhautzellen durchgeführt werden. Die Methode des *Air Liquid Interfaces* würde hierbei eine Aerosol-Exposition am Zellverbund ermöglichen und so die reale *in vivo*-Situation noch besser imitieren. Um auch die Entstehung und Wirkung möglicher Oxidationsprodukte des Glycerins sowie denkbare Wechselwirkungen mit anderen Shisha-Tabakbestandteilen zu erfassen, sollte versucht werden, den Hauptstromrauch der Shisha aus Tabakansätzen mit unterschiedlichen Gehältern von Glycerin zu untersuchen und an humanen Zielzellen zu exponieren. Erstrebenswert wäre dafür die Etablierung eines standardisierten Shisha-Test-Systems, welches das Funktionsprinzip einer Wasserpfeife möglichst präzise abbildet und replizierbare Versuche mit verschiedenen Tabakzusammensetzungen ermöglicht. Ebenso sollten für Forschungszwecke standardisierte Rauchparameter, wie bspw. das Zugvolumen, die Zugfrequenz, die Tabakmenge oder die Sitzungsdauer, definiert werden, um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zwischen verschiedenen Laboratorien zu gewährleisten.

5. Zusammenfassung

Das Tabak-Rauchen verursacht weltweit jährlich etwa 7 Millionen Todesfälle [WHO 2015]. Neben der Zigarette spielen alternative Tabakkonsumtechniken zunehmend eine wichtigere Rolle – so auch die Shisha (Wasserpfeife). Im Shisha-Tabak treten im Vergleich zum Zigaretten Tabak wesentlich höhere Konzentrationen des Feuchthaltemittels Glycerin auf. Bis Mai 2016 wurden die Feuchthaltemittelgehalte im Shisha-Tabak in Deutschland gesetzlich auf 5% limitiert. Anträge zur Anhebung dieser Schwelle wurden vom Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) damals noch ablehnend eingeschätzt und dabei auf die durch Glycerin-Aerosolexposition induzierte Bildung von Plattenepithelmetaplasien des Kehlkopfs bei Ratten [Renne et al. 1992] sowie die potenzielle Bildung des kanzerogenen Acroleins aus Glycerin bei Erhitzung verwiesen [Bundesinstitut für Risikobewertung 2009]. Unter Gültigkeit der neuen Tabakerzeugnisverordnung seit Mai 2016 wurde diese Limitierung aufgehoben und es ist somit mit einem weiteren Anstieg der Glycerin-Gehalte im Shisha-Tabak zu rechnen. Dennoch ist das toxikologische Profil des Glycerins an menschlichen Zellen, insbesondere des oberen Aerodigestivtrakts, bislang nicht hinreichend untersucht. Ziel dieser Arbeit war es folglich, Glycerin auf mögliche zyto- und genotoxische Effekte in humanen Lymphozyten sowie nasalen Mukosazellen zu untersuchen. Auf dieser Grundlage soll das Gefährdungspotenzial durch Glycerin im Shisha-Tabak beurteilt und die tabakkontrollpolitische Situation in Deutschland diskutiert werden.

Um diesen Fragestellungen nachzugehen, wurden Lymphozyten sowie Nasenschleimhautzellen von 10 Patienten für eine Stunde unterschiedlichen Glycerin-Konzentrationen (0,001 mol/l bis 6,0 mol/l) exponiert. Die Zellen wurden anschließend durch den Trypanblau-Ausschlusstest auf Zytotoxizität sowie mit Hilfe der Einzelzellgelelektrophorese (Comet Assay) auf Genotoxizität untersucht. Die Lymphozyten wurden mit dem Mikrokern-Test einem weiteren genotoxischen Testverfahren unterzogen.

Im Trypanblau-Ausschlusstest konnten sowohl bei Lymphozyten als auch bei den nasalen Mukosazellen für die Glycerin-Konzentrationen 1,0 mol/l, 3,0 mol/l sowie 6,0 mol/l signifikante Vitalitätsabfälle im Vergleich zur Negativkontrolle beobachtet werden. Diese fielen bei den Lymphozyten deutlicher aus als bei den nasalen Mukosazellen. Im Comet Assay konnten für die Lymphozyten und die Nasenschleimhautzellen signifikante Unterschiede des Olive Tail Moments (OTM) für die Glycerin-Konzentrationen 1,0 mol/l, 3,0 mol/l sowie 6,0 mol/l im Vergleich zur Negativkontrolle nachgewiesen werden. Quantitativ lagen die OTM-Werte bei den nasalen Mukosazellen höher als bei den Lymphozyten. Im Mikrokern-Test der Lymphozyten wurden die Konzentrationen 3,0 mol/l und 6,0 mol/l aufgrund der starken Vitalitätsabfälle im Trypanblau-Ausschlusstest nicht berücksichtigt. Für die üblichen Konzentrationen traten keine signifikanten Zunahmen der Mikrokern-Anzahl im Vergleich zur Negativkontrolle auf.

In dieser Arbeit konnten zyto- und genotoxische Effekte des Glycerins bei einstündiger Exposition an Lymphozyten sowie nasalen Mukosazellen ab Konzentrationen von 1,0 mol/l nachgewiesen werden. Dies überschreitet die zu erwartende Glycerin-Belastung im Hauptstromrauch der Shisha jedoch deutlich. Dennoch handelt es sich bei Genotoxizität um ein stochastisches Risiko, welches bereits bei geringeren Konzentrationen vorliegt. Ebenso sind bei geringeren Konzentrationen des Glycerins toxische Effekte, z. B. im Rahmen des Erhitzungsprozesses sowie in der Exposition als Aerosol, denkbar. Auch möglichen Wechselwirkungen des Glycerins mit anderen Tabakrauchbestandteilen wird in diesem Versuchsaufbau nicht Rechnung getragen. Um das Gefährdungspotenzial, welches von Feuchthaltemitteln wie dem Glycerin im Shisha-Tabak ausgeht, differenziert und umfänglich beurteilen zu können, sind folglich weitere Untersuchungen indiziert. Auf deren Grundlage sollte der Wegfall der Feuchthaltemittelgehaltslimitierung im Zuge der Tabakerzeugnisverordnung reevaluiert werden. Darüber hinaus besteht ein enormer Handlungsbedarf in der weiteren Einführung sowie Durchsetzung tabakkontrollpolitischer Maßnahmen in Deutschland. Der Tabakforschung kommt dabei auch zukünftig eine bedeutende Rolle zu, die gesellschafts- und gesundheitspolitische Debatte über eine wirksame Tabakprävention in Deutschland wissenschaftlich zu fundieren.

6. Anhang

6.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
°C	Grad Celsius
Be	Belgien
BEGM	Bronchial epithelial growth medium
BFR	Bundesinstitut für Risikobewertung
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CHO-Zellen	chinese hamster ovary-Zellen
cm	Centimeter
D	Deutschland
d	Tag
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desosyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	und andere
EU	Europäische Union
FCS	Fetales Kälberserum
FCTC	Rahmenübereinkommen zur Eindämmung des Tabakgebrauchs
g	Gramm
g	Ortsfaktor
Gb	Großbritannien
h	Stunde
IQR	Interquartilsabstand
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
kg	Kilogramm
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
l	Liter
LD ₅₀	Letale Dosis bei 50% der Exponierten
M	Molar (entspricht mol/l)
mA	Milliamper
MAK	Maximale Arbeitsplatz Konzentration

MEM	Minimum Essential Medium
mg	Milligramm
Mhz	Megahertz
min	Minute
Mio.	Millionen
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MMC	Mitomycin C
MMS	Methylmethansulfonat
MTT-Test	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid-Test
MW	Mittelwert
n	Anzahl
Na₂HPO₄	Natriumdihydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natrium-Hydroxid
NEA	Nicht-essentielle Aminosäuren
ng	Nanogramm
NOAEC	No observed adverse effect concentration
NSH	Nasenschleimhautzellen
OTM	Olive Tail Moment
p	Wahrscheinlichkeit
PAK	polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
pH	pH-Wert
PHA	Phytohämagglutinin
PM_{2,5} -Fraktion	particulate matter – Feinstaubgehalt mit 2,5µm Durchmesser
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
s	Sekunden
SD	Standardabweichung
TabakV	Tabakverordnung
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
UDS-Test	unscheduled DNA-synthesis Test
V	Volt
vs.	versus
WHO	Weltgesundheitsorganisation
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

6.2 Geräte & Verbrauchsmaterialien

6.2.1 Geräte

Geräte	Firma, Ort, Land
Absaugpumpe	KNF Neuberger GmbH, Freiburg, D
Autoklav, Dampfsterilisation	SHP Steriltechnik AG, Magdeburg, D
Brutschrank	Binder GmbH, Tuttlingen, D
Centrifuge 5810R	Eppendorf AG, Hamburg, D
Elektrophoresekammer	Renner GmbH, Dannstadt, D
Elektrophoresenetzgerät EV202	Consort BVBA, Turnhout, Be
Fluoreszenzmikroskop Leica DM4000B	Leica Microsystems, Wetzlar, D
Kühlschrank	Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberach an der Riß, D
Lichtmikroskop	Carl Zeiss AG, Oberkochen, D
Neubauer-Zählkammer	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda- Königshofen, D
Pipetten Eppendorf Research (verschiedene Volumina)	Eppendorf AG, Hamburg, D
Pipettierhelfer	BRAND GMBH + KO KG, Wertheim, D
Präzisionswaage	Sartorius AG, Göttingen, D
Schüttler	IKA Works Inc, Wilmington, NC, USA
Vortex	VELP Scientifica SRL, Usmate, It
Wasserbad	Memmert GmbH + Co. Kg, Schwabach, D
Werkbank	Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold, D
Zellzähler Mikrokern-Test	Karl Hecht KG, Sondheim, D
Zellzählgerät Casy Innovatis	Innovatis AG, Reutlingen, D
Zytozentrifuge Cellspin I	Tharmac GmbH, Waldsolms, D

6.2.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Firma, Ort, Land
Casy-Cups	Innovatis AG, Reutlingen, D
Deckgläser (24x32 mm)	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, D
Einmal-Skalpell (steril)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D
Kompresse (steril)	Lohmann & Rauscher, Rengsdorf, D
Kulturflaschen (50 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
Leucosep-Röhrchen (12 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
Monovetten (Blutentnahmesystem, 9 ml-Heparin)	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, D
Objektträger (76x26 mm)	R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen, D
Pasteurpipettenspitzen (aus Glas)	BRAND GMBH + CO KG, Wertheim, D
Petrischale (100x20 mm)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
Pipettenspitzen (Volumina: 20 µl, 200 µl, 1000 µl)	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, D
Pipettenspitzen (aus Polystyrol, Volumina: 1 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml)	Corning Incorporated, New York, NY, USA
Reaktionsgefäße (Volumina: 1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, D
Zellkulturplatte (24-Well-Format)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, D
Zentrifugen-Röhrchen (Volumina: 15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D

6.3 Daten-Anhang

Tabelle 12.1 und 12.2: Darstellung epidemiologischer Patienten-Daten der Patienten-Kollektive für den Trypanblau-Ausschlusstest und die Einzelzellgelelektrophorese (siehe 12.1) sowie für den Mikrokern-Test (siehe 12.2)

Tabelle 12.1: Darstellung epidemiologischer Patienten-Daten für den Trypanblau-Ausschlusstest und die Einzelzellgelelektrophorese. Angabe des Alters in Jahren, des Geschlechts (m/w) in m = männlich oder w = weiblich sowie der für die durchgeführten Nasenoperationen entscheidenden Diagnosen (re.: rechts, li.: links, bds.: beidseits, chron.: chronisch)

Id	Alter	m/w	Diagnose
1	42	m	Chron. Pansinusitis bds., Nasenmuschelhypertrophie bds., Nasenseptumdeviation
2	21	m	Sonstige angeborene Fehlbildung der Nase, Störung der Nasenatmung
3	67	m	Chronisches Sinusitis ethmoidalis bds., Rezidivpolyposis
4	36	w	Nasenmuschelhypertrophie bds., Nasenseptumdeviation
5	35	m	Chron. Pansinusitis bds. (polypös)
6	58	w	Chron. Sinusitis maxillaris re., Concha bullosa re.
7	54	m	Chron. Sinusitis ethmoidalis bds., Nasenseptumdeviation
8	72	m	Polyposis nasi et sinuum bds., Nasenseptumdeviation
9	42	w	Polyposis nasi et sinuum bds., Nasenseptumdeviation
10	31	w	Nasenseptumdeviation

Tabelle 12.2: Darstellung epidemiologischer Patienten-Daten für den Mikrokern-Test. Angabe des Alters in Jahren, des Geschlechts (m/w) in m = männlich oder w = weiblich sowie der für die durchgeführten Nasenoperationen entscheidenden Diagnosen (re.: rechts, li.: links, bds.: beidseits, chron.: chronisch)

Id	Alter	m/w	Diagnose
1	31	w	Nasenseptumdeviation
2	65	w	Chron. Sinusitis maxillaris bds., Nasenseptumdeviation
3	65	m	Chron. Pansinusitis bds., Nasenhöhlenpolyp bds.
4	33	m	Concha bullosa re., Chron. Sinusitis ethmoidalis bds., Nasenseptumdeviation
5	48	w	Concha bullosa re., Chron. Pansinusitis bds., Nasenseptumdeviation
6	58	m	Chron. Pansinusitis bds.
7	30	m	Nasenseptumdeviation
8	37	w	Chron. Pansinusitis bds., Nasenmuschelhypertrophie bds., Nasenseptumdeviation
9	60	m	Rezidivpolyposis nasi et sinuum bds.
10	45	m	Chron. Pansinusitis bds., Nasenhöhlenpolyp bds., Nasenseptumdeviation

Tabelle 13.1 – Tabelle 13.2: Ausführliche Wertetabellen zum Thema 3.1.1 - **Trypanblau-Ausschlusstest bei Nasenschleimhautzellen**. Positivkontrolle: 200 µM MMS; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung

Tabelle 13.1: Ergebnisse des Trypanblau-Ausschlusstests bei Nasenschleimhautzellen - Teil 1

ID	Negativ (Medium)	Glycerin		
		0,001 mol/l	0,01 mol/l	0,1 mol/l
1	93,2	92,5	94,2	90,4
2	99	96,4	96,3	97,7
3	99,1	98,6	98,6	98,3
4	99,4	99,3	99,7	99,3
5	90,9	94,4	89,8	91,6
6	90,7	89,8	90,2	89,4
7	96,9	97,4	95,3	96,6
8	97,4	98,4	97,2	98,3
9	99,2	99,2	99,6	99,4
10	96,6	96,2	97,1	96,4
MW	96,24	96,22	95,80	95,74
Median	97,15	96,90	96,70	97,15
SD	3,41	3,14	3,52	3,80

Tabelle 13.2: Ergebnisse des Trypanblau-Ausschlusstests bei Nasenschleimhautzellen - Teil 2

ID	Glycerin			Positiv
	1,0 mol/l	3,0 mol/l	6,0 mol/l	MMS
1	90	58,4	22,9	94,7
2	94,4	79,5	67,7	97,7
3	98,2	91,1	65	99,4
4	99,3	96,7	80,5	99,3
5	90,7	76,1	31,4	90,1
6	90,2	66,2	69	91,3
7	91,2	83,3	80	98,4
8	95,2	93	87,4	98
9	99,3	99,2	97,1	99,5
10	94,1	91,4	77,5	96,3
MW	94,26	83,49	67,85	96,47
Median	94,25	87,20	73,25	97,85
SD	3,71	13,46	23,56	3,40

Tabelle 14.1 – Tabelle 14.2: Ausführliche Wertetabellen zum Thema 3.1.2 - **Trypanblau-Ausschlusstest bei Lymphozyten**. Positivkontrolle: 200 μ M MMS;
MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung

Tabelle 14.1: Ergebnisse des Trypanblau-Ausschlusstests bei Lymphozyten - Teil 1

ID	Negativ (Medium)	Glycerin		
		0,001 mol/l	0,01 mol/l	0,1 mol/l
1	99,6	100	99,3	99,4
2	100	100	100	98,5
3	98,8	99,6	100	100
4	99,2	99,6	99,1	98,7
5	98,1	97,4	97,6	97,5
6	96,6	97,9	97,3	97,9
7	98,8	100	96,9	98,6
8	100	98,6	100	98,3
9	99,6	100	99,5	99,1
10	98,8	98,7	98,9	99,4
MW	98,95	99,18	98,86	98,74
Median	99,00	99,60	99,20	98,65
SD	1,02	0,97	1,17	0,75

Tabelle 14.2: Ergebnisse des Trypanblau-Ausschlusstests bei Lymphozyten - Teil 2

ID	Glycerin			Positiv (MMS)
	1,0 mol/l	3,0 mol/l	6,0 mol/l	
1	98,2	91,6	3,8	99,2
2	97,6	74,7	2	98,8
3	98	83,1	8	100
4	95,9	72,3	4,9	99,5
5	96,4	65,5	11,1	96,6
6	90,2	62	12,9	97,5
7	89,9	57,8	9,7	98,4
8	99	88,7	12,5	99,5
9	99,2	57,6	7,9	99,5
10	98,7	63,2	5,4	98,9
MW	96,31	71,65	7,82	98,79
Median	97,80	68,90	7,95	99,05
SD	3,46	12,57	3,75	1,04

Tabelle 15.1 – Tabelle 15.2: Ausführliche Wertetabellen zum Thema 3.2.1 - **Einzelzellgelelektrophorese bei Nasenschleimhautzellen**. OTM: Olive Tail Moment; DT: DNA in Tail; TL: Tail Length; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung

Tabelle 15.1: Ergebnisse der Einzelzellgelelektrophorese bei Nasenschleimhautzellen - Teil 1

	Negativ (Medium)			Glycerin		
				0,001 mol/l		
ID	OTM	DT	TL	OTM	DT	TL
1	2,39	5,85	48,03	1,82	4,40	45,66
2	1,46	4,11	53,37	2,33	5,79	59,69
3	1,21	3,40	43,02	1,00	3,02	42,87
4	0,63	2,27	49,79	0,68	2,24	52,86
5	0,48	2,01	34,39	0,40	1,69	31,27
6	0,66	2,47	36,29	0,43	1,78	33,20
7	0,69	2,71	39,49	0,77	2,80	39,87
8	1,03	4,21	39,18	0,87	3,79	36,97
9	0,45	1,96	33,65	0,82	3,06	34,61
10	0,53	2,26	38,43	0,66	2,37	38,69
MW	0,95	3,13	41,56	0,98	3,10	41,57
Median	0,68	2,59	39,33	0,80	2,91	39,28
SD	0,61	1,26	6,77	0,62	1,27	9,01

Tabelle 15.2: Ergebnisse der Einzelzellgelelektrophorese bei Nasenschleimhautzellen - Teil 2

	Glycerin					
	0,01 mol/l			0,1 mol/l		
ID	OTM	DT	TL	OTM	DT	TL
1	2,71	6,75	56,79	5,13	12,05	67,59
2	3,56	8,16	70,10	4,62	9,18	76,61
3	0,96	3,10	42,96	0,72	2,37	43,48
4	0,50	1,98	41,21	0,80	2,80	49,07
5	0,45	1,79	30,97	0,90	3,29	37,34
6	0,52	2,01	33,63	0,92	3,16	38,15
7	1,21	3,96	45,86	1,99	5,99	56,90
8	0,85	4,04	35,09	1,46	5,01	44,08
9	0,72	2,83	36,12	0,89	3,72	38,75
10	0,64	2,61	41,71	0,68	2,75	44,75
MW	1,21	3,72	43,44	1,81	5,03	49,67
Median	0,79	2,96	41,46	0,91	3,50	44,42
SD	1,06	2,14	11,92	1,67	3,21	13,32

Tabelle 15.3 – Tabelle 15.4: Ausführliche Wertetabellen zum Thema 3.2.1 - **Einzelzellgelelektrophorese bei Nasenschleimhautzellen**. OTM: Olive Tail Moment; DT: DNA in Tail; TL: Tail Length; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung

Tabelle 15.3: Ergebnisse der Einzelzellgelelektrophorese bei Nasenschleimhautzellen - Teil 3

	Glycerin					
	1,0 mol/l			3,0 mol/l		
ID	OTM	DT	TL	OTM	DT	TL
1	5,74	12,11	73,84	9,66	18,68	93,70
2	15,48	28,19	123,69	16,89	30,40	130,00
3	3,99	10,54	65,45	17,20	33,41	117,12
4	3,33	7,93	82,78	10,75	17,76	113,06
5	1,13	4,01	42,04	5,53	14,04	69,77
6	6,52	17,15	75,32	4,45	12,23	64,80
7	6,10	13,31	76,17	8,52	16,87	90,41
8	2,52	7,47	54,08	14,36	25,34	91,83
9	1,86	5,78	52,81	7,55	15,28	81,49
10	2,91	6,89	71,89	12,08	20,47	105,62
MW	4,96	11,34	71,81	10,70	20,45	95,78
Median	3,66	9,23	72,87	10,21	18,22	92,77
SD	4,12	7,10	22,23	4,44	7,07	20,85

Tabelle 15.4: Ergebnisse der Einzelzellgelelektrophorese bei Nasenschleimhautzellen - Teil 4

	Glycerin			Positiv (MMS)		
	6,0 mol/l			200 µM		
ID	OTM	DT	TL	OTM	DT	TL
1	3,30	7,62	73,44	7,54	17,80	88,51
2	15,60	26,67	127,25	15,94	30,63	127,96
3	17,10	31,50	109,25	13,63	28,41	100,79
4	13,97	24,31	105,22	10,10	19,71	89,59
5	5,31	13,31	64,98	7,95	18,13	68,08
6	4,75	11,49	72,90	4,78	11,13	61,35
7	12,96	22,25	117,37	19,73	30,05	106,32
8	13,29	26,67	93,59	11,05	23,78	77,24
9	8,53	16,62	83,98	24,78	43,80	122,92
10	13,65	21,00	118,66	18,27	32,31	126,02
MW	10,84	20,14	96,66	13,38	25,57	96,88
Median	13,13	21,62	99,41	12,34	26,10	95,19
SD	4,94	7,66	22,00	6,28	9,39	24,03

Tabelle 16.1 – Tabelle 16.2: Ausführliche Wertetabellen zum Thema 3.2.2 - **Einzelzellgelelektrophorese bei Lymphozyten**. OTM: Olive Tail Moment; DT: DNA in Tail; TL: Tail Length; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung

Tabelle 16.1: Ergebnisse der Einzelzellgelelektrophorese bei Lymphozyten - Teil 1

ID	Negativ (Medium)			Glycerin 0,001 mol/l		
	OTM	DT	TL	OTM	DT	TL
1	0,46	1,71	36,33	0,43	1,53	34,47
2	0,68	1,89	38,25	1,24	3,16	41,91
3	0,34	1,19	36,51	0,41	1,64	33,36
4	0,22	0,92	30,61	0,28	1,13	32,55
5	0,23	1,10	28,12	0,20	0,98	28,33
6	0,38	1,57	33,78	0,33	1,35	32,24
7	0,59	2,10	39,05	0,50	1,92	33,94
8	0,86	2,23	42,92	0,71	1,97	41,89
9	0,32	1,46	29,55	0,68	2,49	39,25
10	0,21	1,03	26,94	0,24	1,13	28,24
MW	0,43	1,52	34,20	0,50	1,73	34,62
Median	0,36	1,52	35,05	0,42	1,59	33,65
SD	0,22	0,46	5,27	0,31	0,68	4,94

Tabelle 16.2: Ergebnisse der Einzelzellgelelektrophorese bei Lymphozyten - Teil 2

ID	Glycerin					
	0,01 mol/l			0,1 mol/l		
	OTM	DT	TL	OTM	DT	TL
1	0,41	1,68	32,09	0,69	2,64	34,42
2	0,88	2,32	42,60	1,93	4,85	46,66
3	0,19	0,71	32,76	0,25	0,88	34,49
4	0,39	1,15	37,77	0,25	1,03	30,94
5	0,42	1,61	29,81	0,41	1,55	29,32
6	0,46	1,63	34,65	0,73	3,38	37,46
7	0,55	2,16	38,61	0,82	2,83	42,06
8	0,40	1,16	37,32	0,53	1,69	38,96
9	0,28	1,27	27,08	0,45	2,70	30,08
10	0,20	0,92	26,16	0,21	0,97	25,78
MW	0,42	1,46	33,88	0,63	2,25	35,02
Median	0,40	1,44	33,71	0,49	2,17	34,46
SD	0,20	0,52	5,30	0,50	1,27	6,38

Tabelle 16.3 – Tabelle 16.4: Ausführliche Wertetabellen zum Thema 3.2.2 - Einzelzellgelelektrophorese bei Lymphozyten. OTM: Olive Tail Moment; DT: DNA in Tail; TL: Tail Length; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung

Tabelle 16.3: Ergebnisse der Einzelzellgelelektrophorese bei Lymphozyten - Teil 3

ID	Glycerin					
	1,0 mol/l			3,0 mol/l		
	OTM	DT	TL	OTM	DT	TL
1	0,78	2,72	38,40	3,45	9,16	61,01
2	4,86	11,29	68,79	12,72	23,65	108,56
3	0,62	1,89	38,74	5,12	12,40	67,85
4	1,66	3,86	42,37	8,18	15,18	89,43
5	1,22	3,45	39,11	5,54	11,96	68,21
6	2,77	6,79	56,30	11,15	19,82	89,42
7	1,64	6,45	52,04	7,31	14,53	87,14
8	0,97	2,83	39,83	3,59	8,96	65,92
9	1,13	4,17	38,88	3,69	7,86	61,52
10	1,97	6,54	50,43	9,26	17,40	81,70
MW	1,76	5,00	46,49	7,00	14,09	78,08
Median	1,43	4,01	41,10	6,43	13,46	74,96
SD	1,26	2,81	10,22	3,29	5,09	15,62

Tabelle 16.4: Ergebnisse der Einzelzellgelelektrophorese bei Lymphozyten - Teil 4

ID	Glycerin			Positiv (MMS)		
	6,0 mol/l			200 µM		
	OTM	DT	TL	OTM	DT	TL
1	6,10	14,20	80,26	4,11	11,14	73,03
2	4,47	10,02	73,72	5,14	12,83	73,70
3	7,57	17,75	78,22	3,15	8,68	69,52
4	9,35	16,36	90,30	1,10	2,67	35,68
5	5,31	11,68	73,84	9,07	21,02	89,15
6	9,85	18,35	96,37	9,38	22,20	91,62
7	7,94	14,09	99,31	1,20	3,15	44,48
8	5,47	12,79	75,50	1,80	5,78	50,14
9	2,30	5,31	64,71	3,33	9,65	70,82
10	6,10	12,26	85,03	7,14	17,80	94,49
MW	6,45	13,28	81,73	4,54	11,49	69,26
Median	6,10	13,44	79,24	3,72	10,39	71,93
SD	2,29	3,87	10,94	3,08	6,98	20,21

Tabelle 17.1 – Tabelle 17.2: Ausführliche Wertetabellen zum Thema 3.3 – **Mikrokern-Test bei Lymphozyten**. 1Ker: Einkernige Zellen; 2Ker: Zweikernige Zellen; MeKern: Mehrkernige Zellen; Mitos: Mitosen; Apopt: Apoptosen (Jeweils auf 1000 Zellen); MikroK: Mikrokerne (Auf 1000 Doppelkernige Zellen); MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung

Tabelle 17.1: Ergebnisse des Mikrokern-Tests bei Lymphozyten - Teil 1

	Negativ (Medium)					
ID	1Ker	2Ker	MeKern	Mitos	Apopt	MikroK
1	330	636	32	2	0	8
2	212	720	50	16	2	9
3	236	669	87	6	2	5
4	295	621	75	7	2	4
5	179	724	83	11	3	4
6	191	717	85	7	0	6
7	176	725	94	4	1	6
8	138	760	94	6	2	4
9	140	745	111	4	0	3
10	159	706	131	4	0	5
MW	205,6	702,3	84,2	6,7	1,2	5,4
Median	185,0	718,5	86,0	6,0	1,5	5,0
SD	64,4	45,7	28,1	4,1	1,1	1,9

Tabelle 17.2: Ergebnisse des Mikrokern-Tests bei Lymphozyten - Teil 2

	0,01 mol/l Glycerin					
ID	1Ker	2Ker	MeKern	Mitos	Apopt	MikroK
1	301	629	64	4	2	8
2	258	662	72	6	2	11
3	237	673	82	8	0	9
4	214	693	83	9	1	9
5	154	694	139	13	0	5
6	214	659	119	7	1	6
7	185	675	130	8	2	7
8	210	705	79	5	1	5
9	203	681	110	6	0	1
10	393	489	114	3	1	3
MW	236,9	656,0	99,2	6,9	1,0	6,4
Median	214,0	674,0	96,5	6,5	1,0	6,5
SD	67,8	62,5	26,3	2,8	0,8	3,0

Tabelle 17.3 – Tabelle 17.4: Ausführliche Wertetabellen zum Thema 3.3 – **Mikrokern-Test bei Lymphozyten**. 1Ker: Einkernige Zellen; 2Ker: Zweikernige Zellen; MeKern: Mehrkernige Zellen; Mitos: Mitosen; Apopt: Apoptosen (Jeweils auf 1000 Zellen); MikroK: Mikrokerne (Auf 1000 Doppelkernige Zellen); MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung

Tabelle 17.3: Ergebnisse des Mikrokern-Tests bei Lymphozyten - Teil 3

	0,1 mol/l Glycerin					
ID	1Ker	2Ker	MeKern	Mitos	Apopt	MikroK
1	235	699	57	7	2	7
2	254	641	95	8	2	6
3	262	651	66	13	8	17
4	232	690	68	8	2	5
5	218	666	98	6	2	3
6	164	680	144	12	0	3
7	190	684	122	4	0	3
8	174	733	90	3	0	7
9	199	697	97	7	0	2
10	212	700	83	5	0	15
MW	214,0	684,1	92,0	7,3	1,6	6,8
Median	215,0	687,0	92,5	7,0	1,0	5,5
SD	32,6	26,6	26,3	3,2	2,5	5,2

Tabelle 17.4: Ergebnisse des Mikrokern-Tests bei Lymphozyten - Teil 4

	1,0 mol/l Glycerin					
ID	1Ker	2Ker	MeKern	Mitos	Apopt	MikroK
1	282	665	46	6	1	7
2	590	314	72	19	5	20
3	514	426	43	15	2	10
4	458	466	67	6	3	4
5	251	647	96	6	0	30
6	261	655	79	5	0	3
7	181	680	133	5	1	6
8	236	663	97	3	1	4
9	284	640	74	2	0	3
10	496	439	62	3	0	3
MW	355,3	559,5	76,9	7,0	1,3	9,0
Median	283,0	643,5	73,0	5,5	1,0	5,0
SD	143,5	133,7	26,6	5,5	1,6	9,0

Tabelle 17.5: Ausführliche Wertetabellen zum Thema 3.3 – **Mikrokern-Test bei Lymphozyten**. 1Ker: Einkernige Zellen; 2Ker: Zweikernige Zellen; MeKern: Mehrkernige Zellen; Mitos: Mitosen; Apopt: Apoptosen (Jeweils auf 1000 Zellen); MikroK: Mikrokerne (Auf 1000 Doppelkernige Zellen); MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung

Tabelle 17.5: Ergebnisse des Mikrokern-Tests bei Lymphozyten - Teil 5

	Positiv (1 µg/ml MMC)					
ID	1Ker	2Ker	MeKern	Mitos	Apopt	MikroK
1	291	634	50	21	4	33
2	353	576	48	16	5	39
3	284	639	39	33	5	35
4	472	455	58	14	1	31
5	206	670	114	9	1	64
6	361	511	120	8	0	17
7	198	723	90	8	1	25
8	225	690	69	13	3	31
9	196	721	68	15	0	61
10	439	480	71	9	1	50
MW	302,5	609,9	72,7	14,6	2,1	38,6
Median	287,5	636,5	68,5	13,5	1,0	34,0
SD	100,8	99,1	27,4	7,7	2,0	15,2

6.4 Abbildungsnachweis

Es handelt sich ausschließlich um eigene Abbildungen, ausgenommen sind:

Abbildung 2: aus Kuntz B und Lampert T (2016) "Smoke on the water" – Wasserpfeifenkonsum bei Jugendlichen in Deutschland (Ergebnisse aus KiGGS Welle 1). UMID 01/2016, S. 18-25

Abbildung 5: aus Glauner B (2006) Stromausschlussverfahren - Standardisierung der Vitalitätsbestimmung. BIOspektrum 12, S. 394

6.5 Literaturverzeichnis

- Aigner K (2016) **Vormarsch der Wasserpfeifen - eine Literaturrecherche.** Atemwegs Lungenkrankh 42, S. 434
- Akl EA, Gunukula SK, Aleem S, Obeid R, Jaoude PA, Honeine R und Irani J (2011) **The prevalence of waterpipe tobacco smoking among the general and specific populations: a systematic review.** BMC Public Health 11, S. 244
- Al Mulla A, Fanous N, Seidenberg AB und Rees VW (2015) **Secondhand smoke emission levels in waterpipe cafes in Doha, Qatar.** Tob Control 24, S. 227-231
- Albertini RJ, Anderson D, Douglas GR, Hagmar L, Hemminki K, Merlo F, Natarajan AT, Norppa H, Shuker DEG, Tice R, Waters MD und Aitio A (2000) **IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans.** Mutat Res Rev Mutat Res 463, S. 111-172
- Alsatari ES, Azab M, Khabour OF, Alzoubi KH und Sadiq MF (2012) **Assessment of DNA damage using chromosomal aberrations assay in lymphocytes of waterpipe smokers.** Int J Occup Med Environ Health 25, S. 218-224
- Amrock SM, Gordon T, Zelikoff JT und Weitzman M (2014) **Hookah Use Among Adolescents in the United States: Results of a National Survey.** Nicotine Tob Res 16, S. 231-237
- Avelar-Freitas BA, Almeida VG, Pinto MCX, Mourão FAG, Massensini AR, Martins-Filho OA, Rocha-Vieira E und Brito-Melo GEA (2014) **Trypan blue exclusion assay by flow cytometry.** Braz J Med Biol Res 47, S. 307-315
- Aysun A, Yağmur K und Yusuf B (2016) **Cell proliferation and cytotoxicity assays.** Curr Pharm Biotechnol 17, S. 1213-1221
- Baker RR und Bishop LJ (2004) **The pyrolysis of tobacco ingredients.** J Anal Appl Pyrolysis 71, S. 223-311
- Barnes B, Kraywinkel K, Nowossadeck E, Schönfeld I, Starker A, Wienecke A und Wolf U (2016) **Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016.** Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut (Hrsg). Berlin, 2016

- Bartsch W, Sponer G, Dietmann K und Fuchs G (1976) **Acute toxicity of various solvents in the mouse and rat. LD50 of ethanol, diethylacetamide, dimethylformamide, dimethylsulfoxide, glycerine, N-methylpyrrolidone, polyethylene glycol 400, 1,2-propanediol and Tween 20.** *Arzneimittelforschung* 26, S. 1581-1583
- Batra A, Petersen KU, Hoch E, Andreas S, Bartsch G, Gohlke H, Jähne A, Kröger C, Lindinger P und Mühlig S (2016) **S3-Leitlinie „Screening, Diagnostik und Behandlung des schädlichen und abhängigen Tabakkonsums“.** *SUCHT* 62, S. 125-138
- Beranek DT (1990) **Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents.** *Mutat Res* 231, S. 11-30
- Boller K und Schmid W (1970) **Chemical mutagenesis in mammals. The Chinese hamster bone marrow as an in vivo test system. Hematological findings after treatment with trenimon.** *Humangenetik* 11, S. 35-54
- Bonassi S, El-Zein R, Bolognesi C und Fenech M (2011) **Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes and cancer risk: evidence from human studies.** *Mutagenesis* 26, S. 93-100
- Bundesinstitut für Risikobewertung (2009) **Gesundheits- und Suchtgefahren durch Wasserpfeifen.** Aktualisierte Gesundheitliche Bewertung Nr. 011/2009 des BfR vom 26. März 2009. Berlin, 2009
- Carlsen A und Wieth JO (1976) **Glycerol transport in human red cells.** *Acta Physiol Scand* 97, S. 501-513
- Carmines EL und Gaworski CL (2005) **Toxicological evaluation of glycerin as a cigarette ingredient.** *Food Chem Toxicol* 43, S. 1521-1539
- CDC (zitiert am 06.04.2018) **CDC. Global Tobacco Surveillance System Data (GTSSData),** <https://nccd.cdc.gov/GTSSData/default/>
- Countryman PI und Heddle JA (1976) **The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes.** *Mutat Res* 41, S. 321-331

- DFG (2012a) **2-Propenal (Acrolein) [MAK Value Documentation in German language, 1997]**. In: The MAK-Collection for Occupational Health and Safety, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA
- DFG (2012b) **Glycerin [MAK Value Documentation in German language, 2007]**. In: The MAK-Collection for Occupational Health and Safety, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA
- Doolittle DJ, Lee DA und Lee CK (1988) **The genotoxic activity of glycerol in an in vitro test battery**. Food Chem Toxicol 26, S. 631-635
- Eker ED, Koyuncu H, Şahin NÖ, Yüksel A, Berköz M, Diler SB und Akgül SA (2016) **Determination of genotoxic effects of hookah smoking by micronucleus and chromosome aberration methods**. Med Sci Monit 22, S. 4490-4494
- Endres K (2003) **Zellzykluseffekte von Mitomycin C - cellcycle effects of mitomycin C**. Dissertation, Institut für Humangenetik der Universität Würzburg
- Europäisches Parlament und Europäischer Rat (2014) **Richtlinie 2014/40/EU des Europäischen Parlaments und des Rates vom 3. April 2014 zur Angleichung der Rechts- und Verwaltungsvorschriften der Mitgliedstaaten über die Herstellung, die Aufmachung und den Verkauf von Tabakerzeugnissen und verwandten Erzeugnissen und zur Aufhebung der Richtlinie 2001/37/EG. 3**
- Faust F, Kassie F, Knasmüller S, Boedecker RH, Mann M und Mersch-Sundermann V (2004) **The use of the alkaline comet assay with lymphocytes in human biomonitoring studies**. Mutat Res Rev Mutat Res 566, S. 209-229
- Fenech M (2007) **Cytokinesis-block micronucleus cytome assay**. Nat Protoc 2, S. 1084-1104
- Fenech M, Holland N, Chang WP, Zeiger E und Bonassi S (1999) **The HUMAN MicroNucleus Project—An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans**. Mutat Res 428, S. 271-283
- Fenech M und Morley AA (1985) **Measurement of micronuclei in lymphocytes**. Mutat Res Environ Mutagen Relat Subj 147, S. 29-36

- Fromme H und Schober W (2016) **The waterpipe (shisha) – indoor air quality, human biomonitoring, and health effects**. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz, S. 1-12
- Galloway SM, Deasy DA, Bean CL, Kraynak AR, Armstrong MJ und Bradley MO (1987) **Effects of high osmotic strength on chromosome aberrations, sister-chromatid exchanges and DNA strand breaks, and the relation to toxicity**. Mutat Res 189, S. 15-25
- Glauner B (2006) **Stromausschlussverfahren - Standardisierung der Vitalitätsbestimmung**. BIoSpektrum 12, S. 394
- Gültekin B, Sarisu S und Okudu E (2015) **Von der Zigarette zur aromatisierten Wasserpfeife. Wird die Wasserpfeife als Genussmittel im Vergleich zum klassischen Zigarettentabak bevorzugt?** Technische Universität Berlin, Projektarbeit
- Hadidi KA und Mohammed FI (2004) **Nicotine content in tobacco used in hubble-bubble smoking**. Saudi Med J 25, S. 912-917
- Henderson L, Wolfreys A, Fedyk J, Bourner C und Windebank S (1998) **The ability of the Comet assay to discriminate between genotoxins and cytotoxins**. Mutagenesis 13, S. 89-94
- Herth FJF, Kappes J, Ehmann M, Kraft A, Kreuter M und Bischof H (2009) **Wasserpfeife – Wie häufig wird sie von Jugendlichen benutzt?** Pneumologie 63 S01, S. 47
- Hille-Rehfeld A (2007) **Acrolein: Doppelflinte im Zigarettenrauch**. Biol Unserer Zeit 37, S. 15
- Horn F (2012) **Biochemie des Menschen: das Lehrbuch für das Medizinstudium**, 5. Aufl., Georg Thieme Verlag, S. 143-144
- Inoue A, Yokomori K, Tanabe H, Mizusawa H, Sofuni T, Hayashi Y, Tsuchida Y und Shimatake H (1997) **Extensive genetic heterogeneity in the neuroblastoma cell line NB(TU)1**. Int J Cancer 72, S. 1070-1077
- Jazbinsek D (2015) **Totgesagte leben länger**. In: Lobby Work: Interessenvertretung als Politikgestaltung, Hrsg. Speth R und Zimmer A, Springer Fachmedien Wiesbaden, Wiesbaden, S. 343-356

- Joossens L und Raw M (2006) **The Tobacco Control Scale: a new scale to measure country activity**. *Tob Control* 15, S. 247-253
- Joossens L und Raw M (2014) **The Tobacco Control Scale 2013 in Europe**. Association of the European Cancer Leagues. Brüssel, 2014
- Joossens L und Raw M (2017) **The Tobacco Control Scale 2016 in Europe**. Association of the European Cancer Leagues. Brüssel, 2017
- Khabour OF, Alsatari ES, Azab M, Alzoubi KH und Sadiq MF (2011) **Assessment of genotoxicity of waterpipe and cigarette smoking in lymphocytes using the sister-chromatid exchange assay: a comparative study**. *Environ Mol Mutagen* 52, S. 224-228
- Kleinsasser NH, Juchhoff J, Wallner BC, Bergner A, Harréus UA, Gamarra F, Bührlen M, Huber RM und Rettenmeier AW (2004) **The use of mini-organ cultures of human upper aerodigestive tract epithelia in ecogenotoxicology**. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* 561, S. 63-73
- Kleinsasser NH, Wallner BC, Kastenbauer ER, Muenzenrieder RK und Harréus UA (2000) **Comparing the genotoxic sensitivities of human peripheral blood lymphocytes and mucosa cells of the upper aerodigestive tract using the Comet assay**. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* 467, S. 21-30
- Knasmueller S, Holland N, Wultsch G, Jandl B, Burgaz S, Mišák M und Nersesyan A (2011) **Use of nasal cells in micronucleus assays and other genotoxicity studies**. *Mutagenesis* 26, S. 231-238
- Kuntz B und Lampert T (2015) **Wasserpfeifenkonsum (Shisha-Rauchen) bei Jugendlichen in Deutschland**. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 58, S. 467-473
- Kuntz B und Lampert T (2016) **“Smoke on the water “–Wasserpfeifenkonsum bei Jugendlichen in Deutschland (Ergebnisse aus KiGGS Welle 1)**. *UMID 01/2016*, S. 18-25
- Kuntz B, Zeiher J, Lange C und Lampert T (2017) **Zeitliche Entwicklung des Absatzes von Tabakwaren in Deutschland**. *Journal of Health Monitoring* 2, S. 82-89

- Lampert T, von der Lippe E und Müters S (2013) **Prevalence of smoking in the adult population of Germany.** Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz 56, S. 802-808
- Löffler G und Petrides PE (2006) **Biochemie und Pathobiochemie**, 8. Aufl., Springer-Verlag, S. 373
- Maziak W, Taleb ZB, Bahelah R, Islam F, Jaber R, Auf R und Salloum RG (2015) **The global epidemiology of waterpipe smoking.** Tob Control 24, S. 3-12
- McAdam K, Eldridge A, Fearon IM, Liu C, Manson A, Murphy J und Porter A (2016) **Influence of cigarette circumference on smoke chemistry, biological activity, and smoking behaviour.** Regul Toxicol Pharmacol 82, S. 111-126
- Meyer JS, Charney JZ, Rivera VM und Mathew NT (1971) **Treatment with glycerol of cerebral oedema due to acute cerebral infarction.** Lancet 2, S. 993-997
- Moghe A, Ghare S, Lamoreau B, Mohammad M, Barve S, McClain C und Joshi-Barve S (2015) **Molecular Mechanisms of Acrolein Toxicity: Relevance to Human Disease.** Toxicol Sci 143, S. 242-255
- Moller P (2005) **Genotoxicity of environmental agents assessed by the alkaline comet assay.** Basic Clin Pharmacol Toxicol 96 Suppl 1, S. 1-42
- Monn C, Kindler P, Meile A und Brändli O (2007) **Ultrafine particle emissions from waterpipes.** Tob Control 16, S. 390-393
- Mons U (2011) **Tabakattributable Mortalität in Deutschland und in den deutschen Bundesländern – Berechnungen mit Daten des Mikrozensus und der Todesursachenstatistik.** Gesundheitswesen 73, S. 238-246
- Mons U (2017) **Tabakpräventionspolitik in Deutschland: Nachholbedarf trotz einiger Fortschritte.** Karger Kompass Pneumol 5, S. 6
- Monzer B, Sepetdjian E, Saliba N und Shihadeh A (2008) **Charcoal emissions as a source of CO and carcinogenic PAH in mainstream narghile waterpipe smoke.** Food Chem Toxicol 46, S. 2991-2995

- OECD (2002) **SIDS initial assessment report: glycerol**. SIAM 14. Paris, 2002
- Olive PL und Banath JP (2006) **The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells**. Nat Protoc 1, S. 23-29
- Osiander-Fuchs H (2015) **Wasserpfeifentabak - Untersuchungsergebnisse 2014**. Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, URL: www.lgl.bayern.de/produkte/tabak/tabakerzeugnisse/ue_2014_wasserpfeifentabak.htm [Stand: 20.07.2018]
- Ostling O und Johanson KJ (1984) **Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells**. Biochem Biophys Res Commun 123, S. 291-298
- Paz MM, Das A und Tomasz M (1999) **Mitomycin C linked to DNA minor groove binding agents: synthesis, reductive activation, DNA binding and cross-linking properties and in vitro antitumor activity**. Bioorg Med Chem 7, S. 2713-2726
- Piontek D, Atzendorf J, Gomes de Matos E und Kraus L (2016) **Kurzbericht Epidemiologischer Suchtsurvey 2015. Tabellenband: Tabakkonsum und Hinweise auf klinisch relevanten Tabakkonsum nach Geschlecht und Alter im Jahr 2015**. München: IFT Institut für Therapieforschung, München
- Pötschke-Langer M (2015) **Tabakatlas Deutschland 2015**, 1. Auflage, Deutsches Krebsforschungszentrum, www.dkfz.de. URL: <https://www.dkfz.de/de/tabakkontrolle/download/Publikationen/sonstVeroeffentlichungen/Tabakatlas-2015-final-web-dp-small.pdf> [Stand: 14.04.2018]
- Quispe CAG, Coronado CJR und Carvalho Jr JA (2013) **Glycerol: Production, consumption, prices, characterization and new trends in combustion**. RENEW SUST ENERG REV 27, S. 475-493
- Ramachandra SS und Yaldrum A (2015) **Shisha smoking: An emerging trend in Southeast Asian nations**. J Public Health Policy 36, S. 304-317
- Rashidi MA, Shihadeh A und Saliba NA (2008) **Volatile aldehydes in the mainstream smoke of the narghile waterpipe**. Food Chem Toxicol 46, S. 3546-3549

- Renne RA, Wehner AP, Greenspan BJ, Deford HS, Ragan HA, Westerberg RB, Buschbom RL, Burger GT, Hayes AW, Suber RL und Mosberg AT (1992) **2-week and 13-week inhalation studies of aerosolized glycerol in rats.** *Inhal Toxicol* 4, S. 95-111
- Schaller K und Pötschke-Langer M (2016) **Tabakkontrolle in Deutschland und Europa-Erfolge und Defizite.** *Prävention und Rehabilitation* 28, S. 45-53
- Schärfe SSG, Reutlingen (2004) **Elektronische Zellvitalitätsbestimmung, ein Vergleich mit dem klassischen Trypanblau Assay.** *BIOSpektrum* 10, S. 334-336
- Schubert J, Hahn J, Dettbarn G, Seidel A, Luch A und Schulz TG (2011) **Mainstream smoke of the waterpipe: Does this environmental matrix reveal as significant source of toxic compounds?** *Toxicol Lett* 205, S. 279-284
- Schumacher A und Vagts DA (2007) **Nikotin.** In: *Suchtmittel in der AINS*, Hrsg. Vagts DA, Verlag: Springer Berlin Heidelberg, S. 157-167
- Schwarzer M, Thomas J, Nedela-Morales M, Kaltenbach M, Herrmann E und Groneberg D (2015) **Zur Selbsteinschätzung des Wasserpfeifenkonsums von Jugendlichen.** *Psychiatr Prax* 42, S. 47-49
- Sepetdjian E, Shihadeh A und Saliba NA (2008) **Measurement of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons in narghile waterpipe tobacco smoke.** *Food Chem Toxicol* 46, S. 1582-1590
- Shihadeh A (2003) **Investigation of mainstream smoke aerosol of the argileh water pipe.** *Food Chem Toxicol* 41, S. 143-152
- Shihadeh A, Azar S, Antonios C und Haddad A (2004) **Towards a topographical model of narghile water-pipe café smoking: a pilot study in a high socioeconomic status neighborhood of Beirut, Lebanon.** *Pharmacol Biochem Behav* 79, S. 75-82
- Shihadeh A und Saleh R (2005) **Polycyclic aromatic hydrocarbons, carbon monoxide, "tar", and nicotine in the mainstream smoke aerosol of the narghile water pipe.** *Food Chem Toxicol* 43, S. 655-661

- Singh NP, McCoy MT, Tice RR und Schneider EL (1988) **A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells**. *Exp Cell Res* 175, S. 184-191
- Soule EK, Lipato T und Eissenberg T (2015) **Waterpipe tobacco-smoking: a new smoking epidemic among the young?** *Curr Pulmonol Rep* 4, S. 163-172
- Spitz MR, Wei Q, Dong Q, Amos CI und Wu X (2003) **Genetic susceptibility to lung cancer**. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 12, S. 689
- Statistisches Bundesamt (2017) **Steuereinnahmen aus der Tabaksteuer in Deutschland von 2002 bis 2016 (in Milliarden Euro)**. In Statista - Das Statistik-Portal, Zugriff am 21.01.2018, von <https://de.statista.com/statistik/daten/studie/37837/umfrage/einnahmen-aus-der-tabaksteuer-in-deutschland/>
- Statistisches Bundesamt (2018) **Absatz von Pfeifentabak in Deutschland in den Jahren 2002 bis 2017 (in Tonnen)**. In Statista - Das Statistik-Portal, Zugriff am 21.01.2018, von <https://de.statista.com/statistik/daten/studie/303352/umfrage/absatz-von-pfeifentabak-in-deutschland/>
- Stein YS, Antal MJ und Jones M (1983) **A study of the gas-phase pyrolysis of glycerol**. *J Anal Appl Pyrolysis* 4, S. 283-296
- Steinberner U und Preuss W (1987) **Glycerin - Ein fettchemischer Grundstoff im Wandel der Zeit**. *Eur J Lipid Sci Technol* 89, S. 297-303
- Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC und Sasaki YF (2000) **Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing**. *Environ Mol Mutagen* 35, S. 206-221
- Tice RR, Andrews PW, Hirai O und Singh NP (1991) **The single cell gel (SCG) assay: an electrophoretic technique for the detection of DNA damage in individual cells**. In: *Biological reactive intermediates IV: molecular and cellular effects and their impact on human health*, Hrsg. Witmer CM, Snyder RR, Jollow DJ, et al., Springer New York, Boston, S. 157-164
- Tukey JW (1977) **Exploratory data analysis**. Addison-Wesley, Reading

- WHO (2002) **The world health report 2002: reducing risks, promoting healthy life**. World Health Organization, Genf
- WHO (2003) **WHO Framework Convention on Tobacco Control**. World Health Organization, Genf
- WHO (2005) **Waterpipe tobacco smoking: health effects, research needs and recommended actions by regulators**. World Health Organization, Genf
- WHO (2006) **Air quality guidelines. Global update 2005. Particulate matter**. World Health Organization, Genf
- WHO (2008) **WHO report on the global tobacco epidemic, 2008: the MPOWER package**. World Health Organization, Genf
- WHO (2015) **Media centre: Tobacco, fact sheet N 339**. World Health Organization, Genf
- Wienecke A, Barnes B, Lampert T und Kraywinkel K (2014) **Changes in cancer incidence attributable to tobacco smoking in Germany, 1999–2008**. *Int J Cancer* 134, S. 682-691
- Wolfram RM, Chehne F, Oguogho A und Sinzinger H (2003) **Narghile (water pipe) smoking influences platelet function and (iso-)eicosanoids**. *Life Sci* 74, S. 47-53
- Zhang B, Haji F, Kaufman P, Muir S und Ferrence R (2015) **'Enter at your own risk': a multimethod study of air quality and biological measures in Canadian waterpipe cafes**. *Tob Control* 24, S. 175-181
- Zhou S, Behrooz L, Weitzman M, Pan G, Vilcassim R, Mirowsky JE, Breysee P, Rule A und Gordon T (2017) **Secondhand hookah smoke: an occupational hazard for hookah bar employees**. *Tob Control* 26, S. 40-45

Kongressbeiträge und Publikationen:

Kongressbeiträge:

Uebelacker L, Bunk S, Hackenberg S, Kleinsasser NH (2016): **In-vitro-Exposition von humanen Nasenschleimhautzellen und Lymphozyten mit Glycerin als Bestandteil des Shisha-Tabaks.** 87. Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie, Düsseldorf, doi: <https://dx.doi.org/10.3205/16hnod059>

Publikationen:

Uebelacker L, Bunk S, Hochstöger J, Hackenberg S, Poier N, Ickrath P und Kleinsasser NH (2019) **In vitro-Exposition des Shisha-Tabak-Bestandteils Glycerin an humanen Mukosazellen und Lymphozyten.** Laryngo-Rhino-Otol 98, S. 398-407

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich folgenden Personen meinen besonderen Dank für das Zustandekommen dieser Arbeit aussprechen:

- Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h. c. Rudolf Hagen für die Möglichkeit in Ihrer Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten, plastische und ästhetische Operationen forschen zu dürfen
- meinem Doktorvater Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Norbert Kleinsasser, MHBA für die fürsorgliche Betreuung, die hilfreichen Ratschläge und die moralische Unterstützung beim Erstellen der Arbeit
- den Mitarbeitern der Forschungsgruppe Ökogenotoxikologie am Universitätsklinikum Würzburg, insbesondere Herrn Sebastian Bunk, Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Stephan Hackenberg und Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Agmal Scherzad, für die vielen Ratschläge und Anregungen
- Herrn Michael Kessler für die Einarbeitung in die labortechnischen Methoden und die stets nette Gesellschaft im Laboralltag
- Frau Petra Joa und ihrem Laborteam für die hervorragenden Arbeitsbedingungen
- dem gesamten Operations-Team der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten, plastische und ästhetische Operationen für die Entnahme der untersuchten Gewebeproben
- allen an der Studie beteiligten Probanden für das Zurverfügungstellen von Probenmaterialien
- zu guter Letzt meiner Familie und meiner Freundin für die stetige Unterstützung und Ermutigung beim Erstellen der Arbeit sowie eure innige Verbundenheit

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name:	Lukas Uebelacker
Geburtsdatum:	28.07.1993
Geburtsort:	Ulm
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	ledig

Schulischer Werdegang:

1999 – 2003	Grundschule Bimbach
2003 – 2012	Winfriedschule Fulda
Abschluss	Allgemeine Hochschulreife

Universitärer Werdegang:

Ab Oktober 2012	Studium der Humanmedizin in Würzburg
10/2012 – 08/2014	Vorklinischer Abschnitt
10/2014 – 10/2017	Klinischer Abschnitt
10/2017 – 10/2018	Praktisches Jahr
12/2018	Mündliches Examen M3

Würzburg, 16.07.2019