



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
According to the UNI EN ISO 10993-5 modified standard

COMMITTENTE/CUSTOMER	FLAVOURART S.r.l Via Carmine snc 28047 Oleggio (NO) - Italy
CAMPIONE/SAMPLE	Sigaretta elettronica modello 510-T con Liquido base Heaven Juice Tradizionale – Nicotina 9 mg/ml - Aroma 7 Foglie 1% - Lotto/Batch: 1108013
DATA RAPPORTO/REPORT DATE	10/11/2011
PROTOCOLLO N./REPORT N.	REL/1081/2011/CITO/ELB

Pagina 1 di 18
REL/1081/2011/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	5
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 vitalità cellulare MTT/MTT cell vitality assay</i>	9
2.2.6	<i>Espressione dei risultati/Expression of results</i>	10
3	PARTE TERZA/PART THREE - RISULTATI E CONCLUSIONI/RESULTS AND CONCLUSIONS	11
3.1	RISULTATI/RESULTS	11
3.2	CONCLUSIONI/CONCLUSIONS	16
4	BIBLIOGRAFIA/BIBLIOGRAPHY	17



ABICH S.r.l.

Analisi Biologiche e Chimiche
Tossicologia, Ricerche e Servizi

1 PARTE PRIMA/PART ONE – INFORMAZIONI GENERALI/GENERAL INFORMATION

1.1 *Committente/Customer*

FLAVOURART S.r.l
Via Carmine snc
28047 Oleggio (NO) - Italy

1.2 *Campione Analizzato/Tested Material*

Campione/Sample	Codice interno/ Internal code	Descrizione/Description
Sigaretta elettronica modello 510-T con Liquido base Heaven Juice Tradizionale – Nicotina 9 mg/ml - Aroma 7 Foglie 1% - Lotto/Batch: 1108013	2516/11-01	Liquido trasparente giallo/ Clear yellow liquid
Sodium lauryl sulfate Controllo positivo/ Positive control	SIGMA Lotto/ Batch: 056K0082	Polvere bianca/ White powder

La composizione di base del liquido è: glicole propilenico 50%, glicerina 40% ed acqua 10% come indicato dal cliente./ The basic composition of the liquid is: Propylene glycol 50%, Glycerol 40% and water 10% as supplied by customer.

Il Sodio Lauril Solfato (SLS) è stato aggiunto nell'esperimento come controllo interno per le cellule, mentre come controllo positivo è stata utilizzata una sigaretta a base di tabacco normale di marca Marlboro. / Sodium Lauryl Sulfate (SLS) has been enclosed as a internal control for the cells, while as irritant positive control, a traditional Marlboro brand cigarette has been utilized in the experimental set.

1.3 *Test/Assay*

- Citotossicità attraverso il test MTT: test di sopravvivenza cellulare con fibroblasti coltivati in monostrato per la valutazione della biocompatibilità del fumo con le mucose.
- Cytotoxicity by MTT test : cell survival assay using fibroblasts in monolayer cultures to assess biocompatibility of the smoke with the mucosae.

Pagina 4 di 18
REL/1081/2011/CITO/ELB



ABICH S.r.l.

Analisi Biologiche e Chimiche
Tossicologia, Ricerche e Servizi

1.4 Date dello Studio/Study Dates

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

1.5 Date dello Studio/Study Dates

Inizio/Start: 31/10/2011
Fine/End: 02/11/2011

1.6 Sperimentatore/Experimenter

Dr. Alliffranchini Elena, Biotecnologa/ Biotechnologist
ABICH S.r.l.

1.7 Supervisore Scientifico/Scientific Supervisor

Dr. Elena Bocchietto – Biologa specialista in
Biotecnologie / Biologist, biotechnology specialist.
ABICH S.r.l.



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 la 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 with electronic cigarettes. 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 cigarettes, may be considered as a good indicator of its general toxicity towards 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 cleaves 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)

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.

Pagina 6 di 18
REL/1081/2011/CITO/ELB



ABICH S.r.l.

Analisi Biologiche e Chimiche
Tossicologia, Ricerche e Servizi

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

2.2.2 Terreno cellulare/ Cell medium

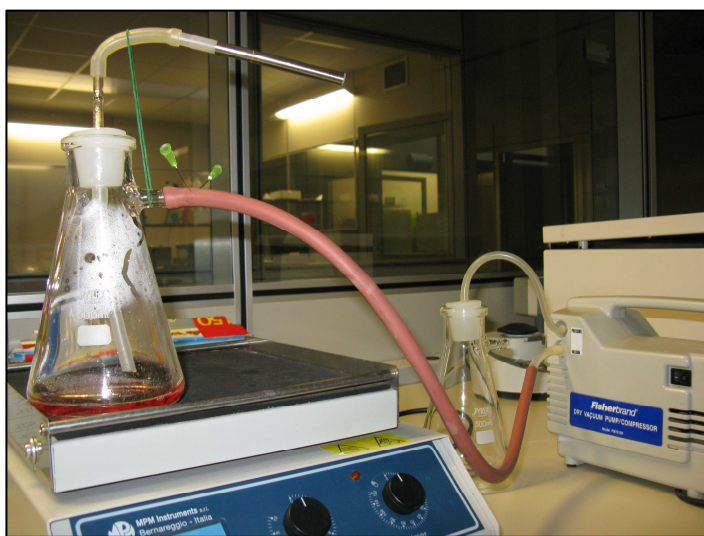
Di seguito riportiamo l'elenco del terreno e i reagenti utilizzati con i relativi lotti./ Hereafter we report the list of the utilized medium and reagents with the batches.

- Dulbecco's basal medium (MEM) Euroclone lotto/batch: EUM0101367
- Pennicillina-Streptomicina / Penicillin-Streptomycin 0,1mg/ml (Euroclone) lotto/batch: EUM0071842
- Kanamicina/ Kanamycin 0.1mg/ml (SIGMA) lotto/batch: 070M0259V
- Non Essential Aminoacid 0,1mg/ml (SIGMA) lotto/batch 029K2390
- Glutamina/ Glutamine 4mM (Euroclone) lotto/batch: EUM0092721
- 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 a depressione comprendente una beuta collegata con la sigaretta elettronica posizionata orizzontalmente (con una inclinazione verso il basso di 30°) tramite un raccordo plastico inerte e collegata tramite un altro tubo di silicone ad una pompa a vuoto come da figura. Nella beuta è stato messo 20 ml di terreno di coltura cellulare (MEM + 10% FBS). / An aspiration/inhalation simulation has been performed by connecting horizontally (with a down slop of 30°) electronic cigarette to a flask by a plastic inert joint and connected to a vacuum pump by another silicone tube as shown in the pictures. In the flask has been added 20ml of medium culture (MEM + 10% FBS).



Pagina 7 di 18

REL/1081/2011/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

Per il controllo positivo sono stati eseguiti 15 cicli di aspirazione/inalazione della sigaretta tradizionale portandola a totale esaurimento.

La cartuccia è stata caricata con 400µl di prodotto in esame e pesata insieme all'atomizzatore con bilancia analitica (Mettler modello AB104-S, precisione 0,1mg). Sono stati effettuati un numero di cicli di aspirazione/inalazione tali da avere un consumo finale del campione di circa 200mg e tali da ottenere alla fine dei cicli una concentrazione teorica nel terreno di coltura pari a 10mg/ml. Le variazioni in peso durante i cicli di aspirazione sono state monitorate nel tempo visivamente tramite apposita finestrella presente sul dispositivo e tramite pesata analitica. Laddove si fosse riscontrato un maggiore consumo di aroma, si è provveduto a variare il volume finale di terreno per ottenere comunque la concentrazione finale di 10mg/ml.

Il ciclo di aspirazione/inalazione ha una durata di 2" con una pausa della durata di 1' tra un'aspirazione e l'altra per favorire la raccolta del condensato nel terreno, mantenuto costantemente in agitazione durante l'esperimento. La depressione del sistema è stata modulata al fine di mimare il più possibile le normali condizioni di utilizzo del dispositivo. Questi cicli di aspirazione e di riposo sono risultati idonei a non incrementare assolutamente la temperatura di esercizio del dispositivo (temperatura esterna <35°C - ve rifica con sonda PT100 adesiva). Alla fine di queste operazioni di simulazione il terreno di coltura contenuto nella beuta è stato raccolto e identificato come "condensato Sigaretta elettronica modello 510-T con Liquido base Heaven Juice Tradizionale – Nicotina 9mg/ml - Aroma 7 Foglie 1% Lotto: 1108013". Questo condensato è stato sottoposto a test di citotossicità.

For positive control 15 cycles of inhalation/aspiration have been made until total exhaustion of the traditional cigarette.

Cartridge has been filled with 400µl of tested product and weighted with atomizer by analytical balance (Mettler model AB104-S, precision of 0.1mg). We carried out a number of inhalation/aspiration cycles to obtain a final weight of flavour of 200mg and to reach a final theoretical concentration in the cell medium of 10mg/ml. Weight changes have been controlled over time visually through specific window on the device and by analytical weighting. Whether it has been found an higher use of flavour, the final volume of the cell medium has been corrected to reach a concentration of 10mg/ml.

The cycle of inhalation/aspiration is of 2" with a break of 1' between the aspirations to make it easier the development of the condensed smoke in the flask. The medium was kept swirling all along the experiment. The system depression is modulated to simulate the normal use condition of the cigarette. Moreover the aspiration and the breaking times are suitable not to increase the device temperature (external temperature < 35°C – monitored by PT100 adesive probe).

At the end of the treatment the medium culture has been collected and identified as "condensed Electronic cigarette model 510-T with base liquid Traditional Heaven Juice - 9mg/ml Nicotine – 7 Foglie flavour 1% – Batch: 1108013 ". This condensed medium has been subjected to cytotoxicity test.

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 aliquotato il condensato della sigaretta elettronica e tradizionale in modo da raggiungere 6 diluizioni finali comprese tra 1000 µl/ml (v/v) e 31,25 µl/ml (v/v).

Ogni campione è stato testato in triplicato. Cellule non trattate sono state utilizzate come controllo negativo. Come controllo interno è stato utilizzato SLS (SIGMA) a diverse concentrazioni. 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.



ABICH S.r.l.

Analisi Biologiche e Chimiche
Tossicologia, Ricerche e Servizi

Cells have been seeded in 96 wells plates, for 24 h in DMEM + 10% FBS. Condensed electronic and traditional cigarette was added with 5 scalar dilutions ranging from 1000 µl/ml (v/v) and 31.25 µl/ml (v/v). For each dilution, 3 replica were performed. At the end of the incubation, cells were tested for their viability by cytotoxicity (MTT) assay. Untreated cells were used as negative control, as internal control was used SLS (SIGMA) at different concentrations. The MTT assay allows to evaluate the toxic impact of the tested compound on the cells viability.

2.2.5 Test di vitalità cellulare MTT/MTT cell vitality 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 quindi 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.

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 cleaves 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 are 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), deducting background 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

2.2.6 *Espressione dei risultati/Expression of results*

Il risultato è espresso come vitalità cellulare in percentuale secondo la formula:

% di vitalità cellulare = [OD(550 nm - 690 nm) prodotto testato / OD(550 nm - 690 nm) controllo negativo] x 100

Una riduzione della vitalità cellulare > 30% è considerato un effetto citotossico.

In tal caso è possibile calcolare il valore di IC_{50} (*Inhibiting Concentration 50*) che indica la concentrazione di prodotto che inibisce la vitalità cellulare del 50%.

The results are expressed in terms of viability:

% of cell viability = [OD(550 nm - 690 nm) test product / OD(550 nm - 690 nm) negative control] x 100

Reduction of cell viability by more than 30% is considered a cytotoxic effect.

In that case it is possible to calculate the IC_{50} value (*Inhibiting Concentration 50*) which indicates the concentration of test compound which inhibits the cell viability of 50%.



ABICH S.r.l.

Analisi Biologiche e Chimiche
Tossicologia, Ricerche e Servizi

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

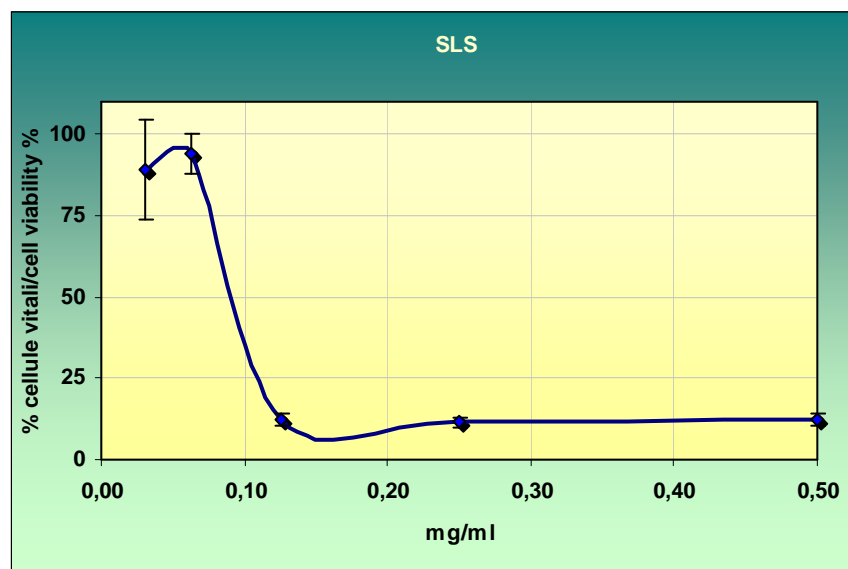
3.1 *Risultati/Results*

SLS (controllo interno/Internal control)					
Dose mg/ml	0,50	0,25	0,125	0,0625	0,03125
Vitalità cellulare % (rispetto al controllo negativo)/ % cell viability (vs negative control)	12,4	11,5	12,3	94,0	89,1
stand. dev.	1,6	1,6	1,7	6,2	15,6

$IC_{50} = 0,10\text{mg/ml}$

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

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



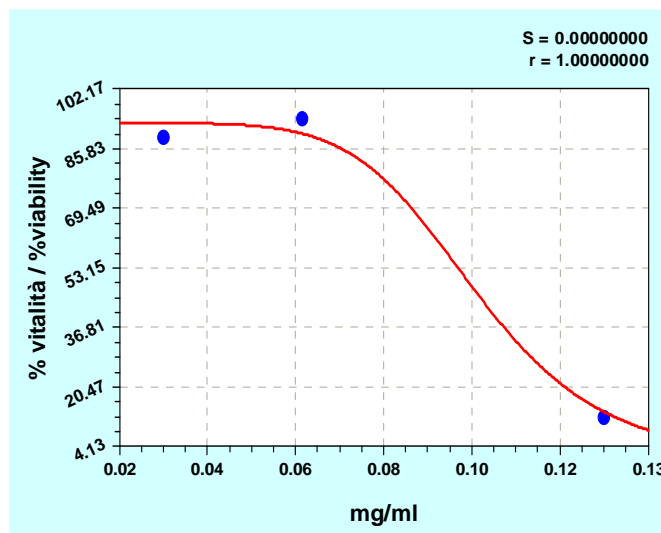
**Espressione della vitalità cellulare dopo trattamento con dosi crescenti di SLS/
Cell vitality expression after treatment with increasing amount of SLS**

Pagina 11 di 18
REL/1081/2011/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

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

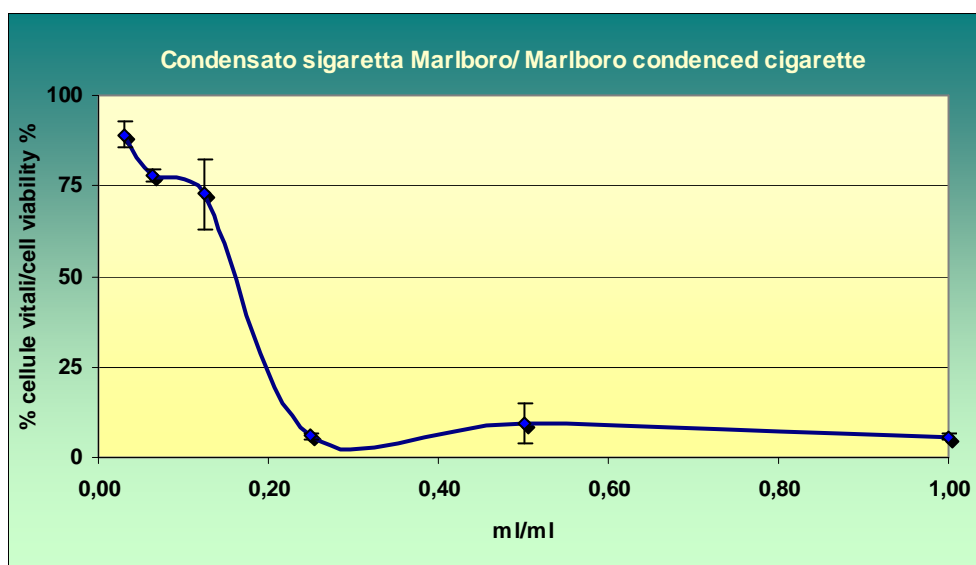
Sede legale:
Via 42 Martiri, 213/B
28924 – Verbania (VB) Italia
CF/P.IVA/Reg. Imp. VCO: 01864020035
R.E.A.: 189901
Cap. Soc. € 16.000,00 i.v.



ABICH S.r.l.

Analisi Biologiche e Chimiche
Tossicologia, Ricerche e Servizi

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
$IC_{50} = 0,16 \text{ ml/ml}$ Viene evidenziata una mortalità cellulare > 30% alle prime tre diluizioni testate. A mortality cell > 30% is pointed out at the first three tested dilutions.						

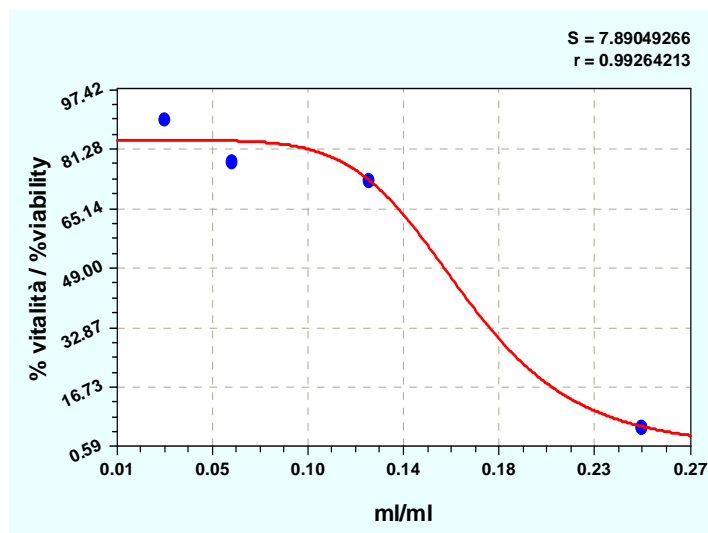


**Espressione della vitalità cellulare dopo trattamento con dosi crescenti di condensato/
Cell vitality expression after treatment with increasing amount of condensed.**



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.

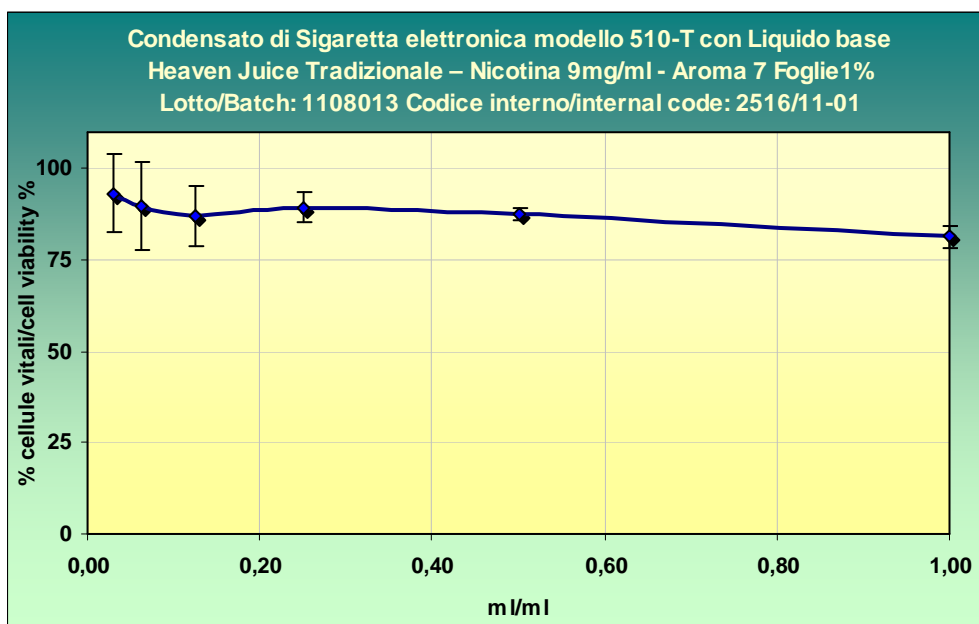
Analisi Biologiche e Chimiche
Tossicologia, Ricerche e Servizi

**Condensato di Sigaretta elettronica modello 510-T con Liquido base Heaven Juice Tradizionale – Nicotina 9mg/ml - Aroma 7 Foglie 1% Lotto/Batch: 1108013
Codice interno/internal code: 2516/11-01**

Dose ml/1ml medium (v/v)	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)	81,4	87,5	89,4	87,1	89,6	93,2
stand. dev.	2,9	1,5	4,0	8,3	12,1	10,7

Non viene evidenziata mortalità cellulare significativa alle concentrazioni testate

No significant cell mortality is pointed out at all the tested dilutions.



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



ABICH S.r.l.

Analisi Biologiche e Chimiche
Tossicologia, Ricerche e Servizi

3.2 Conclusioni/Conclusions

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

Condensato di Sigaretta elettronica modello 510-T con Liquido base Heaven Juice Tradizionale – Nicotina 9mg/ml - Aroma 7 Foglie 1%

Lotto/Batch: 1108013

non ha causato effetti citotossici alle concentrazioni testate su fibroblasti.

Il condensato ottenuto con fumo di una sigaretta tradizionale usato come controllo ha causato alla concentrazione più alta testata il 76% di mortalità cellulare in più rispetto all'aerosol condensato ottenuto dalla sigaretta elettronica.

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

The condensed smoke from one traditional cigarette used as a control caused at the highest tested concentration 76% plus of cell mortality if compared to the condensed aerosol from one electronic cigarette.

Data/Date: 10/11/2011

Il Responsabile dello studio/ Study Monitor
Dr. Elena Bocchietto

Pagina 16 di 18
REL/1081/2011/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. Hans Torma, Magnus Lindberg and Berit Berne (2008). Skin Barrier Disruption by Sodium Lauryl Sulfate-Exposure Alters the Expressions of Involucrin, Transglutaminase 1, Profilaggrin, and Kallikreins during the Repair Phase in Human Skin In Vivo. *Journal of Investigative Dermatology* **128**: 1212–1219.
3. J.W. Fluhr, A. Bornkessel, A. Akengin, S. Fuchs, J. Norgauer, P. Kleesz, R. Grieshaber and P. Elsner. (2005). Sequential application of cold and sodium lauryl sulphate decreases irritation and barrier disruption in vivo in humans. *British Journal of Dermatology* **152**: 702–708.
4. D.G.Koopman, S.Kezic and M.M.Verberk. (2004). Skin reaction and recovery: a repeated sodium lauryl sulphate patch test vs. a 24-h patch test and tape stripping. *British Journal of Dermatology*. **150**: 493–499.
5. Smith HR, Armstrong DK, Holloway D, Whittam L, Basketter DA, McFadden JP.(2002). Skin irritation thresholds in hairdressers: implications for the development of hand dermatitis. *Br J Dermatol*. **146(5)**:849-52.
6. 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.
7. Losio N. et al. In vitro product safety evaluation: a cytotoxicity 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. Seibert, H., Balls, M., Fentem, J.H., Bianchi, V., Fabricier, R.H., Dierickx, P.J., Ekwall, B., Garle, M.J., Gómez-Lechón, 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.
13. C. Faller Evaluation of two in vitro test batteries for the assessment of eye irritation potential of cosmetics - *ATLA* **24**: 250 (1996) poster abstract.
14. 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

Pagina 17 di 18
REL/1081/2011/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

15. F. Sina et al. A collaborative evaluation of seven alternatives to Draize eye irritation test using pharmaceuticals intermediates. *Fundamental and applied toxicology* 26 (1995) :20-31.
16. 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.
17. Mossman, T. (1993). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65**:55-63.
18. Klaus-P Wilhelm, Christian Surber and Howard I. Maibach. (1991) Effect of sodium lauryl sulphate-induced skin irritation on in vivo percutaneous penetration of four drugs. *The Society for Investigative Dermatology.* **97** (5) 927-932.
19. Kupper, T.S. (1990). Immune and inflammatory processes in cutaneous tissue: mechanisms and speculations. *J. Clin. Invest.* **86**:1783-1789.
20. Borenfreund, E. and Puerner, J. (1985). Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol. Lett.* **24**:119-124J