

**Aus der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten,  
plastische und ästhetische Operationen**

**der Universität Würzburg**

**Direktor: Univ.-Professor Dr. med. Dr. h.c. R. Hagen**

**Untersuchung der Nasenschleimhaut auf Genotoxizität und  
Entzündungsreaktionen nach Exposition mit Propylenglykol**



**Inaugural-Dissertation**

**zur Erlangung der Doktorwürde der**

**Medizinischen Fakultät**

**der**

**Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von**

**Felix Wiest**

**aus Würzburg**

**Würzburg, April 2020**

**Referent:** Univ.-Prof. Dr. med. Norbert Kleinsasser MHBA

**Korreferent:** Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Helga Stopper

**Berichterstattung:** Univ.-Prof. Dr. med. Thomas Haaf

**Dekan:** Univ.-Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 21.10.2020

Der Promovend ist Arzt

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Entwicklung der E-Zigarette und Konsumverhalten.....	1
1.2	Aufbau und Funktionsweise der E-Zigarette.....	2
1.3	Gesundheitsrisiken des E-Zigaretten-Konsums.....	3
1.3.1	Beeinflussung der Lunge.....	3
1.3.2	Die E-Zigarette als Hilfsmittel zur Raucherentwöhnung.....	5
1.3.3	Belastung der Raumluft durch die E-Zigarette.....	6
1.3.4	Mechanische Verletzungen.....	7
1.3.5	Fremd- und Giftstoffentstehung.....	7
1.4	Liquide.....	8
1.4.1	Liquidzusammensetzung.....	8
1.4.2	Verwendung und Toxizität von Propylenglykol.....	9
1.5	Festlegung von Grenzwerten.....	10
1.6	Problemstellung und Zielsetzung.....	12
2	Material und Methoden.....	13
2.1	Laborgeräte und Software.....	13
2.2	Labormaterialien.....	14
2.2.1	Reagenzien.....	14
2.2.2	Verbrauchsmaterialien.....	16
2.3	Patienten-Proben.....	16
2.4	Aufarbeitung der Patienten-Proben.....	17
2.5	Kultivierung der Zellen.....	18
2.6	Vorversuch MTT-Test.....	19
2.6.1	Grundlagen.....	19
2.6.2	Durchführung.....	20
2.7	Versuchsaufbau.....	20
2.8	Ablauf der Dampfexposition.....	22

2.9	Einzelzell Mikrogel Elektrophoresese (Comet) Assay.....	22
2.9.1	Grundlagen .....	22
2.9.2	Durchführung.....	23
2.10	Trypanblau Test .....	26
2.10.1	Grundlagen .....	26
2.10.2	Durchführung.....	26
2.11	Mikrokerntest.....	27
2.11.1	Grundlagen .....	27
2.11.2	Durchführung.....	28
2.12	Sandwich-ELISA .....	29
2.12.1	Grundlagen .....	29
2.12.2	Durchführung.....	30
2.13	Datenauswertung .....	32
2.13.1	Graphische Analyse .....	32
2.13.2	Statistische Analyse .....	33
3	Ergebnisse.....	34
3.1	Vorversuch MTT-Test .....	34
3.1.1	Flüssigkeitsexposition.....	34
3.1.2	Dampfexposition.....	35
3.2	Hauptversuch .....	35
3.2.1	Comet Assay .....	35
3.2.2	Trypanblau Test .....	37
3.2.3	Mikrokerntest.....	38
3.2.4	Sandwich-ELISA .....	39
3.3	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	40
4	Diskussion .....	41
4.1	Auswahl der Patientenproben und Zellkultur .....	41
4.2	Expositionsaufbau.....	42
4.3	Analyse der einzelnen Testverfahren und deren Ergebnisse .....	43
4.3.1	Einzelzell Mikrogel Elektrophoresese (Comet) Assay.....	43

4.3.2	Mikrokerntest.....	45
4.3.3	Vergleich Einzelzell Mikrogel Elektrophoresis (Comet) Assay und Mikrokerntest.....	47
4.3.4	Vitalität .....	48
4.3.5	Apoptosen und Nekrosen.....	50
4.3.6	Zellzyklus .....	50
4.3.7	Zellproliferation .....	51
4.3.8	Interleukin Produktion .....	51
4.4	Bewertung der Grenzwerte .....	53
4.4.1	Interpretation des untersuchten Konzentrationsbereichs .....	53
4.4.2	Aktuelle Einordnung als Gefahrenstoff.....	54
4.5	Limitationen der vorliegenden Arbeit .....	57
4.6	Ausblick.....	58
5	Zusammenfassung .....	59
6	Anhang .....	61
6.1	Literaturverzeichnis .....	61
6.2	Abbildungsnachweis.....	80
6.3	Tabellarische Einzelergebnisse.....	80
6.3.1	MTT-Test.....	80
6.3.2	Comet Assay.....	81
6.3.3	Mikrokerntest.....	82
6.3.4	Trypanblau Test .....	84
6.3.5	Sandwich-ELISA .....	84
6.3.6	Ausschluss eines Schadens durch den Versuchsaufbau .....	90

Publikation

Danksagung

Lebenslauf

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	
Abb.	Abbildung
ADI	Acceptable Daily Intake
AEGM	Airway Epithelial Growth Medium
ALI	Air-Liquid-Interface
BFR	Bundesinstitut für Risikobewertung
BH	Bonferroni-Holm
BNichtSchG	Bundesnichtraucherschutzgesetz
CLP	classification, labelling und packaging
DABCO	1,4-Diazabicycloctan
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EFSA	European Food Safety Authority
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
et al.	und andere
FCS	fetales Kälber Serum
FEV <sub>1</sub>	Atemstoßwert
FVC	forcierte Vitalkapazität
HaCat	humane Keratinozyten
HCl	Salzsäure
HRP	Streptavidin-horseradish-peroxidase
Ig	Immunglobulin
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
JuSchG	Jugendschutzgesetz
LD50	Letale Dosis 50 %
LOAEL	Lowest Observed Adverse Effect Level
mA	Milliampere
MEM	Minimum Essential Medium
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MMC	Mitomycin C
MMS	Methylmethansulfonat
NOAEL	No Observed Adverse Effect Level
nm	Nanometer
OTM	Olive Tail Moment
PG	Propylenglykol
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur

SEM	Standardfehler des Mittelwertes
TMB	Tetramethylbenzidin
TPAP	Tetrapropylammoniumperruthenat
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
vgl.	vergleiche
WHO	World Health Organization
W-Test	Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test
z. B.	zum Beispiel
µl	Mikroliter

# 1 Einleitung

## 1.1 Entwicklung der E-Zigarette und Konsumverhalten

Im Jahr 1965 wurde die E-Zigarette das erste Mal erwähnt und in den USA von Herrn Gilbert zum Patent angemeldet [Gilbert, 1965]. In den folgenden Jahrzehnten geriet sie jedoch wieder in Vergessenheit, bis der Pharmazeut Hon Lik 2003 die E-Zigarette in Kooperation mit der Firma Ruyan auf dem chinesischen Markt etablierte [nach Foulds *et al.*, 2011]. Seit diesem Zeitpunkt tritt sie einen ungeahnten Siegeszug sowohl in Deutschland als auch weltweit an. Auch etliche juristische Auseinandersetzungen um den die Vorherrschaft am Markt verdeutlichen die zukünftige Bedeutung und wirtschaftlichen Interessen seitens der Tabakindustrie [Kamerow, 2013; Cicarelli *et al.*, 2012]. So berichtet die World Health Organization (WHO), dass sich der weltweite Jahresumsatz 2014 von E-Zigaretten und deren Zubehör auf ca. drei Milliarden Dollar beläuft. Auch hat sich die Anzahl der E-Zigaretten-Manufakturen seit dem Jahr 2008 in vier Jahren fast verdoppelt [WHO, 2014]. In den USA und Kanada ergaben jeweils Befragungen von Studenten bzw. jungen Erwachsenen, dass die E-Zigarette und ihre Liquide vorrangig aus „Spaß, Coolness und um etwas Neues auszuprobieren“ konsumiert werden [Saddleson *et al.*, 2016; Khoury *et al.*, 2016]. Zudem wird die neuartige Zigarette als Hilfsmittel der Raucherentwöhnung genutzt, weil sie als weniger schädlich als die konventionelle Tabakzigarette angesehen wird [Adkison *et al.*, 2013]. In einer repräsentativen Umfrage in Griechenland von unter 15-jährigen Schülern gaben 16,6 % an, bereits eine E-Zigarette geraucht zu haben, während 0,5 % mitteilten, derzeit eine zu nutzen [Fotiou *et al.*, 2015]. In Deutschland ist die Lage ähnlich. Im März 2017 erschien im deutschen Ärzteblatt eine Studie, die mit Hilfe des Meinungsforschungsinstitutes Forsa erstellt wurde und 4002 Personen im Mai 2016 befragte. Dabei zeigte sich, dass jeder achte schon einmal eine E-Zigarette konsumiert habe [Eichler, 2017]. Die Bundeszentrale für gesundheitliche Aufklärung konnte durch zwei Telefonumfragen aus den Jahren 2012 und 2014 einen ersten Trend skizziert. Unter Jugendlichen im Alter von 12 - 17 Jahren stieg der Bekanntheitsgrad um ca. 10 %. Auch vergrößerte sich die Zahl derjenigen, die schon eine E-Zigarette gedampft haben von 9,1 % auf 13,2 %. Die Daten der 18 bis 25-jährigen verhalten sich ähnlich [Orth und Töppich, 2014]. Einer Schätzung des Verbandes für E-Zigaretten nach, stieg deutschlandweit die Anzahl der Konsumenten in den Jahren

von 2010 bis 2017 von dreihunderttausend auf 3,7 Millionen und somit auch der Umsatz mit E-Zigaretten und deren Zubehör von 5 auf 600 Millionen Euro [Verband des E-Zigarettenhandels, 2017]. Dieser Trend wird sich nach Meinung von de Andrade und Grana unter anderem durch Werbung mit innovativen Marketing Slogans auf sozialen Netzwerken, günstigen Lockangeboten und einer bedenkenlosen Handhabung der Altersgrenze beim Zugang zu den Produkten im Internet weiter fortsetzen [de Andrade M. *et al.*, 2013; Grana und Ling, 2014]. Auch wird beobachtet, dass die Tabak-Industrie E-Zigaretten-Firmen sukzessiv aufkauft, um den Markt zu kontrollieren [Herzog *et al.* 2014]. Ein Beispiel dafür ist der amerikanische E-Zigarettenhersteller Juul. Ende des Jahres 2018 kontrollierte dieser ungefähr 75 % des Marktes. Anfang 2019 stieg der Tabak-Zigarettenhersteller Altria mit 35 % Beteiligung ins Unternehmen Juul ein [Opensecrets, 2018].

## 1.2 Aufbau und Funktionsweise der E-Zigarette

Die E-Zigarette besteht grundsätzlich aus folgenden drei Basis-Elementen: einem Akku, einem Liquid-Depot mit integriertem Heizelement und einem Mundstück für den Konsumenten.

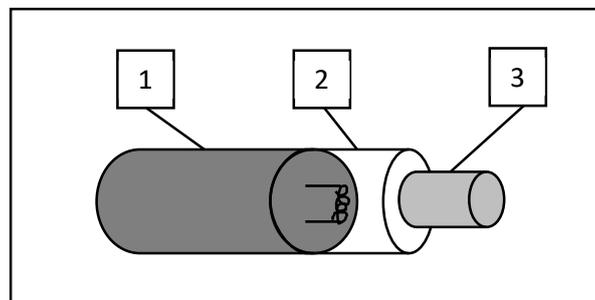


Abbildung 1: Schematischer Aufbau einer E-Zigarette:  
1) Akku 2) Liquid-Depot mit Heizelement 3) Mundstück

Durch die Spannung des Akkus (3,0 - 7,0 Volt) kann das Heizelement, je nach Hersteller, auf 40 °C bis 65 °C erwärmt werden. Dadurch verdampft das Liquid und wird durch den Sog des Konsumenten am Mundstück inhaliert (vgl. Abb. 1). Diese Funktionsweise variiert leicht je nach Generation des Geräts. Die ersten E-Zigaretten sollten noch die klassische Zigarette imitieren. So wurde der Verdampfungsmechanismus allein durch den Sog des Konsumenten ausgelöst und mittels einer LED das Feuer nachempfunden. Die darauffolgende Generation ist momentan die gebräuchlichste Variante und wurde demzufolge auch in dieser Arbeit verwendet: Durch den Kapillareffekte ist das

Heizelement, auch Atomizer oder Vernebler genannt, konstant mit Liquid benetzt und wird über einen Druckknopf und das zeitgleiche Inhalieren des Konsumenten aktiviert (vgl. Abb. 2). Der Atomizer kann ebenfalls, je nach Präferenz und Hersteller, variieren. Das Produkt E-Zigarette wird jedoch stetig weiterentwickelt und verfeinert, sodass der Konsument heute individuelle Einstellungen wie z. B. die Spannung des Akkus vornehmen kann [Action on Smoking and Health, 2016; Bhatnagar *et al.*, 2014; Bertholon *et al.*, 2013; Goniewicz *et al.*, 2013 a].

In dieser Arbeit wurden E-Zigaretten vom Typ Veco One der Firma Vaporesso verwendet. Diese wurden in einem E-Zigaretten-Shop neu erworben. Als Atomizer wurde der Typ EUC Keramik 0,3 Ohm von Vaporesso verwendet (vgl. Abb. 2).

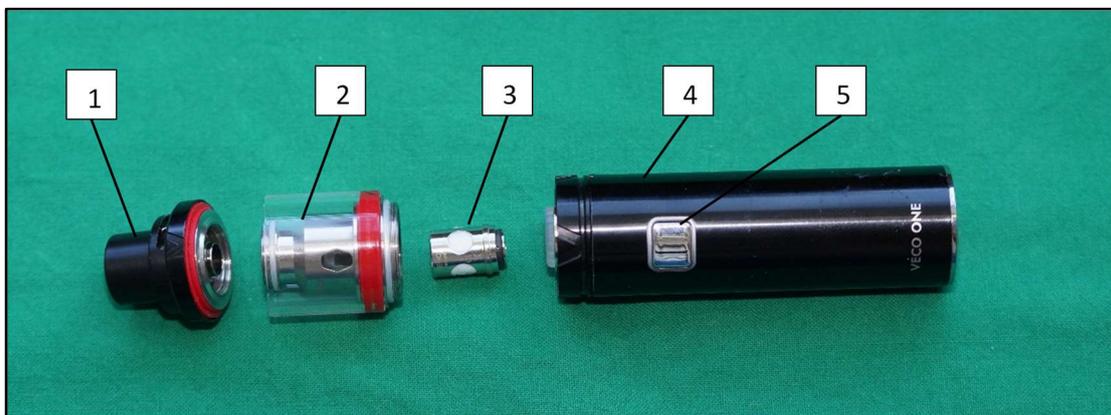


Abbildung 2: im Versuch verwendete E-Zigarette: 1) Mundstück 2) Liquid-Tank 3) Atomizer 4) Akku 5) Aktivierungsknopf

### 1.3 Gesundheitsrisiken des E-Zigaretten-Konsums

Im folgenden Kapitel werden bisherige Erkenntnisse in Bezug auf das Rauchen der E-Zigarette dargestellt.

#### 1.3.1 Beeinflussung der Lunge

Durch zahlreiche Studien konnte bereits belegt werden, dass Rauchen von konventionellen Zigaretten das Risiko unter anderem für Lungenkrebs signifikant steigert [Khuder, 2001; Sasco *et al.*, 2004; Thun *et al.*, 1997]. Deswegen konzentrierten und berücksichtigten bisherige Untersuchungen zur Schädlichkeit der E-Zigarette vorrangig das Organ Lunge. Mehrere humanexperimentelle Untersuchungen zur Schädlichkeit der E-Zigarette untersuchten den Tiffeneau-Index. Dieser beschreibt die relative Einsekundenkapazität ( $FEV_1$ ) bezogen auf die forcierte Vitalkapazität (FVC). Es ist ein

Maß für die Obstruktion. In diesen Studien konnte eine signifikante Reduktion des Tiffeneau-Index im Vergleich zur Kontrollgruppe und einmalig eine Zunahme des Atemwegswiderstand (Resistance) nach zehn Minuten des Konsums einer E-Zigarette registriert werden. Zusätzlich konnten in weiteren Studien Augenirritationen, das Gefühl eines trockenen Halses und Dyspnoe beobachtet werden [Gennimata *et al.*, 2012; Varughese *et al.*, 2005; Wieslander *et al.*, 2001]. Eine Veränderung der Blutzellen konnte jedoch nicht detektiert werden [Flouris *et al.*, 2012]. Dem gegenüber steht eine Studie, die keine signifikante Reduktion des Tiffeneau-Index im Vergleich zur Tabakzigarette feststellte. Zudem konnte nach einstündiger Exposition kein Unterschied des Tiffeneau-Index zwischen dem Aktiv- und Passivdampfen der E-Zigarette gefunden werden [Flouris *et al.*, 2013]. Ebenso zeigte sich bei 30 Dampfern nach fünfminütiger Exposition keine Veränderung der spirometrischen Parameter FVC und der FEV<sub>1</sub>. Die FVC beschreibt das Lungenvolumen, das nach maximaler Inspiration forciert ausgeatmet werden kann. Die FEV<sub>1</sub> beschreibt das Volumen, das nach maximaler Inspiration nach 1 Sekunde ausgeatmet werden kann. Allerdings nahm die Resistance signifikant zu und der Anteil der Stickoxide in der Expiration im Vergleich zur Kontrollgruppe ab [Horvath, 2012]. Diese Zunahme der Resistance und Abnahme der Stickoxide konnten von einer zweiten Forschungsgruppe bestätigt werden [Vardavas *et al.*, 2012]. Ein verringertes NO der Expirationsphase konnte bereits beim Konsum von konventionellen Zigaretten beobachtet werden. Dieses Phänomen könnte auf einer Hemmung der NO-Synthese beruhen. Dadurch fehlt ein möglicher Antagonist der Broncho- und Vasokonstriktion und somit bestünde eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber Infekten [Kharitonov *et al.*, 1995; Horváth *et al.*, 2004]. Eine Entzündungsreaktion im Lungengewebe von Ratten und Mäusen konnte nach mehreren Wochen der Exposition durch Immigration von neutrophilen und basophilen Granulozyten, Lymphozyten und ein erhöhtes Aufkommen von Interleukinen nachgewiesen werden [Lim und Kim, 2014; Werley *et al.*, 2016]. Folglich ist es nicht verwunderlich, dass auch Metaplasien in der Lunge von Ratten oder im Larynx von Hunden detektiert wurden [Phillips *et al.*, 2017; Werley *et al.*, 2011]. In einer Kurzzeit-Dampfexposition von vier aufeinander folgenden Tagen war die Entzündungskonstellation selbstlimitierend [Montharu *et al.*, 2010]. Gegenteilige Ergebnisse konnten in einer Studie mit Ratten gefunden werden. Dabei wurde nach 13 Wochen Exposition kein signifikantes Ergebnis sowohl in Bezug auf

Entzündungsreaktionen als auch Metaplasien in der Lunge festgestellt [Heck *et al.*, 2002]. Die bestehende Studienlage ist demzufolge nicht eindeutig und noch unklar.

### 1.3.2 Die E-Zigarette als Hilfsmittel zur Raucherentwöhnung

Ein direkter Vergleich der E-Zigarette mit der konventionellen Zigarette und der Frage nach einer geringeren Toxizität zeigt ein eindeutiges Ergebnis. Der Konsum der E-Zigarette führt, wie bereits gezeigt, zu einer Reduktion des Tiffeneau-Index, jedoch ist der Abfall im Vergleich zur konventionellen Zigarette wesentlich geringer [Cervellati *et al.*, 2014; Flouris *et al.*, 2013]. Dieses Ergebnis bestätigen auch einige *in vitro*-Studien mit humanen Hautzellen, Mausfibroblasten und humanen Myokardzellen. Dabei wurde eine verringerte Vitalität festgestellt. Im Vergleich zur konventionellen Zigarette war die Schädigung signifikant geringer [Cervellati *et al.*, 2014; Farsalinos *et al.*, 2013a; Romagna *et al.*, 2013]. Zudem verursachen E-Zigaretten im Vergleich zur konventionellen Zigarette weniger Aerosole und könnten damit ungefährlicher sein [Ruprecht *et al.*, 2014]. Dieses Wissen ist auch unter den Konsumenten verbreitet. So wurden bei einer nicht-repräsentativen Online-Umfrage 1347 Konsumenten (72 % Europäer) befragt, wobei diese glauben, dass die E-Zigarette besser und gesünder sei, als die konventionelle Zigarette [Dawkins *et al.*, 2013]. In einer Befragung in Polen von 179 Konsumenten gaben 66 % an, dass ihnen die E-Zigarette helfe, komplett mit der konventionellen Zigarette aufzuhören. Immerhin noch 25 % gaben an, weniger als fünf Tabak-Zigaretten täglich zu rauchen [Goniewicz *et al.*, 2013 b]. Dies ist ein Grund, weshalb die E-Zigarette als erster Schritt der Raucherentwöhnung gesehen werden kann und diesen Prozess dem Konsumenten vereinfacht und angenehmer gestaltet [Etter, 2010]. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass die Liquide der E-Zigarette Nikotin enthalten und die Handhabung der konventionellen Zigarette gleicht. Jedoch haben Studien gezeigt, dass es keinen Unterschied in der Gewährleistung ausreichender Nikotinzufuhr und der Minimierung der Entzugserscheinungen bei der Nutzung von Nikotinplastern oder E-Zigaretten gab [Bullen *et al.*, 2013; Slomski, 2013]. Nachdem viele Konsumenten das Rauchen der herkömmlichen Zigarette aufgegeben haben und auf die E-Zigarette umgestiegen sind, fällt es dem großen Teil schwer auch auf das Dampfen zu verzichten. Viele sind bereits mit dem Erfolg zufrieden auf den Konsum der Tabak-Zigaretten zu verzichten, andere befürchten nach Verzicht auf die E-Zigarette rückfällig

zu werden und erneut Tabak-Zigaretten zu konsumieren [Harrell *et al.*, 2015; Etter und Bullen, 2011 a]. Somit wird das Suchtverhalten der Nikotinzufuhr nicht aufgegeben, sondern durch den Konsum der E-Zigaretten ersetzt.

### 1.3.3 Belastung der Raumluft durch die E-Zigarette

Die Frage nach der Belastung der Raumluft durch das Rauchen einer E-Zigarette und die daraus resultierenden Folgen für Passivraucher wurden schon mehrfach untersucht. Im Speziellen sind nach maschinellm Verdampfen verschiedener Liquide mit jeweils unterschiedlichen Geschmacksrichtungen und Nikotingehalt Raumluftanalysen durchgeführt worden. Dabei konnte ein Anstieg des Propylenglykol- und Glyceringehaltes, der feinen und ultrafeinen Partikel und von flüchtigen organischen Stoffen festgestellt werden [Geiss *et al.*, 2015; Schripp *et al.*, 2013]. Auch eine humanexperimentelle Studie zeigte ähnliche Ergebnisse. Neun Freiwillige mussten in sechs Raucher-Sitzungen über zwei Stunden verschiedene Liquide in einem belüfteten Raum verdampfen. Hierbei verdoppelte sich nahezu die Partikelanzahl in der Raumluft und die Menge der polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe nahm um 20 % zu. Aus diesem Grund gehen die Autoren von einem schädigenden Potenzial der E-Zigarette auch für Passivraucher aus [Schober *et al.*, 2014]. In einer anderen Studie wurde die Raumluft von Kinderzimmern im Vorschulalter untersucht. Dabei wurde eine signifikant erhöhte Anzahl an Fällen mit Asthma, Rhinitiden, erhöhten Werten von Immunglobulin-E (IgE) und allergischen Reaktionen beobachtet, wenn die Konzentration von Propylenglykol und Glycerin in der Luft erhöht war. Da sich Kinder in einer vulnerablen Körperentwicklungsphase befinden und Langzeitfolgen nicht absehbar sind, warnen die Autoren ausdrücklich vor leichtfertigem Umgang mit der E-Zigarette [Choi *et al.*, 2010]. In einer US-amerikanischen Online-Umfrage wurde das Nutzerverhalten und der Ort zum Rauchen beurteilt. Dabei sprachen sich 58,6 % für ein Rauchverbot in ihren Häusern und 63,8 % in ihren Fahrzeugen aus. Demzufolge sind sechs von zehn Amerikanern für ein Rauchverbot in ihrem Auto und Haus. Außerdem sprachen sich Befragte mit höherem Einkommen und Bildung häufiger für ein Rauchverbot aus [Gentzke *et al.*, 2018].

#### 1.3.4 Mechanische Verletzungen

In einer retrospektiven Studie, die den Zeitraum von 2012 bis 2016 erfasst, wurden 27 Fälle mit negativen Effekten auf verschiedene Organsysteme nach Konsum einer E-Zigarette z. B. respiratorisch, kardiovaskulär registriert [Hua und Talbot, 2016]. Es sind auch zwei Fälle mit mechanischen Verletzungen bekannt [Nicoll *et al.*, 2016]. In einem der Fälle explodierte die E-Zigarette ohne Nutzung und Fremdeinwirkung plötzlich in der Hosentasche und entzündete sich. Der Mann erlitt Verbrennungen an Ober- und Unterschenkel, die 8 % der Körperoberfläche ausmachten [Jablow und Sexton, 2015]. In dem zweiten Fall explodierte die E-Zigarette während des Rauchens. Der Patient erlitt dabei orale Verbrennungen und verlor mehrere Zähne, welche künstlich ersetzt werden mussten [Rogér *et al.*, 2016]. Ähnliche Probleme mit Explosionen und Verbrennungen sind bereits bei Lithium-Batterien der Handy-Akkus bekannt. Hier werden verschiedene Ursachen wie thermische und elektrochemische Modelle diskutiert [Wang *et al.*, 2012].

#### 1.3.5 Fremd- und Giftstoffentstehung

In mehreren Studien wurde der Dampf der E-Zigarette auf Inhaltsstoffe und eventuelle Gefahren- und Giftstoffe untersucht. In diesem Zusammenhang wurden 159 unterschiedliche Liquide aus 36 verschiedenen Manufakturen von sieben unterschiedlichen Händlern untersucht. In 74,2 % der Proben wurde Diacetyl und Acetylpropionyl gefunden, wobei die Diketon-Exposition im Vergleich zur konventionellen Zigarette geringer ist [Farsalinos *et al.*, 2015]. Ein ähnliches Resultat zeigten Allen und Mitarbeiter, die diese Stoffe in 76,5 % der Liquide fanden. Diese Ergebnisse sollten sehr ernst genommen werden, da Diacetyl und Acetylpropionyl mit respiratorischen Erkrankungen assoziiert werden, wie z. B. Bronchiolitis obliterans [Allen *et al.*, 2016]. Zusätzlich wurden noch Formaldehyd, Acetaldehyd, Acrolein und Nitrosamine mittels chromatographischen und spektroskopischen Methoden im Dampf nachgewiesen. Der Vergleich mit der konventionellen Zigarette zeigt wiederum eine geringere Zytotoxizität [Goniewicz *et al.*, 2014; Kim und Shin, 2013]. Ebenso konnten Nanopartikel von Feststoffen wie Eisen, Silber, Silikat, Nickel, Chrom und Zinn festgestellt werden [Williams *et al.*, 2013]. Durch weitere Analyse wurden verschiedene Korrelationen der Giftstoffentstehung festgestellt. Vor allem beim Verdampfen von Liquiden mit Fruchtgeschmack entsteht Formaldehyd. Generell stieg der Anteil der

Carbonylverbindungen mit dem Anteil der Geschmacksstoffe im Liquid an [Qu *et al.*, 2018]. Auch konnte eine direkte Korrelation zwischen dem PG-Gehalt und Carbonylverbindungen gefunden werden [Kosmider *et al.*, 2014]. Da die Studien alle *in vitro* durchgeführt wurden und die Liquide nicht mittels einer E-Zigarette verdampft wurden, ist die Interpretation der Toxizität und Übertragbarkeit der Ergebnisse für den Konsumenten eingeschränkt. Ein signifikanter Anstieg von Formaldehyd, Acetaldehyd und Propionaldehyd wurde unter Kontrolle der Temperaturen erst ab 150 °C detektiert [Hutzler *et al.*, 2014]. Die Betriebstemperatur der E-Zigarette liegt mit 40 - 65 °C deutlich darunter (vgl. Kapitel 1.2).

## 1.4 Liquide

### 1.4.1 Liquidzusammensetzung

Es gibt eine nahezu unbegrenzte Auswahl an Liquiden, aus denen der Konsument die Geschmacksrichtung und jeweilige Stärke des Nikotingehalts wählen kann. Zusätzlich besteht auch die Möglichkeit, Liquide individuell zusammenzustellen. Trotz dieser Vielfalt existieren essenzielle Bestandteile, die sich je nach Hersteller erheblich in ihrer Konzentration unterscheiden. Die Einzelbestandteile konnten mittels der Massenspektrometrie und der Gaschromatographie, die Quantität mittels der Flammen-Atomabsorptionsspektrometrie detektiert werden. [Cheah *et al.*, 2014; Uryupin *et al.*, 2013]. Jedoch besteht je nach Hersteller und Untersuchungsaufbau eine breite Varianz der Ergebnisse. In diesen Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass PG mit ca. 66 % gefolgt von Glycerin ca. 24 - 40 % die beiden Hauptbestandteile sind. In ihrem Volumen vernachlässigbar sind kleine Mengen an Wasser und Geschmacksstoffen [Etter und Bugey 2017; Pellegrino *et al.* 2012]. Weitere Spektralanalysen von verschiedenen deutschen Händlern ergaben PG-Konzentrationen zwischen 2 % und 79 % (Median 61 %) und Glycerol-Konzentrationen von ca. 7 - 42 % (Median 25 %) [Hutzler *et al.*, 2014]. Untersuchungen an E-Zigaretten Konsumenten ergaben Konzentrationen von 1673 - 5525 µg PG/Atemzug und 5 - 15 µg Glycerin/Atemzug [Schripp *et al.*, 2013]. Besonders die Angaben der Inhaltsstoffe der Liquide müssen mit Vorsicht betrachtet werden. Der Konsument sollte sich beispielsweise nicht immer auf den angegebenen Nikotingehalt verlassen, oder auf Fälschungen und somit minderwertige Ware achten [Omaiye *et al.*, 2017]. Auch sind zum Teil die Beschriftungen der Inhaltsstoffe

unzureichend oder fehlen ganz [Cheah *et al.*, 2014]. Weiterhin ist zu berücksichtigen, dass häufig die Deklaration des Nikotingehaltes nicht mit den Konzentrationen im produzierten Dampf übereinstimmt. Je nach Gerät und Nutzungsdauer reduzierte sich der Nikotingehalt. Somit muss der Konsument das Liquid eventuell frühzeitiger erneuern als erwartet [Goniewicz *et al.*, 2013 b]. So wurde im September 2019 eine einstweilige Verfügung mit Verkaufstop durch das Landgericht Düsseldorf gegen den amerikanischen Liquid-Hersteller Juul erlassen. Dieser darf seine Produkte zum jetzigen Zeitpunkt auf dem deutschen Markt nicht mehr vertreiben, da der deklarierte und der tatsächliche Inhalt des Nikotingehaltes differieren [Fischer und Simmank, 2019]. Nichtsdestotrotz dürfen diese Mängel nicht generalisiert werden, da je nach untersuchten Marken der tatsächliche Inhalt mit der Deklaration auch übereinstimmen kann [Etter und Bugey, 2017].

#### 1.4.2 Verwendung und Toxizität von Propylenglykol

Propylenglykol (PG) kann zum einen aus Propylenoxid durch Hydrolyse synthetisiert werden oder fällt zum anderen als Nebenprodukt bei der Herstellung von Biodiesel an. Verwendung findet der Stoff in vielen Farben, Harzen und Schmierstoffen [Wiesmann, 2007]. Erste Einsätze als Futterersatz in der Tierhaltung zeigten positive Ergebnisse. Hier konnte die Milchleistung von Kühen konstant gehalten und insbesondere in den beiden Wochen vor dem Kalben Ketosen vorgebeugt werden [Haus Riswick, Landwirtschaftskammer NRW, 2005]. Andererseits zeigten Katzen nach oraler Ingestion Ataxien, Depressionen und D-Laktatwerte von ca. 7 mmol/l. Diese Werte sind bei Menschen mit einer Encephalopathie assoziiert [Christopher *et al.*, 1990]. Dem Menschen begegnet der Stoff im Alltag unter anderem in Kaugummis und Kosmetika. Wobei in den Süßigkeiten eine Höchstmenge nicht direkt festgelegt ist, sondern nach der *Maxime quantum satis* agiert wird [Verbraucher Initiative e.V., 2013]. 37 Probanden zeigten nach gezielter oraler Aufnahme ein Exanthem. Dieses verschwand aber komplikationslos nach 24 - 48 Stunden bis auf eine Ausnahme. In diesem Fall musste eine Kortison-Therapie für vier Tage angewendet werden [Hannuksela und Förström, 1978].

In den Kosmetikprodukten wird PG häufig als Trägerstoff und Lösungsmittel verwendet. In verschiedenen Studien wurden die Auswirkungen auf den Menschen mittels Epikutantest überprüft. In ersten Untersuchungen konnten unter Verwendung des

Reinstoffes irritative Veränderungen bis hin zur Blasenbildung gefunden werden [Warshaw und Herrmann, 1952]. Eine *in vitro*-Studie mit humanen Fibroblasten und Keratinozyten bestätigte dieses Ergebnis. Es wurden Veränderungen in der Zellmorphologie, Zellproliferation und eine Verringerung der Kollagen Kontraktilität festgestellt, wodurch die Autoren von einer uneingeschränkten Nutzung abraten und weitere *in vivo*-Studien empfahlen [Ponec *et al.*, 1990]. Eine später durchgeführte retrospektive Studie konnte allergische und irritative Veränderungen beobachten, wobei das Ausmaß mit der Höhe des PG-Gehaltes korrelierte [Lalla *et al.*, 2018]. Dem gegenüber besagt eine Studie an 42 Probanden, dass PG nur marginale Veränderungen im Epikutantest hervorrief [Willis *et al.*, 1988].

Ein weiteres Anwendungsgebiet in der Medizin und Pharmakologie ist die Funktion als Lösungsmittel oder Trägerstoff von Arzneimittel wie z. B. Lorazepam. Dabei darf jedoch die Leber- oder Nierenfunktion nicht eingeschränkt sein, da es sonst zu einer Akkumulation und toxischen Effekten, wie sepsisartigen Beschwerden, Niereninsuffizienz oder metabolischer Azidose kommen kann [Zar *et al.*, 2007]. Zu beachten ist, dass auch unter subchronischer Exposition mit milden, toxischen Reaktionen gerechnet werden muss, auch wenn die Nierenfunktion dabei nicht eingeschränkt ist [Morshed *et al.*, 1998]. Der Serumkreatininspiegel könnte als Indikator für diese pathologischen Prozesse herangezogen werden, um mögliche toxische Effekte frühzeitig zu erkennen [Yaucher *et al.*, 2012].

Propylenglykol wird somit bereits auf verschiedenen Gebieten verwendet. Allerdings nicht, wie eben beschrieben, in hohen Konzentrationen, sondern beispielsweise nur als Suspensionslösung. Als Hauptbestandteil und in höheren Konzentrationen tritt PG nun erstmalig in Verbindung mit der E-Zigarette auf.

## 1.5 Festlegung von Grenzwerten

In der Toxikologie stellt man sich die zentrale Frage, ob und ab welchen Konzentrationen ein Stoff toxisch ist, und ob dieser akut oder chronisch zu Schäden an Menschen, Tieren, Pflanzen oder der Umwelt führt. Diese maximal zulässigen Konzentrationen werden durch den Grenzwert definiert [Lohs *et al.*, 2009]. Zur Erhebung dieses Wertes werden zunächst Daten *in vitro* und in Tierexperimenten erhoben. Anschließend werden diese in internationalen Gremien wie dem European Food Safety Authority (EFSA) oder auf

nationaler Ebene Deutschlands dem Bundesinstitut für Risikobewertung (BFR) diskutiert. Eine Handlungsempfehlung für die Festlegung von Grenzwerten wird somit im Diskurs von Wissenschaft und Politik ausgesprochen [Lampen, 2010].

Angaben von Grenzwerten und Toxizität des PGs sind in der Literatur nur spärlich vorhanden. Zwar gibt es eine Vielzahl von Tierexperimenten, aber diese Erkenntnisse sind nicht oder nur eingeschränkt für eine *in vitro*-Zellkultur direkt nutzbar. Diese Angaben beziehen sich meist auf die orale oder intravenöse Aufnahme des PG (vgl. Tabelle 1).

*Tabelle 1: Letale Dosis 50 (LD 50) von PG nach oraler Gabe für ausgewählte Tierspezies nach Spector (1955); LD 50: Wert bei dem 50 % der Population sterben; \*: Dosis bei der alle Versuchstiere sterben*

LD 50 g/kg				
Applikationsart	Ratte	Maus	Hase	Hund
oral	21 - 32	22 - 24	19	/
intravenös	/	5 - 8	4 - 6	25*

Angegebene Grenzwerte des Menschen beruhen auf Kasuistik und vorsichtigen Schätzungen. Das klinisch toxikologische Institut der Universität Göttingen gibt hierzu einen Richtwert von 1,5 g/kg mit leichten Symptomen an, wie z. B. Laktatazidose [Hermanns-Clausen und Desel, 2018].

Um sich den Grenzwerten für eine *in vitro*-Zellkultur zu nähern, wurde zunächst in Vorversuchen eine Vitalitätsbestimmung durchgeführt. Hierzu wurden verschiedene Konzentrationen als Flüssigkeiten für eine Stunde verwendet, um zu klären, ob das Propylenglykol überhaupt toxisch auf die Zellen wirkt. Dabei besagt die Nullhypothese  $H_0$ , dass mit PG behandelte Nasenschleimhautzellen dieselben Ergebnisse in den einzelnen Untersuchungsmethoden im Vergleich zu den Unbehandelten zeigen. Die Alternativhypothese  $H_1$  dagegen besagt, dass mit PG behandelte Nasenschleimhautzellen *nicht* dieselben Ergebnisse in den einzelnen Untersuchungsmethoden im Vergleich zu den Unbehandelten zeigen.

Begonnen wurde mit einer Konzentration von 1 mmol/l. Nachdem keine Toxizität ersichtlich war, wurden die Konzentrationen kontinuierlich gesteigert bis schließlich ab einer Konzentration von 1 mol/l die Vitalität abnahm. Daraufhin wurde auf den eigentlichen Versuchsaufbau mit Dampfexposition umgestellt. Eine genaue

Beschreibung erfolgt unter Kapitel 2.4. Auf Grund dieser ersten Ergebnisse wurden folgende Konzentrationen des Propylenglykols in der vorliegenden Arbeit untersucht: 1 mol/l, 10 mol/l und Reinstoff.

## 1.6 Problemstellung und Zielsetzung

Die E-Zigarette erfährt derzeit eine zunehmende Beliebtheit und Verbreitung weltweit. Die eingesetzten Liquide sind meist noch unzureichend untersucht, sodass häufig eine Verunsicherung seitens der Verbraucher und der Politik in der Frage nach der Toxizität besteht. Mit dieser Arbeit soll der Hauptbestandteil der Liquide, das PG, untersucht und folgende Fragen beantwortet werden:

- Inwieweit ist PG zytotoxisch?
- Ist PG DNA-schädigend?
- Erzeugt PG einen Anstieg der Interleukin-6 (IL-6) und Interleukin-8 (IL-8) Konzentration und somit eine Entzündungsreaktion?
- Muss PG als Gefahrenstoff gekennzeichnet werden und eventuell für die Nutzung der E-Zigaretten eingeschränkt werden?

Abschließend soll auf Basis der neu vorliegenden Erkenntnisse dieser Arbeit der teilweise sorglose Umgang mit E-Zigaretten in der Bevölkerung kritisch hinterfragt und eine Empfehlung für Grenzwerte gegeben werden.

## 2 Material und Methoden

In dieser *in vitro*-Studie soll mit Hilfe von Patienten-Proben die oben genannten Fragestellungen beantwortet werden.

Dazu wurden von zehn Patienten in einem operativen Eingriff Nasenschleimhautproben entnommen, separat kultiviert und in ein Air-Liquid-Interface (ALI) überführt. Anschließend wurde jede Probe in mehrere Ansätze aufgeteilt:

- 6 Ansätze für den Comet Assay kombiniert mit dem Trypanblau Test (Positiv-, Negativkontrollen, 1 mol/l, 10 mol/l, Reinstoff)
- 6 Ansätze für den Mikrokerntest (Positiv-, Negativkontrollen, 1 mol/l, 10 mol/l, Reinstoff)
- 1 Ansatz für die Positivkontrolle der Interleukine.

Nach einstündiger Exposition mit Propylenglykol wurden die Zellen auf Entzündungsreaktionen, Zyto- und Gentoxizität mit den jeweiligen Methoden untersucht.

### 2.1 Laborgeräte und Software

Tabellarische Auflistung der verwendeten Laborgeräte und Software:

*Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Laborgeräte und Software*

<b>Laborgeräte und Software</b>	<b>Firma, Ort</b>
Akku Pipetierhilfe	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Kinetik Komet 5.5	Andor Technology, Belfast, UK
Elektrophoresekammern	Renner GmbH, Dannstadt, Deutschland
Elektrophoresenetzgerät, EV 202	Consort, Turnhout, Belgien
ELISA-Reader Elx 800	BioTek, Bad Friedrichshall, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop, DM 4000 B	Leica, Heerbrugg, Schweiz
Gasexpositions-kammer Vitrocell	Vitrocell Systems GmbH, Waldkirch, Deutschland
Laborwasserbad Haake P5 mit Umwälzthermostat C10	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Lichtmikroskop Typ 090-135.001	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Massendurchflussregler EL-Flow	Bronkhorst High-Tech BV, Ruurlo, Niederlande
Neubauerzählkammer	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG, Sondheim v. d. Rhön, Deutschland

pH-Elektrode WTW SenTix21	Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Präzisionspipette Research 0,5 - 10 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Präzisionspipette Research 2 - 20 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Präzisionspipette Research 20 - 200 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Präzisionspipette Research 100 - 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Präzisionswaagen Typ KERN PFB	Kern&Sohn GmbH, Balingen, Deutschland
Pumpe, Trivac	Leybold GmbH, Köln, Deutschland
Statistica 13	Tibco Software Inc., Palo Alto, CA, USA
Software Gen5	BioTek, Bad Friedrichshall, Deutschland
Vortexgerät Genie 2	Bender&Hobein AG, Zürich, Schweiz
Wasserbad, SWB25	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Zentrifuge, 5810 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zytozentrifuge, Cell Spin - 1	Tharmac, Waldsolms, Deutschland

## 2.2 Labormaterialien

### 2.2.1 Reagenzien

Tabellarische Auflistung der verwendeten Reagenzien:

Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Reagenzien

Reagenzien	Firma, Ort
Agarose low melting point (Typ II)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Agarose normal melting point (Typ I)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Airway Epithelial Growth Medium (AEGM)	PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland
Aqua bidestillata	selbst hergestellt
Aqua ad injectabilia Miniplasco 20 ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Cytochalasin B	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
1,4 - Diazabicyclooctan (DABCO)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Deoxyribonuclease (DNase)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Fetales Kälber Serum (FCS)	Biochrom, Berlin, Deutschland
Fungizin/Amphotericin B250	Gibco by Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA

## MATERIAL UND METHODEN

Gel Red	Biotrend Chemikalien GmbH, Köln, Deutschland
Gel Green	Biotium Inc., Fremont, CA, USA
Gentamycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Glycerin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Human IL-6 Elisa Kit	Diaclone SAS, Besancon, Frankreich
Human IL-8 Elisa Kit	Diaclone SAS, Besancon, Frankreich
Isopropanol	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Kollagen A	Biochrom, Berlin, Deutschland
L-Glutamin G7513	Biochrom, Berlin, Deutschland
Minimum Essential Medium (MEM)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Methanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Mitomycin C (MMC)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Methylmethansulfonat (MMS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
NaCl	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
NaOH	Th. Geyer Gruppe, Renningen, Deutschland
N-Lauroylsarcosin-Natriumsalz	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin, Deutschland
Propylenglykol	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Protease	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Phosphatgepufferte Salzlösung 10-fache Konzentration (PBS)	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI)	Biochrom, Berlin, Deutschland
Trypanblau	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Trypsin/EDTA	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Tetrapropylammoniumper-ruthenat (TPAP)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Triton X-100	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

2.2.2 Verbrauchsmaterialien

Tabellarische Auflistung der Verbrauchsmaterialien:

Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Firma, Ort
Einmalpipetten 5 ml, 10 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Deckgläser (24 mm x 32 mm)	Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Eppendorfgefäß 5 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Falcon-Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Pasteurpipetten (Glas)	Brand GmbH, Wertheim, Deutschland
Petrischalen 100 mm x 20 mm	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Pipettenspitzen 0,5 – 10 µl, 1 – 200 µl, 200 – 1000 µl	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäß 0,5 ml	Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Reaktionsgefäß 1,5 ml	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Sterile Mullkompressen 7,5 cm x 7,5 cm	Lohmann & Rauscher GmbH, Rengsdorf, Deutschland
Surgical Disposable Scalpel	B. Braun Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland
Objektträger (26 mm x 76 mm)	R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
12 - Well Platte mit Membraneinsätzen	Corning Incorporated - Life Sciences, NY, USA
96 - Well Platte	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland

2.3 Patienten-Proben

Die Nasenschleimhautzellen wurden von Patienten der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen-, Ohrenkrankheiten, plastische und ästhetische Operationen des Universitätsklinikums Würzburg gewonnen. Die Proben wurden im Rahmen von medizinisch angeratenen, nicht gesundheitsgefährdenden Operationen gewonnen und fielen bei diesen aus technischen Gründen an: viermal Septum Deviationen mit Muschelhyperplasie, dreimal chronische Sinusitis mit Polyposis, zweimal Mukozele mit Pansinusitis und ein knöcherner Defekt der Nasennebenhöhlen. Acht Patienten waren

männlich und zwei weiblich. Der jüngste Patient war 20 Jahre alt und der Älteste 79 Jahre alt, wobei der Altersdurchschnitt 47,6 Jahre betrug. Die Patienten wurden ordnungsgemäß über die Studie aufgeklärt und erteilten ihre schriftliche Einwilligung. Das Aktenzeichen des Ethikantrages lautet 16/06.

#### **2.4 Aufarbeitung der Patienten-Proben**

Die Patientenproben wurden direkt vom hauseigenen Operationssaal abgeholt und ins Labor gebracht. Der Transport erfolgte in einer 0,9 % NaCl-Lösung in einem 50 ml Röhren, die Weiterverarbeitung der Proben wurde spätestens eine Stunde nach Abholung durchgeführt. Zur weiteren Aufbereitung wurde Minimal Essential Medium (MEM) + Zusätze zusammen mit der Probe in eine sterile Petrischale gegeben und mit steriler Pinzette und Skalpell von Blutresten, Knochen- und Knorpelresten befreit. Für die Herstellung des MEM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) wurden 500 ml des Mediums mit 5 ml Penicillin/Streptomycin (Biochrom, Berlin, Deutschland), 5 ml L-Glutamin (Biochrom), 0,5 ml Gentamycin (50 mg/ml; Sigma-Aldrich) und 0,5 ml Fungizid/Amphotericin (Gibco by Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA) vermischt und bei 4 °C gelagert. Im Vorfeld der Versuche wurde ein Enzymmix aus 100 mg Protease (Sigma-Aldrich), 1 mg Deoxyribonuclease (DNase; Sigma-Aldrich) und 10 ml Phosphatgepufferte Salzlösung einfache Konzentration (PBS) hergestellt. Anschließend wurde dieser Enzymmix in Aliquots aus je 100 µl bei -20 °C gelagert. PBS in einfacher Konzentration wurde hergestellt, indem PBS 10-fache Konzentration (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) mit destilliertem Wasser im Verhältnis 1 zu 10 verdünnt wurde. Ein aliquotierter Enzymmix von 100 µl wurde aufgetaut und mit 9,9 ml MEM + Zusätzen in einem 15 ml Röhren gemischt. Die aufgereinigte Probe wurde in ein 15 ml Röhren überführt und 24 Stunden lichtgeschützt bei 4 °C auf einem Schüttler bewegt. Am nächsten Tag wurden 13 Wells mit jeweils 300 µl einer 1:1 Mischung PBS (einfache Konzentration) und Kollagen A (Biochrom) für 30 Minuten inkubiert. In der Zwischenzeit wurde die Patientenprobe vom Vortag in einer sterilen Petrischale mit 2 ml Fetalem Kälber Serum (FCS; Biochrom) vermischt und mittels sterilem Skalpell und Pinzette zerkleinert. Diese Suspension wurde wiederum mit Hilfe einer 5 ml Einmalpipette durch eine sterile Kompresse (7,5 cm x 7,5 cm) in ein 50 ml Röhren gefiltert und für fünf Minuten bei 4 °C bei 500 g zentrifugiert (Zentrifuge 5810 R

Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Nach Absaugen des Überstandes wurde die Suspension mit 6,5 ml (500  $\mu$ l pro Well bei 13 Wells) „Airway Epithelial Cell Growth Medium“ (AEGM; PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland) mit Supplement und 1 % Penicillin/Streptomycin resuspendiert. Für die Herstellung von AEGM mit Zusätzen wurde das mitgelieferte Supplement und 5 ml Penicillin/Streptomycin mit 500 ml Medium vermischt. Nach Ablauf der 30 Minuten wurde der Kollagen/PBS Überstand abgesaugt und jeweils 500  $\mu$ l der Zellsuspension hinzugefügt. Zuletzt wurde 1 ml des AEGMs mit Zusätzen in die basalen Kompartimente gegeben (vgl. Abb. 3).

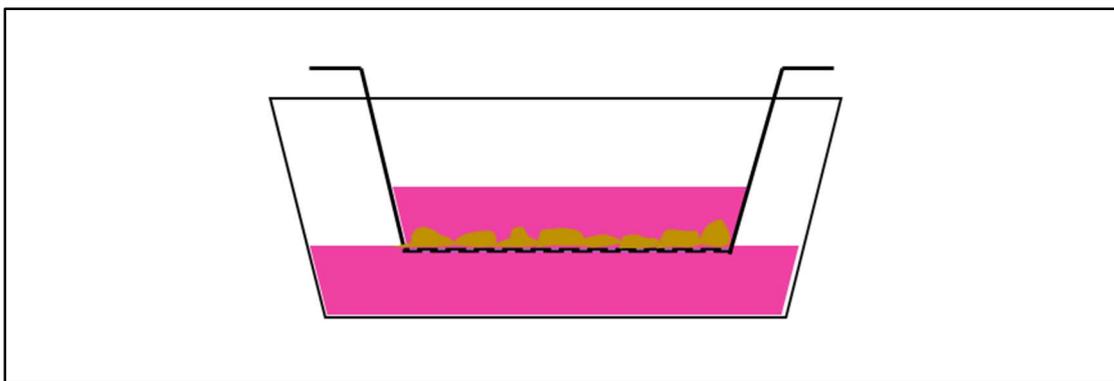


Abbildung 3: schematische Darstellung von Nasenschleimhautzellen auf einem Well mit 500  $\mu$ l Medium im apikalen Kompartiment und 1 ml Medium im basalen Kompartiment

## 2.5 Kultivierung der Zellen

Die kultivierten Nasenschleimhautzellen wurden alle zwei Tage mit frischem AEGM mit Zusätzen wie folgt versorgt: Zunächst wurden die apikalen Kompartimente vorsichtig abgesaugt und anschließend die basalen. Hierbei ist darauf zu achten nicht mit der Pasteurpipette auf dem Transwell aufzusetzen und die Zellen mit abzusaugen. Anschließend wurden 500  $\mu$ l apikal und 1 ml basal des AEGMs mit Zusätzen pipettiert. Bestand nach 7 - 9 Tagen der Kultivierung unter lichtmikroskopischer Kontrolle (Lichtmikroskop Zeiss, Oberkochen, Deutschland) (vgl. Abb. 4) eine Konfluenz von mehr als 70 %, wurde nur noch das basale Kompartiment, wie eben beschrieben, versorgt (vgl. Abb. 5). Nach weiteren drei Tagen der Kultivierung konnte die Exposition erfolgen.

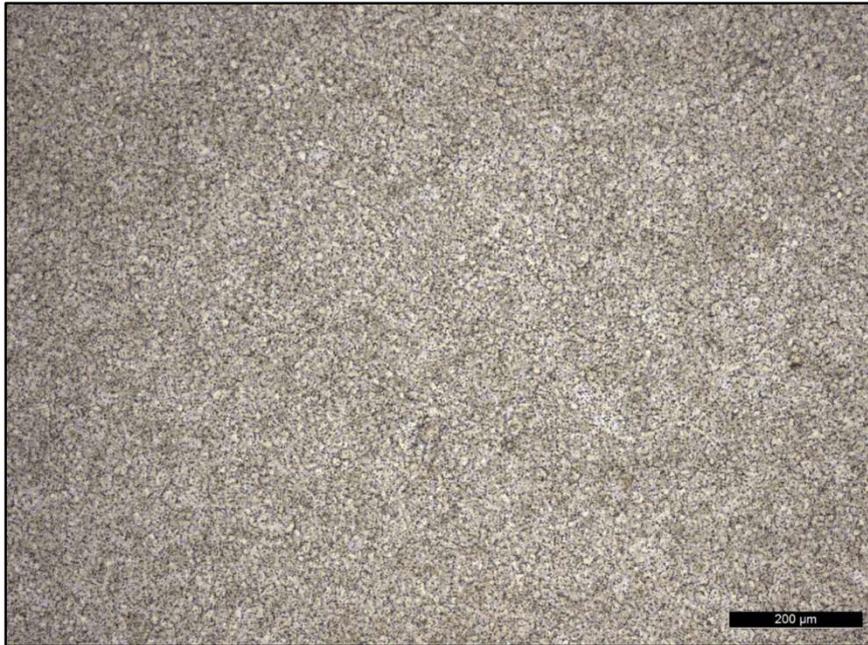


Abbildung 4: Lichtmikroskopische Aufnahme von Nasenschleimhautzellen bei 10-facher Vergrößerung im Air-Liquid-Interface; Tag 11; (Leica, DMI 4000 B, Heerbrugg, Schweiz)

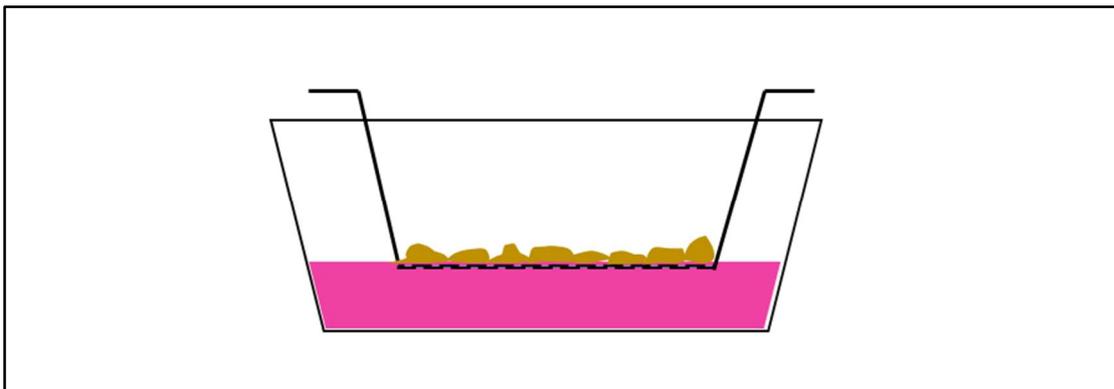


Abbildung 5: schematische Darstellung von Nasenschleimhautzellen auf einem Well im Air-Liquid-Interface: noch 1 ml Medium im basalen Kompartiment

## 2.6 Vorversuch MTT-Test

### 2.6.1 Grundlagen

Das Grundprinzip des MTT-Tests basiert darauf, dass das gelbe, wasserlösliche Tetrazoliumsalz (Sigma-Aldrich) in blau-violettes, wasserunlösliches Formazan reduziert wird. Dieser Farbumschlag kann anschließend mit einem ELISA-Reader mit einer Wellenlänge von 570 nm gemessen werden [Mosman, 1983]. Lange Zeit wurde angenommen, dass für den Farbumschlag die Succinatdehydrogenase im Mitochondrium verantwortlich ist, tatsächlich ist jedoch das NADH und NADPH im endoplasmatischen

Retikulum dafür zuständig. Somit ist der Farbumschlag ein Maß für die Glykolyse-Rate der Zelle und weniger ein Maß für die Zellatmung [Berridge und Tan, 1993].

### 2.6.2 Durchführung

Nach Exposition mit den jeweiligen Konzentrationen in flüssiger oder Gasform wurden die einzelnen Ansätze mit 500 µl der MTT-Suspension für vier Stunden inkubiert. Hierfür wurden mittels einer Präzisionswaage vom Typ KERN PFB (Kern&Sohn GmbH, Balingen, Deutschland) 8 mg des MTTs mit 8 ml AEGM mit 1 % Penicillin/Streptomycin ohne Supplement gelöst. Danach wurde die MTT-Suspension abgesaugt und erneut für 30 Minuten mit 500 µl Isopropanol (VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland) inkubiert. 100 µl dieser blau-violetten Suspension wurden für jede Konzentration auf vier Felder einer 96-Well Platte aufgetragen. Die Auswertung erfolgte mit einem ELISA Reader (BioTek, Bad Friedrichshall, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 570 nm. Dabei wurde die Negativkontrolle mit einer Vitalität von 100 % gleichgesetzt und die restlichen Werte mittels des Dreisatzes ermittelt. Als Positivkontrolle wurde Tetrapropylammonium Perruthenat (TPAP; Sigma-Aldrich) der Konzentration 8 mmol/l verwendet.

### 2.7 Versuchsaufbau

Für die Dampfexposition wurde auf ein durch unsere Arbeitsgruppe etabliertes Verfahren zurückgegriffen [Koehler *et al.*, 2010, Koehler *et al.*, 2011], welches für die Zwecke dieser Arbeit verändert wurde (vgl. Abb. 6 und 7). Das zentrale Element des Aufbaus bildet die Expositions-kammer (Vitrocell Systems GmbH, Waldkirch, Deutschland). Diese wird an ein Wasserbad (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) mit Umwälzpumpe (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) angeschlossen und auf 37 °C erwärmt. Über den Abluftzugang der Expositions-kammer wurde eine Pumpe vom Typ Trivac (Leybold GmbH, Köln, Deutschland) angeschlossen. Diese wird über einen zwischengeschalteten Massendurchflussregler (MFC-Regler, Bronkhorst High-Tech BV, Ruurlo, Niederlande) auf 20 ml/Minute eingestellt. Bei einer Sogstärke von 20 ml/Minute konnte der natürliche Widerstand des Mundstückes der E-Zigarette überwunden werden und es muss nicht mit Zellschädigung durch Austrocknung seitens des erhöhten Luft-

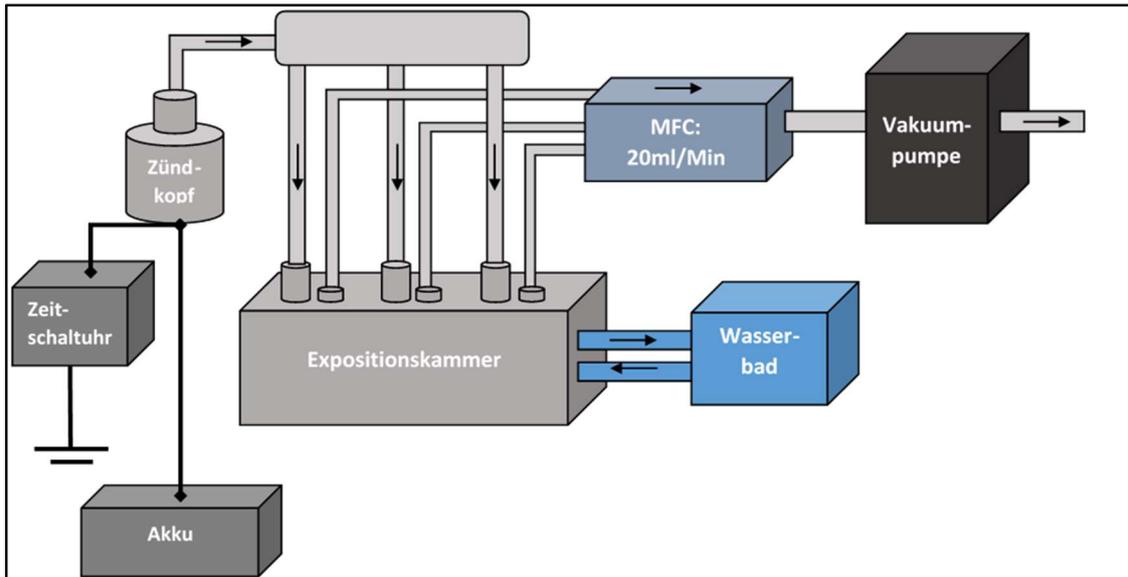


Abbildung 6: schematische Darstellung des Expositionsaufbaues. MFC: Massendurchflussregler. Stromleitung in schwarz, Wasserleitung in blau und Gasleitung in grau dargestellt. Das Wasserbad und somit die Expositionskammer wurde auf 37°C erwärmt. Das verdampfte Öiquid wird durch den Unterdruck der Vakuumpumpe in die Expositionskammer gesaugt. Das Volumen wird durch den MFC kontrolliert

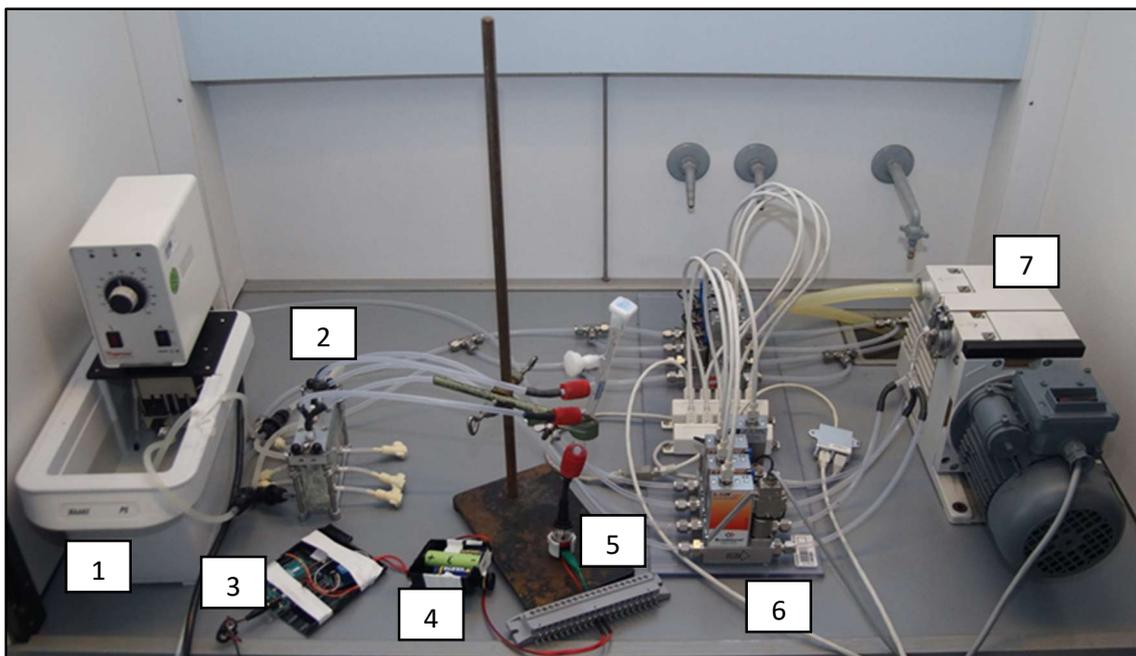


Abbildung 7: Aufbau des Versuches im Labor: 1) Wasserbad mit Umwälzthermostat 2) Expositionskammer 3) Zeitschaltuhr 4) Akku für die Zündung der E-Zigarette 5) Zündkopf der E-Zigarette mit Verteilersystem für die Expositionskammer 6) Massendurchflussregler 7) Vakuumpumpe

stromes gerechnet werden [Bakand *et al.*, 2006]. Die Zuluft wurde über ein Verteilerstück mit dem Verdampfer und dem Liquiddepot der E-Zigarette verbunden. Daran wurde eine Zeitschaltuhr und ein Akku angebracht, um den speziellen Dampfexpositionen gerecht zu

werden: Die Aktivierung der Heizspirale und somit die Verdampfung erfolgte vier Sekunden lang, in einem Intervall von 30 Sekunden, über den gesamten Zeitraum von einer Stunde pro Konzentration. Dieser Zeitablauf wurde bereits mehrfach in vitro-Modellen verwendet und für diese Arbeit übernommen [Farsalinos *et al.*, 2013b; Farsalinos *et al.*, 2015].

Für jede Konzentration wurde eine eigene E-Zigarette verwendet, um Kontaminationen zu vermeiden. Zudem wurde bei jeder Exposition ein neuer Atomizer verwendet.

## 2.8 Ablauf der Dampfexposition

24 Stunden vor Exposition wurde das basale Medium gegen AEGM mit 1 % Penicillin/Streptomycin ohne Supplement ausgetauscht, um eine Beeinflussung durch unbekannte Zusätze des Supplementes zu verhindern. Für die Herstellung des AEGM ohne Zusatz wurden 500 ml des Mediums mit 5 ml Penicillin/Streptomycin vermischt. Am Tag des Versuches wurde die VitroCell Expositions-kammer zunächst mit Ethanol und PBS gereinigt. Anschließend wurden die jeweiligen Konzentrationen des Propylenglykols (Sigma-Aldrich) und einschließlich der Positivkontrollen hergestellt. Für die einzelnen Propylenglykol Konzentrationen wurde *Aqua ad injectabilia* (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) verwendet, um den Filter der E-Zigarette nicht durch Salze oder Proteine zu verunreinigen und somit ungewollte Verbrennungen und Schadstoffe zu erzeugen. Für jede untersuchte Konzentration wurde jeweils 1 Well für den Comet Assay und den Mikrokerntest in die Expositions-kammer eingesetzt. Zusätzlich wurde in jedes Kompartiment 1 ml AEGM mit 1 % Penicillin/Streptomycin ohne Supplement für die spätere IL-6 und IL-8 Bestimmung gegeben. Nach jeder Exposition wurden die Kammern mit PBS gereinigt.

## 2.9 Einzelzell Mikrogel Elektrophorese (Comet) Assay

### 2.9.1 Grundlagen

Der Comet Assay beruht auf einem Verfahren, das von Oestling und Johanson im Jahr 1984 erstmals entwickelt wurde. Hierbei werden mittels Elektrophorese DNA-Doppelstrangbrüche in Zellen nachgewiesen [Oestling und Johanson, 1984]. Im Jahr 1988 wurde diese Technik von Singh und Mitarbeitern unter Verwendung von basischen Puffern ( $\text{pH} > 13$ ) weiterentwickelt, sodass auch Einzelstrangbrüche detektiert werden

können [Singh *et al.*, 1988]. Für die Durchführung nach Singh und Mitarbeitern werden die Zellen in Agarose aufgenommen und auf beschichtete Objektträger gebettet und lysiert. Durch die angelegte Spannung in der Elektrophoresekammer (Renner GmbH, Dannstadt, Deutschland) wandern die negativ geladenen DNA-Stücke in Richtung Anode. Je kleiner die DNA-Stücke desto weiter der Transport und desto größer der Komet und umso ausgeprägter die DNA-Schädigung nach Exposition. Eine Färbung macht den Schweif des Komet fluoreszenzmikroskopisch nachweisbar und messbar.

### 2.9.2 Durchführung

Am Tag vor Durchführung des Experimentes wurden speziell beschichtete Objektträger hergestellt. Dafür wurde „Normal Melting Point“ Agarose (Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland) in der Mikrowelle erhitzt und die Objektträger darin zu 2/3 eingetaucht, anschließend rückseitig gesäubert und zum Trocknen ausgelegt. Danach konnten sie in Boxen bei Raumtemperatur (RT) bis zur Verwendung gelagert werden. Für die Herstellung der „Normal Melting Point“ Agarose wurden 1,5 g der Agarose mit 100 ml PBS einfache Konzentration vermischt und im Kühlschrank gelagert.

Zur Gewinnung der Zellen nach Exposition wurden diese zunächst mit 300 µl PBS einfache Konzentration gewaschen, anschließend mit 200 µl Trypsin/EDTA 0,25 % für fünf Minuten lysiert und mit 600 µl Roswell Park Memorial Institute (RPMI, Biochrom)/10 % FCS abgestoppt. Für die Herstellung des RPMI/10 % FCS wurden 450 ml RPMI mit 50 ml FCS vermischt und bei 4 °C gelagert. Nach Überführen in ein Reaktionsgefäß (1,5 ml) wurden die Zellsuspension bei 5 °C mit 1300 U/Minute für fünf Minuten zentrifugiert. Nun wurde der Überstand auf ca. 30 µl abgesaugt und 10 µl der Suspension in ein neues Reaktionsgefäß (1,5 ml) für den Trypanblau Test überführt. Die restlichen 20 µl wurden gevortext (Vortexgerät Genie 2, Bender&Hobein AG, Zürich, Schweiz) und in ein Reaktionsgefäß 0,5 ml mit 180 µl „Low Melting Point“ Agarose (Sigma-Aldrich) resuspendiert. Für die Herstellung der „Low Melting Point“ Agarose wurden 50 mg der Agarose mit 10 ml PBS einfache Konzentration vermischt und im Kühlschrank gelagert. Anschließend wurde pro beschichtetem Objektträger 60 µl der Suspension aufgetragen und mit einem Deckgläschen versehen. Pro Ansatz wurden zwei Objektträger hergestellt. Die zellbeschichteten Objektträger lagerten für drei Minuten abgedunkelt im Kühlschrank. Danach wurde das Deckgläschen entfernt und die

Objektträger bei 4 °C in der Lyse-Lösung gesammelt, sodass auch das letzte Objektträgerpaar mindestens 60 Minuten lysiert wurde. Für die Herstellung der Lyse-Lösung wurden 0,75 ml Triton X (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 7,5 ml Dimethylsulfoxid (DMSO; Carl Roth GmbH + Co. KG) und 66,75 ml Lyse-Puffer vermischt. Der Lyse-Puffer wurde hergestellt, indem 76 ml N-Lauroylsarcosin-Natriumsalz (Sigma-Aldrich) mit 292,8 g NaCl (Sigma-Aldrich), 2,4 g Trishydroxymethylaminomethan (Tris; Merck, Darmstadt, Deutschland), 74,4 g Ethylendiamintetraacetat (EDTA; Sigma-Aldrich) in 1,8 Liter destilliertem Wasser gelöst wurden, und anschließend mittels NaOH Lösung ein pH von 10,0 titriert wurde (pH-Elektrode, Hartenstein, Würzburg, Deutschland). Für die Herstellung der NaOH Lösung wurden 200 g NaOH (Th. Geyer Gruppe, Renningen, Deutschland) in 950 ml destilliertem Wasser gelöst und anschließend auf 1 Liter aufgefüllt. Der Lyse-Puffer und die NaOH Lösung wurden bei RT gelagert. In der Zwischenzeit wurde die Elektrophoresekammer mit Eis umgeben und mit 1950 ml Elektrophorese Puffer aufgefüllt. Für die Herstellung dieses Puffers wurden am Vortag 120 ml der NaOH Lösung und 10 ml EDTA mit destilliertem Wasser auf 2000 ml aufgefüllt und bei 4 °C gelagert. Für die Herstellung der EDTA Stammlösung wurden 14,89 g EDTA mit 180 ml destilliertem Wasser gemischt und anschließend mit Hilfe von NaOH auf einen pH von 10,0 titriert. Die Lösung wurde auf 200 ml mit destilliertem Wasser aufgefüllt und bei RT gelagert. Nach der Lyse wurden die Objektträger kurz mit destilliertem Wasser gespült und danach mit der Agarose nach oben nebeneinander in die Kammer geschichtet. Die unvollständig gefüllte Kammer wurde mit leeren Objektträgern aufgefüllt. Das Elektrophorese Netzgerät (Consort, Turnhout, Belgien) wurde auf 25 V und durch Zugabe des restlichen Puffers auf 300 mA eingestellt. Die Kammer wurde abgedunkelt und nach weiteren 20 Minuten der Inkubation eingeschaltet. Anschließend wurden die Objektträger für fünf Minuten in Tris Puffer und weitere acht Minuten in Methanol (Sigma-Aldrich) bei -20 °C inkubiert. Damit waren die Proben fixiert und konnten trocken und lichtgeschützt bei RT gelagert werden. Für die Herstellung des Tris Puffers wurden 97 g Tris in 1950 ml destilliertem Wasser gelöst und durch Zugabe einer 5 mol/l Salzsäure (HCl; Merck) auf einen pH-Wert von 7,5 titriert. Anschließend wurde die Lösung auf 2 Liter aufgefüllt, autoklaviert und bei RT gelagert.

Die Auswertung der Proben erfolgte innerhalb von drei Tagen. Kurz vor der Auswertung wurden die Proben mit 20 µl der Färbelösung Gel Red und einem Deckgläschen versehen, damit der Comet fluoreszenzmikroskopisch nachweisbar wurde. Für die Herstellung der Färbelösung wurden 10 µl der Gel Red Stammlösung (Biotrend Chemikalien GmbH, Köln, Deutschland) in 990 µl destilliertem Wasser gelöst und anschließend mit 3 ml 1,4 - Diazabicyclooctan (DABCO; Carl Roth GmbH + Co. KG) versetzt und bei 4 °C gelagert. Für die Herstellung von DABCO wurden 2,5 g DABCO mit 75 ml Glycerin (Carl Roth GmbH + Co. KG) und 25 ml PBS einfache Konzentration vermischt.

Es wurden 100 Zellen pro Ansatz, also 50 Zellen pro Objektträger, ausgezählt. Ein zusätzlich angeschlossener Computer mit dem installierten Programm „Kinetik Komet 5. 5“ (Andor Technology, Belfast, UK) erfasste folgende Parameter:

- Tail DNA

Die Tail DNA gibt den prozentualen Anteil der DNA im Schweif an.

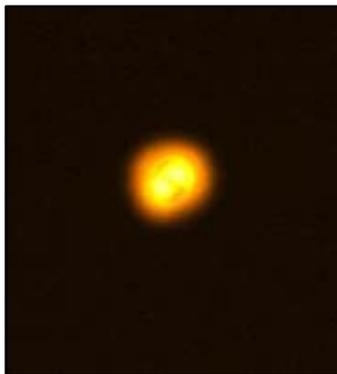
- Tail Length

Die Tail Length gibt die Länge der DNA-Wanderung vom Kern aus an.

- Olive Tail Moment

Das Olive Tail Moment ist das Produkt aus der Tail DNA und der Tail Length.

Je größer dabei das Olive Tail Moment ist, desto größer ist der Schaden durch die Exposition und desto ausgeprägter der Schweif (vgl. Abb. 8 und 9) [Olive et al., 1990]



*Abbildung 8: Nasenschleimhautzelle einer Negativkontrolle im Comet Assay bei 400-facher Vergrößerung*



*Abbildung 9: Nasenschleimhautzelle mit fragmentierter DNA und Schweif im Comet Assay bei 400-facher Vergrößerung*

Als Positivkontrolle wurde Methylmethansulfonat (MMS; Sigma-Aldrich) der Konzentration 600 µmol/l verwendet. Dafür wurden zunächst 8,4 µl des MMS mit 991,6 µl DMSO gemischt. Daraus wurden wiederum 600 µl mit 400 µl DMSO vermischt.

Zuletzt wurden erneut 10 µl entnommen und mit 990 µl AEGM mit Penicillin/Streptomycin, aber ohne Supplement vermischt.

## 2.10 Trypanblau Test

### 2.10.1 Grundlagen

Der Trypanblau Test ist eine schnelle und einfache Methode, um die Vitalität zu bestimmen. Dafür werden die Zellen mit Trypanblau (Sigma-Aldrich) gemischt. Durch Auftragen auf eine Neubauerzählkammer (Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG, Sondheim v. d. Rhön, Deutschland) kann lichtmikroskopisch zwischen vitalen und avitalen Zellen differenziert werden. Durch eine intakte Membran kann der Farbstoff nicht diffundieren, daher bleibt das Cytoplasma hell bzw. weiß. Anders bei Membranschäden, denn in diesem Fall färbt sich das Cytoplasma blau [Schmitz, 2011; Strober, 1997].

### 2.10.2 Durchführung

Das Reaktionsgefäß des Comet Assays mit den restlichen 10 µl wurde nun mit 10 µl Trypanblau vermischt. Daraus wurden 10 µl auf eine Neubauerzählkammer gegeben und lichtmikroskopisch bei 10-facher Vergrößerung ausgewertet. Dafür wurden vier Großquadrate, bestehend aus jeweils 16 kleineren Quadraten, ausgezählt. In der ersten Zählung wurden alle vitalen und anschließend alle avitalen Zellen gezählt. Es ist darauf zu achten, Doppelzählungen zu vermeiden, indem Zellen, die die linke oder die obere Begrenzung des Quadrates berühren, nicht mitgewertet werden. Um die Vitalität in Prozent zu bestimmen, wurde folgende Rechnung angestellt: Für jede Konzentration wurde der Quotient aus den vitalen Zellen und der gesamten Zellzahl gebildet. Die gesamte Zellzahl setzt sich aus der Summe der vitalen und avitalen Zellen zusammen. Um die Vitalität in Prozent zu erhalten, wurde das Ergebnis des Quotienten mit 100 multipliziert.

$$\frac{\text{vitale Zellen}}{\text{gesamte Zellzahl}} \times 100$$

## 2.11 Mikrokerntest

### 2.11.1 Grundlagen

Mikrokerne sind eigenständig vom Nukleolus abgelöste Chromatin-Ansammlungen. Diese können unter anderem durch mutagene Substanzen oder ionisierende Strahlungen entstehen. Dabei können sich einzelne DNA-Stückchen bis hin zu ganzen Chromosomen abspalten und während der Mitose nicht mehr mittels des Spindelapparates in die Tochterzellen überführt werden [Fenech, 1993; Schmid, 1975]. Diese DNA-Ansammlung wird nun von einer neugebildeten, zellkernartigen Membran umgeben und ist nach Färbung als Mikrokern erkennbar [Schiffmann *et al.*, 1991]. Um die zellulären Teilungsprozesse und Abläufe gezielt zu unterbrechen und somit die Ein-, Zwei- und Mehrkernigkeit als auch Apoptosen und Mitosen beurteilen zu können, muss die Funktion des Spindelapparates mit Hilfe von Cytochalasin B (Sigma-Aldrich) unterbrochen werden (vgl. Abb. 10 und 11) [Fenech, 2000].

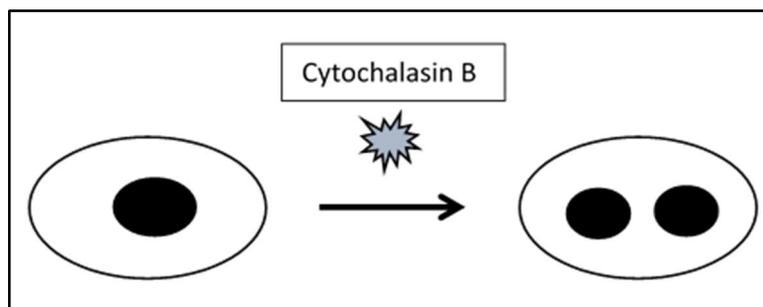


Abbildung 10: schematische Zeichnung: Ablauf der Mitose unter Zugabe von Cytochalasin B und anschließender Arretierung der Zellteilung ohne Mikrokern

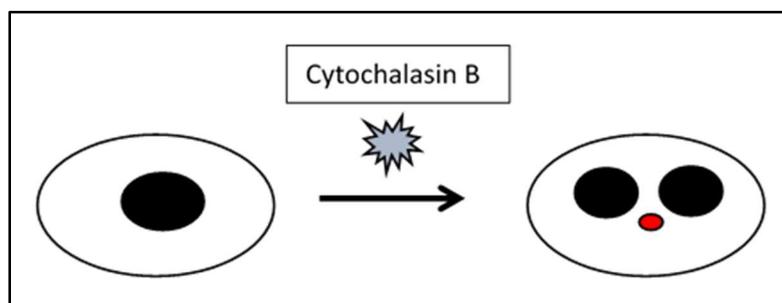


Abbildung 11: schematische Zeichnung: Ablauf der Mitose unter Zugabe von Cytochalasin B und anschließender Arretierung der Zellteilung und Entstehung eines Mikrokerns

### 2.11.2 Durchführung

Nach Exposition wurden die Wells in eine 12-Well-Platte überführt. Aus einer aliquotierten Cytochalasin-B-Stammlösung (1 mg/ml: 5 mg Cytochalasin B mit 5 ml DMSO) wurden pro Well 4 µl mit 1 ml AEGM mit Penicillin/Streptomycin ohne Supplement gemischt und für 24 Stunden erneut inkubiert, um die Zellteilung zu arretieren. Am Folgetag wurde das Medium abgesaugt und jedes Well mit 300 µl PBS einfache Konzentration gewaschen. Anschließend erfolgte eine Lyse der Zellen mit je 200 µl Trypsin/EDTA 0,25 % (Sigma-Aldrich) für fünf Minuten im Inkubator. Dieser Prozess wurde mit 600 µl RPMI + 10 % FCS gestoppt und die Suspension in ein Reaktionsgefäße 1,5 ml überführt. Mittels der Zytozentrifuge Cell-Spin (Tharmac, Waldsolms, Deutschland) wurden die Zellsuspensionen mit 1000 U/Minute für fünf Minuten auf jeweils drei Objektträger übertragen. Die fertigen Objektträger wurden für mindestens zwei Stunden in Methanol (-20 °C) fixiert und dort bis zur Auswertung gelagert. Für die Färbung wurde zunächst eine Gebrauchslösung aus einer Stammlösung hergestellt. Dafür wurden 10 µl der Stammlösung Gel Green (Biotium Inc., Fremont, CA, USA) mit 990 µl destilliertem Wasser vermischt. Nachdem die Präparate aus dem Methanolbad angetrocknet waren, wurden sie mit 25 µl Gebrauchslösung und einem Deckglas (24 mm x 32 mm) für fünf Minuten inkubiert. Anschließend wurde der Objektträger mitsamt Deckglas mit destilliertem Wasser abgespült und angetrocknet. Nun wurde der Objektträger mit 25 µl DABCO und einem neuen Deckglas (24 mm x 32 mm) versehen. Es sollten jedoch immer nur so viele Objektträger gefärbt wie ausgewertet werden, um eine Entfärbung und Verfälschung der Ergebnisse zu vermeiden. Die Auswertung erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop Typ DM 4000 B (Leica, Heerbrugg, Schweiz) und einem verwendeten Filter der Wellenlänge 450 - 490 nm bei 400-facher Vergrößerung. In einer ersten Zählung wurden sowohl alle ein-, zwei- und mehrkernige Zellen als auch Apoptosen, Mitosen und Nekrosen für jeden Ansatz gezählt. In einer zweiten Zählung wurden für jeden Ansatz nur die doppelkernigen Zellen berücksichtigt und ob ein Mikrokern zu sehen ist. Die bereits gezählten zweikernigen Zellen aus der ersten Zählung wurden bei der zweiten Zählung inkludiert. Beide Zählungen wurden jeweils bis 1000 durchgeführt. Folgende Kriterien nach Fenech wurden als Definition für das Vorliegen eines Mikrokerns angewandt [Fenech, 2007]:

- Der Durchmesser des Mikrokerns variiert maximal von 1/16 bis zu 1/3 des Hauptkernes.
- Der Mikrokern ist nicht mit dem Hauptkern durch beispielsweise nukleoplasmatische Brücken verbunden.
- Der Mikrokern darf den Hauptkern berühren, diesen jedoch nicht überlappen.
- Der Mikrokern soll die gleiche Fluoreszenzintensität wie der Hauptkern haben.

Als Positivkontrolle wurde Mitomycin C (MMC; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in einer Konzentration von 1 µg/ml verwendet. Hierfür wurde 1 µl einer 1 mg/ml Stammlösung mit 999 µl AEGM ohne Supplement, aber mit Penicillin/Streptomycin gemischt.

## 2.12 Sandwich-ELISA

### 2.12.1 Grundlagen

Die Interleukine-6 und -8 (IL-6 und IL-8) gehören zu der Gruppe der Zytokine und haben diverse Regulierungs- und Aktivierungsaufgaben im Immunsystem: IL-6 wird bei Verletzungen der Haut und bakteriellen oder viralen Infektionen ausgeschüttet. Durch seine Stimulation werden unter anderem die Synthese von Akut-Phase-Proteinen in der Leber, die Differenzierung von B-Zellen zu Antikörper produzierenden Plasmazellen, die Differenzierung der T-Zelle und deren Wachstum, die Differenzierung der Monozyten in Makrophagen und Aktivierung von natürlichen Killerzellen aktiviert [Hirano, 1998; Sehgal, 1990]. IL-8 wird von Phagozyten und mesenchymalen Zellen produziert. Es wirkt chemotaktisch auf Neutrophile Granulozyten und steigert deren Exozytosen mit oxidativem Burst und führt somit zu einer verstärkten Entzündungsreaktion [Baggiolini und Clark-Lewis, 1992]. Der „Enzyme-Linked Immunosorbent Assay“ (ELISA) ist ein sensitives Verfahren, um Antigene quantitativ zu messen. Hierbei bedient man sich des „Schlüssel-Schloss-Prinzips“, d. h., ein Antigen bindet nur an dem für sich passendem Antikörper (vgl. Abb. 12). Hierfür wird eine beschichtete Mikrotiterplatte mit dem passenden Antikörper (Beschichtungsantikörper) benötigt. Anschließend kann sich durch Zugabe der Probe das spezifische Antigen daran binden. Durch Hinzufügen eines zusätzlichen Primärantikörpers bildet sich ein Komplex mit dem Antigen und dem Beschichtungsantikörper. Überschüssige Antikörper werden durch Waschschrte entfernt. Durch die Zugabe von Sekundärantikörpern gepaart mit weiteren

Waschschritten kann letztendlich ein enzymatischer Farbumschlag induziert werden. Dieser kann photometrisch ausgewertet werden. Je höher die Farbintensität, desto größer die Anzahl der Antikörper-Antigen-Komplexe und desto höher die Konzentration der Probe. Zu jedem Versuch muss eine lineare Standardkurve erzeugt werden, um das Ergebnis quantitativ einordnen und interpretieren zu können [Hünig, 2009; Stolze *et al.*, 2016].

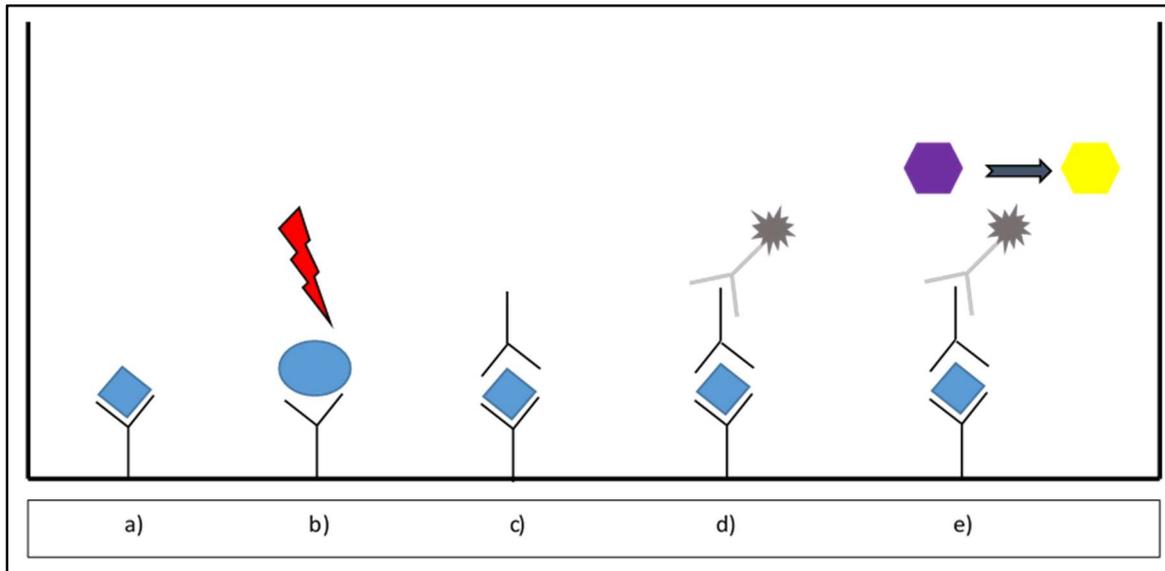


Abbildung 12: Schematischer Ablauf eines Sandwich-ELISAs a) Antigen bindet an Beschichtungsantikörper b) Antigen unpassend; Antigen kann nicht an Antikörper binden c) passender Primärantikörper bindet und Komplex entsteht d) Sekundärantikörper mit gekoppeltem Enzym bindet e) Enzym katalysiert Farbumschlag

### 2.12.2 Durchführung

Nach Exposition wurden die basalen Überstände des Mediums in Reaktionsgefäße (1,5 ml) überführt und bei -20 °C für eine spätere Analyse der Interleukine-6 und -8 eingefroren.

Um die IL-6 und -8 nachzuweisen, wurden Sandwich-ELISA Kits der Firma Diaclone für die jeweiligen Interleukine verwendet. In diesen Kits wurden folgende Reagenzien mitgeliefert: mit Antikörpern beschichtete 96 Well Platten mit Deckeln, IL-6 oder IL-8 Standard Lösung und jeweiligen Kontrollen, Standard Verdünnungspuffer, biotinyliertes anti-IL-8 oder anti-IL-6, biotinyliertes Antikörper Verdünnungsmittel, Streptavidin-horseradish-peroxidase-Lösung (HRP), HRP-Verdünnung, Waschpuffer, Tetramethylbenzidin (TMB), Schwefelsäure. Um die Verständlichkeit zu erleichtern, wird im folgenden Textabschnitt nur von IL-6 gesprochen. Die Angaben gelten jedoch bis auf

wenige Unterschiede ebenso für IL-8. Wie in der Anleitung der Firma Diaclone beschrieben wurde für die Durchführung vorgegangen. Am Tag vor der Versuchsdurchführung wurde der Waschpuffer und der Standard Verdünnungspuffer wie beschrieben hergestellt und in sterilen Flaschen bei 4 °C gelagert. Am Tag der Versuchsdurchführung wurden die Proben zunächst aufgetaut und anschließend bei 21 °C bei 1000 g für zehn Minuten zentrifugiert. In der Zwischenzeit wurde die Standardkurve als Referenz vorbereitet. Hierfür wurden zunächst die IL-6 Standard Lösung und die Positivkontrolle nach Anleitung hergestellt. Anschließend wurden in einer bereits mit Antikörpern beschichteten 96-Well Mikrotiterplatte in die Wells B1 bis F1 und B2 bis F2 jeweils 100 µl des Standard Verdünnungspuffer gegeben. Alle Proben wurden immer als Doppelbestimmung aufgetragen. Nun wurden in die Wells A1 und A2 jeweils 200 µl des IL-6-Standards gegeben. Durch Übertrag von 100 µl aus Well A1 in Well B1 und von Well B1 auf C1 wurde eine fortlaufende Verdünnungsreihe, bis einschließlich Well F1 als Standardkurve, generiert. Die Wells A2 bis F2 wurden ebenso vorbereitet. Die Wells G1 und G2 dienten mit 100 µl Standard Verdünnungspuffer als Negativkontrolle und die Wells H1 und H2 als Positivkontrolle (vgl. Tabelle 5). Nun wurden aus den zu analysierenden Proben jeweils 100 µl als Doppelbestimmung in die restlichen Wells und 50 µl eines mitgelieferten biotinylierten Anti-IL-6 in alle Wells pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde bei RT wurde die Flüssigkeit aspiriert und jedes Well mit 300 µl Waschpuffer gespült. Diese Waschschritte wurden noch zweimal wiederholt. Anschließend wurde in jedes Well 100 µl einer HRP pipettiert und weitere 30 Minuten bei RT inkubiert.

*Tabelle 5: schematische Darstellung der Standardkurven nach Verdünnung in Wells A - F; Well G: Negativkontrolle; Well H: Positivkontrolle*

Wells	IL-6-Konzentration (pg/ml)	IL-8-Konzentration (pg/ml)
A	200	2000
B	100	1000
C	50	500
D	25	250
E	12,5	125
F	6,25	62,5
G	Negativkontrolle	Negativkontrolle
H	Positivkontrolle	Positivkontrolle

Wie bereits oben beschrieben, erfolgte eine zweite Waschung mit dem Waschpufferkonzentrat. Daraufhin wurden jeweils 100 µl des TMB hinzugegeben und für 15 Minuten abgedunkelt inkubiert. Durch die Zugabe von 100 µl der mitgelieferten Schwefelsäure wurde die Farbreaktion gestoppt und die Lösungen verfärbten sich je nach Höhe der Interleukin-Konzentration gelb. Die Mikrotiterplatte wurde mit einem ELISA-Reader (BioTek, Bad Friedrichshall, Deutschland), vom Typ Elx 800 und der Software Gen5 der Firma BioTek (Bad Friedrichshall, Deutschland) ausgewertet. Der Mittelwert der photometrisch gemessenen Einzelergebnisse der Standardreihe konnte der bekannten Interleukin-Konzentration zugeordnet werden. Somit wurde eine lineare Gleichung erstellt. Die Mittelwerte der verschiedenen Konzentrationen der Proben konnten mit Hilfe der erstellten Geraden und deren Gleichung einer Interleukin-Konzentration zugeordnet werden. War die optische Dichte der einzelnen Konzentration jedoch kleiner als die Negativkontrolle der jeweiligen Standardverdünnungsreihe, wurde dafür der Wert gleich Null angenommen.

## **2.13 Datenauswertung**

### 2.13.1 Graphische Analyse

Sowohl die graphische Darstellung als auch die statistische Auswertung erfolgte mit dem Software Programm Statistica 13 (Tibco Software Inc., USA). In den Vorversuchen wurde das Säulendiagramm gewählt, wodurch absolute oder relative Häufigkeiten dargestellt werden können. Die Säulen sind gleich breit und definieren über die Höhe die Häufigkeit der untersuchten Ausprägung [Kamps, 2018; Ludwig-Mayerhofer, 2012]. In dieser Arbeit wurden auf der Abszisse die jeweiligen untersuchten Konzentrationen aufgetragen. Die Ordinate spiegelt die Vitalität in Prozent wider.

In den Hauptversuchen wurde die Darstellung des Boxplots gewählt (vgl. Abb. 15). In dieser Darstellungsweise befinden sich 50 % der Werte innerhalb der Box, die definitionsgemäß durch die erste und dritte Quartile begrenzt wird (25. Und 75. Perzentile). Der Bereich zwischen den Quartilen wird auch als Interquartilsabstand (IQR) bezeichnet. Der Median wird durch eine Linie in der Box dargestellt und teilt die gesamten Einzelergebnisse zu jeweils 50 % gleich auf. Die T-förmigen Whisker schließen die Werte ein, die maximal einen 1,5-fachen IQR zur 25. bzw. der 75. Perzentile

haben. Werte außerhalb dieser Begrenzung werden mit einem Kreis als Ausreißer gekennzeichnet. Ein beispielhaftes Box-Plot-Diagramm ist in Abbildung 13 dargestellt.

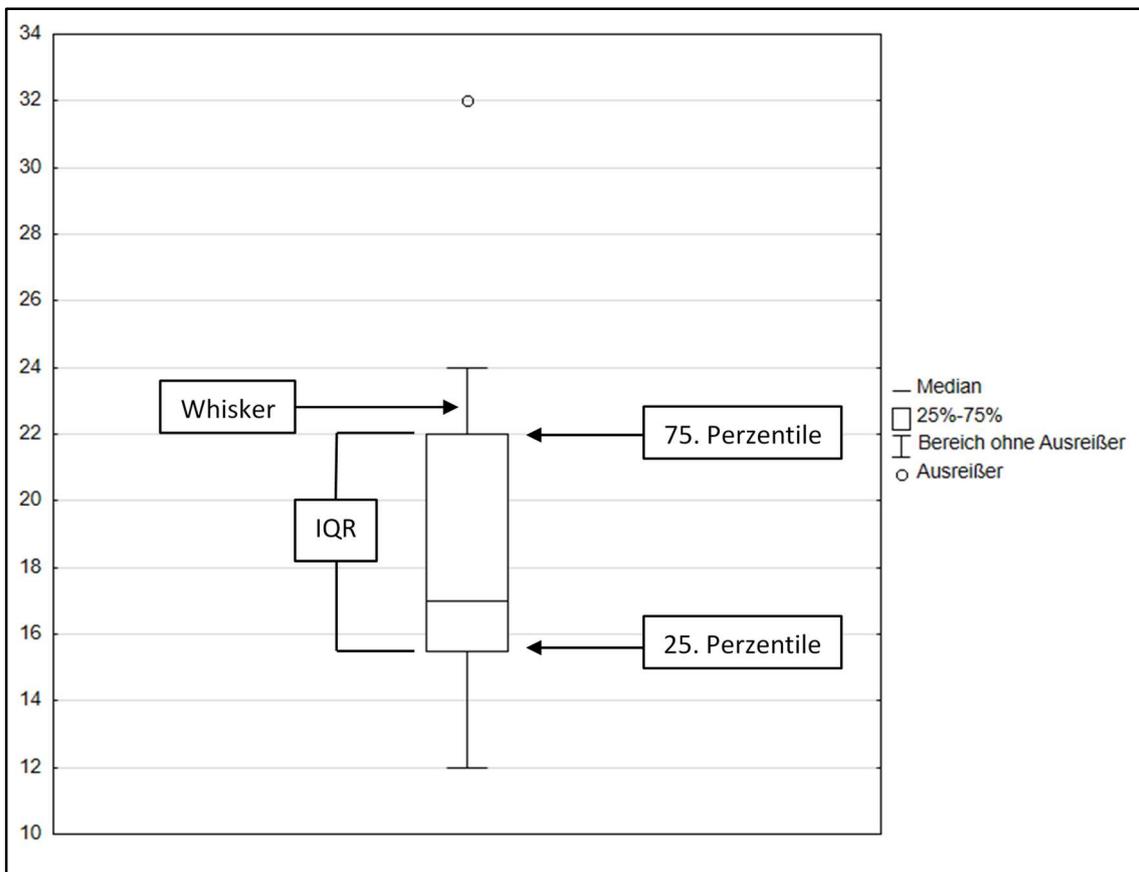


Abbildung 13: Exemplarischer Whisker-Boxplot; IQR: Interquartilsabstand

### 2.13.2 Statistische Analyse

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Software Programm Statistica 13. Dabei wurde der Friedman- und der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test (W-Test) angewandt. Der Friedman-Test wurde von Milton Friedman entwickelt und gehört der Gruppe der nicht parametrischen Verfahren an. Somit setzt dieser keine Normalverteilung der Messwerte voraus [Friedman, 1937]. Der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test wurde von Frank Wilcoxon entwickelt und ist ein nicht parametrischer Test. Dieser ist ein etabliertes Verfahren zur Analyse zweier gepaarter Stichproben [Wilcoxon, 1945].

Im ersten Schritt der statistischen Auswertung wurden die drei Konzentrationen und Negativkontrollen mit dem Friedman-Test untersucht. Konnte dabei ein p-Wert  $< 0,05$  festgestellt werden, so wurde das Ergebnis als statistisch signifikant betrachtet. Um genau zu differenzieren bei welchen Konzentrationen das Ergebnis signifikant war, wurde

anschließend der W-Test verwendet. Hierbei wurden zunächst paarweise die einzelnen Konzentrationen gegen die Negativkontrollen auf Signifikanz überprüft. Die dabei geprüfte Nullhypothese nimmt an, dass die behandelten Zellen dasselbe Ergebnis zeigen, wie die Unbehandelten. War der p-Wert  $< 0,05$  konnte die Nullhypothese verworfen und die Alternativhypothese angenommen werden. Die Alternativhypothese nimmt an, dass die behandelten Zellen nicht dasselbe Ergebnis zeigen, wie die Unbehandelten (vgl. Abb. 3). Wurde die Alternativhypothese bestätigt, sind die einzelnen Konzentrationen auf eine dosisabhängige Schädigung mittels des W-Tests untersucht worden. Da der gleiche Datensatz durch die beiden statistischen Testverfahren mehrfach analysiert wurde, kann es zur Kumulierung des  $\alpha$ -Fehlers kommen. Um diesem Fehler der 1. Art beim multiplen Testen entgegen zu wirken, wurde die Bonferroni-Holm-Korrektur (BH-Korrektur) als Post-Hoc-Test verwendet [Victor *et al.*, 2010].

### 3 Ergebnisse

Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse der verschiedenen Untersuchungsmethoden dargestellt.

#### 3.1 Vorversuch MTT-Test

Um erste Anhaltspunkte für die Toxizität von PG zu erhalten, wurden in Vorversuchen die humanen Nasenschleimhautzellen zunächst in einem Flüssigkeitsmodell untersucht, anschließend wurde eine Dampfexposition durchgeführt. Als Maß für die Toxizität wurde die Vitalität mittels des MTT-Tests bestimmt. Für die Darstellungen wurden aufgrund der Anzahl der Versuche ( $n = 3$ ) Säulen-Diagramme verwendet.

##### 3.1.1 Flüssigkeitsexposition

Nach einstündiger Exposition mit PG als Flüssigkeit konnte im Friedman-Test ein signifikantes Ergebnis ( $p = 0,00179$ ) erzeugt werden. Die Positivkontrolle (TPAP) mit

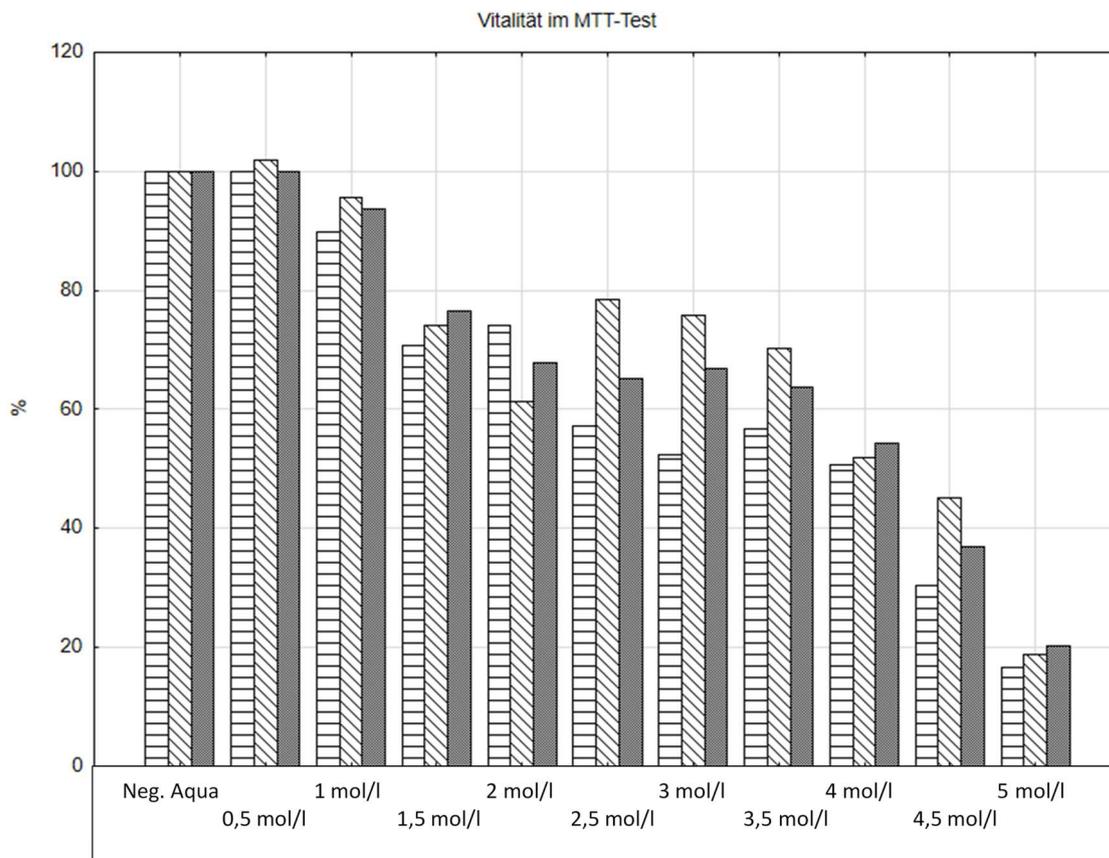


Abbildung 14: MTT-Test im Vorversuch mit  $n = 3$ ; jede Schraffur steht für einen Versuch; Vitalität in Prozent nach Exposition mit PG als Flüssigkeit über eine Stunde; die einzelnen Positivkontrollen sind nicht dargestellt, der Median der Positivkontrollen beträgt 31,73 %

einer Vitalität von 31,73 % ist in der obenstehenden Abbildung nicht dargestellt (vgl. Abb. 14). Die Einzelergebnisse der verschiedenen Ansätze sind im Anhang unter Kapitel 6.3.1 aufgeführt.

### 3.1.2 Dampfexposition

Nach einstündiger Dampfexposition konnte im Friedman-Test kein signifikantes Ergebnis, jedoch eine starke Tendenz ( $p = 0,0719$ ) gefunden werden. Die Positivkontrolle (TPAP) mit einer Vitalität von 55,72 % ist in der untenstehenden Abbildung nicht dargestellt (vgl. Abb. 15). Die Einzelergebnisse der verschiedenen Ansätze sind im Anhang unter Kapitel 6.3.1 aufgeführt.

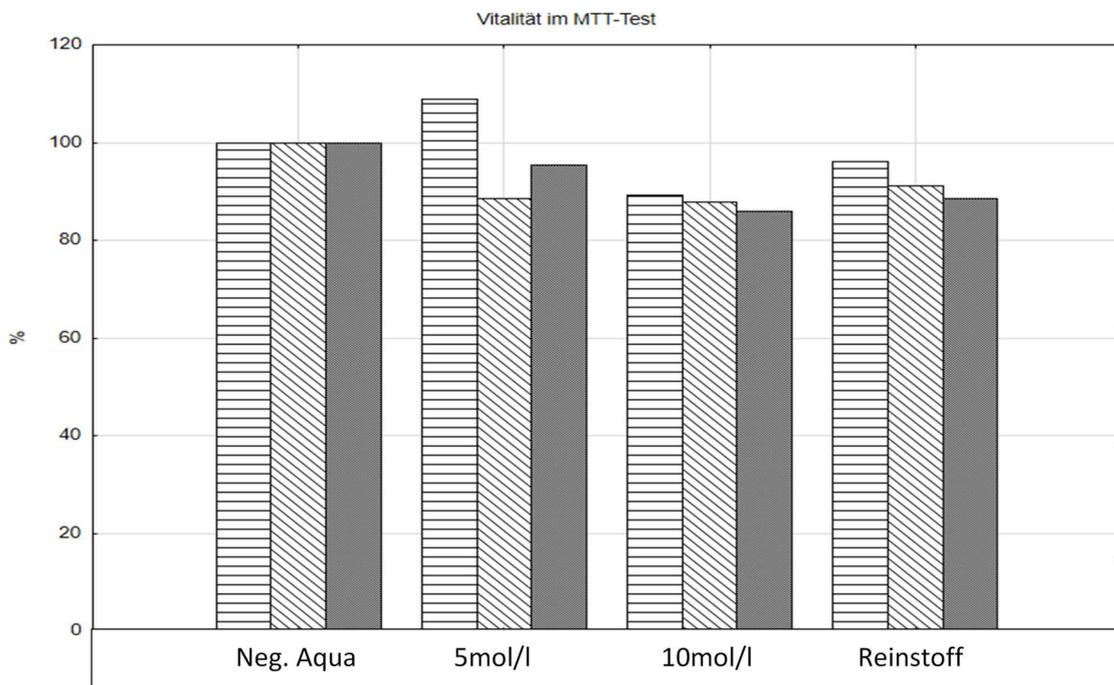


Abbildung 15: MTT-Test im Vorversuch mit  $n = 3$  jede Schraffur steht für einen Versuch; Vitalität in Prozent nach Exposition mit PG als Dampf über einer Stunde; die Positivkontrollen sind nicht dargestellt, der Median der Positivkontrollen beträgt 55,72 %

## 3.2 Hauptversuch

### 3.2.1 Comet Assay

Für die Auswertung des Comet Assays wurde das dimensionslose Olive Tail Moment (OTM) verwendet (vgl. Abb. 16). Die Einzelergebnisse des Comet Assays und der einzelnen Ansätze sind im Anhang unter Kapitel 6.3.2 aufgeführt. Die Positivkontrolle (MMS; Median: 5,85) ist graphisch nicht dargestellt.

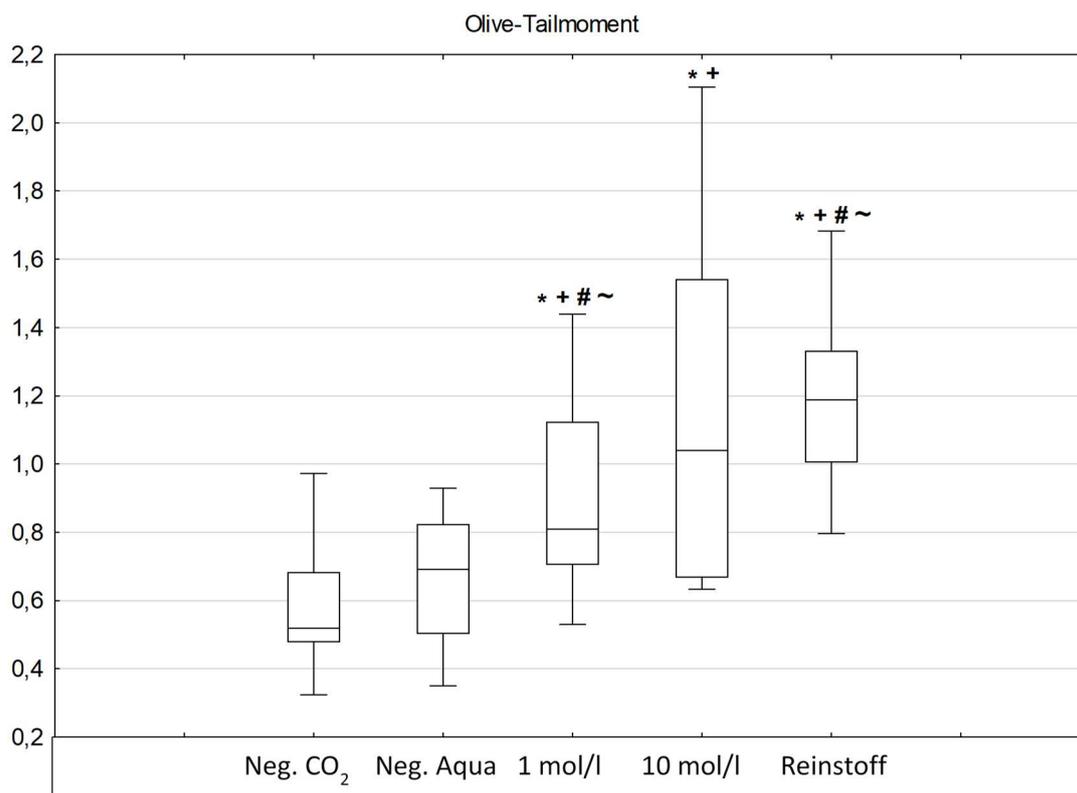


Abbildung 16: Darstellung des dimensionslosen Olive Tail Moments im Box-Plot Diagramm; \* : Signifikanz der Konzentrationen gegenüber der Aqua Negativkontrolle; +: Signifikanz der Konzentrationen gegenüber der Aqua Negativkontrolle nach der Bonferroni-Holm-Korrektur; #: dosisabhängige Schädigung zwischen 1mol/l und Reinstoff; ~: dosisabhängige Schädigung zwischen diesen beiden Konzentrationen nach Bonferroni-Holm-Korrektur; die Positivkontrolle mit einem Median von 5,85 ist hier nicht abgebildet

Im Friedman-Test zeigte sich ein signifikantes Ergebnis ( $p = 0,00182$ ). Um weiter zu differenzieren, zwischen welchen Einzelergebnissen eine Signifikanz besteht, wurde der W-Test verwendet (vgl. Tabelle 6). Die einzelnen Konzentrationen wurden paarweise mit

Tabelle 6: Darstellung der  $p$ -Werte im paarweisen Vergleich der einzelnen Konzentrationen mit der Negativkontrolle; zusätzlich Darstellung der  $p$ -Werte nach der Bonferroni-Holm-Korrektur(BH-Korrektur) im Comet Assay

Konzentrationen	p-Wert	BH-Korrektur
Aqua & 1 mol/l	0,036659	0,0367
Aqua & 10 mol/l	0,012516	0,025
Aqua & Reinstoff	0,005062	0,0152

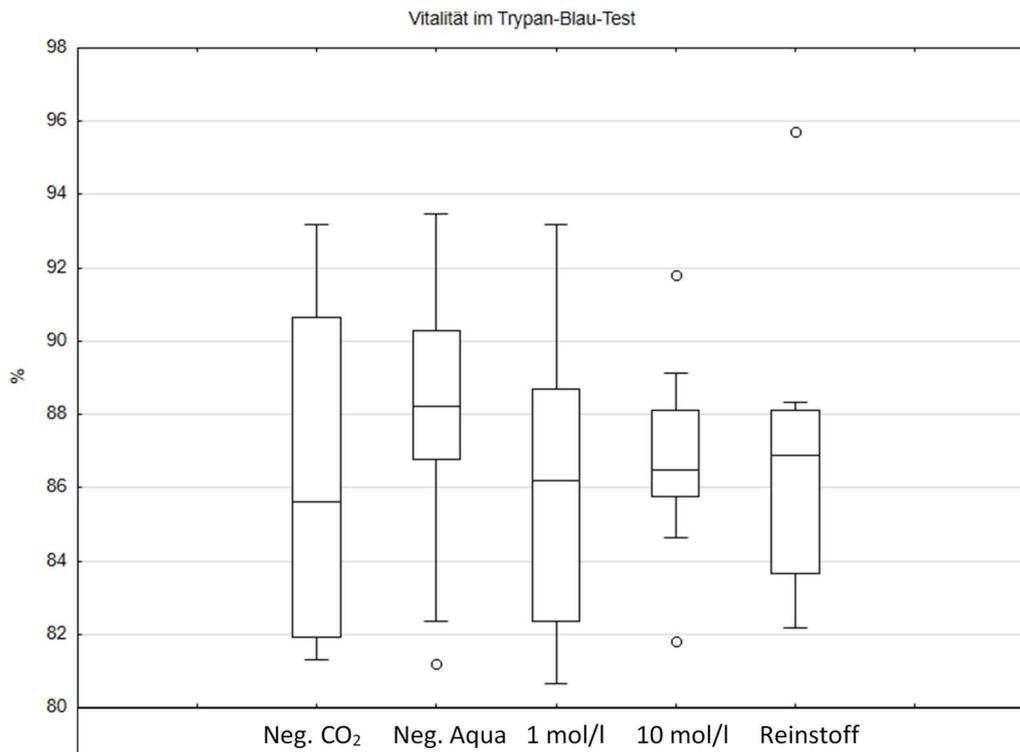
der Negativkontrolle verglichen, wobei jeder  $p$ -Wert dieser Auswertung signifikant war. Die Adjustierung mittels der BH-Korrektur bestätigte dieses Ergebnis. Anschließend

wurden die einzelnen Konzentrationen untereinander auf eine dosisabhängige Schädigung verglichen (vgl. Tabelle 7). Hierbei zeigte sich ein signifikanter Unterschied im Vergleich der 1 mol/l-Lösung und des Reinstoffs ( $p = 0,006911$ ). Dieser Unterschied war auch nach Adjustierung mittels der BH-Korrektur signifikant ( $p = 0,020700$ ). Für die Paare 1 mol/l und 10 mol/l ( $p = 0,202623$ ), 10 mol/l und Reinstoff ( $p = 0,575063$ ) konnte keine signifikante Änderung nachgewiesen werden.

*Tabelle 7: Vergleich der einzelnen Konzentrationen untereinander auf Signifikanz mittels des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests und anschließender Überprüfung mittels der Bonferroni-Holm-Korrektur (BH-Korrektur) im Comet Assay*

Konzentrationen	p-Wert	BH-Korrektur
1 mol/l & 10 mol/l	0,202623	0,4052
10 mol/l & Reinstoff	0,575063	0,570999
1 mol/l & Reinstoff	0,006911	0,0207

### 3.2.2 Trypanblau Test



*Abbildung 17: Darstellung der Vitalität in Prozent nach Exposition der einzelnen Konzentrationen*

Im Trypanblau Test wurde die Vitalität nach Exposition überprüft (vgl. Abb.17). Die Einzelergebnisse des Trypanblau Tests und der einzelnen Ansätze sind im Anhang unter Kapitel 6.3.4 aufgeführt.

Der Friedman-Test zeigte kein signifikantes Ergebnis ( $p = 0,43013$ ) und damit konnte die Nullhypothese angenommen werden.

### 3.2.3 Mikrokerntest

Im Mikrokerntest wurden 1000 doppelkernige Zellen pro Ansatz ausgezählt. Dabei ist die Höhe der mikrokernhaltigen Zellen ein Maß für die DNA-Schädigung. Diese Anzahl wurde untereinander verglichen (vgl. Abb. 18). Die Einzelergebnisse des Mikrokerntests und der einzelnen Ansätze sind im Anhang unter Kapitel 6.3.3 aufgeführt.

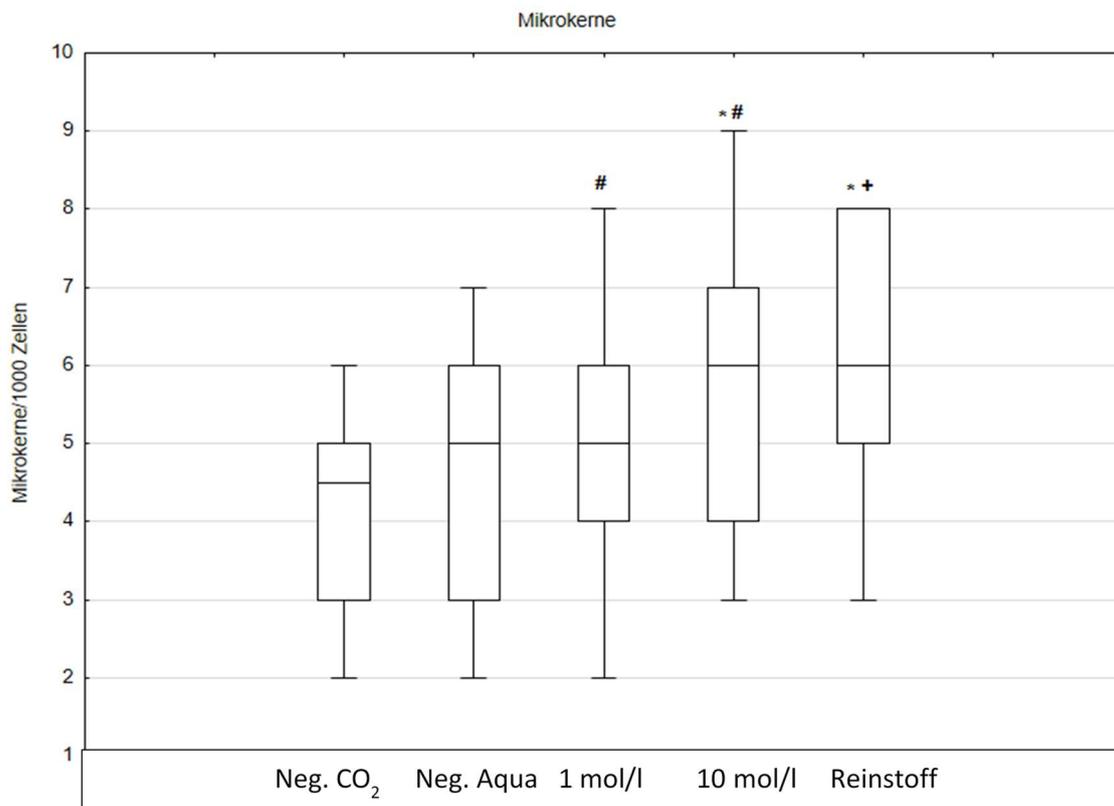


Abbildung 18: Darstellung der absoluten Anzahl der Mikrokerne pro 1000 doppelkerniger Zellen; \* : Signifikanz der Konzentrationen gegenüber der Aqua Negativkontrolle; +: Signifikanz der Konzentrationen gegenüber der Aqua Negativkontrolle nach der Bonferroni-Holm-Korrektur #: dosisabhängige Schädigung zwischen 1 mol/l und 10 mol/l; die Positivkontrolle mit einem Median von 23 ist hier nicht abgebildet

Im Friedman-Test ergab sich ein signifikantes Ergebnis ( $p = 0,00283$ ). Für eine weitere Differenzierung wurden, ebenso wie im Comet Assay, jeweils die einzelnen Konzentrationen gegen die Negativkontrollen getestet. Es konnte keine signifikante

Änderung der Mikrokernanzahl zwischen der Kontrolle und der Probe mit 1 mol/l nachgewiesen werden ( $p = 0,2719$ ). Im Vergleich der Negativkontrolle mit 10 mol/l ( $p = 0,025063$ ) und dem Reinstoff ( $p = 0,007686$ ) ergab sich jeweils ein signifikanter Unterschied. Nach der BH-Korrektur zeigte sich lediglich ein signifikanter Unterschied zwischen der Negativkontrolle und dem Reinstoff ( $p = 0,0231$ ), jedoch nicht zwischen der Negativkontrolle und 10 mol/l ( $p = 0,0501$ ) (vgl. Tabelle 8).

*Tabelle 8: Vergleich der Konzentrationen gegenüber der Negativkontrolle und anschließender Darstellung der Bonferroni-Holm-Korrektur (BH-Korrektur) im Mikrokerntest*

Konzentrationen	p-Wert	BH-Korrektur
Aqua & 1 mol/l	0,2719	0,2719
Aqua & 10 mol/l	0,025063	0,0501
Aqua & Reinstoff	0,007686	0,0231

Zur Klärung einer dosisabhängigen Schädigung wurden die einzelnen Konzentrationen untereinander paarweise untersucht. Hierbei ergab sich lediglich eine Signifikanz der 1 mol/l und der 10 mol/l ( $p = 0,042316$ ). Der Vergleich der 10 mol/l-Lösung und dem Reinstoff ( $p = 0,441269$ ) und der 1 mol/l-Lösung und dem Reinstoff ( $p = 0,058025$ ) ergaben kein signifikantes Ergebnis. Die Adjustierung mittels der BH-Korrektur konnte die Signifikanz der 1 mol/l und der 10 mol/l nicht bestätigen ( $p = 0,1269$ ), (vgl. Tabelle 9).

*Tabelle 9: Vergleich der einzelnen Konzentrationen untereinander auf Signifikanz mittels des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests und anschließender Überprüfung mittels der Bonferroni-Holm-Korrektur (BH-Korrektur) im Mikrokerntest*

Konzentrationen	p-Wert	BH-Korrektur
1 mol/l & 10 mol/l	0,042316	0,1269
10 mol/l & Reinstoff	0,441269	0,441269
1 mol/l & Reinstoff	0,058025	0,1269

### 3.2.4 Sandwich-ELISA

Mittels des Sandwich-ELISAs wurde die Quantität der IL-6- und IL-8-Konzentration nachgewiesen. Als erstes wurden lineare Gleichungen aus den Messwerten der optischen Dichte und den dafür bekannten korrelierenden Interleukin-Konzentrationen gebildet

(vgl. Abb. 22, 23 für IL-6 und Abb. 25 und 26 für IL-8 im Anhang). Im Folgenden sind die errechneten Standardgleichungen für die jeweiligen Konzentrationen aufgeführt.

Diese wurden durch das Softwareprogramm Statistica 13 ermittelt:

$$\text{IL-6, Pat. 1-5: } y = 0,48769 + 0,0125 \cdot x; (R^2 = 0,9632)$$

$$\text{IL-6, Pat. 6-10: } y = 0,31042 + 0,01272 \cdot x; (R^2 = 0,9692)$$

$$\text{IL-8, Pat. 1-5: } y = 0,60921 + 0,00172 \cdot x; (R^2 = 0,9422)$$

$$\text{IL-8, Pat. 6-10: } y = 0,34454 + 0,00153 \cdot x; (R^2 = 0,9591)$$

Um die Interleukin-Konzentration in pg/ml zu erhalten, muss die jeweilige Gleichung nach  $x$  aufgelöst werden ( $y$  entspricht der optischen Dichte).

Beispielrechnung:

$$y = 0,48769 + 0,0125 \cdot x \rightarrow$$

$$0,495 = 0,48769 + 0,0125 \cdot x \rightarrow$$

$$0,00731 = 0,0125 \cdot x \rightarrow$$

$$x = 0,5848$$

Somit beträgt die IL-6-Konzentration für dieses Beispiel 0,58 pg/ml.

Wie die Einzelergebnisse der Ansätze im Anhang zeigen (vgl. Kapitel 6.3.5), besteht bis auf fünf Einzelergebnisse keine IL-6 - oder IL-8-Erhöhung (vgl. Tabelle 17 und 19). So zeigte auch der Friedman-Test der IL-6- und IL-8-Konzentrationen keine signifikanten Ergebnisse (vgl. Tabelle 10).

*Tabelle 10: Darstellung der p-Werte im Friedmann-Test jeweils für die IL-6 und die IL-8 Konzentration*

Konzentrationen	p-Wert
IL-6	0,60258
IL-8	0,39163

### 3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

In vorliegender Arbeit wurden Nasenschleimhautzellen im Air-Liquid-Interface kultiviert. Anschließend wurden diese mit verschiedenen Propylenglykol Konzentrationen von 1 mol/l, 10 mol/l und dem Reinstoff für eine Stunde bedampft. Die Zytotoxizität des Propylenglykols wurde mittels des Trypanblau Tests überprüft, die Genotoxizität durch den Comet Assay und den Mikrokerntest. Eine Entzündungsreaktion wurde durch einen Sandwich-ELISA anhand der IL-6 und IL-8 Konzentration untersucht.

Nach einstündiger Exposition zeigte sich keine signifikante Reduktion der Vitalität im Trypanblau Test im Vergleich zur Negativkontrolle. Ebenso konnte kein signifikanter Anstieg der IL-6 oder IL-8 Konzentration gefunden werden. Im Comet Assay war eine signifikante Schädigung im Vergleich zur Negativkontrolle in allen untersuchten Konzentrationen nachweisbar. Zudem zeigte sich eine dosisabhängige signifikante Schädigung der Konzentrationen 1 mol/l und Reinstoff. Im Mikrokernstest konnte ein signifikanter Unterschied zwischen dem Reinstoff und der Negativkontrolle gefunden werden. Eine dosisabhängige Schädigung konnte nicht bestätigt werden.

## 4 Diskussion

Die weltweite Zunahme des E-Zigaretten-Konsums macht eine Untersuchung des Stoffes Propylenglykol notwendig. Dieser ist Hauptbestandteil der Liquide. Da es sich bei Konsum der E-Zigarette um keine Verbrennung handelt, sondern vielmehr um eine Verdampfung, fehlen gesetzliche Regelungen für die Handhabung. Die erhobenen Daten sollen im folgenden Kapitel interpretiert, kritisch analysiert und abschließend in Kontext des Konsums gesetzt werden.

### 4.1 Auswahl der Patientenproben und Zellkultur

Da die Proben von Patienten mit einer operationsbedürftigen Grunderkrankung entnommen wurden, ist die Integrität nur teilweise kontrollierbar. Bei der Auswahl der Patientenproben wurde streng darauf geachtet, keine tumorerkrankten oder immunsupprimierte Patienten einzuschließen, da diese ein verändertes Wachstums- und Sekretionsverhalten aufweisen können [Lodish *et al.*, 2016]. Auch ist zu berücksichtigen, dass interindividuelle Unterschiede nicht messbar oder ausschließbar sind.

Für die Verwendung von humaner Nasenschleimhaut wurde sich bewusst entschieden, da diese die Haupthöhle der Nase, die Nasennebenhöhlen und den Nasopharynx auskleiden und damit eine wichtige Rolle in der Entstehung der Karzinomsequenz der oberen Atem- und Speiseorgane spielen [Duncker und Kummer, 2008].

Die Kultivierung im Air-Liquid-Interface (ALI) bietet den Vorteil der anschließenden Gasexposition. Ein anderer Ansatz wäre die Kultivierung von Miniorgankulturen. Diese eignen sich zwar sehr gut für Untersuchungen *in vitro* und entsprechen fast vollständig den physiologischen Gegebenheiten [Kleinsasser *et al.*, 2001; Kleinsasser *et al.*, 2004]. Jedoch können damit nur Expositionen mit Flüssigkeiten durchgeführt werden, sodass sie für den Versuchsaufbau dieser Arbeit ungeeignet wären [Wallner *et al.*, 2005]. Zusätzlich ist zu berücksichtigen, dass durch die 24-stündige Lyse, das Auslösen der Zellen aus ihrem Verband und die Kultivierung eines Monolayerzellrasens die Sensibilität gegenüber Noxen erhöht sein könnte. So konnte bereits in Monolayerkulturen der Leberzellen mit zunehmender Kulturdauer eine abnehmende Detoxifikationsrate und Syntheseleistung im Vergleich zu Miniorgankulturen festgestellt werden [Khalil *et al.*, 2001].

## 4.2 Expositionsaufbau

Es wurden schon einige Versuche unternommen objektive Kriterien für die Untersuchung von E-Zigaretten im Labor zu entwickeln [Farsalinos *et al.*, 2013b]. Diese Ansätze bleiben jedoch *in vitro*-Modelle und können die Realität nur teilweise abbilden. So inhaliert der Konsument den Dampf zunächst mit dem Mund in die Lunge und expiriert den Dampf anschließend über Nase oder Mund. Es kommt zu Veränderungen der Partikelgröße der Aerosole und der Zusammensetzung des Dampfes in der Lunge. Dies wird wahrscheinlich durch Verdunstung und Sedimentation verursacht [Schripp *et al.*, 2013]. Betrachtet man die große Variabilität der E-Zigaretten an sich, kann festgestellt werden, dass es interindividuelle Unterschiede in der Dampfzusammensetzung gibt. Unter anderem variieren die Flussrate und der Unterdruck am Mundstück für die Dampfproduktion [Williams und Talbot, 2011].

Um möglichen Verschmutzungen und Entstehung von toxischen Stoffen entgegen zu wirken, wurde für jede Konzentration ein neuer Atomizer mit 0,3  $\Omega$  verwendet. Um weitere Variablen beispielsweise die individuellen Spannungseinstellung zu vermeiden, wurde ein weitverbreitetes Gerät der zweiten Generation benutzt. Durch die verwendete Zeitschaltuhr im Versuchsaufbau ist eine objektive Zündung und somit hohe Reliabilität gewährleistet.

Auf das verwendete Testsystem, vgl. Abb. 6 und 7, konnte bis auf kleine Veränderungen durch Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe zurückgegriffen werden [Koehler *et al.*, 2010; Koehler *et al.*, 2011]. So wurde die E-Zigarette mittels eines Verteilersystems mit der Expositionskammer direkt verbunden. Die restliche Versuchsanordnung blieb unverändert. In diesem Versuchsaufbau ist zu kritisieren, dass nicht messbar war, welche Menge des PGs an den Zellen ankommt. Zwar konnte die Konzentration des Liquids im Liquid-Depot individuell festgelegt werden, in der anschließenden Expositionskammer entzieht sich die Konzentration und Exposition an den Zellen jeder Kontrolle.

Auch wird Raumluft über den Zündkopf angesaugt. Darin könnten schädliche Stoffe enthalten sein. Deswegen wurde unter einer Sterilbank gearbeitet, um eventuelle Schadstoffe und Verunreinigungen der Raumluft zu kontrollieren. Damit eine Schädigung durch den Versuchsaufbau an sich ausgeschlossen werden konnte, wurde die Negativkontrolle *Aqua* mit der Negativkontrolle CO<sub>2</sub>, die im Brutschrank im Rahmen der Exposition bei 5 % CO<sub>2</sub> für eine Stunde lagerte, verglichen. Somit konnten Schädigungen

beispielsweise Austrocknung und damit eine Fehlinterpretation der Ergebnisse verhindert werden, vgl. Ergebnisse im Anhang Kapitel 6.3.6.

Trotz der hier aufgeführten Nachteile der Bedampfung, wurde sich bewusst für diese Art der Exposition entschieden. So stellt der produzierte Dampf und damit der veränderte Aggregatzustand die Exposition lebensnäher dar als beispielsweise eine Flüssigkeitsexposition.

### 4.3 Analyse der einzelnen Testverfahren und deren Ergebnisse

Im Folgenden sollen nun die einzelnen Testverfahren Comet Assay, Mikrokerntest, Vitalitätstest und Sandwich-ELISA sowie deren Ergebnisse differenziert betrachtet werden.

#### 4.3.1 Einzelzell Mikrogel Elektrophoresese (Comet) Assay

Das Comet Assay-Verfahren nach Singh und Mitarbeitern [Singh *et al.*, 1988] wurde nach einer internationalen Experten-Konferenz 1999 in Washington als das Effizienteste unter den genotoxikologischen Verfahren anerkannt. Durch dieses können neben Einzelstrangbrüchen und alkalilabilen Schäden auch Vernetzungen zwischen DNA-Molekülen und Proteinen, sowie zwei DNA-Molekülen, oder Einzelstrangbrüchen mit unvollständiger Exzisionsreparatur detektiert werden. Des Weiteren ist dieses Verfahren sehr sensitiv, kostengünstig, leicht durchführbar und benötigt nur eine geringe Zellzahl für eine effektive Auswertung [Tice *et al.*, 1995; Tice *et al.*, 2000].

Speziell für das histologische Gewebe der Nasenschleimhaut, hat sich das Verfahren des Comet Assays zum Nachweis von DNA-Schäden in einem anderen Versuchsaufbau mit NO<sub>2</sub>-Exposition mehrfach bewährt [Koehler *et al.*, 2010; Koehler *et al.*, 2011]. Aufgrund der produzierten Ergebnisse im Comet Assay kann von einer genotoxischen Schädigung der Nasenschleimhäute ausgegangen werden. Alle genutzten Konzentrationen zeigten eine höhere Schädigung als die Negativkontrolle ( $p < 0,05$ ). Ähnliche Ergebnisse konnten auch in einer anderen Studie erzeugt werden [Lerner *et al.*, 2016]. Dafür wurden humane Lungen-Fibroblasten kultiviert und im ALI dem Dampf von einer Sorte Liquid mit Nikotin ausgesetzt. Die Expositionsparameter wurden wie in dieser Arbeit mit Zügen (puffs) von vier Sekunden und jeweils 30 Sekunden Pause gewählt. Jedoch war der untersuchte Zeitraum auf 5, 10, 15 und 20 Minuten beschränkt und erbrachte außer in der

fünf Minuten Exposition signifikante Unterschiede im Vergleich zur Negativkontrolle. Zusätzlich konnte noch eine Zunahme von mitochondrialen Sauerstoffspezies und eine Abnahme der Integrität des Komplexes V in der Elektronen-Transportkette fluoreszenzmikroskopisch beobachtet werden [Lerner *et al.*, 2016]. Ähnliche Ergebnisse waren ebenfalls mit humanen Schleimhautzellen des Oropharynx zu beobachten [Welz *et al.*, 2016]. Hier wurden ebenfalls DNA-Schäden nachgewiesen, wobei das Ausmaß der Schädigung der Liquide mit Fruchtgeschmack wesentlich höher war als mit Tabakgeschmack [Welz *et al.*, 2016]. Ebenfalls konnten Schäden in humanen Hautzellen (HaCat) und humanen Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomen mittels Comet Assay nachgewiesen werden [Yu *et al.*, 2016]. Hierfür wurden zwei Liquide von einem Hersteller jeweils mit Nikotin und ohne untersucht. Dazu wurde der Liquid (70 % PG und 30 % Glycerin) verdampft und mittels Unterdruckverfahren dem Nährmedium zugeführt [Yu *et al.*, 2016]. Jedoch kritisierten Holliday und Mitarbeiter an dieser Arbeit von Yu und Mitarbeitern, dass die Expositionszeit eine Woche lang war. Zudem fehlten genaue Beschreibungen der Methode, der Exposition und des Versuchsaufbaues, diese seien mangelhaft, schwer nachvollziehbar und nicht objektiv dargestellt gewesen. Dadurch sei die Aussagekraft des Ergebnisses stark eingeschränkt [Holliday *et al.*, 2016]. Zu kritisieren ist, dass in all diesen Studien das gesamte Liquid verwendet wurde und somit noch weitere Stoffe enthalten sind. Deshalb kann letztendlich nicht differenziert werden, welcher Stoff die Schädigung verursachte. Demgegenüber stehen folgende Studienergebnisse: Nachdem Liquide von E-Zigaretten verschiedener Generation verdampft wurden und humane Bronchialzellen mittels ALI exponiert wurden, konnten DNA-Schäden mittels des  $\gamma$ -H2AX-Verfahrens ausgeschlossen werden [Thorne *et al.*, 2017]. Ähnliche Ergebnisse konnten bereits ein Jahr zuvor von derselben Arbeitsgruppe mittels des Ames-Verfahrens und den Salmonellen-Stämmen TA 98 und TA 100 über eine dreistündige Exposition gezeigt werden. Wohingegen eine parallel durchgeführte Versuchsreihe mit konventionellen Zigaretten schon nach 24 Minuten ein klares mutagenes Potenzial zeigte [Thorne *et al.*, 2016]. In Tierversuchen mit Ovar Zellen von Mäusen konnte eine signifikante Schädigung mittels Comet Assay gezeigt werden. Hierbei wurde mit PG-Konzentrationen von 5 %, 7,5 % und 15 % jeweils für eine, fünf Minuten, eine Stunde oder zwei Stunden exponiert. Der Unterschied zur Kontrollgruppe war jedes Mal signifikant außer bei der 5 % Konzentration. In den beiden höchsten

Konzentrationen war der Schaden unabhängig von der Dauer signifikant im Vergleich zur Negativkontrolle [Berthelot - Ricou *et al.*, 2011]. Konträre Ergebnisse zeigten Studien zur Kryokonservierung der Eizellen bei Frauen. In diesen wurden die eingefrorenen Zellen mit einer Lösung aus 1,0 mol/l oder 1,5 mol/l PG und verschiedenen Konzentrationen Saccharose aufgetaut. Bei Überlebensraten von 75 - 90 % und einer Fertilisationsrate von 67 - 73 % ist von keiner Schädigung der Oozyten auszugehen [Chen *et al.*, 2005; Fosas *et al.*, 2003]. Dies bestätigen auch andere Studien, die PG als ein geeigneten Kryoprotektor deklarieren und diesen Stoff bereits erfolgreich in der Praxis eingesetzt haben [Lassalle *et al.*, 1985; Testart *et al.*, 1986].

Da der Gehalt des PG je nach Hersteller variiert, wurden die Ergebnisse des Comet Assays in dieser Arbeit des Weiteren auf eine dosisabhängige Schädigung untersucht. Hierbei zeigte sich ein signifikanter Unterschied der 1 mol/l Konzentration und dem Reinstoff auch nach Adjustierung mittels der BH-Korrektur. Als mögliche Ursache hierfür könnte eine vermehrte Entstehung von Carbonylverbindungen aus PG sein, die die vermehrte Toxizität erklärt. Damit wäre PG indirekt für die Schädigung verantwortlich [Kosmider *et al.*, 2014]. Da PG, soweit dies bekannt ist, nie als Reinstoff verwendet wird, sondern immer nur die Basis des Liquids bildet [Hutzler *et al.*, 2014], ist dieses Ergebnis für den Konsumenten von untergeordneter Bedeutung.

#### 4.3.2 Mikrokerntest

Der Mikrokerntest ist ein etabliertes und mehrfach bewährtes Verfahren, um geno- und zytotoxische Schäden zu detektieren. Dabei können sowohl Schäden der Chromosomen in Form von Mikrokerneln detektiert werden als auch Aussagen zur Zellproliferation und Zelltod, Apoptose und Nekrose, getroffen werden [Heddle *et al.*, 1983; Fenech, 2006]. Als Ursache für Mikrokerne können Brüche der Chromosomen angesehen werden, ausgelöst durch mutagene Stoffe oder auch ionisierende Strahlungen [Gantenberg *et al.*, 1991]. Ein fehlerhafter Spindelapparat, beispielsweise ausgelöst durch Colchicin, oder auch ein fehlerhaftes Reparatursystem, können ebenfalls ursächlich sein [Degrassi und Tanzarella, 1988; Hsu, 1987]. Die genaue Entstehungsursache der Mikrokerne kann jedoch nur mit Zusatzuntersuchungen herausgefunden werden. Dafür werden beispielsweise Kinetochore in Mikrokerneln mittels immunfluoreszierender Antikörper markiert. Auf Grund dessen enthalten Mikrokerne, verursacht durch ionisierende

Strahlung oder mutagenen Stoffe, azentrische Chromosomenfragmente. Genetisch bedingte oder durch Colchicin ausgelöste Störungen beinhalten meist ein ganzes Chromosom [Degrassi und Tanzarella, 1988].

Das Gewebe Nasenschleimhaut bewährte sich schon mehrfach bei Untersuchungen auf Schädigung von Fremdstoffen [Knasmueller *et al.*, 2011]. Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit kann angenommen werden, dass der Reinstoff eine signifikante Schädigung hervorruft und die 1 mol/l keinen signifikanten Schaden im Vergleich zur Negativkontrolle haben. Die 10 mol/l ergab eine signifikant höhere Schädigung im W-Test, jedoch wurde dieses nach der Korrektur des  $\alpha$ -Fehlers mittels der BH-Formel wieder knapp verworfen. Eine mögliche Ursache könnte die geringe Anzahl der gezählten Mikrokerne sein und somit eine Anfälligkeit und einhergehende Irrtumswahrscheinlichkeit.

Eine subjektive Verzerrung durch den Auswerter am Mikroskop und somit Beeinflussung des Ergebnisses ist nicht völlig auszuschließen. Durch eine Software unterstützte Auswertung könnte eine größere Objektivität und zudem Vergleichbarkeit unter den Laboren gewährleistet werden [Decordier *et al.*, 2009; Decordier *et al.*, 2011]. Des Weiteren wurde die Negativkontrolle *Aqua* mit einer weiteren Negativkontrolle CO<sub>2</sub>, die im Brutschrank im Rahmen der Exposition bei 5 % CO<sub>2</sub> für eine Stunde lagerte, verglichen. Dadurch konnte eine Schädigung durch den Versuchsaufbau an sich, beispielsweise durch Austrocknung, ausgeschlossen und eine Fehlinterpretation verhindert werden.

Ein signifikantes Ergebnis zur PG Exposition konnte Ishidate und Mitarbeiter finden, die Fibroblasten von Hamstern kultivierten und mit dem Mikrokerntest analysierten. In Konzentrationen von 32 mg/ml (420,6 mmol/l) über 48 Stunden Exposition stieg die Anzahl der Mikrokerne signifikant an. Hierbei ist zu bedenken, dass die osmotische Veränderung im Medium ursächlich für den resultierenden Schaden sein könnte [Ishidate *et al.*, 1984]. In einer *in vivo*-Folgestudie mit Mäusen konnte das Ergebnis nicht bestätigt werden. Dabei wurde das PG intraperitoneal gespritzt und ausgespülte Knochenmarkszellen des Femurs untersucht [Hayashi *et al.*, 1988]. Jedoch ist ein direkter Vergleich einer *in vivo*-Studie mit einer Zellkultur auf Grunde der unterschiedlichen Voraussetzungen nur bedingt aussagekräftig [Frey und Dym, 2006]. Demgegenüber steht eine Studie, die keine genotoxische Veränderungen an humanen Lungenfibroblasten und

Ovarzellen von Hamstern beobachtet hat [Misra *et al.*, 2014]. Hier wurden die Liquide in Dosen von 0 – 20 mg/ml für 24 Stunden dem Nährmedium zugeführt. Dafür wurden die Liquide erst verdampft, die Aerosole mittels eines Filter Pads aufgefangen und im Medium gelöst. Dadurch war eine natürliche Grenze der Löslichkeit von 20 mg/ml gegeben. Erwähnenswert ist, dass die Forscher Angestellte der Lorillard Tobacco Company sind, jedoch einen Gewissenskonflikt dementieren [Misra *et al.*, 2014]. PG ist zudem ein beliebter Stoff zur Kryokonservierung der Eizellen. In einer Studie mit Oozyten von Hamstern wird von einem Erbgut schädigendem Potenzial ausgegangen. Dadurch ist PG im Kontext der Kryokonservierung als ungeeignet zu bewerten [Aye *et al.*, 2010].

#### 4.3.3 Vergleich Einzelzell Mikrogel Elektrophorese (Comet) Assay und Mikrokerntest

Die Verfahren des Comet Assays und Mikrokerntests wurden beide in dieser Arbeit verwendet. Dabei handelt es sich um etablierte Verfahren, die mit unterschiedlichen Voraussetzungen die Genotoxizität untersuchen [Maluf *et al.*, 2001]. Der Comet Assay eignet sich insbesondere dazu, unter anderem Einzelstrangbrüche von nicht-proliferierenden Zellen quantitativ zu detektieren [Diem und Rüdiger, 1999]. Im Gegensatz dazu untersucht der Mikrokerntest proliferierende Zellen und größere DNA-Schäden, wie Fragmente oder Störungen des Spindelapparates [Diem und Rüdiger, 1999; Lasne *et al.*, 1984].

Die Auswertung des Comet Assays ist schnell, objektiv und nicht sehr zeitintensiv. Der Mikrokerntest wird demgegenüber von einer Person manuell am Mikroskop ausgezählt. Somit ist eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse eingeschränkt [Szirmai *et al.*, 1993].

Im Comet Assay spielen zudem Reparaturvorgänge der DNA eine wichtige Rolle. In einer retrospektiven Studie konnte gezeigt werden, dass erste Reparaturvorgänge bereits innerhalb von wenigen Minuten in eukaryontischen Zellen ablaufen [Frankenberg-Schwager, 1989]. In Untersuchungen von humanen Schleimhautzellen der Nase nach Exposition mit N-Nitrosodiethylamin wurden Reparaturintervalle untersucht. Diese umfassten 15 und 30 Minuten mit Inkubation in einem 37°C warmen Wasserbad und eine Analyse direkt nach Exposition. Dabei wurde festgestellt, dass der größte Teil der induzierten Schädigung bereits nach 15 Minuten repariert worden war [Harréus *et al.*, 2001]. In dieser Arbeit wurden die Comet Assay Proben nach Exposition direkt aus dem Zellverband gelöst, lysiert und mittels Agarose auf Objektträger fixiert, um bei 4 °C in

der Lyse-Lösung inkubiert zu werden. Dadurch sollte den Reparaturmechanismen durch die niedrige Temperatur und die Ablösung aus ihren Wells und Fixierung auf den Objektträgern entgegengewirkt werden. Im Mikrokerntest dagegen wurden die Zellen für 24 Stunden unter Zugabe von Cytochalasin B zur Arretierung der Zellteilung inkubiert. In diesem Zeitraum könnten die vitalen Zellen kleinere Schäden der DNA beheben. Dieser Effekt konnte in einem Versuch mit Lymphozyten und der Zugabe von Zytokin-Blockern bewiesen werden [Fenech und Neville, 1992]. Dieser Umstand könnte die unterschiedlichen Ergebnisse des Comet Assays und des Mikrokerntests erklären.

#### 4.3.4 Vitalität

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Vitalität der exponierten Nasenschleimhautzellen gegenüber der Negativkontrolle nicht signifikant unterscheidet. In Folge dessen kann davon ausgegangen werden, dass PG nicht toxisch auf Nasenschleimhautzellen wirkt. Eine Schädigung durch den Versuchsaufbau konnte ausgeschlossen werden, weil sich die Negativkontrolle mit einer Kontrolle, die im Brutschrank lagerte, nicht signifikant unterscheidet.

Dies konnte auch von anderen Arbeitsgruppen bestätigt werden. Dabei wurden humane Keratinozyten und Lungenzellen kultiviert und dem Rauch konventioneller Zigaretten und E-Zigaretten ausgesetzt. Die Vitalität wurde mittels Trypanblau Tests und dem Lactat Dehydrogenase Assay untersucht und ergab keinen Schaden durch die Liquide. Dagegen erzeugte der Rauch konventioneller Zigaretten im Vergleich einen signifikanten Schaden [Cervellati *et al.*, 2014]. In einem anderen Versuchsaufbau [Misra *et al.*, 2014] wurden verschiedene Liquide verdampft, die Aerosole mittels eines Filters aufgefangen und dem Nährmedium in verschiedenen Konzentrationen über 24 Stunden zugeführt. Durch die Neutral-Rot-Methode konnten keine zytotoxischen Effekte festgestellt werden, im Vergleich zu konventionellen Zigaretten war diese jedoch signifikant. Allerdings ist zu kritisieren, dass es keine Dampfexposition war und die Versuchsleiter Angestellte eines Tabakkonzerns waren [Misra *et al.*, 2014]. Auf die gleiche Art und Weise der Exposition wurden embryonale Maus Fibroblasten gegenüber 21 nikotinhaltenen Liquiden durch den MTT-Test untersucht. 12 Liquide waren mit Tabak- und neun mit gesüßtem oder Fruchtgeschmack versetzt [Romagna *et al.*, 2013]. Ein signifikanter Unterschied zur Negativkontrolle bestand nur bei dem Liquid mit Kaffeegeschmack (51 % Vitalität bei

100 %-iger Konzentration) [Romagna *et al.*, 2013]. Dieses Ergebnis konnte mit 20 verschiedenen Liquiden an Kardiomyoblasten von Ratten wiederholt und mit ähnlichen Ergebnissen bestätigt werden [Farsalinos *et al.*, 2013a]. Dabei waren drei Tabakgeschmacksrichtungen und eine Zimtgeschmacksrichtung zytotoxisch. Herauszuheben ist, dass eine Liquid-Mischung aus 50 % PG und 50 % Glycerin nicht toxisch war. Als Ursache für die Toxizität des Zimt-Liquids konnten Zimtaldehyde und 2-Methoxy-Zimtaldehyde identifiziert werden [Behar *et al.*, 2014].

Demgegenüber steht eine Studie, die gesunde bronchiale Zellen, im Zuge einer Lungen Carcinom Operation gewonnen haben, mittels ALI Liquid exponierten und eine signifikante Schädigung durch die Alamar Blue Methode bewiesen [Scheffler *et al.*, 2015]. In derselben Arbeit wurde zudem darauf hingewiesen, dass die Schädigung im Vergleich zur konventionellen Zigarette um das 4,5 bis 8-fache geringer war. Ähnliche Resultate erzielte eine Gruppe in der Untersuchung von Oropharyngeal Zellen [Welz *et al.*, 2016]. Ebenfalls konnten Schäden an HaCat Zellen und humanen Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomen mittels Comet Assay nachgewiesen werden. Hierfür wurden zwei Liquide von einem Hersteller, jeweils nikotinhalzig und ohne Nikotin, untersucht. Dazu wurde der Liquid (70 % PG und 30 % Glycerin) verdampft und mittels Unterdruckverfahren dem Nährmedium zugeführt [Yu *et al.*, 2016]. Eine Erklärung für diese Divergenz der Ergebnisse könnte sein, dass embryonale Stammzellen und adulte Zellen unterschiedlich auf die Noxen reagieren und somit noch eine Abhängigkeit des Alters der Zellen besteht. So konnte gezeigt werden, dass humane embryonale Stammzellen und neuronale Stammzellen der Maus sensitiver auf die Liquide reagieren als humane Lung-fibroblasten [Bahl *et al.*, 2012].

Ein weiteres Erklärungsmodell könnte sein, dass die verwendeten E-Zigaretten das Ergebnis beeinflussen. So wurden verschiedene Atomizer untersucht und der Dampf mittels Spektralchromatographie und der MTT-Methode analysiert. Dabei konnten unter anderem kleinste Metalle und Silicate nachgewiesen werden, die toxisch auf humane Lungen Fibroblasten wirkten [Williams *et al.*, 2013]. Auch ist ein Vergleich der einzelnen aufgeführten Ergebnisse eingeschränkt, da unterschiedliche Zellkulturen und insbesondere unterschiedliche Methoden für die Bestimmung der Vitalität verwendet wurden.

#### 4.3.5 Apoptosen und Nekrosen

Apoptose und Nekrose bezeichnen zwei unterschiedliche Arten des Zelltodes. Die Apoptose ist ein selbst induzierter Vorgang, ausgelöst durch z. B. exogene Faktoren, die ein Überleben und die Funktionalität der Zelle einschränken. Hierbei kommt es zum Abbau der DNA und der Implosion der Zelle. Im Gegensatz dazu ist bei einer Nekrose der Schaden der Zelle und Funktionalität so gestört, dass kein geordneter Abbau mehr möglich ist. Die Zelle schwillt an, platzt letztendlich, sodass Zellorganellen sich ins Interstitium ergießen und Entzündungsreaktionen auslösen [Königshoff und Brandenburger, 2012; Lüllmann-Rauch und Paulsen, 2012]. Durch den Mikrokerntest konnten die Zellen auf Apoptosen und Nekrosen ausgezählt werden. Hierbei zeigte sich jeweils kein signifikanter Unterschied zwischen den Konzentrationen. Dieses Ergebnis wird auch vom Trypanblau Test unterstützt, da die Vitalität von 80 % bei sämtlichen eingesetzten PG-Konzentrationen nicht unterschritten wird. Somit ist im Umkehrschluss von keinem akut zytotoxischen Potenzial auszugehen. Vergleichbare Ergebnisse konnte eine Arbeitsgruppe erzielen, die Liquide verdampften und mittels Unterdrucks in das Nährmedium bliesen und auf diese Weise verschiedene Konzentrationen untersuchten [Taylor *et al.*, 2016]. Die dabei verwendeten humanen bronchialen Zellen zeigten in einem Caspase 3/7-ELISA keine signifikante Schädigung. In einem anderen Versuchsaufbau wurden HaCat-Zellen mittels der Durchflusszytometrie in Kombination eines Annexin V Antikörpers und Propidiumiodid untersucht [Yu *et al.*, 2016]. Hierfür wurden zwei Liquide von einem Hersteller, jeweils nikotinhaltig und ohne Nikotin, untersucht. Dazu wurde der Liquid (70 % PG und 30 % Glycerin) verdampft und mittels Unterdruckverfahren dem Nährmedium zugeführt. Die Nekrose- und Apoptoserate des nikotinhaltigen Liquids (20 - 134 %; 121 - 258 %) war höher als ohne Nikotin (53 - 68 %; 120 - 200 %) [Yu *et al.*, 2016].

#### 4.3.6 Zellzyklus

Der Zellzyklus ist der periodische Ablauf verschiedener Aktivitätsphasen einer eukaryontischen Zelle. Diese besteht aus den Abschnitten G 1-, S-, G 2- und M-Phase [Eilers, 2009]. Durch den Mikrokerntest konnte die Anzahl der Mitosen ausgezählt werden, wodurch Rückschlüsse auf einen abnormal verlaufenden Zellzyklus möglich sind. In dieser Untersuchung wurde allerdings kein signifikanter Unterschied zwischen

den PG-Konzentrationen festgestellt. In einem Versuch mit humanen Epithelzellen der Cervix sind ähnliche Beobachtungen gemacht worden. Dabei wurden die Zellen mittels eines Phasenkontrastmikroskops untersucht. Es konnte eine geringe Anzahl von Chromosomen detektiert werden, die sich nicht wie erwartet in der Äquatorialebene, sondern an den Polen befanden. Nichts desto trotz konnte eine normal ablaufende Anaphase beobachtet werden [Rao und Engelberg, 1967]. Es muss wiederholt auf die Veröffentlichungen von Yu und Mitarbeiter zurückgegriffen werden, da bis heute wenige Arbeiten zu dieser spezifischen Fragestellung veröffentlicht wurden [Yu *et al.*, 2016]. In dieser Studie wurden Zelllinien des Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinoms verwendet und zeigten eine Beeinflussung des Zellzyklus. Hierfür wurden zwei Liquide von einem Hersteller, jeweils nikotinhaltig und ohne Nikotin, untersucht. Dazu wurde der Liquid (70 % PG und 30 % Glycerin) verdampft und mittels Unterdruckverfahren dem Nährmedium zugeführt. In der Durchflusszytometrie konnte eine statistisch signifikante Arretierung des Zellzyklus in der G 1- und G 2-Phase beobachtet werden [Yu *et al.*, 2016].

#### 4.3.7 Zellproliferation

Auswirkungen des PGs auf die Zellproliferation konnten mittels des Mikrokerntests beobachtet werden. Dafür wurden die Verteilungsverhältnisse der ein-, doppel- und mehrkernigen Zellen verglichen. Folglich spiegelt sich die Toxizität im Anstieg der einkernigen Zellen wider, wohingegen die Zahl der doppel- und mehrkernigen Zellen sinkt [Stopper, 2010]. Im Vergleich dieser Parameter konnte kein signifikantes Ergebnis in dieser Arbeit festgestellt werden. Ähnlich Ergebnisse präsentiert eine Studie, in der Kaninchen PG in Konzentrationen von 12,5 %, 25 und 50 % intravenös injiziert wurden. Es zeigten sich keine Unterschiede im Hämoglobingehalt, der Anzahl der Erythrozyten und der Leukozyten. Lediglich im Differenzialblutbild stieg die Menge der neutrophilen Granulozyten. Dieser Effekt war nach 24 Stunden vollständig reversibel und könnte laut Studie auch dem Stress der Exposition geschuldet sein [Brittain und D'Arcy, 1962].

#### 4.3.8 Interleukin Produktion

Der Entzündungsprozess ist ein fein abgestimmter und sehr komplexer Ablauf. Dabei spielen IL-6 und IL-8 eine entscheidende Rolle in der Aktivierung und letztendlich auch

in der Heilungsförderung. Kommt es jedoch zu Störungen in dieser gut abgestimmten Kaskade, kann der Heilungserfolg ausbleiben oder sogar Krankheiten entstehen lassen bzw. begünstigen, beispielsweise Rheumatoide Arthritis, Psoriasis, Lungenfibrose [Arican *et al.*, 2005; Jones 2005; Heinrich *et al.*, 2003]. Auch konnte in anderen Untersuchungen die Bedeutung der Interleukine bewiesen werden. Die IL-6- und IL-8-Konzentration steigt zum einen bei Leber- und Lungenmetastasen des Colonkarzinoms stark an [Ueda *et al.*, 1994], zum anderen steigt bei septischen Patienten die Konzentrationen des IL-6 an. Die Mortalitätsrate korrelierte dabei mit der Höhe der Interleukine [Patel *et al.*, 1994]. Diese prognostischen Verfahren haben sich in der Medizin von heute aber nicht durchgesetzt.

In dieser Arbeit waren nach einstündiger Exposition bis auf fünf Einzelergebnisse alle Interleukin-Konzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze. Ähnliche Ergebnisse konnten mit humanen Lungenkarzinom Zellen und Hamster Ovar Zellen bestätigt werden [Misra *et al.*, 2014]. Dafür wurden verschiedene Liquide verdampft, gefiltert und in unterschiedlichen Konzentrationen bis zu 20 mg/ml dem Medium der Zellen zugeführt. Nach 24-stündiger Exposition wurde für nur drei Marken mit hohen Konzentrationen von 6,9 bis 13,8 mg/ml eine IL-8 Erhöhung nachgewiesen [Misra *et al.*, 2014]. Dem gegenüber stehen verschiedene Studien, die eine signifikante Interleukin-Produktion nachweisen konnten. So wurden humane Lungenfibroblasten mittels ALI dem Dampf von E-Zigaretten ausgesetzt. Dabei konnte 18 Stunden nach Exposition im Vergleich zur Negativkontrolle ein signifikanter Anstieg des IL-6 und -8 mittels des Dual Antikörper Kit nachgewiesen werden [Lerner *et al.*, 2016]. Cervelatti und Mitarbeiter konnten mit HaCat Zellen und Lungenzellen ähnliche Ergebnisse erzeugen. In Folge dessen stieg unter anderem die IL-8 Konzentration in beiden Zellgruppen stark an, wohingegen die IL-6 Konzentration im Vergleich zur Negativkontrolle abnahm [Cervelatti *et al.*, 2014]. Eine Erklärung für den fehlenden Anstieg der Interleukine in dieser Arbeit könnte die direkte Bestimmung nach der Exposition sein und die fehlende Zeit für die Synthese der Proteine. In verschiedenen Studien konnte der Anstieg des IL-6 im zeitlichen Verlauf betrachtet werden. Nach verschiedenen Bauchoperationen an Menschen wurden die IL-6 Konzentrationen immer wieder bestimmt und erst drei Stunden nach der Operation zeigten sich Veränderungen im Serum. Nach 24 Stunden war der Zenit erreicht [Ohzato *et al.*, 1992]. Ähnliche Ergebnisse zeigte auch eine Studie an Ratten. Diesen wurde

mechanisch eine Verletzung am Gehirn zugefügt. Daraufhin stieg die IL-6-Konzentration nach einigen Stunden an, wobei das Maximum nach 24 Stunden erreicht war und sich am zweiten Tag wieder um 40 % verringerte [Woodrooffe *et al.*, 1991]. Diese beiden Beispiele sind nur bedingt mit diesem Versuchsaufbau vergleichbar, jedoch liegt der Schluss nahe, dass eine zeitabhängige Korrelation der Interleukin-Entstehung besteht. Die parallel durchgeführte Positivkontrolle bestätigt zudem den erfolgreichen Versuchsaufbau und Durchführung.

#### 4.4 Bewertung der Grenzwerte

Im folgenden Unterkapitel soll nun der untersuchte Konzentrationsbereich genauer betrachtet werden und eine Einordnung in bestehende Grenzwerte erfolgen.

##### 4.4.1 Interpretation des untersuchten Konzentrationsbereichs

Wie in Kapitel 1.5 beschrieben, wurden die Konzentrationsbereiche aufgrund der *in vitro*-Ergebnisse festgelegt. Dadurch soll dem Vorwurf entgegengewirkt werden, einen Bereich gezielt zu untersuchen und eventuell falsch positive Ergebnisse zu generieren. Des Weiteren ist der PG-Gehalt je nach Hersteller unterschiedlich, sodass ein großer Bereich abgedeckt werden musste. Wie bereits in Kapitel 1.4.1 beschrieben, schwanken die PG-Anteile im Liquid von 2 - 79 % und in diesem Versuchsaufbau wurden Konzentrationen mit mol/l angegeben. Deswegen soll nun eine Verknüpfung dieser verschiedenen Einheiten mit anschließender Interpretation stattfinden. Dafür wurden die Prozentangaben mit folgender Formel  $n = \frac{m}{M}$  (n= Stoffmenge; m= Masse; M= Molare Masse: 76,09 g/mol) in mol/l umgerechnet. Eine exemplarische Rechnung wurde für den zweiprozentigen Wert aufgeführt:

$$n = \frac{m}{M} = \frac{2\%(w/v)}{76,09 \frac{g}{mol}} = \frac{0,02 \frac{g}{ml}}{76,09 \frac{g}{mol}} = 0,00027 \frac{mol}{ml} = 0,27 \frac{mol}{L}$$

Somit bekommt man folgende Werte für die Untergrenze von 2 % ~ 0,27 mol/l, für den Median von 61 % ~ 8,60 mol/l und für die Obergrenze von 79 % ~ 10,75 mol/l. Folglich wird mit dem untersuchten Bereich von 1 mol/ bis zum Reinstoff fast der ganze Bereich der möglichen PG-Konzentrationen abgedeckt. Nichtsdestotrotz ist im Bereich von 2 - 7 % keine Aussage möglich, da 8 % ~ 1,09 mol/l PG entsprechen. Jedoch liegt der

angegebene Median von 61 % ~ 8,60 mol/l (vgl. Kapitel 1.4.1) [Hutzler *et al.*, 2014] genau im Messbereich dieser Arbeit. Somit sind alle generierten Ergebnisse für den Konsumenten von Bedeutung und sollten bedacht werden. Auch wenn es sich hier um eine *in vitro*-Studie handelt und nicht eins-zu-eins auf den Menschen übertragen werden kann.

#### 4.4.2 Aktuelle Einordnung als Gefahrenstoff

Die Nasenschleimhautzellen zeigten nach einstündiger Exposition mit PG in diesem Versuchsaufbau keine akute Entzündungsreaktion im Interleukin-Test. Durch die Ergebnisse im Comet Assay kann dagegen von einem genotoxischen Potenzial auf die Nasenschleimhaut ausgegangen werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit fügen sich, wie oben in der Diskussion erläutert, in bereits bestehende Ergebnisse ohne größere Widersprüche ein. In ersten *in vivo*-Langzeitstudien mit Ratten konnten eine vermehrte nasale Schleimsekretion mit Zunahme der Becherzellen und Hyperplasie der Nasenschleimhaut festgestellt werden. Zusätzliches Nasenbluten und trockene Augen könnten jedoch auch durch die Dampfexposition verursacht worden sein [Suber *et al.*, 1989; Werley *et al.*, 2016]. Eine anderer Forschungsansatz untersuchte die Reinigungsfunktion und somit den Zilienschlag von humanen Nasenschleimhautzellen. Hier konnte mittels High-Speed-Kamera eine reversible Reduktion des Zilienschlags in den Zellen nachgewiesen werden [Vetter *et al.*, 2012].

Auch das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) deklarierte Anfang 2012 den Konsum der E-Zigarette als ein nicht abschätzbares Risiko und riet vom Konsum ab [BfR, 2012]. Es sollten noch weitere Studien erfolgen, da das Risiko für den Menschen durch die vielen unterschiedlichen Inhaltsstoffe der Liquide nicht absehbar ist [BfR, 2012]. Momentan ist der Stoff Propylenglykol durch die Europäische Chemikalienagentur (ECHA) nicht als Gefahrenstoff gekennzeichnet und ist im Anhang VI des „classification, labelling and packagin“ (CLP) als nicht gesundheitsschädlicher Stoff gelistet [European Chemical Agency, 2016 a]. Je nach öffentlicher Institution und Land wurde in der Konsultation die Aufnahme als Gefahrenstoff teils begrüßt und teils auf das heftigste kritisiert [European Chemical Agency, 2016 b]. Für Deutschland gibt es derzeit ebenfalls keinen Grenzwert für die maximale Arbeitsplatz-Konzentrations- (MAK) und die Biologische Arbeitsstoff-Toleranzwert-Werte-Liste (BAT) 2016

[Deutsche Forschungsgemeinschaft, 2016]. Auch in der deutschen Gesetzgebung fällt die E-Zigarette bis zum heutigen Tag nicht unter den § 1 des Bundesnichtraucherschutzgesetzes (BNichtrSchG), da ihr Liquid verdampft und nicht wie bei der konventionellen Zigarette der Tabak verbrannt wird. Demzufolge darf sie an öffentlichen Orten, auch Kneipen und Bars konsumiert werden. Es kann jedoch zu Einschränkungen der Nutzung durch das bestehende Hausrecht kommen. So legt die Deutsche Bahn in ihrer Hausordnung fest, dass der Konsum der konventionellen Zigarette und der E-Zigarette nur in den gekennzeichneten Bereichen erlaubt ist [Deutsche Bahn, 2015]. Das BNichtrSchG wird durch die jeweilige Landesgesetzgebung ergänzt und kann jeweils weitere Einschränkungen oder Freiheiten einräumen. So besteht beispielsweise durch das bayerische Gesundheitsschutzgesetz die Ausnahmeregel, dass in psychiatrischen Krankenhäusern das Rauchen und damit auch das Dampfen in Nebenräumen gestattet werden kann. Trotz mancher Ausnahmen muss das Jugendschutzgesetz (JuSchG) immer beachtet werden. Auch E-Zigaretten dürfen laut § 10 des JuSchG nicht an Jugendliche oder Kinder verkauft, oder deren Zugang ermöglicht werden.

Die Regierungsbehörde „Public Health England“, Exekutivagentur des „Department of Health and Social Care“ im Vereinigten Königreich, ist dem Konsum der E-Zigarette gegenüber offener eingestellt. Diese Behörde deklariert in einer Stellungnahme, dass der Konsum der E-Zigarette unbedenklich sei und durch die widersprüchlichen Forschungsergebnisse im Vergleich zur konventionellen Tabakzigarette als harmloser gelte [Grennberg und Jose, 2018; McNeill *et al.*, 2015]. Diese Aussage sollte durch die genotoxikologischen Ergebnisse des Comet Assays dieser Arbeit kritisch aufgearbeitet werden. Die britische Behörde stützt ihre These auf verschiedene human- und tierexperimentelle Studien. Beispielsweise konnte nach 13 Wochen keine Entzündungsreaktionen oder Metaplasien in Nase oder Lunge von Ratten im Vergleich zur Kontrollgruppe gefunden werden [Heck *et al.*, 2002]. Fraglich ist jedoch der Expositionsaufbau, da PG konventionellen Tabakzigaretten beigemischt und anschließend als Rauch zugeführt wurde. Folglich könnten in diesem Aufbau die Schäden durch den zusätzlichen Tabakkonsum verschleiert sein. Des Weiteren argumentieren sie, dass in humanexperimentellen Untersuchungen zwar eine verringerte FEV<sub>1</sub>, Irritationen der Augen und trockner Hustenreiz, jedoch keine Behinderung der Nasenatmungspassage, des Geruchs oder der VC festgestellt wurde [Wieslander *et al.*,

2001] und von einer marginalen Schädigung ausgegangen werden muss. Zusätzlich sei die E-Zigarette weniger toxisch als konventionelle Zigaretten [Farsalinos *et al.*, 2013a; Cervellati *et al.*, 2014] und somit aus Sicht des „Public Health of England“ eventuell als eine zukünftige Methode zur Raucherentwöhnung anzusehen. Der deutsche Gesetzgeber betrachtet im Gegensatz zu dem britischen die E-Zigarette mit Skepsis und belegt diese aktuell mit einem nahezu kompletten Werbeverbot. Durch die § 19 und § 20 des Tabakerzeugnisgesetzes ist Werbung durch Druckerzeugnisse, audiovisuelle Werbung und das Sponsorings der E-Zigarette nicht gestattet. Der ehemalige Präsident der Bundesärztekammer Prof. Dr. med. Montgomery fordert darüber hinaus weitere Verbote, sodass auch Werbung beispielsweise an Hauswänden oder Bushaltestellen nicht mehr gestattet werden [Bundesärztekammer, 2019; Handelsblatt, 2019]. Der Konsum der E-Zigarette darf sicherlich nicht banalisiert werden. Vielmehr könnten eine Verharmlosung und ein laxer Umgang in der Handhabung die Akzeptanz in der Bevölkerung erhöhen, wobei die Langzeitschäden zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht absehbar sind [Grana *et al.*, 2014].

In den Vereinigten Staaten von Amerika nutzen laut der Gesundheitsbehörde „Food and Drug Administration“ im Jahr 2018 ca. 20,8 Prozent der High School Schüler eine E-Zigarette. Die Jugendlichen sind meistens zwischen 14 und 18 Jahren alt. Einer ersten Schätzung für das Jahr 2019 könnte es sich auf 25 Prozent der Schüler steigern [Lindner, 2019]. Laut der amerikanischen Gesundheitsbehörde „Centers for Disease Control and Prevention“ sind 450 mögliche Erkrankungen mit Atemnot und Brustkorbschmerzen durch Konsum der E-Zigarette bis September 2019 in über 33 Bundesstaaten registriert worden. Zudem wurden sechs Tote gemeldet [Fiedler, 2019]. In vielen der Erkrankungsfälle wurde festgestellt, dass den Liquiden der E-Zigarette zusätzlich Tetrahydrocannabinol, Wirkstoff des Cannabis, beigemischt wurde. Abschließende Untersuchungen stehen aktuell noch aus [Lindner, 2019]. Seit Mitte September 2019 fordert der Präsident der Vereinigten Staaten Donald Trump ein Teilverbot für den Verkauf bestimmter Liquide. Vor allem aromatisierte Liquide, die besonders junge Konsumenten ansprechen, wie Gurke, Mango und Minze sollen komplett verboten werden, sodass auch Erwachsene diese nicht mehr erwerben können. Es sollen lediglich Liquide mit Tabakgeschmack erhalten bleiben. Der Gesundheitsminister Azar erwägt auch ein Verbot der Liquide mit Tabakgeschmack, sollte sich herausstellen, dass

Jugendliche auf diese zurückgreifen. Damit schließt sich die amerikanische Regierung verschiedenen Städten, Regionen und Bundesstaaten an, die einzelne aromatisierte Liquide oder den kompletten Verkauf der E-Zigarette verbieten [Fiedler, 2019; Hautkapp, 2019; Lindner, 2019].

Dieser amerikanischen Forderung nach Verboten schließt sich die indische Regierung im September 2019 an. Diese plant ein entsprechendes Gesetz, um junge Erwachsene vor den nicht absehbaren gesundheitlichen Folgen durch ein generelles Verbot der E-Zigarette zu schützen. Dabei soll sowohl die Produktion, Verkauf, Import und Transport unter Strafe gestellt werden. Das Strafmaß soll sich zwischen einmaligen Geldzahlungen im dreistelligen Bereich bis hin zu mehrjährigen Gefängnisstrafen bei Wiederholungstätern belaufen [Abi-Habib und Venugopal, 2019].

Diese globale Unsicherheit im Umgang mit der E-Zigarette, ob diese ein geeignetes Ersatzprodukt für Tabakzigaretten ist, oder Jugendliche zum Rauchen verführt und damit gesundheitlich gefährdet, darf zukünftig nicht unberücksichtigt bleiben und fordert weitere Untersuchungen.

#### **4.5 Limitationen der vorliegenden Arbeit**

Für die Ergebnisse und Interpretation dieser Studie gelten Einschränkungen. Die Verwendung von Zellkulturen bietet eine erste Möglichkeit unter standardisierten Bedingungen Ergebnisse zu generieren und erste Anhaltspunkte für eine eventuelle Toxizität zu erhalten. Diese *in vitro*-Resultate sollten nicht einfach auf den Menschen übertragen, sondern müssen in klinischen Studien überprüft werden.

Ein weiteres Problem besteht bis heute darin, dass es zwar standardisierte Protokolle für die Untersuchung der konventionellen Zigarette gibt, jedoch nicht für die E-Zigarette. Somit ist eine Vergleichbarkeit durch die unterschiedliche Dampferzeugung eingeschränkt. Die Versuchsaufbauten orientieren sich an den Protokollen der konventionellen Zigarette, jedoch wurden diese auf Grund eines anderen Anforderungsprofils der E-Zigarette in experimentellen Studien verändert [Farsalinos *et al.*, 2013b]. Der Versuchsaufbau dieser Arbeit untersucht insbesondere die akute Toxizität des PGs, sodass vor allem Langzeitfolgen schwerlich abgeschätzt werden können.

In dieser Arbeit wurden zwar E-Zigaretten einer weit verbreiteten Marke verwendet, jedoch ist die Diversität der Liquide und der E-Zigaretten unüberschaubar groß. Insbesondere neuere Generationen der E-Zigarette mit individuell einstellbarer Temperatur des Heizelements verändert die Dampfzusammensetzung [Bhatagner *et al.*, 2014; Bertholon *et al.*, 2013; Goniewicz *et al.*, 2013 a]. Dadurch kann von den vorliegenden Ergebnissen dieser Arbeit nur eingeschränkt auf andere E-Zigaretten und deren Toxizität geschlossen werden. Auch wurde in dieser Arbeit das PG isoliert betrachtet. Durch die verschiedenen Aromen und Geschmackszusätze in den Liquiden können beim Konsum des Verbrauchers toxische Volatile entstehen [Qu *et al.*, 2018; Kosmider *et al.*, 2014; Allen *et al.*, 2016], die in diesem Versuchsaufbau nicht abgebildet wurden.

#### 4.6 Ausblick

In unserem Versuchsaufbau wurde die akute Toxizität nach einer Stunde PG-Exposition untersucht. Dabei konnte ein erhöhtes Risiko für Mutagenität entdeckt und ein akute Entzündungsreaktion ausgeschlossen werden. Diese Ergebnisse sind ein weiterer Schritt zur Einordnung des PG als Gefahrenstoff. Es sollten weitere Studien und Versuchsaufbauten folgen. Insbesondere sollte die Ermittlung der Interleukin-Konzentration nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden wiederholt werden. Ergänzend kann beispielsweise mittels der Real-Time quantitativen Polymerase-Kettenreaktion mögliche Veränderungen auf DNA-Ebene detektieren werden, die sich noch nicht in der Proteinsynthese und damit Interleukin-Produktion zeigen. Auch könnten andere Organkulturen des Oropharyngealtraktes bedampft und dessen Wirkung analysiert werden. Beispielsweise wurde in Speichelproben von Konsumenten Cotinin als Metabolit des Nikotins gefunden [Etter und Bullen, 2011 b]. Folglich wäre es nahe liegend, Parotiszellen zu kultivieren und auf eventuelle Schädigungen zu untersuchen, da ein erhöhter Zigarettenabusus eine Ursache für benigne Parotistumore sein kann [Klusmann *et al.*, 2006; Sadetzki *et al.*, 2008]. Ein anderer Versuchsansatz wäre es Langzeitstudien durchzuführen. Dabei könnten mit Hilfe von täglichen Bedampfungen über einen festgelegten Zeitraum chronische Schädigungen besser abgeschätzt und eingeordnet werden.

## 5 Zusammenfassung

Die E-Zigarette gewinnt in den letzten Jahren immer mehr an Zustimmung und Popularität. Dies zeigt sich deutlich an den weltweit steigenden Umsatzzahlen. Eine E-Zigarette wird mit einem Akku betrieben und kann in der Haptik einer konventionellen Zigarette ähneln. Eine Batterie erwärmt eine Heizspirale, durch den Zug des Rauchers am Mundstück wird Liquid aus einem Depot zur Spirale gesaugt und verdampft. Bei einer großen Variabilität der Liquide ist der Stoff Propylenglykol ein essenzieller Bestandteil. Propylenglykol ist in der Industrie bereits seit geraumer Zeit bekannt und wird in der Tierhaltung als Futterzusatz oder in Kosmetikprodukten verwendet. Der Einsatz als Trägerstoff in der E-Zigarette dagegen ist neu. In wenigen zellbiologischen und klinischen Studien sind gesundheitliche Probleme nach Konsum der E-Zigarette festgestellt worden. So sind bei Menschen Beeinträchtigungen der Lungenfunktion, Irritationen der Augen, allergische Reaktionen der Haut beschrieben. Liquide, die von Kindern passiv geraucht wurden, stehen im Verdacht allergische Erkrankungen auszulösen. Befürworter der E-Zigarette deklarieren diese als weniger toxisch im Vergleich zur konventionellen Zigarette. Dadurch könnte sie in der Raucherentwöhnung nützlich sein. In der vorliegenden Arbeit soll die Fragestellung nach Genotoxizität und eine akute Entzündungsreaktion von Nasenschleimhautzellen nach Dampfexposition mit Propylenglykol untersucht werden. Auf Basis der generierten Ergebnisse soll eine Einordnung in die bestehende Studienlage erfolgen und eine Handlungsempfehlung ausgesprochen werden.

Humane Nasenschleimhautzellen von zehn Probanden wurden mit der Methode des Air-Liquid-Interface kultiviert und anschließend mit drei verschiedenen Konzentrationen von 1 mol/l, 10 mol/l und Reinstoff des Propylenglykols für eine Stunde bedampft. Dabei wurde mit einer Zeitschaltuhr in einem Intervall von 30 Sekunden für vier Sekunden die E-Zigarette aktiviert und die Zellen bedampft. Durch den Trypanblau Test wurde die Vitalität überprüft. Die exponierten Zellen wurden auf Genotoxizität mittels des Comet Assays und des Mikrokerntestes untersucht. Eine akute Entzündungsreaktion wurde mittels des Nachweises von IL-6 und IL-8 im Sandwich-ELISA untersucht.

Nach einstündiger Exposition zeigte sich keine signifikante Reduktion der Vitalität im Trypanblau Test im Vergleich zur Negativkontrolle. Ebenso konnte kein signifikanter

Anstieg der IL-6 oder IL-8 Konzentration gefunden werden. Im Comet Assay war eine signifikante Schädigung im Vergleich zur Negativkontrolle in allen untersuchten Konzentrationen nachweisbar. Zudem zeigte sich eine dosisabhängige signifikante Schädigung der Konzentrationen 1 mol/l und Reinstoff. Im Mikrokerntest konnte ein signifikanter Unterschied zwischen dem Reinstoff und der Negativkontrolle gefunden werden. Eine dosisabhängige Schädigung konnte nicht bestätigt werden.

Die vorliegenden Ergebnisse der verwendeten Untersuchungsmethoden dieser Arbeit fügen sich in die bisherige Studienlage ein: So konnte eine Genotoxizität im Comet Assay bestätigt werden, jedoch keine akute Entzündungsreaktion. Aufgrund dieser widersprechenden Studienlage behandelt die deutsche Politik den Umgang der E-Zigarette restriktiv mit Werbeverboten und strengen Jugendschutzgesetzen und wird diesen Umgang wahrscheinlich auch fortsetzen. Der britische Gesetzgeber ist dem gegenüber liberaler und begrüßt die E-Zigarette als erfolgversprechende Möglichkeit der Raucherentwöhnung. Dagegen fordert die Regierung der Vereinigten Staaten von Amerika und die indische Regierung seit September 2019 ein Verbot der E-Zigarette, da vermehrt Erkrankungsfälle und einzelne Todesfälle in Zusammenhang mit dem Konsum der E-Zigarette gebracht werden. Die aktuelle Studienlage bis heute ist sehr uneindeutig bezüglich der Frage nach der Toxizität der E-Zigarette. So konnte auch in vorliegender Arbeit eine Genotoxizität im Comet Assay gefunden werden, diese jedoch nicht im Mikrokerntest bestätigt werden. Es sollten Studien folgen, um Klarheit bezüglich zusätzlicher Endpunkte der Genotoxizität zu erlangen. Insbesondere sollten Langzeitfolgen chronischer Exposition in geeigneten Versuchsansätzen untersucht werden.

## 6 Anhang

### 6.1 Literaturverzeichnis

- Abi-Habib M & Venugopal S, 2019, The New York Times: India plans to ban E-Cigarettes, as Global Backlash Intensifies, (<https://www.nytimes.com/2019/09/19/world/asia/india-vaping-ban-e-cigarettes.html>, zuletzt geprüft am 28.03.2020).
- Action on Smoking and Health, 2016, ash.org: Electronic Cigarettes, Briefing on electronic cigarettes, (<http://ash.org.uk/stopping-smoking/ash-briefing-on-electronic-cigarettes-2/>, zuletzt geprüft am 28.03.2020).
- Adkison AE, O'Connor RJ, Bansal-Travers M, Hyland A, Borland R, Yong HH, Cummings KM, McNeill A, Thrasher JF, Hammond D & Fong GT, 2013, Electronic nicotine delivery systems: international tobacco control four-country survey, *American Journal of Preventiv Medicine*, 44: 207-215.
- Allen JG, Flanigan SS, LeBlanc M, Vallarino J, MacNaughton P, Stewart JH & Christiani DC, 2016, Flavoring Chemicals in E-Cigarettes: Diacetyl, 2,3-Pentanedione, and Acetoin in a Sample of 51 Products, Including Fruit-, Candy-, and Cocktail-Flavored E-Cigarettes, *Environmental Health Perspectives*, 733-739.
- Arican O, Aral M, Sasmaz S & Ciragil P, 2005, Serum Levels of TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-8, IL-12, IL-17, and IL-18 in Patients With Active Psoriasis and Correlation With Disease Severity, *Mediators of Inflammation*, 24: 273-279.
- Aye A, Di Giorgio C, De Mo M, Botta A, Perrin J & Courbiere B, 2010, Assessment of the genotoxicity of three cryoprotectants used for human oocyte vitrification: Dimethyl sulfoxide, ethylene glycol and propylene glycol, *Food and Chemical Toxicology*, 48: 1905-1912.
- Baggiolini M & Clark-Lewis I, 1992, Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine, *FEBS Letters*, 307: 97-101.
- Bahl V, Lin S, Xu N, Davis B, Wang YH & Talbot P, 2012, Comparison of electronic cigarette refill fluid cytotoxicity using embryonic and adult models, *Reproductive Toxicology*, 34: 529-537.

- Bakand S, Winder C, Khalil C & Hayes A, 2006, An experimental in vitro model for dynamic direct exposure of human cells to airborne contaminants, *Toxicology Letters*, 165: 1-10.
- Behar RZ, Davis B, Wang Y, Bahl V, Lin S & Talbot T, 2014, Identification of toxicants in cinnamon-flavored electronic cigarette refill fluids, *Toxicology in Vitro*, 28: 198-208.
- Berridge MV & Tan AS, 1993, Characterization of the Cellular Reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): Subcellular Localization, Substrate Dependence, and Involvement of Mitochondrial Electron Transport in MTT Reduction, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 303: 474-482.
- Berthelot-Ricou A, Perrin J, di Giorgio C, de Meo M, Botta A & Courbiere B, 2011, Assessment of 1,2-propanediol (PrOH) genotoxicity on mouse oocytes by comet assay, *Fertility and Sterility*, 96: 1002-1007.
- Bertholon JF, Becquemin MH, Annesi-Maesano I & Dautzenberg B, 2013, Electronic Cigarettes: A Short Review, *Respiration*, 86: 433-438.
- BFR, 2012, BFR: Fragen und Antworten zur E-Zigarette, ([https://www.bfr.bund.de/de/fragen\\_und\\_antworten\\_zur\\_e\\_zigarette-129574.html](https://www.bfr.bund.de/de/fragen_und_antworten_zur_e_zigarette-129574.html), zuletzt geprüft am 28.03.2020).
- Bhatnagar A, Whitsel LP, Ribisl KM, Bullen C, Chaloupka F, Piano MR, Robertson RM, McAuley T, Goff D, Benowitz N, Committee AHAAC, Nursing CoCaS, Cardiology CoC & Research CoQoCaO, 2014, Electronic Cigarettes, *Circulation*, 130: 1418-1436.
- Böhm R & Herdegen T, 2014, Grundlagen der Pharmakotherapie, in Herdegen T, Böhm R, Culman J, Gohlke P, Luippold G & Wätzig V, *Kurzlehrbuch Pharmakologie und Toxikologie* (Georg Thieme Verlag KG), S. 56-57.
- Brittain RT & D'Arcy PF, 1962, Hematologic effects following the intravenous injection of propylene glycol in the rabbit, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 4: 738-744.
- Bullen C, Howe C, Murray L, McRobbie H, Parag V, Williman J & Walker N, 2013, Electronic cigarettes for smoking cessation: a randomised controlled trial, *The Lancet*, 16: 1629-1637.

- Bundesärztekammer, 2019, aerzteblatt.de: Werbeverbot sollte auch für E-Zigaretten und Tabakerhitzer gelten, (<https://www.aerzteblatt.de/nachrichten/102569/Werbeverbot-sollte-auch-fuer-E-Zigaretten-und-Tabakerhitzer-gelten>, zuletzt geprüft am 28.03.2020).
- 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.
- Cheah NP, Chong NW, Tan J, Morsed FA & Yee SK, 2014, Electronic nicotine delivery systems: regulatory and safety challenges: Singapore perspective, *Tobacco Control*, 23: 119-125.
- Chen SU, Lien YR, Chen HF, Chang LJ, Tsai YY & Yang YS, 2005, Observational clinical follow-up of oocyte cryopreservation using a slow-freezing method with 1,2-propanediol plus sucrose followed by ICSI., *Human Reproduction*, 20: 1975-1980.
- Choi H, Schmidbauer N, Sundell J, Hasselgren M, Spengler J & Bornehag CG, 2010, PLOS:Common household chemicals and the allergy risks in pre-school age children, *PLOS One*, 5: e13423
- Christopher MM, Eckfeldt JH & Eaton JW, 1990, Propylene glycol ingestion causes D-lactic acidosis., *Laboratory Investigation*, 62: 114-118.
- Ciccarelli J, Clairborne R, Fitzgerald P, Gill N, Haynes B & Ashley L. Taylor J, 2012, Tobacco Law Blog: Ruyan Patent Litigation as Reason to Consider Patent Protection, (<https://www.tobaccolawblog.com/2012/07/ruyan-patent-litigation-as-reason-to-consider-patent-protection/>, zuletzt geprüft am 24.01.2020).
- Dawkins L, Turner J, Roberts A & Soar K, 2013, 'Vaping' profiles and preferences: an online survey of electronic cigarette users, *Addiction*, 108: 1115-1125.
- de Andrade M, Hastings G & Angus K, 2013, Promotion of electronic cigarettes: tobacco marketing reinvented?, *British Medical Journal*, 347: f7473.
- Decordier I, Papine A, Plas G, Roesems S, Vande Loock K, Moreno-Palomo J, Cemeli E, Anderson D, Fucic A, Marcos R, Soussaline F & Kirsch-Volders M, 2009, Automated image analysis of cytokinesis-blocked micronuclei: an adapted protocol and a validated scoring procedure for biomonitoring, *Mutagenesis*, 24: 85-93.

- Decordier I, Papine A, Vande Loock K, Plas G, Soussaline F & Kirsch-Volders M, 2011, Automated image analysis of micronuclei by IMSTAR for biomonitoring, *Mutagenesis*, 26: 163-168.
- Degrassi F & Tanzarella C, 1988, Immunofluorescent staining of kinetochores in micronuclei: A new assay for the detection of aneuploidy, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 203: 339-345.
- Deutsche Bahn, 2015, Deutsche Bahn: Hausordnung, (<https://www.bahnhof.de/service/search/bahnhof-de/520608?query=Hausordnung>, zuletzt geprüft am 28.03.2020).
- Deutsche Forschungsgemeinschaft, 2016, Wiley online Library: MAK-und BAT-Werte-Liste 2016, (<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9783527805976>, zuletzt geprüft am 28.03.2020).
- Diem E & Rüdiger HW, 1999, Mikrokerntest und Comet Assay: Ein Ergebnisvergleich bei Normalprobanden, *Arbeitsmedizin, Sozialmedizin, Umweltmedizin*, 437-441.
- Duncker HR & Kummer W, 2008, Atemsystem, in Drenckhahn D, *Anatomie, Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie* (Urban & Fischer Verlag ), S. 544-545.
- Eichler M, 2017, Ärzteblatt.de: Phänomen E-Zigarette, (<https://www.aerzteblatt.de/archiv/187360/Phaenomen-E-Zigarette>, zuletzt geprüft am 28.03.2020).
- Eilers M, 2009, Zellzyklus und Zelltod, in Scharl M, Gessler M & von Eckardstein A, *Biochemie und Molekularbiologie des Menschen* (Elsevier GmbH), S. 671-672.
- Etter JF, 2010, Electronic cigarettes: a survey of users, *BMC Public Health*, 10: 231.
- Etter JF & Bugey A, 2017, E-cigarette liquids: Constancy of content across batches and accuracy of labeling, *Addictive Behaviors*, 73: 137-143.
- Etter JF & Bullen C, 2011a, Electronic cigarette: users profile, utilization, satisfaction and perceived efficacy, *Addiction*, 106: 2017-2028.
- Etter JF & Bullen C, 2011b, Saliva cotinine levels in users of electronic cigarettes, *European Respiratory Journal*, 38: 1219-1220.

- European Chemical Agency, 2016a, European Chemical Agency: Glyphosate discussed and opinions given on hexavalent chromium by ECHA's scientific committees; Annex to a news alert ECHA/NA/16/37, ([https://echa.europa.eu/de/view-article/-/journal\\_content/title/glyphosate-discussed-and-opinions-given-on-hexavalent-chromium-by-echa-s-scientific-committees](https://echa.europa.eu/de/view-article/-/journal_content/title/glyphosate-discussed-and-opinions-given-on-hexavalent-chromium-by-echa-s-scientific-committees), zuletzt geprüft am 28.03.2020).
- European Chemical Agency, 2016b, European Chemical Agency: Harmonised classification and labelling previous consultations; Commenst and response to comments on CHL: Proposal and Justification, (<https://echa.europa.eu/de/harmonised-classification-and-labelling-previous-consultations/-/substance-rev/12910/term>, zuletzt geprüft am 28.03.2020).
- Farsalinos KE, Kistler KA, Gillman G & Voudris V, 2015, Evaluation of Electronic Cigarette Liquids and Aerosol for the Presence of Selected Inhalation Toxins, *Nicotine & Tobacco Research*, 17: 168-174.
- Farsalinos KE, Romagna G, Alliffranchini E, Ripamonti E, Bocchietto E, Todeschi S, Tsiapras D, Kyrzopoulos S & Voudris V, 2013a, Comparison of the cytotoxic potential of cigarette smoke and electronic cigarette vapour extract on cultured myocardial cells., *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10: 5146-5162.
- Farsalinos KE, Romagna G, Tsiapras D, Kyrzopoulos S & Voudris V, 2013b, Evaluation of electronic cigarette use (vaping) topography and estimation of liquid consumption: implications for research protocol standards definition and for public health authorities' regulation., *International Journal of Environmental Research an Public Health*, 10: 2500-2514.
- Fenech M, 1993, The cytokinesis-block micronucleus technique and its application to genotoxicity studies in human populations, *Environmental Health Perspectives*, 285: 101-107.
- Fenech M, 2000, The in vitro micronucleus technique, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 455: 81-95.
- Fenech M, 2006, Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a "cytome" assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death, *Mutation Research*, 600: 58-66.
- Fenech M, 2007, Cytokinesis-block micronucleus cytome assay, *Nature Protocols*, 2: 1084-1104.

- Fenech M & Neville S, 1992, Conversion of excision-repairable DNA lesions to micronuclei within one cell cycle in human lymphocytes., *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 19: 27-36.
- Fiedler M, 2019, Der Tagesspiegel: Trump will aromatisierte E-Zigaretten verbieten (<https://www.tagesspiegel.de/politik/nach-sechs-todesfaellen-trump-will-aromatisierte-e-zigaretten-verbieten/25007128.html>, zuletzt geprüft am 28.03.2020).
- Fischer L & Simmank J, 2019, Zeit Online: Wie riskant sind E-Zigaretten? (<https://www.zeit.de/wissen/gesundheit/2019-09/vaping-e-zigarette-juul-landgericht-duesseldorf>, zuletzt geprüft am 28.03.2020).
- Flouris AD, Chorti MS, Poulianiti KP, Jamurtas AZ, Kostikas K, Tzatzarakis MN, Wallace Hayes A, Tsatsakis AM & Koutedakis Y, 2013, Acute impact of active and passive electronic cigarette smoking on serum cotinine and lung function., *Inhalation Toxicology*, 25: 91-101.
- Flouris AD, Poulianiti KP, Chorti MS, Jamurtas AZ, Kouretas D, Owolabi EO, Tzatzarakis MN, Tsatsakis AM & Koutedakis Y, Oktober, Acute effects of electronic and tobacco cigarette smoking on complete blood count, *Food and Chemical Toxicology*, 50: 3600-3603.
- Fosas N, Marina F, Torres PJ, Jové I, Martín P, Pérez N, Arnedo N & Marina S, 2003, The births of five Spanish babies from cryopreserved donated oocytes, *Human Reproduction*, 18: 1417-1421.
- Fotiou A, Kanavou E, Stavrou M, Richardson C & Kokkevi A, 2015, Prevalence and correlates of electronic cigarette use among adolescents, *Addictive Behaviors*, 51: 88-92.
- Foulds J, Veldheer S & Berg A, 2011, Electronic cigarettes (e-cigs): views of aficionados and clinical/public health perspectives, *The International Journal of Clinical Practice*, 65: 1037-1042.
- Frankenberg-Schwager M, 1989, Review of repair kinetics for DNA damage induced in eukaryotic cells in vitro by ionizing radiation, *Radiotherapy and Oncology*, 14: 307-320.
- Frey DD & Dym CL, 2006, Validation of design methods: lessons from medicine, *Research in Engineering Design*, 17: 45-57.

- Friedman M, 1937, The Use of Ranks to Avoid the Assumption of Normality Implicit in the Analysis of Variance, *Journal of the American Statistical Association*, 32: 675-701.
- Gantenberg HW, Wuttke K, Streffer C & Müller WU, 1991, Micronuclei in human lymphocytes irradiated in vitro or in vivo, *Radiation Research*, 128: 276-281.
- Geiss O, Bianchi I, Barahona F & Barrero-Moreno J, 2015, Characterisation of mainstream and passive vapours emitted by selected electronic cigarettes., *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 218: 169-180.
- Gennimata SA, Palamidis A, Kaltsakas G, Tsikrika S, Vakali S, Gratziou C & Koulouris N, 2012, Acute effect of e-cigarette on pulmonary function in healthy subjects and smokers, *European Respiratory Journal, Annual Congress 2012*, 40: 1053.
- Gentzke AS, Homa D. M, Kenemer JB, Gomez Y & King BA, 2018, Rules to prohibit the use of electronic vapor products inside homes and personal vehicles among adults in the U.S., 2017, *Preventive Medicine*, 114: 47-53.
- Gilbert AH, 1965, USA Patent No. 3200819A.
- Goniewicz ML, Knysak J, Gawron M, Kosmider L, Sobczak A, Kurek J, Prokopowicz A, Jablonska-Czapla M, Rosik-Dulewska C, Havel C, Jacob PI & Benowitz N, 2014, Levels of selected carcinogens and toxicants in vapour from electronic cigarettes., *Tobacco Control*, 23: 133-139.
- Goniewicz ML, Kuma T, Gawron M, Knysak J & Kosmider L, 2013a, Nicotine Levels in Electronic Cigarettes, *Nicotine & Tobacco Research*, 15: 158-166.
- Goniewicz ML, Lingas EO & Hajek P, 2013b, Patterns of electronic cigarette use and user beliefs about their safety and benefits: an internet survey, *Drug and Alcohol Review*, 32: 133-140.
- Grana R, Benowitz N & Glantz SA, 2014, E-Cigarettes, A Scientific Review, *Circulation*, 129: 1972-1986.
- Grana RA & Ling PM, 2014, "Smoking Revolution" A Content Analysis of Electronic Cigarette Retail Websites, *American Journal of Preventive Medicine*, 46: 395-403.
- Greenberg A & Jose RJ, 2018, Public Health England prematurely endorses e-cigarettes, *British Medical Journal*, 360: k1262.

- Handelsblatt, 2019, Handelsblatt: Ärztepräsident fordert Werbeverbot auch für E-Zigaretten, (<https://www.handelsblatt.com/politik/deutschland/bundesaezrtekammer-aerztepraesident-fordert-werbeverbot-auch-fuer-e-zigaretten/24244084.html?ticket=ST-150870-OXkm3ZImDcvYWMd3FHaD-ap1>, zuletzt geprüft am 28.03.2020).
- Hannuksela M & Förström L, 1978, Reactions to peroral propylene glycol., *Contact Dermatitis*, 4: 41-45.
- Harrell PT, Simmons VN, Piñeiro B, Correa JB, Menzie NS, Meltzer LR, Unrod M & Brandon TH, 2015, E-cigarettes and expectancies: why do some users keep smoking?, *Addiction*, 110: 1833-1843.
- Harréus UA, Wallner BC, Kastenbauer ER & Kleinsasser NH, 2001, Untersuchungen zur DNA-Reparatur von Schleimhautzellen und Lymphozyten mit dem Comet Assay, *Laryngo-Rhino-Otologie*, 80: 23-26.
- Harris CB, Chowanadisai W, Mishchuk DO, Satre MA, Slupsky CM & Rucker RB, 2013, Dietary pyrroloquinoline quinone (PQQ) alters indicators of inflammation and mitochondrial-related metabolism in human subjects, *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 24: 2076-2084.
- Haus Riswick & Landwirtschaftskammer NRW, 2005, Milchleistungsfutter im Test, (<http://www.riswick.de/versuche/tierhaltung/futterwertpruefung/archiv/milchleistungsfutter-447.htm>, zuletzt geprüft am 24.01.2020).
- Hautkapp D, 2019, Berliner Morgenpost:Nach Todesfällen: Trump will E-Zigaretten den Stecker ziehen (<https://www.morgenpost.de/politik/article227068527/Nach-Todesfaellen-Trump-will-E-Zigaretten-den-Stecker-ziehen.html>, zuletzt geprüft am 28.03.2020).
- Hayashi M, Kishi M, Sofuni T & Ishidate MJ, 1988, Micronucleus tests in mice on 39 food additives and eight miscellaneous chemicals, *Food and Chemical Toxicology*, 26: 487-500.
- Heck JD, Gaworski CL, Rajendran N & Morissey RL, 2002, Toxicologic evaluation of humectants added to cigarette tobacco: 13-week smoke inhalation study of glycerin and propylene glycol in Fischer 344 rats, *Inhalation Toxicology*, 14: 1135-1152.

- Heddle JA, Hite M, Kirkhart B, Mavournin K, MacGregor JT, Newell GW & Salamone MF, 1983, The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity: A report of the U.S. environmental protection agency Gene-Tox program, *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 123: 61-118.
- Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Müller-Newen G & Schaper F, 2003, Principles of Interleukin (IL)-6-type cytokin signalling and its regulation, *Biochemical Journal*, 374: 1-20.
- Hermanns-Clausen M & Desel H, 2018, Klinisch toxikologisches Labor der Universität Göttingen: Toxikologie von Glykolderivaten, (<https://www.giz-nord.de/pts/index.php/fachinformationen.html>, zuletzt geprüft am 28.03.2020).
- Herzog B, Gerberi J & Scott A, 2014, *Equity research: Vapor-Revolutionizing the tobacco industry*, (<http://www.ecigarette-politics.com/files/4q14-wells-fargo.pdf>, zuletzt geprüft am 28.03.2020)
- Hirano T, 1998, Interleukin 6 and its Receptor: Ten Years Later, *International Reviews of Immunology*, 16: 249-284.
- Holliday R, Kist R & Bauld L, 2016, E-cigarette vapour is not inert and exposure can lead to cell damage, *Evidence-Based Dentistry*, 17: 2-3.
- Horvath I, 2012, Zu den akuten pulmonalen Wirkungen bei Verwendung einer E-Zigarette, *Der Pneumologe*, 9: 203-204.
- Horváth I, Donnelly LE, Kiss A, Balint B, Kharitonov SA & Barnes PJ, 2004, Exhaled nitric oxide and hydrogen peroxide concentrations in asthmatic smokers, *Respiration*, 71: 463-468.
- Hsu TC, 1987, Genetic predisposition to cancer with special reference to mutagen sensitivity, *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, 23: 591-603.
- Hua M & Talbot P, 2016, Potential health effects of electronic cigarettes: A systematic review of case reports, *Preventive Medicine Reports*, 4: 169-178.
- Hünig T, 2009, Immunologie, in Schartl M, Gessler M & von Eckardstein A, *Biochemie und Molekularbiologie des Menschen* (Urban&Fischer), S. 840-841.
- Hutzler C, Paschke M, Kruschinski S, Henkler F, Hahn J & Luch A, 2014, Chemical hazards present in liquids and vapors of electronic cigarettes, *Archives of Toxicology*, 88: 1295-1308.

- Ishidate MJ, Sofuni T, Yoshikawa K, Hayashi M, Nohmi T, Sawada M & Matsuoka A, 1984, Primary mutagenicity screening of food additives currently used in Japan, *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 22: 623-636.
- Jablow LM & Sexton RJ, 2015, Spontaneous Electronic Cigarette Explosion: A Case Report, *American Journal of Medical Case Reports*, 3: 93-94.
- Jones SA, 2005, Directing Transition from Innate to Acquired Immunity: Defining a Role for IL-6, *The Journal of Immunology*, 175: 3463-3468.
- Kamerow D, 2013, Big Tobacco lights up e-cigarettes, *British Medical Journal*, 346: 346-347.
- Kamps U, 2018, Springer: Gabler Wirtschaftsexikon: Säulendiagramm, (<https://wirtschaftslexikon.gabler.de/definition/saeulendiagramm-45026/version-268326>, zuletzt geprüft am 28.03.2020).
- Khalil M, Shariat-Panahi A, Tootle R, Ryder T, McCloskey P, Roberts E, Hodgson H & Selden C, 2001, Human hepatocyte cell lines proliferating as cohesive spheroid colonies in alginate markedly upregulate both synthetic and detoxificatory liver function, *Journal of Hepatology*, 34: 68-77.
- Kharitonov SA, Robbins RA, Yates D, Keatings V & Barnes PJ, 1995, Acute and chronic effects of cigarette smoking on exhaled nitric oxide, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 152: 609-612.
- Khoury M, Manlhiot C, Fan CP, Gibson D, Stearne K, Chahal N, Dobbin S & McCrindle BW, 2016, Reported electronic cigarette use among adolescents in the Niagara region of Ontario., *CMAJ*, 188: 794-800.
- Khuder SA, 2001, Effect of cigarette smoking on major histological types of lung cancer: a meta-analysis, *Lung Cancer*, 31: 139-148.
- Kim HJ & Shin HS, 2013, Determination of tobacco-specific nitrosamines in replacement liquids of electronic cigarettes by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1291: 48-55.
- Kleinsasser NH, Gamarra F, Bergner A, Wallner BC, Harréus UA, Juchhoff J, Kastenbauer ER & Huber RM, 2001, Genotoxicity of Nitroso Compounds and Sodium Dichromate in a Model Combining Organ Cultures of Human Nasal Epithelia and the Comet Assay, *ORL* 63, 63: 141-147.

- Kleinsasser NH, Juchhoff J, Wallner BC, Bergner A, Harréus UA, Gamarra F, Bühlren M, Huber RM & Rettenmeier AW, 2004, The use of mini-organ cultures of human upper aerodigestive tract epithelia in ecogenotoxicology, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 561: 63-73.
- Klussmann JP, Wittekindt C, Preuss SF, Al Attab A, Schroeder U & Guntinas-Lichius O, 2006, High risk for bilateral Warthin tumor in heavy smokers – review of 185 cases, *Acta Oto-Laryngologica*, 126: 1213-1217.
- Knasmueller S, Holland N, Wultsch G, Jandl B, Burgaz S, Mišík M & Nersesyan A, 2011, Use of nasal cells in micronucleus assays and other genotoxicity studies, *Mutagenesis*, 26: 231-238.
- Koehler C, Ginzkey C, Friehs G, Hackenberg S, Froelich H, Scherzad A, Burghartz M, Kessler M & Kleinsasser N, 2010, Aspects of nitrogen dioxide toxicity in environmental urban concentrations in human nasal epithelium, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 245: 219-225.
- Koehler C, Ginzkey C, Friehs S, Froelich K, Scherzad A, Burghartz M, Kessler M & Kleinsasser N, 2011, Ex vivo toxicity of nitrogen dioxide in human nasal epithelium at the WHO defined 1-h limit value, *Toxicology Letters*, 207: 89-95.
- Königshoff M & Brandenburger T, 2012, Zellbiologie, in *Kurzlehrbuch Biochemie*, 3. Auflage (Georg Thieme Verlag KG), S. 334-336.
- Kosmider L, Sobczak A, Fik M, Knysak J, Zaciera M, Kurek J & Goniewicz ML, 2014, Carbonyl compounds in electronic cigarette vapors: effects of nicotine solvent and battery output voltage., *Nicotine & Tobacco Research*, 16: 1319-1326.
- Lalla SC, Nguyen H, Chaudhry H, Killian JM, Drage LA, Davis MDP, Yiannias JA & Hall MR, 2018, Patch Testing to Propylene Glycol: The Mayo Clinic Experience, *Dermatitis*, 29: 200-205.
- Lampen A, 2010, Toxikologische Grenzwerte, Definitionen, in Vohr H-W, *Toxikologie, Band 1: Grundlagen der Toxikologie* (Wiley-VCH Verlag GmbH&Co.KGaA), S. 381-382.
- Lasne C, Gu ZW, Venegas W & Chouroulinkov I, 1984, The in vitro micronucleus assay for detection of cytogenetic effects induced by mutagen-carcinogens: comparison with the in vitro sister-chromatid exchange assay, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 130: 273-282.

- Lassalle B, Testart J & Renard JP, 1985, Human embryo features that influence the success of cryopreservation with the use of 1,2 propanediol, *Fertility and Sterility*, 44: 645-651.
- Lerner CA, Rutagarama P, Ahmad T, Sundar IK, Elder A & Rahman I, 2016, Electronic cigarette aerosols and copper nanoparticles induce mitochondrial stress and promote DNA fragmentation in lung fibroblasts, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 477: 620-625.
- Lim HB & Kim SH, 2014, Inhalation of e-Cigarette Cartridge Solution Aggravates Allergen-induced Airway Inflammation and Hyper-responsiveness in Mice, *Toxicological Research*, 30: 13-18.
- Lindner R, 2019, Frankfurter Allgemeine: Trump sagt E-Zigaretten den Kampf an, (<https://www.faz.net/aktuell/wirtschaft/trump-sagt-e-zigaretten-den-kampf-an-16380353.html>, zuletzt geprüft am 28.03.2020).
- Lodish H, Berk A, Kaiser CA, Krieger M, Bretscher A, Ploegh H, Amon A & Martin KC, 2016, Cancer, in *Molecular Cell Biology*, 8. Auflage (W.H. Freeman and Company), S. 1136-1140.
- Lohs K, Elstner P & Stephan U, 2009, in *Fachlexikon Toxikologie*, 4. Auflage (Springer Verlag), S. 201.
- Ludwig-Mayerhofer W, 2012, Ilmes: Säulendiagramm, ([http://wlm.userweb.mwn.de/Ilmes/ilm\\_s31.htm](http://wlm.userweb.mwn.de/Ilmes/ilm_s31.htm), zuletzt geprüft am 28.03.2020).
- Lüllmann-Rauch R & Paulsen F, 2012, Zellkern, Zellyklus, Zellumsatz, Zelltod, in *Taschenlehrbuch Histologie*, 4. Auflage (Georg Thieme Verlag), S. 90-92.
- Maluf SW, Passos DF, Bacelar A, Speit G & Erdtmann B, 2001, Assessment of DNA damage in lymphocytes of workers exposed to X-radiation using the micronucleus test and the comet assay., *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 38: 311-315.
- McNeill A, Brose LS, Calder R, Hitchman SC, Hajek P & McRobbie H, 2015, Public Health England: *E-cigarettes: an evidence update*, ([https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment\\_data/file/733022/E-cigarettes\\_an\\_evidence\\_update\\_A\\_report\\_commissioned\\_by\\_Public\\_Health\\_England\\_FINAL.pdf](https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/733022/E-cigarettes_an_evidence_update_A_report_commissioned_by_Public_Health_England_FINAL.pdf), zuletzt geprüft am 28.03.2020)

- Misra M, Leverette RD, Cooper BT, Bennett MB & Brown SE, 2014, Comparative In Vitro Toxicity Profile of Electronic and Tobacco Cigarettes, Smokeless Tobacco and Nicotine Replacement Therapy Products: E-Liquids, Extracts and Collected Aerosols, *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 11: 11325-11347.
- Montharu J, Le Guellec S, Kittel B, Rabemampianina Y, Guillemain J, Gauthier F, Diot P & de Monte M, 2010, Evaluation of lung tolerance of ethanol, propylene glycol, and sorbitan monooleate as solvents in medical aerosols, *Journal of Aerosol Medicine and Pulmonary Drug Delivery*, 23: 41-46.
- Morshed KM, Jain SK & McMartin KE, 1998, Propylene Glycol-Mediated Cell Injury in a Primary Culture of Human Proximal Tubule Cells, *Toxicological Sciences*, 46: 410-417.
- Mosman T, 1983, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays, *Journal of Immunological Methods*, 65: 55-63.
- Nicoll KJ, Rose AM, Khan MAA, Quaba O & Lowrie AG, 2016, Thigh burns from exploding e-cigarette lithium ion batteries: First case series, *Burns*, 42: 42-46.
- Oestling O & Johanson KJ, 1984, Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 123: 291-298.
- Ohzato O, Yoshizaki K, Nishimoto N, Ogata A, Tagoh H, Monden M, Gotoh M, Kishimoto M & Mori T, 1992, Interleukin-6 as a new indicator of inflammatory status: detection of serum levels of interleukin-6 and C-reactive protein after surgery, *Surgery*, 111: 201-209.
- Olive PL, Banáth JP & Durant RE, 1990, Heterogeneity in Radiation-Induced DNA Damage and Repair in Tumor and Normal Cells Measured Using the "Comet" Assay, *Radiation Research*, 122: 86-94.
- Omaiye EE, Cordova I, Davis B & Talbot P, 2017, Counterfeit Electronic Cigarette Products with Mislabeled Nicotine Concentrations, *Tobacco Regulatory Science*, 3: 347-357.
- Opensecrets, 2018, Opensecrets: Electronic Cigarettes, (<https://www.opensecrets.org/news/issues/e-cigarettes/>, zuletzt geprüft am 28.03.2020).

- Orth B & Töppich J, 2014, Bundesinstitut für gesundheitliche Aufklärung: Rauchen bei Jugendlichen und jungen Erwachsenen in Deutschland 2014, (<https://www.bzga.de/forschung/studien-untersuchungen/studien/suchtpraevention/>), zuletzt geprüft am 28.03.2020).
- Patel RT, Deen KI, Youngs D, Warwick J & Keighley MR, 1994, Interleukin 6 is a prognostic indicator of outcome in severe intra-abdominal sepsis, *British Journal of Surgery*, 81: 1306-1308.
- Pellegrino RM, Tinghino B, Mangiaracina G, Marani A, Vitali M, Protano C, Osborn JF & Cattaruzza MS, 2012, Electronic cigarettes: an evaluation of exposure to chemicals and fine particulate matter (PM). *annali di igieni: medicina di preventiva e di comunita*, 24: 279-288.
- Phillips B, Titz B, Kogel U, Sharma D, Leroy P, Xiang Y, Vuillaume G, Lebrun S, Sciuscio D, Ho J, Nury C, Guedj E, Elamin A, Esposito A, Krishnan S, Schlage WK, Veljkovic E, Ivanov NV, Martin F, Peitsch MC, Hoeng J & Vanscheeuwijk P, 2017, Toxicity of the main electronic cigarette components, propylene glycol, glycerin, and nicotine, in Sprague-Dawley rats in a 90-day OECD inhalation study complemented by molecular endpoints, *Food and Chemical Toxicology*, 109: 315-332.
- Ponec M, Haverkort M, Soei YL, Kempenaar J & Bodde H, 1990, Use of human keratinocyte and fibroblast cultures for toxicity studies of topically applied compounds., *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 79: 312-316.
- Qu Y, Kim KH & Szulejko JE, 2018, The effect of flavor content in e-liquids on e-cigarette emissions of carbonyl compounds., *Environmental Research*, 166: 324-333.
- Rao PN & Engelberg J, 1967, Structural specificity of estrogens in the induction of mitotic chromatid non-disjunction in HeLa cells, *Experimental Cell Research*, 48: 71-81.
- Rogér JM, Abayon M, Elad S & Kolokythas A, 2016, Oral Trauma and Tooth Avulsion Following Explosion of E-Cigarette, *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 74: 1181-1185.
- Romagna G, Alliffranchini E, Bocchietto E, Todeschi S, Esposito M & Farsalinos KE, 2013, Cytotoxicity evaluation of electronic cigarette vapor extract on cultured mammalian fibroblasts (ClearStream-LIFE): comparison with tobacco cigarette smoke extract, *Inhalation Toxicology*, 25: 354-361.

- Ruprecht AA, De Marco C, Pozzi P, Munarini E, Mazza R, Angellotti G, Turla F & Boffi R, 2014, Comparison between particulate matter and ultrafine particle emission by electronic and normal cigarettes in real-life conditions, *Tumori Journal*, 100: 24-27.
- Saddleson ML, Kozlowski LT, Giovino GA, Goniewicz ML, Mahoney MC, Homisha GG & Arora A, 2016, Enjoyment and other reasons for electronic cigarette use: Results from, *Addictive Behaviors*, 54: 33-39.
- Sadetzki S, Oberman B, Mandelzweig L, Chetrit A, Ben-Tal T, Jarus-Hakak A, Duvdevani S, Cardis E & Wolf M, 2008, Smoking and risk of parotid gland tumors: a nationwide case-control study, *Cancer*, 112: 1974-1982.
- Sasco AJ, Secretan MB & Straif K, 2004, Tobacco smoking and cancer: a brief review of recent epidemiological evidence, *Lung Cancer*, 45 Suppl 2: 3-9.
- Scheffler S, Dieken H, Krischenowski O, Förster C, Branscheid D & Aufderheide M, 2015, Evaluation of E-cigarette liquid vapor and mainstream cigarette smoke after direct exposure of primary human bronchial epithelial cells, *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 12: 3915-3925.
- Schiffman D & De Boni U, 1991, Dislocation of chromatin elements in prophase induced by diethylstilbestrol: a novel mechanism by which micronuclei can arise, *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 246: 113-122.
- Schmid W, 1975, The micronucleus test, *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 31: 9-15.
- Schmitz S, 2011, Zellbiologische und Routinemaßnahmen, in *Der Experimentator: Zellkultur* (Springer Verlag), S. 206-211.
- Schober W, Szendrei K, Matzen W, Osiander-Fuchs H, Heitmann D, Schettgen T, Jörres RA & Fromme H, 2014, Use of electronic cigarettes (e-cigarettes) impairs indoor air quality and increases FeNO levels of e-cigarette consumers, *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 217: 628-637.
- Schripp T, Markewitz D, Uhde E & Salthammer T, 2013, Does e-cigarette consumption cause passive vaping?, *Indoor Air*, 23: 25-31.
- Sehgal PB, 1990, Interleukin-6: Molecular Pathophysiology, *Journal of investigative Dermatology*, 94: 2-6.

- Singh NP, McCoy MT, Tice RT & Schneider EL, 1988, A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Experimental Cell Research*, 175: 184-191.
- Slomski A, 2013, E-Cigarettes Match Nicotine Patches in Smoking Quit Rates, *JAMA*, 310: 1665.
- Spector WS, 1955, Acute Toxicity, in *Handbook of Toxicology*, 1: 248-249.
- Steinsvag S, Strand M, Berg O, Miaguchi M & Olofsson J, 1991, Human respiratory mucosa in a nonadhesive stationary organ culture system., *Laryngoscope*, 101: 1323-1331.
- Stolze Y, Ostendorf N & Baume A, 2016, DocCheckFlexikon: ELISA, (<http://flexikon.doccheck.com/de/ELISA>, zuletzt geprüft am 28.03.2020).
- Stopper H, 2010, Genotoxizität und chemische Kanzerogenese, Voehr HW: *Toxikologie Band 1* (Wiley-VCH Verlag GmbH&Co.KGaA), S. 151-152.
- Strober W, 1997, Current Protocols in Immunology: Trypan blue exclusion test of cell viability, *Current Protocols in Immunology*, 21: A.3B.1-A.3B.2.
- Suber RL, Deskin R, Nikiforov I, Fouillet X & Coggins CRE, 1989, Subchronic nose-only inhalation study of propylene glycol in Sprague-Dawley rats, *Food and Chemical Toxicology*, 27: 573-583.
- Szirmai S, Bérces J & Köteles GJ, 1993, Computerized image analysis for determining micronucleus frequency, *Environ Health Perspect*, 101 Suppl 3: 57-60.
- Taylor M, Carr T, Oke O, Jaunky T, Breheny D, Lowe F & Gaça M, 2016, E-cigarette aerosols induce lower oxidative stress in vitro when compared to tobacco smoke, *Toxicology Mechanisms and Methods*, 26: 465-476.
- Testart J, Lassalle B, Belaisch-Allart J, Hazout A, Forman R, Rainhorn JD & Frydman R, 1986, High pregnancy rate after early human embryo freezing, *Fertility and Sterility*, 46: 268-272.
- Thorne D, Crooks I, Hollings M, Seymour A, Meredith C & Gaça M, 2016, The mutagenic assessment of an electronic-cigarette and reference cigarette smoke using the Ames assay in strains TA98 and TA100., *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 812: 29-38.

- Thorne D, Larard S, Baxter A, Meredith C & Gaça M, 2017, The comparative in vitro assessment of e-cigarette and cigarette smoke aerosols using the  $\gamma$ H2AX assay and applied dose measurements, *Toxicology Letters*, 265: 170-178.
- Thun MJ, Lally CA, Calle EE, Heath CW, Flannery JT & Flanders WD, 1997, Cigarette Smoking and Changes in the Histopathology of Lung Cancer, *Journal of the National Cancer Institute*, 89: 1580-1586.
- Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi A, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC & Sasaki YF, 2000, Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing., *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35: 206-221.
- Tice RR & Strauss GH, 1995, The single cell gel electrophoresis/comet assay: a potential tool for detecting radiation-induced DNA damage in humans., *Stem Cells*, 13 Suppl 1: 207-214.
- Ueda T, Shimada E & Urakawa T, 1994, Serum levels of cytokines in patients with colorectal cancer: Possible involvement of interleukin-6 and interleukin-8 in hematogenous metastasis, *Journal of Gastroenterology*, 29: 423-429.
- Uryupin AB, Peregudov AS, Kochetkov KA, Bulatnikova LN, Kiselev SS & Nekrasov YS, 2013, Qualitative and quantitative compositions of fluids for electronic cigarettes, *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 46: 687-692.
- Vardavas CI, Anagnostopoulos N, Kougias M, Evangelopoulou V, Connolly GN & Behrakis PK, 2012, Short-term pulmonary effects of using an electronic cigarette: impact on respiratory flow resistance, impedance, and exhaled nitric oxide., *Chest*, 141: 1400-1406.
- Varughese S, Teschke K, Brauer M, Chow Y, van Netten C & Kennedy SM, 2005, Effects of theatrical smokes and fogs on respiratory health in the entertainment industry, *American Journal of Industrial Medicine*, 47: 411-418.
- Verband des E-Zigarettenhandels, 2017, Verband des E-Zigarettenhandels: Faktenreport 2017, (<http://www.vd-eh.de/daten-fakten-zur-e-zigarette-grundlagen-der-e-zigarette/>, zuletzt geprüft am 28.03.2020).
- Verbraucher Initiative e.V., 2013, Zusatzstoffe-online.de: Propylenglycol, ([http://www.zusatzstoffe-online.de/zusatzstoffe/316.e1520\\_propylenglycol.html](http://www.zusatzstoffe-online.de/zusatzstoffe/316.e1520_propylenglycol.html), zuletzt geprüft am 28.03.2020).

- Vetter A, Augustijns P & Bernkop-Schnürch A, 2012, Solubilizing agents in nasal formulations and their effect on ciliary beat frequency., *Toxicology in Vitro*, 26: 150-156.
- Victor A, Elsässer A, Hommel G & Blettner M, 2010, Judging a Plethora of p-Values, *Deutsche Ärzteblatt*, 107: 50-56.
- Wallner BC, Harréus UA, Gamarra F, Sassen A & Kleinsasser NH, 2005, Miniorgankulturen humaner nasaler Mukosa, *HNO*, 53: 1037-1046.
- Wang Q, Ping P, Zhao X, Chu G, Sun J & Chen C, 2012, Thermal runaway caused fire and explosion of lithium ion battery, *Journal of Power Sources*, 208: 210-224.
- Warshaw TG & Hermann F, 1952, Studies of Skin Reactions to Propylene Glycol, *Journal of investigative Dermatology*, 19: 423-430.
- Welz C, Canis M, Schwenk-Zieger S, Becker S, Stucke V, Ihler F & Baumeister P, 2016, Cytotoxic and Genotoxic Effects of Electronic Cigarette Liquids on Human Mucosal Tissue Cultures of the Oropharynx, *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*, 35: 343-354.
- Werley MS, Kirkpatrick DJ, Oldham MJ, Jerome AM, Langston TB, Lilly PD, Smith DC & McKinney Jr. WJ, 2016, Toxicological assessment of a prototype e-cigarette device and three flavor formulations: a 90-day inhalation study in rats, *Inhalation Toxicology*, 28: 22-38.
- Werley MS, McDonald P, Lilly P, Kirkpatrick D, Wallery J, Byron P & Venitz J, 2011, Non-clinical safety and pharmacokinetic evaluations of propylene glycol aerosol in Sprague-Dawley rats and Beagle dogs, *Toxicology*, 287: 76-90.
- WHO, 2014, WHO: Backgrounder on WHO report on regulation of e-cigarettes and similar products, (<http://www.who.int/nmh/events/2014/backgrounder-e-cigarettes/en/>, zuletzt geprüft am 28.03.2020).
- Wieslander G, Norback D & Lindgren T, 2001, Experimental exposure to propylene glycol mist in aviation emergency training: acute ocular and respiratory effects, *Occupational & Environmental Medicine*, 58: 649-655.
- Wiesmann M, 2007, Ashland und Cargill bilden Joint Venture, (<https://www.process.vogel.de/ashland-und-cargill-bilden-joint-venture-a-65987/>, zuletzt geprüft am 28.03.2020).

- Wilcoxon F, 1945, Individual Comparisons by Ranking Methods, *Biometrics Bulletin*, 1: 80-83.
- Williams M & Talbot P, 2011, Variability Among Electronic Cigarettes in the Pressure Drop, Airflow Rate, and Aerosol Production, *Nicotine & Tobacco Research*, 13: 1276-1283.
- Williams M, Villarreal A, Bozhilov K, Lin S & Talbot P, 2013, Plos One: Metal and silicate particles including nanoparticles are present in electronic cigarette cartomizer fluid and aerosol., (<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0057987>, zuletzt geprüft am 28.03.2020).
- Willis CM, Stephens JM & Wilkinson JD, 1988, Experimentally-induced irritant contact dermatitis. Determination of optimum irritant concentrations, *Contact Dermatitis*, 18: 20-24.
- Woodroffe MN, Sarna GS, Wadhwa M, Hayes GM, Loughlin AJ, Tinker A & Cuzner ML, 1991, Detection of interleukin-1 and interleukin-6 in adult rat brain, following mechanical injury, by in vivo microdialysis: evidence of a role for microglia in cytokine production, *Journal of Neuroimmunology*, 33: 227-236.
- Yaucher NE, Fish JT, Smith HW & Wells JA, 2012, Propylene Glycol-Associated Renal Toxicity from Lorazepam Infusion, *Pharmacotherapy*, 23: 1094-1099.
- Yu V, Rahimy M, Korrapati A, Xuan Y, Zou AE, Krishnan AR, Tsui T, Aguilera JA, Advani S, Crotty Alexander LE, Brumund KT, Wang-Rodriguez J & Ongkeko WM, 2016, Electronic cigarettes induce DNA strand breaks and cell death independently of nicotine in cell lines, *Oral Oncology*, 52: 58-65.
- Zar T, Graeber C & Perazella MA, 2007, Reviews: Recognition, Treatment, and Prevention of Propylene Glycol Toxicity, *Seminars in Dialysis*, 20: 217-219.

## 6.2 Abbildungsnachweis

Alle Abbildungen, Tabellen und Grafiken wurden selbst erstellt.

## 6.3 Tabellarische Einzelergebnisse

### 6.3.1 MTT-Test

*Tabelle 11: Darstellung der Einzelergebnisse im MTT-Test in Prozent nach Flüssigkeitsexposition; Neg. K. Aqua: Negativkontrolle mit Aqua injectabilia; Pos. K: Positivkontrolle; SD: Standardabweichung*

Patient	Neg. K. Aqua	0,5 mol/l	1 mol/l	1,5 mol/l	2 mol/l	2,5 mol/l
1	100	100	89,94	70,84	74,06	57,11
2	100	101,97	95,72	74,24	61,31	78,49
3	100	99,92	93,57	76,48	67,94	65,13

<b>Median</b>	100	100	93,57	74,24	67,94	65,13
<b>Mittelwert</b>	100	100,63	93,08	73,85	67,77	66,91
<b>SD</b>	0	1,16	2,92	2,84	6,38	10,80

Patient	3 mol/L	3,5 mol/l	4 mol/l	4,5 mol/l	5 mol/l	Pos. K.
1	52,35	56,65	50,62	30,36	16,78	27,87
2	75,84	70,28	51,84	45,06	18,91	34,63
3	66,84	63,72	54,27	36,87	20,35	31,73

<b>Median</b>	66,84	63,72	51,84	36,87	18,91	31,73
<b>Mittelwert</b>	65,01	63,55	52,24333	37,43	18,68	31,41
<b>SD</b>	11,851443	6,81659	1,858126	7,365983	1,796079	3,391342

*Tabelle 12: Darstellung der Einzelergebnisse im MTT-Test in Prozent nach Dampfexposition; Neg. K. Aqua: Negativkontrolle mit Aqua injectabilia; Pos. K: Positivkontrolle; SD: Standardabweichung*

Patient	Neg. K. Aqua	5 mol/l	10 mol/l	Reinstoff	Pos. K.
1	100	108,98	89,27	96,15	59,66
2	100	88,48	87,73	91,05	55,72
3	100	95,31	85,89	88,57	49,39

<b>Median</b>	100	95,31	87,73	91,05	55,72
<b>Mittelwert</b>	100	97,59	87,63	91,92	54,92
<b>SD</b>	0	10,44	1,70	3,86	5,18

6.3.2 Comet Assay

Tabelle 13: Darstellung der Einzelergebnisse des Comet Assays; Neg. K. CO<sub>2</sub>: Negativkontrolle im Brutschrank; Neg. K. Aqua: Negativkontrolle mit Aqua injectabilia; Pos. K.: Positivkontrolle; T-L: Tail Length; OT-M: Olive Tailmoment; T-DNA: Tail-DNA; SD: Standardabweichung

Patient	Neg. K. CO <sub>2</sub>			Neg. K. Aqua			1 mol/l		
	T-L	OT-M	T-DNA	T-L	OT-M	T-DNA	T-L	OT-M	T-DNA
1	1,60	0,95	2,59	35,1	0,77	3,27	39,8	1,12	2,98
2	34,74	0,48	1,72	39,42	0,93	2,99	42,57	1,44	3,47
3	36,05	0,97	2,70	39,07	0,84	2,58	41,27	1,16	2,86
4	32,73	0,67	2,51	34,85	0,62	2,40	34,69	0,83	2,96
5	28,30	0,48	2,17	27,96	0,82	3,00	27,82	0,59	2,62
6	27,18	0,32	1,67	30,28	0,56	2,54	33,78	0,77	2,99
7	28,78	0,49	2,03	29,05	0,43	1,91	31,38	0,71	3,04
8	28,96	0,55	2,32	31,53	0,76	2,90	30,28	0,53	2,19
9	30,84	0,68	2,36	28,32	0,35	1,56	32,52	0,79	2,84
10	29,41	0,40	1,68	32,73	0,50	1,86	34,39	0,86	2,90

Median	30,13	0,52	2,24	32,13	0,69	2,56	34,09	0,81	2,93
Mittelwert	31,13	0,60	2,17	32,83	0,66	2,50	34,85	0,88	2,88
SD	3,10	0,22	0,39	4,19	0,19	0,57	4,88	0,28	0,32

Patient	10 mol/l			Reinstoff			Pos. K.		
	T-L	OT-M	T-DNA	T-L	OT-M	T-DNA	T-L	OT-M	T-DNA
1	37,3	1,54	3,69	40,42	1,33	3,41	78,8	5,89	15,73
2	40,8	0,92	2,405	40,76	1,68	4,10	84,64	6,68	15,77
3	47,38	2,10	5,57	49,41	1,25	2,89	59,03	3,52	10,57
4	36,95	0,73	2,96	39,76	0,93	3,26	82,46	5,98	15,99
5	31,75	1,16	3,96	35,82	1,41	4,84	72,71	7,18	19,97
6	37,47	1,59	5,15	33,61	1,01	3,55	75,65	5,82	14,35
7	33,93	1,22	4,38	33,86	1,32	4,53	65,67	4,35	11,58
8	30,47	0,67	2,91	32,48	1,10	3,76	73,08	6,22	13,60
9	32,23	0,64	2,81	37,41	1,13	3,89	61,12	3,86	11,71
10	34,85	0,63	2,10	35,96	0,80	2,77	61,59	3,68	9,98

Median	35,90	1,04	3,33	36,69	1,19	3,66	72,90	5,86	13,98
Mittelwert	36,31	1,12	3,59	37,95	1,19	3,70	71,5	5,32	13,93
SD	5,00	0,50	1,16	4,98	0,26	0,67	9,21	1,34	3,07

6.3.3 Mikrokerntest

Tabelle 14: Darstellung der Einzelergebnisse des Mikrokerntests in absoluten Zahlen; Neg. K. CO<sub>2</sub>: Negativkontrolle im Brutschrank; Neg. K. Aqua: Negativkontrolle mit Aqua injectabilia; Pos. K.: Positivkontrolle; 1-k: Einkernige Zellen; 2-k: Doppelkernige Zellen; M-k: Mehrkernige Zelle; Mikrok: Mikrokerne; SD: Standardabweichung

Patient	Neg. K. CO <sub>2</sub>				Neg. K. Aqua				1 mol/l			
	1-K	2-K	M-K	MikroK	1-K	2-K	M-K	MikroK	1-K	2-K	M-K	MikroK
1	739	243	7	3	760	194	19	2	738	223	16	2
2	642	310	29	3	706	277	4	3	681	294	7	2
3	665	325	5	2	693	289	8	2	697	289	4	4
4	666	328	3	3	675	317	4	3	711	277	6	4
5	703	267	14	5	699	276	5	5	757	223	2	7
6	771	214	3	5	756	229	4	6	753	235	4	8
7	829	155	2	6	708	270	2	5	774	195	7	5
8	698	287	3	5	648	331	2	6	673	298	16	6
9	746	235	2	5	747	237	1	5	764	205	5	6
10	739	246	2	4	717	259	3	7	730	249	5	5

Median	721	256,5	3	4,5	707	273	4	5	734	242	5,5	5
Mittelwert	719,8	261	7	4,1	710,9	267,9	5,2	4,4	727,8	248,8	7,2	4,9
SD	56,45	54,13	8,56	1,29	35,78	40,82	5,22	1,78	35,69	38,31	4,87	1,97

Patient	10 mol/l				Reinstoff				Pos. K.			
	1-K	2-K	M-K	MikroK	1-K	2-K	M-K	MikroK	1-K	2-K	M-K	MikroK
1	743	228	15	4	775	199	9	3	675	283	21	11
2	668	311	9	3	639	340	4	4	635	345	7	23
3	682	296	9	4	700	286	6	5	626	357	5	20
4	645	330	7	5	723	256	9	6	622	360	5	21
5	819	157	5	9	724	250	7	8	740	241	2	31
6	747	237	5	7	717	257	5	6	681	305	4	23
7	801	172	1	6	732	252	3	6	721	264	3	24
8	797	183	3	6	763	223	1	8	718	266	3	24
9	749	226	0	7	708	274	5	6	736	249	4	22
10	754	235	3	6	808	177	3	8	684	302	3	23

Median	748	231,5	5	6	723,5	254	5	6	682,5	292,5	4	23
Mittelwert	740,5	237,5	5,7	5,7	728,9	251,4	5,2	6	683,8	297,2	5,7	22,2
SD	58,8	59,02	4,47	1,77	46,08	45,58	2,62	1,70	44,80	44,28	5,56	4,92

ANHANG

Tabelle 15: Darstellung der Einzelergebnisse des Mikrokerntests in absoluten Zahlen; Neg. K. CO<sub>2</sub>: Negativkontrolle im Brutschrank; Neg. K. Aqua: Negativkontrolle mit Aqua injectabilia; Pos. K.: Positivkontrolle; Nek.: Nekrose; Ap.: Apoptose; Mit.: Mitose; SD: Standardabweichung

Patient	Neg. K. CO <sub>2</sub>			Neg. K. Aqua			1 mol/l		
	Nek.	Ap.	Mit.	Nek.	Ap.	Mit.	Nek.	Ap.	Mit.
1	2	7	2	7	17	3	9	13	1
2	5	11	3	3	8	2	8	8	2
3	1	4	0	3	6	1	3	6	1
4	2	1	0	1	2	1	2	2	2
5	6	9	1	6	13	1	5	12	1
6	5	6	1	3	7	1	2	5	1
7	4	7	3	4	15	1	7	16	1
8	5	6	1	4	13	2	2	7	4
9	4	11	2	5	10	0	7	17	2
10	3	9	1	4	15	2	5	10	1

Median	4	7	1	4	11,5	1	5	9	1
Mittelwert	3,7	7,1	1,4	4	10,6	1,4	5	9,6	1,6
SD	1,64	3,11	1,08	1,7	4,79	0,84	2,67	4,88	0,97

Patient	10 mol/l			Reinstoff			Pos. K.		
	Nek.	Ap.	Mit.	Nek.	Ap.	Mit.	Nek.	Ap.	Mit.
1	4	9	1	4	11	2	6	12	3
2	4	8	0	4	11	2	2	8	1
3	5	7	1	2	6	0	7	5	0
4	9	6	3	5	5	2	7	4	2
5	7	12	0	5	13	1	5	10	2
6	3	8	0	9	10	2	1	9	0
7	5	19	2	3	10	0	4	8	0
8	3	14	0	3	10	0	3	10	0
9	6	19	0	3	9	1	3	7	1
10	2	6	0	1	9	2	4	7	0

Median	4,5	8,5	0	3,5	10	1,5	4	8	0,5
Mittelwert	4,8	10,8	0,7	3,9	9,4	1,2	4,2	8	0,9
SD	2,1	5,01	1,06	2,18	2,37	0,92	2,04	2,40	1,10

### 6.3.4 Trypanblau Test

Tabelle 16: Darstellung der Einzelergebnisse des Trypanblau Tests; Vitalität in Prozent angegeben; Neg. K. CO<sub>2</sub>: Negativkontrolle im Brutschrank; Neg. K. Aqua: Negativkontrolle mit Aqua injectabilia; Pos. K.: Positivkontrolle des Comet Assays; SD: Standardabweichung

Patient	Neg. K. CO <sub>2</sub>	Neg. K. Aqua	1 mol/l	10 mol/l	Reinstoff	Pos. K.
1	93,19	81,19	93,20	91,80	88,09	85,14
2	91,67	90,28	86,24	89,13	86,67	91,15
3	81,29	90,53	82,35	81,82	83,67	81,76
4	90,65	89,91	80,65	86,67	86,55	83,43
5	81,47	82,37	80,81	85,77	82,16	81,63
6	83,90	87,08	86,19	84,65	88,13	82,32
7	86,90	93,46	83,05	88,10	95,71	87,27
8	81,93	88,70	88,96	86,27	87,13	82,61
9	85,53	86,79	88,70	87,42	83,65	86,41
10	85,68	87,71	86,22	86,25	88,33	94,27
<b>Median</b>	85,61	88,21	86,21	86,47	86,90	84,29
<b>Mittelwert</b>	86,22	87,80	85,64	86,79	87,01	85,60
<b>SD</b>	4,34	3,74	4,00	2,66	3,74	4,28

### 6.3.5 Sandwich-ELISA

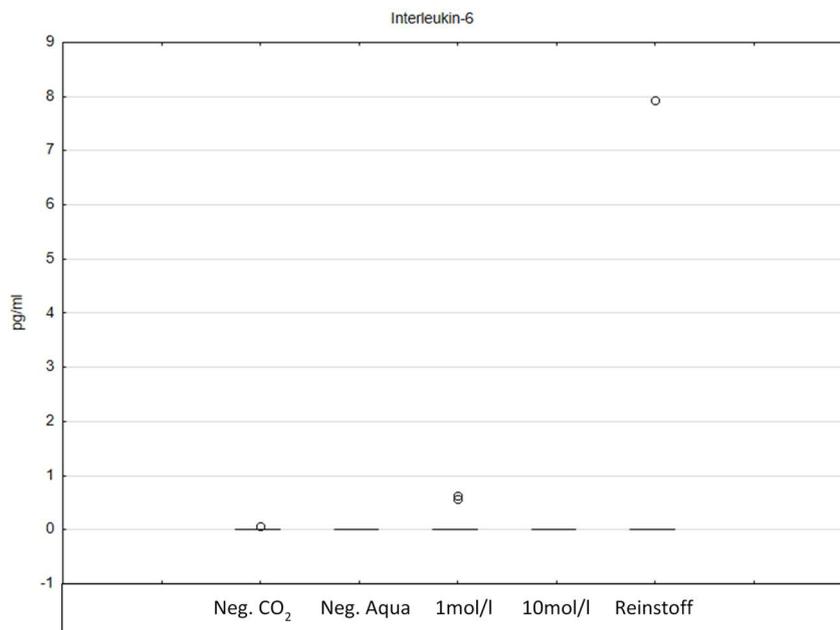


Abbildung 19: Darstellung der Interleukin-6-Konzentration in pg/ml; die Positivkontrolle mit einem Median von 3,91 pg/ml ist hier nicht abgebildet

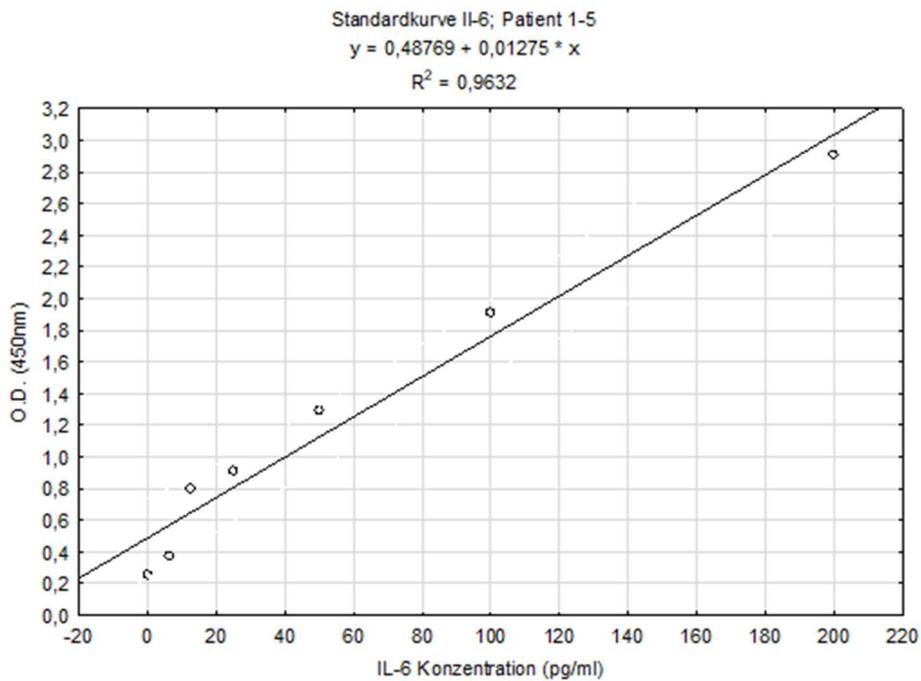


Abbildung 20: Darstellung der gemessenen Interleukin-6-Konzentrationen (°) in pg/ml und die daraus errechneten Standardkurven; jeweils errechnet für die Patienten 1-5;  $R^2$ : Bestimmtheitsmaß; O. D.: optische Dichte bei 450 nm gemessen

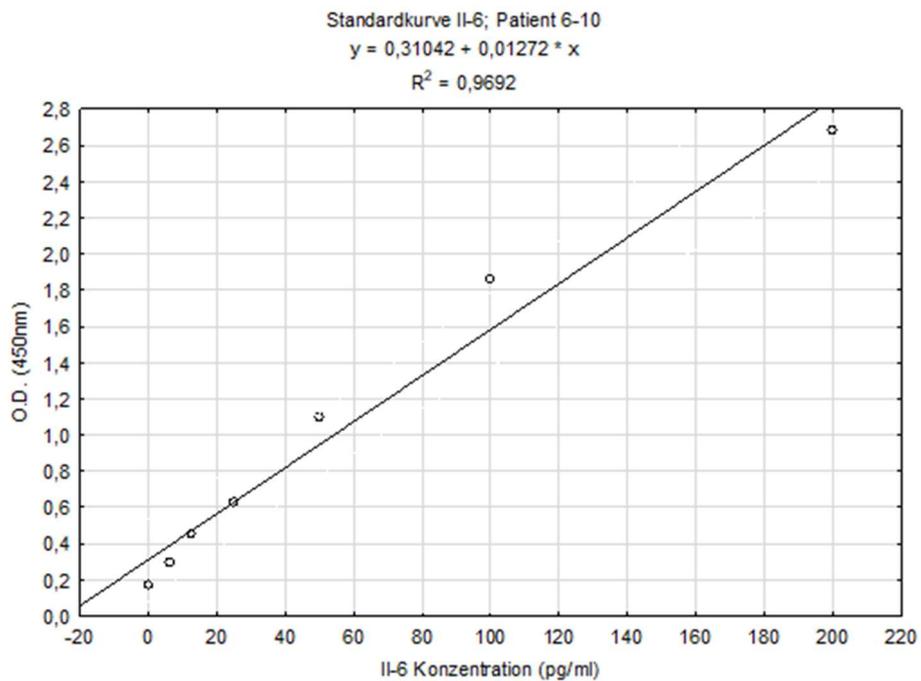


Abbildung 21: Darstellung der gemessenen Interleukin-6-Konzentrationen (°) in pg/ml und die daraus errechneten Standardkurven; jeweils errechnet für die Patienten 6 - 10;  $R^2$ : Bestimmtheitsmaß; O. D.: optische Dichte bei 450 nm gemessen

Tabelle 17: Darstellung der Einzelergebnisse der Interleukin-6 Konzentrationen in pg/ml; Neg. K. CO<sub>2</sub>: Negativkontrolle im Brutschrank; Neg. K. Aqua: Negativkontrolle mit Aqua injectabilia; Pos. K.: Positivkontrolle; SD: Standardabweichung

IL-6 Patient	Neg. K. CO <sub>2</sub> pg/ml	Neg. K. Aqua pg/ml	1 mol/l pg/ml	10 mol/l pg/ml	Reinstoff pg/ml	Pos. K. pg/ml
1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	5,50
2	0,00	0,00	0,58	0,00	8,06	4,31
3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,62
4	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00	1,13
5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,78
6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	4,85
7	0,00	0,00	0,64	0,00	0,00	1,23
8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	4,46
9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,51
10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	6,35

Median	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,91
Mittelwert	0,01	0,00	0,12	0,00	0,81	3,67
SD	0,02	0,00	0,26	0,00	2,55	1,74

Tabelle 18: Darstellung der Einzelergebnisse der optischen Dichte bei 450 nm und der daraus, mittels linearer Regression errechneten Interleukin-6-Konzentration in pg/ml; Neg. K. CO<sub>2</sub>: Negativkontrolle im Brutschrank; Neg. K. Aqua: Negativkontrolle mit Aqua injectabilia; Pos. K.: Positivkontrolle; SD: Standardabweichung

Patient	Neg. K. CO <sub>2</sub>				Neg. K. Aqua			
	Einzelwert		Mittelwert	pg/ml	Einzelwert		Mittelwert	pg/ml
1	0,302	0,309	0,3055	0	0,282	0,526	0,404	0
2	0,295	0,295	0,295	0	0,439	0,281	0,36	0
3	0,3	0,326	0,313	0	0,722	0,205	0,4635	0
4	0,46	0,517	0,4885	0,06	0,38	0,448	0,414	0
5	0,284	0,159	0,2215	0	0,315	0,132	0,2235	0
6	0,165	0,129	0,147	0	0,09	0,147	0,1185	0
7	0,295	0,172	0,2335	0	0,218	0,227	0,2225	0
8	0,161	0,15	0,1555	0	0,102	0,124	0,113	0
9	0,176	0,117	0,1465	0	0,097	0,117	0,107	0
10	0,128	0,156	0,142	0	0,115	0,111	0,113	0

Patient	1 mol/l				10 mol/l			
	Einzelwert		Mittelwert	pg/ml	Einzelwert		Mittelwert	pg/ml
1	0,323	0,377	0,35	0	0,572	0,33	0,451	0
2	0,517	0,473	0,495	0,58	0,262	0,366	0,314	0
3	0,289	0,296	0,2925	0	0,302	0,178	0,24	0
4	0,356	0,436	0,396	0	0,204	0,189	0,1965	0
5	0,146	0,125	0,1355	0	0,193	0,158	0,1755	0
6	0,122	0,116	0,119	0	0,116	0,138	0,127	0
7	0,279	0,358	0,3185	0,64	0,215	0,2	0,2075	0
8	0,116	0,106	0,111	0	0,191	0,06	0,1255	0
9	0,103	0,118	0,1105	0	0,101	0,098	0,0995	0
10	0,099	0,115	0,107	0	0,13	0,181	0,1555	0

Patient	Reinstoff				Pos. K.			
	Einzelwert		Mittelwert	pg/ml	Einzelwert		Mittelwert	pg/ml
1	0,428	0,464	0,446	0	0,508	0,607	0,5575	5,58
2	0,305	0,872	0,5885	8,06	0,503	0,582	0,5425	4,38
3	0,276	0,249	0,2625	0	0,594	0,448	0,521	2,66
4	0,182	0,232	0,207	0	0,48	0,524	0,502	1,14
5	0,184	0,152	0,168	0	0,541	0,505	0,523	2,82
6	0,103	0,093	0,098	0	0,325	0,419	0,372	4,84
7	0,266	0,183	0,2245	0	0,374	0,278	0,326	1,22
8	0,122	0,071	0,0965	0	0,349	0,385	0,367	4,45
9	0,076	0,084	0,08	0	0,331	0,379	0,355	3,50
10	0,082	0,098	0,09	0	0,347	0,435	0,391	6,33

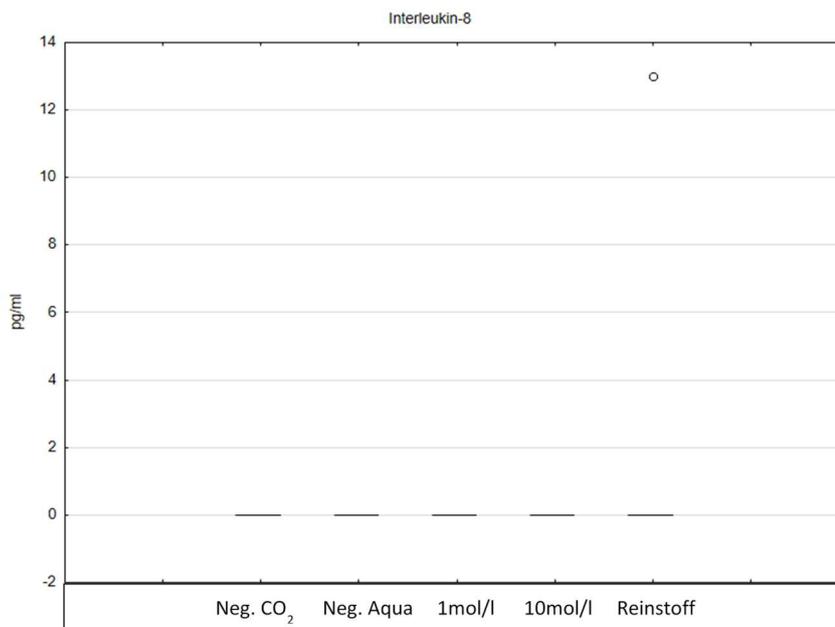


Abbildung 22: Darstellung der Interleukin-8-Konzentration in pg/ml; die Positivkontrolle mit einem Median von 11,68 pg/ml ist hier nicht abgebildet

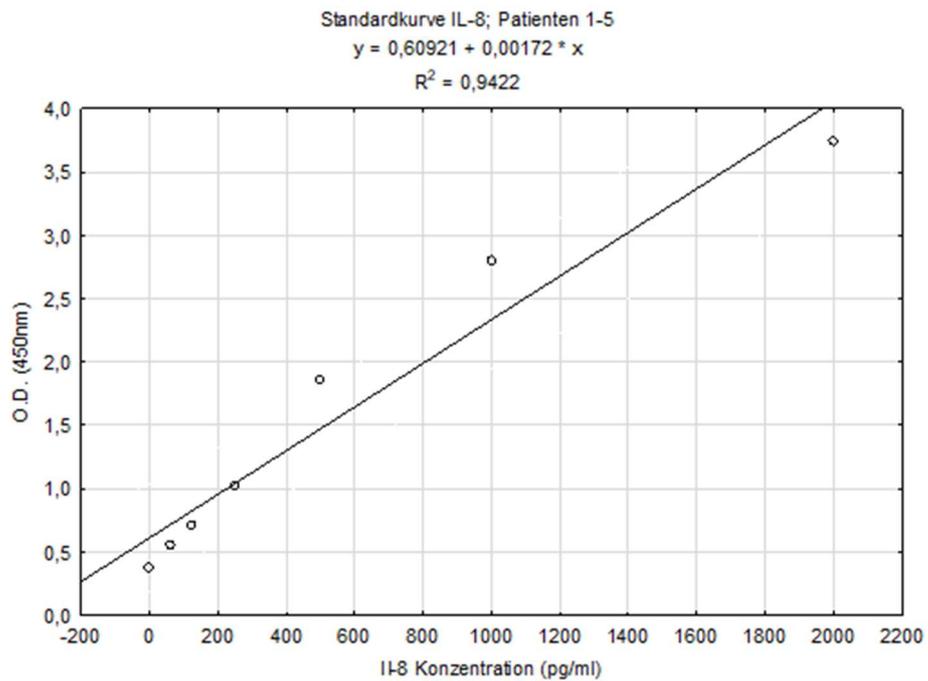


Abbildung 23: Darstellung der gemessenen Interleukin-8-Konzentrationen (°) in pg/ml und die daraus errechneten Standardkurven; jeweils errechnet für die Patienten 1-5;  $R^2$ : Bestimmtheitsmaß; O. D.: optische Dichte bei 450 nm gemessen

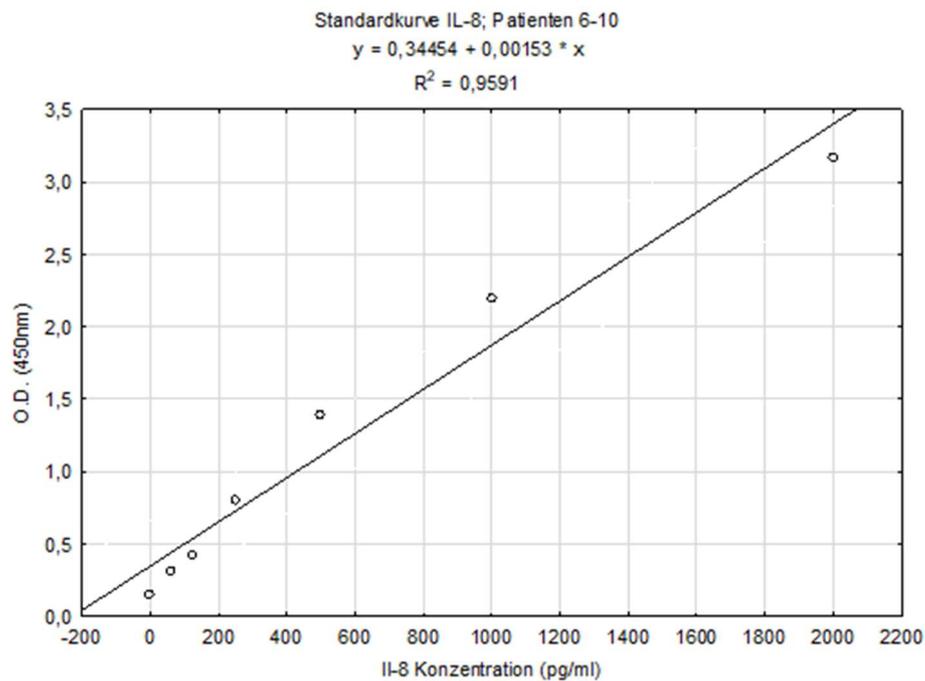


Abbildung 24: Darstellung der gemessenen Interleukin-8-Konzentrationen (°) in pg/ml und die daraus errechneten Standardkurven; jeweils errechnet für die Patienten 6-10;  $R^2$ : Bestimmtheitsmaß; O. D.: optische Dichte bei 450 nm gemessen

Tabelle 19: Einzelergebnisse der Interleukin-8-Konzentration in pg/ml; Neg. K. CO<sub>2</sub>: Negativkontrolle im Brutschrank; Neg. K. Aqua: Negativkontrolle mit Aqua injectabilia; Pos. K.: Positivkontrolle; SD: Standardabweichung

IL-8 Patient	Neg. K. CO <sub>2</sub> pg/ml	Neg. K. Aqua pg/ml	1 mol/l pg/ml	10 mol/l pg/ml	Reinstoff pg/ml	Pos. K. pg/ml
1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	11,35
2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	21,35
3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	7,82
4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	24,59
5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	7,24
6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	12,00
7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	4,67
8	0,00	0,00	0,00	0,00	12,72	15,67
9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	14,33
10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	9,33

Median	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	11,68
Mittelwert	0,00	0,00	0,00	0,00	1,27	12,84
SD	0,00	0,00	0,00	0,00	4,02	6,32

Tabelle 20: Darstellung der Einzelergebnisse der optischen Dichte bei 450 nm und der daraus, mittels linearer Regression errechneten Interleukin-8-Konzentration in pg/ml; Neg. K. CO<sub>2</sub>: Negativkontrolle im Brutschrank; Neg. K. Aqua: Negativkontrolle mit Aqua injectabilia; Pos. K.: Positivkontrolle; SD: Standardabweichung

Patient	Neg. K. CO <sub>2</sub>				Neg. K. Aqua			
	Einzelwert		Mittelwert	pg/ml	Einzelwert		Mittelwert	pg/ml
1	0,373	0,359	0,366	0	0,397	0,382	0,3895	0
2	0,44	0,387	0,4135	0	0,412	0,381	0,3965	0
3	0,35	0,365	0,3575	0	0,408	0,402	0,405	0
4	0,388	0,361	0,3745	0	0,367	0,314	0,3405	0
5	0,359	0,379	0,369	0	0,339	0,303	0,321	0
6	0,148	0,219	0,1835	0	0,165	0,168	0,1665	0
7	0,203	0,324	0,2635	0	0,189	0,247	0,218	0
8	0,299	0,239	0,269	0	0,244	0,228	0,236	0
9	0,229	0,161	0,195	0	0,253	0,286	0,2695	0
10	0,297	0,169	0,233	0	0,328	0,208	0,268	0

Patient	1 mol/L				10 mol/L			
	Einzelwert		Mittelwert	pg/ml	Einzelwert		Mittelwert	pg/ml
1	0,352	0,324	0,338	0	0,452	0,421	0,4365	0
2	0,324	0,394	0,359	0	0,468	0,431	0,4495	0
3	0,337	0,338	0,3375	0	0,356	0,379	0,3675	0
4	0,342	0,358	0,35	0	0,377	0,384	0,3805	0
5	0,35	0,358	0,354	0	0,342	0,366	0,354	0
6	0,221	0,249	0,235	0	0,166	0,213	0,1895	0
7	0,216	0,407	0,3115	0	0,187	0,436	0,3115	0
8	0,196	0,19	0,193	0	0,226	0,438	0,332	0
9	0,184	0,214	0,199	0	0,359	0,184	0,2715	0
10	0,393	0,148	0,2705	0	0,226	0,266	0,246	0

Patient	Reinstoff				Pos.K.			
	Einzelwert		Mittelwert	pg/ml	Einzelwert		Mittelwert	pg/ml
1	0,353	0,453	0,403	0	0,578	0,679	0,6285	11,22
2	0,431	0,397	0,414	0	0,668	0,623	0,6455	21,10
3	0,369	0,37	0,3695	0	0,554	0,691	0,6225	7,73
4	0,358	0,429	0,3935	0	0,608	0,694	0,651	24,30
5	0,353	0,331	0,342	0	0,693	0,55	0,6215	7,15
6	0,121	0,197	0,159	0	0,392	0,333	0,3625	11,74
7	0,227	0,29	0,2585	0	0,221	0,482	0,3515	4,55
8	0,295	0,433	0,364	12,72	0,342	0,394	0,368	15,33
9	0,26	0,243	0,2515	0	0,394	0,338	0,366	14,03
10	0,22	0,148	0,184	0	0,374	0,343	0,3585	9,12

6.3.6 Ausschluss eines Schadens durch den Versuchsaufbau

Tabelle 21: Darstellung der p-Werte für die einzelnen Untersuchungsmethoden zum Ausschluss eines Schadens durch den Versuchsaufbau selbst. Dabei wurde die jeweilige Negativkontrolle Aqua mit der Negativkontrolle CO<sub>2</sub> verglichen.

	Comet Assay	Mikrokerntest	Vitalität
p-Wert	0,44458	0,50018	0,20262

## **Publikation**

Folgende Publikation wurde am 09.04.2020 in der Zeitschrift *HNO* eingereicht und befindet sich aktuell im Review-Prozess:

Wiest F, Scherzad A, Ickrath P, Poier N, Hackenberg S & Norbert Kleinsasser N,  
Untersuchungen zum Schädigungspotential durch den Konsum von E-Zigaretten: In vitro-Exposition von humanen Nasenschleimhautzellen mit Propylenglykol im Air Liquid Interface

## **Danksagung**

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Rudolf Hagen für die Ermöglichung dieser Promotionsarbeit in der HNO-Klinik der Universität Würzburg.

Vielen Dank auch an meinen Doktorvater Herrn Prof. Kleinsasser für die interessante Themenstellung und Beratung.

Herzlichen Dank an Herrn PD Hackenberg für die gute Betreuung und das „offene Ohr“ für Fragen jeglicher Art während der Promotionsarbeit.

Vielen Dank an das Laborteam von Frau Joa, insbesondere an Herrn Kessler und Frau Scheurich für die Einarbeitung in die Zellkultur und dauerhafte Unterstützung im Labor.

Ein besonderer Dank gilt Frau Malsch und dem Epidemiologischen Institut Würzburg für die statistische Beratung.

Den Probanden danke ich für die Teilnahme an diesem Forschungsvorhaben.

Meiner Familie und Freunden für die Unterstützung und Ermutigungen. Insbesondere Johanna für die engelsgleiche Geduld und stetige Motivation.

## **Lebenslauf**

### *Persönliche Angaben*

Name	Felix Wiest
Geburtstag	14.03.1992
Geburtsort	München

### *Schulische Ausbildung*

1998 bis 2002	Grundschule Nord in Fürstenfeldbruck
2002 bis 2011	Viscardi-Gymnasium in Fürstenfeldbruck
Mai 2011	Allgemeine Hochschulreife

### *Studium*

2012-2019	Studium der Humanmedizin an der Universität Würzburg
Juni 2019	Approbation als Arzt