Clear Stream project:

Citotoxicity assesment of an electronic cigarette vapour on 3T3 fibroblasts. Data review and comment.
Updated data from the third laboratory analysis

G. Romagna

In seguito al riscontro, nei risultati della prima fase dello studio, di fenomeni di citotossicità, abbiamo deciso di analizzare e rivalutare la procedura di raccolta del campione, con lo scopo di comprendere, isolare e rimuovere le eventuali anomalie, che avrebbero potuto alterare gli esiti delle prove.
Dopo un'attenta valutazione, si è giunti alla conclusione che verosimilmente, le condizioni di esercizio della prima prova potevano esporre il sistema al rischio di surriscaldamento, fenomeno potenzialmente in grado di produrre la formazione, di composti tossici o irritanti .
Con lo scopo di standardizzare i campioni in modo rigoroso, si è deciso quindi di stilare una nuova procedura per l'allestimento dei campioni, mantenendo invariati i parametri di concentrazione nel terreno di coltura, così da garantire la confrontabilità dei test.

As a consequence of the confirmation of cytotoxicity phenomena in the first phase results of the study, we decided to analyze and revaluate sample collecting practice in order to understand, isolate and remove possible abnormalities which could have distorted test results.
After further investigation, we reached the conclusion that first test conditions could probably expose the system to overheating risk, phenomenon being potentially able to produce toxic and irritating compounds formation.
With the purpose of doing a meticulous compounds standardization, we decided to draw up a new compounds arrangement procedure, keeping concentration parameters of culture medium unchanged, in order to assure tests comparability.

Materiali e metodi

Per questa terza fase dello studio, si è scelto di utilizzare una sigaretta elettronica modella 510-T , con cartuccia XL avente una capienza di circa 0,6ml.
Tutti gli atomizzatori, sono stati lavati accuratamente con acqua distillata in un bagno ad ultrasuoni per 180 secondi.
Ogni atomizzatore è stato poi caricato con una cartuccia contenete liquido HJ a 9mg/ml non aromatizzato e quindi azionato da un utente esperto, che ne ha valutato il corretto funzionamento, rilevando anche la resistenza elettrica.
Tutti gli atomizzatori selezionati, avevano una variabilità della resistenza rispetto alla media, inferiore a 0,1Ohm.
Ogni atomizzatore è stato utilizzato per un unico test con un unico campione.

Equipments and methods

For this third study phase, we decided to use an electronic cigarette model 510-T, with XL cartridge having a capacity of about 0.6 ml.
All atomizers were carefully washed with distilled water in an ultrasonic bath for 180 seconds.
Each atomizer was then filled with a cartridge containing unflavored HJ liquid up to 9mg/ml and then it was activated by an expert user who estimated the right functioning and also pointing out electrical resistance.
All the selected atomizers had a resistance variability 0.1 Ohm lower than the average.
Each atomizer was used for a single test and with a single sample.

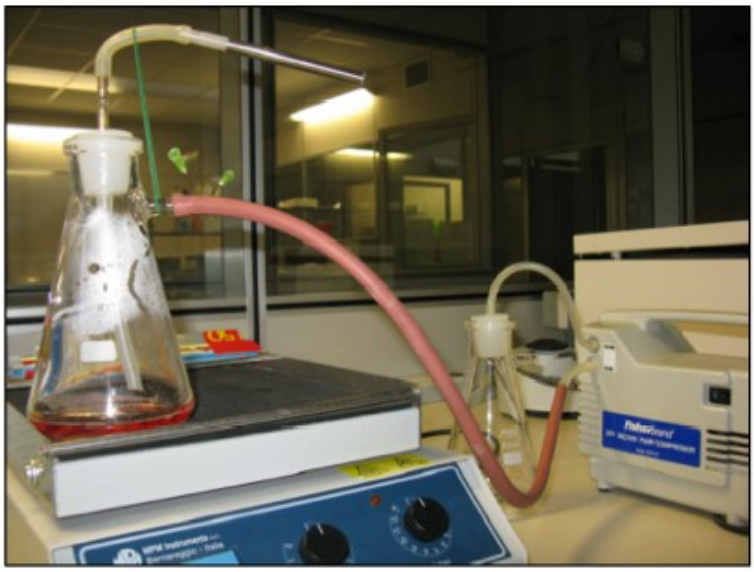
Clear Stream project:

Citotoxicity assesment of an electronic cigarette vapour on 3T3 fibroblasts. Data review and comment.
Updated data from the third laboratory analysis

G. Romagna

Una cartuccia XL è stata caricata con 0,4 ml di liquido campione e inserita nell'atomizzatore.
L'assieme cartuccia-atomizzatore è stato quindi pesato, annotando il peso di partenza.
La sigaretta elettronica così assemblata è stata collegata ad una beuta contenente 20ml di terreno di coltura cellulare, avendo cura che la cartuccia si trovasse più in alto rispetto all'atomizzatore, in posizione semi-verticale.

An XL cartridge was filled with 0.4 ml of sample liquid and putted in the atomizer.
The cartridge-atomizer mix was then weighted, noting down its initial weight.
Electronic cigarette collected in this way was connected to a flask containing 20 ml of cell culture medium, paying attention that the cartridge was higher than the atomizer in a semi-vertical position.



Nel corso dell'esperimento, veniva periodicamente monitorato il peso dell'assieme cartuccia-atomizzatore, interrompendo l'esperimento fino al raggiungimento di 200mg (circa 0,2ml) di liquido effettivamente vaporizzato.
Questo volume dissolto in 20 ml di terreno di coltura, produce un terreno contaminato con una quantità nota e precisa di campione in ragione dell'1%, secondo quanto stabilito dalla norma UNI EN ISO 10993-5 relativa alla valutazione biologica dei dispositivi medici opportunamente modificata allo scopo.
Nei casi in cui, il quantitativo vaporizzato superava il valore di 200mg , si provvedeva ad aggiungere terreno di coltura in quantità

During the test, the weight of cartridge-atomizer mix was periodically monitored, interrupting the test until attainment of 200mg (about 0.2ml) of liquid actually vaporized.
This volume dissolved in 20 ml of culture medium produces a contaminated soil with a precise and well-known amount of sample at the rate of 1%, in compliance with the UNI EN ISO 10993-5 standard concerning the biological evaluation of medical devices, modified for the purpose.
When vaporized quantity exceeded 200mg value, we provided additional culture medium in appropriate and proportional amount to normalize all the samples up to 1%.
During the test, atomizer outside temperature

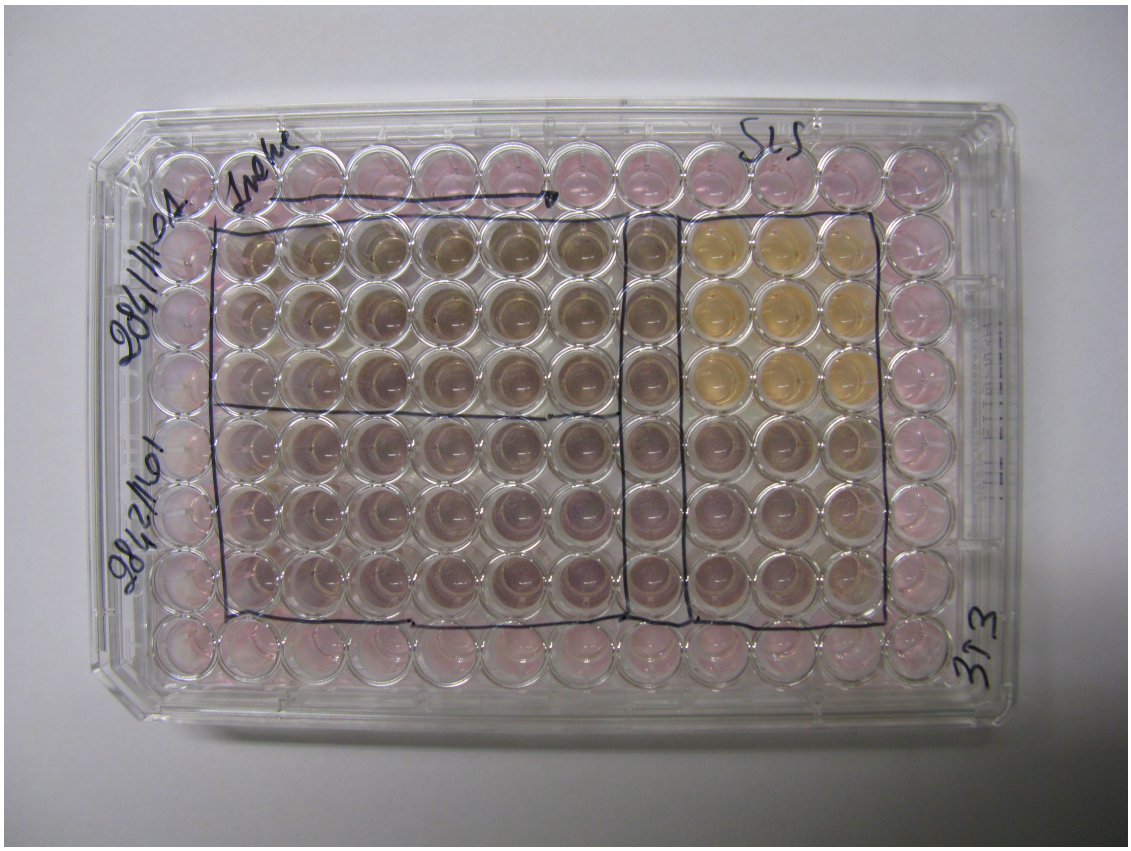
Clear Stream project:

Citotoxicity assesment of an electronic cigarette vapour on 3T3 fibroblasts. Data review and comment.
Updated data from the third laboratory analysis

G. Romagna

adeguata e proporzionale a normalizzare tutti i campioni all'1%.
Durante il test, è stata monitorata la temperatura esterna dell'atomizzatore con una sonda adesiva.
Nel corso degli esperimenti condotti, non si sono riscontrate anomalie nella temperatura rilevata sull'atomizzatore.
i campioni così raccolti sono stati poi sottoposti al test di citotossicità su fibroblasti 3T3 con metodica MTT come per i precedenti campioni.
In aggiunta al controllo positivo con il fumo di sigaretta tradizionale, è stato inserito un controllo interno con SLS (Sodium Lauryl Sulfate), per meglio valutare la responsività della linea cellulare.

was monitored with an adhesive probe.
In the course of the conducted experiments, no abnormalities were noticed concerning atomizer monitored temperature.
The collected samples were then submitted to cytotoxicity test on 3T3 fibroblasts with MTT methodology as for previous samples.
In addition to the positive control with the traditional cigarette smoke, we includedan internal control with SLS (Sodium Lauryl Sulfate), to better evaluate the responsiveness of the cell line.



Clear Stream project:

Citotoxicity assesment of an electronic cigarette vapour on 3T3 fibroblasts. Data review and comment. Updated data from the third laboratory analysis

G. Romagna

Considerazioni sulla nuova procedura

Nella precedente batteria di esami, sono state evidenziate delle criticità, legate a diversi aspetti delle fasi di allestimento e raccolta del campione. Nel sospetto che queste criticità, potessero alterare i risultati dei test, si è deciso di ristrutturare la parte iniziale della procedura, alla luce di alcune considerazioni sul funzionamento del dispositivo.
Nella prima fase dello studio, era stata utilizzata una sigaretta elettronica modello 510 standard con batteria automatica, caricando le cartucce con 0,3 ml di liquido, eseguendo 120 aspirazioni , nell'ottica di vaporizzare completamente il liquido contenuto nella cartuccia.
il target infatti era quello di vaporizzare 0,3ml in 30ml di terreno di coltura contenuto nella beuta.
Quindi le aspirazioni venivano eseguite in eccesso, proprio per assicurarsi di vaporizzare tutto il liquido contenuto nella cartuccia.
In questa terza fase, abbiamo scelto di usare una sigaretta elettronica 510 T, che dispone di un serbatoio trasparente, che consente di valutare agevolmente il consumo di liquido.
Inoltre abbiamo modificato la logica di raccolta del campione, poichè ha poco senso utilizzare come riferimento il numero di boccate, visto che la quantità di liquido vaporizzato con ogni boccata è diversa tra un dispositivo e l'altro e anche tra un individuo e l'altro.
Abbiamo quindi deciso di orientare la nostra attenzione sul volume di liquido effettivamente vaporizzato, così da avere un dato di riferimento preciso, correlato con qualcosa di misurabile e indipendente dalla tipologia del dispositivo impiegato.
Per fare questo, la nuova procedura, ha impiegato una bilancia di precisione, per valutare la variazione di peso dell'assieme

Remarks on the new procedure

In the previous set of tests, some critical situations were pointed out due to different aspects in sample preparation and collecting. Suspecting these critical situations could have distorted test results, we decided to renovate the initial part of procedure in the light of some considerations about device functioning.
In the first phase of the study, we used an electronic cigarette model 510 standard with automatic battery, filling cartridges with 0.3 ml of liquid, making 120 puffs, in order to totally vaporize the liquid contained in the cartridge.
The target was indeed to vaporize 0.3 ml in 30 ml of culture medium contained in the flask.
Then, puffs were done in excess, just to be sure all the liquid in the cartridge was vaporized.
In this third phase, we decided to use an electronic cigarette 510 T, having a transparent tank which let easily estimate liquid consumption.
Moreover, we modified the logic of sample collecting, since it is senseless using as reference system the number of puffs considering that the amount of vaporized liquid for each puff is different from each device and each person.
Thus, we decided to direct our attention toward the volume of liquid actually vaporized, so that we could have an accurate reference, correlated with something measurable and independent of any used device.
To do this, new procedure used a precision balance to measure weight variation of the cartridge-atomizer mix, in order to notice the amount of vaporized liquid, going on with puffs up to desired liquid volume attainment.
This simple trick lets us be sure the sample we want to analyze is really vaporized in the adequate amount for our purposes and in particular is the indirect evidence that our

Clear Stream project:

Citotoxicity assesment of an electronic cigarette vapour on 3T3 fibroblasts. Data review and comment.
Updated data from the third laboratory analysis

G. Romagna

cartuccia-atomizzatore, così da rilevare la quantità di liquido vaporizzato, procedendo con le aspirazioni fino al raggiungimento del volume di liquido desiderato.
Questo semplice accorgimento, ci permette inoltre di essere sicuri che il campione che vogliamo analizzare, sia stato effettivamente vaporizzato, nelle quantità adeguate per i nostri scopi e soprattutto ci fornisce la prova indiretta che il dispositivo ha funzionato correttamente.
Infatti una anomalia nell'alimentazione, sarebbe facilmente riconosciuta, per via del ridotto consumo di liquido.
E' importante sottolineare che, sebbene la quantità di liquido vaporizzato in questa terza tornata di test, sia inferiore(0,2ml contro 0,3) , il rapporto di concentrazione tra liquido e terreno di coltura è rimasto invariato(0,2ml/20ml = 0,3ml/30ml), mantenendo sempre l'1% di contaminante, questo ci consente di paragonare i risultati di questo test con quelli precedenti.
La durata delle aspirazioni, cosi come il loro numero, sono state ricavate da una simulazione preliminare, mentre l'intervallo tra una aspirazione e l'altra è stato regolato a vista, valutando la quantità di vapore nella beuta e attendendo che tutto il vapore, si disperdesse completamente nel terreno prima di eseguire l'aspirazione successiva.
Con questo sistema la pausa ottimale tra una aspirazione e la successiva, è stata di 60 secondi.
Nel corso di una simulazione preliminare, si è potuto osservare che, quando il dispositivo si trova in una posizione sfavorevole all'alimentazione di liquido, la temperatura del guscio esterno raggiunge i 70 C° dopo appena 3 aspirazioni.
Mentre quando l'alimentazione è corretta, non si riscontrano significative variazioni di temperatura.

device worked properly.
Indeed, a supply abnormality would be easily recognized because of a smaller liquid consumption.
It is important to highlight that even though the amount of vaporized liquid in this third test session was lower (0.2 ml in spite of 0.3) the concentration ratio between liquid and culture medium is unchanged (0.2 ml/20 ml = 0.3 ml/30 ml), maintaining always 1% of contaminant, this let us compare the results of this test to the previous ones.
The length of puffs, as well as their number, were obtained through a preliminary simulation, while the pause between puffs was adjusted at the moment, measuring the amount of vapor in the flask and waiting for all the vapor to completely straggle in the soil before doing the following puff.
With this system the optimal pause between a puff and the next one was 60 seconds long.
During a preliminary simulation we could observe that when the device is in a unfavorable position to liquid supply, shell's outside temperature reaches 70° C just after 3 puffs.
On the contrary, when supply is correct no meaningful temperature variations are observed.

Clear Stream project:

Citotoxicity assesment of an electronic cigarette vapour on 3T3 fibroblasts. Data review and comment.
Updated data from the third laboratory analysis

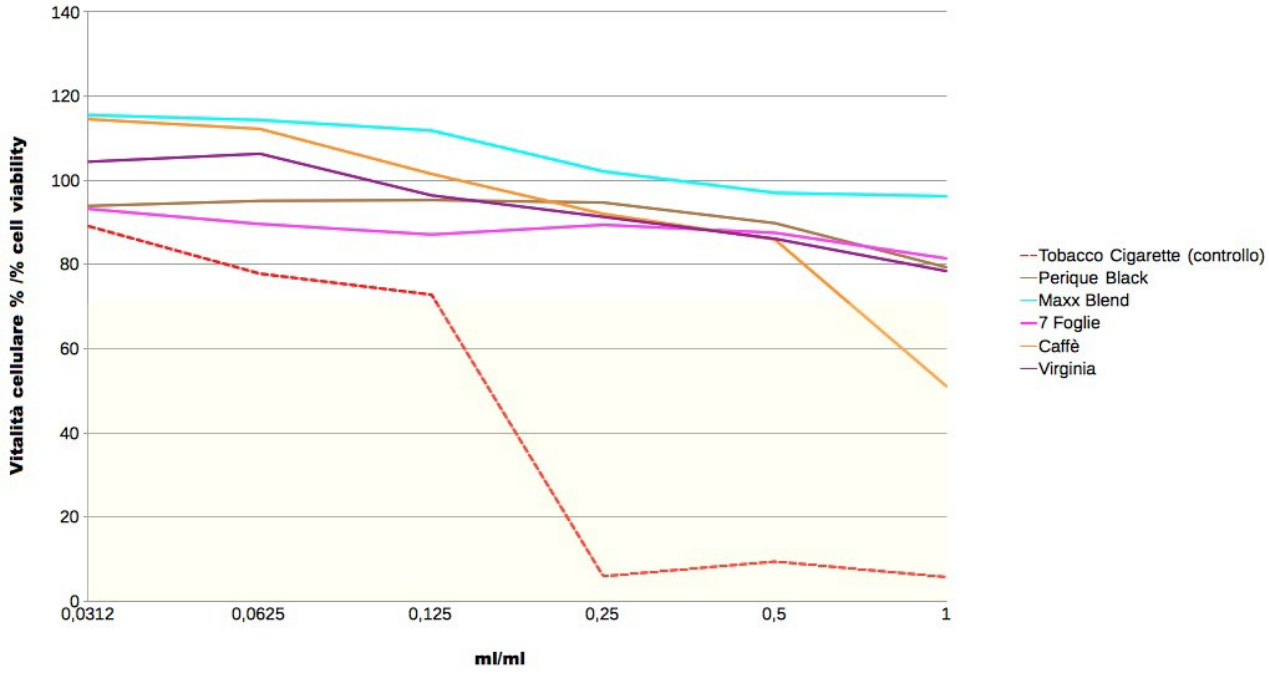
G. Romagna

Risultati

In questa terza fase sono stati testati nuovamente 5 campioni, che nella prima fase avevano dato esito di citotossicità.
Con questa nuova procedura, solo uno dei cinque campioni (aroma Caffè)ha manifestato una debole citotossicità, mentre tutti gli altri, si sono rivelati non citotossici.
Il confronto con la tossicità acuta prodotta dal fumo di sigaretta tradizionale è adesso ancora più evidente.

Results

In this third phase we tested again 5 samples that in first phase have been positive to cytotoxicity test.
With this new procedure, only one of the five samples (Coffee flavour) showed slight cytotoxicity, while all the other ones were not cytotoxic.
The comparison with the acute toxicity of traditional cigarette smoke is now even more evident.



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%).

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)

Clear Stream project:

Citotoxicity assesment of an electronic cigarette vapour on 3T3 fibroblasts. Data review and comment.
Updated data from the third laboratory analysis

G. Romagna

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
Perique Black	93,9	95,1	95,3	94,7	89,8	79,3	nd
Maxx Blend	115,5	114,3	111,8	102,1	97	96,2	nd
7 Foglie	93,2	89,6	87,1	89,4	87,5	81,4	nd
Caffè	114,5	112,2	101,5	92	85,9	51	nd
Virginia	104,4	106,3	96,4	91,3	86,1	78,4	nd

Questi risultati, confermano le ipotesi prodotte dalla prima fase di test, che hanno condotto alla revisione della procedura di allestimento e raccolta del campione e rimarcano il fatto che in condizioni di scarsa alimentazioni o di surriscaldamento, è plausibile ipotizzare la produzione di composti tossici e irritanti.

These results confirm hypothesis presented in first test phase: they led to the reassessment of samples preparation and collecting procedure and pointed out the fact that in case of weak supply or overheating, it is plausible to suppose the production of toxic and irritating compounds.