dartschSCIENTIFIC
INSTITUT FÜR ZELLBIOLOGISCHE TESTSYSTEME

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

Firma
valeo laboratories GmbH
Lise-Meitner-Straße 21

D-25524 Itzehoe

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. Juni 2015

TESTBERICHT

Toxische Wirkung von E-Liquid-Dampf und Zigarettenrauch nach Langzeitexposition von kultivierten Lungenzellen des Menschen

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 beiden folgenden E-Liquids der Firma valeo laboratories GmbH, D-25524 Itzehoe, untersucht:

- Valeo Nikotin Liquid Sample mit 12 mg/ml Nikotin
- Valeo BioNic Liquid Nikotinsubstitut 1,5 %

Erhalt des Primäreluats durch Simulation des Rauchens bzw. Dampfens

Um unter möglichst realitätsnahen Bedingungen den Rauch bzw. Dampf aufzufangen, wurde eine spezielle 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 3-5 Sekunden Dauer und einer Pause von 15 bis 30 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 gleichen Bedingungen eingehalten, d.h. es wurden 20 Züge mit jeweils 3-5 Sekunden Dauer durchgeführt. Der Rauch der Tabakzigaretten bzw. Dampf der E-Liquids wurde durch eine Schlauchpumpe angesaugt und durch 20 ml eines 10 mM HEPES-gepufferten Zellkulturmediums (= Elutionsmedium) geleitet. Dieses Primäreluat war im Falle der Tabakzigarette braungelb verfärbt; im Falle des

dartschSCIENTIFIC
INSTITUT FÜR ZELLBIOLOGISCHE TESTSYSTEME

Dampfes war keine Verfärbung feststellbar. Für alle Primäreluate wurde keine Abweichung vom neutralen pH-Wert > 0,3 pH-Einheiten festgestellt. Das Primäreluat wurde mit Porenfiltern (0,45 µm Porengröße) sterilfiltriert und in den beschriebenen Verdünnungen bzw. Konzentrationen zu den Lungenzellkulturen zugegeben.

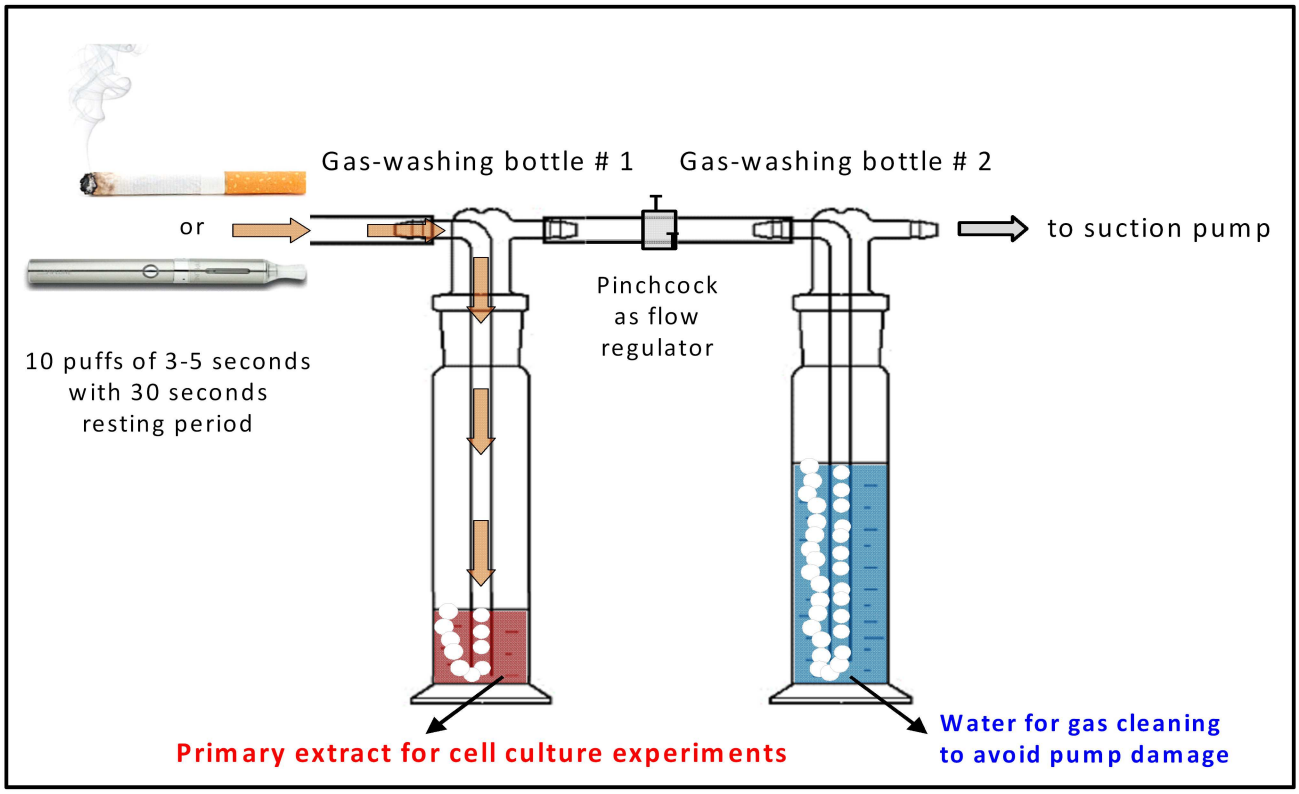

Abb. 1: Versuchsanordnung zur Simulation des Rauchens bzw. Dampfens. Durch die Ansaugpumpe auf der rechten Seite wird ein einstellbarer Unterdruck im System erzeugt, welcher zum Ansaugen und Ein- bzw. Durchleiten des Rauches bzw. Dampfes in das Kulturmedium der Gaswaschflasche # 1 führt. So entsteht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

Versuchsdurchführung

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. Die Lungenzellen wurden aus 80 % konfluenten Massenkulturen in Kulturflaschen mit 25 cm^2 Wachstumsfläche und 4 ml Kulturmedium ausgesät. Die Zellzahl betrug dabei 5.000 Zellen/Flasche. 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 % CO_2 und 95 % Luft inkubiert. Am Tag 2 nach der Aussaat und dem vollständigen Absetzen und Ausbreiten der Zellen wurde frisches Kulturmedium mit den folgenden Konzentrationen

des Primäreluats vom E-Liquid-Dampf bzw. Elutionsmedium in die Kulturflaschen pipettiert: 10 – 25 – 50 – 100 Vol%. Vom Zigarettenrauch wurden nur die 5 Vol% in den Test aufgenommen. Als Reagenzienkontrolle diente das Elutionsmedium ohne Rauch bzw. Dampf in den gleichen Konzentrationen. Am Tag 5 wurde die verdunstete Menge an Flüssigkeit in den Kulturschalen durch Zugabe von 1 ml sterilem Wasser ausgeglichen. Am Tag 7 wurde das Kulturmedium und die entsprechenden Mengen Primäreluat erneuert und am Tag 10 wurde nochmals 1 ml steriles Wasser zugegeben 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 entsteht durch das Zusammenwachsen einzelner Zellhaufen durch mitotische Teilungen eine subkonfluente Massenkultur. Die Gesamtzahl der mitotischen Teilungen in der Zellpopulation beträgt nach 12 Tagen statistisch etwa 5 bis 6 Teilungen pro Zelle, was mit einem mehrjährigen Zeitraum in vivo vergleichbar ist. Durch das Vorhandensein von toxisch wirkenden Substanzen im Primäreluat werden so im Vergleich zu einer kurzzeitigen Exposition von 24 h die Effekte deutlich verstärkt.
Nach Ablauf der Kultivierungsdauer wurde das Expositionsmedium abgesaugt und die Zellen in den Kulturflaschen mit Methanol p.A. 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 Kulturen wurden durch digitale Bildanalyse der besiedelten Fläche ausgewertet (Wimasis Image Analysis, ibidi GmbH, München; Abb. 2). Die Versuchsergebnisse wurden in tabellarischer und graphischer Form dargestellt. Die Untersuchungen wurden im dreifachem Versuchsansatz durchgeführt (n = 3).

Versuchsergebnisse und Schlussfolgerungen

Wie bereits auch aus früheren Versuchen bekannt, führte die getestete Primäreluat-Konzentration des Zigarettenrauches von 5 Vol% (also einem Zwanzigstel der hier als Maximum getesteten Primäreluat-Konzentration von E-Liquid-Dampf mit 100 Vol%) bereits zu einem vollständigen Absterben der Zellen (nicht dargestellt). Auch Einzelzellen konnten unter dem Mikroskop nach der Expositionszeit nicht mehr entdeckt werden, was den hohen Toxizitätsgrad des Zigarettenrauches bei langzeitiger Exposition eindrücklich aufzeigt.
Ganz anders dagegen die Ergebnisse mit dem Dampf der beiden E-Liquids. Alle beiden Liquids bewirkten bei der höchsten Testkonzentration von 100 Vol% (entspricht einem unverdünnten Primäreluat) auch nach dieser langen Expositionszeit keine morphologischen Auffälligkeiten bei den Zellen im Vergleich zur entsprechenden Reagenzienkontrolle (= 100 Vol% Elutionsmedium; Abb. 2). Weiterhin konnte bei der Bestimmung der durch

dartschSCIENTIFIC
INSTITUT FÜR ZELLBIOLOGISCHE TESTSYSTEME

Zellteilung besiedelten Fläche in der Kulturflasche kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen dem unverdünnten Elutionsmedium und dem unverdünnten Primäreluat festgestellt werden. Die geringeren Eluatkonzentrationen von 50, 25 und 10 Vol% verhielten sich ebenso (Tab. 1 und Abb. 3).
Zusammengefasst waren auch bei der Langzeitexposition die beiden E-Liquids der Firma valeo laboratories GmbH ohne toxische Wirkung auf die kultivierten humanen Lungenzellen. Im Gegensatz dazu war die 20fach geringere getestete Zigarettenrauch-Konzentration bei der Langzeitexposition in erheblichem Ausmaß zytotoxisch. Daher sollte dem Dampfen einer E-Zigarette mit einem der beiden getesteten E-Liquids auf jeden Fall der Vorzug gegenüber einer Tabakzigarette gegeben werden.

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

Schongau, den 1. Juni 2015

CELL-BIOLOGICALLY TESTED PRODUCT • PRODUKT ZELLBIOLOGISCH GEPRÜFT • dartsch SCIENTIFIC 2015

Prof. Dr. Peter C. Dartsch
Diplom-Biochemiker

dartschSCIENTIFIC
INSTITUT FÜR ZELLBIOLOGISCHE TESTSYSTEME

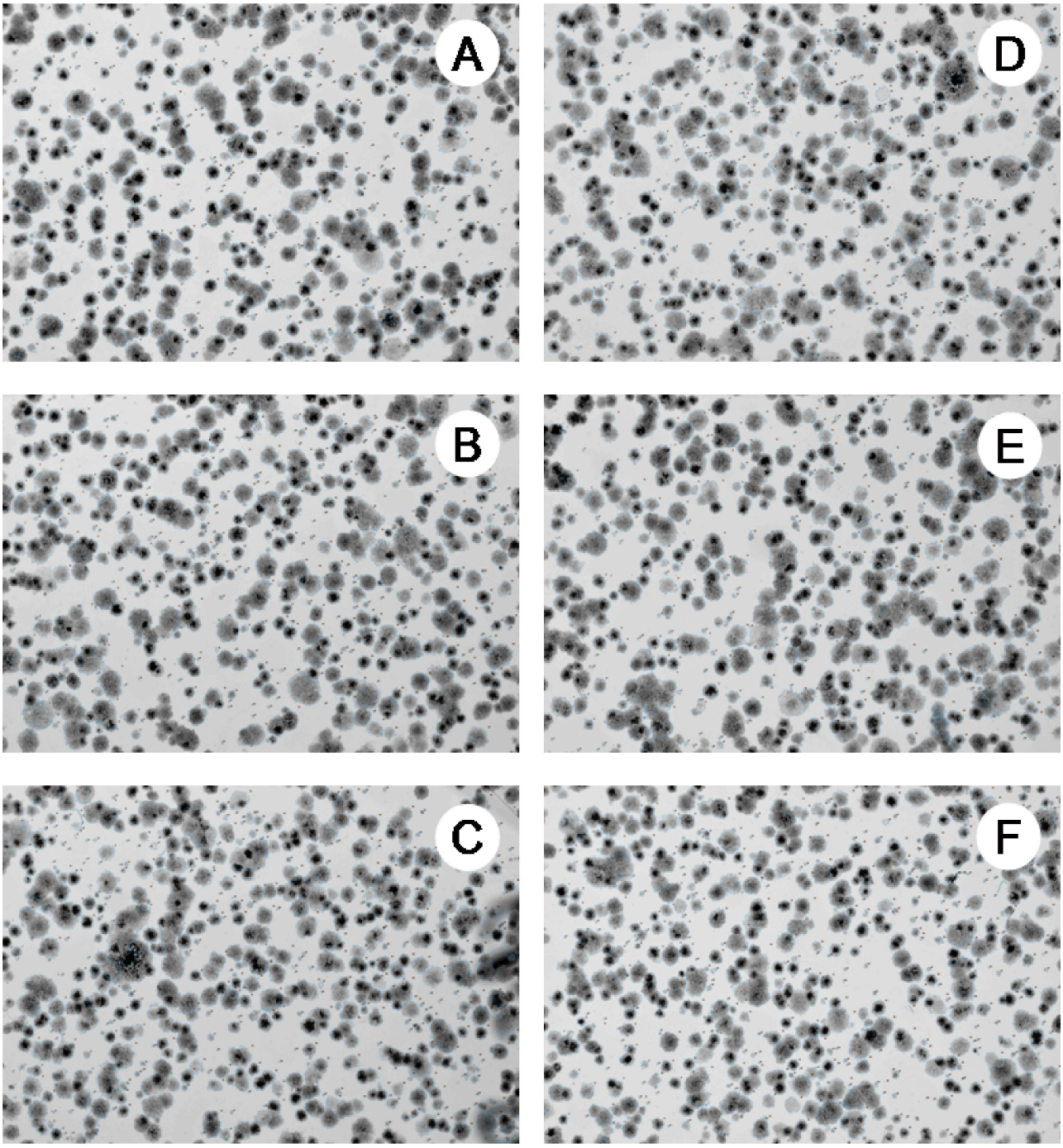

Abb. 2: Repräsentative Makrofotos und Wimasis Digital Analysis der Lungenzellkulturen nach 12tägiger Exposition mit den verschiedenen Eluaten des E-Liquid-Dampfes im Vergleich zum Elutionsmedium (= Reagenzienkontrolle). Hier abgebildet sind jeweils die Kulturen mit den Testkonzentrationen von 10 Vol% (A-C) und 100 Vol% (D-F) für Valeo Nikotin Liquid Sample mit 12 mg/ml Nikotin (A, D), Valeo BioNic Liquid Nikotinsubstitut 1,5 % (B, E) sowie das Elutionsmedium als Kontrolle (C, F).

dartschSCIENTIFIC
INSTITUT FÜR ZELLBIOLOGISCHE TESTSYSTEME

Tab. 1: Tabellarische Darstellung der Versuchsergebnisse für das Elutionsmedium (= Reagenzienkontrolle) sowie für die beiden untersuchten E-Liquids. Bes. Fläche = besiedelte Fläche der Kulturschale; M.W. = Mittelwert; S.D. = Standardabweichung. Weitere Erläuterungen im Text.

Elutionsmedium (= Reagenzienkontrolle)

Probe	Bes. Fläche [%] Wert 1	Bes. Fläche [%] Wert 2	Bes. Fläche [%] Wert 3	Bes. Fläche [%] M.W.	±	Bes. Fläche [%] S.D.
Primäreluat 10 Vol%	34,82	38,37	41,35	38,18	±	3,27
Primäreluat 25 Vol%	35,75	39,21	40,35	38,44	±	2,40
Primäreluat 50 Vol%	39,98	41,63	38,81	40,22	±	1,99
Primäreluat 100 Vol%	37,28	42,29	33,72	38,01	±	6,06

Valeo Nikotin Liquid Sample mit 12 mg/ml Nikotin

Probe	Bes. Fläche [%] Wert 1	Bes. Fläche [%] Wert 2	Bes. Fläche [%] Wert 3	Bes. Fläche [%] M.W.	±	Bes. Fläche [%] S.D.
Primäreluat 10 Vol%	36,98	29,85	43,22	36,68	±	6,69
Primäreluat 25 Vol%	32,89	41,76	39,84	38,16	±	4,67
Primäreluat 50 Vol%	32,59	39,54	41,23	37,79	±	4,58
Primäreluat 100 Vol%	33,38	40,98	40,25	38,20	±	4,19

Valeo BioNic Liquid Nikotinsubstitut 1,5 %

Probe	Bes. Fläche [%] Wert 1	Bes. Fläche [%] Wert 2	Bes. Fläche [%] Wert 3	Bes. Fläche [%] M.W.	±	Bes. Fläche [%] S.D.
Primäreluat 10 Vol%	32,90	44,23	38,33	38,49	±	5,67
Primäreluat 25 Vol%	31,76	38,36	41,26	37,13	±	4,87
Primäreluat 50 Vol%	36,25	43,87	39,21	41,54	±	3,30
Primäreluat 100 Vol%	37,21	40,76	34,63	37,70	±	4,33

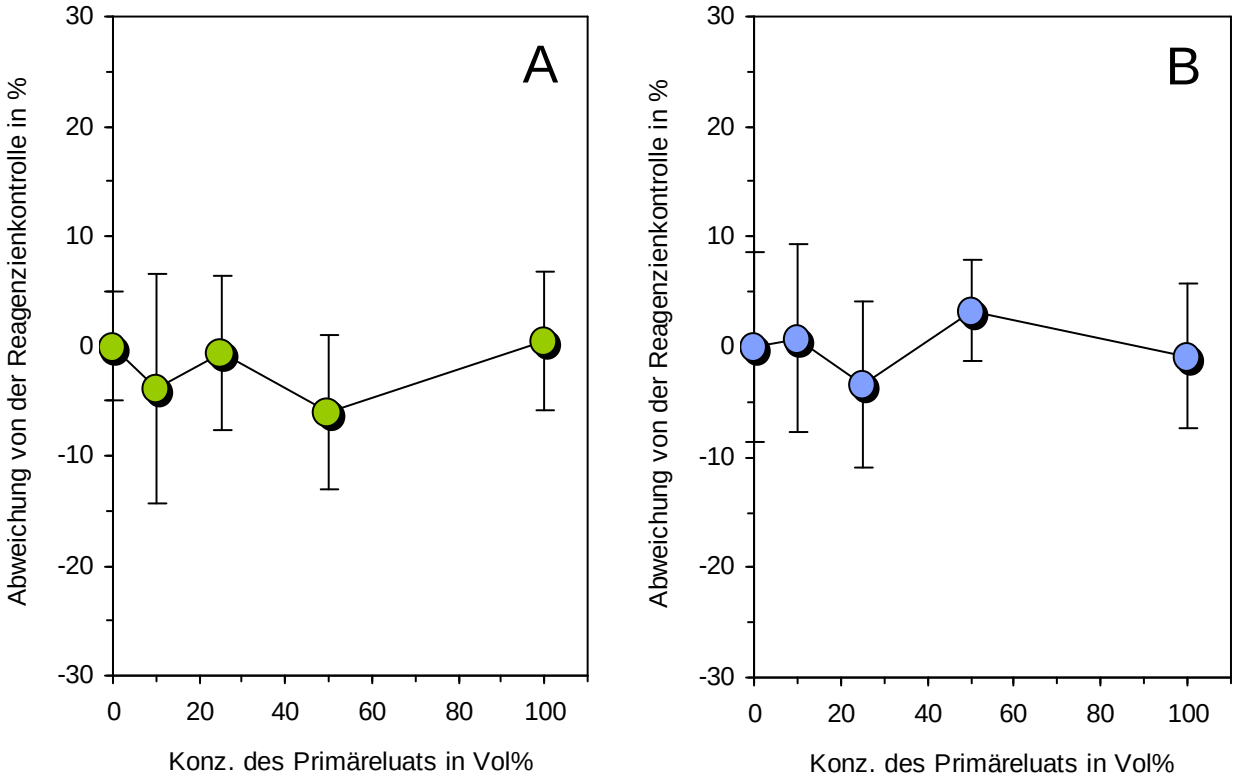

Abb. 3: Vergleichende graphische Darstellung der Versuchsergebnisse für Valeo Nikotin Liquid Sample mit 12 mg/ml Nikotin (A) und Valeo BioNic Liquid Nikotinsubstitut 1,5 % (B) im Vergleich zum Elutionsmedium (= Reagenzienkontrolle). Abgebildet ist jeweils der Mittelwert ± Standardabweichung aus drei Versuchen. Es ist gut erkennbar, dass die beiden Liquids im Vergleich zum Elutionsmedium zu keiner statistisch signifikanten Veränderung der Zellteilungsrate und damit auch der besiedelten Fläche führen.