



Sezione di Biochimica Medica

REPORT

**“TEST DI CITOSSICITÀ *IN VITRO* SU CELLULE DI EPITELIO BRONCHIALE UMANO
DI CAMPIONI DI LIQUIDI PER SIGARETTA ELETTRONICA”**

CONDIZIONI Sperimentali

I campioni di liquido di sigaretta elettronica (di seguito definito “e-liquid”) testati presso i nostri laboratori erano i seguenti:

1. “Red Bacco” No. 19 contenente 15 mg/ml di nicotina,
2. “Dolce Bacco” No. 20 contenente 15 mg/ml di nicotina,
3. “Deciso” No. 22 contenente 15 mg/ml di nicotina e
4. “Otello” No. 23 contenente 15 mg/ml di nicotina,

prodotti e commercializzati dalla Dreamods Srl. Gli e-liquids sono stati testati mediante una sigaretta elettronica Aspire Zelos, che monta un atomizzatore molto diffuso quale il “Nautilus 2”, tarato con differenti impostazioni, come di seguito specificato. Ogni e-liquid è stato vaporizzato alle seguenti condizioni:

- A. Coil da 1,6 Ohm, 10 Watt di potenza



Sezione di Biochimica Medica

B. Coil da 0,7 Ohm, 18 Watt di potenza

Tali condizioni di utilizzo sono state adoperate per tutti e 4 gli e-liquid, procedendo inizialmente con una valutazione “cell-free” della produzione di specie reattive dell’ossigeno facendo gorgogliare il vapore prodotto da essi, alle 2 condizioni specificate (“A” e “B”) in terreno di coltura DMEM, FBS-free, con diclorodiidro fluoresceina diacetato e la sua fluorescenza è stata misurata al fluorimetro calcolando la quantità di equivalenti di H₂O₂ formati rispetto ad una curva standard. Questo esperimento è stato condotto per diversi tempi e numeri di puffate e confrontato a esposizioni del terreno ad aria (puff di aria gorgogliata nel medium). E’ stato inoltre utilizzato come riferimento di confronto una sigaretta a tabacco sperimentale standard (1R6F, Kentucky University) ed una a tabacco riscaldato (IQOS). Le stesse condizioni sono state utilizzate per studiare la citotossicità prodotta in un periodo di 72h dai vapori degli stessi e-liquid ottenuti alle condizioni sopra specificate (“a” e “b”). Lo studio è stato impostato seguendo i metodi di riferimento internazionali per ogni tipologia di prodotto, di modo da rendere le condizioni di esposizione delle cellule di epitelio bronchiale umano più vicine possibile all’uso dei diversi prodotti alla “real-life experience” dei consumatori. Innanzitutto si è deciso di utilizzare, come modello sperimentale, le cellule umane primarie di epitelio bronchiale (Normal Human Endothelial Cells - NHBE), e non modelli di cellule “immortalizzate” (o tumorali). Inoltre tutte le



Sezione di Biochimica Medica

esposizioni delle cellule a fumo/vapore/aerosol di cellule di epitelio bronchiale sono state condotte all’interfaccia aria-liquido (Air-Liquid-Interface o ALI), che è la modalità fisiologica in cui queste cellule vengono a contatto con questi prodotti in “real-life”.

Il regime di esposizione utilizzato per esporre le NHBE ai vapori della sigaretta elettronica è il “CORESTA Reference Method n. 81” (CRM81); per l’esposizione delle NHBE al fumo di sigaretta a tabacco è stato impiegato il regime “Health Canada Intense” (HCl) hole vents blocked e, infine, per l’esposizione delle NHBE all’aerosol del device a tabacco riscaldato (iQOS) è stato utilizzato il regime HCl hole vents not-blocked. E’ stata quindi valutata la cell viability (sopravvivenza cellulare) delle cellule NHBE esposte a fumo e vapori mediante xCELLigence ed i dati sono stati ulteriormente confermati mediante Neutral Red Uptake (NRU) assay. Abbiamo inoltre valutato la morfologia cellulare, le specie reattive dell’ossigeno (ROS) e la funzione mitocondriale mediante high content screening analysis. Tutti gli esperimenti sono stati effettuati in triplicato ed i risultati sono stati raccolti ed analizzati mediante analisi statistica per generare il presente report scientifico. Tutti gli esperimenti sono stati condotti presso i laboratori del Dipartimento di Scienze Biomediche e Biotecnologiche dell’Università degli Studi di Catania.



Sezione di Biochimica Medica

RISULTATI

Effetti degli e-liquid sulla produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) in un modello cell free based assay

In tabella 1 vengono riportate le medie dei valori di produzione di ROS nelle condizioni sperimentali di cui al punto A della precedente sezione. I nostri risultati hanno dimostrato che in assenza di nicotina il PG/VG non genera ROS. L'utilizzo di una formulazione di PG/VG contenente nicotina genera invece la produzione di ROS in modo direttamente proporzionale al numero di puff eseguiti. Questo risultato è in accordo con i dati della letteratura che dimostrerebbero che i prodotti di pirolisi della nicotina possono generare ROS. Dolce Bacco, Red Bacco e Deciso non generano ROS in queste condizioni sperimentali mentre invece Otello mostra una produzione di ROS direttamente proporzionale al numero di puffate. È interessante notare che la produzione di ROS di quest'ultimo prodotto (Otello) risulta però significativamente più bassa rispetto al solo PG/VG con nicotina. È per tanto possibile ipotizzare che la formulazione degli aromi contenuti nei quattro prodotti testati possano fungere da scavenger (effetto antiossidante) nei confronti della produzione dei ROS prodotti dalla pirolisi della nicotina.



Sezione di Biochimica Medica

Tabella 1. Valori di ROS nel sistema cell free assay. I dati sono presentati come la media±deviazione standard e riferiti a uM di H₂O₂.

ID PRODOTTO	Resistenza 1.6 Ohm Battery Power 10 Watt	Numero di Puff			
		10	20	40	60
	Aria	-	-	-	-
	PG/VG	-	-	-	-
	PG/VG + Nicotina 15mg/ml	410,1 ± 15,20	434,24 ± 10,58	576,77 ± 30,17	657,7 ± 19,77
	Dolce Bacco	-	-	-	-
	Red Bacco	-	-	-	-
	Deciso	-	-	-	-
	Otello	283,5 ± 49,33	337,15 ± 5,61	347,37 ± 30,94	319,71 ± 45,99

In Tabella 2 vengono riportati i livelli di produzione di ROS nelle condizioni sperimentali di cui al punto B della precedente sezione. In queste condizioni sperimentali nessuno dei prodotti testati ha mostrato una produzione apprezzabile di ROS. Questo effetto potrebbe essere ascrivibile all'aumentata potenza utilizzata per testare i prodotti che comporterebbe



Sezione di Biochimica Medica

un aumento della quantità sia di PG/VG (che possiede attività antiossidante) che dei prodotti contenuti negli aromi.

Tabella 2. Valori di ROS nel sistema cell free assay. I dati sono presentati come la media±deviazione standard e riferiti a uM di H₂O₂.

ID PRODOTTO	Resistenza 0.7 Ohm Battery Power 18 Watt	Numero di Puff			
		10	20	40	60
Aria	-	-	-	-	-
PG/VG	-	-	-	-	-
PG/VG + Nicotina 15mg/ml	-	-	-	-	-
Dolce Bacco	-	-	-	-	-
Red Bacco	-	-	-	-	-
Deciso	-	-	-	-	-
Otello	-	-	-	-	-



Sezione di Biochimica Medica

Effetti degli e-liquid sulla vitalità cellulare valutata mediante xCelligence technology, neutral red uptake ed high content screening analysis

In figura 1 vengono riportati i dati relativi all'effetto degli e-liquid utilizzando le condizioni sperimentali di cui al punto A e B della precedente sezione.

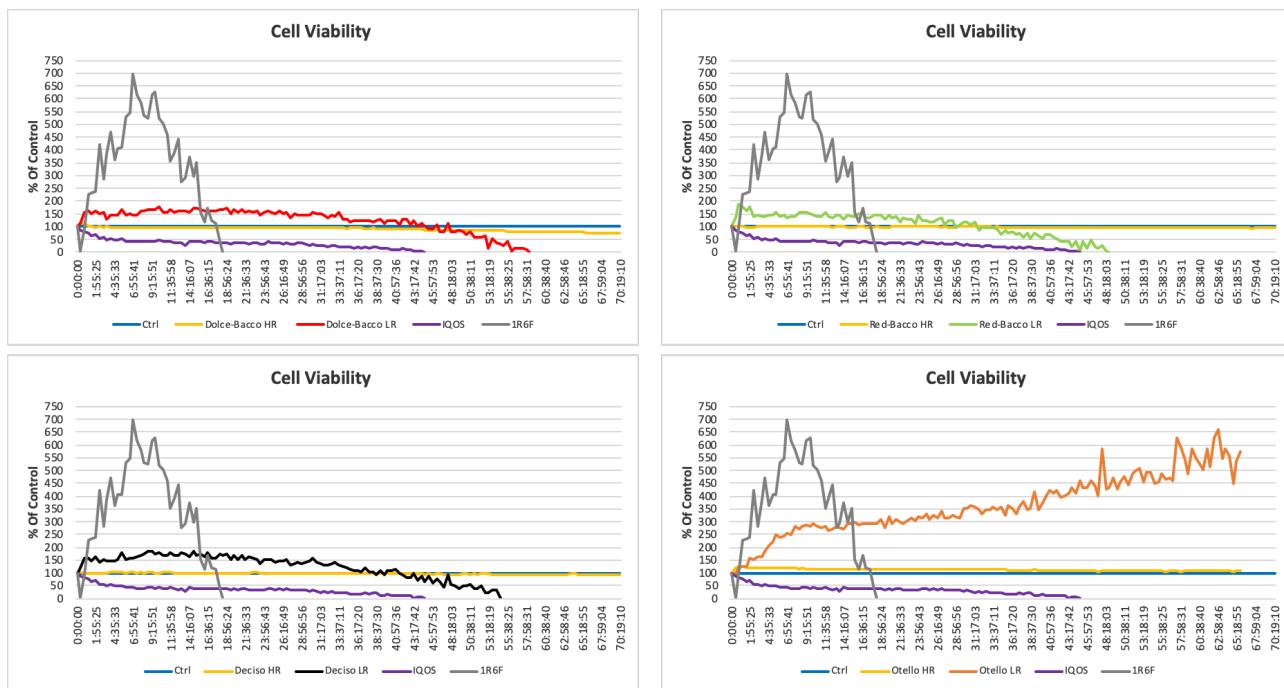


Figura 1. Dati xCelligence rapportati in percentuale rispetto al controllo indicato come 100% per tutti i tempi di osservazione. I valori indicati nel grafico fanno riferimento alla resistenza elettrica (Cell index) che risulta essere direttamente proporzionale al numero di cellule.



Sezione di Biochimica Medica

Il set di esperimenti effettuati con resistenza alta (Condizione A) ha dimostrato che nessuno dei prodotti testati ha una tossicità significativa nelle prime 24h di esposizione. Soltanto il prodotto Dolce Bacco ha mostrato una riduzione del cell index rispetto al proprio controllo di riferimento. Tale riduzione potrebbe essere dovuta alle transitorie modifiche metaboliche della cellula a seguito dell'esposizione a questo prodotto (vedi figura 2). Tutti i prodotti testati hanno mostrato una citotossicità inferiore rispetto alla sigaretta di riferimento ed IQOS.

Relativamente ai dati ottenuti con le condizioni sperimentali a bassa resistenza (Condizione B) i dati dimostrano una significativa riduzione della vitalità cellulare tempo dipendente. In particolare, tutti i prodotti testati hanno mostrato una morte cellulare pari al 100% oltre le 48h di trattamento. È opportuno notare però che tutti i prodotti testati nella condizione B dimostrano una tossicità inferiore rispetto alla sigaretta di riferimento ed iQOS.

I dati relativi alla vitalità cellulare sono stati ulteriormente confermati utilizzando un test (Neutral red uptake) che tiene conto dell'attività metabolica cellulare. In questo set di esperimenti (Figura 2) il prodotto Dolce Bacco ha mostrato una significativa riduzione transitoria nelle prime 24h dall'esposizione della vitalità. Per quanto riguarda gli altri prodotti si è osservato un trend similare ma che risultava essere non significativo ai fini della vitalità cellulare come dimostrato dal fatto che non si sono osservate modifiche significative negli esperimenti condotti con xCelligence (Figura 1).



Sezione di Biochimica Medica

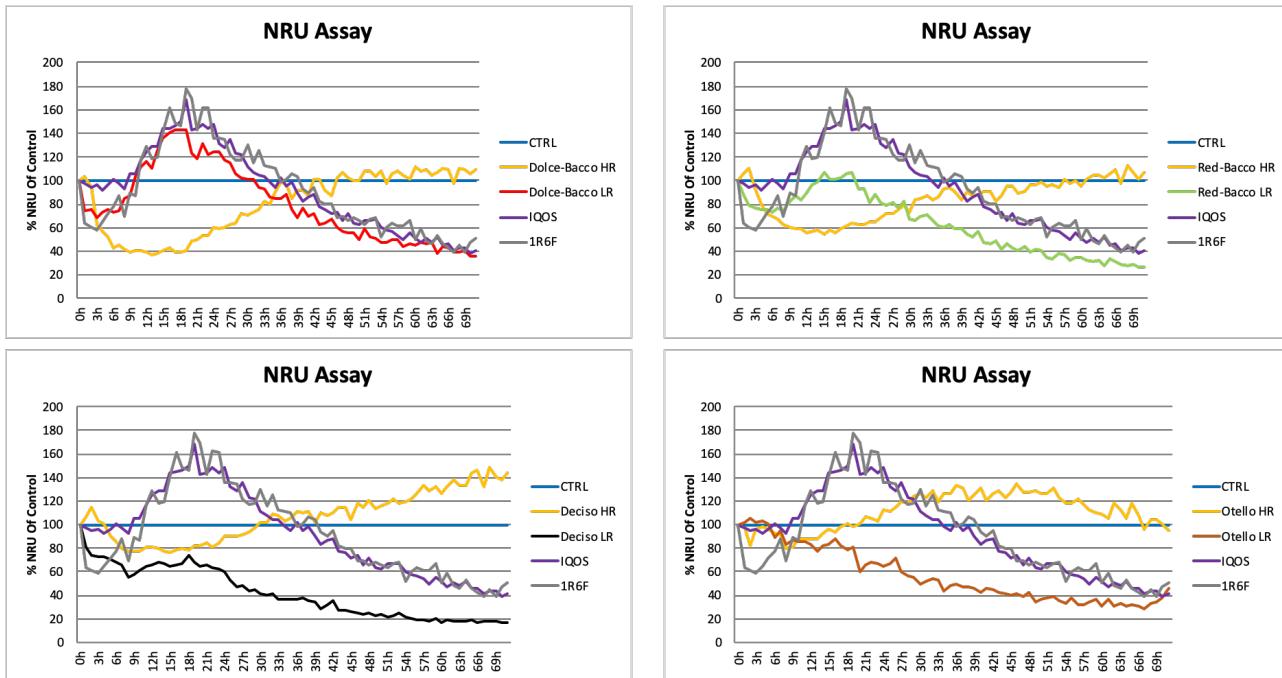


Figura 2

I prodotti testati con la condizione B hanno tutti mostrato una permanente riduzione della vitalità oltre le 24h di esposizione. Dalla figura 2 si evince inoltre come la tossicità dei prodotti testati sia maggiore rispetto alla sigaretta di riferimento ed iQOS. A tal riguardo bisogna fare notare un'apparente discrepanza tra i dati ottenuti in Figura 1 (xCelligence) ed in figura 2. È opportuno considerare sulla base dei dati xCelligence che la sigaretta di riferimento ed iQOS producono una morte cellulare più significativa rispetto ai prodotti e-liquids e che le cellule che sopravvivono potrebbero risultare “adattate” e/o “selezionate” al trattamento contribuendo all’uptake del colorante nelle condizioni sperimentali B.



Sezione di Biochimica Medica

Tale possibilità è inoltre supportata dalla morfologia cellulare che risulta essere più irregolare nelle cellule trattate con la sigaretta di riferimento (Figura 3).

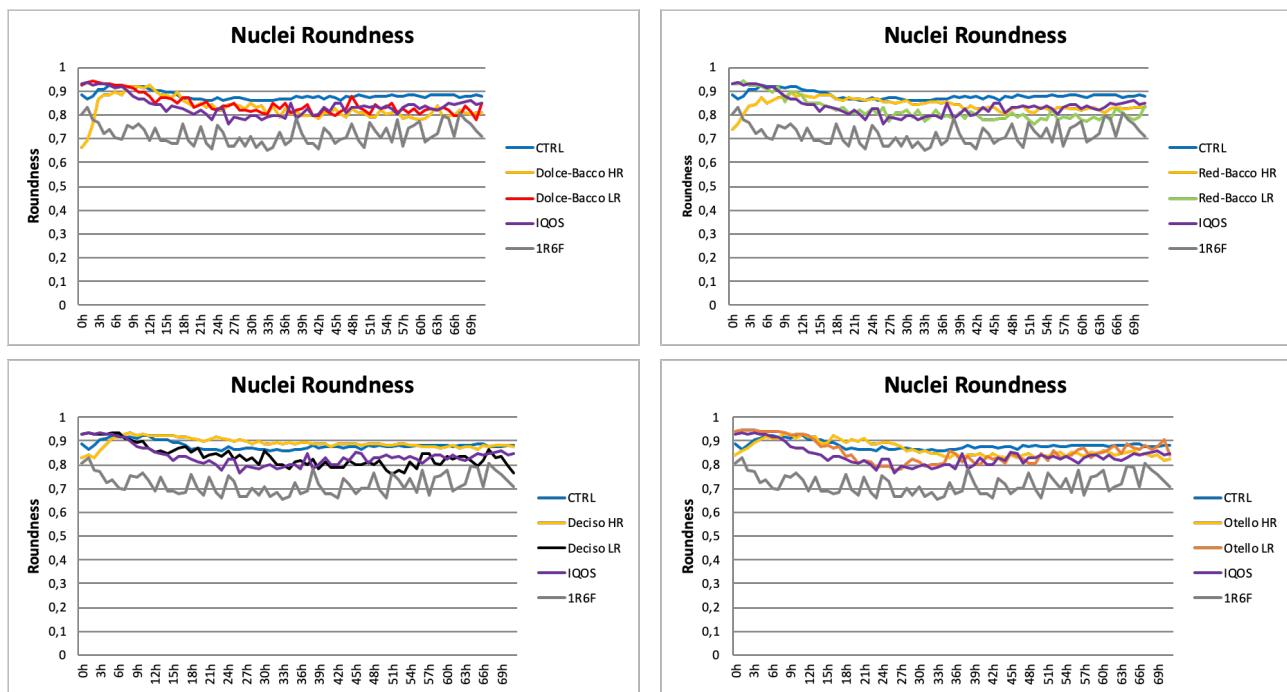


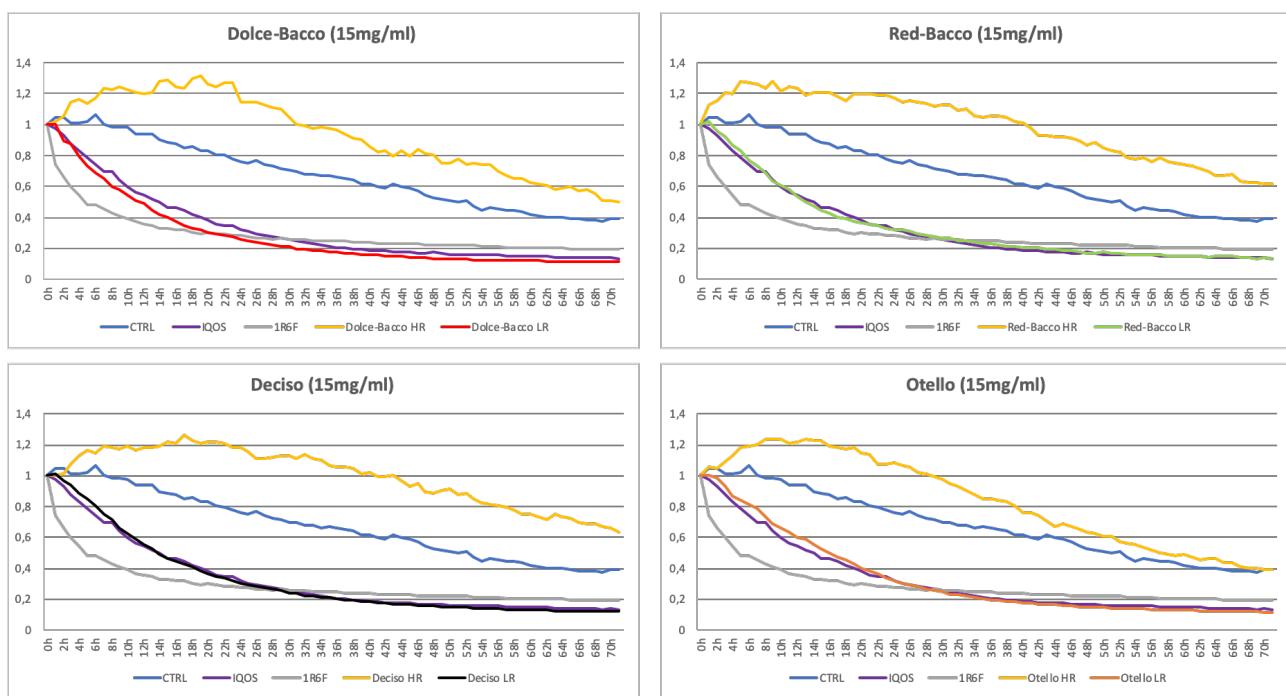
Figura 3. Analisi morfologica dei nuclei. Il valore viene ottenuto dividendo la lunghezza per la larghezza ed il rapporto indica la forma regolare tondeggiante quanto più il valore si avvicina ad 1.



Sezione di Biochimica Medica

Effetti degli e-liquid sul metabolismo ossidativo cellulare e mantenimento dell'omeostasi redox

Parallelamente a quanto già osservato per gli altri parametri valutati ed in accordo con i risultati ottenuti, gli esperimenti diretti a valutare la funzione mitocondriale mediante lo studio della depolarizzazione della membrana mitocondriale con probe fluorescente JC1 hanno dimostrato che tutti i prodotti testati nelle condizioni ad alta resistenza (Condizione A) non causano riduzione della funzione mitocondriale (Figura 4 e Figure 5-9).





Sezione di Biochimica Medica

Figura 4. I dati riportati nel grafico sono ottenuti mediante il rapporto dei valori di fluorescenza a diversa lunghezza d'onda del probe JC-1. Quanto più il valore si discosta da 1 tanto più alta risulta essere la depolarizzazione mitocondriale.

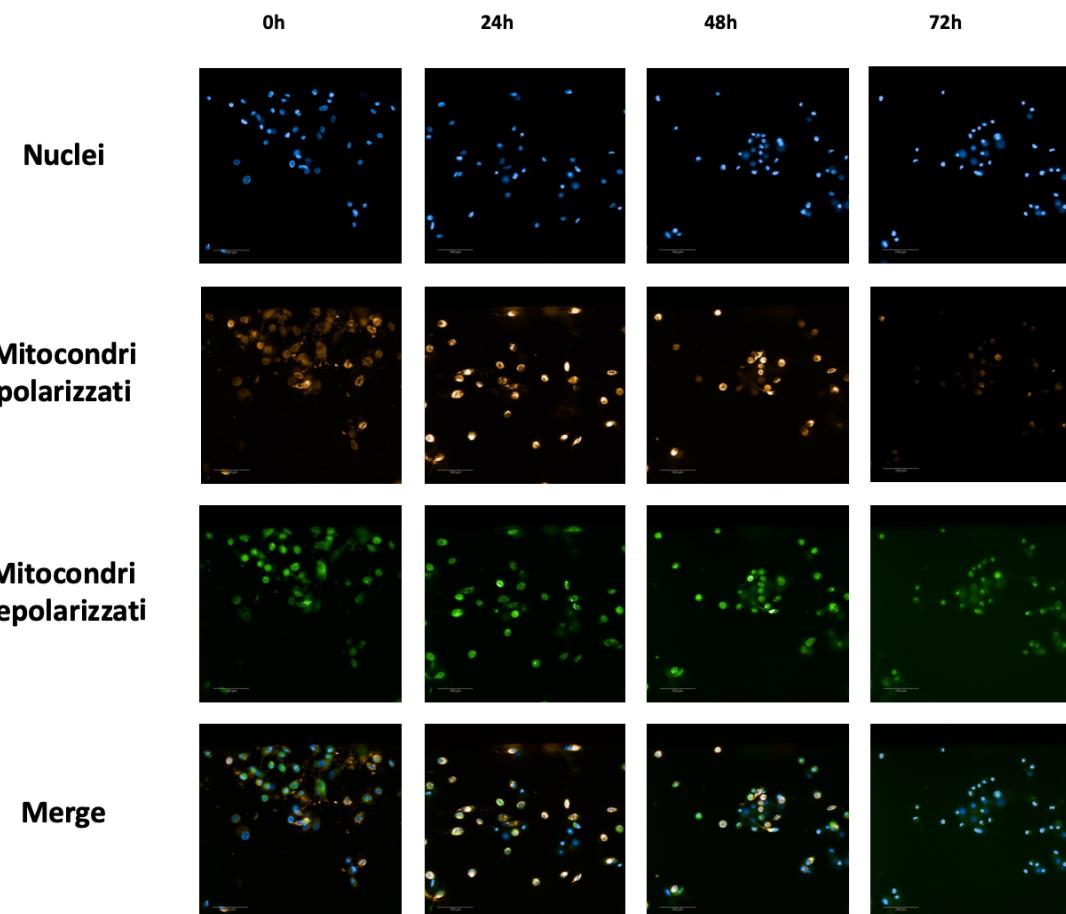


Figura 5. (Controllo) Il pannello mostra la fluorescenza del probe alle due diverse lunghezze d'onda utilizzate e quantificate come riportato in figura 4.



Sezione di Biochimica Medica

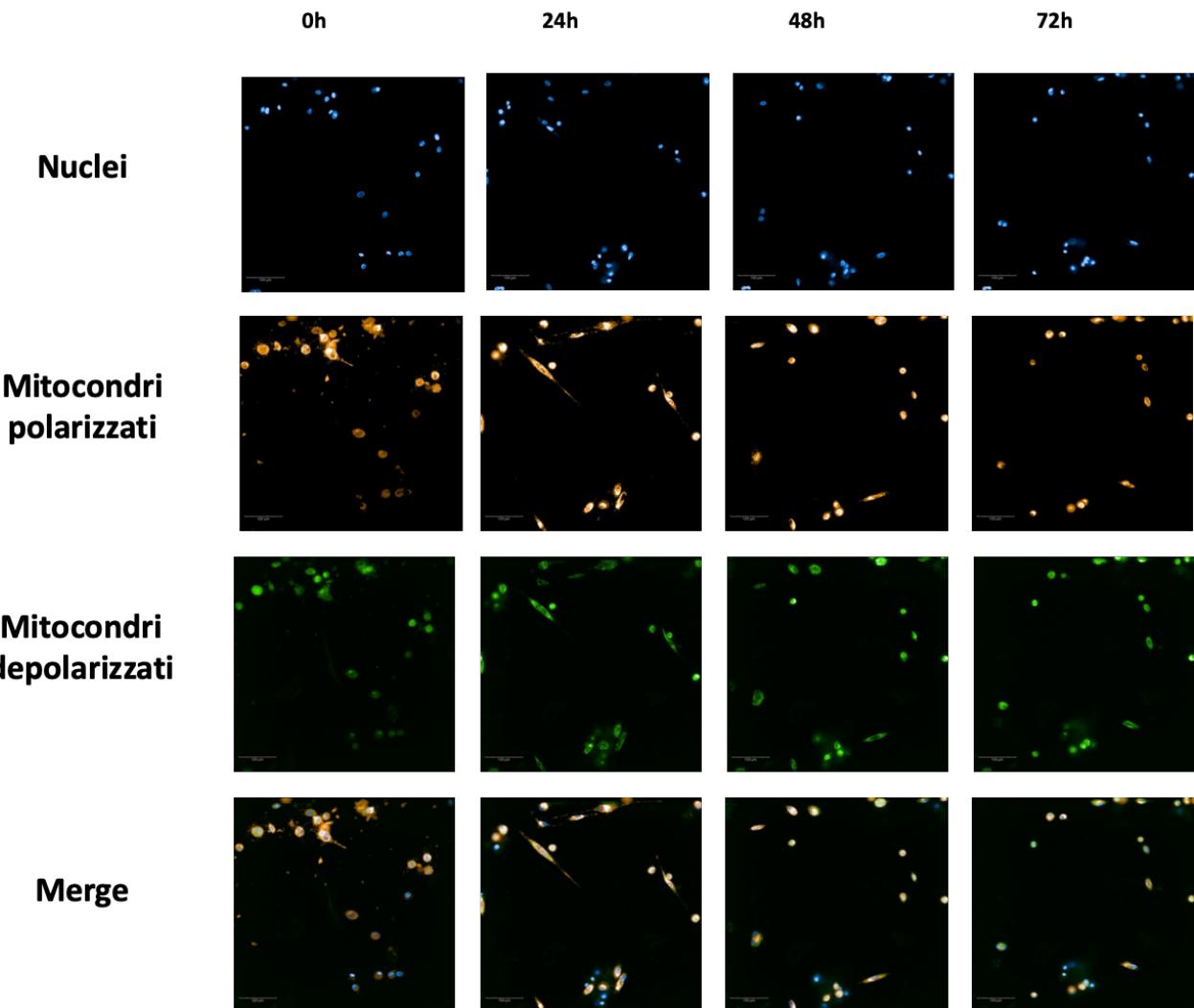


Figura 6. (Dolce Bacco) Il pannello mostra la fluorescenza del probe alle due diverse lunghezze d'onda utilizzate e quantificate come riportato in figura 4.



Sezione di Biochimica Medica

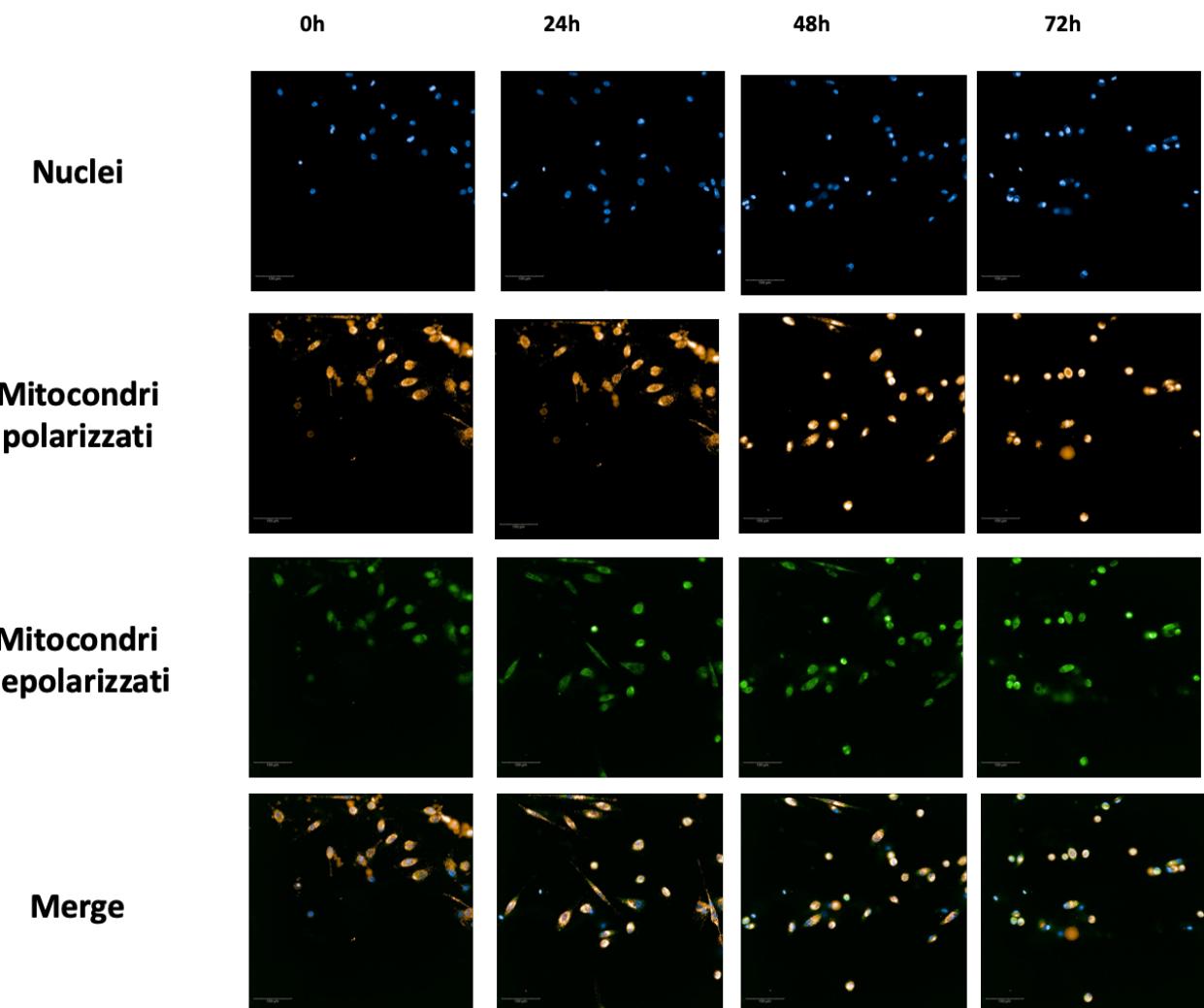


Figura 7. (Red Bacco) Il pannello mostra la fluorescenza del probe alle due diverse lunghezze d'onda utilizzate e quantificate come riportato in figura 4.



Sezione di Biochimica Medica

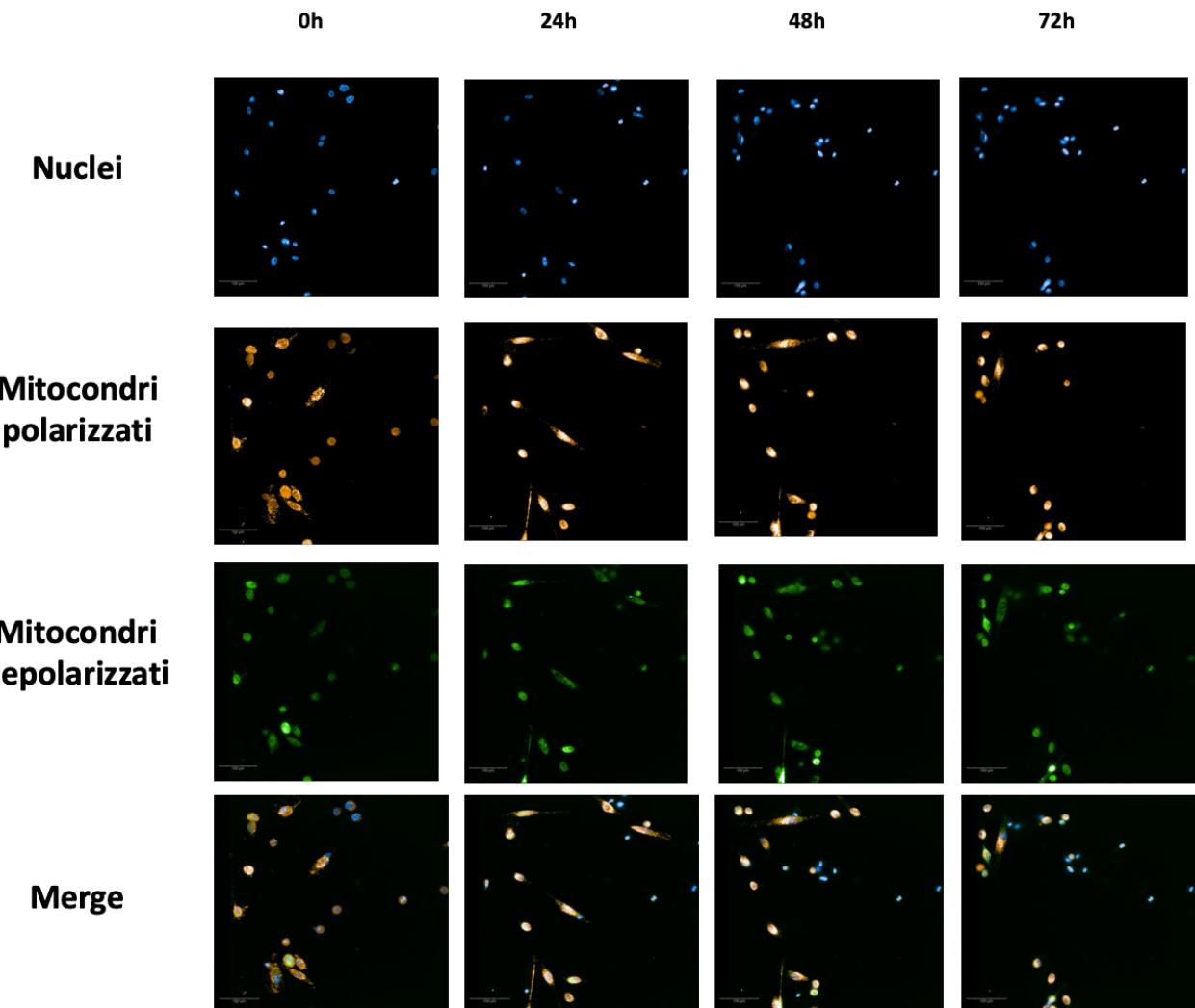


Figura 8. (Deciso) Il pannello mostra la fluorescenza del probe alle due diverse lunghezze d'onda utilizzate e quantificate come riportato in figura 4.



Sezione di Biochimica Medica

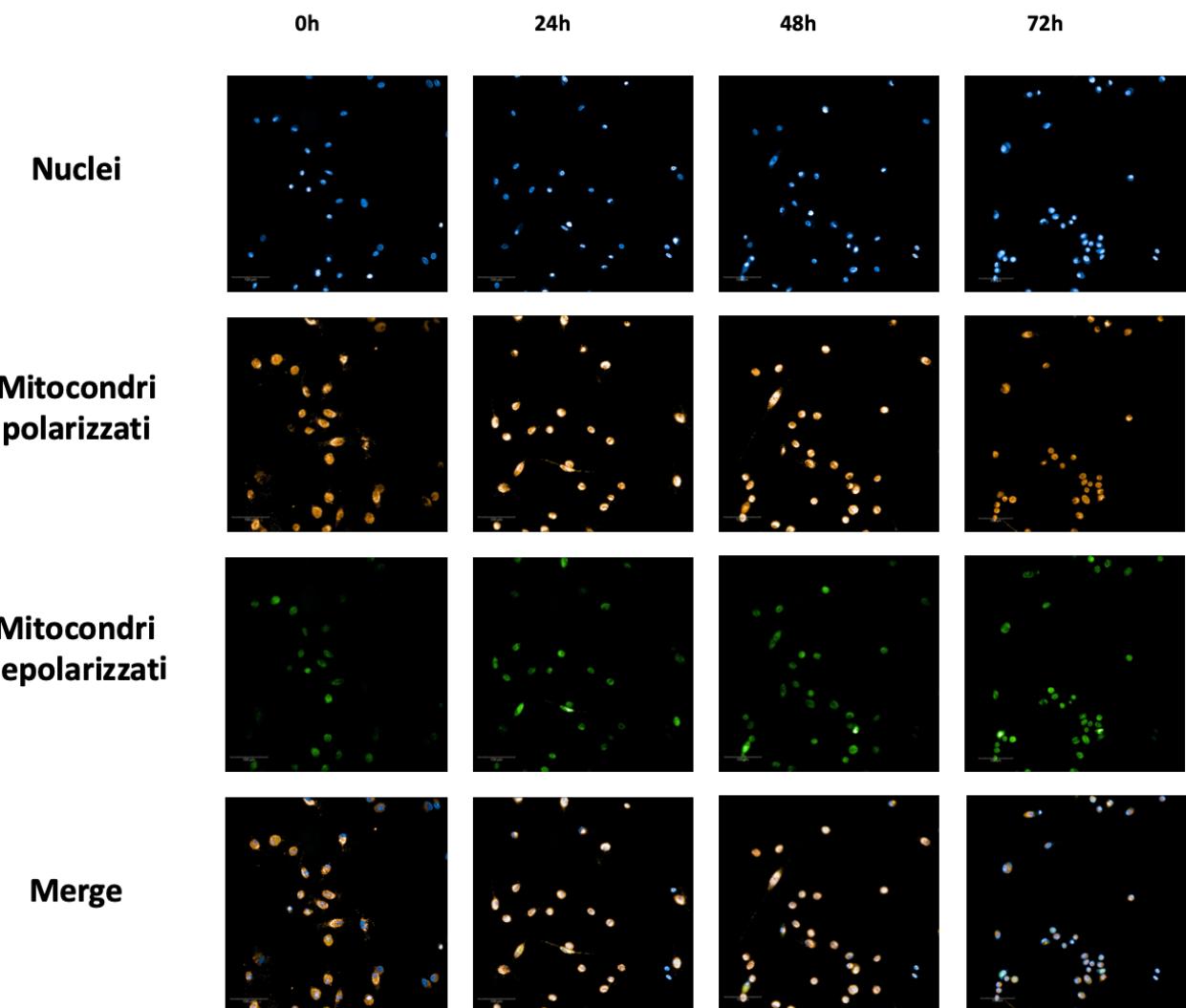


Figura 6. (Otello) Il pannello mostra la fluorescenza del probe alle due diverse lunghezze d'onda utilizzate e quantificate come riportato in figura 4.



Sezione di Biochimica Medica

In queste condizioni sperimentali tutti i prodotti testati hanno mostrato una funzione mitocondriale significativamente migliore rispetto alla sigaretta di riferimento o iQOS.

I prodotti testati con la resistenza più bassa dimostrano invece una significativa riduzione della funzione mitocondriale già nelle primissime fasi dall'esposizione. I valori di funzione mitocondriale risultano sovrapponibili a quelli ottenuti con iQOS mentre risultano essere migliori rispetto alla sigaretta di riferimento che mostra una drammatica e rapida caduta del potenziale mitocondriale (Figura 4). Dal momento che i mitocondri rappresentano la sede principale intracellulare per la produzione dei ROS, abbiamo ulteriormente valutato il redox balance cellulare valutando la produzione di specie reattive con un probe fluorescente (dicitrofluoresceina diacetato) (Figura 10). Questo set di esperimenti ha permesso di dimostrare che i prodotti testati alla resistenza più alta aumentano i ROS in una finestra temporale compresa nelle 3h. La successiva riduzione dei ROS con valori sovrapponibili a quelli del controllo sono da ascriversi ai fisiologici meccanismi antiossidanti intracellulari. Per quanto riguarda le condizioni sperimentali con la resistenza più bassa, i valori di produzione di ROS sembrerebbero paradossalmente inferiori a quelli del controllo. In particolare, sia la cinetica che i valori ottenuti con questi prodotti rispetto alla sigaretta di riferimento ed iQOS sembrerebbero essere sovrapponibili. Come già spiegato in precedenza questo effetto potrebbe essere frutto dell'alterata funzione mitocondriale che è sede principale della produzione dei ROS. Non è possibile inoltre escludere che la



Sezione di Biochimica Medica

produzione di ROS possa avere una kinetica diversa che si esaurisca in una finestra inferiore rispetto ai tempi impostati per questo set di esperimenti.

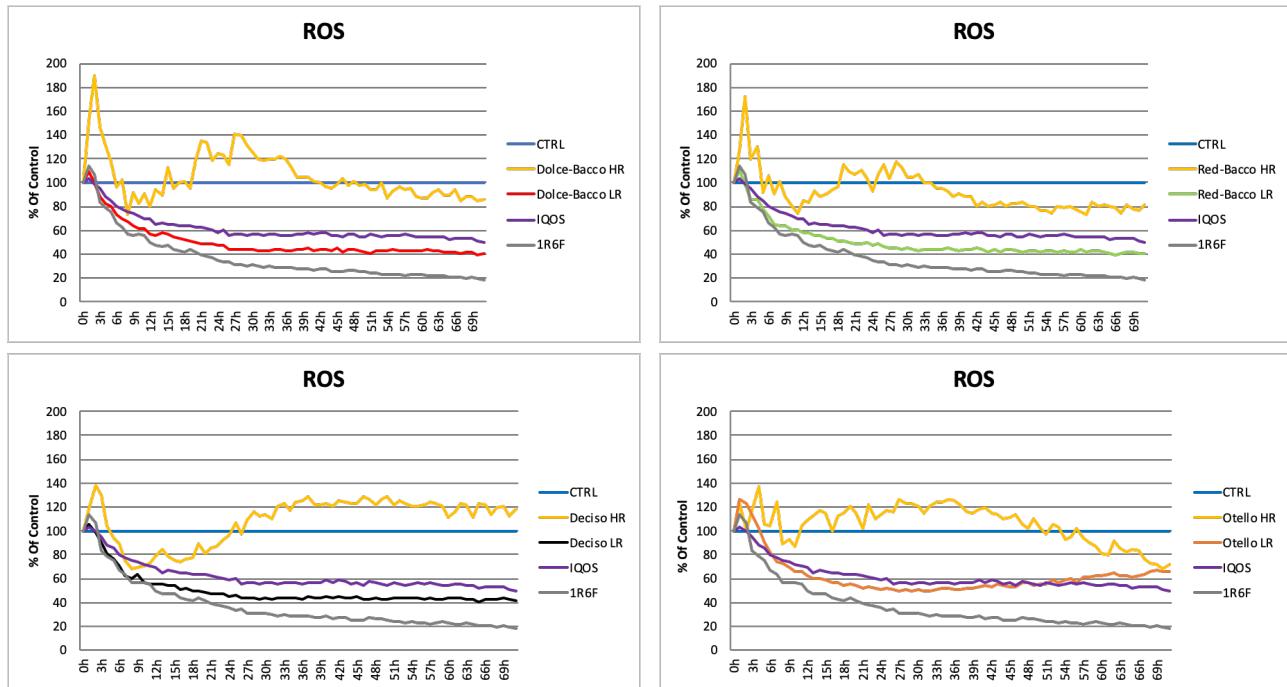


Figura 10. In figura vengono riportati i valori di fluorescenza relativa alla formazione dei ROS espressi in percentuale rispetto a quelli del controllo.



Sezione di Biochimica Medica

CONCLUSIONI

Tutti gli e-liquid testati hanno mostrato un ottimo profilo di sicurezza ed una bassa tossicità seppur con differenze variabili da prodotto a prodotto. I prodotti Dolce Bacco, Red Bacco e Deciso non producono ROS a tutte le condizioni testate nel cell-free system assay, suggerendo che la parte aromatica dei prodotti possa compensare la produzione di ROS dovuta all'effetto della pirolisi della nicotina. Il prodotto Otello mostra un aumento di ROS nello stesso sistema rispetto agli altri prodotti ma comunque significativamente più bassi rispetto alla sola nicotina. A tal proposito si consiglia di voler rivedere la composizione della parte aromatica del presente prodotto al fine di ridurre la produzione di ROS mantenendone inalterate le proprietà sensoriali per il consumatore. Quando utilizzati in condizioni di alta resistenza tutti i prodotti non hanno mostrato significative e permanenti alterazioni del metabolismo cellulare anche nei periodi più lunghi di osservazione. Per quanto riguarda le condizioni di utilizzo con la resistenza più bassa, i prodotti mostrano un buon profilo nei tempi di osservazione compresi nelle 24h. Infine tutti i prodotti mostrano in tutte le condizioni un profilo tossicologico sovrappponibile ed in alcuni casi migliore rispetto ad un sistema a tabacco riscaldato (iQOS).