

POSAMEZNE KOMPONENTE VEJPA ZMANJŠAJO ŽIVOST JETRNIH, PLJUČNIH IN MOŽGANSKIH CELIC

INDIVIDUAL COMPONENTS OF VAPES REDUCE THE VIABILITY OF LIVER, LUNG AND BRAIN CELLS

AVTORJI / AUTHORS:

Pia Žižek, mag. lab. biomed.^{1,2}

Monika Minjovič³

Špela Rozman, dipl. bioteh.¹

Vito Ham, mag. mol. funk. bio.^{1,2}

doc. dr. Barbara Breznik Vittori, mag. farm.^{1,4}

doc. dr. Metka Novak, dipl. biokem.^{1,5}

dr. Martina Štampar, mag. mikrob.¹

¹ Nacionalni Inštitut za Biologijo,
Večna pot 121, 1000 Ljubljana

² Mednarodna podiplomska šola Jožef Stefan,
Jamova 39, 1000 Ljubljana

³ Gimnazija Bežigrad,
Peričeva ulica 4, 1000 Ljubljana

⁴ Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko
tehnologijo, Večna pot 113, 1000 Ljubljana

⁵ Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta,
Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: martina.stampar@nib.si; metka.novak@nib.si



POVZETEK

Uporaba vejпов, na videz neškodljive alternative klasičnih cigaret, narašča, zlasti med mladimi. Njihove privlačne arome in izstopajoče barvite embalaže pomembno prispevajo k njihovi priljubljenosti. Zaradi pomanjkljivih podatkov o njihovi škodljivosti in vplivu na zdravje smo želeli ovrednotiti vpliv sedmih izbranih vejпов in njihovih posameznih komponent, kot so arome, nikotin in topila, na morfologijo in živost humanih jetrnih, pljučnih in možganskih celic *in vitro*. Vejpi in njihove komponente so pomembno vplivale na morfologijo celic, predvsem so povzročile njihovo krčenje in prekinjanje medceličnih povezav. Ugotovili smo, da vejpi povzročijo od koncentracije odvisno citotoksičnost; pri nizkih koncentracijah večina ni povzročila statistično pomembnih razlik, najvišja koncentracija pa je pri večini vejпов povzročila upad živosti celic. Posamezne komponente so povzročile večji upad živosti celic v primerjavi s celotnimi vejpi. Najizrazitejši učinek so imele arome. Izsledki naših raziskav nakazujejo na akutne toksične učinke vejпов in njihovih komponent. Zaradi kratkotrajne prisotnosti vejпов na trgu pa je še nemogoče zanesljivo oceniti njihove dolgoročne učinke na zdravje ljudi.

KLJUČNE BESEDE:

arome, citotoksičnost, humani modeli celic, vejpa

ABSTRACT

The use of vapes, a seemingly harmless alternative to traditional cigarettes, is increasing, especially among young people. Their attractive aromas and eye-catching colorful packaging contribute significantly to their popularity. Due to the lack of data on their harmfulness and impact on health, we wanted to evaluate the effects of seven selected vapes and their individual components such as flavors, nicotine, and base on the morphology and viability of human liver, lung, and brain cells *in vitro*. Vapes and their components significantly affected cell morphology, primarily causing cell contraction and disruption of intercellular connections. We found that vape aerosols cause concentration-dependent cytotoxicity; at low concentrations, most did not cause statistically significant differences, but the highest concentration led to decreased cell viability in most



vape aerosols. Individual components caused a greater decline in cell viability compared to whole vapes. Flavors had the most pronounced effect. The findings of our studies indicate acute toxic effects of vapes and their components. However, due to the short-term presence of vapes on the market, it is impossible to reliably assess their long-term effects on human health.

KEY WORDS:

aromas, cytotoxicity, human cell models, vape

1 UVOD

Elektronske cigarete oziroma elektronski sistemi za dovanje nikotina, ki se pogovorno pogosto imenujejo vejpi, so baterijsko napajane elektronske naprave brez tobaka, ki s segrevanjem tekoče mešanice oziroma e-tekočine ustvarjajo aerosol za vdihavanje. Vejpi so sprva bili predstavljeni kot potencialno varnejša alternativa klasičnim cigaretam, po njih pa posega vedno več ljudi, zlasti mladostnikov (1, 2). E-tekočina v splošnem vsebuje osnovno nosilno bazo vejпов, t. i. mešanico propilen glikola (PG) in rastlinskega glicerina (VG) v različnih razmerjih, ter nikotin in arome (3). Topilo PG/VG je pri sobni temperaturi netoksično, ob segrevanju pa pride do razgradnje in nastanka več produktov, kot so acetaldehid, aceton, formaldehid, propilen oksid (4). Uporaba obeh topil hkrati naj bi povzročila povečan nastanek reaktivnih kisikovih zvrsti in vplivala na celično signaliziranje kalcija ter na rast, živost celic in vnetje (1, 3). Arome, ki vejpom dajejo prijeten vonj in okus ter jih tako naredijo privlačnejše, so velikokrat uporabljene v prehrambeni industriji in so prepoznane kot varne za zaužitje, kar pa ne pomeni, da pri vdihovanju ne morejo delovati toksično (4). Tak primer je diacetil, ki se v prehrambni industriji uporablja kot aroma masla, ob vdihovanju pa zmanjšuje zmogljivost pljuč in deluje toksično, saj povzroča obliterantni bronhilitis oz. t. i. »popcorn lung« (3, 5). Slovenija je pri omejevanju uporabe tobačnih in povezanih izdelkov že vrsto let med najnaprednejšimi državami v EU. Z novelo Zakona o omejevanju uporabe tobačnih in povezanih izdelkov je bila 24. aprila 2025 prepovedana uporaba vseh arom v vejpih, razen tobačnih arom (ZOUTPI-B, Uradni list RS, št. 31/24). Regulativni ukrepi vključujejo tudi omejevanje dostopnosti teh izdelkov mladostnim osebam

ter prepoved vejpanja v zaprtih javnih prostorih. Pomemben vidik regulacije predstavlja tudi vsebnost nikotina. Pri uporabi vejпов namreč nikotin po vdihovanju aerosola, ki nastane ob segrevanju baze do točke izparevanja, preide v pljuča in nato v krvni obtok, od koder se lahko porazdeli tudi v druga tkiva in organe, vključno z jetri in možgani (1, 4). Zato je evropska direktiva omejala najvišjo dovoljeno koncentracijo nikotina v e-tekočini na 20 mg/mL (Direktiva 2014/40/EU, člen 20(3)(b)). Pri vejpih, ki jih uporabniki pripravijo oziroma sestavijo sami, pa je dejansko koncentracijo nikotina in drugih sestavin težje nadzorovati (4).

Nikotin sam po sebi dokazano negativno vpliva na zdravje ljudi in povzroča razvoj odvisnosti, dodatne kemijske snovi, prisotne v posameznih komponentah vejpa, pa na različne načine prispevajo k njihovi celokupni toksičnosti. Rakotvorne snovi, npr. formaldehid, kovine in akrolein, ki jih vsebuje aerosol vejпов, povzročajo prokancerogene spremembe v ustni votlini (4). Vejpanje oslabi imunski odziv proti bakterijam in virusom ter spodbuja vnetje, kar poveča tveganje za okužbe dihal in avtoimunske bolezni (3, 6). Pri uporabnikih se lahko pojavi z vejpanjem povezana poškodba pljuč, ki se klinično kaže z respiratornimi in gastrointestinalnimi simptomi ter sistemskimi znaki, kot so vročina, mrzlica in utrujenost (5, 6). Vejpi so na trgu premalo časa, da bi bilo mogoče zanesljivo oceniti njihove dolgoročne učinke na zdravje uporabnikov ter oseb, izpostavljenih pasivnemu vdihavanju aerosolov. Le približno 25 % inhaliranih aerosolov naj bi ostalo v pljučih, kar pomeni, da je večina delcev izdihanih v prostor, kjer lahko povzročijo posredno sekundarno in terciarno izpostavljenost (4). Ogrodje vejпов predstavlja nevarnost sproščanja kovin, kot so aluminij, krom, železo in svinec, v e-tekočino in nadalje v aerosol (5). Kljub obstoječim regulativnim ukrepom uporaba vejпов, zlasti aromatiziranih izdelkov, med mladimi ostaja pomemben javnozdravstveni izziv. Naraščajoča uporaba teh izdelkov v ranljivi populaciji zato poudarja potrebo po nadaljnjih raziskavah njihovih učinkov na zdravje.

Kljub vse večjemu številu raziskav so toksični učinki vejпов in njihovih posameznih komponent še vedno pomanjkljivo pojasnjeni, zlasti glede njihovega vpliva na različne tipe človeških celic. Bibliometrični pregled objav v bazi Web of Science kaže, da se je število publikacij na tem področju po letu 2015 izrazito povečalo: medtem ko je bilo v letih 2013–2015 objavljenih le nekaj raziskav letno, je število objav v obdobju 2020–2024 dosegalo približno 38–56 objav na leto. Ta porast odraža naraščajoč znanstveni in javnozdravstveni pomen raziskovalnega področja, hkrati pa številna vprašanja, predvsem na področju toksikologije po-

sameznih komponent in njihovih kombinacij, ostajajo odprta. Prisotnost številnih kemikalij v vseh sestavinah e-tekočin zelo otežuje oceno varnosti, zlasti zaradi dodatnega segrevanja in posledične razgradnje kemikalij, saj se pri tem lahko tvorijo nove spojine, ki jih uporabnik inhalira (4). Zaradi navedenih nejasnosti in še vedno omejenega razumevanja učinkov posameznih komponent vejпов na različne tipe človeških celic je smiselno njihove učinke dodatno preučiti v nadzorovanih *in vitro* pogojih. Ocena morfoloških sprememb in živosti celic omogočata določitev vpliva na različne tipe celic ter identifikacijo komponent vejпов, ki najbolj prispevajo k njihovi škodljivosti (7). Razumevanje teh učinkov je ključno za razvoj učinkovitih in na dokazih temelječih javnozdravstvenih ukrepov. Za preučevanje vpliva vejpanja na živost in morfologijo celic smo za dvodimenzionalne modele *in vitro* izbrali celične linije, ki izvirajo iz organov, relevantnih za izpostavljenost oziroma učinke komponent vejпов: to so pljuča, ki so primarno mesto stika z vdihanim aerosolom, možgani, kamor lahko prehaja nikotin, ter jetra, ki imajo pomembno vlogo pri presnovi ksenobiotikov in so lahko tarča sistemskih učinkov izpostavljenosti (8–10). Namen naše raziskave je bil ovrednotiti toksične učinke izbranih uporabljenih vejпов ter njihovih ključnih komponent na posamezne človeške celice. Osredotočili smo se na ključne komponente vejпов kot so osnovno topilo (PG/VG), raztopina arome, nikotin in nikotinski pospeševalec ter na njihove kombinacije, saj te tvorijo temeljno kemijsko matrico vejпов. Cilj raziskave je bil določiti vpliv celotnih vejпов ter posameznih komponent na celično živost, morfološke spremembe celic in posledično prepoznati zgodnje indikatorje toksičnosti, ki lahko prispevajo k razumevanju mehanizmov škodljivega delovanja vejпов.

2 MATERIALI IN METODE

2.1 DELO S CELIČNIMI LINIJAMI

Humane celice raka jeter (Hep G2, ATCC HB-8065) smo gojili v gojišču Minimum Essential Medium z 10 % fetalnega seruma goveda, 1 % penicilina in streptomicina, 1 % L-glutamina, 1 % natrijevega piruvata in 1 % neesencialnih aminokislin. Humane pljučne fibroblaste (MRC-5, ATCC CCL-171) smo gojili v gojišču Eagle's Minimum Essential Medium z 10 % fetalnega seruma goveda, 1 % penicilina

KLJUČNA SPOROČILA

- Vejpi so že po 24-urni izpostavitvi povzročili spremembo morfologije in živosti humanih jetrnih, pljučnih in možganskih celic, pri čemer je bil učinek odvisen od koncentracije.
- Citotoksičnost vejpa ni posledica le nikotina; pomembno prispevajo tudi arome in nosilna baza.
- Aroma blond tobak je zmanjšala živost celic, čeprav spada med dovoljene tobačne arome po veljavni zakonodaji.

in streptomicina. Humane astrocite (NHA, Lonza CC-2565) smo gojili v gojišču Astrocyte Growth Medium z 10 % fetalnega seruma goveda in 1 % penicilina in streptomicina in 1 % rastnega seruma za astrocite. Celice smo nasadili na plošče s 96 vdolbinicami z gostoto 8.000 celic/vdolbinico in jih čez noč inkubirali, da so se pritrdile na podlago. Naslednji dan smo iz vseh vdolbinic odstranili gojišče ter za 24 ur dodali 100 μ L gojišča s specifičnimi mešanici vejпов, opisanimi v naslednjem poglavju.

2.2 IZPOSTAVITEV CELIC MEŠANICAM VEJPOV

Celice HepG2, MRC-5 in NHA smo za 24 ur izpostavili izbranim tekočinam vejпов in njihovim posameznim komponentam, ki smo jih pripravili kot delovne raztopine neposredno v ustreznem celičnem gojišču. Koncentracije tretmajev smo določili na podlagi preračuna po enačbi, predstavljeni v Sassano in sod., ki predpostavlja, da v telo preide ena dvanajstina inhalirane tekočine vejpa (1). Kot izhodišče smo uporabili vejpo za enkratno uporabo s približno 600 vdih, 2 mL tekočine in koncentracijo nikotina 18 mg/mL, kar skupno ustreza 36 mg nikotina. Ena dvanajstina te količine ustreza 3 mg nikotinskega ekvivalenta. Na tej osnovi smo pripravili tri delovne koncentracije tretmajev: 0,5, 1,5 in 3 mg/mL nikotinskega ekvivalenta, ki so ustrezale približno 100, 300 in 600 vdihov. Navedene vrednosti predstavljajo koncentracije nikotinskega ekvivalenta v delovnih raztopinah, pripravljenih z redčenjem tekočin vejпов oziroma posameznih komponent v celičnem gojišču, in ne absolutne količine nikotina, dodane v posamezno vdolbinico. Ker je bil nikotin v izhodiščnih mešanicah vejпов raztopljen v bazi PG/VG, smo po določitvi nikotinskega ekvivalenta preračunali še pripadajoči delež PG/VG, ki je znašal 2,8 %, 8,4 % oziroma 16,8 % PG/VG v končnem inkubacijskem gojišču. Preostali volumen do 100 μ L je



predstavljalo ustrezno celično gojišče. Enak pristop preračuna smo uporabili tudi za posamezne komponente, vključno z osnovno topilno bazo PG/VG, aromami, nikotinom in nikotinskim pospeševalcem. Uporabljeni koncentracijski razpon je služil kot testni razpon za primerjavo citotoksičnega potenciala med testiranimi tekočinami vejпов in njihovimi komponentami. Vsi poskusi so bili izvedeni pod nadzorovanimi pogoji *in vitro* v treh neodvisnih bioloških ponovitvah, pri čemer je bila vsaka biološka ponovitev izvedena v štirih tehničnih ponovitvah.

Preučili smo vpliv sedmih različnih mešanic vejпов (tri raztopine arom, nikotin in nikotinski pospeševalec ter en vejp za enkratno uporabo; preglednica 1) in njihovih posameznih komponent (tri raztopine arom, nikotin in nikotinski pospeševalec, baza 50/50 PG/VG). Pri mešanicah vejпов 1–6 smo posamezne komponente, kot so aroma, nikotin oziroma nikotinski pospeševalec in baza PG/VG, pripravili v znanih volumskih razmerjih (preglednica 1).

Vejp 7 predstavlja predhodno pripravljeno elektronsko cigareto za enkratno uporabo, pri kateri sestavin nismo dodatno mešali, temveč smo uporabili že pripravljeno komercialno tekočino. Koncentracije vejpa 7 so bile preračunane po enaki enačbi kot sestavljeni vejpi. Izbrane koncentracije celotnih mešanic vejпов in njihovih posameznih komponent smo pripravili z redčenjem v ustreznem celičnem gojišču. Tako pripravljene raztopine smo nato dodali celicam, pri čemer je uporabljeni pristop predstavljal izpostavitve komponentam v gojišču in ne neposredne izpostavitve aerosolom. Pozitivna kontrola je bila 7-% dimetil sulfoksid (DMSO), ker je citotoksičen in povzroča maksimalno celično smrt, s čimer zagotavlja referenco za minimalno raven adenozin trifosfata (ATP), preko katerega smo ocenjevali živost celic. Prav tako so bile na vsaki plošči tudi vdolbinice z vsemi tremi koncentracijami PG/VG v gojišču (2,8 %, 8,4 % in 16,8 %), ki so služile kot kontrole topila, ter netretirane celice.

Preglednica 1: Sestava testiranih mešanic vejпов. Posamezna mešanica vejpa je bila testirana v treh različnih koncentracijah nikotinskega ekvivalenta/mL in topila PG/VG, preračunanih glede na število vdihov in prehajanje v telo. PG/VG – mešanica propilen glikola in rastlinskega glicerina.

Table 1: Mixtures of vape liquids tested. Each vape mixture was tested at three different nicotine equivalent/mL concentrations and PG/VG solvent ratios, adjusted based on the number of puffs and the amount absorbed into the body. PG/VG – a mixture of propylene glycol and vegetable glycerin.

Mešanica*	Sestava mešanic vejпов
Vejp 1	raztopina z aromo gozdni sadeži in liči (1 mL) raztopina nikotina (4 mL)
Vejp 2	raztopina z aromo gozdni sadeži in liči (1 mL) raztopina nikotinskega pospeševalca (4 mL)
Vejp 3	raztopina z aromo ovseni kosmiči s karamelo (1 mL) raztopina nikotina (4 mL)
Vejp 4	raztopina z aromo ovseni kosmiči s karamelo (1 mL) raztopina nikotinskega pospeševalca (4 mL)
Vejp 5	raztopina z aromo blond tobak (0,75 mL) raztopina nikotina (4,02 mL) PG/VG (0,22 mL)
Vejp 6	raztopina z aromo blond tobak (0,75 mL) raztopina nikotinskega pospeševalca (4,02 mL) PG/VG (0,22 mL)
Vejp 7	predhodno pripravljena elektronska cigareta za enkratno uporabo – komercialni vejp s koncentracijo 20 mg/mL

* Vse navedene mešanice vejпов so bile testirane pri treh koncentracijskih pogojih, ki ustrezajo 100, 300 in 600 vdihom. Ti pogoji so bili preračunani na 0,5, 1,5 in 3 mg nikotinskega ekvivalenta/mL, ki je vseboval 2,8, 8,4 in 16,8 % PG/VG v celičnem gojišču. Izraz raztopina nikotina se nanaša na komercialno nikotinsko mešanico, v kateri je bil nikotin raztopljen v bazi PG/VG, in ne na čisti nikotin. PG/VG služi kot topilo oziroma nosilna baza in je prisoten v vseh osnovnih raztopinah v enaki koncentraciji.

2.3 OCENA MORFOLOŠKIH SPREMEMB IN TEST ŽIVOSTI CELIC

Po 24-urnem tretiranju smo morfologijo vseh celic pregledali s svetlobnim invertnim mikroskopom EVOS M7000 (Thermo Fisher Scientific) pod fazno-kontrastnim filtrom in 10x povečavo. Pri tem smo sistematično beležili morebitne spremembe v celični obliki, adheziji, gostoti, zaobljenost celic ali odstopanje celic od podlage.

Za določanje živosti celic smo uporabili test CellTiter-Glo, po navodilih proizvajalca (Promega G9682), ki temelji na luminiscenčni detekciji vsebnosti ATP kot indikatorju presnovne aktivnosti celic. Po 24-urnem tretmaju smo v vsako vdolbinico plošče dodali 100 μ L reagenta CellTiter-Glo. Ploščo smo pokrili z aluminijasto folijo in jo za 10 minut postavili na orbitalni stresalnik, da je prišlo do popolne lize celic ter sproščanja znotrajceličnega ATP. Nato smo vsebino posamezne vdolbinice prenesli na belo ploščo s 96 vdolbinicami ter pomerili luminiscenco s čitalcem Cytation 5 Cell Imaging Multimode Reader (Agilent). Količina izmerjenega ATP je premo sorazmerna količini metabolno aktivnih celic in živosti. Rezultati so prikazani kot delež živih celic, pri čemer so vrednosti normalizirane na kontrolo topila.

2.4 STATISTIČNA ANALIZA

Statistična analiza je bila izvedena samo za rezultate testa z ATP, s katerim smo vrednotili živost celic po izpostavitvi testiranim vejpom. Rezultati so izraženi kot relativna živost celic glede na kontrolo topila (KT), ki je ustrezala koncentraciji PG/VG v izbranih koncentracijah testiranih vejпов in je bila opredeljena kot 100 %. Za primerjavo med KT in posameznimi izbranimi koncentracijami testiranih vejпов smo uporabili enozorčni t-test. Statistično analizo posameznih komponent vejpa ter KT pa smo uporabili enosmerno analizo variance (one-way ANOVA). Statistično značilnost smo vrednotili pri izbrani stopnji značilnosti $p < 0,05$. Vsi poskusi so bili izvedeni v treh neodvisnih bioloških ponovitvah, pri čemer je bila vsaka biološka ponovitev izvedena v štirih tehničnih ponovitvah. Za statistično analizo, obdelavo podatkov in pripravo grafičnih prikazov smo uporabili program GraphPad Prism 10. Rezultati na grafih so prikazani kot povprečje $\pm$ standardni odklon (SD).

3 REZULTATI IN RAZPRAVA

V raziskavi smo spremljali vpliv sedmih različnih mešanic vejпов in njihovih posameznih komponent na živost in mor-

fologijo pljučnih, jetrnih in možganskih celic v dvodimenzionalnem modelu *in vitro* po 24-urni izpostavitvi. Testirali smo tri koncentracijske pogoje, ki so bili na podlagi preračuna opredeljeni kot približek 100, 300 in 600 vdihov. Rezultati raziskave so pokazali, da izpostavitve vejпов tekočinam lahko povzroči izrazito, od koncentracije odvisno citotoksičnost na različnih tipih človeških celic, pri čemer se med posameznimi testiranimi vejпов mešanicami pojavljajo pomembne razlike (slika 1). Takšna variabilnost je verjetno povezana z razlikami v sestavi vejпов, vključno z razmerjem PG/VG, prisotnostjo arom in drugih dodatkov. To je skladno z ugotovitvami drugih raziskav, ki kažejo, da kemijska sestava tekočin vejпов pomembno vpliva na njihov biološki učinek, medtem ko lahko pri dejanski uporabi k toksičnosti dodatno prispevajo tudi termični produkti razgradnje, ki nastanejo ob segrevanju (1).

3.1 VPLIV MEŠANIC VEJPOV NA ŽIVOST

Izpostavitve celic HepG2, MRC-5 in NHA naraščajočim koncentracijam sedmih mešanic vejпов je pokazala koncentracijsko odvisno zmanjšanje celične živosti. Pri raztopinah z nižjimi koncentracijami nikotinskega ekvivalenta ter pripadajočimi deleži arom in topil (0,5–1,5 mg/mL; približno 100–300 vdihov) večina mešanic vejпов ni povzročila statistično značilnih sprememb v živosti celic. Nasprotno pa je pri najvišji testirani koncentraciji, ki je poleg 3 mg/mL nikotinskega ekvivalenta vsebovala tudi najvišji delež arom in topil ter je ustrezala približno 600 vdihom, pri večini testiranih mešanic vejпов prišlo do izrazitega zmanjšanja živosti celic (pri mešanici vejпов 1 do skoraj popolne celične smrti). Ta učinek je lahko deloma povezan tudi s toksičnostjo topila PG/VG, ki pri višjih koncentracijah v večjem deležu (16,8 % PG/VG; 600 vdihov) pomembno prispeva k zmanjšanju celične živosti (slika 1). Rezultati tako nakazujejo, da k citotoksičnim učinkom testiranih vejпов mešanic ne prispevajo le raztopine arom ali druge prisotne komponente, temveč lahko pomembno vlogo igra tudi samo osnovno topilo; zlasti v pogojih visokega termičnega stresa, kjer lahko nastanejo derivati, kot so formaldehidni hemiacetali (11, 12). Pri interpretaciji teh rezultatov je treba upoštevati, da raziskava temelji na izpostavitvi celic testiranim tekočim komponentam v izbranih pogojih *in vitro*, zato ne zajame vseh vidikov izpostavljenosti, ki nastanejo pri dejanski uporabi vejпов. Ker komponent nismo segrevali in celic nismo izpostavili aerosolom, rezultati ne vključujejo morebitnega dodatnega prispevka termično nastalih razgradnih produktov PG/VG.

Glede na zmanjšanje živosti celic so bile med testiranimi celičnimi linijami najbolj občutljive celice HepG2 (do 50 %



znižanje preživetja pri 300 vdihih), sledile so celice MRC-5 (do 20 % znižanje preživetja pri 300 vdihih), medtem ko so celice NHA izrazitejši upad živosti pokazale predvsem pri najvišjih testiranih koncentracijah. Rezultati kažejo tudi, da imajo posamezni vejpi različen vpliv na živost celic. Vejpa 2 in 7 sta povzročila najizrazitejši upad živosti vseh treh celičnih linij, medtem ko je vejpa 6 pokazal najšibkejši citotoksični učinek in pri večini koncentracij ni povzročil statistično značilnih sprememb.

3.2 VPLIV MEŠANIC VEJPOV NA MORFOLOGIJO CELIC

Vzporedno s testom citotoksičnosti smo spremljali tudi spremembe v morfoloiji celic. Na sliki 2 so prikazane spremembe morfoloije celic HepG2, MRC-5 in NHA 24 ur po izpostavitvi najvišji in najnižji koncentraciji najbolj (vejpa 7) in najmanj toksičnega vejpa (vejpa 6). Vidimo lahko, da oba vejpa vplivata na morfoloijo celic, izraženo s celičnim krčenjem, prekinjanjem medceličnih povezav ter zmanjšano adhezijo na plastiko. Vejpa 6 je v primerjavi z ostalimi vejpi najmanj vplival na celice MRC-5 in NHA, kar vidimo zlasti po delno ohranjeni morfoloiji pri 100 vdihih.

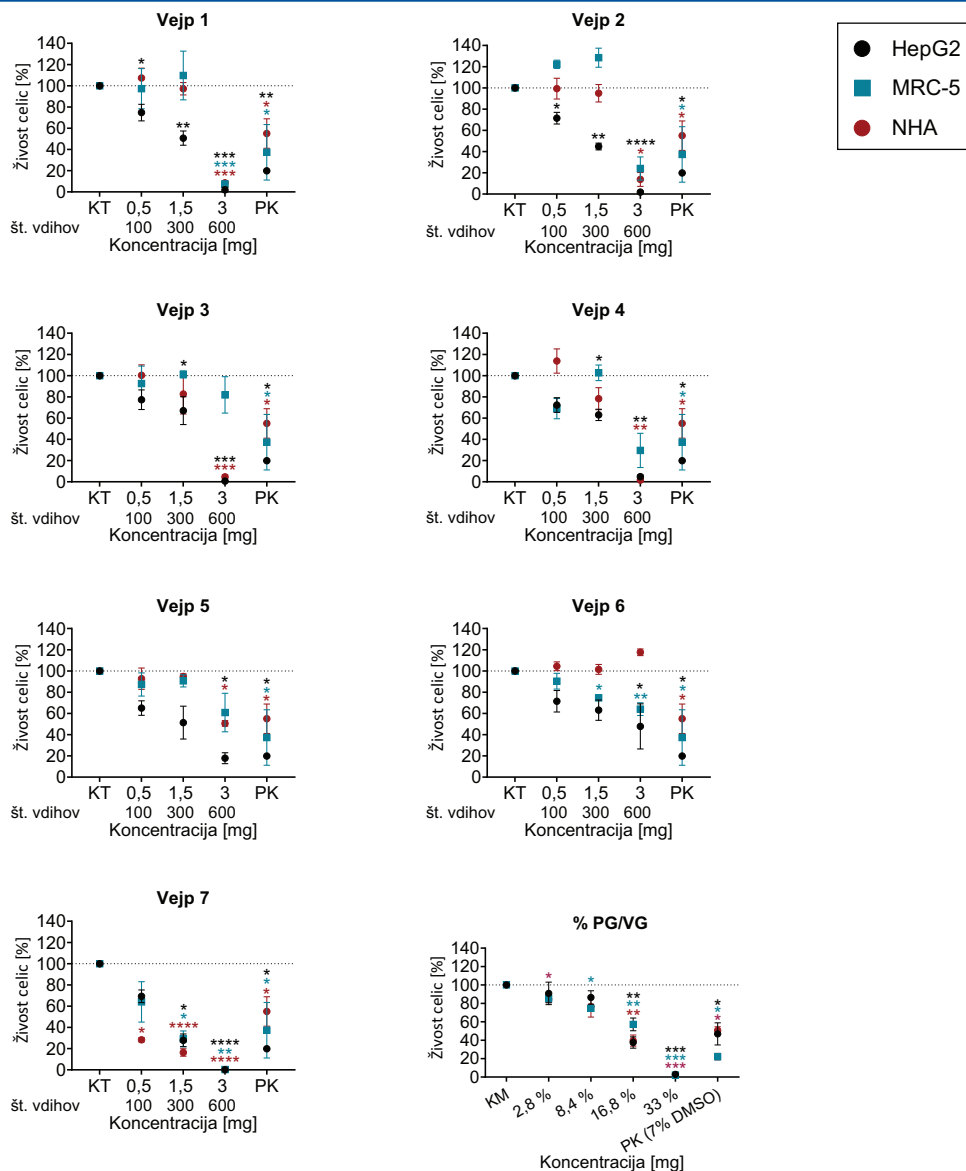
3.3 VPLIV POSAMEZNIH KOMPONENT

Po analizi učinka celotnih mešanic vejпов na živost celic smo v nadaljevanju želeli natančneje opredeliti, katere posamezne komponente največ prispevajo k opaženim citotoksičnim učinkom, zato smo analizirali samostojni vpliv raztopin arom, nikotinske komponente (nikotina oziroma nikotinskega pospeševalca) in topila PG/VG na živost celic HepG2, MRC-5 in NHA. Za te poskuse smo izbrali nižji koncentracijski območji, ki sta ustrezali približno 100 in 300 vdihom oziroma 0,5 in 1,5 mg/mL nikotinskega ekvivalenta, saj pri teh pogojih samo topilo PG/VG ni povzročilo izrazitega zmanjšanja živosti celic. Testirali smo tri različne raztopine arom (gozdni sadeži in liči, ovseni kosmiči s karamelo ter blond tobak) ter dve nikotinski formulaciji: nikotin in nikotinski pospeševalec. Vejpa 7 ni bil vključen v analizo zaradi neznane sestave.

Izpostavitev celic HepG2, MRC-5 in NHA posameznim komponentam vejpa (slika 3) je pokazala jasne razlike v njihovem učinku na živost celic, pri čemer so bili učinki izrazitejši pri višjem testiranem pogoju (300 vdihov). Ta analiza dopolnjuje rezultate celotnih mešanic vejпов, prikazane na sliki 1, saj omogoča oceno, katere komponente lahko pomembneje prispevajo k opaženemu zmanjšanju živosti ce-

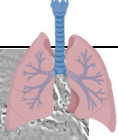
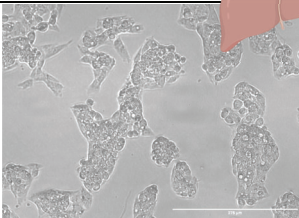
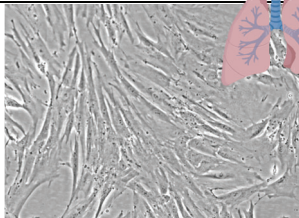
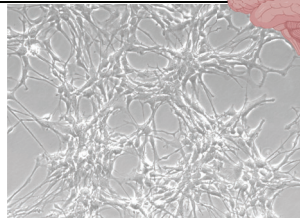
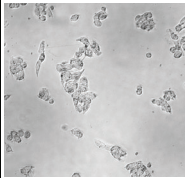
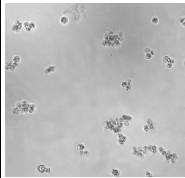
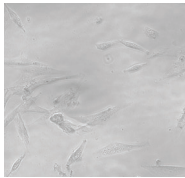
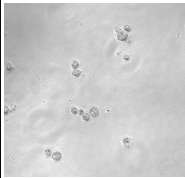
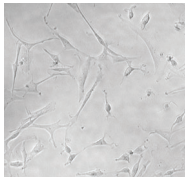
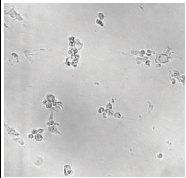
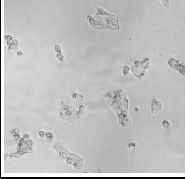
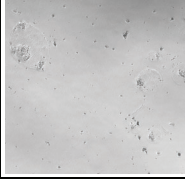
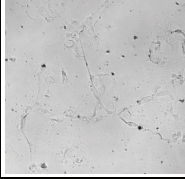
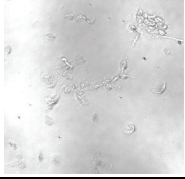
lic. V primerjavi s posameznimi komponentami so celotne mešanice vejпов pri 100 in 300 vdihih povzročile manj izrazit upad živosti celic, kar lahko kaže na kompleksne interakcije med sestavinami v končni mešanici.

Nikotinska komponenta je povzročila zmeren upad živosti, ki je bil izrazitejši pri 300 vdihih, vendar še vedno manjši v primerjavi z aromami. Navaden nikotin je sam po sebi znan kot zmeren dejavnik citotoksičnosti (13, 14), kar potrjuje, da nikotin v uporabljenih pogojih ni bil edini oziroma glavni dejavnik zmanjšanja celične živosti v testiranih mešanicah vejpa. Nasprotno je nikotinski pospeševalec pri posamezni testirani komponenti, zlasti pri vejpih 2, 4 in 6 (pri 300 vdihih), povzročil izrazitejši upad živosti celic. Pri tem je treba upoštevati, da učinka izolirane komponente ni mogoče neposredno enačiti z učinkom celotne mešanice vejpa, saj se lahko v končni mešanici spremenijo razmerja med sestavinami, njihova razpoložljivost in medsebojne interakcije. Zato odsotnost enako izrazitega padca živosti pri celotni mešanici vejpa ne pomeni nujno protektivnega učinka drugih komponent, temveč kaže na kompleksnost biološkega odziva na mešanice več sestavin. Med testiranimi celičnimi linijami so bile glede na zmanjšanje živosti po izpostavitvi nikotinu oziroma nikotinskemu pospeševalcu najbolj občutljive celice MRC-5 (do 75 % znižanje živosti), medtem ko je bilo zmanjšanje živosti pri celicah HepG2 in NHA manj izrazito (do 15 % znižanje živosti). Pri celicah NHA zmanjšanja živosti po izpostavitvi nikotinskemu pospeševalcu nismo zaznali; vrednosti signala pri merjenju ATP so bile pri vseh testiranih koncentracijah nad vrednostjo kontrole topila. To bi lahko bilo povezano s povečano presnovno aktivnostjo oziroma povečano aktivnostjo mitohondrijskih dehidrogenaz, kar lahko kaže na spremenjeno presnovno stanje celic, ne pa neposredno na živost (15). Najizrazitejši učinek na živost celic so imele testirane raztopine arom (gozdni sadeži in liči, ovseni kosmiči s karamelo ter blond tobak). V vseh testiranih pogojih so povzročile največji upad živosti celic v primerjavi z drugimi posameznimi komponentami vejпов. Najbolj občutljive so bile možganske celice NHA in jetrne celice HepG2, najmanj pa pljučne celice MRC-5. Več testiranih raztopin arom je povzročilo statistično pomembno znižanje živosti celic, pri čemer je aroma ovseni kosmiči s karamelo izstopala kot najbolj citotoksična (vejpa 3 in 4). Povzročila je najnižje preživetje vseh treh celičnih linij, zlasti po izpostavitvi 300 vdihom (slika 3). Pri izpostavitvi 100 vdihov je povzročila najnižje preživetje celic NHA (30-% živost celic), pri celicah HepG2 in MRC-5 pa smo pri tej koncentraciji opazili padec preživetja na 70 %. Najnižje preživetje je povzročila zlasti raztopina arome, ekvivalentna 300 vdihov, saj je ta kon-



Slika 1: Izpostavitve celic HepG2, MRC-5 in NHA naraščajočim koncentracijam sedmih vejrov in pripadajočim kontrolam topila (KT) s koncentracijami 2,8, 8,4 in 16,8 % mešanici propilen glikola in rastlinskega glicerina (PG/VG). Živost celic je bila merjena po 24 urah izpostavitve vejrov s sestavo v preglednici 1 s testom merjenja adenzin trifosfata (ATP). Kot pozitivna kontrola (PK) je bil uporabljen 7% dimetilsulfoksid (DMSO). Statistična analiza primerjave KT in izbranih koncentracij vejrov je bila izvedena z enovzorčnim t- testom. Vsi poskusi so bili izvedeni v treh neodvisnih bioloških ponovitvah, pri čemer je bila vsaka biološka ponovitev (n = 3) izvedena v štirih tehničnih ponovitvah; na sliki so prikazana povprečja meritev in standardni odklon (SD) za vse tri celične linije. * (p < 0.05), ** (p < 0.01), *** (p < 0.001), **** (p < 0.0001). KM – kontrola medija.

Figure 1: Exposure of HepG2, MRC-5, and NHA cell lines to increasing concentrations of seven vape formulations and the corresponding mixtures of propylene glycol and vegetable glycerin (PG/VG) as solvent controls (KT) (2.8%, 8.4%, and 16.8%). Cell viability was assessed by adenosine triphosphate (ATP) after 24 hours of exposure to the vape formulations listed in Table 1. A 7% dimethyl sulfoxide (DMSO) solution was used as the positive control (PC). Statistical analysis between KT and selected concentrations of vapes was performed using a one-sample t-test. All experiments were performed in three independent biological replicates, with each biological replicate (n = 3) carried out in four technical replicates. The figure shows the mean values and standard deviation (SD) of the measurements for all three cell lines. * (p < 0.05), ** (p < 0.01), *** (p < 0.001), **** (p < 0.0001). KM – media control.

	HepG2 		MRC-5 		NHA 	
Kontrola						
Število vdihov	100	600	100	600	100	600
Nikotinski ekvivalent/mL v tretmaju	0,5	3	0,5	3	0,5	3
% topila PG/VG	2,8	16,8	2,8	16,8	2,8	16,8
Vejp 6						
Vejp 7						

Slika 2: Morfologija humanih jetrnih (HepG2), pljučnih (MRC-5) in možganskih (NHA) celic po 24-urni izpostavitvi najvišji (3 mg) in najnižji (0,5 mg) koncentraciji najbolj (vejp 7) in najmanj toksičnega vejpa (vejp 6). Slikano z mikroskopom EVOS M7000 pri 10x povečavi. Merilo je na prvi sliki (HepG2) in velja za vse slike.

Figure 2: Morphology of human liver (HepG2), lung (MRC-5), and brain (NHA) cells after 24-hour exposure to the highest (3 mg) and lowest (0.5 mg) concentrations of the most toxic (vape 7) and least toxic vape (vape 6). Images were captured using an EVOS M7000 microscope at 10x magnification. The scale bar is shown in the first image (HepG2) and applies to all images.

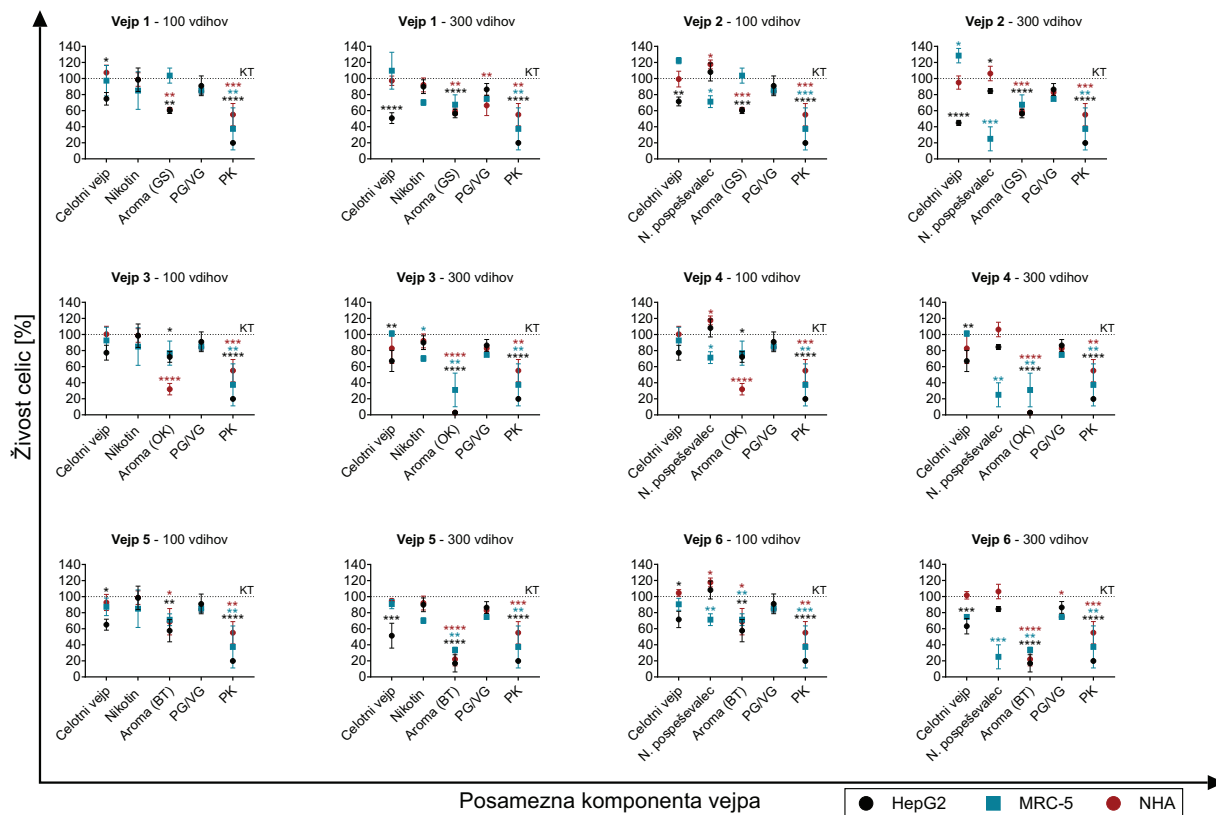
centracija povzročila skoraj popolno celično smrt celic HepG2 in NHA, preživetje celic MRC-5 pa je padlo na 30 %. Ti rezultati kažejo na prisotnost potencialno citotoksičnih spojin v raztopinah arom in so skladni s študijami, ki so identificirale aromatske spojine predvsem v kompleksnih sladkih in kremastih aromah kot pomemben vir citotoksičnosti v vejpih (11, 16, 17).

Iz rezultatov je razvidno, da citotoksičnosti vejпов ni mogoče pripisati zgolj nikotinski komponenti, temveč je v veliki meri odvisna tudi od drugih sestavnih komponent, predvsem arom in topil. Te lahko v določenih primerih, zlasti pri višji obremenitvi, izkazujejo celo izrazitejši citotoksični učinek kot nikotinska komponenta sama, kar poudarja njihovo pomembno vlogo pri skupnem citotoksičnem potencialu vejпов in je bilo dokazano tudi v drugih študijah (6). Lerner in sod. so npr. od arome odvisne genotoksične učinke dokazali na primarnih pljučnih fibroblastih (6).

Raziskava ima nekaj omejitev. Uporabljeni modeli *in vitro* ne posnema v celoti dejanske izpostavljenosti uporabnikov elektronskih cigaret, saj so bile celice testiranim mešanicam in komponentam izpostavljene neposredno v celičnem gojišču. Zato uporabljenih koncentracij ni mogoče neposredno primerjati s koncentracijami nikotina v krvi uporabnikov; najvišjo koncentracijo obravnavamo kot zgornji testni pogoj *in vitro* za oceno citotoksičnega potenciala.

4 SKLEP

Kljub zakonskim omejitvam uporabe vejпов v Sloveniji njihova raba, zlasti med mladimi, ostaja pomemben javno-



Slika 3: Izpostavitve celic HepG2, MRC-5 in NHA posameznim komponentam vejpa. Celice so bile 24 ur izpostavljene raztopinam arom: gozdni sadeži in liči (GS), ovseni kosmiči s karamelo (OK) ter blond tobak (BT), ter dvema nikotinskima formulacijama: nikotin in nikotinski pospeševalec. Celične linije so bile izpostavljene primerni kontroli topila (KT), ki je vsebovala mešanico propilen glikola in rastlinskega glicerina (PG/VG) v koncentracijah 2,8 oziroma 8,4 %. Kot PK (pozitivna kontrola) je bil uporabljen 7% dimetilsulfoksid (DMSO). Za statistično analizo primerjave KT in posameznih komponent vejpa je bila uporabljena enosmerna analiza variance (one-way ANOVA). Vsi poskusi so bili izvedeni v treh neodvisnih bioloških ($n = 3$) ponovitvah, pri čemer je bila vsaka biološka ponovitev izvedena v štirih tehničnih ponovitvah. Na sliki so prikazana povprečja meritev in SD za vse tri celične linije; * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$), **** ($p < 0.0001$).

Figure 3: Exposure of HepG2, MRC-5, and NHA cells to individual vape components. Cells were exposed for 24 hours to flavoring agents—forest fruits and lychee (GS), oatmeal with caramel (OK), and blond tobacco (BT)—as well as to two nicotine formulations (nicotine and a nicotine enhancer). Cells were also treated with the corresponding solvent control (KT) containing 2.8%, or 8.4% mixture of propylene glycol and vegetable glycerin (PG/VG). A 7% dimethyl sulfoxide (DMSO) solution was used as the positive control (PC). Statistical comparisons between the solvent control (KT) and individual vape components were performed using one-way analysis of variance (one-way ANOVA). All experiments were performed in three independent biological replicates ($n = 3$), with each biological replicate carried out in four technical replicates. The figure shows the mean values and SD of the measurements for all three cell lines; * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$), **** ($p < 0.0001$).

zdravstveni izziv. Mladi so zaradi razvojnih značilnosti ter večje dovzetnosti za arome, marketinške strategije in socialne vplive še posebej ranljiva skupina, zato je razumevanje bioloških učinkov vejпов ključno za utemeljeno oblikovanje preventivnih in regulativnih ukrepov. V naši raziskavi je izpostavitve različnih celičnih tipov različnim mešanicam vejпов povzročila koncentracijsko odvisno zmanjšanje živosti pljučnih, jetrnih in možganskih celic, pri čemer so se učinki med posameznimi vejpi razlikovali. Citotoksičnih

učinkov ni bilo mogoče pripisati zgolj nikotinski komponenti, saj so pomembno prispevale tudi druge komponente, zlasti arome in topilo PG/VG. Med testiranimi aromami so se učinki razlikovali. Najizrazitejše zmanjšanje živosti celic je povzročila aroma ovseni kosmiči s karamelo, kar je skladno z ugotovitvami, da so lahko kompleksne sladke in kremaste arome pomemben vir citotoksičnosti. Tudi aroma gozdni sadeži in liči je pri posameznih celičnih linijah oziroma ostrejših pogojih prispevala k zmanjšanju živosti celic. Statistično

značilno znižanje živosti celic je bilo ugotovljeno tudi pri aromi blond tobak, ki spada med dovoljene tobačne arome v skladu z Zakonom o omejevanju uporabe tobačnih in povezanih izdelkov (Uradni list RS, št. 9/17, 29/17 in 31/24) ter Pravilnikom o poročanju o tobačnih in povezanih izdelkih (Uradni list RS, št. 96/24). Ugotovitve nakazujejo, da lahko vejpi in njihove posamezne komponente prispevajo k citotoksičnim učinkom v modelih *in vitro*. Pri tem imajo lahko pomembno vlogo poleg nikotina tudi arome in topila, zato rezultati poudarjajo potrebo po nadaljnjih raziskavah toksi-kološke varnosti posameznih komponent ter njihovih kombinacij, pa tudi raziskave dolgoročne izpostavljenosti.

5 IZJAVA

To delo je podprla Javna agencija za znanstvenoraziskovalno in inovacijsko dejavnost Republike Slovenije, programski projekt P1-0245.

6 LITERATURA

1. Sassano MF, Davis ES, Keating JE, Zorn BT, Kochar TK, Wolfgang MC, et al. Evaluation of e-liquid toxicity using an open-source high-throughput screening assay. *PLoS Biol.* 2018;16(3):e2003904.
2. NIJZ. Tobačni in povezani izdelki [Internet]. 2024 [cited 2025 Oct 2]. Available from: <https://obcine.nijz.si/vsebine/izbrane-vsebine/tobacni-in-povezani-izdelki-113/>
3. Eltorai AEM, Choi AR, Eltorai AS. Impact of Electronic Cigarettes on Various Organ Systems. *Respir Care.* 2018;64(3):328–36. doi:10.4187/respcare.06300
4. Gordon T, Karey E, Rebuli ME, Escobar YNH, Jaspers I, Chen LC. E-Cigarette Toxicology. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2022;62(Volume 62, 2022):301–22. doi:<https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-042921-084202>
5. Cao DJ, Aldy K, Hsu S, McGetrick M, Verbeck G, De Silva I, et al. Review of Health Consequences of Electronic Cigarettes and the Outbreak of Electronic Cigarette, or Vaping, Product Use-Associated Lung Injury. *Journal of Medical Toxicology.* 2020;16(3):295–310. doi:10.1007/s13181-020-00772-w
6. Gandhi A, Lee CE, Beaumont AL, Ozeki S, Parambil CJ, Bowler RP, et al. The respiratory epithelium in the era of vaping: insights from *in vitro*, *in vivo* and human studies. *European Respiratory Review.* 2025;34(178). doi:10.1183/16000617.0256-2024.
7. Caruso Brown AE, Cohen MN, Tong S, Braverman RS, Rooney JF, Giller R, et al. Pharmacokinetics and Safety of Intravenous Cidofovir for Life-Threatening Viral Infections in Pediatric Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(7):3718–25. doi:10.1128/AAC.04348-14
8. Espinoza-Derout J, Shao XM, Bankole E, Hasan KM, Mtume N, Liu Y, et al. Hepatic DNA damage induced by electronic cigarette exposure is associated with the modulation of NAD⁺/PARP1/SIRT1 axis. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2019;10(JUN):453548. doi:10.3389/FENDO.2019.00320/TEXT
9. Wall A, Roslin S, Borg B, McDermott S, Walele T, Nahde T, et al. E-Cigarette Aerosol Deposition and Disposition of [¹¹C]Nicotine Using Positron Emission Tomography: A Comparison of Nicotine Uptake in Lungs and Brain Using Two Different Nicotine Formulations. *Pharmaceuticals.* 2022;15(3):367. doi:10.3390/PH15030367/S1
10. Rickard BP, Ho H, Tiley JB, Jaspers I, Brouwer KLR. E-Cigarette Flavoring Chemicals Induce Cytotoxicity in HepG2 Cells. *ACS Omega.* 2021;6(10):6708–13. doi:10.1021/acsomega.0c05639
11. Noël A, Ghosh A. Carbonyl Profiles of Electronic Nicotine Delivery System (ENDS) Aerosols Reflect Both the Chemical Composition and the Numbers of E-Liquid Ingredients—Focus on the *In Vitro* Toxicity of Strawberry and Vanilla Flavors. *Int J Environ Res Public Health.* 2022;19(24). doi:10.3390/ijerph192416774 PubMed PMID: 36554655.
12. Chen JY, Canchola A, Lin YH. Carbonyl Composition and Electrophilicity in Vaping Emissions of Flavored and Unflavored E-Liquids. *Toxics.* 2021;9(12):345. doi:10.3390/toxics9120345
13. Hajiasgharzadeh K, Somi MH, Mansoori B, Doustvandi MA, Vahidian F, Alizadeh M, et al. Alpha7 Nicotinic Acetylcholine Receptor Mediates Nicotine-induced Apoptosis and Cell Cycle Arrest of Hepatocellular Carcinoma HepG2 Cells. *Adv Pharm Bull.* 2020;10(1):65–71. doi:10.15171/apb.2020.008 PubMed PMID: 32002363.
14. Tellez CS, Juri DE, Phillips LM, Do K, Yingling CM, Thomas CL, et al. Cytotoxicity and Genotoxicity of E-Cigarette Generated Aerosols Containing Diverse Flavoring Products and Nicotine in Oral Epithelial Cell Lines. *Toxicological Sciences.* 2021;179(2):220–8. doi:10.1093/TOXSCI/KFAA174 PubMed PMID: 33226417.
15. Mahadev Bhat S, Shrestha D, Massey N, Karriker LA, Kanthasamy AG, Charavaryamath C. Organic dust exposure induces stress response and mitochondrial dysfunction in monocytic cells. *Histochem Cell Biol.* 2021;155(6):699–718. doi:10.1007/s00418-021-01978-x
16. Lerner CA, Sundar IK, Yao H, Gerloff J, Ossip DJ, McIntosh S, et al. 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. *PLoS One.* 2015;10(2):e0116732. doi:10.1371/journal.pone.0116732
17. Ruth T, Daniel J, König A, Trittler R, Garcia-Käufer M. Inhalation toxicity of thermal transformation products formed from e-cigarette vehicle liquid using an *in vitro* lung model exposed at the Air-Liquid Interface. *Food and Chemical Toxicology.* 2023;182:114157. doi:10.1016/j.fct.2023.114157