dartschSCIENTIFIC
INSTITUT FÜR ZELLBIOLOGISCHE TESTSYSTEME

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

My-eLiquid
Markus Steiner & Stephan Steiner GbR
Kistlerhofstraße 70

81379 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

28. April 2015

TESTBERICHT

Akuttoxische Wirkung von Zigarettenrauch im Vergleich zum Dampf aromatisierter E-Liquids der Marke My-eLiquid – Untersuchungen mit kultivierten Lungenzellen des Menschen –

Hintergrund

Nach den aktuellen wissenschaftlichen Erkenntnissen sind elektrische Zigaretten eine bei weitem weniger schädliche Alternative zum Zigarettenrauchen. Vor diesem Hintergrund sollte in dieser Studie die akuttoxische Wirkung von Zigarettenrauch im Vergleich zum Dampf von drei E-Liquids der Firma My eLiquid, 81379 München, mit kultivierten Lungenzellen des Menschen untersucht werden.

Verwendete Tabakzigarette und E-Liquids

Die Untersuchungen wurden durchgeführt mit einer verbreiteten Zigarettenmarke mittlerer Stärke mit 10 mg Teer, 0,8 mg Nikotin und 10 mg Kohlenmonoxid. Im Vergleich dazu wurden die drei folgenden E-Liquids der Firma My eLiquid, 81379 München, untersucht.

- My-eLiquid „Erdbeer“ mit 18 mg/ml Nikotin. Inhaltsstoffe: Glycerin, bidestilliertes Wasser, Aromen, Nikotin, E1520.
- My e-Liquid „Summersplash“ mit 18 mg/ml Nikotin. Inhaltsstoffe: Glycerin, bidestilliertes Wasser, Aromen, Nikotin, E1520, E1519, E1518.
- My-eLiquid „PINK Poisen“ mit 18 mg/ml Nikotin. Inhaltsstoffe: Glycerin, bidestilliertes Wasser, Aromen, Nikotin, Ethanol, E260, E270, E300, E1520, E1519, E1518.

Dabei wurden die E-Liquids mit Absicht so ausgewählt/zusammengesetzt, dass sie unterschiedliche erlaubte Lebensmittelzusatzstoffe enthalten. Die Lebensmittelzusatzstoffe im Einzelnen sind: Ethanol, E260 - Essigsäure (Konservierungs- und Säuerungsmittel), E270 - Milchsäure (Konservierungs- und Säuerungsmittel), E300 - Ascorbinsäure / Vitamin C

(Antioxidationsmittel), E320 - Butylhydroxyanisol (Antioxidationsmittel), E1518 - Triacetin (Trägermittel für Aromen), E1519 - Benzylalkohol (Trägermittel für Aromen) und E 1520 - Propylenglykol (Trägermittel für Aromen und zur Produktion von Dampf).

Simulation des Rauchens bzw. Dampfens

Um unter möglichst in vivo-nahen Bedingungen den Rauch bzw. Dampf aufzufangen, wurde eine speziell konstruierte Rauchapparatur verwendet (Abb. 1). Diese gestattet es, die Zugfrequenz und die Dauer und Tiefe der Züge zu variieren. Als Vorlage wurden für das Rauchen von zwei Tabakzigaretten 20 Züge mit jeweils 3 Sekunden Dauer und einer Pause von 15 Sekunden zwischen zwei Zügen angenommen. Siehe hierzu Vansickel AR et al. (2010): A clinical laboratory model for evaluating the acute effects of electronic “cigarettes”: Nicotine delivery profile and cardiovascular and subjective effects. Cancer Epidemiology, Biomarkers, and Prevention 19:1945–1953. Für die E-Zigarette einer handelsüblichen Sorte mit Verdampfer 2,2 Ω und Akku 3,7 V wurden die vergleichbaren Bedingungen eingehalten, d.h. es wurden 20 Züge mit jeweils 5 Sekunden Dauer durchgeführt. Anmerkung: Bei E-Zigaretten wird im Vergleich zur Tabakzigarette weniger stark, aber dafür deutlich langsamer und länger gezogen.

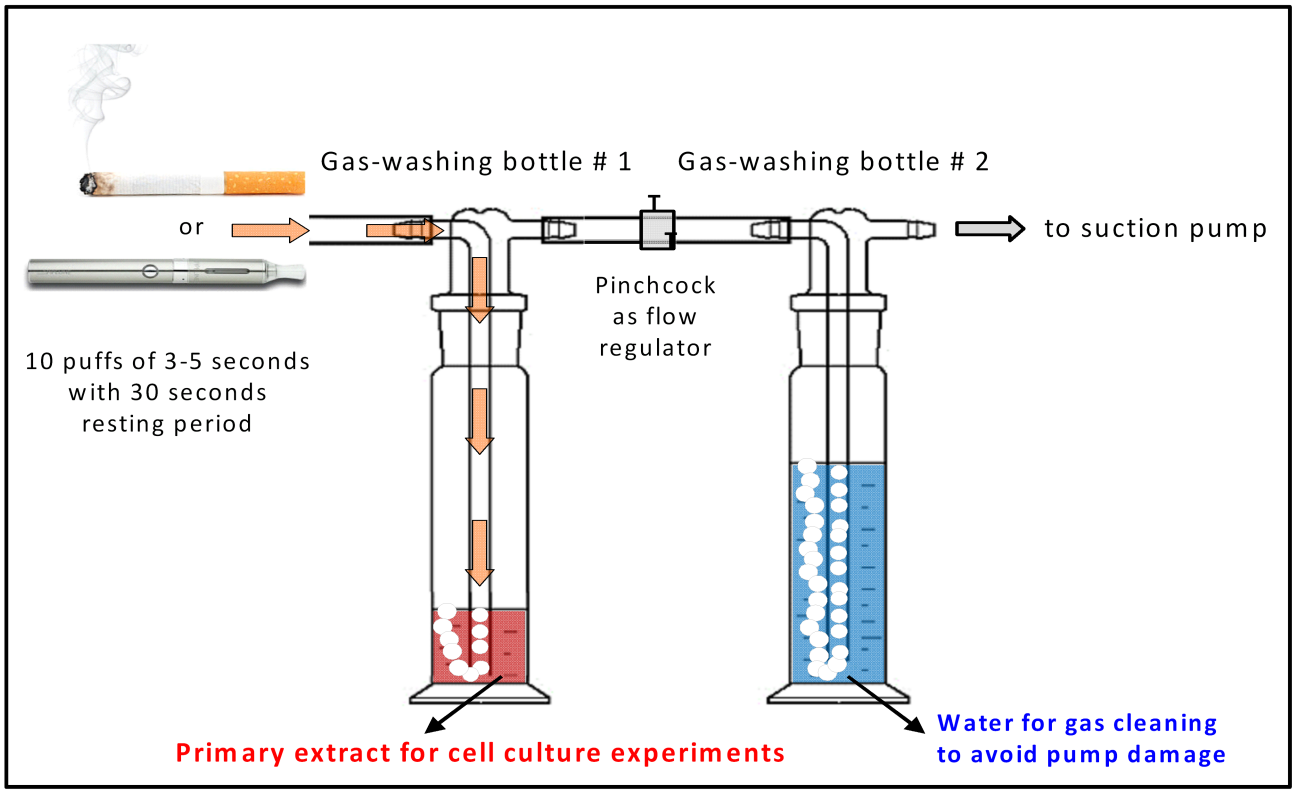

Abb. 1: Versuchsanordnung zur Simulation des Dampfens bzw. Rauchens. Für die zellbiologischen Untersuchungen wird nur das Primäreluat in der linken Gaswaschflasche verwendet, in welcher sich gepuffertes Kulturmedium zur Konstanthaltung des pH-Wertes während des Durchsaugens von E-Liquid-Dampf bzw. Zigarettenrauch befindet.

Der Rauch der Tabakzigaretten bzw. Dampf der E-Liquids wurde durch eine Schlauchpumpe angesaugt und durch 20 ml des 10 mM HEPES-gepufferten Zellkulturmediums geleitet. Dieses Primäreluat war im Falle der Tabakzigarette braungelb verfärbt; im Falle des Dampfes war keine Verfärbung feststellbar. Für alle Primäreluate wurde keine Abweichung vom neutralen pH-Wert festgestellt. Das Primäreluat wurde mit Porenfiltern (0,45 µm Porengröße) sterilfiltriert und in den im nächsten Abschnitt beschriebenen Verdünnungen bzw. Konzentrationen zu den Lungenzellkulturen gegeben.

Versuchsdurchführung

Für die Untersuchungen wurden humane Adenokarzinomzellen des Menschen (Zelllinie A549; European Collection of Animal Cell Cultures, Salisbury, UK) verwendet, welche – trotz ihres kanzerogenen Ursprungs – in der aktuellen zellbiologischen Forschung der Lunge häufig eingesetzt werden. Siehe hierzu Cervellati F et al.(2014): Comparative effects between electronic and cigarette smoke in human keratinocytes and epithelial lung cells. Toxicology in Vitro 28: 999-1005.

Für die Versuche wurden die Zellen aus 80-90 % konfluenten Massenkulturen in neue 96-Loch-Multiwellplatten (enzymatischer Test der Zellvitalität; 200 µl/Vertiefung) ausgesät. Dabei wurde die Zelldichte so gewählt, dass die Zellen während der gesamten Expositionszeit keine Konfluenz erreichten. Die Zellen wurden in DMEM/Ham's F12 (1:1) mit 10 % fötalem Kälberserum und den üblichen Mengen an Penicillin und Streptomycin kultiviert und in einem Brutschrank bei 37 °C und einer Atmosphäre aus 5 % CO_2 und 95 % Luft für 24 Stunden zum vollständigen Absetzen und Ausbreiten vorinkubiert. Danach wurde das Kulturmedium abgesaugt und durch eine Mischung aus frischem Kulturmedium und dem Primäreluat vom Zigarettenrauch bzw. E-Liquid-Dampf ersetzt. Dabei betrug die Konzentration des Primäreluats im Test: 0 – 10 – 25 – 50 – 100 Vol% mit 0 Vol% als Kontrolle (= nur Kulturmedium ohne Primäreluat) und 100 Vol% (= unverdünntes Primäreluat). Die Expositionszeit der Zellen betrug 24 Stunden. Danach wurden die Zellen auf sichtbare Zeichen einer akuttoxischen Wirkung durchmustert, das Kulturmedium abgesaugt und durch 190 µl frisches Kulturmedium und 10 µl des Tetrazoliumfarbstoffes WST-1 (Roche Diagnostics, Mannheim) ersetzt und für 60 min im Brutschrank inkubiert. Das rote Tetrazoliumsalz wird durch die Produktion von NAD(P)H während der Glykolyse metabolisch aktiver Zellen in ein wasserlösliches gelbes Formazan gespalten. Die gebildete Menge an Formazan korreliert dabei direkt mit der metabolischen Aktivität einer Zellpopulation. Die optischen Dichte (= Menge) an gebildetem Formazan kann kolorimetrisch bei einer definierten Wellenlänge gemessen werden. Daher wurde nach der Inkubationszeit von 60 min die optische Dichte als Differenzmessung ΔOD = 450 minus 690 nm in einem Elisareader (Bio-Tek Slx808, Bad Friedrichshall) nach einer 4 Sekunden-Schüttelperiode gemessen. Die erhaltenen Werte wurden aufgezeichnet und statistisch ausgewertet. Die Untersuchungen wurden im dreifachen Versuchsansatz durchgeführt.

dartschSCIENTIFIC
INSTITUT FÜR ZELLBIOLOGISCHE TESTSYSTEME

Versuchsergebnisse und Schlussfolgerungen

Die morphologischen Veränderungen der Lungenzellen nach der 24stündigen Expositionszeit mit dem Primäreluat vom Zigarettenrauch waren dramatisch und führten zu einem ausgeprägten Abrunden, Ablösen und Absterben der Zellen (nicht abgebildet). Selbst die niedrigste Testkonzentration von 10 Vol% bewirkte bereits einen mehr als 30%igen Vitalitätsverlust der Zellen und erreichte beim unverdünnten Primäreluat (= 100 Vol%) sein Maximum mit nur noch 3 % vitalen Zellen.

Ganz anders dagegen bei den Zellen, welche dem Dampf der E-Liquids ausgesetzt waren. Hier wurden bei allen Testkonzentrationen keinerlei morphologische Veränderungen der Lungenzellen beobachtet. Auch die enzymatisch bestimmte Zellvitalität nach Exposition mit dem Dampf der E-Liquids wich nicht statistisch signifikant von der Kontrolle ab (Wilcoxon-Mann-Whitney-Test; Abb. 2).

Zusammengefasst hat der Tabakrauch eine vielfach höhere Akuttoxizität als der Dampf der drei getesteten E-Liquids der Marke My-eLiquid. Bei den hier durchgeführten *in vitro*-Untersuchungen konnten für den E-Liquid-Dampf keinerlei akuttoxische Wirkungen bei kultivierten Lungenzellen des Menschen nach 24stündiger kontinuierlicher Einwirkungszeit festgestellt werden.

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

Schongau, den 28. April 2015

CELL-BIOLOGICALLY TESTED PRODUCT
dartsch SCIENTIFIC
2015
PRODUKT ZELLBIOLOGISCH GEPRÜFT

Prof. Dr. Peter C. Dartsch
Diplom-Biochemiker

dartschSCIENTIFIC
INSTITUT FÜR ZELLBIOLOGISCHE TESTSYSTEME

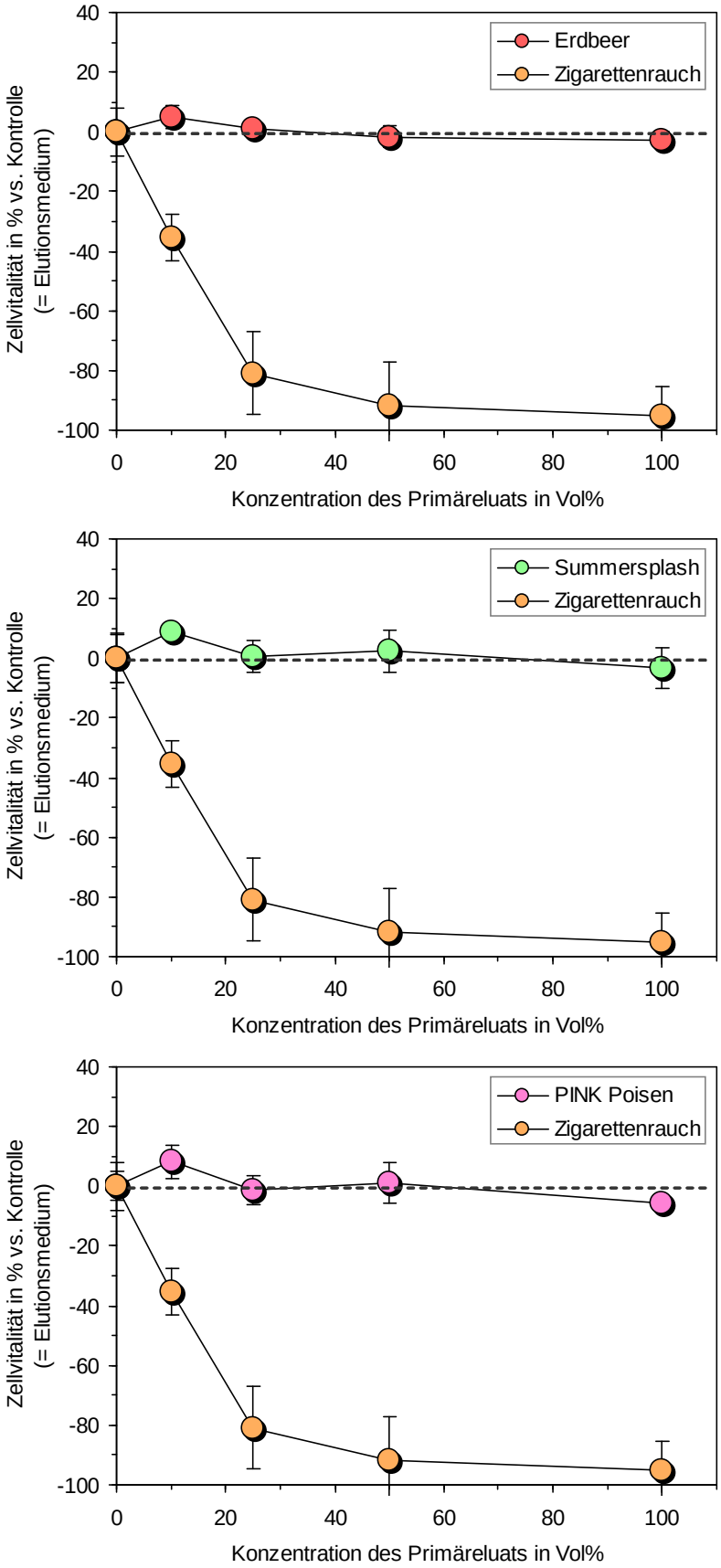

Abb. 2: Graphische Darstellung der Versuchsergebnisse zur akuttoxischen Wirkung von Zigarettenrauch im Vergleich zum Dampf der E-Liquids. Während das Primäreluat des Zigarettenrauches bereits bei 10 Vol% zu einem deutlichen Vitalitätsverlust der Lungenzellen führt, ist die Vitalität der Zellen selbst bei 100 Vol% des Dampfes – und damit dem unverdünnten Primäreluat – immer in einem Bereich, der statistisch nicht signifikant vom Kontrollwert abweicht. Angegeben ist der Mittelwert ± Standardabweichung aus 3 Versuchen.