



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

**Corso di Laurea
SCIENZE BIOLOGICHE**

**SIGARETTE ELETTRONICHE E INVECCHIAMENTO POLMONARE:
UNO STUDIO SPERIMENTALE SUGLI EFFETTI DI UN E-LIQUID
AROMATIZZATO SUI FIBROBLASTI POLMONARI**

**ELECTRONIC CIGARETTES AND PULMONARY AGING: AN
EXPERIMENTAL STUDY ON THE EFFECTS OF A FLAVORED
E-LIQUID ON PULMONARY FIBROBLASTS**

Tesi di Laurea di:
di:

BIAGIOTTI ALICE

Docente Referente
Chiar.mo Prof.

GIOACCHINI GIORGIA

Sessione AUTUNNALE

Anno Accademico 2023-2024

Sigarette elettroniche (e-cig)

- Elevata popolarità nei Paesi occidentali, soprattutto tra gli adolescenti.
- Dispositivi che generano aerosol da liquidi di ricarica (e-liquid) contenenti nicotina e composti aromatizzanti, solubilizzati in un umettante come il glicole propilenico (PG) o la glicerina vegetale (VG).
- Inizialmente commercializzate come un'alternativa più sicura rispetto alle sigarette tradizionali, sono la **causa dell'aumento della dipendenza da nicotina tra i giovani.**



SIGARETTA TRADIZIONALE



SIGARETTA ELETTRONICA



Invecchiamento

Progressivo deterioramento delle funzioni fisiologiche nel tempo, accompagnato da:

Infiammazione

Processi di riparazione disregolati

Senescenza



Tabagismo

Abitudine o dipendenza dal fumo di tabacco

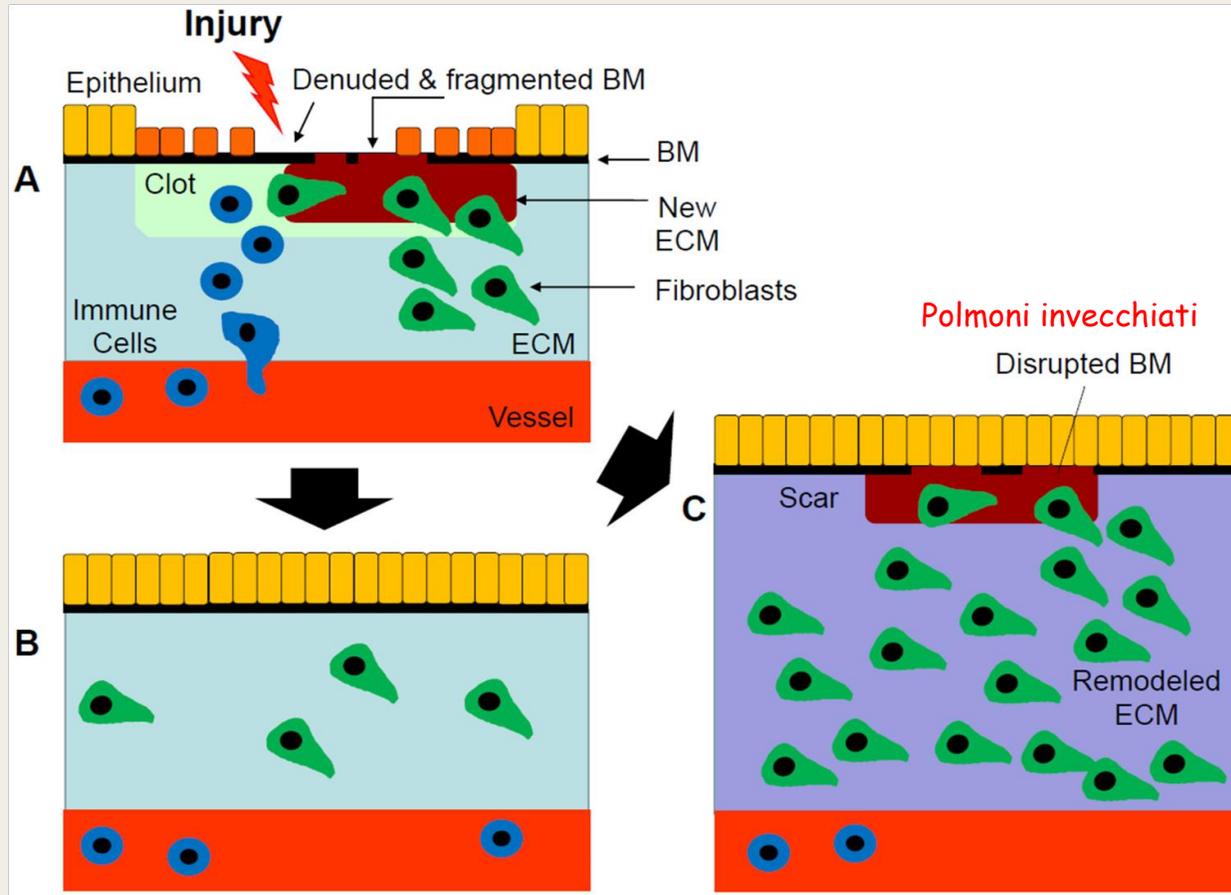
Infiammazione

Senescenza precoce dell'apparato respiratorio

Invecchiamento polmonare



Processi di riparazione tissutale disregolati



Fibrosi polmonare

Perdita di funzione



Obiettivo dello studio



Valutazione degli effetti di un e-liquid disponibile in commercio, una **miscela di aromi di cocco, biscotto e vaniglia** contenente nicotina, sull'infiammazione e sulla senescenza dei **fibroblasti polmonari**

Ipotesi: l'esposizione all'e-liquid inibisce l'attivazione dei fibroblasti in miofibroblasti indotta dal TGF- β 1



E - LIQUID

Miscela 50/50 di glicole propilenico (PG) e glicerina vegetale (VG)

Nicotina (3 mg/ml)

Aromi di **tabacco**, **cocco**, **biscotto** e **vaniglia**



Metodi

GASCROMATOGRAFIA
e SPETTROMETRIA DI MASSA



Caratterizzazione dei **composti chimici** presenti nell'e-liquid

Risultati

Principali **costituenti aromatizzanti** dell'e-liquid:

Pirazine

Vanillina

Furanoni



Noti **irritanti polmonari!!!**



FIBROBLASTI POLMONARI UMANI (HFL-1)

Coltivazione in terreno *Dulbecco's Modified Eagle's medium* (DMEM)
all'interno di flaconi T75



Trattamento con e-liquid per valutarne
gli effetti su:

VITALITÀ
CELLULARE

INFIAMMAZIONE

SENESCENZA
CELLULARE

ATTIVAZIONE IN
MIOFIBROBLASTI
INDOTTA DAL TGF- β 1

Gruppi sperimentali



**TNF- α
positivo**

**Vitalità
Infiammazione
Senescenza**



24h
Vitalità
Infiammazione



72h
Senescenza

**Controllo
negativo**

**PG/VG
(50:50)**

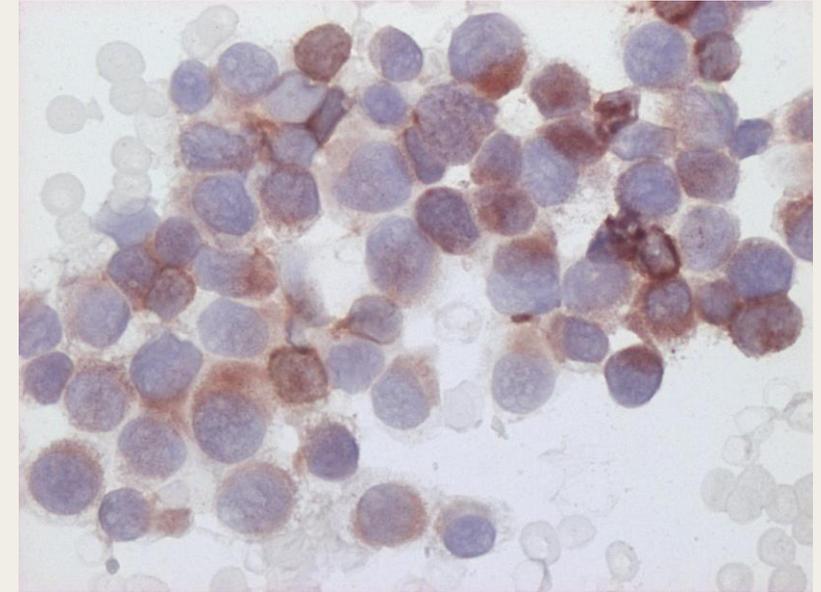
Nicotina

E-liquid

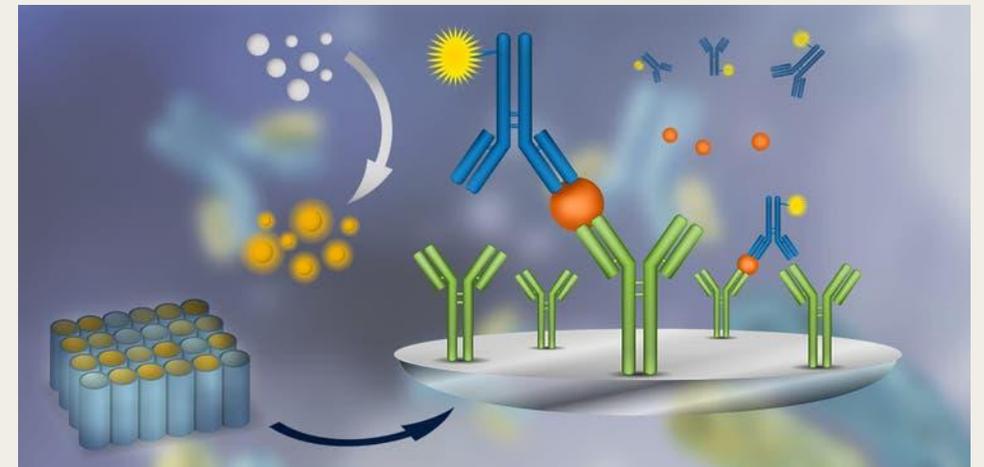
**0,1% v/v
0,25% v/v
0,5% v/v
1% v/v**

Metodi

- Vitalità

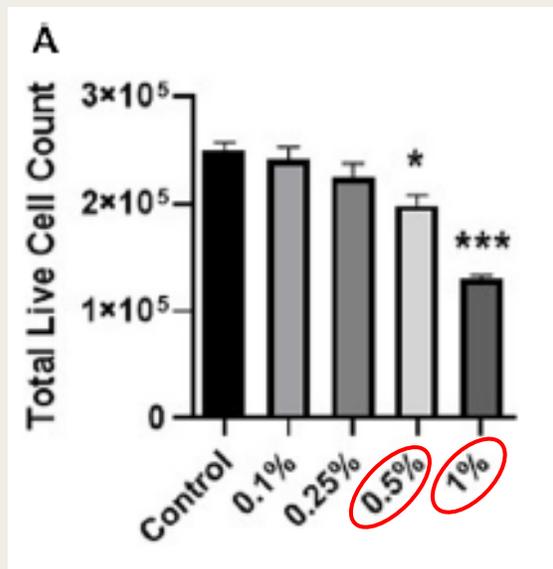


- Infiammazione

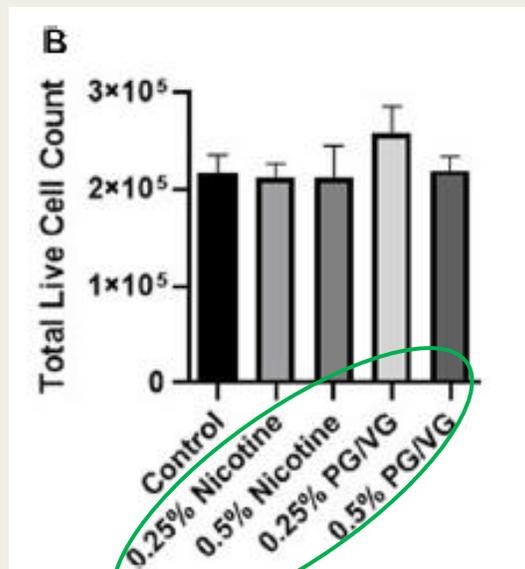


Risultati

• Vitalità

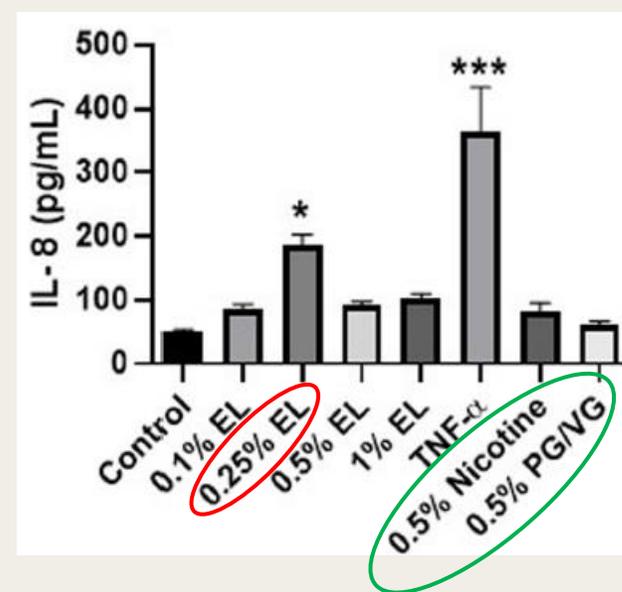


0,5% e 1% EL:
citotossicità
significativa (1% >
0,5%)



0,25% e 0,5% nicotina o
PG/VG: alcuna
citotossicità

• Infiammazione



0,25% EL: aumento
significativo del rilascio
di IL-8 rispetto al
controllo

0,5% nicotina o PG/VG:
alcun cambiamento nel
rilascio di IL-8 rispetto al
controllo

Infiammazione indotta dagli **aromi**
presenti nell'e-liquid

Dosi più alte di e-liquid sono citotossiche

Morte cellulare indotta dagli **aromi** presenti
nell'e-liquid

Metodi

- Senescenza

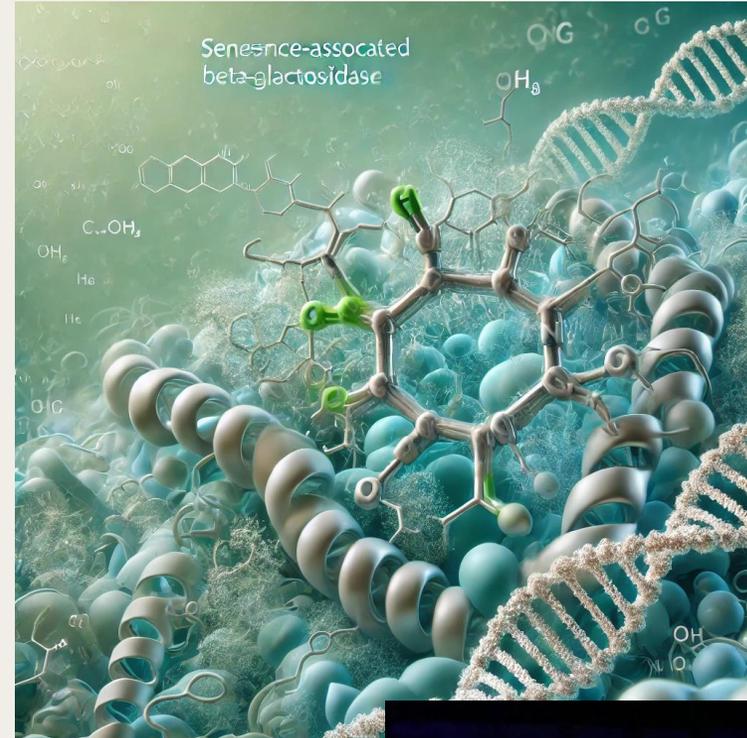
Misurazione dell'attività dell'enzima SA- β -gal



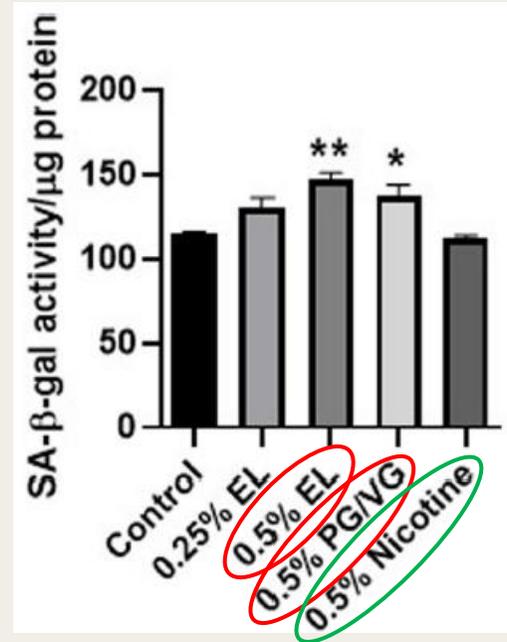
Conversione 4-MUG in 4-MU fluorescente



SPETTROFLUORIMETRIA



Risultati



0,5% EL o PG/VG:
aumento dell'attività di
SA-β-gal rispetto al
controllo

0,5% nicotina: alcun
effetto sull'attività di
SA-β-gal



Senescenza cellulare indotta sia da e-liquid sia da PG/VG
(**e-liquid > PG/VG**)

PG/VG induce senescenza ma non morte cellulare

Gruppi sperimentali



Attivazione in
miofibroblasti indotta
dal TGF- β 1

TGF- β 1: 5 ng/ml

E-liquid: 0,5% v/v



72h

Controllo
negativo

TGF- β 1
positivo

E-liquid

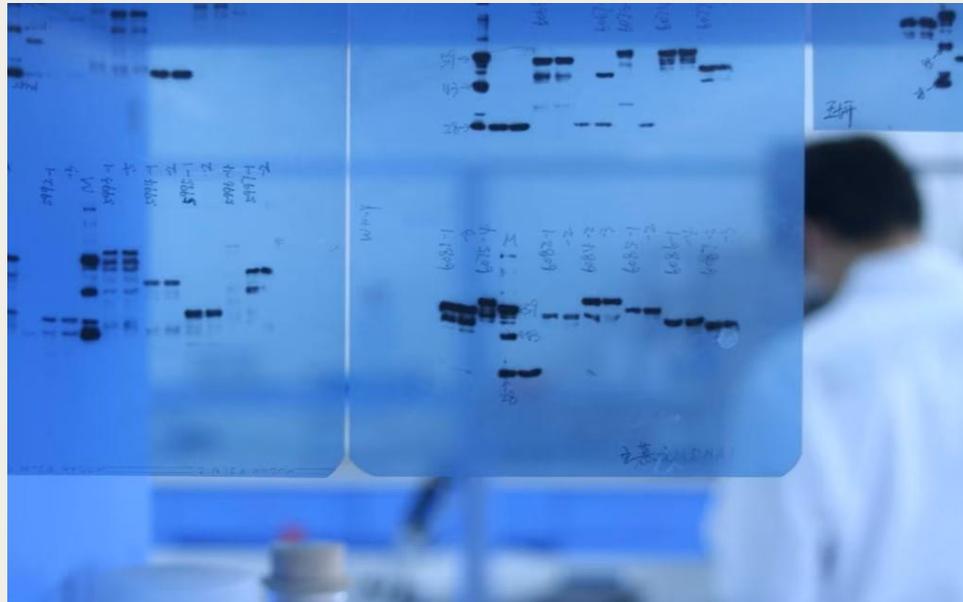
TGF- β 1 +
E-liquid

Metodi

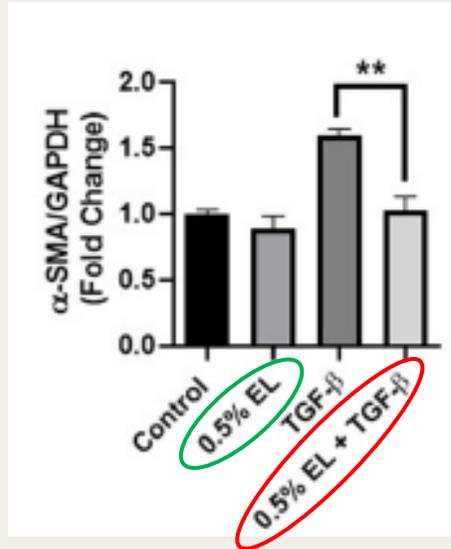
WESTERN
BLOT

Anticorpi specifici
contro:

- α -SMA
- Fibronectina
- Collagene di tipo I

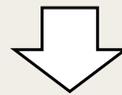


Risultati

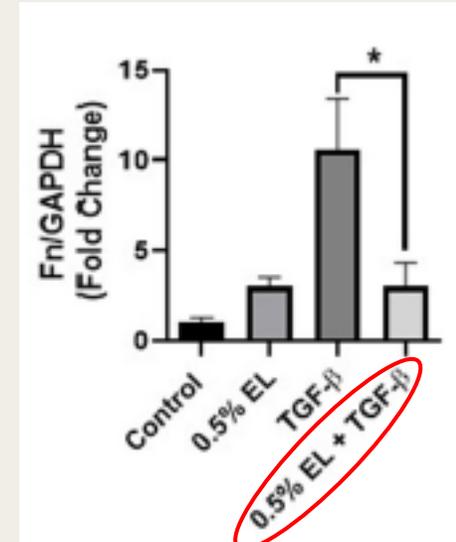


0,5% EL: alcuna alterazione dei livelli di α -SMA rispetto al controllo

0,5% EL + TGF- β 1: inibizione da parte di EL dell'attivazione dei fibroblasti indotta dal TGF- β 1



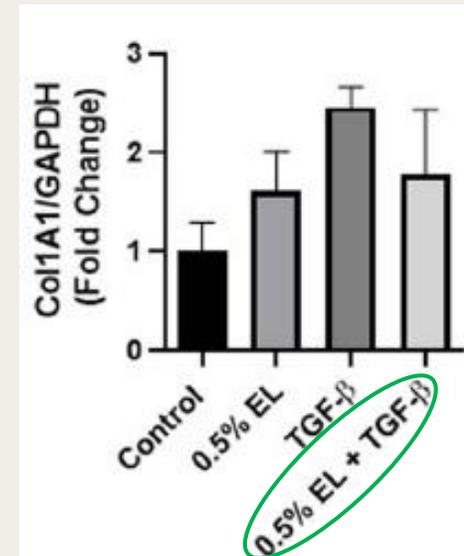
L'e-liquid può potenzialmente inibire le risposte alla guarigione delle ferite



0,5% EL + TGF- β 1: inibizione da parte di EL della fibronectina indotta dal TGF- β 1



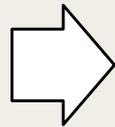
L'e-liquid inibisce l'effetto del TGF- β 1, riducendo i livelli di fibronectina



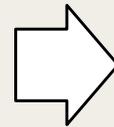
0,5% EL + TGF- β 1: alcun effetto significativo di EL sul collagene indotto dal TGF- β 1

CONCLUSIONI

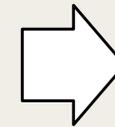
Esposizione agli e-liquid causa **conseguenze negative** sulla salute umana e può promuovere **cambiamenti nella funzione cellulare** associati all'invecchiamento



Effetti negativi sulla salute umana associati non solo a solvente base o nicotina, ma anche agli **aromi** contenuti negli e-liquid



Necessari **ulteriori studi** sugli effetti degli e-liquid sugli organi e sull'invecchiamento



Necessarie **nuove regolamentazioni** per le principali sostanze chimiche identificate negli aromi degli e-liquid

GRAZIE PER L'ATTENZIONE!

ABSTRACT

Electronic cigarette (e-cig) usage has risen dramatically worldwide over the past decade.

While they are touted as a safe alternative to cigarettes, recent studies indicate that high levels of nicotine and flavoring chemicals present in e-cigs may still cause adverse health effects. We hypothesized that an e-liquid containing a mixture of tobacco, coconut, vanilla, and cookie flavors would induce senescence and disrupt wound healing processes in pulmonary fibroblasts. To test this hypothesis, we exposed pulmonary fibroblasts (HFL-1) to e-liquid at varying doses and assessed cytotoxicity, inflammation, senescence, and myofibroblast differentiation. We found that e-liquid exposure caused cytotoxicity, which was accompanied by an increase in IL-8 release in the conditioned media. E-liquid exposure resulted in elevated senescence-associated beta-galactosidase (SA-b-gal) activity. Transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) induced myofibroblast differentiation was inhibited by e-liquid exposure, resulting in decreased α -smooth muscle actin and fibronectin protein levels. Together, our data suggest that an e-liquid containing a mixture of flavors induces inflammation, senescence and dysregulated wound healing responses.

BIBLIOGRAFIA

- Lucas, Joseph H., Thivanka Muthumalage, Qixin Wang, Michelle R. Friedman, Alan E. Friedman, e Irfan Rahman. «E-Liquid Containing a Mixture of Coconut, Vanilla, and Cookie Flavors Causes Cellular Senescence and Dysregulated Repair in Pulmonary Fibroblasts: Implications on Premature Aging». *Frontiers in Physiology* 11 (4 settembre 2020): 924. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00924>.
- Roman, Jesse. «Fibroblasts—Warriors at the Intersection of Wound Healing and Disrepair». *Biomolecules* 13, fasc. 6 (6 giugno 2023): 945. <https://doi.org/10.3390/biom13060945>.