

Vpliv tekočin za elektronske cigarete na neparenhimske jetrne celice

Raziskovalna naloga

Raziskovalno področje: ZDRAVSTVO

Avtorja: Zala Smeh, Eva Lubej

II. gimnazija Maribor

Mentorica: Katja Holnhaner Zorec

Somentor: dr. Eneko Jose Madorran Esteiro

KAZALO VSEBINE

POVZETEK	V
ABSTRACT	VI
ZAHVALA	VII
1 UVOD	1
2 RAZISKOVALNA VPRAŠANJA IN HIPOTEZE	3
3 TEORETIČNI DEL	5
3.1 Elektronske cigarete	5
3.1.1 Zgradba in delovanje e-cigarete	5
3.1.2 Tipi e-cigaret	7
3.2 E-tekočine	8
3.2.1 Propilen glikol	8
3.2.2 Rastlinski glicerin	9
3.2.3 Nikotin	10
3.2.4 Arome	11
3.2.5 Mentol	12
3.2.6 Tobak	13
3.2.7 Mlečna kislina	13
3.3 Domnevni zdravstveni učinki - posledice uporabe	14
3.4 Jetra	16
3.4.1 Kupfferjeve celice (makrofagi)	17
3.4.2 Zvezdaste celice (fibroblasti)	18
3.4.3 Jetrne sinusoidalne endotelne celice	18
3.5 Celične kulture	19
3.6 Fluorescenčna in absorbančna spektrometrija	20
3.7 Reaktivne kisikove spojine (ROS)	20

3.8	Mitohondrijska aktivnost (MTT)	21
4	LABORATORIJSKO DELO.....	22
4.1	Seznam opreme in materialov.....	22
4.1.1	Kemikalije.....	22
4.1.2	Celična kultura	22
4.1.3	Laboratorijski pribor in oprema	22
4.2	Potek dela.....	23
4.3	Priprava celic	24
4.4	Priprava koncentracij	24
4.5	Reaktivne kisikove spojine (ROS) protokol	25
4.6	Mitohondrijska aktivnost (MTT - Mitochondrial activity) protokol	25
4.7	Načrt eksperimentalnega dela	26
4.8	Metode anketirnaja.....	28
4.9	Obdelava podatkov	28
5	REZULTATI.....	29
5.1	Rezultati ankete.....	31
6	DISKUSIJA	35
6.1	Vrednotenje metode	38
7	ZAKLJUČEK	39
8	DRUŽBENA ODGOVORNOST	40
9	BIBLIOGRAFIJA.....	41
10	SLIKOVNI VIRI	48

KAZALO SLIKOVNEGA GRADIVA

Slika 1: Shematski prikaz sestave elektronske cigarete	6
Slika 2: Prikaz treh generacij elektronskih cigaret	7
Slika 3: Puff bar	8
Slika 4: Kemijska formula nikotina	11
Slika 5: Prikaz spojin v elektronskih cigaretah.....	12
Slika 6: Prikaz domnevnih vplivov uporabe e-cigaret na človeško telo.....	15
Slika 7: Anatomija jeter	16
Slika 8: Kupfferjeve celice Slika 9: Zvezdaste celice.....	17
Slika 10: Sinusoidalne jetrne celice	18
Slika 11: Neparenhimska jetrna celična kultura po 1 mesecu rasti	19
Slika 12: Potek dela, prikazan na organogramu	23
Shema 1: Shema razporeditve vodnjakov pri eksperimentalnem delu (lastni vir)	26
Tabela 1: Legenda sheme 1	27
Graf 1: Povprečne vrednosti merjenja reaktivnih kisikovih spojin (ROS) pri različnih koncentracijah propilen glikola, arome tobaka in mentola $\pm 1 SD$	29
Graf 2: Povprečne vrednosti merjenja mitohondrijske aktivnosti (MTT) pri različnih koncentracijah propilen glikola, arome tobaka in mentola $\pm 1 SD$	30
Graf 3: Informiranost mladih o EC	31
Graf 4: Mnenje mladostnikov o uporabi EC.....	32
Graf 5: Uporaba EC med mladimi	32
Graf 6: Primerjava škodljivosti	33

POVZETEK

Elektronska cigareta (e-cigareta) je na tržišču dokaj nov izdelek, v katerem baterija segreva posebno tekočino, ki se spremeni v aerosol, ki ga nato uporabnik vdihuje. Ker jih uporablja vedno več ljudi, smo se odločili raziskati razširjenost uporabe e-cigaret med mladimi in vpliv e-tekočin na človeške jetrne celice. Izvedli smo anketo med učenci in dijaki mariborskih in okoliških šol. Potencialni škodljivi vpliv e-tekočin (aromi tobaka in mentola ter propilen glikol) na neparenhimske jetrne celice smo preučevali z metodo DCHF-DA za merjenja prostih kisikovih radikalov (ROS) in mitohondrijsko aktivnostjo (MTT), metodo za določanje viabilnosti celic. Z obema metodama smo ugotovili trend povišanja vrednosti ROS in znižanja viabilnosti jetrnih celic in s tem potencialno citotoksičen vpliv arome mentola in propilen glikola pri koncentraciji, višji od 5 %. Zaradi tega priporočamo izvedbo nadalnjih raziskav na tem področju. Rezultati ankete kažejo, da je kar 39 % anketirancev že vsaj enkrat poskusilo uporabo e-cigaret, od tega je rednih uporabnikov 24 %. Zato so po našem mnenju potrebne dodatne aktivnosti za informiranje o potencialni škodljivosti teh izdelkov.

Ključne besede: skrb za zdravje, elektronske cigarete, tekočine za elektronske cigarete, jetra, neparenhimske jetrne celice, aerosol, arome

ABSTRACT

An electronic cigarette (e-cigarette) is a relatively new product on the market, in which a battery heats a special liquid, which is turned into aerosol, which is then inhaled by the user. Because more and more people are using them, we decided to investigate the prevalence of e-cigarette use among people and the impact of e-liquids on human liver cells. That is why we surveyed students and pupils from Maribor and its surrounding schools. Potential adverse effects of e-liquids (tobacco and menthol flavours and propylene glycol) on nonparenchymal liver cells were studied with the DCHF-DA method, for measuring free oxygen radicals (ROS) and Mitochondrial activity (MTT), a method for determining cell viability. Both methods showed a trend of increasing ROS and decreasing viability of liver cells and thus the potential cytotoxic effect of menthol aroma and propylene glycol in concentrations greater than 5%. We therefore recommend that further research be carried out in this area. According to the survey, 39% of respondents have tried smoking e-cigarettes at least once, of which 24% are regular users. This is why, in our opinion, additional activities are needed to raise awareness of the potential harmfulness of these products.

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujeva vsem, ki so pripomogli k nastanku raziskovalne naloge. Še posebej se zahvaljujeva mentorjem za vse usmeritve, spodbudo in pomoč, brez katere nama ne bi uspelo.

Zahvaljujeva se tudi Medicinski fakulteti Maribor, kjer sva opravljali praktični del naloge, za prostor in vso potrebno opremo.

1 UVOD

Vse več ljudi uporablja najrazličnejše elektronske cigarete (vape, puff itd.). Pogosta je tudi uporaba med mladimi, kar postaja skrb vzbujajoč problem. Elektronska cigareta (EC) se je prvič pojavila leta 2004, razvil jo je Hon Liku iz kitajske družbe Ruyan (McEwen & McRobbie, 2016). V Evropi se je prvič pojavila leta 2006, bolj dostopne pa so postale leta 2010. Od leta 2018 pa vse do danes so EC različnih vrst postale širše dostopne, zelo priljubljene ter so v večini primerov nadomestek klasičnih cigaret (Koprivnikar idr., 2020).

Pogosto jih ljudje razumejo kot nenevarne oz. telesu manj nevarne od navadnih cigaret, delno tudi zato, ker jih na ta način oglašujejo ponudniki. Razne spletnne strani in trgovine, ki prodajajo tovrstne izdelke, navajajo tudi razne članke, ki izpostavljajo večinoma prednosti uporabe e-cigaret. Primer: v eni izmed trgovin v Mariboru imajo pod rubriko študije in raziskave navedeno naslednje: *“Znanstveno soglasje podpira zamisel, da je vejpanje bistveno manj škodljivo kot kajenje, e-cigarete pa lahko celo igrajo ključno vlogo pri pomoči kadilcem pri opuščanju kajenja.”* (Q Vapehouse, 2023).

Aerosol elektronskih cigaret ni navadna vodna para ali ogret zrak, ampak vsebuje zdravju škodljive snovi. V aerosolu so poleg nikotina še propilen glikol, rastlinski glicerin, različne arome, rakotvorne snovi in težke kovine. Za vlažilce (propilen glikol in rastlinski glicerin) in arome še ni narejenih dovolj raziskav glede učinkov na zdravje pri dolgoročnem vdihavanju (NIJZ, 2023).

V primerjavi z navadnimi cigaretami so v aerosolu elektronskih cigaret škodljive snovi vsebovane v nižjih ravneh, vendar pa nižja raven izpostavljenosti ne pomeni znižanje tveganj za zdravje. Uporaba elektronskih cigaret je še posebej tvegana za mladostnike, saj so ti bolj dovetni za zasvojenost z nikotinom na dolgi rok. Hkrati pa lahko izpostavljenost nikotinu v času intenzivnega razvoja privede do trajnih škodljivih učinkov, kot so motnje pozornosti, spomina, razpoloženja, in do kognitivnih in psihiatričnih motenj (Goriounova & Mansvelder, 2012). Problem je tudi v tem, da vsebine tekočin za elektronske cigarete uradne institucije

(ECHA – Evropska agencija za kemikalije) nadzorujejo le občasno in še to le nekatere tržne znamke (NIJZ, 2023).

Raziskave kažejo, da so tudi določene arome citotoksične, genotoksične, ali pa imajo druge škodljive učinke na človeške celice (Welz idr., 2016). Prav tako arome, ki so varne pri zaužitju, ne pomenijo varnosti tudi pri vdihovanju (Clapp idr., 2019). Ob segrevanju tekočine lahko sestavine med seboj tudi reagirajo in tvorijo nove spojine, ki so lahko prav tako toksične (Jaegers idr., 2021). Elektronske cigarete (EC) hkrati ogrožajo naše okolje, saj večine sestavnih delov ni možno reciklirati. Mnogi izdelki in vložki s tekočinami so namenjeni enkratni uporabi, vsebujejo strupene snovi, baterije in težke kovine. Ob nepravilni reciklaži baterije velikokrat pride tudi do samovžiga. Proizvajalci potrošnikom večinoma ne dajejo informacij o primerinem shranjevanju in kasnejšem recikliranju. (NIJZ, 2023).

Namen naše raziskovalne naloge je bil ugotoviti, kako tekočine, ki se uporabljajo v elektronskih cigaretah, vplivajo na človeške neparenhimske jetrne celice. Dne 9. 11. 2023 je bil sprejet predlog o prenovljeni tobačni zakonodaji, ki predvideva prepoved vseh arom; v elektronskih cigaretah bosta dovoljeni le aromi mentola in tobaka, ki pa bosta strogo nadzorovani (T.K.B., 2023). Glede na ta predlog smo se odločili, da bomo preverjali le toksičnost teh dveh arom na neparenhimske celice človeških jeter.

Zanimala nas je tudi razširjenost uporabe elektronskih cigaret med mladimi, ki obiskujejo osnovno ali srednjo šolo v Mariboru in okolici.

2 RAZISKOVALNA VPRAŠANJA IN HIPOTEZE

Raziskovalna vprašanja:

R1: Kakšen je vpliv arome mentola in tobaka na sproščanje prostih kisikovih radikalov (ROS) in na viabilnost (MTT) neparenhimskej jetrnih celic?

R2: Kakšen je vpliv propilen glikola na sproščanje kisikovih radikalov (ROS) in viabilnost neparenhimskej jetrnih celic?

R3: Kolikšen delež učencev in dijakov mariborskih in okoliških šol je informiranih o pojmu elektronska cigareta in kakšna je razširjenost uporabe elektronske cigarete med anketiranimi?

Hipoteze:

H1: Izpostavljenost celic aromi tobaka in mentola v gojišču bo povišala vrednost reaktivnih kisikovih radikalov (ROS) in zmanjšala viabilnost (MTT) neparenhimskej jetrnih celic.

Predvidevamo, da bo ob izpostavljenosti aromam izmerjena vrednost ROS neparenhimskej jetrnih celic povišana. Prav tako se bo zmanjšala njihova viabilnost. V eni izmed študij so pri mentolu opazili zmanjšanje viabilnosti že po 90 minutah. Pri 24- in 48-urni izpostavljenosti pa ni bilo možno opaziti bistvenih razlik, ne glede na dodano koncentracijo (Rickard idr., 2021). V drugi študiji so ugotovili, da so arome sadja in sladic močnejši oksidanti kot aroma tobaka. Vrednosti ROS so bile zato pri aromi tobaka nižje kot pri preostalih sladkih oz. sadnih aromah (Lerner idr., 2015).

H2: Propilen glikol bo povzročil povišanje vrednosti ROS ter zmanjšanje viabilnosti neparenhimskej jetrnih celic.

V študiji, kjer so preverjali vpliv PG (propilen glikola) na jetrne celice (HepG2), so ugotovili, da ta v kombinaciji z aromami zmanjša viabilnost celic (Rickard idr., 2021). PG se v jetrih pretvori v mlečno kislino, ob prekomernem vnosu PG lahko pride do kislinskega neravnovesja, ki je povezano s povečano produkcijo mlečne kisline, kar pa lahko privede do jetrne acidoze (Bornhorst & Mbhughuni, 2019).

H3: Za pojem elektronske cigarete je slišalo že vsaj 70 % anketiranih. Kadarkoli v življenju je elektronsko cigareto uporabilo 30 % anketirancev.

V že narejeni raziskavi (Koprivnikar & Zupanič, 2018), kjer so sodelovale srednje šole iz cele Slovenije, je anketo rešilo 1215 dijakov, ki so obiskovali 2. letnik. Kar 88,1 % je za pojem elektronske cigarete že slišala, 37 % anketiranih je elektronske cigarete uporabilo kadarkoli v življenju. 12,3 % dijakov pa elektronsko cigareto uporablja vsak dan.

3 TEORETIČNI DEL

3.1 Elektronske cigarete

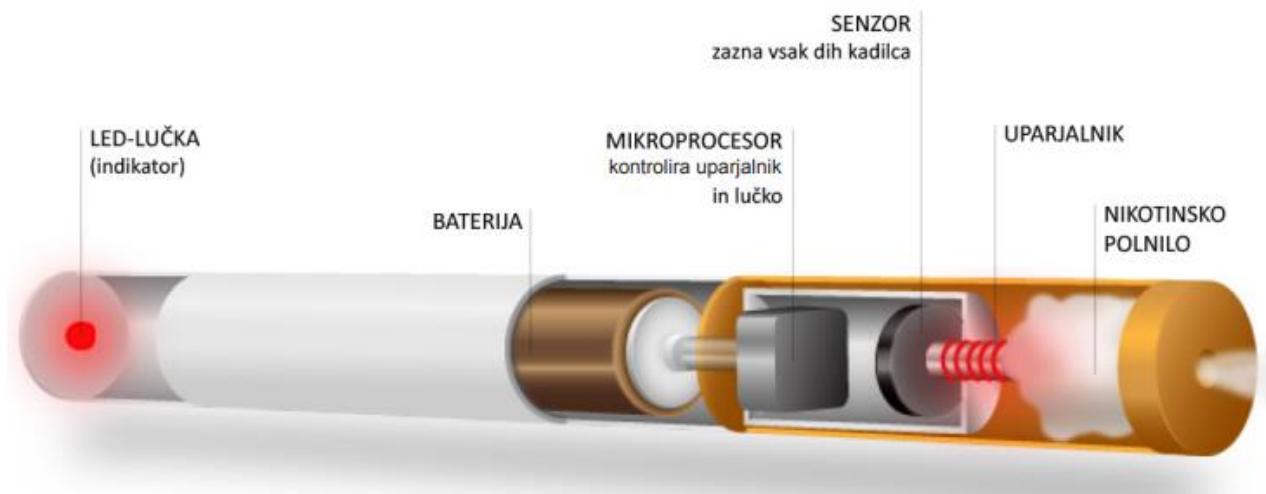
Elektronska cigareta je izdelek, v katerem baterija segreva posebno tekočino, da se spremeni v aerosol, ki ga nato uporabnik vdihuje. Aerosol je viden kot meglica, ki nastaja pri uporabi elektronske cigarete. Glavne sestavine tekočine za elektronske cigarete so nikotin, vlažilci oz. topila in arome. Osnovni namen elektronskih cigaret je, da uporabnik v telo dobi nikotin, na voljo pa so tudi tekočine brez nikotina, ki so namenjene predvsem vdihovanju aerosola z aromami. Uporaba elektronskih cigaret se imenuje vejpanje, uporabniki tovrstnih izdelkov pa so vejperji (Koprivnikar idr., 2018).

Elektronske cigarete ne vsebujejo tobaka in v njih ne poteka gorenje, temveč segrevanje. Uporablajo se tudi za vdihovanje različnih prepovedanih drog, najpogosteje kanabisa. E-cigarete so v prodaji že od leta 2006, popularnejše pa so postale leta 2010. Število tržnih znamk je že več let nekaj manj kot 500, močno pa je v zadnjih letih naraslo število arom, trenutno jih je na voljo približno 15.600 (Koprivnikar idr., 2018).

3.1.1 Zgradba in delovanje e-cigarete

Med posameznimi e-cigaretami obstajajo velike razlike v obliki, videzu in kompleksnosti, čeprav so na splošno sestavljeni iz podobnih komponent ter delujejo na podoben način.

Elektronske cigarete so sestavljene iz baterije, mikroprocesorja, senzorja, LED-lučke, uparjalnika in nikotinskega polnila.



Slika 1: Shematski prikaz sestave elektronske cigarete

[\(elektronske_cigaretete_podrobnejse_info_za_zdr_delavce.pdf \(nijz.si\)\)](http://elektronske_cigaretete_podrobnejse_info_za_zdr_delavce.pdf)

Tuljava, ki je del uparjalnika, segreva e-tekočino. Pri že narejenih raziskavah so ugotovljali temperaturni razpon tuljav pri nizki, standardni in visoki upornosti tuljave, pri napetosti 3 in 6 V ter v 3 različnih pogojih (suhih, polsuhih, mokrih). Pri suhih pogojih, kjer tuljava ni v stiku z e-tekočino, se lahko ta segreje od 322 do 1008 °C. Pri polsuhih pogojih, kjer e-tekočina kaplja na tuljavo oz. prši, so se temperature gibale od 145 do 334 °C. Pri mokrih pogojih je e-tekočina v neposrednem stiku s tuljavo, takrat pa so se temperature gibale od 110 do 185 °C. Iz prikazanih rezultatov je razvidno, da ima vlažnost tuljave pomemben vpliv na temperature segrevanja. Študije so pokazale, da lahko pregravanje zaradi toplotne razgradnje e-tekočin vodi do povečane izpostavljenosti strupenim spojinam. Poročali so o zaskrbljujočih rezultatih visokih emisij karbonilnih spojin, kot so formaldehid, acetaldehid in akrolein (Chen idr., 2018).

V drugi študiji so izmerili koncentracije 14 izbranih kovin v aerosolih (srebro, aluminij, arzen, baker, železo, magnezij, nikelj, cink, kadmij, kobalt, krom, mangan, svinec, antimon), ki so nastali pri različnih nastavitevah moči e-cigarette. Rezultati so pokazali, da so bile koncentracije Al, As, Cd, Cu, Fe, Mg, Ni, Pb in Zn prisotne v vseh vzorcih aerosolov, ne glede na moč. Sproščanje teh kovin se je postopoma povečalo s povečanjem moči e-cigarette (Ko & Ae, 2022). Tehnologija EC se seveda razvija, obstajajo namreč tudi naprave, ki imajo vgrajeno temperaturno kontrolo. Ta nadzira, da se tuljava ne segreje preveč (Pure E-liquids, 2021). Po pregledu slovenskih spletnih strani legalnih trgovin je te naprave možno dobiti tudi pri nas. Pri

opisih izdelkov pa ni vedno naveden temperaturni razpon, razen pri EC s temperaturno kontrolo.

3.1.2 Tipi e-cigaret

Poznamo tri generacije EC. Novejše spodbujajo uporabnike k eksperimentiranju, sestavljanju svoje lastne e-cigarete iz posameznih delov, k uporabi e-cigaret z veliko močjo tudi do 100 W, ter k mešanju lastnih tekočin in arom.

Prva generacija EC	Najpogosteje so podobne konvencionalnim cigaretam, lahko tudi cigaram ali pipam. Namenjene so ali enkratni uporabi ali pa uporabnik menja prednapolnjene vložke s tekočino. V nobenem primeru uporabnik ne pride v stik s tekočino.	
Druga generacija EC (t. i. sistemi »tank«)	Večinoma imajo obliko nalivnega peresa, močnejšo baterijo in transparentni rezervoar za ponovno polnjenje, ki ima večji volumen kot vložki pri prvi generaciji. V rezervoar uporabnik sam naliva tekočino iz posebnih stekleničk, v katerih kupi tekočino.	
Tretja generacija EC (t. i. sistemi »mod«)	So zelo raznolike in večje EC; uporabnik jih lahko iz posameznih delov sestavi tudi sam po svojih željah. So kvadratne ali pravokotne oblike, prav nič podobne tobačnim izdelkom. Moč naprave je dosti večja kot pri zgodnejših izdelkih. Pri nekaterih je možno nastavljati temperaturo segrevanja tekočine in te EC posamezni strokovnjaki uvrščajo v četrto generacijo EC.	

Slika 2: Prikaz treh generacij elektronskih cigaret

(https://nijz.si/wp-content/uploads/2022/07/elektronske_cigaretne_podrobnejse_info_za_zdr_delavce.pdf)

Pri mladih zelo priljubljena vrsta EC je puff bar. Gre za EC za enkratno uporabo s širokim izborom okusov. So priročnejše in lažje prenosne zaradi svoje majhnosti. So tudi cenovno bolj ugodne od preostalih EC, saj se cene gibljejo od 4 do 20 €. Delujejo na podoben način, vendar se ne da prilagajati temperature, e-tekočine itd. Predstavljajo tudi ekološki problem, saj jih ni mogoče reciklirati v celoti (Q Vapehouse, 2023).



Slika 3: Puff bar (lastni vir)

3.2 E-tekočine

Običajna e-tekočina vsebuje štiri sestavine: propilen glikol (PG), rastlinski glicerin (VG), aromo in nikotin. Proizvajalci mešajo PG in VG glede na njune prednosti in lastnosti, PG zagotavlja lažje vdihavanje oz. prijetnejši občutek ob vdihavanju, VG pa uporabljajo za večjo gostoto dima, saj je viskozna spojina, ki zagotavlja gostoto pare in sladkost dima (Q Vapehouse, 2023).

Arome povečujejo privlačnost in uporabo e-cigaret, s tem pa tudi izpostavljenost potencialno strupenim sestavinam. Povprečno število arom na e-tekočino je 10, najpogosteje so uporabljene arome vanilje (vanilin), sadja (etyl butirat) in arome slaščic (etyl maltol). Vanilin je prisoten v 35 %, etil maltol v 32 % in etil butirat v 28 % vseh tekočina (Krüsemann in dr., 2021). Na embalaži e-tekočin lahko zasledimo tudi prisotnost nekaterih škodljivih spojin, ki pa niso vse v celoti navedene.

3.2.1 Propilen glikol (PG)

Propilen glikol je brezbarvna, rahlo sirupasta tekočina. Pri sobni temperaturi je brez barve in okusa. Druga imena zanj so 1,2-dihidroksipropan, 1,2-propandiol, metil glikol in trimetil glikol. Njegova molekulska formula je $C_3H_8O_2$. Vrelišče ima pri 187,6 °C, plamenišče pa pri 101 °C. Pri hladnih temperaturah, v dobro zaprtih posodah je propilen glikol stabilen, vendar se pri visokih temperaturah nagiba k oksidaciji, kar povzroča nastanek propionaldehida, piruvične,

mlečne in ocetne kisline. Kemično je tudi stabilen, če ga zmešamo z etanolom (95 %), glicerinom ali vodo. Je sintetična tekoča snov, ki absorbira vodo in se uporablja kot sredstvo proti zmrzovanju. Uporablja se za absorpcijo dodatne vode in vzdrževanje vlage v nekaterih zdravilih, kozmetiki ali živilskih izdelkih. Uporablja se tudi v živilih kot topilo za barvila in arome, hkrati pa tudi za ustvarjanje umetnega dima ali megle, ki se uporablja pri gasilskem usposabljanju, v gledaliških produkcijah in v elektronskih cigaretah (PubChem, 2004). Leta 1973 je uprava za hrano in zdravila PG uvrstila na seznam varnih snovi pod pogoji predvidene uporabe kot aditiv za živila (National Academies of Sciences, Division, Practice & Systems, 2018).

V raziskavi (Wieslander et al., 2001) so nekateri ljudje poročali o draženju zgornjih dihal po minuti vdihavanja aeroliziranega PG, vendar dolgoročni učinki na zdravje pri ljudeh niso dovolj dobro opredeljeni. Vdihavanje aeroliziranega PG vpliva tudi na tveganje za razvoj astme. Pri visokem intravenskem vnosu PG neželeni učinki vključujejo hemolizo, srčno aritmijo, hiperosmolarnost, laktacidozu in prizadetost centralnega živčnega sistema. PG se lahko absorbira peroralno, skozi kožo ali sluznico, po absorpciji ledvice izločijo 45 % PG, jetra pa preostanek pretvorijo v mlečno kislino, piruvično kislino ali aceton (National Academies of Sciences, Division, Practice & Systems, 2018). Narejene so bile tudi študije o inhalacijski izpostavljenosti PG na živalih, in sicer so kunce izpostavili 10 % aerosolu PG za 20 in 120 minut. Dvajsetminutna izpostavljenost ni imela vidnega učinka, vendar je povzročila spremembe na vrčastih celicah v trahealnem epiteliju. Daljša izpostavljenost pa je povzročila spremembe na vrčastih celicah kot tudi na drugih celicah trahealnega epitelija (National Academies of Sciences Division, Practice & Systems, 2018). En vdih pri puff bar povzroči izpostavljenost PG in VG od 430 do 603 mg/m³, zato avtorji raziskave opozarjajo, da so te koncentracije višje od koncentracij, ki povzročajo draženje dihalnih poti, in sicer pri 309 mg/m³ (Kienhuis idr., 2015).

3.2.2 Rastlinski glicerin

Glicerin, znan tudi kot glicerol, je brezbarvna do rjava tekočina z blagim vonjem in sladkim okusom. Ima vlogo topila in detergenta. Pridobivajo ga iz živalskih ali rastlinskih maščob.

Drugo ime zanj je propan-1,2,3-triol, njegova molekulska formula je $C_3H_8O_3$. Vrelische ima pri 290 °C, plamenisce pa pri 177 °C (PubChem, 2004). Uporablja se v prehranskih izdelkih, saj deluje kot konzervans in sladilo v hrani in pijači. Uporablja se tudi v farmacevtskih izdelkih kot vlažilno sredstvo, vključujejo ga v sirupe za kašelj, mazila, anestetike in pastile. Pogosto se uporablja v izdelkih za osebno nego, npr. za nego kože in las (Santhakumar, 2021).

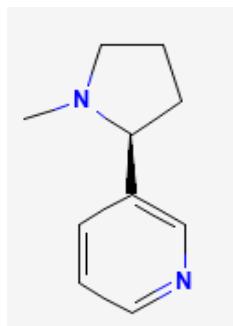
Glicerin se v jetrih (80 do 90 %) in ledvicah (10 do 20 %) pretvori do α -glicerolfosfata, nato v glukozo in na koncu v glikogen. 7 do 14 % se ga izloči z urinom (National Academies of Sciences, Division, Practice & Systems, 2018). V študiji so bile podgane izpostavljene aeroliziranemu glicerinu treh različnih koncentracij (1000, 1930, 3910 mg/m³). Poskus je trajal 2 tedna, in sicer so bile podgane 5 dni v tednu po 6 ur na dan izpostavljene glicerinu. Poročali so o minimalni skvamozni metaplaziji epiglotisa. Gre za zamenjavo celic z drugim tipom celic, imenovanim skvamozni (ploščate celice) epitelij v poklopcu. Drugih sprememb niso opazili (Renne et al., 2008).

3.2.3 Nikotin

Nikotin je brezbarvna, svetlo rumena do rjava tekočina (ob izpostavljenosti z zrakom ali s svetlobo) z vonjem po ribah. Njegovo ime po IUPAC je 3-[(2S)-1-metilpirolidin-2-il]piridin, molekulska formula je $C_{10}H_{14}N_2$. Vrelische ima pri 247 °C, plamenisce pa pri 95 °C. Je zelo strupen rastlinski alkaloid, najden v tobaku (PubChem, 2004). V Sloveniji je možno dobiti na mililiter tekočine 6 stopenj tobaka, in sicer, 0 mg, 3 mg, 6 mg, 9 mg, 12 mg in 18 mg (Q Vapehouse, 2016). Nikotin je prototipni agonist nikotinskih holinergičnih receptorjev, ki stimulira nevrone in blokira sinaptični prenos. Spodbuja sproščanje in aktivnost več vrst nevrotransmitorjev, kot so: acetilholin, dopamin, noradrenalin, serotonin, glutamat, γ -aminomasleno kislino in endorfin (Benowitz, 2009) (Benowitz idr., 2008). Ko nikotin v aerosolu doseže pljuča, se hitro absorbira v pljučno-vensko cirkulacijo, nato v sistemsko arterijsko cirkulacijo in na koncu v možgane. Nikotin po vdihavanju e-cigarette možgane doseže že v 15 sekundah, kar vodi v aktivacijo sproščanja dopamina (Benowitz idr., 2009). Glavno mesto presnove nikotina so jetra, tam se pretvori v kotinin (80–90 %), ki je glavni nikotinski

metabolit (Benowitz et al., 2009). Iz telesa se izloči z urinom v obliki kotinina in njegovih derivatov (Benowitz et al., 2009)

Nikotin se v možganih veže na nikotinske receptorje in poveča sproščanje kemičnih prenašalcev, med njimi je najpomembnejši dopamin, ki sproži občutek ugodja. Za doseganje ugodja je z dolgotrajno uporabo potreben vedno večji vnos nikotina, kar pa vodi v zasvojenost. Posamezniki, zasvojeni z nikotinom, lahko ob opustitvi doživijo odtegnitvene znake, kot so: depresija, tesnobnost, težave z zbranostjo, razdražljivost, nespečnost idr. Znaki se lahko pojavijo že po nekaj urah, ko izdelka niso uporabili (NIJZ, 2023). Pri vsakodnevnom kajenju naj bi bile najvišje koncentracije nikotina v krvi od 19 do 50 ng/ml, najnižje pa od 10 do 37 ng/ml, odvisno od e-cigarete. Ta se v telesu pri rednih kadilcih kopiči 6–9 ur in s tem povzroča nevroadaptacije ter razvijanje tolerance (Benowitz, 2009). Študije, ki so bile narejene glede tega, ali je nikotin rakotvorna snov, niso podprle hipoteze, da nikotin povzroča tumorje na živalih in ljudeh oz. so zaključili, da ni dovolj podatkov, da bi lahko sklepali o njegovi rakotvornosti (National Academies of Sciences, Division, Practice & Systems, 2018).



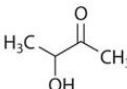
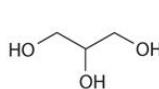
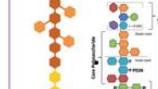
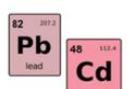
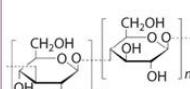
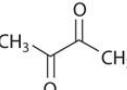
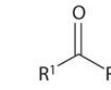
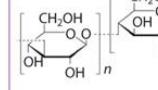
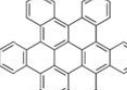
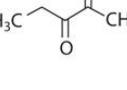
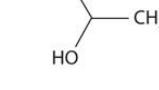
Slika 4: Kemijska formula nikotina

[Nicotine | C10H14N2 | CID 89594 - PubChem \(nih.gov\)](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/89594)

3.2.4 Arome

Arome so kemične snovi, ki prehajajo v aerosol in so same po sebi toksične ali dražilne. Arome, ki se uporablajo v e-cigaretah, se pojavljajo tudi v proizvodnji hrane in so varne ob zaužitju, kar pa ne pomeni, da so varne tudi pri vdihavanju (Koprivnikar idr., 2020). Problematične so

zaradi svoje privlačnosti, saj spodbujajo kajenje tudi med neuporabniki oz. mladimi. V študiji (Hutzler et al., 2014) so v 28 e-tekočinah odkrili 140 hlapnih aromatičnih spojin v koncentracijah od 1 do 5 %. Ugotovili so tudi povečano tvorbo aldehidov, pri 150 °C so zaznali znatne količine formaldehyda, acetaldehyda in propionaldehyda (Hutzler et al., 2014). V raziskavi (Wang idr., 2015) so na družbeni platformi Reddit izvedli anketo glede popularnosti arom. Ugotovili so, da je med uporabniki najbolj priljubljena aroma sadja, druge najbolj priljubljene so kremne arome, nato pa sledita aromi mentola in tobaka.

Allen et al. 2016 ¹	Klager et al. 2017 ²	Lee et al. 2017 ¹	Lee et al. 2019 ²	Fowles et al. 2020 ³	Lee & Christiani 2020 ²
 Acetoin	 Glicerol	 Nanodelci	 Endotoksi	 Težke kovine	 Beta glukani
 Diacetil	 Formaldehid in acetaldehid	 Karbonili	 Beta glukani	 Polyciklični aromatski ogljikovodiki	
 2,3-Pentandion	 Propilen glicerol	 Hlapne organske spojine			

Slika 5: Prikaz spojin v elektronskih cigaretah (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10228557/>)

3.2.5 Mentol

Mentol je ciklični monoterpenski alkohol, ki ima hladilne lastnosti. Njegovo IUPAC-ime je 5-metil-2-propan-2-ilcikloheksan-1-ol. Je v obliki belih kristalov, vonj ima po poprovi meti. Vrelišče ima pri 214,6 °C, plamenišče pa pri 93 °C (PubChem, 2005) (Carl Roth, 2018). Je eden izmed najpomembnejših aromatičnih aditivov, uporablja se v različnih izdelkih, kot so hrana, zobne paste, zdravila in cigarete. Naravni mentol je izoliran iz *Mentha canadensis* (Kamatou idr., 2013). V drugi študiji (Chandra idr., 2023) so ugotovili, da uporaba EC z aromo mentola

zmanjša indeks pljučne funkcije neodvisno od starosti, spola, rase, trajanja kajenja in uporabe nikotina ali konoplje v e-tekočinah.

3.2.6 Tobak

Tobak pridobijo iz posušenih listov rastline *Nicotiana tabacum* (McMurtrey, 2023). Gre za mešanico več spojin, do zdaj jih je znanih 2.550, več kot 4.000 pa jih je v tobačnem dimu. Najmanj 43 snovi v tobaku je rakotvornih, medtem ko tobačni dim vsebuje še številne druge snovi, ki vodijo v nastanek različnih bolezni pljuč (Mishra S. & Mishra M., 2013). V študiji (Lagruet idr., 1993) opisujejo škodljive učinke tobaka in poudarjajo, da je tobak ena glavnih strupenih snovi v naši civilizaciji. Njegova razširjenost je povzročila epidemijo kajenja. Arome tobaka v e-tekočinah velikokrat vsebujejo TSNA (za tobak specifične nitrozamine), ki se tvorijo med procesom sušenja tobakovih listov. Te spojine posnemajo okus tobaka in hkrati spadajo med rakotvorne spojine (Hecht & Hoffmann, 1988).

3.2.7 Mlečna kislina

Mlečna kislina je brezbarvna do rumenkasta sirupasta tekočina. Njeno IUPAC-ime je 2-hidroksipropanojska kislina. Njena molekulska formula je $C_3H_6O_3$ (PubChem, 2004). Proizvaja se s fermentacijo, ogljikovi hidrati se hidrolizirajo v monosaharide, nato mikroorganizmi v odsotnosti kisika fermentirajo do mlečne kisline. Za proizvodnjo uporablja mlečnokislinske bakterije rodu *Lactobacillus* in plesni iz rodu *Rhizopus* (Litchfield, 2009). Prvič je bila v komercialnem obsegu z bakterijsko fermentacijo leta 1883 proizvedena v ZDA (Litchfield, 2009). Mlečnokislinska fermentacija se uporablja tudi za konzerviranje mlečnih izdelkov, zelenjave in mesa (Malo & Urquhart, 2016).

Mlečna kislina je končni produkt anaerobne presnove glukoze, ki se odstrani z glukoneogenezo ali oksidacijo (mišic, jeter, ledvic) (Ritz & Heidland, 1977). Glukoneogeneza je presnovna pot, v kateri se sintetizira glukoza iz piruvata, laktata, glicerola, glukogenih aminokislin ali vmesnih produktov ciklusa trikarboksilnih kislin (Slovenski medicinski slovar, 2012). Pri visoki koncentraciji laktata v plazmi lahko pride do laktacidoze, ki je opredeljena kot stanje, kjer je arterijski pH manjši od 7,3 (Ritz & Heidland, 1977). Laktacidoza lahko privede tudi do

odpovedi organov in smrti. Simptomi, ki se pojavijo ob bolezni, so slabost in bruhanje, utrujenost, mišični krči, zmedenost, odpoved jeter idr. (Cleveland Clinic, 2023).

Kot je že opisano zgoraj, se propilen glikol v jetrih pretvori v mlečno kislino, zato smo jo v raziskovalno nalogu vključili kot eno izmed kontrol. Uporaba EC v prekomernih količinah lahko vpliva na raven mlečne kisline v krvi, a ta ne sme presegati 4 mmol/L, saj lahko to privede do razvoja laktacidoze (Pohanka, 2020).

3.3 Domnevni zdravstveni učinki – posledice uporabe

Kljub temu da so e-cigarete in njim podobni pripravki pri nas relativno novi, drugod po svetu znanstveniki že leta opozarjajo na njihove negativne posledice. Zaskrbljujoč pa ni le učinek na pljuča in obtočila, pojavljajo se tudi problemi z zobmi, spolnimi celicami in z duševnim zdravjem.

Na združenju NIH (National Institutes of Health) so v letu 2022 odkrili, da kronična uporaba elektronskih cigaret negativno vpliva na znotrajcelično oksidativno stanje in zavira endoteljsko sproščanje NO (National Institutes of Health, 2022).

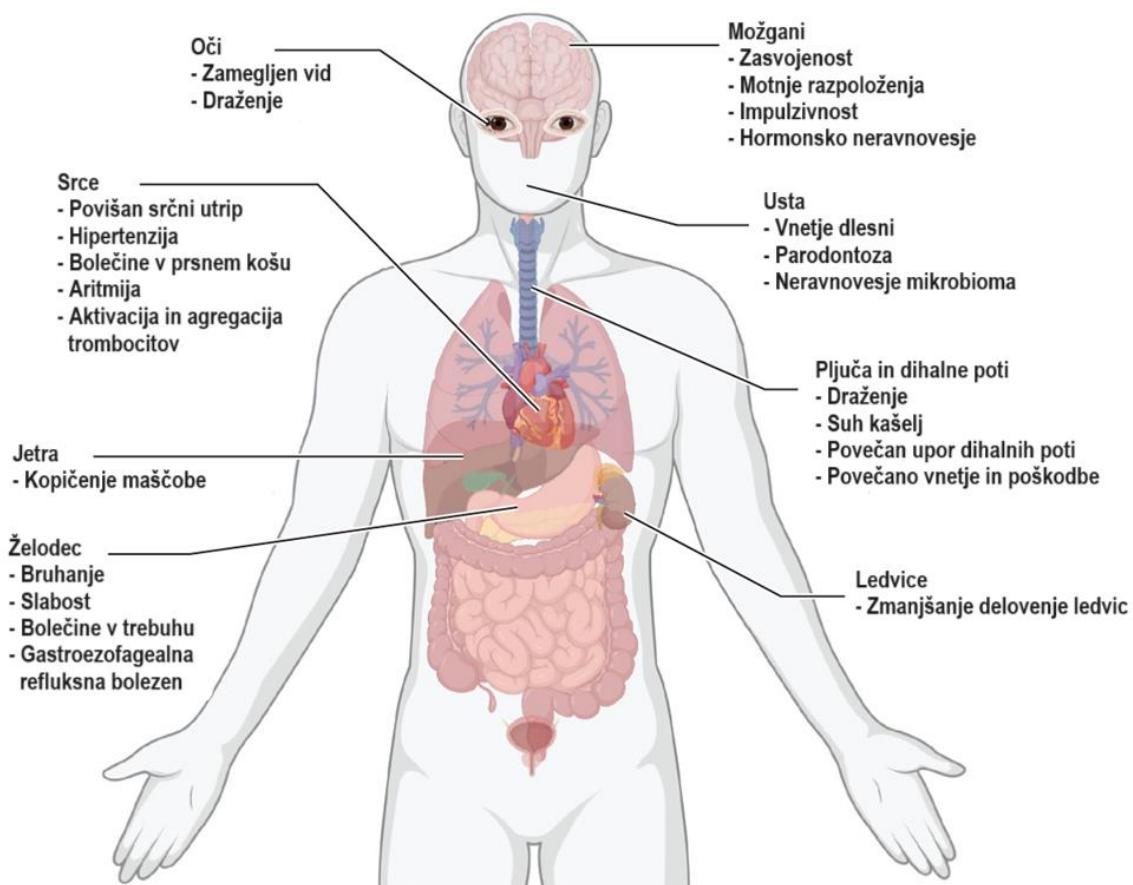
Mnoge izmed tekočin, ki se uporabljam v EC (elektronskih cigaretah), vsebujejo tudi zgoraj omenjen nikotin, ki povzroča hudo zasvojenost in ob prekiniti uporabe tudi hude oblike odtegnitvenega sindroma (Widysanto idr., 2023).

Opaža se tudi korelacija med uporabo nikotinskih pripravkov pri ljudeh z duševnimi težavami, sploh anksiozno motnjo, depresijo in hudo tesnobo (Javed idr., 2022).

“Podatki iz raziskave, ki je vključevala ameriške kadilce, kažejo na to, da skoraj polovica ljudi (45 %), ki ima resno anksioznost, uporablja tudi tobak. Sem sodijo kajenje, vejpanje oz. uporaba elektronskih cigaret in uporaba drugih tobačnih izdelkov, npr. tobak, ki se žveči” (Društvo za zdravje srce in ožilja Slovenija, 2021). Kratkotrajna uporaba povzroča tudi poškodbe in vnetja pljučnega tkiva, za katerega pa na dolgi rok še ne poznamo jasnega vpliva (American Lung Association, 2023).

Na celični ravni poročajo o nevarnosti aldehidnih kisikovih skupin, ki so v tekočinah, predvsem v aromah. Aldehidi so v celici znani po inaktivaciji beljakovin, uničenju mitohondrijev in vodijo do apoptoze celice. Uporaba e-cigaret povzroča tudi oksidativni stres celice, kar bomo merili tudi mi z metodo ROS, in spreminja dedni material, kar je posebej tvegano pri spolnih celicah (Katz & Yaghoubian, 2021).

Marsikje po svetu (npr. v Združenem kraljestvu) še danes dovoljujejo aditive, ki so v aromah tekočin oz. "vape sokovih" (kot jim pravijo nekateri), za katere so negativni učinki na zdravje že potrjeni. Eden izmed teh je pripravek diacetil, ki povzroča stanje, ki mu pravimo tudi "pokovka v pljučih" (Harber idr., 2006). Ime je bolezen dobila po delavcih v tovarni pokovke, ki so zaradi izpostavljenosti diacetilu, ki so ga uporabljali za povečanje aromatičnosti pokovke, množično zbolevali za simptomi te bolezni.



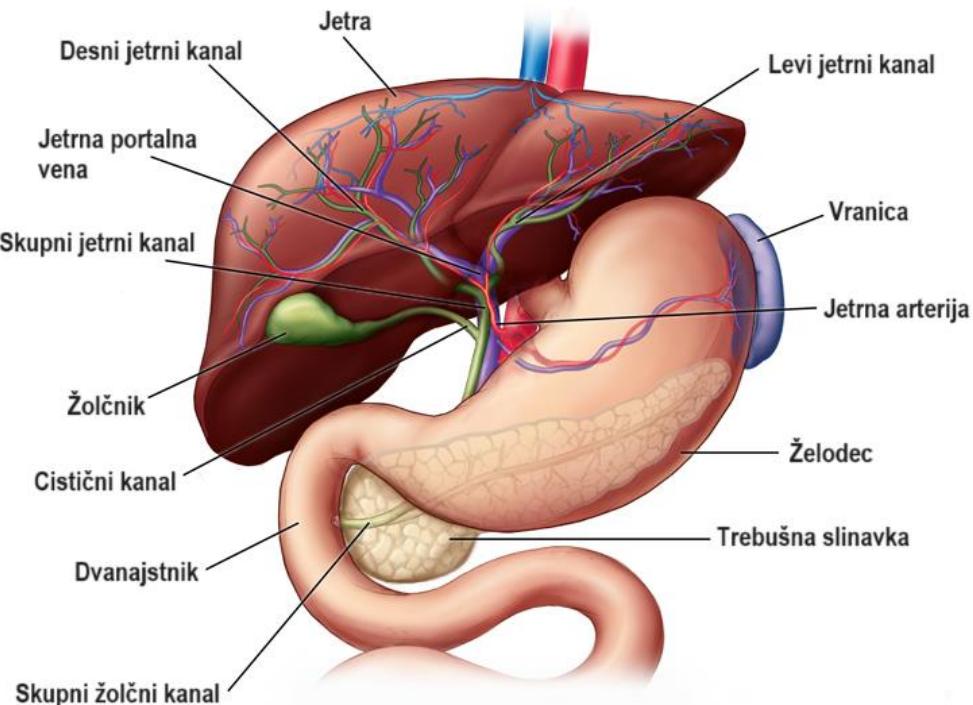
Slika 6: Prikaz domnevnih vplivov uporabe e-cigaret na človeško telo ([Vaping and Lung Inflammation and Injury - PMC \(nih.gov\)](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5308372/))

3.4 Jetra

Človekov največji organ so jetra, ki so rožnato-rjave barve. Ležijo v zgornjem desnem delu trebušne votline, pod trebušno prepono in imajo obliko tristrane piramide. V povprečju tehtajo 1,5 kilograma, kar pri odraslem človeku predstavlja kar 2–5 % celotne telesne teže. Po eni strani iz telesa filtrirajo strupene snovi ter omogočajo, da se te skozi ledvice ali črevesje izločijo, po drugi strani pa so nepogrešljiva pri prebavi maščob, ogljikovih hidratov in beljakovin v prehrani. Med drugim ima tudi vlogo endokrine in eksokrine žleze (Johns Hopkins Medicine, 2019).

Jetra imajo dvojno preskrbo s krvjo:

- ***portalno veno***: dovaja vensko kri iz želodca, črevesja in vranice (kri, bogata s hranili, toda tudi nasičena s strupi), jetra v 75 % priskrbi s kisikom.
- ***hepatično (jetrno) arterijo***: dovaja arterijsko kri in jetra priskrbi s preostalimi 25 % kisika.



Slika 7: Anatomija jeter

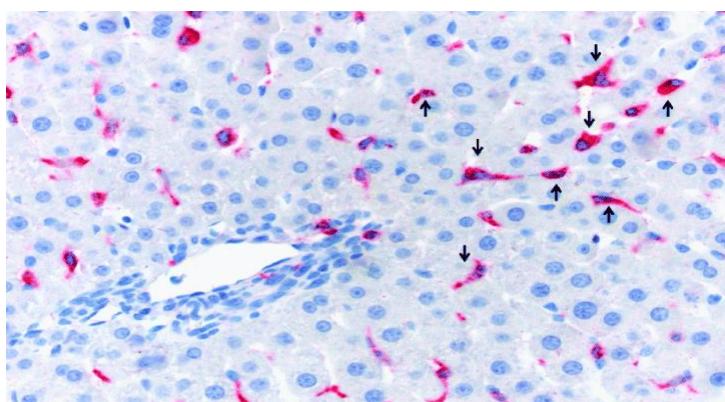
(<https://www.hopkinsmedicine.org/health/conditions-and-diseases/liver-anatomy-and-functions>)

Jetra zadržujejo približno pol litra (13 %) telesne oskrbe s krvjo v danem trenutku. Sestavljena so iz dveh glavnih režnjev, od katerih je desni neprimerljivo večji. Od levega ga loči srasta jetrna vez. Oba sestavlja osem segmentov, razdeljenih na približno 1000 majhnih režnjev. Ti so povezani z majhnimi kanali (cevkami), ki se povezujejo z večjimi kanali in tvorijo skupni jetrni kanal. Skupni jetrni kanal dovaja žolč, ki ga proizvajajo jetrne celice, v žolčnik in dvanaestnik (prvi del tankega črevesa) preko skupnega žolčnega voda (Johns Hopkins Medicine, 2019).

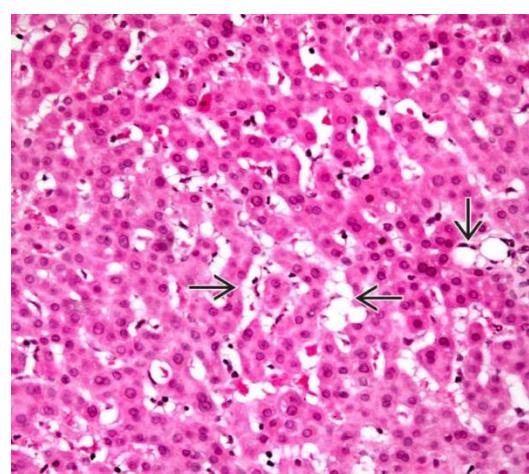
Okoli 6 % jetrnega parenhima sestavljajo celice, ki niso hepatocite. Sem vključujemo endotelne celice (2,8 %), Kupfferjeve celice (2,1 %) in zvezdaste celice (1,4 %) (Johns Hopkins Medicine, 2019).

3.4.1 Kupfferjeve celice (makrofagi)

So jetrne makrofagne celice, ki so v sinusoidnem žilnem prostoru. Gre za populacijo fiksiranih makrofagov, katerih glavna naloga je fagocitiranje patogenov in odstranjevanje trdih delcev iz krvnega obtoka (Boron & Boulpaep, 2012). Prvi jih je leta 1876 opisal Karl Wilhelm von Kupffer kot "Sternzellen" oz. zvezdaste celice, s prepričanjem, da so del endotelija jetnih žil. Kot makrofage so jih identificirali šele leta 1898. Ker imajo pomembno protivnetno vlogo, je tudi vsaka sprememba funkcionalne aktivnosti Kupfferjevih celic povezana z različnimi boleznimi (Boron & Boulpaep, 2012) (Johns Hopkins Medicine, 2019).



Slika 8: Kupfferjeve celice



Slika 9: Zvezdaste celice

([Role of Kupffer cells in host defense and liver disease - Bilzer - 2006 - Liver International - Wiley Online Library](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jli.2006)) (<https://basicmedicalkey.com/stellate-cell-hyperplasia-2/>)

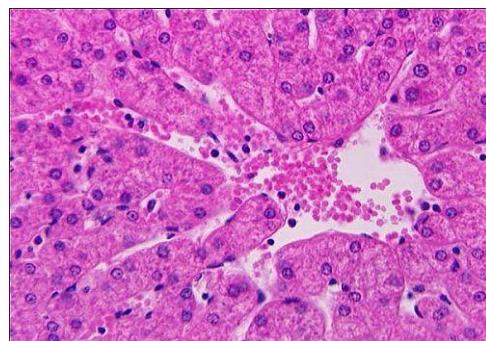
3.4.2 Zvezdaste celice (fibroblasti)

So celice z vezivno vlogo, ki so svoje ime dobile po svoji zvezdasti obliki. Splošno tvorijo kolagenska, retikulinska in elastična vlakna ter peptidoglikane.

Najdemo jih v Dissejevem prostoru, med Kupfferjevimi celicami in hepatociti. Imenujemo jih tudi Itove celice. Morfološko jih prepoznamo po prisotnosti velikih maščobnih kapljic v svoji citoplazmi. Njihova glavna naloga je zaloga vitamina A, dokazano je, da se lahko spremenijo v pro-literativne, fibrogene in kontaktne miofibroblaste. Ob poškodbi jeter te aktivirane celice sodelujejo pri fibrogenizi s preoblikovanjem zunajceličnega matriksa in odlaganjem kolagena tipa I., kar lahko privede do ciroze jeter (Johns Hopkins Medicine, 2019).

3.4.3 Jetrne sinusoidalne endotelne celice

So celice, ki oblegajo žilne kanale ali sinusoide, ki tvorijo fenestrirano strukturo s svojimi telesi in citoplazemskimi podaljški. Raztopljeni snovi v krvni plazmi, ne pa tudi krvne celice, se lahko gibljejo v Dissejev prostor skozi pore v endotelijskih celicah. Nekateri dokazi kažejo tudi, da lahko pore uravnava dostop do Dissejevega persinusoidalnega prostora s svojo zmožnostjo krčenja (Johns Hopkins Medicine, 2019).



Slika 10: Sinusoidalne jetrne celice

(http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/pathphys/digestion/liver/histo_sinusoids.html)

3.5 Celične kulture

Procesi in procedure se razlikujejo glede na vrsto celic, saj je način ravnanja z njimi odvisen od njihovih značilnosti. Poznamo dva načina pridobivanja celic ali iz celične banke ali z izolacijo celic iz darovalskega tkiva. Pri celični kulturi, ki je bila pridobljena iz celične banke, je treba opraviti postopke odmrzovanja, sejanja in opazovanja celic. Če so celice odvzete iz darovalčevega tkiva, se najprej odstrani nepotrebno tkivo, če je pritrjeno. Pri izolaciji celic uporabljajo dve metodi: kultura eksplanta in encimsko metodo (Nikon, 2023).

Pri odmrzovanju zamrznjenih krioprezerviranih celic, ki so pridobljene iz celične banke, se prenesejo iz posode s tekočim dušikom ali kriogenega zamrzovalnika (- 150 °C) v posodo za hlajenje (v posodo s tekočim dušikom). Celice se odmrznejo v vodni kopeli pri 37 °C ali pa v talilni napravi. Doda se jim celični medij, vse skupaj se da centrifugirati, da se celice naberejo na dnu. Potem se celični medij odlije in doda novega (mora biti predhodno segret na 37 °C). Te celice se potem prenesejo v posodo za gojenje celic (s pipetiranjem se resuspendirajo oz. ponovno razpršijo po mediju). Posodo moramo dati v inkubator s 5 % CO_2 pri 37 °C, kjer jih opazujemo, konstantno preverjamo njihovo rast, zgradbo, menjavamo celični medij, ter preverjamo prisotnost neželenih tujkov (Nikon, 2023).

Ko se celice začnejo razmnoževati, jih razdelimo v nove posode za gojenje celic. Ta "prehod" je priporočljivo izvesti, kadar celice pokrijejo 70 do 80 % posode. Stanje, pri katerem so celice večinsko pokrile dno posode, se imenuje "konfluentno". Ko celice postanejo konfluentne, lahko pridejo v stik med seboj, kar lahko vpliva na njihovo rast in razmnoževanje, lahko pride do tako imenovane kontaktne inhibicije (celice se ne bodo več razmnoževale) (Nikon, 2023).



Slika 11: Neparenhimska jetrna celična kultura po 1 mesecu rasti (lastni vir)

3.6 Fluorescenčna in absorbančna spektrometrija

Fluorescenčna spektrometrija je metoda za določanje koncentracij analita v raztopini, na podlagi njegovih fluorescentnih lastnosti. Pri fluorescenčni spektroskopiji skozi raztopino prehaja žarek z valovno dolžino od 180 do 800 nm, tako lahko izmerimo emisijski spekter oz. koliko svetlobe vzorec oddaja. Koncentracija analita je sorazmerna z intenzivnostjo emisije (Hooijschuur, 2023).

Pri fluorescenci molekula absorbira energijo (foton), po vzbujanju foton oddaja daljše valovne dolžine (Hooijschuur, 2023).

Pri absorbančni spektroskopiji se spektrometer uporablja za neposredno merjenje, in sicer koliko svetlobe vzorec absorbira. Je ena najpogosteje uporabljenih tehnik za kvalifikacijo celičnih komponent. Vsaka spojina absorbira oz. prenaša svetlobo v določenem območju valovne dolžine. Glede na valovno dolžino svetlobe in njeni intenzivnosti je mogoče zaznati specifične elemente in izmeriti njihove koncentracije (Thermo Fisher Scientific, 2023).

3.7 Reaktivne kisikove spojine (ROS)

Reaktivne kisikove spojine so organski produkti celičnega metabolizma. Pod ROS prištevamo več različnih molekul z oksidativnimi lastnostmi, izmed katerih lahko mnoge poškodujejo DNA ali RNA. V celici tudi oksidirajo lipide in proteine, kar celici povzroča dodaten stres (Wu & Yotnda, 2011). Povečano število reaktivnih kisikovih spojin (ROS) implicira mnoge bolezni, zato je njihov nadzor velikega pomena. Preverjali smo jih s pomočjo spektrofluorometra, kjer smo merili fluorescenčnost. Njena jakost je premo sorazmerna s količino ROS, ki jih celica proizvede, torej je povišana vrednost ROS lahko skrb vzbujajoča (Yang & Lian, 2019). Uporabljen reagent pri metodi ROS je DCFH-DA, ki se oksidira samo znotraj celice in lahko tako zaznamo sproščanje reaktivnih kisikovih radikalov znotraj celice.

Od preizkusa mitohondrijske aktivnosti (MTT) se razlikuje tudi po občutljivosti, saj se pri ROS toksičnost opazi v veliko večji meri.

3.8 Mitohondrijska aktivnost (MTT)

MTT (preizkus mitohondrijske aktivnosti) je metoda, ki se uporablja za merjenje celične presnovne aktivnosti, kot indikator viabilnosti celic, proliferacije in citotoksičnosti. Gre za kolorimetričen poskus, ki temelji na redukciji rumene tetrazolijeve soli v vijolične kristale formazana s presnovno aktivnimi celicami. MTT se izmeri s spektroflourometrom. Višja, kot je vrednost absorbance, več je preživelih celic, torej je celična viabilnost večja.

4 LABORATORIJSKO DELO

Večino laboratorijskega dela smo opravili med 3. in 22. januarjem 2024 na Medicinski fakulteti v Mariboru.

4.1 Seznam opreme in materialov

4.1.1 Kemikalije

- aroma mentola (Q Vapehouse, Liqua)
- aroma tobaka z 18 mg nikotina (Q Vapehouse, Liqua)
- 100-% propilen glikol (Belidim, Angel flavors)
- tripsin (Sigma Aldrich, ZDA)
- 100-% mlečna kislina

4.1.2 Celična kultura

- Kupfferjeve celice (ZEN-BIO, USA)
- zvezdaste celice (ZEN-BIO, USA)
- jetrne sinusoidalne endotelne celice (ZEN-BIO, ZDA)
- celični medij (Sigma Aldrich, ZDA)
- serum (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Nemčija)

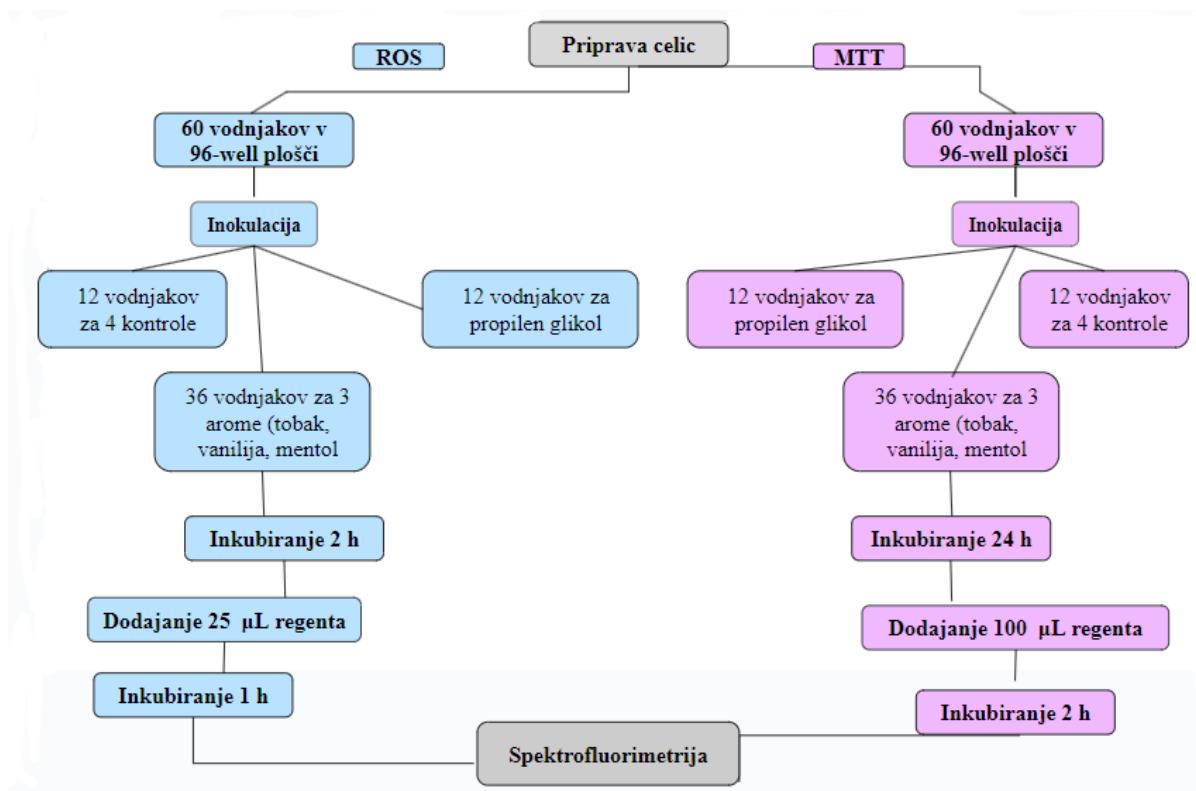
4.1.3 Laboratorijski pribor in oprema

Oprema:

- celični inkubator, CO_2 inkubator (Sanyo, Japonska)
- centrifuga Eppendorf 5804 R (Eppendorf, Nemčija)
- kabinet za biološko varnost HerasafeKSP (Thermo Fisher Scientific, Nemčija)
- vodna kopel (Kambič laboratorijska oprema, EU)
- mikroskop za štetje celic Cyto smart (Corning, Nizozemska)

- vibracijski mešalnik za epruvete (ang. scientific classic advanced vortex mixer) (VELP, Italija)
- zamrzovalnik (Thermo Fisher Scientific)
- hladilnik (Thermo Fisher Scientific)
- spektrofluorometer (VarioskanFlash, Thermo Fisher Scientific, Nemčija)
- zaščitne rokavice
- posoda za gojenje celičnih kultur
- pipete z nastavki (Thermo Fisher Scientific, Nemčija)
- mikrotitrská plošča za 96 vzorcev

4.2 Potek dela



Slika 12: Potek dela, prikazan na organigramu (lastni vir)

4.3 Priprava celic

Iz zamrzovalnika (- 80 °C) smo vzeli Kupfferjeve, zvezdaste in jetrne sinusoidalne celice. Celice, celični medij in celični serum smo nato odtalili v vodni kopeli pri 37 °C. Nato smo celicam dodali 9 ml celičnega medija ter zmes centrifugirali. Tekočino smo potem odlili, saj so se celice nabrale na dnu. Na novo smo dodali 9 ml celičnega medija in 1 ml celičnega serumca v posodo, namenjeno za gojenje celičnih kultur, in inkubirali pri 37 °C in 5 % CO_2 . Celicam smo menjavali celični medij in serum, dokler ni bilo dno posode večinsko pokrito s celicami. Ko smo celice prenesli v drugo posodo, smo celicam dodali tripsin, ki je omogočil, da so se celice ločile oz. odlepile od dna posode.

4.4 Priprava koncentracij

Za potrebe raziskave smo pripravili 18 različnih tekočinskih vzorcev. 15 izmed teh je bilo testnih (arome in propilen glikol), 3 pa so bile kontrolne. Za arome smo izbrali 4 različne koncentracije, ki smo jih izračunali za 1000 vzorcev, saj bi bile koncentracije premajhne za pipetiranje:

- $2 \% \rightarrow 0,02 \text{ arome} \times 0,25 \mu\text{L PG} = 0,005 \mu\text{L}$ za 1000 vzorcev: $0,005 \mu\text{L} \times 1000 = 5 \mu\text{L}$
- $4 \% \rightarrow 0,04 \times 0,25 \mu\text{L PG} = 0,01 \mu\text{L}$ za 1000 vzorcev: $0,01 \mu\text{L} \times 1000 = 10 \mu\text{L}$
- $6 \% \rightarrow 0,06 \times 0,25 \mu\text{L PG} = 0,015 \mu\text{L}$ za 1000 vzorcev: $0,015 \mu\text{L} \times 1000 = 15 \mu\text{L}$
- $8 \% \rightarrow 0,08 \times 0,25 \mu\text{L PG} = 0,02 \mu\text{L}$ za 1000 vzorcev: $0,02 \mu\text{L} \times 1000 = 20 \mu\text{L}$

Pri propilen glikolu smo prav tako izbrali 4 različne koncentracije:

- $0,25 \% \rightarrow 0,25 \mu\text{L} + 99,75 \mu\text{L}$ medija
- $1 \% \rightarrow 1 \mu\text{L} + 99,0 \mu\text{L}$ medija
- $5 \% \rightarrow 5 \mu\text{L} + 95,0 \mu\text{L}$ medija
- $10 \% \rightarrow 10 \mu\text{L} + 90 \mu\text{L}$ medija

Za kontroli smo potrebovali koncentraciji 1 mmol/L in 4 mmol/L mlečne kisline.

Pri kontroli 1: 100 μL medija

Pri kontroli 2: 0,25 μL PG + 99,75 μL medija

Pri kontroli 3 (prva koncentracija mlečne kisline): 0,1 μL mlečne kisline + 99,9 μL medija

Pri kontroli 3 (druga koncentracija mlečne kisline): 3 µL mlečne kisline + 97 µL medija

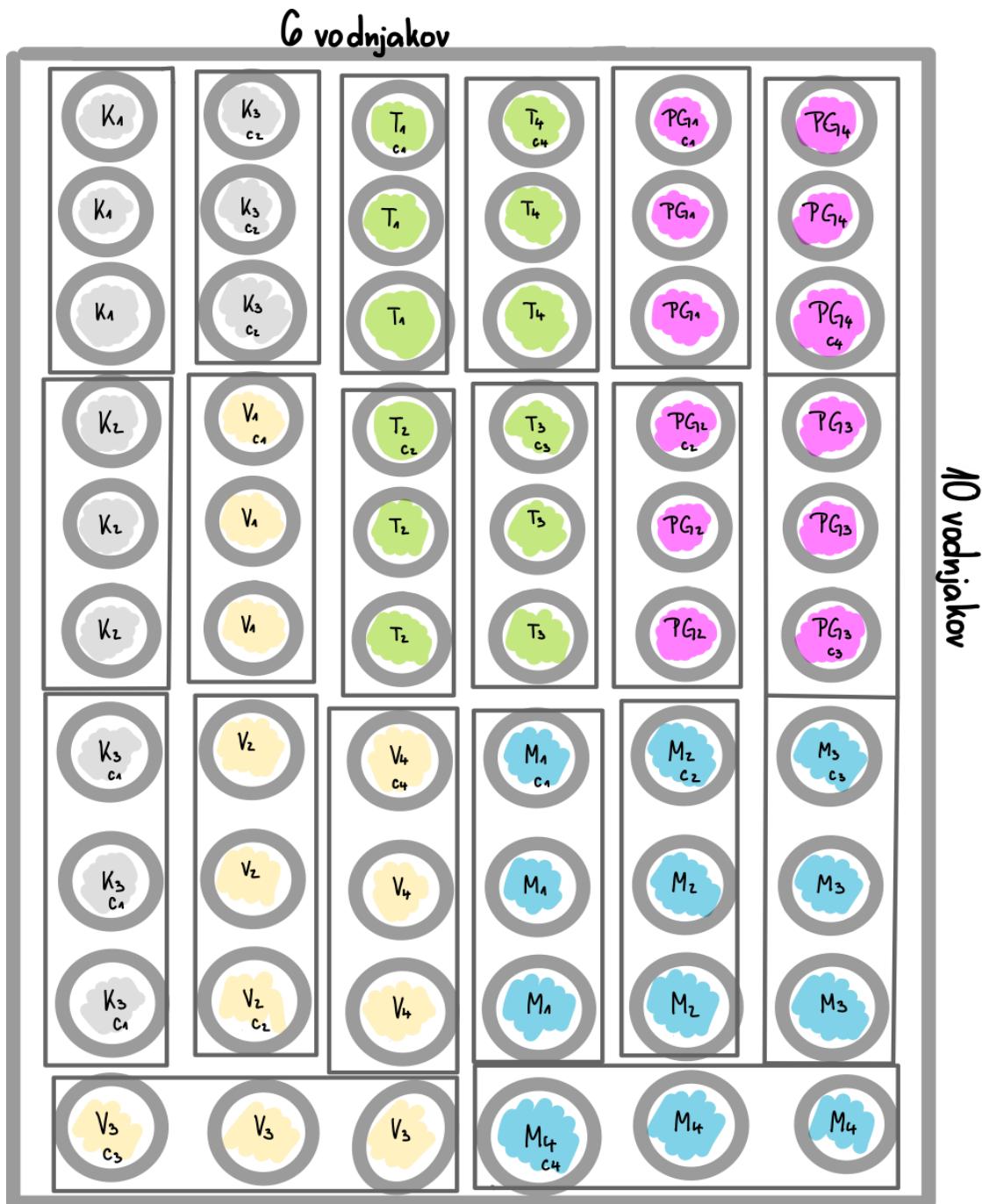
4.5 Reaktivne kisikove spojine (ROS) protokol

Količino nastalih radikalov smo izmerili s pomočjo reagenta DCFH-DA. Delo smo začeli tako, da smo testni plošči z vodnjaki, ki so vsebovali celice, odlili medij. 60 izmed 96 vodnjakov smo napolnili s 100 µL testne tekočine po že zgoraj opisanem načrtu in inkubirali 2 uri na 37 °C in 5 % CO₂. Nato smo tekočine zopet odlili iz testne ploščice in celice sprali s PBS. Vodnjake smo ponovno napolnili s 25 µL reagenta DCFH-DA in HBSS, ter inkubirali 1 uro, zopet pri enakih pogojih. V zadnjem koraku smo ploščo z vodnjaki položili v spektrofluorometer in merili fluorescenčnost pri valovni dolžini 485–528 nm.

4.6 Mitochondrijska aktivnost (MTT – Mitochondrial activity) protokol

Najprej smo medij odpipetirali iz vodnjakov in jih napolnili s testno tekočino. Nato smo jih inkubirali na 37 °C pri 5 % CO₂ za 24 ur. Naslednji dan smo delo začeli tako, da smo tekočino odpipetirali in celice zopet sprali s PBS. V vsak vodnjak smo dodali 100 µL DMEM z barvilom MTT (rumene barve) in inkubirali še za dodatni 2 uri. Po pretečenem času smo zopet odpipetirali tekočino in dodali 100 mikrolitrov DMSO. Testno ploščico z vodnjaki smo dali v spektroflourometer in izmerili absorbanco na 560 in 620 nm.

4.7 Načrt eksperimentalnega dela



Shema 1: Shema razporeditve vodnjakov pri eksperimentalnem delu (lastni vir)

Legenda:

K₁	celična kultura + medij	M₃	celična kultura + medij + 0,25 % PG + 6 % arome mentola
K₂	celična kultura + medij + 0,25 % propilen glikol (PG)	M₄	celična kultura + medij + 0,25 % PG + 8 % arome mentola
K₃₁	celična kultura + medij + 0,5 µL mlečne kisline (1 mmol/L)	T₁	celična kultura + medij + 0,25 % PG + 2 % arome tobaka
K₃₂	celična kultura + medij + 3 µL mlečne kisline (4 mmol/L)	T₂	celična kultura + medij + 0,25 % PG + 4 % arome tobaka
V₁	celična kultura + medij + 0,25 % PG + 2 % arome vanilje	T₃	celična kultura + medij + 0,25 % PG + 6 % arome tobaka
V₂	celična kultura + medij + 0,25 % PG + 4 % arome vanilje	T₄	celična kultura + medij + 0,25 % PG + 8 % arome tobaka
V₃	celična kultura + medij + 0,25 % PG + 8 % arome vanilje	PG₁	celična kultura + medij + 0,25 % PG
V₄	celična kultura + medij + 0,25 % PG + 8 % arome vanilje	PG₂	celična kultura + medij + 1 % PG
M₁	celična kultura + medij + 0,25 % PG + 2 % arome mentola	PG₃	celična kultura + medij + 5 % PG
M₂	celična kultura + medij + 0,25 % PG + 4 % arome mentola	PG₄	celična kultura + medij + 10 % PG

Tabela 1: Legenda sheme 1 (lastni vir)

4.8 Metode anketiranja

Anketa je bila narejena na portalu 1KA anketa. V anketi so sodelovali učenci in dijaki mariborskih in okoliških šol. Seznam vseh šol, ki so sodelovale, je naveden v prilogi 2.

4.9 Obdelava podatkov

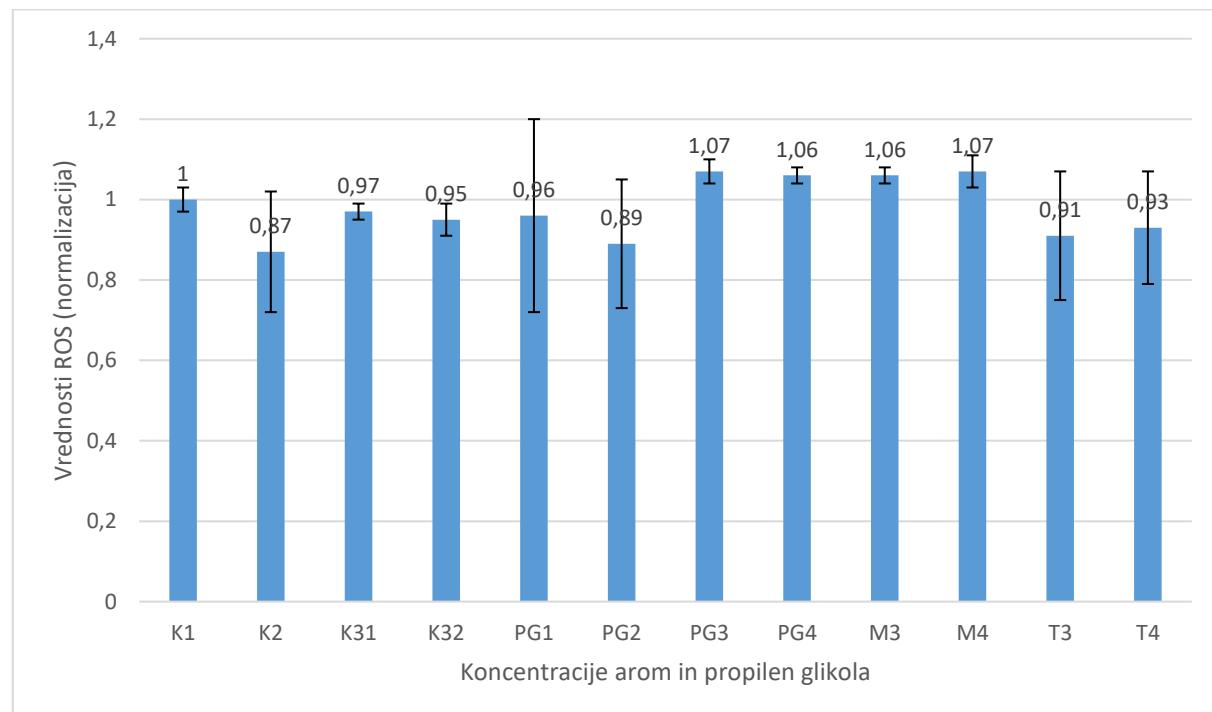
Podatke smo obdelali in grafično prikazali z Excelom (2023). Statistična obdelava je obsegala izračun povprečnih vrednosti, standardnega odklona in t-test za primerjavo kontrole in vzorca z največjo razliko. Rezultati ankete so bili prav tako analizirani na portalu 1KA anketa, vprašalnik lahko vidite spodaj v prilogi 1.

5 REZULTATI

S spektofluorometrom smo izmerili količino reaktivnih kisikovih spojin (ROS) pri različnih koncentracijah arom tobaka in mentola ter propilen glikola. Pri propilen glikolu smo imeli štiri koncentracije: 0,25 %, 1 %, 5 % in 10 %. Pri aromi mentola in tobaka smo imeli dve koncentraciji: 6 % in 8 %. Aromo vanilje smo v celoti izključili, zaradi neveljavnih rezultatov. Pri aromi mentola in tobaka smo izključili 2-% in 4-% koncentracijo.

Preverjali smo tudi mitohondrijsko aktivnost (MTT), test je bil opravljen pri enakih koncentracijah arom tobaka in mentola (aromi tobaka in mentola: 6 % in 8 %), ter propilen glikola (PG: 0,25 %, 1 %, 5 %, 10 %).

Graf 1 prikazuje rezultate meritev prostih kisikovih radikalov pri različnih koncentracijah PG, arom tobaka in mentola. Iz grafa lahko razberemo, da so najvišje vrednosti ROS (višje vrednosti pomenijo več prostih kisikovih radikalov) pri M4 (8-% aroma mentola), M3 (6-% aroma mentola), PG4 (10 % PG) in PG3 (5 % PG). Najnižje vrednosti so bile izmerjene pri K2 (medij + 0,25 % PG), P2 (1 % PG), T3 (6-% aroma tobaka) in T4 (8-% aroma tobaka).

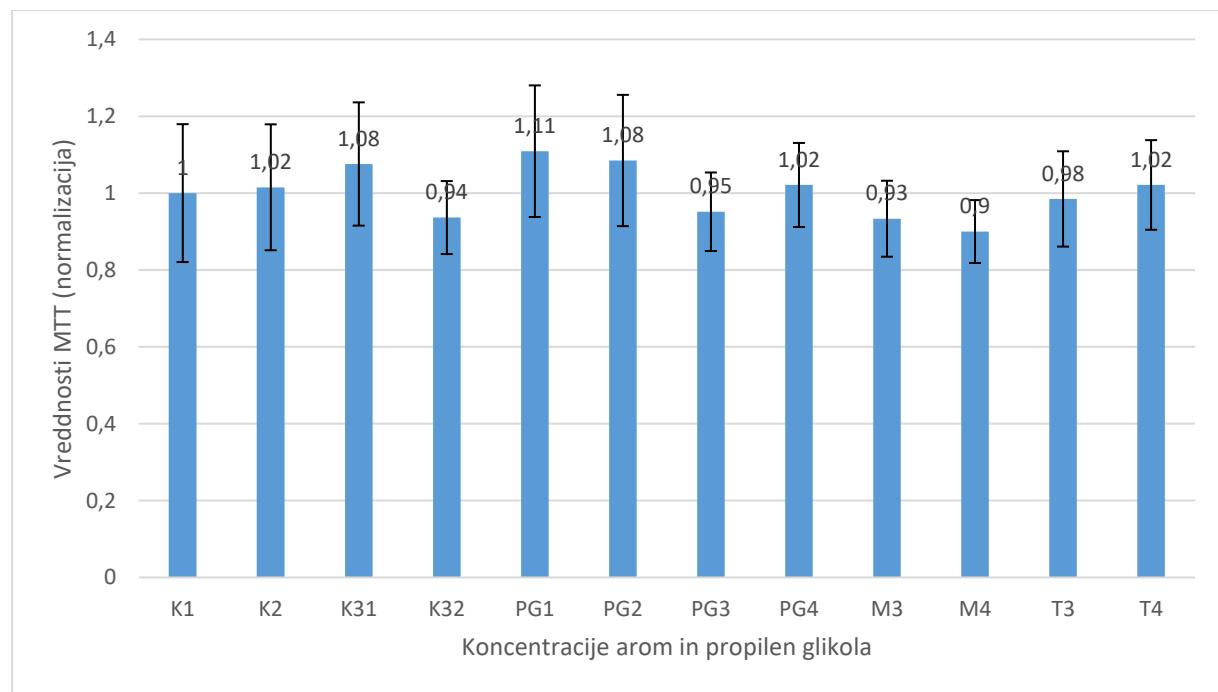


Graf 1: Povprečne vrednosti merjenja reaktivnih kisikovih spojin (ROS) pri različnih koncentracijah propilen glikola, arome tobaka in mentola ± 1 SD

Graf 1 prikazuje povprečne vrednosti ROS pri določenih koncentracijah z vršanim intervalom napake (standardna deviacija, ± 1 SD). Normalizacija je postopek, ki omogoča lažjo primerjavo med nabori podatkov (DataScientest, 2021). Na grafu predstavlja razmerje oz. količnik med testno koncentracijo in kontrolo (K1). Vrednosti, ki so višje od 1 oz. od K1, pri metodi DCFH-DA za merjenje reaktivnih kisikovih spojin pomenijo povišano vrednosti ROS.

Opravili smo tudi t-test med vrednostmi kontrole in najvišjimi izmerjenimi vrednostmi ROS med vrednostmi, ki so bile največje, torej pri M4. Izračunana p-vrednost je bila 0,1201. Razlika je prisotna, vendar ni statistično pomembna ($p > 0,05$).

Graf 2 prikazuje rezultate meritev mitohondrijske aktivnosti (MTT). Iz grafa je razvidno, da so vrednosti MTT pri PG1 (medij + 0,25 %PG), K31 (medij + 1 mmol/L mlečne kisline), PG2 (medij + 1 % PG) najvišje. Najnižje (nižje vrednosti pomenijo manj viabilnih celic) pa so pri M4 (8-% aroma mentola), M3 (6-% aroma mentola) in K32 (medij + 4 mmol/L mlečne kisline).



Graf 2: Povprečne vrednosti merjenja mitohondrijske aktivnosti (MTT) pri različnih koncentracijah propilen glikola, arome tobaka in mentola ± 1 SD

Graf 2 prikazuje povprečne vrednosti meritev MTT. Na grafu 2 normalizacija prav tako predstavlja razmerje oz. količnik med testno koncentracijo in kontrolo (K1). Vrednosti, ki so manjše od 1 oz. od K1 pri metodi MTT, pomenijo zmanjšanje viabilnosti celic.

Opravili smo tudi t-test med dvema setoma podatkov, med vrednostmi pri kontroli in med vrednostmi, ki so bile najnižje, torej pri M4. Izračunana p-vrednost je bila 0,297. Tudi tukaj je razlika prisotna, vendar ni statistično pomembna ($p > 0,05$).

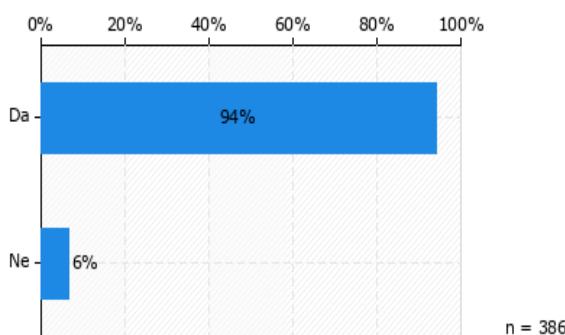
5.1 Rezultati ankete

Zaradi vse bolj pogoste uporabe e-cigaret (v šoli, med vožnjo, v lokalih ipd.), smo se odločili k raziskovalni nalogi dodati anketo. Anketo smo oblikovali in analizirali prek spletne strani 1KA anketa. Poslali smo jo srednjim in osnovnim šolam ter želeli izvedeti, kaj je adolescente privelo do uporabe, kako lahko posežejo po takšnih pripravkih (glede na starostno omejitev v trgovinah) ipd.

Anketo je rešilo 387 ljudi, tako iz urbanega Maribora kot iz manjših naselij, ki ga obkrožajo.

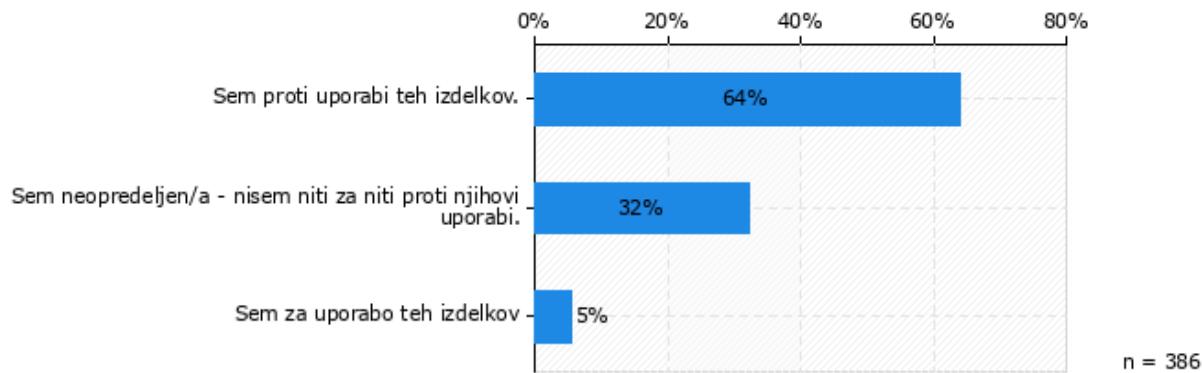
Približno polovico (49 %) anket so rešili osnovnošolci, preostali del (51 %) pa srednješolci. Največ odgovorov smo dobili od dijakov, starih med 15 in 16 let.

Iz rezultatov, ki so prikazani na grafu 3, smo izvedeli, da je 94 % anketiranih seznanjenih z elektronskimi cigaretami ali pa so za ta pojem že slišali.



Graf 3: Informiranost mladih o EC

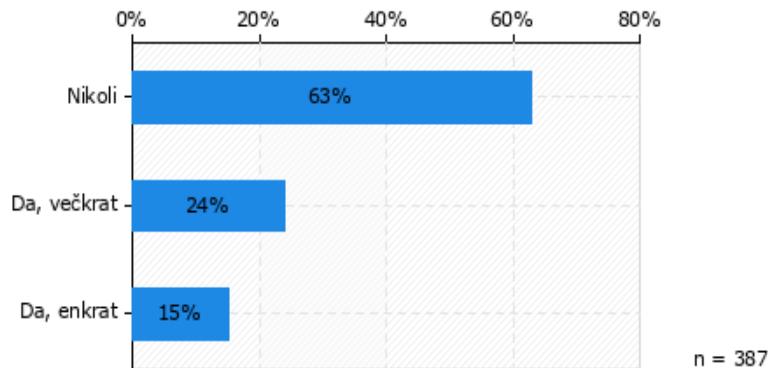
V navezovanju na prejšnje vprašanje smo želeli izvedeti tudi mnenje anketirancev o uporabi EC, kar prikazuje graf 4.



Graf 4: Mnenje mladostnikov o uporabi EC

Ugotovili smo, da je velika večina proti uporabi teh izdelkov, nekoliko manj mladih pa meni, da ve pre malo, da bi se lahko opredelili.

Pri naslednjem vprašanju smo želeli ugotoviti, koliko mladih je katero izmed elektronskih cigaret (EC) že poskusilo in ali jih uporablja redno. Iz grafa 5 lahko razberemo, da je EC poskusilo 39 % anketiranih.

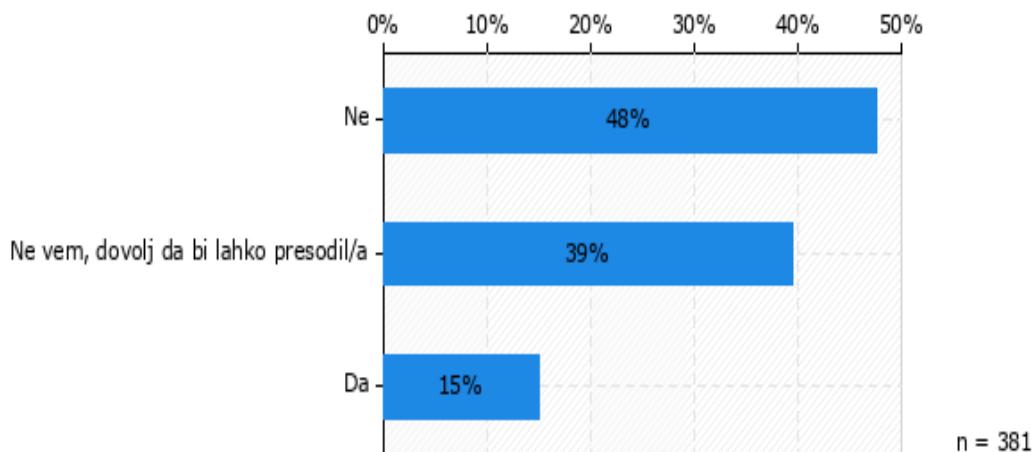


Graf 5: Uporaba EC med mladimi

K zgornjemu vprašanju smo dodali, kako pogosto tisti, ki kadijo, uporabljajo elektronsko cigaretto. Ugotovili smo, da je največje povpraševanje po elektronskih cigaretah (EC) med mladimi na zabavah, druženjih s prijatelji in ob drugih posebnih priložnostih. V nadaljevanju smo spraševali tudi po okusu oz. aromi, ki jo mladi uporabljajo pri uporabi, in ugotovili, da so najbolj priljubljene arome jagodičevja (grodje, jagoda, malina ipd.).

Povprašali smo tudi, ali morda kdo izmed družinskih članov kadi.

S tem vprašanjem smo želeli poiskati korelacijo med prisotnostjo kajenja drugih družinskih članov in mladostnika samega, kar je bilo v raziskavah že velikokrat potrjeno (Columbia University Irving Medical Center, 2015). Glede na naše rezultate korelacije ni mogoče potrditi zaradi velikega števila anketirancev, ki ne kadi.



Graf 6: Primerjava škodljivosti

Na grafu 6 je prikazano mnenje anketirancev o škodljivosti EC v primerjavi s klasičnimi cigaretami. Kar 48 % jih je mnenja, da EC ni manj škodljiva kot uporaba klasičnih, tobačnih. Tezo so zagovarjali s tem, da sestava EC ni popolnoma znana in da nekatere kemikalije še niso dovolj raziskane, da bi lahko zagotovo vedeli, ali so rakotvorne.

Kot razlog za kajenje je večina odgovorila, da so poskusili iz radovednosti. Pritegnila pa jih je tudi velika ponudba različnih arom oz. okusov.

Na vprašanje, kje mladi kupujejo tovrstne izdelke, je večina anketirancev odgovorila, da preko prijateljev, znancev, na bencinskih črpalkah, trafikah ali spletnih straneh.

V sklopu informiranosti mladih smo želeli izvedeti, kaj mladi menijo, da vsebujejo elektronske cigarete.

Velika večina je na to vprašanje odgovorila z "nikotin, tobak, vodna para, kemikalije", kar je v večini pravilno, nakazuje pa tudi na zmotno oglaševanje nekaterih ponudnikov (Q Vapehouse, 2023).

Glede vprašanja, ki se navezuje na predlog vlade o prepovedi vseh arom razen mentola in tobaka, vidimo, da je večina anketirancev neopredeljenih oz. jim je vseeno, iz česar ni možno

natančno razbrati, ali se z uvedbo zakona, ki bi prepovedoval uporabo arom v tekočinah za elektronske cigarete, strinjajo ali ne.

Iz ankete smo torej razbrali, da je kar 94 % udeležencev že slišalo za elektronske cigarete. Kar 39 % izmed njih je že poskusilo ali redno kadi elektronske cigarete.

6 DISKUSIJA

Z raziskovalno nalogo smo želeli raziskave glede EC razširiti na področje jeter, zanimala nas je potencialna citotoksičnost arom in propilen glikola ter njihov negativni vpliv na zdravje.

Na podlagi rezultatov lahko iz grafa 1 razberemo, da so vrednosti ROS pri M3 (6-% aroma mentola) in M4 (8-% aroma mentola) najvišje, kar pomeni da se sprošča več reaktivnih kisikovih radikalov. Več reaktivnih kisikovih radikalov pa vodi v oksidativni stres za celico, ki moti njeno delovanje. Iz grafa 2 je razvidno, da so najnižje vrednosti MTT pri M3 in M4, kar potrjujejo rezultati iz grafa 1, saj nižje vrednosti pri MTT pomenijo manj viabilnih celic. Razlike pri obeh metodah niso statistično pomembne ($p > 0,05$), vendar nakazujejo na trend negativnega delovanja mentola na celice.

Pri aromi tobaka smo opazili, da v primerjavi s kontrolo vrednosti ROS niso povisane tako kot pri aromi mentola. Tudi vrednosti MTT niso najnižje, kar pomeni, da imajo celice, ki so bile izpostavljene aromi tobaka, večjo viabilnost kot celice, izpostavljene aromi mentola. Na podlagi teh rezultatov lahko potrdimo svojo prvo hipotezo samo za aroma mentola.

Naši rezultati se skladajo z že izvedenimi raziskavami, saj so v študiji (Rickard idr., 2021) dokazali, da se je zmanjšala viabilnost celic po 30 in 90 minutah izpostavljenosti aromi mentola pri različnih koncentracijah (100 nM, 1 μ M, 500 μ M, 2.5 mM) v primerjavi s kontrolno skupino. Opazili so tudi, da je ponavljajoča se izpostavljenost aromi povzročila še večje zmanjšanje viabilnosti kot enkratna izpostavljenost.

V študiji (Yogeswaran idr., 2021) je bila aroma tobaka s 5-% nikotinom z najvišjimi vrednostmi ROS (merili so v μ M H_2O_2), na tretjem mestu pa je bila aroma mentola s 6-% nikotinom. Ugotovili so, da so vrednosti ROS bistveno višje pri aromah, ki so vsebovale nikotin. Naši rezultati nakazujejo, da so vrednosti ROS pri tobaku nižje kot pri mentolu, kar je nasprotno od pričakovanj, kot so jih pokazali v že opravljeni študiji. Razlikovanje v rezultatih lahko pripisemo napakam pri meritvi ali pa je bilo število celic v vodnjaku manjše od kontrolne (saj plošča ni bila popolnoma polna).

Na podlagi rezultatov lahko iz grafa 1 razberemo, da so vrednosti ROS najvišje pri PG3 (5 % propilen glikol) in PG4 (10 % propilen glikol), kar pomeni, da se sprošča več reaktivnih kisikovih radikalov, ki povzročajo oksidativni stres za celico (Schieber & Chandel, 2014). Iz grafa 2 je razvidno, da so najnižje vrednosti MTT pri PG3. Pri PG4 ni opazna zmanjšana viabilnost celic, so pa povišane vrednosti ROS, kar pomeni, da je prišlo do napake pri meritvi. Vzrok za takšen rezultat je lahko tudi različna občutljivost uporabljenih metod, namreč MTT metoda je manj občutljiva, kar lahko povzroči napačne informacije o citotoksičnosti (Jo idr., 2015).

Naši rezultati se skladajo z že narejenimi raziskavami, kljub temu da smo izbrali nižje koncentracije PG. Pri izbiri koncentracij smo se orientirali na že narejeno raziskavo (Rickard idr., 2021), kjer so uporabili 0,5-% ali 1-% mešanico propilen glikola in rastlinskega glicerina. Pri 0,5 % in 1 % mešanice propilen glikola in rastlinskega glicerina niso opazili zmanjšanje viabilnosti, kar se sklada tudi z našimi rezultati, saj pri 0,25 % in 1 % propilen glikolu ni opaznih povišanih vrednosti ROS in niti zmanjšane viabilnosti celic.

Večina raziskav je doslej obravnavala predvsem višje koncentracije propilen glikola, ali pa so izvedene v kombinaciji z rastlinskim glicerinom. Dokazano je bilo tudi uničenje (in poškodbe) celične membrane ob stiku s propilen glikolom, toksični učinki so bili vidni že po 2 urah izpostavljenosti (Morshed, idr., 1994).

Glede na naše rezultate so že pri 5 % PG opazne spremembe oz. povečano sproščanje reaktivnih kisikovih radikalov in zmanjšanje viabilnosti, kar potrjuje našo drugo hipotezo. Obstaja verjetnost, da se pri višjih koncentracijah PG ti učinki še stopnjujejo, kar lahko predstavlja potencialne škodljive učinke na zdravje. V študiji (Burstyn, 2014), ki to potrjuje, so ocenjene potencialne ravni izpostavljenosti PG pri uporabi e-cigaret, pri čemer so predpostavljeni ekstremni scenariji vključno z visoko porabo e-tekočine, in sicer 5–25 ml/dan in visokimi vsebnostmi propilen glikola v tekočini (50–95 %). Ugotovljeno je bilo, da so se ravni vdihanega propilen glikola gibale med 1 in 6 mg/m³. Pri tej predpostavki je bilo upoštevano, da se propilen glikol v celoti absorbira pri vdihavanju. Na podlagi ugotovitev je bilo ocenjeno, da izpostavljenost propilen glikolu presegajo mejne vrednosti TLV (povprečna koncentracija, ki jo oseba lahko vdihne v določenem časovnem obdobju brez škodljivih učinkov na zdravje), kar povzroča zaskrbljenost za zdravje zaradi potencialnih tveganj.

Našo tretjo hipotezo lahko potrdimo, saj rezultati ankete nakazujejo, da je kar 94 % anketiranih že slišalo za pojem elektronska cigareta. Ta podatek lahko razumemo kot veliko zanimanje mladih za tovrstne izdelke. Velik del tega zanimanja lahko pripisemo različnim vonjem in okusom, ki jih e-cigarete omogočajo, mladim pa se zdijo veliko bolj mamljive kot navadne cigarete (Martinelli & Taskiran, 2023).

Kar 39 % jih je EC vsaj poskusilo, od tega jih 24 % EC uporablja redno. Večina je seznanjena s pojmom elektronska cigareta, vendar smo z nadaljnimi vprašanji ankete ugotovili, da mladi ne vedo veliko o sestavi EC, morebitnih zdravstvenih učinkih itd. Iz rezultatov ankete je razvidno, da 32 % anketiranih nima dovolj informacij, da bi se lahko jasno opredelili za ali proti uporabi EC. Podobno so odgovorili tudi pri vprašanju o primerjavi škodljivosti EC in klasične tobačne cigarete, kjer jih je 39 % odgovorilo z »ne vem dovolj, da bi lahko presodil/a«. Rezultati kažejo na pomanjkanje znanja in informacij glede uporabe EC, kar lahko vodi v neustrezne odločitve in težave pri presojanju morebitnih tveganj ob uporabi.

Naši rezultati se skladajo z že narejenimi raziskavami, v študiji (Koprivnikar in dr., 2018) poročajo, da je 37 % anketiranih uporabilo EC kadarkoli v življenju, 12 % jih je EC uporabilo v zadnjih 30 dneh, 5 % pa EC uporablja vsaj enkrat na teden. Prav tako šolski delavci opažajo razširjenost in porast uporabe EC med učenci in dijaki.

Glede na te podatke smo v anketi pričakovali večji delež tistih, ki kadijo, vendar se je izkazalo, da je dejanski delež kadičev manjši od pričakovanj. Zaskrbljujoče je, da kar 68 % staršev ne ve, da njihovi otroci kadijo, s tem da moramo upoštevati, da 26 % anketirancev na to vprašanje ni želelo odgovoriti. Nevednost staršev o kajenju njihovih otrok lahko prispeva k vzpostavitvi rutinskega vzorca kajenja. Zaskrbljujoče je tudi dejstvo, da večina ljudi ni vedelo, katere spojine so v resnici vsebovane v EC. Mladi pogosto niso ozaveščeni o sestavinah, ki so v EC, kar lahko vodi v pomanjkanje razumevanja o škodljivih posledicah kajenja, zato se zavzemamo, da bi se na tem področju izvedlo več raziskav, v izobraževalnih ustanovah pa bi se o morebitnih negativnih posledicah kajenja e-cigaret govorilo več.

6.1 Vrednotenje metode

Pri obeh zgoraj opisanih metodah (MTT in DCHF-da za merjenje prostih kisikovih radikalov) smo meritev izvedli samo enkrat, pri vsaki testni koncentraciji smo izvedli le 3 ponovitve. Zanesljivost podatkov bi bila zagotovo večja, če bi meritve ponovili večkrat, za vsako koncentracijo pa bi bilo treba izvesti več ponovitev oz. napolniti več vodnjakov.

Do napake je prišlo tudi pri odmerjanju mešanice testnih koncentracij pri aromi vanilje, posledično so bili rezultati neveljavni, zato smo se odločili, da jo izločimo iz raziskave.

V prihodnje bi želeli poskus razširiti še na druge arome in proizvajalce, kar bi omogočilo boljše razumevanje raznolikosti vpliva različnih vrst arom ter proizvodnih metod.

Zanimivo bi bilo tudi izbrati večji nabor koncentracij, da bi bila morebitna toksičnost bolj očitna. S tem bi pridobili širši vpogled v potencialne učinke in biološke odzive na sestavine etekočin.

7 ZAKLJUČEK

V raziskavi smo se ukvarjali s potencialnim negativnim vplivom e-tekočin, ki se uporabljajo v EC (elektronskih cigaretah), na človeške neparenhimske jetrne celice. Predvsem smo se osredotočili na povišanje vrednosti prostih kisikovih radikalov (ROS) in zmanjšanje celične viabilnosti, ki smo jo izmerili z mitohondrijsko aktivnostjo (MTT).

Ne glede na to, da so EC na tržišču še dokaj nove, je njihov citotoksični vpliv na celice pljučnega epitela že dobro raziskan (MuChun in dr., 2020). Glede na to, da imajo jetra ključno vlogo pri razgrajevanju snovi in toksinov v telesu, smo želeli naše raziskovanje razširiti na človeške neparenhimske celice.

V raziskovalni nalogi smo dokazali, da propilen glikol in aroma mentola povečata prisotnost ROS, kar lahko moti normalno delovanje celice in njenega metabolizma. Celici povzročata oksidativni stres, kar vodi v porušenje homeostaze ali poškodbe celičnih struktur (Snezhkina in dr., 2019).

Dokazali smo tudi, da propilen glikol in aroma mentola zmanjšata viabilnost celic. To smo dokazali z metodo mitohondrijske aktivnosti (MTT), kjer je bila absorbanca manjša.

Z raziskovalno nalogo smo pripomogli k širjenju znanja na tem področju in opozorili na nevarnost uporabe tovrstnih izdelkov. Dokazali smo, da so tekočine za elektronske cigarete potencialno citotoksične, saj višajo vrednosti prostih kisikovih radikalov v celici in nižajo celično viabilnost.

8 DRUŽBENA ODGOVORNOST

Za raziskovalno nalogo smo se odločili prav zaradi skrb vzbujajoče pogostosti uporabe raznih elektronskih cigaret, sploh pri mladostnikih. Najmlajši izmed uporabnikov namreč obiskujejo drugo triado osnovne šole, različni puffi in vejpi, ki jih mnogi učenci in dijaki prinašajo s seboj, pa motijo normalno delovanje in potek pouka (Ferlin, 2022). Med brskanjem po literaturi smo zasledili tudi najrazličnejše spletni strani, ki z lažnimi reklamami in promocijami vabijo k uporabi njihovih zdravju škodljivih izdelkov. Na spletni strani:

<https://sl.smoko.com/blogs/why-use-an-e-cigarette/vape-juice-everything-you-need-to-know>

smo celo zasledili brezplačni začetniški paket, ki kupca uvede v svet elektronskega kajenja.

Na raznih forumih smo našli tudi razne "recepte" mešanja tekočin, s pomočjo katerih smo izbirali naše testne koncentracije. Vredno je tudi poudariti, da večine sestavnih delov e-cigaret ali vejgov za enkratno uporabo ni možno reciklirati, kar predstavlja velik ekološki problem (Q Vapehouse, 2023). Nepravilno reciklirana baterija lahko privede do samovžiga, kar predstavlja nevarnost tako za posameznika kot okolje.

Uporaba tovrstnih izdelkov torej škoduje zdravju in prispeva k onesnaževanju okolja. Z našo nalogo smo želeli opozoriti na nevarnosti, ki jih lahko prinaša uporaba e-cigaret in hkrati pozivamo, naj se na tem področju izvede še več raziskav. Prav tako bomo tudi sami na informativnih dnevih in na drugih šolah ozaveščali mladostnike o škodljivi rabi EC s predstavitevijo raziskovalne naloge.

9 BIBLIOGRAFIJA

- American Lung Association. (2023). *The Impact of E-Cigarettes on the Lung*. Pridobljeno 11. februar 2024 iz American Lung Association: <https://www.lung.org/quit-smoking/e-cigarettes-vaping/impact-of-e-cigarettes-on-lung>
- Arya, S. S., Rookes, J. E., Cahill, D. M., & Lenka, S. K. (2021). *Vanillin: a review on the therapeutic prospects of a popular flavouring molecule*. Pridobljeno 4. februar 2024 iz National Library of Medicine: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7790484/>
- Benowitz, N. L. (2008). *Neurobiology of nicotine addiction: implications for smoking cessation treatment*. Pridobljeno 3. februar 2024 iz National Library of Medicine: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18342164/>
- Benowitz, N. L. (2009). *Pharmacology of Nicotine: Addiction, Smoking-Induced Disease, and Therapeutics*. Pridobljeno 3. februar 2024 iz National Library of Medicine: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2946180/>
- Benowitz, N. L., Hukkanen, J., & Jacob III, P. (2009). *Nicotine Chemistry, Metabolism, Kinetics and Biomarkers*. Pridobljeno 3. februar 2024 iz ResearchGate: https://www.researchgate.net/publication/23966405_Nicotine_Chemistry_Metabolism_Kinetics_and_Biomarkers
- Bornhorst, J. A., & Mbughuni, M. M. (2019). *Chapter 3 - Alcohol Biomarkers: Clinical Issues and Analytical Methods*. Pridobljeno 3. februar 2024 iz ScienceDirect: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780128156070000034>
- Boron, W. F., & Boulpaep, E. L. (2012). *Medical physiology: a cellular and molecular approach* (2nd updated izd.). Philadelphia: Saunders, Elsevier.
- Burstyn, I. (2014). *Peering through the mist: systematic review of what the chemistry of contaminants in electronic cigarettes tells us about health risks*. Pridobljeno 7. februar 2024 iz BMC Public Health: <https://bmcpublichealth.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2458-14-18>
- Carl Roth. (2018). *Safety Data Sheet - Menthol*. Pridobljeno 4. februar 2024 iz Carl Roth: <https://www.carlroth.com/medias/SDB-8391-IE-EN.pdf?context=bWFzdGVyfHNIY3VyaXR5RGF0YXNoZWV0c3wyNTExNjN8YXBwbGljYXRpb24vcGRmfHNIY3VyaXR5RGF0YXNoZWV0cy9oOWEvaDFhLzkwNzUwNzkyNDk5NTAucGRmfGQwOTQ0OTQ1ZTczNzI5NjQzMdkzYzNiMzg1YzZIMzUwZTA0OGZkMjM5NzE2NDdmY2YyZDk5>
- Chandra, D., Bogdanoff, R. F., Bowler, R. P., & Benam, K. H. (2023). *Electronic cigarette menthol flavoring is associated with increased inhaled micro and sub-micron particles and worse lung function in combustion cigarette smokers*. Pridobljeno 4. februar 2024 iz National Library of Medicine: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37038183/>
- ChemSrc. (2024). *Tobacco dodecane*. Pridobljeno 6. februar 2024 iz ChemSrc: https://www.chemsrc.com/en/cas/1209-61-6_601009.html
- Chen, W., Wang, P., Ito, K., Fowles, J., Shusterman, D., Jaques, P. A., & Kumagai, K. (2018). *Measurement of heating coil temperature for e-cigarettes with a "top-coil" clearomizer*.

Pridobljeno 20. januar 2024 iz National Library of Medicine:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5908153/>

Clapp, P. W., Peden, D. B., & Jaspers, I. (2019). *E-cigarettes, vaping-related pulmonary illnesses, and asthma: A perspective from inhalation toxicologists*. Pridobljeno 2. februar 2024 iz Journal of Allergy and Clinical Immunology: [https://www.jacionline.org/article/S0091-6749\(19\)31482-4/fulltext](https://www.jacionline.org/article/S0091-6749(19)31482-4/fulltext)

Cleveland Clinic. (2023). *Lactic Acidosis*. Pridobljeno 4. februar 2024 iz Cleveland Clinic: <https://my.clevelandclinic.org/health/diseases/25066-lactic-acidosis>

Columbia University Irving Medical Center. (2015). *If Mom or Dad Is a Smoker, Their Teenager Is More Likely To Be a Smoker Too*. Pridobljeno 7. februar 2024 iz Columbia University Irving Medical Center: <https://www.publichealth.columbia.edu/news/if-mom-or-dad-smoker-their-teenager-more-likely-be-smoker-too>

DataScientest. (2021). *Data normalization: How this concept is related to Data Science?* Pridobljeno 11. februar 2024 iz DataScientest: <https://datascientest.com/en/hello-daniel-what-is-data-normalization>

Društvo za zdravje srce in ožilja Slovenija. (2021). *Kajenje in tesnoba*. Pridobljeno 11. februar 2024 iz Društvo za zdravje srce in ožilja Slovenija: <https://zascrce.si/clanek/kajenje-in-tesnoba/>

Ferlin, Š. (2022). *Vejpanje kar pred učitelji med poukom*. Pridobljeno 7. februar 2024 iz Dnevnik: <https://www.dnevnik.si/1043003562>

Goriounova, N. A., & Mansvelder, H. D. (2012). *Short- and Long-Term Consequences of Nicotine Exposure during Adolescence for Prefrontal Cortex Neuronal Network Function*. Pridobljeno 2. februar 2024 iz National Library of Medicine: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3543069/>

Harber, P., Saechao, K., & Boomus, C. (2006). *Diacetyl-Induced Lung Disease*. Pridobljeno 5. februar 2024 iz Springer Link: <https://link.springer.com/article/10.2165/00139709-200625040-00006>

Hecht, S. S., & Hoffmann, D. (1988). *Tobacco-specific nitrosamines, an important group of carcinogens in tobacco and tobacco smoke*. Pridobljeno 6. februar 2024 iz National Library of Medicine: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3286030/>

Hooijsscher, J. H. (2023). *FLUORESCENCE SPECTROMETRY*. Pridobljeno 6. februar 2024 iz Chromedia Analytical Sciences: https://www-chromedia-org.translate.goog/chromedia?waxtrapp=mkqjtbEsHiemBpdmBIIEcCArB&subNav=cczbdbEsHiemBpdmBIIEcCArBP&_x_tr_sl=en&_x_tr_tl=sl&_x_tr_hl=sl&_x_tr_pto=sc

Hutzler, C., Paschke, M., Kruschinski, S., Henkler, F., Hahn, J., & Luch, A. (2014). *Chemical hazards present in liquids and vapors of electronic cigarettes*. Pridobljeno 3. februar 2024 iz National Library of Medicine: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24958024/>

Jaegers, N. R., Hu, W., Weber, T. J., & Hu, J. Z. (2021). *Low-temperature (< 200 °C) degradation of electronic nicotine delivery system liquids generates toxic aldehydes*. Pridobljeno 2. februar 2024 iz Nature: <https://www.nature.com/articles/s41598-021-87044-x>

- Javed, S., Usmani, S., Sarfraz, Z., Sarfraz, A., Hanif, A., Firoz, A., . . . Ahmedl, S. (2022). *A Scoping Review of Vaping, E-Cigarettes and Mental Health Impact: Depression and Suicidality*. Pridobljeno 4. februar 2024 iz National Library of Medicine: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9195082/>
- Jo, H. Y., Kim, Y., Park, H. W., Moon, H. E., Bae, S., Kim, J., . . . Paek, S. H. (2015). *The Unreliability of MTT Assay in the Cytotoxic Test of Primary Cultured Glioblastoma Cells*. Pridobljeno 7. februar 2024 iz Experimental Neurobiology: <https://www.en-journal.org/journal/view.html?uid=276>
- Johns Hopkins Medicine. (2019). *Liver: Anatomy and Functions*. Pridobljeno 26. januar 2024 iz Johns Hopkins Medicine: <https://www.hopkinsmedicine.org/health/conditions-and-diseases/liver-anatomy-and-functions>
- Kamatou, G. P., Vermaak, I., Viljoen, A. M., & Lawrence, B. M. (2013). *Menthol: a simple monoterpenoid with remarkable biological properties*. Pridobljeno 4. februar 2024 iz National Library of Medicine: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24054028/>
- Katz, A., & Yaghoubian, L. L. (2021). *The Effects of Smoking Cigarettes, Marijuana, and E-Cigarettes on Fertility*. Pridobljeno 5. februar 2024 iz Yeshiva Academic Institutional Repository: <https://repository.yu.edu/handle/20.500.12202/6895>
- Kienhuis, A. S., Soeteman-Hernandez, L. G., Bos, P. M., Cremers, H. W., Klerx, W. N., & Talhout, R. (2015). *Potential harmful health effects of inhaling nicotine-free shisha-pen vapor: a chemical risk assessment of the main components propylene glycol and glycerol*. Pridobljeno 3. februar 2024 iz National Library of Medicine: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26120296/>
- Ko, T.-J., & Kim, S. A. (2022). *Effect of Heating on Physicochemical Property of Aerosols during Vaping*. Pridobljeno 20. januar 2024 iz National Library of Medicine: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8835267/>
- Koprivnikar, H., & Tina, Z. (2018). *UPORABA ELKTRONSKIH CIGARET MED DIJAKI 2. LETNIKOV SREDNJIH ŠOL IN ŠTUDENTI ZDRAVSTVENIH VED V SLOVENIJI, 2017*. Pridobljeno 11. februar 2024 iz NIJZ: https://nijz.si/wp-content/uploads/2022/07/e_cigarette Raz_dij_stud_2017.pdf
- Koprivnikar, H., Roškar, M., Orožen, K., & Zupanič, T. (2018). *KAJ BI BILO DOBRO, DA BI STARŠI IN VSI, KI DELAJO Z MLADOSTNIKI, VEDELI O ELEKTRONSKIH CIGARETAH, VODNIH PIPAH IN NOVIH TOBAČNIH IZDELKIH*. Ljubljana: Kočevski tisk d. d., Kočevje.
- Koprivnikar, H., Zupanič, T., & Lainščak, F. J. (2020). *ELEKTRONSKE CIGARETE – podrobnejše informacije za zdravstvene delavce*. Pridobljeno 28. december 2023 iz NIJZ: https://nijz.si/wp-content/uploads/2022/07/elektronske_cigaretete_podrobnejse_info_za_zdr_delavce.pdf
- Krüsemann, E. J., Havermans, A., Pennings, J. L., Graaf, K. d., Boesveldt, S., & Talhout, R. (2021). *Comprehensive overview of common e-liquid ingredients and how they can be used to predict an e-liquid's flavour category*. Pridobljeno 8. januar 2024 iz National Library of Medicine: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32041831/>
- Lagruel, G., Branellec, A., & Lebargy, F. (1993). *Toxicology of tobacco*. Pridobljeno 5. februar 2024 iz National Library of Medicine: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8235355/>
- Lerner, C. A., Sundar, I. K., Yao, H., Gerloff, J., Ossip, D. J., McIntosh, S., . . . Rahman, I. (2015). *Vapors produced by electronic cigarettes and e-juices with flavorings induce toxicity, oxidative stress,*

- and inflammatory response in lung epithelial cells and in mouse lung.* Pridobljeno 3. februar 2024 iz National Library of Medicine: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25658421/>
- Litchfield, J. (2009). *Lactic acid, Microbially Produced.* Pridobljeno 4. februar 2024 iz ScienceDirect: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780123739445001516>
- Malo, P. M., & Urquhart, E. A. (2016). *Fermented Foods: Use of Starter Cultures.* Pridobljeno 4. februar 2024 iz ScienceDirect: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780123849472002828>
- Martinelli, K., & Taskiran, S. (2023). *Teen Vaping: What You Need to Know.* Pridobljeno 11. februar 2024 iz Child Mind Institute: <https://childmind.org/article/teen-vaping-what-you-need-to-know/>
- McEwen, A., & McRobbie, H. (2016). *Elektronske cigarete: navodila službam za pomoč pri opuščanju kajenja.* Pridobljeno 10. februar 2024 iz Združenje Vejperjev Slovenije: <https://zv-slo.si/wp-content/uploads/2016/03/Elektronske-cigarete-navodila-slu%C5%BEbam-za-pomo%C4%8D-pri-opu%C5%A1%C4%8DDanju-kajenja.pdf>
- McMurtrey, J. E. (2023). *Tobacco.* Pridobljeno 5. februar 2024 iz Britannica: <https://www.britannica.com/plant/common-tobacco>
- Merck. (2023). *MTT Assay Protocol for Cell Viability and Proliferation.* Pridobljeno 18. januar 2024 iz Sigma Aldrich: <https://www.sigmaaldrich.com/SL/en/technical-documents/protocol/cell-culture-and-cell-culture-analysis/cell-counting-and-health-analysis/cell-proliferation-kit-i-mtt>
- Mishra, S., & Mishra, M. (2013). *Tobacco: Its historical, cultural, oral, and periodontal health association.* Pridobljeno 11. februar 2024 iz National Library of Medicine: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3894096/>
- Morshed, K. M., Jain, S. K., & McMartin, K. E. (1994). *Acute Toxicity of Propylene Glycol: An Assessment Using Cultured Proximal Tubule Cells of Human Origin.* Pridobljeno 7. februar 2024 iz ScienceDirect: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0272059084710761>
- MuChun, T., Min, K. B., John, S., & Alexander M.D., L. E. (2020). *Effects of e-cigarettes and vaping devices on cardiac and pulmonary physiology.* Pridobljeno 11. februar 2024 iz The Physiological Society: <https://physoc.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1113/JP279754>
- Muthumalage, T., Prinz, M., Ansah, K. O., Gerloff, J., Sundar, I. K., & Rahman, I. (2018). *Inflammatory and Oxidative Responses Induced by Exposure to Commonly Used e-Cigarette Flavoring Chemicals and Flavored e-Liquids without Nicotine.* Pridobljeno 4. februar 2024 iz National Library of Medicine: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29375399/>
- National Academies of Sciences, E. a., Division, H. a., Practice, B. o., & Systems, C. o. (2018). *Public Health Consequences of E-Cigarettes.* Pridobljeno 9. januar 2024 iz National Library of Medicine: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507184/>
- National Institutes of Health. (2022). *E-cigarettes linked with blood vessel damage.* Pridobljeno 11. februar 2024 iz National Institutes of Health: <https://www.nih.gov/news-events/nih-research-matters/e-cigarettes-linked-blood-vessel-damage>

- NIJZ. (2023). *Elektronske cigarete - Pogosta vprašanja*. Pridobljeno 11. november 2023 iz NIJZ:
<https://nijz.si/zivljenjski-slog/tobacni-in-povezani-izdelki/elektronske-cigarete-pogosta-vprasanja/>
- NIJZ. (2023). *Nikotin in zasvojenost – Informacije za mladostnike*. Pridobljeno 25. januar 2024 iz NIJZ:
<https://nijz.si/zivljenjski-slog/tobacni-in-povezani-izdelki/nikotin-in-zasvojenost-informacije-za-mladostnike/>
- Nikon. (2023). *Basic Cell Culture Processes and Procedures*. Pridobljeno 6. februar 2024 iz Nikon:
<https://www.healthcare.nikon.com/en/ss/cell-image-lab/knowledge/process.html>
- Pohanka, M. (2020). *D-Lactic Acid as a Metabolite: Toxicology, Diagnosis, and Detection*. Pridobljeno 11. februar 2024 iz National Library of Medicine:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7320276/>
- PubChem. (2004). *Glycerin*. Pridobljeno 8. januar 2024 iz National Library of Medicine:
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Glycerin>
- PubChem. (2004). *Lactic Acid*. Pridobljeno 4. februar 2024 iz National Library of Medicine:
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Lactic-Acid>
- PubChem. (2004). *Nicotine*. Pridobljeno 9. januar 2024 iz National Library of Medicine:
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/89594>
- PubChem. (2004). *Propylene Glycol*. Pridobljeno 7. januar 2024 iz National Library of Medicine:
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Propylene-Glycol>
- PubChem. (2004). *Vanillin*. Pridobljeno 4. februar 2024 iz National Library of Medicine:
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Vanillin>
- PubChem. (2005). *4,9,12,12-Tetramethyl-5-oxatricyclo[8.2.0.04,6]dodecane*. Pridobljeno 5. februar 2024 iz National Library of Medicine: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/102579>
- PubChem. (2005). *Menthol*. Pridobljeno 4. februar 2024 iz National Library of Medicine:
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Menthol>
- Q Vapehouse. (2023). *Naprave za enkratno uporabo: Prednosti in slabosti*. Pridobljeno 3. februar 2024 iz Q Vapehouse: <https://www.qvapehouse.com/si/2023/08/naprave-za-enkratno-uporabo-prednosti-in-slabosti/>
- Q Vapehouse. (2023). *PG vs VG: Obsežen vodnik o osnovnih sestavinah e-tekočin*. Pridobljeno 28. december 2023 iz Q Vapehouse: <https://www.qvapehouse.com/si/2023/05/pg-vs-vg-obsezen-vodnik-o-osnovnih-sestavinah-e-tekocin/>
- Q Vapehouse. (2023). *Prvi koraki*. Pridobljeno 9. januar 2024 iz Q Vapehouse:
<https://www.qvapehouse.com/si/prvi-koraki/>
- Q Vapehouse. (2023). *Razkrivanje zavajajočih trditev, da uporaba e-cigaret povzroča raka*. Pridobljeno 2. februar 2024 iz Q Vapehouse:
<https://www.qvapehouse.com/si/2023/04/razkrivanje-zavajajocih-trditev-da-uporaba-e-cigaret-povzroca-raka/>

- Renne, R. A., Wehner, A. P., Greenspan, B. J., Deford, H. S., Ragan, H. A., Westerberg, R. B., . . . Mosberg, A. T. (2008). *2-Week and 13-Week Inhalation Studies of Aerosolized Glycerol in Rats*. Pridobljeno 3. februar 2024 iz Taylor and Francis Online: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/08958379209145307>
- Rickard, B. P., Henry, H., Tiley, J. B., Jaspers, I., & Brouwer, K. L. (2021). *E-Cigarette Flavoring Chemicals Induce Cytotoxicity in HepG2 Cells*. Pridobljeno 26. januar 2024 iz National Library of Medicine: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7970492/>
- Ritz, E., & Heidland, A. (1977). *Lactic acidosis*. Pridobljeno 4. februar 2024 iz National Library of Medicine: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/872461/>
- Santhakumar, S. (2021). *What to know about vegetable glycerin*. Pridobljeno 3. februar 2024 iz Medical News Today: <https://www.medicalnewstoday.com/articles/vegetable-glycerin>
- Schieber, M., & Chandel, N. S. (2014). *ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress*. Pridobljeno 7. februar 2024 iz National Library of Medicine: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4055301/>
- Schieber, M., Chandel, & S., N. (2014). *ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress*. Pridobljeno 11. februar 2024 iz National Library of Medicine: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4055301/>
- Slovenski medicinski slovar. (2012). *Glukoneogeneza*. Pridobljeno 4. februar 2024 iz Termania: <https://www.termania.net/slovarji/slovenski-medicinski-slovar/5517057/glukoneogeneza>
- SMOKO E-Cigarettes. (2021). *What exactly is in Vape juice*. Pridobljeno 17. januar 2024 iz SMOKO E-Cigarettes: <https://sl.smoko.com/blogs/why-use-an-e-cigarette/vape-juice-everything-you-need-to-know>
- Snezhkina, A. V., Kudryavtseva, A. V., Kardymon, O. L., Savvateeva, M. V., Melnikova, N. V., Krasnov, G. S., & Dmitriev, A. A. (2019). *ROS Generation and Antioxidant Defense Systems in Normal and Malignant Cells*. Pridobljeno 7. februar 2024 iz National Library of Medicine: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6701375/>
- T.K.B. (2023). *NIJZ: Prodajo elektronskih cigaret in nikotinskih vrečk čim prej omejiti, arome pa prepovedati*. Pridobljeno 26. januar 2024 iz MMC RTV SLO: <https://www.rtvslo.si/zdravje/nijz-prodajo-elektronskih-cigaret-in-nikotinskih-vreck-cim-prej-omejiti-arome-pa-prepovedati/685929>
- Thermo Fisher Scientific. (2023). *Atomic Absorption Spectroscopy*. Pridobljeno 6. februar 2024 iz Thermo Fisher Scientific: <https://www.thermofisher.com/si/en/home/industrial/spectroscopy-elemental-isotope-analysis/trace-elemental-analysis/atomic-absorption-aa-spectroscopy.html>
- Waldmann, M. S. (2011). *Veliki atlas anatomije*. Tržič: Učila International.
- Wang, L., Zhan, Y., Li, Q., Zeng, D. D., Leischow, S. J., & Okamoto, J. (2015). *An Examination of Electronic Cigarette Content on Social Media: Analysis of E-Cigarette Flavor Content on Reddit*. Pridobljeno 3. februar 2024 iz National Library of Medicine: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4661688/>

- Welz, C., Canis, M., Schwenk-Zieger, S., Becker, S., Stucke, V., Ihler, F., & Baumeister, P. (2016). *Cytotoxic and Genotoxic Effects of Electronic Cigarette Liquids on Human Mucosal Tissue Cultures of the Oropharynx*. Pridobljeno 2. februar 2024 iz National Library of Medicine: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27992314/>
- Widysanto, A., Combest, F. E., Dhakal, A., & Saadabadi, A. (2023). *Nicotine Addiction*. Pridobljeno 5. februar 2024 iz National Library of Medicine: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499915/>
- Wieslander, G., Norback, D., & Lindgren, T. (2001). *Experimental exposure to propylene glycol mist in aviation emergency training: acute ocular and respiratory effects*. Pridobljeno 3. februar 2024 iz National Library of Medicine: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1740047/>
- Wu, D., & Yotnda, P. (2011). *Production and detection of reactive oxygen species (ROS) in cancers*. Pridobljeno 10. februar 2024 iz National Library of Medicine: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22127014/>
- Yang, S., & Lian, G. (2019). *ROS and diseases: role in metabolism and energy supply*. Pridobljeno 6. februar 2024 iz National Library of Medicine: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7089381/>
- Yogeswaran, S., Muthumalage, T., & Rahman, I. (2021). *Comparative Reactive Oxygen Species (ROS) Content among Various Flavored Disposable Vape Bars, including Cool (Iced) Flavored Bars*. Pridobljeno 7. februar 2024 iz National Library of Medicine: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8538728/>

10 SLIKOVNI VIRI

Slika 1: [elektronske cigarete podrobnejse info za zdr delavce.pdf \(nijz.si\)](#) (10.2.2024)

Slika 2: [elektronske cigarete podrobnejse info za zdr delavce.pdf \(nijz.si\)](#) (10.2.2024)

Slika 3: lastni vir (11.2.2024)

Slika 4: [Nicotine | C10H14N2 | CID 89594 - PubChem \(nih.gov\)](#) (10.2.2024)

Slika 5: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10228557/> (10.2.2024)

Slika 6: [Vaping and Lung Inflammation and Injury - PMC \(nih.gov\)](#) (10.2.2024)

Slika 7: <https://www.hopkinsmedicine.org/health/conditions-and-diseases/liver-anatomy-and-functions> (10.2.2024)

Slika 8: [Role of Kupffer cells in host defense and liver disease - Bilzer - 2006 - Liver International - Wiley Online Library](#) (10.2.2024)

Slika 9: [Stellate Cell Hyperplasia | Basicmedical Key](#) (10.2.2024)

Slika 10: [histo sinusoids.html](#) (10.2.2024)

Slika 11: lastni vir (10.2.2024)

Slika 12: lastni vir (10.2.2024)

SEZNAM PRILOG

PRILOGA I: Anketni vprašalnik

PRILOGA II: Seznam šol, vključenih v anketno raziskavo

PRILOGA I:

Q1 - Spol

Možnih je več odgovorov

Moški

Ženski

Q2 - Katero šolo obiskuješ?

Možnih je več odgovorov

Osnovno šolo

Srednjo šolo

Q3 - Katero šolo obiskuješ?

Možnih je več odgovorov

I. gimnazija Maribor

II. gimnazija Maribor

Konservatorij za glasbo in balet Maribor

Škofijska gimnazija Maribor

SERŠ Maribor

OŠ Antona Irgoliča Spodnja Polskava

OŠ Franceta Prešerna Maribor

OŠ Selnica ob Dravi

OŠ Pohorskega odreda Slovenska Bistrica

OŠ Pesnica

OŠ Franca Rozmana-Staneta Maribor

OŠ Rada Robiča Limbuš

OŠ Ludvika Pliberška Maribor

Q4 - Starost

Možnih je več odgovorov

10 let ali manj

11–12 let

13–14 let

15–16 let

17–18 let

18 let ali več

Q5 - Ali si že kdaj slišal za e-cigareto/puff/vape?

Možnih je več odgovorov

Da

Ne

Q6 - Kakšno je tvoje mnenje o e-cigaretah/puff-ih/vape-ih?

Možnih je več odgovorov

Sem proti uporabi teh izdelkov.

Sem za uporabo teh izdelkov.

Sem neopredeljen/a – nisem niti za niti proti njihovi uporabi.

Q7 - Ali si že kdaj poskusil katerega izmed zgoraj naštetih izdelkov?

Možnih je več odgovorov

Da, večkrat

Da, enkrat

Nikoli

Q8 - Kako pogosto uporabljaš tovrstne izdelke?

Možnih je več odgovorov

Vsak dan

Večkrat na teden

Ob posebnih priložnostih (zabave, druženje s prijatelji ipd.)

Nikoli

Q9 - Ali starši vedo, da kadiš?

Možnih je več odgovorov

- Da
- Ne
- Ne želim odgovoriti

Q10 - Kateri okus oz. aromo uporabljaš pri kajenju?

Možnih je več odgovorov

Jagodičevje

Tropsko sadje

Drugo sadje

Sladice

Sladkarije

Tobak

Mentol

Pijsače

Drugo:

Q11 - Ali kdo od družinskih članov, s katerimi živiš, kadi (klasične ali elektronske cigarete)?

Možnih je več odgovorov

Da

Ne

Q12 - Ali se ti zdi uporaba e-cigaret/puff-ov/vape-ov manj škodljiva od uporabe klasičnih cigaret?

Možnih je več odgovorov

Da

Ne

Ne vem, dovolj, da bi lahko presodil/a

Q13 - Utemelji svoj odgovor na prejšnje vprašanje.

Q14 - Zakaj si se odločil za uporabo tovrstnih izdelkov?

Možnih je več odgovorov

- zaradi radovednosti, potem mi je postalo všeč
- ker se mi zdijo manj škodljivi kot klasične cigarete
- ker jih uporabljam tudi prijatelji
- ker se mi zdi uporabo teh izdelkov lažje skriti pred starši
- zaradi okusa oz. arome
- Drugo:

Q15 - Kdo ti kupuje izdelke?

Možnih je več odgovorov

- Sam/a
- Starši
- Stari starši
- Prijatelji
- Bratje/sestre
- Učenci višjih razredov
- Drugo:

Q16 - Kje kupuješ tovrstne izdelke?

Možnih je več odgovorov

- V trgovinah, ki prodajajo te izdelke (Vape shop-i)
- Preko spletnih objav na socialnih omrežjih (Instagram, Snapchat...)
- Pri sovrstnikih
- Pri učencih višjih razredov
- Preko spletnih trgovin, ki prodajajo te izdelke
- Drugo:

Q17 - Naštej nekaj snovi, za katere misliš, da se nahajajo v dimu e-cigaret?

Q18 - Ali se strinjaš z novim predlogom vlade, da bi ukinili različne arome, razen mentola in tobaka?

Možnih je več odgovorov

- Strinjam se
- Ne strinjam se
- Ne vem niti za kaj se gre
- Vseeno mi je

PRILOGA II:

I. gimnazija Maribor

II. gimnazija Maribor

Konservatorij za glasbo in balet Maribor

Škofijska gimnazija Maribor

SERŠ Maribor

OŠ Antona Irgoliča Spodnja Polskava

OŠ Franceta Prešerna Maribor

OŠ Selnica ob Dravi

OŠ Pohorskega odreda Slovenska Bistrica

OŠ Pesnica

OŠ Franca Rozmana-Staneta Maribor

OŠ Rada Robiča Limbuš

OŠ Ludvika Pliberška Maribor