



ABICH S.r.l.

Analisi Biologiche e Chimiche
Tossicologia, Ricerche e Servizi

VALUTAZIONE DELLA CITOTOSSICITA' ***Cytotoxicity Evaluation***

Secondo la norma UNI EN ISO 10993-5 modificata
Following the UNI EN ISO 10993-5 rule modified

COMMITTENTE/CUSTOMER	FLAVOURART S.r.l Via Carmine snc 28047 Oleggio (NO) - Italy
CAMPIONE/SAMPLE	Sigaretta elettronica modello 510 con Aroma Heaven Juice Tradizionale - 9mg Nicotina - Aroma Camtel Ultimate FA0576 Lotto/Batch: 1102029
DATA RAPPORTO/REPORT DATE	26/05/2011
PROTOCOLLO N./REPORT N.	REL/0491/2011/CITO/ELB

Pagina 1 di 14
REL/0491/2011/CITO/ELB

AZIENDA CERTIFICATA
UNI EN ISO 9001:2008
Certificato N. 501004992 – Rev. 03

www.abich.it

Direzione, uffici e
laboratorio analisi:
Via 42 Martiri, 213/B
28924 – Verbania (VB) Italia
Tel +39 0323 586239/496041
Fax +39 0323 496877
e-mail: info@abich.it

Centro studi clinici e
cosmetologici:
Via Bruno Buozzi, 4
20090 – Vimodrone (MI) Italia

Sede legale:
Via 42 Martiri, 213/B
28924 – Verbania (VB) Italia
CF/P.IVA/Reg. Imp. VCO: 01864020035
R.E.A.: 189901
Cap. Soc. € 16.000,00 i.v.



ABICH S.r.l.

Analisi Biologiche e Chimiche
Tossicologia, Ricerche e Servizi

Premessa/Preliminary

Questo rapporto contiene i dati sperimentali registrati durante l'esecuzione del test eseguito sul prodotto in oggetto.

I risultati del test sono presentati sotto forma di tabelle e grafici riassuntivi per agevolare l'interpretazione.

La prima parte fornisce informazioni circa il committente, il prodotto testato, il tipo di test, il laboratorio esecutore, le date di inizio e fine studio e l'identità degli sperimentatori.

La seconda parte descrive il protocollo sperimentale.

La terza parte riporta i risultati e le conclusioni.

This report contains the experimental data compiled during the in vitro studies of the test product.

The test results are presented in a concise table format for easy interpretation.

The first part provides information regarding sponsor and test product identifications, assay type, entrusted laboratory, study initiation and completion dates and supervisory personnel.

The second part describes the study design, including materials and procedures.

The test results and conclusions are presented in the third and last part of the report.

Nota/Note:

Il risultato dei test citati nel presente rapporto si riferisce esclusivamente al prodotto/i testato/i e alle particolari condizioni sperimentali impiegate nel test. Il presente rapporto o parti di esso possono essere riprodotti solo con il consenso degli sperimentatori.

The results reported in the present brochure refer only to the tested sample/samples and to the particular experimental conditions hereby described. This report or parts of it can be reproduced only with the experimenters' agreement.



ABICH S.r.l.

Analisi Biologiche e Chimiche
Tossicologia, Ricerche e Servizi

Sommario/Summary

1	PARTE PRIMA/PART ONE – INFORMAZIONI GENERALI/GENERAL INFORMATION	4
1.1	COMMITTENTE/CUSTOMER	4
1.2	CAMPIONE ANALIZZATO/TESTED MATERIAL	4
1.3	TEST/ASSAY	4
1.4	DATE DELLO STUDIO/STUDY DATES	4
1.5	DATE DELLO STUDIO/STUDY DATES	5
1.6	SPERIMENTATORE/EXPERIMENTER	5
1.7	SUPERVISORE SCIENTIFICO/SCIENTIFIC SUPERVISOR	5
2	PARTE SECONDA/PART TWO - PROTOCOLLO SPERIMENTALE/STUDY DESIGN	6
2.1	SCOPO DEL TEST/AIM OF THE TEST	6
2.2	ESECUZIONE DEL TEST/ASSAY PROCEDURES	6
2.2.1	<i>Modelli adottati/Test systems</i>	6
2.2.2	<i>Terreno cellulare/ Cell medium</i>	7
2.2.3	<i>Preparazione del campione/Sample preparation</i>	7
2.2.4	<i>Trattamento ed esposizione /Treatment and exposure</i>	8
2.2.5	<i>Test di citotossicità MTT/ The MTT cytotoxicity assay</i>	8
2.2.6	<i>Espressione e valutazione dei risultati/ Expression and evaluation of results</i>	9
3	PARTE TERZA/PART THREE - RISULTATI E CONCLUSIONI/RESULTS AND CONCLUSIONS	10
3.1	RISULTATI/RESULTS	10
3.2	CONCLUSIONI/CONCLUSIONS	13
4	BIBLIOGRAFIA/BIBLIOGRAPHY	14

ABICH S.r.l.

Analisi Biologiche e Chimiche
Tossicologia, Ricerche e Servizi



ABICH S.r.l.

Analisi Biologiche e Chimiche
Tossicologia, Ricerche e Servizi

1.5 Date dello Studio/Study Dates

Inizio/Start: 16/05/2011

Fine/End: 18/05/2011

1.6 Sperimentatore/Experimenter

Dr. Allifranchini Elena, Biotecnologa/ Biotechnologist
ABICH S.r.l.
Via 42 Martiri, 213/B – 28924
Verbania –Italy tel +39 (0)323 586239 fax +39 (0)323 496877

1.7 Supervisore Scientifico/Scientific Supervisor

Dr. Elena Bocchietto – Biologa specialista in
Biotecnologie / Biologist, biotechnology specialist.
ABICH S.r.l.
Via 42 Martiri, 213/B – 28924 Verbania
Tel +39 (0)323 586239 – Fax +39 (0)323 496877



ABICH S.r.l.

Analisi Biologiche e Chimiche
Tossicologia, Ricerche e Servizi

2 PARTE SECONDA/PART TWO - PROTOCOLLO SPERIMENTALE/STUDY DESIGN

2.1 Scopo del test/Aim of the test

Scopo del test è valutare la citotossicità del condensato del fumo aspirato ottenuto con 120 aspirazioni della sigaretta elettronica nei confronti di cellule che compongono gli epiteli quali i fibroblasti, secondo quanto descritto nella norma UNI EN ISO 10993-5 relativa alla valutazione biologica dei dispositivi medici opportunamente modificata allo scopo.

La citotossicità del condensato ottenuto simulando l'esposizione a cui è soggetto l'utilizzatore della sigaretta è un buon indicatore della sicurezza d'uso del dispositivo in oggetto e della sua tossicità globale nei confronti dell'epitelio respiratorio. Dal momento che non esistono dati pubblicati relativi a studi analoghi effettuati su simili dispositivi, è stato utilizzato come controllo di riferimento il condensato di fumo di tabacco ottenuto in condizioni analoghe con una sigaretta tradizionale.

La metodica utilizzata per il saggio di vitalità cellulare è quella dell'MTT, semplice e riproducibile. Il reagente chiave è il 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide o MTT, sostanza che dà un colore giallo in soluzione acquosa. La deidrogenasi mitocondriale delle cellule vitali taglia l'anello tetrazolico, portando alla formazione di cristalli di formazano color viola porpora insolubili in acqua. I cristalli vengono sciolti in isopropanolo e la soluzione viola risultante viene misurata spettrofotometricamente. Un aumento o diminuzione delle cellule vitali ha per risultato un cambiamento concomitante nella quantità di formazano che si forma e che può essere considerato come un indicatore del grado di citotossicità causato dall'esposizione alle sostanze in esame.

Aim of the test is to evaluate the cytotoxicity towards fibroblasts of the condensed inspired smoke obtained following 120 inspiration of the electronic cigarette. As no specific official methods are available, we followed the UNI EN ISO 10993-5 rule concerning the biological evaluation of medical devices, modified for the purpose.

The cytotoxicity of the condensed smoke obtained by simulating the use conditions of the electronic cigarette, may be considered as a good indicator of its general toxicity versus the cells of the respiratory epithelia. Due to the general lack of published experimental data on the subject, to refer to, we also investigated in similar conditions a traditional tobacco cigarette to compare the results.

The MTT assay is used to assess the cell vitality. The key component is (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) or MTT. This product is of yellowish colour in solution. Mitochondrial dehydrogenases of viable cells cleave the tetrazolium ring, leading to the formation of purple crystals which are insoluble in aqueous solutions. The crystals are re-dissolved in isopropanol and the resulting purple solution is measured spectrophotometrically. An increase or decrease in cell number results in a concomitant change in the amount of formazan formed, indicating the degree of cytotoxicity caused by the test material.

2.2 Esecuzione del test/Assay procedures

2.2.1 Modelli adottati/Test systems

Il modello cellulare utilizzato per il test in vitro è rappresentato da: //In vitro test system employed consists of:

fibroblasti murini (cellule 3T3)/murine fibroblasts (3T3)



ABICH S.r.l.

Analisi Biologiche e Chimiche
Tossicologia, Ricerche e Servizi

La linea cellulare deriva da fibroblasti di topo albino ceppo Swiss stabilizzati da embrioni/Cell line derives from Swiss albino mouse fibroblasts established from albino mouse embryos.

La linea cellulare utilizzata è rappresentativa del tessuto a cui verrà in contatto il prodotto. / The employed cell line is representative of the tissue supposed to come in contact with the product.

2.2.2 Terreno cellulare/ Cell medium

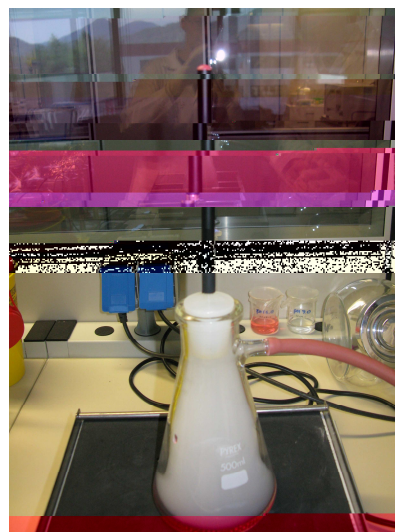
Di seguito riportiamo l'elenco del terreno e i reagenti utilizzati con i relativi lotti./ We reported above the list of the utilized medium and reagents with the batches.

- Dulbecco's basal medium (MEM) Euroclone lotto/batch: EUM0090085
- Pennicillina-Streptomicina / Pennicillin-Streptomycin 0,1mg/ml (Euroclone) lotto/batch: EUM0061816
- Kanamicina/ Kanamycin 0.1mg/ml (SIGMA) lotto/batch: 115k00772
- Non Essential Aminoacid 0,1mg/ml (SIGMA) lotto/batch 029K2390
- Glutamina/ Glutamine 4mM (Euroclone) lotto/batch: EUM0080054
- Fetal Bovin serum (FBS) (Euroclone) lotto/batch: EUS0071169

pH 7,2 - 7,4.

2.2.3 Preparazione del campione/Sample preparation

E' stata eseguita una simulazione di aspirazione/inalazione, utilizzando un sistema comprendente una beuta collegata con la sigaretta elettronica tramite un corto tubo di silicone (3 cm) e contenente 30 ml di terreno di coltura MEM + 10% FBS e collegata tramite un altro tubo di silicone ad una pompa a vuoto./ An aspiration/inhalation simulation system was made up connecting the electronic cigarette to a flask, with 30ml of MEM medium culture + 10% FBS by a short silicone tube (3 cm) and connected to a vacuum pump by an other silicone tube.



Pagina 7 di 14
REL/0491/2011/CITO/ELB



ABICH S.r.l.

Analisi Biologiche e Chimiche
Tossicologia, Ricerche e Servizi

Figura/ Figure 2.2.2.1 Sistema di aspirazione/ aspiration system

Sono stati effettuati 120 cicli di aspirazione/inalazione della sigaretta elettronica di 3" ciascuno e 15 cicli di aspirazione/inalazione della sigaretta tradizionale, mantenendo costantemente il terreno di coltura in agitazione tramite agitatore a piastra per favorire lo sviluppo di aerosol e la raccolta del condensato del fumo. Alla fine di queste operazioni di simulazione il terreno di coltura contenuto nella beuta è stato raccolto e identificato come condensato Sigaretta elettronica con Fragranza Heaven Juice Tradizionale - 9mg Nicotina - (ottenuto dall'aspirazione della sigaretta elettronica) e condensato Sigaretta Marlboro (ottenuto dalla sigaretta tradizionale)./ 120 cycles of inhalation/aspiration of 3" each were made with the electronic cigarette and 15 cycles of inhalation/aspiration of the traditional cigarette. The medium were kept swirling by means of a plate shaker, all along the experiment, to easy the development of an aerosol and the collection of a condensed smoke in the flasks. At the end of the treatment the medium cultures have been collected, called condensed Electronic cigarette with Heaven Juice (obtained from electronic cigarette) and condensed Marlboro (obtained from tobacco cigarette Marlboro), and analysed for their cytotoxicity.

2.2.4 *Trattamento ed esposizione /Treatment and exposure*

Le cellule sono state seminate in piastre da 96 pozzetti per 24h in MEM + 10% FBS. Quindi è stato aggiunto il condensato della sigaretta elettronica e tradizionale in modo da raggiungere 6 diluizioni finali comprese tra 1 e 0,03125 ml/ml.

Ogni campione è stato testato in triplicato. Cellule non trattate sono state utilizzate come controllo negativo. Al termine dell'incubazione è stato quindi eseguito il test di citotossicità (MTT) per valutare la percentuale di sopravvivenza cellulare. Il test MTT valuta l'impatto tossico della sostanza in questione sulla vitalità cellulare.

Cells are seeded in 96 wells plates, for 24 h in DMEM + 10% FBS. Condensed electronic cigarette is added with 5 scalar dilutions ranging from 1 to 0.03125 ml/ml. For each dilution, 3 replica were performed. At the end of the incubation, cells are tested for vitality with the citotoxicity (MTT assay). Untreated cells were used as negative control.

The MTT assay is able to evaluate the toxic impact of the tested compound on the cells viability.

2.2.5 *Test di citotossicità MTT/ The MTT cytotoxicity assay*

Il test MTT è semplice, accurato e fornisce risultati riproducibili. Questo metodo è stato sviluppato originariamente da Mossman. Il reagente chiave è il 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide o MTT, sostanza che dà un colore giallo in soluzione acquosa. La deidrogenasi mitocondriale delle cellule vitali taglia l'anello tetrazolico, portando alla formazione di cristalli di formazano color viola porpora insolubili in acqua. I cristalli vengono sciolti con una soluzione solubilizzante l'MTT.

La soluzione viola risultante viene misurata spettrofotometricamente. Un aumento o diminuzione delle cellule vitali ha per risultato un cambiamento concomitante nella quantità di formazano che si forma e che può essere considerato come un indicatore del grado di citotossicità causato dall'esposizione alle sostanze irritanti.

Dopo 24h di trattamento il terreno di coltura viene aspirato e le cellule incubate in 150 µl/pozzetto di una soluzione 1mg/ml di MTT, per 2h a 37°C. la soluzione viene rimossa e sostituita con 200 µl/pozzetto di isopropanolo con successivi 30' di incubazione a temperatura ambiente e con agitazione a media velocità. Viene letta l'assorbanza a 550 nm con un colorimetro (Tecan modello Sunrise remote) equipaggiato con un lettore di piastre sottraendo la lettura del fondo a 690 nm. Le assorbanze vengono corrette sottraendo le letture dovute al mezzo diluente.

Pagina 8 di 14
REL/0491/2011/CITO/ELB



ABICH S.r.l.

Analisi Biologiche e Chimiche
Tossicologia, Ricerche e Servizi

The MTT assay is simple, accurate and yields reproducible results. This method has been developed originally by Mossman. The key component is (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) or MTT. This product is of yellowish colour in solution. Mitochondrial dehydrogenases of viable cells cleave the tetrazolium ring, leading to the formation of purple crystals which are insoluble in aqueous solutions. The crystals are re-dissolved with the MTT Solubilization Solution and the resulting purple solution is measured spectrophotometrically. An increase or decrease in cell number results in a concomitant change in the amount of formazan formed, indicating the degree of cytotoxicity caused by the test material

After 24h exposure of the cells to the test material, the culture medium is removed and the cells incubated for 2 h in 150 µl/well of 1mg/ml MTT solution at 37°C. The solution is then removed and replaced with 200 µl/well of isopropanol, with further 30' incubation at room temperature under medium speed shaking.

The absorbance at 550 nm is measured with a microplate reader (Tecan modello Sunrise remote), with background clearing at 690 nm. The absorbance values are corrected by subtracting the reading of the blanks, with the diluent only.



ABICH S.r.l.

Analisi Biologiche e Chimiche
Tossicologia, Ricerche e Servizi

3 PARTE TERZA/PART THREE - RISULTATI E CONCLUSIONI/RESULTS AND CONCLUSIONS

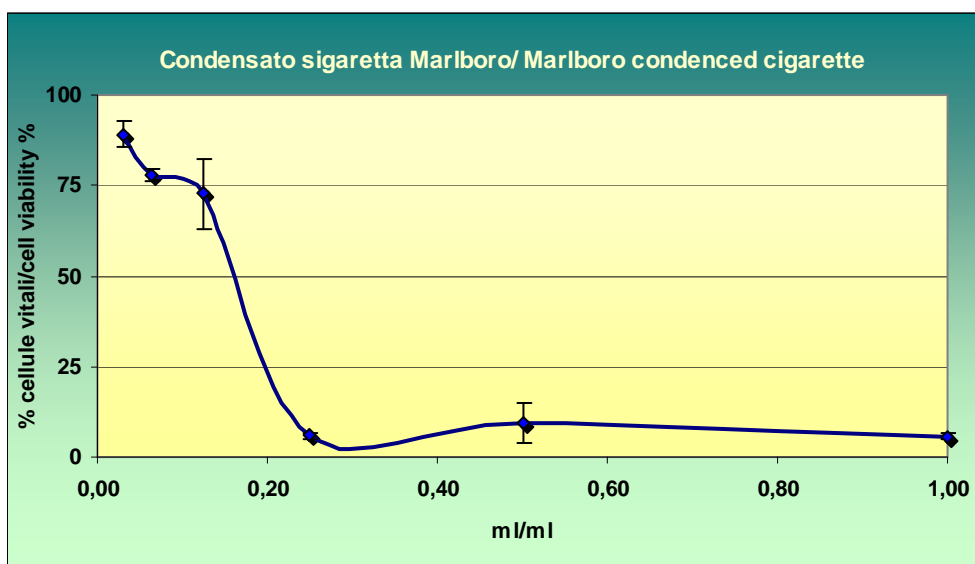
3.1 *Risultati/Results*

Condensato Marlboro/ Condensed Marlboro (controllo positivo/positive control)						
Dose ml/ml	1 (tal quale, undiluted)	0,5 (1:2)	0,250 (1:4)	0,125 (1:8)	0,0625 (1:16)	0,0312 (1:32)
Vitalità cellulare % (rispetto al controllo negativo)/% cell viability (vs negative control)	5,7	9,4	5,9	72,8	77,8	89,1
stand. dev.	0,7	5,3	0,9	9,7	1,8	3,5

IC₅₀ = 0,16 ml/ml

Viene evidenziata una mortalità cellulare > 30% alle prime tre diluizioni testate.

A mortality cell > 30% is pointed out at the first three tested dilutions.



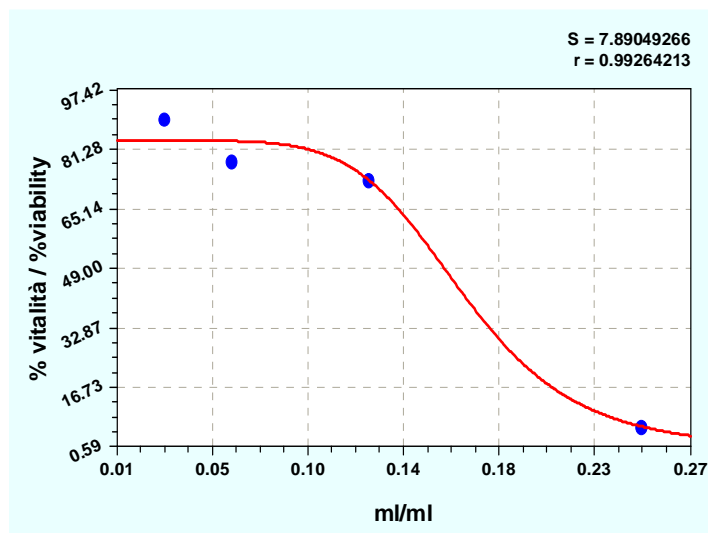
**Espressione della vitalità cellulare dopo trattamento con dosi crescenti di condensato/
Cell vitality expression after treatment with increasing amount of condensed.**

Pagina 10 di 14
REL/0491/2011/CITO/ELB



ABICH S.r.l.

Analisi Biologiche e Chimiche
Tossicologia, Ricerche e Servizi



Curva di regressione per il calcolo dell'IC₅₀/Regression plot to calculate the IC₅₀ dose



ABICH S.r.l.

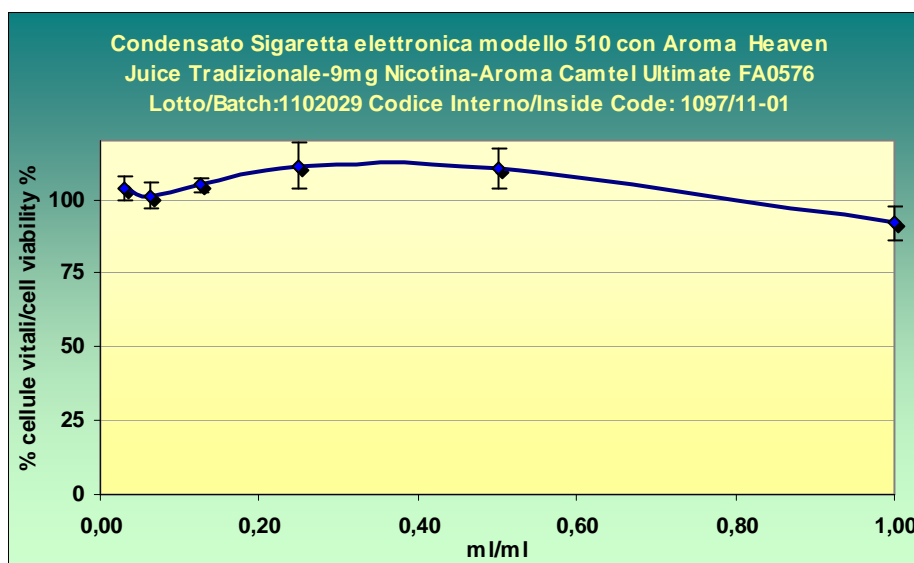
Analisi Biologiche e Chimiche
Tossicologia, Ricerche e Servizi

**Condensato Sigaretta elettronica modello 510 con Aroma Heaven Juice Tradizionale -
9mg Nicotina - Aroma Camtel Ultimate FA0576 Lotto/Batch: 1102029
Codice interno/internal code: 1097/11-01**

Dose ml/ml	1 (tal quale, undiluted)	0,5 (1:2)	0,250 (1:4)	0,125 (1:8)	0,0625 (1:16)	0,0312 (1:32)
Vitalità cellulare % (rispetto al controllo negativo)/% cell viability (vs negative control)	92,0	110,5	111,4	104,8	101,3	103,8
stand. dev.	5,9	6,8	7,9	2,6	4,5	4,0

Non viene evidenziata mortalità cellulare significativa alle concentrazioni testate

Any significant cell mortality is pointed out at all tested concentrations.



**Espressione della vitalità cellulare dopo trattamento con diverse diluizioni del prodotto testato/
Cell vitality expression after treatment with different dilutions of the tested product**



ABICH S.r.l.

Analisi Biologiche e Chimiche
Tossicologia, Ricerche e Servizi

3.2 Conclusioni/Conclusions

Sulla base dei risultati sopra riportati, il condensato del fumo ottenuto simulando l'uso del prodotto/On the bases of the results here shown, the condensed smoke obtained by simulating the use of the product:

Condensato Sigaretta elettronica modello 510 con Aroma Heaven Juice Tradizionale - 9mg Nicotina - Aroma Camtel Ultimate FA0576

Lotto/Batch: 1102029

non ha causato effetti citotossici alle concentrazioni testate su fibroblasti.

Il condensato ottenuto con fumo di 1 sigaretta tradizionale (15 cicli di aspirazione) usato come controllo ha causato alla concentrazione più alta testata l'86,3% di mortalità cellulare in più rispetto all'aerosol condensato ottenuto da 1 filtro di sigaretta elettronica (120 cicli di aspirazione).

did not cause cytotoxic effects at all tested concentrations on fibroblasts.

The condensed smoke from 1 traditional cigarette (15 inspiration strokes) used as a control caused at the highest tested concentration 86.3% plus of cell mortality if compared to the condensed aerosol from 1 filter of electronic cigarette (120 inspiration stroke)

Data/Date: 26/05/2011

Il Responsabile dello studio/ Study Monitor
Dr. Elena Bocchietto

Pagina 13 di 14
REL/0491/2011/CITO/ELB

AZIENDA CERTIFICATA
UNI EN ISO 9001:2008
Certificato N. 501004992 – Rev. 03

www.abich.it

**Direzione, uffici e
laboratorio analisi:**
Via 42 Martiri, 213/B
28924 – Verbania (VB) Italia
Tel +39 0323 586239/496041
Fax +39 0323 496877
e-mail: info@abich.it

**Centro studi clinici e
cosmetologici:**
Via Bruno Buozzi, 4
20090 – Vimodrone (MI) Italia

Sede legale:
Via 42 Martiri, 213/B
28924 – Verbania (VB) Italia
CF/P.IVA/Reg. Imp. VCO: 01864020035
R.E.A.: 189901
Cap. Soc. € 16.000,00 i.v.



ABICH S.r.l.

Analisi Biologiche e Chimiche
Tossicologia, Ricerche e Servizi

4 BIBLIOGRAFIA/BIBLIOGRAPHY

- 1 Norma UNI EN ISO 10993-5 Valutazione biologica dei dispositivi medici/ biological evaluation of medical devices – Prove per la citotossicità in vitro/ assays for the in vitro cytotoxicity- Settembre 2009.
- 2 Jürgen Fuchs, Norbert Groth and Thomas Herrling. (2000). In vitro and in vivo assessment of the irritation potential of different spin traps in human skin. *Toxicology*. **151**: 55-63.
- 3 Losio N. et al. In vitro product safety evaluation: a citotoxicity study on oral care formulations containing usnic acid, a natural anti-microbial agent extracted from tree lichen, 3rd World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, Bologna, 29 Agosto-2 settembre 1999.
- 4 Botham P.A., Earl L.K., Fentem J.H., Roguet R., van deSandt J.J.M. (1998) Alternative methods for skin irritation testing: the current status. *ATLA* **26**: 195-211.
- 5 Ohno T., Futamura Y., Harihara A., Hatao M., Hayasaka A. (1998) Validation study on five cytotoxicity assays by JSAE- VIII. Details of the neutral red uptake assay. *Alternatives to animal testing and experimentation*, **5**:131-145.
- 6 Lawrence, J.N., Dickson, F.M. and Benford, D.J. (1997). Skin irritant-induced cytotoxicity and prostaglandin E₂ release in human skin keratinocyte cultures. *Toxicology in Vitro* **11**: 627-631.
- 7 Tsutsui, T., Tanaka, Y., Ushimura, A., Ide, T., Matsumura, M. and Barrett, J.C. (1997). In vitro cytotoxicity of diverse preparations used in dental practice to human gingival keratinocytes. *Toxicology in Vitro* **11**: 393-398.
- 8 Seibert, H., Balls, M., Fentem, J.H., Bianchi, V., Fabricier, R.H., Dierickx, P.J., Ekwall, B., Garle, M.J., Gómez-Lechòn, M.J., Gribaldo, L., Gülden, M., Liebsch, M., Rasmussen, E., Roguet, R., Shivrastava, R. and Walum, E. (1996). Acute toxicity testing *in vitro* and the classification and labelling of chemicals. *ATLA* **24**:499-510.
- 9 C. Faller Evaluation of two in vitro test batteries for the assessment of eye irritation potential of cosmetics - *ATLA* 24: 250 (1996) poster abstract.
- 10 M Balls et al. The EC/HO international validation study on alternatives to the Draize eye irritation test, *Toxicology in vitro* 9 (1995) : 871-929
- 11 F. Sina et al. A collaborative evaluation of seven alternatives to Draize eye irritation test using pharmaceutical intermediates. *Fundamental and applied toxicology* 26 (1995) :20-31.
- 12 Wilhelm KP, Cua AB, Wolff HH, Maibach HI. (1993). Surfactant-induced stratum corneum hydration in vivo: prediction of the irritation potential of anionic surfactants. *J Invest Dermatol.* **101(3)**:310-5.
- 13 Mossman, T. (1993). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65**:55-63.
- 14 Kupper, T.S. (1990). Immune and inflammatory processes in cutaneous tissue: mechanisms and speculations. *J. Clin. Invest.* **86**:1783-1789.
- 15 Borenfreund, E. and Puerner, J. (1985). Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol. Lett.* **24**:119-124.

Pagina 14 di 14
REL/0491/2011/CITO/ELB