

Projet Clear Stream

Evaluation cytotoxique de la vapeur de cigarette électronique sur des 3T3 fibroblasts.

Examen des données et observations.

Mise à jour des données 3ème analyse du laboratoire

G. Romagna

Traduction par Absolut Vapor, www.absolut-vapor.com

Comme conséquence de la confirmation des phénomènes de cytotoxicité dans les résultats de la première phase de l'étude, nous avons décidé d'analyser et de réévaluer la pratique de collecte d'échantillons en vue de comprendre, isoler et supprimer les éventuels anomalies qui auraient pu déformer les résultats des tests. Après une évaluation minutieuse nous avons conclu que les conditions du premier test pouvaient sans doute exposer le système au risque de surchauffe, phénomène étant potentiellement capable d'engendrer la formation de composés toxiques ou irritants.

Dans le but de faire une standardisation méticuleuse des échantillons, il a été décidé de rédiger une nouvelle procédure pour la préparation des échantillons, en maintenant inchangés les paramètres de concentration dans le milieu de culture, de sorte d'assurer la comparabilité des tests.

Equipements et méthodes

Pour cette 3ème phase d'étude, nous avons décidé d'utiliser un modèle de cigarette électronique 510-T, avec cartouche XL ayant une capacité d'environ 0,6 ml. Tous les atomiseurs ont été soigneusement lavés avec de l'eau distillée dans un bain à ultrasons pendant 180 secondes. Chaque atomiseur a ensuite rempli avec une cartouche contenant du liquide sans saveur « Heaven Juice » à 9mg/ml puis il a été activé par un expert qui a vérifié son bon fonctionnement en mesurant la résistance électrique.

Tous les atomiseurs sélectionnés avaient une résistance ayant au maximum plus ou moins 0,1 Ohm par rapport à la moyenne. Chaque atomiseur a été utilisé pour tester seulement un seul échantillon. Une cartouche XL a été remplie avec 0,4 ml de liquide et inséré sur l'atomiseur. L'assemblage cartouche/atomiseur a ensuite été pesé, en notant son poids initial.

La cigarette électronique assemblée de cette manière a été reliée à un flacon contenant 20 ml de cellules de milieu de culture, en prenant soin que la cartouche soit plus élevée, en position semi-verticale.



Pendant l'essai, le poids de la cartouche/atomiseur a été contrôlé régulièrement. Le test a été interrompu au moment de l'obtention de 200 mg (environ 0,2 ml) de liquide réellement vaporisé.

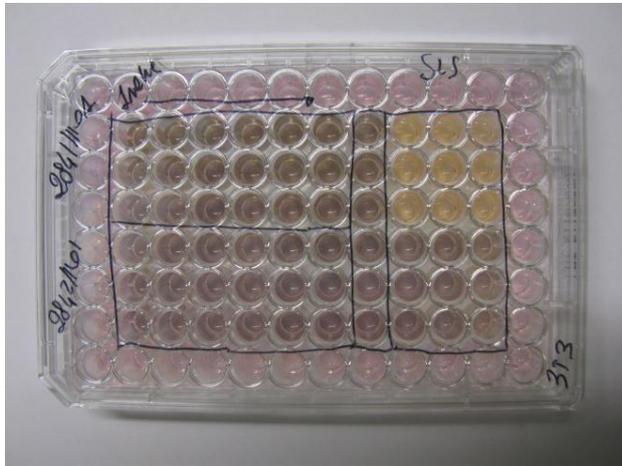
Ce volume dissous dans 20 ml de milieu de culture produit un sol contaminé par une quantité précise et bien connue de l'échantillon à un taux de 1%, en conformité avec la norme standard UNI EN ISO10993-5 sur les évaluations biologiques des dispositifs médicaux.

Dans le cas où la quantité vaporisée dépassait 200mg, nous avons fourni un milieu de culture supplémentaire en quantité appropriée afin de normaliser tous les échantillons à 1%.

Pendant les essais, la température d'atomisation a été contrôlée à l'extérieur avec une sonde adhésive. Au cours des expériences menées, aucune anomalie n'a été constatée concernant la température des atomiseurs.

Les échantillons recueillis ont ensuite été soumis à un test de cytotoxicité sur fibroblastes 3T3 avec MTT avec la même méthodologie que pour les échantillons précédents.

En plus du contrôle positif à la fumée de cigarette traditionnelle, nous avons inclus un contrôle interne avec SLS (sodium lauryl Sulfate), afin de mieux évaluer la réactivité de la ligne cellulaire.



Remarques sur la nouvelle procédure

Dans la précédente série de tests, certaines critiques ont été signalées en raison des différents aspects de la préparation et de la collecte des échantillons. Soupçonnant que ces situations critiques pourraient biaiser les résultats des tests, nous avons décidé de rénover la partie initiale de la procédure, à la lumière de certaines considérations sur le fonctionnement de l'appareil.

Dans la première phase de l'étude, nous avons utilisé une cigarette électronique 510 standard avec batterie automatique, et des cartouches remplies avec 0,3 ml de liquide et effectuant 120 bouffées, afin de totalement vaporiser le liquide contenu dans la cartouche. L'objectif était en effet de vaporiser 0,3 ml dans 30 ml de milieu de culture contenu dans le ballon. Puis, les bouffées avaient été faites en excès, juste pour être sûr que tout le liquide dans la cartouche avait été vaporisé.

Dans cette troisième phase, nous avons décidé d'utiliser une cigarette électronique 510 T, ayant un réservoir transparent qui permet d'estimer la consommation de liquide. Par ailleurs, nous avons modifié la logique de la collecte de l'échantillon, car il est peu judicieux de se référer à un nombre de bouffées alors que la quantité de liquide vaporisé pour chaque bouffée est différente de chaque appareil et pour chaque personne.

Ainsi, nous avons décidé d'orienter notre attention vers le volume de liquide vaporisé, de sorte que nous pourrions avoir une référence précise, corrélée avec quelque chose de mesurable et indépendante de tout dispositif utilisé.

Pour ce faire, la nouvelle procédure s'appuie sur la variation de poids de l'assemblage cartouche/atomiseur, afin de constater la quantité de liquide vaporisé, ajustant les bouffées jusqu'à atteindre le volume désiré de liquide.

Cette astuce simple nous permet d'être sûrs que l'échantillon vaporisé, est en quantité suffisante pour nos besoins et en particulier est la preuve indirecte que notre dispositif fonctionne correctement.

En effet, une anomalie d'alimentation serait facilement détectée à cause de la réduction de la consommation de liquide. Il est important de souligner que même si la quantité de liquide vaporisé dans cette troisième série de tests session a été plus faible (0,2 ml, contre 0,3) le rapport de concentration entre le liquide et la milieu de culture est inchangée (0,2 ml/20 ml = 0,3 ml/30ml), soit 1% de concentration des contaminants.

Cela nous a permis de comparer les résultats de ce test avec les précédentes. La durée des aspirations, ainsi que leur nombre, ont été obtenus grâce à une simulation préliminaire, tandis que la pause entre les bouffées a été ajustée en fonction de la quantité de vapeur dans le ballon, de sorte que la vapeur soit complètement dispersée dans le milieu de culture avant l'aspiration suivante

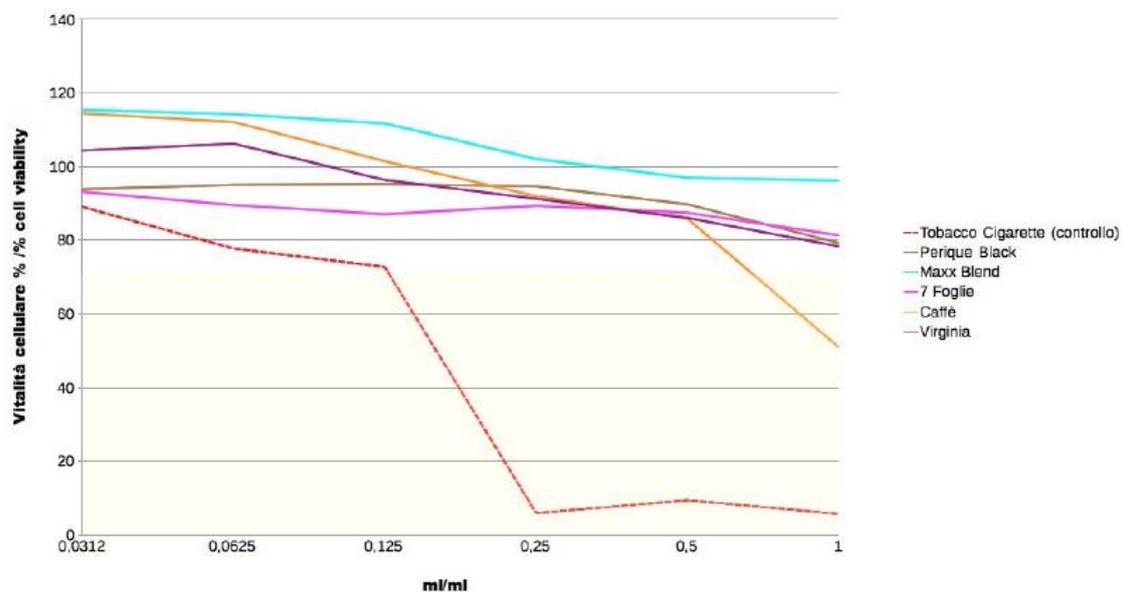
Avec ce système la pause optimale entre une bouffée et la prochaine a été de 60 secondes. Pendant une simulation préliminaire, nous avons pu observer que lorsque l'appareil est en manque de liquide la température dans la coque extérieure atteint 70 °C après seulement 3 aspirations bouffées. Au contraire, lorsque le liquide est présent, aucune variation de température significative n'est observée.

Résultats

Dans cette troisième phase, nous avons à nouveau testé les 5 mêmes échantillons qui apparaissaient cytotoxique lors de la première phase

Avec cette nouvelle procédure, un seul des cinq échantillons (arôme de café) a montré une légère cytotoxicité, alors que tous les autres n'ont pas été cytotoxiques.

La comparaison avec la toxicité aiguë de la fumée de cigarette traditionnelle est désormais encore plus évidente.



Le graphique montre le degré de vitalité cellulaire sur l'axe y calculée en utilisant un groupe de référence de cellules non traitées, tandis que sur l'axe des x, nous pouvons trouver le niveau de dilution du sol contaminé utilisé pour le test. La gamme de dilution se situe entre 1 / 32(0,0312) et 1 (100% des sols contaminés)

Vitalità/Diluizione	0,0312	0,0625	0,125	0,25	0,5	1	IC50
Tobacco Cigarette (controllo)	89,1	77,8	72,8	5,9	9,4		5,7/0,16 ml/ml
Perique Black	93,9	95,1	95,3	94,7	89,8		79,3nd
Maxx Blend	115,5	114,3	111,8	102,1	97		96,2nd
7 Foglie	93,2	89,6	87,1	89,4	87,5		81,4nd
Caffè	114,5	112,2	101,5	92	85,9		51nd
Virginia	104,4	106,3	96,4	91,3	86,1		78,4nd

Ces résultats confirment l'hypothèse présentée dans la première phase de test: qui ont conduit à la réévaluation de la préparation des échantillons et la procédure de collecte et soulignent le fait que, en cas de faible approvisionnement de liquide ou de surchauffe, il est plausible de supposer la production de composés toxiques et irritants.