

ZERTIFIKAT · CERTIFICATE



DARTSCH SCIENTIFIC GMBH Institut für zellbiologische Testsysteme

bescheinigt hiermit, dass das Produkt

E-Liquid der Marke Happy Liquid mit Menthol und 18 mg/ml Nikotin

der Firma

Happy People GmbH aus D-80337 München

mit tierversuchsfreien zellbiologischen Testmethoden
auf akuttoxische Wirkungen untersucht wurde.

Testergebnis:

Bei den von uns durchgeführten Untersuchungen mit kultivierten humanen Lungenzellen (Zelllinie A549) führte das Dampfen des Happy-Liquid im Konzentrationsbereich von 10 Atemzügen (= 100 Vol% Primäreluat) entsprechend dem Rauchen einer Tabakzigarette zu einem geringen Vitalitätsverlust der Zellen. Im Gegensatz dazu bewirkte der Rauch nur einer einzigen Tabakzigarette im gleichen Testsystem bereits bei einer zehnfach niedrigeren Konzentration (= 10 Vol% Primäreluat) ein nahezu vollständiges Absterben der Lungenzellen. Somit zeigen die Untersuchungen, dass das Dampfen eines E-Liquid der Marke Happy Liquid mit Menthol und 18 mg/ml Nikotin erheblich geringere akuttoxische Wirkungen hat als das Rauchen einer Tabakzigarette.

Schongau, der 14. August 2014

Prof. Dr. rer. nat. Peter C. Dartsch
Diplom-Biochemiker

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

8. August 2014

TESTBERICHT

Akuttoxische Wirkung von Tabakrauch im Vergleich zum Dampf eines E-Liquid auf kultivierte 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 hier die akuttoxische Wirkung von Tabakrauch im Vergleich zum Dampf eines E-Liquid der Marke Happy Liquid (Happy People GmbH, München) mit kultivierten Zellen 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 (Ramaga et al. 2006; Kode et al. 2006; Zhao et al. 2009; Jorgensen et al. 2010; Cervellati et al. 2014).

Ramage L, Jones AC, and Whelan CJ (2006). Induction of apoptosis with tobacco smoke and related products in A549 lung epithelial cells in vitro. *J Inflammation* 3: 3-14.

Kode A, Yang SR, and Rahman I (2006). Differential effects of cigarette smoke on oxidative stress and proinflammatory cytokine release in primary human airway epithelial cells and in a variety of transformed alveolar epithelial cells. *Respiratory Res* 7: 132-152.

Zhao H, Albino AP, Jorgensen E, Traganos F, and Darzynkiewicz Z (2009). DNA damage response induced by tobacco smoke in normal human bronchial epithelial and A549 pulmonary adenocarcinoma cells assessed by laser scanning cytometry. *Cytometry A* 75: 840–847.

Jorgensen ED, Zhao H, Traganos F, Albino AP, and Darzynkiewicz Z (2010). DNA damage response induced by exposure of human lung adenocarcinoma cells to smoke from tobacco- and nicotine-free cigarettes. *Cell Cycle* 9: 2170–2176.

Cervellati F, Muresan XM, Sticozzi C, Gambari R, Montagner G, Forman HJ, Torricelli C, Maioli E, Valacchi G (2014): Comparative effects between electronic and cigarette smoke in human keratinocytes and epithelial lung cells. *Toxicology in Vitro* 28: 999-1005.

Verwendete Tabakzigarette und E-Liquid

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 wurde ein E-Liquid der Marke Happy Liquid, hergestellt von der Firma Happy People GmbH, mit Menthol und 18 mg/ml Nikotin verwendet.

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. Diese gestattet es, die Zugfrequenz und die Dauer und Tiefe der Züge zu variieren. Als Vorlage wurden für das Rauchen einer Zigarette 10 Züge mit jeweils 3 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 μm Porengröße) sterilfiltriert und in den beschriebenen Verdünnungen auf die Lungenzellen gegeben.

Zellbiologische Versuchsdurchführung

Bei den hier verwendeten Testkonzentrationen wurde von einer näherungsweise kalkulierten Rauch bzw. Dampfkonzentration in der Lunge von 10 Vol% ausgegangen, welche sich aus dem Verhältnis von Atemzugvolumen (500 ml) zu Vitalkapazität (5.000 ml) ergibt. Durch individuelle Rauch bzw. Dampfgewohnheiten kann sich dieser Wert jedoch nach oben verändern und sollte daher nur als grober Anhaltspunkt zum Abschätzen der hier beobachteten Wirkungen auf die Lungenzellen betrachtet werden.

Für die Versuche wurden die Zellen aus 80 % konfluenten Massenkulturen in neue 96-Loch-Multiwellplatten (enzymatischer Test der Zellvitalität; 200 μl /Vertiefung) und 12-Loch-Multiwellplatten (Zellmorphologie; 2 ml/Vertiefung) ausgesät. Dabei wurde die Zelldichte so gewählt, dass die Zellen während der gesamten Expositionszeit nicht Konfluenz erreichen. Die Zellen wurden in DMEM/Ham's F12 (1:1) mit 10 % fötalem Kälberserum und den üblichen Mengen an Penicillin und Streptomycin ausgesät und in einem Brutschrank bei 37 °C und einer Atmosphäre aus 5 % CO₂ und 95 % Luft für 24 Stunden zum vollständigen Absetzen und Ausbreiten inkubiert.

Am Tag 2 nach der Aussaat wurde das Kulturmedium abgesaugt und durch eine Mischung aus frischem Kulturmedium und dem Primäreluat vom Tabakrauchen bzw. Dampfen ersetzt. Dabei betrug die Konzentration des Primäreluats im Test: 0 – 10 – 25 – 50 – 75 –

100 Vol% mit 0 Vol% als Kontrolle (= nur Kulturmedium ohne Primäreluat) und 100 Vol% (= unverdünntes Primäreluat). Die Expositionszeit für die Zellen war 24 Stunden.

Danach wurden die Zellen in den 12-Loch-Multiwellplatten morphologisch auf sichtbare Zeichen einer akuttoxischen Wirkung durchmustert und mikrofotografisch dokumentiert. Bei den Zellen in den 96-Loch-Multiwellplatten wurde das Kulturmedium abgesaugt und durch 200 μ l frisches Kulturmedium mit 10 Vol% XTT ersetzt und für 120 min im Brutschrank inkubiert. XTT ist das Natriumsalz von 2,3-bis[2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl]-2H-tetrazolium-5-carboxyanilid und hat eine gelbliche Farbe. Mitochondriale Dehydrogenasen lebender Zellen spalten den Tetrazoliumring von XTT und es entstehen orange gefärbte und wasserlösliche Formazankristalle, deren optischen Dichte man bei einer definierten Wellenlänge messen kann. Siehe hierzu Roehm et al (1991) and Brosin et al (1997).

Nach der Inkubationszeit von 120 min wurde die optische Dichte als Differenzmessung OD = 450 – 690 nm in einem Elisareader (BioTek Slx808) nach einer 4 Sekunden-Schüttelperiode gemessen. Die erhaltenen Werte wurden aufgezeichnet und statistisch ausgewertet. Die Untersuchungen wurden im dreifachen getrennten Versuchsansatz durchgeführt (n = 3).

Roehm NW, Rodgers GH, Hatfield SM, and Glasebrook AL (1991). An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. *J Immunol Meth* 142: 257-265.

Brosin A, Wolf V, Mattheus A, and Heise H (1997). Use of XTT-assay to assess the cytotoxicity of different surfactants and metal salts in human keratinocytes (HaCaT). A feasible method for in vitro testing of skin irritants. *Acta Dermato-venereologica* 77:26-28.

Versuchsergebnisse

Wie aus den Abbildungen 1 und 2 (jeweils linke Spalte) sehr gut erkennbar ist, waren die morphologischen Veränderungen der Lungenzellen nach der 24stündigen Expositionszeit mit den verschiedenen Konzentration bzw. Verdünnungen des Primäreluats vom Tabakrauch in allen Fällen dramatisch. Selbst die geringste Konzentration von 10 Vol% bewirkte bereits ein Abrunden nahezu aller Zellen sowie das Auftreten von Zellen, welche unter Wasserverlust zu einer Stechapfelform geschrumpft waren oder eine starke Vakuolenbildung aufwiesen. Bei höheren Konzentrationen kam es zu einem ausgeprägten Ablösen und Absterben der Zellen sowie zu zahlreichen Zellen, welche durch ein Aufreißen der Zellmembran ihre Zellkerne und Zytoplasma verloren hatten (sog. „ghosts“). Ganz anders dagegen bei den Zellen, welche dem Dampf des E-Liquid ausgesetzt waren. Hier wurden bei allen Konzentrationen keine hochgradigen morphologischen Veränderungen der Lungenzellen beobachtet; jedoch kam es ab einer Konzentration von 75 Vol% zu einem vermehrten Ablösen der Zellen.

Diese beobachteten morphologischen Veränderungen korrelierten sehr gut mit den erhaltenen Messdaten zur Zellvitalität (Tabelle 1 und Abbildung 3). Hier zeigte sich, dass beim Primäreluat des Tabakrauches die geringste Konzentration von 10 Vol% bereits zu einem 95%igen Vitalitätsverlust der Lungenzellen (= akuttoxischer Effekt) im Vergleich zur unbe-

handelten Kontrolle führte. Beim Primäreluat des Dampfes resultierte ab 50 Vol% eine dosisabhängige Abnahme der Zellvitalität, welche bei der höchsten Testkonzentration von 100 Vol% das Maximum mit 27 % Zellvitalitätsverlust erreichte. Schätzt man aus Vergleichsgründen durch Extrapolation der Messwerte eine ED50 ab, also die Konzentration, bei der die Hälfte der Zellen nicht mehr vital ist (analog zur LD50 bei Tierversuchen), so beträgt diese im vorliegenden Testsystem für den Tabakrauch etwa 7 Vol% und für den Dampf ist sie größer als 100 Vol%. Somit hat der Tabakrauch eine geschätzte 50 bis 100fach höhere Akuttoxizität als der Dampf des Happy-Liquid.

Schlussfolgerungen

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen können sehr gut veranschaulichen, dass das Rauchen nur einer einzigen Tabakzigarette zu einer ausgeprägten akuttoxischen Wirkung im Testsystem mit humanen Lungenzellen innerhalb von nur 24 Stunden führt. Das Dampfen des Happy-Liquid hat im gleichen getesteten Konzentrationsbereich keine akuttoxischen Wirkungen an den Zellen zur Folge. Allerdings zeigen die drei höchsten Testkonzentrationen des E-Liquid eine negative Beeinflussung der Zellkulturen, welche mit einem verstärkten Ablösen der Zellen und einer damit einhergehenden reduzierten Zellvitalität der Gesamtzellpopulation einhergeht. Somit zeigen die Untersuchungen auch, dass das Dampfen eines E-Liquid zwar erheblich geringere akuttoxische Wirkungen hat als das Rauchen einer Tabakzigarette, jedoch keinesfalls als harmlos oder die Gesundheit nicht beeinträchtigend angesehen werden sollte. In einem solchen Fall würde der Dampf die kultivierten Lungenzellen überhaupt nicht negativ beeinflussen. Hier wäre eine Langzeituntersuchung sicherlich von Interesse. Eine chemische Analyse des Primäreluats könnte unter diesen Bedingungen einer in vivo-nahen Simulation des Dampfens auch einen weiteren Aufschluss über die hier wirkenden Bestandteile des Dampfes (z.B. Aldehyde) und ihre Konzentration geben.

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

Schongau, den 8. August 2014



Prof. Dr. Peter C. Dartsch
Diplom-Biochemiker

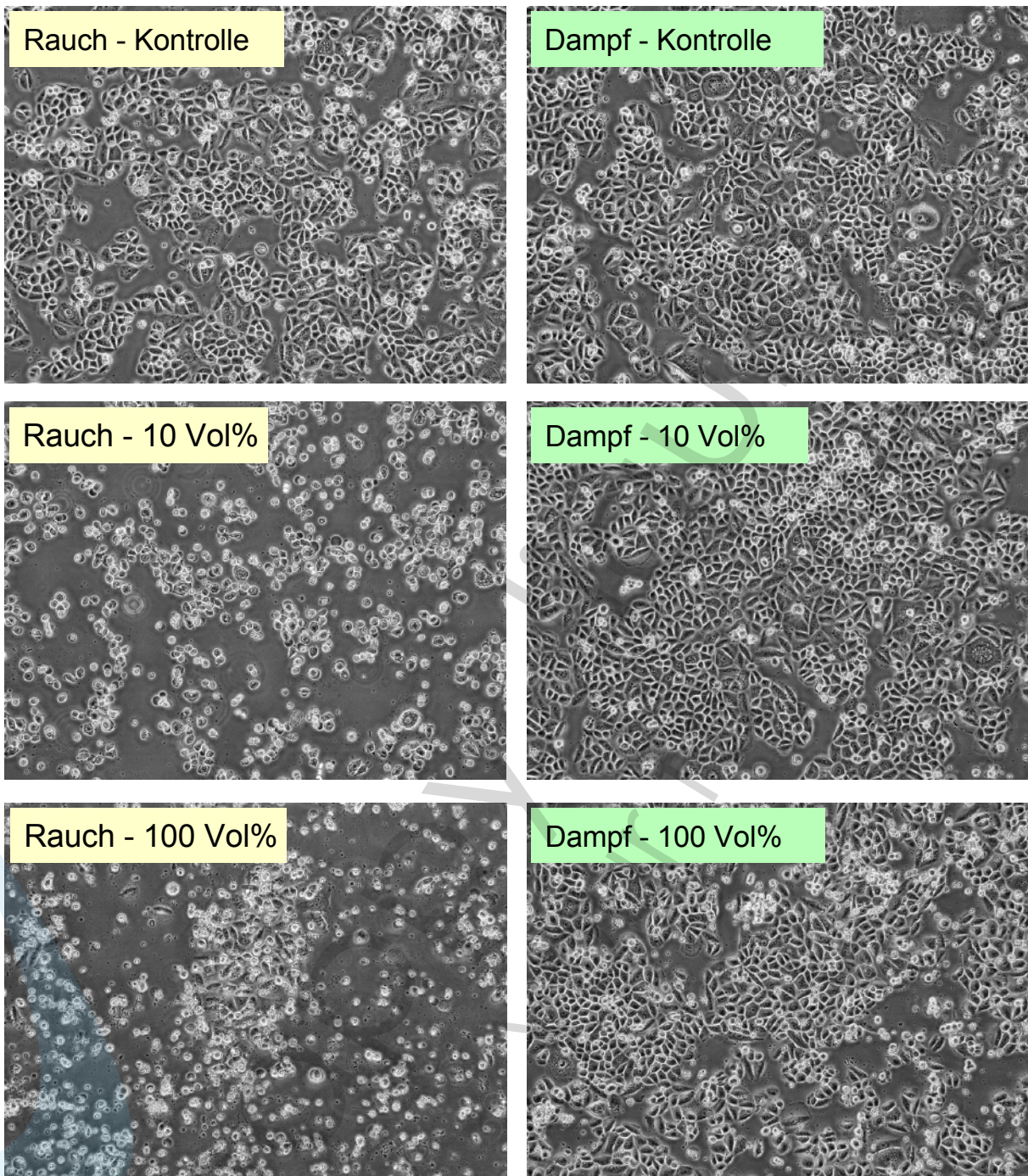


Abb. 1: Wirkung von verschiedenen Konzentrationen des Tabakrauches (linke Spalte) und des Dampfes des Happy-Liquid (rechte Spalte) auf die Morphologie von kultivierten Lungenzellen des Menschen. Kontrolle = reines Kulturmedium; Primäreluat des simulierten Rauchens bzw. Dampfens unverdünnt (= 100 Vol%) und 1:10 verdünnt (= 10 Vol%). Beachte die erhebliche akuttoxische Wirkung des Tabakrauchs durch Abrunden und Absterben der Zellen bereits bei 10 Vol% sowie die nahezu unveränderte Zellmorphologie beim Dampf des Happy-Liquid mit 100 Vol%. Die kleineren rundlichen Zellen in den Kontrollen und beim Dampf sind mitotisch aktive Zellen und auf den ersten Blick nur schlecht von den toten Zellen beim Tabakrauch zu unterscheiden. Olympus IX50 Inversmikroskop im Phasenkontrastverfahren mit Olympus E-10 Digitalkamera und 10x-Objektiv.

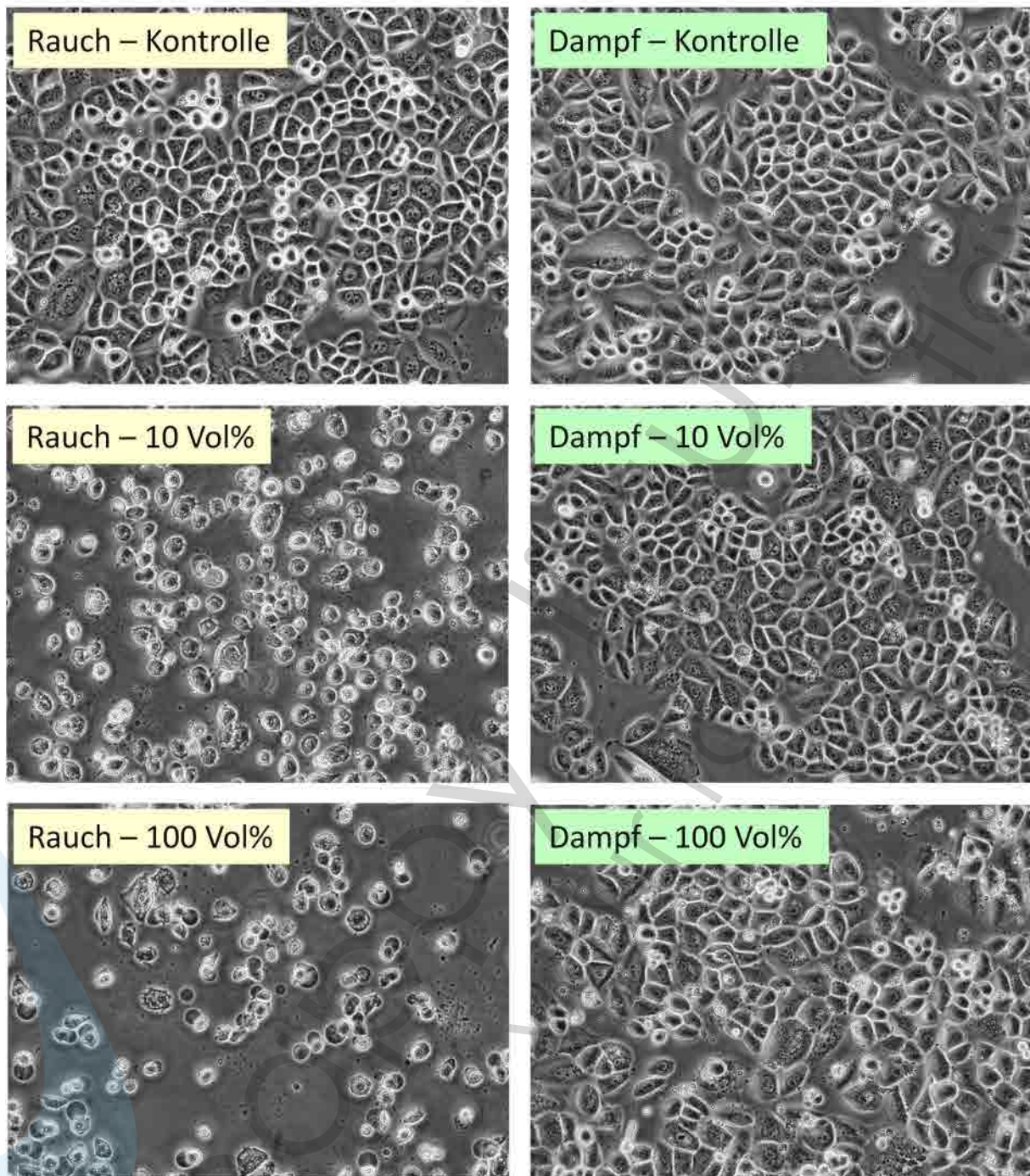


Abb. 2: Wirkung von verschiedenen Konzentrationen des Tabakrauches (linke Spalte) und des Dampfes des Happy-Liquid (rechte Spalte) auf die Morphologie von kultivierten Lungenzellen des Menschen. Kontrolle = reines Kulturmedium; Primäreluat des simulierten Rauchens bzw. Dampfens unverdünnt (= 100 Vol%) und 1:10 verdünnt (= 10 Vol%). Beachte die erhebliche akuttoxische Wirkung des Tabakrauchs durch Abrunden und Absterben der Zellen bereits bei 10 Vol% sowie die nahezu unveränderte Zellmorphologie beim Dampf des Happy-Liquid mit 100 Vol%. Die kleineren rundlichen Zellen in den Kontrollen und beim Dampf sind mitotisch aktive Zellen und auf den ersten Blick nur schlecht von den toten Zellen beim Tabakrauch zu unterscheiden. Olympus IX50 Inversmikroskop im Phasenkontrastverfahren mit Olympus E-10 Digitalkamera und 20x-Objektiv.

Zigarettenrauch

Probe	Gemessene opt. Dichte (Einzelwerte)			Mittelwert	±	S.D.	Rel. Zellvitalität in % vs. Kontrolle	±	S.D. in %
Kontrolle (= 0 Vol%)	720	616	662	666	±	52	100	±	7,8
Primäreluat 10 Vol%	58	16	39	38	±	21	5,7	±	3,2
Primäreluat 25 Vol%	5	1	2	3	±	2	0,4	±	0,3
Primäreluat 50 Vol%	2	3	1	2	±	1	0,3	±	0,2
Primäreluat 75 Vol%	1	2	2	2	±	1	0,3	±	0,1
Primäreluat 100 Vol% (= unverdünnt)	0	0	1	0	±	1	0,1	±	1,5

E-Liquid-Dampf

Probe	Gemessene opt. Dichte (Einzelwerte)			Mittelwert	±	S.D.	Rel. Zellvitalität in % vs. Kontrolle	±	S.D. in %
Kontrolle (= 0 Vol%)	705	714	662	694	±	28	100	±	4,0
Primäreluat 10 Vol%	757	627	731	705	±	69	101,6	±	9,9
Primäreluat 25 Vol%	746	645	692	694	±	51	100,1	±	7,3
Primäreluat 50 Vol%	682	585	628	632	±	49	91,1	±	7,0
Primäreluat 75 Vol%	581	687	585	618	±	60	89,0	±	8,7
Primäreluat 100 Vol% (= unverdünnt)	496	497	528	507	±	18	73,1	±	2,6

Tab. 1: Tabellarische Darstellung der Versuchsergebnisse der einzelnen Versuche (n=3) sowie die daraus kalkulierbaren Werte zur Zellvitalität. S.D. = Standardabweichung. Weitere Erläuterungen in der Legende zu Abb. 3.

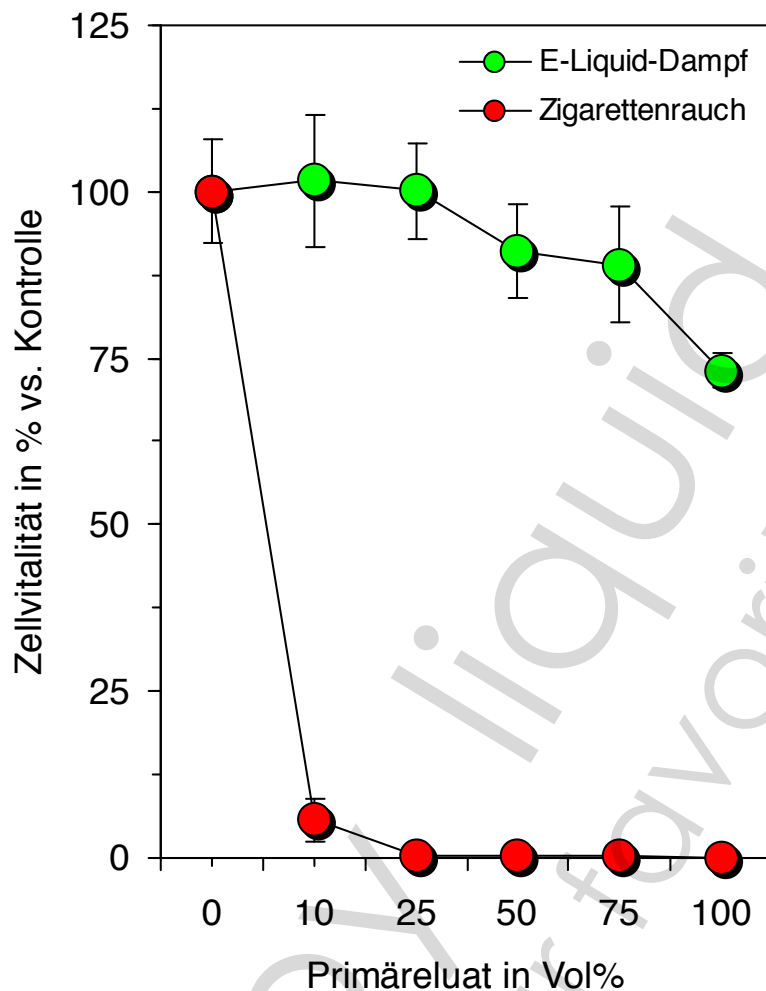


Abb. 3: Graphische Präsentation der Versuchsergebnisse zur akuttoxischen Wirkung von Tabakrauch im Vergleich zum Dampfen des Happy-Liquid mit Menthol und 18 mg/ml Nikotin. Während das Primäreluat des Zigarettenrauches bereits bei nur 10 Vol% zu einem nahezu vollständigen Vitalitätsverlust der Lungenzellen führt, ist deren Vitalität bei 100 Vol% des Dampfes immer noch in einem Bereich, wo man nur von einer geringen negativen Beeinflussung spricht. Somit hat der Tabakrauch eine erheblich höhere Akuttoxizität als der Dampf des E-Liquid. Dennoch bleibt anzumerken, dass auch der Dampf des E-Liquid nicht als harmlos oder gar gesundheitlich unbedenklich einzustufen ist (denn in einem solchen Fall würde er die Zellen gar nicht negativ beeinflussen). Angegeben ist der Mittelwert \pm Standardabweichung aus 3 Versuchen.