

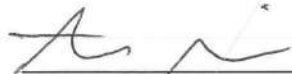
**Final Report**

*Title:* Evaluation of Toxicity Responses of EpiAirway™ to Nutriair®  
Product Exposures

*MatTek Study Number:* 012-18

*Sponsor:* Joshua Matzkin  
NV Nutrition LLC  
3226 Bennett Street North  
St. Petersburg, FL 33713

*Study Director:*

  
Anna Maione, Ph.D.

*Date:*

April 4, 2018

**TABLE OF CONTENTS**

|                                |    |
|--------------------------------|----|
| 1. Quality Assurance Statement | 3  |
| 2. Executive Summary           | 4  |
| 3. Experimental Methods        | 4  |
| 4. Test Articles               | 5  |
| 5. QC Results                  | 6  |
| 6. Experimental Results        | 6  |
| 7. Conclusion                  | 12 |



**Quality Assurance Statement**

I have reviewed the procedures and data presented in this report.

The AIR-100-PC12 tissues (Lot # 28024) and reagents used within this study were produced or obtained in accordance with MatTek's SOPs. The tissue production and test protocols were performed by qualified laboratory personnel.

Based on the results of standardized Quality Control testing, all tissues used in this study fulfill the acceptance criteria for the tissue models.

I hereby certify that the data contained herein are in agreement with the raw data collected during the performance of the study.

*Paul Kearney*

Paul Kearney  
Quality Assurance Director

*April 4, 2018*

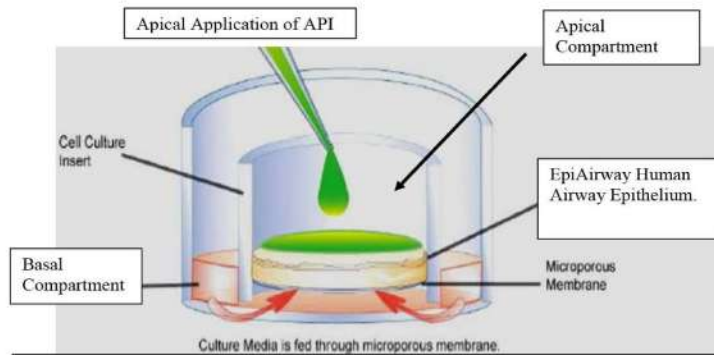
Date

## 2. Executive Summary

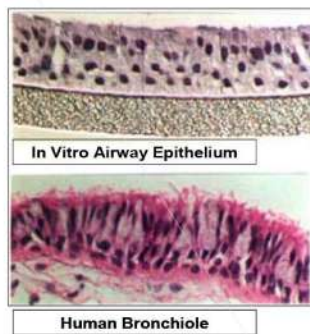
The current study was conducted to compare the toxicity response of EpiAirway™ tissues to aerosol from Nutriair Energy (20 puffs) and Nutriair Sleep (5 puffs), along with vehicle controls (pure 50:50 PG/VG, Energy vehicle + flavor and Sleep vehicle + flavor). Tissues were exposed in triplicate to aerosol and control air using a Vitrocell VC1 smoking machine. Untreated, incubator control tissues and Triton X-100 treatment control tissues were also included. Aerosol was generated using the CRM81 regime under a 0.5 L/min dilution rate and 20 mL/min vacuum rate. Twenty four hours following exposure, tissue viability was assessed by the LDH assay, barrier function was assessed by TEER and tissue morphology was assessed by H&E staining of tissue cross-sections. All tissues remained viable following exposure to either the full formulation Energy or Sleep aerosol. Likewise, tissue viability was unaffected by exposure to any of the vehicle controls. Similarly, tissue barrier function remained intact after all test article exposures. Histological assessment of tissue sections demonstrated that tissue morphology was unaffected by test article exposure, with all tissues exhibiting a pseudostratified and well-differentiated epithelial layer, stereotypical of the human respiratory epithelium. Taken together, these data indicate that exposure to Nutriair Energy Inhaler or Nutriair Sleep Inhaler did not negatively impact the viability, barrier function or morphology of EpiAirway tissues under the conditions tested. Follow-up experiments could be conducted to confirm and further expand on these results.

## 3. Experimental Methods

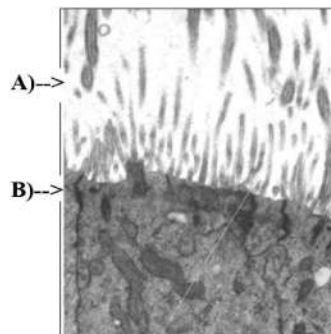
The EpiAirway™ model (AIR-100-PC12) is a highly differentiated *in vitro* human airway culture derived from primary human tracheal/bronchial epithelial cells. The human airway epithelial cells have been cultured to form a 3-dimensional model of human airway epithelial tissue. Morphologically, EpiAirway™ is of uniform thickness and is very similar to native nasal and tracheal epithelial tissue in that it exhibits a pseudostratified morphology and contains both ciliated and mucin producing cells. EpiAirway™ tissues possess *in vivo*-like barrier properties due to the formation of functional tight junctions between adjacent epithelial cells. EpiAirway™ cultures also express numerous *in vivo*-like drug metabolizing capabilities including P450, UDP-glucuronosyltransferase, glutathione S-transferase and alkaline phosphatase activities (See MatTek Technical References #456 and 566 and internal data). The EpiAirway™ PC12 tissues (surface 1.12 cm<sup>2</sup>) are cultured on collagen coated microporous membrane cell culture inserts and are grown at the air liquid interface, which allows direct apical application of test materials (similar to *in vivo* exposure). These inserts are the correct size for aerosol exposure using the Vitrocell VC1 smoking machine and 6 well exposure chamber. The model system is shown schematically in **Figure 1**. H&E stained paraffin sections of the EpiAirway™ cultures compared to excised human bronchial epithelium is shown in **Figure 2**. A transmission electron micrograph showing cilia and tight junctions at the apical surface the EpiAirway™ model is shown in **Figure 3**.



**Figure 1.** The EpiAirway Model System showing apical compartment, epithelial tissue, microporous membrane and basal (receiver) compartment.



**Figure 2.** Pseudostratified mucociliary morphology of the EpiAirway tissue compared to excised human bronchial epithelium.



**Figure 3.** Transmission electron micrograph of EpiAirway showing cilia (A) and tight junctions (B).

A detailed protocol is found in **Appendix B**. Briefly, the apical surfaces of EpiAirway™ tissues were rinsed with PBS prior to exposure. Triplicate tissues were exposed to 20 puffs of Energy Inhaler, 20 puffs of Energy Inhaler flavor vehicle control, 5 puffs of Sleep Inhaler, 5 puffs of Sleep Inhaler flavor vehicle control or 20 puffs of PG/VG vehicle control in parallel with exposure to clean control air. All aerosol was generated by a Vitrocell VC1 smoking machine using the CORESTA Recommended Method Number 81(CRM81) regime (square-wave profile, 55 mL puff volume, 3s duration, 8s exhaust and 30s interval) under a 0.5 L/min dilution rate and 20 mL/min vacuum rate. Additional controls, performed in triplicate on each day of Inhaler exposure, included untreated incubator control tissues (negative control) and tissues treated apically for three hours with 0.5% Triton X-100 (positive control for tissue death).

EpiAirway™ tissues were analyzed for barrier function using trans-epithelial electrical resistance (TEER) before and after exposure. Tissue viability was assessed after exposure using the LDH assay and tissue morphology was assessed by Hemotoxylin and Eosin (H&E) staining of tissue sections. In addition, conditioned media were collected from all tissue cultures for possible future cytokine analysis. The mean  $\pm$  standard deviation of TEER values (expressed as percent of pre-exposure value) and percent viability were calculated relative to matched controls. Additional analyses are available upon request.

#### 4. Test Articles

Test articles were supplied by the Sponsor. Triton X-100 was supplied by MatTek. Air used for clean air controls was compressed breathing quality air composed of 76.5-80.5% nitrogen and 19.5-23.5% oxygen.

Additional components are outlined below:

| Article              | CAS #     | Manufacturer/ Catalog # | Lot#                |
|----------------------|-----------|-------------------------|---------------------|
| TritonX-100          | 9002-93-1 | Sigma / X100            | 112217OOB           |
| LDH cytotoxicity kit | N/A       | Takara / MK401          | AH4P029,<br>AH4P028 |

**Table 1. Test Articles.**

Vehicle controls: 50:50 PG/VG, Energy Inhaler vehicle + flavor (Vfrost 50:50 PG/VG), Sleep Inhaler vehicle + flavor (Earl Grey 50:50 PG/VG)

Negative controls: Clean air, Incubator control

Positive controls: 0.5% Triton X-100 (positive control for cytotoxicity)

## 5. Quality Control

Baseline tissue barrier function by TEER:

Study QC acceptance criteria:  $>300 \Omega \cdot \text{cm}^2$

| Lot # | TEER $\pm$ s.d.   |
|-------|-------------------|
| 28024 | 755.9 $\pm$ 153.4 |

**Table 2. QC TEER Data.**

**Conclusion:** Based on the TEER results obtained from the standardized quality control tests, the EpiAirway™ tissues used in this study meet the QC acceptance criteria.

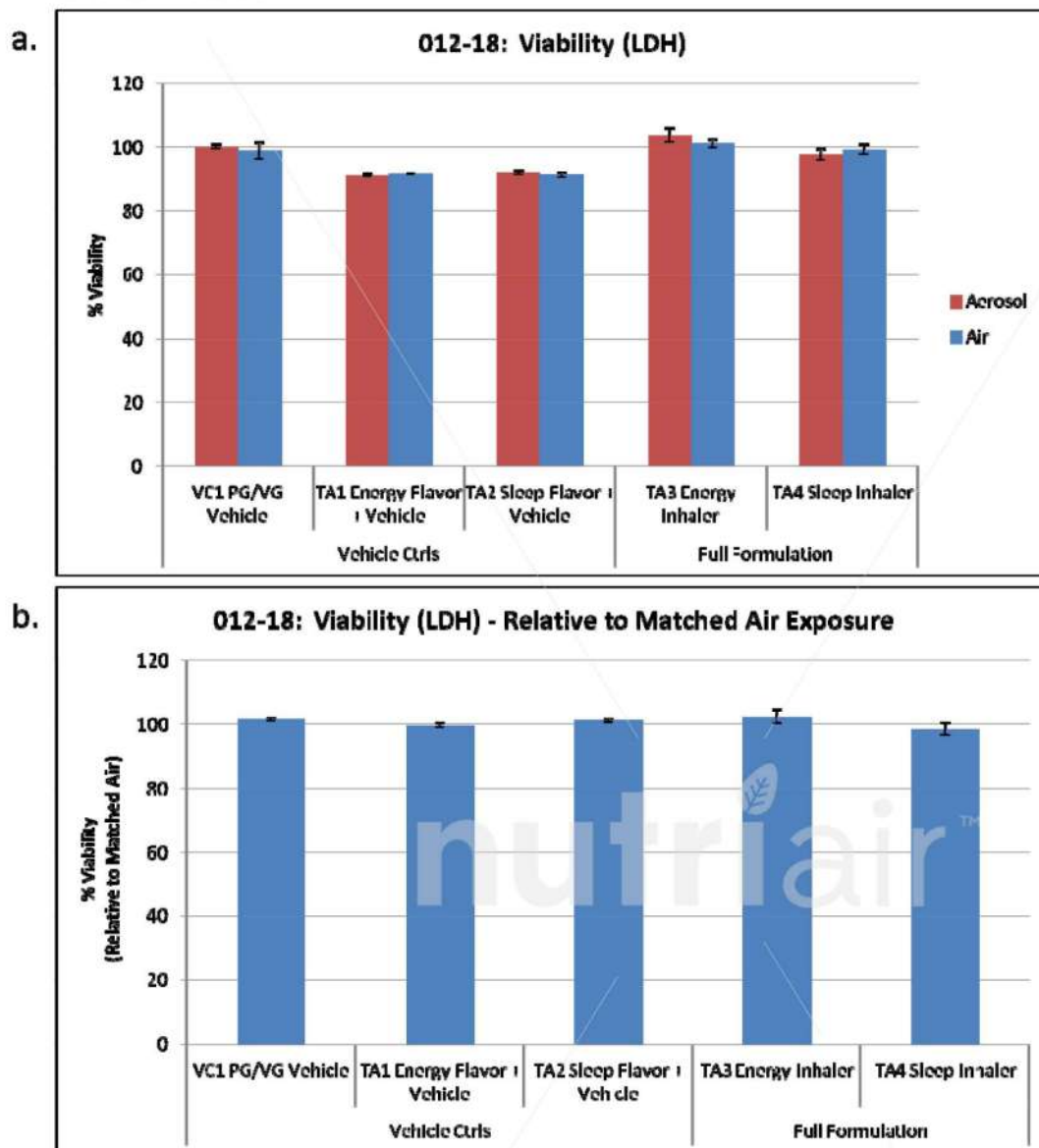
## 6. Results

### 6a. Macroscopic observations of EpiAirway™ tissues following exposure to test articles.

The apical surfaces of tissues exposed to test articles appeared similar to that of the matched control air-exposed tissues and to the untreated, incubator control tissues. Triton-treated tissues were leaky and media had seeped into the apical side of the insert.

### 6b. EpiAirway™ tissue viability determined by LDH following exposure to test articles.

Tissue viability following control treatments and aerosol/air exposure was measured using an LDH assay. Viability was calculated relative to the untreated control (100% viable) and Triton X-100 treatment (kill control). All tissues were  $> 90\%$  viable following treatment with either test articles or control air (**Figure 4a**). There was no difference in viability between the test article-exposed tissues and the matched control air-exposed tissues, indicating that the test articles did not induce any cytotoxicity (**Figure 4b**).

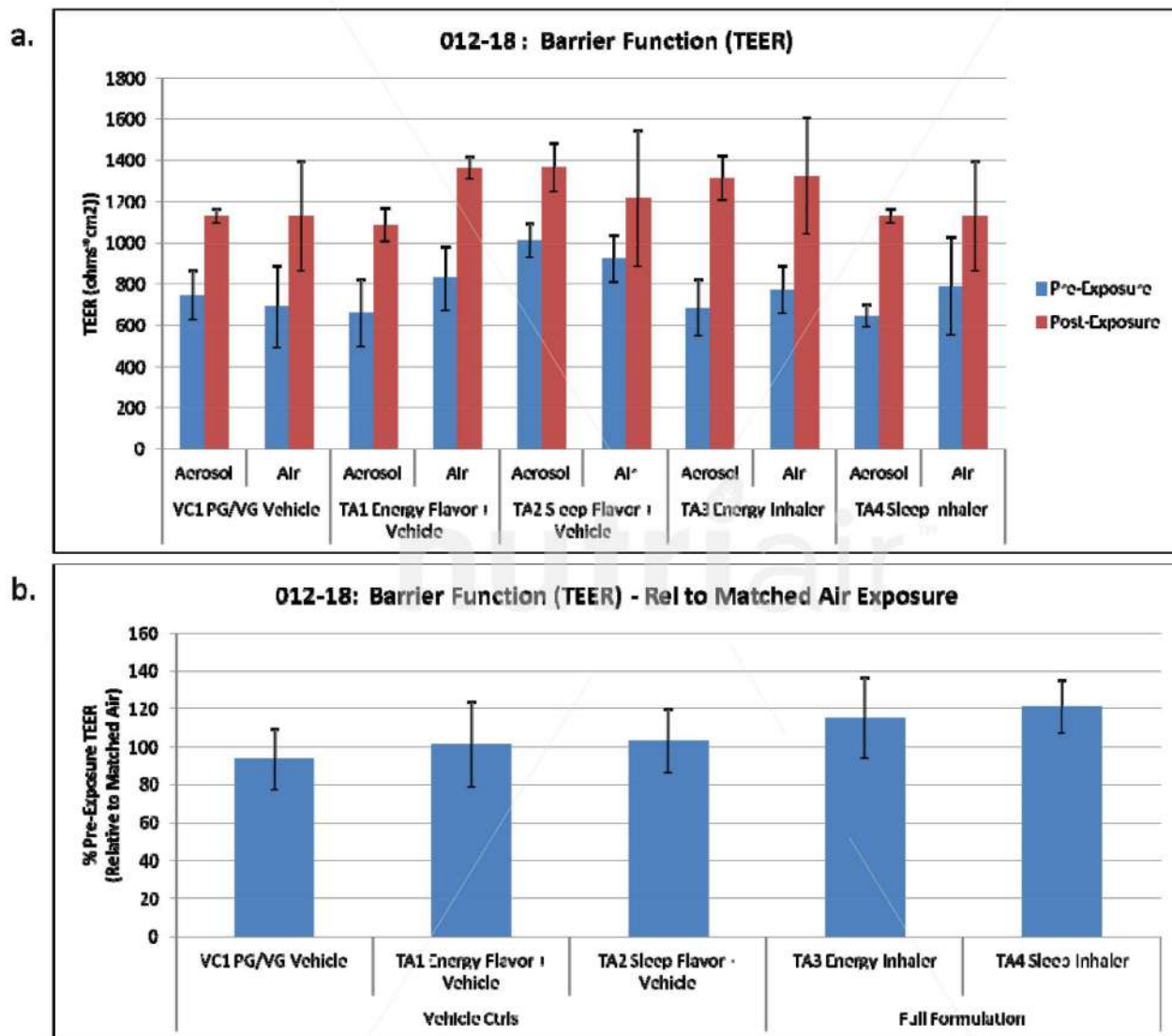


**Figure 4. Tissue viability determined by LDH.** Tissue viability following exposure to test article aerosol or matched control air was assessed using LDH. (a.) Tissue viability calculated relative to the untreated, incubator control (positive viability control) and the Triton X-100 control (cell death control) remained above 90% viable for all test article exposures and air exposures. (b.) Viability of test article-exposed tissues was expressed relative to the matched air-exposed tissues. Viability of tissues exposed to test articles remained ~100% of the matched air-exposed tissues. Mean viability  $\pm$  s.d. is shown (n=3).

### 6c. Barrier function of EpiAirway™ tissues determined by TEER following exposure to test articles.

Barrier function was assessed by TEER following exposure to test article aerosol, air and control treatments. All tissues had pre-exposure TEER values  $>300 \Omega \cdot \text{cm}^2$ , indicative of an

intact epithelial barrier. Following exposure to Triton, the positive control for cell death, barrier function was completely lost (TEER values  $<1\%$  of pre-exposure value,  $\leq 3.4 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ). Untreated, incubator control tissues maintained barrier function with TEER values  $>300 \Omega \cdot \text{cm}^2$ . Likewise, all air-exposed and test article-exposed tissues maintained barrier function (TEER values  $>300 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ) after treatment (**Figure 5a**). Barrier function did not differ between tissues exposed to the test article aerosol and tissues exposed to control air, suggesting that the test articles did not impact tissue barrier function (**Figure 5b**).



**Figure 5. Barrier function of control-treated tissues determined by TEER.** Barrier function following treatment was assessed by TEER. (a.) Mean  $\pm$  s.d. absolute TEER values expressed in  $\Omega \cdot \text{cm}^2$  are shown ( $n=3$ ). All tissues exhibited pre-exposure TEER values  $\geq 300 \Omega \cdot \text{cm}^2$ , indicative of an intact epithelial barrier. All post-exposure TEER values were  $\geq 300 \Omega \cdot \text{cm}^2$ , demonstrating that none of the treatments impaired tissue barrier function. (b.) The % pre-exposure TEER values expressed relative to the matched air values show TEER was similar between treatments. Mean  $\pm$  s.d. is shown ( $n=3$ ).

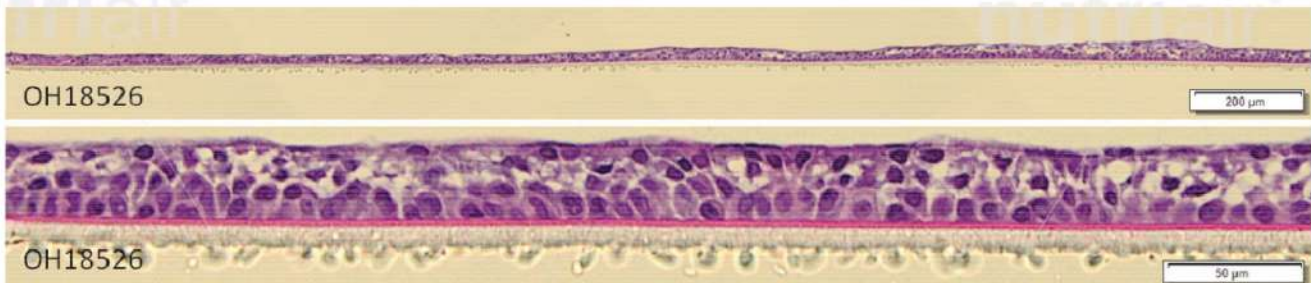


## 6d. Effects of test articles on EpiAirway™ tissue morphology determined by histological assessment.

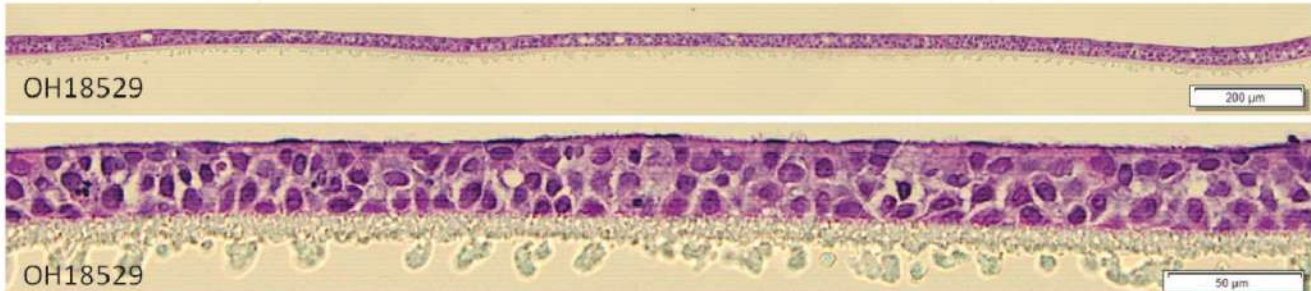
At the 24-hour time point, all tissues were formalin fixed, paraffin-embedded, sectioned and stained by H&E to assess overall tissue morphology. Untreated, incubator control tissues, air control-exposed tissues and test article-exposed tissues all showed comparable morphology that is typical of a healthy pseudostratified respiratory epithelium (**Figure 6**). No tissue damage or abnormalities were detected. The Triton-treated, negative control tissues were almost entirely destroyed, with only a few cells remaining attached to the insert membrane.



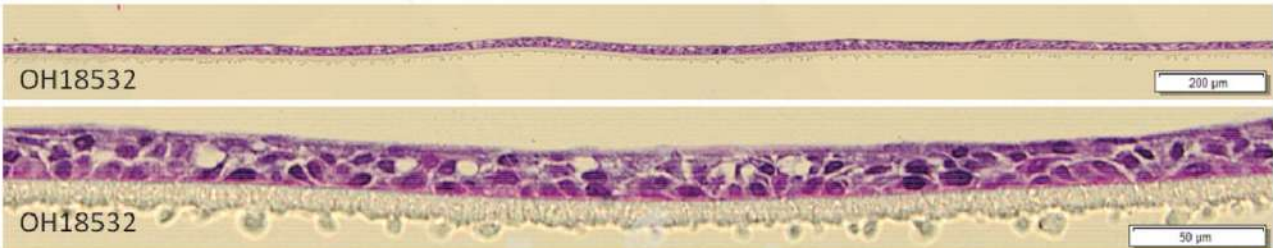
**TA2: Sleep Flavor  
+ Vehicle**



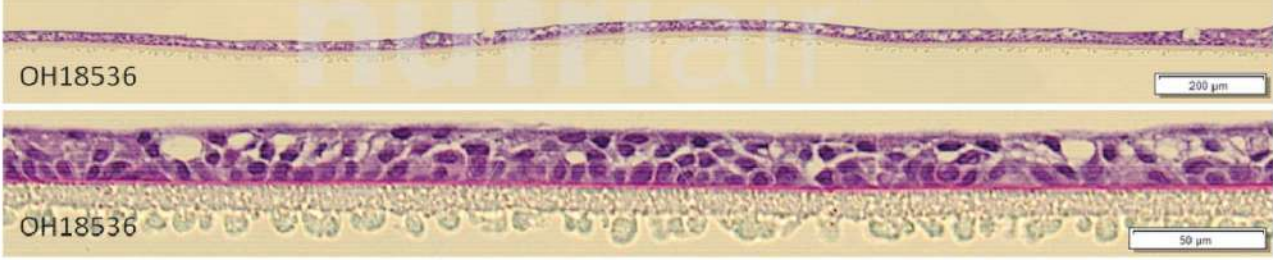
**TA2: Matched Air**

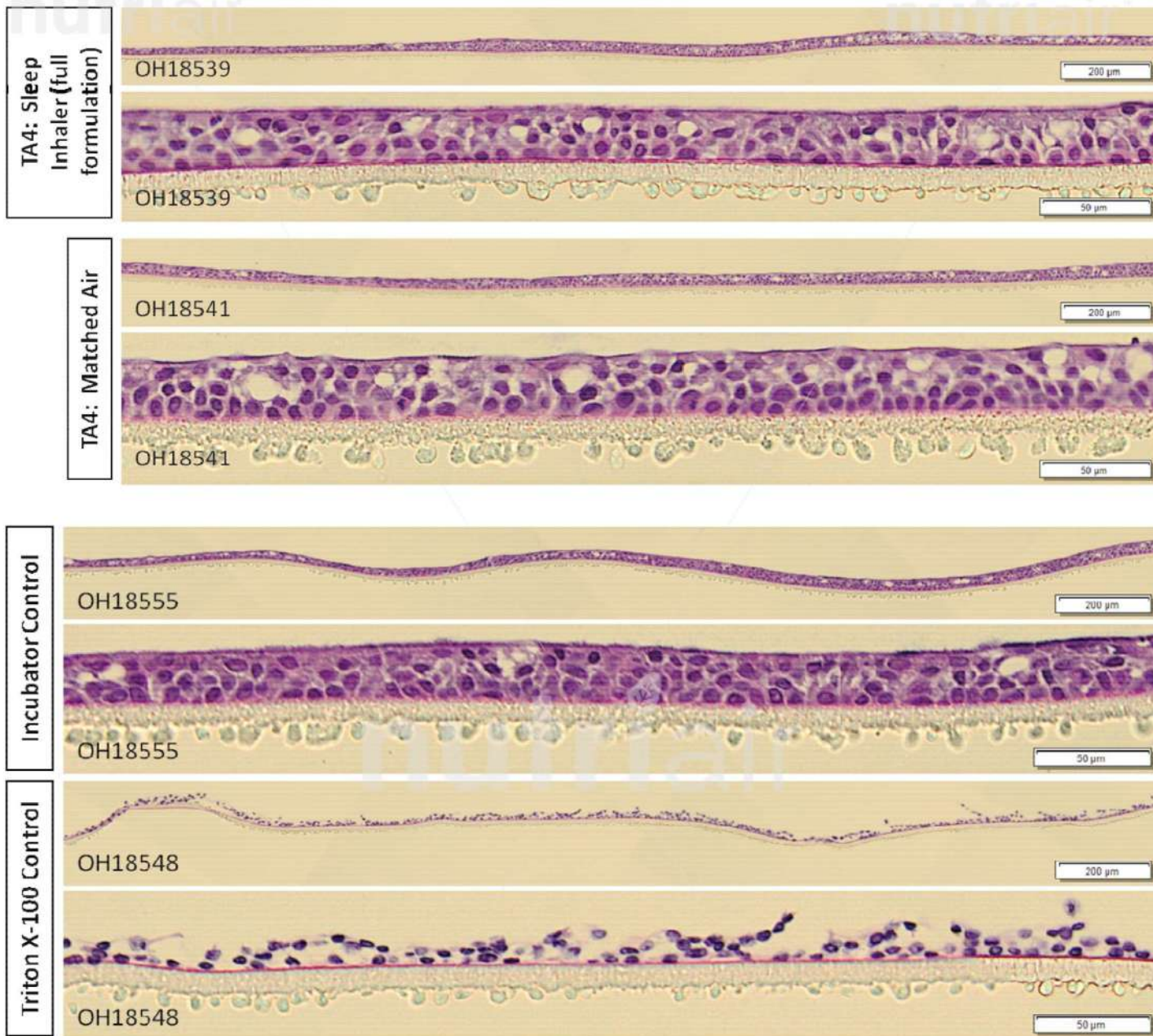


**TA3: Energy  
Inhaler (full  
formulation)**



**TA3: Matched Air**





**Figure 6. Morphology of EpiAirway™ tissues 24 hours post-treatment.** Tissue morphology was assessed by H&E staining of tissue sections (n=3). One representative image from each treatment is shown at a low and high magnification. Images are labeled with the Slide ID number.

## 7. Conclusion

This study evaluated the effects of Nutriair Energy Inhaler and Nutriair Sleep Inhaler, along with the vehicle control aerosol (pure 50:50 PG/VG, Energy vehicle + flavor and Sleep vehicle + flavor) on EpiAirway tissue viability, epithelial barrier function and tissue architecture. Tissue viability, determined using the LDH assay, was unaffected by exposure to the fully formulated test articles and the vehicle control test articles compared to matched air exposure, indicating no cytotoxic effects of the test articles on the EpiAirway tissues at the doses tested. This result was further supported by the evaluation of epithelial tight junction integrity by TEER measurement. TEER showed that all tissues maintained barrier function following exposure to the test articles. Lastly, H&E stained tissue cross-sections demonstrated that the tissue structure and differentiation was similar between untreated tissues and tissues exposed to air, vehicle control aerosol and full formulation aerosol. Follow-up experiments could be conducted to further confirm and extend these results. For example, additional functional endpoints like changes in gene expression or oxidative stress markers could be examined or higher doses could be evaluated to confirm that toxicity would not occur under extreme exposures. Conditioned cell culture media were collected and saved for possible future evaluation of cytokine secretion following test article exposure. In conclusion, the Nutriair Energy Inhaler and Sleep Inhaler did not impair EpiAirway tissue viability, barrier function or morphology under the conditions tested here. EpiAirway™ tissues are a valuable *in vitro* tool for screening and evaluating the effects aerosol products on human respiratory epithelial tissues at the air-liquid interface.

## **Заключительный отчет**

*Название:* Оценка токсической реакции тканей EpiAirway™  
на воздействие продуктов Nutriair®

*Номер исследования MatTek:* 012-18b

*Спонсор:* Джошуа Мацкин  
NV Nutrition LLC

3226 Беннет Стрит Норт  
Сент-Питерсберг, Флорида 33713 США

(3226 Benneth Street North  
St. Petersburg, FL 33713)

*Руководитель исследования:* /Подпись/  
Анна Майоне, доктор наук

*Дата:* 4 апреля 2018 г.

## СОДЕРЖАНИЕ

|                                  |    |
|----------------------------------|----|
| 1. Заявление о гарантии качества | 3  |
| 2. Резюме                        | 4  |
| 3. Методы исследования           | 4  |
| 4. Исследуемые препараты         | 7  |
| 5. Результаты контроля качества  | 7  |
| 6. Результаты исследования       | 7  |
| 7. Вывод                         | 15 |

## **Заявление о гарантии качества**

Мною проверены процедуры и данные, представленные в настоящем отчете.

Ткани AIR-100-PC12 (партия № 28024) и реагенты, использованные в настоящем исследовании, были произведены или получены в соответствии с типовыми рабочими инструкциями компании MatTek. Производство тканей и оформление протоколов испытаний осуществлялись квалифицированным персоналом.

Как показывают результаты стандартизованного контроля качества, все образцы, использованные в настоящем исследовании, отвечают критериям приемлемости для моделей тканей.

Настоящим удостоверяю, что данные, содержащиеся в настоящем отчете, соответствуют первичным данным, полученным в ходе проведения исследования.

*/Подпись/*

Пол Кёрни

Руководитель отдела обеспечения качества

*4 апреля 2018 г.*

Дата

## 2. Резюме

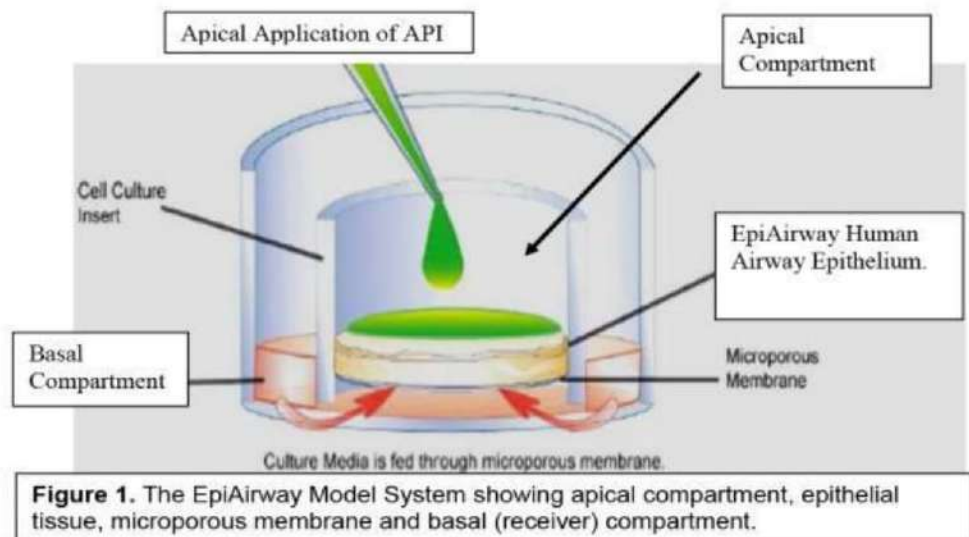
Настоящее исследование проведено для сравнения токсической реакции тканей EpiAirway™ на воздействие аэрозолей Nutriair Energy (20 затяжек) и Nutriair Sleep (5 затяжек), а также воздействие контрольных растворителей (чистый пропиленгликоль / растительный глицерин (PG/VG) 50:50, Energy растворитель + ароматизатор и Sleep растворитель + ароматизатор). По три пробы тканей подвергались воздействию аэрозоля и контрольного воздуха при помощи курительной машины Vitrocell VC1. Также в исследовании использовались в качестве контроля необработанные ткани после инкубации и ткани после обработки тритоном X-100. Аэрозоль создавался с использованием режима CRM81 при скорости разбавления 0,5 л/мин. и скорости набора вакуума 20 мл/мин. Через 24 часа после воздействия производилась оценка жизнеспособности тканей при помощи ЛДГ-теста, барьерная функция оценивалась по трансэндотелиальному электрическому сопротивлению (TEER), а морфология тканей – при помощи окрашивания гематоксилин-эозином поперечных срезов тканей. Все ткани оставались жизнеспособными после воздействия аэрозоли Energy или Sleep в полном составе. Аналогично жизнеспособность тканей не пострадала после воздействия всеми контрольными растворителями. Сходным образом, барьерная функция тканей оставалась интактной после воздействия всех исследуемых препаратов. Гистологическое исследование срезов тканей показало, что под воздействием исследуемых препаратов морфология тканей не изменилась, и во всех тканях отмечался многорядный высокодифференцированный эпителиальный слой, характерный для дыхательного эпителия человека. Эти данные в совокупности свидетельствуют о том, что воздействие испарителя Nutriair Energy или испарителя Nutriair Sleep не оказывало отрицательного воздействия на жизнеспособность, барьерную функцию или морфологию тканей EpiAirway™ в условиях исследования. Возможно проведение последующих испытаний для подтверждения и дальнейшего расширения этих результатов.

## 3. Методы исследования

Модель EpiAirway™ (AIR-100-PC12) представляет собой высокодифференцированную культуру дыхательных путей человека *in vitro*, полученную из первичных клеток эпителия трахеи/бронхов человека. Эпителиальные клетки дыхательных путей человека культивировались до получения трехмерной модели эпителиальной ткани дыхательных путей. Морфологически EpiAirway™ имеет равномерную толщину и проявляет значительное сходство с нативной тканью носовой полости и трахеи за счет многорядного строения и содержания как реснитчатых, так и продуцирующих муцин клеток. Ткани EpiAirway™ обладают барьерными свойствами, сходными со свойствами тканей *in vivo*, за счет образования функциональных плотных контактов между смежными эпителиальными клетками. Культуры EpiAirway™ также проявляют различные свойства метаболизации лекарственных средств, сходные со свойствами *in vivo*, включая активность в отношении P450, УДФ-глюкуронилтрансферазы, глутатион-S-трансферазы и щелочной фосфатазы (см. техническое руководство MatTek № 456 и 566, а также внутренние данные). Ткани EpiAirway™ PC12 (площадь поверхности 1,12 см<sup>2</sup>) культивируются на покрытых коллагеном микропористых мембранных вставках для культур клеток и выращиваются на границе раздела водной и воздушной сред, что позволяет применять исследуемые материалы непосредственно апикально (аналогично воздействию *in vivo*). Эти вставки имеют

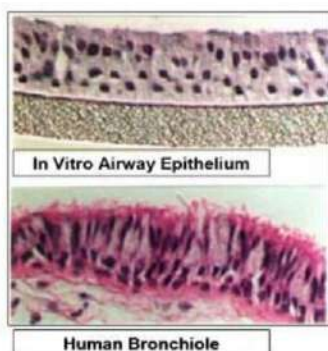


надлежащий размер для воздействия аэрозолей при помощи курительной машины Vitrocell VC1 и затравочных камер на 6 лунок. Строение модели схематично показано на **Рисунке 1**. Окрашенные гематоксилин-эозином парафиновые срезы культур EpiAirway™ в сравнении с иссеченным бронхиальным эпителием человека показаны на **Рисунке 2**. Электронная микрофотография в проходящем свете ресничек и плотных контактов на апикальной поверхности модели EpiAirway™ показана на **Рисунке 3**.



|  |   |
|--|---|
| Apical Application of API                          | Апикальное нанесение активного фармакологического ингредиента |
| Apical Compartment                                 | Апикальное отделение  |
| Cell Culture Insert                                | Вставка для культуры клеток                                   |
| EpiAirway Human Airway Epithelium                  | Эпителий дыхательных путей человека EpiAirway                 |
| Basal Compartment                                  | Базальное отделение   |
| Microporous Membrane                               | Микропористая мембрана  |
| Culture Media is fed through microporous membrane. | Питательная среда подается через микропористую мембрану.      |

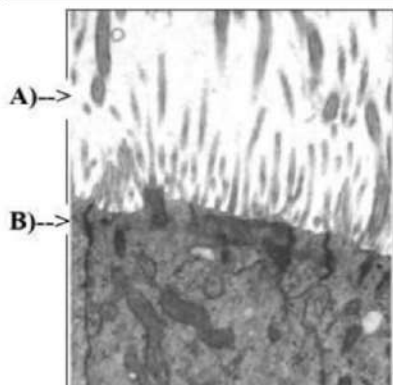
**Рисунок 1.** Система модели EpiAirway, на которой показано апикальное отделение, эпителиальная ткань, микропористая мембрана и базальное (приемное) отделение.



**Figure 2.** Pseudostratified mucociliary morphology of the EpiAirway tissue compared to excised human bronchial epithelium.

|                            |  |
|----------------------------|--|
| In Vitro Airway Epithelium | Эпителий дыхательных путей <i>in vitro</i> |
| Human Bronchiole           | Бронхиола человека                         |

**Рисунок 2.** Многорядное муцинозно-реснитчатое строение ткани EpiAirway в сравнении с иссеченным бронхиальным эпителием человека.



**Figure 3.** Transmission electron micrograph of EpiAirway showing cilia (A) and tight junctions (B).

**Рисунок 3.** Электронная микрофотография в проходящем свете ресничек (A) и плотных контактов (B) EpiAirway™.

Подробный протокол приведен в **Приложении В**. Вкратце, апикальные поверхности тканей EpiAirway™ перед воздействием промывались ФСБ. По три пробы тканей подвергались воздействию 20 затяжек испарителя Energy, 20 затяжек контрольного растворителя испарителя Energy с ароматизатором, 5 затяжек испарителя Sleep, 5 затяжек контрольного растворителя испарителя Sleep с ароматизатором или 20 затяжек контрольного растворителя PG/VG параллельно с воздействием чистого воздуха в качестве контроля. Все аэрозоли создавались при помощи курительной машины Vitrocell VC1 с использованием рекомендованного Центром сотрудничества научных исследований, связанных с табаком (CORESTA) режима «метод номер 81» (CRM81) (профиль затяжки прямоугольный, объем затяжки 55 мл, продолжительность 3 с, выпуск 8 с и интервал 30 с) при скорости разбавления 0,5 л/мин. и скорости набора вакуума 20 мл/мин. Также проводились дополнительные трехкратные контрольные исследования каждый день воздействия испарителя с использованием необработанных контрольных тканей после инкубации (отрицательный контроль) и тканей, обработанных апикально в течение трех часов 0,5% тритоном X-100 (положительный контроль гибели клеток).

Было проведено исследование барьерной функции тканей EpiAirway™ путем определения трансэндотелиального электрического сопротивления (TEER) до и после воздействия. Жизнеспособность тканей оценивалась после воздействия при помощи ЛДГ-теста, а морфология тканей — при помощи окрашивания гематоксилин-эозином поперечных срезов тканей. Кроме того, проводился сбор кондиционированных сред всех культур тканей для возможного последующего анализа на цитокины. Среднее  $\pm$  стандартное отклонение значений TEER (выраженное в процентах от значений до воздействия) и процент жизнеспособности подсчитывались относительно аналогичной контрольной группы. Дополнительные анализы доступны по запросу.

#### 4. Исследуемые препараты

Исследуемые препараты предоставил спонсор. Тритон X-100 предоставила компания MatTek. Для контроля чистым воздухом использовался сжатый воздух, пригодный для дыхания, состоящий на 76,5–80,5% из азота и на 19,5–23,5% из кислорода.

Дополнительные компоненты указаны ниже:

| Препарат                               | № реестра CAS | Производитель / № по каталогу | Партия №            |
|--|---------------|-------------------------------|---------------------|
| Тритон X-100                           | 9002-93-1     | Sigma / X100                  | 11221700B           |
| Набор для ЛДГ-теста на цитотоксичность | н/д           | Takara / MK401                | АН4P029,<br>АН4P028 |

**Таблица 1. Исследуемые препараты.**

Контрольные растворители: PG/VG 50:50, растворитель + ароматизатор испарителя Energy (Vfrost PG/VG 50:50), растворитель + ароматизатор испарителя Sleep (Earl Grey PG/VG 50:50)

Отрицательный контроль: чистый воздух, контроль после инкубации

Положительный контроль: 0,5% тритон X-100 (положительный контроль на цитотоксичность)

#### 5. Контроль качества

Исходная барьерная функция тканей по результатам TEER:

Критерии приемлемости контроля качества исследования:  $>300 \text{ ом} \cdot \text{см}^2$

| Партия № | TEER $\pm$ ст. откл. |
|----------|----------------------|
| 28024    | 755,9 $\pm$ 153,4    |

**Таблица 2. Данные контроля качества, TEER.**

**Вывод:** Как показывают результаты TEER в рамках тестов стандартизованного контроля качества, ткани EpiAirway™, использованные в настоящем исследовании, отвечают критериям приемлемости контроля качества.

#### 6. Результаты

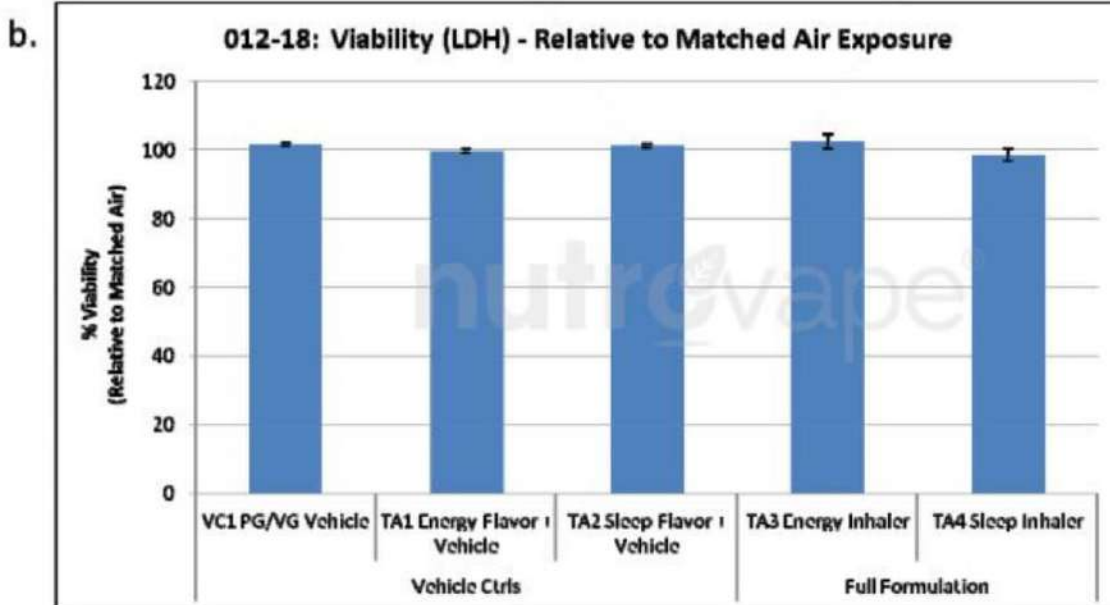
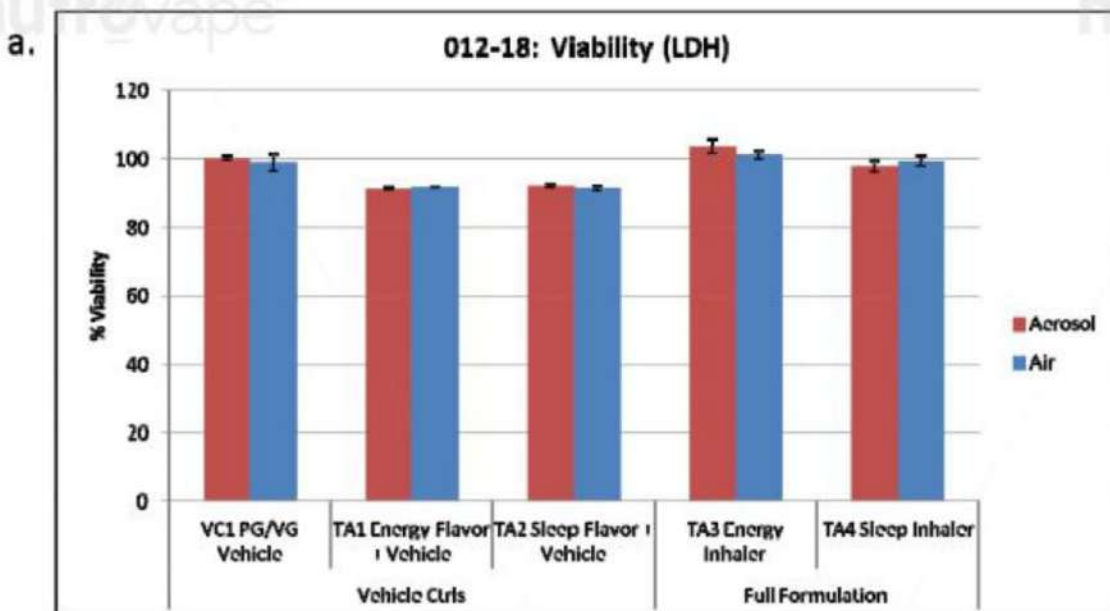
##### 6а. Макроскопическое исследование тканей EpiAirway™ после воздействия исследуемых препаратов.

Апикальные поверхности тканей, подвергнутых воздействию исследуемых препаратов, сходны с поверхностями тканей аналогичной контрольной группы, подвергнутых воздействию воздуха, и контрольных тканей после инкубации, не проходивших обработки.

Обработанные тритоном ткани лизировались, а среда просачивалась через апикальную сторону вставки.

### 6b. Жизнеспособность тканей EpiAirway™ после воздействия исследуемых препаратов по результатам ЛДГ-теста.

Жизнеспособность тканей после обработки контрольных групп и воздействия аэрозоли/воздуха измерялась при помощи ЛДГ-теста. Жизнеспособность рассчитывалась относительно необработанного контроля (100% жизнеспособность) и обработки тритоном X-100 (гибель клеток). У всех тканей жизнеспособность после обработки исследуемым препаратом или контрольным воздухом составляла >90% (Рисунок 4а). Не было выявлено различий в жизнеспособности между тканями, подвергнутыми воздействию исследуемых препаратов, и аналогичными тканями контрольной группы после воздействия воздуха, что свидетельствует о том, что исследуемые препараты не вызывали цитотоксичности (Рисунок 4b).



Viability (LDH)

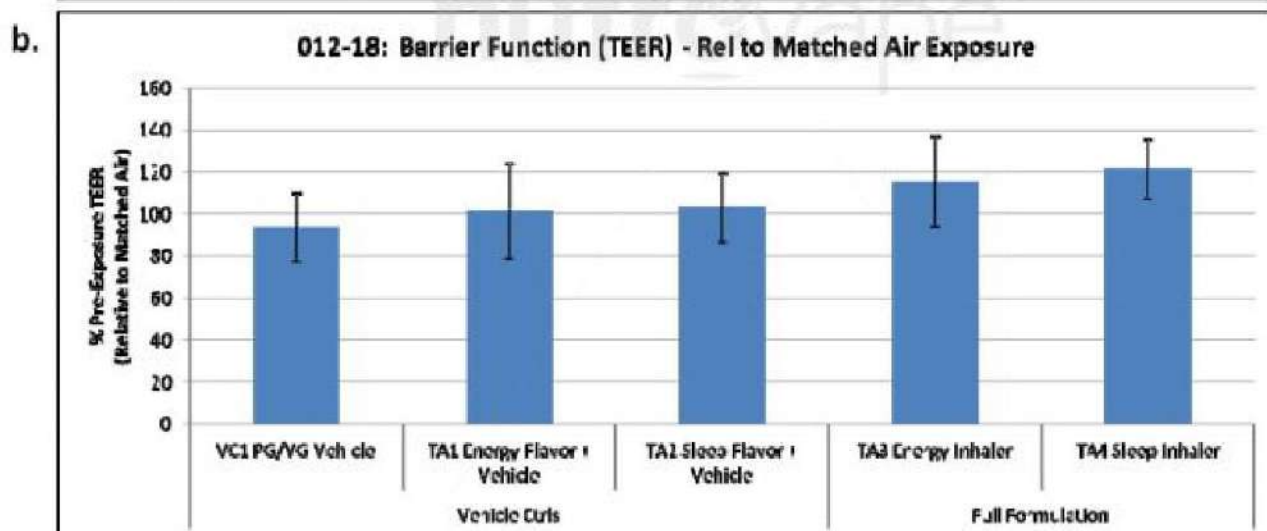
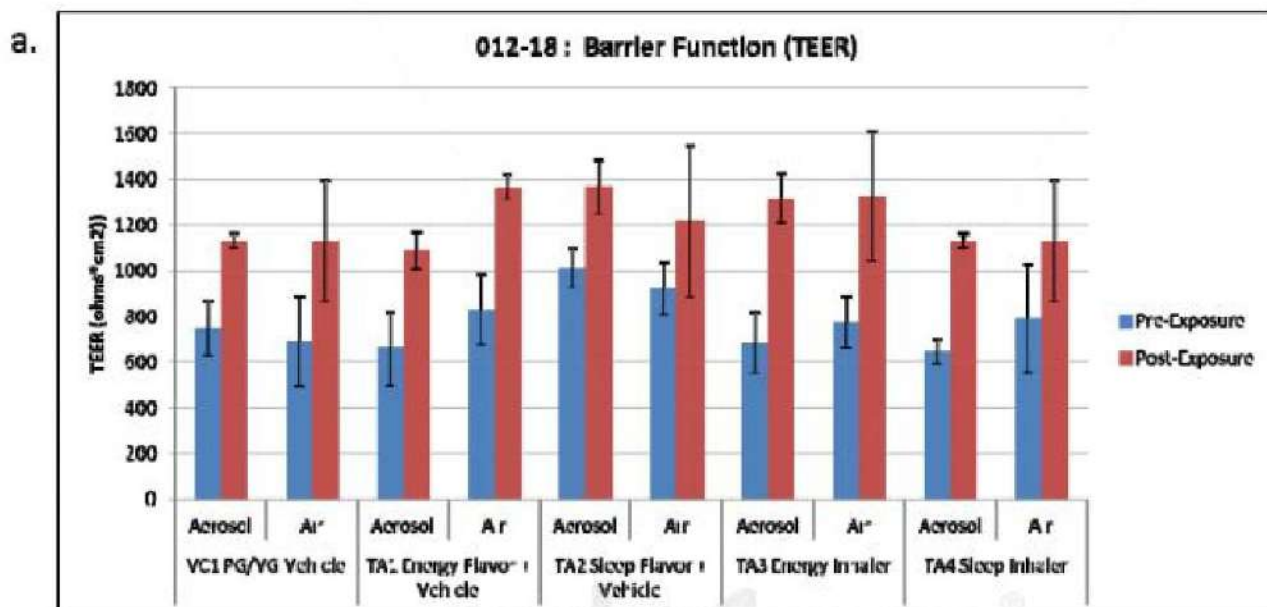
Жизнеспособность (ЛДГ)

|  |  |
|--|--|
| % Viability  | % жизнеспособности   |
| VC1 PG/VG Vehicle                                  | КР1 Растворитель PG/VG   |
| TA1 Energy Flavor Vehicle                          | ИП1 Energy растворитель + ароматизатор   |
| TA2 Sleep Flavor Vehicle                           | ИП2 Sleep растворитель + ароматизатор  |
| Vehicle Ctrls                                      | Контрольные растворители   |
| TA3 Energy Inhaler                                 | ИП3 Испаритель Energy  |
| TA4 Sleep Inhaler                                  | ИП4 Испаритель Sleep   |
| Full Formulation                                   | Полный состав  |
| Aerosol  | Аэрозоль   |
| Air  | Воздух   |
|  |  |
| Viability (LDH) - Relative to Matched Air Exposure | Жизнеспособность (ЛДГ) – относительно аналогичной контрольной группы после воздействия воздуха |
| % Viability (Relative to Matched Air)              | % жизнеспособности (относительно аналогичной контрольной группы после воздействия воздуха)     |
| VC1 PG/VG Vehicle                                  | КР1 Растворитель PG/VG   |
| TA1 Energy Flavor Vehicle                          | ИП1 Energy ароматизатор + растворитель   |
| TA2 Sleep Flavor Vehicle                           | ИП2 Sleep ароматизатор + растворитель  |
| Vehicle Ctrls                                      | Контрольные растворители   |
| TA3 Energy Inhaler                                 | ИП3 Испаритель Energy  |
| TA4 Sleep Inhaler                                  | ИП4 Испаритель Sleep   |
| Full Formulation                                   | Полный состав  |

**Рисунок 4. Жизнеспособность тканей по результатам ЛДГ-теста.** Жизнеспособность тканей после воздействия аэрозоли исследуемых препаратов или воздуха в аналогичной контрольной группе оценивалась при помощи ЛДГ (а.) Жизнеспособность тканей, рассчитанная относительно необработанных контрольных тканей после инкубации (положительный контроль жизнеспособности) и контрольных тканей, обработанных тритоном X-100 (гибель клеток), оставалась выше 90% после воздействия всех исследуемых препаратов и воздействия воздуха. (b.) Жизнеспособность тканей после воздействия исследуемых препаратов была выражена относительно тканей аналогичной контрольной группы, подвергнутых воздействию воздуха. Жизнеспособность тканей после воздействия исследуемых препаратов оставалась равна ~100% от тканей аналогичной контрольной группы, подвергнутых воздействию воздуха. Показана средняя жизнеспособность  $\pm$  ст. откл. (n = 3).

**6с. Барьерная функция тканей EpiAirway™ после воздействия исследуемых препаратов, определенная по TEER.**

Барьерная функция после воздействия аэрозоли исследуемого препарата, воздуха или контрольной обработки оценивалась по TEER. У всех тканей до воздействия значения TEER составляли  $>300 \text{ ом} \cdot \text{см}^2$ , что свидетельствует об интактном эпителиальном барьере. После воздействия тритона (положительный контроль на гибель клеток) барьерная функция полностью утрачивалась (значения TEER  $<1\%$  от значений до воздействия,  $\leq 3,4 \text{ ом} \cdot \text{см}^2$ ). У необработанных контрольных тканей после инкубации барьерная функция сохранялась, TEER составляло  $>300 \text{ ом} \cdot \text{см}^2$ . Аналогично у всех тканей после воздействия воздуха и исследуемых препаратов барьерная функция сохранялась (значения TEER  $>300 \text{ ом} \cdot \text{см}^2$ ) (**Рисунок 5а**). Барьерная функция тканей, подвергнутых воздействию аэрозоли исследуемых препаратов, и тканей, подвергнутых воздействию контрольного воздуха, не различалась, что дает основания предполагать, что исследуемые препараты не влияли на барьерную функцию тканей (**Рисунок 5б**).



|                             |  |
|-----------------------------|--|
| Barrier Function (TEER)     | Барьерная функция (TEER)               |
| TEER (ohm*cm <sup>2</sup> ) | TEER (ом*см <sup>2</sup> )             |
| VC1 PG/VG Vehicle           | КР1 Растворитель PG/VG                 |
| TA1 Energy Flavor Vehicle   | ИП1 Energy ароматизатор + растворитель |

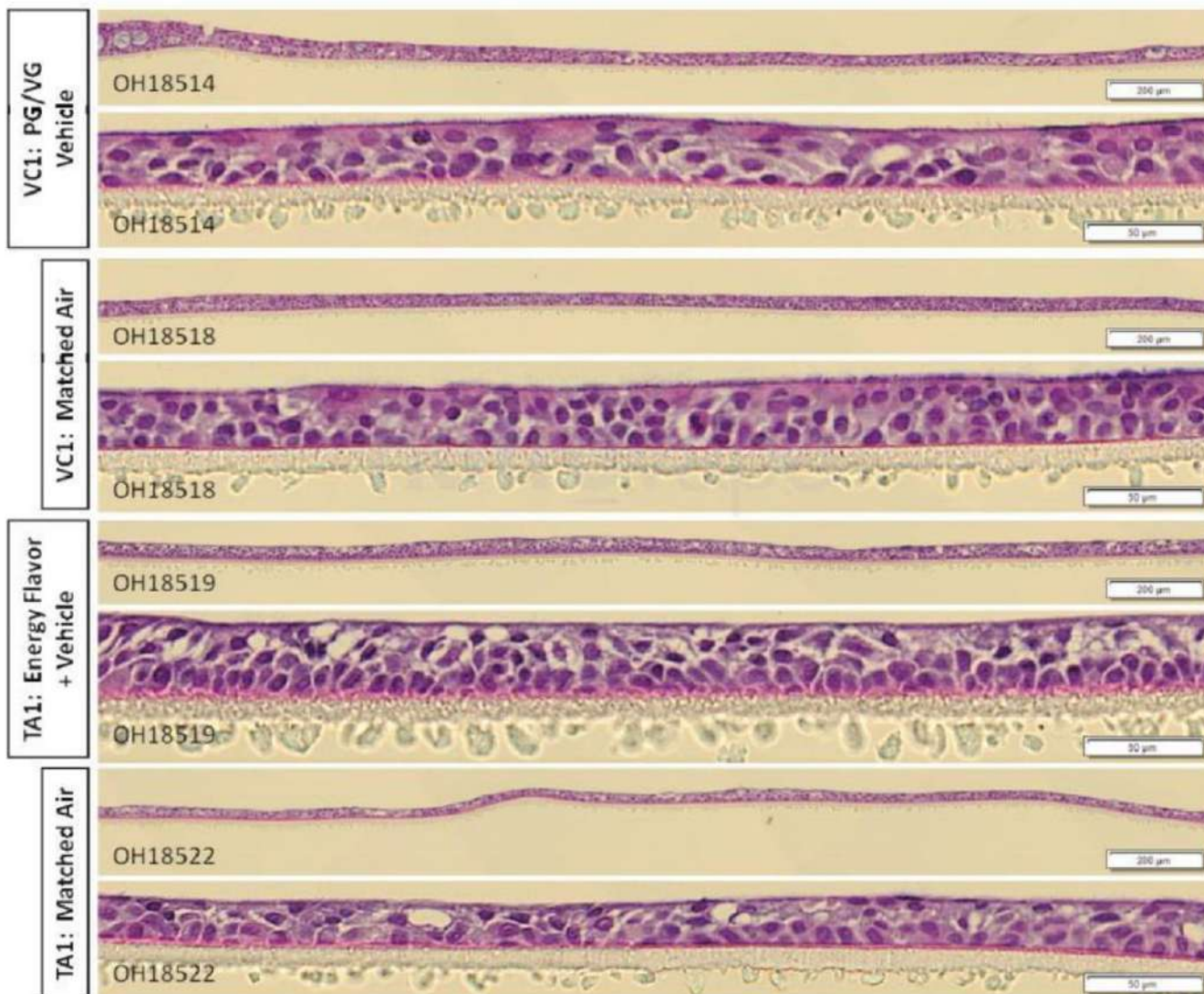
|  |  |
|--|--|
| TA2 Sleep Flavor Vehicle                                   | ИП2 Sleep ароматизатор + растворитель  |
| TA3 Energy Inhaler   | ИП3 Испаритель Energy  |
| TA4 Sleep Inhaler  | ИП4 Испаритель Sleep   |
| Aerosol  | Аэрозоль   |
| Air  | Воздух   |
| Pre-Exposure   | До воздействия   |
| Post-Exposure  | После воздействия  |
| Barrier Function (TEER) - Relative to Matched Air Exposure | Барьерная функция (TEER) - относительно аналогичной контрольной группы после воздействия воздуха |
| % Pre-exposure TEER (Relative to Matched Air)              | % от TEER до воздействия (относительно аналогичной контрольной группы после воздействия воздуха) |
| VC1 PG/VG Vehicle  | КР1 Растворитель PG/VG   |
| TA1 Energy Flavor Vehicle                                  | ИП1 Energy ароматизатор + растворитель   |
| TA2 Sleep Flavor Vehicle                                   | ИП2 Sleep ароматизатор + растворитель  |
| Vehicle Ctrls  | Контрольные растворители   |
| TA3 Energy Inhaler   | ИП3 Испаритель Energy  |
| TA4 Sleep Inhaler  | ИП4 Испаритель Sleep   |
| Full Formulation   | Полный состав  |

**Рисунок 5. Барьерная функция обработанных контрольных тканей, определенная по TEER.** Барьерная функция после воздействия определялась по TEER. (а.) Показаны средние абсолютные значения TEER  $\pm$  ст. откл., выраженные в  $\text{ом} \cdot \text{см}^2$  ( $n = 3$ ). До воздействия у всех тканей TEER составляло  $\geq 300 \text{ ом} \cdot \text{см}^2$ , что свидетельствует об интактном эпителиальном барьере. После воздействия все значения TEER были  $\geq 300 \text{ ом} \cdot \text{см}^2$ , что говорит об отсутствии нарушения барьерной функции тканей при обработке всеми препаратами. (б.) % от значения TEER до воздействия, выраженный относительно значений аналогичной контрольной группы после воздействия воздуха показывает, что TEER было сходным в группах после воздействия различных веществ. Показаны средние значения  $\pm$  ст. откл. ( $n = 3$ ).

**6d. Влияние исследуемых препаратов на морфологию тканей EpiAirway™ по результатам гистологического исследования.**

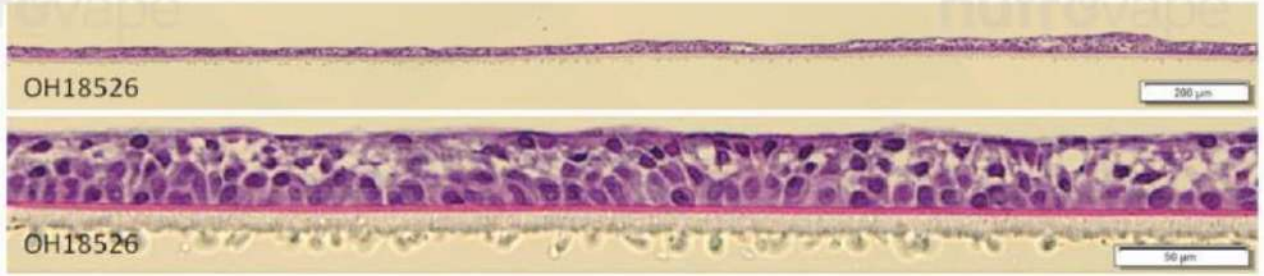
Через 24 часа все ткани были фиксированы в формалине, залиты в парафин, были получены срезы и окрашены гематоксилин-эозином для оценки общей морфологии тканей. Необработанные контрольные ткани после инкубации, контрольные ткани после воздействия воздуха и ткани после воздействия исследуемых препаратов имели сравнимую морфологию, характерную для здорового многорядного дыхательного эпителия (**Рисунок 6**). Повреждения или патологии тканей выявлено не было. Обработанные тритоном ткани

отрицательного контроля были почти полностью разрушены: на мембране вставки сохранялось лишь несколько клеток.

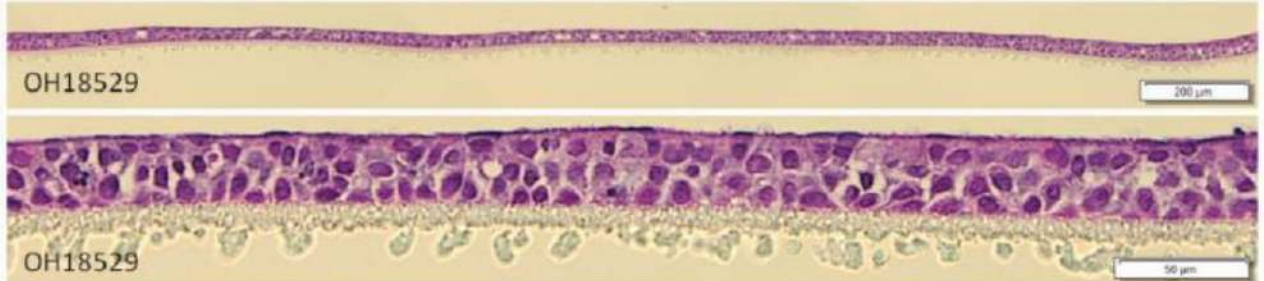




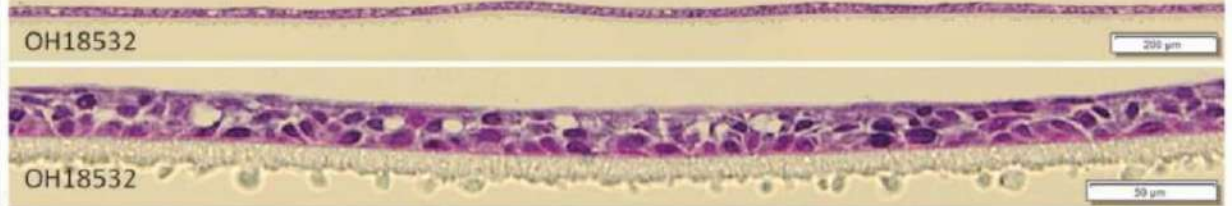
TA2: Sleep Flavor  
+ Vehicle



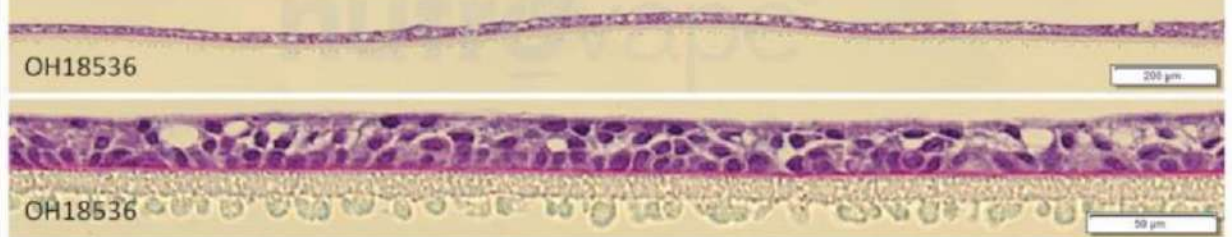
TA2: Matched Air

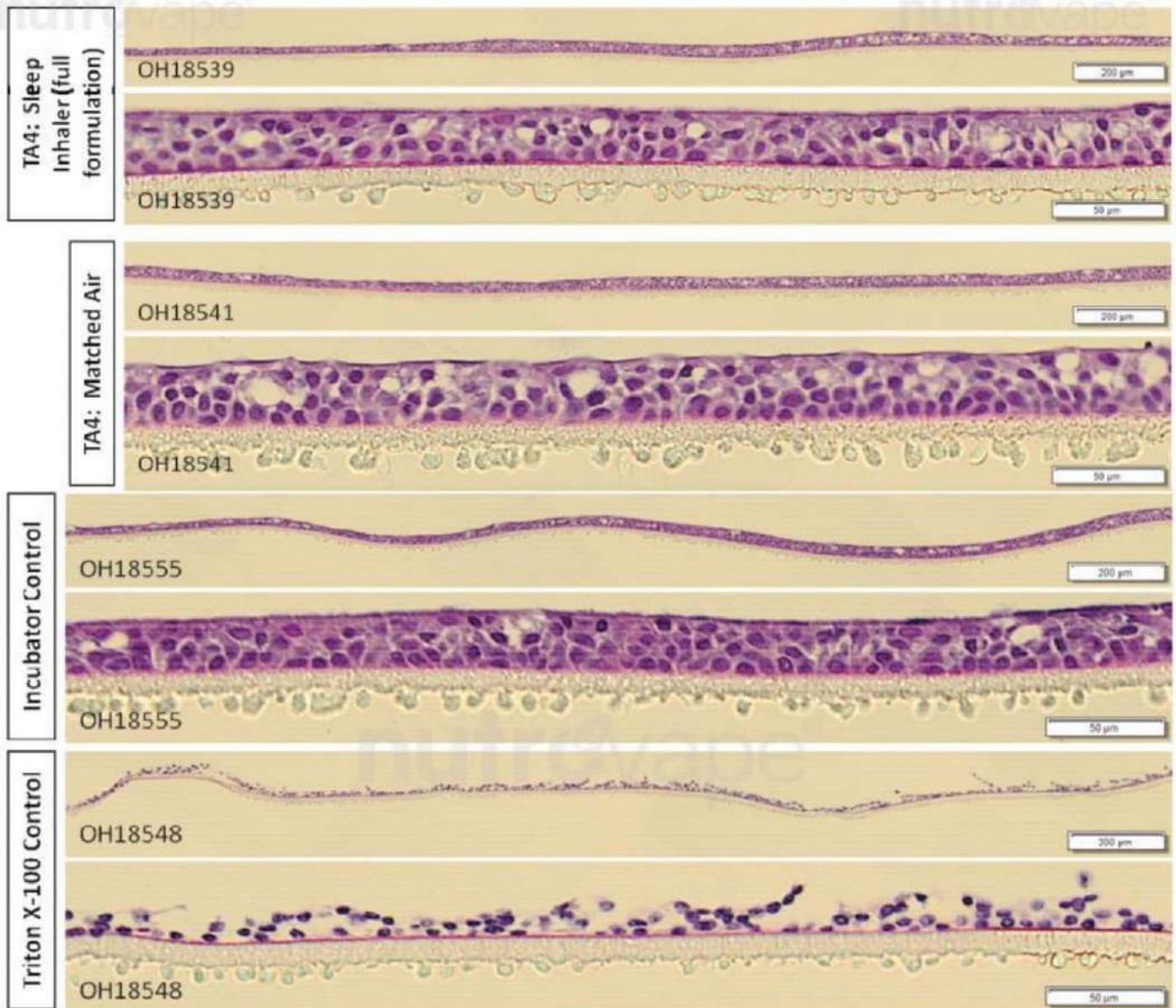


TA3: Energy  
Inhaler (full  
formulation)



TA3: Matched Air





|  |  |
|--|--|
| VC1: PG/VG Vehicle                     | КР1: Растворитель PG/VG                |
| VC1: Matched Air                       | КР1: аналогичный контроль с воздухом   |
| TA1: Energy Flavor + Vehicle           | ИП1 Energy ароматизатор + растворитель |
| TA1: Matched Air                       | ИП1: аналогичный контроль с воздухом   |
| TA2: Sleep Flavor + Vehicle            | ИП2 Sleep ароматизатор + растворитель  |
| TA2: Matched Air                       | ИП2: аналогичный контроль с воздухом   |
| TA3: Energy Inhaler (full formulation) | ИП3: испаритель Energy (полный состав) |
| TA3: Matched Air                       | ИП3: аналогичный контроль с воздухом   |
| TA4: Sleep Inhaler (full formulation)  | ИП4: испаритель Sleep (полный состав)  |
| TA4: Matched Air                       | ИП4: аналогичный контроль с воздухом   |
| Incubator Control                      | Контроль после инкубации               |
| Triton X-100 Control                   | Контроль с тритоном X-100              |

**Рисунок 6. Морфология тканей EpiAirway™ через 24 часа после воздействия.** Морфология тканей оценивалась по окрашенным гематоксилин-эозином срезам тканей (n = 3). Показано по одному представительному изображению тканей после каждого вида обработки с малым и большим увеличением. На изображениях приведен идентификационный номер микропрепарата.

## 7. Вывод

В рамках настоящего исследования была проведена оценка воздействия испарителя Nutriair Energy и испарителя Nutriair Sleep, а также воздействия аэрозолей контрольных растворителей (чистый PG/VG 50:50, Energy растворитель + ароматизатор и Sleep растворитель + ароматизатор) на жизнеспособность, барьерную функцию эпителия и архитектуру тканей EpiAirway. На жизнеспособность тканей, определенную при помощи ЛДГ-теста, не оказало отрицательного влияния воздействие исследуемых препаратов в полном составе и контрольных растворителей исследуемых препаратов при сравнении с воздействием воздуха на аналогичную контрольную группу, что свидетельствует об отсутствии цитотоксического воздействия исследуемых препаратов в исследуемых дозировках на ткани EpiAirway. Этот результат был далее подкреплен оценкой целостности эпителиальных плотных контактов путем измерения TEER. TEER показало, что все ткани сохраняли барьерную функцию после воздействия исследуемых препаратов. Наконец, поперечные срезы тканей, окрашенные гематоксилин – эозином, показали, что структура тканей и дифференциация были сходны в необработанных тканях и тканях, подвергнутых воздействию воздуха, аэрозоли контрольных растворителей и аэрозоли исследуемых препаратов в полном составе. Возможно проведение последующих испытаний для подтверждения и дальнейшего расширения этих результатов. Например, можно исследовать дополнительные конечные критерии оценки результатов, такие как изменения экспрессии генов или маркеры окислительного стресса, или оценивать более высокие дозировки для подтверждения отсутствия токсичности при чрезвычайном воздействии. Кондиционированные среды культур клеток были собраны и сохранены для возможного последующего анализа секреции цитокинов после воздействия исследуемых препаратов. В заключение стоит отметить, что воздействие испарителя Nutriair Energy и испарителя Nutriair Sleep не нарушало жизнеспособность тканей EpiAirway, их барьерную функцию или морфологию в условиях, исследованных нами. Ткани EpiAirway™ являются ценным инструментом *in vitro* для проведения скрининговых исследований и оценки воздействия аэрозольных продуктов на ткани дыхательного эпителия человека на границе воздушной и жидкой сред.