

Dartsch Scientific GmbH · Oskar-von-Miller-Str. 10 · D-86956 Schongau

Firma

Happy People GmbH

Lindwurmstr. 5

80337 München

Oskar-von-Miller-Straße 10
D-86956 Schongau, Germany

Fon Diessen: +49 8807 2759-650

Fon Schongau: +49 8861 256-5250

Fax: +49 8861 256-7162

Email: info@dartsch-scientific.com

Web: www.dartsch-scientific.com

1. Dezember 2014

TESTBERICHT

Toxische Wirkung von Tabakrauch im Vergleich zum Dampf ausgewählter E-Liquids nach Langzeitexposition kultivierter Lungenzellen des Menschen

Hintergrund

Die E-Zigarette oder elektronische Zigarette ist ein elektrisch beheiztes Gerät zur Verdampfung einer aromatisierten Flüssigkeit (E-Liquid). Das entstehende Aerosol wird vom Konsumenten inhaliert. Im Unterschied zur Zigarette findet beim Dampfen einer E-Zigarette kein Verbrennungsprozess statt. Nach den aktuellen Erkenntnissen sind elektrische Zigaretten eine bei weitem weniger schädliche Alternative zum Tabakrauchen und es werden bei Rauchern, die von Tabakrauch auf elektrische Zigaretten wechseln, gesundheitliche Vorteile erwartet.

Vor diesem Hintergrund sollte die Wirkung von Tabakrauch im Vergleich zum Dampf ausgewählter E-Liquids der Firma Happy People GmbH in München nach Langzeitexposition kultivierter Lungenzellen untersucht werden. Für die Untersuchungen wurden humane Adenokarzinomzellen des Menschen (Zelllinie A549; ECACC, Salisbury, UK) verwendet, welche – trotz ihres kanzerogenen Ursprungs – in der aktuellen Forschung häufig eingesetzt werden.

Verwendete Tabakzigaretten und E-Liquids

Die Untersuchungen wurden durchgeführt mit zwei verbreiteten Zigarettenmarken mittlerer Stärke mit jeweils 10 mg Teer, 0,8 mg Nikotin und 10 mg Kohlenmonoxid. Im Vergleich dazu wurden die folgenden E-Liquids der Firma Happy People GmbH getestet: (1) „Menthol“ mit 18 mg/ml Nikotin, (2) „Apfel“ mit 6 mg/ml Nikotin und (3) „Erdbeere mit Menthol“ mit 6 mg/ml Nikotin.

Erhalt des Primäreluats durch Simulation des Rauchens bzw. Dampfens

Um unter möglichst in vivo-nahen Bedingungen den Rauch bzw. Dampf aufzufangen, wurde eine spezielle Rauchapparatur konstruiert (Abbildung 1). Diese gestattet es, sowohl die Zugfrequenz als auch die Dauer und Tiefe der Züge zu variieren. Als Vorlage wurden für das Rauchen einer Zigarette 10 Züge mit jeweils 3-5 Sekunden Dauer und einer Pause von 30 Sekunden zwischen zwei Zügen angenommen. Für die E-Zigarette (EVOD, EU-Version, Verdampfer 2,2 Ω und Akku 3,7 V; KangerTech) wurden exakt die gleichen Bedingungen eingehalten. Der Rauch einer Zigarette bzw. Dampf analog einer Zigarette wurde durch eine Schlauchpumpe angesaugt und durch 20 ml Zellkulturmedium durchgeleitet. Dieses Primäreluat war im Falle der Tabakzigarette braungelb verfärbt; im Falle des Dampfes war keine Verfärbung feststellbar. Für beide Primäreluate wurde keine Abweichung vom neutralen pH-Wert größer als 0,3 pH-Einheiten festgestellt. Das Primäreluat wurde mit Porenfiltern (0,45 μ m Porengröße) sterilfiltriert und in den weiter unten beschriebenen Verdünnungen auf die Lungenzellen gegeben.

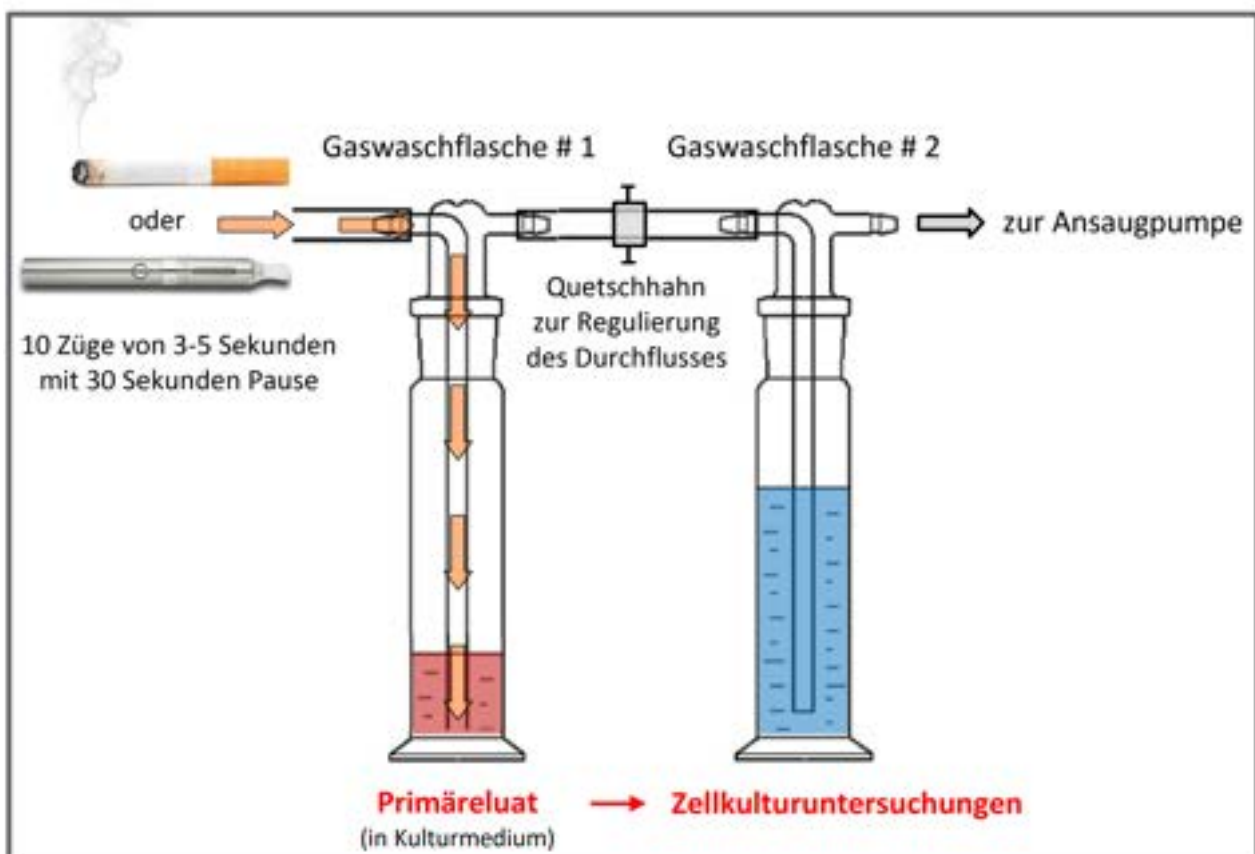


Abb. 1: Versuchsanordnung zur Simulation des Rauchens bzw. Dampfens. Durch die Ansaugpumpe auf der rechten Seite wird ein einstellbarer Unterdruck im System erzeugt, welcher zum Ansaugen und Ein-/Durchleiten des Rauches bzw. Dampfes in das Kulturmedium der Gaswaschflasche # 1 führt. So entsteht das Primäreluat, welches unverdünnt oder verdünnt für die weiteren zellbiologischen Untersuchungen verwendet wird.

Versuchsdurchführung

Die Lungenzellen wurden aus 80 % konfluenten Massenkulturen in neue Kulturschalen mit 55 cm² Wachstumsfläche und 9 ml Kulturmedium ausgesät. Die Zellzahl betrug dabei 1.000 Zellen/Schale, so dass sich die Zellen einzeln auf der Wachstumsfläche verteilen konnten. Die Zellen wurden in DMEM/Ham's F12 (1:1) mit 10 % fötalem Kälberserum und den üblichen Mengen an Penicillin und Streptomycin in einem Brutschrank bei 37 °C und einer Atmosphäre aus 5 % CO₂ und 95 % Luft inkubiert. Am Tag 2 nach der Aussaat wurde in die Kulturschalen jeweils 1 ml des unverdünnten Primäreluats sowie die weiteren Verdünnungen pipettiert. Dabei betrug die Konzentration des Primäreluats vom Tabakrauch im Test: 0 – 1 – 2,5 – 5 Vol% und vom Dampf der E-Liquids: 0 – 1 – 2,5 – 5 – 10 Vol% mit 0 Vol% als Kontrolle (= nur Kulturmedium ohne Primäreluat). Am Tag 8 wurde die verdunstete Menge an Flüssigkeit in den Kulturschalen durch Zugabe von 3 ml sterilem Wasser ausgeglichen und so die Osmolarität des Kulturmediums über die gesamte Versuchszeit weitgehend konstant gehalten. Die Zellen wurden für insgesamt 14 Tage nach der Aussaat inkubiert – davon 12 Tage unter dem Einfluss des Primäreluats.

In dieser Zeit ist üblicherweise nur ein Teil der Einzelzellen mitotisch aktiv und teilt sich, so dass nur bei diesen Zellen durch weitere Teilungen einzelne isolierte Zellklone (= Zellhaufen mit genetisch identischen Zellen) entstehen. Die Zahl dieser Zellklone und ihre Größe ist abhängig von der Kultivierungsumgebung und wird wegen der langen Expositionszeit von 12 Tagen beim Vorhandensein von toxisch wirkenden Substanzen im Primäreluat im Vergleich zu einer kurzzeitigen Exposition von 24 h deutlich verstärkt.

Nach Ablauf der Kultivierungsdauer wurde das Expositionsmedium abgesaugt und die Zellen in den Kulturschalen mit reinem Methanol fixiert und mit Coomassie-Giemsa nach Romanowsky gefärbt. Durch diese Farbstofflösung werden die Zellkerne rötlich und das Zytoplasma der Zellen blauviolett dargestellt. Die gefärbten Kulturen wurden luftgetrocknet und danach mit einem Makroobjektiv an einer Nikon D300 dSLR im Maßstab 1:2 fotografiert. Die Makrofotos der Klonkulturen (Abbildung 2) wurden durch digitale Bildanalyse (Wimasis Image Analysis, ibidi GmbH, München) ausgewertet. Die Versuchsergebnisse wie Klonierungseffizienz (= Anzahl der gebildeten Klone x 100/Zahl der ausgesäten Zellen), Klongröße und besiedelte Fläche der Kulturschale wurden in tabellarischer Form dargestellt. Die Untersuchungen wurden im dreifachen getrennten Versuchsansatz durchgeführt (n = 3).

V Versuchsergebnisse und Schlussfolgerungen

Wie aus Tabelle 1 und Abbildung 3 hervorgeht, führten die beiden höchsten getesteten Konzentrationen des Tabakrauches von 5 und 2,5 Vol% zu keinerlei Klonbildung. Auch Einzelzellen konnten unter dem Mikroskop nach der Expositionszeit nicht entdeckt werden. Daraus ist zu schließen, dass diese beiden Konzentrationen zu einem vollständigen Ab-

sterben der humanen Lungenzellen geführt haben. Erst bei der niedrigsten Testkonzentration von 1 Vol% wurden Klonierungsparameter festgestellt, welche nicht signifikant von den unbehandelten Kontrolle abwichen.

Ganz anders dagegen die Ergebnisse mit dem Dampf der E-Liquids (Tab. 2). Zwei der drei E-Liquids, nämlich „Apfel“ und „Erdbeere mit Menthol“, zeigten bei allen Testkonzentrationen eine Klonierungseffizienz, welche im Vergleich zur Kontrolle im gleichen Wertebereich oder sogar höher war. Dies galt für alle getesteten Konzentrationen. Das E-Liquid „Menthol“ und 18 mg/ml Nikotin zeigte eine konzentrationsabhängige Reduzierung der Klonierungseffizienz sowie der Besiedlungsfläche. Dabei versteht man unter diesem Begriff den prozentualen Flächenanteil einer Kulturschale, welcher von Zellen besiedelt ist. Diese geringfügige Reduktion der Klonierungsparameter im Langzeittest ist jedoch nicht auf einen toxischen Effekt zurück zu führen, sondern eher auf einer verminderte Zellteilungsaktivität möglicherweise durch den hohen Nikotingehalt von 18 mg/ml.

Zusammengefasst waren auch bei der Langzeitexposition die drei E-Liquids der Firma Happy People GmbH in München ohne toxische Wirkung auf die kultivierten humanen Lungenzellen. Lediglich die E-Liquid „Menthol“ mit 18 mg/ml Nikotin zeigte eine geringe dosisabhängige Verminderung der Zellteilungsaktivität. Dem kann durch die Verwendung der Formulierung mit einem niedrigeren Nikotingehalt begegnet werden. Im Gegensatz dazu sind beide getesteten Tabakzigaretten bei der Langzeitexposition in erheblichem Ausmaß toxisch, so dass aus gesundheitlichen Gründen dem Dampfen einer E-Zigarette mit einem der drei Liquids auf jeden Fall der Vorzug gegeben werden sollte.

Versuchsleiter und verantwortlich für die fachgerechte Durchführung und Auswertung der Untersuchungen.

Schongau, den 1. Dezember 2014



Prof. Dr. Peter C. Dartsch
Diplom-Biochemiker

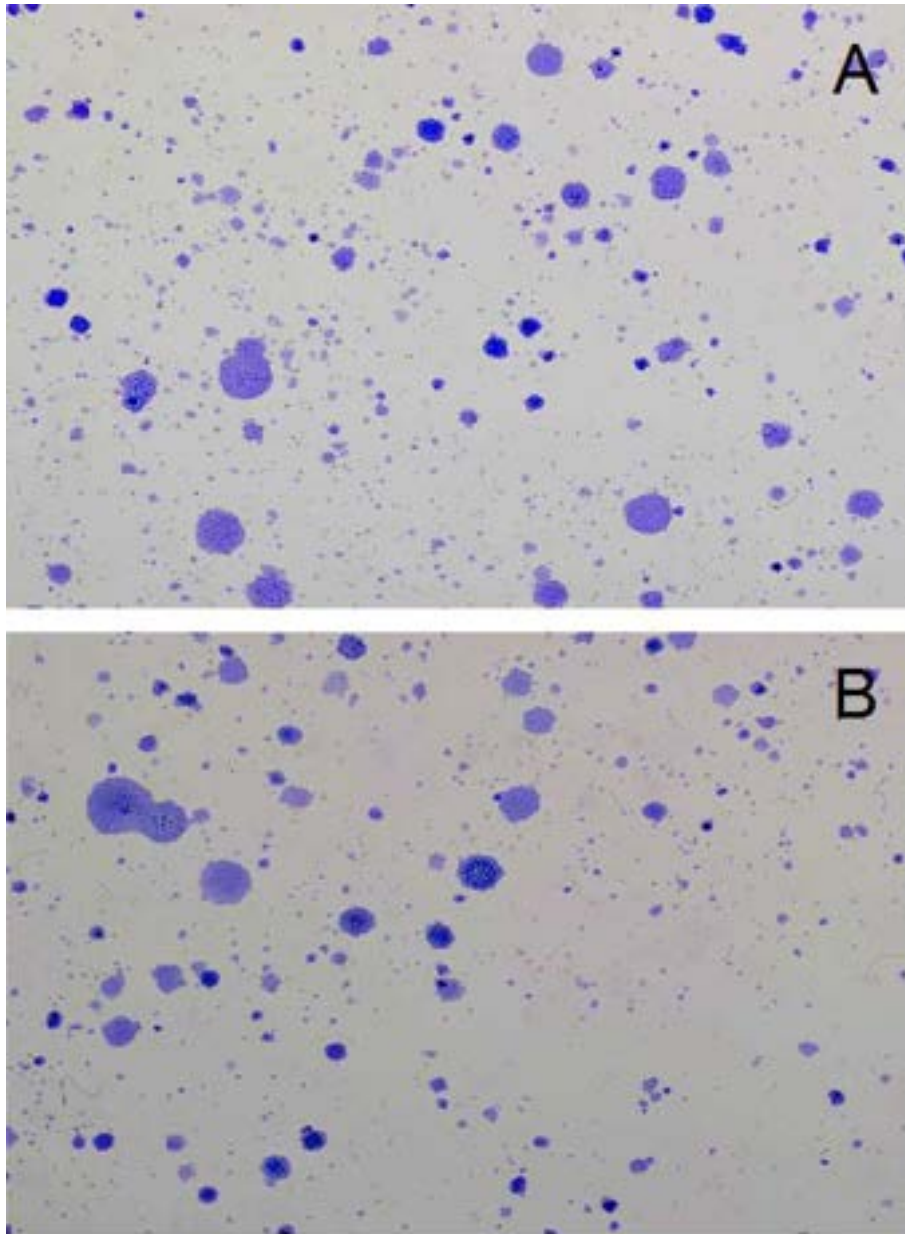


Abb. 2: Beispielhafte Makroaufnahmen der angefärbten Klonkulturen von dem E-Liquid „Erdbeere mit Menthol“ mit 6 mg/ml Nikotin bei einer Konzentration von 10 Vol% (A) und dem Rauch einer Tabakzigarette bei einer Konzentration von 1 Vol% (B). Es ist gut erkennbar, dass die Klonierungseffizienz beim E-Liquid-Dampf – trotz der zehnfach höheren Konzentration – immer noch höher ist als bei dem Rauch der Tabakzigarette. Diese Art von Makroaufnahmen wurden zur digitalisierten Bildauswertung mit der Wimasis Image Analysis-Software verwendet.

Tab. 1: Tabellarische Darstellung der Versuchsergebnisse für zwei Zigarettensorten mittlerer Stärke. Nähere Erläuterungen im Text.

Zigarettendrauch Marke 1

Probe	Klon.eff. [%] M.W.	±	Klon.eff. [%] S.E.M.	Klongröße [px] M.W.	±	Klongröße [px] S.E.M.	Bes. Fläche [%] M.W.	±	Bes. Fläche [%] S.E.M.
Kontrolle (= 0 Vol%)	3,82	±	0,30	11.216	±	974	9,25	±	1,18
Primäreluat 1 Vol%	3,75	±	0,28	11.343	±	894	10,36	±	2,01
Primäreluat 2,5 Vol%	0			0			0		
Primäreluat 5 Vol%	0			0			0		

Zigarettendrauch Marke 2

Probe	Klon.eff. [%] M.W.	±	Klon.eff. [%] S.E.M.	Klongröße [px] M.W.	±	Klongröße [px] S.E.M.	Bes. Fläche [%] M.W.	±	Bes. Fläche [%] S.E.M.
Kontrolle (= 0 Vol%)	3,82	±	0,30	11.216	±	974	9,25	±	1,18
Primäreluat 1 Vol%	3,95	±	0,41	10.440	±	935	7,63	±	1,04
Primäreluat 2,5 Vol%	0			0			0		
Primäreluat 5 Vol%	0			0			0		

Klon.eff. = Klonierungseffizienz für Klone > 5.000 px
Bes. Fläche = Besiedelte Fläche der Kulturschale

M.W. = Mittelwert
S.E.M. = Standardfehler von M.W.

px = Pixel

Tab. 2: Tabellarische Darstellung der Versuchsergebnisse für drei ausgewählte E-Liquids der Marke Happy Liquid. Nähere Erläuterungen im Text.

E-Liquid mit Menthol und 18 mg/ml Nikotin

Probe	Klon.eff. [%] M.W.	±	Klon.eff. [%] S.E.M.	Klongröße [px] M.W.	±	Klongröße [px] S.E.M.	Bes. Fläche [%] M.W.	±	Bes. Fläche [%] S.E.M.
Kontrolle (= 0 Vol%)	3,82	±	0,30	11.216	±	974	9,25	±	1,18
Primäreluat 1 Vol%	3,84	±	0,24	10.549	±	696	9,83	±	0,96
Primäreluat 2,5 Vol%	3,64	±	0,31	9.996	±	791	8,77	±	1,39
Primäreluat 5 Vol%	3,41	±	0,17	9.282	±	683	7,89	±	1,24
Primäreluat 10 Vol%	3,26	±	0,29	8.750	±	720	7,53	±	1,02

E-Liquid mit Apfel und 6 mg/ml Nikotin

Probe	Klon.eff. [%] M.W.	±	Klon.eff. [%] S.E.M.	Klongröße [px] M.W.	±	Klongröße [px] S.E.M.	Bes. Fläche [%] M.W.	±	Bes. Fläche [%] S.E.M.
Kontrolle (= 0 Vol%)	3,82	±	0,30	11.216	±	974	9,25	±	1,18
Primäreluat 1 Vol%	3,85	±	0,27	9.776	±	847	10,02	±	2,02
Primäreluat 2,5 Vol%	3,79	±	0,33	10.383	±	943	9,94	±	1,99
Primäreluat 5 Vol%	3,76	±	0,31	9.297	±	735	10,1	±	1,68
Primäreluat 10 Vol%	4,62	±	0,28	8.859	±	945	9,29	±	2,06

E-Liquid mit Erdbeer & Menthol und 6 mg/ml Nikotin

Probe	Klon.eff. [%] M.W.	±	Klon.eff. [%] S.E.M.	Klongröße [px] M.W.	±	Klongröße [px] S.E.M.	Bes. Fläche [%] M.W.	±	Bes. Fläche [%] S.E.M.
Kontrolle (= 0 Vol%)	3,82	±	0,30	11.216	±	974	9,25	±	1,18
Primäreluat 1 Vol%	3,95	±	0,41	10.437	±	996	9,57	±	1,84
Primäreluat 2,5 Vol%	4,63	±	0,35	10.381	±	664	9,71	±	1,67
Primäreluat 5 Vol%	4,80	±	0,32	9.543	±	891	10,22	±	1,89
Primäreluat 10 Vol%	4,92	±	0,42	9.144	±	927	10,13	±	2,21

Klon.eff. = Klonierungseffizienz für Klone > 5.000 px
 Bes. Fläche = Besiedelte Fläche der Kulturschale

M.W. = Mittelwert
 S.E.M. = Standardfehler von M.W.

px = Pixel

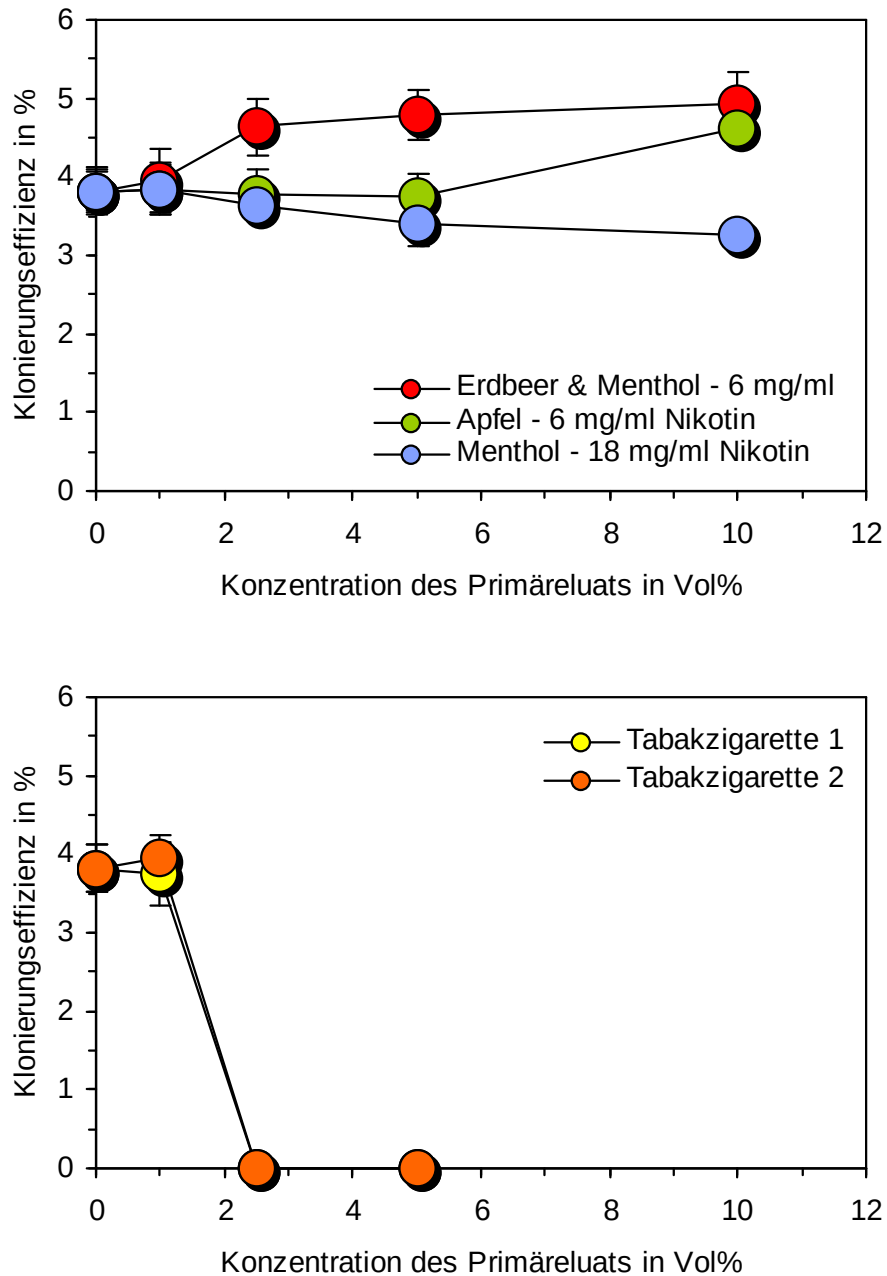


Abb. 3: Vergleichende graphische Darstellung der Versuchsergebnisse für drei ausgewählte E-Liquids der Marke Happy Liquid sowie der beiden Tabakzigaretten. Es ist nur die Klonierungseffizienz als aussagekräftigster Wert für die Langzeitvitalität der humanen Lungenzellen dargestellt. Abgebildet ist jeweils der Mittelwert $\pm$ Standardabweichung.