



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

**Corso di Laurea Magistrale**  
**Biologia Molecolare e Applicata curriculum nutrizione**

*Analisi della citotossicità della componente aromatica e della nicotina nelle  
sigarette elettroniche in un modello di cellule bronchiali*

*Cytotoxicity analysis of the aromatic component and nicotine used in  
electronic cigarettes, in a bronchial cellular model*

**Tesi di Laurea Magistrale  
di:**

**Antonella Leti**

*antonella leti*

**Relatore  
Chiar.mo Prof.**

**Luca Tiano**

*Luca Tiano*

**Correlatore:**

**Ilenia Cirilli**

*Ilenia Cirilli*

**Sessione: straordinaria**

**Anno Accademico: 2019/2020**

# RIASSUNTO

Nonostante i comprovati danni per la salute derivanti dalla dipendenza (tabagismo) e dall'esposizione diretta o indiretta al fumo di tabacco, il consumo di sigarette rimane molto diffuso a livello mondiale. Pertanto, la lotta al tabagismo è una priorità nelle politiche per la salute pubblica. In questo ambito da qualche anno ha suscitato notevole interesse l'introduzione sul mercato della sigaretta elettronica come alternativa "sicura" alle sigarette di tabacco, e conseguentemente questo prodotto innovativo ha avuto da subito una notevole diffusione.

Attualmente il mercato delle sigarette elettroniche, anche note come svapo, costituisce un'industria da svariati miliardi di dollari che si rivolge ai fumatori attivi, agli ex fumatori e purtroppo trova preoccupanti consensi anche tra i giovani che non hanno mai fumato. In particolare, è proprio la diffusione delle e-cig tra i giovani che desta maggior preoccupazione perché può rappresentare una modalità di accesso al fumo di sigaretta tradizionale. Questa tendenza è facilitata dal fatto che generalmente i giovani consumatori non considerano questo dispositivo dannoso e sono allo stesso tempo attratti dalla possibilità di

personalizzare gli e-liquids da svapare. Pertanto, la diffusione dell'impiego della sigaretta elettronica inizia ad assumere le dimensioni di un problema di salute pubblica, in particolare nella popolazione giovanile. In realtà l'assenza di tossicità della sigaretta elettronica è tutt'altro che acclarata e le ricerche a disposizione sono ancora insufficienti per stabilire la tossicità di questi dispositivi, a causa dei pochi anni intercorsi dalla loro introduzione in commercio e per la grande varietà dei dispositivi elettronici e la variabilità dei componenti degli e-liquids, in particolare delle molecole aromatizzanti. Difatto sebbene gli aromi impiegati siano sicuri per l'ingestione essendo del tutto identici a quelli approvati nella normativa alimentare, non si hanno dati certi della loro sicurezza quando inalati.

Il presente progetto si pone l'obiettivo di studiare gli effetti dei singoli aromi selezionandone 8 tra i più utilizzati negli e-liquids, oltre alla nicotina, paragonandoli al fumo di sigaretta e al controllo negativo, in un modello cellulare bronchiale, a seguito di una esposizione acuta (24h) e cronica (72h).

Inizialmente è stata valutata la vitalità cellulare, in acuto (24h) e in cronico (72h) per analizzare la tossicità delle sostanze (estratti vaporizzati degli aromi, del fumo di tabacco e della nicotina) ed individuare le

concentrazioni sub-letali da impiegare nelle successive analisi, evitando le dosi tossiche letali. Successivamente sono stati valutati gli effetti degli estratti sull'equilibrio ossidativo a livello mitocondriale e citosolico sia in acuto (24h) che in cronico (72h).

Sono emersi interessanti risultati che dimostrano la minore tossicità degli aromi delle e-cig rispetto al fumo della normale sigaretta (cigarette smoke extract, CSE), ma gli estratti dei vapori aromatizzati non sono risultati del tutto innocui in quanto essi contribuiscono alla tossicità delle e-cig in modalità aroma-specifico, con alterazione dello stato ossidativo cellulare.

In particolare, tra gli 8 aromi testati, l'Etil Vanillina e l'Etil Maltolo sono quelli che hanno mostrato un'elevata tossicità dopo un'esposizione di 72 ore, seppur minore rispetto il CSE. Inoltre, a seguito dell'esposizione cronica, la Vanillina e l'Etil Vanillina, entrambe aldeidi, aumentano in maniera altamente significativa il livello dei ROS mitocondriali, tuttavia, a livello citosolico questa variazione è molto più contenuta, a eccezione di Etil Maltolo, Etil Butirrato e Nicotina, che aumentano in modo significativo lo squilibrio ossidativo sia a livello mitocondriale che citosolico dopo 72ore.

Al contrario, il maltolo, il mentolo, l'alcol benzilico e l'etil acetato non alterano lo stato ossidativo cellulare e sono caratterizzati da un'elevata

percentuale di vitalità cellulare in seguito all'esposizione sia acuta che cronica. Particolare è l'effetto del veicolante degli aromi, costituito da glicole propilenico e glicerolo vegetale, che rappresenta almeno il 95% di tutti i liquidi da sigaretta elettronica, che sebbene risulti non tossico nell'esposizione acuta, tuttavia, dopo 72h di esposizione, ha determinato l'aumento del livello dei ROS citosolici.

In conclusione, lo studio della presente tesi ha evidenziato pattern di tossicità in relazione alle più comuni molecole aromatiche impiegate singolarmente. Sono tuttavia necessari ulteriori studi per valutare se la combinazione di miscele complesse di aromi producano effetti sinergici nel potenziare la tossicità dei singoli composti e se i danni prodotti siano reversibili una volta sospesa l'esposizione alla sostanza tossica e in quali tempi.

# **ABBREVIAZIONI**

CSE Estratto del fumo di sigaretta

E-CIG Sigarette elettroniche

EVC Estratto del vapore della sigaretta elettronica

ROS Specie reattive dell'ossigeno

# INDICE

|  |           |
|--|-----------|
| <b>RIASSUNTO .....</b>   | <b>1</b>  |
| <b>ABBREVIAZIONI.....</b>  | <b>5</b>  |
| <b>INTRODUZIONE.....</b>   | <b>8</b>  |
| <b>STORIA DEL FUMO E DELLE SIGARETTE: DA STRUMENTO RELIGIOSO A VELENO<br/>    NELLA SOCIETA' DEI CONSUMI .....</b> | <b>8</b>  |
| <b>SIGARETTA DI TABACCO .....</b>  | <b>11</b> |
| <b>LA COMPOSIZIONE DELLA SIGARETTA .....</b>   | <b>15</b> |
| <b>PATOLOGIE CORRELATE AL FUMO DI SIGARETTA DI TABACCO .....</b>   | <b>18</b> |
| <b>SIGARETTA ELETTRONICA.....</b>  | <b>21</b> |
| <b>COMPOSIZIONE E-LIQUIDS .....</b>  | <b>28</b> |
| <b>EFFETTI DELLA COMPONENTE AROMATICA DEGLI E-LIQUIDS QUANDO INALATI..</b>   | <b>29</b> |
| <b>BASI, PRESUPPOSTI E SCOPO DEL PROGETTO.....</b>   | <b>33</b> |
| <b>MATERIALI E METODI .....</b>  | <b>35</b> |
| <b>PREPARAZIONE DELL'ESTRATTO DEL FUMO DI SIGARETTA .....</b>  | <b>35</b> |
| <b>PREPARAZIONE DEGLI AROMI E DEI LORO ESTRATTI .....</b>  | <b>36</b> |
| <b>MODELLO CELLULARE .....</b>   | <b>38</b> |
| <b>DISEGNO SPERIMENTALE .....</b>  | <b>39</b> |
| <b>SAGGIO DI VITALITA' CON REAGENTE PRESTOBLUE.....</b>  | <b>40</b> |
| <b>ANALISI DELLA CITOMETRIA A FLUSSO .....</b>   | <b>41</b> |
| <b>ANALISI ROS CITOPLASMATICI.....</b>   | <b>41</b> |
| <b>ANALISI ROS MITOCONDRIALI: SAGGIO DELL'ANIONE SUPEROSSIDO .....</b>   | <b>44</b> |
| <b>ANALISI DEI DATI.....</b>   | <b>46</b> |
| <b>RISULTATI.....</b>  | <b>47</b> |
| <b>VALUTAZIONE DELLA VITALITA' CELLULARE .....</b>   | <b>47</b> |
| <b>VALUTAZIONE DELLA CITOTOSSICITÀ DEGLI AROMI .....</b>   | <b>53</b> |
| <b>ROS MITOCONDRIALI.....</b>  | <b>54</b> |
| <b>ROS CITOSOLICI.....</b>   | <b>56</b> |
| <b>DISCUSSIONE.....</b>  | <b>59</b> |

|                           |           |
|---------------------------|-----------|
| <b>CONCLUSIONI</b> .....  | <b>65</b> |
| <b>BIBLIOGRAFIA</b> ..... | <b>67</b> |



# INTRODUZIONE

## **STORIA DEL FUMO E DELLE SIGARETTE: DA STRUMENTO RELIGIOSO A VELENO NELLA SOCIETA' DEI CONSUMI**

Il tabacco è una pianta originaria del continente americano dove veniva fumata dalle civiltà precolombiane presso le quali era associata a riti sacri, ad uso esclusivo dei sacerdoti. I Maya e gli Atzechi, già verso il mille a.C., soffiavano il fumo verso il Sole e in direzione dei punti cardinali per comunicare con le divinità. La nebulizzazione del fumo, "immateriale" proprio come uno spirito, era un importante strumento religioso. La funzione del fumo di tabacco fra i nativi americani era dunque quella di provocare uno stato modificato di coscienza, aspirandolo con forza e in grandi quantità.

Il tabacco veniva anche masticato o sniffato in polvere per usi più comuni, con presunti poteri curativi, oppure mescolato con cenere e usato come gomma da masticare. Tali impieghi sono usati ancora oggi dagli Yanomami del Brasile con apparenti effetti positivi sul pH della bocca e sulla salute dei loro denti. Gli Indiani delle pianure del Nordamerica

fumavano la pipa, ma solo in cerimonie spirituali o durante i consigli degli anziani.

Dall'America il tabacco fece il suo ingresso in Europa, portato dai compagni di Cristoforo Colombo. Successivamente, nel 1560, un ambasciatore portoghese in Francia, Jean Nicot, promosse il tabacco come pianta medicinale (e da lui viene il nome del principio attivo, la nicotina). Ma ben presto divenne materia prima da fumare fra marinai e soldati europei. Tuttavia, l'Europa e l'Asia non erano nuove a queste pratiche. L'inalazione di prodotti vegetali combustibili caratterizzati dalla presenza di sostanze psicotrope era diffusa in oriente dall'antichità. Gli Arieri dell'attuale Iran e l'antica popolazione degli Sciti coltivavano Cannabis sativa per fumarla. I Sumeri, molto prima, utilizzavano l'oppio in particolari cerimonie, sotto forma di tintura e palline da deglutire. Inoltre, l'oppio in estremo Oriente e l'hashish nel medio oriente, divennero molto diffusi già nel Medioevo.

Tornando al tabacco, come ha fatto a diventare da sostanza sacra e curativa dell'antichità a veleno nella società dei consumi? Già nel XVII secolo gli inglesi iniziarono a sviluppare il commercio del tabacco in forma di sigari o di tabacco per pipa trovando consumatori non solo fra i soldati, ma anche fra gli intellettuali: scrittori, poeti e pittori. Entrarono in scena

anche alcune donne, che fondarono in Inghilterra l'*Ordine della tabacchiera*.

La "peste del fumo" iniziò nel 1832 quando i soldati musulmani turchi che stringevano d'assedio la città di San Giovanni d'Acri pensarono di infilare tabacco nei cilindri di carta in cui veniva conservata la polvere da sparo e li accesero per fumare, originando così la sigaretta. Le macchine della rivoluzione industriale, dalla Turchia alla Gran Bretagna, dalla Francia alla Germania, iniziarono a produrre milioni e milioni di sigarette. La sigaretta era considerata una specie di doping per i soldati al fronte sia per gli effetti tonici della nicotina che per le antiche e presunte doti magico-taumaturgiche del tabacco, così come il tabacco da pipa era consigliato ai prelati come antidoto contro le tentazioni di tipo sessuale.

Il tabacco, di gusto più leggero e aromatico, si diffuse durante la guerra civile americana e, nel 1880, fu sviluppata una macchina capace di garantire la produzione di grandi quantità di sigarette a basso costo. Con l'aiuto della pubblicità e le apparizioni di personaggi influenti come attori, cantanti, e scrittori con la sigaretta, dagli anni '50-'60 questo prodotto trasformò l'usanza sacra del fumo in un vizio quotidiano per le masse.

Nonostante il largo uso del tabacco solo in tempi recenti ne sono stati studiati in dettaglio gli effetti biologici e tossicologici, con particolare attenzione al suo abuso. 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.

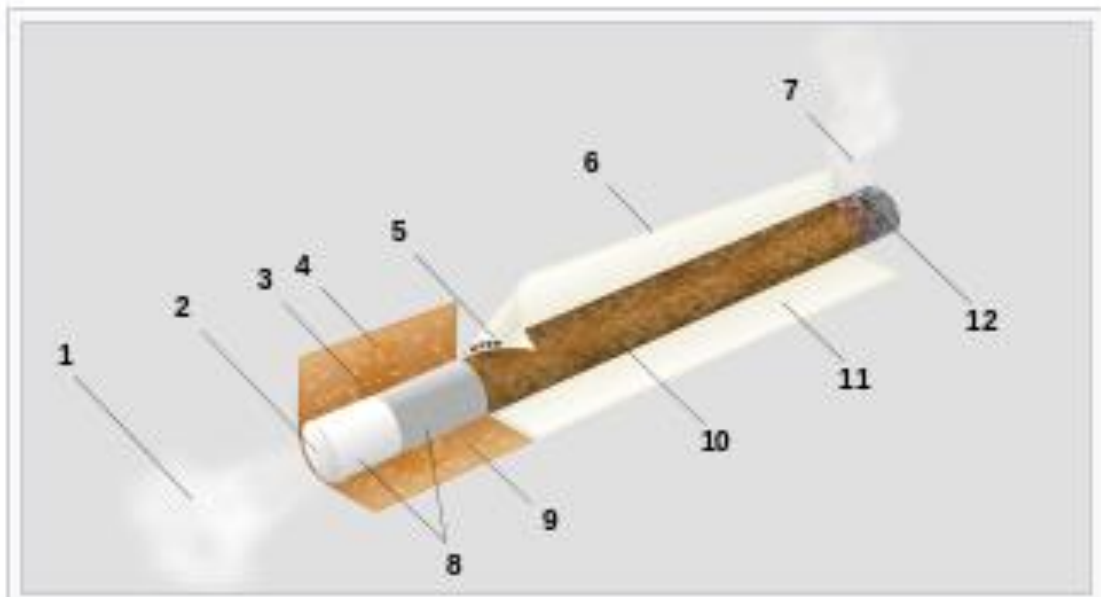
## **SIGARETTA DI TABACCO**

Ci sono molti diversi tipi di prodotti del tabacco, il più comune è la sigaretta.

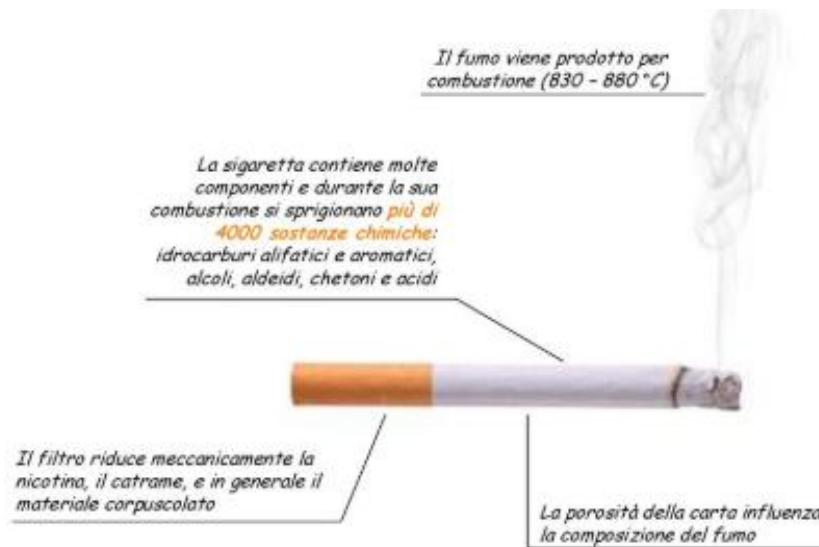
La sigaretta è un oggetto di consumo molto diffuso in alcune culture, nonostante i comprovati danni derivanti dalla dipendenza (tabagismo) e dall'assunzione diretta o indiretta del fumo, il quale veicola la nicotina, componente psicoattivo del tabacco [1].

La sigaretta in uso in occidente è generalmente composta di foglie di tabacco essiccato e finemente tritato (trinciato) e di tabacco ricostituito, spesso mischiato con altri additivi, arrotolate o pressate in un cilindro di carta arrotolata di varie fogge, spesso di poco meno di 120 mm di

lunghezza e 10 mm di diametro. Uno dei lati della sigaretta viene acceso e brucia lentamente senza fiamma permettendo di inalare il suo fumo dall'altro lato dove può essere posto un filtro, che il fumatore porta alla bocca [2], (figure 1 e 2).



*Fig1: **Struttura della sigaretta.** 1. Uscita del fumo; 2. Materiale filtrante (carbone attivo ed altri); 3. Adesivo; 4. Fori di ventilazione; 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.*



*Fig2: Componenti e tossicità della sigaretta.*

Il fumo di sigaretta (e generalmente di tabacco), è una miscela di gas (87%), vapore (5%) e particelle solide sospese (8%).

Dalla grandezza delle particelle e dalla forza di aspirazione del fumo dipende la deposizione delle particelle stesse: quelle di dimensioni più piccole penetrano profondamente nell'albero respiratorio fino ai bronchioli e agli alveoli, mentre quelle più grandi si fermano nelle prime vie aeree.

Il fumo derivante dalla combustione di una sigaretta contiene oltre 4 000 composti. Circa 3900 di queste sostanze sono gravemente dannose per gli organismi viventi [3]. In generale, il prodotto della maggior parte delle combustioni in carenza di ossigeno, atte a generare particolato incombusto o fumo, contiene composti dannosi per la salute.

Negli ultimi anni nei Paesi più progrediti, i consumatori del fumo di sigaretta sono diminuiti, a seguito delle notizie riportate dal Surgeon General nel 1964, riguardo la correlazione fra fumo e danno alla salute [4]. Tuttavia, la riduzione non è stata molto drastica: nel 2003, ad esempio, negli USA il 22% degli uomini fumava regolarmente [5], e nel 2004, nonostante il Surgeon General abbia evidenziato nuovi pericoli aggiuntivi per chi utilizza abitualmente sigarette, il numero di consumatori non è diminuito ulteriormente [6]. Attualmente in Italia i fumatori rappresentano il 22% delle persone di 15 anni e più, corrispondenti a circa 11.2 milioni di cittadini italiani (6.5 milioni di uomini e 4.7 milioni di donne), mentre i non fumatori sono il 59.6% e gli ex fumatori il 18.4%, pari rispettivamente a 30.3 milioni e 9.3 milioni di italiani [7].

Il sesso maschile prevale e più del 30% dei fumatori inizia prima del raggiungimento della maggiore età. Per quanto riguarda il sesso femminile, il consumo di sigarette comporta il 17% di tutti i decessi negli USA [8]. Inoltre, il fumo, avendo effetti anti-estrogenici, comporta nella donna cambiamenti ormonali come l'anticipazione della menopausa [9]. La tossicità e la capacità di creare dipendenza dei prodotti del tabacco sono correlati alla loro composizione. La nicotina è una sostanza presente nel tabacco e viene oggi riconosciuta, al pari di oppiacei, cocaina, alcol e

allucinogeni, tra le sostanze psicoattive in grado di indurre dipendenza fisica e psichica, rendendo così difficile la decisione di smettere di consumare tabacco, nonostante la consapevolezza dei problemi di salute associati a quest'abitudine. La nicotina però non è l'unica sostanza in grado di scatenare dipendenza.

Le sigarette, così come gli altri prodotti derivati dal tabacco, contengono altre sostanze la cui funzione è migliorare il rilascio e l'assorbimento della nicotina, ma che sono in grado esse stesse di indurre dipendenza.

L'industria del tabacco ha una lunga storia di manipolazione dei contenuti, design e altri fattori legati al fascino del consumatore al fine di aumentarne l'utilizzo e la dipendenza, spesso con il risultato di un maggiore contenuto di additivi tossici nei prodotti e conseguentemente nelle emissioni [10].

### **LA COMPOSIZIONE DELLA SIGARETTA**

I componenti chimici del fumo del tabacco dipendono da vari fattori come la coltivazione, la varietà della pianta e le lavorazioni successive. Il fumo di sigaretta è composto oltre 4000 sostanze differenti, derivanti dalla simultanea combustione del tabacco, additivi e carta. Di queste, più di 40 sono cancerogene.



I componenti più pericolosi comprendono:

1. Catrame: è il principale costituente della parte corpuscolata del fumo ed è formato da centinaia di sostanze, in massima parte da idrocarburi, ad effetto cancerogeno che si depositano nei polmoni e nelle vie respiratorie, aumentando il rischio di tumori, primo fra tutti di quello polmonare. L'effetto immediato del catrame è il colore giallo dei denti, il gusto di amaro in bocca e l'irritazione delle vie respiratorie.

2. Nicotina: è un alcaloide facilmente assorbito dalle mucose, dagli epitelii dei bronchi e dagli alveoli polmonari. La nicotina aspirata raggiunge in otto-dieci secondi il cervello, dove stimola la liberazione di dopamina e adrenalina che danno un effetto di lieve stimolazione ed euforia fisica e mentale. L'azione della nicotina sugli organi periferici determina un aumento della frequenza cardiaca, della pressione arteriosa e della motilità intestinale.

3. Sostanze irritanti: tra le più rilevanti vi sono l'acroleina, la formaldeide e gli ossidi di azoto che, inalate con il fumo, inibiscono il movimento delle ciglia della mucosa delle vie respiratorie e, depositandosi, interferiscono con l'autodepurazione dei polmoni. Esse causano un accumulo di secrezioni nei bronchi con il conseguente ristagno di agenti infettivi e

sostanze irritanti e cancerogene, divenendo così responsabili di bronchite cronica, enfisema, asma bronchiale e cancro polmonare.

4. Sostanze cancerogene: oltre al catrame si annoverano le polveri fini come il PM10 (particulate matter) e il benzopirene che contribuiscono ad aumentare il rischio di cancro.

5. Monossido di Carbonio: è un gas che deriva dalla combustione incompleta del tabacco. E' una molecola che si lega irreversibilmente all'emoglobina con un'affinità decine di migliaia di volte superiore, rappresentando di fatto un potente veleno metabolico. In seguito alla sua aspirazione il sangue risulta essere meno ossigenato, con conseguente ridotto apporto di ossigeno ai tessuti, che provoca l'ingiallimento della pelle, l'indebolimento dei capelli, l'invecchiamento precoce e il ridotto rendimento muscolare.

Tuttavia, nella sigaretta sono contenute molte altre sostanze pericolose per l'organismo, mostrate in Fig.3, quali: • Piridina (liquido infiammabile utilizzato per gli insetticidi); • Solfuro di diidrogeno (gas tossico); • Fenolo (composto acido estremamente tossico); • Acido formico (utilizzato nella fabbricazione di tessuti, irritante); • Arsenico (potente veleno); • Ammoniaca (facilita l'assorbimento di nicotina); • Cianuro di idrogeno

(veleno utilizzato in alcune modalità di esecuzione capitale); • Metanolo (alcol tossico presente nei carburanti, antigelo, ecc.); • Propylaldehydum (disinfettante); • Acetonitrile (composto tossico presente nelle plastiche e negli insetticidi); • Acetaldeide (liquido infiammabile, tossico e irritante) [11].



*Fig.3: sostanze altamente pericolose presenti nella sigaretta.*

## **PATOLOGIE CORRELATE AL FUMO DI SIGARETTA DI TABACCO**

Il consumo abituale di sigarette è fattore di incremento del rischio dell'insorgenza di una serie di patologie che possono avere esito mortale per il soggetto, raggruppabili in tre sottospecie: cardiopatie [12], malattie

respiratorie e comparsa di masse tumorali [13]. Il fumo di tabacco contiene elevate concentrazioni di sostanze chimiche ossidanti in entrambe le fasi gassosa e particellare, che si ritiene contribuiscano alla lesione dei tessuti, all'infiammazione, alla disfunzione endoteliale e alla trombosi, con effetti coinvolti nella fisiopatologia delle malattie cardiovascolari e polmonari oltre al cancro [14]. Inoltre, il fumo prodotto dalla combustione della sigaretta è una fra le forme più pericolose di inquinamento in ambienti chiusi poiché avvelena l'aria degli spazi in cui viviamo e respiriamo giorno e notte. Inoltre, permane nell'aria per alcune ore, anche quando non si vede e non si sente più all'olfatto [15, 16].

### **TUMORI DEL POLMONE**

Il fumo di tabacco è la prima causa del tumore del polmone; provocando i due terzi dei morti nel mondo per questa malattia. Smettere di fumare ne riduce il rischio ed il beneficio è importante anche dopo molti anni. Infatti, dopo 10 anni senza fumo, la probabilità di ammalarsi si dimezza rispetto a quella di un fumatore. Inoltre, come dimostrato da importanti studi epidemiologici, il rischio aumenta con il numero delle sigarette fumate e con la durata dell'abitudine al fumo.

## **MALATTIE RESPIRATORIE CRONICHE**

La broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO) è una malattia progressiva che compromette pesantemente la qualità di vita, con tosse e difficoltà respiratorie, ed è causata principalmente dal fumo di sigaretta. In particolare, chi ha iniziato a fumare da giovanissimo ha un elevato rischio di sviluppare questa forma di bronchite cronica poiché in età giovane il tabacco interferisce con il corretto sviluppo polmonare. Il tabacco, inoltre, peggiora i sintomi dell'asma.

## **DANNI AL FETO E AI BAMBINI**

Il fumo di sigaretta produce danni a tutte le età, anche prima della nascita. Se la madre in gravidanza fumava o se era esposta al fumo passivo, i bambini mostrano problemi nello sviluppo e nella corretta funzionalità polmonare con una frequenza maggiore rispetto la media. Inoltre anche i bambini che respirano il fumo altrui sono maggiormente esposti dei loro coetanei ad asma, polmoniti, bronchiti ed infezioni delle vie respiratorie. Nel mondo, sono circa 60000 i bambini che muoiono prima di compiere 5 anni a causa di malattie infettive delle vie respiratorie provocate dal fumo passivo.

## **TUBERCOLOSI**

Il decorso ed i sintomi di questa malattia sono aggravati dal fumo di sigaretta. Inoltre, le sostanze tossiche contenute nel tabacco agiscono da innesco per le infezioni latenti da tubercolosi.

## **LESIONI VASCOLARI**

Sebbene l'esatta fisiopatologia del fumo di sigaretta non sia stata chiarita, è ormai assodato che provoca lesioni all'endotelio vascolare causandone la disfunzione, produce anione superossido, riduce la produzione e la biodisponibilità dell'ossido nitrico (NO), aumenta la produzione e il rilascio di endotelina, aumentando il rischio di trombosi, aterosclerosi, infarto, malattia coronarica (CAD), ictus e morte [17].

## **SIGARETTA ELETTRONICA**

La sigaretta elettronica (e-cig) è stata introdotta nel mercato come alternativa sicura al fumo di sigaretta e 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 [18].

In particolare, desta preoccupazione la diffusione delle e-cig specialmente tra i giovani, i quali non considerano questo dispositivo dannoso per la salute e sono molto attratti dalla possibilità di personalizzare gli e-liquids da svapare. Pertanto, la diffusione dell'impiego della sigaretta elettronica costituisce un problema di salute pubblica, in particolare nella popolazione giovanile [19, 20].

Le sigarette elettroniche utilizzano una bobina di resistenza metallica per riscaldare le miscele, nominate e-liquids, di glicerina vegetale, glicole propilenico, nicotina e agenti aromatizzanti, senza combustione, ma generando un aerosol inalabile. Gli e-liquids vengono condotti da un serbatoio alla bobina da uno stoppino di cotone, silice o ceramica e l'utente, premendo un pulsante o generando un flusso d'aria attraverso il dispositivo, attiva la corrente elettrica che arriva alla bobina e riscalda l'e-liquid causandone la vaporizzazione.

## La sigaretta elettronica

### Com'è fatta



### Come funziona

- 1** Quando il fumatore aspira, il passaggio d'aria aziona un sensore collegato a un condensatore a batteria
- 2** Il condensatore si scalda e miscela una quantità (regolabile) di vapore acqueo assieme con particelle di nicotina e glicerolo

### I numeri del settore

**400.000**

i fumatori italiani che già usano la sigaretta elettronica. Entro fine 2013 dovrebbero diventare 1 milione

**200** milioni di euro

il fatturato del comparto della produzione di sigarette elettroniche nel 2012. Entro fine 2013 dovrebbe raggiungere i 500 milioni di euro

**1.500**

gli attuali occupati nel settore

da **70** a **150** tiri

la durata della fumata, che può variare a seconda del modello

da **60** a **120** euro

il costo di una sigaretta elettronica (kit completo)

ANSA-CENTIMETRI

Fig 4: Sigaretta elettronica: struttura, funzionamento e diffusione.

Dalla loro introduzione avvenuta 15 anni fa, le sigarette elettroniche hanno subito importanti cambiamenti nel design che consentono all'utente un maggiore controllo sulla composizione del liquido elettronico, comprese le proprietà organolettiche e la concentrazione della



nicotina, e sulle caratteristiche della vaporizzazione dell'e-liquid. Infatti, la categoria delle sigarette elettroniche include una notevole varietà di dispositivi che possono essere distinti in prima, seconda, terza e quarta generazione (Fig.5 A-B).

Le E-cig di prima generazione ("cig-a-like") sono state progettate per imitare l'aspetto delle sigarette di tabacco; tuttavia, gli utenti regolari si sono sempre più interessati ai dispositivi di seconda, terza e quarta generazione i quali consentono un maggiore controllo sulla composizione degli e-liquids e una migliore gestione della produzione del vapore [21-22].

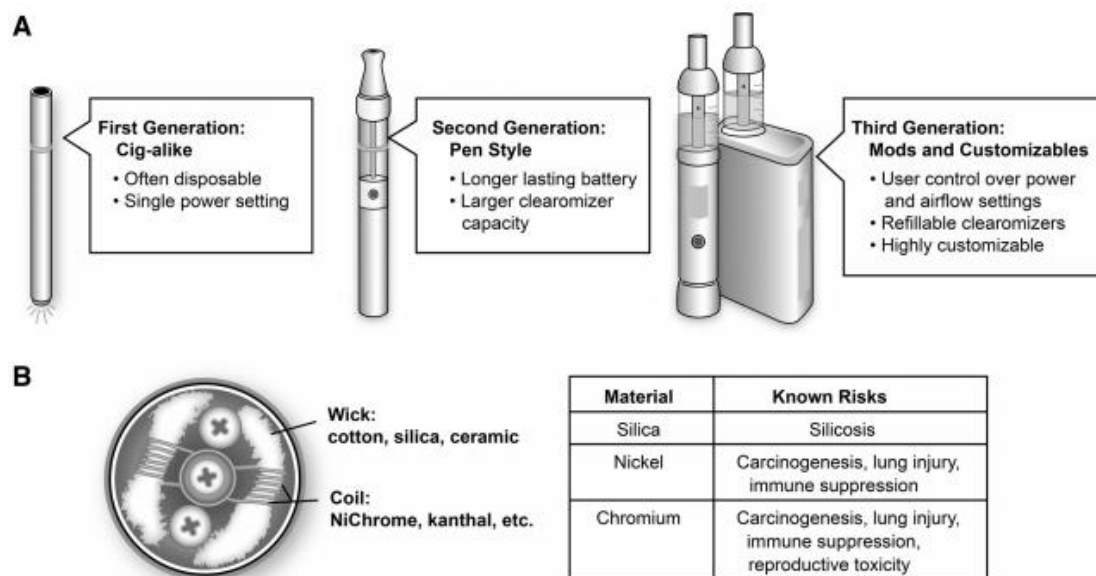


Fig 5: tipologie di sigarette elettroniche

In particolare, le sigarette elettroniche di 3° e 4° generazione sono caratterizzate dalla possibilità di regolare la potenza e la temperatura di riscaldamento del vapore, oltre alla presenza di atomizzatori, batterie e serbatoi molto capienti. Nel dettaglio, le e-cig sono costituite dalle seguenti componenti principali (Fig 6):



*Fig.6: struttura delle e-cig.*

1) Drip Tip o boccaglio: prodotto in diverse forme e materiali, entra in contatto con le labbra, permettendo di modificare le caratteristiche di aspirazione.

2) Tank o serbatoio: contiene l'e-liquid da vaporizzare. Può essere di vetro, in policarbonato o in acciaio, con differenti caratteristiche e dimensioni.

3) Coil o resistenza: parte fondamentale del sistema, ha la funzione di scaldare l'e-liquid inducendone la vaporizzazione. Al suo interno è presente del cotone che permette il trasporto per capillarità dell'e-liquid

dal tank alla sua struttura. In commercio si trovano resistenze di varie dimensioni da 0.15 a 3.5  $\Omega$ , a parità di watt, una resistenza più elevata consente di scaldare il liquido ad una temperatura maggiore.

4) Base: elemento di collegamento tra l'atomizzatore e la batteria che permette il passaggio dell'aria esterna verso la resistenza determinando la "svapata" di guancia o di polmone a seconda dell'apertura.

5) Batteria o Box: fornisce l'energia necessaria per riscaldare la resistenza permettendo la formazione dell'aerosol. Ogni batteria ha un range di potenza compreso tra 3 e 300W, regolato attraverso il display dal fumatore.

Secondo la legge di Ohm, la potenza (P) espressa in watt, in un circuito elettrico, è uguale al quadrato della tensione (V) diviso la resistenza (R) in ohm, ovvero:  $P = V^2/R$ . Quindi la potenza del lavoro nel processo di aerosol dipende sia dalla tensione che dalla resistenza, le quali possono variare con l'età o addirittura con la temperatura dei componenti. Inoltre, molti dispositivi recenti consentono agli utenti di sostituire le bobine con la resistenza desiderata e regolare direttamente la tensione. Tuttavia, livelli di potenza elevati hanno dimostrato indurre la produzione di specie carboniliche volatili e aumentare la massa di aerosol prodotta [23-24].

Perciò i valori di resistenza delle bobine svolgono un ruolo chiave nella tossicità delle sigarette elettroniche ed è di fondamentale importanza comprenderne i meccanismi [25].

Attualmente il mercato delle sigarette elettroniche, anche note come svapo costituisce un'industria da svariati miliardi di dollari che si rivolge ai fumatori attivi, agli ex fumatori e purtroppo trova preoccupanti consensi anche tra i giovani che non hanno mai fumato.

I dati relativi la loro efficacia come strumento per facilitare la cessazione di fumare, il loro impatto a livello di popolazione e la loro più bassa tossicità rispetto i prodotti del tabacco combustibile sono altamente controversi. Gli anni di studio sono ancora troppo pochi, inoltre è complicato raggiungere conclusioni generali poiché i prodotti in commercio sono molto diversi per la tecnologia delle apparecchiature, per la composizione dei liquidi e la concentrazione delle diverse sostanze (in genere glicole propilenico, glicerina, nicotina, aromi, ma sono state rilevate varie sostanze nocive come metalli pesanti e aldeidi). Sono necessari decenni per osservare gli effetti di un' esposizione cronica al fumo, in particolare nello sviluppo di malattie polmonari come il cancro ai polmoni o la broncopneumopatia cronica ostruttiva, quindi gli effetti

sulla popolazione dell'uso delle sigarette elettroniche potrebbero non essere del tutto evidenti fino alla metà di questo secolo. Attualmente quindi, la conoscenza degli effetti delle e-cig è limitata ed insufficiente per determinare se le conseguenze della sigaretta elettronica sulla salute respiratoria sono minori a quelli dei prodotti del tabacco combustibile [26].

### **COMPOSIZIONE E-LIQUIDS**

Dalla e-cig viene prodotto un aerosol attraverso la nebulizzazione dell'e-liquid, che è formato da due componenti: la base (80-90%) e gli aromi (flavours), in cui può essere contenuta nicotina ad una concentrazione compresa tra 0 e 36 mg/ml [27].

La base è una miscela, in percentuali variabili, di: Glicole Propilenico (PG), fluido veicolante dell'aroma, e Glicerolo Vegetale (VG), sostanza vischiosa e densa che dà corpo al vapore. Mentre gli aromi costituiscono il 5-10% dell'e-liquid.

Vari aromi ed esaltatori di sapidità sono comunemente inseriti negli e-liquids venduti online e/o tramite VaperStore. Attualmente esistono più di 250 marchi di sigarette elettroniche, 8000 diversi aromi solo nel mercato degli Stati Uniti, e molti prodotti si sono evoluti rapidamente negli ultimi

anni [28]. Molto spesso le miscele sono il risultato di un mix di aromi. Peyton Tierney et al. [29] analizzando gli e-liquids commerciali hanno individuato la composizione della componente aromatica e otto delle molecole maggiormente impiegate, e rappresentate nella tabella 1, sono state testate nel presente lavoro.

| NOME COMMERCIALE           | CLASSE  | CONCENTRAZIONE |           | CARATTERISTICHE ORGANOLETTICHE |
|----------------------------|---------|----------------|-----------|--------------------------------|
|                            |         | Min mg/mL      | Max mg/mL |                                |
| <i>Glicerolo</i>           |         |                |           |                                |
| <i>Glicole Propilenico</i> |         |                |           |                                |
| <i>Vanillina</i>           | Aldeide | 0,1            | 33        | <i>Cre moso, dolce</i>         |
| <i>Etil Vanillina</i>      | Aldeide | 0,2            | 8,4       | <i>Cre moso, dolce</i>         |
| <i>Maltolo</i>             | Alcol   | 0,8            | 6,2       | <i>Caramello so, fruttato</i>  |
| <i>Etil Maltolo</i>        | Alcol   | 0,3            | 27,5      | <i>Caramello so, dolce</i>     |
| <i>L-Mentolo</i>           | Alcol   | 5,7            | 21,6      | <i>Mentoso</i>                 |
| <i>Alcol Benzilico</i>     | Alcol   | 0,1            | 8,4       | <i>Balsamico, floreale</i>     |
| <i>Etil Butirrato</i>      | Estere  | 0,1            | 11,1      | <i>Fruttato, dolce</i>         |
| <i>Etil Acetato</i>        | Estere  | 0,2            | 7,2       | <i>Etereo, dolce</i>           |

*Tab.1: I due veicolanti e le 8 molecole aromatiche maggiormente impiegate negli e-liquids con le relative concentrazioni.*

## **EFFETTI DELLA COMPONENTE AROMATICA DEGLI E-LIQUIDS QUANDO INALATI**

Diversi studi hanno evidenziato un aumento dei disturbi respiratori negli adolescenti che fumano sigarette elettroniche. Questo è un tema cruciale, poiché molti prodotti puntano dritto al target dei giovanissimi, come viene dimostrato dal fatto che negli States un sedicenne su quattro e il 10% dei dodici-tredicenni usano sigarette elettroniche. Sono stati riscontrati casi

di asma, respiro corto, bronchiti o sintomi simili più alti della media nei giovani fumatori rispetto ai coetanei. Inoltre, sono tanti gli effetti negativi a livello polmonare, come la polmonite lipoidea, una polmonite che si può verificare per l'inalazione di sostanze oleose. Sugli animali sono stati dimostrati danni al polmone, compresa una maggiore suscettibilità alle infezioni. Infine, gli studi condotti su campioni di tessuto polmonare hanno osservato effetti negativi di diversa natura pur ribadendo che è estremamente difficile riprodurre le conseguenze di apparecchi e sostanze così eterogenee nella realtà dei consumatori [30].

Tra i vari parametri che possono influenzare la tossicità delle e-cig, vi è la potenza della batteria, in particolare nei dispositivi di ultima generazione, infatti un innalzamento notevole della temperatura condurrebbe ad una maggiore degradazione delle molecole con produzione di composti tossici nell'aerosol inalato ed espirato. Kosmider et al. hanno dimostrato che il riscaldamento dell'e-liquid a temperature elevate, sopra i 150°C, determina il rilascio dagli aromi di alti livelli di acroleina, acetaldeide e formaldeide, mentre in seguito al riscaldamento del glicole propilenico viene rilasciata un'elevata concentrazione di ossido di propilene [31].

Inoltre, anche la componente aromatica, sebbene con dati contrastanti, sembra contribuire alla tossicità di questi dispositivi, nonostante gli aromi utilizzati siano certificati dalla FDA (Food and Drug Administration) come GRAS (generalmente riconosciuti sicuri). Tuttavia, questa classificazione si riferisce alla sicurezza delle molecole una volta ingerite, quindi senza alcuna garanzia degli effetti a seguito della loro inalazione.

Le sostanze aromatizzanti possono avere diversa natura chimica, le più diffuse sono aldeidi, alcoli ed esteri. In particolare, le aldeidi sono riconosciute come "irritanti primari" del tessuto mucoso delle vie respiratorie [32].

Tuttavia, i dati tossicologici sulle sostanze aromatizzanti sono ancora limitati soprattutto in relazione all'inalazione. Prove emergenti suggeriscono che le sigarette elettroniche sono in grado di causare stress ossidativo e di indurre la risposta infiammatoria e il danno al DNA nelle cellule polmonari. Inoltre, è stato dimostrato che l'aerosol della sigaretta elettronica smorza la risposta immunitaria innata e influenza il movimento mucociliare.



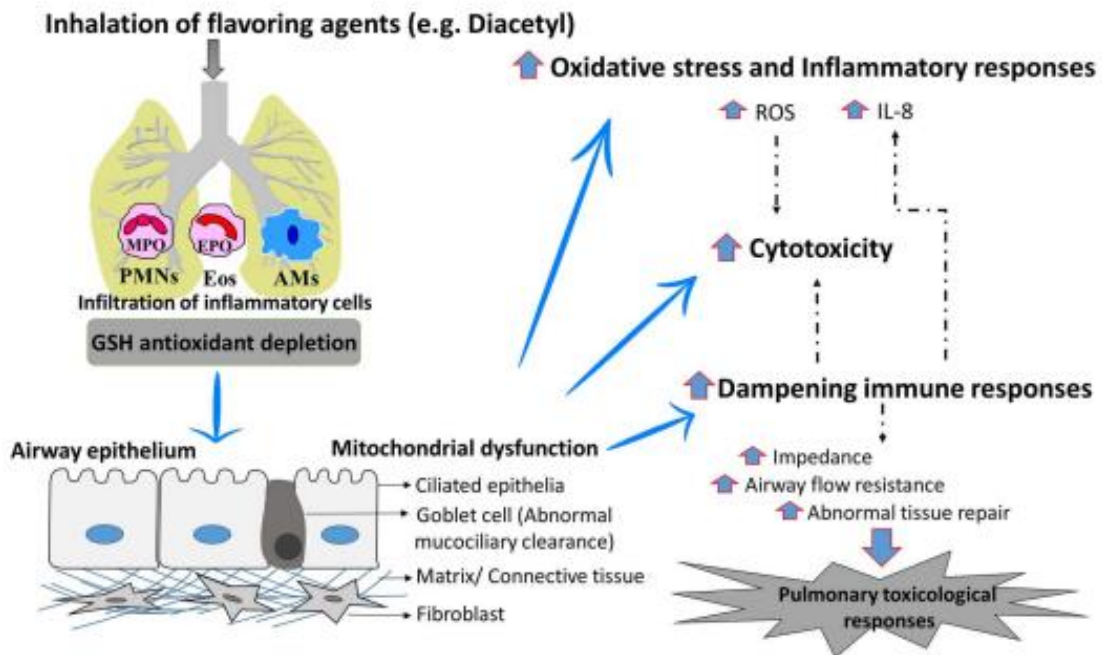


Fig. 8: risposta dell'epitelio polmonare scatenata dall'inalazione del Diacetile.

La figura 8 [33] rappresenta il meccanismo di tossicità polmonare dopo inalazione della sostanza chimica aromatizzante diacetile. Una volta inalato, l'agente aromatizzante provoca danno alla prima linea di difesa (ad es. deplezione dei tioli antiossidanti e disfunzione della barriera) contro agenti particolati e antigeni, nell'epitelio delle vie aeree. Responsabile di un'adeguata conduzione del flusso d'aria, l'epitelio delle vie aeree fisiologicamente è costituito da cellule epiteliali allineate intervallate da cellule caliciformi che secernono muco. Quindi il contatto con sostanze chimiche aromatizzanti provoca l'induzione di stress ossidativo, della risposta infiammatoria (registrati rispettivamente con

l'aumento della produzione di ROS e della secrezione di IL-8) e della risposta immunitaria caratterizzata dalla riduzione della lubrificazione e dalla resistenza al flusso determinando la comparsa della tosse, come osservato nella bronchiolite in caso di inalazione di diacetile. 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 [34]. Tuttavia, l'esatto meccanismo citotossico della componente aromatica delle e-cig non è ancora stato chiarito.

## **BASI, PRESUPPOSTI E SCOPO DEL PROGETTO**

Le sigarette elettroniche, ormai diffuse in modo esponenziale negli ultimi anni, sono arrivate sul mercato senza estesi test tossicologici preclinici o prove di sicurezza a lungo termine. Ad oggi è difficile dedurre indicazioni generali di precauzione anche perché i prodotti in commercio sono molto diversi per struttura del dispositivo, per composizione dei liquidi e concentrazione delle diverse sostanze aromatiche che sono estremamente eterogenee tra cui le aldeidi, alcoli e esteri.

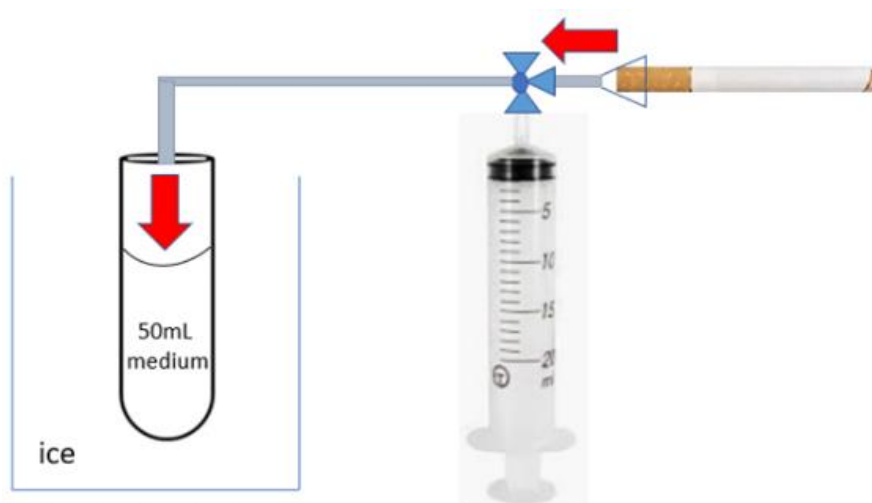
Per fare più chiarezza riguardo la tossicità dei componenti degli e-liquids, in particolar modo delle molecole aromatizzanti, precedentemente, è stato condotto uno studio di ricerca preliminare con l'obiettivo di valutare la citotossicità degli estratti del vapore (EVC) generato dai 7 aromi più frequentemente presenti negli e-liquids con un trattamento in acuto (24h) di fibroblasti neonatali del derma umano (nHDF). E' emerso che gli e-liquids senza nicotina sono molto meno tossici delle sigarette, tuttavia non sono innocui. In particolare, la componente aromatica ha contribuito in modo differenziale alla tossicità delle e-cig alterando l'equilibrio ossidativo, ad eccezione del mentolo. Mentre l' Etil Vanillina e la Vanillina hanno mostrato un' azione tossica specifica a livello mitocondriale.

Questo progetto si pone perciò l'obiettivo di integrare il lavoro di ricerca precedente, analizzando l'effetto sulla vitalità cellulare e sull'induzione dei ROS citosolici e mitocondriali da parte di 8 aromi e della nicotina, utilizzando un modello cellulare più pertinente, ossia cellule bronchiali umane (BEAS-2B), e valutando gli effetti di un' esposizione sia acuta (24h) che cronica (72h).

# MATERIALI E METODI

## PREPARAZIONE DELL'ESTRATTO DEL FUMO DI SIGARETTA

L'estratto del fumo della sigaretta di tabacco (CSE), impiegato come controllo positivo, è stato ottenuto da una sigaretta comunemente disponibile in commercio apportando una modifica al metodo descritto da Carp e Janoff [35]. La composizione della sigaretta di tabacco impiegata è la seguente: catrame 10mg/cig; monossido di carbonio 10mg/cig; nicotina 0.8 mg/cig. Il CSE è stato ottenuto bruciando dieci sigarette con il sistema rappresentato in figura 9, basato sull'aspirazione del fumo mediante una siringa.



*Fig.9: Rappresentazione schematica del sistema di estrazione del fumo.*

Più precisamente, il campionamento del CSE è stato eseguito con un protocollo standardizzato, in cui il fumo derivante da ogni puff, ovvero

un'aspirazione durante la quale l'aria si mescola con il fumo proveniente dalla sigaretta mimando così un atto respiratorio, 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 DMEM-HG in 10 secondi. Ogni sigaretta è stata consumata in 17 aspirazioni. La sospensione risultante è stata filtrata attraverso un filtro con pori di 0.20 µm 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 3.4 puff/ml è stata diluita nel mezzo di coltura.

## **PREPARAZIONE DEGLI AROMI E DEI LORO ESTRATTI**

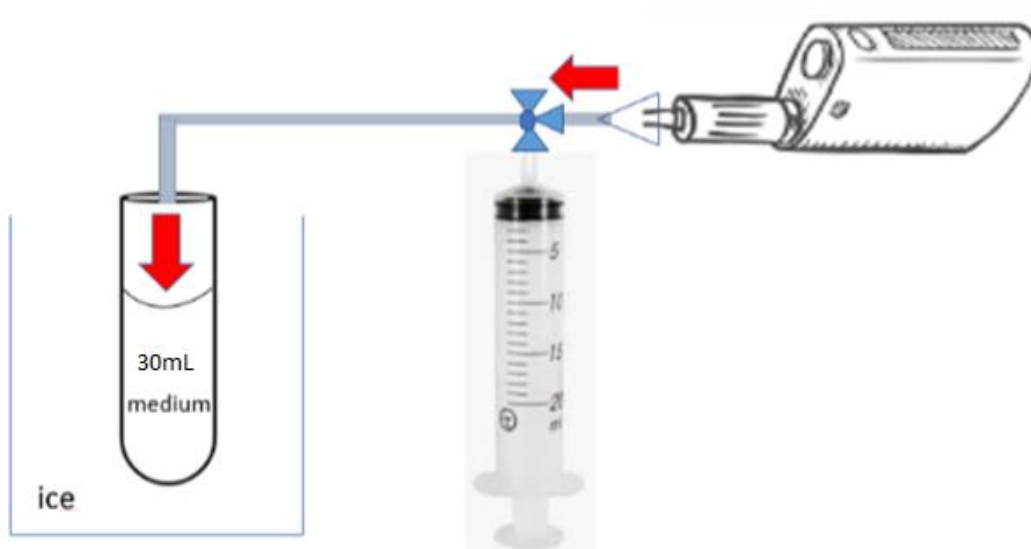
Dallo studio di Peyton e collaboratori [29], sono stati selezionati otto aromi tra i più comunemente utilizzati nella produzione degli e-liquids, ovvero: Vanillina, Etil vanillina, Maltolo, Etil maltolo, Mentolo, Alcol benzilico, Etil butirrato ed Etil acetato (tabella 1). Ognuno è stato solubilizzato 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 da 1.5 a 6.9 volte superiore rispetto alle concentrazioni massime individuate negli e-liquids

commerciali analizzati da Peyton e collaboratori, in particolare sono stati testati ad una concentrazione di 50 mg/ml, ad eccezione del Maltolo, che per la sua inferiore solubilità, è stato testato a 10 mg/ml. Inoltre, per valutare il contributo tossico della nicotina è stato preparato un e-liquid, analogamente al procedimento per gli aromi, contenente 36 mg/mL di nicotina.

Per vaporizzare e quindi estrarre il fumo degli e-liquids ottenuti, è stata utilizzata una sigaretta elettronica di quarta generazione, la iKunn I80 dotata di un atomizzatore Eleaf MELO4 il cui tank presenta una capienza massima di 3 ml. L'e-cig è stata utilizzata con la potenza di uscita del vapore di 40W, la resistenza di 0.5  $\Omega$  ed il voltaggio di 4.5V. 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 e-liquid contenente un singolo aroma o la nicotina 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 30 ml di DMEM-HG in 10 secondi e, al fine di mantenere gli stessi rapporti di aspirazione sia per il CSE che l'EVC, ovvero

3.4 puff/ml, ogni estratto è stato ottenuto gorgogliando 102 puff in 30ml di DMEM-HG.

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.



*Fig.10: Rappresentazione schematica del sistema di estrazione del vapore da e-cig.*

## MODELLO CELLULARE

Nel presente studio, per testare la tossicità della componente aromatica, e della nicotina, utilizzando il CSE come controllo positivo, è stato impiegato un modello *in vitro* di cellule umane bronchiali (BEAS-2B). Le cellule sono

state coltivate in DMEM-HG (Dulbecco's Modified Eagle Medium–High Glucose) contenente il 10% di siero fetale di bovino inattivato, 1% di L-glutammina, streptomina (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 10-16.

## **DISEGNO SPERIMENTALE**

Lo studio è stato diviso in due parti. Inizialmente è stata valutata la vitalità cellulare, in acuto (24h) e in cronico (72h) per valutare la tossicità delle sostanze (estratti vaporizzati di aromi, fumo di tabacco e nicotina) ed individuare le concentrazioni sub-letali da impiegare nelle successive analisi, evitando le dosi tossiche letali. Successivamente sono stati valutati gli effetti degli estratti sull'equilibrio ossidativo a livello mitocondriale e citosolico sia in acuto (24h) che in cronico (72h).

Cellule non trattate o trattate con i veicolanti, ovvero la miscela PG/VG (50/50), sono state impiegate come controllo negativo.



Ogni esperimento è stato condotto almeno in triplicato per ogni sessione sperimentale, le quali sono state ripetute tre volte.

## **SAGGIO DI VITALITA' CON REAGENTE PRESTOBLUE**

Il reagente PrestoBlue™ è pronto all'uso per una rapida valutazione della vitalità cellulare e contiene resazurina e un sistema buffer.

Quando aggiunto nel mezzo di coltura a contatto con le cellule, il reagente PrestoBlue viene rapidamente assorbito dalle cellule vitali. L'ambiente riducente all'interno delle cellule metabolicamente attive converte la resazurina nella sua forma ridotta, determinandone la variazione dello spettro di fluorescenza. Questo permette di determinare la quantità di Resazurina che è stata ridotta la quale sarà proporzionale alla quantità di cellule vive e metabolicamente attive.

Perciò, dopo 24h o 72h di trattamento con gli estratti, in una piastra da 96 pozzetti, il terreno di coltura è stato aspirato e le cellule incubate con 100 ul/pozzetto di una soluzione al 5% di Reagent PrestoBlue diluito nel DMEM-HG, per 1h al buio a 37°C. La fluorescenza è stata poi registrata a 550nm con il lettore di piastra Synergy HT (Bio-tek) e corretta sottraendo la fluorescenza della soluzione al 5% di PrestoBlue in DMEM-HG. La vitalità, espressa in %, è stata normalizzata per il controllo negativo,

ovvero le cellule non trattate e mantenute in DMEM-HG, mediante la seguente proporzione:

[Fluorescenza del composto testato (550nm) /fluoresc. Controllo negativo] x 100

## **ANALISI DELLA CITOMETRIA A FLUSSO**

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

## **ANALISI ROS CITOPLASMATICI**

I livelli citosolici di ROS sono stati valutati utilizzando come sonda fluorescente la carbossi-2,7-diclorofluoresceina diacetato (carbossi-H<sub>2</sub>DCFDA) (Invitrogen), una molecola non polare lipofilica che diffonde facilmente attraverso la membrana cellulare. All'interno della cellula la

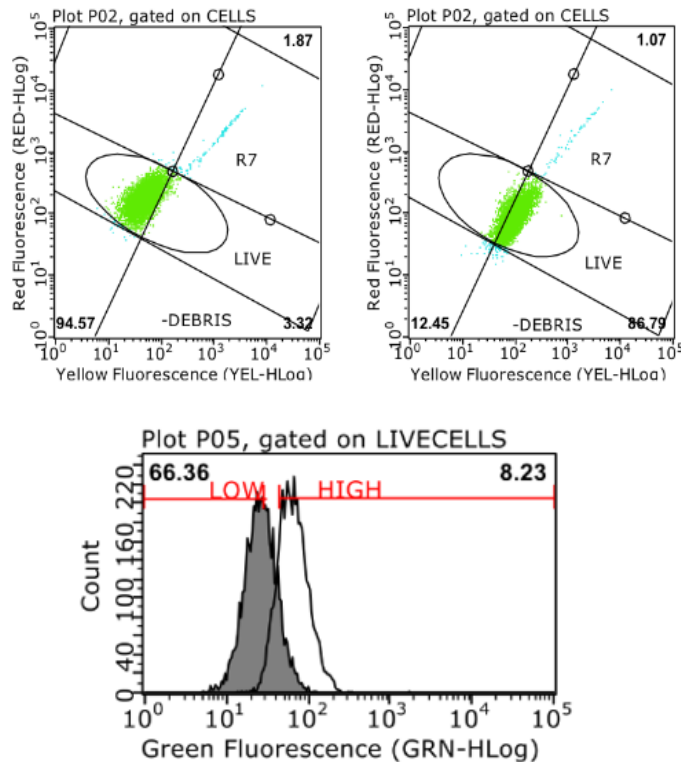
H<sub>2</sub>DCFDA viene idrolizzata dalle esterasi intracellulari che rimuovono i gruppi acetati rendendola polare e idrofilica (H<sub>2</sub>DCF, Diidrodiclorofluoresceina), quindi, non più in grado di diffondere attraverso la membrana cellulare, si accumula a livello intracellulare. La H<sub>2</sub>DCFDA è un fluorocromo leuco, ossia composto non fluorescente, che viene successivamente ossidato da specie ossidanti, quali i ROS, in 2',7'-diclorofluoresceina (DCF), molecola invece altamente fluorescente.

I livelli di fluorescenza sono così proporzionali alla quantità di specie reattive dell'ossigeno intracellulari. La DCF, molecola in forma ossidata, emette fluorescenza ad una lunghezza d'onda di 532 nm, regione del verde. Dopo trattamento con gli estratti vaporizzati degli aromi, del fumo e della nicotina, in acuto (24h) e in cronico (72h), il mezzo di coltura è stato rimosso e le cellule incubate con la sonda (1 µM in PBS) per 30 minuti a 37°C al buio, successivamente lavate e staccate. Ad ogni campione è stata poi aggiunta una soluzione di Guava ViaCount (Merck Millipore), miscela di due molecole fluorescenti. I due coloranti, presenti nella formulazione, sono in grado di legare il DNA e quindi permettono di discriminare cellule vive, morte ed apoptotiche, sulla base delle loro differenti permeabilità alla membrana plasmatica. 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 frammenti cellulari che risultano negativi.

Il fluorocromo impermeabile alle membrane (fluorescente in giallo) entra solo nelle cellule morte o in procinto di morire con la membrana danneggiata, diversi livelli di fluorescenza gialla consentono di distinguere le cellule morte dalle apoptotiche. L'analisi dei ROS e dell'apoptosi/vitalità sono state condotte simultaneamente in citometria a flusso impiegando una tripla colorazione. L'utilizzo combinato delle due sonde fluorescenti ha lo scopo di valutare i livelli di ROS intracellulari solo nelle cellule vive. Perciò, è essenziale in questa analisi escludere le cellule con la membrana cellulare compromessa, poiché la fuoriuscita della DCF dalle cellule morte o con membrana non integra, comporterebbe falsi negativi.

Perciò, per l'analisi dei dati, sono state prima definite le cellule vive, apoptotiche e morte all'interno dei canali di fluorescenza giallo e rosso, in modo da poter analizzare il contenuto citosolico di ROS nelle sole cellule vive. Sono quindi state arbitrariamente definite all'interno del canale verde, usando come riferimento la distribuzione del controllo negativo le regioni "LOW" e "HIGH" corrispondenti rispettivamente al 60 ed al 10% delle cellule analizzate (figura 11). Gli stessi settaggi sono stati utilizzati per l'analisi di tutte le repliche sperimentali.



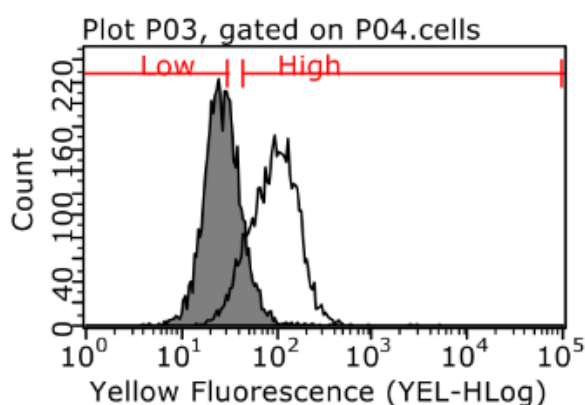
*Fig 11: Rappresentazione della distribuzione di fluorescenza registrata al citofluorimetro. In alto: dot-plot relativi alla vitalità del controllo negativo PG/VG (sinistra) e positivo CSE (destra), valutata con la sonda ViaCount. In basso: istogramma relativo alla distribuzione della fluorescenza verde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

## **ANALISI ROS MITOCONDRIALI: SAGGIO DELL'ANIONE SUPEROSSIDO**

L'identificazione dei ROS a livello mitocondriale è stata effettuata valutando la produzione dell'anione superossido, tramite citometria a flusso per mezzo della sonda nernstiana ridotta MitoSOX™ - Indicatore di superossido mitocondriale rosso (Invitrogen). Questo colorante fluorimetrico è un derivato idroetidnico che viene assorbito dai mitocondri delle cellule metabolicamente attive in fase di respirazione

cellulare, e quando viene ossidato dall'anione superossido diviene fluorescente emettendo ad una lunghezza d'onda di 580nm, corrispondente allo spettro del giallo.

In pratica, dopo trattamento con gli estratti vaporizzati degli aromi, del fumo e della nicotina, in acuto (24h) e in cronico (72h), il mezzo di coltura è stato rimosso e le cellule incubate con una soluzione 5  $\mu$ M di MitoSOX in PBS per 10 min 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.



*Fig.12: istogramma relativo alla distribuzione della fluorescenza gialla della sonda MitoSOX nel controllo negativo PG/VG (grigio) e positivo CSE (bianco).*

# ANALISI DEI DATI

Sono stati eseguiti almeno tre replicati biologici per ogni esperimento, condotti in tre diverse sessioni sperimentali.

La significatività statistica è stata valutata con il test T di Student, dove ogni campione è stato paragonato al controllo negativo e al 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  $\pm$  deviazione standard.

# **RISULTATI**

Le molecole aromatizzanti contenute negli e-liquids per le sigarette elettroniche costituiscono il principale elemento di attrazione per i consumatori. Tuttavia, ci sono dati insufficienti sulla sicurezza a seguito della loro inalazione. Gli studi presenti in letteratura analizzano gli e-liquids commerciali i quali contengono un mix di molecole aromatizzanti, mentre il presente lavoro si pone l'obiettivo di studiare il contributo alla tossicità dei singoli componenti vaporizzati. Dunque, per valutare gli effetti dannosi degli estratti prodotti dalla vaporizzazione degli aromi selezionati, nella comune matrice di polietilenglicole e glicerolo, è stata prima eseguita un'analisi della vitalità e successivamente è stato valutato il loro effetto sullo stato ossidativo cellulare sia a livello mitocondriale che citosolico a seguito di un'esposizione sia acuta che cronica.

## **VALUTAZIONE DELLA VITALITA' CELLULARE**

Il test della vitalità si basa sulla capacità riducente che hanno le cellule metabolicamente attive, quindi l'attività metabolica cellulare è un indice che rappresenta la % di cellule vive in una particolare condizione e momento temporale comparate con il campione di controllo.



Le cellule BEAS-2B sono state trattate con il mezzo di coltura contenente ciascuno degli estratti delle 8 sostanze aromatiche, della nicotina e del CSE, ed analizzate in due tempi diversi: dopo 24h e dopo 72h, per simulare rispettivamente l'esposizione in acuto ed in cronico.

Sono state usate le concentrazioni di 1.7 e 3.4 puff/ml per i singoli aromi e la nicotina, mentre per il fumo della sigaretta di tabacco, a causa della sua elevata tossicità, è stata considerata una scala più ampia (0.11, 0.22, 0.43, 0.85, 1.7 e 3.4 puff/mL) ed i risultati sono stati comparati con il controllo negativo ed il PV/VG. È emerso che l'estratto di fumo (CSE) conferma i dati ottenuti dal precedente studio risultando altamente tossico già dopo 24h di trattamento alla concentrazione di 0.85 puff/mL, riducendo la vitalità al 40%. Per quanto riguarda gli estratti degli e-liquids, il veicolante PG/VG non ha avuto alcun effetto tossico, mentre la vitalità cellulare è significativamente diminuita in modo dose dipendente per l'Etil Vanillina e l'Etil Maltolo (figura 13 in alto). Mentre in seguito dell'esposizione cronica, ovvero 72h, il decremento della % di cellule vive è accentuato per i casi dove era stata osservata una tossicità già dopo 24h. In particolare, la concentrazione 0.43 puff/mL del CSE, prima innocua, riduce la vitalità al 60%, analogamente all'Etil vanillina 3.4 puff/mL (60%), mentre l'Etil Maltolo 3.4 puff/mL si riduce al 40%. Inoltre, anche la Nicotina e il Maltolo,

che non avevano mostrano alcuna tossicità in seguito all'esposizione in acuto, dopo 72h di trattamento hanno determinato una lieve ma significativa riduzione della vitalità. Mentre gli altri aromi non hanno avuto alcun effetto (figura 13 in basso).

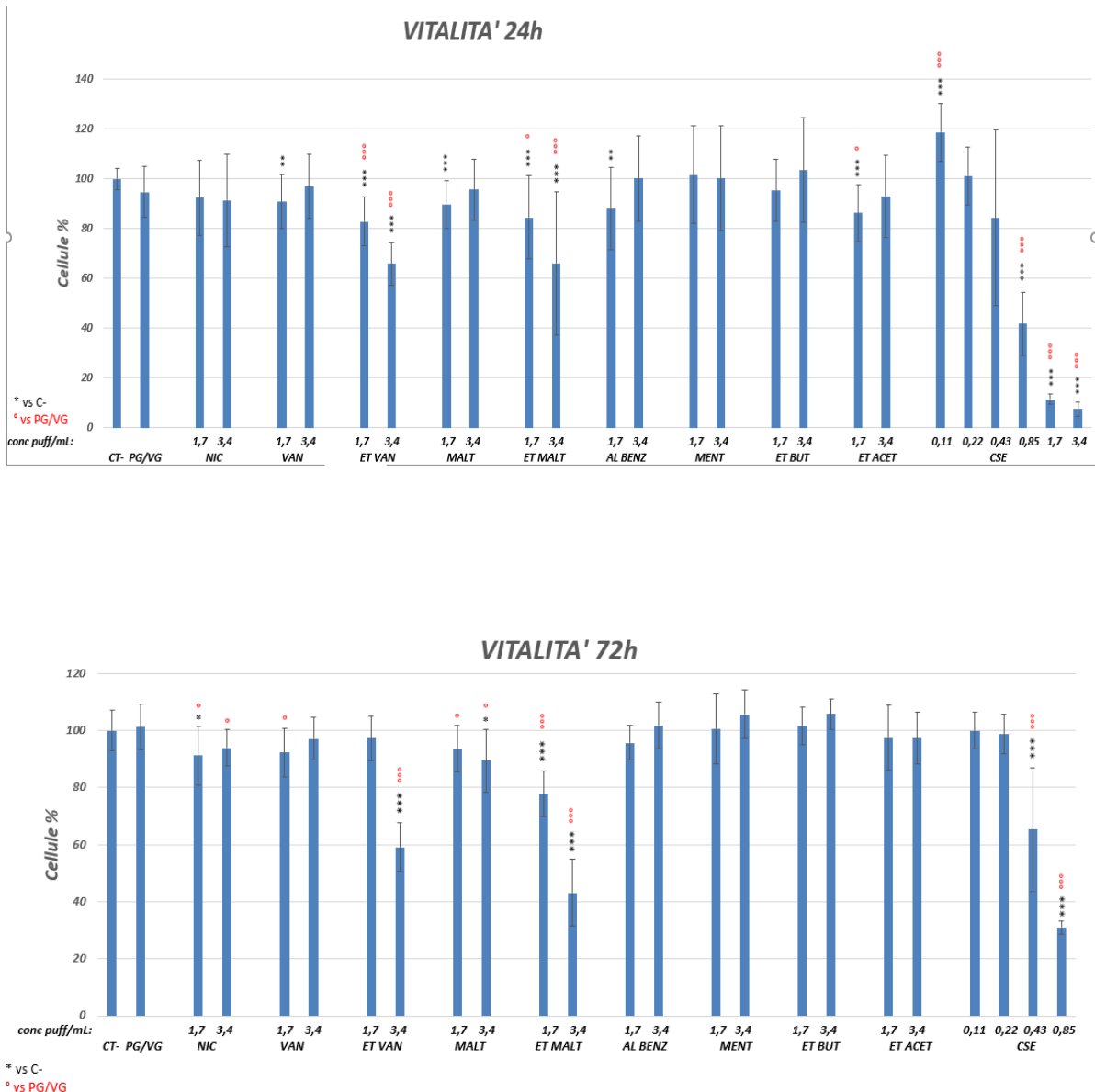
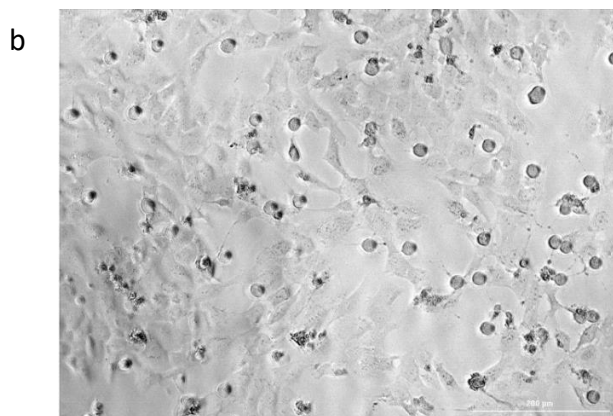
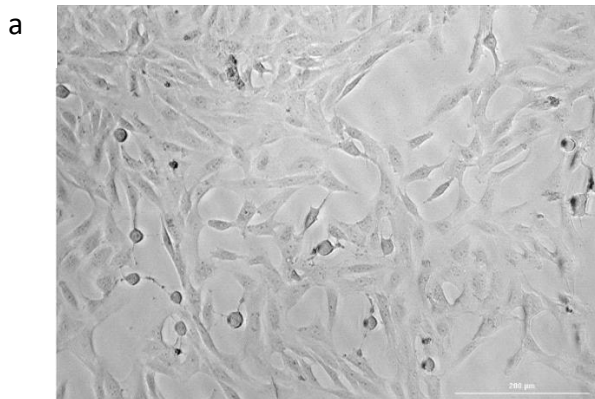
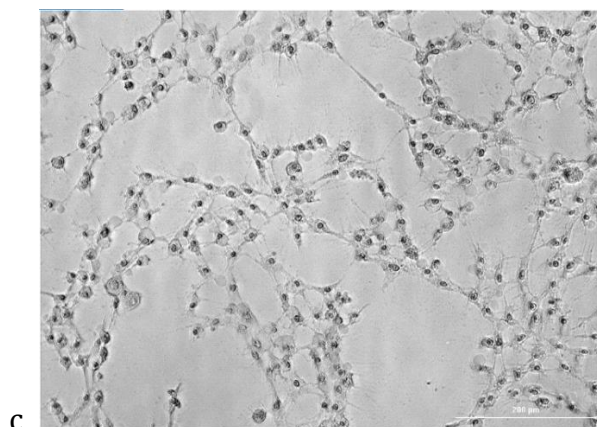


Fig.14: Effetti degli estratti testati a diverse concentrazioni sulla vitalità in acuto (in alto) e in cronico (in basso).

Inoltre, in figura 14 è possibile osservare come la morfologia fisiologica delle cellule di controllo trattate con il PG/VG (figura 14.a) vari drasticamente in seguito all' esposizione con l'Etil Vanillina (figura 14.b) e l' Etil Maltolo (figura 14.c) divenendo raggrinzite e con evidenti vescicolazioni, indice della tossicità di questi composti che inducono la morte cellulare.





*Fig. 14: Morfologia cellulare in seguito al trattamento in cronico (72h) con PG/VG (a), Etil Vanillina 3.4 puff/mL (b) ed Etil Maltolo 3.4 puff/mL (c).*

Nonostante la vitalità non sia stata influenzata dopo 24h di esposizione con la maggior parte degli aromi, è stato registrato un aumento del numero di cellule in apoptosi per tutti gli estratti ad esclusione della Vanillina. In particolare, il CSE ha determinato un notevole aumento delle cellule apoptotiche, tuttavia questo non risulta in un aumento della mortalità cellulare, neanche dopo 72h di esposizione. Al contrario dell' Etil Vanillina a 24h e dell' Etil Maltolo a 72h che inducono un incremento significativo della mortalità rispetto il controllo PG/VG. Tuttavia, a 72h il fenomeno dell'apoptosi è risultato diminuito rispetto le 24h con tutti gli estratti. Questo potrebbe essere il risultato dell'induzione di meccanismi di difesa cellulare che hanno contrastato i danni riportando le cellule in uno stato vitale, oppure, nel caso di un'apoptosi avanzata, le cellule possono essere andate in contro a morte, come nel caso dell'Etil Maltolo

ed, in minore misura, dell'Alcol Benzilico, dell'Etil Butirrato e della Nicotina, che hanno determinato un aumento della mortalità (figura 15).

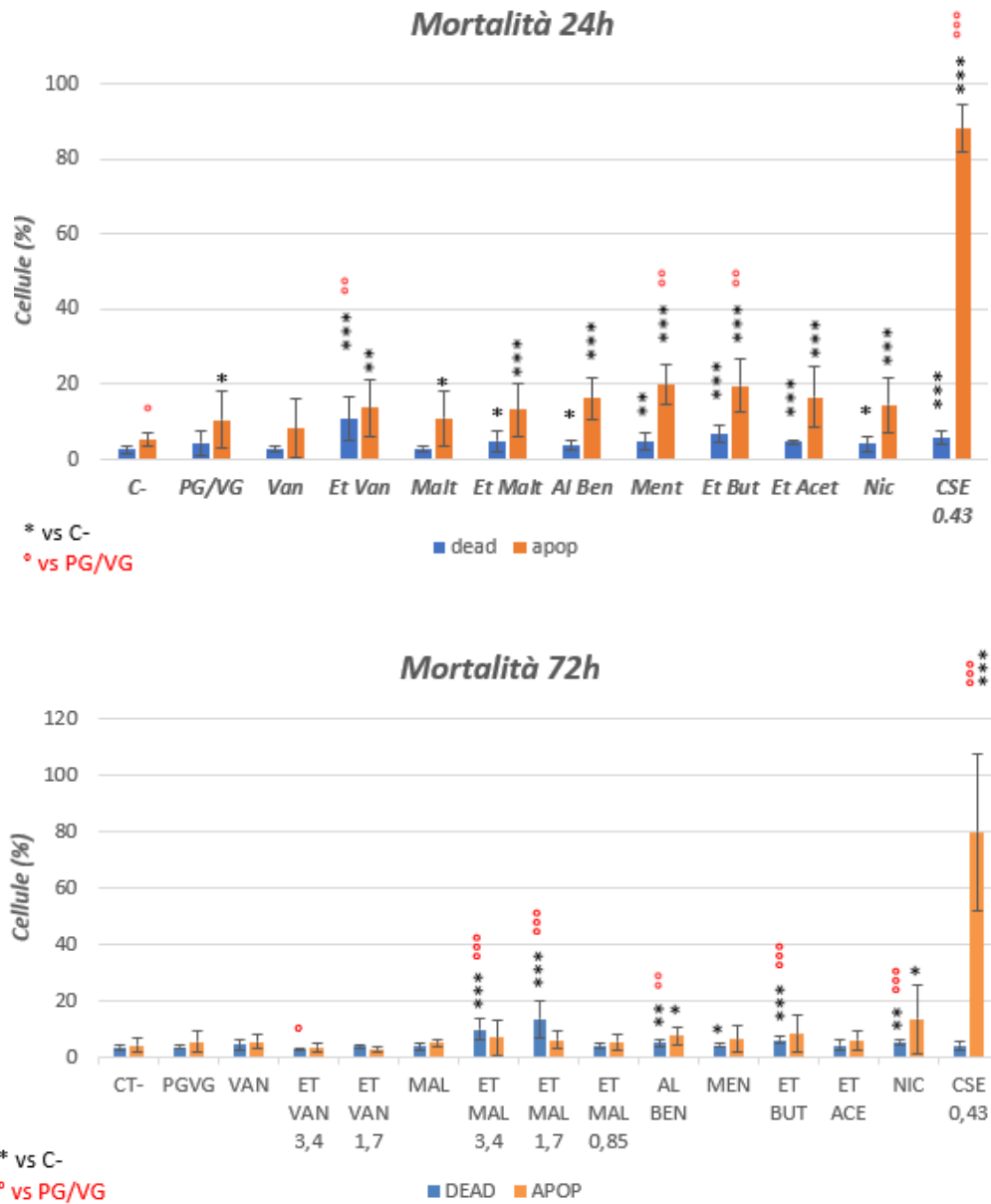


Fig.15: Effetti degli estratti sulla mortalità e cellule apoptotiche in acuto alla concentrazione 3.4 puff/mL, ad eccezione del CSE (0.43 puff/mL) (in alto) e in cronico alla concentrazione di 3.4 puff/ml e, per l' Et Vanillina ed Et Maltolo anche a 1.7 puff/ml, mentre il CSE a 0.43 puff/ml (in basso).

## **VALUTAZIONE DELLA CITOTOSSICITÀ DEGLI AROMI**

Gli estratti degli aromi non sono innocui a livello cellulare, anche se meno tossici rispetto al fumo della sigaretta di tabacco, è risultato quindi interessante indagare i meccanismi, a livello ossidativo, che potrebbero essere coinvolti nelle alterazioni correlate all'esposizione in acuto (24h) e in cronico (72h), analizzando la presenza di radicali a livello citoplasmatico e mitocondriale.

Le specie reattive dell'ossigeno (ROS) si formano prevalentemente, ma non esclusivamente, a livello del mitocondrio, come sottoprodotti della catena respiratoria mitocondriale. Quando la produzione di ROS è particolarmente elevata o i sistemi di difesa non sono efficienti, può configurarsi uno stato di stress ossidativo. In queste condizioni vi è un rischio elevato di danni cellulari e subcellulari (gli stessi mitocondri), che possono portare a un'accelerazione dei processi collegati alla senescenza fino alla morte cellulare.

## ROS MITOCONDRIALI

Trascorse 24h di trattamento con gli aromi di interesse (figura 16 in alto), non è stata registrata una variazione di ROS mitocondriali, nonostante l'aumentato numero di cellule in apoptosi, ad eccezione del CSE, che conferma la sua alta tossicità, e dell'Etil Vanillina (HIGH =  $24 \pm 14.4\%$ ,  $p_{vs.PG/VG}=0.007$ ).

Tuttavia, a 72h (figura 16 in basso), nonostante la quantità di cellule in apoptosi sia tornata paragonabile al controllo negativo, si è verificato uno squilibrio dello stato ossidativo mitocondriale altamente significativo, in seguito al trattamento con Etil Vanillina, Etil Maltolo, in cui l'incremento resta alto anche alla concentrazione più bassa di 1.7 puff/mL. Un incremento molto significativo anche se di minore entità, è stato registrato con la Vanillina, Etil butirrato e Nicotina.

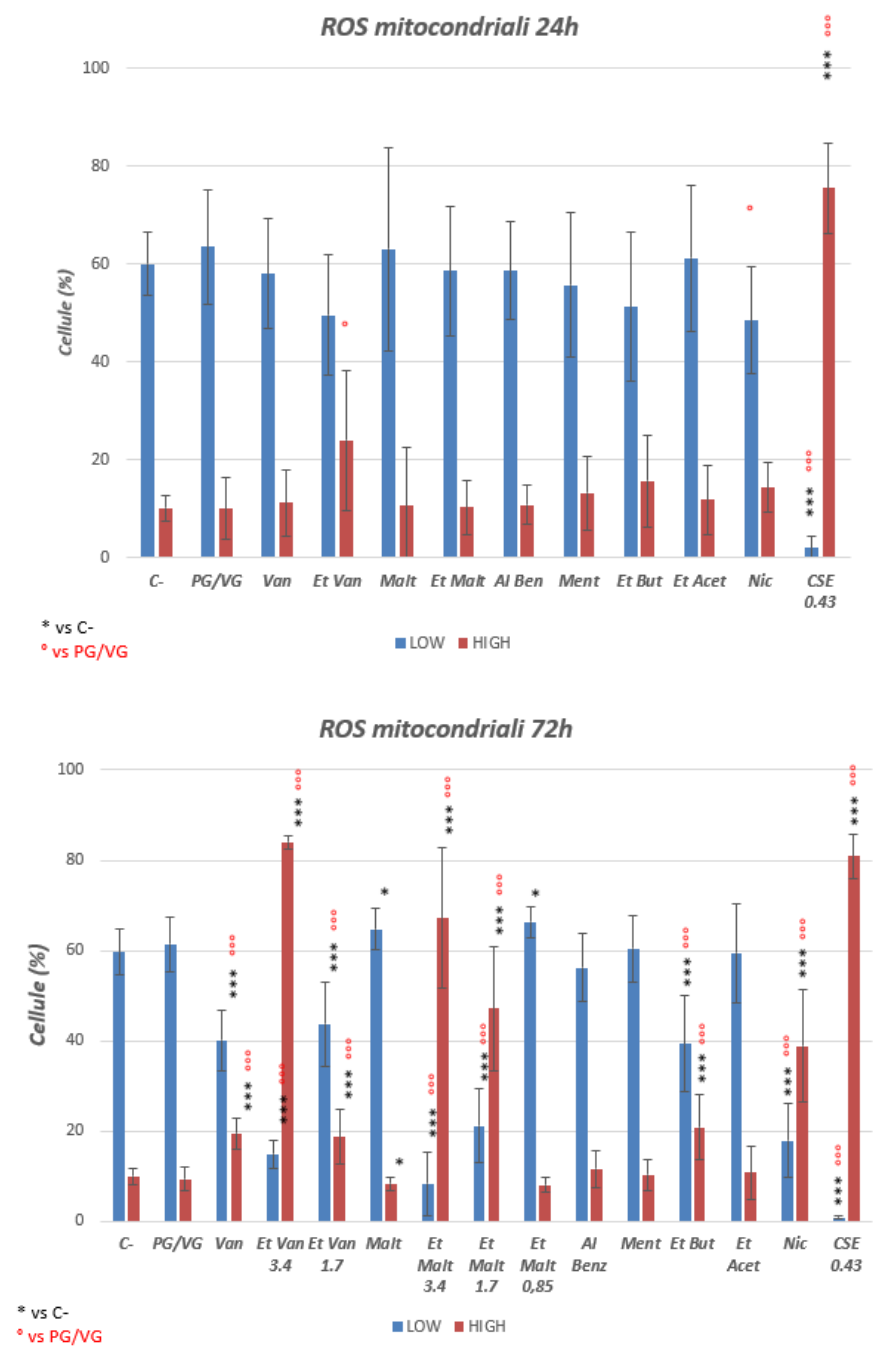


Fig.16: Alterazione del contenuto di ROS a livello mitocondriale dopo 24h alla concentrazione 3.4 puff/mL, ad eccezione del CSE (0.43 puff/mL) (in alto) e dopo 72h alla concentrazione di 3.4 puff/ml e, per l' Et Vanillina ed Et Maltolo anche a 1.7 puff/ml, mentre il CSE a 0.43 puff/ml (in basso).



## ROS CITOSOLICI

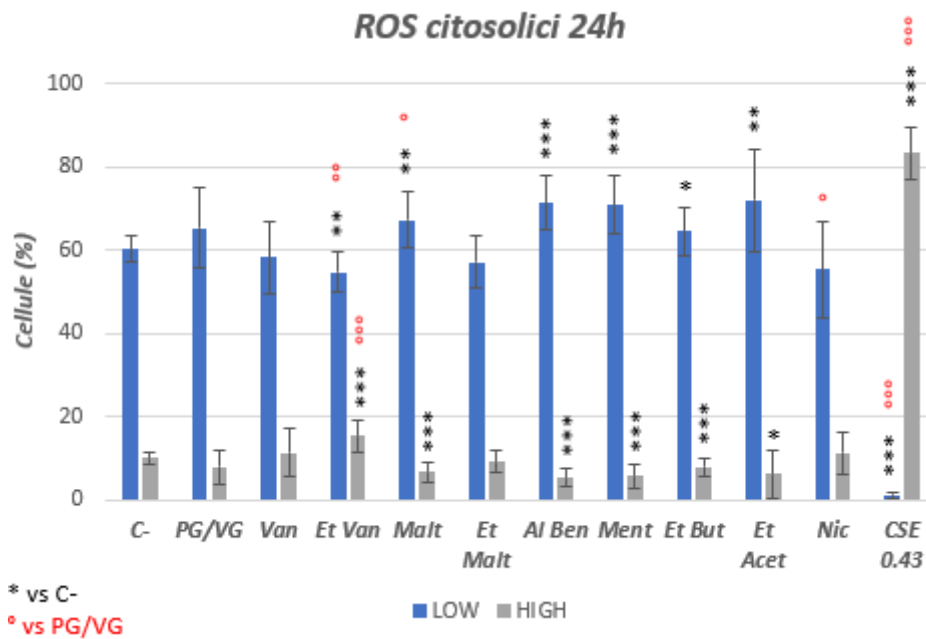
Il mitocondrio è il principale produttore di ROS e una loro eccessiva produzione può danneggiare questo organello con conseguente alterazione dell'equilibrio ossidativo di tutta la cellula. Tuttavia, la cellula possiede dei sistemi antiossidanti di detossificazione che possono risultare insufficienti o inefficienti quando si ha uno squilibrio molto pronunciato.

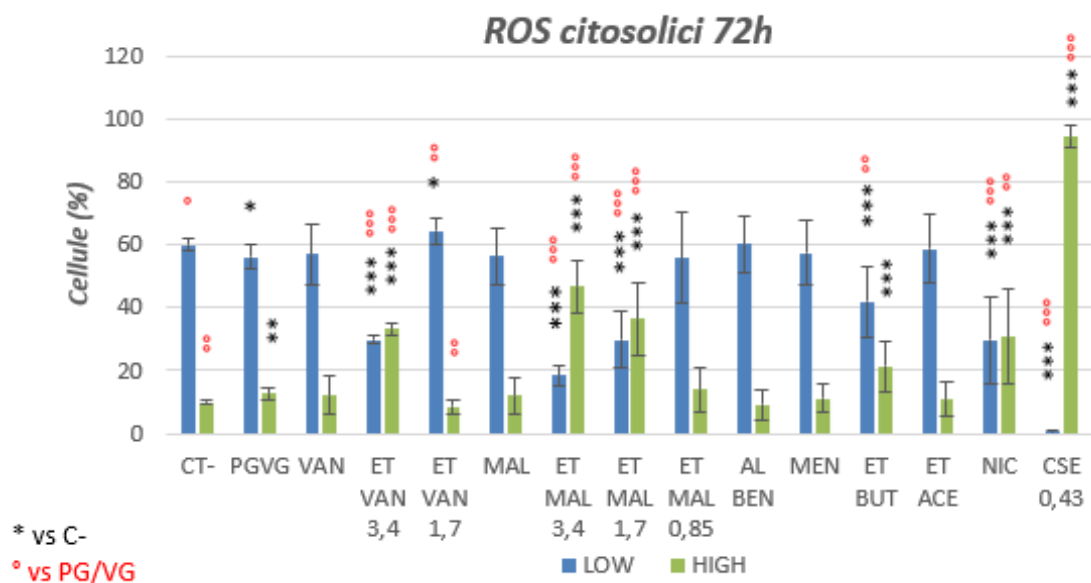
Si è osservato che l'alterazione dello stato ossidativo mitocondriale si riflette a livello citosolico (figura 17), in cui vi è un incremento della % di cellule ad alto contenuto di ROS dopo l'esposizione acuta solamente con l'Etil Vanillina e il CSE. Prolungando il trattamento fino a 72h è stata osservata una situazione diversa rispetto al mitocondrio, con un lieve ma significativo effetto della miscela veicolante PG/VG (C- HIGH:  $10 \pm 0.7\%$ , PG/VG HIGH =  $13 \pm 1.93\%$ ,  $p_{vs.C-} = 0.002$ ). In particolare, l'Etil Vanillina, alla più alta concentrazione testata (3.4 puff/mL), pur triplicando la % di cellule ad alto contenuto di ROS citosolici, rispetto al controllo negativo, è comunque meno incisiva rispetto all'alterazione che ha causato a livello dello stato ossidativo mitocondriale. Inoltre, questo squilibrio a livello

citosolico si annulla alla concentrazione di 1.7 puff/mL, al contrario di quanto registrato nel mitocondrio.

Un' analoga risposta relativamente al contenuto dei ROS citosolici si osserva con l'Etil Maltolo in presenza del quale , tuttavia, si osserva un mantenimento dei livelli elevati di ROS citosolici anche nei campioni trattati con 1.7 puff/mL, e con la Nicotina.

Mentre l'Etil Butirrato determina uno squilibrio di ROS di pari entità sia nel citosol che nel mitocondrio.





*Fig.17: Alterazione del contenuto di ROS citosolici dopo 24h alla concentrazione 3.4 puff/mL, ad eccezione del CSE (0.43 puff/mL) (in alto) e dopo 72h alla concentrazione di 3.4 puff/ml e, per l' Et Vanillina ed Et Maltolo anche a 1.7 puff/ml, mentre il CSE a 0.43 puff/ml (in basso).*

## DISCUSSIONE

Le sigarette elettroniche, appena immesse nel mercato mondiale, hanno subito un'esponenziale diffusione, molto probabilmente perché pubblicizzate come alternativa sicura alle sigarette tradizionali nell'ambito della lotta al tabagismo. L'ampio mercato delle e-cig ha tuttavia destato rapidamente molta preoccupazione perché non ci sono evidenze scientifiche sugli effetti indotti dall'inalazione dei vapori derivanti dal riscaldamento con conseguente evaporazione e condensazione degli e-liquids. Le ricerche sono ancora incomplete e spesso discordanti, a causa del breve periodo intercorso dalla loro diffusione e dell'ampia varietà di dispositivi esistenti. Inoltre, gli studi condotti finora sono stati effettuati utilizzando principalmente gli e-liquids nella loro complessità, ovvero costituiti da una miscela di veicolanti (glicole propilenico e glicerolo vegetale), nicotina e aromi, inoltre spesso contengono contaminanti come metalli pesanti, rendendo impossibile l'individuazione delle molecole responsabili dei danni indotti dalle e-cig. L'utente, sottovalutando il potenziale pericolo di questi dispositivi, si sottopone ad un continuo ed elevato livello di esposizione ai composti chimici presenti negli e-liquids ed in particolare quelli derivanti dal loro riscaldamento. E' quindi

opportuno cercare di comprendere gli effetti dei singoli componenti, in particolare delle singole molecole aromatizzanti in quanto queste appartengono a classi chimiche di per sé potenzialmente pericolose, ovvero aldeidi, alcoli ed esteri. Un lavoro di tesi precedente aveva individuato il contributo tossico di 7 molecole aromatiche contenute negli e-liquids in fibroblasti del derma umano, dopo un'esposizione di 24h. Con il presente studio invece si è deciso di lavorare con un modello cellulare più pertinente, quali le cellule bronchiali umane (BEAS-2B), sottoponendole ad un trattamento con gli estratti per 24h e 72h, al fine di simulare rispettivamente l'esposizione in acuto e in cronico. In particolare, sono stati analizzati 8 aromi tra quelli più frequentemente impiegati negli e-liquids, oltre alla nicotina e al fumo di sigaretta. Le BEAS-2B in generale sono risultate più resistenti alle alterazioni rispetto ai fibroblasti, nelle prime 24h di trattamento. Nel modello sperimentale con i fibroblasti, sebbene tutti gli aromi, ad eccezione del mentolo, abbiano indotto un incremento dei ROS mitocondriali, a livello citosolico le aldeidi (vanillina ed etil vanillina) non hanno alterato lo stato ossidativo, evidenziando una potenziale azione specifica a livello del mitocondrio, organello chiave nella produzione di specie reattive dell'ossigeno. Le BEAS-2B sottoposte al trattamento hanno mostrato un comportamento differente dai fibroblasti,

e dipendente dal tipo di sostanza in esame e dal tempo di esposizione  
intercorso.

In particolare, testando gli effetti degli estratti degli aromi, della nicotina e del fumo di sigaretta di tabacco, sulla vitalità e produzione di ROS a livello mitocondriale e citosolico, sono state registrate le seguenti variazioni (figura 18):

| TEMPO DI ESPOSIZIONE | VITALITA' |      | CELL APOPT<br>CELL MORTE |     | ROS MIT |     | ROS CITOS |     |
|----------------------|-----------|------|--------------------------|-----|---------|-----|-----------|-----|
|                      | 24h       | 72h  | 24h                      | 72h | 24h     | 72h | 24h       | 72h |
| PG/VG                |           |      |                          |     |         |     |           | ↑   |
| Vanillina            |           |      |                          |     |         | ↑↑  |           |     |
| Etil Vanillina       | ↓↓↓       | ↓↓↓↓ | ↑                        |     | ↑       | ↑↑↑ | ↑         | ↑↑↑ |
| Etil Butirrato       |           |      | ↑                        | ↑   |         | ↑↑  |           | ↑   |
| Etil Maltolo         | ↓↓↓       | ↓↓↓↓ | ↑                        | ↑   |         | ↑↑↑ |           | ↑↑↑ |
| Nicotina             |           | ↓    | ↑                        | ↑   |         | ↑↑↑ |           | ↑↑↑ |
| Alcol Benzilico      |           |      | ↑                        | ↑   |         |     |           |     |
| Maltolo              |           | ↓    |                          |     |         |     |           |     |
| Etil Acetato         |           |      | ↑                        |     |         |     |           |     |
| L-Mentolo            |           |      | ↑                        |     |         |     |           |     |
| CSE                  | ↓↓↓       | ↓↓↓↓ | ↑↑↑                      | ↑↑↑ | ↑↑↑     | ↑↑↑ | ↑↑↑       | ↑↑↑ |

*Fig 18: schema riassuntivo degli effetti dei vari estratti sulla vitalità, % cellule apoptotiche, % cellule morte, ROS mitocondriali e citosolici.*

Si può affermare che nella prima parte di questo studio riguardante l'analisi della vitalità e presenza di cellule apoptotiche, i risultati confermano l'elevata tossicità, già ben documentata, del fumo di sigaretta di tabacco, il quale, nel presente modello sperimentale, ha ridotto la vitalità cellulare al 40% alla concentrazione di 0.85 puff/ml già dopo 24h, aumentando la sua tossicità dopo 72h, associata ad un forte stress ossidativo. Recenti sviluppi nella conoscenza degli eventi di segnalazione cellulare dimostrano infatti che il fumo di sigaretta provoca stress ossidativo e risposte pro-infiammatorie nelle cellule polmonari. Il fumo di sigaretta è una complessa miscela di oltre 4000 composti tra cui alti livelli di molecole ossidanti. Lo stress ossidativo che ne consegue, quando le difese cellulari antiossidanti si esauriscono, è accompagnato dall'aumento della produzione di ROS nelle cellule epiteliali polmonari. Lo stress ossidativo mediato dal fumo di sigaretta produce danni al DNA e attiva cascate di segnalazione della sopravvivenza con conseguente proliferazione e trasformazione cellulare incontrollata [36].

Nel nostro studio, benché le sigarette elettroniche siano state immesse in commercio come strumento di lotta al tabagismo, perché pubblicizzate come "sicure", gli aromi contenuti negli e-liquids vaporizzati sono risultati meno tossici del fumo ma comunque non innocui, in linea con precedenti

studi i quali hanno dimostrato che diverse sostanze chimiche aromatizzanti, presenti negli aerosol delle e-cig, innescano una risposta infiammatoria mediante il rilascio di citochine infiammatorie IL-8 nelle cellule Beas2B e HFL-1 [34]. In particolare, tra gli 8 aromi testati, la vanillina e l'Etil Vanillina, entrambe aldeidi, in seguito all'esposizione cronica, aumentano in maniera significativa ed elevata il livello dei ROS mitocondriali, tuttavia, a livello citosolico questa variazione è molto più contenuta, ad eccezione di Etil Maltolo, Etil Butirrato e Nicotina, che confermano quanto accade a livello mitocondriale. Quindi queste aldeidi potrebbero indurre particolari sistemi antiossidanti in grado di contrastare lo squilibrio ossidativo a livello citosolico, come già osservato nei fibroblasti.

Tuttavia, dal presente studio è emerso che alcuni aromi, ovvero il maltolo, il mentolo, l'alcol benzilico e l'etil acetato, quando vaporizzati nelle condizioni riportate, non alterano lo stato ossidativo delle cellule bronchiali neanche in seguito a 72h di esposizione e sono caratterizzati da un'elevata percentuale di vitalità cellulare in seguito all'esposizione sia acuta che cronica, in accordo con i dati relativi al mentolo riportati da Stringaro e collaboratori [37]. Particolare è l'effetto del PV/VG, che sembra non essere tossico, tuttavia, dopo 72h di trattamento, le cellule mostrano



un aumento del livello di ROS citosolici. Questo potrebbe suggerire una sua bassa tossicità che si potrebbe manifestare a seguito di un'esposizione più prolungata che merita un approfondimento su modelli animali.

La differenza che emerge con i fibroblasti è che essi sono sensibili alle sostanze aromatizzanti già dopo un'esposizione di 24h, mentre le cellule bronchiali BEAS-2B mostrano lo squilibrio ossidativo solo dopo 72h di trattamento.

Questi risultati perciò evidenziano la capacità di alcuni aromi tra i più diffusi nelle formulazioni commerciali di indurre uno squilibrio ossidativo differenziale sia a livello citoplasmatico che mitocondriale. Sarebbe interessante valutare la capacità cellulare di remissione del danno, esponendo le stesse cellule precedentemente trattate, al mezzo di cultura normale, e valutare se i livelli aumentati di ROS mitocondriali e citosolici diminuiscano e in quali tempi.

# CONCLUSIONI

L'industria delle sigarette elettroniche attualmente promuove i suoi prodotti affermando che siano meno tossici delle normali sigarette di tabacco.

Gli e-liquids sono disponibili in una varietà di aromi a varie concentrazioni di nicotina che vanno da 0 mg a 36 mg / mL [38]. Tuttavia, non sono noti i potenziali effetti avversi dei componenti degli e-liquids sulla salute respiratoria. I vapori della sigaretta elettronica espongono i polmoni alle sostanze chimiche aromatizzanti quando gli e-liquids vengono vaporizzati e inalati. Sebbene le sigarette elettroniche presentino potenziali vantaggi rispetto alle sigarette tradizionali vi sono ancora poche informazioni in letteratura sulla loro sicurezza, inoltre è ancor più difficile trovare una linea guida standard di valutazione del rischio poiché vi è una grande variabilità tra i dispositivi.

In questo studio sono emersi interessanti risultati che dimostrano la minore tossicità degli aromi delle e-cig rispetto al fumo della tradizionale sigaretta, ma gli estratti dei vapori aromatizzati non sono risultati del tutto innocui ed è emerso che gli stessi contribuiscono alla tossicità delle e-cig

in modalità aroma-specifico, con alterazione dello stato ossidativo cellulare.

In conclusione, gli aromi sono molto meno tossici del fumo di sigaretta, i più dannosi per esposizione cronica sono Etil Vanillina ed Etil Maltolo. Sono comunque necessari ulteriori studi per valutare se tra i vari aromi emergano effetti sinergici nel potenziare le singole tossicità e se i danni prodotti siano reversibili una volta sospesa l'esposizione alla sostanza tossica e in quali tempi.

# BIBLIOGRAFIA

[1] Joseph C. Segen, Concise Dictionary of Modern Medicine Pag 316, New York, McGraw-Hill, 2006

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

[3] Patel RR, Ryu JH, Vassallo R., Cigarette smoking and diffuse lung disease, in *Drugs*, vol. 68, 2008, pp. 1511-1527

[4] Cortas CS, Talley CL., Appropriate remedial action? medical students, medical schools, and smoking and health education in New York and the United States, 1964-87, in *J Hist Med Allied Sci.*, vol. 62, 2007, pp. 316-335

[5] Levy DT, Nikolayev L, Mumford E., Recent trends in smoking and the role of public policies: results from the SimSmoke tobacco control policy simulation model., in *Addiction.*, vol. 100, 2005, pp. 1526-1536

[6] Jack H. Mendelson, M.D., Michelle B. Sholar, Nathalie Goletiani, M.D., Arthur J. Siegel, M.D., and Nancy K. Mello, Ph.D, Effects of Low and High Nicotine Cigarette Smoking on Mood States and the HPA Axis in Men, in *Neuropsychopharmacology.*, settembre 2005

[7] Il fumo in Italia (DOXA 2008) OSSFAD – Istituto Superiore di Sanità

[8] Eugene Braunwald, Malattie del cuore (7<sup>a</sup> edizione) Pag 1953, Milano, Elsevier Masson, 2007

[9] McKinlay SM., The normal menopause transition: an overview, in *Maturitas.*, vol. 23, 1996, pp. 137-145

[10] WHO Study Group on Tobacco Product Regulation. Guiding principles for the development of tobacco product research and testing capacity and proposed protocols for the initiation of tobacco product testing: recommendation 1. Geneva, World Health Organization, 2004

[11] WHO, The scientific Basis of tobacco product legislation

[12] (De Rosa S, Pacileo M, Sasso L, Di Palma V, Maietta P, Paglia A, Brevetti L, Cirillo P, Chiariello M., Insights into pathophysiology of smoke-related cardiovascular disease., in *Monaldi Arch Chest Dis.* , vol. 70, giugno 2008, pp. 59-67

[13] Richard Doll, Richard Peto, Jillian Boreham, Isabelle Sutherland, Mortality in relation to smoking: 50 years' observations on male British doctors., in *BMJ*, vol. 328, 2004

[14] Burke A, FitzGerald, GA. Oxidative stress and smoking-induced tissue injury. *Progress in Cardiovascular Disease*, 2003, 46:79–90

[15] OMS, World No Tobacco Day

[16] I numeri del cancro in Italia, Airtum-Aiom, 2018

[17] 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

[18] 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>]

[19] 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

[20] ; 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 66 Greece: findings from 2011–2013 global adult tobacco surveys. *Nicotine Tob. Res.* 18, 501–507

[21] Grana RP, Benowitz NM, Glantz SAP. Background Paper on E-cigarettes (Electronic Nicotine Delivery Systems) [Online] eScholarship. <http://escholarship.org/uc/item/13p2b72n>, 10 Oct. 2016

[22] Wagener TL, Floyd EL, Stepanov I, Driskill LM, Frank SG, Meier E, Leavens EL, Tackett AP, Molina N, Queimado L. Have combustible cigarettes met their match? The nicotine delivery profiles and harmful constituent exposures of second-generation and third-generation electronic cigarette users. *Tob Control* 26, e1: e23–e28, 2017

[23] Geiss O, Bianchi I, Barrero-Moreno J. Correlation of volatile carbonyl yields emitted by e-cigarettes with the temperature of the heating coil and the perceived sensorial quality of the generated vapours. *Int J Hyg Environ Health* 219: 268 –277, 2016. doi:10.1016/j.ijheh.2016.01.004

[24] Gillman IG, Kistler KA, Stewart EW, Paolantonio AR. Effect of variable power levels on the yield of total aerosol mass and formation of aldehydes in e-cigarette aerosols. *Regul Toxicol Pharmacol* 75: 58 –65, 2016. doi:10.1016/j.yrtph.2015.12.019

[25] Chausse P, Naughton G, Dutheil F. Electronic cigarettes: the resistance value of the heating filament could be the key to lung toxicity. *Chest* 148: e29 –e30, 2015. doi:10.1378/chest.15-0497

[26] What are the respiratory effects of e-cigarettes *BMJ* 2019; 366 doi: <https://doi.org/10.1136/bmj.l5275> (Published 30 September 2019)

[27] [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

[28] 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

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

[30] What are the respiratory effects of e-cigarettes? *British Medical Journal*, 2019

[31] 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

[32] Flavour chemicals in electronic cigarette fluids Peyton A Tierney,1 Clarissa D Karpinski,2 Jessica E Brown,1 Wentai Luo,2 James F Pankow1,2

[33] 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.

[34] 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



[35] Possible Mechanisms Of Emphysema in Smokers: In Vitro Suppression of Serum Elastase-Inhibitory Capacity by Fresh Cigarette Smoke and its Prevention by antioxidants, H Carp, A Janoff - American Review of Respiratory Disease, 1978

[36] 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.

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

[38] 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.