

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

An

Bündnis für Tabakfreien Genuss e.V.

(BfTG e.V.)

Ringseisstraße 6a

D-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

22. November 2015

TESTBERICHT

Akuttoxische Wirkung von Menthol im Dampf von E-Liquids – Untersuchungen mit kultivierten Lungenzellen des Menschen –

Hintergrund

Chemisch gesehen ist Menthol (Summenformel $C_{10}H_{20}O$, 2-Isopropyl-5-methylcyclohexanol) ein monozyklisches Terpen, das als Hauptbestandteil des ätherischen Öls vorwiegend in den Blättern von Spezies der Pflanzengattung *Mentha* vorkommt. Das Isomer (-)-Menthol kommt in der Natur am häufigsten vor und ist die Form, die nicht nur den charakteristischen Pfefferminzgeruch aufweist, sondern auch kühlend auf die Haut und die Schleimhäute wirkt (Eccles R (2000): Role of cold receptors and menthol in thirst, the drive to breathe and arousal. Appetite 34:29–35). In einer Analyse des aktuellen wissenschaftlichen Kenntnisstandes kommen die Autoren der Stabsstelle Krebsprävention und WHO-Kollaborationszentrum für Tabakkontrolle vom Deutsches Krebsforschungszentrum in Heidelberg, zu dem Schluss, dass Menthol als der „am meisten verwendete und bedeutendste Zusatzstoff in Tabakprodukten ... neben seinem charakteristischen Geschmack auch eine Reihe pharmakologisch wirksamer Eigenschaften besitzt, die beim Rauchen zur Erleichterung der Inhalation und zu einem erhöhten Abhängigkeitspotenzial beitragen.“ Daher sollte Menthol als Zusatzstoff in Tabakprodukten reguliert werden (Kahnert S, Nair U, Mons U, Pötschke-Langer M (2012): Wirkungen von Menthol als Zusatzstoff in Tabakprodukten und die Notwendigkeit einer Regulierung. Bundesgesundheitsbl 55:409–415).

Im Unterschied zur Zigarette findet beim Dampfen einer E-Zigarette kein Verbrennungsprozess statt, so dass E-Zigaretten als eine bei weitem weniger schädliche Alternative zum Zigarettenrauchen gelten. Daher erhebt sich grundsätzlich die Frage, ob die Mentholproblematik, welche beim Rauchen von Tabakprodukten auftritt, auch für E-Zigaretten seine Gültigkeit hat.

Vor diesem Hintergrund sollte in dieser Studie erstmalig die akuttoxische Wirkung von Menthol in E-Liquids mit kultivierten Lungenzellen des Menschen untersucht werden.

Verwendetes E-Liquid

Das hier verwendete E-Liquid wurde speziell für diese Versuchsreihe hergestellt und ist kommerziell nicht erhältlich. Es bestand aus einem Basisliquid (50 % Propylenglykol bzw. 1,2-Propandiol und 50 % vegetarisches Glycerin) mit 12 mg/ml Nikotin sowie 5 % Menthol.

Simulation des Dampfens

Um unter möglichst in vivo-nahen Bedingungen den Dampf aufzufangen, wurde eine speziell konstruierte Dampfapparatur verwendet (Abb. 1). Diese gestattet es, die Zugfrequenz und die Dauer und Tiefe der Züge zu variieren. Das mentholhaltige E-Liquid wurde mit einer handelsüblichen E-Zigarette (eGrip OLED von Joyetech mit Verdampfer 1,7 Ω und 3,3 Volt = 6,5 Watt Leistung) mit 30 Zügen mit jeweils 4 bis 5 Sekunden Dauer und einer Pause von 10 Sekunden zwischen zwei Zügen gedampft (siehe Anmerkung). Dieser Dampf wurde durch eine Schlauchpumpe angesaugt und durch 20 ml des mit 10 mM HEPES gepufferten Zellkulturmediums (temperiert auf 37 °C) geleitet. Das erhaltene Primäreluat wurde mit Porenfiltern (0,45 μ m Porengröße) sterilfiltriert und in den im nächsten Abschnitt beschriebenen Verdünnungen bzw. Konzentrationen zu den Lungenzellkulturen gegeben.

Anmerkung: Bei E-Zigaretten wird im Vergleich zur Tabakzigarette weniger stark, aber dafür deutlich langsamer und länger gezogen. 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.

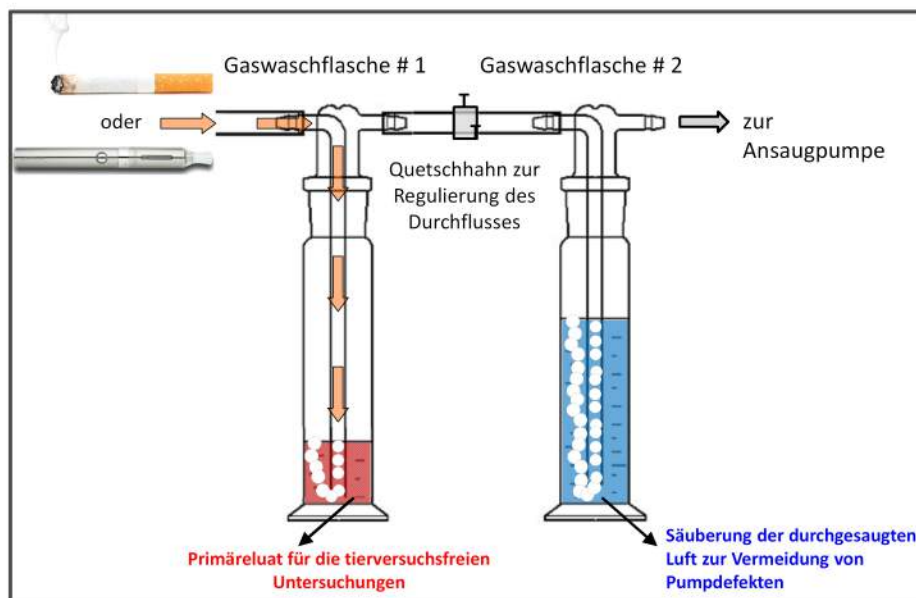


Abb. 1: Versuchsanordnung zur Simulation des Dampfens. Für die zellbiologischen Untersuchungen wird nur das Primäreluat in der linken Gaswaschflasche verwendet, in welcher sich gepuffertes Kulturmedium zur Konstanthaltung des pH-Wertes während dem Durchleiten von E-Liquid-Dampf befindet.

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 % CO₂ 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 E-Liquid-Dampf ersetzt. Dabei betrug die Menthol-Konzentration des Primäreluats des gedampften E-Liquids mit 5 % Menthol im Test: 0 – 0,25 – 0,5 – 1 – 2 – 2,5 – 3 – 4 – 5 % mit 0 % als Kontrolle (= nur Kulturmedium ohne Primäreluat) und 5 % (= unverdünntes Primäreluat des gedampften E-Liquids). Die Expositionszeit der Lungenzellen betrug 24 Stunden.

Danach wurden die Zellen auf sichtbare Zeichen einer akuttoxischen Wirkung durchmustert, das Kulturmedium abgesaugt und durch 100 µl frisches Kulturmedium und 25 µl des Tetrazoliumfarbstoffes XTT (Xenometrix AG, Allschwil, Schweiz) ersetzt und für 120 min im Brutschrank inkubiert. XTT ist das Natriumsalz von 2,3-bis[2-methoxy-4-nitro-5-sulfo-phenyl]-2H-tetrazolium-5-carboxyanilid und hat eine gelbliche Farbe. Mitochondriale Dehydrogenasen lebender Zellen spalten den Tetrazoliumring von XTT und es entstehen orange gefärbte, wasserlösliche Formazankristalle, deren optischen Dichte man bei einer definierten Wellenlänge messen kann (Roehm NW et al. (1991): An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. *J Immunol Meth* 142:257-265). 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 o.g. Inkubationszeit von 120 min die optische Dichte als Differenzmessung $\Delta OD = 450 \text{ nm} - 690 \text{ nm}$ in einem Elisareader (BioTek Slx808, Bad Friedrichshall) nach einer 4 Sekunden-Schüttelperiode gemessen. Die erhaltenen Werte wurden aufgezeichnet und statistisch mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney-Test als parameterfreiem statistischem Test ausgewertet. Die Untersuchungen wurden im dreifachen Versuchsansatz durchgeführt.

Versuchsergebnisse und Schlussfolgerungen

Nach der 24stündigen Expositionszeit konnten für alle Testkonzentrationen keine morphologischen Veränderungen bei den Lungenzellkulturen festgestellt werden, die auf einem akuttoxischen Effekt beruhen (nicht abgebildet).

Die Untersuchung der Zellvitalität mit der dargestellten enzymatischen Methode ergab eine dosisabhängige Abnahme der Vitalität der Lungenzellkulturen. Diese Reduktion der Zellvitalität war statistisch signifikant bei Konzentrationen $\geq 2,5 \%$ ($p \leq 0,02$; Wilcoxon-Mann-Whitney-Test). Die maximale Reduktion der Zellvitalität von etwa 20 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle war bei der höchsten Eluatkonzentration von 5 % festzustellen (Abb. 2). Die beobachtete Zellvitalitätsverminderung ist nicht mit einer akuttoxischen Wirkung gleich zu setzen, bei welcher es zu einem ausgeprägten Absterben der Zellen sowie zu erheblichen morphologischen Veränderungen gekommen wäre.

Die Ergebnisse zeigen, dass steigende Mentholkonzentrationen zwar die Stoffwechselaktivität und somit Vitalität von kultivierten Lungenzellen dosisabhängig beeinflussen, dies jedoch nicht mit einer akuttoxischen Wirkung und einem Absterben von Lungenzellen einhergeht.

In diesem Zusammenhang von besonderem Interesse wäre m.E. die Untersuchung der chronischen Toxizität von Menthol während einer Langzeitexposition von Lungenzellen über mindestens 10 Tage hinweg, da durch die hohe Anzahl der in dieser Zeit stattfindenden Zellteilungen ein mehrjähriger Zeitraum in vivo simuliert wird.

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

Schongau, den 22. November 2015



Prof. Dr. Peter C. Dartsch
Diplom-Biochemiker

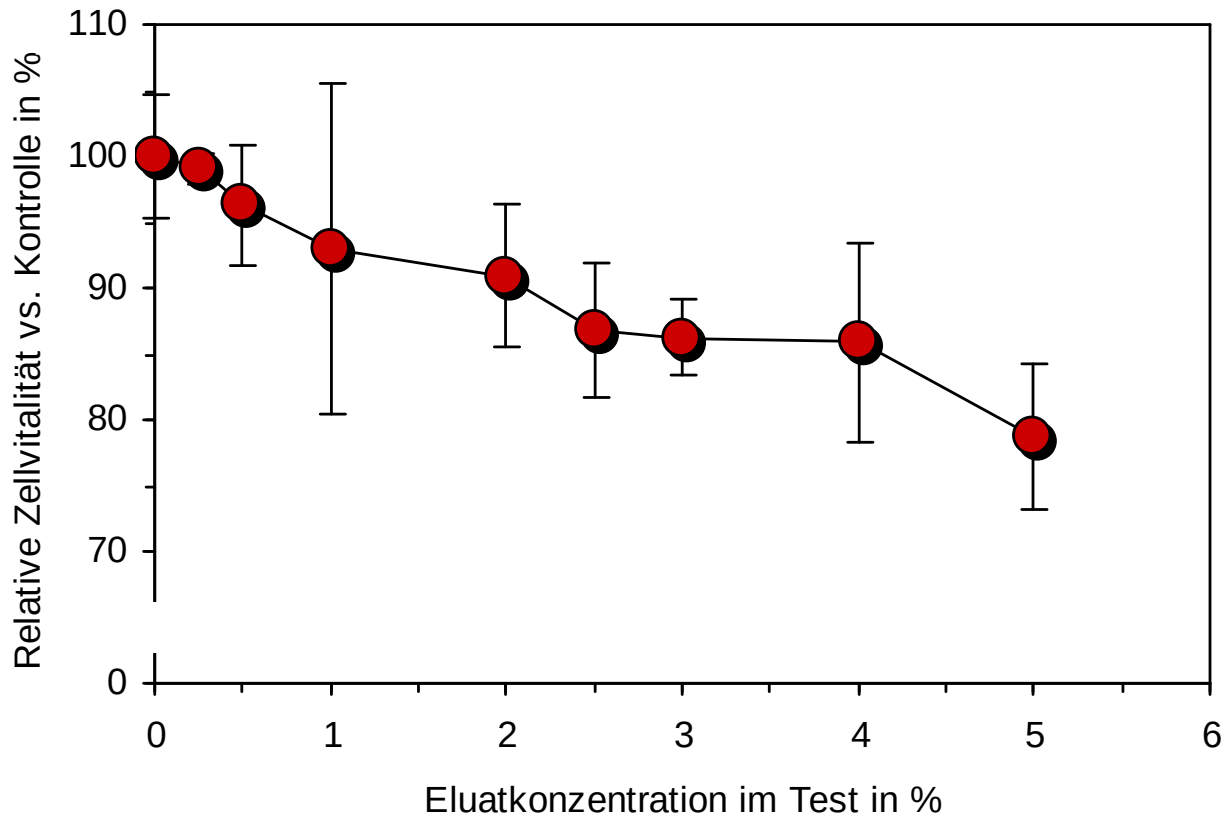


Abb. 2: Graphische Darstellung der relativen Versuchsergebnisse zur akuttoxischen Wirkung von mentholhaltigem Dampf eines E-Liquids. Der mentholhaltige Dampf führt zu einer dosisabhängigen Reduktion der Vitalität von kultivierten Lungenzellen. Diese Wirkung ist jedoch nicht mit einem toxischen Effekt gleich zu setzen, da keine morphologischen Veränderungen der exponierten Zellkulturen festgestellt werden konnten. Die Reduktion der Zellvitalität ist signifikant bei Eluatkonzentrationen $\geq 2,5$ % ($p \leq 0,02$; Wilcoxon-Mann-Whitney-Test). Angegeben ist der Mittelwert $\pm$ Standardabweichung aus 3 Versuchen.