



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE  
DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea Magistrale  
In Biologia Molecolare ed Applicata

**Citotossicità del fumo di sigaretta elettronica: Effetto della  
componente aromatica**

**Cytotoxicity of electronic cigarette smoke: Aromatic component  
effect**

**Tesi di Laurea Magistrale di:**

Tudini Lorenzo

**Relatore:**

Chiar.mo Prof.

Tiano Luca

**Correlatore:**

Cirilli Ilenia

Sessione autunnale (Ottobre 2019)

Anno Accademico 2018-2019

## RIASSUNTO

Il fumo di tabacco è uno dei più comuni abusi a livello mondiale ed è un importante problema per la salute pubblica con un significativo impatto economico sia a livello individuale che sociale. Il consumo di sigarette di tabacco causa, solo nell'Unione Europea, circa 700 000 morti ogni anno. Negli ultimi anni, grazie alla commercializzazione della sigaretta elettronica (e-cig) e alle campagne di sensibilizzazione sempre più mirate, è stata registrata una diminuzione importante dei fumatori di tabacco, tuttavia contrapposta ad un incremento quasi esponenziale dei consumatori delle e-cig, facendo registrare nel 2018, solo in Gran Bretagna, 3.2 milioni di "vapers". La rapida diffusione di questi dispositivi è attribuibile alla percezione da parte degli utenti della più bassa tossicità rispetto alle classiche sigarette. Tuttavia, il fumo prodotto dalle e-cig è in grado di indurre stress ossidativo e danni al DNA, probabilmente per mezzo delle molecole generate durante il riscaldamento dell'e-liquid. Generalmente gli e-liquids sono composti dalla base (glicole propilenico e glicerolo vegetale), con disciolta la nicotina e la componente aromatica, la quale è un insieme di più molecole. Questi aromi sono sicuri per l'ingestione, mentre insufficienti informazioni sono disponibili in relazione al loro effetto quando inalati.

Perciò, nel presente studio, dopo aver ottimizzato un modello di stress indotto dal fumo di sigaretta (CSE), è stata valutata la citotossicità degli estratti del vapore (EVC) generato dai 7 aromi più frequentemente presenti negli e-liquids con un trattamento in acuto (24h) di fibroblasti neonatali del derma umano (nHDF).

Il CSE ha mostrato una tossicità dose-dipendente e un'elevata capacità di induzione dei ROS citosolici, tuttavia, tutti gli aromi sono risultati molto meno tossici del CSE, sebbene sono stati responsabili dell'alterazione dello stato ossidativo sia citoplasmatico che mitocondriale, ad eccezione del mentolo che non ha interferito con l'equilibrio ossidativo. In particolare la vanillina e l'etil vanillina hanno indotto un incremento del contenuto di ROS mitocondriali senza alterare quello citosolico. Mentre solamente il maltolo e l'etil maltolo hanno innescato dei processi pro-apoptotici con conseguente aumento del numero di cellule in apoptosi.

In conclusione, la componente aromatica contribuisce in modo differenziale alla tossicità delle e-cig alterando l'equilibrio ossidativo, ad eccezione del mentolo.

PAROLE CHIAVE: Flavours, EVC, e-cig, CSE, tossicità, stress ossidativo.

# INDICE

---

<b>RIASSUNTO .....</b>	<b>1</b>
<b>ABBREVIAZIONI .....</b>	<b>5</b>
<b>1. INTRODUZIONE.....</b>	<b>6</b>
1.1. Dal tabacco alle e-cig: storia e diffusione .....	6
1.2. Sigaretta di tabacco.....	10
1.2.1. Principali patologie fumo-correlate .....	13
1.2.2. Modifiche biochimiche indotte dal fumo.....	16
1.3. Sigaretta elettronica: struttura e funzionamento delle e-cig.....	20
1.3.1. Composizione degli e-liquids.....	24
1.3.2. Effetti pericolosi correlati all'inalazione delle e-cig .....	26
1.3.3. Effetti della componente aromatica sulla salute.....	29
<b>2. SCOPO DELLA TESI.....</b>	<b>32</b>

<b>3. MATERIALI E METODI.....</b>	<b>33</b>
3.1. Preparazione dell'estratto del fumo di sigaretta .....	33
3.2. Preparazione degli aromi e dei loro estratti .....	35
3.3. Modello cellulare.....	37
3.4. Disegno sperimentale.....	37
3.5. Saggio MTT .....	38
3.6. Analisi della citometria a flusso.....	39
3.6.1. Contenuto citoplasmatico di ROS .....	40
3.6.2. Saggio dell'anione superossido .....	43
3.7. Analisi dei dati.....	44
<b>4. RISULTATI.....</b>	<b>45</b>
4.1. Modello di stress indotto dal CSE.....	45
4.2. Valutazione della citotossicità degli aromi.....	47
<b>5. DISCUSSIONE .....</b>	<b>52</b>
<b>6. CONCLUSIONE .....</b>	<b>56</b>
<b>7. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>59</b>

## ***ABBREVIAZIONI:***

<b>CSE</b>	Estratto del fumo di sigaretta
<b>EVC</b>	Estratto del vapore di sigaretta elettronica
<b>ROS</b>	Specie reattive dell'ossigeno
<b>E-CIG</b>	Sigarette elettroniche

# 1. INTRODUZIONE

---

## 1.1. DAL TABACCO ALLE E-CIGARETTES: STORIA E DIFFUSIONE

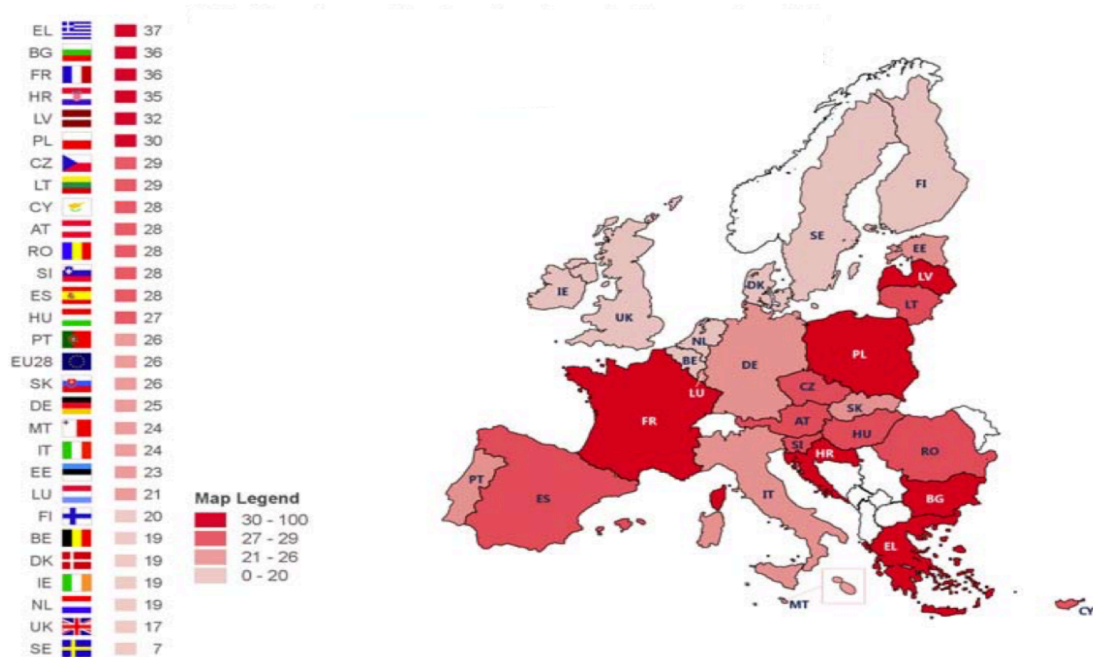
La coltivazione e il fumo del tabacco erano pratiche note agli indigeni americani, dove il primo uso attestato risale alle civiltà precolombiane. Nei secoli successivi la popolarità del tabacco crebbe enormemente con la colonizzazione spagnola che permise l'introduzione della pianta del tabacco nel continente europeo dove venne fortemente commercializzata. Nonostante il largo uso del tabacco solo in tempi recenti ne sono stati studiati in dettaglio gli effetti biologici e tossicologici del fumo di tabacco con particolare attenzione al suo abuso, i quali effetti negativi sono stati ampiamente sottostimati sino a pochi decenni fa. Le recenti ricerche dimostrano che il tabagismo costituisce un importante problema epidemiologico e sociale, in cui le patologie fumo-correlate sono uno dei principali problemi sanitari del pianeta.

Secondo i dati dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) sono circa un miliardo i fumatori presenti sulla terra, di cui l'80% vive in paesi a basso medio reddito, dove gli effetti patologici del fumo sono molto più rilevanti. L'OMS stima che il consumo attivo di tabacco è responsabile di quasi 6

milioni di decessi annuali nel mondo. Tuttavia, anche il consumo passivo, molto spesso sottovalutato, è altrettanto pericoloso, causando circa 603 000 morti premature annuali di cui il 28% di bambini, il 26% di uomini e il 46% di donne [*Ministero della Salute, 2017*].

Nell'Unione Europea il consumo di sigarette ogni anno è responsabile della morte di circa 700 000 persone e della presenza di patologie, come malattie respiratorie, cancro e malattie cardiovascolari, in milioni di fumatori. Inoltre, i risultati dell'indagine Eurobarometro hanno evidenziato che dal 2014 la prevalenza di fumatori, pari a 26%, è rimasta costante, tuttavia, si è assistito ad un parallelo aumento dei fumatori nella fascia di età compresa dai 15-25 anni che sono passati dal 24% al 30% (figura 1) [*Ministero della Salute, 2017*].





**Figura 1: Percentuale di fumatori nei paesi europei nel 2017.**

In Italia, in linea con la media europea, il 22% della popolazione, ovvero 11.5 milioni di persone, consuma quotidianamente prodotti del tabacco e la prevalenza maggiore si registra nella fascia di età tra i 25 e i 44 anni. Inoltre, si stima nel territorio italiano come conseguenza diretta o indiretta del fumo del tabacco quasi 80 000 decessi annuali [*Istituto superiore di Sanità, 2016*].

Parallelamente alla graduale diminuzione del consumo dei prodotti del tabacco si assiste ad una crescente diffusione delle sigarette elettroniche (e-cig), inizialmente commercializzate per la lotta al tabagismo. Tale dispositivo permette di inalare vapore, generalmente aromatizzato, contenente quantità variabili di nicotina,. Il primo dispositivo che ispirò le moderne e-cig, fu brevettato nel 1927 da Joseph Robinson che lo definì “Vaporizzatore ad accensione meccanica di butano”, la cui funzione era quella di vaporizzare

composti medicinali riscaldati elettricamente per produrre vapore da inalare. Nel 1963, l'americano Herbert A. Gilbert, progettò il primo design completo della sigaretta elettronica. Il dispositivo produceva vapore, diverso da quello che conosciamo oggi, e non conteneva nicotina. Sebbene il dispositivo sia stato brevettato negli Stati Uniti e malgrado l'esistenza di un prototipo, non ricevette lo stesso tipo di attenzione che al contrario hanno ricevuto le e-cig moderne e non venne pertanto prodotto su larga scala. Nel 2001 il farmacista cinese Hon Lik si dedicò alla realizzazione della sigaretta elettronica moderna che brevettò l'anno successivo per introdurla prima sul mercato cinese (2004) poi in quello statunitense (2007).

La sigaretta elettronica è stata introdotta nel mercato con una comunicazione molto efficace, ovvero come alternativa sicura al fumo di sigaretta, questo le ha permesso di avere subito una grande diffusione. Secondo i dati riportati dalla Action on Smoking and Health in Gran Bretagna sono stati registrati 3.2 milioni di *vapers* adulti nel 2018 rispetto ai 700 000 iniziali registrati nel 2012 (tabella 1). Inoltre tra gli utilizzatori di e-cig sono più frequenti gli ex-fumatori (1.7 milioni) che i fumatori di sigarette (1.4 milioni) [ASH, 2018].

	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018
Number of vapers	700,000	1.3 million	2.1 million	2.6 million	2.8 million	2.9 million	3.2 million
Year on year rate of change		+86%	+62%	+24%	+8%	+4%	+10%

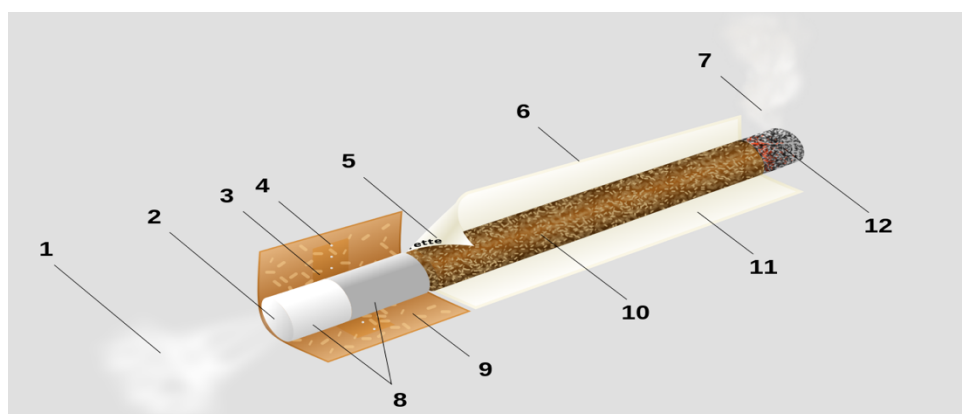
Tabella 1: Espansione del numero di vapers in Gran Bretagna dal 2012 al 2018 [ASH, 2018].

Tuttavia, il dato che desta maggiore preoccupazione è la diffusione delle e-cig tra i giovani, i quali sono attratti dalla possibilità di personalizzazione dei liquidi da “svapare” e soprattutto non considerano questo dispositivo dannoso. In realtà le evidenze relative alla assenza di nocività delle sigarette elettroniche sono ad oggi assenti ed il loro utilizzo nelle fasce più giovani della popolazione dei non fumatori può facilitare la transizione degli stessi verso l’impiego delle sigarette tradizionali. Nel complesso pertanto l’impiego della sigaretta elettronica costituisce un problema di salute pubblica, in particolare nella popolazione giovanile [Czoli, C.D., Hammond, 2015; Palipudi, K.M., Mbulo, L. 2016].

## 1.2. SIGARETTA DI TABACCO

La sigaretta è generalmente composta da foglie di tabacco essiccate, finemente tritate e mescolate con additivi. Questo composto viene arrotolato o

pressato in un cilindro di carta lungo 120 mm e con diametro di 10 mm. Uno dei lati della sigaretta viene acceso e brucia lentamente senza fiamma permettendo di inalare il suo fumo dall'altro lato dove è posto un filtro, che il fumatore porta alla bocca (figura 2) [Wigand, MA. 2006].



**Figura 2** Composizione di una sigaretta:

*1. Uscita del fumo principale; 2. Materiale filtrante (carbone attivo ed altri); 3. Adesivo; 4. Fori di ventilazione (non sempre presenti); 5. Inchiostro; 6. Adesivo; 7. Uscita del fumo secondaria; 8. Filtro; 9. Carta del filtro; 10. Tabacco e additivi; 11. Carta; 12. Punto di combustione e ceneri.*

La composizione chimica del fumo del tabacco dipende da vari fattori come i metodi di coltivazione, la varietà della pianta e le lavorazioni successive alla raccolta. In generale la combustione del tabacco e della carta che lo avvolge genera un fumo contenente una miscela di oltre 4000 sostanze nocive per la salute umana, convenzionalmente divise in componente gassosa e

componente corpuscolata [*Claudio F. Donner 2001*]. Nella frazione gassosa sono state riscontrate concentrazioni significativamente alte di monossido di carbonio insieme a minori ma nocive quantità di ossido di azoto, nitrosammine, acido cianidrico, ammoniaca, nitrili, acetaldeidi, idrocarburi volatili, formaldeide e acroleina. Mentre la componente corpuscolata consiste di un aerosol di particelle catrame/nicotina. Il catrame è la sostanza residua appiccicosa di colore marrone lasciata dopo la rimozione della nicotina e dell'umidità dalla componente corpuscolata, ed è composto da idrocarburi aromatici polinucleari che comprendono sostanze cancerogene come le nitrosammine non volatili, le ammine aromatiche ed il benzopirene. Inoltre nel catrame sono stati individuati alcuni elementi radioattivi come il polonio-210 [*Hoffman D, Wynder EL. 1986*].

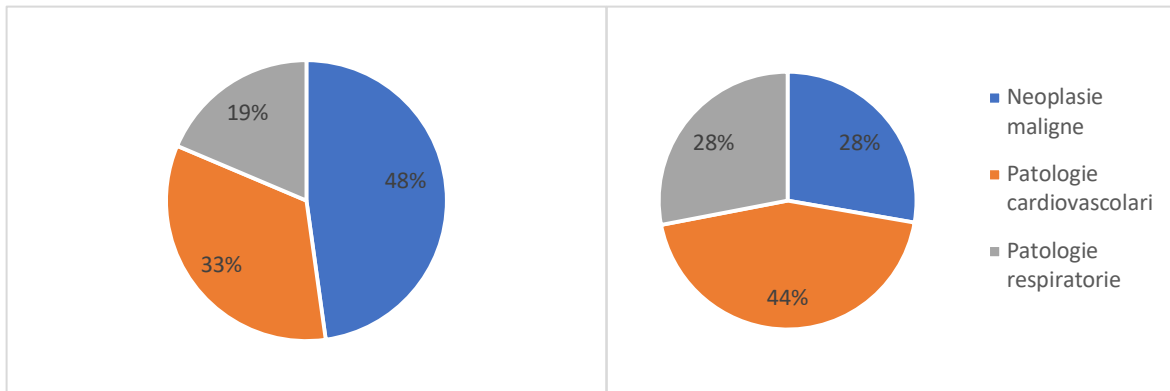
La continua e prolungata esposizione alle sostanze tossiche derivate dalla combustione del tabacco è in grado di incidere sulla qualità e sulla durata della vita media. Si stima che il consumo di 20 sigarette al giorno riduca di quasi 4.6 anni l'aspettativa di vita di un giovane che inizia a fumare all'età di 25 anni. Risulta quindi essenziale sensibilizzare le persone contro il tabagismo, al fine di ridurre l'incidenza di patologie fumo-correlate.

### 1.2.1. PRINCIPALI PATOLOGIE FUMO-CORRELATE

Il fumo del tabacco colpisce molteplici organi; tra cui l'apparato broncopolmonare e quello cardiovascolare sono sicuramente i più bersagliati [*Ministero della Salute, 2018*].

L'entità dei danni fisici dovuti all'esposizione al fumo di tabacco è direttamente proporzionale all'entità complessiva del suo abuso. Più precisamente i fattori determinanti sono: l'età di inizio, il numero di sigarette consumate giornalmente, il numero degli anni di esposizione al fumo, la profondità dell'inalazione [*Ministero della Salute, 2018*].

Il fumo di tabacco è la principale causa dello sviluppo di bronchiti acute e, a seguito dell'esposizione prolungata, di bronchiti croniche ed enfisemi polmonari. Inoltre, è responsabile dell'aumento della pericolosità ma soprattutto dell'incidenza nella popolazione di episodi asmatici ed infezioni respiratorie ricorrenti, ma anche dello sviluppo di neoplasie polmonari in cui i principali responsabili riconosciuti sono gli idrocarburi policiclici aromatici contenuti nel catrame e nel Polonio 210 (figura 3) [*Ministero della Salute, 2018*].



**Figura 3: Causa di morte per patologia negli uomini (sinistra) e nelle donne (destra) fumatrici.**

Il consumo del tabacco è anche uno dei principali responsabili dello sviluppo di malattie coronariche e di infarto, condizione patologica che colpisce più di 200 000 italiani all'anno e in un caso su tre conduce alla morte. Il fumo aumenta enormemente il rischio di aterosclerosi e di infarto in quanto danneggia le cellule che rivestono internamente i vasi arteriosi, favorendo la formazione di placche ostruttive e di trombi. Altra condizione patologica indotta dall'abuso di tabacco è la cardiopatia ischemica causata principalmente dal monossido di carbonio che può legare in maniera irreversibile l'emoglobina limitando l'apporto ai tessuti, particolarmente rilevante in quelli a metabolismo principalmente aerobico come il muscolo cardiaco

Il fumo aumenta la probabilità di insorgenza non solo dell'aterosclerosi delle coronarie, ma di tutte le arterie. Questo provoca nei fumatori una maggiore predisposizione all'insorgenza di malattie come:

- L'ictus, al terzo posto tra le cause di morte negli USA e l'incidenza è aumentata tre o quattro volte tra i fumatori.
- L'aneurisma aortico, ovvero la dilatazione anormale dell'aorta, rende questa arteria più soggetta a rotture che provocherebbero la morte immediata. I decessi per rottura sono 6 volte maggiori tra i fumatori rispetto ai non fumatori, perciò chi soffre di aneurisma aortico non dovrebbe fumare.

Tuttavia, il fumo di sigaretta non provoca danni solamente ai consumatori, ma è ampiamente dimostrato che l'esposizione passiva al fumo di tabacco costituisca, secondo la Environmental Protection Agency (EPA), uno dei più pericolosi e diffusi fattori inquinanti per i non fumatori. Il Surgeon General degli USA e la National Academy of Sciences hanno recentemente determinato una stretta correlazione tra fumo passivo e un'aumentata incidenza di polmoniti, bronchiti, crisi asmatiche e rinofaringiti nei figli di



fumatori rispetto a quelli con genitori non fumatori [*Ministero della Salute, 2018*].

Riassumendo, il fumo di sigaretta è uno dei principali fattori di rischio per numerose malattie, anche se negli ultimi 35 anni l'attuazione di politiche di controllo dell'uso del tabacco ha portato ad una diminuzione concreta della prevalenza dei fumatori in quasi tutti i paesi, soprattutto quelli europei, rimane tuttavia un'importante causa di sviluppo e progressione delle malattie cardiovascolari (CVD) [*Wilkins 2017*].

### 1.2.2. MODIFICHE BIOCHIMICHE INDOTTE DAL FUMO

Il fumo di sigaretta, grazie alla sua complessità, è in grado di indurre danni alterando molteplici vie metaboliche in diversi tessuti ed organi, in particolare il sistema cardiovascolare e respiratorio risultano essere i principali bersagli.

Numerosi studi in vitro hanno evidenziato la capacità del fumo di sigaretta di indurre disfunzioni a livello dell'endotelio. Tali alterazioni sono associate ad

una diminuita espressione dell'ossido nitrico sintasi (eNos) ed una minore biodisponibilità dell'ossido nitrico (NO) circolante [*Rahman and Laher 2007*]. Inoltre, il fumo di sigaretta contiene sia molecole in grado di promuovere la formazione di ROS che i ROS stessi. I ROS (reactive oxygen species) sono molecole o porzioni di molecole che possiedono un elettrone spaiato nel loro orbitale di valenza e che conferisce a queste molecole una notevole reattività. Conseguentemente le specie reattive dell'ossigeno nella ricerca della loro stabilità reagiscono in maniera aspecifica con molecole prossimali nei sistemi biologici, sequestrando o donando un elettrone. In particolare, ROS come l'anione superossido e il perossido d'idrogeno possono reagire con l'ossido nitrico, inattivandolo diminuendo la sua funzione fisiologica nel sistema vascolare e simultaneamente determinando la formazione di perossinitrito, una specie radicalica estremamente reattiva che può provocare la nitrosilazione di proteine e di cofattori coinvolti in diversi processi metabolici [*Barua 2003; Arunachalam 2010*].

La pericolosità del fumo di sigaretta è legata anche al rilascio di numerose molecole tossiche le quali, una volta assorbite, inducono stress ossidativo ed infiammazione, non solo a livello vascolare, ma anche polmonare [*Luca Giordano et al., 2019, Faux SP et al., 2009*]. Studi in vitro su diverse linee cellulari come; macrofagi alveolari (AMs), cellule epiteliali alveolari di tipo II

(A549) e polimorfonucleati (PMNs) hanno evidenziato una stretta relazione tra l'esposizione acuta al fumo e l'aumento dei prodotti di perossidazione lipidica e di degradazione della matrice proteica extracellulare. Inoltre, l'esposizione al fumo ha un effetto soppressivo sul reclutamento di una particolare categoria di polimorfnucleati, gli eosinofili, e sulla capacità del tessuto polmonare di secernere citochine infiammatorie [*H van der Vaart, 2004*].

Tuttavia, il fumo può agire anche più in profondità andando a danneggiare direttamente e indirettamente il DNA, come dimostrato da Luo e collaboratori che ha osservato la capacità di produrre aberrazioni a livello cromosomico in seguito ad esposizione in vitro. In particolare la componente corpuscolata del fumo sembra produrre uno squilibrio genomico alterando la frequenza di formazione dei ponti anafasici in cellule umane in coltura, indipendentemente dal meccanismo regolato dalla proteina p53. Il fumo inoltre agisce danneggiando anche la doppia elica del DNA, sia purificato che nelle cellule in coltura. Questo effetto viene mediato dalla produzione di ROS, dato che alcuni scavenger di radicali, come la 2'-deossiguanosina-5'-monofosfato (dGMP), prevengono la formazione del ponte anafasico indotto dal fumo e lo squilibrio genomico conseguente [*Luo et al. 2004*].

Inoltre, è stato dimostrato come il fumo sia in grado di indurre una senescenza prematura in diverse linee cellulari, come le cellule epiteliali delle vie aeree [Wu 2016; Liu 2016] e i fibroblasti della cute [Yang 2013]. In particolare, è stato osservato, in cellule progenitrici endoteliali esposte direttamente al fumo di sigaretta, una maggiore espressione di p16<sup>INK4a</sup> con il conseguente blocco del normale ciclo cellulare [He et al., 2017].

### 1.3. SIGARETTA ELETTRONICA: STRUTTURA E FUNZIONAMENTO DELL'E-CIG

La categoria delle sigarette elettroniche include una notevole varietà di dispositivi che possono essere distinti in prima, seconda, terza e quarta generazione (figura 4). Quelli di prima generazione sono i primissimi modelli immessi nel mercato con un formato molto simile a quello delle sigarette tradizionali, e composti da tre parti: batteria, atomizzatore e cartuccia, sono dispositivi generalmente monouso. Le e-cig di seconda generazione presentano un formato diverso, molto più simile ad una penna, leggermente più lunghi e spessi. Rispetto alla precedente generazione questi dispositivi hanno batterie di maggiore capacità consentendo una carica molto più duratura nel tempo, oltre ad atomizzatori e circuiti elettronici più grandi che forniscono maggiore energia e serbatoi separati ricaricabili di grandi dimensioni.

Le e-cig di terza e quarta generazione presentano delle importanti innovazioni sia a livello estetico che a livello strutturale. Atomizzatori, batterie e serbatoi sono sempre più capienti e potenti, inoltre permettono all'utente di personalizzare il dispositivo, regolando attraverso il display posto generalmente sulla batteria, la potenza di riscaldamento del vapore, ma anche la composizione strutturale del dispositivo stesso, per assicurare l'ottimizzazione della produzione della giusta quantità e densità del vapore da

aspirare ma anche semplicemente per fini estetici. Sebbene le e-cig possono variare molto nel design, il principio di funzionamento rimane sempre lo stesso [Bhatnagar A et al., 2014] [U.S Department of Health and Human Services, 2016].

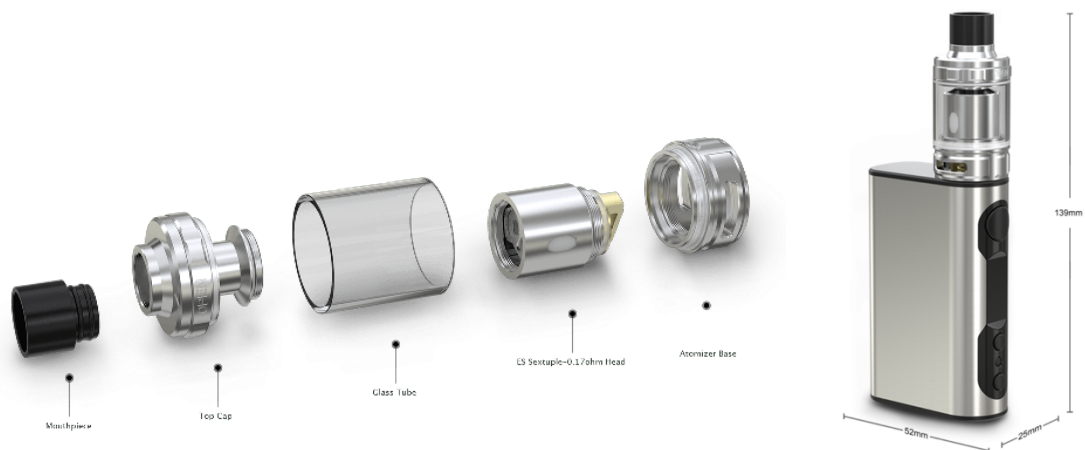


**Figura 4: differenti design, suddivisi per generazioni, appartenenti alla categoria delle e-cig [U.S Department of Health and Human Services].**

Oggi giorno le sigarette elettroniche più comunemente acquistate ed usate sono quelle di 4<sup>a</sup> generazione, le cui componenti principali, illustrate in figura 5, sono di seguito descritte:

- Drip Tip o boccaglio: parte che entra in contatto con le labbra. In commercio ne esistono di diverse forme e materiali e permettono di modificare le caratteristiche di aspirazione del device.

- Tank o serbatoio: contiene l'e-liquid da vaporizzare, generalmente è in vetro, ma può essere in policarbonato o in acciaio, e anch'esso può trovarsi in commercio con differenti caratteristiche e dimensioni.
- Coil o resistenza: questa è la parte fondamentale del sistema, ha la funzione di scaldare l'e-liquid inducendone la vaporizzazione. La resistenza elettrica contiene al suo interno del cotone che permette il trasporto per capillarità dell'e-liquid dal tank alla sua struttura. In commercio è possibile trovare resistenze di varie dimensioni che generalmente vanno da 0.15 a 3.5  $\Omega$ , più è grande la resistenza maggiore è la temperatura alla quale il liquido viene scaldato, a parità di watt.
- Base: elemento di collegamento tra l'atomizzatore e la batteria che permette di scegliere tra la "svapata" di guancia o di polmone a seconda che l'apertura per il passaggio dell'aria esterna verso la resistenza sia rispettivamente chiusa o aperta.
- Batteria o Box: fornisce l'energia necessaria per riscaldare la resistenza permettendo la vaporizzazione dell'e-liquid. Ogni Box presenta diversi range di potenza compresi tra 3 e 300W, che possono essere facilmente regolati attraverso il display.



**Figura 5: Componenti delle e-cig di quarta generazione.**



**Figura 6: Esempi di e-liquids.**



**Figura 7: Modalità di ricarica dei e-liquids nelle sigarette elettroniche.**

L'utilizzo delle sigarette elettroniche è molto semplice, così come il loro principio di funzionamento. La batteria fornisce energia per il riscaldamento della componente principale dell'atomizzatore, ovvero la resistenza, la quale, a sua volta, riscalda l'e-liquid di cui è impregnata fino a vaporizzarlo. Il vapore generato, tramite l'aspirazione da parte del fumatore, si miscela con l'aria che penetra dalla base del serbatoio e viene poi inalato attraverso il boccaglio.



### 1.3.1. COMPOSIZIONE DEGLI E-LIQUIDS

Il vapore emesso dalla e-cig è la nebulizzazione di un liquido formato da due macro componenti: la base ed gli aromi (*flavours*), a cui può essere aggiunta la nicotina ad una concentrazione compresa tra 1 mg e 36 mg/ml [Davis et al., 2015].

La base rappresenta l'80-90% dell'e-liquid ed è un mix di due elementi: il Glicole Propilenico (PG), un fluido veicolante dell'aroma, e il Glicerolo Vegetale (VG), una sostanza vischiosa e densa che dà corpo al vapore. Le percentuali relative di queste due componenti sono variabili e determinano le caratteristiche del fumo che verrà generato.

Mentre la componente aromatica generalmente varia tra il 5 e il 10% dell'e-liquid. In commercio sono disponibili numerosissimi aromi che il "vaper" può scegliere in base ai suoi gusti personali. Nei vaperStore americani ne sono presenti più di 8000 differenti ed i venditori li classificano in base ai loro caratteristici e peculiari sapori con brand name quali berry-cherry, tropical fruit, sweet-chocolate, vanilla, IceMint etc. [Muthumalage et al., 2017].

Molto spesso i gusti sono il risultato di un mix di aromi, infatti, come riportato da Peyton Tierney et al., in un e-liquid possono essere contenute anche 7 diverse molecole aromatizzanti. Il gruppo statunitense ha valutato la composizione di 30 e-liquids identificando le singole molecole aromatizzanti

presenti e le relative concentrazioni. Da questa analisi, le molecole risultate più frequentemente impiegate sono elencate nella tabella 2 [Peyton A Tierney et al. 2015].


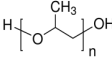




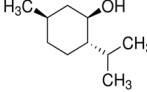

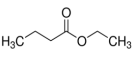
NOME COMMERCIALE	NOME CHIMICO	STRUTTURA CHIMICA	"CLASSE"	CONCENTRAZIONE MIN	CONCENTRAZIONE MAX	CARATTERISTICHE ORGANOLETTICHE
<b>Glicerolo</b>	1,2,3-Propanetriol Glycerin					
<b>Glicole Propilenico</b>	1,2-Propanediol					
<b>Vanillina</b>	4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyde Vanillic aldehyde		Aldeide	0.1 mg/ml	33 mg/ml	Creinoso; dolce
<b>Etil Vanillina</b>	3-Ethoxy-4-hydroxybenzaldehyde		Aldeide	0.2 mg/ml	8.4 mg/ml	Creinoso; dolce
<b>Maltolo</b>	3-Hydroxy-2-methyl-4-pyrone 3-Hydroxy-2-methyl-4H-pyran-4-one Larixinic acid		Alcol	0.8 mg/ml	6.2 mg/ml	Caramelloso; dolce; fruttato
<b>Etil Maltolo</b>	2-Ethyl-3-hydroxy-4H-pyran-4-one		Alcol	0.3 mg/ml	27.5 mg/ml	Caramelloso; dolce
<b>L-Mentolo</b>	(-)-Menthol (1R,2S,5R)-(-)-Menthol (1R,2S,5R)-2-Isopropyl-5-methylcyclohexanol 5-Methyl-2-(1-methylethyl)cyclohexanol		Alcol	5.7 mg/ml	21.6 mg/ml	Mentoso; rinfrescante; balsamico
<b>Alcol Benzilico</b>	Benzenemethanol phenylmethanol		Alcol	0.1 mg/ml	8.4 mg/ml	Fruttato; floreale; dolce
<b>Etil Butirrato</b>	Butyric acid ethyl ester Ethyl butanoate		Estere	0.1 mg/ml	11.1 mg/ml	Fruttato; dolce; ananas; etereo

Tabella 2: Composizione degli e-liquids: la base e le molecole aromatizzanti più comunemente impiegate con le relative concentrazioni negli e-liquids [Peyton A Tierney et al. 2015].

Gli aromi che possono essere contenuti negli e-liquids sono molto vari e di diversa natura chimica, dalle aldeidi, agli alcoli fino agli esteri, tuttavia questi

devono essere “food grade” e/o generalmente riconosciuti come sicuri (GRAS).

### 1.3.2. EFFETTI PERICOLOSI CORRELATI ALL’INALAZIONE DELLE E-CIG

Vi è una forte preoccupazione sulla sicurezza legata all’inalazione degli e-liquids per la salute umana, sebbene gli ingredienti debbano essere “food grade” e/o siano classificati come GRAS (generalmente riconosciuti sicuri) dal FDA (Food and Drug Administration). Tuttavia, queste classificazioni si riferiscono alla sicurezza delle molecole una volta ingerite, ovvero per il loro impiego come additivi alimentari. Mentre si hanno poche ed insufficienti informazioni sulla tossicità di queste molecole quando inalate, cioè quali effetti possono indurre a lungo termine nei polmoni, ed in particolare come si trasformano in seguito al riscaldamento [*U.S Department of Health and Human Services.*, 2016] [*Peter G. shields et al., 2017*]. Se da un lato la ricerca in questo ambito è stata avviata solo recentemente dall’altro è difficile ottenere dei dati univoci in quanto le e-cig non sono strettamente regolamentate per cui in commercio si trovano prodotti molto diversi tra loro rendendo difficile la standardizzazione dei metodi.

In particolare, una delle caratteristiche principali delle e-cig di ultima generazione sono le batterie, molto più potenti rispetto alle precedenti, e

capaci, in combinazione con le resistenze, di aumentare notevolmente la temperatura di riscaldamento dell'e-liquid, aumentando il rischio di degradazione delle molecole e la conseguente formazione di composti tossici e generando nuvole di fumo contenenti sostanze potenzialmente pericolose. Uno studio condotto da Kosmider e collaboratori ha evidenziato come il riscaldamento dell'e-liquid a temperature elevate, sopra i 150°C, determina il rilascio da parte degli aromi di alti livelli di acroleina, acetaldeide e formaldeide mentre alti livello di ossido di propilene sono rilasciati in seguito al riscaldamento dal glicole propilenico [*Leon Kosmider et al., 2014*]. Seppur siano stati investigati aspetti tossicologici associati al riscaldamento dei veicolanti, i dati tossicologici delle sostanze chimiche aromatizzanti denominati “*flavour*” sono stati investigati in maniera molto limitata. In letteratura esistono dati tossicologici per alcuni aromi comunemente usati in campo alimentare che hanno causato malattie polmonari irreversibili nell'essere umano. Il Diacetile, un comune agente aromatizzante usato per fornire un sapore burroso e cremoso a diversi alimenti, è presente in molti e-liquids che conferiscono aroma di caramello, anguria e fragola. Per questa molecola è stata dimostrata l'associazione con bronchiolite obliterante acuta in ambito professionale [*Farsalinos KE et al., 2014; Phillip W. Clapp et al., 2011*].

Ricerche condotte in vivo hanno evidenziato che alcuni aromi fruttati possono rilasciare aldeidi potenzialmente pericolose in seguito alla vaporizzazione. Ad esempio, gli e-liquids al gusto ciliegia quando riscaldati rilasciano una grande quantità di benzaldeide, composto causa dell'irritazione delle vie respiratorie su animali da laboratorio, oltre ad essere coinvolto attivamente nello sviluppo di asma nei bambini in seguito all'inalazione [*George D. Leikauf., 2002; Phillip W. Clapp et al., 2011*]. Kosmider e collaboratori hanno quantificato i livelli di benzaldeide rilasciati dalla vaporizzazione di 145 e-liquids aromatizzati utilizzando una e-cig di seconda generazione con resistenza di 2.4  $\Omega$ , batteria da 900mAh ed impostazione della potenza a 3.4 V. Su 108 e-liquids sono state riscontrate concentrazioni di benzaldeide variabili comprese tra 5.129  $\mu\text{g}$  ogni 30 puff a 141.2  $\mu\text{g}/30$  puff, ovvero aspirazioni durante le quali l'aria si mescola con il fumo proveniente dalla sigaretta elettronica, perciò ogni puff mima un atto respiratorio. Sulla base di questi risultati hanno stimato una dose media giornaliera assunta dai vapers di circa 70.3  $\mu\text{g}$  di benzaldeide, quantità mille volte inferiore al limite di esposizione consentito per lo stesso composto sul posto di lavoro.

Tuttavia, sebbene le quantità di benzaldeide assunte tramite e-cig siano notevolmente inferiori rispetto al limite consentito giornalmente in ambienti di lavoro, la scarsa conoscenza riguardo gli effetti tossici dall'inalazione di

queste sostanze aumenta la possibilità di effetti negativi causati da un continuo e prolungato uso delle e-cig sulla salute umana [*Leon Kosmider et al., 2016; Phillip W. Clapp et al., 2011*].

### 1.3.3. EFFETTI DELLA COMPONENTE AROMATICA SULLA SALUTE

Sebbene vi sia una scarsità di informazioni sugli effetti tossici causati dall'inalazione degli aromi, prove emergenti suggeriscono che il loro vapore può causare un aumento dello stress ossidativo con induzione di una forte risposta infiammatoria che può determinare un danneggiamento del DNA a livello delle cellule polmonari. L'inalazione di questi aromi è stato associato anche ad una diminuzione della risposta immunitaria innata e della clearance mucociliare (figura 8) [*Gurjot., Muthumalage., Rahman.2018*].

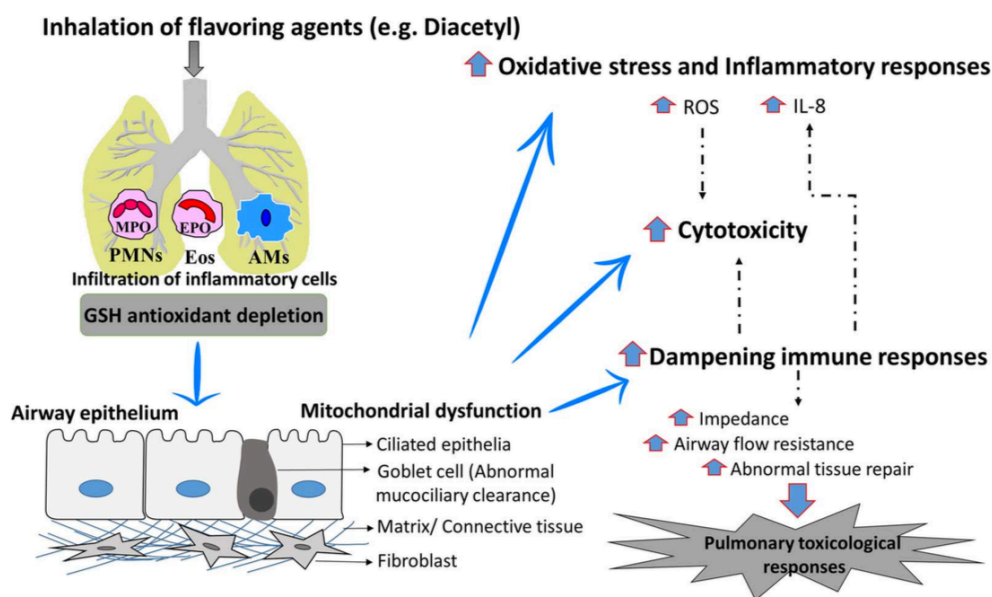


Figura 8: Rappresentazione schematica dei meccanismi tossici mediati dal fumo delle e-cig [Gurjot., Muthumalage., Rahman.2018].

In particolare, Gerloff e collaboratori hanno registrato un aumento nella produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) in seguito all'esposizione acuta di cellule dell'epitelio bronchiale (Beas2B) e di fibroblasti (HFL-1) umani ai più noti aromi presenti in commercio. Nello specifico l'esposizione ad alcuni specifici aromi come l'acetoino, la vanillina e il maltolo, causano una maggiore stimolazione del rilascio della citochina pro-infiammatoria IL-8 inducendo una maggiore attivazione della risposta infiammatoria [Gerloff *et al.*, 2017; Gurjot Kaur *et al.*, 2018; Sundar *et al.*, 2016]. Risultato analogo è stato ottenuto da Ween *et al.* che ha evidenziato come il conseguente incremento della produzione di ROS e del rilascio endogeno di IL-8

diminuisca drasticamente la normale capacità fagocitica di linee cellulari di macrofagi THP-1 [*Miranda Ween et al., 2017*].

Il vapore delle e-cig, oltre a determinare un aumentato stress ossidativo con conseguente aumento dell'infiammazione, riduce la risposta immunitaria contro infezioni batteriche soprattutto da *Staphylococcus aureus* ed il virus dell'influenza A [*Hwang et al., 2016, Sussan et al., 2015, Gurjot et al., 2018*].

L'esposizione al fumo delle e-cig determina dunque una serie di importanti alterazioni a livello cellulare, sopprimendo le difese immunitarie, aumentando la produzione endogena di citochine pro-infiammatorie inducendo il rilascio di ROS che possono indurre significativi danni a livello del DNA. Infatti dall'analisi dei meccanismi che modulano il danno al DNA, è stato identificato un aumento dei ROS cellulari parallelamente ad un'inibizione dell'espressione delle proteine essenziali per la riparazione del danno al DNA aumentando potenzialmente i rischi dello sviluppo di neoplasie polmonari.

Sebbene negli ultimi anni siano stati fatti alcuni progressi nello studio della tossicità degli aromi impiegati nei liquidi per le sigarette elettroniche, i meccanismi patogenetici di disregolazione restano sconosciuti e i risultati sono spesso discordanti, pertanto risulta evidente la necessità e l'estrema importanza di eseguire ulteriori ricerche e di regolamentare l'uso di questi dispositivi [*Gurjot et al., 2018*].



## 2. SCOPO DELLA TESI:

---

L'utilizzo delle sigarette elettroniche si è diffuso in modo quasi esponenziale negli ultimi anni, in particolar modo tra i giovani. Questo dato desta molta preoccupazione in quanto, sebbene sia noto che le e-cig siano meno nocive delle sigarette di tabacco, risultati sempre più consistenti evidenziano che non sono innocue per la salute. Tuttavia, ad oggi, le ricerche sugli effetti dell'utilizzo di questi nuovi dispositivi sono incomplete e spesso forniscono risultati discordanti. In particolare, i dati riguardanti la tossicità dei singoli aromi impiegati negli e-liquid sono limitati. In particolare la natura di queste molecole aromatizzanti potenzialmente tossiche, è estremamente eterogenea e comprende aldeidi, alcoli ed esteri. Risulta pertanto fondamentale chiarire il loro diverso contributo nella tossicità delle e-cig. A tale fine, lo scopo della presente tesi è la valutazione della citotossicità di sette specifici aromi tra i più comunemente impiegati negli e-liquid dopo essere stati vaporizzati con la sigaretta elettronica. In particolare, è stato analizzato il loro effetto sulla vitalità e lo stato ossidativo in una linea cellulare primaria di fibroblasti del derma umani utilizzando l'estratto di fumo di sigaretta di tabacco come controllo positivo.

### 3. MATERIALI E METODI:

---

#### 3.1 PREPARAZIONE DELL'ESTRATTO DEL FUMO DI SIGARETTA

L'estratto del fumo di sigaretta (CSE) è stato preparato apportando una modifica al metodo descritto da Carp e Janoff [*Carp and Janoff., 1978*], è stata utilizzata una sigaretta con filtro, comunemente disponibile in commercio (tabella 3).

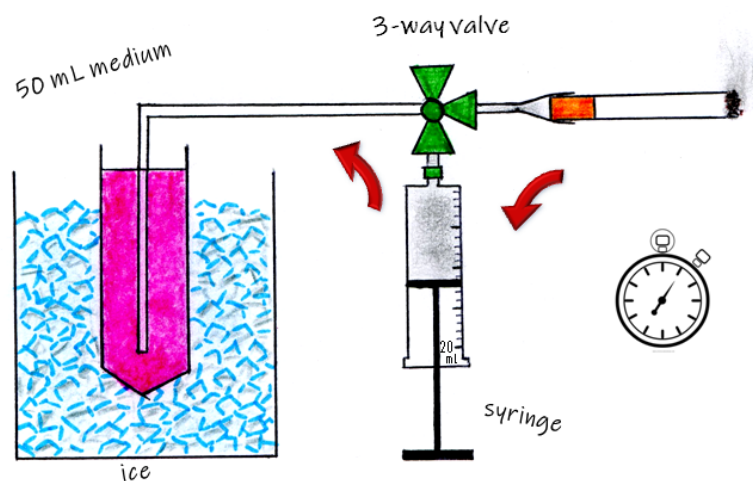
	<b>Sigaretta con filtro commerciale (mg/sigaretta)</b>
Catrame	10
Monossido di carbonio	10
Nicotina	0.8

**Tabella 3: Composizione delle sigarette di tabacco.**

Il CSE è stato ottenuto bruciando dieci sigarette con il sistema rappresentato in figura 9, basato sull'aspirazione del fumo mediante una siringa.

Più precisamente, il campionamento del CSE è stato eseguito con un protocollo standardizzato, in cui il fumo derivante da ogni puff è stato aspirato da una siringa da 20 ml riempita in due secondi. Il fumo risultante è stato poi fatto gorgogliare in 50 ml di MEM in 10 secondi. Ogni sigaretta è

stata consumata in 15 aspirazioni. La sospensione risultante è stata filtrata attraverso un filtro con pori di  $0.20\ \mu\text{m}$  per eliminare eventuali particelle estranee e contaminazioni batteriche, ed il pH è stato aggiustato a 7.4. Al momento del trattamento delle cellule con il CSE, la soluzione madre corrispondente a 3.5 puff/ml è stata diluita nel mezzo di coltura. La riproducibilità e la stabilità della soluzione madre è stata verificata valutando la vitalità e la produzione ROS in HDF esposti per 24h a 5 diversi estratti preparati al momento e dopo conservazione per 6 mesi a  $4^\circ\text{C}$  al buio.



**Figura 9:** Rappresentazione schematica del sistema per l'estrazione del fumo.

### 3.2. PREPARAZIONE DEGLI AROMI E DEI LORO ESTRATTI

Sulla base del lavoro di Peyton e collaboratori [*Peyton A Tierney et al. 2015*] descritto nel capitolo precedente, sono stati selezionati sette aromi tra i più comunemente utilizzati dalle ditte di produzione degli e-liquids, ovvero; Vanillina, Etil vanillina, Maltolo, Etil maltolo, Mentolo, Alcol benzilico ed Etil butirrato (tabella 3). Ognuno è stato solubilizzato in glicole propilenico (pg) e poi mescolato con il glicerolo vegetale (vg) per formare il mix di vaporizzazione, con un rapporto 50/50 pg/vg, ottenendo una concentrazione finale degli aromi superiore rispetto alle concentrazioni massime individuate negli e-liquids commerciali analizzati da Peyton e collaboratori, in particolare etil vanillina, vanillina, alcol benzilico, etil butirrato e mentolo sono state testate ad una concentrazione di 50 mg/ml, mentre l'etil maltolo a 40 mg/ml e il maltolo a 20 mg/ml.

Per vaporizzare e quindi estrarre il fumo degli e-liquids ottenuti, è stata utilizzata una sigaretta elettronica di quarta generazione, la iStick QC 200W dotata di una batteria da 5000mAh ed atomizzatore MELO300 il cui tank presenta una capienza massima di 3.5 ml, rappresentata in Figura 5. L'e-cig è stata utilizzata con la potenza di uscita del vapore di 100W, la resistenza di 0.17  $\Omega$  ed il voltaggio di 4V.

Per estrarre il vapore della sigaretta elettronica (EVC) è stato impiegato lo stesso protocollo utilizzato per ottenere il CSE adattando il sistema di aspirazione al dispositivo elettronico, sistema illustrato in figura 10. In particolare, il vapore generato da ogni aroma è stato aspirato da una siringa da 20ml dopo aver premuto per 3 secondi il pulsante di avviamento della vaporizzazione sulla e-cig. Il vapore è stato poi fatto gorgogliare in 20 ml di MEM in 10 secondi, e, al fine di mantenere gli stessi rapporti di aspirazione sia per il CSE che l'EVC, ovvero 3.5 puff/ml, ogni estratto è stato ottenuto gorgogliando 68 puff in 20ml di MEM.

La sospensione ottenuta di EVC è stata successivamente filtrata mediante un filtro con pori di 0.20  $\mu\text{m}$  per eliminare potenziali contaminazioni batteriche e particelle estranee ed il pH aggiustato a 7.4.

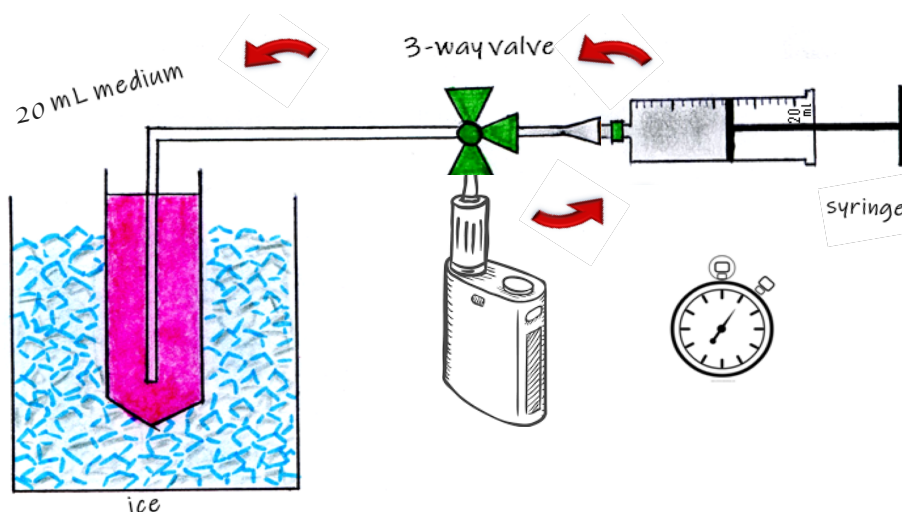


Figura 10: Rappresentazione schematica del sistema per l'estrazione del vapore da e-cig.

### 3.3. MODELLO CELLULARE

Nel presente studio, per testare la tossicità della componente aromatica e del CSE, è stato impiegato un modello cellulare di fibroblasti del derma umani neonatali (nHDF). Le cellule sono state coltivate in MEM (Minimum Essential Media) contenente il 10% di siero fetale di bovino inattivato, 1% di L-glutamina, streptomicina (100 µg) e penicillina (100 U/ml). La coltura cellulare è stata mantenuta in incubatore a 37°C in un'atmosfera umidificata al 5% di CO<sub>2</sub>. Gli esperimenti sono stati condotti su cellule tra i passaggi 10-15.

### 3.4. DISEGNO SPERIMENTALE

Lo studio è stato suddiviso in due parti: innanzitutto è stato identificato ed ottimizzato un modello di stress indotto dal fumo di sigaretta di tabacco in una coltura cellulare di nHDF, dopodiché sono stati testati gli effetti citotossici indotti dagli estratti vaporizzati degli aromi.

In particolare, nella prima parte cellule confluenti di nHDF sono state trattate per 24h con concentrazioni scalari di CSE (0.11, 0.22, 0.44, 0.88, 1.75, 3.5 Puff/ml) e sono stati valutati gli effetti dose-dipendenti sulla vitalità e lo stato ossidativo cellulare mediante la citometria a flusso.

Mentre, nella seconda parte dello studio sono stati valutati gli effetti citotossici dell'esposizione ai vapori prodotti da e-liquids contenenti aromi specifici. Perciò cellule confluenti di nHDF sono state trattate per 24h con EVC, e sono stati valutati i parametri citotossici quali la vitalità e lo stato ossidativo citoplasmatico e mitocondriale.

### 3.5. SAGGIO MTT

Dopo il trattamento di cellule nHDF per 24h con gli estratti vaporizzati degli aromi, è stata valutata la vitalità cellulare mediante il saggio MTT.

Questo metodo si basa su un sale di tetrazolio (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro o MTT), sostanza che dà un colore giallo in soluzione acquosa. La deidrogenasi mitocondriale delle cellule vive e metabolicamente attive taglia l'anello tetrazolico, portando alla formazione di cristalli di formazano color viola porpora insolubili in acqua. I cristalli vengono poi sciolti mediante un apposito liquido organico. La soluzione risultante avrà un'intensità della colorazione proporzionale alla quantità e grandezza dei cristalli che si sono formati, di conseguenza sarà proporzionale alla vitalità cellulare.

Dopo il trattamento di 24h eseguito su una piastra da 96 pozzetti, il terreno di coltura è stato aspirato e le cellule incubate con 100 µl/pozzetto di una

soluzione 0.5 mg/ml di MTT, per 1h al buio a 37°C. La soluzione è stata successivamente rimossa e sostituita con 100 µl/pozzetto di DMSO (Dimetilsolfossido) per 10 minuti di incubazione al buio a temperatura ambiente, per permettere la solubilizzazione dei cristalli di formazano. L'assorbanza delle soluzioni è stata poi registrata a 550nm con il lettore di piastra Synergy HT (Bio-tek) e corrette sottraendo l'assorbanza del mezzo diluente, ovvero il DMSO. La vitalità espressa in % è stata calcolata mediante la seguente proporzione:

$$[\text{Assorb. composto testato (550nm)} / \text{assorb. Controllo negativo}] \times 100$$

### 3.6. ANALISI DELLA CITOMETRIA A FLUSSO

I livelli di ROS citosolici e mitocondriali, oltre all'apoptosi, sono stati valutati mediante citometria a flusso utilizzando specifiche sonde fluorescenti quantificate mediante il citometro a flusso (Guava EasyCyte) con il software GuavaSoft 2.7 (Merck Millipore, Darmstadt, Germania). Come sorgente eccitante è stato utilizzato una laser alla lunghezza d'onda di 488nm e l'intensità della fluorescenza emessa è stata registrata in canali diversi su una media di 5000 cellule per ciascun campione.



### 3.6.1. CONTENUTO CITOPLASMATICO DI ROS

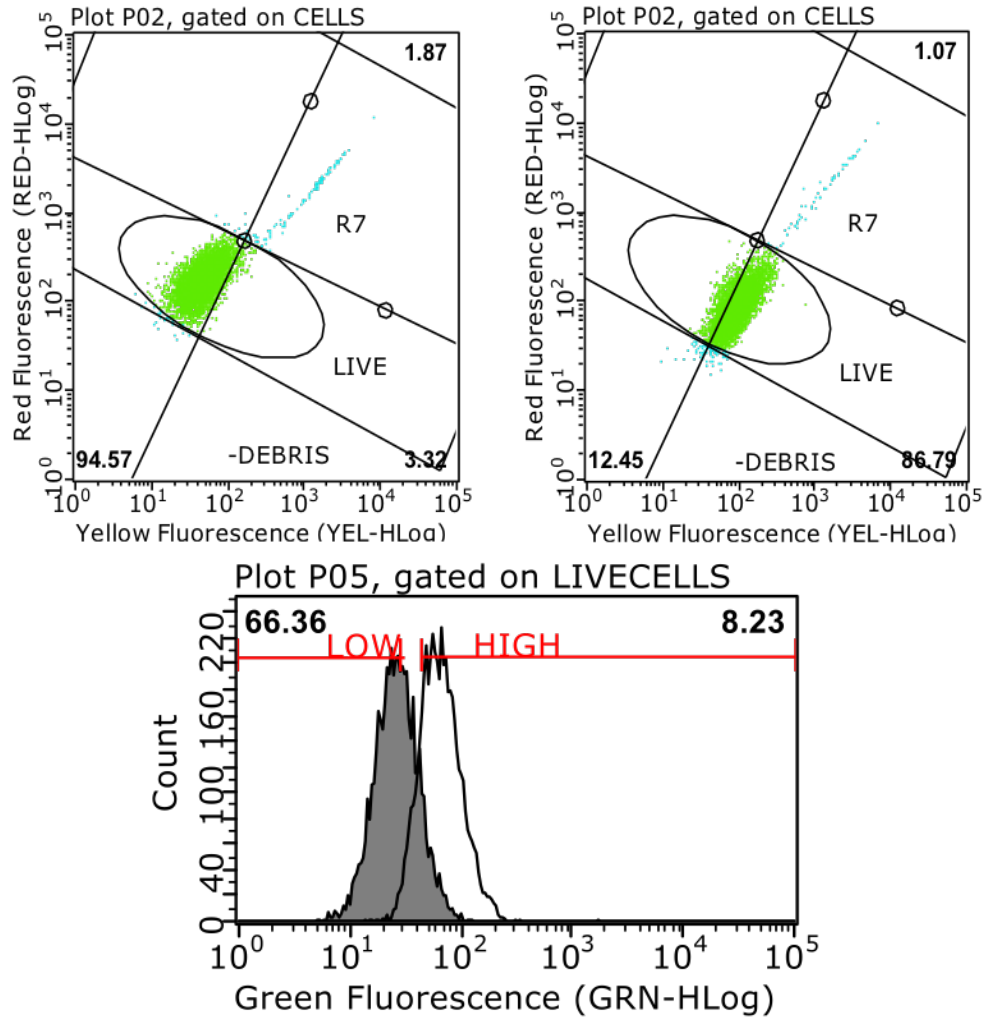
I livelli citosolici di ROS sono stati valutati utilizzando come sonda fluorescente la carbossi-2,7-diclorofluoresceina diacetato (carbossi- $H_2DCFDA$ ) (Invitrogen), una molecola non polare lipofilica che diffonde facilmente attraverso la membrana cellulare. All'interno della cellula la  $H_2DCFDA$  viene idrolizzata dalle esterasi intracellulari che rimuovono i gruppi acetati rendendola polare e idrofilica ( $H_2DCF$ , Diidrodiclorofluoresceina), quindi impermeabile alla membrana cellulare, determinandone in questo modo l'accumulo intracellulare. La  $H_2DCFDA$  è un fluorocromo leuco, ossia non è fluorescente come tale, ma lo diventa in seguito ad ossidazione da parte di specie ossidanti. I livelli di fluorescenza sono pertanto proporzionali alla quantità di specie reattive dell'ossigeno intracellulari. La forma ossidata che si forma è una molecola altamente fluorescente che emette ad una lunghezza d'onda di 532 nm, ovvero nella regione del verde.

A seguito del trattamento con gli estratti vaporizzati degli aromi, le cellule sono state incubate con la sonda (10  $\mu M$  in PBS) per 30 minuti a 37°C al buio, dopodiché sono state lavate e staccate. Un'aliquota di ciascun campione è stata poi aggiunta ad una soluzione di Guava ViaCount (Merck Millipore), una formulazione di molecole fluorescenti in grado di discriminare cellule

vive, morte ed apoptotiche, sulla base delle differenti permeabilità alla membrana plasmatica di due coloranti che legano il DNA. La sonda permeabile alla membrana plasmatica (che emette fluorescenza rossa) colora tutte le cellule nucleate, indipendentemente dalla vitalità della cellula e consente di discriminare i debris cellulari. Il fluorocromo impermeabile alle membrane (fluorescente in giallo) entra solo nelle cellule morenti con la membrana compromessa, diversi livelli di fluorescenza gialla consentono di distinguere le cellule morte dalle apoptotiche, in analogia all'impiego del propidio sopravvitalo. L'analisi dei ROS e dell'apoptosi sono state condotte simultaneamente con il citometro a flusso. Di fatto, l'utilizzo combinato delle due sonde fluorescenti è necessario al fine di valutare i livelli di ROS intracellulari solo nelle cellule vive. Infatti, è essenziale per questa analisi, escludere le cellule con la membrana cellulare compromessa per evitare di incorrere in falsi negativi causati dalla fuoriuscita della DCF dalle cellule morte e con una membrana non integra.

Per l'analisi dei dati, sono state definite arbitrariamente all'interno del canale verde delle cellule vive, usando come riferimento la distribuzione del controllo pg/vg, le regioni "LOW" e "HIGH" del contenuto citosolico di ROS corrispondenti rispettivamente al 55 ed al 12% delle cellule analizzate (figura 11). Mentre le cellule vive, apoptotiche e morte sono state definite all'interno

dei canali di fluorescenza giallo e rosso. Gli stessi settaggi sono stati utilizzati per l'analisi di tutte le repliche sperimentali.

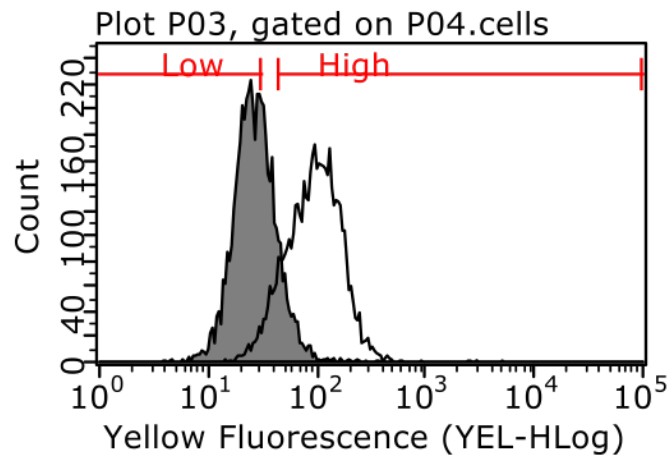


**Figura 11: Rappresentazione della distribuzione di fluorescenza registrata al citofluorimetro. In alto: dot-plot relativo alla vitalità del controllo negativo pg/vg (sinistra) e positivo CSE (destra), valutata con la sonda ViaCount. In basso: istogramma relativo alla distribuzione della fluorescenza verde della sonda H2DCFDA nel controllo negativo pg/vg (grigio) e positivo CSE (bianco).**

### 3.6.2. SAGGIO DELL'ANIONE SUPEROSSIDO

La produzione di anione superossido a livello mitocondriale è stato valutato tramite citometria a flusso per mezzo della sonda nerstiana ridotta MitoSOX™ - Indicatore di superossido mitocondriale rosso (Invitrogen), un derivato idroetidinicico che viene assorbito dai mitocondri in fase di respirazione cellulare, e quando viene ossidato dal superossido diviene fluorescente emettendo ad una lunghezza d'onda di 580nm, corrispondente alla zona del rosso.

In breve, le cellule trattate con CSE, EVC e le cellule di controllo non trattate, sono state incubate con una soluzione 5  $\mu$ M di MitoSOX in PBS per 15 minuti a 37°C al buio. Dopo averle staccate con la tripsina, le cellule sono state lavate ed analizzate tramite il citometro a flusso Guava Easycyte (Millipore). Per l'analisi quantitativa della distribuzione della fluorescenza emessa, sono state arbitrariamente impostate due regioni corrispondenti a "LOW" e "HIGH" contenuto mitocondriale di ROS usando come riferimento il controllo negativo pg/vg (figura 12). Gli stessi settaggi sono stati mantenuti per l'analisi di tutti gli esperimenti successivi.



**Figura 12: Distribuzione registrata al citofluorimetro della fluorescenza gialla della sonda MitoSOX™ nel controllo negativo pg/vg (grigio) e positivo CSE (bianco).**

### 3.7. ANALISI DEI DATI

Ogni esperimento è stato eseguito almeno in tre replicati biologici condotti in tre diverse sessioni sperimentali. La significatività statistica è stata valutata mediante il test T di Student prendendo come riferimento il controllo negativo pg/vg, ed un valore P inferiore a 0.05 è stato considerato statisticamente significativo e rappresentato come: “\*”  $p \leq 0.05$ , “\*\*”  $p \leq 0.01$  o “\*\*\*”  $p \leq 0.001$ . I dati sono stati rappresentati come media  $\pm$  SD.

## 4. RISULTATI:

---

Sebbene in letteratura siano presenti diversi studi condotti sulla tossicità degli e-liquids, risultati contrastanti mettono in evidenza la necessità di ulteriori analisi. In particolare, gli studi presenti in letteratura analizzano gli e-liquids commerciali, i quali contengono un mix di molecole aromatizzanti e sono spesso soggetti a contaminati quali metalli pesanti. Con il presente studio, è stato valutato l'effetto di ogni singola molecola aromatizzante, dopo aver ottimizzato un modello di stress indotto dal fumo di sigaretta tradizionale.

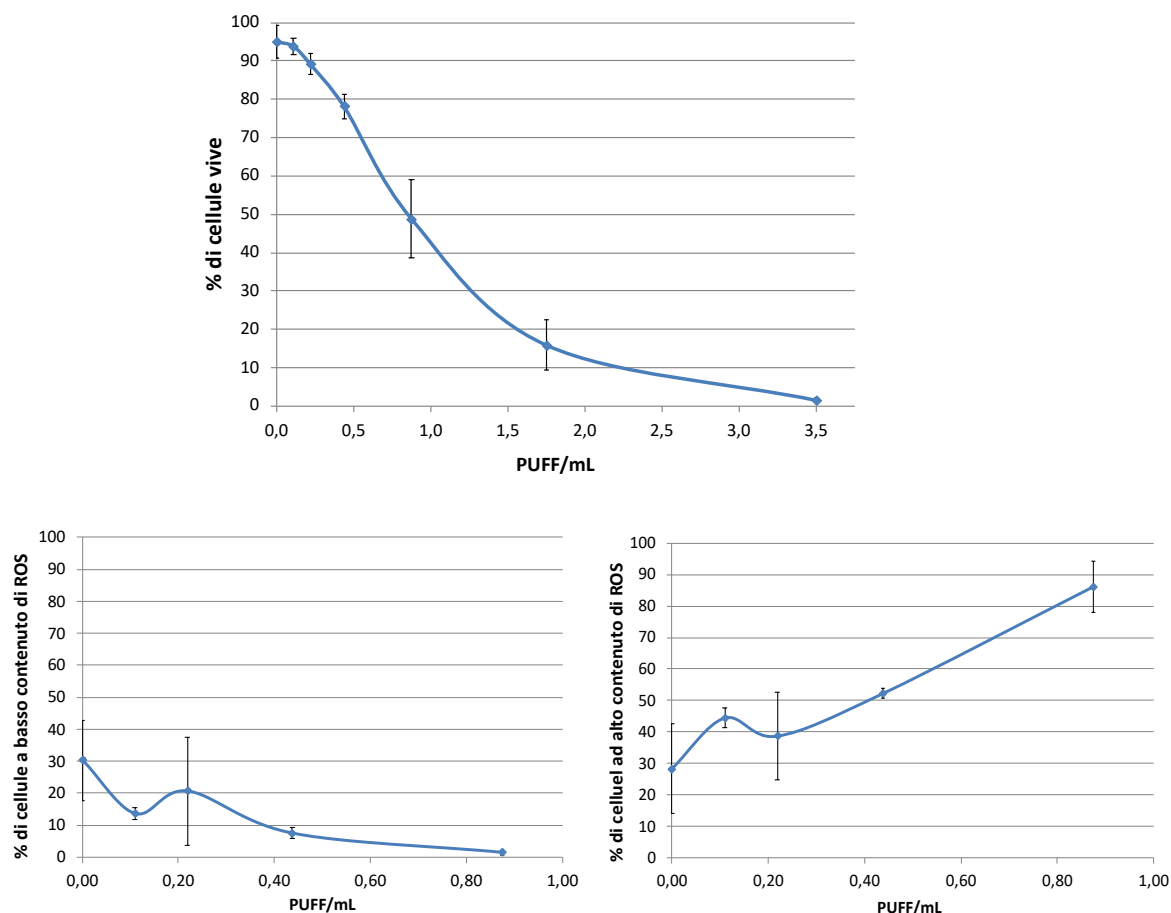
### 4.1. MODELLO DI STRESS INDOTTO DA CSE

Inizialmente è stata analizzata la citotossicità del CSE trattando cellule nHDF con un'ampia scala di concentrazioni di estratto di sigaretta (3.50, 1.75, 0.88, 0.44, 0.22, 0.11 Puff/ml) per 24h dopodiché è stata valutata la vitalità e l'alterazione dello stato ossidativo cellulare tramite citometria a flusso. Dall'analisi dei risultati rappresentati in figura 13, si osserva un effetto dose-dipendente del CSE sulla vitalità, in cui concentrazioni crescenti determinano un aumento del tasso di mortalità. In particolare alla concentrazione di 0.88

puff/ml la vitalità è stata stimata al 49% per azzerarsi quasi completamente dopo l'esposizione a 3.5 puff/ml di CSE.

Sulla base di questi risultati è stato possibile identificare una concentrazione sub-letale (0.88 puff/ml) utilizzata come controllo positivo nelle successive analisi condotte sugli estratti vaporizzati degli aromi.

La concentrazione di 0.88 puff/ml oltre a determinare una diminuzione della vitalità altera in modo sensibile anche lo stato ossidativo cellulare causando un incremento delle cellule vive ad alto contenuto di ROS dal  $28 \pm 14\%$  del controllo negativo al  $86 \pm 8\%$ . Oltre tale concentrazione la mortalità è troppo alta rendendo inutile e insensata la valutazione dello stato ossidativo cellulare. Per cui la concentrazione 0.88 puff/ml di CSE è risultata essere quella migliore al fine di indurre uno stress ossidativo in un modello di nHDF, per cui è stata utilizzata come controllo positivo negli esperimenti successivi.



**Figura 13: Effetto dose-dipendente del trattamento con CSE per 24h su nHDF. Vitalità (in alto) e Contenuto dei ROS cellulari (in basso)**

## 4.2. VALUTAZIONE DELLA CITOTOSSICITÀ DEGLI AROMI

Le sigarette elettroniche sono state immesse nel mercato mondiale come un'alternativa sicura alle sigarette tradizionali, tuttavia quest'immagine potrebbe ingannare l'utente il quale potrebbe sottovalutare il potenziale pericolo di questi dispositivi sottoponendosi ad un continuo ed alto livello di esposizione ai composti chimici presenti negli e-liquids ed in particolare quelli derivanti dal loro riscaldamento. Una componente degli e-liquids molto



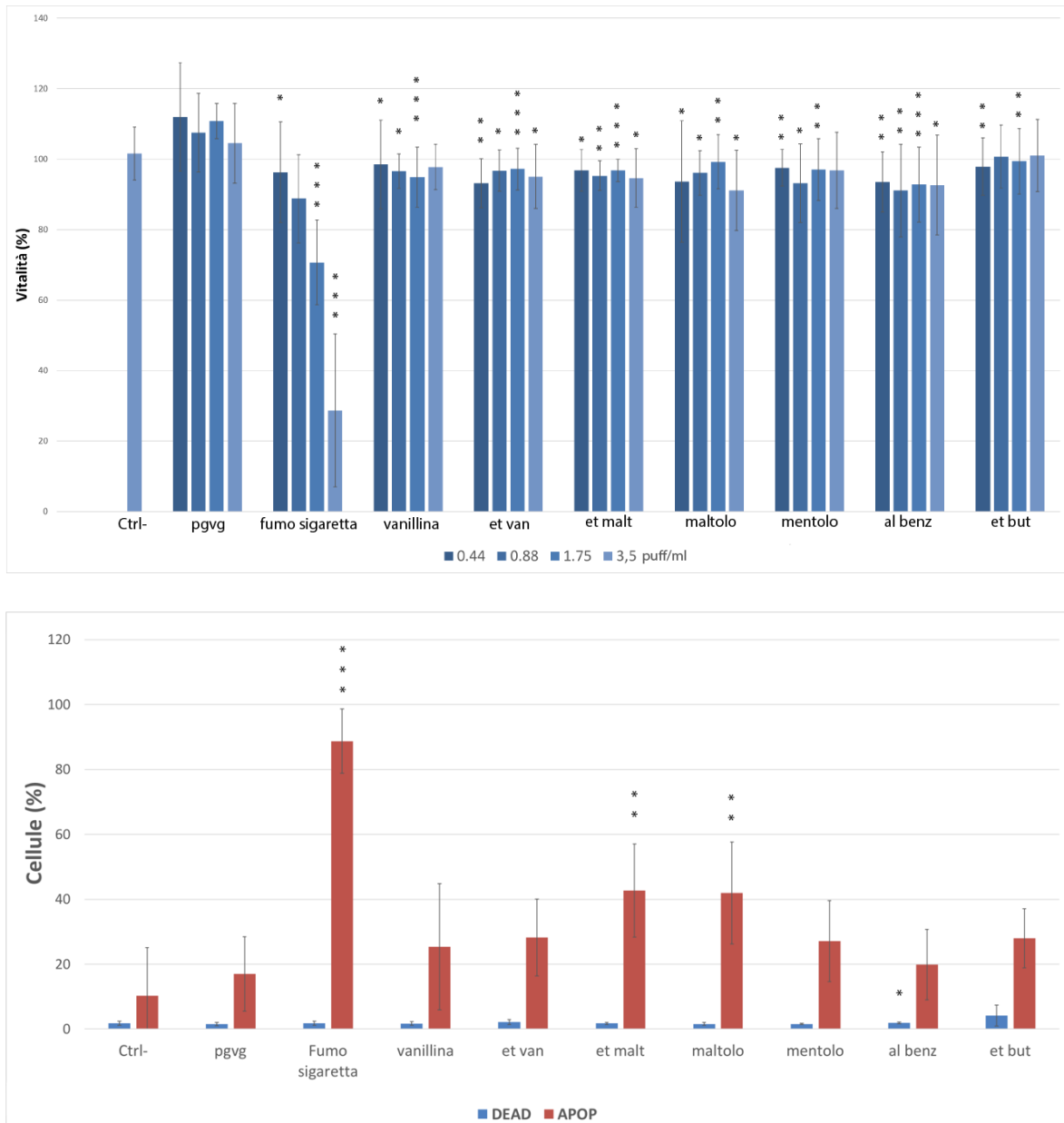
importante e che attrae all'utilizzo di questi dispositivi è chiaramente quella aromatica. Tuttavia ci sono dati insufficienti sulla sicurezza dell'inalazione delle molecole aromatiche.

Dunque, per valutare la tossicità degli estratti prodotti dalla vaporizzazione degli aromi selezionati, nella comune matrice di polietilenglicole e glicerolo, è stata prima eseguita un'analisi della vitalità, tramite il saggio MTT, dopodiché è stato valutato il loro effetto sullo stato ossidativo cellulare.

Le cellule nHDF sono state trattate per 24h con una scala di concentrazioni (0.44, 0.88, 1.75, 3.50 Puff/ml) ed i risultati sono stati comparati con il controllo negativo pg/vg e quello positivo, ovvero trattato con CSE. Dall'analisi dell'assorbanza registrata con il saggio MTT è emerso un basso livello di tossicità di tutti gli estratti. Sebbene la vitalità, quando comparata con il controllo negativo pg/vg, diminuisca in modo significativo con quasi tutte le concentrazioni testate, si mantiene superiore al 90%. Tuttavia, tutti gli aromi sono risultati nettamente meno tossici rispetto al CSE, il quale ha determinato una diminuzione dose-dipendente della vitalità (figura 14). In particolare alla concentrazione sub-letale, ovvero 0.88 puff/ml, il CSE ha determinato un aumento altamente significativo delle cellule apoptotiche portandole al  $49 \pm 11\%$  delle cellule totali. Mentre tra gli estratti aromatici, solamente il maltolo e l'etil maltolo alla più alta concentrazione testata,

ovvero 3.5 puff/ml, hanno causato un aumento significativo dell'apoptosi.

Questo particolare shift potrebbe essere una conseguenza di un aumentato stress ossidativo che si verifica in seguito all'esposizione con queste sostanze.

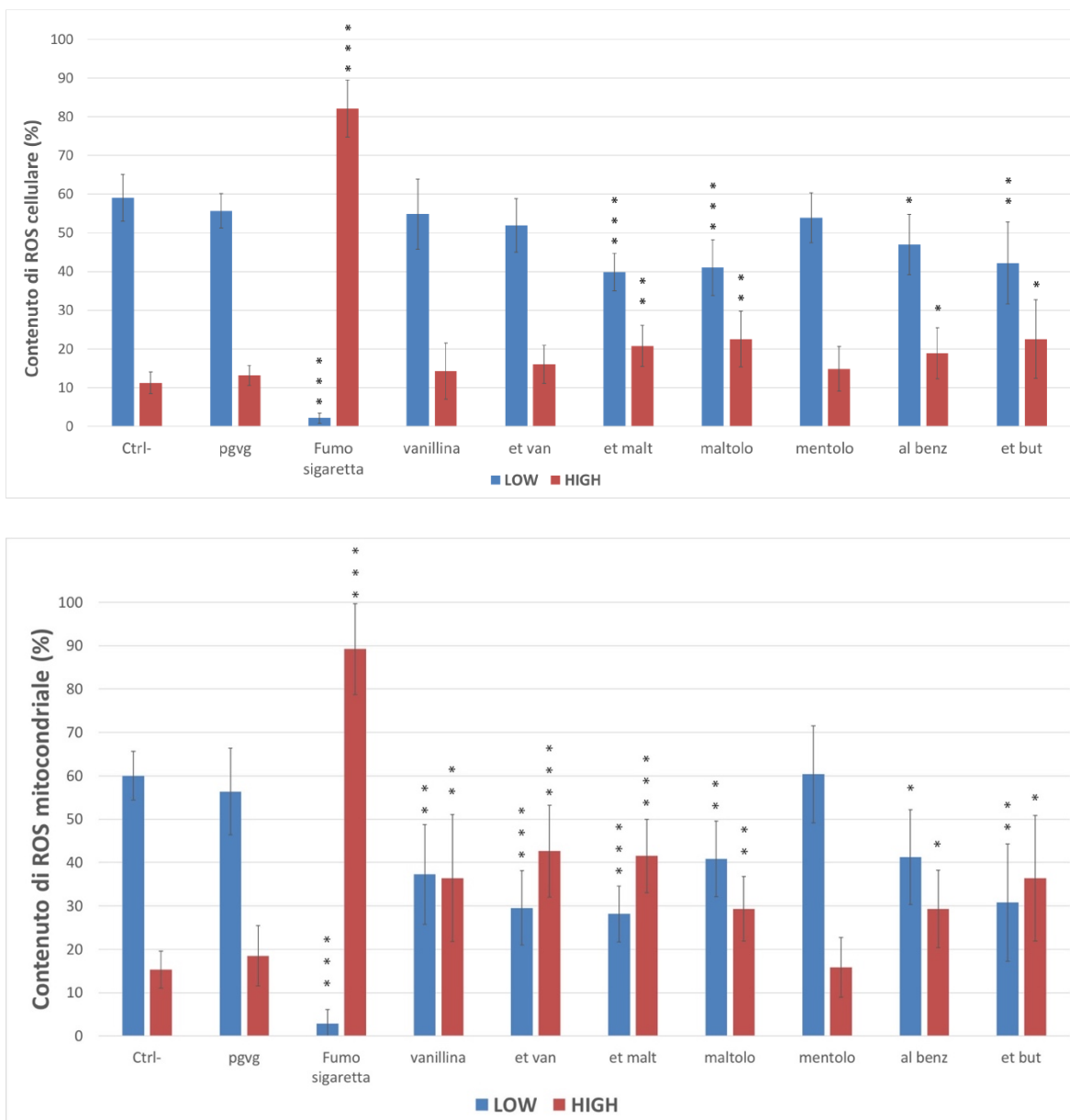


**Figura 14: Effetto sulla vitalità del trattamento con EVC (3.5 puff/ml) per 24h su nHDF. Vitalità (in alto) e distribuzione della % di cellule morte ed apoptotiche (in basso).**

Seppur molto meno tossici del fumo di sigaretta, gli estratti dei flavours non sono innocui a livello cellulare, risulta quindi interessante indagare i meccanismi che potrebbero essere coinvolti sulle alterazioni correlate ad una esposizione in acuto, in particolare a livello ossidativo, analizzando i principali markers a livello citoplasmatico e mitocondriale.

L'esposizione al CSE (0.88 puff/ml) oltre ad inficiare la vitalità, ha alterato in modo sostanziale lo stato ossidativo a livello citoplasmatico delle cellule vive aumentandone il contenuto di ROS in più dell'80% di cellule. Mentre il trattamento con EVC alla concentrazione massima (3.5 puff/ml) ha determinato un modesto ma significativo incremento della percentuale di cellule ad alto contenuto di ROS ad eccezione delle aldeidi (vanillina ed etil vanillina) e del mentolo che sono comparabili con il controllo negativo pg/vg. Questa variazione dello stato ossidativo citosolico si riflette a livello mitocondriale alterandone il contenuto di ROS, in particolare dell'anione superossido caratteristico di questo organello. Infatti, tutti gli aromi che hanno determinato un aumento dei ROS citosolici hanno causato anche l'aumento di quelli mitocondriali, ad eccezione delle aldeidi testate (vanillina ed etil vanillina) le quali hanno alterato il contenuto di radicali a livello mitocondriale senza modificare quello citosolico, mostrando quindi un'azione specifica verso questo organello. Infine, il mentolo, l'unico alcol testato privo

di anello aromatico, sembra non causare alcun tipo di modificazione del quadro ossidativo né a livello citoplasmatico né mitocondriale.



**Figura 15: Effetto sullo stato ossidativo citoplasmatico (in alto) e mitocondriale (in basso) del trattamento con EVC (3.5 puff/ml) per 24h su nHDF. Il fumo di sigaretta (0.88 puff/ml) è utilizzato come controllo positivo, mentre pg/vg come controllo negativo.**

## 5. DISCUSSIONE

---

L'esponenziale diffusione delle sigarette elettroniche desta molta preoccupazione in quanto, non solo la percezione di scarsa tossicità può comunque avvicinare i più giovani ad abitudini potenzialmente nocive, ma soprattutto perché è presente uno scarso numero di dati tossicologici in relazione agli effetti dell'utilizzo di questi dispositivi sulla salute umana. Infatti, ad oggi le ricerche sugli effetti indotti dall'inalazione dei vapori derivanti dal riscaldamento con conseguente evaporazione e condensazione degli e-liquids, sono ancora incomplete e spesso discordanti, principalmente a causa dell'ampia varietà di dispositivi esistenti. Inoltre tali studi utilizzano gli e-liquids commerciali i quali, tuttavia, sono miscele di veicolanti (glicole propilenico e glicerolo vegetale), nicotina e aromi, e spesso contengono contaminanti come metalli pesanti, rendendo impossibile l'identificazione delle molecole responsabili dei danni indotti dalle e-cig. Perciò risulta importante comprendere il contributo dei singoli componenti, in particolare delle singole molecole aromatizzanti in quanto queste appartengono a delle classi chimiche di per sé potenzialmente pericolose, ovvero aldeidi, alcoli ed esteri.

Perciò, nel presente studio, dopo aver ottimizzato il modello di stress indotto dal fumo di sigaretta di tabacco (CSE) in cellule nHDF, sono stati studiati gli effetti citotossici in acuto (24h) degli estratti dei principali aromi comparando i risultati con il CSE.

I risultati ottenuti nella prima parte di questo studio confermano l'elevata tossicità, già ben documentata, del fumo di sigaretta di tabacco, il quale, nel presente modello sperimentale, ha determinato un tasso di mortalità cellulare di quasi il 50% alla concentrazione di 0.88 puff/ml associato ad un forte stress ossidativo, indotto, con molta probabilità, da un'azione diretta ed indiretta di molecole pro-ossidanti presenti nel fumo a livello cellulare [*Faux SP et al., 2009*].

Le sigarette elettroniche sono state commercializzate in principio anche nell'ambito della lotta al tabagismo come alternativa sicura alle classiche sigarette. Enti di riconosciuto prestigio nella lotta ai tumori, quali la Fondazione Veronesi che inizialmente avevano espresso alcune considerazioni positive su questa modalità rispetto al fumo di tabacco tradizionale, recentemente hanno emesso dei comunicati decisamente più cauti che sottolineano i potenziali rischi ancora non sufficientemente noti [*Fondazione Umberto Veronesi magazine, 2019*]. Infatti, sebbene le sigarette elettroniche siano risultate molto meno tossiche degli estratti delle sigarette

tradizionali in relazione sia alla vitalità che allo stato ossidativo cellulare. Tuttavia, vi sono evidenze che le sostanze chimiche contenute nei vapori di sigaretta elettronica sono comunque in grado di indurre danni ossidativi a livello cellulare [Gurjot *et al.*, 2018]. In particolare, si è osservato un contributo differenziale degli aromi nella tossicità indotta dal fumo delle e-cig. Nel nostro modello sperimentale, sebbene tutti gli aromi, ad eccezione del mentolo, abbiano indotto un incremento dei ROS mitocondriali, questo stress non si riflette a livello citosolico per tutte le molecole testate, ovvero le aldeidi (vanillina ed etil vanillina) non alteravano lo stato ossidativo citoplasmatico evidenziando una potenziale azione specifica esclusivamente a livello mitocondriale, un organello chiave nella produzione di specie reattive dell'ossigeno cellulari. Il fatto che i radicali prodotti a livello mitocondriale non contribuivano ad un aumento dei ROS totali citosolici significa che probabilmente in questo caso i sistemi di detossificazione cellulare sono comunque in grado di bilanciare la formazione di specie reattive dell'ossigeno e quindi sottolineano una minore tossicità di questi aromi rispetto agli altri dove evidentemente si osserva una minore capacità di contrastare lo stress ossidativo cellulare che può essere dovuta sia ad una maggiore quantità di ROS prodotti in assoluto oppure ad una inattivazione dei sistemi di difesa. Inoltre, solamente il maltolo e l'etil maltolo sembrano coinvolte maggiormente

nella stimolazione dei meccanismi pro-apoptotici, mentre si evidenzia un effetto protettivo del mentolo, il quale non altera lo stato ossidativo cellulare ed è caratterizzato da un'elevata percentuale di vitalità cellulare in seguito all'esposizione, in accordo con i dati riportati da Stringaro e collaboratori [Stringaro et al., 2018].

Pertanto, in linea con i precedenti studi condotti da Gurjot e collaboratori [Gurjot Kaur et al., 2018], i risultati del presente studio evidenziano la capacità della maggior parte degli aromi tra i più diffusi nelle formulazioni commerciali di indurre uno squilibrio ossidativo differenziale sia a livello citoplasmatico che mitocondriale. Questi dati sono molto interessanti, tuttavia, sono stati ottenuti su un modello di fibroblasti del derma, perciò sono necessarie ulteriori indagini in modelli più pertinenti alla tematica delle sigarette elettroniche, come, ad esempio, in linee cellulari delle vie aeree, al fine di elucidare gli effetti ed i meccanismi d'azione delle singole molecole aromatizzanti in relazione all'inalazione. Inoltre sarebbe di particolare interesse la valutazione della tossicità dell'esposizione cronica a tali sostanze e dell'effetto dell'associazione di più molecole aromatiche in modo da individuare eventuali effetti sinergici che contribuiscono alla tossicità cellulare, in particolare anche in relazione all'associazione con la nicotina, e conseguentemente per identificare le combinazioni meno tossiche.



## 6. CONCLUSIONE

---

La sigaretta elettronica è un dispositivo che ha segnato una svolta epocale nella società moderna, permettendo di essere un'alternativa al tabacco. Tuttavia, la nuova tecnologia desta molta preoccupazione per la popolazione giovanile attratta dalle novità e dalle molteplici fragranze disponibili, ma sottovalutando i rischi per la salute che non sono per niente esclusi. Sebbene le sigarette elettroniche presentino potenziali vantaggi rispetto alle sigarette tradizionali vi sono ancora poche informazioni in letteratura sulla loro sicurezza. Inoltre, differenze nelle caratteristiche dei vari dispositivi e la possibilità di personalizzarli sostituendo i diversi componenti aumentano notevolmente la difficoltà della standardizzazione di modelli per lo studio dei loro effetti.

Dunque, se da una parte numerosi studi hanno evidenziato una minore tossicità delle e-cig rispetto alle sigarette tradizionali per via della minore presenza di sostanze cancerogene dovute principalmente all'assenza della combustione, dall'altra c'è la consapevolezza della presenza di importanti lacune nella regolamentazione dell'utilizzo di tali dispositivi e degli e-liquids, derivanti dalla mancanza di dati scientifici. La recentissima notizia relativa a diversi decessi derivanti dall'utilizzo di sigarette elettroniche associate

all'impiego di specifiche formulazioni, sottolinea la gravità della situazione attuale.

Nel presente studio di tesi sono emersi importanti risultati che attribuiscono una minore tossicità al vapore generato dalle sigarette elettroniche rispetto alle tradizionali. Tuttavia, gli estratti dei vapori aromatizzati non sono risultati del tutto innocui ma si è osservato che gli stessi contribuiscono alla tossicità delle e-cig in modalità aroma-specifico, promuovendo uno sbilanciamento ossidativo. L'unico aroma che non ha dimostrato alcun effetto tossico tra quelli investigati è stato il mentolo. In particolare, le aldeidi testate (vanillina ed etil vanillina) sembrano alterare l'omeostasi ossidativa agendo in modo specifico a livello mitocondriale, ed il maltolo e l'etil maltolo sembrano essere maggiormente coinvolti nella stimolazione dei meccanismi pro-apoptotici, causati probabilmente da una loro marcata capacità di alterare l'equilibrio ossidativo cellulare.

Possiamo pertanto concludere che le molecole aromatizzanti testate, e presenti nella maggior parte delle formulazioni commerciali, non sono innocue per la salute sebbene risultino molto meno tossiche delle sigarette di tabacco. Sono comunque necessari ulteriori studi per valutare la loro tossicità in relazione all'inalazione e alla potenza delle e-cig nella produzione di

composti tossici ma anche per analizzare gli effetti di un'esposizione cronica a questi composti.

## 7. BIBLIOGRAFIA

---

**Arunachalam G**, Yao H, Sundar IK, Caito S, Rahman I. SIRT1 regulates oxidant and cigarette smoke-induced eNOS acetylation in endothelial cells: Role of resveratrol. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010; 393:66–72.

**ASH**, September 2018 (Use of e-cigarettes (vapourisers) among adults in Great Britain [<http://ash.org.uk/wp-content/uploads/2017/05/ASH-Adult-e-cig-factsheet-2018-corrected.pdf>]).

**Barua RS**, Ambrose JA, Srivastava S, DeVoe MC, Eales-Reynolds LJ. Reactive oxygen species are involved in smoking-induced dysfunction of nitric oxide biosynthesis and upregulation of endothelial nitric oxide synthase: an in vitro demonstration in human coronary artery endothelial cells. *Circulation.* 2003; 107, 2342–2347.

**Bhatnagar A**, Whitsel LP, Ribisl KM, Bullen C, Chaloupka F, Piano MR, Robertson RM, McAuley T, Goff D, Benowitz N; 2014 Electronic cigarettes: a policy statement From the American Heart Association.

**Clapp Phillip W.** and Ilona Jaspers; 2011. Electronic Cigarettes: Their Constituents and Potential Links to Asthma. doi:10.1007/s11882-017-0747-5.

**Czoli C.D.**, Hammond, D., Reid, J.L., Cole, A.G., Leatherdale, S.T., **2015**. Use of conventional and alternative tobacco and nicotine products among a sample of canadian youth. *J. Adolesc. Health* 57, 123–125 S1054-1139X(1015)00090-00097.

**Davis B.**, Dang, M., Kim, J., Talbot, P., 2015. Nicotine concentrations in electronic cigarette refill and do-it yourself fluids. *Nicotine Tob. Res.* 17, 134–141.

**Donner Claudio F.** 2001 La composizione del fumo di tabacco Dipartimento di Medicina Riabilitativa Pneumologica, Fondazione Salvatore Maugeri, IRCCS, Veruno (NO).

**Farsalinos KE**, Kistler KA, Gillman G, Voudris V. Evaluation of electronic cigarette liquids and aerosol for the presence of selected inhalation toxins. *Nicotine Tob Res.* 2015; 17(2):168–74.

**Faux SP**, Tai T, Thorne D, Xu Y, Breheny D, Gaca M. 2009. The role of oxidative stress in the biological responses of lung epithelial cells to cigarette smoke. doi: 10.1080/13547500902965047.

**Fondazione Umberto Veronesi magazine.** 2019.

*<https://www.fondazioneveronesi.it/magazine/articoli/fumo/sigarette-elettroniche-troppo-presto-per-dire-che-fanno-meno-male>*

**Gerloff J.**, Sundar, I.K., Freter, R., Sekera, E.R., Friedman, A.E., Robinson, T., Rahman, 2017. Inflammatory response and mass spectrometry in e-liquids and e-vapors on human lung epithelial cells and fibroblasts. *Appl. In Vitro Toxicol.* 3, 28–40.

**Giordano Luca**, Antoine Farnham, Praveen K. Dhandapani, Laura Salminen, Jahnavi Bhaskaran, Robert Voswinckel, Peter Rauschkolb, Susan Scheibe Natascha Sommer, Christoph Beisswenger, Norbert Weissmann, Thomas Braun, Howard T. Jacobs, Robert Bals, Christian Herr, and Marten Szibo. 2019. Alternative Oxidase Attenuates Cigarette Smoke-induced Lung Dysfunction and Tissue Damage.

**Gurjot Kaur**, Thivanka Muthumalage, Irfan Rahman 2018. Mechanisms of toxicity and biomarkers of flavoring and flavor enhancing chemicals in emerging tobacco and non-tobacco products.

**He Z**, Chen Y, Hou C, He W, Chen P. Cigarette Smoke Extract Changes Expression of Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS) and p16(INK4a) and is Related to Endothelial Progenitor Cell Dysfunction. *Med Sci Monit.*2017; 23:3224-3231.

**Hoffman D**, Wynder EL. Chemical constituent and bioactivity of tobacco smoke. LARC - Tobacco: a major international health hazard. Lyon: LARC Scientific Publications, Peto Ed, 1986; 74: 145-65.

**Hwang J.H.**, Lyes, M., Sladewski, K., Enany, S., McEachern, E., Mathew, D.P., Das, S., Moshensky, A., Bapat, S., Pride, D.T., Ongkeko, W.M., Crotty Alexander, L.E., 2016. Electronic cigarette inhalation alters innate immunity and airway cytokines while increasing the virulence of colonizing bacteria. *J. Mol. Med. (Berl.)* 94, 667–679.

**Istituto superiore di Sanità**, portale dell'epidemiologia per la sanità pubblica, 2016.  
<https://www.epicentro.iss.it/fumo/epidemiologia-italia>.

**Kosmider Leon**, Andrzej Sobczak, Maciej Fik, Jakub Knysak, Marzena Zaciera , Jolanta Kurek, Maciej Lukasz Goniewicz; 2014. Carbonyl Compounds in electronic Cigarette vapors: effects of nicotine solvent and Battery Output voltage .

**Kosmider Leon**, Andrzej Sobczak, Adam Prokopowicz, Jolanta Kurek, Marzena Zaciera, Jakub Knysak, Danielle Smith, and Maciej L. Goniewicz.,2016 Cherry-flavoured electronic cigarettes expose users to the inhalation irritant, benzaldehyde. *Thorax*. 2016 April ; 71(4): 376–377. doi:10.1136/thoraxjnl-2015-207895.

**Leikauf George**, Center for Environmental Genetics, Departments of Environmental Health, and Pulmonary and Critical Care Medicine, University of Cincinnati, Cincinnati, Ohio, USA, 2002 Hazardous Air Pollutants and Asthma. DOI: 10.1289/ehp.02110s4505.

**Liu A**, Wu J, Li A, Bi W, Liu T, Cao L, Liu Y, Dong L. The inhibitory mechanism of *Cordyceps sinensis* on cigarette smoke extract-induced senescence in human bronchial epithelial cells. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2016;11:1721-31.



**Luo LZ**, Werner KM, Gollin SM, Saunders WS. 2004. Cigarette smoke induces anaphase bridges and genomic imbalances in normal cells. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2004.06.031.

**Ministero della Salute**, Prevenzione e controllo del Tabagismo. Rapporto annuo del 2017. [http://www.salute.gov.it/imgs/C\\_17\\_pagineAree\\_467\\_listaFile\\_itemName\\_0\\_file.pdf](http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pagineAree_467_listaFile_itemName_0_file.pdf).

**Ministero della Salute**, Direzione Generale della Prevenzione Sanitaria. Danni derivati dall'uso del tabacco. 5 gennaio 2018.

[http://www.salute.gov.it/imgs/C\\_17\\_pagineAree\\_463\\_listaFile\\_itemName\\_0\\_file.pdf](http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pagineAree_463_listaFile_itemName_0_file.pdf).

**Muthumalage T.**, Prinz, M., Ansah, K.O., Gerloff, J., Sundar, I.K., Rahman, I., 2017. Inflammatory and oxidative responses induced by exposure to commonly used e-cigarette flavoring chemicals and flavored e-liquids without nicotine. *Front. Physiol.* 8, 1130.

**Palipudi, K.M.**, Mbulo, L., Morton, J., Mbulo, L., Bunnell, R., Blutcher-Nelson, G., Kosen, S., Tee, G.H., Abdalla, A.M., Mutawa, K.A., Barbouni, A., Antoniadou, E., Fouad, H., Khoury, R.N., Rarick, J., Sinha, D.N., Asma, S., Group, G.C., **2016**. Awareness and current use of electronic cigarettes in Indonesia, Malaysia, Qatar, and

Greece: findings from 2011–2013 global adult tobacco surveys. *Nicotine Tob. Res.* 18, 501–507.

**Peyton A Tierney**, Clarissa D Karpinski, Jessica E Brown, Wentai Luo 2015. Flavour chemicals in electronic cigarette fluids. doi:10.1136/tobaccocontrol-2014-052175 .

**Rahman MM** and Laher I. Structural and functional alteration of blood vessels caused by cigarette smoking: an overview of molecular mechanisms. *Curr. Vasc. Pharmacol.* 2007; 5, 276–292.

**Shields Peter G.**, Micah Berman, Theodore M. Brasky, Jo L. Freudenheim, Ewy Mathe, Joseph P. McElroy, Min-Ae Song and Mark D. Wewers; 2017. A Review of Pulmonary Toxicity of Electronic Cigarettes In The Context of Smoking: A Focus On Inflammation. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-17-0358.

**Stringaro Annarita**, Marisa Colone and Letizia Angiolella. Ottobre 2018. Antioxidant, Antifungal, Antibiofilm, and Cytotoxic Activities of *Mentha* spp. Essential Oils. doi: 10.3390/medicines5040112.

**Sundar I.K.**, Javed, F., Romanos, G.E., Rahman, I., 2016. E-cigarettes and flavorings induce inflammatory and pro-senescence responses in oral epithelial cells and periodontal fibroblasts. *Oncotarget* 7, 77196–77204.

**Sussan T.E.**, Gajghate, S., Thimmulappa, R.K., Ma, J., Kim, J.H., Sudini, K., Consolini, N., Cormier, S.A., Lomnicki, S., Hasan, F., Pekosz, A., Biswal, S., 2015. Exposure to electronic cigarettes impairs pulmonary anti-bacterial and anti-viral defenses in a mouse model. *PLoS One* 10, e0116861.

**U.S department of health and human services**; 2016. E-Cigarette Use Among Youth and Young Adults: A Report of the SurgeonGeneral ([https://ecigarettes.surgeongeneral.gov/documents/2016\\_sgr\\_full\\_report\\_non-508.pdf](https://ecigarettes.surgeongeneral.gov/documents/2016_sgr_full_report_non-508.pdf)).

**Van der Vaart H**, D S Postma, W Timens, N H T Ten Hacken, 2004. Acute effects of cigarette smoke on inflammation and oxidative stress: a review. *59*:713–721. doi: 10.1136/thx.2003.012468.

**Vareille M.**, Kieninger, E., Edwards, M.R., Regamey, N., 2011. The airway epithelium: soldier in the fight against respiratory viruses. *Clin. Microbiol. Rev.* 24, 210–229.

**Ween Miranda P.**, Jonathan J. Whittall, Rhys Hamon, Paul N. Reynolds & Sandra J. Hodge, 2017. Phagocytosis and Inflammation: Exploring the effects of the components of E-cigarette vapor on macrophages. doi: 10.14814/phy2.13370.

**Wigand, MA.** *Additives, cigarette design and tobacco product regulation*, a report to: world health organization, tobacco free initiative, tobacco product regulation group 2006.

**Wilkins E**, Wilson L, Wickramasinghe K, Bhatnagar P, Leal J, Luengo-Fernandez R, Burns R, Rayner M, Townsend N. European Cardiovascular Disease Statistics 2017. *European Heart Network*, Brussels 2017.

**Wu Q**, Jiang D, Matsuda JL, Ternyak K, Zhang B, Chu HW. Cigarette Smoke Induces Human Airway Epithelial Senescence via Growth Differentiation Factor 15 Production. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2016 Sep; 55(3):429-38.

**Yang GY**, Zhang CL, Liu XC, Qian G, Deng DQ. Effects of cigarette smoke extracts on the growth and senescence of skin fibroblasts in vitro. *Int J Biol Sci.* 2013; 9(6):613-23.