



Gimnazija Bežigrad

Peričeva ulica 4

1000 Ljubljana

Vejp: nedolžen trend ali zdravstvena grožnja prihodnosti?

Biologija

Raziskovalna naloga

Raziskovalka: Monika Minjovič, 3. C
Mentor: Gregor Križ, mag. prof.
Somentorici: doc. dr. Metka Novak,
dr. Martina Štampar

Ljubljana, 2024/2025

POVZETEK

Namen moje raziskovalne naloge je bil raziskati ozaveščenost in navade mladih v povezavi z vejpanjem ter ugotoviti, ali izbrane vejp tekočine in njihove posamezne komponente vplivajo na morfologijo, delitev in živost celic v različnih humanih 2D *in vitro* modelih. Izvedla sem anketo, v kateri je sodelovalo 713 anketirancev med 11. in 20. letom. Ugotovila sem, da večina mladih pozna vejpe in jih zaznava kot zdravju škodljive. Kljub temu jih je 33 % vsaj enkrat poskusilo vejpati ali pa to počnejo redno, večinoma v namen zabave. Pri tem sta jim okus in vonj enako pomembna kot sestavine v vejp tekočini. Dostopnost mladih do vejпов je sicer precej neovirana. V drugem, laboratorijskem delu raziskave sem ugotovila, da vejpi, arome in nikotinski pospeševalci oz. vejp tekočine in njihove komponente citotoksično vplivajo na vse tri testirane celične linije, pljučne MRC5, jetrne HepG2 in možganske celice NHA. Viden je toksičen vpliv na živost celic vseh treh organov (pljuč, jeter in možganov). Že pri najnižji testirani koncentraciji, ki ustreza 100 vdihom vejpa, je viden negativen učinek na naš *in vitro* celični sistem. Sklep raziskave poudarja nujnost nadaljnjih raziskav dolgoročnih učinkov uporabe vejпов ter potrebo po strožji regulativi vejпов in ozaveščanju mladih o tveganjih, povezanih z njihovo uporabo.

Ključne besede: vejp tekočina, *in vitro* 2D celični modeli, mladi uporabniki, citotoksičnost

ZAHVALA

Na začetku bi se želela iskreno zahvaliti svojima mentoricama dr. Martini Štampar in dr. Metki Novak iz Nacionalnega inštituta za biologijo v Ljubljani. Namenili sta mi ogromno svojega časa, tudi izven rednega delovnika in mi omogočili poglobljeno raziskovanje. S svojimi jasnimi razlagami, potrpežljivostjo in vodstvom sta me vodili skozi vse faze laboratorijskega dela in analize. Njuna konstruktivna kritika mi je odprla nova obzorja in me spodbudila k napredku. Pri delu v laboratoriju so mi z deljenjem znanja in super vzdušjem pomagali (po abecedi) Vito Ham, Ema Leskovec, Špela Rozman in Pia Žižek, za kar sem jim zelo hvaležna. Hvala mojemu profesorju, Gregorju Križu, ki mi je tako zelo priljubil biologijo in me venomer spodbujal.

KAZALO VSEBINE

POVZETEK.....	I
ZAHVALA	I
KAZALO VSEBINE	II
Kazalo slik in tabel.....	III
UVOD.....	1
1.1 Nameni in cilji.....	1
1.2 Hipoteze	2
2. TEORETIČNI DEL	2
2.1 Kaj so vejpi in vejping?	2
2.1.1 Vrste vejпов	3
2.1.2 Kemijska sestava vejpa.....	4
2.1.2.1 E-tekočina.....	4
2.1.2.2 PG/VG.....	4
2.1.2.2.1 Nikotinski pospeševalci.....	5
2.1.2.2.2 Arome	5
2.1.3 Preverjanje citotoksičnosti snovi	5
2.1.3.1 Kaj sta pojma toksičnost in citotoksičnost?	5
2.1.3.2 Testiranje citotoksičnosti	6
2.1.3.3 2D celični modeli za testiranje toksičnosti.....	6
2.1.4 Toksikologija vejpa in znani vpliv na zdravje.....	7
2.1.5 Statistika o uporabi	8
2.1.6 Slovenska zakonodaja in zakonodajne spremembe	8
3. Eksperimentalni del	9
3.1 Anketa	9
3.2 Uvod v laboratorijsko delo.....	10
3.2.1 Uporabljene snovi	11
3.2.2 Laboratorijska oprema	12
3.3 Testiranje dostopnosti sestavin vejп tekočin.....	13
3.4 Metode dela.....	13
3.4.1 Priprava mešanic za tretiranje (tretmajev)	14
3.4.2 Izračun koncentracij za tretmaje.....	14
3.4.3 Priprava tretmajev	15

3.4.4	Priprava in štetje celic	16
3.4.5	Tretiranje celic.....	16
3.4.6	Luminiscenčni test s Cell Titer Glo – test viabilnosti	16
3.4.7	Mikroskopija.....	17
4.	Analitični del.....	17
4.1	Rezultati ankete	17
4.1.1	Demografski podatki anketirancev	17
4.1.2	Splošno znanje anketirancev o vejpih.....	18
4.1.3	Uporabniki vejпов	18
4.1.4	Anketiranci, ki še nikoli niso poskusili vejpa	21
4.1.5	Mnenje anketirancev o uporabi vejпов med mladimi	22
4.2	Rezultati laboratorijskega dela naloge – vpliv izbranih vejпов in njihovih posameznih komponent na živost celic	22
4.2.1	Preliminarni poskusi za izbor koncentracij in določitev vpliva baze PG/VG na morfologijo in živost humanih celic (MRC5, HepG2, NHA).....	23
4.2.2	Vpliv različnih vejпов na živost celic in spremembe v morfologiji po celičnih linijah	24
4.2.2.1	Mikroskopski pregled morfologije vejпов izpostavljenih celičnih linij	26
4.2.3	Katera od komponent vejpa najbolj prispeva k citotoksičnosti?	26
4.2.3.1	Vpliv testiranih nikotinskih pospeševalcev na živost celic v različnih celičnih modelih..	27
4.2.3.2	Vpliv testiranih arom na živost celic v različnih celičnih modelih	28
4.2.3.3	Vpliv testiranih nikotinskih pospeševalcev in arom na morfologijo celic v različnih celičnih modelih	29
5.	Vrednotenje hipotez	30
6.	RAZPRAVA IN ZAKLJUČEK.....	31
6.1	Možnosti za nadaljnjo raziskovanje	33
7.	Viri in literatura	34

Kazalo slik in tabel

Slika 1:	2D celični modeli in izpostavitve kemikalijam	6
Slika 2:	Jaz pri delu v laboratoriju.....	10
Slika 3:	Jaz pri izvajanju eksperimentalnega dela naloge.....	15
Slika 4:	Povezava do anketnega vprašalnika	17
Slika 5:	Strukturni krogi o prikazu splošnega znanja anketirancev o vejpih	18
Slika 6:	Strukturna kroga o prikazu uporabe vejpa	18
Slika 7:	Strukturna kroga o prikazu uporabe vejpa in številu vdihov	19
Slika 8:	Strukturna kroga o prikazu uporabe arom v vejpih.....	20

Slika 9: Strukturni krog o prikazu razloga za uporabo vejpa	20
Slika 10: Strukturna kroga o prikazu načina pridobitve vejpa in pomembnih lastnosti vejpa.....	21
Slika 11: Strukturni krog o prikazu razloga za neuporabo vejpa.....	22
Slika 12: Strukturni krog o prikazu mnenja mladih o uporabi vejpa	22
Slika 13: Vpliv baze PG/VG na živost humanih celic (HepG2, MRC5, NHA) po 24 h izpostavitve v primerjavi s kontrolo (K). Kot pozitivno kontrolo (PK) sem uporabila 7 % DMSO.	23
Slika 14: Morfološki pregled sprememb na humanih celicah (HepG2, MRC5, NHA) 24 h po izpostavitvi bazi PG/VG pri 10 000x povečavi (EVOS; 10 000x povečava).....	24
Slika 15: Vpliv mešanic vejпов na posamezno celično linijo (HepG2, MRC5, NHA) po 24 h izpostavitve različnim koncentracijam nikotina. Vsebnost arom je enaka.	25
Slika 16: Morfološki pregled sprememb na humanih celicah (HepG2, MRC5, NHA) 24 h po izpostavitvi najbolj (Vape 7) in najmanj toksični vejp mešanici (Vape 4) (EVOS; 10 000x povečava)	26
Slika 17: Primerjava učinka nikotinskih pospeševalcev na posamezno celično linijo (HepG2, MRC5, NHA) po 24 h izpostavitve v različnih koncentracijah nikotina	27
Slika 18: Primerjava učinka arom na posamezno celično linijo (HepG2, MRC5, NHA) po 24 h izpostavitve v različnih koncentracijah PG/VG	28
Slika 19: Morfološki pregled sprememb na humanih celicah (HepG2, MRC5, NHA) 24 h po izpostavitvi nikotinskima pospeševalcema in najbolj toksični aroma (Aromi 3) (EVOS; 10 000x povečava).....	29
Slika 20: Kratak prikaz mojega dela v laboratoriju.....	33
Tabela 1: Prikaz štirih generacij vejпов.....	4
Tabela 2: Kemikalije in oprema uporabljena v eksperimentalnem delu raziskovalne naloge.....	11
Tabela 3: Kemikalije, ki sem jih uporabila za sestavo medijev za posamezne celične linije.....	11
Tabela 4: Uporabljene komponente vejp tekočin	11
Tabela 5: Laboratorijski pripomočki (manjši ročni inštrumenti in potrošni material).....	12
Tabela 6: Mešanice vejp tekočin.....	15

UVOD

Dandanes je med mladimi vse bolj popularna uporaba vejpr naprav. Vejpi ali elektronske cigarete so sodobni izdelki, namenjeni simulaciji kajenja brez gorenja tobaka. Delujejo tako, da segrevajo e-tekočine, ki so mešanice v PG/VG bazi raztopljenih arom in nikotinskih pospeševalcev. Vejpr tekočine vsebujejo več kot 60 različnih kemikalij, med njimi tudi snovi s citotoksičnimi učinki, ki velikokrat niso navedene na samih izdelkih in povzročajo različna kronična obolenja ter vnetja. Zaradi privlačnih arom, je uporaba vejpr med mladostniki tudi v Sloveniji precej razširjena, kar sproža zaskrbljenost glede javnega zdravja. Leta 2024 je bil zato sprejet zakon, ki med drugim prepoveduje arome v vejpr, razen tistih z okusom tobaka ter bolj omejuje dostop mladoletnim uporabnikom. V tej raziskovalni nalogi sem spoznala trend vejpanja med mladimi v Sloveniji ter ugotavljala toksične učinke vejpr tekočin in njihovih komponent.

Naloga je sestavljena iz dveh delov. V prvem sklopu sem izvedla anketo med 713 anketiranci osnovnih in srednjih šol, s katero sem želela oceniti ozaveščenost mladih o vejpr ter njihove navade in odnos do vejpanja. V drugem sklopu naloge pa sem izvajala eksperimente, na treh različnih *in vitro* 2D celičnih modelih, pljučnih (MRC5), jetrnih (HepG2) in možganskih celicah (NHA). Na celičnih linijah sem preučevala, kako izbrane mešanice vejpr in njihove posamezne komponente vplivajo na živost in morfologijo celic.

1.1 Nameni in cilji

Namen raziskovalne naloge je spoznati kulturo vejpanja med mladimi ter določiti njihov vpliv na zdravje potrošnika (izpostavljenih posameznikov). S kombinacijo ankete in eksperimentalnim laboratorijskim delom želim pokazati kako pogosto se uporabljajo vejpi med mladimi, glavni cilj raziskave pa je pokazati kako izbrani vejpi, ki se najpogosteje uporabljajo, in njihove posamezne komponente vplivajo na zdrave človeške pljučne, jetrne in možganske celice *in vitro*.

V prvem delu naloge želim oceniti ozaveščenost mladih med 11. in 20. letom glede uporabe vejpr in njihovega možnega škodljivega vpliva na zdravje ter spoznati njihove navade v povezavi z vejpanjem. V drugem delu naloge pa bom ugotavljala, ali izbrane vejpr tekočine in njihove posamezne komponente vplivajo na morfologijo, delitev in živost celic v različnih humanih 2D *in vitro* modelih.

1.2 Hipoteze

Pred začetkom eksperimentalnega dela, sem si zastavila sledeče hipoteze:

1. Večina mladih anketirancev pozna izraz 'vejp' in je seznanjena z njihovo uporabo.
2. Večini anketiranih oseb je okus vejp naprav pomembnejši od njihove vsebnosti.
3. Posamezne testirane komponente vejpov, kot so baza PG/VG, arome, nikotinski pospeševalci, manj vplivajo na viabilnost zdravih človeških pljučnih, možganskih in jetrnih celic, kot testirane mešanice vejp tekočin.
4. Med glavnimi sestavinami, ki sestavljajo vejp tekočino, so najbolj toksične arome.

2. TEORETIČNI DEL

2.1 Kaj so vejpi in vejping?

V spletnem slovarju slovenskega jezika, natančneje v Sprotnem slovarju slovenskega jezika, Fran-u je od leta 2023 vpisana tudi beseda *vape* oz. poslovenjeno *vejp*. Definicija pravi, da gre za pogovorno besedo, ki se uporablja za elektronske priprave za kajenje, ki uparjajo tekočino z nikotinom. Etimološko gre za privzeto besedo, ki izhaja iz angleške besede *vape*, iz *vapor*, ki pomeni 'para, hlap'. Iz nje izhaja tudi *vejpanje*, ki pomeni uporabo vejp naprav, uporabnika le-teh pa imenujemo *vejper* (ZRC SAZU, 2023). Za vejp naprave se je primarno začela uporabljati stalna besedna zveza *elektronska cigareta* (EC) ali na kratko kar *e-cigareta*. Elektronske cigarete, e-cigareti ali vejpi so znani tudi pod imeni puff, vap, pod, mod, bar, osebni uparjalnik, elektronski ali osebni inhalator, elektronski sistem za dovajanje nikotina in drugimi (NIJZ, 2023).

Vejpi so izdelki, ki simulirajo kajenje (CDC, 2024). So elektronske naprave, ki uparjajo tekočino z okusom (Ameriška akreditirana medicinska fakulteta, 2017). Običajno delujejo na baterije, ki segrevajo tekočino v napravi, da se le-ta spremeni v aerosole, ki jih nato vdihuje uporabnik. Aerosoli so mešanica majhnih delčkov, ki se sprostijo v zrak in izgledajo kakor uparjena vodna para, a v nasprotju z običajno vodno paro vsebujejo nikotin, arome, vlažilce, tudi vodo in več kot 60 drugih kemikalij. Uporabnik vejp naprave te aerosole inhalira v pljuča, kjer nikotin in kemikalije preidejo v krvni obtok. Obenem lahko aerosol, ki ga vejper izdihne vdihne tudi mimoidoči (CDC, 2024). Vejpi ne vsebujejo tobaka in v njih ne poteka gorenje (NIJZ, 2024a).

Vejpi običajno vsebujejo nikotin, snov, ki povzroča zasvojenost in jo najdemo v običajnih cigaretah in drugih tobačnih izdelkih (CDC, 2024). Na voljo pa so tudi tekočine brez nikotina (NIJZ, 2024a). Nekatere vejp naprave se uporabljajo tudi za inhaliranje (CDC, 2024) oz. vdihavanje raznoraznih prepovedanih substanc, najpogosteje kanabisa (NIJZ, 2024a).

Vejpi so bili izumljeni leta 2003 na Kitajskem (Ameriška akreditirana medicinska fakulteta, 2017), pri nas pa so v prodaji od leta 2006. Na svoji popularnosti so začeli pridobivati po letu 2010. Danes obstaja že skoraj 500 različnih tržnih znamk, ki ponujajo tovrstne izdelke (NIJZ, 2024a). Običajno so privlačnih svetlih in živahnih barv. Na voljo so mnogi okusi, dodane so jim arome z okusom sadja, sladil, mentola in mete, z namenom pritegniti mlade uporabnike (CDC, 2024). Tako na trgu eksponentno narašča število arom, predvsem sladkih in sadnih, po podatkih NIJZ iz 2020 jih je bilo že takrat na voljo približno 15 600. Uporaba vejпов ni enaka kajenju konvencionalnih nikotinskih cigaret. Za njihovo uporabo so značilni daljši in obsežnejši vdih, ki so sicer odvisni od izkušenosti uporabnika in značilnosti izdelka ter tekočine, predvsem od vsebnosti nikotina. Z izkušnostjo uporabnika naraščata trajanje in prostornina vdiha, medtem ko se z višanjem vsebnosti nikotina v tekočini le-ta znižujeta (NIJZ, 2024a).

2.1.1 Vrste vejпов

Dandanes obstaja mnogo različnih oblik in velikosti vejпов (CDC, 2024). Med posameznimi izdelki obstajajo velike razlike v izgledu, obliki in kompleksnosti. Vseeno pa so v splošnem sestavljene iz podobnih delov in delujejo na podoben način (NIJZ, 2024a). Prve, zgodnje vejp naprave so izgledale kakor navadni cigareti, cigare ali pipe. Sedaj pa novejši modeli izgledajo tudi kakor USB ključki, pisala, označevalci besedila, igrače ali druge vrste izdelkov. Obstajajo tudi večje naprave, kot so rezervoarji ali "modi". Prav tako obstajajo vejpi za enkratno uporabo, vejp naprave z možnostjo ponovnega polnjenja in vejp naprave s predhodno napolnjenimi kartušami ali kapsulami (CDC, 2024). Glede na sestavo, izgled in razvoj poznamo tri generacije elektronskih cigaret ter četrto skupino, ki ne sodi v nobeno izmed njih. Sodobne elektronske cigarete uporabnike motivirajo k preizkušanju in sestavljanju lastnih vejпов iz posameznih komponent. Spodbujajo jih k eksperimentiranju z uporabo vejпов z močjo vse do 100 W ter k pripravi lastnih mešanic tekočin in arom. Večina teh naprav proizvaja velike količine aerosola, zaradi česar je

njihova uporaba zelo opazna, obstaja pa tudi nova skupina vejпов, ki ne spada v nobeno od prej omenjenih treh generacij (NIJZ, 2024a).

Tabela 1: Prikaz štirih generacij vejпов

Prva generacija vejпов	Druga generacija vejпов (t. i. sistemi »tank«)	Tretja generacija vejпов (t. i. sistemi »mod«)	Četrta (nova) skupina vejпов (t. i. sistemi »pod«)
			
Naprave za enkratno uporabo, podobne navadnim cigaretam ali pipam.	Naprave podobne nalivnemu peresu z rezervoarjem za polnjenje.	Večje in zelo raznolike naprave kvadratne ali pravokotne oblike s po želji prilagodljivimi deli.	Majhne, USB-ključkom podobne naprave, t.i. "žepni vejpi"

Vir: NIJZ, 2024a

2.1.2 Kemijska sestava vejpa

2.1.2.1 E-tekočina

E-tekočina (tekem besedila: "tekočina", "vejp tekočina" itd.) je tekočina v vejpih oz. elektronskih cigaretah, ki se upari v aerosol. Običajno je mešanica vode, arom, nikotina, propilen glikola in glicerola ter drugih kemijskih snovi (CDC, 2024).

E-tekočine obstajajo v veliko različnih okusih. Količina nikotina v e-tekočinah se razlikuje med tekočinami. Uporabnik lahko izbere e-tekočino glede na količino nikotina in okus, obstajajo pa tudi tekočine, ki ne vsebujejo nikotina (Veppo Vape Shop, 2017). Mnoge e-tekočine so skrbno mešane v razmerju med PG in VG, da združijo prednosti obeh sestavin. Najbolj so priljubljena razmerja 50/50 ali 70/30. Izbira med e-tekočino z visoko vsebnostjo PG ali VG pa je predvsem odvisna od osebnih preferenc in vrste uporabljene naprave. Višja količina PG je npr. precej priljubljena pri osebah, ki uporabljajo vejpe z namenom prenehanja kajenja, saj nudi podoben občutek v grlu. (QVapehouse, b.d.).

2.1.2.2 PG/VG

Propilen glikol (PG) in rastlinski glicerol (VG) sta dve osnovni sestavini vejpa tekočin oz. e-tekočine. Ne samo, da obe snovi prispevata edinstvene lastnosti pri uporabniški izkušnji, vendar predstavljata bazo, v kateri so raztopljene vse ostale snovi.

PG je brezbarvna tekočina, ki tudi nima vonja, ima pa značilnost učinkovitega prenašanja okusa. Tekočine z višjim razmerjem PG običajno zagotavljajo intenzivnejši okus in močnejši t.i. »throat hit« oz. jakost »udarca« v grlu ob vdihu, pri čemer pa lahko povzročijo

tudi draženje grla. Alternativa PG je VPG (rastlinski propilen glikol), ki se uporablja kot nadomestek, saj naj bi bil kljub enaki kemični sestavi manj grob do grla.

VG pa je gostejša in slajša snov, ki ustvarja gostejše oblake pare, kar imajo nekateri radi. Uporabniku nudi bolj gladek vdih, zaradi česar je manj verjetno, da bo povzročil alergijo kakor PG. Zaradi svoje gostote pa lahko povzroči nabiranje tekočine v vejp napravi.

PG/VG baza je osnova, v katero se dodajo tako arome, kot nikotinski pospeševalci in hladilni učinki. Obstajajo različna razmerja med PG in VG in so običajno označena na izdelkih, tudi na aromah in pospeševalcih, saj sta v njih kot topilo. Pomembno je, da je baza dovolj, saj bi v primeru prevelikih koncentracij dodatkov uporabnik vejpa lahko doživel akutno zastrupitev.

2.1.2.2.1 Nikotinski pospeševalci

Nikotinski pospeševalec (angl. »booster«) je tekočina brez okusa, ki vsebuje določeno koncentracijo nikotina, ki po zakonodaji EU ne sme preseči 20 mg/ml. Uporablja se za dodajanje nikotina v vejp tekočine. Poznamo navadne in solne nikotinske pospeševalce, namen obojih pa je, da uporabniku nudijo izkušnjo vdihavanja nikotina, sicer v manjših količinah kot pri navadnih cigaretah. Navadni pospeševalec je v PG/VG bazi raztopljen čisti nikotin. Solni pospeševalec je ime dobil po kemijski sestavi, saj ga sestavljata kislina in baza. Z umetnim višanjem pH pri izdelavi te soli, je omogočeno dovajanje višjih odmerkov nikotina v sistem uporabnika, brez neprijetnega draženja grla (*Cloud57, 2022*).

2.1.2.2.2 Arome

Arome so snovi, ki dajejo prijeten vonj in/ali okus. Arome, ki so raztopljene v PG/VG topilu, se zamešajo v vejp tekočino in tako dodajo različne okuse in vonjave samemu vejpu. Popularni okusi so sadni, okusi sladkarij, različnih znanih pijač ipd. Pogosto gre za arome, ki so prisotne tudi v prehranski industriji, kar pa ne pomeni, da so varne tudi za vdihavanje. Točne sestavine arom v vejpih so večinoma nerazkrita poslovna skrivnost (*VapeJuice, 2024*).

2.1.3 Preverjanje citotoksičnosti snovi

2.1.3.1 Kaj sta pojma toksičnost in citotoksičnost?

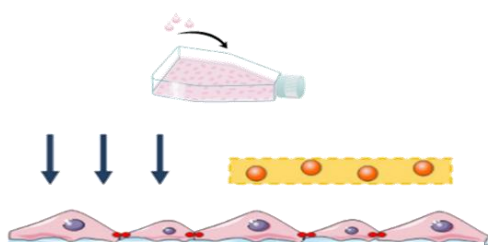
Toksičnost je izraz, ki pomeni strupenost snovi. Snov, ki je za nek organizem toksična ali strupena, sodi med organizmu tuje snovi (ksenobiotike). Veda, ki se ukvarja s

preučevanjem toksičnosti je toksikologija, le-ta proučuje škodljive učinke kemikalij na organizem. Strupenost snovi preučujemo z *in vitro* in *in vivo* modeli. Citotoksičnost pa je lastnost snovi, da toksično deluje na ravni celic (*ZRC SAZU, b.d.*). Primarno pomeni potencialno povzročitev celične smrti in predstavlja enega najpogosteje določenih bioloških parametrov. Z njimi lahko na enostaven način izmerimo občutljivost celic na določeno koncentracijo toksina. Pri nižjih koncentracijah citotoksičnih substanc pride v celici do fizioloških sprememb, pri višjih koncentracijah pa do bolj toksičnih efektov (*Cof, 2013*).

2.1.3.2 Testiranje citotoksičnosti

Za ugotavljanje toksičnosti snovi se je običajno uporabljalo *in vivo* teste na laboratorijskih živalih, pri katerih so bili prisotni tako etični pomisleki, kot visoki stroški. Posledično se sedaj kot alternativna metoda vse več uporablja teste citotoksičnosti *in vitro*, s katerimi se določa delež mrtvih celic po izpostavljenosti določeni snovi. Najpogosteje testiranje citotoksičnosti temelji na določanju porušjenja membranske integritete, sprememb v celični morfologiji ali spremembah metabolne aktivnosti celic ter delitvi. Z *in vitro* testi določamo sposobnost snovi, da povzroči celično smrt oz. bazalno citotoksičnost. Le-ta je posledica onemogočenega delovanja osnovnih celičnih funkcij (*Cof, 2013*).

2.1.3.3 2D celični modeli za testiranje toksičnosti



Slika 1: 2D celični modeli in izpostavitve kemikalijam (*Vir: Fontana idr., 2020*)

Procese in poskuse, ki potekajo v nadzorovanem okolju izven živega organizma, v laboratoriju imenujemo *in vitro* poskusi. *In vitro* testiranje običajno izvajamo z uporabo dvodimenzionalnih (2D) enoplastnih celičnih modelov. Gre za dolgo uveljavljeno metodo, ki se izvaja na trajnih celičnih linijah, pridobljenih iz tkiv živalskega ali človeškega izvora. Celice se goji v plastenkah ali epruveh, v katerih so pritrjene na podlago, kjer rastejo in se delijo v enem samem sloju ali monosloju (*Moro idr., 2024*). Takšne celične kulture so večinsko sestavljene iz živih celic, saj se mrtve celice običajno odlepijo od površine in odstranijo med presajanje. Rast celic poteka v eni plasti, kar vsem celicam zagotavlja neomejen dostop do sestavin gojišča, ki jih potrebujejo za izvajanje metabolnih procesov. Prav tako pa takšne celice brez težav izločajo sekundarne produkte njihove presnove (*Žabkar, 2020*).

2.1.4 Toksikologija vejpa in znani vpliv na zdravje

Vejp tekočine vsebujejo več kot 60 različnih kemikalij, ki velikokrat niso navedene na samih izdelkih ali pa so njihove koncentracije prikrite. V opravljenih raziskavah na humanih fibroblastih in miših, izpostavljenih različnim aromam in bazi PG/VG v vejp tekočinah, je bil ugotovljen citotoksičen učinek le-teh, neodvisno od koncentracije nikotina. Arome in mešanice e-tekočin zmanjšujejo sposobnost preživetja jetrnih celic (*Li idr., 2021*).

Vejpi kakor navadne cigarete v večini dovajajo nikotin. Nikotin je snov, ki prispeva k razvoju bolezni srca in ožilja, doprinaša k rasti tumorjev in ima škodljive učinke na razvijajoče se možgane mladih. Spreminja kemijo možganov, deluje kot poživilo in povzroča zasvojenost (*Zorko, 2021*).

Obstaja na tisoče arom vejпов in mnoge izmed njih vsebujejo tudi diacetil in acetonin, za katera je znano, da povzročata povečano pojavnost kroničnega kašlja, bronhitisa, astme in hude pljučne bolezni (*NIJZ, 2024a*). Okusi, ki vsebujejo diacetil (predvsem masleni okusi) povzročajo t.i. »popcorn lungs«, bolezen imenovano obliterantni bronholitis, ki ni reverzibilna. Povzroči vnetje epitelijskih in subepitelijskih celic, kar vodi v nezmožnost celic za regeneracijo tkiva (*Ameriška akreditirana medicinska fakulteta, 2017*).

Rezultati ene izmed izvedenih raziskav tujih raziskovalcev so pri pljučih, izpostavljenih aerosolu vejпов, pokazali poslabšanje sposobnosti alveolarnih makrofagov, kar pomeni, da se je zmanjšala samočistilna sposobnost pljuč, neodvisno od okusa arome v izbrani e-tekočini. Ob uporabi vejпов se dokazano pojavijo tudi vnetni procesi, ki poslabšajo nekatere sposobnosti tkiv, ki skrbijo za obrambo pred okužbami (*Podobnik, 2022*).

V aerosolu vejпов so prisotni tudi nanodelci težkih kovin, ki lahko zaradi svoje majhnosti ob vdihu dosežejo epitel pljučnih mešičkov. Številne izmed njih (Ni, Cr, Sn, Al, Cu, Mn) povzročajo celični stres, rušijo redoks ravnotežje ter povzročajo vnetja (*Podobnik, 2022*). V ameriški raziskavi o vplivih PG/VG topila so ugotovili, da je baza PG/VG škodljivo vplivala na viabilnost celic, saj je povzročil zmanjšano rast in odmiranje celic (*Lee idr., 2018*). Obstajajo podatki, da lahko vdihavanje PG poveča tveganje za astmo, obenem ga povezujejo s posameznimi primeri lipidne pljučnice (*NIJZ, 2024a*).

Medtem ko imamo o vplivu tobačnih cigaret veliko podatkov, saj jih ljudje kadijo že stoletja, vejpi obstajajo zgolj desetletje. Posledično sestavine tekočin/aerosola vejпов niso

raziskane ali odobrene za vdihavanje, čeprav so v oglaševanju pogosto prisotne zavajajoče trditve o varnosti ob zaužitju (*NIJZ, 2024a*).

Pomanjkanje podatkov o toksičnosti kemikalij, prisotnih v vejpih, ob vnosu v telo po inhalatorni poti, nam onemogoča celosten vpogled v škodljivost dolgoročne uporabe vejpnih naprav. Ker zaenkrat sploh še ne poznamo možnih škodljivih učinkov torej ne moremo trditi, da je vejpanje manj zdravju nevarno kakor kajenje navadnih cigaret. Za boljše razumevanje in več podatkov bodo v prihodnosti ključne raziskave *in vitro* ter *in vivo* in klinične študije.

2.1.5 Statistika o uporabi

V Sloveniji elektronske cigarete uporablja višji delež mladostnikov kot odraslih. Med odraslimi prebivalci Slovenije elektronske cigarete uporablja manj kot 1 %, med mladostniki pa so deleži občutno višji. Po anketi, ki jo je leta 2017 izvedel Nacionalni inštitut za javno zdravje (NIJZ) med 17-letnimi dijaki, je več kot tretjina vseh (37 %) poročala o uporabi elektronske cigarete kadarkoli v življenju, več kot desetina pa v zadnjih 30 dneh (12 %) (*NIJZ, 2018*). Elektronsko cigareto je poskusil že vsak deseti 12-letnik, kadi pa jih že skoraj vsak peti 15-letnik. K temu so zelo verjetno pripomogle tudi arome, ki z dobrim okusom mladim dajejo občutek, da je izdelek manj škodljiv (*24ur.com, 2024*). Trenutni podatki kažejo na hitro naraščanje uporabe elektronskih cigaret in povezanih izdelkov, predvsem med mlajšo populacijo (*NIJZ, 2024b*). V Sloveniji je na voljo veliko brezplačnih programov, ki posameznikom nudijo pomoč pri opuščanju uporabe tobačnih in povezanih izdelkov. Za pomoč so usposobljeni terapevti v Zdravstveno-vzgojnih centrih in Centrih za krepitev zdravja v zdravstvenih domovih po Sloveniji. V okviru NIJZ deluje tudi brezplačna telefonska številka za pomoč pri opuščanju kajenja: 080 2777, ki je na voljo vsak dan, tudi med vikendi in prazniki (*NIJZ, 2025*).

2.1.6 Slovenska zakonodaja in zakonodajne spremembe

28. marca 2024 je Državni zbor Republike Slovenije sprejel Zakon o spremembah in dopolnitvah Zakona o omejevanju uporabe tobačnih in povezanih izdelkov (ZOUTPI-B). Zakon, ki je prvič stopil v veljavo v začetku leta 2017 (*Republika Slovenija, 2017*) poleg tobačnih izdelkov obravnava tudi povezane izdelke, kakršne so vejpi, ki ne vsebujejo tobaka, ampak nikotin iz njega (*Republika Slovenija, 2024*). Novela zakona je bila

sprejeta v skladu s Strategijo za zmanjševanje posledic rabe tobaka Za Slovenijo brez tobaka 2022-2030, katere cilj je, da bo v letu 2030 manj kot 5 % prebivalcev uporabljalo povezane in druge nikotinske izdelke (*Ministrstvo za zdravje Republike Slovenije, 2022*). Izredno pomembna sprememba je novela, ki popolnoma prepoveduje arome, razen tobaka, v vejpih. Prav tako prepoveduje tudi oglaševanje in promocijo vejпов ter prodajo le-teh mladoletnim osebam. Obenem širi prepoved vejпов, v vseh zaprtih javnih, delovnih prostorih in v vozilih, ko so prisotne mladoletne osebe. Prav tako so določili, da bodo po 31. decembru 2025 ukinjene vse kadičnice v zaprtih javnih in delovnih prostorih. Vejpi in njihovi sestavni deli z aromami se lahko dajejo na trg še največ 12 mesecev oz. eno leto od uveljavitve zakona. Zakon je v veljavo stopil 24. aprila 2024 (*Republika Slovenija, 2024*). Za prodajalce in kupce na črnem trgu so določene visoke kazni (5 000 – 50 000 Evrov) (*24ur.com, 2024*).

3. EKSPERIMENTALNI DEL

Eksperimentalni del naloge sem razdelila v dva sklopa. V prvem sklopu sem izvedla anketo med osnovnimi in srednjimi šolami s katero sem želela oceniti ozaveščenost mladih o vejpih ter njihove navade in odnos do vejpanja. V drugem sklopu naloge pa sem izvajala eksperimente, na treh različnih *in vitro* dvodimenzionalnih celičnih modelih, MRC5, HepG2 in NHA. Na celičnih linijah sem preučevala, kako izbrane mešanice vejпов in njihove posamezne komponente vplivajo na živost in morfologijo celic. Laboratorijsko delo sem izvajala na Oddelku za genetsko toksikologijo in biologijo raka Nacionalnega inštituta za biologijo v Ljubljani, v obdobju od 3. 1. do 31. 1. 2025 in je potekalo pod strokovnim mentorstvom dr. Martine Štampar in dr. Metke Novak.

3.1 Anketa

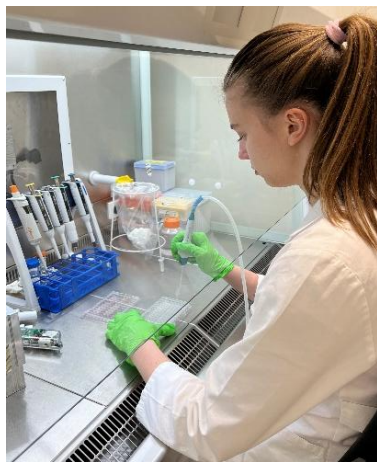
Z anketiranjem mladih med 11. in 20. letom sem želela spoznati kakšna je splošna ozaveščenost anketirancev o vejpih, kakšen odnos imajo mladi do vejpanja, koliko jih je že kdaj uporabilo vejp napravo ter kakšne so njihove navade v povezavi z vejpi. Anketo sem ustvarila v spletnem orodju 1ka, odprta je bila 20 dni v začetku leta 2025, pridobila pa sem 713 ustreznih odgovorov.

Vključila sem štiri osnovne šole (*OŠ Jožeta Moškriča, OŠ Podutik, OŠ Radovljica, OŠ Zalog*), štiri poklicne srednje šole (*BIC Ljubljana, Srednja šola za oblikovanje in fotografijo Ljubljana, Srednja zdravstvena šola Ljubljana, Šolski center Ljubljana*) in štiri gimnazije (*Gimnazija Bežigrad, Gimnazija Jožeta Plečnika, Gimnazija Vič, Gimnazija Šentvid*).

Z uporabo pogojev sem anketo razdelila na osebe, ki so že kdaj uporabile vejp ter tiste, ki ga niso še nikoli, da sem s tem pridobila podatke o izkušnjah, mnenju in znanju obeh skupin.

3.2 Uvod v laboratorijsko delo

Prvi teden moje prisotnosti v laboratoriju sem bila s strani mentoric seznanjena s protokoli, pravili in varnostnimi ukrepi v laboratoriju. Nosila sem zaščitno haljo, obujke za čevlje ter



Slika 2: Jaz pri delu v laboratoriju

rokavice. Predstavljene so mi bile aseptične tehnike, ki sem jih nato uporabljala pri delu. V laboratoriju sem izvajala vse dele poskusa, razen samega tretiranja (nanašanja tretmajev na celice), saj je vsaka snov, ki še ni bila testirana tretirana kot nevarna. Zaradi same narave dela in ker po pravilih NIB dijaki ne smejo delati s toksičnimi snovmi, sem pri tretmajih zgolj opazovala mentorico in asistirala. Uporabila sem tri celične kulture, kot celične modele za določevanje vpliva na živost celic po izpostavitvi kemikalijam, prisotnih v vejpih. Izbrala sem celične linije iz delov telesa, ki so pri vejpanju najbolj izpostavljeni, to so pljuča (MRC5), jetra (HepG2) in možgani (NHA). Sodelovala sem pri planiranju poskusa, računanju, štetju, nasajanju, presajanju celic, celice sem analizirala pod mikroskopom in izvedla ATP (Adenozin-5'-trifosfat) test, ki meri celično viabilnost. Po opravljenem uvajalnem delu smo z mentoricama izvedle preliminarni poskus, ki je bil namenjen ugotavljanju primernih koncentracij snovi, še posebej toksičnosti samega topila. Vsak teden sem nato izvedla eksperiment za posamezno celično linijo. Za vsako kulturo sem testirala viabilnost s testom celične viabilnosti, po 24 h izpostavitvi tretmaju. Testirala sem najpogostejše kombinacije vejp tekočin ter posamezne komponente, ki so v uporabi med mladimi (glede na zbrane podatke in priljubljenost izdelkov na internetu). Vsi testi so bili opravljeni v 3 tehničnih in 3 bioloških ponovitvah.

3.2.1 Uporabljene snovi

Tabela 2: Kemikalije in oprema uporabljena v eksperimentalnem delu raziskovalne naloge

Kemikalije	Kataloška številka	Proizvajalec
Tripansko modrilo	T8154-100 ml	Sigma, ZDA
Trypsin (0,25% Trypsin-EDTA)	25200-056	Gibco, ZDA
CellTiter-Glo® 3D Cell viability assay	G9668A	Promega, ZDA
Dimetil sulfoksid (DMSO)	414880010	Acros organics, Belgija
DPBS (10x)	14200-067	Gibco, ZDA
Gojitvene plošče velikosti 25 cm ² (T25)		Corning Costar ZDA
Stripete (volumna 5, 10, 25 ml)		Corning Costar, ZDA
Plastični nastavki za pipete (tipsi) (10-200 µl, 100-1000 µl, 5 ml)		Corning Costar, ZDA
Prozorne, črne in bele mikrotitrne plošče s 96 vdolbinicami v obliki črke U		Corning Costar, ZDA

Vir: Lastni prikaz

Tabela 3: Kemikalije, ki sem jih uporabila za sestavo medijev za posamezne celične linije

	Sestavina	Proizvajalec	Kataloška številka
MRC-5	Eagle's Minimum Essential Medium	ATCC	30-2003
	10 % FBS (fetal bovine serum)	Gibco, ZDA	10500064
	1 % P/S (Penicillin-Streptomycin)	Merck	SI-P0781-100 ml
NHA	Astrocyte Growth Medium (AGM™)	AGS, ScienCell	1801
	10 % FBS (fetal bovine serum)	Sigma, ZDA	A9418-500G
	1 % astrocyte growth supplement	AGS, ScienCell	1852
	1 % penicillin/streptomycin solution	Merck	SI-P0781-100 ml
Hep G2 (za 100 ml gojišča)	86,54 ml medija MEM <i>ang. Minimal essential medium, z dodanimi neesencialnimi aminokislinami</i>	Sigma, ZDA	M2414
	10 ml seruma govejega zarodka FBS (ang. Fetal bovine serum)	Gibco, ZDA	A9418-500G
	1 ml natrijevega piruvata (100 ml)	Sigma, ZDA	P2256
	1 ml L-glutamina (1%)	Sigma, ZDA	G7513
	1 ml pripravljene raztopine antibiotikov penicilina/streptomicina (1%)	Sigma, ZDA	P0781

Vir: Lastni prikaz

Tabela 4: Uporabljene komponente vejp tekočin

Ime izdelka	Imenovanje v nalogi	Proizvajalec	Vsebnost
Curieux Base DIY VEGETAL 500ml - 50VPG/50VG	baza ali PG/VG	Curieux	breznikotinska baza za pripravo lastne e-tekočine; razmerje 50VPG/50VG
Curieux Nikotin Booster Vegetal 50VPG/50VG	Navadni pospeševalec (KN)	Curieux	nikotinska baza z razmerjem 50VPG/50VG in vsebnostjo nikotina 20mg/ml
Curieux SALT Nikotin Booster Vegetal 50VPG/50VG	Solni pospeševalec (SN)	Curieux	solna nikotinska baza z razmerjem 50VPG/50VG in vsebnostjo nikotina 20mg/ml
VDLV Aroma Cirkus Classic FR	Cirkus	VDLV	aroma s klasičnim okusom "Blond" tobaka
Curieux Aroma Astrale Pegase	Pegase	Curieux	aroma z okusom ovsenih kosmičev v kombinaciji s karamelo
Curieux Aroma Astrale Galatee	Galatee	Curieux	aroma z okusom gozdnih sadežev in ličija













Wiipstick X (Watermelon)	Vajp za enkratno uporabo – okus lubenica	Wiip	koncentracija nikotina 18 mg/ml (MyWIIP, b.d.).
--------------------------	--	------	---



Vir: QVapehouse, b.d.

3.2.2 Laboratorijska oprema

Vsi pripomočki morajo biti sterilni, delo pa aseptično, da zaščitimo tako sebe kot rezultate.

Tabela 5: Laboratorijski pripomočki (manjši ročni inštrumenti in potrošni material)

LABORATORIJSKE NAPRAVE			
	Laminarij		Inkubator
	Delovna postaja, manjši avtomatiziran omejen prostor v laboratoriju, ki omogoča sterilno, aseptično delo.		Naprava za gojenje celic na stalni T in vlagi ter 5% CO2
	Vacuboy		Centrifuga
	Ročni vakumski operator, ki z ustvarjanjem vakuma izsesava tekočine.		S centrifugalno silo oz. vrtenjem vzorca pri visoki hitrosti poskrbi za ločitev delcev glede na gostoto.
	Pipetni polnilec ali 'pištolca'		Orbitalni stresalnik ali 'hula dancer'
	Naprava za pipetiranje večjih volumnov tekočin.		Laboratorijski 'šejker', ki stresa in omogoča hitro mešanje tekočin.
	'detektor luminiscence' (uporabljen BioTek Cytation 5 Cell Imaging Multimode Reader)		Mikroskop (uporabljen EVOS Cell Imaging System)
	Večnačinski bralnik mikroplošč, ki omogoča merjenje luminiscence		Invertni mikroskop, ki omogoča vizualizacijo morfologije celic.
LABORATORIJSKI PRIPOMOČKI (manjši ročni inštrumenti in potrošni material)			
	Sterilna platenka s perforiranim zamaškom		Pipeta (uporabljene mehanske pipete znamke Sartorius)
	Za gojenje celic – vanjo damo medij in celične kulture.		Orodje za natančno pipetiranje, prenos tekočin.
	Stripeta (steklena kapilara)		Falkonka
	Pripomoček za prenos ali izsesavanje tekočin v odpad ali na pipetni polnilec.		Plastična epruveta s koničastim dnom in pokrovčkom, za shranjevanje vzorcev.

	96-well plošče ali 'plate' Plastične plošče z 96, vdolbinicami v katere se nasadi celice.		Hemocitometer Mrežna komora za štetje celic v tekočini.
---	---	--	---

Vir: Lastni prikaz

3.3 Testiranje dostopnosti sestavin vejp tekočin

Zanimalo me je, kako dostopni so vejp oz. njihove sestavine in preko spleta sem na znani spletni strani, naročila sestavine za vejp tekočino. Edina omejitev na katero sem naletela, je bilo vprašanje o datumu rojstva. Vnesla sem lažen podatek in brez problema izbrala, naročila in plačala ter prevzela paket s sestavinami za sestavo vejpa in mešanje tekočin. Omenjena spletna stran ni edina, na kateri je to mogoče, na večini legalnih spletnih strani je namreč vpis datuma rojstva edini varnostni ukrep, ki pa vsekakor ne preprečuje nakupa mladoletne osebe. Izdelke sem prevzela ne da bi kdorkoli vsaj preveril mojo osebno izkaznico, kakor npr. pri kupovanju alkohola. Med drugim na izdelkih tudi ni bilo slovenski napisov oz. ničesar v slovenščini. Sestavine, ki sem jih naročila (in kasneje uporabila v poskusu) so bile prav tako v količinah, ki bi bile zmešane skupaj izredno nevarne. Naročila sem na primer več stekleničk nikotinskih pospeševalcev, saj količina pri nakupu ni omejena. Posledično lahko uporabnik sam eksperimentira in krepko preseže količino tudi legalno dovoljene količine nikotina v vejp tekočini (20 mg/ml). Ko uporabnik prejme sestavine jih lahko meša po lastni izbiri. So pa na spletnih straneh, dostopni kalkulatorji za izračun primerne količine glede na željo uporabnika. Tak kalkulator smo uporabile tudi z mentoricama za izračun sestave mešanic vejpov.

3.4 Metode dela

Uporabljene celične linije:

- **MRC-5**: diploidna celična linija iz človeških fibroblastov (pljučne celice) (ATCC, b.d.-a)
- **NHA**: normalni človeški astrociti (možganske celice) (Lonza, b.d.)
- **Hep G2**: linija človeških jetrnih rakavih celic, ki imajo dobro ohranjeno funkcijo jeter, zato so še posebej uporabne za raziskave (ATCC, b.d.-b)

3.4.1 Priprava mešanic za tretiranje (tretmaje)

Vse vejp mešanice so bile zamešane sveže pred poskusom, razen za Vape 7 (18 mg/ml), ki je e-naprava za enkratno uporabo (elektronska palčka iz katere sem ekstrahirala 2 ml tekočine). Vejp mešanice sem pripravila s pomočjo uporabe kalkulatorja, ki je dostopen na spletni strani, kjer kupiš sestavine za vejp. Namenjen je uporabnikom, ki si sami mešajo vejp tekočine (*QVapehouse, b.d.*) pri vejpih za večkratno uporabo. Vejpe sem zamešala po spodnjem izračunu le za manjše volumne. PG/VG je topilo tako za nikotinsko bazo kakor za arome.

Pripravila sem 5 ml vejp mešanice:

- recept za Pegase in Galatee (4 ml nikotinskega pospeševalca (navaden ali solni) + 1 ml arome)
- recept za Cirkus (4,02 ml nikotinskega pospeševalca (navaden ali solni) + 0,22 ml čistega PG/VG + 0,75 ml arome)

3.4.2 Izračun koncentracij za tretmaje

Pri računanju koncentracij sem izhajala iz članka (*Lee idr., 2018*) o izvedeni raziskavi, v katerem piše, da naj bi v človeški sistem prišla približno dvanajstina koncentracije vdihanega vejpa. Ta vir je služil kot izhodišče, saj je področje vejпов še vedno izredno neraziskano oz. t. i. »siva cona«. Tudi strokovnjaki na NIJZ namreč pravijo, da nam primanjkuje podatkov (*NIJZ, 2018*).

Upoštevala sem »življenjsko mero« za lažjo predstavljaljivost količine, in sicer en povprečen vejp za enkratno uporabo, ima 600 vdihov. Za najvišjo koncentracijo sem uporabila 600 vdihov, za srednjo 300 vdihov (pol manj) in za najnižjo koncentracijo 100 vdihov.

Povprečen vejp vsebuje 18 mg nikotina na 1 ml. V vseh napravah je 2 ml tekočine, kar nanese 36 mg nikotina v 2 ml. Ker v naše telo pride dvanajstina vdihnenih količin, to pomeni, da če ima 600 vdihov 36 mg nikotina v 2 ml, ga v naše telo pride 1/12 od tega, kar je 3 mg/ml nikotina in to sem vzela za standard. Ko sem s pomočjo kalkulatorja preračunala kako zamešati vejp sem ugotovila da je 3 mg nikotina raztopljenih v 16,8 % PG/VG-bazi, v kateri so raztopljene vse snovi za pripravo vejпов. Torej je izračun koncentracij sledil naslednjemu receptu: 600 vdihov = porabljen celoten vejp = 3 mg/ml nikotina, 300 vdihov = porabljen polovični vejp = 1,5 mg/ml nikotina ter 100 vdihov =

porabljena 1/6 vejpa = 0,5 mg/ml nikotina. V nadaljevanju je vsaki koncentraciji nikotina pripadala svoja kontrola topila. Kot kontrola topila je bil PG/VG. Pri koncentraciji 3 mg/ml nikotina je vsebovala 16,8 % PG/VG, koncentracija 1,5 mg/ml nikotina je vsebovala 8,40 % PG/VG in koncentracija 0,5 mg/ml nikotina je vsebovala 2,8 % PG/VG topila. Po enakem ključu so bile preračunane tudi koncentracije arom. Pozitivna kontrola je bil 7 % DMSO (preliminarni poskus) ter 33 % PG/VG (vsi ostali poskusi).

3.4.3 Priprava tretmajev

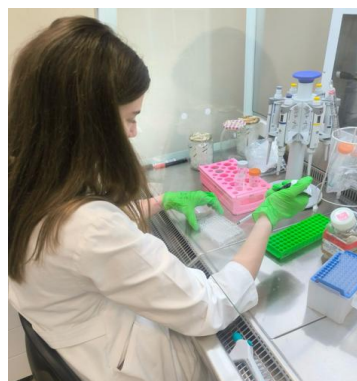
Vse izbrane koncentracije vejпов in posameznih komponent so bile zamešane v primernih razmerjih s celičnim medijem, ki je bil za vsako celično linijo specifičen. Za vsako tretma »Vape x ($x \in 1, 2, 3, 4, 5, 6$)« so bile testirane tri različne koncentracije za dva nikotinska pospeševalca (v njim pripadajočih PG/VG razmerjih [%]): 0,5 mg/ml (2,80 %), 1,5 mg/ml (8,40 %) in 3 mg/ml (16,80 %).

Vse tri arome, ki ne vsebujejo nikotina pa so bile testirane v treh različnih koncentracijah glede na vsebnost PG/VG (2,80 %, 8,40 % in 16,80 %). Za sestavo nikotinskih pospeševalcev in arom glej »Tabela 4.

Tabela 6: Mešanice vejп tekočin

Tretma	Vsebnost	
	Aroma	Nikotin
Vape 1	Galatee	KN
Vape 2	Galatee	SN
Vape 3	Pegase	KN
Vape 4	Pegase	SN
Vape 5	Cirkus	KN
Vape 6	Cirkus	SN
Vape 7	Wiipstick X	

Tretma	Vsebnost
NK	Navadni pospeševalec
SN	Solni pospeševalec
Tretma	Vsebnost
Aroma 1	Cirkus
Aroma 2	Pegase
Aroma 3	Galatee



Slika 3: Jaz pri izvajanju eksperimentalnega dela naloge

Prav tako so bile na vsaki plošči tudi vdolbinice z vsemi tremi koncentracijami PG/VG v mediju, ki so služile kot kontrola topila za tretmaje (da izenačim učinek topila) ter vdolbinice s celicami v katere sem dala medij, ki so služile kot kontrola. Vsi tretmaji so bili opravljeni za vse tri celične linije. Celice sem izpostavila za 24 h. Vsi procesi dela s celicami, ki zahtevajo aseptično delo so potekali v laminariju, ki je bil predhodno razkužen s 70 % etanolom.

3.4.4 Priprava in štetje celic

Uporabila sem razmerje 1:1 z 20 μ L tripan modrega in 20 μ L celic. V majhno centrifugirko sem namešala barvilo ter dodala celice iz centrifugirke z odmrznjenimi celicami in premešala s pipeto (prbl. 5-krat). Nato sem na hemocitometer položila krovno stekelce ter na vsak okenček hemocitometra odpipetirala 10 μ L mešanice tako, da je mešanica 'zlezla' pod stekelce. Celice sem preštela z napravo 'countesso' (Countess Automated Cell Counter), ki omogoča digitalno natančno štetje celic. V napravo se zgolj vstavi hemocitometer in na ekranu je možno videti število živih in mrtvih celic (s številko ter v %). Po znanem številu celic se glede na dobljeno št. celic/ml izračunala koliko celic je potrebno dodati gojišču za presaditev, in sicer po sledeči formuli: $\frac{c_1}{V_1} = \frac{c_2}{V_2}$. Odvisno od celične kulture sem izračunala volumen za 6000 ter 8000 celic na vdolbinico plošče s 96 vdolbinicami.

3.4.5 Tretiranje celic

Naslednji dan po 24 h sem iz vseh vdolbinic z vakumboyem odsesala medij tako, da nisem pobrala celic. Od tukaj naprej je delo prevzela mentorica, saj je šlo za delo s toksičnimi snovmi. Različne celične linije so bile tretirane s tretmaji, ki so bili vedno pripravljene sveže v različnih medijih glede na celično linijo (*glej poglavje 3.1.5.3*). Tretirane plošče s 96 vdolbinicami sem postavila nazaj v inkubator z nadzorovanimi pogoji 37°C, 5 % CO₂ in vlago za 24 h. Meritve na Cytation 5 in pod mikroskopom EVOS sem opravila po 24 h izpostavitvi.

3.4.6 Luminiscenčni test s Cell Titer Glo – test viabilnosti

Cell Titer Glo je metoda za določanje števila živih celic v kulturi, ki temelji na količini prisotne ATP energije, ki je indikator presnovno aktivnih celic. (*Promega, b.d.*)

Cell Titer Glo se meša v razmerju 1:1, zato sem nato iz vsake vdolbinice izsesala 50 %, torej 50 μ L tekočine tako, da nisem pobrala celic na dnu. Dodala sem 50 μ L reagenta (Cell Titer Glo) v vsako od vdolbinic. Postopek sem izvajala v laminariju, brez luči, da svetloba ne bi vplivala na rezultate. Ploščo s tretiranimi celicami in dodanim reagentom sem pokrila z aluminijasto folijo, za zaščito pred svetlobo in jo za 10 minut dala na orbitalni stresalnik, da so se celice odlepile in zbrale na sredini, predvsem pa zato, da sem

povzročila lizo celic. Nato sem vso vsebino plošče s tretiranimi celicami s pipeto prenesla na belo ploščo, saj sem merila luminiscenco. Postopek sem ponovila z vsemi ploščami ter jih odnesla v bralnik mikroplošč (Cytation 5), kjer sem izvedla test luminiscence. Ob lizi celic v kombinaciji z reagentom, je namreč luminiscenčni signal, ki ga celica generira sorazmeren s količino prisotnega ATP. Reagent povzroči luminiscenčni signal 'svetlečega tipa', ki ga lahko izmerimo. Tako sem pridobila podatke o količini ATP za posamezne tretmaje v primerjavi s kontrolo.

3.4.7 Mikroskopija

Vse plošče s 96 vdolbinicami sem natančno pregledala pod mikroskopom, pri čemer sem vsako vdolbinico posebej primerjala s kontrolo na 10 000x povečavi (EVOS). Za vsak poskus sem naredila slike vseh vdolbinic na plošči, v nalogi pa bom prikazala le reprezentativne rezultate.

4. ANALITIČNI DEL

4.1 Rezultati ankete



Anketa je bila razdeljena na tri pomenske enote. Prvi del je bil splošni, enak za vse, nato pa se je glede na podane odgovore vprašanih, anketa razdelila na vprašanja za tiste, ki so že kdaj v življenju poskusili vejp ali redno vejpajo ter tiste, ki še nikoli niso uporabili vejpa. Celotni anketni vprašalnik lahko najdete na priloženi QR-kodi.

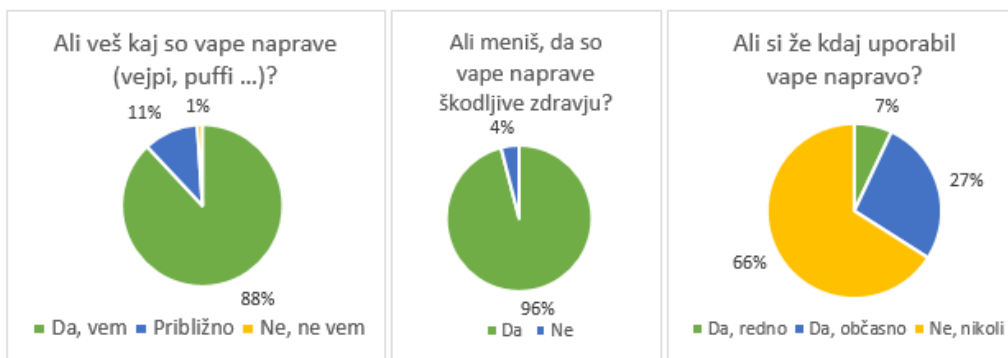
Slika 4: Povezava do vprašalnika

4.1.1 Demografski podatki anketirancev

V anketi je sodelovalo 13 % osnovnošolcev, 63 % gimnazijcev in 23 % dijakov poklicnih šol. 1 % anketirancev je podalo neveljavni odgovor. Anketiranci so bili v starosti od 11 do 20 let, 1 % jih je bilo starih 11 let, 3 % 12 let, 4 % 13 let, 4 % 14 let, 19 % 15 let, 22 % 16 let, 25 % 17 let, 16 % 18 let, 4 % 19 let in 1 % 20 let. Največ anketirancev je bilo torej starih 16 oz. 17 let. 66 % anketiranih učencev je bilo ženskega in 34 % moškega spola.

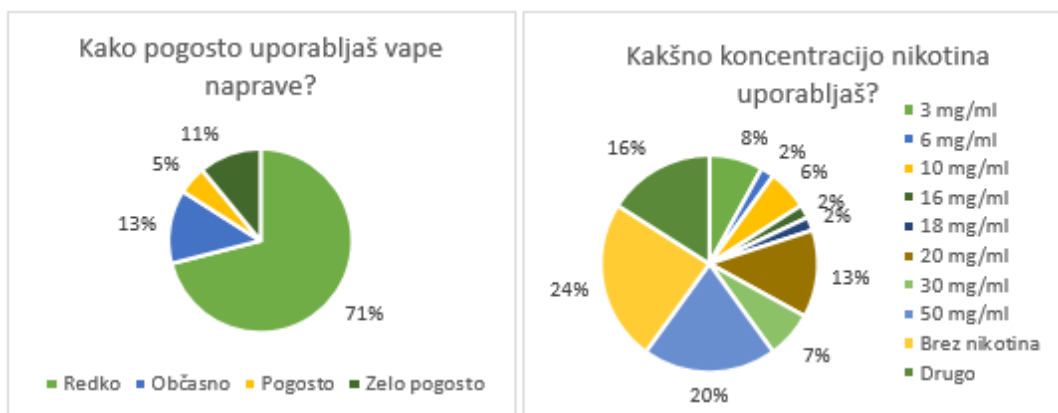
4.1.2 Splošno znanje anketirancev o vejpih

Na vprašanje: »Ali veš kaj so vape naprave?«, je največ (88 %) anketirancev odgovorilo z »Da, vem.«, 11 % jih je odgovorilo, da vedo približno in zgolj 1 % jih je označilo, da ne vedo kaj je vejp. Tisti, ki so na vprašanje odgovorili, da vedo približno ali ne vedo kaj je vejp, so pred naslednjim vprašanjem dobili obrazložitev kaj vejp je. Pri naslednjem vprašanju, je kar 96 % anketirancev na vprašanje »Ali meniš, da so vape naprave škodljive zdravju?« odgovorilo z »Da.« (Slika 5). Na vprašanje ali kadijo navadne cigarete je 10 % vprašanih odgovorilo, da cigarete kadijo še zdaj, 13 % pa da so jih, vendar jih ne kadijo več. Preostali (77 %) nikoli ni kadilo cigaret. Z vprašanjem »Ali si že kdaj uporabil vape napravo?« je bil namen ločiti anketirance v dve skupini glede na njihove izkušnje z vejpanjem. Če so odgovorili z »Da, redno.« (7 %) ali »Da, občasno.« (27 %), so bili preusmerjeni na vprašanja o njihovi izkušnji. Medtem ko je 66 % vprašanih odgovorilo, da še nikoli niso uporabili vejpa in so bili preusmerjeni na drugačna vprašanja (Slika 5).



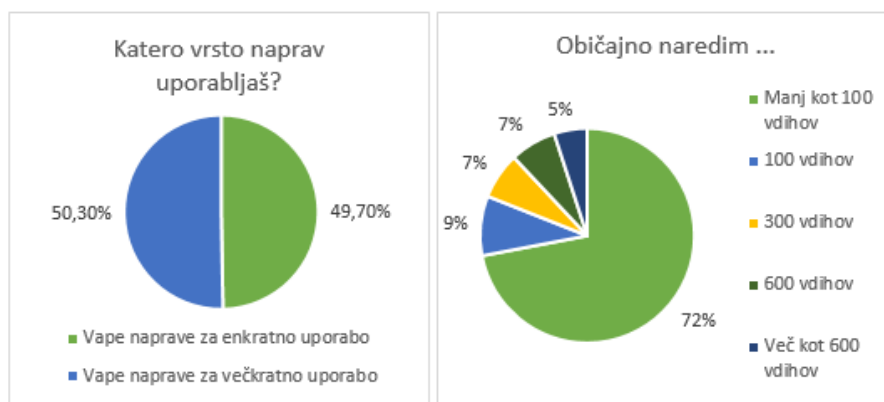
Slika 5: Strukturalni krogi o prikazu splošnega znanja anketirancev o vejpih (Vir: Lastni prikaz)

4.1.3 Uporabniki vevpov



Slika 6: Strukturalna kroga o prikazu uporabe vevpa (Vir: Lastni prikaz)

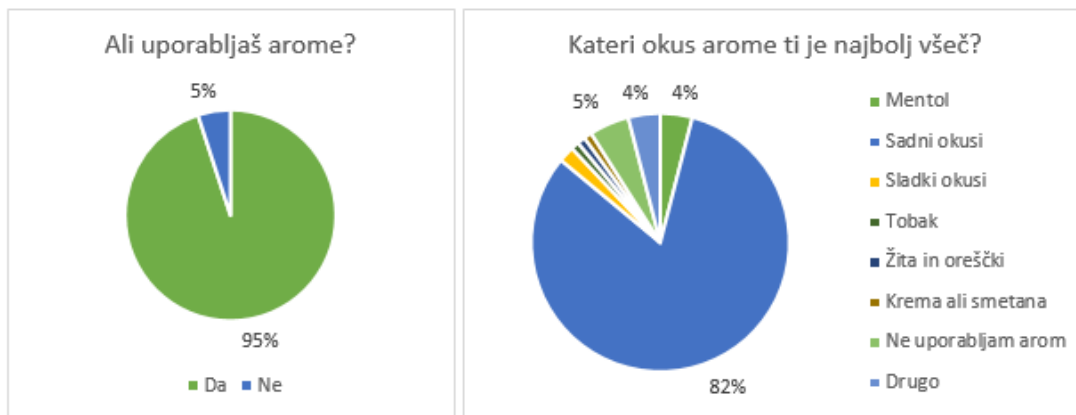
Od 240 anketirancev, ki so že kdaj poskusile vejp ali ga tudi redno uporabljajo, sem dobila sledeče odgovore. Na vprašanje o pogostosti uporabe vejpa je 71 % anketirancev odgovorilo, da vejpajo redko (nekajkrat na mesec ali manj), 13 % jih vejpja občasno (nekajkrat na teden), 5 % pogosto (vsak dan) in 11 % zelo pogosto (večkrat na dan). To pomeni, da 29 % anketiranih uporabnikov vejpa nekajkrat na teden ali več. Pomembno vprašanje je bilo »Kakšno koncentracijo nikotina v vape napravi običajno uporabljaš (glede na oznako na izdelku)?«. Rezultati so bili sledeči: največ anketirancev je odgovorilo, da ne uporabljajo vejp naprav z nikotinom (24 %), nekaj manj pa, da uporabljajo vejpe z 5 % oz. 50 mg/ml nikotina (20 %). Največjo legalno količino 20 mg/ml uporablja 13 % vprašanih, 3 mg/ml 8 %, 30 mg/ml uporablja 7 % vprašanih, 10 mg/ml pa 6 % anketirancev. Po 2 % anketirancev uporablja vejpe z 6 mg/ml, 16 mg/ml in 18 mg/ml. 16 % odgovorov na to vprašanje je padlo v kategorijo »Drugo«, od tega je 60 % zapisalo, da ne vedo kolikšno koncentracijo nikotina uporabljajo (med drugim zato, ker si vejpe sposodijo pri prijateljih) (Slika 6).



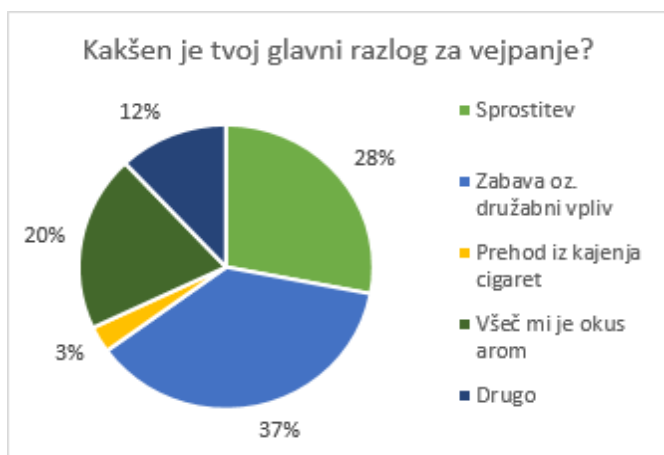
Slika 7: Strukturalna kroga o prikazu uporabe vejpa in številu vdihov (Vir: Lastni prikaz)

Na vprašanje »Katero vrsto vape naprave uporabljaš najpogosteje?« je 49,7 % uporabnikov vejпов odgovorilo, da uporabljajo naprave za enkratno uporabo, 50,3 % pa naprave za večkratno uporabo. Na vprašanje »Kadar uporabljam vape napravo običajno:« je 72 % uporabnikov vejпов odgovorilo, da naredijo manj kot 100 vdihov. Teh 72 % je dobilo podvprašanje, pri katerem so zapisali koliko vdihov naredijo in odgovori so se gibali med 10 in 80 vdih. 9 % uporabnikov vejпов je odgovorilo »Porabim približno šestino vape-a za enkratno uporabo oz. 100 vdihov«, 7 % »Porabim približno polovico vape-a za enkratno uporabo oz. 300 vdihov«, prav tako 7 % »Porabim celoten vape za

enkratno uporabo oz. 600 vdihov« in preostalih 5 % je označilo, da porabijo več kot en vape za enkratno uporabo oz. več kot 600 vdihov (Slika 7).



Slika 8: Strukturalna kroga o prikazu uporabe arom v vejpih (Vir: Lastni prikaz)

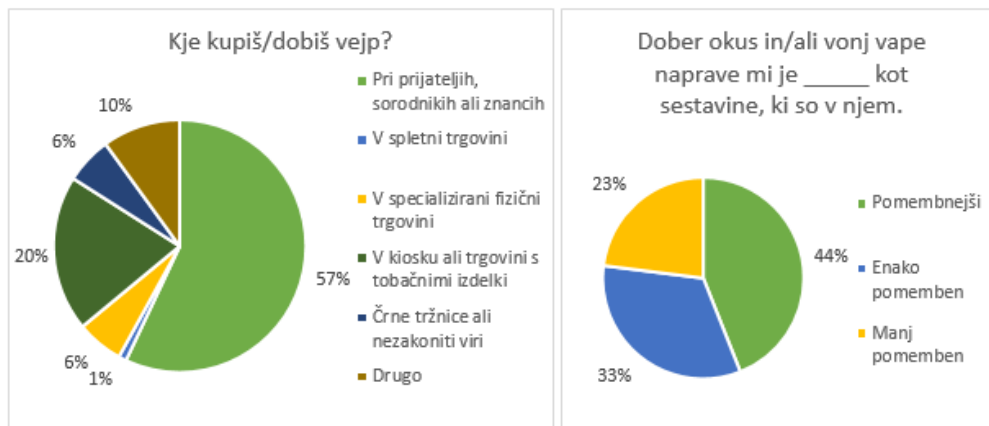


Slika 9: Strukturalna kroga o prikazu razloga za uporabo vejpa (Vir: Lastni prikaz)

Kar 95 % anketiranih uporabnikov vejпов uporablja vejpe z aromami. Na vprašanje »Kateri okus vape-a ti je najbolj všeč?« je 5 % odgovorilo, da arom ne uporabljajo. Večina (82 %) je izbrala odgovor »Sadni okusi (npr. lubenica, jagoda, grozdje, mango, gozdni sadeži ...)«, 4 % so odgovorili, da imajo najraje okus mentola, 2 % je izbralo »Sladki okusi (npr. bonboni, karamela, sladice ...)«, po 1 % pa »Tobak«, »Žita in oreščki (npr. kokos, mandlji ...)« in »Krema ali smetana«. Preostali 4 % so označili možnost »Drugo« in pisali specifične okuse, kakršen je Red Bul in Blue Razz Ice (Slika 8).

Kot razlog za uporabo vejпов med mladimi je največ, 37 %, uporabnikov navedlo zabavo oz. družabni vpliv, 28 % pa sprostitvev. 20 % je zapisalo, da jim je všeč okus arom, 3 % pa je označilo »Prehod iz kajenja cigaret«. 12 % je izbralo možnost »Drugo« in med razlogi, ki so jih zapisali so bili stres, ljubezenske težave, radovednost in želja po tem, da

bi bili kul. Nekaj jih je enostavno zapisalo, da nimajo posebnega razloga, ampak jim vejpanje preprosto paše (Slika 9).



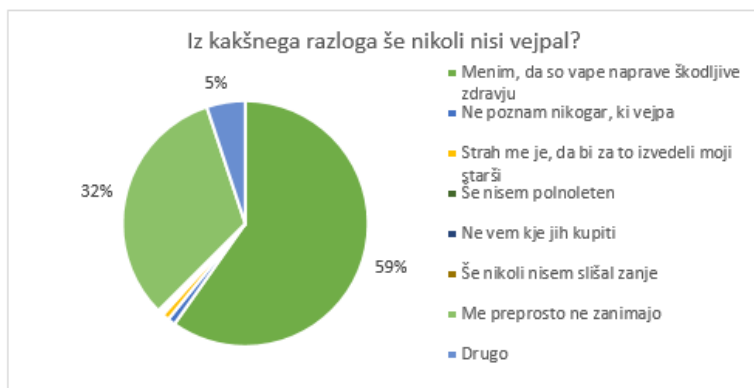
Slika 10: Strukturalna kroga o prikazu načina pridobitve vejpa in pomembnih lastnosti vejpa (Vir: Lastni prikaz)

Na vprašanje »Kje običajno kupiš ali dobiš vape naprave?« je več kot polovica (57 %) uporabnikov odgovorila »Pri prijateljih, sorodnikih ali znancih (neformalni nakupi)«, 20 % »V kiosku ali trgovini s tobačnimi izdelki«, 6 % jih je označilo »V specializirani fizični trgovini (vape shopi)« in prav tako 6 % »Črne tržnice ali nezakoniti viri«. Samo 1 % je izbral odgovor »V spletni trgovini (naročim preko spleta)«, preostalih 10 % pa je pod »Drugo« navajalo specifične lokacije ter to, da si jih sposodijo pri prijateljih in znancih, a jih ne kupijo. Zanimalo me je, koliko je uporabnikom vejпов sploh mar za sestavine oz. snovi v vejpu, če ima le-ta dober okus oz. vonj. Na »Dopolni stavek: Dober okus in/ali vonj vape naprave mi je _____ kot sestavine, ki so v njem.« je 44 % uporabnikov odgovorilo, da jim je okus oz. pomembnejši od sestavin, 33 %, da jim je enako pomemben in 23 %, da jim je manj pomemben (Slika 10).

4.1.4 Anketiranci, ki še nikoli niso poskusili vejpa

Na vprašanje »Iz kakšnega razloga še nikoli nisi uporabil vape naprave?« je bilo 59 % odgovorov »Ker menim, da so vape naprave škodljive zdravju«, 32 % pa »Ker me preprosto ne zanima kakšen je občutek«. Po 1 % vprašanih je odgovorilo, da je razlog to, da ne poznajo nikogar, ki vejpata ter da jih je strah, da bi za vejpanje izvedeli njihovi starši. Manj kot 1 % oz. 1-2 vprašana sta kot razlog označila »Ker še nisem polnoleten in ne smem kupiti vape naprave«, »Ker ne vem kje jih kupiti« ali »Ker nikoli prej nisem slišal zanje«. 5 % vprašanih je izbralo možnost »Drugo« in med odgovori so bili kot razlogi

navedeni astma, slab vonj vejпов, več od ponujenih odgovorov (niso se mogli opredeliti),



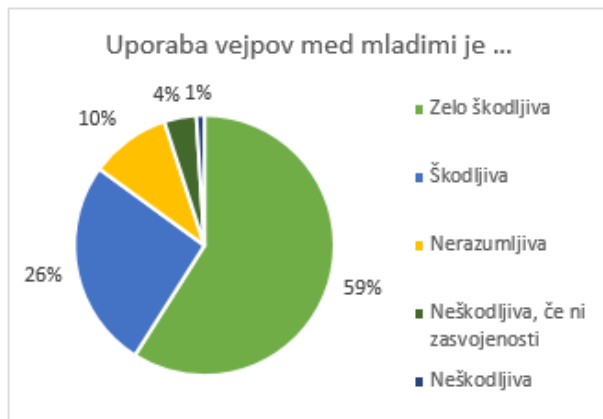
to, da so športniki, ker menijo, da je vejpjanje za manj inteligentne posameznike, tudi to, da uporabljajo druge sisteme za dovajanje nikotina in podobno (Slika 11). Pri vprašanju »Koliko ljudi, ki jih poznaš uporablja vape naprave občasno (nekajkrat na teden) ali pogosteje?« je 30 %

Slika 11: Strukturni krog o prikazu razloga za neuporabo vejpa (Vir: Lastni prikaz)

vprašanih odgovorilo, da poznajo več kot 6 takšnih oseb, 25 % pozna 3-4, 23 % 1-2 osebi in 10 % 5-6 oseb. 12 % vprašanih ne pozna nikogar, ki bi občasno ali pogosteje vejpjal.

4.1.5 Mnenje anketirancev o uporabi vejпов med mladimi

Na skupno vprašanje o njihovem mnenju o uporabi vejпов med mladimi, je več kot



Slika 12: Strukturni krog o prikazu mnenja mladih o uporabi vejpa (Vir: Lastni prikaz)

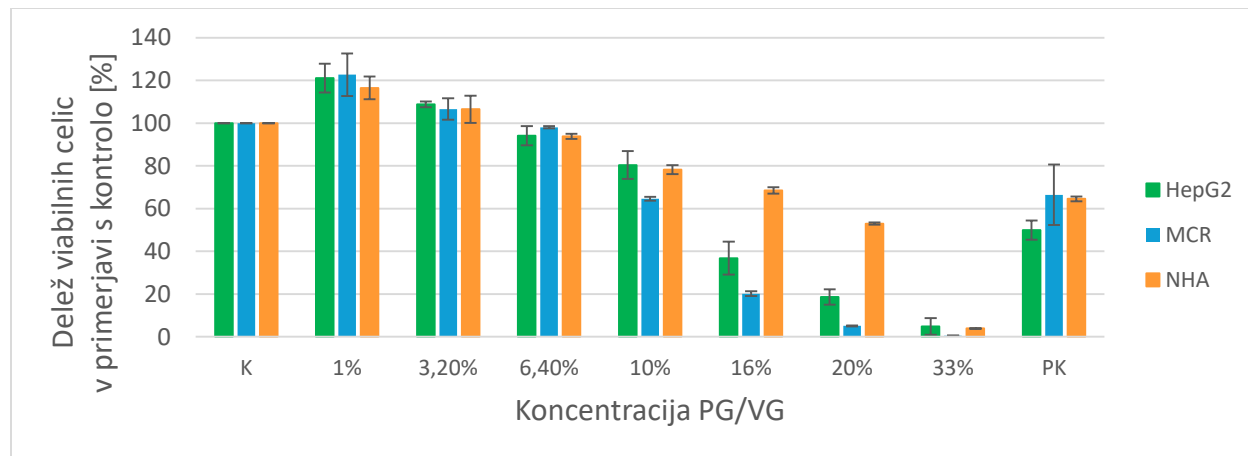
polovica (59%) vseh anketirancev odgovorila, da se jim zdi le-ta zelo škodljiva, 26 % da se jim zdi škodljiva in 10 % je odgovorilo, da jim je nerazumljiva (menijo, da mladi ne bi smeli uporabljati vejp naprav). 4 % vprašanih so označili, da je vejanje med mladimi po njihovem mnenju neškodljivo, če ni zasvojenosti in samo 1 % anketiranih je odgovorilo, da je uporaba vejпов po njihovem mnenju neškodljiva (Slika 12).

4.2 Rezultati laboratorijskega dela naloge – vpliv izbranih vejпов in njihovih posameznih komponent na živost celic

V drugem delu raziskovalne naloge sem na 2D *in vitro* celičnih modelih (MRC5, HepG2, NHA) preučila vpliv 7 različnih vejp mešanic in njihovih posameznih komponent (baza 50%50 PG/VG, 3 arome, 2 nikotinska pospeševalca (glej poglavje 3.1.5.3)) na morfologijo in živost humanih celic.

4.2.1 Preliminarni poskusi za izbor koncentracij in določitev vpliva baze PG/VG na morfologijo in živost humanih celic (MRC5, HepG2, NHA)

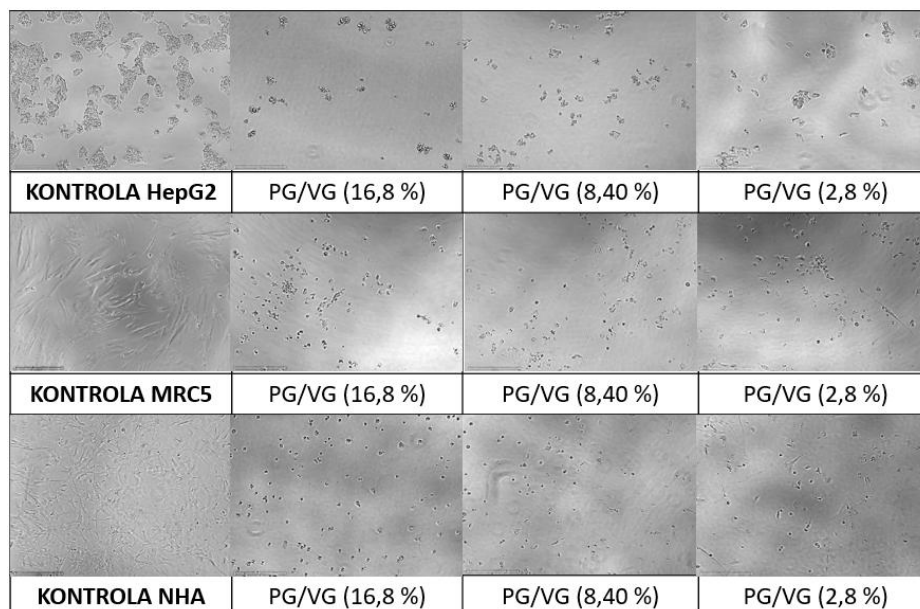
Najprej sem izvedla preliminarne teste, kjer sem določila izbrane koncentracije glede na vpliv na morfologijo in živost celic ter glede na povprečno koncentracijo snovi iz vejp tekočine, ki pride v stik z našim organizmom (*glej poglavje 3.1.5.3*). Vpliv baze PG/VG na morfologijo celic sem ocenila na podlagi videza z mikroskopskim pregledom pod 10 000x povečavo (EVOS), kjer sem izpostavljene celice primerjala s kontrolo. Nato sem izmerila vpliv topila PG/VG na živost celic s pomočjo testa ATP (*glej poglavje 3.1.5.6*), kjer sem posamezen tretma primerjala s kontrolo (celice v zanje specifičnem mediju), ki je predstavljala 100 % viabilnost celic. Vse kar je bilo 70 % ali manj viabilno, je pomenilo citotoksičnost.



Slika 13: Vpliv baze PG/VG na živost humanih celic (HepG2, MRC5, NHA) po 24 h izpostavitve v primerjavi s kontrolo (K). Kot pozitivno kontrolo (PK) sem uporabila 7 % DMSO. (*Vir: Lastni prikaz*)

Graf (Slika 13) prikazuje, da je že sama baza PG/VG koncentracijsko odvisno toksična za vse testirane celične linije. 1 % in 3,2 % PG/VG baze v mediju ne vpliva na viabilnost testiranih celic, prav tako pri 10 % in 6,4 % PG/VG še ne gre za citotoksičnost, pride pa do rahlega upada živosti. Nasprotno je najvišja testirana koncentracija 44 % PG/VG zelo citotoksično vplivala na vse testirane celične linije. Zaključim lahko, da že sama baza, ki se uporablja za pripravo vejp tekočin, precej vpliva na živost testiranih celičnih linij. Meja toksičnosti topila PG/VG pa je med 10 in 16 %. Ker baza deluje kot topilo pri vseh ostalih komponentah je pomembno, da pri tretiranju izberemo koncentracije, ki niso toksične. Na podlagi pridobljenih rezultatov in izračunanih koncentracij, ki pridejo do izpostavljenega

organizma (*glej poglavje 3.1.5.3*) smo z mentoricama za nadaljnje raziskave izbrali naslednje koncentracije PG/VG 16,8 %, 8,40 % in 2,8 %.



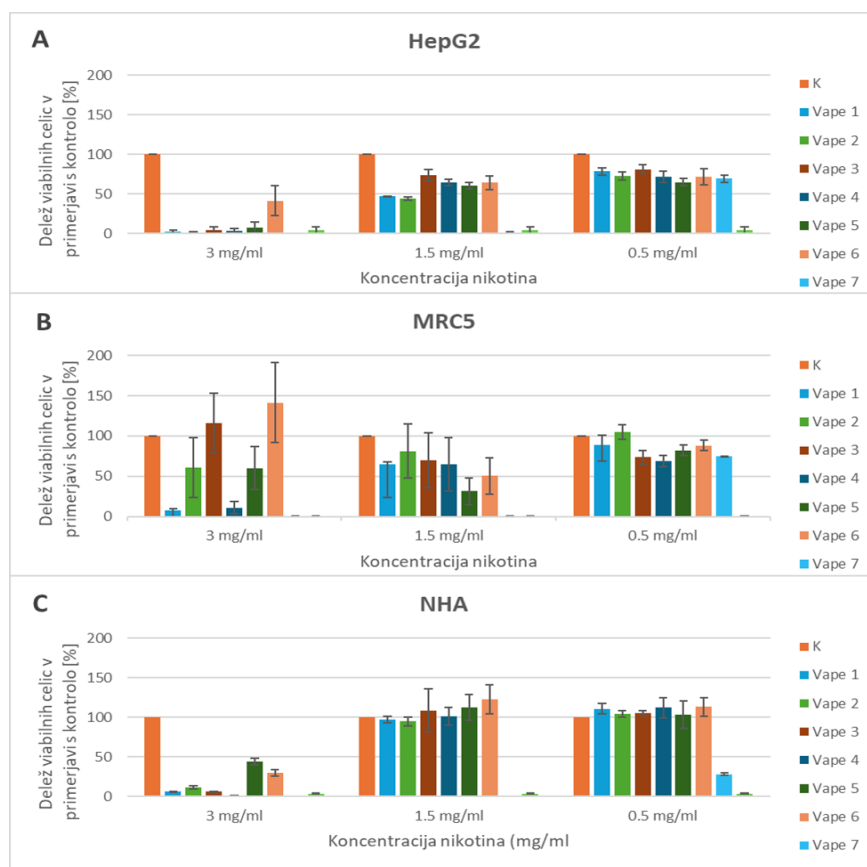
Slika 14: Morfološki pregled sprememb na humanih celicah (HepG2, MRC5, NHA) 24 h po izpostavitvi bazi PG/VG pri 10 000x povečavi (EVOS; 10 000x povečava) (Vir: Lastni prikaz)

Morfološki pregled celic pod mikroskopom (EVOS) je pokazal, da so se po 24 h izpostavitve PG/VG pri vseh testiranih celičnih linijah prekinile medcelične povezave. Celice so se skrčile v manjše skupke in njihova konfluenca se je malo zmanjšala. Zaradi morfoloških sprememb lahko rečemo, da so bili oslabljeni biološko potrebni procesi.

4.2.2 Vpliv različnih vejпов na živost celic in spremembe v morfologiji po celičnih linijah

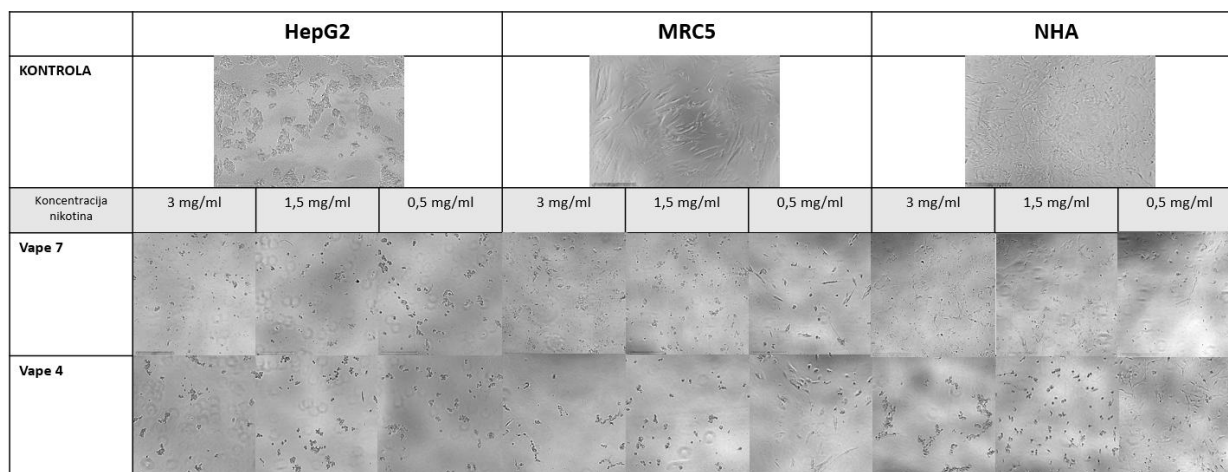
S testom CellTiter-Glo (vsebnost ATP) sem 24 h po izpostavitvi tretmajem ocenila vpliv mešanic vejпов (*glej poglavje 3.1.5.3*) na živost celic na različnih celičnih modelih (HepG2, MRC5 in NHA celice). Rezultati so pokazali, da so jetrne celice HepG2 najbolj občutljive na testirane vejp tekočine, sledijo pa jim pljučne celice MRC5. Pri višjih testiranih koncentracijah nikotina so bile bolj kakor pljučne prizadete možganske celice (NHA), pri najnižji testirani koncentraciji pa so bile bolj prizadete pljučne celice (MRC5). Koncentracija 3 mg/ml nikotina je pri vseh treh celičnih linijah delovala najbolj citotoksično, tudi zato, ker je pri tej koncentraciji vsebnost PG/VG 16,8 %, ki je že sama po sebi delovala rahlo toksično. Najmanjši vpliv na živost celic ima Vape 3, največjega pa Vape 7. Pri celicah HepG2 (Slika 15A) lahko opazimo, da je bil pri višjih koncentracijah mg/ml

in 1,5 mg/ml kar se sklada s 600 in 300 vdihni vejpa, najbolj toksičen Vape 7, ki je deloval citotoksično tudi pri najmanjši uporabljeni koncentraciji nikotina (0,5 mg/ml), pri kateri je odmrlo približno 30 % celic. Najmanj toksična tekočina pa je Vape 3, saj je citotoksičen samo pri najvišji koncentraciji (odmrlo 96 % celic). Pri celicah MRC5 (Slika 15B) opazimo, da najbolj citotoksično delujeta Vape 7 in 4 saj pri koncentraciji 1,5 mg/ml nikotina znižata viabilnost za 99,8 % in 35 %, pri 0,5 mg/ml nikotina pa za 26 % in 32 %. Za Vape 3 lahko rečemo, da je toksičen pri srednji in nizki koncentraciji, pri najvišji koncentraciji pa povišanje viabilnosti (115 %) nakazuje na delovanje mitohondrijskih encimov, kar pa pomeni, da je celica v stresu. Pri celični liniji NHA (Slika 15C) lahko opazimo, da je le-ta najbolj odporna na vplive vejp mešanic. Vidimo lahko, da pri koncentracijah 1,5 mg/ml in 0,5 mg/ml nikotina (kjer ni več vpliva PG/VG) vsi vejpji, razen Vape 7, ne vplivajo na živost celic. Kot pozitivno kontrolo (PK) testa celične viabilnosti sem uporabila 33 % PG/VG, ki ubije vse celice.



Slika 15: Vpliv mešanic vejpov na posamezno celično linijo (HepG2, MRC5, NHA) po 24 h izpostavitve različnim koncentracijam nikotina. Vsebnost arom je enaka. (Vir: Lastni prikaz)

4.2.2.1 Mikroskopski pregled morfologije vejpom izpostavljenih celičnih linij



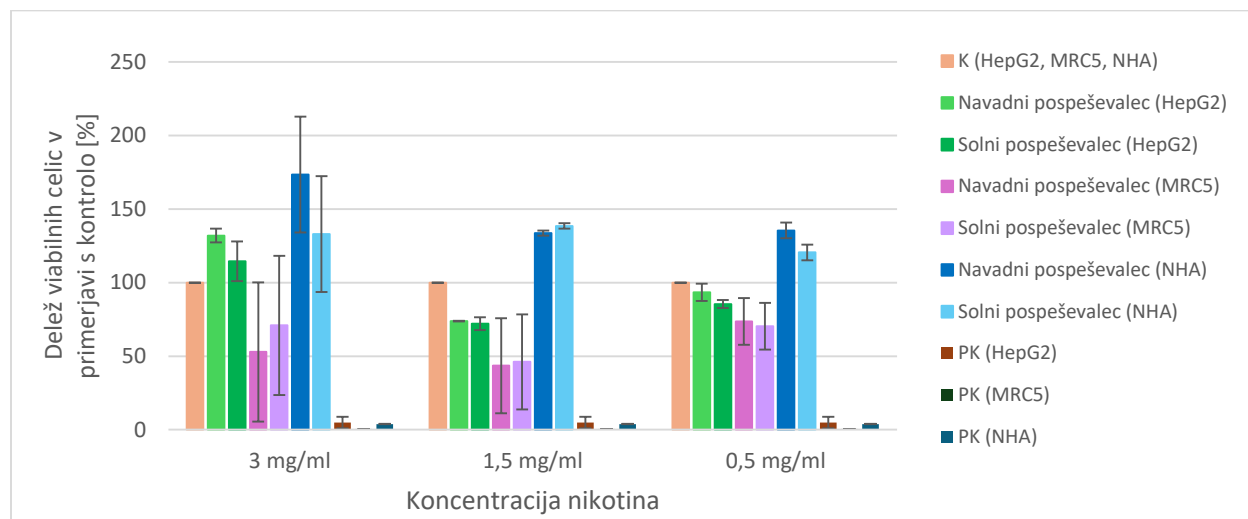
Slika 16: Morfološki pregled sprememb na humanih celicah (HepG2, MRC5, NHA) 24 h po izpostavitvi najbolj (Vape 7) in najmanj toksični vejp mešanici (Vape 4) (EVOS; 10 000x povečava) (Vir: Lastni prikaz).

Na sliki 16 so prikazane morfološke spremembe humanih jetrnih (HepG2), pljučnih (MRC5) in možganskih (NHA) celic, 24 h po izpostavitvi najbolj (Vape 7) in najmanj toksični vejp mešanici (Vape 4). Iz prikaza je vidno, da je tako Vape 4 kot Vape 7 povzročil smrt več celic ter prekinitev medceličnih povezav. Prav tako so se celice zelo skrčile oz. nekako zgrudile same vase, kar je bolj očitno pri tretmaju Vape 7 bolj kot pri Vape 4. Pri tretmaju Vape 4 so celice MRC5 in možganske celice NHA ohranile približno primarno morfologijo.

4.2.3 Katera od komponent vejpa najbolj prispeva k citotoksičnosti?

V nadaljevanju naloge me je zanimalo, ali so posamične komponente bolj ali manj citotoksične kakor v mešanici vejp tekočin, zato sem mešanico vejpov razstavila na posamezne komponente. Moje mešanice so bile sestavljene iz ene arome, nikotinskega pospeševalca in baze (glej poglavje 3.1.5.3). V nadaljevanju sem preučevala samo Vape 1-6, za katere sem imela točno znano sestavo. Različne celične linije (HepG2, MRC5 in NHA) sem za 24 h izpostavila dvema nikotinskima pospeševalcema pri različni vsebnosti nikotina (3 mg/ml, 1,5 mg/ml in 0,5 mg/ml) ter trem različnim aromam pri različni vsebnosti PG/VG, ki v tem primeru služi kot topilo. Za sestavo nikotinski pospeševalcev in arom glej »Tabela 4.

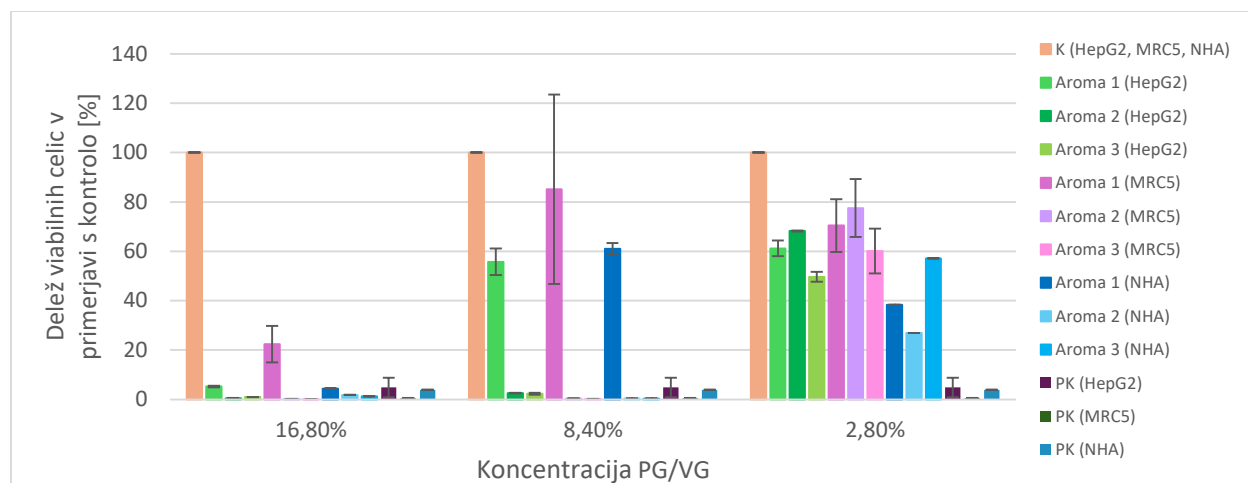
4.2.3.1 Vpliv testiranih nikotinskih pospeševalcev na živost celic v različnih celičnih modelih



Slika 17: Primerjava učinka nikotinskih pospeševalcev na posamezno celično linijo (HepG2, MRC5, NHA) po 24 h izpostavitve v različnih koncentracijah nikotina (Vir: Lastni prikaz)

Na sliki 16 rezultati prikazujejo, da sta nikotinska pospeševalca najbolj citotoksično vplivala na viabilnost pljučnih celic MRC5, najmanj, čeprav še vedno s toksičnim učinkom pa na jetrne celice HepG2. Možganske celice NHA so bile pri vseh testiranih koncentracijah nikotina krepko nad 100 % kar bi lahko povezali z delovanjem mitohondrijskih dehidrogenaznih encimov, kar pa nakazuje da so celice pod stresom. Oba nikotinska pospeševalca sta pri višjih testiranih koncentracijah nikotina delovala na celice MRC5 citotoksično in jih pobila, pri najnižji testirani koncentraciji pa so bili rezultati meritev malo nad zastavljeno mejo citotoksičnosti (73 % pri Navadnem in 70 % živost pri Solnem). Pri obeh pospeševalcih so bili sicer prisotni precejšnji standardni odkloni. Navadni pospeševalec je deloval bolj toksično kot Solni pospeševalec. Pri višjih dveh koncentracijah sta bila za celice HepG2 oba nikotinska pospeševalca toksična, pri 0,5 mg/ml pa ne. Oba nikotinska pospeševalca sta povzročila velik stres celic NHA, saj so bile pri vseh testiranih koncentracijah njihove vrednosti nad krepko 100 %, kar povezujemo z delovanjem mitohondrijskih dehidrogenazni. V večji stres je sicer celice v povprečju spravil Navadni pospeševalec, a so razlike precej majhne. Tudi v splošnem so ob upoštevanju standardnih odklonov razlike v toksičnosti med nikotinskima pospeševalcema minimalne.

4.2.3.2 Vpliv testiranih arom na živost celic v različnih celičnih modelih

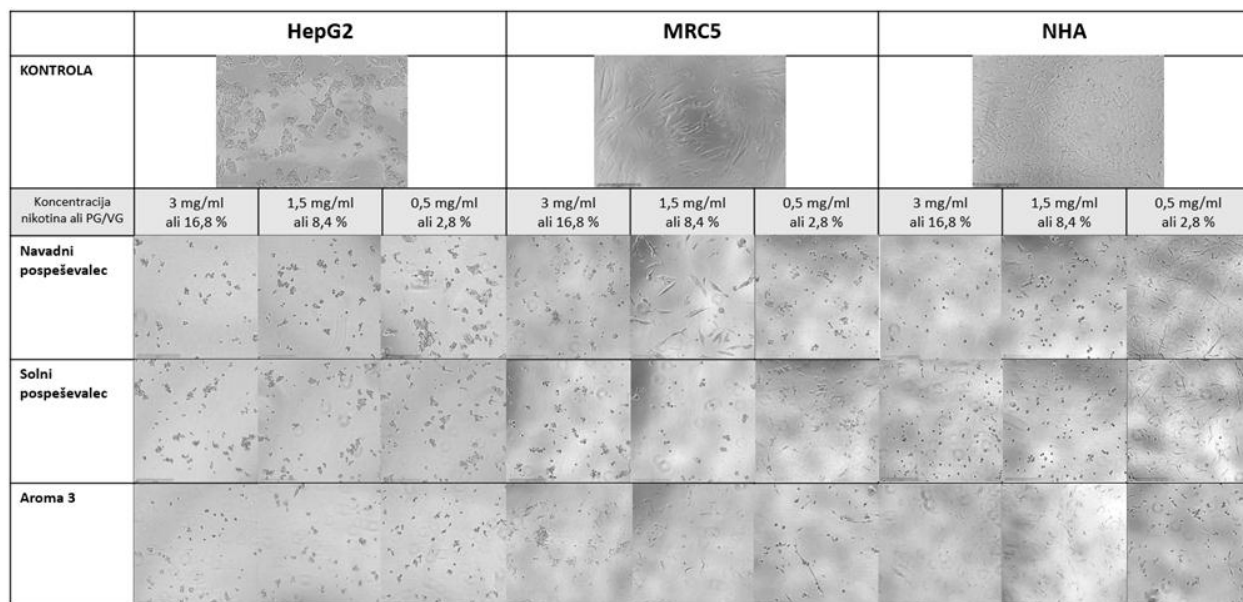


Slika 18: Primerjava učinka arom na posamezno celično linijo (HepG2, MRC5, NHA) po 24 h izpostavitve v različnih koncentracijah PG/VG (Vir: Lastni prikaz)

Iz grafa (Slika 18) je razvidno, da je na učinek arom najbolj občutljiva možganska celična linija NHA, najmanj pa pljučna linija MRC5. To pomeni, da arome najbolj vplivajo na viabilnost človeških možganskih celic in najmanj na viabilnost pljučnih celic. Vseeno ne smemo pozabiti, da čeprav je vpliv manjši, so pri najvišji testirani koncentraciji PG/VG (16,8 %) citotoksične prav vse arome in pri srednji (8,4 %) prav tako (z izjemo Arome 1 pri MRC5). Pri jetrnih celicah HepG2 lahko opazimo da so vse arome negativno vplivale na živost celic pri vseh testiranih koncentracijah PG/VG. Pri HepG2 celicah, se je pri Aromi 1 pri 16,8 % PG/VG živost zmanjšala za 95 %, pri 8,4 % PG/VG za 45 %, pri 2,8 % PG/VG pa za 39 %. Pri Aromi 2 pri 16,8 % PG/VG se je živost zmanjšala za 99,6 %, pri 8,4 % PG/VG za 98 % pri 2,8 % PG/VG pa za 32 %. Pri Aromi 3 pri 16,8 % PG/VG se je živost zmanjšala za 99 %, pri 8,4 % PG/VG za 98 % pri 2,8 % PG/VG pa za 51 %. Za jetrno celično linijo (HepG2) je torej najmanj, a še vedno očitno citotoksična Aroma 1, najbolj pa Aroma 3. Pri MRC5 celični liniji opazimo, da so vse testirane koncentracije vseh treh arom, z izjemo Arome 1 pri srednji koncentraciji PG/VG (8,4 %) citotoksične. Pri MRC5 celicah, se je pri Aromi 1 pri 16,8 % PG/VG živost zmanjšala za 78 %, pri 8,4 % PG/VG za 15 %, pri 2,8 % PG/VG pa za 30 %. Pri Aromi 2 pri 16,8 % PG/VG je umrlo 100 % celic, pri 8,4 % PG/VG za 99,7 % pri 2,8 % PG/VG pa za 23 %. Pri Aromi 3 je bilo pri 16,8 % PG/VG in 8,4 % umrlih 100 % celic, pri 2,8 % PG/VG pa za 40 %. Za pljučne celice MRC5 je torej najbolj citotoksična Aroma 3, v primerjavi z ostalima pa je najmanj toksična Aroma 1, ki pa glede na standardni odklon navzdol vseeno nakazuje na toksičen

vpliv. Pri možganski celični liniji NHA rezultati kažejo, da so vse testirane arome negativno vplivale na živost celic. Pri NHA celicah, se je pri Aromi 1 pri 16,8 % PG/VG živost zmanjšala za 96 %, pri 8,4 % PG/VG za 40 %, pri 2,8 % PG/VG pa za 62 %. Pri Aromi 2 pri 16,8 % PG/VG se je živost zmanjšala za 98 %, pri 8,4 % PG/VG za 99,7 % pri 2,8 % PG/VG pa za 74 %. Pri Aromi 3 pri 16,8 % PG/VG se je živost zmanjšala za 99 %, pri 8,4 % PG/VG za 99,8 % pri 2,8 % PG/VG pa za 43 %. Najmanj citotoksičen učinek na NHA celice je torej imela Aroma 1, Aroma 3 je bolj toksična od ostalih pri višjih koncentracijah, Aroma 2 pa je najbolj toksična pri najnižji koncentraciji PG/VG.

4.2.3.3 **Vpliv testiranih nikotinskih pospeševalcev in arom na morfologijo celic v različnih celičnih modelih**



Slika 19: Morfološki pregled sprememb na humanih celicah (HepG2, MRC5, NHA) 24 h po izpostavitvi nikotinskima pospeševalcema in najbolj toksični aroma (Aromi 3) (EVOS; 10 000x povečava) (Vir: Lastni prikaz)

Na sliki 18 so prikazane morfološke spremembe humanih jetrnih (HepG2), pljučnih (MRC5) in možganskih (NHA) celic, 24 h po izpostavitvi trem različnim koncentracijam nikotinskih pospeševalcev in najbolj toksične izmed arom. Pri vseh prikazanih tretmajih so se uničile povezave med celicami, kar pomeni, da ni bilo več medceličnih interakcij. Celice HepG2 so se pri Aromi 3 najbolj skrčile vase in izgubile svojo strukturo. Prav tako se je pri Aromi 3 pri vseh treh koncentracijah PG/VG v primerjavi z nikotinskima pospeševalcema najbolj zmanjšala konfluenta. Solni nikotinski pospeševalec je na pljučne celice MRC5 vplival bolj toksično kot Navadni pospeševalec in je povzročil, da so

se celice zgrudile v manjše skupke ter zmanjšal njihovo konfluenco. Pri Navadnem pospeševalcu je zanimivo to, da so celice pri srednji testirani koncentraciji nikotina (1,5 mg/ml) manj prizadete, kot pri najnižji in najvišji koncentraciji. Aroma 3 je na MRC5 celice vplivala bolj toksično kot pospeševalca in je porušila njihovo strukturo. Nikotinska pospeševalca sta imela najmanjši vpliv na celice NHA, ki so pri najnižji koncentraciji pospeševalcev (0,5 mg/ml nikotina) kljub uničenim medceličnim povezavam, še vedno ohranile primarno morfologijo oz. se niso dosti spremenile. Zmanjšala pa se je njihova konfluenca. Aroma 3 je bolj toksična kakor nikotinska pospeševalca pri vseh treh testiranih humanih celičnih linijah. Vpliv nikotinskih pospeševalcev je približno enak, z razmeroma večjo toksičnostjo Solnega pospeševalca.

5. VREDNOTENJE HIPOTEZ

V sklopu raziskovalne naloge sem želela potrditi ali ovreči zastavljene hipoteze:

Hipoteza 1: Večina mladih anketirancev pozna izraz 'vejp' in je seznanjena z njihovo uporabo.

Na podlagi odgovorov ankete lahko ugotovim, da so mladi (11-20 let), v večini (88 %) vedeli kaj so vejp naprave ter se večinsko zavedajo da so le-te zdravju škodljivi. Približno 93 % mladih je že vsaj enkrat v življenju poskusilo vdihovati vejp, pri čemer v 37 % vejpajo z namenom zabave oz. zaradi vpliva družbe. Te rezultati kažejo, da so mladi seznanjeni z uporabo vejpov in rudi s škodljivimi učinki, ki jih njihovo vdihavanje povzroča, zato Hipotezo 1 POTRDIM.

Hipoteza 2: Večini anketiranih oseb je okus vejp naprav pomembnejši od njihove vsebnosti

Z anketo sem ugotovila, da je 56 % vprašanih odgovorilo, da jim je oboje enako pomembno ali da jim je pomembnejša vsebnost. Mladim torej ni vseeno za snovi, ki jih pri vejpjanju prejmejo v sistem, tudi če gre pri tem za prijeten vonj in/ali okus vejpa, zato lahko Hipotezo 2 OVRŽEM.

Hipoteza 3: Posamezne testirane komponente vejpov, kot so baza PG/VG, arome, nikotinski pospeševalci, manj vplivajo na viabilnost zdravih človeških pljučnih, možganskih in jetrnih celic, kot celotne mešanice vejp tekočin.

Primerjava vseh dobljenih laboratorijskih rezultatov z vsemi celičnimi linijami je pokazala, da posamezne komponente različno vplivajo na viabilnost celic. Ugotovila sem, da nikotinski pospeševalci v povprečju manj vplivajo na viabilnost celic, kot mešanice vejp tekočin, medtem ko čiste arome delujejo bolj citotoksično in v veliki meri zmanjšajo viabilnost. Baza PG/VG viabilnost zmanjšuje manj kakor vejp mešanice. Iz teh zaključkov lahko Hipotezo 3 DELNO POTRDIM DELNO OVRŽEM.

Hipoteza 4: Med glavnimi sestavinami, ki sestavljajo vejp tekočino, so najbolj toksične arome.

Rezultati laboratorijskih testov so pokazali, da so arome tiste, ki največ prispevajo k toksičnosti vejp tekočin. Izstopala je predvsem Aroma 3, saj je najbolj citotoksičen tretma pri vseh celičnih linijah. Najlepše se je to opazilo pri najnižji koncentraciji PG/VG, kjer vsebnost baze nikakor ni imela vpliva na celice. Na podlagi teh rezultatov lahko Hipotezo 4 POTRDIM.

6. RAZPRAVA IN ZAKLJUČEK

Dandanes vejpi vse bolj pridobivajo na svoji popularnosti, trg pa se širi tudi med mladoletno populacijo, ki jih privlačijo predvsem raznovrstne arome v vejp tekočinah. V Sloveniji se z novelo zakona ukinja arome v vejpih in prepoveduje distribucijo mladoletnim osebam ter vejpanje v zaprtih javnih prostorih z ukinjanjem kadihnic. Uporaba vejpov je povezana s pojavnostjo kroničnih pljučnih obolenj, boleznih povezanih z vdihavanjem nikotina, hudih vnetij in zmanjšanim delovanjem ter razvojem pljučnih, jetrnih in možganskih celic. Zato je ključnega pomena, da so mladi ozaveščeni o morebitnih tveganjih ponavljajoče se uporabe vejpov.

V anketi o ozaveščenosti o vejpih in odnosu mladih do vejpanja, ki je zajela 713 vprašanih iz štirih osnovnih šol, štirih gimnazij in štirih poklicnih šol, je sodelovalo 66 % žensk in 44 % moških anketirancev, v starosti od 11 do 20 let po približni Gaussovi krivulji.

Tako kot v anketi izvedeni s strani NIJZ (NIJZ, 2018), kjer je več kot tretjina najstnikov poročala o uporabi vejpa, je tudi v moji anketi 33 % vseh vprašanih že vsaj enkrat v življenju poskusilo vejp, kljub temu, da se zavedajo njihove škodljivosti. Mojo anketo sem nadgradila z vprašanjem zakaj vejpajo in večina je odgovorila, da za zabavo in sprostitev. Večina mladih ne ve kakšne sestavine so prisotne v vejpju in ne vedo da je količina

nikotina, ki jo uporabljajo 3 % več kot je zakonsko dovoljena količina po standardih EU (NIJZ, 2024a). Pri nakupu jih najbolj prepriča dober okus in vonj vejpa. Ravno arome so bile tudi ključne sestavine vejpa, ki sem jih želela preučiti, saj se o njihovi potencialni škodljivosti ne ve veliko. Preučila sem vpliv različnih mešanic vejпов in posameznih komponent vejп tekočin, na 2D celičnem modelu jeter, možganov in pljuč, s poudarkom na spremembah morfologije in živosti celic. Rezultati so pokazali pomembne vpoglede v celične odzive na izpostavljenost vejpom in posamičnim komponentam, pri čemer sem opazila splošen upad živosti celic vseh treh celičnih linij. Že sama baza PG/VG, ki služi kot topilo vseh vejпов, je izredno toksična v primerjavi s samim medijem.

Večina vprašanih naredi dnevno 100 vdihov vejpa, kar prevede pri klasični sestavi vejpa do 0,5 mg/ml nikotina z 2,8 % PG/VG topila. Ta koncentracija še ni toksična. Polovica vejpa pa že predstavlja toksično koncentracijo PG/VG topila. Celoten vejp s približno 600 vdihmi vsebuje 16,8 % PG/VG topila, kar je po mojih rezultatih izredno toksično.

Ni veliko predkliničnih raziskav, ki bi pokazale kakšne količine posameznih komponent vejpa pridejo v naš organizem. Ena izmed obstoječih *in vitro* študij po kateri sem se zgledovala je pokazala, da od 100 % snovi, ki so prisotne v aerosolu vejpa, le dvanajstina (okoli 8 %) pride in ostane v našem organizmu (Lee *idr.*, 2018). V naravnem okolju kot je v telesu po kajenju navadnih cigaret so koncentracije nikotina v krvi lahko tudi 100 ng/ml, čeprav so lahko bolj specifične odvisno od načina uporabe in metabolizma posameznika (Matta *idr.*, 2007). Pri testiranju citotoksičnosti v laboratoriju pa se uporabljajo koncentracije nikotina, ki so tudi 10-100-krat večje, da se ocenijo učinki na celice pri večjih izpostavljenostih, kot bi jih lahko zaznali v telesu ali okolju, da bi dobili zanesljive rezultate oz. da odkrijemo "mejo", pri kateri snov postane škodljiva ali celo usodna za celice. V mojih testiranih vejpih je bilo 36 mg nikotina v 2 ml tekočine. V naše telo pride 1/12 od tega, kar je 3 mg/ml nikotina in to sem vzela za standard. Pri vseh testiranih kemikalijah, v moji predklinični raziskavi so bile na morfologiji testiranih celic opazne močne spremembe porušenja zgradbe celic in smrt celic. Testiranje različnih mešanic vejп tekočin je pokazalo, da je komercialni vejp za enkratno uporabo deloval bolj toksično kot ostale pripravljene mešanice. Sklepam lahko, da je rezultat takšen zaradi s strani proizvajalcev prikritih receptov za vejp tekočine, kar pomeni, da so v uporabljenem kupljenem vejpu dodane tudi druge primesi, ki pa niso navedene na izdelku. Od

pripravljenih mešanic za večkratno uporabi je imel na upad živosti celic največji vpliv testiran Vape 4. Pri testiranju nikotinskih pospeševalcev se je izkazalo, da pri nižjih koncentracijah (1,5 in 0,5 mg/ml), kjer ni tako velik vpliv topila PG/VG, pospeševalci niso delovali tako citotoksično kot mešanice vejпов in arome. Arome s sadnim okusom in vonjem so tudi pri najnižji testirani koncentraciji topila zelo toksično vplivale na vse celične linije. Aroma tobak (Aroma 1), ki z zakonodajo ne bo prepovedana je prav tako, pri najnižji testirani koncentraciji topila, kar ustreza 100 vdihov vejpa, izredno toksična.

Če povzamem izsledke raziskave, lahko rečem, da so nadaljnje raziskave nujno potrebne za celovito razumevanje dolgoročnih učinkov vejпов in mešanic na celične funkcije in dolgoročno zdravje izpostavljenih posameznikov. Kot sem pri nakupu preko spleta ugotovila tudi sama, so vejpi prelahko dostopni tudi mladoletnim uporabnikom, saj je v Sloveniji regulativa na tem področju še vedno precej pomanjkljiva. Vejpi in vejp tekočine so pogosto vključene v splošnejše predpise o tobačnih izdelkih, namesto da bi obstajal poseben zakon, ki bi upošteval njihove edinstvene lastnosti. Ker so vejpi vse bolj prisotni med mladimi (NIJZ), je ključno, da v prihodnosti s poglobljenim znanstvenim pristopom in ozaveščanjem potrošnikov zagotovimo boljši nadzor in večjo varnost uporabnikov vejпов.



Slika 20: Kratak prikaz mojega dela v laboratoriju (*Vir: Lastni prikaz*)

6.1 Možnosti za nadaljnjo raziskovanje

Pri nadaljevanju raziskovanja, bi izbrala še več bolj natančnih koncentracij, glede na učinke snovi na celice v tem poskusu. Izvedla bi več ponovitev pri dodatnih izbranih pogojih. Lahko bi vključila tudi daljšo, kronično izpostavitve celic vejp tekočinam pri več zaporednih dneh izpostavitve, predvsem pa bi izvedla bolj poglobljene toksikološke teste, ki morda preučujejo poškodbe na DNK celic (kometni test, test mikrojedder ...). Na koncu bi poskusila vključiti tudi bolj napredne modele za testiranje, kot so sodobni 3D modeli, npr. 3D sferoidi in kokulture z drugimi humanimi celicami.

7. VIRI IN LITERATURA

- 24ur.com. (2024, 28. marec) *Konec arom v vejpih in elektronskih cigaretah*. Citirano 15. februarja 2025, <https://www.24ur.com/novice/slovenija/konec-arom-v-vejpih-in-elektronskih-cigaretah.html>.
- Ameriška akreditirana medicinska fakulteta. (2017, 23. avgust). *Electronic Cigarettes and Vaping* [Video]. YouTube. https://www.youtube.com/watch?v=9dZS_Rniak0.
- ATCC. (b.d.-a). *CCL-171: WI-38 Cell Line*. <https://www.atcc.org/products/ccl-171>.
- ATCC. (b.d.-b). *HB-8065: U-87 MG Cell Line*. <https://www.atcc.org/products/hb-8065>.
- Centers for Disease Control and Prevention. (2024). *About electronic cigarettes (e-cigarettes)*. <https://www.cdc.gov/tobacco/e-cigarettes/about.html>.
- Cloud57. (2022, 30. avgust). *Freebase nicotine and nicotine salts*. <https://cloud57.co.uk/2022/08/30/freebase-nicotine-and-nicotine-salts/>.
- Cof, T. (2013). *Merjenje citotoksičnosti s pomočjo primarnih osteogenih celičnih kultur* (magistrsko delo). Univerza v Ljubljani. Citirano 17. februarja 2025, <https://repozitorij.uni-lj.si/IzpisGradiva.php?lang=slv&id=123385>.
- Fontana, F., Raimondi, M., Marzagalli, M., Sommariva, M., Gagliano, N., & Limonta, P. (2020, 16. september). Three-dimensional cell cultures as an in vitro tool for prostate cancer modeling and drug discovery. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(18), 6806. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7554845/>.
- Lee, W. H., Lee, K. S., Shin, J. H., Cho, H. J., & Kim, S. J. (2018, 27. marec). E-cigarette vapor exposure alters the human bronchial epithelium transcriptome. *Scientific Reports*, 8(1), 2296. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5870948/>.
- Li, M., Liu, H., Yu, X., Wang, W., Li, Y., Liu, Q., ... & Zhu, Y. (2021, 2. marec). *Evaluation of cytotoxicity induced by electronic cigarette generated aerosol based on selected carbonyl compounds and nicotine*. *ACS Omega*, 6(9), 6050–6057. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c05639>.
- Lonza. (b.d.). *Knowledge Center: WI-38 Cell Line*. <https://knowledge.lonza.com/cell?id=791>.
- Matta, S. G., Balfour, D. J. K., Benowitz, N. L., Boyd, R. T., Buccafusco, J. J., Caggiula, A. R., ... & Zirger, J. M. (2007). *Guidelines on nicotine dose selection for in vivo research*. *Psychopharmacology*, 190(3), 269–319. <https://doi.org/10.1007/s00213-006-0441-0>.
- Ministrstvo za zdravje Republike Slovenije. (2022, 29. november). *Izvedbeni načrt na področju nadzora nad tobakom* [PDF]. Ministrstvo za zdravje RS. https://www.gov.si/assets/ministrstva/MZ/DOKUMENTI/DJZ-Preventiva-in-skrb-za-zdravje/kajenje/izvedbeni_nacrt_tobak_final_P-dokument.pdf.
- Moro, L. G., Guarnier, L. P., Azevedo, M. F., Fracasso, J. A. R., Lucio, M. A., Castro, M. V. d., Dias, M. L., Lívero, F. A. d. R., & Ribeiro-Paes, J. T. (2024, 15. december). A brief history of cell culture: From Harrison to organs-on-a-chip. *Cells*, 13(24), 2068. <https://www.mdpi.com/2073-4409/13/24/2068>.
- MyWIIP. (b.d.). *WIIPstick X Watermelon*. <https://mywiip.com/product/wiipstick-x-watermelon/>.
- Nacionalni inštitut za javno zdravje (NIJZ). (2018, 17. september). *Preprečujemo uporabo elektronskih cigaret med mladostniki*. <https://nijz.si/zivljenjski-slog/tobacni-in-povezani-izdelki/preprecujmo-uporabo-elektronskih-cigaret-med-mladostniki/>.

- Nacionalni inštitut za javno zdravje (NIJZ). (2023, 19. maj). *Elektronske cigarete – pogosta vprašanja*. <https://nijz.si/zivljenjski-slog/tobacni-in-povezani-izdelki/elektronske-cigarete-pogosta-vprasanja/>.
- Nacionalni inštitut za javno zdravje (NIJZ). (2024a). *Elektronske cigarete – podrobnejše informacije za zdravstvene delavce* [PDF]. <https://nijz.si/publikacije/elektronske-cigarete-podrobnejse-informacije-za-zdravstvene-delavce/>.
- Nacionalni inštitut za javno zdravje (NIJZ). (2024b). *Uporaba novih tobačnih in nikotinskih izdelkov med mladimi v Sloveniji narašča*. Citirano 15. februarja 2025. <https://nijz.si/zivljenjski-slog/tobacni-in-povezani-izdelki/uporaba-novih-tobacnih-in-nikotinskih-izdelkov-med-mladimi-v-sloveniji-narasca/>.
- Nacionalni inštitut za javno zdravje (NIJZ). (2025, 30. januar). *Brez kajenja za več življenja*. <https://nijz.si/zivljenjski-slog/tobacni-in-povezani-izdelki/brez-kajenja-za-vec-zivljenja/>.
- Podobnik, L. (2022). *Škodljivi učinki na zdravje pri kajenju elektronskih cigaret »heat-not-burn« naprav: primerjava s klasičnimi cigaretami* (magistrsko delo). Univerza v Ljubljani. Citirano 16. februarja 2025, <https://repozitorij.uni-lj.si/lzpisGradiva.php?lang=slv&id=137997>.
- Promega. (b.d.). *CellTiter-Glo® luminescent cell viability assay*. https://worldwide.promega.com/products/cell-health-assays/cell-viability-and-cytotoxicity-assays/celltiter_glo-luminescent-cell-viability-assay/?catNum=G7570.
- QVapehouse. (b.d.). *QVapehouse Slovenija*. Citirano 16. januarja 2025, <https://www.qvapehouse.com/si/>.
- Republika Slovenija. (2017, 24. februar). *Zakon o omejevanju uporabe tobačnih in povezanih izdelkov (ZOUTPI)*. Uradni list RS. <https://www.uradni-list.si/glasilo-uradni-list-rs/vsebina/2017-01-0404/zakon-o-omejevanju-uporabe-tobacnih-in-povezanih-izdelkov-zoutpi?h=zout>.
- Republika Slovenija. (2024, 9. april). *Zakon o spremembah in dopolnitvah Zakona o omejevanju uporabe tobačnih in povezanih izdelkov (ZOUTPI-B)*. Uradni list RS. <https://www.uradni-list.si/glasilo-uradni-list-rs/vsebina/2024-01-0899/zakon-o-spremembah-in-dopolnitvah-zakona-o-omejevanju-uporabe-tobacnih-in-povezanih-izdelkov-zoutpi-b?h=toba%C4%8D>.
- VapeJuice. (2024, 12. avgust). *E-Liquid Ingredients*. Citirano 29. februarja 2025, <https://vapejuice.com/blogs/vape-juice-news/e-liquid-ingredients>.
- Veppo Vape Shop. (2017, 5. september). *The Beginner's Guide to Vaping* [Video]. YouTube. <https://www.youtube.com/watch?v=tnMhQGFiT-w>.
- Zorko, L. (2021). *Varnost elektronskih nikotinskih dostavnih sistemov in sistemov za segrevanje tobaka* (magistrsko delo). Univerza v Ljubljani. Citirano 17. februarja 2025, <https://repozitorij.uni-lj.si/lzpisGradiva.php?id=124777>.
- ZRC SAZU. (2023). *Vejp, vape. Fran.* Citirano 20. januarja 2024, <https://fran.si/132/sprotni-sprotni-slovar-slovenskega-jezika/4663005/vejp?View=1&Query=vape>.
- ZRC SAZU. (b.d.). *Citotoksičnost*. Farmacevtski slovar. <https://isjfr-zrc-sazu.si/sl/terminologisce/slovarji/farmacevtski/iskalnik?iztocnica=citotoksi%C4%8Dnost>.
- Žabkar, S. (2020). *Jetrni 3D celični modeli za zaznavanje genotoksičnega delovanja kemikalij* (magistrsko delo). Univerza v Ljubljani. Citirano 17. februarja 2025, <https://repozitorij.uni-lj.si/lzpisGradiva.php?id=124063>.