

# Clear Stream project:

## Cytotoxicity assesment of an electronic cigarette vapour on 3T3 fibroblasts. Data review and comment

G. Romagna

### Premessa

Scopo di questa relazione, è analizzare e commentare i risultati preliminari e i contenuti dello studio denominato "clear stream", al fine di interpretare i dati, evidenziarne i limiti, e formulare nuove ipotesi da verificare nelle successive fasi dello studio.

### Introduzione

Il progetto Clear stream, è nato dall'esigenza di comprendere, il comportamento dell'aerosol prodotto da una sigaretta elettronica, nella sua interazione biologica e biochimica con una struttura cellulare vivente, con lo scopo di evidenziare eventuali fenomeni di tossicità misconosciuti.

lo studio ha analizzato gli effetti citotossici della nebbia/aerosol prodotta da una sigaretta elettronica, caricata con un liquido aromatizzato con diverse fragranze

Poiché non esistono in letteratura, lavori analoghi su questo genere di dispositivi, si è scelto di usare come controllo, il fumo di una tradizionale sigaretta di tabacco.

### Materiali e metodi (7)

Per il test, eseguito in vitro, è stato scelto come target biologico, un monostrato di fibroblasti murini (3T3). I fibroblasti sono le cellule responsabili della costruzione dell'impalcatura strutturale degli organi e pertanto presenti anche nell'apparato respiratorio. Una alterazione della proliferazione e della migrazione dei fibroblasti sembra essere alla base dell'enfisema polmonare indotto dal fumo di tabacco (3).

Questa linea cellulare, in virtù delle sue caratteristiche biologiche è già stata impiegata in numerosi studi per valutare la tossicità del condensato di sigaretta tradizionale (2)(3)(4)

Per l'esperimento, è stato allestito un sistema di aspirazione collegato ad una beuta contenente

### Overview

The purpose of the following report is to analyse and comment the preliminary results and the contents of the study called "clear stream" in order to interpret the data, highlight the limits, and formulate new hypothesis to be verified in further stages of the study.

### Introduction

The "Clear Stream" project began because of the need to understand the behaviour of the aerosol produced by an electronic cigarette in its biological and biochemical interaction with a living cell structure, in order to detect possible unknown toxic effects.

The study analysed the cytotoxic effects of the haze/aerosol produced by an electronic cigarette filled with a flavoured liquid of different fragrances.

As no other studies exist as such on e-cig in literature yet, the smoke of a standard tobacco cigarette was chosen for comparison.

### Methods and materials (7)

For the test, carried out in vitro, a monolayer of murine fibroblasts (3T3) was chosen as a biological target. Fibroblasts are cells responsible for building the structural framework of the organs and they can be found in the respiratory tract in a large amount. An alteration of the proliferation and migration of fibroblasts seems to be the main cause of pulmonary emphysema induced by tobacco smoke (3).

This cell line, because of its biological features, has been widely used already in different studies that aimed to assess the toxicity of traditional cigarette smoke condensate (CSC) (2) (3) (4)

The test was set up by connecting an aspiration system to a flask containing 30ml of cell culture

# Clear Stream project:

## Citotoxicity assesment of an electronic cigarette vapour on 3T3 fibroblasts. Data review and comment

### G. Romagna

30ml di terreno di coltura cellulare, la cui composizione è stata meticolosamente descritta fino ai lotti di produzione dei singoli componenti.

Alla beuta è stata collegata una sigaretta elettronica, modello 510, caricata con liquido aromatizzato HJ (1) , contenente 9mg/ml di nicotina e sono state eseguite 120 aspirazioni di circa 3 secondi ciascuna.

La beuta è stata mantenuta in costante agitazione per garantire una migliore dissoluzione delle componenti vaporizzate all'interno del terreno di coltura.

Il terreno di coltura così contaminato, è stato successivamente utilizzato per coltivare i fibroblasti, valutando eventuali alterazioni della loro vitalità.

Una prova analoga è stata allestita come controllo, utilizzando 15 aspirazioni prodotte da una sigaretta di tabacco.

Questa procedura è stata ripetuta con diverse miscele di HJ a 9mg/ml di nicotina, aromatizzate di volta in volta con fragranze differenti e successivamente il contenuto della beuta è stato diluito in modo scalare, e messo in incubazione con i fibroblasti.

Dopo un periodo di incubazione di 24 ore, la vitalità dei fibroblasti è stata analizzata utilizzando il test MTT che, utilizzando un marcatore cromatico, ha permesso di valutare in modo accurato e riproducibile il grado di vitalità delle cellule.(5)

I risultati per ogni singolo campione, sono quindi stati organizzati sotto forma di grafici che rappresentano l'influenza che il campione ha avuto sulla vitalità delle cellule alle varie diluizioni.

Come da protocollo MTT tutti i campioni che hanno prodotto una riduzione della vitalità, maggiore o uguale al 30% sono stati classificati come tossici.(5)(7)

medium, which its composition has been meticulously described back to the batch production for every single component.

The flask was connected to an electronic cigarette, model 510, filled with flavoured HJ (1) liquid, containing 9mg/ml nicotine and 120 puffs were performed with a duration of 3 seconds each.

The flask was kept in constant motion to ensure a better dissolution of the vaporised components within the culture medium.

The culture medium contaminated with these components was subsequently used to grow the fibroblasts, assessing possible variation of their vitality.

A similar test was performed for comparison, by 15 puffs from a tobacco cigarette.

This procedure was repeated with different mixtures of HJ 9mg/ml nicotine, flavoured each time with different fragrances. Then, the flask content was diluted at lower rates, and incubated with fibroblasts.

After a 24 hours incubation period, the vitality of the fibroblasts was analysed according to the MTT test guide lines, by using a colour marker, allowed us to accurately and reproducibly assess the degree of cells vitality. (5)

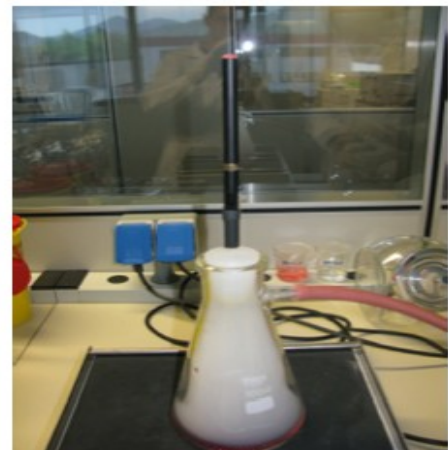
The results for each sample were then represented in graph forms which show the influence that the sample suffered for its cells' vitality at different dilution rates.

As for the MTT protocol, all samples that showed a reduction of vitality higher or equal than 30%, were classified as toxic. (5)(7)

# Clear Stream project:

## Citotoxicity assesment of an electronic cigarette vapour on 3T3 fibroblasts. Data review and comment

G. Romagna



### Risultati

dallo studio è emerso che, su 15 campioni esaminati contenenti diverse miscele aromatiche, 9 non hanno modificato in modo significativo la vitalità cellulare, mentre 6 campioni (Caffè, Virginia, Perique Black, 7Foglie, Vape Wizard) hanno prodotto una alterazione significativa della vitalità, suggestiva di un effetto citotossico.

Il campione di controllo, ottenuto usando una sigaretta tradizionale di tabacco, ha invece prodotto un marcato ed evidente effetto citotossico anche a concentrazioni molto basse (IC50 0,16 ml/ml). (Tabella 1)

### Results

The study showed that out of 15 examined samples containing different aromatic blends, 9 did not significantly alter cell vitality, while 6 samples (Coffee, Virginia, Black Perique, 7Foglie, Vape Wizard) showed a significant alteration of cells vitality, indicating cytotoxic effects.

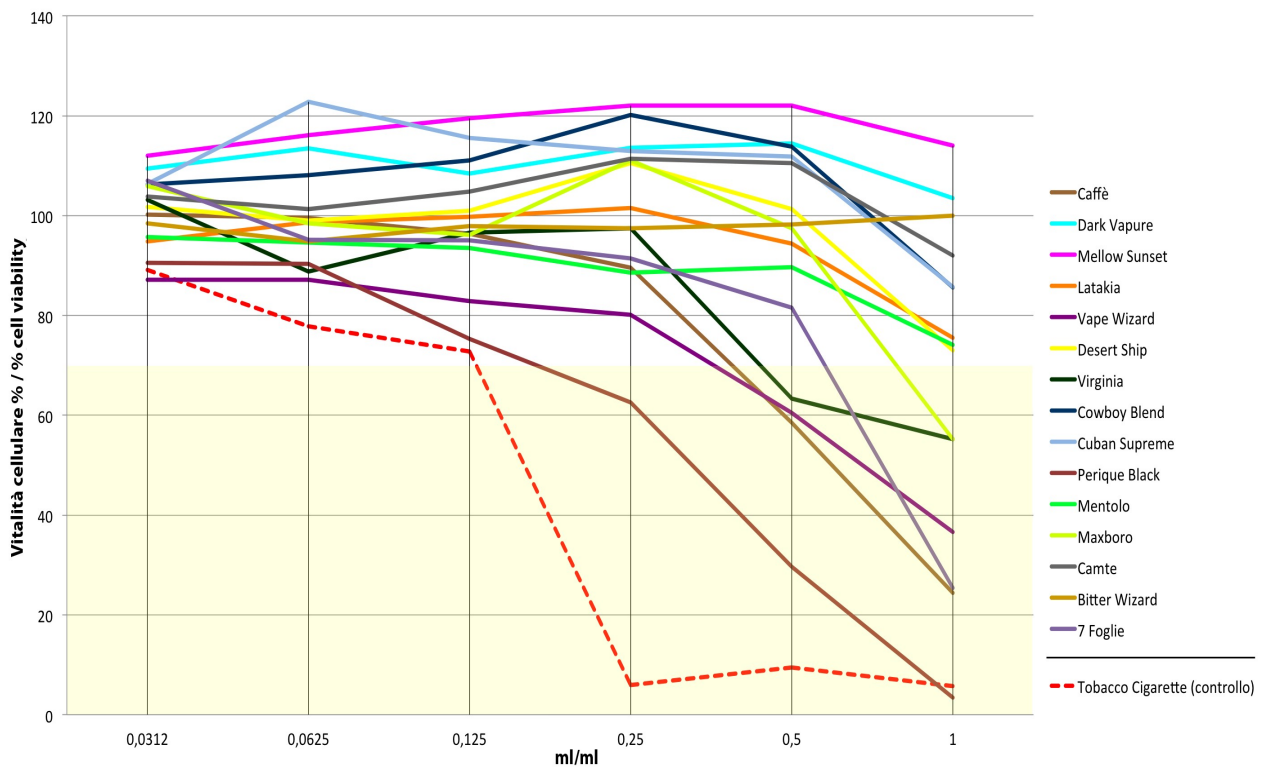
The comparison sample, obtained by using a standard tobacco cigarette, produced instead clear and obvious cytotoxic effects, even at a very low dosage (IC50 0.16 mg / ml). (Chart 1)

Vitalità/Diluizione	0,0312	0,0625	0,125	0,25	0,5	1	IC50
Tobacco Cigarette (controllo)	89,1	77,8	72,8	5,9	9,4	5,7	0,16 ml/ml
Caffè	100,2	99,5	96,4	89,6	58,5	24,4	0,59 ml/ml
Dark Vapure	109,4	113,5	108,4	113,6	114,5	103,5	nd
Mellow Sunset	112	116,1	119,5	122,1	122,1	114	nd
Latakia	94,8	98,7	99,8	101,5	94,4	75,5	nd
Vape Wizard	87,1	87,1	82,9	80,1	60,5	36,6	0,70 ml/ml
Desert Ship	101,8	99	101	110,5	101,3	73	nd
Virginia	103,2	88,8	96,6	97,5	63,3	55,2	nd
Cowboy Blend	106,2	108,1	111,1	120,2	113,8	85,6	nd
Cuban Supreme	106,4	122,8	115,6	112,9	111,8	85,7	nd
Perique Black	90,6	90,3	75,3	62,6	29,6	3,4	0,33ml/ml
Mentolo	95,7	94,6	93,5	88,6	89,7	74,1	nd
Maxboro	105,9	98,5	96,2	111,1	97,5	55,2	nd
Camtel Ultimate	103,8	101,3	104,8	111,4	110,5	92	nd
Bitter Wizard	98,4	94,8	97,9	97,5	98,2	100	nd
7 Foglie	107	95,2	95,1	91,4	81,5	25,4	0,75ml/ml

# Clear Stream project:

## Citotoxicity assesment of an electronic cigarette vapour on 3T3 fibroblasts. Data review and comment

G. Romagna



*Il grafico mostra sulle ordinate il grado di vitalità cellulare calcolato usando come riferimento un gruppo di cellule non trattate, mentre sull'asse delle ascisse, troviamo il grado di diluizione del terreno contaminato utilizzato per il test. Le diluizioni vanno da 1/32 (0,0312) a 1 (terreno contaminato al 100%). Dalla figura appare evidente come i fenomeni di tossicità sono più marcati nella parte destra del grafico in relazione all'aumento di concentrazione e come il fumo di sigaretta tradizionale, manifesti la propria tossicità a concentrazioni più basse.*

*The graph shows the cell vitality degree on the y-axis calculated by using a group reference of untreated cells, while on the x-axis we can find the dilution level of the contaminated soil used for the test. The dilution range is between 1/32 (0.0312) and 1 (100% contaminated soil). From the diagram it is evident that the toxicity phenomena are more accentuated on the right side of the graph in connection with an increased concentration and how the traditional cigarette smoke shows its toxicity at lower concentrations.*

# Clear Stream project:

## Cytotoxicity assesment of an electronic cigarette vapour on 3T3 fibroblasts. Data review and comment

G. Romagna

Successivamente alla pubblicazione di questi primi dati, numerose segnalazioni fatte dagli utilizzatori abituali di questo dispositivo, hanno evidenziato alcune anomalie nella procedura, potenzialmente in grado di alterare o influenzare l'esito dei test.

Nello specifico è stato obiettato che:

La posizione verticale della sigaretta elettronica, non corrisponde alla sua posizione naturale durante l'uso e potrebbe compromettere l'alimentazione di liquido alla resistenza, con possibile surriscaldamento.

Il numero di aspirazioni previste dal test (pari a 120) è verosimilmente superiore all'autonomia massima della cartuccia, che potrebbe quindi esaurire il liquido di cui è impregnata, prima del completamento del test, con conseguente surriscaldamento

L'intervallo di tempo tra le aspirazioni è troppo breve e non consente al sistema di rifornirsi di liquido dalla cartuccia in modo adeguato per la successiva aspirazione, questo produrrebbe surriscaldamento.

Alla luce di queste segnalazioni e con lo scopo di comprendere quanto questi fattori incidano sul risultato, sono stati allestiti nuovi test con configurazioni differenti.

Un campione di Vape wizard, già testato con esito di citotossicità, è stato nuovamente sottoposto al test, con 120 aspirazioni, ma modificando la posizione della sigaretta elettronica, da verticale in orizzontale.

Successivamente lo stesso campione è stato sottoposto ad un test con 50 aspirazioni, intervallate da una pausa di 2-3", sia in posizione verticale che orizzontale, più un'ulteriore prova con 50 aspirazioni intervallate da una pausa di 8-10".

After the release of those early results just shown, a large number of reports put in by frequent users of electronic cigarettes have pointed out some possible mistakes made during the procedure, which would potentially be able to alter or affect the outcome of the tests.

In particular the following issues have been argued:

The vertical position of the electronic cigarette does not correspond to its natural position during normal use, which might compromise the flow of the liquid to the resistance, resulting in possible overheating.

The number of puffs set for the test protocol (120) were likely to outweigh the maximum duration of the cartridge, which could easily dry off the liquid before the end of the test, causing overheating.

The time intervals between the puffs were too short and did not allow the resistance to be supplied with liquid from the cartridge properly before the next puff. Again, this would result of overheating.

Considering these issues, and with the purpose of understanding how these factors affect the result, new tests were set up with different configurations.

A sample of Vape wizard, already successfully tested for cytotoxicity, was tested again, with 120 puffs, but this time the position of the electronic cigarette was changed from vertical to horizontal.

Subsequently, the same sample was tested with 50 puffs, one puff every 2-3 seconds, both vertically and horizontally. In addition, a further test with 50 puffs at 8-10 seconds from one to the next was performed.

# Clear Stream project:

## Citotoxicity assesment of an electronic cigarette vapour on 3T3 fibroblasts. Data review and comment

### G. Romagna

Da questa verifica è emerso che, con 120 aspirazioni, la posizione orizzontale o verticale del dispositivo, non produce un miglioramento in termini di tossicità, mostrando anzi una lievissima accentuazione di quest'ultima in posizione orizzontale.

Al contrario invece, con 50 aspirazioni, il campione non ha mostrato citotossicità, indipendentemente dal suo orientamento spaziale o dalla durata delle pause tra una aspirazione e l'altra. (tabella 2)

These tests showed that, with 120 puffs, the horizontal or vertical position of the device did not improve anything in terms of toxicity, actually showing a slight increase of toxicity in the horizontal position.

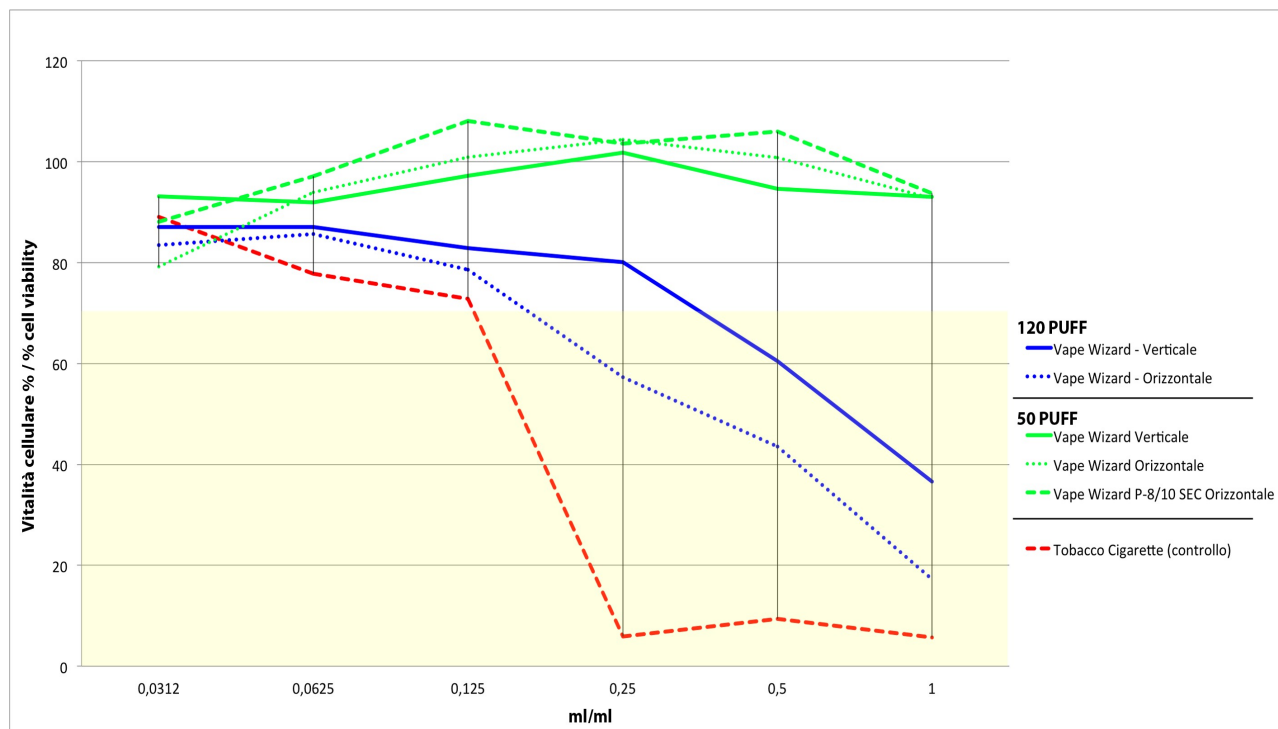
However, with 50 puffs, the sample showed no cytotoxicity, regardless of its position or the duration time between an aspiration and the next. (Table 2)

Vitalità/Diluizione	0,0312	0,0625	0,125	0,25	0,5	1	IC50
Tobacco Cigarette (controllo)	89,1	77,8	72,8	5,9	9,4	5,7	0,16 ml/ml
<b>120 PUFF</b>							
Vape Wizard - Verticale	87,1	87,1	82,9	80,1	60,5	36,6	0,70 ml/ml
Vape Wizard - Orizzontale	83,5	85,7	78,6	57,3	43,5	17,2	0,37ml/ml
<b>50 PUFF</b>							
Vape Wizard Verticale	93,1	91,9	97,2	101,8	94,6	93	nd
Vape Wizard Orizzontale	79,2	93,9	100,9	104,4	100,8	92,7	nd
Vape Wizard P-8/10 SEC Orizzontale	88,1	97,1	108,1	103,6	106	93,7	nd

# Clear Stream project:

## Citotoxicity assesment of an electronic cigarette vapour on 3T3 fibroblasts. Data review and comment

G. Romagna



*Il grafico mostra 5 test di tossicità, condotti tutti con la stessa metodica MTT, modificando però alcuni aspetti della raccolta del campione. Tutte le prove sono state eseguite utilizzando la stessa componente aromatica. La posizione del dispositivo, così come anche la pausa tra una aspirazione e l'altra, non sembrano influire sul risultato, mentre la tossicità risulta costantemente assente con 50 aspirazioni.*

*The graph shows 5 toxicity tests, all carried out with the same MTT methods, though having changed the way how the sample was collected. All tests were conducted using the same flavour. The orientation of the device, as well as the pause duration between one puff and the next, does not seem to affect the outcome, while the toxicity is instead consistently absent with 50 puffs.*

# Clear Stream project:

## Citotoxicity assesment of an electronic cigarette vapour on 3T3 fibroblasts. Data review and comment

**G. Romagna**

### Commento allo studio

Lo studio sperimentale sopra descritto, va considerato, come la fase preliminare di un progetto più vasto, con la funzione di comprendere meglio le modalità più idonee per allestire i successivi campioni e migliorare la qualità e la significatività dei risultati.

Pur essendo ancora un abbozzo però, ha evidenziato degli aspetti interessanti e solo in parte ipotizzati che meritano attenzione e ulteriori approfondimenti.

I test di citotossicità in vitro, sono una metodica largamente utilizzata e sempre più diffusa che sta sostituendo in gran parte la sperimentazione su cavie viventi.

Esistono numerosi protocolli standardizzati e ben strutturati per la valutazione e l'interpretazione dei risultati che sono ripetibili e affidabili a patto di accettare e comprendere i limiti tipici della metodica.

Un test in vitro, è allestito su un sistema di cellule estremamente semplice e quindi facilmente riproducibile. Questo da un lato elimina la variabilità che c'è tra individui diversi rendendo i risultati più omogenei, e dall'altro rende questi dati confrontabili con test analoghi allestiti in condizioni equivalenti. Tuttavia un test in vitro, non è in grado di rilevare i fenomeni di tossicità tipici della biologia di un organismo complesso.

Un'altro limite da tenere a mente nella valutazione di questo test riguarda la sua capacità di evidenziare unicamente i fenomeni di tossicità acuta, quelli cioè che si manifestano immediatamente dopo il contatto con il campione, mentre non ci dice nulla sulla tossicità prodotta da una cronica esposizione a una determinata sostanza.

Da un analisi dei dati prodotti dalla prima fase dello studio, 6 campioni hanno mostrato di possedere effetti citotossici assolutamente non

### Comment to the study

The experimental study described above aims to better understand how to set up and perform further tests in order to improve the reliability of the results. The study should be just considered as a preliminary phase of a larger project.

Although the study can be still considered a rough outline, however, it has revealed interesting aspects, only partially assumed, that surely deserve attention and further investigations.

The in vitro cytotoxicity test is a largely and increasingly used method that is replacing most of the tests on animals.

There are plenty of well-structured and standardized protocols for the evaluation and interpretation of the results that are repeatable and reliable as long as we accept and understand the limits that traditional methods involve.

An in vitro test, is set on a very simple cell system, hence the test and the results are easily reproducible. This, both nullifies the variability that exists between different individuals by providing more consistent results, and also makes the data comparable to other similar tests that were set up under the same conditions. However, an in vitro test is not suitable when we want to prove toxicities typical of a more complex organism's biology.

Another significant limitation to keep in mind for an in vitro test, is the ability to show acute toxicity incident only, that is all those events that occur immediately after contact with the sample, but which on the other hand cannot provide any data about the possible toxicity produced by a chronic exposure to a substance.

From the analysis of the data obtained by the first stage of our study, 6 samples showed potential and unexpected cytotoxic effects.



# Clear Stream project:

## Cytotoxicity assesment of an electronic cigarette vapour on 3T3 fibroblasts. Data review and comment

G. Romagna

previsti.

Tuttavia, quando è stato ripetuto il test per uno dei campioni, modificando le condizioni dell'esperimento, il risultato ha rivelato delle informazioni ancora più inaspettate.

L'orientamento spaziale della sigaretta elettronica durante il test, non sembra influire sul risultato e altrettanto sembra ininfluenza la durata della pausa tra una aspirazione e l'altra.

Con 50 aspirazioni, anziché 120, i fenomeni di citotossicità del campione sono spariti del tutto. E' verosimile pensare quindi, che 120 aspirazioni, sono eccessive per la capacità della cartuccia contenuta nella sigaretta elettronica, che probabilmente ha esaurito il liquido con cui era caricata, prima di completare le 120 aspirazioni.

In queste condizioni, la resistenza presente all'interno dell'atomizzatore, dovendo lavorare praticamente a secco, ha raggiunto temperature decisamente superiori a quelle normali di esercizio e potrebbe aver portato alla formazione di composti tossici dovuti a fenomeni di pirolisi.

Il surriscaldamento di un liquido contenente glicerina, potrebbe portare alla formazione di acroleina, che ha dimostrato di possedere un effetto inibente la proliferazione e l'adesione cellulare dei fibroblasti polmonari(6).

Questi composti hanno poi verosimilmente provocato i fenomeni di citotossicità osservati nel test.

A questa analisi si può obiettare che non tutti i campioni hanno prodotto tossicità, nonostante tutti siano stati sottoposti a 120 cicli di aspirazione. E' vero però che il modello di sigaretta elettronica impiegato nello studio, utilizzando una cartuccia con tampone di fibra sintetica, fornisce un'alimentazione non costante e ripetibile. Inoltre il corretto caricamento di questa cartuccia è più soggetto, rispetto ad altri modelli più moderni, all'abilità

However, when the test was repeated on one of those samples, by simply changing the setup for the test, the given results unexpectedly changed.

The vertical or horizontal position of the electronic cigarette in the test does not seem to affect the outcome, as well as the pause between one puff to the next.

On the other hand, by applying 50 puffs instead of 120, the phenomenon of cytotoxicity completely disappeared.

It is likely to think that 120 puffs were too many for the capacity of the cartridge, which probably ran out of liquid before completing the 120 puffs cycle.

Under these conditions, the resistance inside the atomizer, having to work in dry conditions for a non specified period of time during the test, reached high temperatures, far beyond the normal operating temperature, and that may have led to the formation of toxic compounds due to the pyrolysis phenomenon.

By overheating a liquid containing glycerin, it could lead to the formation of acrolein, which demonstrated an inhibitory effect on the proliferation and cell adhesion of lung fibroblasts (6).

Likely, these compounds have then caused the cytotoxic effects detected in our tests.

In this analysis we can state that not all samples have given proof of toxicity, although all of them have been subjected to 120 puffs. It is true though that the e-cig model used in this study, having a synthetic fiber cartridge pad, is not able to provide a constant supply of liquid, therefore the outcome cannot be consistent. In addition, a correct filling method with liquid of this cartridge is more subjected to the skill of the operator for proper efficiency, if compared to more recent models. As well artefacts caused by defective or malfunctioning atomizers or contaminated with processing waste cannot be excluded. These are all factors that a machine

# Clear Stream project:

## Cytotoxicity assesment of an electronic cigarette vapour on 3T3 fibroblasts. Data review and comment

**G. Romagna**

e alla competenza dell'operatore. Non si possono poi escludere le anomalie prodotte da atomizzatori difettosi o mal funzionanti, o anche contaminati con residui di lavorazione, tutti aspetti che una macchina non sarebbe in grado di riconoscere.

Lo studio quindi sembrerebbe suggerire che, quando una sigaretta elettronica, opera in condizioni di scarsa umidificazione della resistenza, è in grado di produrre sostanze citotossiche.

Questa aspetto, finora solo sospettato, sembra avere adesso una prova scientifica documentata.

Al di là dei numerosi limiti di uno studio in vitro, questo progetto ha mostrato un approccio decisamente innovativo e fino ad oggi mai percorso, nella comprensione di questi dispositivi e delle loro implicazioni biochimiche e biologiche.

Questo, insieme ai tanti studi gascromatografici presenti in letteratura, contribuisce ad aggiungere un'altro tassello nella caratterizzazione della tossicità del vapore di sigaretta elettronica, di cui tanto si discute, ma di cui purtroppo poco si studia.

### Note

Alla luce dei dati e dei fenomeni osservati nel corso di questa prima fase, riporto quanto secondo me andrebbe rivalutato, nell'allestimento degli esperimenti, al fine di eliminare o ridurre al minimo le influenze legate al fattore umano, ad anomalie di funzionamento del dispositivo o a contaminazioni dello stesso.

- Valutare la possibilità di impiegare un hardware più moderno, con tecnologia Tank, che dovrebbe garantire una alimentazione più uniforme e costante

would not be able to detect.

Therefore, the study seems to prove clearly that when an electronic cigarette's resistance works in poor liquid supply conditions, it is able to produce cytotoxic substances.

This aspect, at first only suspected, now seems to have a scientific evidence.

Apart for the limits that come from an in vitro study, this project has shown a very innovative and revolutionary approach that was never attempted before, in order to better understand these devices and their biochemical and biological implications.

Along with many gas chromatography studies in the literature, this might add value in the toxicity characterization of an electronic cigarette's vapour, which is widely discussed, but unfortunately not so much studied.

### Notes

According to the outcome data and the phenomenons observed during the first stage of the study, I report here what in my opinion should be reviewed in matter of "how to setup the experiments properly", in order to obviate, or at least minimize, the influence relative to the human factor, the abnormal operation of the device, or the contamination of it.

- Consider the possibility of using a more recent hardware like "Tank" technology for instance, which should ensure a fair and constant supply of liquid to the

# Clear Stream project:

## Cytotoxicity assesment of an electronic cigarette vapour on 3T3 fibroblasts. Data review and comment

### G. Romagna

oltre ad essere meno soggetto ad errori legati all'inesperienza dell'operatore che allestisce il test.

- Tutti gli atomizzatori, coinvolti nel test, dovrebbero subire una lavaggio e un successivo rodaggio, con una base identica a quella prevista per il test ma priva della componente aromatica. Questa operazione andrebbe condotta da un utilizzatore abituale di questi dispositivi, che potrebbe riconoscere gli eventuali pezzi difettosi o mal funzionanti.
- Di tutti gli atomizzatori, andrebbe misurata la resistenza, scartando quelli che si discostano troppo dalla media
- L'assieme cartuccia tank preriempita + atomizzatore, andrebbe pesato con una bilancia di precisione, prima e dopo la prova, al fine di valutare la quantità di campione effettivamente vaporizzato durante la sessione di aspirazioni. Questo consentirebbe di riconoscere in anticipo, una anomalia di alimentazione o un esaurimento precoce del liquido campione e scartare il terreno prima di procedere alla coltura cellulare.
- L'autonomia della cartuccia, andrebbe valutata accuratamente con delle sessioni di prova, al fine di stabilire il numero massimo di aspirazioni erogabili.
- Le condizioni del test dovrebbero riprodurre il più possibile quelle di uso normale del prodotto, per questo credo che sarebbe più opportuno eseguire cicli di 20-30 aspirazioni, della durata di 4-5 secondi alternate da una pausa di 8-10 secondi, magari eseguendo più cicli con una pausa di 5-10 minuti. nella pausa è opportuno verificare visivamente la presenza di liquido residuo nella resistenza as well as being less error-prone due to inexperience of the operator who sets up the test.
- All atomizers involved in tests, should be washed and then run with a liquid that must be identical to the one provided for the test, but without the aromatic component. This operation should be performed by a user who is familiar with these kind of devices and who must be able to detect any defective or malfunctioning parts.
- For all the atomizers, the resistance value expressed in Ohm, should be measured, discarding all those which are way too far from the average.
- The pre-filled cartridge tank and the atomizer should be weighed together with a precision scale before and after the test, in order to assess the actual amount of sample vaporized during the session. This would allow us to detect in advance a supply failure or an early depletion of the liquid and discard the medium before to proceed with the cell culture process.
- The autonomy of the cartridge should be assessed thoroughly through test sessions, in order to determine the maximum number of available puffs.
- The test conditions should be similar as much as possible to the normal use of the device. For this reason, I believe it would be more suitable to run 20-30 puff cycles, lasting 4-5 seconds each alternated by a 8-10 seconds break, perhaps running more cycle with 5-10 minutes break from a cycle to the next. During the breaks, the quantity of liquid present in the cartridge should be visually verified to make sure that the test can be carried on.

# Clear Stream project:

## Cytotoxicity assesment of an electronic cigarette vapour on 3T3 fibroblasts. Data review and comment

### G. Romagna

cartuccia in quantità sufficiente a proseguire il test.

- La posizione spaziale del dispositivo, con un sistema tank è estremamente critica per garantire una buona alimentazione dell'atomizzatore, quindi a mio parere la sigaretta elettronica andrebbe orientata verso il basso quasi verticalmente
- Nei limiti del possibile andrebbe rivalutato il sistema di aspirazione, in modo tale da rendere il conteggio del numero delle aspirazione così come della loro durata e delle pause, totalmente automatizzato, andrebbe valutata anche la pressione di aspirazione cercando di renderla assimilabile a quella reale.

A mio parere andrebbero comunque adottate tutte le accortezze possibili al fine di ridurre al minimo, l'influenza del fattore umano, sul risultato dei test.

- The position of the device plays a leading role in a tank system, in order to ensure a proper supply to the atomizer. Therefore, in my opinion, the electronic cigarette should be oriented almost vertically.
- Where possible, the intake system should be improved, so that the number of puffs, as well as their duration and pauses, will be totally automated. Besides, the suction pressure should be registered in order to make it as real as possible.

In my opinion, however, all possible attentions and precautions should be taken to minimize the influence of human factor on the tests outcome.

### Note Bibliografiche / Bibliography

- 1) Base Heaven Juice (HJ) tradizionale, composta da Glicole propilenico 50%, glicerina 40%, acqua 10% / Juice Heaven (HJ) traditional base, consisting of 50% propylene glycol, 40% glycerine, 10% water
- 2) Ig Sanita Pubbl. 2006 May-Jun;62(3):241-54. **Evaluation of the cytotoxicity of cigarette smoke condensate by using different solvents** Martino A, Flamma F, Bassi A, Nunziata A, Andreoli C.(Article in Italian)
- 3) **Cytotoxicity and gene expression profiles in cell cultures exposed to whole smoke from three types of cigarettes.** Lu B, Kerepesi L, Wisse L, Hitchman K, Meng QR.
- 4) **Cytotoxicity, mutagenicity, and tumorigenicity of mainstream smoke from three reference cigarettes machine-smoked to the same yields of total particulate matter per cigarette.** Roemer E, Ottmueller TH, Zenzen V, Wittke S, Radtke F, Blanco I, Carchman RA.
- 5) Secondo quanto descritto nella norma UNI EN ISO 10993-5 relativa alla valutazione biologica dei dispositivi medici / as described in UNI EN ISO 10993-5 concerning the biological evaluation of medical devices
- 6) Am. J. Respir. Crit. Care Med. 1995;151:1497-1503 **Cigarette smoke inhibits lung fibroblast proliferation and chemotaxis.** Nakamura Y, Romberger DJ, Tate L, Ertl RF, Kawamoto M, Adachi Y, Mio T, Sisson JH, Spurzem JR, Rennard SI.
- 7) Lo studio è stato commissionato da FlavourArt s.r.l. al laboratorio Abich s.r.l. di Verbania(VB), che ha ideato e allestito l'esperimento eseguendo inoltre le analisi sui campioni prodotti. / The study was commissioned by FlavourArt srl to the Abich Lab srl Verbania (VB), which planned and set up the test and also performed analysis on the samples.