

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Sara V. Trifunović

Biološki odgovor ćelijskih linija bronhijalnog epitela
(BEAS2B) i fibroblasta pluća (V79) na komponente
tečnosti za elektronske cigarete

doktorska disertacija

Beograd, 2026

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Sara V. Trifunović

Biological response of bronchial epithelial cell lines
(BEAS2B) and lung fibroblasts (V79) to e-cigarette
liquid components

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2026

MENTORI:

dr Mila Ljujić, viši naučni saradnik

Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu

dr Miloš Brkušanin, docent

Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

ČLANOVI KOMISIJE:

dr Dušanka Savić Pavićević, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet

dr Aleksandra Divac Rankov, naučni savetnik

Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu

dr Nataša Petrović Stanojević, docent

Univerzitet u Beogradu - Stomatološki fakultet; Kliničko odeljenje za pulmologiju, alergologiju i kliničku imunologiju, KBC Zvezdara, Beograd

Datum odbrane: _____

Zahvalnica

Ova doktorska disertacija urađena je u Laboratoriji za molekularnu biologiju, u grupi za funkcionalnu genomiku i ćelijsku toksikologiju, pod mentorstvom dr Mile Ljujić. Želim da izrazim iskrenu zahvalnost svojoj mentorki, dr Mili Ljujić, na stručnom vođenju, stalnoj podršci, razumevanju i velikom trudu da se stigne do cilja na ovom turbulentnom putu. Njeno iskustvo, posvećenost i kritički pristup bili su od velikog značaja u svim fazama ovog istraživanja. Hvala na svojoj pruženoj pomoći i svemu što me je naučila.

Posebnu zahvalnost dugujem dr Aleksandri Divac Rankov na nesebičnoj pomoći, podršci i uvođenju u tematiku koja mi je na početku ovog istraživanja bila potpuno nova, kao i na brojnim sugestijama koje su doprinele oblikovanju istraživačkog rada, tumačenju dobijenih rezultata i konačnom oblikovanju disertacije.

Dr Milošu Brkušaninu zahvaljujem se na odličnoj komunikaciji, spremnosti da pomogne u vezi sa fakultetskim procedurama, kao i na pažljivom čitanju disertacije i korisnim komentarima koji su doprineli njenom kvalitetu.

Zahvaljujem se članovima komisije, dr Dušanki Savić Pavićević i dr Nataši Petrović Stanojević, na izdvojenom vremenu, pažljivom čitanju disertacije i korisnim komentarima.

Zahvaljujem se dr Dragici Radojković, koja je u vreme mog dolaska na Institut bila rukovodilac Laboratorije za molekularnu genetiku, što mi je pružila priliku da postanem deo ovog kolektiva i da se razvijam u naučnom okruženju koje je značajno oblikovalo moj dalji istraživački rad.

Dr Katarini Smiljanić se zahvaljujem na dugogodišnjem prijateljstvu, podršci i saradnji. Hvala na svemu što me je naučila, na brojnim savetima, razumevanju i zajedničkim trenucima koji su imali posebno mesto tokom mog naučnog i ličnog razvoja.

Kolegama iz Laboratorija 03, 11, 12 i 13 hvala na pomoći, saradnji i dobroj atmosferi tokom svih ovih godina. Hvala vam na razgovorima, smeđu i svim onim svakodnevnim sitnicama zbog kojih je laboratorija bila mesto podrške, razumevanja i dobrog raspoloženja.

Posebnu zahvalnost želim da iskažem svojim prijateljima i kolegama sa MedILSa, mesta na kojem je ova disertacija i započeta. Miru hvala na tome što mi je otvorio potpuno novu životnu i naučnu perspektivu, na idejama, drugačijem načinu razmišljanja i prilici da radimo zajedno. Danici hvala na velikoj podršci, razumevanju i širenju vidika u svakom smislu. Period proveden sa vama duboko me je i trajno promenio i na tome sam vam izuzetno zahvalna. Zahvaljujući vama stekla sam širinu koja mi je omogućila da svet, nauku i sebe sagledam na drugačiji način.

Katarini Trajković hvala na prijateljstvu, smeđu i svim nezaboravnim trenucima koji su obeležili jedan važan deo mog života i rada. Njeno znanje, iskustvo i način razmišljanja mnogo su mi značili u naučnom sazrevanju, a posebno sam zahvalna što se iz naše saradnje razvilo iskreno prijateljstvo.

Milici, Marini, Nataši, Daci i Jovani hvala na prijateljstvu, podršci i tome što su pratile svaki korak ovog dugog puta. Vaše razumevanje, ohrabrenje i prisustvo značili su mi više nego što mogu da izrazim. Prava je sreća imati vas za prijatelje.

Hvala mojoj porodici na bezrezervnoj ljubavi, podršci i razumevanju. Tati Vladimiru i mami Vesni hvala što su mi pružili slobodu da biram i pratim svoj put i sigurnost da ću u tim izborima uvek imati njihovu podršku, bez osuđivanja. Retka je takva vrsta ljubavi i oslonca i na tome sam im duboko zahvalna. Zahvaljujući njima odrastala sam verujući da se trudom, istrajnošću i radom može postići sve što se istinski želi.

Mami Vesni, mojoj najvećoj podršci, posebno hvala na svemu što svakodnevno čini za mene, kao i na tome što je u meni probudila interesovanje za biologiju i medicinu. Njena snaga, vedrina i lakoća sa kojom prolazi kroz život zauvek će mi biti uzor.

Nani Veri hvala što nam je svima usadila svest o važnosti obrazovanja. Sestri Ani hvala na podršci, razumevanju i strpljenju, iako joj je tema mog doktorata verovatno ostala prilično daleka.

Urošu, koji je pratio svaki korak ove doktorske disertacije, hvala na podršci, razumevanju, strpljenju za slušanje svakog najmanjeg detalja i analiziranje istog. Hvala na ljubavi i pomoći koju mi je pružio.

Ovu tezu posvećujem svojoj ćerki Mitri, mojoj najvećoj ljubavi i sreći.

Biološki odgovor ćelijskih linija bronhijalnog epitela (BEAS2B) i fibroblasta pluća (V79) na komponente tečnosti za elektronske cigarete

SAŽETAK

Elektronske cigarete predstavljaju alternativu konvencionalnom pušenju koja se često smatra manje štetnom. Uprkos rastućem broju studija koje opisuju pojedinačne aspekte ćelijskog odgovora, još uvek nedostaju sveobuhvatni podaci o efektima elektronskih cigareta i njihovih komponenti.

U ovoj doktorskoj disertaciji ispitan je biološki odgovor ćelija poreklom iz pluća (BEAS2B i V79) na akutno izlaganje komponentama tečnosti za elektronske cigarete, primenom paralelne analize transkriptoma i proteoma, uz funkcionalnu karakterizaciju odabranim ćelijskim esejima. Analizirani su efekti necitotoksičnih koncentracija tečnosti za e-cigarete na V79 ćelijama i kondenzata njihovih aerosola na BEAS2B ćelijama.

Rezultati su pokazali da izlaganje komponentama tečnosti za elektronske cigarete, kako tečnostima u V79 ćelijama, tako i kondenzatima aerosola u BEAS2B ćelijama, dovodi do poremećaja sinteze proteina i narušavanja mitohondrijske homeostaze. U oba ćelijska modela detektovano je povećanje broja i raznovrsnosti modifikacija proteina, uključujući ireverzibilne modifikacije. U BEAS2B ćelijama tretiranim kondenzatima aerosola tečnosti za e-cigarete, naročito u prisustvu arome i nikotina, uočene su promene u metabolizmu lipida, povećanje broja lipidnih kapljica, aktivacija metabolizma ksenobiotika i povećan lizosomalni signal. U V79 ćelijama nije utvrđen mutageni niti genotoksični efekat u primenjenim uslovima. Na nivou međućelijske komunikacije, u V79 ćelijama je došlo do narušavanja metaboličke kooperacije, dok je u BEAS2B ćelijama primećen povećan broj tunelskih nanotuba.

Zajedno posmatrano, rezultati ukazuju da komponente tečnosti za elektronske cigarete dovode do kompleksnog poremećaja ćelijske homeostaze, čak i pri akutnom izlaganju, u odsustvu citotoksičnosti.

Ključne reči: elektronske cigarete, BEAS2B, V79, plućne ćelije, transkriptomika, proteomika, modifikacije proteina, međućelijska komunikacija, lizozomi, mitohondrije

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Molekularna biologija

Biological response of bronchial epithelial cell lines (BEAS2B) and lung fibroblasts (V79) to e-cigarette liquid components

ABSTRACT

Electronic cigarettes are often perceived as a less harmful alternative to conventional smoking. Despite the growing number of studies describing individual aspects of the cellular response, comprehensive data on the effects of electronic cigarettes and their components are still lacking.

This doctoral dissertation aimed to investigate the biological response of lung-derived cell lines (BEAS2B and V79) to components of e-cigarette liquids following acute exposure, using parallel transcriptomic and proteomic analyses complemented by selected cellular assays. The effects of e-cigarette liquids and their aerosol condensates were examined at their non-cytotoxic concentrations.

The results demonstrate that exposure to e-cigarette components, both to e-liquids in V79 and aerosol condensates in BEAS2B, disrupts protein synthesis and mitochondrial homeostasis. In both cell lines, there was an increase in the number and diversity of protein modifications, including irreversible modifications. In BEAS2B cells exposed to e-cigarette aerosol condensate, particularly in the presence of aroma and nicotine, alterations in lipid metabolism, increased lipid droplet accumulation, activation of xenobiotic metabolism, and enhanced lysosomal activity were observed. No mutagenic or genotoxic effects were observed in V79 cells under the applied conditions. Electronic cigarette components also affected intercellular communication, as evidenced by disrupted metabolic cooperation in V79 cells and an increased number of tunneling nanotubes in BEAS2B cells.

Taken together, these findings indicate that components of e-cigarette liquids induce complex disturbances in cellular homeostasis, even upon acute exposure in the absence of cytotoxic effects.

Keywords: electronic cigarettes, BEAS2B, V79, lung cells, transcriptomics, proteomics, protein modifications, intercellular communication, lysosomes, mitochondria

Scientific field: Biology

Scientific subfield: Molecular biology

Skraćenice

ATP – Adenozin-trifosfat

AT1 – Alveolarne epitelne ćelije tipa I

AT2 – Alveolarne epitelne ćelije tipa II

VĆM – Vanćelijski matriks

HOBP – Hronična opstruktivna bolest pluća

KVB – Kardiovaskularne bolesti

PM2.5 – Suspendovane čestice prečnika manjeg od 2.5 µm

E-cigarete – Elektronske cigarete

PG – Propilen-glikol

VG – Biljni glicerol, eng. *vegetable glycerol*

THC – Tetrahidrokanabinol

EVALI – eng. *e-cigarette or vaping product use-associated lung injury*

GSTHR – eng. *Global State of Tobacco Harm Reduction*

ESPAD – Evropsko školsko istraživanje o upotrebi alkohola i drugih droga

ROS – Reaktivne kiseonične vrste, eng. *Reactive Oxygen Species*

CRP – C-reaktivni protein

sICAM – Rastvorljivi međućelijski adhezioni molekul, eng. *soluble intercellular adhesion molecule*

LLM – Makrofagi sa akumuliranim lipidima, eng. *Lipid-laden macrophages*

H₂O₂ – Vodonik-peroksid

kTEC – Kondenzat aerosola tečnosti za e-cigarete

TEC – Tečnost za elektronske cigarete koja sadrži PG, VG, aromu i nikotin

FBS – Fetalni goveđi serum

EDTA – Etilendiaminotetraacetat

DMSO – Dimetil-sulfoksid

PGVG – Nosač tečnosti za e-cigarete koji se sastoji od PG i VG

PGVG + A – Tečnosti za e-cigarete koji se sastoji od PG, VG i arome

kPGVG – Kondenzati aerosola generisani iz PGVG tečnosti

MTT – 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolijum bromid

OD – Optička gustina, eng. *optical density*

PBS – Fosfatni pufer

SRA – eng. *Sequence Read Archive*

GEO – eng. *Gene Expression Omnibus*

FDR – Stopa lažnih otkrića

DEG – Diferencijalno eksprimirani geni

BCA – bicinoninska kiselina

BSA – goveđi serum albumin, eng. *Bovine Serum Albumin*

1D SDS-PAGE – jednodimenzionalna elektroforeza u poliakrilamidnom gelu sa natrijum-dodecil-sulfatom, eng. *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*

PAA – poliakrilamid

TEMED – tetrametiletildiamin

ABC – Amonijum-bikarbonat

DTT – Ditiotreitol

IAA – Jodoacetamid

ACN – Acetonitril
FA – Mravlja kiselina, eng. *Formic acid*
TFA – Trifluorosirćetna kiselina
AGC – Automatska kontrola pojačanja, eng. *Automatic Gain Control*
LFQ – Kvantifikacija bez obeležavanja, eng. *label-free kvantifikacija*
HPRT – Hipoksantin-guanin-fosforibozil transferaza
6-TG – 6 tioguanin
 $\Delta\Psi_m$ – Mitohondrijski membranski potencijal
JC-1 – 5,5',6,6'-tetrahloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolilkarbocijanin jodid
TMRE – Tetrametilrodamin etil-estar
OP-puromicin – O-propargil-puromicina
WT – ćelija divljeg soja, eng. *Wild type*
6TG-R – 6TG rezistentne ćelije
PVDF – Poliviniliden-fluoridna
Cx43 – Koneksin 43
TNT – Tunelske nanotube, eng. *Tunneling nanotubes*,
LFC – Log-fold promena, eng. *Log fold change*
PCA – Analiza osnovnih komponenti, eng. *principal component analysis*
GO – Analiza obogaćenja funkcionalnih kategorija gena, eng. *gene ontology enrichment*
ORA – Analiza prekomerne zastupljenosti funkcionalnih kategorija, eng. *over-representation analysis*
GSEA – Analiza obogaćenja setova gena, eng. *Gene set enrichment analysis*
Heatmap – Grafički prikaz hijerarhijske klaster analize ekspresije gena, eng. *heatmap*
ES – Trend skorova obogaćenja, eng. *Enrichment score*
Shotgun – Neselektivna proteomska analiza, eng. *shotgun proteomics*
DEP – Diferencijalno eksprimirani proteini
PM – Modifikacija proteina
P – Fiziološke modifikacije proteina
A – Artefaktne modifikacije proteina
CD – hemijski derivatne modifikacije proteina, eng. *chemical derivatives*
XIC – eng. *Extracted ion chromatogram*
NIK – Nikotin u koncentraciji od 250 µg/ml
FAK-1 – Kinaza fokalne adhezije 1
TCA ciklus – Ciklus trikarboksilnih kiselina
4-HNE – 4-hidroksinonenal
BF – svetlo polje, eng. *Brightfield*
PMA – Forbol-12-miristat-13-acetat
AhR – Aril-hidrokarbonski receptor
PAH – Policiklični aromatični ugljovodonici
ALI – eng. *Air Liquid Interface*
BAL – Bronhoalveolarna lavaža
3-NT – 3-nitrotirozin
AGE – Napredni produkti glikacije
2-AT – 2-aminotirozin
HIV – Virus humane imunodeficijencije, eng. *human immunodeficiency virus*

Sadržaj

1. Uvod	1
1.1. Respiratorni sistem	1
1.1.1. Građa i funkcija pluća	1
1.1.2. Čelijski sastav plućnog tkiva	2
1.1.2.1. Epitelne plućne ćelije	2
1.1.2.2. Fibroblasti u plućima	3
1.2. Sredinski faktori rizika u nastanku bolesti pluća	3
1.2.1. Duvanski dim	3
1.2.2. Aerozagađenje	5
1.3. Elektronske cigarete	5
1.3.1. Istorijski razvoj i načini upotrebe	5
1.3.2. Struktura i funkcionalne komponente e-cigareta	6
1.3.3. Komponente tečnosti za e-cigarete i njihov aerosol	8
1.3.4. Globalna ekspanzija tržišta e-cigareta i ekonomski značaj	9
1.3.5. Srbija kao studija slučaja: prevalencija upotrebe među mladima	12
1.4. Zdravstveni rizici i toksikološki aspekti upotrebe e-cigareta	12
1.5. Molekularni mehanizmi toksičnosti e-cigareta	13
1.5.1. Genotoksičnost i mutagenost	14
1.5.2. Inflamacija	14
1.5.3. Oksidativni stres	15
2. Ciljevi	17
2.1. Specifični ciljevi	17
3. Materijal i metode	18
3.1. Čelijske linije i kulture	18
3.2. Priprema kondenzata i tretmani tečnostima za e-cigarete	18
3.3. Određivanje necitotoksične doze tretmana ispitivanjem vijabilnosti ćelija korišćenjem MTT eseja ...	19
3.4. Izolacija RNK, RNK-sekvenciranje i transkriptomska analiza (BEAS-2B)	20
3.4.1. Izolacija ukupne RNK	20
3.4.2. RNK sekvenciranje	21
3.4.3. Transkriptomska analiza	21
3.5. Priprema ekstrakata proteina BEAS-2B i V79 ćelija za masenu spektrometriju visoke rezolucije nLC-MS/MS	22
3.5.1. Izolacija i određivanje koncentracije proteina	22
3.5.2. Elektroforetska priprema ekstrakata proteina za tripsinsku digestiju u gelu	23
3.5.3. Pranje gela, redukcija i alkilacija proteina	23
3.5.4. Prva serija ispiranja - uklanjanje boje	24
3.5.5. Redukcija i alkilacija proteina	24
3.5.6. Druga serija ispiranja - uklanjanje ostataka reagensa	24

3.5.7. Tripsinska digestija proteina.....	24
3.5.8. Zaustavljanje digestije	25
3.5.9. Ekstrakcija peptida iz gela i desalinizacija	25
3.6. Analiza masenom spektrometrijom visoke rezolucije nLC-MS/MS (BEAS-2B)	26
3.7. Identifikacija i kvantifikacija bez obeležavanja proteina i profilisanje posttranslacionih modifikacija proteina (BEAS-2B)	26
3.8. Masena spektrometrija visoke rezolucije nLC-MS/MS (V79)	27
3.9. Identifikacija i kvantifikacija bez obeležavanja proteina i profilisanje posttranslacionih modifikacija proteina (V79)	27
3.10. Analiza mutagenosti i genotoksičnosti	28
3.10.1. HPRT test mutagenosti (V79)	28
3.10.2. Test genotoksičnosti - Kometa esej (V79)	29
3.11. Analiza membranskog potencijala mitohondrijske membrane.....	29
3.12. Analiza <i>de novo</i> sinteze proteina	30
3.13. Fluorescentno obeležavanje lizozoma i kiselih vezikula.....	31
3.14. Fluorescentno obeležavanje neutralnih lipida u ćelijama	32
3.15. Test metaboličke kooperacije (V79).....	32
3.16. Analiza ekspresije proteina Cx43 metodom <i>Western blot</i> -a.....	33
3.17. Kvantifikacija tunelskih nanotuba	34
3.18. Statistička obrada podataka	34
4. Rezultati.....	35
4.1. Uticaj komponenti tečnosti za e-cigarete na vijabilnost BEAS-2B i V79 ćelija	35
4.2. Analiza transkriptoma BEAS-2B ćelija nakon izlaganje kondenzatima aerosola tečnosti za e-cigarete	36
4.3. Analiza proteoma BEAS-2B ćelija nakon izlaganje kondenzatima aerosola tečnosti za e-cigarete	47
4.4. Modifikacije proteina u BEAS-2B ćelijama nakon izlaganja kondenzatima aerosola tečnosti za e-cigarete	51
4.5. Analiza proteoma V79 ćelija nakon izlaganja tečnostima za e-cigarete	55
4.6. Modifikacije proteina u V79 ćelijama nakon izlaganja tečnostima za e-cigarete	59
4.7. Uticaj kondenzata aerosola tečnosti za e-cigarete na sintezu proteina u BEAS-2B ćelijama	61
4.8. Uticaj kondenzata aerosola tečnosti za e-cigarete na mitohondrijski membranski potencijal u BEAS-2B ćelijama.....	62
4.9. Uticaj kondenzata aerosola tečnosti za e-cigarete na intenzitet lizozomskog signala u BEAS-2B ćelijama	64
4.10. Uticaj kondenzata aerosola tečnosti za e-cigarete na akumulaciju neutralnih lipida u BEAS-2B ćelijama	66
4.11. Procena mutagenog potencijala tečnosti za e-cigarete u V79 ćelijama korišćenjem HPRT testa	67
4.12. Procena genotoksičnosti tečnosti za e-cigarete u V79 ćelijama kometa testom.....	67
4.13. Uticaj tečnosti za e-cigarete na metaboličku kooperaciju u V79 ćelijama	68
4.14. Uticaj tečnosti za e-cigarete na ekspresiju proteina Cx43 u V79 ćelijama.....	69
4.15. Uticaj tečnosti za e-cigarete na formiranje tunelskih nanotuba u BEAS-2B ćelijama	70

5. Diskusija.....	72
5.1. Translacija i proteostaza nakon izlaganja komponentama tečnosti za e-cigarete.....	74
5.2. Mitohondrijska homeostaza nakon izlaganja komponentama tečnosti za e-cigarete	75
5.3. Indukcija enzima metabolizma ksenobiotika CYP1A1 i CYP1B1 u BEAS-2B ćelijama nakon izlaganja kondenzatima aerosola tečnosti za e-cigarete	78
5.4. Akumulacija neutralnih lipida i lizozomalni sistem u BEAS-2B ćelijama nakon izlaganja kondenzatima aerosola tečnosti za e-cigarete.....	79
5.5. Modifikacije proteina kao hemijski otisak izlaganja komponentama tečnosti za e-cigarete.....	81
5.5.1. Metodološki izazovi u analizi modifikacija proteina.....	83
5.6. Promene u međucelijskoj komunikaciji nakon izlaganja komponentama tečnosti za e-cigarete: pukotinaste veze i TNT	83
6. Zaključci.....	87
7. Literatura:	88

1. Uvod

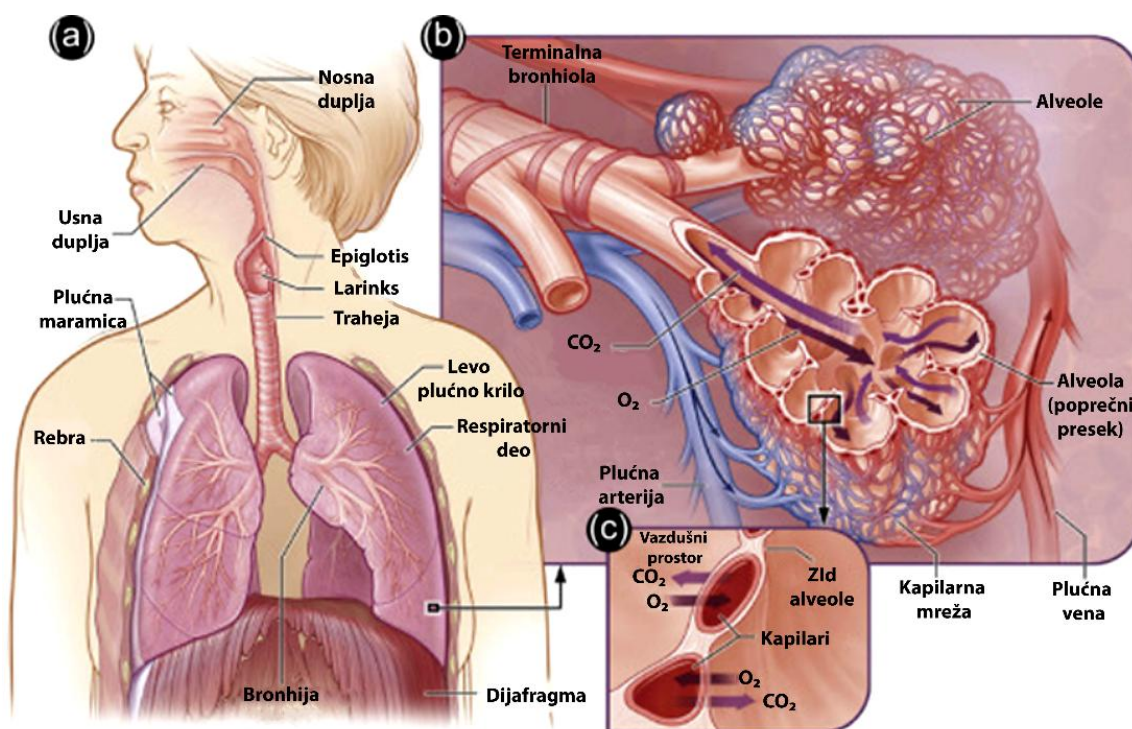
1.1. Respiratorni sistem

1.1.1. Građa i funkcija pluća

Pluća predstavljaju centralni organ respiratornog sistema, čija je osnovna uloga da posreduju u efikasnoj razmeni gasova između spoljašnje sredine i unutrašnjeg miljea organizma. Ovaj proces je fiziološki složen i podrazumeva prelazak kiseonika iz gasovite u tečnu fazu i ugljen-dioksida iz tečne u gasovitu sredinu.

Respiratorni sistem obuhvata gornje i donje disajne puteve, tj. provodni i respiratorni deo. Provodni deo respiratornog sistema obuhvata nos, nazofarinks, larinks, dušnik i niz sve užih bronhija i bronhiola, koji se završavaju terminalnom bronhiolom (Slika 1) (1). Respiratorni deo počinje od respiratorne bronhiole, nastavlja se kroz alveolarne kanale i alveolarne vrećice i završava u alveolama, gde se odvija primarna razmena gasova (2,3). U okviru pluća, pet lobusa, dva u levom i tri u desnom plućnom krilu sadrže približno 300 miliona alveola, malih kesastih struktura koje višestruko uvećavaju površinu dostupnu za difuziju gasova (4). Na ovoj alveolo-kapilarnoj granici kiseonik difuzijom prelazi kroz epitelne i endotelne membrane u plućne arteriole, dok se ugljen-dioksid oslobađa iz venske krvi u alveolarni prostor (Slika 1) (5). Ova dvosmerna razmena gasova obezbeđuje kontinuiranu isporuku kiseonika u sistemsku cirkulaciju i uklanjanje nusprodukata metabolizma, čime se održava ćelijska i fiziološka homeostaza (6,7).

Proces disanja može se podeliti na četiri međuzavisne faze: plućnu ventilaciju, spoljašnje disanje, transport gasova i unutrašnje disanje (8). Plućna ventilacija zasniva se na koordinisanoj aktivnosti dijafragme i grudnih mišića, čija kontrakcija povećava intratorakalni volumen i smanjuje intraalveolarni pritisak, omogućavajući ulazak vazduha u pluća. Spoljašnje disanje odvija se na nivou alveola, gde se kiseonik apsorbuje, a ugljen-dioksid oslobađa, dok u transportu gasova posreduje hemoglobin u eritrocitima sistemske cirkulacije. Unutrašnje disanje uključuje prelazak kiseonika iz kapilara u tkiva, gde podržava oksidativnu fosforilaciju i sintezu adenozin-trifosfata (ATP), dok se ugljen-dioksid stvara kao metabolički nusproizvod (9). Ovi procesi ilustruju blisku povezanost respiratornog i kardiovaskularnog sistema, pri čemu efikasnost plućne funkcije direktno određuje isporuku kiseonika i ćelijski energetskei metabolizam. Pored toga, provodna zona respiratornog trakta, koja se proteže od nosa do terminalnih bronhiola, ima zaštitnu ulogu jer zagreva, ovlažuje i filtrira udahnuti vazduh, dok mukocilijarni aparat uklanja čestice i patogene pre nego što dospeju do osetljivih alveolarnih struktura (10).



Slika 1. Strukturna organizacija respiratornog sistema i razmena gasova u alveolarnom regionu.

(a) Makroskopski prikaz respiratornog sistema, uključujući provodne disajne puteve i pluća.

(b) Prikaz terminalnih bronhiola i alveola kao osnovnih funkcionalnih jedinica pluća, sa pratećom vaskularnom mrežom.

(c) Šematski prikaz razmene gasova na nivou alveola. Preuzeto i modifikovano sa:

<https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/respiratory-system> (9)

Zbog stalnog kontakta sa spoljašnjom sredinom, respiratorni trakt predstavlja jednu od najizloženijih površina u organizmu, koja istovremeno mora da obezbedi efikasnu razmenu gasova i da ograniči prodor čestica i hemijskih agenasa. Zato su mehanizmi barijerne zaštite, mukocilijarnog klirensa i lokalnog imunskog odgovora ključni za očuvanje plućne funkcije, ali ujedno predstavljaju i prve mete inhalacionih toksikanata.

1.1.2. Ćelijski sastav plućnog tkiva

1.1.2.1. Epitelne plućne ćelije

Epitelne ćelije respiratornog sistema mogu se, u skladu sa anatomskom i funkcionalnom organizacijom pluća, podeliti na ćelije bronhijalnog i alveolarnog epitela (3,11). Bronhijalni epitel oblaže provodne disajne puteve i sastoji se od više diferenciranih ćelijskih tipova, uključujući trepljaste ćelije, peharaste ćelije koje luče mukus, bazalne ćelije sa progenitorskom ulogom, kao i klubske ćelije, koje učestvuju u detoksikaciji i održavanju epitelne homeostaze (12,13). Alveolarni epitel čine dva glavna tipa ćelija: alveolarne epitelne ćelije tipa I (AT1), koje pokrivaju najveći deo alveolarne površine i omogućavaju efikasnu razmenu gasova, i alveolarne epitelne ćelije tipa II (AT2), koje sintetišu i luče surfaktant, učestvuju u obnovi alveolarnog epitela i predstavljaju progenitorsku populaciju za AT1 ćelije (14). Pored epitelnih, prisutne su i imunske ćelije, endotelne ćelije, fibroblasti i stromalne ćelije (15,16).

Bronhijalne epitelne ćelije predstavljaju prvu liniju odbrane respiratornog trakta, delujući ne samo kao pasivna fizička barijera, već i kao dinamički regulatori imunske homeostaze. Kroz koordinisano lučenje citokina, hemokina i antimikrobnih molekula, bronhijalne epitelne ćelije aktivno učestvuju u

oblikovanju urođenih i stečenih imunskih odgovora, čime održavaju integritet disajnih puteva i štite od udahnutih patogena i toksičnih supstanci (17,18). Pod uticajem ponovljenih spoljašnjih izazova, kao što su hronična izloženost duvanskom dimu ili infektivnim agensima, bronhijalne epitelne ćelije doživljavaju strukturne i funkcionalne promene koje narušavaju barijernu funkciju, povećavaju oksidativni stres i remete imunsku signalizaciju (19). Umesto da obezbede zaštitnu kontrolu, izmenjene bronhijalne epitelne ćelije mogu pokretati perzistentne inflamatorne procese, regrutovati i aktivirati imunske efektorske ćelije i doprineti remodelovanju disajnih puteva. Ove promene naglašavaju centralnu ulogu bronhijalnih epitelnih ćelija kao čuvara zdravlja disajnih puteva, ali i potencijalnih pojačivača patogenih kaskada, što ih pozicionira kao ključne mete u istraživanju mehanizama oštećenja pluća i razvoju novih terapijskih pristupa (20).

1.1.2.2. Fibroblasti u plućima

Fibroblasti u plućima predstavljaju ključne stromalne ćelije odgovorne za proizvodnju i održavanje vanćelijskog matriksa (VĆM), koji čini strukturni okvir alveola i drugih plućnih odeljaka. Sintetišući osnovne komponente VĆM-a, kao što su kolagen i elastin, fibroblasti obezbeđuju integritet i elastičnost tkiva, što je od suštinskog značaja za normalnu plućnu funkciju i razmenu gasova. Ova strukturna uloga od presudnog je značaja tokom razvoja, održavanja homeostaze i reparacije tkiva nakon povrede (21,22).

Pored obezbeđivanja mehaničke potpore, plućni fibroblasti aktivno učestvuju u procesima obnove tkiva nakon oštećenja ili inflamacije. Oni proliferišu i migriraju ka oštećenim regionima, gde deponuju VĆM i time omogućavaju remodelovanje tkiva i obnovu alveolarne arhitekture. Poremećaj aktivnosti fibroblasta može dovesti do patološkog remodelovanja, kao što je prekomerno nakupljanje VĆM-a viđeno kod plućne fibroze, što značajno narušava plućnu funkciju (23,24).

Takođe, fibroblasti doprinose imunskom okruženju pluća proizvodnjom signalnih molekula koji utiču na regrutaciju i aktivaciju imunskih ćelija tokom inflamatornih odgovora. Zahvaljujući sposobnosti da istovremeno modulišu reparativne i imunske puteve, fibroblasti imaju integralnu ulogu u održavanju plućnog zdravlja i u orkestraciji odgovora na oštećenje, čime postaju važne mete za terapijske intervencije u hroničnim plućnim bolestima (24,25).

U tom okviru, epitelne i stromalne ćelije predstavljaju komplementarne komponente koje određuju ishod odgovora pluća na oštećenje: epitel inicira i usmerava rane odbrambene reakcije, dok fibroblasti oblikuju reparaciju i remodelovanje tkiva. Zbog toga su *in vitro* modeli koji obuhvataju ove ćelijske tipove posebno pogodni za mehanističko ispitivanje efekata inhalacionih agenasa.

S obzirom na ovu složenu organizaciju plućnog tkiva i stalnu izloženost spoljašnjim faktorima, očuvanje njegove funkcije zahteva precizno koordinisanu komunikaciju između različitih ćelijskih populacija.

1.2. Sredinski faktori rizika u nastanku bolesti pluća

1.2.1. Duvanski dim

Pušenje cigareta i dalje predstavlja jedan od najvećih izazova za globalno javno zdravlje, uzrokujući približno 8 miliona smrtnih ishoda godišnje, pri čemu se većina beleži u zemljama sa niskim i srednjim prihodima, gde su resursi za kontrolu upotrebe duvana ograničeni (26). Procene pokazuju da širom sveta oko 1,1 milijarda ljudi starijih od 15 godina puši, što čini približno 21% ukupne

populacije. Uprkos decenijama istraživanja i jasnim dokazima o štetnosti pušenja, kao i sprovođenju brojnih programa kontrole, prevalencija konzumiranja duvana i dalje je visoka i uzrokuje značajan morbiditet i mortalitet. Zahvaljujući programima kontrole upotrebe duvana, stopa pušenja se u poslednjim decenijama smanjila sa 22,3% u 2007. na 16,4% u 2023. godini, ali teret bolesti povezanih s duvanom i dalje ostaje veliki. Globalno, učestalost pušenja beleži tendenciju smanjenja, ali je napredak neravnomerno raspoređen, jer se upotreba duvana i s njom povezani smrtni ishodi u sve većoj meri koncentrišu u zemljama u razvoju (27,28).

Dim cigareta je izuzetno složen aerosol koji sadrži više od 6000 hemijskih jedinjenja, od kojih su mnoga toksična za respiratorni sistem. Među najvažnijim štetnim sastojcima izdvajaju se nikotin, akrolein, fenoli, ugljen-monoksid, benzen, acetaldehid, formaldehid i 1,3-butadien, a svaki od njih doprinosi inflamaciji pluća i ćelijskom oštećenju koje pokreće patogenezu respiratornih bolesti (29–31).

Epidemiološki podaci jasno potvrđuju snažnu dozno-zavisnu povezanost između pušenja i rizika od karcinoma pluća. Pušači imaju približno 11 puta veću verovatnoću da razviju ovaj malignitet u poređenju sa nepušačima, pri čemu rizik raste proporcionalno kumulativnoj izloženosti cigaretama. Pasivna, odnosno sekundarna izloženost duvanskom dimu povećava rizik od karcinoma pluća za 41%. Osim toga, pušenje povećava rizik za razvoj hronične opstruktivne bolesti pluća (HOBP) četiri puta, dok rizik od astme raste 1,6 puta (32).

Hronična opstruktivna bolest pluća predstavlja značajan zdravstveni problem i procenjuje se da je vodeći uzrok smrtnosti povezan sa hroničnim respiratornim oboljenjima, učestvujući sa približno 5,7% u ukupnom broju svih smrtnih ishoda (33). Morbiditet i mortalitet ovog oboljenja su visoki i nastavljaju da rastu, pri čemu se predviđa da će HOBP do 2030. godine postati treći vodeći uzrok smrti u svetu (34).

Pored respiratornih efekata, pušenje cigareta predstavlja ključni faktor rizika za kardiovaskularne bolesti (KVB), koje čine značajan udeo u ukupnom mortalitetu povezanom sa upotrebom duvana. Prema podacima Svetske zdravstvene organizacije, duvan je odgovoran za približno 10% svih KVB na globalnom nivou, uključujući povećanu incidencu infarkta miokarda i fatalne koronarne bolesti (35). Smanjenje broja popušenih cigareta ne predstavlja delotvornu strategiju za smanjenje rizika od bolesti, jer istraživanja pokazuju da osobe koje puše samo jednu cigaretu dnevno imaju približno 50% rizika za razvoj koronarne bolesti srca i moždanog udara u odnosu na osobe koje puše 20 cigareta dnevno, a ne dvadeset puta manji rizik kako bi se intuitivno očekivalo. Ovi nalazi jasno ukazuju na to da ne postoji bezbedan nivo pušenja i da je potpuno prestajanje pušenja jedini efikasan način da se značajno smanji rizik od kardiovaskularnih oboljenja (36). Pasivno pušenje, iako uključuje oko 1% izloženosti duvanskom dimu u poređenju sa aktivnim pušenjem, povezano je sa 30% većim rizikom od koronarne bolesti, dok aktivni pušači imaju približno 80% veći rizik. Patofiziološki mehanizmi koji stoje u osnovi ovih efekata uključuju endotelnu disfunkciju, oksidativni stres i pro-trombotička stanja izazvana toksičnim sastojcima duvanskog dima (37–40).

Uprkos kontinuiranim naporima u oblasti kontrole duvana, teret bolesti na zdravstvene sisteme koji se može pripisati pušenju ostaje ogroman, a zavisnost od nikotina predstavlja ozbiljnu prepreku kako u prevenciji, tako i u procesu odvikavanja. Bolesti povezane sa pušenjem, uključujući maligne, respiratorne i kardiovaskularne poremećaje, uzrokuju prevremenu smrtnost i značajne ekonomske troškove na globalnom nivou. Efikasne javno-zdravstvene strategije, koje obuhvataju edukaciju, regulaciju i podršku programima za odvikavanje, od suštinske su važnosti za dalju redukciju upotrebe duvana, smanjenje opterećenja zdravstvenih sistema i unapređenje zdravstvenih ishoda u populaciji. Kontinuirano praćenje trendova u pušenju i njihovog uticaja na zdravlje, naročito u osetljivim populacijama, ostaje neophodno za oblikovanje javnih politika i optimalno raspoređivanje resursa (41).

Uzimajući u obzir dobro poznate štetne efekte konvencionalnog pušenja i izloženosti duvanskom dimu, pojavila se potreba za razvojem alternativnih načina unosa nikotina namenjenih osobama koje nisu u mogućnosti da u potpunosti prekinu sa konzumiranjem nikotina. Takvi proizvodi, poput elektronskih cigareta i sličnih uređaja, nastali su kao pokušaj da se smanji izloženost štetnim komponentama sagorevanja duvana, uz zadržavanje efekta nikotina koji izaziva zavisnost.

1.2.2. Aerozagađenje

Pored duvanskog dima, aerozagađenje predstavlja jedan od najznačajnijih sredinskih faktora rizika za nastanak i progresiju plućnih bolesti, sa globalnim zdravstvenim implikacijama uporedivim sa onima koje se pripisuju aktivnom i pasivnom pušenju (42–44).

Suspendovane čestice u vazduhu, naročito fine čestice aerodinamičkog prečnika manjeg od 2,5 µm (PM_{2.5}), potiču kako iz primarnih izvora, poput drumskog saobraćaja, industrijskih procesa i sagorevanja fosilnih goriva i biomase, tako i iz sekundarno formiranih aerosola, koji nastaju u atmosferi hemijskim i fotohemijskim reakcijama gasovitih prekursora, kao što su sumpor-dioksid, azotni oksidi i isparljiva organska jedinjenja, pri čemu se ovi gasovi transformišu u fine čestične komponente (45).

Na ćelijskom i tkivnom nivou, izloženost PM_{2.5} povezuje se sa indukcijom oksidativnog stresa, aktivacijom inflamatornih puteva, oštećenjem epitelne barijere i poremećajem ćelijske homeostaze (46–48). Ovi mehanizmi doprinose razvoju i pogoršanju hroničnih respiratornih oboljenja, uključujući astmu i HOBP, kao i povećanom riziku od karcinoma pluća (49,50). Dugotrajna izloženost PM_{2.5} povezana je sa smanjenjem i usporenim razvojem plućne funkcije, ubrzanim opadanjem respiratornog kapaciteta, kao i povećanom učestalošću egzacerbacija, pri čemu su posebno pogođene osetljive populacije, uključujući decu, starije osobe i pacijente sa postojećim respiratornim oboljenjima (51,52).

1.3. Elektronske cigarete

1.3.1. Istorijski razvoj i načini upotrebe

Elektronske cigarete (e-cigarete) predstavljaju inovativnu alternativu tradicionalnom pušenju, omogućavajući korisnicima da udišu aerosol nastao zagrevanjem tečnosti, koja obično sadrži nikotin.

Ideja o uređajima koji omogućavaju inhalaciju aromatizovanog aerosola bez sagorevanja duvana datira još iz 20. veka. Na primer, 1963. godine, Herbert A. Gilbert je patentirao "bezdimnu cigaretu bez duvana", koja je koristila zagrejani, aromatizovani vazduh umesto dima. Međutim, ovaj uređaj nikada nije komercijalizovan, delom zbog tadašnje popularnosti tradicionalnog pušenja i nedostatka svesti o efektima na zdravlje, kao i nedostatka tržišnog interesa. Autor Herbert je izjavio u intervjuu da je jedan od razloga za neuspeh njegovog izuma to što tečnost nije sadržala nikotin tako da pušačima nije mogla da nadomesti klasične cigarete (53,54).

Prva moderna e-cigareta razvijena je početkom 2000-ih godina, a ključnu ulogu u ovom izumu odigrao je kineski farmaceut Hon Lik. Motivisan težnjom da pronađe manje štetnu zamenu za klasično pušenje, Hon Lik je 2003. godine osmislio uređaj koji zagreva tečnost koja sadrži propilen glikol (PG), biljni glicerol (eng. *vegetable glycerin*, VG), nikotin i aromu, stvarajući aerosol koji se udiše umesto tradicionalnog dima. Prema američkoj patentnoj prijavi, ovaj uređaj je definisan kao

"elektronska atomizacijska cigareta" osmišljena kao alternativa tradicionalnom pušenju i kao pomoć u prestanku pušenja (patent br. 8,490,628 B2).

Od svog nastanka, e-cigarete su doživele brzu evoluciju. Prvobitni modeli bili su jednostavni i namenjeni isključivo kao zamena za klasične cigarete, ali su se s vremenom razvili u sofisticirane uređaje sa mogućnošću podešavanja temperature, različitim dizajnima i širokim spektrom ukusa (Slika 2). Danas su na tržištu prisutne različite varijante e-cigareta koje zadovoljavaju raznovrsne potrebe korisnika - od onih koji žele da prestanu sa pušenjem i traže manje štetnu alternativu u odnosu na tradicionalne cigarete, do onih koji e-cigarete koriste isključivo radi uživanja u različitim aromama, iako prethodno nisu bili pušači (55,56).



Slika 2. Razvoj i funkcionalne karakteristike različitih generacija e-cigareta.

Prikazana je progresija od jednostavnih jednokratnih uređaja ka kompleksnim sistemima sa mogućnošću prilagođavanja sastava tečnosti i radnih parametara.

Preuzeto i modifikovano sa: <https://www.mdpi.com/2075-1729/13/3/827> (57)

1.3.2. Struktura i funkcionalne komponente e-cigareta

E-cigarete predstavljaju složene uređaje namenjene isporuci nikotina i drugih supstanci putem aerosolizacije, bez procesa sagorevanja, čime se nude kao alternativa tradicionalnom pušenju duvana. Uređaj se sastoji od izvora napajanja (obično punjive baterije), atomizera ili grejača, i patrone ili rezervoara u kojem se nalazi tečnost. Atomizer sadrži kalem smešten u rezervoaru sa tečnošću, koji se zagreva kada korisnik aktivira uređaj, ručno ili automatskim udisajem kroz njega. Zagrejani kalem vaporizuje tečnost unutar patrone, pretvarajući je u aerosol koji korisnik udiše.

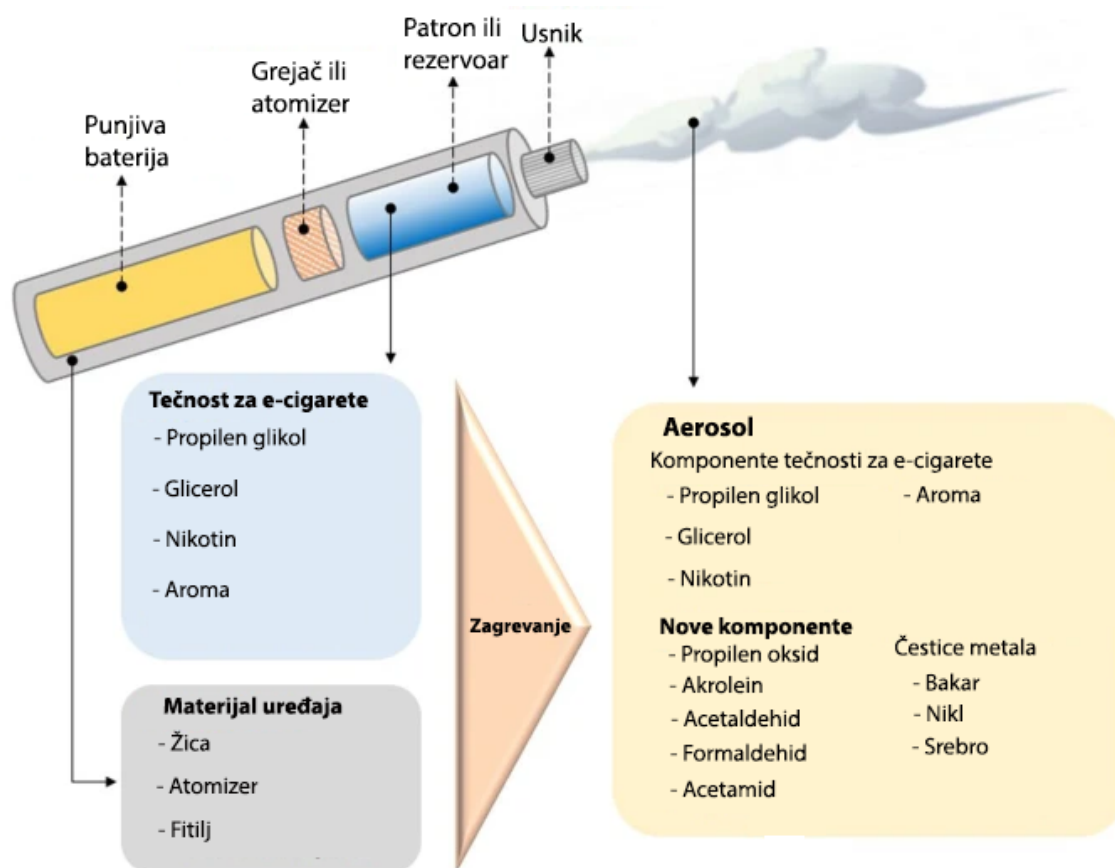
Većina uređaja za e-cigarete dizajnirana je da oponaša iskustvo pušenja tradicionalnih cigareta, sličnim načinom isporuke od usta do pluća.

Tokom poslednje decenije, dizajn e-cigareta se značajno razvijao, s pojavom sistema baziranih na patronama, jednokratnih uređaja sa promenljivim naponom koji omogućavaju veću kontrolu nad proizvodnjom aerosola (Slika 3) (58,59).

Baterija služi kao izvor energije za uređaj, a njen kapacitet može se razlikovati u zavisnosti od modela, pri čemu većina uređaja zahteva periodično punjenje. Savremene e-cigarete koriste litijum-jonske baterije, koje su poznate po visokoj gustini energije i dugom životnom veku. Veličina i kapacitet baterije direktno utiču na trajanje korišćenja uređaja između punjenja.

Atomizer, odnosno grejač, ključna je komponenta u procesu vaporizacije, jer pretvara električnu energiju iz baterije u toplotu koja zagreva tečnost do tačke isparavanja. Kalem unutar atomizera, najčešće izrađen od nerđajućeg čelika ili kanthala, omogućava taj proces prolaskom električne struje kroz sebe. Temperatura vaporizacije zavisi od tipa i proizvođača uređaja, a prema dostupnim podacima kreće se u opsegu od 139°C do 231°C (60). Napredni modeli omogućavaju kontrolu temperature, čime se sprečava pregrevanje i smanjuje stvaranje štetnih nusprodukata (58,61).

Jedan od ključnih faktora u performansama uređaja za e-cigarete je efikasnost sistema za isporuku tečnosti. Najčešći oblici su rezervoari i patrone. Rezervoari imaju veći kapacitet za tečnost i obično imaju dizajn koji omogućava dopunjavanje, što korisnicima omogućava da zamene tečnost po potrebi. S druge strane, sistemi sa patronama su manji i kompaktniji, sa unapred napunjenim patronama koje se mogu zameniti kada tečnost nestane. Oba sistema sadrže fitilje, pravljene od pamuka ili silikona, koji upijaju tečnost i dovode je do grejača kalema. Materijal fitilja je od esencijalne važnosti za obezbeđivanje efikasne apsorpcije tečnosti i vaporizacije. Pored toga, moderni uređaji često uključuju sisteme za kontrolu protoka vazduha koji korisnicima omogućavaju da podešavaju količinu vazduha koji ulazi u uređaj, što može uticati na proizvodnju aerosola i opšti osećaj udisanja. Inovacije u tehnologiji e-cigareta dovele su do razvoja različitih uređaja koji zadovoljavaju različite preferencije, uključujući one koji daju prioritet jednostavnosti korišćenja, prenosivosti ili prilagodljivosti (62).



Slika 3. Šematski prikaz strukture e-cigarete i formiranja aerosola tokom zagrevanja tečnosti.

Zagrevanje tečnosti u atomizeru dovodi do stvaranja aerosola koji, pored osnovnih komponenti, može sadržati i produkte termičke razgradnje i čestice metala iz uređaja. Preuzeto i modifikovano sa: <https://respiratory-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12931-021-01737-5> (62)

1.3.3. Komponente tečnosti za e-cigarete i njihov aerosol

Aerosoli e-cigareta dopremaju u pluća kompleksne hemijske mešavine koje uključuju nikotin, PG, VG, aromatične aditive, metale i proizvode termičke degradacije, pri čemu je njihov sastav snažno uslovljen karakteristikama uređaja, temperaturom grejača i formulacijom tečnosti za e-cigarete (63).

Toksikološke analize aerosola tečnosti za e-cigarete ukazale su na prisustvo različitih potencijalno štetnih hemijskih jedinjenja koja nastaju kako iz sastava tečnosti za e-cigarete, tako i kao posledica termičkih procesa tokom zagrevanja. Među najčešće identifikovanim jedinjenjima nalaze se aldehidi, uključujući acetaldehid, akrolein i formaldehid, kao i N-nitrozamini, koji su poznati po svom toksičnom i potencijalno kancerogenom dejstvu. Prisustvo ovih supstanci u aerosolima e-cigareta potvrđeno je u više nezavisnih studija, pri čemu se njihove koncentracije značajno razlikuju u zavisnosti od sastava tečnosti za e-cigarete, snage uređaja i uslova zagrevanja (59,64).

Pored organskih toksina, u aerosolima e-cigareta detektovani su i tragovi metala, uključujući kadmijum, nikl, olovo, mangan i hrom, za koje se pretpostavlja da potiču iz metalnih komponenti uređaja, grejača i kalemova, kao i iz samih tečnosti za e-cigarete. Ovi metali mogu biti prisutni u obliku rastvorenih jona ili kao čestice koje se tokom inhalacije deponuju u respiratornom traktu, gde mogu doprineti razvoju oksidativnog stresa, inflamatornih procesa i oštećenja tkiva (64–66).

Dodatno, u aerosolima e-cigareta identifikovane su i silikatne čestice, uključujući i nanočestice, koje mogu nastati usled degradacije staklenih i silikatnih komponenti uređaja ili kontaminacije tokom proizvodnje. Zbog svoje veličine, ove čestice imaju potencijal da prodru duboko u donje disajne puteve i alveolarni prostor, gde mogu izazvati mehaničko oštećenje ćelija, aktivaciju inflamatornih odgovora i dugotrajne biološke efekte (64–66).

Dodatnu složenost toksikološkog profila aerosola e-cigareta predstavlja prisustvo aromatičnih aditiva, koji su, iako često odobreni za oralnu upotrebu, nedovoljno ispitani u pogledu bezbednosti pri inhalacionoj izloženosti i mogu ispoljiti nezavisne citotoksične i prooksidativne efekte (64,67–69).

Aromatična jedinjenja, kao što su diacetil, etil-maltol, vanilin i cimet-aldehid pokazala su sposobnost da indukuju oksidativni stres, inflamatorne procese, endotelnu disfunkciju i oštećenje DNK, čak i u odsustvu nikotina (68,70–72). Dodatno, vitamin E acetat, identifikovan je u određenim tečnostima za e-cigarete koje uglavnom sadrže tetrahidrokanabinol (THC) i snažno povezan sa pojavom EVALI (eng. *E-cigarette or vaping product use-associated lung injury*), teškom oboljenju koji vodi ka razvoju akutnog oštećenja pluća (73). Ovi nalazi ukazuju da pojedine komponente aerosola e-cigareta, naročito u uslovima zagrevanja, mogu generisati visoko reaktivne produkte sa izraženim potencijalom za akutno i hronično oštećenje plućnog tkiva.

Dodatnu složenost procene toksičnosti aromatičnih aditiva predstavlja njihova velika raznovrsnost i način primene u tečnostima za e-cigarete. Studija iz 2014. godine je ukazala na postojanje više od 7000 dostupnih jedinstvenih aroma za e-cigarete na tržištu (74). Dodatni problem predstavlja činjenica da se prehrambene arome, koje se u namirnicama koriste u veoma niskim koncentracijama, u tečnostima za e-cigarete mogu naći u koncentracijama i do 10 000 puta većim od onih korišćenih u hrani, pri čemu inhalacioni put administracije ovih supstanci, naročito u takvim koncentracijama, nije odobren od strane nijednog relevantnog regulatornog tela (67). Pored toga, analiza efekata aroma treba da obuhvati ne samo inherentnu toksičnost pojedinačnih hemijskih supstanci i njihovih mešavina, već i način na koji aromatične komponente modifikuju ili unapređuju korisničko iskustvo, uključujući ublažavanje iritirajućeg osećaja pri inhalaciji nikotinskih aerosola, s obzirom na to da ovi faktori mogu doprineti razvoju i održavanju nikotinske zavisnosti (75). Imajući u vidu navedene nalaze, neophodno je hitno uspostaviti jasne i strože kriterijume za odobravanje upotrebe pojedinih jedinjenja kao aroma u tečnostima za e-cigarete, uključujući regulaciju dozvoljenih koncentracija korišćenih supstanci, kao i formiranje sistematizovane baze dozvoljenih i zabranjenih jedinjenja zasnovane na njihovoj bezbednosti pri inhalacionoj izloženosti.

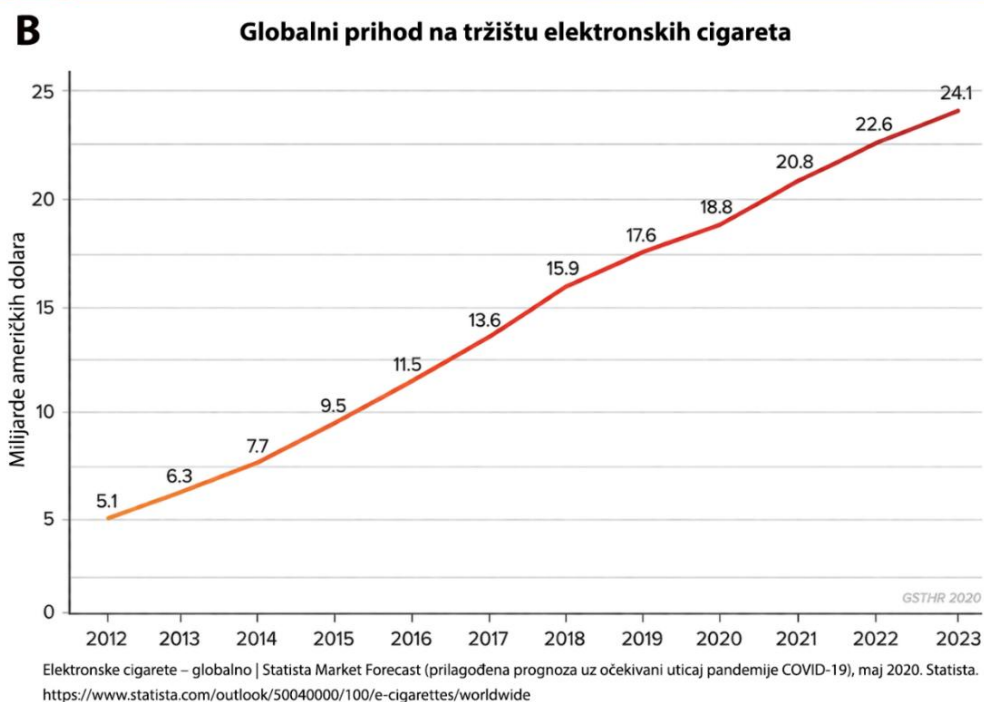
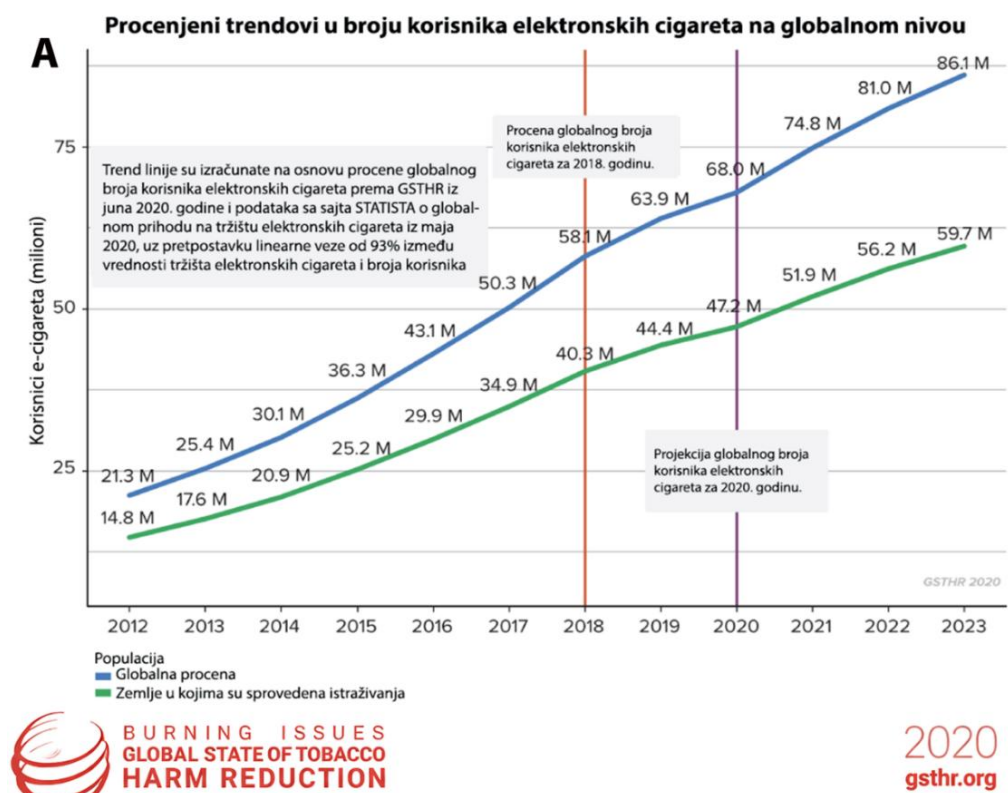
1.3.4. Globalna ekspanzija tržišta e-cigareta i ekonomski značaj

Tržište e-cigareta beleži snažnu i kontinuiranu globalnu ekspanziju, što ukazuje na njihovu brzu komercijalizaciju i rastući ekonomski značaj u okviru savremene nikotinske industrije. Prema savremenim tržišnim analizama, globalna vrednost tržišta e-cigareta procenjena je na približno 29,6 milijardi američkih dolara u 2025. godini, uz projekcije da će dostići oko 52,1 milijardu američkih dolara do 2032. godine, sa prosečnom godišnjom stopom rasta od 8,4% (76). Ovakva dinamika rasta potvrđuje pozicioniranje e-cigareta kao jednog od najbrže rastućih segmenata tržišta duvanskih i nikotinskih proizvoda.

Priloženi grafikoni (Slika 4), preuzeti sa platforme *Global State of Tobacco Harm Reduction* (GSTHR), dodatno ilustruju ovaj trend. Analiza globalnog prihoda od e-cigareta ukazuje na gotovo kontinuiran porast tržišne vrednosti u periodu od 2012. do 2023. godine, sa rastom prihoda sa približno 5 milijardi na više od 24 milijarde američkih dolara (77,78). Uporedo sa tim, procene globalnog broja korisnika e-cigareta ukazuju na stabilan porast broja korisnika e-cigareta tokom iste

decenije, sa oko 20 miliona korisnika početkom 2010-ih godina na više od 80 miliona u najnovijim procenama (78). Ova paralelna ekspanzija tržišne vrednosti i broja korisnika jasno oslikava snažnu povezanost ekonomskih interesa, tehnoloških inovacija u dizajnu uređaja i unapređenja isporuke nikotina, kao i promene u percepciji e-cigareta kao potencijalno manje štetne alternative konvencionalnim cigaretama.

Međutim, ovako ubrzan tržišni rast istovremeno naglašava i sve izraženiju tenziju između snažnih ekonomskih podsticaja i rastuće zabrinutosti u vezi sa zdravstvenim rizicima, naročito u kontekstu izloženosti respiratornog sistema aerosolima e-cigareta. Upravo ova diskrepanca između ekonomske ekspanzije tržišta i ograničenog razumevanja dugoročnih bioloških i molekularnih efekata inhalacije aerosola e-cigareta predstavlja jedan od ključnih polaznih okvira ove doktorske disertacije.



Slika 4. Procena globalnog broja korisnika i rast tržišne vrednosti e-cigareta u periodu 2012-2023. godine.

(A) Procena trendova u globalnom broju korisnika e-cigareta.

(B) Rast globalnih prihoda na tržištu e-cigareta (izražen u milijardama američkih dolara).

Preuzeto i modifikovano sa: <https://gsth.org/resources/vaping/> (78)

1.3.5. Srbija kao studija slučaja: prevalencija upotrebe među mladima

U skladu sa globalnim trendovima rasta tržišta i broja korisnika e-cigareta, dostupni epidemiološki podaci ukazuju na to da se slični obrasci mogu uočiti i u Republici Srbiji, naročito u adolescentskoj populaciji. Podaci dobijeni u okviru Evropskog školskog istraživanja o upotrebi alkohola i drugih droga (ESPAD) iz 2019. godine, sprovedenog na reprezentativnom uzorku učenika prvih razreda srednjih škola u Republici Srbiji, ukazuju na značajnu rasprostranjenost upotrebe e-cigareta među adolescentima. Prema ovom istraživanju, čak 17,7% ispitanika navelo je da je barem jednom u životu koristilo e-cigarete, dok je 5,5% učenika izvestilo o upotrebi ovih proizvoda u poslednjih 30 dana, što ukazuje na postojanje stabilne grupe trenutnih korisnika. Posebno zabrinjava podatak da je deo učenika započeo eksperimentisanje sa e-cigaretama u veoma ranom uzrastu, pre navršene 13. godine života. Istovremeno, zabeležena je niska percepcija zdravstvenog rizika povezanog sa upotrebom e-cigareta, što dodatno može doprineti njihovoj popularizaciji među mladima. Ovi nalazi ukazuju na jasan trend porasta eksperimentisanja i upotrebe e-cigareta u adolescentskoj populaciji u Srbiji, koji se odvija uporedo sa ekspanzijom tržišta ovih proizvoda i agresivnim marketinškim strategijama, te naglašavaju potrebu za sistematskim praćenjem prevalencije, ekonomskog značaja tržišta e-cigareta i potencijalnih dugoročnih zdravstvenih posledica njihove upotrebe (Institut za javno zdravlje Srbije „Dr Milan Jovanović Batut“, ESPAD, 2019) (79).

Ovi trendovi - istovremeni rast broja korisnika, ekonomske vrednosti tržišta i rane inicijacije među adolescentima, dodatno naglašavaju potrebu za mehanističkim studijama koje će precizno definisati biološke efekte izloženosti aerosolima e-cigareta, posebno u respiratornom sistemu.

1.4. Zdravstveni rizici i toksikološki aspekti upotrebe e-cigareta

Tečnosti za e-cigarete uvedene su u široku upotrebu pre nego što je njihova bezbednost pri inhalacionoj izloženosti bila sistematski i sveobuhvatno procenjena.

Upotreba e-cigareta povezana je sa povećanim rizikom za razvoj respiratornih oboljenja, pri čemu se procenjuje da povećava verovatnoću pojave HOBP za 49%, astme za 39% (80), alergijskog rinitisa za 43% i hroničnog rinosinuzitisa za 41% (81), dok je rizik za pojavu respiratornih simptoma povećan za 32% (82) kod osoba koje koriste e-cigarete u odnosu na one koje ih ne koriste.

Iako eksperimentalne studije i istraživanja zasnovana na biomarkerima ukazuju na to da izloženost aerosolima e-cigareta može aktivirati genotoksične i prokarcinogene mehanizme na ćelijskom nivou, stvarni rizik od razvoja malignih oboljenja povezanih sa upotrebom e-cigareta kod ljudi trenutno se ne može pouzdano proceniti, budući da ovi proizvodi nisu u širokoj upotrebi dovoljno dugo, a razvoj karcinoma karakteriše duga latentna faza koja često traje više decenija (83,84). Shodno tome, donošenje čvrstih zaključaka zasnovanih na dugoročnim epidemiološkim podacima zahtevaće višedecenijsko praćenje populacija, koje će se verovatno protezati do sredine 21. veka (84,85).

Jedna studija je pokazala da osobe koje istovremeno koriste klasične cigarete i e-cigarete imaju značajno povećan rizik od razvoja raka pluća, pri čemu je dualna upotreba (kombinovanje klasičnih i e-cigareta) bila povezana sa približno četverostruko većim rizikom u poređenju sa osobama koje su isključivo pušile cigarete (86). Ovaj nalaz zahteva posebnu pažnju, jer ukazuje na to da prelazak na dualnu upotrebu ne mora predstavljati zdravstveno povoljniju strategiju u odnosu na isključivo pušenje duvana. Naprotiv, intuitivna pretpostavka da će smanjenje broja klasičnih cigareta uz uvođenje e-cigarete automatski dovesti do redukcije rizika može biti pogrešna. Kod korisnika koji ne prekidaju pušenje u potpunosti, već e-cigarete koriste uporedo, ovakav obrazac ponašanja može rezultovati dodatnim povećanjem verovatnoće za razvoj karcinoma pluća, što dodatno naglašava značaj adekvatne javnozdravstvene edukacije i preciznog komuniciranja rizika.

EVALI predstavlja teško akutno respiratorno oboljenje povezano sa upotrebom e-cigareta i srodnih proizvoda. Ovo stanje je u najvećoj meri dovedeno u vezu sa vitamin E acetatom, koji se u pojedinim tečnostima za e-cigarete koristi kao razređivač, a koji se pri zagrevanju može razložiti na visoko reaktivni ketenski gas sa izraženim toksičnim potencijalom (64,73). Ovi nalazi dodatno ukazuju na to da određene komponente prisutne u proizvodima za e-cigarete mogu predstavljati značajan rizik po respiratorno zdravlje.

Upotreba e-cigareta tokom trudnoće postaje sve češća, delom zbog percepcije da predstavljaju manje štetnu alternativu u odnosu na konvencionalne cigarete, što je dodatno podstaknuto intenzivnim promotivnim kampanjama (87,88). Ovaj fenomen je posebno relevantan jer su trudnice populacija sa izraženom motivacijom da promene navike pušenja usled svesti o štetnim efektima na razvoj fetusa, zbog čega često posežu za e-cigaretama kao „bezbednijom“ opcijom. Međutim, e-cigarete mogu obezbediti količine nikotina uporedive ili čak veće od duvanskog dima (89,90), a nikotin lako prolazi kroz placentu i negativno utiče na razviće ploda, uključujući poremećaje rasta i dugoročne neurobihejvioralne posledice (91,92). Pored nikotina, aerosoli e-cigareta sadrže i druge štetne supstance, poput formaldehida, teških metala i isparljivih organskih jedinjenja (88,89), što ukazuje da i formulacije bez nikotina mogu predstavljati rizik za intrauterini razvoj. Iako trudnice često koriste e-cigarete sa ciljem prestanka pušenja, ovakva praksa neretko dovodi do istovremene upotrebe više proizvoda, dualnog korišćenja, čime se produžava izloženost nikotinu (93) što ukazuje na potrebu za jasnijim javnozdravstvenim smernicama i edukacijom o potencijalnim rizicima tokom trudnoće (94).

Nedavno je objavljen sistemski pregled literature koji je analizirao studije o uticaju izloženosti nepušača sekundarnom aerosolu e-cigareta. Rezultati pokazuju da nepušači izloženi ovom dimu imaju merljive nivoe nikotina i njegovog metabolita kotinina, što može biti povezano sa različitim nepovoljnim efektima, uključujući respiratorne probleme, kao i potencijalne posledice po kardiovaskularno i mentalno zdravlje (95,96). Dokazi su još uvek ograničeni, ali autori zaključuju da takva izloženost premda manje štetna od izloženosti duvanskom dimu, nije bezopasna (95), posebno za osetljive grupe poput dece sa astmom, kod kojih je jedna studija pokazala tendenciju ka većem broju problema sa astmom. Iako razlike u toj maloj studiji nisu bile statistički značajne, ovo je aspekt koji zahteva pažnju u budućim istraživanjima (97). E-cigarete emituju znatno manje čestica u poređenju sa klasičnim cigaretama, ali je najveća izloženost po kilogramu telesne mase zabeležena kod dece, što dodatno ukazuje na potrebu za strožom regulacijom njihove upotrebe u zatvorenim prostorima, naročito u prisustvu dece (98).

1.5. Molekularni mehanizmi toksičnosti e-cigareta

Rastuća globalna prevalenca upotrebe e-cigareta nameće potrebu za detaljnim sagledavanjem njihovih molekularnih i ćelijskih toksičnih efekata. Iako se e-cigarete često promovišu kao bezbednija alternativa konvencionalnim cigaretama, sve veći broj dokaza ukazuje na to da ovi proizvodi nisu biološki inertni i da mogu izazvati širok spektar štetnih efekata, naročito u respiratornom sistemu (31,99,100).

Kombinacija hemijske raznovrsnosti aerosola i načina izloženosti putem inhalacije dovodi do njihovog direktnog kontakta sa epitelom disajnih puteva i alveolarnim mikrookruženjem, čime se mogu pokrenuti citotoksični, inflamatorni i metabolički poremećaji.

Na ćelijskom nivou, izloženost aerosolima e-cigareta povezuje se sa širokim spektrom toksičnih efekata koji narušavaju osnovne procese ćelijske homeostaze i vitalnosti. Brojne studije ukazuju na to da ovakva izloženost može dovesti do izraženih citotoksičnih odgovora, uključujući aktivaciju

programirane ćelijske smrti i gubitak integriteta ćelijske membrane, kao i do kaspazama posredovanih signalnih odgovora povezanih sa inflamacijom (101–105).

Pored direktnih citotoksičnih efekata, aerosoli e-cigareta kompromituju i ključne odbrambene mehanizme respiratornog sistema, inhibicijom fagocitne i eferocitne sposobnosti, kao i smanjenjem efikasnosti eliminacije patogena, čime se povećava podložnost respiratornim infekcijama i razvoj zapaljenja pluća (106,107). Ovi poremećaji praćeni su pojačanom produkcijom citokina i hemokina, što ukazuje na uspostavljanje inflamatornog mikrookruženja u plućima (104,105,108).

Takođe je pokazano da aerosoli e-cigareta koji sadrže nikotin dovode do povećanja permeabilnosti plućnog endotela i aktivacije inflamatornih signalnih puteva, čime se dodatno narušava funkcionalni integritet plućnog tkiva (109,110). Ovi procesi često su praćeni povećanom aktivnošću proteolitičkih enzima, uključujući neutrofilnu elastazu i matriksne metaloproteinaze, što doprinosi pojačanoj proteolizi i remodelovanju plućnog tkiva (106).

Centralni mehanizmi koji stoje u osnovi ovih efekata najčešće uključuju indukciju oksidativnog stresa, aktivaciju inflamatornih signalnih puteva i oštećenje DNK (101,103,104). Izlaganje aerosolima e-cigareta dovodi do pojačanog stvaranja reaktivnih kiseoničnih vrsta, što rezultuje lipidnom peroksidacijom, naročito u ćelijama disajnih puteva (111,112). Ovakav oksidativni stres dodatno doprinosi mitohondrijskoj disfunkciji i smanjenoj proizvodnji ATP-a (111).

1.5.1. Genotoksičnost i mutagenost

Tečnosti za e-cigarete u pojedinim eksperimentalnim modelima ispoljavaju genotoksične efekte, uključujući oštećenje DNK i smanjenu sposobnost reparacije, što je pokazano u studijama na ćelijskim linijama i u *in vivo* modelima (113,114). Ovi efekti se najčešće dovode u vezu sa oksidativnim stresom, prvenstveno posredovanim reaktivnim kiseoničnim vrstama (eng. *Reactive Oxygen Species*, ROS) (114,115). Međutim, rezultati nisu ujednačeni, jer su u nekim standardizovanim testovima mutagenosti i genotoksičnosti aerosoli e-cigareta pokazali slabe ili odsutne efekte, naročito u poređenju sa konvencionalnim cigaretama (116,117), dok su u drugim eksperimentalnim pristupima pojedine tečnosti za e-cigarete ispoljile genotoksične i mutagene efekte, uz izraženu varijabilnost između uzoraka (118). Takođe, treba imati u vidu da su u pojedinim studijama, koje su pokazale izraženija oštećenja DNK, korišćeni režimi izlaganja i koncentracije aerosola koje prevazilaze realne uslove izloženosti kod korisnika e-cigareta, što otežava direktno prenošenje ovih nalaza na *in vivo* situaciju (119). Zbog toga se može zaključiti da, iako e-cigarete mogu izazvati oštećenje DNK u određenim eksperimentalnim uslovima, biološki značaj ovih efekata u realnim uslovima upotrebe ostaje nedovoljno razjašnjen.

1.5.2. Inflamacija

Uprkos percepciji e-cigareta kao manje štetne alternative konvencionalnom pušenju, brojni eksperimentalni i klinički podaci ukazuju na njihov potencijal da modulišu inflamatorne procese u respiratornom sistemu (120).

U *in vitro* modelima, izlaganje humanih bronhijalnih epitelih ćelija aerosolu e-cigareta povezano je sa povećanom ekspresijom proinflamatornih citokina (IL-6, IL-8, TNF- α) (121–123) i mucina (124,125), često posredovanom aktivacijom signalnih puteva kao što su NF- κ B i p38 MAPK (126,127). Važno je naglasiti da inflamatorni odgovor nije isključivo zavisao od prisustva nikotina, budući da su efekti zabeleženi i kod formulacija bez nikotina (124), što ukazuje na značajnu ulogu

nosača (PG/VG) u pokretanju inflamatornih procesa, potencijalno kroz hiperosmotski i oksidativni stres (128,129). Takođe, intenzitet inflamatornog odgovora zavisi i od arome tečnosti za e-cigarete, tako tečnosti za e-cigarete sa aromom cimeta izaziva veću citotoksičnost (72,130) i jaču produkciju IL-8 u odnosu na tečnosti za e-cigarete sa aromom duvana (125).

Rezultati *in vivo* studija dodatno ukazuju na mogućnost brzog inflamatornog odgovora nakon akutnog izlaganja, uključujući infiltraciju neutrofila (131), povećane koncentracije citokina u bronhoalveolarnoj lavaži i markere oksidativnog stresa (132). Ovaj odgovor je u velikoj meri posredovan aktivacijom rezidentnih makrofaga u epitelu gornjih disajnih puteva. Aktivirani makrofagi posreduju u fagocitozi i oslobađaju proinflamatorne citokine poput IL-6, IL-10 i IL-1 β , čime doprinose regulaciji imunskog odgovora i diferencijaciji limfocita. Među njima, IL-6 ima važnu ulogu u aktivaciji JAK-STAT signalnog puta i fosforilaciji STAT3, što može uticati na regrutaciju i migraciju neutrofila u plućno tkivo. Aktivirani neutrofili dodatno doprinose inflamatornom odgovoru oslobađanjem TNF- α , IL-10, i IL-1 β , koji aktiviraju p38 i NF- κ B signalni put (131) i proteolitičkih enzima, kao što su neutrofilna elastaza i matriks metaloproteinaze (133).

Podaci iz humanih studija ukazuju na akutne promene inflamatornih markera, poput povećanja C-reaktivnog proteina (CRP) i rastvorljivog međućelijskog adhezionog molekula (eng. *soluble intercellular adhesion molecule*, sICAM) (134), i pojavom makrofaga sa akumuliranim lipidima (eng. *lipid-laden macrophages*, LLM) (135). Sistematičan pregled literature ukazuje na to da su inflamatorni efekti e-cigareta uopšteno govoreći slabiji u odnosu na konvencionalne cigarete, ali i dalje potencijalno značajni za dugoročno zdravlje respiratornog sistema, posebno u kontekstu intenzivne upotrebe i prisustva veoma raznovrsnih jedinjenja u aromama (136).

1.5.3. Oksidativni stres

Jedan od ključnih mehanizama toksičnosti e-cigareta jeste generisanje oksidativnog stresa i produkcija ROS u plućima korisnika. Smatra se da oksidativni stres predstavlja jedan od centralnih pokretača drugih štetnih efekata, uključujući oštećenje DNK i inflamaciju. Koncentracija ROS u aerosolu značajno je uslovljena karakteristikama uređaja i uslovima korišćenja, uključujući brend e-cigarete, aromu tečnosti za e-cigarete, režim korišćenja i radni napon uređaja (137). Takođe, količina ROS u aerosolu zavisi od tipa, odnosno arome tečnosti za e-cigarete, pri čemu je zabeleženo da slatke i voćne arome generišu veće količine ROS u poređenju sa duvanskim aromama (137,138).

Oksidativni stres se može ostvariti dvostrukim mehanizmom. Prvi podrazumeva direktan unos egzogenih reaktivnih kiseoničnih vrsta prisutnih u aerosolu. Drugi uključuje povećanu endogenu produkciju reaktivnih kiseoničnih vrsta kao posledicu poremećaja redoks ravnoteže i mitohondrijske funkcije u ćelijama (139).

U *in vitro* modelima, povećan nivo ROS detektovan je kako u samom aerosolu tečnosti za e-cigarete, tako i u plućnim epitelnim ćelijama i THP-1 ćelijama nakon tretmana tečnostima za e-cigarete (131,137). U humanim plućnim fibroblastima, izlaganje aerosolu tečnosti za e-cigarete dovodi do povećanja mitohondrijskih reaktivnih kiseoničnih vrsta. Ova promena je praćena pojačanom produkcijom proinflamatornih citokina IL-6 i IL-8, kao i fragmentacijom DNK (139). Oksidativni stres usled izloženosti tečnostima za e-cigarete je detektovan i u primarnim humanim bronhijalnim epitelnim ćelijama, gde je izmeren povišen unutarćelijski vodonik-peroksid (H₂O₂), pri čemu su u poređenju sa klasičnim cigaretama promene u ćelijskoj vijabilnosti i oksidativnom stresu, iako značajne, bile oko 5 puta manje u odnosu na klasične cigarete (140).

U *in vivo* modelima, miševi izloženi aerosolu e-cigareta pokazuju smanjenje nivoa glutaciona u plućima, koji predstavlja ključni antioksidativni faktor u održavanju redoks ravnoteže (125).

U studijama na ljudima, pokazano je da e-cigarete izazivaju povišenje markera oksidativnog stresa u krvi ispitanika, peptida poreklom od NOX2 i 8-izo-prostaglandin F2 α . Ovi efekti su manje izraženi nego kod konvencionalnih cigareta, ali su i dalje značajni (141). Takođe, zabeležen je povećan nivo ćelijskog oksidativnog stresa u imunskim ćelijama periferne krvi korisnika e-cigareta u poređenju sa nekorisnicima, pri čemu je ovaj efekat takođe bio manje izražen nego kod pušača (142).

Iako su dosadašnja istraživanja detaljno opisala ulogu oksidativnog stresa i inflamatornih puteva u odgovoru na izlaganje e-cigaretama, ovakvi pristupi najčešće se zasnivaju na analizi pojedinačnih mehanizama, što može ograničiti uvid u kompleksnost i međusobnu povezanost promena koje nastaju na nivou ćelije. Sagledavanje ovakvog odgovora zahteva pristupe koji omogućavaju istovremeno praćenje velikog broja molekularnih događaja, bez unapred definisanih pretpostavki. U tom kontekstu, omički pristupi, poput transkriptomike i proteomike, omogućavaju istovremeno sagledavanje velikog broja molekularnih promena bez unapred definisanih pretpostavki, čime pružaju uvid u kompleksne i međusobno povezane procese koji čine ćelijski odgovor na spoljašnje uticaje. Prednost ovih metoda ogleda se u mogućnosti identifikacije koordinisanih promena na nivou bioloških procesa, molekularnih funkcija i ćelijskih komponenti, kao i u detekciji suptilnih, ali konzistentnih promena koje pojedinačni pristupi često ne prepoznaju.

2. Ciljevi

Osnovni cilj ove doktorske disertacije je karakterizacija biološkog odgovora ćelija poreklom od pluća na komponente tečnosti za e-cigarete nakon akutnog izlaganja tečnostima za e-cigarete, kao i kondenzatima aerosola tečnosti za e-cigarete (kTEC) kroz paralelnu analizu transkriptoma i proteoma. Kako bi se procenio uticaj različitih kombinacija komponenti koje ulaze u sastav tečnosti za e-cigarete na biološki odgovor ćelija, ispitan je i uporedni efekat kompletnih tečnosti za e-cigarete (koje sadrže propilen glikol, biljni glicerol, aromu i nikotin - TEC) sa tečnostima koje sadrže samo propilen glikol i biljni glicerol i tečnostima koje sadrže propilen glikol, glicerol i aromu.

2.1. Specifični ciljevi

1. Ispitivanje citotoksičnosti komponenti tečnosti za e-cigarete i određivanje maksimalne necitotoksične koncentracije za dalji rad
2. Ispitivanje uticaja komponenti tečnosti za e-cigarete na promenu RNK ekspresije metodom RNK-sekvenciranja
3. Ispitivanje promena na nivou proteoma pod dejstvom TEC i kTEC
4. Ispitivanje genotoksičnosti i mutagenosti komponenti tečnosti za e-cigarete u necitotoksičnim koncentracijama
5. Ispitivanje uticaja komponenti tečnosti za e-cigarete na međućelijsku komunikaciju praćenjem metaboličke kooperacije i ekspresije specifičnih proteina

3. Materijal i metode

3.1. Čelijske linije i kulture

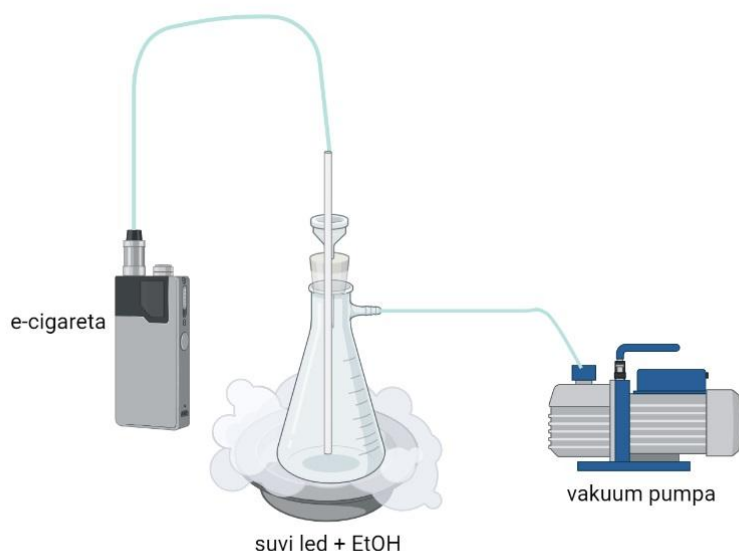
Za ispitivanje uticaja tečnosti i kondenzata aerosola tečnosti za e-cigarete korišćene su dve čelijske linije: humane bronhijalne epitelne ćelije BEAS-2B (ATCC® CRL-3588™) i plućni fibroblasti kineskog hrčka V79 (ATCC® CCL-93™). Čelijska linija BEAS-2B je izolovana iz normalnog bronhijalnog epitela. Ćelije V79, izolovane iz normalnog plućnog tkiva odraslog mužjaka kineskog hrčka, često su korišćen model u toksikološkim istraživanjima. Ćelije su gajene u Dulbecco modifikovanom Eagle medijumu (DMEM, Sigma, Nemačka) sa visokom koncentracijom glukoze (4,5 g/L), L-glutaminom i piruvatima, suplementisanom sa 10% (v/v) fetalnog goveđeg seruma (FBS, Gibco, SAD). Ovaj medijum je u daljem tekstu označen kao kompletni medijum.

Ćelije su gajene u inkubatoru sa 5% CO₂, u vlažnoj atmosferi na 37°C. Ćelije su propagirane nakon što je kultura dostigla približno 80% konfluencije. Odlepljivanje ćelija sa površine suda izvedeno je primenom tripsin-EDTA rastvora u krajnjoj koncentraciji od 0,05% tripsina i 0,02% EDTA (etilendiaminotetraacetat) (Sigma, Nemačka). Broj ćelija određivan je pomoću hemocitometra. Za dugoročno čuvanje, ćelije su krioprezervirane u medijumu koji sadrži 10% dimetil-sulfoksida (DMSO) u FBS u parama tečnog azota.

3.2. Priprema kondenzata i tretmani tečnostima za e-cigarete

Komercijalno dostupne tečnosti za e-cigarete *Flavour Art* sa aromom „*Virginia Tobacco*“ nabavljene su u lokalnim Umbrella prodavnicama u Srbiji, izabrane su po svojoj širokoj upotrebi na tržištu u Srbiji u trenutku početka studije. Korišćene su sledeće formulacije tečnosti za e-cigarete: nosač tečnosti za e-cigarete koji se sastoji od PG i VG u odnosu 50/50 (u daljem tekstu PGVG); PGVG i aroma, sa 18 mg/mL nikotinom (u daljem tekstu TEC) ili bez nikotina (u daljem tekstu PGVG + A). Rastvor nikotina (Sigma, Nemačka) korišćen je kao referentni tretman u koncentracijama ekvivalentnim nikotinu prisutnom u TEC. Za tretman ćelija BEAS-2B korišćeni su kondenzati aerosola generisani iz PGVG tečnosti (kPGVG) i iz TEC (kTEC).

Kondenzati TEC pripremani su korišćenjem aparature koja je sastavljena u laboratoriji, a opremljena je vakuum pumpom (Slika 5). Aparatura je bazirana na protokolu iz istraživanja McAlinden i kolega (143). Sistem za kondenzaciju uključivao je cev dužine 30 cm, kroz koju je aerosol putovao do ohlađenog staklenog suda u kome je dolazilo do kondenzacije aerosola. Kondenzacija je olakšana održavanjem suda na niskoj temperaturi pomoću mešavine suvog leda i 96% etanola.



Slika 5. Šematski prikaz sistema za generisanje i prikupljanje kondenzata aerosola e-cigarete.

Aerosol generisan iz e-cigarete usmerava se kroz sistem uz pomoć vakuumpumpe i prolazi kroz rashladni medijum (suvi led i etanol), gde dolazi do kondenzacije i sakupljanja aerosolnog kondenzata. Ilustracija je generisana korišćenjem platforme *BioRender* (dostupno na: <https://www.biorender.com/>)

Za generisanje kondenzata korišćen je uređaj Zelos 3 Mod (Aspire, Kina) (3200 mAh) e-cigarete, snage 13,5 W, pri čemu je svaki eksperimentalni ciklus uključivao potpuno napunjenu bateriju (100%). Pri svakom ciklusu korišćen je i novi grejač KAL Z Coil (Innokin, Kina) (1,6 Ω) sastavljen od Kanthala (legure gvožđa, hroma i aluminijuma) sa preporučenim rasponom snage 10-14 W, što je simuliralo uslove prvog korišćenja. U uređaj je dodato približno 3 mL TEC ili PGVG, a simulacije udisanja (eng. „*puffing*“) sprovedene su trajanjem od ~4 sekunde, sa pauzom od 17 sekundi između 2 udaha kako bi se izbeglo pregrevanje uređaja. Aparatura je radila u vakuumu ukupno 40 minuta po tretmanu, uključujući 5 minuta faze pre početka aerosolizacije i 35 minuta aktivne aerosolizacije e-cigaretom.

Tokom procesa, približno 3 mL tečnosti je aerosolizovano, pri čemu je dobijeno oko 500 μ L kondenzata. Dobijeni kondenzat predstavljao je mešavinu aerosola tečnosti za e-cigarete i kondenzovane atmosferske vlage. Za svaku ispitivanu tečnost korišćen je novi atomizer sa novim kalemom, čime je u potpunosti izbegnuta unakrsna kontaminacija između eksperimentalnih uslova.

3.3. Određivanje necitotoksične doze tretmana ispitivanjem vijabilnosti ćelija korišćenjem MTT eseja

MTT test predstavlja standardnu kolorimetrijsku metodu za procenu vijabilnosti ćelija u *in vitro* uslovima, zasnovanu na metaboličkoj aktivnosti živih ćelija. Metoda se široko koristi u ispitivanjima citotoksičnosti i proliferacije, zahvaljujući svojoj jednostavnosti, reproducibilnosti i osetljivosti (144).

Princip MTT testa zasniva se na redukciji 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolijum bromida (MTT) u nerastvorljive ljubičaste kristale formazana u metabolički aktivnim ćelijama, pre svega putem mitohondrijskih dehidrogenaza. Količina nastalog formazana proporcionalna je ukupnoj metaboličkoj aktivnosti ćelija, što omogućava indirektnu procenu njihove vijabilnosti.

Nakon inkubacije sa MTT reagensom, kristali formazana se rastvaraju u dimetil sulfoksidu (DMSO), a apsorbancu se meri spektrofotometrijski. Dobijene vrednosti se normalizuju u odnosu na kontrolne uzorke i koriste za izražavanje relativne vijabilnosti ćelija. Iako MTT test ne meri direktno ćelijsku smrt, već metaboličku aktivnost, predstavlja pouzdan i široko prihvaćen metod za inicijalnu procenu efekata različitih tretmana na ćelijsku vijabilnost.

Ćelije su zasejane na mikrotitar ploče sa 96 bunarića (5×10^3 ćelija po bunariću) u 100 μ L kompletnog medijuma. Tretmani su primenjeni 24 h nakon sejanja, a izlaganje je trajalo 24 h za BEAS-2B i 72 h za V79 ćelije. Zbog povećane viskoznosti samih tretmana, oni su prethodno razblaženi u kompletnom medijumu do zapremine od 10 μ L, kako bi se obezbedila ravnomerna distribucija u bunarićima. Ukupna zapremina medijuma u bunarićima pre dodavanja MTT reagensa iznosila je 100 μ L. Nakon 24 h tretmana za BEAS-2B i 72 h za V79 u bunariće je dodato 10 μ L MTT reagensa (Thiazolyl Blue Tetrazolium, Sigma, Nemačka) u koncentraciji od 5 mg/mL i inkubacija sprovedena 2-3 h na 37°C sa 5% CO₂. Nakon 2 h za BEAS-2B i 3h za V79, kompletni medijum sa tretmanima i MTT reagensom je uklonjen i formazanski kristali su rastvoreni u DMSO inkubacijom i laganim mešanjem 15 min, a apsorbancija je merena na 570 nm na spektrofotometru *Infinite 200 PRO multiplate reader* (TECAN, Švajcarska). Rezultati su normalizovani na netretirane kontrole. Vrednosti apsorbance korigovane su oduzimanjem apsorbance bunarića bez ćelija, nakon čega su korišćene u formuli $OD_{uzorak}/OD_{kontrola} \times 100$ (optička gustina, eng. *optical density*, OD) za izračunavanje procenta vijabilnosti ćelija.

Za inicijalni skrining na V79 ćelijama, tečnosti za e-cigarete su primenjivane u razblaženjima od 0,69; 1,38; 2,77 i 4,14% (v/v), što odgovara koncentraciji nikotina od 125; 250; 500 i 750 μ g/mL. Dalji eksperimenti su sprovedeni koristeći razblaženje od 1,38% (250 μ g/mL nikotina).

Za inicijalni skrining kondenzata aerosola tečnosti za e-cigarete korišćene su koncentracije 0,5; 1; 2; 3 i 4% (v/v). Dalji eksperimenti su sprovedeni koristeći razblaženje od 2%.

3.4. Izolacija RNK, RNK-sekvenciranje i transkriptomska analiza (BEAS-2B)

Za transkriptomsku analizu korišćena je humana bronhijalna epitelna ćelijska linija BEAS-2B. Ćelije su zasejavane u mikrotitar ploče sa 6 bunarića u gustini od 2×10^6 ćelija po bunariću i gajene 24 h u standardnim uslovima (37°C, 5% CO₂). Nakon perioda adaptacije, ćelije su tretirane kondenzatima aerosola tečnosti za e-cigarete (kTEC i kPGVG) u konačnoj koncentraciji 2% (v/v) i inkubirane dodatnih 24 h. Netretirane ćelije služile su kao kontrola.

3.4.1. Izolacija ukupne RNK

Po isteku tretmana, ćelije su isprane fosfatnim puferom (PBS) i lizirane direktno u bunarićima dodatkom 350 μ L pufera RLT Plus, u skladu sa brojem ćelija. Izolacija ukupne RNK sprovedena je korišćenjem *RNeasy Plus Mini Kit-a* (Qiagen, Hilden, Nemačka), prema uputstvima proizvođača.

Ukratko, ćelije su lizirane dodatkom pufera *RLT Plus*, nakon čega je lizat homogenizovan vorteksiranjem u trajanju od 30 s. Homogenizovani lizati preneti su na gDNA *Eliminator spin* kolone postavljene u kolekcione epruvete zapremine 2 mL i centrifugirani 30 s pri $\geq 8000 \times g$, čime je uklonjena genomska DNK. Kolone sa DNK su potom odbačene, a sakupljeni protočni deo je korišćen za dalju izolaciju RNK.

U dobijeni protočni deo dodato je 350 μ L 70% etanola, uz pažljivo mešanje pipetiranjem, bez centrifugiranja. Uzorci su zatim preneti na *RNeasy spin* kolone, postavljene u nove kolekcione epruvete, i centrifugirani 15 s pri $\geq 8000 \times g$, nakon čega je protočni deo odbačen.

Kolone su zatim ispirane dodatkom 700 μ L pufera *RW1*, uz centrifugiranje 15 s pri $\geq 8000 \times g$, a potom dvostrukim ispiranjem sa 500 μ L pufera *RPE*. Prvo ispiranje izvedeno je centrifugiranjem 15 s pri $\geq 8000 \times g$, dok je drugo ispiranje sprovedeno centrifugiranjem 2 min pri $\geq 8000 \times g$ radi potpunog uklanjanja ostataka etanola. Nakon toga, kolone su dodatno centrifugirane 1 min pri maksimalnoj brzini radi potpunog sušenja membrane.

Elucija RNK izvršena je premeštanjem *RNeasy* kolona u nove *RNase-free* epruvete zapremine 1,5 mL i dodatkom 30-50 μ L *RNase-free* vode direktno na membranu, uz centrifugiranje 1 min pri $\geq 8000 \times g$. Dobijeni eluati čuvani su na -80°C do dalje analize.

Kvalitet i količina RNK procenjeni su pomoću sistema 2100 *Bioanalyzer* (Agilent, Santa Clara, CA, SAD).

3.4.2. RNK sekvenciranje

Priprema biblioteka i RNK sekvenciranje sprovedeni su u *Novogene Corporation Inc.* (U.K., Cambridge Sequencing Center).

Informaciona RNK je prečišćena iz ukupne RNK korišćenjem poli-T oligonukleotida vezanih za magnetne perle. Nakon fragmentacije, sintetisan je prvi lanac cDNK korišćenjem nasumičnog heksamera, a zatim i drugi lanac cDNK. Biblioteke su dalje pripremane kroz standardne korake popravke krajeva DNK (eng. *end-repair*), dodavanja A-nukleotida (eng. *A-tailing*), ligacije adaptera, selekcije fragmenata odgovarajuće veličine, PCR amplifikacije i prečišćavanja. Upareno sekvenciranje (eng. *paired-end*, 150 bp) sprovedeno je na platformi *NovaSeq 6000*, pri čemu je generisano ukupno 32 Gb podataka. Sekvencirano je 9 uzoraka, po tri replikata za svaki tretman.

Sirovi podaci deponovani su u NCBI bazama *Sequence Read Archive* (SRA) i *Gene Expression Omnibus* (GEO) i dostupni su pod brojevima BioProject PRJNA1198719 i GEO serije GSE315683.

3.4.3. Transkriptomska analiza

Preprocesovanje i kontrola kvaliteta sirovih podataka (FASTQ fajlovi) sprovedeni su korišćenjem alata *fastp v0.23.4* sa podrazumevanim parametrima. Filtrirani očitani fragmenti mapirani su na humani referentni genom GRCh38.p12 korišćenjem STAR v2.7.11b alata.

Kvantifikacija ekspresije gena izvršena je alatom *featureCounts* iz paketa *subread v2.0.4*, uz zadat tip obeležja „exon“ i GTF anotacioni fajl *Homo_sapiens.GRCh38.111.chr.gtf*. Multimapirani i višestruko preklapajući očitani fragmenti nisu uključeni u analizu. Za svaki tretman korišćena su tri biološka ponavljanja.

Analiza diferencijalne ekspresije izvršena je pomoću DESeq2 (v1.46.0) paketa. Efekat serije uklonjen je korišćenjem ComBat-Seq funkcije iz SVA paketa (v3.54.0), uz *full model* i tretman kao grupni parametar. dds objekat formiran je iz korigovane matrice brojanja, pri čemu su zadržani samo geni sa ≥ 10 očitavanja u najmanje tri uzorka, čime je broj transkripata smanjen sa 63 187 na 16 100. Normalizacija podataka sprovedena je metodom faktora veličine u okviru DESeq2. Diferencijalna ekspresija analizirana je poređenjem tretmana kPGVG i kTEC međusobno, kao i u odnosu na kontrole. Wald test korišćen je kao metoda značajnosti, a diferencijalno eksprimirani geni definisani su pragom lažno pozitivnih podudaranja (eng. *false discovery rate* FDR) $< 0,05$. Smanjenje varijabilnosti log-fold promene sprovedeno je primenom *ashr* paketa (eng. *LFC shrinkage*). Povećano i smanjeno (eng. *up* i *down*) eksprimirani geni korišćeni su za funkcionalno obogaćivanje i vizualizaciju u okviru paketa *clusterProfiler* (v4.12.6). Zajednički setovi diferencijalno eksprimiranih

gena (DEG) prikazani su Venn dijagramom generisanim alatom Interactivenn (<https://www.interactivenn.net/>).

3.5. Priprema ekstrakata proteina BEAS-2B i V79 ćelija za masenu spektrometriju visoke rezolucije nLC-MS/MS

3.5.1. Izolacija i određivanje koncentracije proteina

Za proteomsku analizu, BEAS-2B ćelije su zasejane u mikrotitar ploče sa 6 bunara, 2×10^5 ćelija po bunaru i tretirane sa kTEC i kPGVG u finalnoj koncentraciji od 2% (v/v) 24 h nakon zasejavanja. Nakon 24 h tretmana ćelije su isprane PBS-om i sakupljene struganjem sa površine suda.

Za proteomsku analizu V79 ćelija, 2×10^5 ćelija je zasejano u Petri šolje prečnika 10 cm i tretirano nakon 24 h sa TEC i PGVG+A u finalnoj koncentraciji od 1,38% (v/v). Tretmani su trajali 72 h nakon čega su ćelije isprane PBS-om i sakupljene struganjem sa površine suda.

Ćelijski peleti su lizirani u 50 μ L RIPA pufera po uzorku (Pierce™ RIPA Buffer, Thermo Scientific, Rockwood, TN, SAD) uz dodatak inhibitora proteaza (cOmplete, Roche, SAD). Liziranje je sprovedeno inkubacijom uzoraka na ledu u trajanju od 60 minuta, uz povremeno mešanje vokteksiranjem radi efikasnog rastvaranja proteina.

Nerastvoreni ćelijski ostaci uklonjeni su centrifugiranjem pri 13 000 o/min tokom 30 minuta na +4°C, nakon čega je sakupljen supernatant koji je predstavljao ukupni ekstrakt proteina. Uzorci su čuvani na -80°C do daljih analiza.

Koncentracija proteina u dobijenim ekstraktima određena je metodom bicinhoninske kiseline (BCA) korišćenjem *Pierce™ BCA Protein Assay Kit*-a (Thermo Scientific, SAD), u mikrotitar formatu, prema standardnom protokolu proizvođača.

Za pripremu standardne krive korišćen je goveđi serum albumin (eng. *Bovine Serum Albumin*, BSA) kao standard. Serija razblaženja BSA pripremljena je u istom rastvaraču kao i uzorci (RIPA pufer), u opsegu koncentracija pogodnom za mikrotitarski protokol (20-2000 μ g/mL), uključujući i slepu probu.

Radni BCA reagens pripremljen je neposredno pre upotrebe mešanjem 50 delova reagensa A sa 1 delom reagensa B (odnos 50:1, v/v).

U svaki bunarić mikrotitar ploče dodato je 5 μ L standarda ili uzorka proteina i 100 μ L sveže pripremljenog BCA radnog reagensa. Ploča je blago promućkana kako bi se obezbedilo ravnomerno mešanje sadržaja bunarića, a zatim inkubirana 30 minuta na 37°C. Nakon inkubacije, ploča je ohlađena na sobnu temperaturu.

Apsorbancija je merena na 562 nm korišćenjem NanoDrop™ 2000c spektrofotometra (*Thermo Scientific, Rockwood, TN, SAD*), u režimu kompatibilnom sa mikrotitarskim merenjima. Vrednosti apsorbancije uzoraka korigovane su oduzimanjem prosečne apsorbancije slepe probe.

Standardna kriva konstruisana je nanošenjem srednjih vrednosti apsorbancije - slepa proba u odnosu na poznate koncentracije BSA standarda. Koncentracija proteina u nepoznatim uzorcima izračunata je interpolacijom sa standardne krive. Svi uzorci su mereni u triplikatu, a dobijene vrednosti korišćene su za normalizaciju količine proteina u daljoj nLC-MS/MS analizi.

3.5.2. Elektroforetska priprema ekstrakata proteina za tripsinsku digestiju u gelu

Ekstrakti proteina su razblaženi u RIPA puferu tako da su svi uzorci dovedeni na istu konačnu koncentraciju proteina. Za elektroforetsko razdvajanje, 15 µg ukupnih proteina BEAS-2B i 30 µg proteina V79 po uzorku analizirano je u redukcionim uslovima primenom jednodimenzionalne elektroforeze u poliakrilamidnom gelu sa natrijum-dodecil-sulfatom (1D SDS-PAGE eng. *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*), korišćenjem sistema *Mini-PROTEAN Tetra Vertical Electrophoresis Cell* (Bio-Rad, SAD).

Priprema uzoraka obuhvatala je mešanje ekstrakata proteina sa 4× puferom za nanošenje uzoraka (50 mM Tris, pH 6,8; 2% SDS; 10% glicerol; 0,1% bromfenol-plavo) u zapreminskom odnosu 4:1 (uzorak : pufer). Nakon toga, uzorci su podvrgnuti termalnoj denaturaciji zagrevanjem na 95°C u trajanju od 5 minuta.

Elektroforeza je vršena na dvokomponentnom poliakrilamidnom (PAA) gelu, koji se sastojao od gela za koncentrovanje (6% PAA; 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8; 0,1% SDS; 0,1% amonijum-persulfat; 0,01% TEMED (tetrametiletilendiamin)) za BEAS-2B i V79 ekstrakte proteina i gela za razdvajanje (14% PAA; 375 mM Tris-HCl, pH 8,8; 0,1% SDS; 0,1% amonijum-persulfat; 0,01% TEMED) za uzorke BEAS-2B i razdvajajući gel sa 12% PAA za V79 ekstrakte proteina.

Za izvođenje elektroforeze korišćen je Tris-glicin-SDS (TGB) pufer (25 mM Tris-HCl, pH 8,8; 250 mM glicin; 0,1% SDS). Elektroforetsko razdvajanje sprovedeno je pri konstantnom naponu od 100 V tokom prolaska uzoraka kroz gel za koncentrovanje, a zatim pri 180 V u gelu za razdvajanje, sve do ulaska proteinskih frakcija u razdvajajući gel, pri čemu je maksimalna migracija iznosila do 5 mm unutar razdvajajućeg SDS-PA gela.

Gelovi su obojeni komasi plavim (CBB R-250) (0,4% *comassie blue*; 10% sirćetna kiselina; 40% metanol) i obezbojeni u rastvoru 7% sirćetne kiseline i 25% metanola.

Za *shotgun* digestiju u gelu, trakice gela koje sadrže ukupne proteine isečene su skalpelom i prebačene u tube.

3.5.3. Pranje gela, redukcija i alkilacija proteina

Svi rastvori korišćeni u narednim koracima pripremani su sveži neposredno pre upotrebe. Kao osnovni pufer korišćen je amonijum-bikarbonat (ABC). Pripremljeni su sledeći rastvori:

- 50 mM ABC (197,37 mg NH_4HCO_3 (Sigma, Nemačka) rastvoreno u 50 mL dejonizovane vode),
- 25 mM ABC (mešanjem 12,5 mL dejonizovane vode i 12,5 mL 50 mM ABC),
- 10 mM DTT (38,6 mg ditioneitol (Sigma, Nemačka) rastvoreno u 25 mL dejonizovane vode),
- 55 mM IAA (254,4 mg jodoacetamida (Sigma, Nemačka) rastvoreno u 25 mL dejonizovane vode),
- 25 mM ABC sa 50% acetonitrila (ACN) (Sigma, Nemačka) (12,5 mL ACN i 12,5 mL 50 mM ABC),
- 10% mravlja kiselina (eng. *formic acid*, FA) (Sigma, Nemačka) (100 µL FA i 900 µL dejonizovane vode).

Svi rastvori koji sadrže IAA držani su zaštićeni od svetlosti, obmotavanjem epruveta aluminijumskom folijom. Tokom svih faza rada, pipetne nastavke je bilo potrebno sistematski ispirati tri puta u etanolu i tri puta u rastvoru koji se odmerava, kako bi se smanjio rizik od kontaminacije.

3.5.4. Prva serija ispiranja - uklanjanje boje

Gel-trakice su najpre ispirane u 200 μ L 25 mM ABC pufera u trajanju od 1 h, uz mešanje na 600 o/min, na sobnoj temperaturi (20°C). Nakon toga, supernatant je uklonjen. Zatim su gel-trakice ispirane 45 minuta u 100 μ L 25 mM ABC sa 50% ACN, uz mešanje na sobnoj temperaturi, nakon čega je supernatant uklonjen.

3.5.5. Redukcija i alkilacija proteina

Razbijanje disulfidnih veza i stabilizacija tiolnih grupa cisteinskih ostataka, čime se obezbeđuje potpuna denaturacija proteina i sprečava njihova ponovna oksidacija tokom digestije, sprovedeno je redukcijom DTT-jem a alkilacija IAA-om.

Redukcija proteina izvedena je dodatkom 100 μ L 10 mM DTT u svaku tubu, uz inkubaciju na 57°C, u mraku, uz mešanje, u trajanju od 1 h. Nakon inkubacije, tube su kratko centrifugirane kako bi se kondenzat sa zidova i poklopca spustio na dno, a supernatant je potom uklonjen.

U svaku tubu dodat je 100 μ L ACN, a gel-trakice su mešane na vorteksu 6 minuta. Nakon mešanja, supernatant je uklonjen.

Alkilacija je sprovedena dodatkom 100 μ L 55 mM IAA u svaku tubu sa gel-trakom, uz inkubaciju na sobnoj temperaturi u trajanju od 45 minuta, bez mešanja, u potpunom mraku (tube su obmotane aluminijumskom folijom). Po završetku, supernatant je uklonjen.

3.5.6. Druga serija ispiranja - uklanjanje ostataka reagensa

Gel-trakice su zatim ispirane sa 100 μ L 25 mM ABC tokom 30 minuta, uz mešanje na sobnoj temperaturi, nakon čega je supernatant uklonjen. Sledeće pranje sprovedeno je sa 100 μ L 25 mM ABC sa 50% ACN tokom 15 minuta, uz mešanje na sobnoj temperaturi, a zatim je supernatant uklonjen. Na kraju, gel-trakice su ispirane sa 100 μ L 100% ACN u trajanju od 5 minuta, uz mešanje na sobnoj temperaturi, nakon čega je supernatant uklonjen.

3.5.7. Tripsinska digestija proteina

Tripsinska digestija predstavlja standardni korak u proteomskim analizama, kojim se proteini specifično razlažu na peptide odgovarajuće dužine i naelektrisanja, što omogućava njihovu efikasnu detekciju i identifikaciju masenom spektrometrijom.

Za digestiju proteina korišćen je tripsin izolovan iz svinja (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Nemačka), pripremljen u koncentraciji 7,5 ng/ μ L i čuvan na -20°C. Za svaki eksperiment korišćena je nova epruveta tripsina, koja je izvađena sa -20°C neposredno pre upotrebe.

Priprema tripsina obuhvatala je najpre pripremu matičnog rastvora tripsina koncentracije 0,5 μ g/ μ L, rastvaranjem 20 μ g liofilizovanog tripsina u 40 μ L 25 mM ACN. Nova epruveta je prethodno isprana sa 1 mL etanola, a zatim sa 1 mL 25 mM ABC pufera. Radni rastvor tripsina (7,5 ng/ μ L) pripremljen je dodavanjem 15 μ L matičnog rastvora tripsina u 985 μ L 25 mM ACN pufera.

U svaku tubu sa redukovanom, alkilovanom i opranom gel-trakom dodato je 20 μ L tripsina, nakon čega je ostavljeno oko 10 minuta da se gel rehidrira. U slučaju da nakon rehidratacije nije ostala mala

količina tečnosti u tubi, dodavano je dodatnih 5-10 μL 25 mM ABC pufera. Digestija je sprovedena preko noći (18 h) na 37°C (145).

3.5.8. Zaustavljanje digestije

Za zaustavljanje enzimske reakcije korišćen je 10% rastvor FA pod digestorom. U svaku tubu sa gel-trakom i digestom dodato je 2 μL 10% FA, pri čemu je zapremina digestata iznosila približno 20 μL , što je rezultovalo konačnom koncentracijom FA od približno 1%.

Nakon dodatka FA, tube su kratko centrifugirane kako bi se kondenzat sa zidova i poklopca spustio na dno, zatim vorteksirane, i ponovo centrifugirane.

3.5.9. Ekstrakcija peptida iz gela i desalinizacija

Po završetku tripsinske digestije i zaustavljanja reakcije dodatkom mravlje kiseline, peptidi su ekstrahovani iz poliakrilamidnih gel-trakica sekvencijalnim ispiranjem. Gel-trakice su najpre inkubirane sa 50 μL rastvora koji sadrži 50% ACN i 0,1% FA, uz mešanje na sobnoj temperaturi u trajanju od 20 minuta. Nakon inkubacije, supernatant koji je sadržao ekstrahovane peptide pažljivo je sakupljen i prebačen u nove tube.

Postupak ekstrakcije ponovljen je još jednom pod istim uslovima, a dobijeni supernatanti su spojeni sa prvim ekstraktom. Preostale gel-trakice su potom ispirane sa 100% ACN u trajanju od 10 minuta, uz mešanje na sobnoj temperaturi, nakon čega je i ovaj supernatant dodat prethodno prikupljenim ekstraktima.

Sakupljeni peptidni ekstrakti su potom upareni do suvoće u vakuum-centrifugi (eng. *SpeedVac*) na sobnoj temperaturi, bez primene toplote, i čuvani na -20°C do desalinizacije.

Desalinizacija peptidnih uzoraka sprovodi se radi uklanjanja soli, pufera i drugih niskomolekulskih nečistoća koje mogu ometati hromatografsko razdvajanje, jonizaciju i detekciju peptida tokom nLC-MS/MS analize.

Za desalinizaciju i prečišćavanje peptida korišćeni su C18 pipetni nastavci (HyperSep™ C18, Thermo Scientific, SAD), prema standardnoj proceduri proizvođača. Pre upotrebe, C18 kolone su aktivirane dodatkom 100 μL 100% ACN, nakon čega su ekvilibrisane sa 100 μL 0,1% FA u vodi. Osušeni peptidni uzorci su zatim rastvoreni u 30 μL 0,1% FA i naneti na C18 kolone.

Nakon vezivanja peptida, kolone su ispirane sa 100 μL 0,1% FA u vodi radi uklanjanja soli i nečistoća. Elucija peptida izvršena je dodatkom 30 μL 80% ACN sa 0,1% FA, pri čemu je eluat sakupljen u čiste tube.

Eluirani peptidi su ponovo upareni do suvoće u vakuum-centrifugi i neposredno pre nLC-MS/MS analize rastvoreni u odgovarajućoj zapremini 0,1% FA za BEAS-2B i 0,1% trifluorosirćetne kiseline (TFA) za V79 peptide, u skladu sa zahtevanom koncentracijom i zapreminom injekcije za masenu spektrometriju.

3.6. Analiza masenom spektrometrijom visoke rezolucije nLC-MS/MS (BEAS-2B)

Tripsinski peptidi (zapremina injekcije 1 μ L; približno 375 ng po uzorku) hromatografski su razdvojeni nLC sistemom UltiMate 3000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, SAD) korišćenjem mobilnih faza A) 0,1% FA u vodi i B) 0,1% FA u ACN. Korišćen je gradijent 5-70%-95% B pri protoku od 250 nL/min u trajanju od 88 min. Svi rastvarači bili su čistoće predviđene za masenu spektrometriju (eng. *MS grade*) (Sigma Aldrich, Nemačka).

Peptidi su analizirani na Orbitrap Exploris™ 240 masenom spektrometru (Thermo Scientific Inc., Bremen, Nemačka) u pozitivnom režimu jonizacije, u zavisnom MS/MS režimu (eng. *data-dependent acquisition*, DIA), pri čemu je 20 najintenzivnijih prekursora fragmentisano HCD metodom (sudarna disocijacija pri višoj energiji eng. *Higher-energy Collisional Dissociation*) (HCD 30%). Opseg skeniranja bio je 350-1400 m/z, rezolucija MS1 skeniranja 60 000, a MS2 15 000. Izolacioni prozor iznosio je 1,4 m/z. Normalizovani AGC (automatska kontrola pojačanja, eng. *Automatic Gain Control*) ciljevi bili su 300% za MS1 i 200% za MS2, dok je maksimalno vreme injekcije iznosilo 25 ms za oba skeniranja. Dinamička ekskluzija podešena je na 3 s nakon prvog ponovljenog jonskog događaja.

3.7. Identifikacija i kvantifikacija bez obeležavanja proteina i profilisanje posttranslacionih modifikacija proteina (BEAS-2B)

Proteini BEAS-2B ćelija identifikovani su korišćenjem platforme PEAKS X Pro (Bioinformatics Solution Inc., Ontario, Kanada) i PTM algoritma, pretragom UniProtKB baze za *Homo sapiens* (taxon ID 9606; 42 379 sekvenci; pristupljeno 29.11.2022) i baze kontaminanata „*Common Repository of Adventitious Proteins*“ (<http://www.thegpm.org/>; 116 sekvenci; pristupljeno 18.10.2019). Oksidacija (Met) i deamidacija (Gln, Asn) definisane su kao varijabilne modifikacije, dok je karbamidometilacija (Cys) postavljena kao fiksna modifikacija u PEAKS DB algoritmu. U okviru PEAKS PTM algoritma sprovedena je neograničena pretraga modifikacija korišćenjem liste od 313 modifikacija iz *Unimod* baze podataka. Dozvoljene su do dva propuštena mesta tripsinskog sečenja uz poluspecifični režim (nespecifično cepanje na jednom kraju peptida). Tolerancije mase bile su ± 10 ppm za prekursorske jone i $\pm 0,02$ Da za fragment jone. Filteri na nivou proteina bili su: $\text{protein} - 10 \times \log P \geq 20$, najmanje 2 jedinstvena peptida po proteinu i $\text{AScore} \geq 50$ za pouzdanu identifikaciju modifikacija. AScore se izračunava po formuli $-10 \times \log_{10} P$, gde je P verovatnoća da je peptid slučajno podudaran sa dobijenim spektrom. Filteri na nivou peptida bili su: stopa lažno pozitivnih podudaranja za peptid-spektar podudaranje $< 0,1\%$ (rezultujući FDR sekvence peptida $< 0,5\%$) i lokalni skor pouzdanosti *de novo* poravnanja $\geq 80\%$.

Količina identifikovanih proteina upoređena je kvantifikacijom bez obeležavanja (eng. *label-free kvantifikacijom*, LFQ) korišćenjem PEAKS Q algoritma. Termin „PTM profilisanje“ označava relativni stepen modifikacija unutar jednog uzorka. Relativna LFQ kvantifikacija proteina i PTM-ova u tri tretmanske grupe sa po tri biološka ponavljanja sprovedena je po kriterijumima za definisanje pouzdano diferencijalno regulisanih proteina: skor značajnosti $20 (-10\log P; p < 0,01)$ i ≥ 2 -puta promena u log 2 odnosu povišeni/sniženi (eng. *up/down*), pri poređenju tretmana u odnosu na kontrolu.

Bioinformatičke analize (funkcionalno obogaćivanje i Venn dijagrami) sprovedene su u softverima FunRich v3.1.3 (<http://funrich.org>) i QuickGO (<https://www.ebi.ac.uk/QuickGO>). Kao pozadinska baza korišćen je kompletan recenzirani UniProt set za *Homo sapiens* (taxon ID 9606; 20 423

sekvence). Proteomski podaci masene spektrometrije deponovani su u ProteomeXchange konzorcijum putem PRIDE repozitorijuma, pod identifikatorom PXD072831 (10.6019/PXD072831).

3.8. Masena spektrometrija visoke rezolucije nLC-MS/MS (V79)

Tripsinski peptidi (2 µg iz svakog uzorka; zapremina injekcije 15 µL) hromatografski su razdvojeni pomoću U3000 RSLC-nano sistema (Thermo Scientific, Bremen, Nemačka) spregnutog sa TimsTOF masenim spektrometrom (Bruker, Bremen, Nemačka). Uzorci peptida nanošeni su na trap kolonu (Acclaim PepMap100 C18; 100 µm × 2 cm) u 0,1% TFA pri protoku od 20 µL/min. Nakon 5 minuta, predkolona je prebačena u liniju sa analitičkom kolonom (Acclaim PepMap100 C18; 75 µm × 50 cm), a peptidi su razdvajani binarnim gradijentom u trajanju od 130 minuta, u rasponu od 3 do 38% ACN u 0,1% FA, na 60°C i pri protoku od 250 nL/min.

Maseni spektrometar je radio u režimu paralelne akumulacije i serijske fragmentacije - zavisne akvizicije podataka (PASEF-DDA), sa radnim ciklusom od 100%, vremenom akumulacije od 1,1 s i 10 PASEF MS/MS skeniranja po top-N ciklusu akvizicije. MS i MS/MS spektri snimani su u opsegu m/z 100-1700. Poligonalni filter primenjen je u ravni m/z i jonske mobilnosti radi selekcije signala koji najverovatnije predstavljaju peptidne prekursore, a ne jednostruko naelektrisane pozadinske jone. Širina kvadrupolne izolacije podešena je na 2 Th za m/z < 700 i 3 Th za m/z > 700, dok je energija sudara povećavana u zavisnosti od rastuće jonske mobilnosti, u opsegu od 0,6 do 1,6 1/K0 (V·s/cm³), odnosno od 20 do 59%.

3.9. Identifikacija i kvantifikacija bez obeležavanja proteina i profilisanje posttranslacionih modifikacija proteina (V79)

Proteini V79 ćelija identifikovani su korišćenjem platforme PEAKS X Pro (Bioinformatics Solution Inc., Ontario, Kanada) i njenog PTM algoritma, pretragom u *UniProtKB* bazi podataka (<http://www.uniprot.org/>) za vrstu *Cricetulus griseus* (taxon ID 10029, 56.575 sekvenci, pristupljeno 22.08.2021), kao i u bazi kontaminanata *Common Repository of Adventitious Protein* (<http://www.thegpm.org/>, 116 sekvenci, pristupljeno 18.10.2019). Lista svih identifikovanih V79 proteina sastoji se od grupa proteina sa najmanje dva jedinstvena peptida, pri čemu su pogoci kontaminanata uklonjeni, a stopa FDR bila je manja od 0,5%.

Platforma PEAKS X Pro obuhvatila je 313 posttranslacionih i hemijskih modifikacija u prostoru pretrage, koji se redovno ažurira na osnovu Unimod baze podataka. Količina identifikovanih V79 proteina upoređivana je LFQ korišćenjem algoritma PEAKS Q. Termin „PTM profilisanje” označava relativni stepen modifikacija unutar jednog uzorka. Relativno profilisanje PTM i relativna LFQ proteina u četiri grupe, sa po jednim uzorkom po grupi (146).

Ukratko, u LFQ analizi kriterijumi za definisanje pouzdano diferencijalno regulisanih proteina bili su: skor značajnosti 20 (-10logP, p < 0,01), dvostruka promena u log2 odnosu povećanja/smanjenja i najmanje jedan korišćeni peptid, pri čemu je promena bila prisutna u bilo kom od tri tretmana u odnosu na kontrolnu grupu.

3.10. Analiza mutagenosti i genotoksičnosti

3.10.1. HPRT test mutagenosti (V79)

Hipoksantin-guanin fosforiboziltransferaza (HPRT) je enzim puta ponovne sinteze purinskih baza (eng. *salvage pathway*), koji učestvuje u konverziji purinskih baza u nukleotide. Purinski analog 6-tioguanin (6-TG) zahteva metaboličku aktivaciju putem HPRT-a kako bi ispoljio citotoksično dejstvo. U ćelijama sa očuvanom HPRT aktivnošću, 6-TG se metaboliše u nukleotidne oblike koji se ugrađuju u DNK i dovode do ćelijske smrti, dok su ćelije sa inaktivirajućim mutacijama u genu *HPRT* rezistentne na 6-TG.

HPRT mutacioni esej omogućava detekciju i kvantifikaciju novoindukovanih mutacija u genu *HPRT*, nastalih kao posledica izlaganja ispitivanim tretmanima. Ove mutacije dovode do pojave novih 6-TG-rezistentnih ćelija, koje se ne nalaze u početnoj populaciji. Broj rezistentnih kolonija nakon selekcije predstavlja direktnu meru frekvencije mutacionih događaja i koristi se za procenu mutagenog potencijala ispitivanih agenasa u poređenju sa kontrolama.

Nakon tretmana, ćelije se gaje tokom perioda oporavka od šest dana u kompletnom medijumu bez selektivnog agensa, čime se omogućava iscrpljivanje preostale HPRT enzimske aktivnosti u mutiranim ćelijama. Tokom ovog perioda određuje se i sposobnost formiranja kolonija radi procene citotoksičnosti tretmana. Nakon faze oporavka, ćelije se zasejavaju pri niskoj konfluenciji, kako bi se sprečila metabolička kooperacija između ćelija, a zatim se podvrgavaju selekciji u prisustvu 6-TG. Krajnji ishod testa predstavlja broj 6-TG rezistentnih kolonija, normalizovan u odnosu na preživljavanje i upoređen sa kontrolnim uslovima (147).

HPRT test mutagenosti izveden je prema modifikovanoj proceduri (148).

U Petri šolje prečnika 150 mm zasejano je po 2×10^5 V79 ćelija, koje su tretirane nakon 24 h i inkubirane 72 h sa tretmanima TEC i PGVG+A 1,38% (v/v). Tretman sa 2 mM H_2O_2 (Sigma, Nemačka), dobijen razblaživanjem 30% (9,8 M) rastvora H_2O_2 u medijumu bez seruma, u trajanju od 1 h, služio je kao pozitivna kontrola i dodat je 1 h pre kraja 72 h ostalih tretmana.

Ćelije su zatim odlepljene rastvorom 0,05% tripsina i 0,02% EDTA i 2×10^5 ćelija je zasejano u Petri šolje od 150 mm radi uzgajanja u kompletnom medijumu bez tretmana tokom perioda oporavka.

Istovremeno, 100 ćelija je zasejano u Petri šolje od 60 mm (2 šolje po tretmanu) radi procene citotoksičnosti tretmana i njihovog uticaja na sposobnost ćelija da formiraju kolonije, sa inkubacijom od 8 dana.

Nakon 72 h ćelije koje su gajene radi oporavka su dostigle 80% konfluentnosti, i odlepljene su od suda rastvorom 0,05% tripsina i 0,02% EDTA i ponovo zasejane u 150 mm Petri šolju (2×10^5 ćelija) zarad još 72 h oporavka, ukupno 6 dana oporavka da bi se iscrpela rezidualna aktivnost HPRT u ćelijama koje su stekle novonastalu mutaciju *HPRT* genu.

Osam dana nakon zasejavanja 100 ćelija u Petri šolje od 60 mm za ispitivanje preživljavanja i sposobnosti ćelija da formiraju kolonije, uklonjen je medijum, ćelije su isprane PBS-om i fiksirane 15 min metanolom koji je stajao na -20°C . Nakon fiksiranja, ćelije su isprane PBS-om a zatim su kolonije obojene 0,5% rastvorom kristal violeta (Sigma, Nemačka) u 20% metanolu. Zatim su isprane 4 puta dejonizovanom vodom i Petri šolje su skenirane na Epson Perfection V370 Photo skeneru (Epson, Japan). Kolonije su brojane ručno analizom dobijenih slika.

Nakon perioda oporavka od 6 dana, $2,5 \times 10^5$ ćelija zasejano je u Petri šolje prečnika 150 mm (4 po tretmanu) u kompletnom medijumu uz dodatak 7,5 $\mu\text{g/mL}$ 6-TG 15 min nakon zasejavanja. Nakon 4 dana zamjenjen je kompletni medijum + 6-TG i inkubirano je još 4 dana, ukupno 8 dana u prisustvu

7,5 µg/mL 6-TG. Nakon 8 dana uklonjen je medijum, ćelije su isprane PBS-om i fiksirane 15 min metanolom koji je stajao na -20°C. Nakon fiksiranja, ćelije su isprane PBS-om a zatim su kolonije obojene 0,5% (w/v) rastvorom kristal violeta (Sigma, Nemačka) u 20% metanolu. Zatim su isprane dejonizovanom vodom 4 puta i Petri šolje su skenirane na Epson Perfection V370 Photo skeneru (Epson, Japan). Kolonije su brojane ručno analizom dobijenih slika.

Broj 6-TG rezistentnih kolonija normalizovan je na procenat preživljavanja i poreden sa kontrolama.

3.10.2. Test genotoksičnosti - Kometa esej (V79)

Kometa test (jednoćelijski gel elektroforetski test) predstavlja osetljivu i široko primenjivanu metodu za detekciju primarnih oštećenja DNK na nivou pojedinačnih ćelija, uključujući jednolančane i dvolančane prekide, alkalno-labilna mesta i nepotpuno popravljene lezije. Metoda se zasniva na migraciji fragmenata DNK iz jedra ćelije ugrađene u agarozni gel pod dejstvom električnog polja u alkalnim uslovima, pri čemu stepen oštećenja DNK korelira sa količinom DNK koja migrira iz jedra i formira karakterističan „rep“ komete. Kvantifikacija oštećenja omogućava procenu genotoksičnog potencijala ispitivanih tretmana u poređenju sa kontrolnim uslovima.

Ćelije V79 (2×10^5) zasejavane su u Petri šolje prečnika 150 mm i tretirane nakon 24 h sa TEC i PGVG+A 1,38% (v/v). Po isteku 72 h, ćelije su odlepljene od plastike i razblažene na 5×10^4 ćelija/mL kompletnog medijuma.

Kometa test izveden je prema standardnoj alkalnoj proceduri (149). Staklene pločice mikroskopa su prethodno premazane rastvorom 1% agaroze normalne tačke topljenja. Suspenzije ćelija (30 µL) u koncentraciji 5×10^4 ćelija/mL kompletnog medijuma, mešane su sa 1% rastvorom agaroze (Sigma Aldrich, SAD) niske tačke topljenja. Od te smeše, 70 µL je postavljeno na prethodno premazane pločice i ostavljeno 5 minuta na 4°C da se gelovi stvrdnu. Nakon toga, pločice su lizirane 1 h u sveže pripremljenom, ohlađenom (4°C) lizirajućem puferu (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 1,5% Triton X-100, pH 10), a zatim prenete u komoru za elektroforezu (Enduro, Labnet, SAD) koja sadrži hladni (4°C) alkalni elektroforetski pufer (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH 13). Prvi korak, denaturacija DNK, uključivao je inkubaciju pločica 20 minuta na 4°C bez struje, nakon čega je uključena struja (0,75 V/cm, 300 mA) (Enduro, Labnet, SAD) u istom rastvoru 20 minuta. Nakon elektroforeze, pločice su prenete u sveže pripremljeni neutralizujući pufer ohlađen na 4°C (0,4 M Tris, pH 7,5) na 15 minuta. Pločice su potom fiksirane u metanolu na 4°C 15 minuta i osušene na sobnoj temperaturi. Za vizualizaciju, gelovi su obojeni *GelGreen* bojom (Biotium, SAD). Analizirano je ukupno 50 jedara po pločici (150 po tretman grupi) korišćenjem fluorescentnog mikroskopa pri uvećanju 400×, sa filterom za ekscitaciju 510-560 nm i barijernim filterom 590 nm (Leica, DMLS, Austrija) i softverom Comet Score 2.0. Za kvantifikaciju oštećenja korišćen je procenat DNK u „repovima“ (eng. *Tail DNA* %).

3.11. Analiza membranskog potencijala mitohondrijske membrane

Mitohondrijski membranski potencijal ($\Delta\Psi_m$) predstavlja ključni bioenergetski parametar koji odražava funkcionalno stanje mitohondrija i integritet respiratornog lanca. Promene u $\Delta\Psi_m$ povezane su sa poremećajima oksidativne fosforilacije, povećanom produkcijom ROS i aktivacijom signalnih puteva koji vode ka ćelijskom stresu ili smrti. Fluorescentne boje osetljive na membranski potencijal, poput 5,5',6,6'-tetrahloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolilkarbocijanin jodid (JC-1) i tetrametilrodamin etil-estar (TMRE), omogućavaju kvantitativnu procenu mitohondrijske funkcije na nivou pojedinačnih ćelija, što ih čini pogodnim alatima za detekciju ranih mitohondrijskih disfunkcija izazvanih različitim toksičnim agensima.

JC-1 je potencijal-zavisna boja zasnovana na odnosu fluorescentnih signala koja pri visokim vrednostima $\Delta\Psi_m$ formira agregate u mitohondrijama i emituje crvenu fluorescenciju, dok pri depolarizaciji mitohondrijske membrane ostaje u monomernom obliku sa zelenom fluorescencijom. Odnos crvene i zelene fluorescencije omogućava internu normalizaciju signala, čime se smanjuje uticaj varijacija u broju ćelija i intenzitetu osvetljenja. Zbog toga je JC-1 pogodna za poređenje relativnih promena $\Delta\Psi_m$ između različitih tretmana.

TMRE je lipofilna katjonska boja koja se akumulira u mitohondrijama proporcionalno $\Delta\Psi_m$ i emituje jedinstveni fluorescentni signal, omogućavajući jednostavnu i visoko osetljivu kvantifikaciju membranskog potencijala. TMRE ne omogućava korekciju signala zasnovanu na odnosu intenziteta fluorescencije između različitih kanala i osetljivija je na promene u broju mitohondrija i ukupnoj ćelijskoj masi, zbog čega je preporučljivo paralelno koristiti dodatne markere ili normalizaciju po ćeliji.

Ćelije BEAS-2B obeležene su sa 5 μM *CellTraceTM Violet* (Invitrogen, SAD) 10 min na 37°C i zasejane su u mikrotitar ploču sa 96 bunarića pri gustini od 7000 ćelija po bunariću. Nakon 24 h, ćelije su tretirane i inkubirane dodatnih 24 h. Da bi se izmerio mitohondrijski membranski potencijal, ćelije su inkubirane sa 1 μM JC-1 (Invitrogen, SAD) ili 500 nM TMRE (Sigma, Nemačka), dodatim u kompletni medijum tokom 15 minuta na 37°C. Nakon toga, ćelije su isprane PBS-om i vizualizovane pomoću *ImageXpress® Pico Automated Cell Imaging System* (Molecular Devices, San Jose, CA, SAD) sa objektivom od 10 $\times$, nakon što je određeno optimalno vreme ekspozicije za svaki filter osvetljenja.

Dobijene TMRE slike analizirane su korišćenjem *CellReporterXpress* softvera v2.8.2.669 (Molecular Devices, SAD) primenom „*Cell Scoring Analysis*“ protokola, pri čemu je kvantifikovan prosečni intenzitet fluorescencije po ćeliji. JC-1 fluorescencija analizirana je korišćenjem Fiji softvera v1.54p (National Institutes of Health, Bethesda, MD, SAD), primenom „*Multi-Wavelength Cell Scoring Analysis*“ protokola. Ukratko, pojedinačne ćelije su segmentirane, pozadinski signal je automatski oduzet iz crvenog (JC-1 agregati) i zelenog (JC-1 monomeri) kanala, a srednje vrednosti intenziteta fluorescencije po ćeliji korišćene su za izračunavanje odnosa crvena/zelena fluorescencija. Analizirano je najmanje 300 ćelija po uslovu.

3.12. Analiza *de novo* sinteze proteina

Za procenu *de novo* sinteze proteina korišćen je metod metaboličkog obeležavanja novonastalih polipeptidnih lanaca analogom puromicina, koji se ugrađuje tokom translacije i omogućava fluorescentnu detekciju novoformiranih proteina na nivou pojedinačnih ćelija.

Detekcija ukupne sinteze proteina sprovedena je korišćenjem *Global Protein Synthesis Assay Kit*-a (Abcam, UK), zasnovanog na upotrebi O-propargil-puromicina (OP-puromicin). OP-puromicin prolazi kroz ćelijsku membranu i kovalentno se vezuje za rastuće polipeptidne lance, čime dovodi do terminacije translacije, dok se nastali skraćeni polipeptidi detektuju pomoću fluorescentnog azida u reakciji zavisnoj od prisustva bakra.

BEAS-2B ćelije su zasejane u mikrotitar ploče sa 96 bunarića u gustini od 10 000 ćelija po bunariću. Nakon 24 h, ćelije su podvrgnute tretmanima kTEC i kPGVG+A u finalnoj koncentraciji od 2% (v/v) i inkubirane narednih 24 h. Nakon tretmana, medijum je zamenjen svežim medijumom koji sadrži boju za proteine (eng. *Protein Label*) (OP-puromicin) u finalnoj koncentraciji 1 $\times$, dobijenoj razblaživanjem 400 $\times$ *Protein Label* rastvora prema uputstvu proizvođača. Ćelije su inkubirane sa bojom za proteine tokom 3 h u standardnim uslovima kulture.

Kao negativna kontrola korišćen je cikloheksimid, inhibitor sinteze proteina, koji je dodat ćelijama u finalnoj koncentraciji 1× (razblaženje 100×), uz inkubaciju od 30 minuta na 37°C pre dodavanja *Protein Label* reagensa.

Po završetku inkubacije, ćelije su isprane PBS-om i fiksirane korišćenjem rastvorom za fiksiranje I (eng. *Fixative Solution I*) tokom 15 minuta na sobnoj temperaturi, a zatim permeabilizovane puferom za permealizaciju (eng. *Permeabilization Buffer*) tokom 10 minuta. Nakon uklanjanja permeabilizacionog pufera, ćelije su inkubirane sa 20 µL svežeg pufera za permealizaciju po uzorku, nakon čega je sprovedena reakcija fluorescentnog obeležavanja.

Pripremljen je 1× reakciona smeša (eng. *Reaction Cocktail*) koji je po uzorku sadržao:

93 µL PBS-a

1 µL 100× *Copper Reagent*-a

1 µL 100× *Fluorescent Azide*-a

5 µL 20× *Reducing Agent*-a

Ćelije su inkubirane sa 100 µL reakcionoj smeši tokom 30 minuta na sobnoj temperaturi, zaštićene od svetlosti. Nakon reakcije, ćelije su isprane tri puta puferom za ispiranje (eng. *Wash Buffer*).

Jedra su obeležena inkubacijom sa *Hoechst 33342* (Thermo Fisher Scientific, USA) u finalnoj koncentraciji 1 µg/mL tokom 15 minuta na sobnoj temperaturi. Fluorescentne slike dobijene su korišćenjem *ImageXpress® Pico Automated Cell Imaging System*-a (Molecular Devices, SAD) sa objektivom 10×, uz prethodno optimizovana vremena ekspozicije za svaki fluorescentni kanal.

Analiza OP-puomicin fluorescencije sprovedena je korišćenjem softvera *CellReporterXpress v2.8.2.669* (Molecular Devices, SAD), primenom „*Cell Scoring Analysis*“ protokola. Segmentacija pojedinačnih ćelija izvršena je na osnovu nuklearnog signala, a nivo ukupne sinteze proteina kvantifikovan je kao prosečan intenzitet zelene fluorescencije po ćeliji, nakon oduzimanja pozadinskog signala.

3.13. Fluorescentno obeležavanje lizozoma i kiselih vezikula

Lizozomi i druge kisele ćelijske vezikule mogu se selektivno obeležiti fluorescentnim bojama čija se akumulacija zasniva na kiselosti njihovog lumena. *LysoTracker® Green* se pasivno distribuira kroz ćelijsku membranu i akumulira u kiselim organelama usled protonacije, dok se *Acridine orange* boja koncentriše u kiselim vezikulama formiranjem fluorescentnih agregata, omogućavajući njihovu vizualizaciju u živim ćelijama.

BEAS-2B ćelije su zasejane u mikrotitar ploče sa 96 bunarića u gustini od 10 000 ćelija po bunariću. Nakon 24 h, ćelije su podvrgnute tretmanu i inkubirane narednih 24 h. Lizozomi i kisele vezikule obeleženi su pomoću 1 µM *LysoTracker® Green DND-26* (Invitrogen, SAD) i 1 µM *Acridine orange* boje (Sigma, Nemačka). Bojenje je sprovedeno u PBS-u u trajanju od 30 minuta na 37°C. Jedra su obeležena inkubacijom sa *Hoechst 33342* (1 µg/mL) tokom 15 min na sobnoj temperaturi. Nakon bojenja, ćelije su isprane PBS-om, a snimanje živih ćelija sprovedeno je u PBS-u korišćenjem *ImageXpress® Pico Automated Cell Imaging System* (Molecular Devices, SAD) sa objektivom 10×. Fluorescentne slike analizirane su u *CellReporterXpress* softveru v2.8.2.669 primenom *Cell Scoring Analysis* protokola, kvantifikujući prosečne intenzitete fluorescencije po ćeliji.

3.14. Fluorescentno obeležavanje neutralnih lipida u ćelijama

Bojenje neutralnih lipida sprovedeno je korišćenjem *BODIPY*TM 493/503, lipofilne fluorescentne boje koja se selektivno ugrađuje u neutralne lipide, omogućavajući njihovo obeležavanje i vizualizaciju u ćelijama.

BEAS-2B ćelije su zasejane u staklene posude prečnika 30 mm sa dnom za mikroskopiju (Greiner, Kremsmünster, Austrija) u gustini od 150 000 ćelija po posudi. Nakon 24 h, ćelije su tretirane i inkubirane još 24 h. Neutralni lipidi su obeleženi u PBS-u pomoću 5 μ M *BODIPY*TM 493/503 (4,4-difluoro-1,3,5,7,8-pentametil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen) (150) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD) tokom 20 min na 37°C.

Žive ćelije su snimane na konfokalnom mikroskopu Leica TCS SP8 (Leica Microsystems, Wetzlar, Nemačka) koristeći objektiv HC PL APO CS2 40 $\times$ /1.30. Lipidne kapljice su kvantifikovane korišćenjem softvera *Fiji* v1.54p (National Institutes of Health, Bethesda, MD, SAD) uz dodatak *3D Objects Counter*. Broj lipidnih kapljica i ukupna zapremina (μ m³) određeni su po vidnom polju i normalizovani na broj ćelija kako bi se dobile vrednosti po ćeliji. Srednja zapremina lipidnih kapljica izračunata je kao odnos ukupne zapremine i broja objekata za svako vidno polje. Za svaki uslov analizirano je najmanje 350 ćelija.

3.15. Test metaboličke kooperacije (V79)

Test metaboličke kooperacije predstavlja funkcionalni ćelijski esej koji se koristi za procenu međućelijske komunikacije zavisne od direktnog kontakta, pre svega komunikacije posredovane pukotinastim vezama. Ovaj test se zasniva na fenomenu metaboličke saradnje između susednih ćelija, pri čemu mali molekuli i metabolički produkti mogu da se prenose između ćelija pukotinastim vezama, utičući na njihov odgovor na toksične ili selektivne agense.

U kontekstu HPRT/6-TG sistema, test metaboličke kooperacije omogućava ispitivanje sposobnosti HPRT-pozitivnih ćelija divljeg soja (eng. *wild type* WT) da metabolički „komplementiraju“ HPRT-deficijentne (6-TG-rezistentne) ćelije. Naime, WT ćelije su sposobne da metabolišu 6-TG u citotoksične nukleotide, koji se putem pukotinastih veza mogu preneti u susedne 6-TG-rezistentne ćelije, dovodeći do njihove smrti. Kao posledica toga, u uslovima očuvane međućelijske komunikacije dolazi do smanjenog broja kolonija 6-TG-rezistentnih ćelija u ko-kulturi.

Nasuprot tome, oštećenje ili inhibicija komunikacije putem pukotinastih veza, bilo direktnim delovanjem ispitivanih tretmana ili posrednim promenama u ekspresiji ili funkciji koneksina, dovodi do prekida metaboličke razmene između ćelija. U takvim uslovima, 6-TG-rezistentne ćelije ostaju funkcionalno izolovane i zadržavaju sposobnost formiranja kolonija, što se manifestuje povećanim brojem 6-TG-rezistentnih (6-TG-R) kolonija u ko-kulturi.

Stoga, test metaboličke kooperacije predstavlja osetljiv i funkcionalno relevantan pristup za procenu integriteta i efikasnosti komunikacije posredovane pukotinastim vezama, kao i za ispitivanje efekata različitih hemijskih agenasa na ovaj vid ćelijske interakcije.

Test metaboličke kooperacije je sproveden prema prethodno objavljenoj metodi, uz modifikacije (151).

Ćelije V79 su kultivisane u kompletnom medijumu u prisustvu 7,5 μ g/mL 6-TG, sa promenom kompletnog medijuma sa 6-TG na svaka 3 dana. Kolonije spontano nastalih rezistentnih ćelija su selektovane i propagirane kako bi se dobile 6-TG-R V79 ćelije.

Mešavina od $7,5 \times 10^5$ WT i 100 6-TG-R ćelija je sejana u ko-kulturi u Petri šoljama prečnika 60 mm, a tretmani TEC i PGVG+A 1,38% (v/v) su dodati 4 h nakon sejanja. Kao kontrola uticaja svakog tretmana na preživljavanje i sposobnost formiranja kolonija 6-TG-R ćelija, 100 6-TG-R ćelija je zasebno zasejano u Petri šoljama prečnika 60 mm i tretirano na isti način kao i ćelije u ko-kulturi. Nakon 72 h tretmani su uklonjeni, a dodat je svež kompletni medijum suplementovan sa $7,5 \mu\text{g/mL}$ 6-TG. Nakon 8 dana uklonjen je medijum, ćelije su isprane PBS-om i fiksirano 15 min metanolom koji je stajao na -20°C . Nakon fiksiranja, ćelije su isprane PBS-om a zatim su kolonije obojene 0,5% (w/v) rastvorom kristal violeta (Sigma, Nemačka) u 20% metanolu. Zatim su isprane dejonizovanom vodom 4 puta i Petri šolje su skenirane na *Epson Perfection V370 Photo* skeneru (Epson, Japan). Kolonije 6-TG-R ćelija su prebrojane ručno analizom dobijenih slika. Broj kolonija u Petri šoljama sa ko-kulturama je normalizovan prema kontrolama sejanja sa samo 100 6-TG-R ćelija.

3.16. Analiza ekspresije proteina Cx43 metodom *Western blot-a*

Ćelije su isprane PBS-om, sastrugane sa površine Petrijevih šolja i lizirane u RIPA puferu (Thermo Fisher, SAD) uz dodatak Halt inhibitora proteaza (Thermo Scientific, SAD) tokom 60 minuta na ledu. Nerastvoreni ćelijski ostaci uklonjeni su centrifugiranjem pri 13 000 o/min tokom 30 minuta na $+4^\circ\text{C}$. Koncentracija proteina određena je korišćenjem *BCA Protein Assay Kit-a* (Thermo Fisher Scientific) prema prethodno navedenom postupku.

Priprema uzoraka obuhvatala je mešanje ekstrakata proteina sa $4\times$ puferom za nanošenje uzoraka (50 mM Tris, pH 6,8; 2% SDS; 10% glicerol; 0,1% bromfenol-plavo) u zapreminskom odnosu 4:1 (uzorak : pufer). Nakon toga, uzorci su podvrgnuti termalnoj denaturaciji zagrevanjem na 95°C u trajanju od 5 minuta.

Sedam mikrograma proteina po uzorku nanošeno je na dvokomponentni PAA gel, koji se sastojao od gela za koncentrovanje (6% PAA; 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8; 0,1% SDS; 0,1% amonijum-persulfat; 0,01% TEMED (tetrametiletilendiamin)) i gela za razdvajanje (12% PAA; 375 mM Tris-HCl, pH 8,8; 0,1% SDS; 0,1% amonijum-persulfat; 0,01% TEMED) nakon čega su proteini razdvajani elektroforezom u *Mini-Protean® Tetra Cell* sistemu (Bio-Rad, SAD). Na gel je nanošen i proteinski marker poznatih molekulskih težina (Thermo Scientific, SAD).

Razdvojeni proteini su zatim preneti na poliviniliden-fluoridnu (PVDF) membranu pomoću *Trans-Blot Turbo Transfer System-a* (Bio-Rad, SAD), pri konstantnom naponu od 25 V (do 1,0 A) u trajanju od 30 minuta. Gel je prethodno inkubiran u katodnom puferu (25 mM Tris-baza, pH 9,4; 40 mM kapronska kiselina; 20% metanol). Radi aktivacije, PVDF membrana je kratko potopljena u metanol, zatim ispirana 5 minuta u destilovanoj vodi i inkubirana 5 minuta u anodnom puferu II (25 mM Tris-baza, pH 10,4; 20% metanol). Anodna ploča je pokvašena anodnim puferom I (300 mM Tris-baza, pH 10,4; 20% metanol), nakon čega su postavljena dva sloja 3MM hromatografskog papira (Whatman, UK), prethodno natopljena istim puferom. Na njih je dodat jedan sloj 3MM papira natopljenog anodnim puferom II, zatim aktivirana membrana, a preko nje gel. Na vrh su postavljena tri sloja 3MM papira natopljena katodnim puferom. Transfer proteina sproveden je tokom 30 minuta pri konstantnom naponu od 25 V (do 1,0 A).

Membrane su obojene *MemCode Staining Kit-om* (Thermo Fisher, SAD), a zatim blokirane u PBS-Tween 0,05% sa 5% BSA preko noći na $+4^\circ\text{C}$ zarad sprečavanja nespecifičnog vezivanja antitela. Nakon blokiranja, membrane su inkubirane sa monoklonskim antitelom za koneksin 43 (Connexin 43, Cx43) (Thermo Fisher, SAD) proizvedenom u mišu u razblaženju 1:500 u PBS-Tween 0,05% preko noći na $+4^\circ\text{C}$, zatim sa anti-tubulin antitelom (Abcam, UK) u razblaženju 1:100 000, takođe preko noći na $+4^\circ\text{C}$, i na kraju sa kozjim anti-mišjim Alexa Fluor 488 sekundarnim antitelom (Thermo Fisher, SAD) u razblaženju 1:5000 tokom 3 h na sobnoj temperaturi. Fluorescentni signal je detektovan pomoću Typhoon™ FLA 9500 biomolekularnog skenera (GE Healthcare).

Kvantifikacija signala izvršena je korišćenjem ImageJ softvera (National Institute of Mental Health; Bethesda, MA, USA). Ekspresija Cx43 proteina normalizovana je u odnosu na ekspresiju tubulina u svakom uzorku.

3.17. Kvantifikacija tunelskih nanotuba

Tunelske nanotube (eng. *Tunneling nanotubes*, TNT) predstavljaju tanke, aktinom bogate citoplazmatske strukture koje omogućavaju direktnu međućelijsku komunikaciju i razmenu signalnih molekula, organela i drugih ćelijskih komponenti. Njihova učestalost i dinamika mogu se menjati u uslovima ćelijskog stresa, zbog čega se analiza TNT-ijeva može koristiti kao pokazatelj adaptivnih ili patoloških ćelijskih odgovora. Fluorescentno obeležavanje ćelija i snimanje živih ćelija konfokalnom mikroskopijom omogućavaju vizualizaciju i kvantifikaciju TNT. *CellTrace*TM Violet je fluorescentna boja za praćenje ćelija koja pasivno difunduje kroz ćelijsku membranu i kovalentno se vezuje za intracelularne proteine, obezbeđujući stabilan i dugotrajan fluorescentni signal, što je čini pogodnom za praćenje TNT mikroskopijom živih ćelija.

Ćelije BEAS-2B su odlepljene od plastične podloge korišćenjem rastvora tripsina, nakon čega su resuspendovane u PBS-u i obeležene fluorescentnom bojom *CellTrace*TM Violet (Thermo Fisher, SAD) u razblaženju 1:1000, što odgovara finalnoj koncentraciji od 5 μ M, tokom 10 minuta na 37°C u suspenziji. Nakon bojenja, ćelije su prebrojane i zasejane u gustini od 30 000 ćelija po odeljku u Petri šolji prečnika 35 mm sa staklenim dnom podeljenom u 4 odeljka, namenjene za snimanje živih ćelija (*CELLview*TM Glass Bottom Dish, 4 compartments; Greiner Bio-One, Austrija).

Dvadeset četiri sata nakon sejanja, BEAS-2B ćelije su podvrgnute tretmanima TEC, PGVG i NIK, primenjenim u finalnoj koncentraciji od 1,38% (v/v). Ćelije su snimane 4, 24 i 48 h nakon tretmana na konfokalnom mikroskopu Leica TCS SP8 (Leica Microsystems, Wetzlar, Nemačka) korišćenjem HC PL APO CS2 40 $\times$ /1.30 objektivu.

Dobijene slike analizirane su manuelno, pri čemu je broj TNT određivan direktnim brojanjem sa slike, a rezultati su izraženi kao broj TNT po ćeliji.

3.18. Statistička obrada podataka

Statistička analiza rezultata izvršena je korišćenjem softvera GraphPad Prism verzije 8.4.3 (La Jolla, CA, SAD) ili Statistica 6.0 (StatSoft, Inc.). Normalnost raspodele podataka testirana je Shapiro-Wilk testom, nakon čega su, u zavisnosti od raspodele, primenjeni jednofaktorska ANOVA sa Dunnettovim testom višestrukih poređenja ili Kruskal-Wallis jednofaktorska ANOVA. Razlike sa p-vrednošću manjom od 0,05 smatrane su statistički značajnim.

Rezultati dobijeni MTT testom, analizom mitohondrijskog membranskog potencijala i testom sinteze proteina analizirani su u softveru GraphPad Prism verzije 6.0 (La Jolla, CA, SAD) primenom neparnog t-testa sa Welch-ovom korekcijom, pri čemu su razlike sa $p < 0,05$ smatrane statistički značajnim.

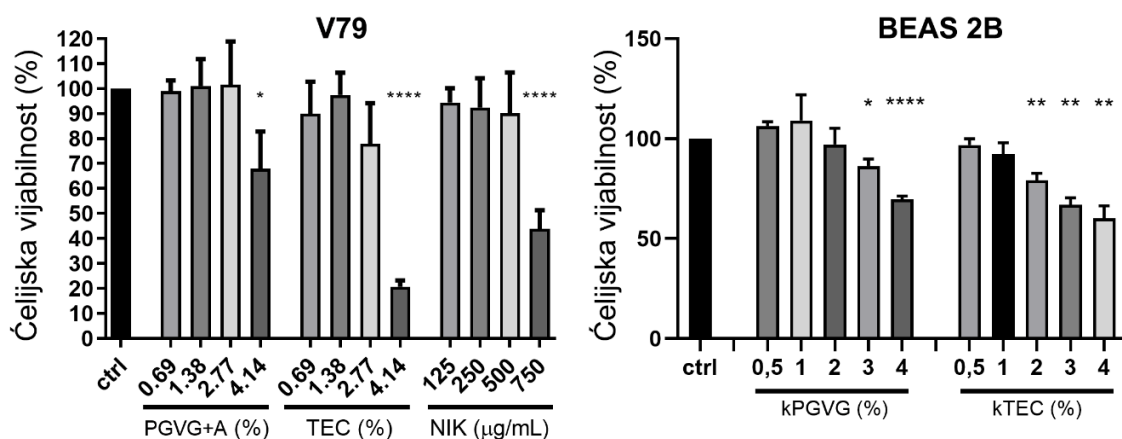
Statistički test PEAKS Q korišćen je u okviru proteomske platforme PEAKS Studio X Pro za ispitivanje značajnih razlika u relativnoj kvantifikaciji bez obeležavanja proteina. Hipergeometrijski test, kao metoda procene nekorigovane p-vrednosti, kao i Bonferronijev test, zajedno sa BH i Q-value testovima (Storey-Tibshirani metoda) kao korigovanim pristupima procene p-vrednosti, korišćeni su u softveru *FunRich* verzije 3.1.3.

4. Rezultati

U ovom radu ispitivan je odgovor humanih bronhijalnih epitelnih ćelija BEAS-2B na izlaganje komponentama kondenzata aerosola tečnosti za e-cigarete i fibroblasta pluća kineskog hrčka V79 na izlaganje komponentama tečnosti za e-cigarete. Kao polazni pristup primenjene su analize transkriptoma i proteoma, sa ciljem sveobuhvatnog pregleda promena izazvanih tretmanima na nivou ekspresije gena i proteina, kao i modifikacija proteina. Na osnovu uočenih obrazaca u ovim analizama, dalje su ispitani odabrani ćelijski procesi primenom funkcionalnih eseja. Rezultati obuhvataju kvantitativne promene u ekspresiji gena i proteina, reorganizaciju subćelijskih komponenti, obrasce modifikacija proteina, kao i nalaze dobijene analizom mitohondrijske funkcije, sinteze proteina, lizozomalnog signala, međućelijske komunikacije, mutagenosti i genotoksičnosti nakon izlaganja ispitivanim uslovima.

4.1. Uticaj komponenti tečnosti za e-cigarete na vijabilnost BEAS-2B i V79 ćelija

Kako bi se definisali uslovi izlaganja pogodni za dalja ispitivanja, vijabilnost BEAS-2B i V79 ćelija je procenjena primenom MTT eseja nakon izlaganja rastućim koncentracijama TEC, PGVG+A i nikotina za V79 ćelije, i kondenzata aerosola TEC i PGVG za BEAS-2B ćelije (Slika 6). Na osnovu dobijenih rezultata, kao radna koncentracija izabrana je maksimalna ne-citotoksična doza, odnosno najviša koncentracija koja nije dovela do značajnog smanjenja vijabilnosti u odnosu na kontrolu. U daljem istraživanju, za BEAS-2B ćelije korišćeni su kondenzati aerosola TEC i PGVG u koncentraciji od 2% (v/v), dok je za V79 ćelije primenjena TEC i PGVG+A u koncentraciji od 1,38% (v/v), što odgovara koncentraciji nikotina od 250 µg/mL. Na taj način obezbeđeno je da uočene promene u transkriptomskom i proteomskom profilu, kao i u funkcionalnim ishodima, odražavaju subletalni ćelijski odgovor na izloženost, a ne sekundarne posledice masivnog odumiranja ćelija ili selekcije najotpornije subpopulacije. Ovakav pristup omogućava poređenje tretmana u uslovima očuvane osnovne ćelijske vitalnosti, istovremeno zadržavajući dovoljno visok intenzitet izlaganja da se detektuju rani i adaptivni odgovori ćelija relevantni za procenu biološkog efekta ispitivanih uzoraka.



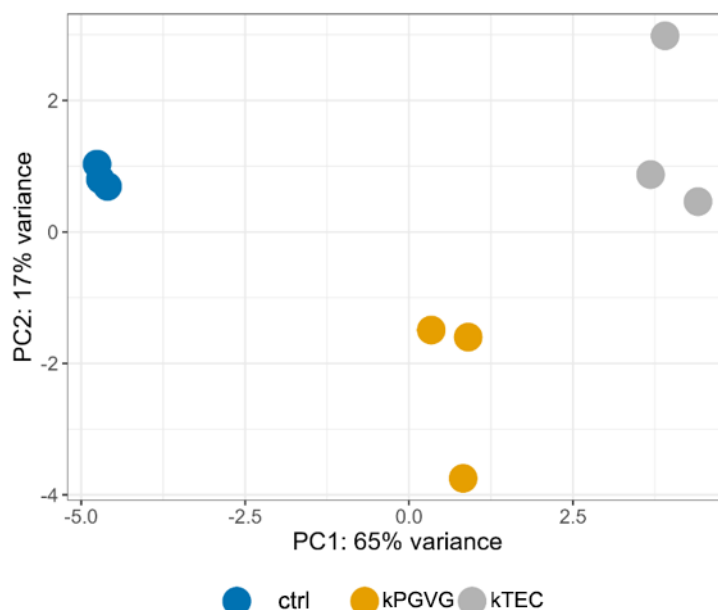
Slika 6. Grafički prikaz vijabilnosti ćelija nakon tretmana V79 ćelija tečnostima za e-cigarete tokom 72 h i BEAS-2B ćelija kondenzatima aerosola tečnosti za e-cigarete tokom 24 h.

Rezultati su normalizovani u odnosu na kontrolu (netretirane ćelije). PGVG+A - tečnosti za e-cigarete koja sadrži PG, VG i aromu; TEC - tečnosti za e-cigarete koja sadrži PG, VG, aromu i nikotin (18 mg/ml); NIK - nikotin; kPGVG - kondenzat aerosola tečnosti koja sadrži PG i VG; kTEC - kondenzat aerosola tečnosti za e-cigarete koja sadrži PG, VG, aromu i nikotin (18 mg/ml).

4.2. Analiza transkriptoma BEAS-2B ćelija nakon izlaganje kondenzatima aerosola tečnosti za e-cigarete

Analiza transkriptoma BEAS-2B ćelija sprovedena je 24 sata nakon izlaganja kondenzatima aerosola tečnosti za e-cigarete u koncentraciji od 2% (v/v). Diferencijalna ekspresija gena ispitana je poređenjem tretmana koji je sadržao kondenzat aerosola propilen glikola i biljnog glicerola (kPGVG) i kondenzat aerosola kompletne tečnosti za e-cigarete koja pored PG i VG sadrži i aromu i nikotin (kTEC) u odnosu na netretiranu kontrolu, kao i direktnim poređenjem kTEC i kPGVG uslova. Analiza je obuhvatila tri biološke replike po uslovu, pri čemu su DEG definisani kao geni sa FDR < 0,05, bez primene praga za log-fold promenu (eng. *log fold change* - LFC).

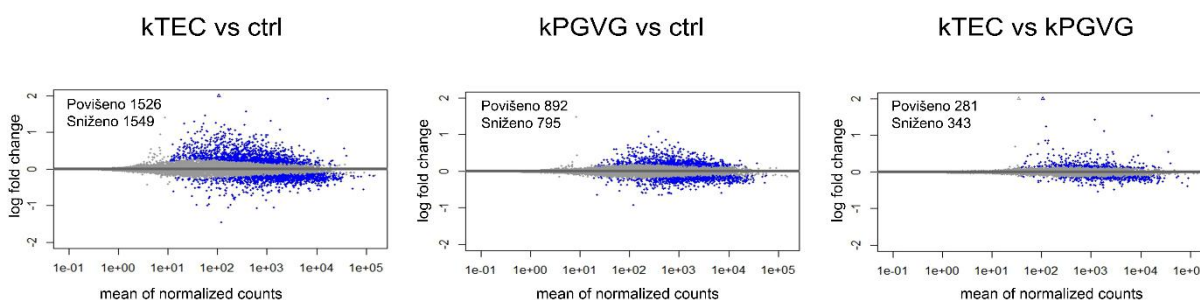
Analiza osnovnih komponenti (eng. *principal component analysis* - PCA) pokazala je jasno razdvajanje uzoraka u zavisnosti od uslova tretmana (Slika 7). Prva osnovna komponenta (PC1), koja objašnjava 65% ukupne varijanse, razdvajala je kontrolne uzorke od tretiranih, dok je druga komponenta (PC2), koja objašnjava dodatnih 17% varijanse, doprinosila razdvajanju između kPGVG i kTEC uslova. Biološke replike unutar svakog uslova grupisale su se blisko jedna uz drugu, što ukazuje na dobru reproduktivnost eksperimentalnih uslova i konzistentnost transkriptomskih profila.



Slika 7. Analiza osnovnih komponenti (PCA) transkriptomskih podataka BEAS-2B ćelija.

PCA grafikon zasnovan na normalizovanim vrednostima ekspresije gena za kontrolne (ctrl), kPGVG i kTEC uzorke nakon 24 h tretmana. Svaka tačka predstavlja jednu biološku repliku. Procenat objašnjene varijanse za PC1 i PC2 prikazan je na odgovarajućim osama.

U poređenju sa kontrolom, identifikovano je ukupno 1677 DEG u kPGVG tretmanu, od čega je 892 bilo snižene, a 785 povišene ekspresije, dok je u kTEC tretmanu detektovano 3075 DEG, uključujući 1549 sniženo i 1526 povišeno eksprimiranih gena. Direktnim poređenjem kTEC i kPGVG uslova identifikovana su 624 DEG, od kojih je 343 bilo snižene, a 281 povišene ekspresije. Distribucija promena u ekspresiji gena prikazana je MA-graficima koji prikazuju odnos između prosečne normalizovane ekspresije (A osa) i LFC vrednosti (M osa) (Slika 8).



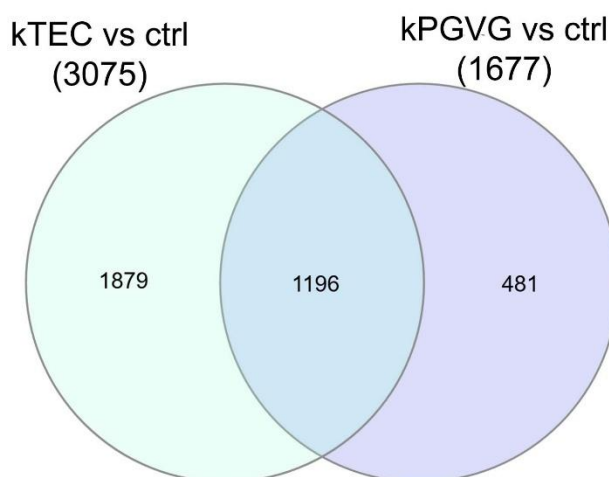
Slika 8. Transkriptomski odgovor BEAS-2B ćelija na izlaganje kondenzatima aerosola tečnosti za e-cigarete.

MA grafici koji prikazuju raspodelu *shrunk* $\log_2$ fold change vrednosti diferencijalno eksprimiranih gena (padj < 0,01) za poređenja kTEC vs ctrl, kPGVG vs ctrl i kTEC vs kPGVG. Plave tačke predstavljaju statistički značajno diferencijalno eksprimirane gene, dok sive tačke označavaju gene bez značajne promene.

Ctrl - netretirane ćelije; kPGVG - kondenzat aerosola tečnosti za e-cigarete koja sadrži PG i VG; kTEC - kondenzat aerosola tečnosti za e-cigarete koja sadrži PG, VG, aromu i nikotin (18 mg/ml).

Preklapanje DEG između analiziranih tretmana prikazano je Venn dijagramom (Slika 9). U poređenju kPGVG i kontrole samo je jedan gen pokazao vrednost $[LFC] > 1$, dok je u poređenju kTEC i kontrole identifikovano ukupno 54 gena sa $[LFC] > 1$, od kojih je 48 bilo povišene, a 6 snižene ekspresije. U direktnom poređenju kTEC i kPGVG identifikovano je 9 gena sa povišenom ekspresijom i $[LFC] >$

1. Funkcionalna anotacija gena sa povišenom ekspresijom u kTEC tretmanu ukazala je da su oni uključeni u različite biološke procese, uključujući inflamatorni odgovor (*IL24*, *SECTM1*, *RSAD2/MX2*, *DMBT1*), metabolizam ksenobiotika (*CYP1A1*, *CYP1B1*, *TIPARP*, *ALDH3A1*) i organizaciju citoskeleta (*VCAN*, *NGFR*). Među genima sa sniženom ekspresijom u ovom poređenju izdvojio se *POSTN*, koji kodira sekretovani protein ekstracelularnog matriksa. Od ukupno 48 gena sa povišenom ekspresijom u poređenju kTEC i kontrole, sedam (*CYP1B1*, *CYP1A1*, *IL24*, *TIPARP*, *SECTM1*, *VIPR1* i *SHISA2*) je takođe bilo povišeno eksprimirano i u poređenju kTEC i kPGVG.



Slika 9. Preklapanje diferencijalno eksprimiranih gena između kTEC i kPGVG tretmana u BEAS-2B ćelijama.

Venn dijagram prikazuje broj zajedničkih i tretman-specifičnih diferencijalno eksprimiranih gena identifikovanih u poređenjima kTEC vs ctrl i kPGVG vs ctrl. Brojevi u preseku označavaju gene zajedničke za oba tretmana, dok brojevi van preseka predstavljaju gene specifične za pojedinačne uslove.

Ctrl - netretirane ćelije; kPGVG - kondenzat aerosola tečnosti za e-cigarete koja sadrži PG i VG; kTEC - kondenzat aerosola tečnosti za e-cigarete koja sadrži PG, VG, aromu i nikotin (18 mg/ml). Venn dijagram je generisan korišćenjem Interactivenn alata dostupnog na: <https://www.interactivenn.net/>

U cilju identifikacije dominantnih funkcionalnih obrazaca indukovanih tretmanima, sprovedena je analiza obogaćenja funkcionalnih kategorija gena (eng. *gene ontology enrichment*, GO), primenom analize prekomerne zastupljenosti funkcionalnih kategorija (eng. *over-representation analysis*, ORA) pomoću alata *enrichGO*. Ovom analizom identifikovani su biološki procesi, molekularne funkcije i ćelijske komponente koje su statistički značajno prekomerno zastupljene među diferencijalno eksprimiranim genima.

Analiza obogaćenja funkcionalnih kategorija pokazala je da se rezultati oba poređenja, kTEC naspram kontrole i kPGVG naspram kontrole, u velikoj meri preklapaju. U sve tri kategorije - biološki procesi, molekularne funkcije i ćelijske komponente, najzastupljeniji su bili procesi povezani sa ribozomima i translacijom.

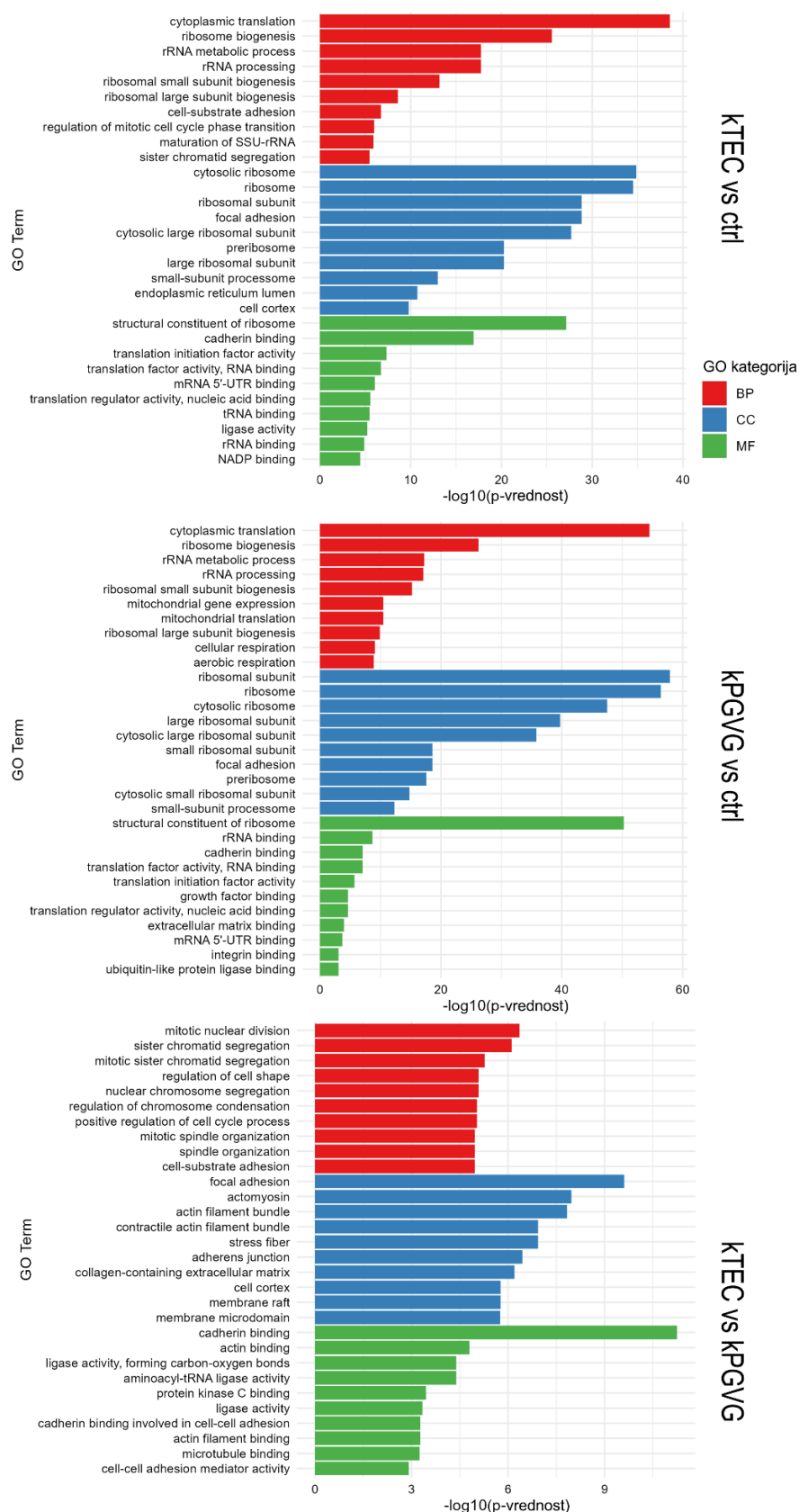
U oba poređenja tretmana sa kontrolom među biološkim procesima najizraženije su bile kategorije povezane sa citoplazmatskom translacijom (GO:0002181), biogenezom ribozoma (GO:0042254), metabolizmom rRNK (GO:0016072) i obradom rRNK (GO:0006364). Ovakav obrazac ukazuje da su promene u transkriptomu dominantno usmerene na komponente translacionog aparata (Slika 5).

Sličan obrazac uočen je i pri analizi kategorija ćelijskih komponenti. U oba poređenja u odnosu na kontrolu posebno su se izdvajali termini povezani sa ribozomima (GO:0005840), uključujući citosolne ribosome (GO:0022626), ribozomske subjediniice (GO:0044391) i ribozomske komplekse

(GO:0005840) (Slika 10). U poređenju kTEC tretmana sa kontrolom, proces fokalne adhezije nalazio se na četvrtom mestu među obogaćenim kategorijama, dok je u poređenju kPGVG tretmana sa kontrolom bio rangiran na sedmom mestu. Ovakav raspored ukazuje da je ovaj proces izraženije pogođen u kTEC nego u kPGVG tretmanu, što dodatno potvrđuje i direktno poređenje kTEC i kPGVG, u kojem je fokalna adhezija bila najznačajnije rangirana kategorija.

U okviru kategorije molekularnih funkcija dominirali su termini povezani sa ribozomskim strukturama i njihovim funkcijama. U oba poređenja tretmana u odnosu na kontrolu posebno su se izdvajali termini strukturna komponenta ribozoma (GO:0003735), zajedno sa funkcijama vezivanja rRNK (GO:0019843) i aktivnostima translacionih faktora (GO:0180051), što ukazuje da su promene u transkriptomu primarno usmerene na procese sinteze proteina (Slika 5). U poređenju kTEC tretmana sa kontrolom, pored kategorija povezanih sa ribozomima izdvojila se i funkcija vezivanja kadherina (GO:0045296). Ovaj proces, slično fokalnoj adheziji, bio je izraženije pogođen u kTEC u odnosu na kPGVG tretman, što potvrđuje i direktno poređenje ovih tretmana, gde je vezivanje kadherina rangirano kao najznačajnija kategorija.

Direktnim poređenjem kTEC sa kPGVG tretmanom uočeno je obogaćenje ćelijskih komponenti fokalna adhezija (GO:0005925), snopovi aktinskih filamenata (GO:0005884) i membranski domeni, što može ukazivati na promene u organizaciji citoskeleta i ćelijskoj adheziji (Slika 10).



Slika 10. GO analiza obogaćenja diferencijalno eksprimiranih gena u BEAS-2B ćelijama.

Analiza obogaćenja GO termina za diferencijalno eksprimirane gene specifične za poređenja kTEC vs ctrl, kPGVG vs ctrl i kTEC vs kPGVG. Prikazana je ORA analiza sa po 10 najznačajnije obogaćenih termina u okviru ontoloških

kategorija biološki proces (BP), ćelijska komponenta (CC) i molekularna funkcija (MF). Vrednosti na x-osi predstavljaju $-\log_{10}(p\text{-vrednosti})$. Analiza je sprovedena u R-u korišćenjem paketa *ClusterProfiler*.

Ctrl - netretirane ćelije; kPGVG - kondenzat aerosola tečnosti za e-cigarete koja sadrži PG i VG; kTEC - kondenzat aerosola tečnosti za e-cigarete koja sadrži PG, VG, aromu i nikotin (18 mg/ml).

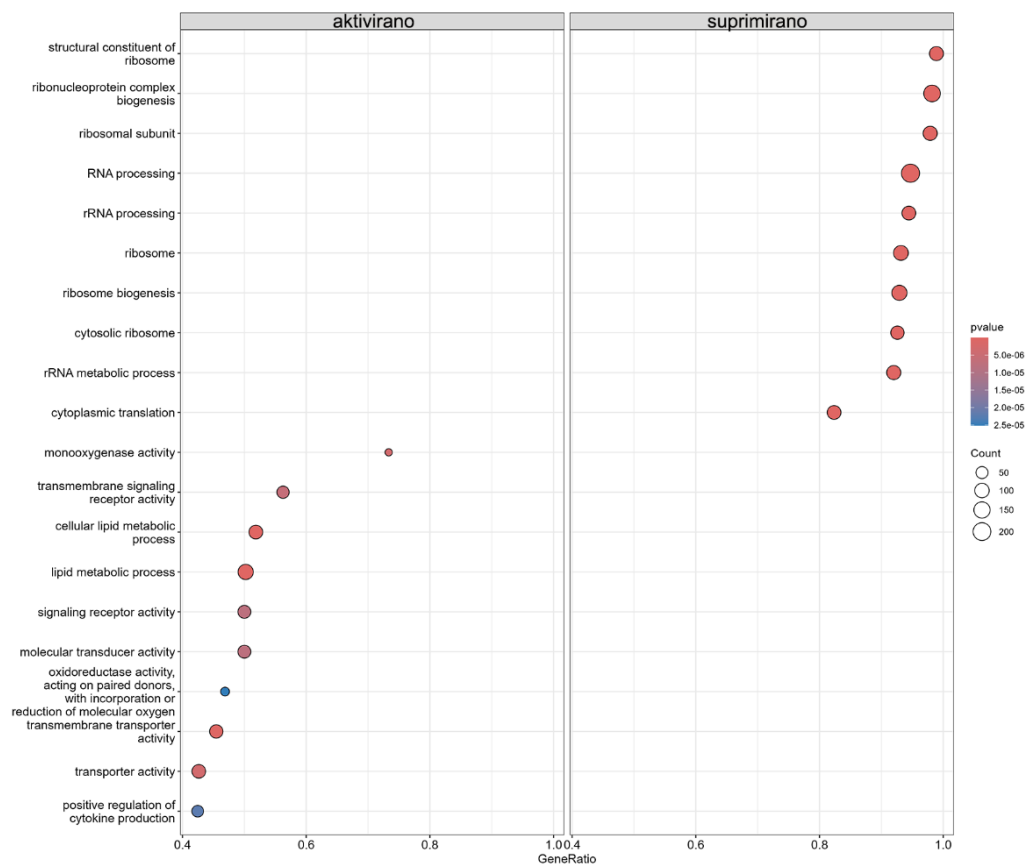
Radi utvrđivanja smera promena ekspresije na nivou funkcionalnih procesa, primenjena je analiza obogaćenja setova gena (eng. *gene set enrichment analysis*, GSEA). Rezultati ove analize pokazali su da je ćelijska translacija suprimirana u ćelijama tretiranim kTEC i kPGVG u poređenju sa kontrolom (Slika 11), što ukazuje na negativan uticaj oba tretmana na procese sinteze proteina.

U poređenju kTEC tretmana sa kontrolom izdvojila se povećana zastupljenost procesa povezanih sa metabolizmom lipida, što je kasnije potvrđeno fluorescentnim obeležavanjem neutralnih lipida. U istom poređenju najizraženije su bile i aktivacije transmembranske signalne receptorske aktivnosti i aktivnosti molekularnih transduktora. Ove promene mogu odražavati izmene u međućelijskim interakcijama i membranskom transportu.

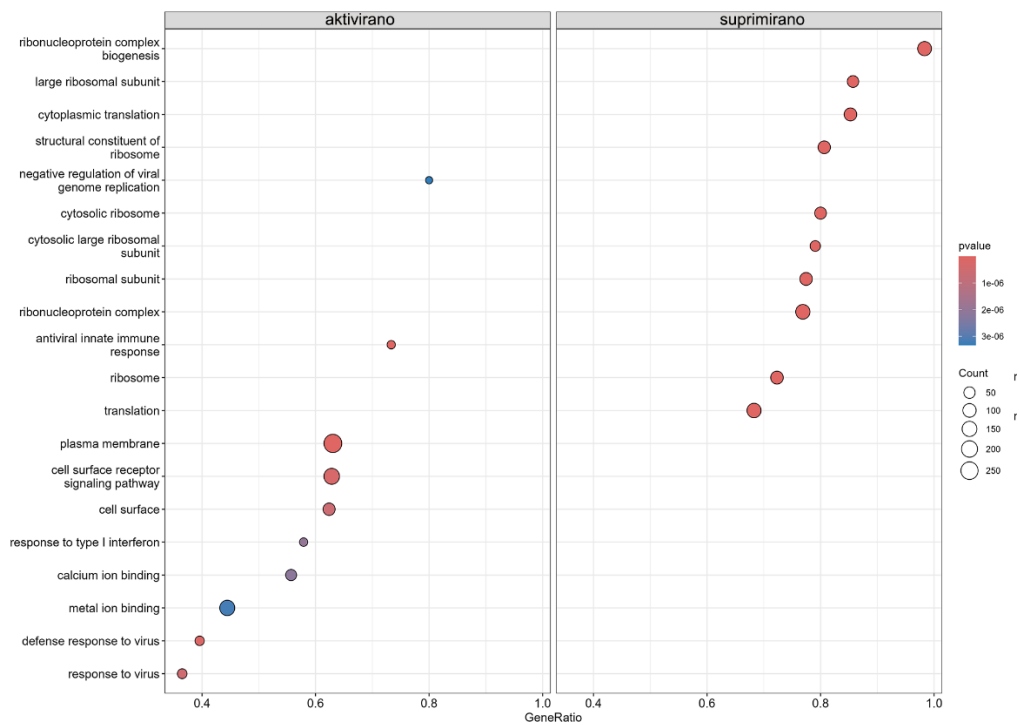
U poređenju kPGVG tretmana sa kontrolom identifikovano je obogaćenje funkcija povezanih sa vezivanjem metalnih jona, što je u skladu sa ranije objavljenim podacima iz literature (65,66). U ovom poređenju povećanje je takođe zabeleženo u terminima povezanim sa plazma membranom i vezivanjem receptora na površini ćelije, što može ukazivati na promene u međućelijskim interakcijama i membranskom transportu.

Dodatno, analiza je pokazala obogaćenje procesa pozitivne regulacije produkcije citokina u kTEC poređenju sa kontrolom kao i odgovora na virus u poređenju kPGVG i kontrole, što ukazuje na aktivaciju signalnih puteva povezanih sa imunskim odgovorom (Slika 11).

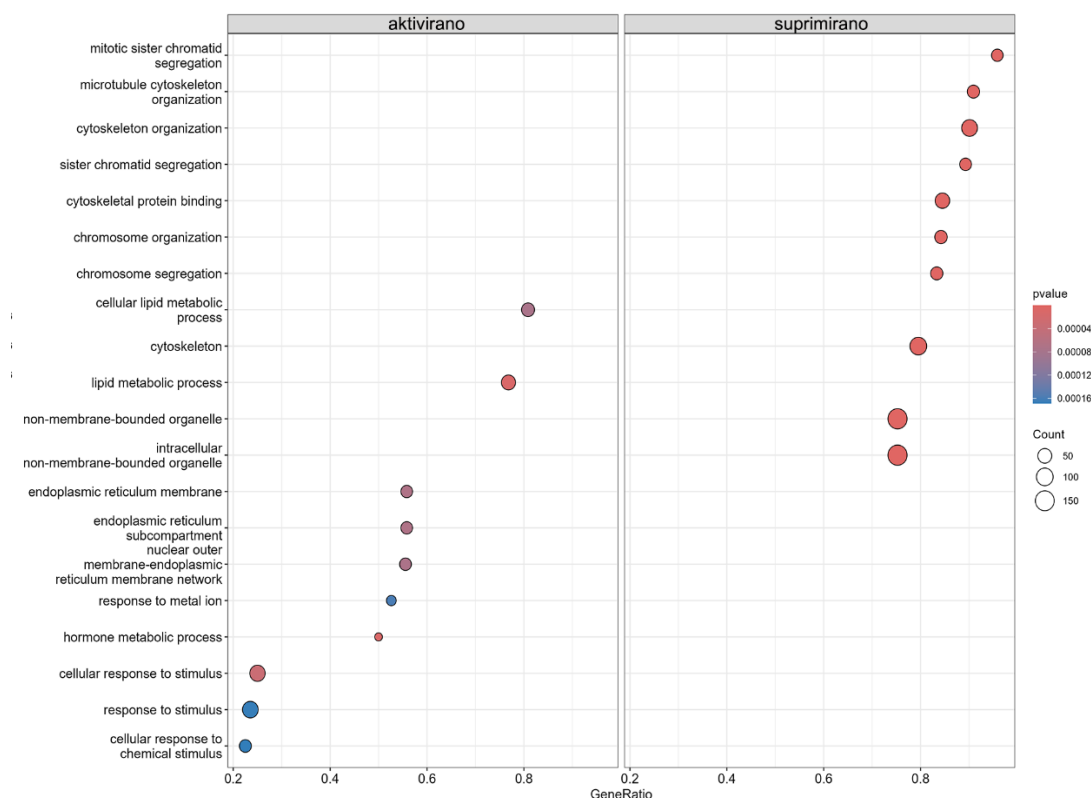
kTEC vs ctrl



kPGVG vs ctrl



kTEC vs kPGVG



Slika 11. GSEA obogaćenja setova gena u BEAS-2B ćelijama nakon izlaganja kondenzatima aerosola tečnosti za e-cigarete.

Rezultati GSEA prikazani su za poređenja kTEC vs ctrl, kPGVG vs ctrl i kTEC vs kPGVG. Grafici prikazuju najznačajnije obogaćene biološke procese i ćelijske komponente, pri čemu položaj tačaka odražava vrednost normalizovanog obogaćenja, dok veličina i boja označavaju statističku značajnost i broj gena uključenih u dati set. Analiza ukazuje na supresiju puteva povezanih sa translacijom u oba tretmana u odnosu na kontrolu, kao i na razlike u procesima ćelijske adhezije, organizacije aktinskog citoskeleta i mitotičkih događaja između kTEC i kPGVG uslova.

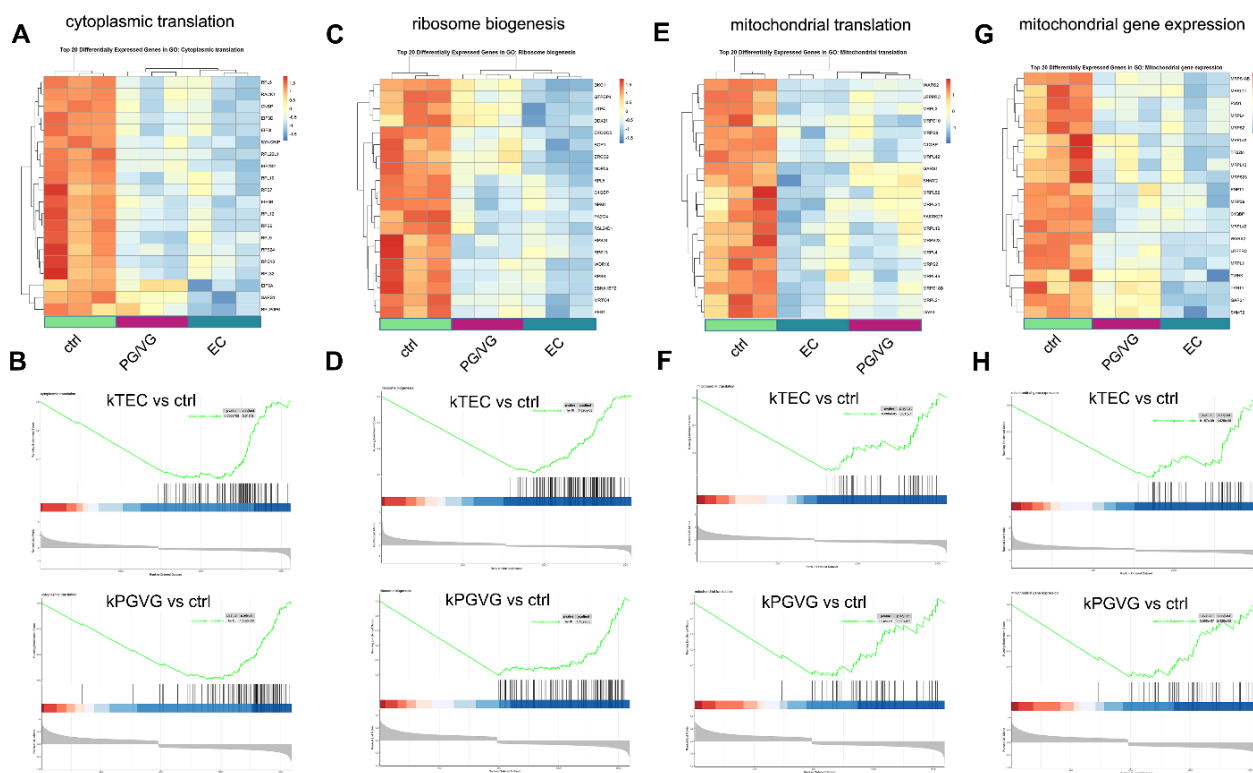
Ctrl - netretirane ćelije; kPGVG - kondenzat aerosola tečnosti za e-cigarete koja sadrži PG i VG; kTEC - kondenzat aerosola tečnosti za e-cigarete koja sadrži PG, VG, aromu i nikotin (18 mg/ml).

Grafički prikaz hijerarhijske klaster analize ekspresije gena (eng. *heatmap*) uključenih u GO kategoriju proces citoplazmatske translacije pokazala je da se među 20 najizraženije promenjenih gena nalaze *EIF3A*, *EIF3B*, *EIF3I* i *EIF3D*, koji kodiraju subjedinice eukariotskog inicijacionog faktora 3 (eIF3), kao i geni *RPL5* i *RPS6* koji kodiraju strukturne komponente ribozoma (Slika 12 A, C). Iako su ovi geni rangirani među najviše promenjenim unutar analiziranog seta gena, nijedan od njih nije dostigao vrednosti $[LFC] > 0,5$, što ukazuje da su promene u njihovoj ekspresiji relativno suptilne. Smanjenje ekspresije transkriptata uključenih u citoplazmatsku translaciju u tretiranim ćelijama dodatno je ilustrovano grafičkim prikazima obogaćenja na Slikama 12B i 12D.

Uporedo sa promenama u citoplazmatskoj translaciji, analiza je ukazala i na poremećaje u procesima povezanim sa funkcijom mitohondrija. U tom kontekstu, analiza obogaćenja funkcionalnih kategorija gena primenom ORA ukazala je da su u poređenju kPGVG naspram kontrole među deset najznačajnije obogaćenih bioloških procesa zastupljeni i procesi povezani sa ekspresijom mitohondrijskih gena (GO:0140053) i mitohondrijskom translacijom (GO:0032543), kao i aerobnom (GO:0009060) i ćelijskom respiracijom (GO:0045333), što ukazuje na promene u funkciji mitohondrija (Slika 12).

Analiza obogaćenja setova gena pokazala je da su geni uključeni u procese mitohondrijske translacije i ekspresije mitohondrijskih gena imali smanjenu ekspresiju u ćelijama tretiranim kTEC i kPGVG u poređenju sa kontrolom (Slika 12 F, H). Grafički prikazi obogaćenja ukazuju na negativan pomak setova gena u oba poređenja, što sugerise da tretmani utiču na procese povezane sa mitohondrijskom biosintezom proteina. Smanjenje ekspresije bilo je izraženije u kTEC tretmanu, iako je sličan trend uočen i u kPGVG uslovima. Nasuprot tome, geni uključeni u procese aerobne i ćelijske respiracije nisu pokazali značajne promene u kTEC tretmanu.

Među genima sa sniženom ekspresijom u oba tretmana nalazili su se geni koji kodiraju mitohondrijske ribozomske proteine nuklearnog porekla, uključujući *MRPS18B*, *MRPL3*, *MRPL21*, *DAP3* i *MRPL4* (Slika 12 E, G). Pored toga, gen *COA3*, koji učestvuje u sklapanju citohrom c oksidaze, kao i mitohondrijski gen *ND2*, koji kodira subjedinicu II NADH-dehidrogenaze, pokazali su blago sniženu ekspresiju u kPGVG tretmanu u odnosu na kontrolu, dok u kTEC tretiranim ćelijama nisu identifikovani kao DEG.



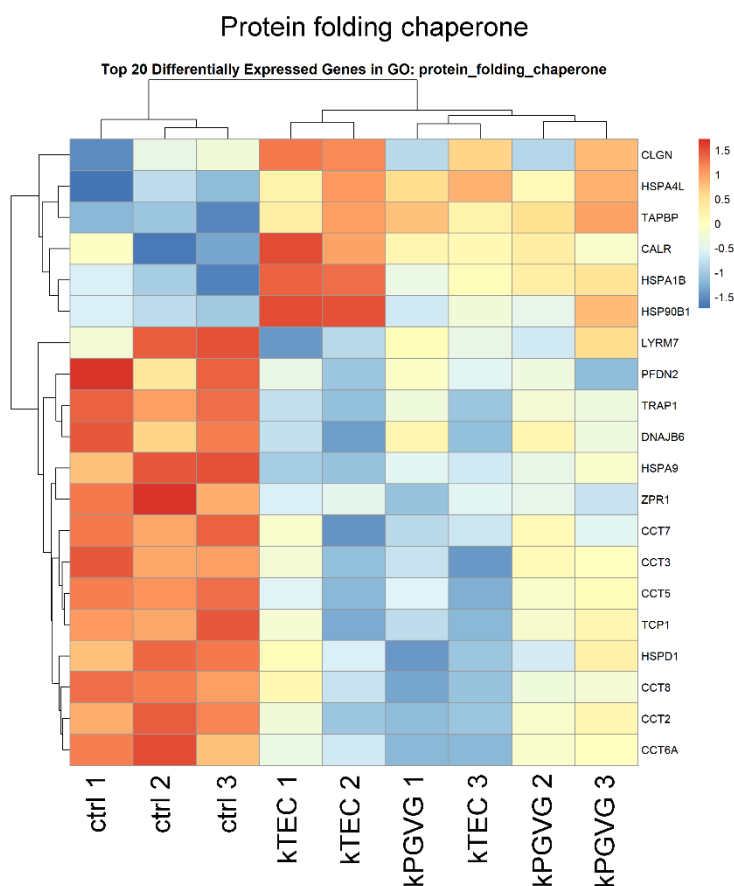
Slika 12. Grafički prikaz promena u setovima gena povezanim sa translacijom i funkcijom mitohondrija u BEAS-2B ćelijama nakon izlaganja kondenzatima aerosola tečnosti za e-cigarete.

(A, C, E, G) Hijerarhijski klasterisane *heatmap*-e 20 najznačajnije diferencijalno eksprimiranih gena u okviru setova gena: citoplazmatske translacije (A), biogeneze ribozoma (C), mitohondrijske translacije (E) i ekspresije mitohondrijskih gena (G). Nivo ekspresije prikazan je gradijentom boja od plave (niža ekspresija) do crvene (viša ekspresija).

(B, D, F, H) GSEA grafici obogaćenja za iste setove gena: citoplazmatska translacija (B), biogeneza ribozoma (D), mitohondrijska translacija (F) i ekspresija mitohondrijskih gena (H) u BEAS-2B ćelijama tretiranim kondenzatima aerosola e-cigareta. Zelena linija predstavlja trend skorova obogaćenja (eng. *enrichment score*, ES), pri čemu negativan ES ukazuje na sniženu regulaciju prikazanih procesa.

Ctrl - netretirane ćelije; kPGVG - kondenzat aerosola tečnosti za e-cigarete koja sadrži PG i VG; kTEC - kondenzat aerosola tečnosti za e-cigarete koja sadrži PG, VG, aromu i nikotin (18 mg/ml).

Hijerarhijska klaster analiza gena uključenih u GO kategoriju uvijanje proteina posredovano šaperonima (GO:0044183) (eng. *protein folding chaperone*) pokazala je razdvajanje kontrolnih i tretiranih uzoraka (Slika 13). Kontrolni uzorci karakterisani su višim nivoima ekspresije većine analiziranih šaperonskih gena, dok je u tretiranim ćelijama (kTEC i kPGVG) uočen opšti trend smanjenja njihove ekspresije. Posebno izraženo sniženje zabeleženo je za gene koji kodiraju članove CCT kompleksa i proteine HSP porodice, što ukazuje na promene u ekspresiji ključnih komponenti sistema šaperon-posredovanog uvijanja proteina na transkripcionom nivou.



Slika 13. Hijerarhijska klaster analiza diferencijalno eksprimiranih gena uključenih u GO kategoriju „protein folding chaperone“ u BEAS-2B ćelijama.

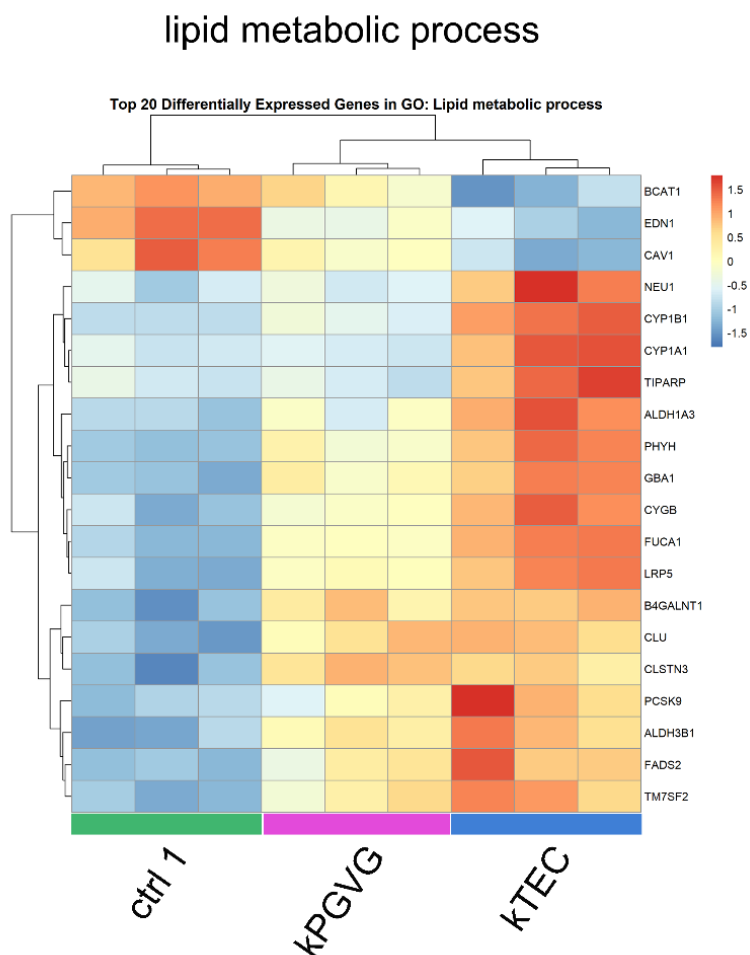
Prikazana je *heatmap*-a 20 najznačajnije diferencijalno eksprimiranih gena povezanih sa uvijanjem proteina posredovanim šaperonima u kontrolnim (ctrl), kTEC i kPGVG uzorcima. Nivoi ekspresije predstavljeni su gradijentom boja od plave (niža ekspresija) do crvene (viša ekspresija), nakon normalizacije i skaliranja po genu.

Heatmap-a gena uključenih u GO kategoriju metaboličkih procesa lipida (GO:0006629) pokazuje različite obrasce ekspresije između kontrolnih i tretiranih ćelija (Slika 11; Slika 14). Većina analiziranih gena pokazuje niže nivoe ekspresije u kontrolnim uzorcima, dok je u tretiranim ćelijama, posebno u kTEC tretmanu, uočen trend njihove povećane ekspresije. Uzorci tretirani kPGVG pokazivali su uglavnom intermedijaran obrazac ekspresije između kontrolnih i kTEC uzoraka.

Među genima sa najizraženijim povećanjem ekspresije u kTEC tretmanu izdvajaju se *CYP1A1* i *CYP1B1*, koji pripadaju porodici citohroma P450 i učestvuju u metabolizmu lipofilnih jedinjenja i ksenobiotika. Ovi geni su među najjače eksprimiranim u kTEC uzorcima u poređenju sa kontrolnim ćelijama, dok je njihova ekspresija u kPGVG tretmanu umereno povećana. Sličan obrazac ekspresije

uočen je i za gene povezane sa metabolizmom i remodelovanjem lipida *ALDH3A1* i *TIPARP* kao i *NEU1* uključen u metabolizam glikolipida i lizozomalni katabolizam.

Nasuprot tome, pojedini geni unutar ove funkcionalne kategorije, poput *BCAT1*, koji kodira ključni enzim u metabolizmu razgranatih aminokiselina, pokazivali su višu ekspresiju u kontrolnim uzorcima i smanjene nivoe transkripata u tretiranim ćelijama.



Slika 14. Hijerarhijska klaster analiza diferencijalno eksprimiranih gena uključenih u GO kategoriju „lipid metabolic process“ u BEAS-2B ćelijama.

Prikazana je *heatmap*-a 20 najznačajnije DEG povezanih sa metabolizmom lipida u kontrolnim (ctrl), kPGVG i kTEC uslovima. Nivoi ekspresije gena predstavljeni su gradijentom boja od plave (niža ekspresija) do crvene (viša ekspresija), nakon normalizacije i skaliranja po genu.

Kako bi se ispitalo da li se uočene promene na nivou transkriptoma odražavaju i na nivou proteina, u nastavku je analiziran proteomski odgovor BEAS-2B ćelija izloženih istim eksperimentalnim uslovima.

4.3. Analiza proteoma BEAS-2B ćelija nakon izlaganje kondenzatima aerosola tečnosti za e-cigarete

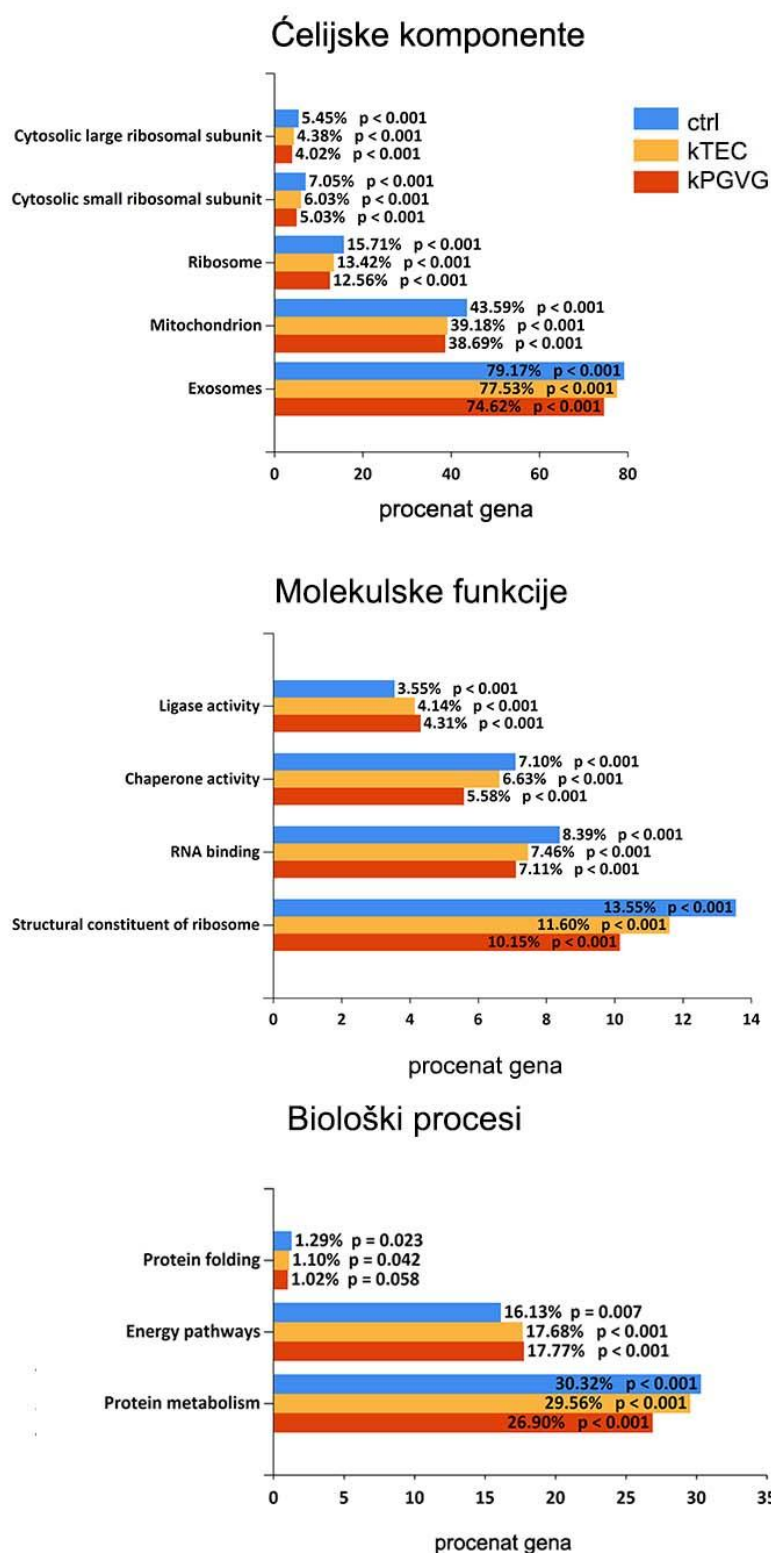
Neselektivna proteomska analiza (eng. *shotgun proteomics*) zasnovana na LC-MS/MS pristupu omogućava istovremeno sagledavanje globalnih promena u proteinskom profilu ćelija, pružajući uvid u funkcionalne poremećaje na nivou bioloških procesa, molekularnih funkcija i ćelijskih komponenti kao i uvid u modifikacije proteina. Na osnovu podataka dobijenih *shotgun* proteomskim analizama, sprovedena je analiza obogaćenja funkcionalnih kategorija definisanih GO klasifikacijom, kao i identifikacija značajno diferencijalno eksprimiranih proteina (DEP) između kontrolne i tretiranih grupa, analiziranih u triplicatima.

Na slici 15 prikazani su odabrani primeri statistički značajno obogaćenih kategorija u kontrolnim i tretiranim uzorcima. Dobijeni rezultati ukazuju na izražen poremećaj metabolizma proteina u oba tretmana, koji se manifestuje smanjenim obogaćenjem odgovarajućih GO kategorija.

U okviru aspekta ćelijske komponente, prikazane kategorije ukazuju na smanjenu zastupljenost proteina povezanih sa ribozomskim strukturama i mitohondrijama. U oba tretmana zabeležen je manji procenat proteina svrstanih u ribozomske kategorije u odnosu na kontrolu, što se odnosi kako na ribosome kao celinu, tako i na male i velike citosolne ribozomske subjedinice. Sličan obrazac uočen je i za proteine povezane sa mitohondrijama, čiji je udeo u tretiranim uzorcima bio niži nego u kontrolnim ćelijama (Slika 15).

Promene povezane sa ribozomskim komponentama uočene su i u okviru aspekta molekulske funkcije. U tretiranim uzorcima zabeležen je manji procenat proteina svrstanih u kategoriju strukturnih komponenti ribozoma i vezivanje za RNK. U ovom aspektu uočena i povećana zastupljenost kategorije aktivnosti ligaza koja u zavisnosti od toga koje su ligaze pogođene može imati različite biološke implikacije (Slika 15). Takođe, primećena je i manja zastupljenost kategorije aktivnosti šaperona, što je u skladu sa rezultatima dobijenim analizom transkriptoma (Slika 8) i može ukazivati na poremećaje u procesima uključenim u održavanje pravilnog uvijanja i stabilnosti proteina.

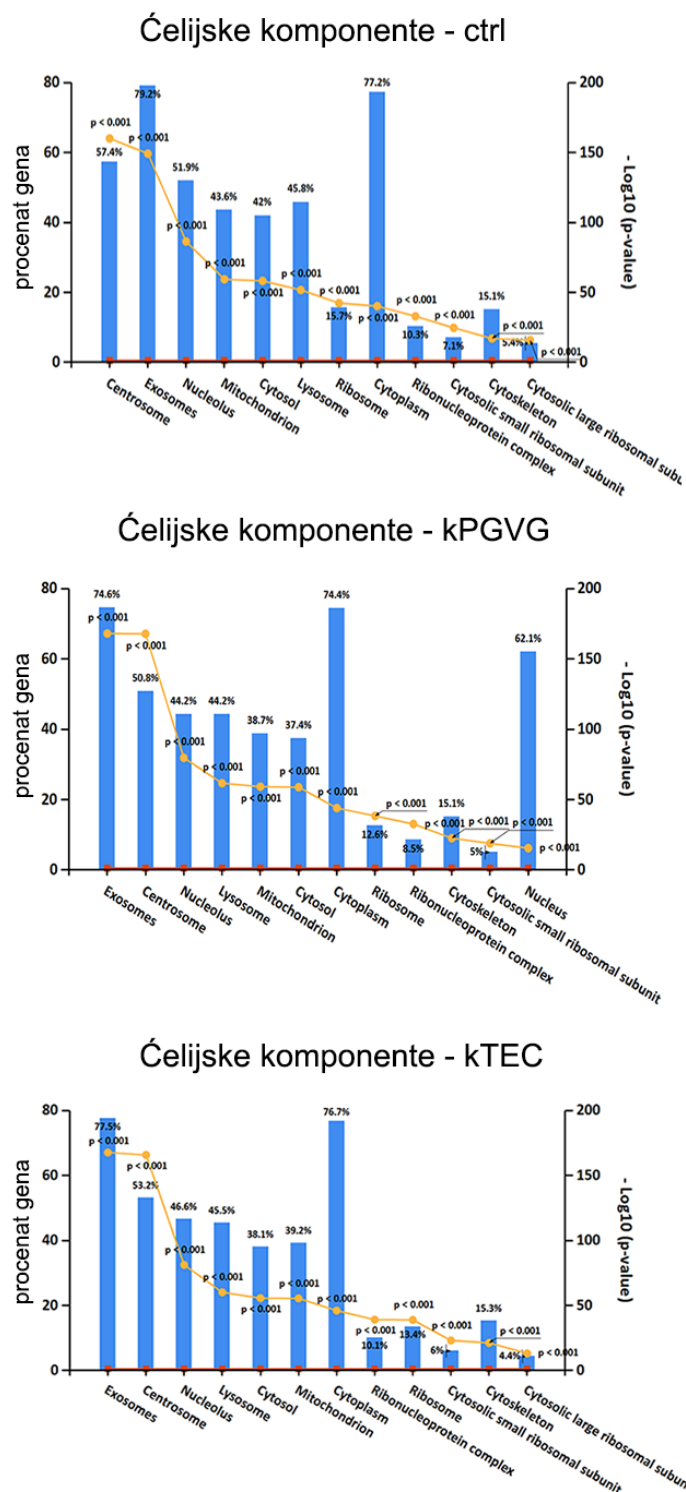
U okviru aspekta bioloških procesa, kategorije povezane sa metabolizmom proteina i uvijanjem proteina bile su manje zastupljene u tretiranim ćelijama u poređenju sa kontrolom. Sličan obrazac uočen je i u drugim aspektima GO analize, gde su kategorije povezane sa ribozomskim strukturama i šaperonskom aktivnošću takođe pokazale smanjenu zastupljenost. U okviru aspekta bioloških procesa uočeno je da je kategorija energetskih puteva zastupljenija u tretiranim ćelijama nego u kontrolnim. Iako je razlika relativno mala, ovaj obrazac je uočen paralelno sa manjom zastupljenošću kategorija povezanih sa mitohondrijama u okviru aspekta ćelijskih komponenti, što može ukazivati na reorganizaciju energetskog metabolizma tretiranih ćelija (Slika 15).



Slika 15. GO profilisanje proteoma BEAS-2B ćelija nakon tretmana kondenzatima aerosola tečnosti za e-cigarete.

Poređenje GO kategorija ćelijskih komponenti, molekulskih funkcija i bioloških procesa između kontrolnih (ctrl), kTEC i kPGVG uslova zasnovano je na proteomskim podacima i analizirano pomoću softvera *FunRich* 3.1.3. Prikazani su reprezentativni primeri statistički značajno obogaćenih kategorija, izraženi kao procenat gena u svakoj GO grupi. Vrednosti p izračunate su hipergeometrijskim testom uz Bonferoni korekciju za višestruka poređenja.

Kako bi se uočeni obrasci GO obogaćenja dodatno sagledali na nivou relativnog rangiranja funkcionalnih kategorija, primenjen je i automatizovani pristup selekcije najznačajnijih kategorija korišćenjem softvera *FunRich* (Slika 16). Prva kolona u svakom grafiku predstavlja ćelijske komponente sa najizraženijim obogaćenjem, dok su ostali procesi prikazani opadajućim redosledom. Stoga, svaka promena u redosledu ćelijskih komponenti između tretmana u odnosu na kontrolu ukazuje na značajnu reorganizaciju funkcionisanja ćelija. Ovaj pristup je pokazao da ribozomi zauzimaju 7., 8. i 9. mesto u kontrolnim, kPGVG i kTEC uslovima, redom, dok mitohondrije zauzimaju 4., 5. i 6. mesto u istim uslovima. Pored toga, u tretiranim uslovima uočeno je obogaćenje kategorije lizozoma u okviru aspekta ćelijske komponente, pri čemu su lizozomi rangirani na 4. mestu u kTEC i kPGVG uslovima, dok su u kontrolnim uzorcima zauzimali 6. mesto.



Slika 16. GO profilisanje ćelijskih komponenti u proteomu BEAS-2B ćelija nakon izlaganja kondenzatima aerosola tečnosti za e-cigarete.

Analiza obogaćenja kategorije ćelijskih komponenti sprovedena je za kontrolne (ctrl), kPGVG i kTEC uslove na osnovu proteomskih podataka. Stubičasti dijagrami prikazuju procenat gena unutar svake GO kategorije, dok linijski grafikon predstavlja $-\log_{10}(p\text{-vrednosti})$ kao meru statističke značajnosti obogaćenja. p-vrednosti su izračunate hipergeometrijskim testom uz Bonferoni korekciju za višestruka poređenja. Analiza i vizualizacija izvedene su pomoću softvera *FunRich* 3.1.3.

4.4. Modifikacije proteina u BEAS-2B ćelijama nakon izlaganja kondenzatima aerosola tečnosti za e-cigarete

Pored promena u zastupljenosti proteina i funkcionalnih kategorija, analiza proteoma omogućila je i identifikaciju modifikacija proteina koje mogu nastati kao posledica izlaganja ćelija kondenzatima aerosola tečnosti za e-cigarete.

Profil modifikacija proteina u BEAS-2B ćelijama omogućio je istovremenu kvalitativnu i kvantitativnu procenu posttranslacionih i hemijskih modifikacija proteina (PM), uključujući fiziološke modifikacije (P), artefakte (A) i hemijske derivate (eng. *chemical derivatives*, CD), identifikovane u kontrolnim i tretiranim uslovima (Slika 17, Tabela 1). Analiza je pokazala da tretman kondenzatom aerosola tečnosti za e-cigarete dovodi do značajnog povećanja broja i raznovrsnosti CD modifikacija u poređenju sa kontrolom.

Analiza raspodele modifikacija između eksperimentalnih uslova pokazala je da modifikacije koje se pojavljuju u svim uzorcima pretežno pripadaju fiziološkim posttranslacionim modifikacijama. U preseku svih uslova identifikovane su 22 zajedničke modifikacije, među kojima dominiraju fiziološke modifikacije i artefakti analize, dok je samo jedna modifikacija klasifikovana kao hemijski derivat (Slika 17).

Nasuprot tome, modifikacije koje su specifične za tretirane uzorke u većoj meri pripadaju grupi hemijskih derivata. U kTEC tretiranim ćelijama identifikovano je 18 modifikacija koje nisu detektovane u kontrolnim uslovima, pri čemu je 14 njih klasifikovano kao CD. Sličan, ali nešto manje izražen obrazac uočen je i u kPGVG tretmanu, gde je među modifikacijama specifičnim za ovaj uslov takođe dominirala grupa CD (Slika 17). Nasuprot tome, među modifikacijama specifičnim za kontrolne uzorke preovlađuju fiziološke posttranslacione modifikacije.

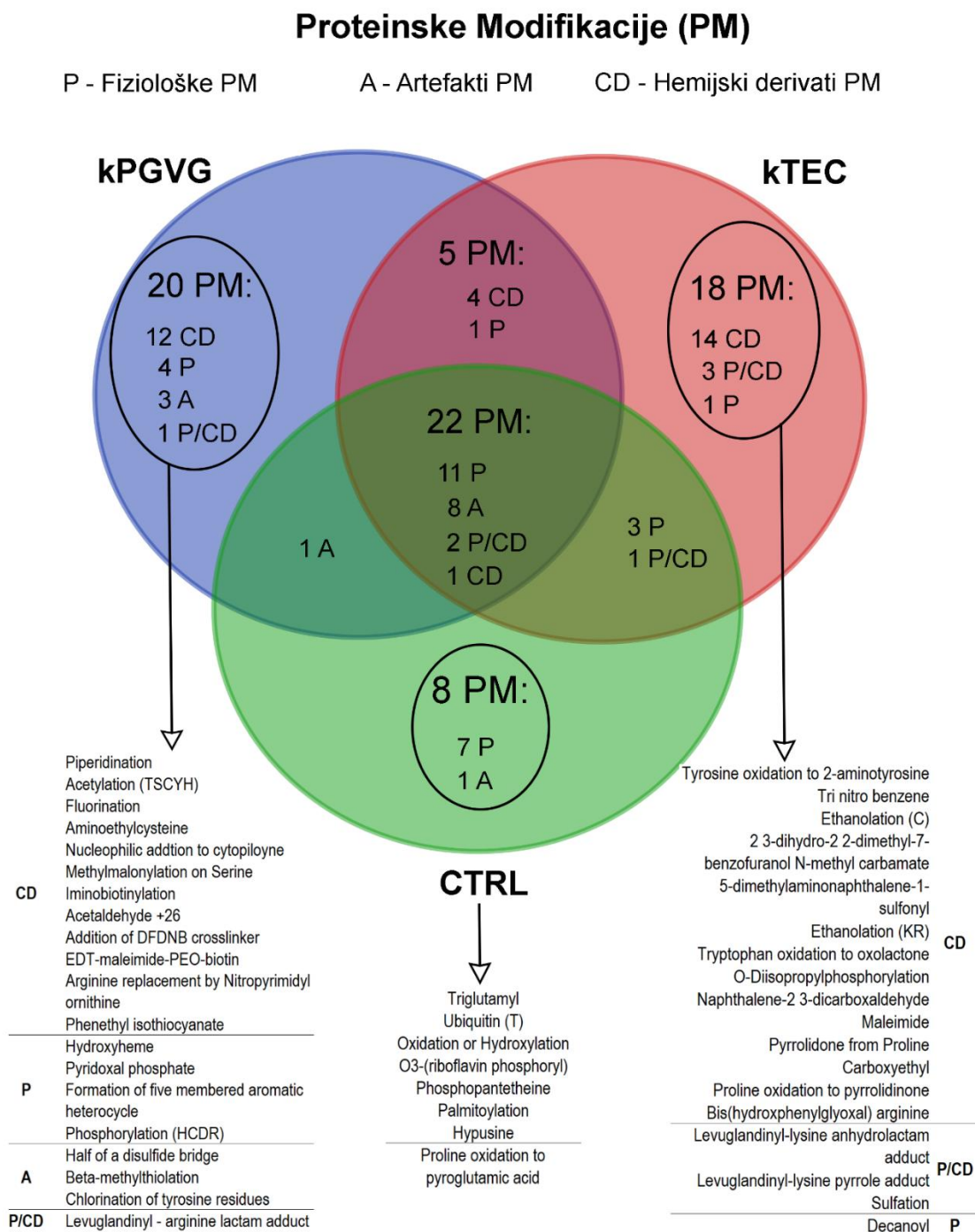
Ovaj obrazac je u skladu sa ukupnim brojem CD identifikovanih u svakom eksperimentalnom uslovu. U kTEC uzorcima detektovano je 25 CD modifikacija među ukupno 49 identifikovanih modifikacija proteina, dok je u kPGVG uzorcima registrovano 20 CD modifikacija od ukupno 48. U kontrolnim ćelijama identifikovane su četiri modifikacije ove kategorije od ukupno 35 detektovanih PM.

Dalja klasifikacija modifikacija ukazala je i na razlike u zastupljenosti pojedinih funkcionalnih grupa. U kTEC tretmanu identifikovano je sedam modifikacija koje su u okviru korišćene baze klasifikovane kao toksične, u kPGVG uzorcima detektovane četiri takve modifikacije, dok su u kontrolnim ćelijama modifikacije ove kategorije nisu registrovane. Toksične modifikacije detektovane u kTEC tretmanu obuhvatale su, između ostalog, trinitrobenzen, 2,3-dihidro-2,2-dimetil-7-benzofuranol N-metil-karbamat (karbofuran), bis(hidroksifenilglicoksal)-arginin, 5-dimetilaminonaftalen-1-sulfonyl, O-diizopropilfosforilaciju, N-sukcinimidil-2-morfolin-acetat i naftalen-2,3-dikarboksaldehid (Tabela 1).

Pored toga, u kTEC tretmanu zabeležen je i veći broj oksidativnih modifikacija proteina u odnosu na druge eksperimentalne uslove. Ukupno je detektovano 14 oksidativnih modifikacija u kTEC uzorcima, u poređenju sa 7 u kPGVG i 8 u kontrolnim ćelijama. Među njima su identifikovane modifikacije kao što su oksidacija prolina do pirolidinona, oksidacija triptofana do oksolaktona i oksidacija tirozina do 2-aminotirozina (Tabela 1).

Pored CD, u svim eksperimentalnim uslovima detektovane su i brojne fiziološke posttranslacione modifikacije, uključujući acetilaciju, metilaciju, fosforilaciju i lipidne modifikacije. Ove modifikacije prisutne su i u kontrolnim ćelijama, ali su u tretiranim uzorcima zabeležene promene u njihovoj relativnoj zastupljenosti i saturaciji unutar proteoma (Tabela 1).

Zbirno posmatrano, analiza modifikacija proteina ukazuje na jasan obrazac u kome tretman BEAS-2B ćelija kondenzatima aerosola tečnosti za e-cigarete menja obrazac hemijskih i posttranslacionih modifikacija proteina. U tretiranim uzorcima zabeležen je veći broj hemijskih derivata u poređenju sa kontrolnim ćelijama, dok modifikacije zajedničke za tretirane i netretirane ćelije pretežno pripadaju fiziološkim posttranslacionim modifikacijama.



Slika 17. Venn dijagram raspodele PM identifikovanih u BEAS-2B ćelijama nakon izlaganja kondenzatima aerosola tečnosti za e-cigarete.

Prikazano je preklapanje modifikacija detektovanih u kontrolnim (ctrl), kPGVG i kTEC uslovima. Brojevi unutar dijagrama označavaju ukupan broj modifikacija u odgovarajućim skupovima, dok su pojedinačne modifikacije navedene ispod dijagrama. Modifikacije su klasifikovane kao fiziološke (P), artefakti (A) i hemijski derivati (CD).

Tabela 1. Relativni profil modifikacija proteina u proteomima kontrolnih i tretiranih BEAS-2B ćelija.

Prikazane su identifikovane modifikacije proteina klasifikovane prema tipu modifikacije, *Unimod* oznaci i prosečnom pomeraju mase (Δm), zajedno sa relativnim odnosom (*Ratio*) i procentualnim udelom (%) u proteomu za kontrolne (ctrl), kPGVG i kTEC uslove. Modifikacije su grupisane u oksidativne modifikacije, fiziološke posttranslacione modifikacije (PTM), toksične hemijske derivate, sredinske hemijske derivate i artefakte. Kvantifikacija je zasnovana na zbiru površina ispod XIC (eng. *extracted ion chromatogram*) krivih modifikovanih peptida detektovanih u LFQ proteomskoj analizi.

Tip modifikacije	Unimod oznaka	prosečan Δm pomeraj (a.u.)	ctrl		kPGVG		kTEC	
			Ratio	%	Ratio	%	Ratio	%
OKSIDATIVNE MODIFIKACIJE								
I Karbonilacija usled direktne oksidacije bočnih lanaca aminokiselina lizina (Lys), treonina (Thr) i prolina (Pro)								
Proline oxidation to pyrrolidinone	CD	-30.0260	N/A	0	N/A	0	∞	100
Pyrrolidone from Pro	CD	-28.0101	N/A	0	N/A	0	∞	14
2-amino-3-oxo-butanoic_acid from Thr	P/CD	-2.0159	1.0±1.2	6±7	0.5±0.5	4±3	0.03±0.01	0.5±0.2
Lysine oxidation to amino adipic semialdehyde	P/CD	-1.0311	N/A	0	1.0±0.1	43±37	2.2	62
II Karbonilacija usled Michaelove adicije α,β-nezasićenih aldehida nastalih tokom lipidne peroksidacije								
Levuglandinyl-lysine anhydropyrrole adduct	P/CD	298.4192	1.0±0.1	39±4	1.1±0.5	34±12	1.7±1.4	24±10
Levuglandinyl - arginine lactam adduct	P/CD	290.3939	N/A	0	∞	100	N/A	0
III Karbonilacioni događaji nastali usled formiranja AGEs (krajnjih produkata uznapredovale glikacije)								
Condensation product of glucosone on Arg	CD	160.12470	N/A	0	1.0	3	1.6	56
Carboxyethyl (H)	CD	72.06270	N/A	0	N/A	0	∞	0.4
Druge direktne oksidativne modifikacije								
Ethanolation (K and R)	CD	44.0526	N/A	0	N/A	0	∞	12±6
Dihydroxy (K)	P	31.9988	1	21	0	0	0	0
Dihydroxy (R and/or P)	P	31.9988	N/A	0	N/A	0	∞	97±3
Met double oxidation (sulphone)	A	31.9988	1.0±0.7	4	0	0	0.2	2
Met single oxidation (sulfoxide)	P/CD	15.9994	1.0±0.2	28±7	1.0±0.5	23±6	0.7±0.1*	23±6
His and Trp oxidation	A	15.9994	1.0±0.5	8±2	1.3±0.4	4±2	0.7±0.1	8±1
Oxidation or Hydroxylation of Asn	P	15.9994	1	38	0	0	0	0
Tyrosine oxidation to 2-aminotyrosine	CD	15.0146	N/A	0	N/A	0	∞	5
Proline oxidation to pyroglutamic acid	A	13.9835	1	3	0	0	0	0
Tryptophan oxidation to oxolactone	CD	13.9835	N/A	0	N/A	0	∞	25
FIZIOLOŠKE MODIFIKACIJE (PTMs)								
Acetylation (K)	P/CD	42.0367	1.0±1.0	93±12	1.4±0.4	73±15	0.7±0.5	67±2
Acetylation (Protein N-term)	P/CD	42.0367	1.0±0.1	94±2	1.0±0.1	91±3	1.2±0.3	93±2
Methylation(KR)	P	14.0266	1.0±0.2	86±13	3.4±1.5	13±10	1.3±1.6	60±49

Biotinylation (GNLK)	P	226.2954	1.0±0.8	22±16	1.5±0.2	22±8	1.0±1.2	49±15
Dimethylation (KR)	P	28.0532	1.0±0.2	86±13	2.1±0.2	100±0	1.5±1.4	92±5
Diethylation	P	56.1063	1.0±0.3	41±29	2.2	51	1.6±0.7	42±8
Heme (H)	P	616.4873	1.0±0.6	63±19	1.4±0.6	70±1	1.6±0.6	62±1
Dehydration (S,T,N,Q,Y)	P	-18.0153	1.0	30	2.2±0.4	37±11	0.7	18
Myristoylation (GCK)	P	210.3556	1.0±0.1	52±68	4.3±4.3	100±0	4.6	100
Dehydration (D)	P	-18.0153	1.0±0.3	3±1	0	0	0	0
Hydroxyheme E	P	614.4714	N/A	0	∞	0.4	N/A	0
Phosphorylation (STY)	P	79.9799	1.0	9	5.1	43	4.3±1.0	44±2
Palmitoylation (KT)	P	238.4088	1.0±0.8	52±67	0	0	0	0
Decanoyl (S)	P	154.2493	N/A	0	N/A	0	∞	5
Octanoyl (T)	P	126.1962	1.0±0.5	5±2	1.1±0.3	4±1	0.9±0.0	5±1
Lipoyl (K)	P	188.3103	N/A	0	∞	100	∞	100
O3-(riboflavin) phosphoryl (T)	P	438.3285	1.0	1	0	0	0	0
Triglutamyl on Glu	P	387.3419	1.0	5	0	0	0	0
Phosphopantetheine (S)	P	340.333	1.0	98	0	0	0	0
Deamidation (R)	P	-0.9848	1.0±1.2	43	0	0	0	0
N-acetyl neuraminic acid (T)	P	291.2546	1.0	19	0	0	0.6	17
Sulfation (S)	P	80.0632	N/A	0	N/A	0	∞	1
Pyridoxal phosphate (K)	P	229.1266	N/A	0	∞	100	N/A	0
Hypusine (K)	P	87.1204	1.0	31	0	0	0	0

TOKSIČNE MODIFIKACIJE (Hemijski derivati-CD)

Tri nitro benzene (R)	CD	211.0886	N/A	0	N/A	0	∞	5
2,3-dihydro-2,2-dimethyl-7-benzofuranol N-methyl carbamate (S)	CD	57.0153	N/A	0	N/A	0	∞	48
Bis(hydroxyphenylglyoxal) arginine	CD	282.2476	N/A	0	N/A	0	∞	6
5-dimethylaminonaphthalene-1-sulfonyl (V)	CD	233.2862	N/A	0	N/A	0	∞	0.3
O-Diisopropylphosphorylation (AV)	CD	164.1394	N/A	0	N/A	0	∞	100
N-Succinimidyl-2-morpholine acetate (LIP)	CD	127.1412	N/A	0	∞	48±23	∞	70
Naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde (LNW)	CD	175.1855	N/A	0	N/A	0	∞	50±70
Acetaldehyde +26 (H)	CD	26.0373	N/A	0	∞	100	N/A	0
Chlorination of tyrosine residues	CD	34.4451	N/A	0	∞	100	N/A	0
Fluorination (FWYA)	CD	17.9905	N/A	0	∞	1	N/A	0

SREDINSKE MODIFIKACIJE (Hemijski derivati-CD)

Ubiquitination (K)	CD	383.446	1.0±0.9	59±36	1.2±0.2	52±50	1.3±0.8	41±13
Phenethyl isothiocyanate (ES)	CD	163.2395	N/A	0	∞	100	N/A	0

Nucleophilic addition to cytopiloyne (KT)	CD	362.3738	N/A	0	∞	57±61	N/A	0
Methylmalonylation (S)	CD	100.0728	N/A	0	∞	34	N/A	0
Arginine replacement by Nitroprimidyl ornithine	CD	81.0297	N/A	0	∞	13	N/A	0
Addition of DFDNB crosslinker (K)	CD	164.0752	N/A	0	∞	67±11	N/A	0
Beta-methylthiolation (C)	CD	46.0196	N/A	0	∞	100	N/A	0
Aminoethylcysteine (T)	CD	59.1334	N/A	0	∞	5.0±0.4	N/A	0
Iminobiotinylation (T)	CD	225.3106	N/A	0	∞	8±3	N/A	0
Piperidination (EY)	CD	68.1170	N/A	0	∞	3	∞	47±5
EDT-maleimide-PEO-biotin (T)	CD	601.8201	N/A	0	∞	48	N/A	0
Maleimide (K)	CD	97.0721	N/A	0	N/A	0	∞	5

ARTEFAKTI

Amidation (any C term)	A	-0.9848	1	86	1.1±0.6	71±41	0	0
Carbamoylation (KR)	A	43.0247	1	1	2.5	1	1.2±1.0	1±1
Deamidation (NQ)	A	0.9848	1.0±0.1	10±3	3.8±4.5	40±18	1.1±0.2	14±3
Formylation (KR)	A	28.0101	1.0±1.3	28±35	1.1±0.9	66±19	2.0±0.3	55±15
Pyro-glu from Q	A	-17.0305	1.0±0.5	14±5	1.1±0.3	25±14	1.0±0.4	26±2
Pyro-glu from E	A	-18.0153	1.0±0.4	4±5	0.2±0.1	2.0±0.4	0.3±0.3	23±16

*Ratio: odnos zbir površina ispod XIC krivih svih modifikovanih peptida sa istim tipom modifikacije u odnosu na zbir površina modifikovanih peptida iz kontrolne grupe. *Procentat (%): udeo zbir površina XIC krivih modifikovanih peptida određene modifikacije u ukupnom zbiru XIC krivih svih proteina unutar datog tretmana. CD - hemijski derivat; P - fiziološka modifikacija (posttranslaciona ili PTM-slična modifikacija); A - artefakt modifikacija; Δm - promena mase nakon uvođenja modifikacije; N/A - nije primenljivo (modifikovani oblik peptida nije detektovan); ∞ - vrednost nastala deljenjem sa nulom kada je XIC vrednost kontrolnog modifikovanog peptida jednaka 0.

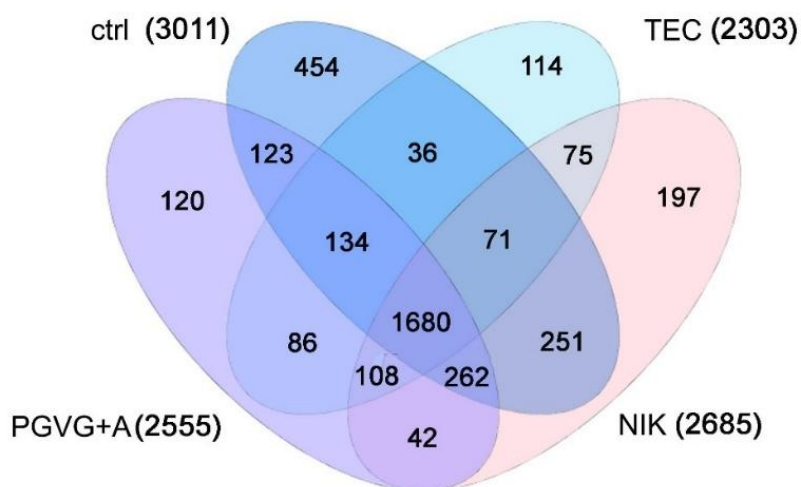
4.5. Analiza proteoma V79 ćelija nakon izlaganja tečnostima za e-cigarete

Nakon analize proteomskog odgovora BEAS-2B ćelija na izlaganje kondenzatima aerosola tečnosti za e-cigarete, u narednom delu razmatran je proteomski odgovor V79 ćelija na izlaganje tečnostima za e-cigarete koje sadrže PG, VG i aromu (PGVG+A); i PG, VG, aromu i nikotin 18mg/ml (TEC) u koncentraciji od 1,38% (v/v) i nikotina u koncentraciji od 250 µg/ml (NIK) nakon 72 h.

Proteomski profili V79 ćelija nakon izlaganja tečnostima za e-cigarete ispitani su primenom *shotgun* proteomskog pristupa zasnovanog na TimsTOF tehnologiji. Prednost TimsTOF sistema u odnosu na Orbitrap ogleda se u primeni separacije na osnovu jonske mobilnosti i PASEF akvizicije, što omogućava veću dubinu proteomske analize i efikasniju detekciju nisko zastupljenih peptida u kompleksnim uzorcima.

Ukupan broj identifikovanih proteina bio je najveći u netretiranim ćelijama (3011), dok je u svim tretiranim uslovima zabeležen manji broj detektovanih proteina, 2685 proteina u NIK, 2555 u PGVG+A i 2303 u TEC tretmanu, gde je zabeležen najveći pad u ukupnom broju proteina od 23% u odnosu na kontrolu (Slika 18). Sličan trend uočen je i kod jedinstveno identifikovanih proteina, pri čemu su kontrolni uzorci sadržali najveći broj proteina (454), dok je najmanji broj zabeležen u TEC

uslovima (114). Uzorci PGVG+A i NIK imali su vrednosti između kontrolnih i TEC uzoraka (120 i 197, redom).



Slika 18. Preklapanje proteoma V79 ćelija nakon različitih tretmana.

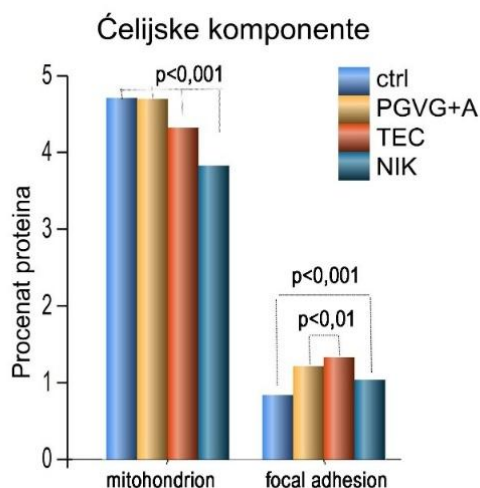
Venn dijagram koji prikazuje preklapanje najzastupljenijih („top“) proteina identifikovanih u V79 ćelijama u kontrolnim uslovima (ctrl) i nakon tretmana TEC, PGVG+A i NIK. U slučajevima kada je isti protein bio zastupljen kroz više proteoformi sa različitim pristupnim brojevima, prikazan je samo najviše rangirani identifikovani oblik. Brojevi u zagradama označavaju ukupan broj „top“ proteina detektovanih u svakom pojedinačnom tretmanu, dok brojevi unutar preseka dijagrama predstavljaju broj zajedničkih proteina između odgovarajućih grupa. Grafik je generisan korišćenjem softvera *FunRich* 3.1.3.

Kako bi se sagledala funkcionalna organizacija identifikovanog proteoma, analiziran je aspekt ćelijskih komponenti kroz zastupljenost proteina u odgovarajućim GO kategorijama. Dobijeni rezultati ukazuju da se mitohondrije i fokalna adhezija izdvajaju kao kategorije sa izraženim obogaćenjem i uočljivim razlikama između kontrolnih i tretiranih uzoraka (Slika 19).

U poređenju sa kontrolom, mitohondrijski proteini najizraženije su smanjeni u ćelijama tretiranim nikotinom i TEC tretmanima, dok je u PGVG+A bila manja razlika (Slika 19). Detaljnija analiza mitohondrijskog proteoma pokazala je da broj identifikovanih proteinskih vrsta opada u tretiranim uslovima (95 u kontrolnim, 81 u PGVG+A, 68 u TEC i 70 u NIK uzorcima). Među njima je identifikovano 18 proteina prisutnih isključivo u netretiranim ćelijama, uključujući glutaminazu i dihidrofolat-reduktazu. Sa druge strane, pojedini proteini detektovani su specifično u tretiranim uzorcima, kao što je dihidrolipoil-dehidrogenaza u TEC tretmanu.

Proteini povezani sa fokalnim adhezijama bili su zastupljeniji u svim tretiranim grupama, sa najvećim povećanjem u TEC uslovima (približno 60% u odnosu na kontrolu) (Slika 19).

Detaljnija analiza razlika u sastavu proteina fokalne adhezije pokazala je da su netretirane ćelije imale najmanji broj identifikovanih proteina, dok je TEC tretman pokazao najveći broj jedinstvenih proteina u okviru aspekta fokalna adhezija. U tretmanima tečnostima za e-cigarete i nikotinom detektovane su izoforme nespecifičnih protein-tirozin kinaza koje su analizom sekvenci pokazale visok stepen sličnosti (oko 95%) sa kinazom fokalne adhezije 1 (FAK-1), proteinom koji ima centralnu ulogu u signalizaciji fokalnih adhezija i povezivanju integrina sa citoskeletom.



Slika 19. Profilisanje ćelijskih komponenti u proteomu V79 ćelija nakon tretmana tečnostima za e-cigarete.

Poređenje zastupljenosti odabranih ćelijskih komponenti između kontrolnih (ctrl) i tretiranih V79 ćelija (PGVG+A, TEC i NIK), prikazano kao procenat proteina anotiranih u okviru odgovarajućih GO kategorija. Grafikon prikazuje reprezentativne primere značajno obogaćenih ćelijskih odeljaka, mitohondrija i fokalne adhezije. Statistička značajnost obogaćenja određena je hipergeometrijskim testom, a prikazane p-vrednosti označavaju razlike između odgovarajućih grupa tretmana. Grafik je generisan korišćenjem softvera *FunRich* 3.1.3.

Uočene razlike u zastupljenosti ćelijskih komponenti prate i promene u obogaćenju bioloških procesa između tretmana. Kako bi se ovi obrasci dodatno sagledali na nivou relativnog rangiranja bioloških procesa, primenjen je i automatizovani pristup selekcije najznačajnijih procesa korišćenjem softvera *FunRich* (Slika 20), pri čemu su biološki procesi prikazani u opadajućem redosledu prema stepenu obogaćenja. Promene u rangiranju bioloških procesa u tretiranim uslovima u odnosu na kontrolu odražavaju značajnu reorganizaciju ćelijskog funkcionisanja V79 ćelija.

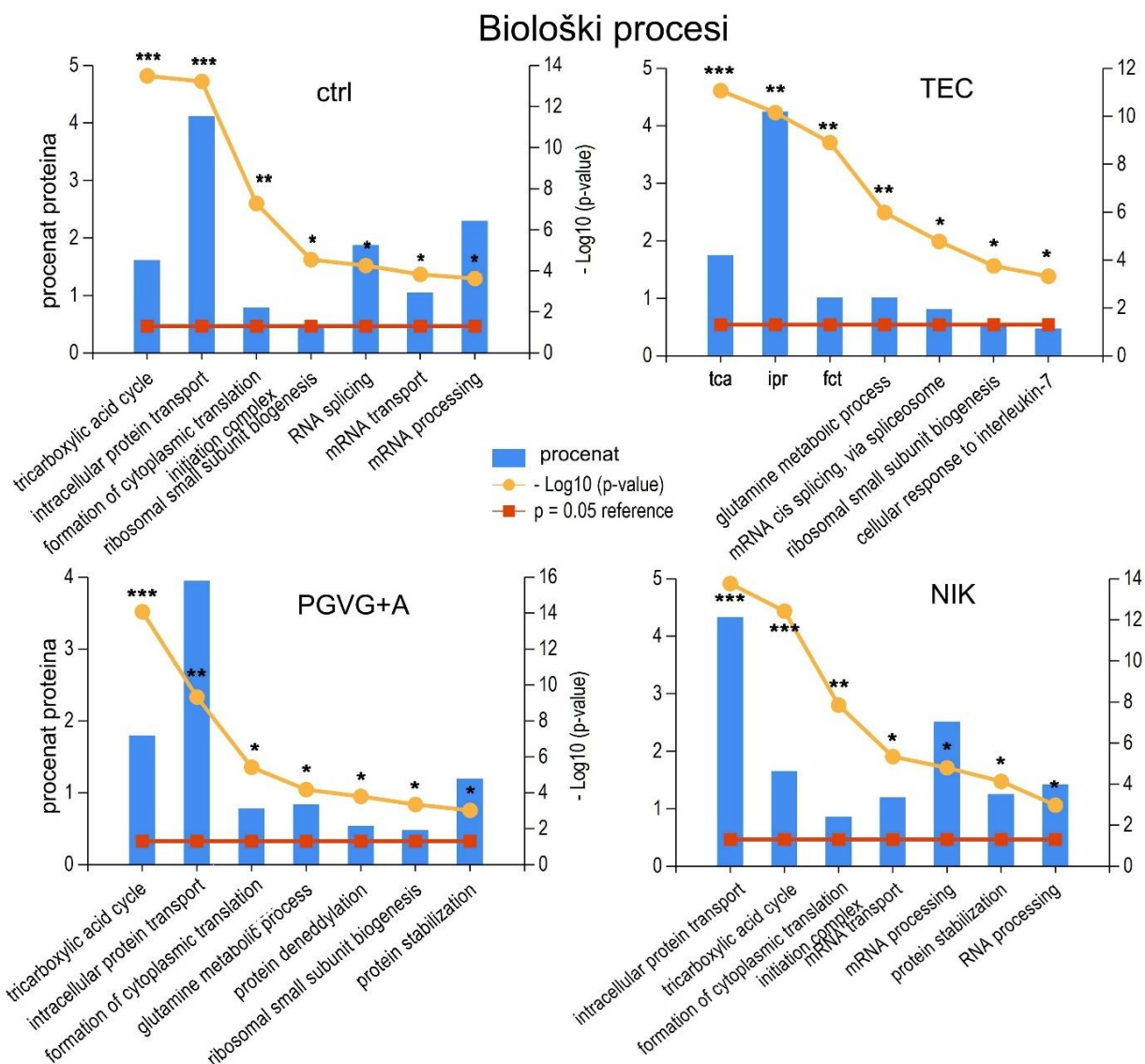
Ciklus trikarboksilnih kiselina (TCA ciklus), centralni katabolički proces produkcije energije u mitohondrijama, se u V79 ćelijama tretiranim NIK nalazi na drugom mestu, dok je u ostalim tretmanima i kontroli na prvom mestu (Slika 20). Ovaj rezultat je u skladu sa najizraženijim smanjenjem zastupljenosti mitohondrijskih proteina u NIK tretiranim ćelijama (slika 19).

Takođe, u V79 ćelijama tretiranim sa TEC i PGVG+A među značajno obogaćenim biološkim procesima pojavljuje se i metabolizam glutamina, što ukazuje na promene u energetsom i metaboličkom balansu ćelija. Glutamin predstavlja važan izvor intermedijera za TCA ciklus, kao i značajan supstrat za biosintetičke procese i održavanje redoks ravnoteže. Stoga, uključivanje metabolizma glutamina može odražavati adaptivni odgovor ćelija na izmenjene energetske i metaboličke zahteve (Slika 20).

Pored učenih zajedničkih metaboličkih adaptacija, identifikovane su i promene u biološkim procesima povezanim sa obradom RNK. Biogeneza male ribozomske subjediniice u netretiranim ćelijama zauzima četvrto mesto, dok je u TEC i PGVG+A tretmanima pomerena na šesto mesto, a u NIK tretmanu se ne nalazi među prvih sedam rangiranih procesa (Slika 20). Kategorija obrada mRNK (eng. *mRNA processing*) prisutna je u netretiranim i NIK ćelijama, gde zauzima sedmo, odnosno peto mesto, dok u TEC i PGVG+A tretmanima nije detektovana među vodećim procesima. Kategorija transport mRNK uočena je isključivo u netretiranim ćelijama. Ovakav obrazac ukazuje na reorganizaciju procesa povezanih sa ribozomima i metabolizmom RNK, što može upućivati na promene u regulaciji translacije i u skladu je sa smanjenim ukupnim sadržajem proteina u tretiranim ćelijama (Slika 18).

Među biološkim procesima koji su pokazali specifičnosti u pojedinim tretmanima, u PGVG+A uslovima uočena je pojava procesa denedilacije proteina (Slika 20). Denedilacija predstavlja posttranslacioni regulatorni mehanizam uklanjanja NEDD8 modifikacije sa ciljnih proteina i učestvuje u regulaciji aktivnosti ubikvitin-ligaznih kompleksa.

Procesi ćelijskog odgovora na interleukin-7 detektovani su isključivo u TEC tretmanu, što predstavlja specifičnost bioloških procesa prisutnih u ovom uslovu u poređenju sa ostalim tretmanima i ukazuje na uključenje signalnih mreža povezanih sa preživljavanjem, adaptacijom i odgovorom na stres (Slika 20) (152).



Slika 20. Rangiranje i analiza obogaćenja bioloških procesa u V79 fibroblastima pluća nakon različitih tretmana.

Grafički prikaz redosleda najzastupljenijih i statistički značajno obogaćenih bioloških procesa u kontrolnim (ctrl) i tretiranim V79 ćelijama (TEC, PGVG+A i NIK), izražen kao procenat proteina anotiranih u okviru odgovarajućih GO kategorija (plave kolone). Linijski grafikon predstavlja vrednosti $-\log_{10}(p\text{-vrednosti})$, koje odražavaju statističku značajnost obogaćenja u GO analizi. Skraćenice: tca - ciklus trikarboksilnih kiselina; ipr - intracelularni transport proteina; fct - formiranje inicijacionog kompleksa citoplazmatske translacije. Grafici su generisani korišćenjem softvera *FunRich* 3.1.3.

4.6. Modifikacije proteina u V79 ćelijama nakon izlaganja tečnostima za e-cigarete

Analiza profila posttranslacionih i hemijskih modifikacija proteina u V79 ćelijama pokazala je promene u njihovoj raznovrsnosti i relativnoj zastupljenosti nakon izlaganja tečnostima za e-cigarete (Tabela 2). Reprezentativni primeri modifikacija prikazani su kroz odnos modifikovanih peptida u odnosu na kontrolu (*ratio*) i njihov udeo u proteomu (%).

U poređenju sa kontrolnim uslovima, tretirani uzorci karakterišu se širim spektrom detektovanih modifikacija. Najveći broj različitih modifikacija zabeležen je u PGVG+A tretmanu (19 od 21), dok je u TEC uzorcima identifikovano 17 od 21 tipova modifikacija. U kontrolnim i NIK uzorcima detektovano je 11, odnosno 12 tipova modifikacija. Većina modifikacija prikazanih u Tabeli 2. spada u ireverzibilne promene, izuzev oksidacije metionina do sulfoksida.

Analiza pojedinačnih modifikacija pokazala je da većina njih prati sličan obrazac u relativnoj promeni u odnosu na kontrolu i u njihovom udelu u proteomu. Za najveći broj modifikacija zabeležene su više vrednosti u tretiranim uzorcima u poređenju sa kontrolom i NIK uslovima, što je naročito izraženo kod oksidativnih modifikacija aminokiselinskih ostataka, kao što su oksidacija histidina i triptofana, kao i kod dvostruke oksidacije metionina. Sličan trend uočen je i kod karbonilacionih modifikacija nastalih reakcijama sa produktima lipidne peroksidacije.

Izuzetak od ovog obrasca predstavljaju oksidacija metionina do sulfoksida i direktna oksidacija treonina do 2-amino-3-oksobutanoične kiseline. Iako je relativni odnos Met oksidacije bio nešto niži u tretiranim ćelijama, njeno zasićenje proteoma bilo je veće, naročito u TEC tretmanu, gde je zabeležen porast od 24% u odnosu na kontrolu.

Pored opšteg povećanja zastupljenosti modifikacija, u tretiranim uzorcima uočena je i pojava specifičnih hemijskih modifikacija koje nisu detektovane u kontrolnim uslovima. Među njima se posebno izdvaja prisustvo 4-hidroksinonenal (4-HNE), koji je detektovan isključivo u uzorcima tretiranim tečnostima za e-cigarete kao i modifikacije povezane sa formiranjem krajnjih produkata glikacije (Tabela 2).

Dodatno, u tretiranim V79 ćelijama identifikovane su modifikacije koje ukazuju na vezivanje različitih organskih jedinjenja alifatične i aromatične prirode, uključujući acetaldehid, etilaciju, dietilaciju i hidroksimetilaciju. Ove modifikacije bile su odsutne ili prisutne u tragovima u kontrolnim uzorcima, dok su u tretiranim ćelijama bile jasno detektovane (Tabela 2). Takođe su identifikovane i modifikacije sa potencijalno toksičnim karakteristikama, poput O-izopropilmetilfosfonilacije (organofosfatni pesticid), prisutne isključivo u PGVG+A tretmanu, kao i trinitrobenzena, detektovanog u PGVG+A i TEC uslovima.

Iako su pojedine modifikacije detektovane i u NIK uslovima, njihov intenzitet i zastupljenost bili su niži u poređenju sa tretmanima koji uključuju tečnosti za e-cigarete.

Zbirno posmatrano, rezultati ukazuju da tretman V79 ćelija tečnostima za e-cigarete dovodi do proširenja spektra modifikacija proteina i povećanja njihove zastupljenosti u proteomu u odnosu na kontrolne uslove.

Tabela 2. Relativni profil modifikacija proteina u proteomima kontrolnih i tretiranih V79 ćelija.

Relativno profilisanje karbonilacionih, oksidativnih i hemijskih modifikacija povezanih sa izlaganjem tečnostima za e-cigarete i nikotinu u proteomima V79 ćelija. Prikazane su vrednosti relativne zastupljenosti identifikovanih modifikacija u kontrolnim (ctrl) i tretiranim uslovima (PGVG+A, TEC i NIK), izražene kao odnos (Ratio) i procenat (%). Kvantifikacija je zasnovana na zbiru površina ispod XIC krivih modifikovanih peptida detektovanih u LFQ proteomskoj analizi. Modifikacije su grupisane prema tipu: (I) karbonilacija usled direktne oksidacije bočnih lanaca aminokiselina lizina, treonina i prolina; (II) karbonilacija usled Michaelove adicije α,β -nezasićenih aldehida nastalih tokom lipidne peroksidacije; (III) karbonilacioni događaji povezani sa formiranjem krajnjih produkata uznapredovale glikacije (AGEs); druge direktne oksidativne modifikacije; kao i hemijske modifikacije izazvane ili pojačane tečnostima za e-cigarete i nikotinom.

Tip Modifikacije	ctrl		PGVG+A		TEC		NIK	
	Ratio*	%**	Ratio	%	Ratio	%	Ratio	%
I Karbonilacija usled direktne oksidacije bočnih lanaca aminokiselina lizina (Lys), treonina (Thr) i prolina (Pro)								
2-pyrrolidone from Pro	1	0,03	1,8	0,07	1,4	0,07	1	0,04
2-amino-3-oxo-butanoic_acid from Thr	1	0,15	0,04	0,001	0,02	0,004	0,01	0,002
Lysine oxidation to amino adipic semialdehyde	N/A	0	∞	0,001	N/A	0	N/A	0
II Karbonilacija usled Michaelove adicije α,β-nezasićenih aldehida nastalih tokom lipidne peroksidacije								
Levuglandinyl-lysine anhydropyrrole adduct	1	0,01	2,5	0,05	4	0,11	0,7	0,02
4-hydroxynonenal (HNE)	N/A	0	∞	0,001	∞	0,003	N/A	0
III Karbonilacioni događaji nastali usled formiranja AGEs (krajnjih produkata uznapredovale glikacije)								
Carboxymethyl on N term	N/A	0	∞	0,004	∞	0,002	N/A	0
Druge direktne oksidativne modifikacije								
Met single oxidation (sulfoxide)	1	54	0,8	66	0,7	78	0,8	68
Met double oxidation (sulfone)	1	0,02	5,9	0,2	4,6	0,2	1,9	0,06
His and Trp oxidation	1	0,09	5,9	0,77	4,8	0,85	3,7	0,51
Proline oxidation to pyroglutamic acid	N/A	0	N/A	0	∞	0,003	N/A	0
Tryptophan oxidation to hydroxykynurenin	1	0,01	1,2	0,02	0,9	0,02	1,4	0,02
Hemijske modifikacije najverovatnije izazvane ili pojačane tečnostima za e-cigarete i nikotinom								
2,3-dihydro-2,2-dimethyl-7-benzofuranol N-methyl carbamate	N/A	0	N/A	0	∞	0,001	N/A	0
5-dimethylaminonaphthalene-1-sulfonyl	N/A	0	∞	0,004	∞	0,001	∞	0,002
Hydroxymethyl	N/A	0	∞	0,0003	N/A	0	N/A	0
O-Isopropylmethylphosphonylation	N/A	0	∞	0,003	N/A	0	N/A	0

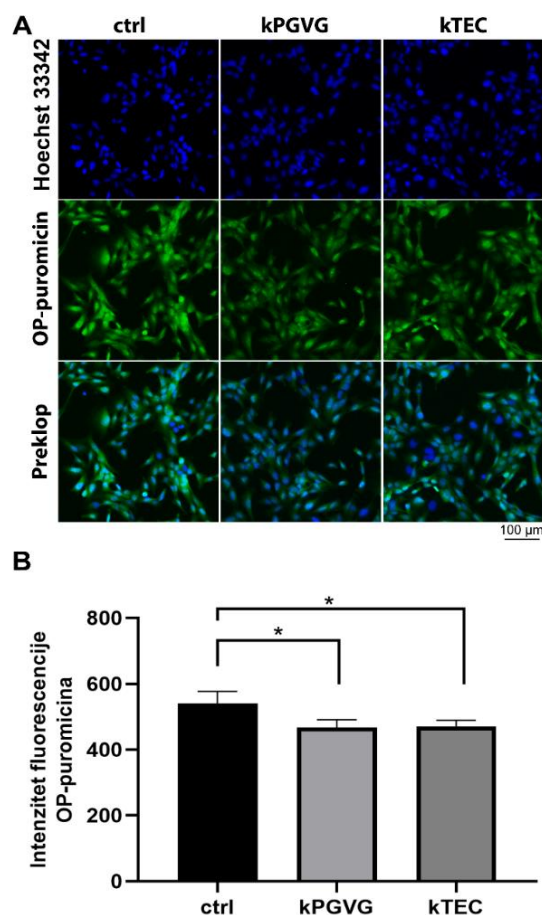
Tri nitro benzene	N/A	0	∞	0,1	∞	0,1	N/A	0
Diethylation	N/A	0	∞	0,002	N/A	0	N/A	0
Acetaldehyde +26	1	0,01	1,8	0,03	1,5	0,04	1,4	0,03
Dichlorination of tyrosine residues	1	0,0004	45	0,03	32	0,03	27	0,02
Ethylation	1	0,01	2,7	0,05	1,4	0,04	3,4	0,07
Replacement of 2 protons by nickel	1	0,08	1,3	0,16	1,1	0,18	1,1	0,14

*Ratio: odnos zbira površina ispod XIC krivih svih modifikovanih peptida sa istim tipom modifikacije u odnosu na zbir površina modifikovanih peptida iz kontrolne grupe. *Procenat (%): udeo zbira površina XIC krivih modifikovanih peptida određene modifikacije u ukupnom zbiru XIC krivih svih proteina unutar datog tretmana. N/A - nije primenljivo (modifikovani oblik peptida nije detektovan); ∞ - vrednost nastala deljenjem sa nulom kada je XIC vrednost kontrolnog modifikovanog peptida jednaka 0.

4.7. Uticaj kondenzata aerosola tečnosti za e-cigarete na sintezu proteina u BEAS-2B ćelijama

Kako bi se obrasci uočeni transkriptomskim i proteomskim analizama u procesima vezanim za metabolizam i obradu proteina dodatno sagledali na funkcionalnom nivou, u narednom delu istraživanja primenjen je funkcionalni esej usmeren na procenu globalne sinteze proteina.

U cilju dalje procene efekta kTEC i kPGVG tretmana na metabolizam proteina, sinteza proteina u BEAS-2B ćelijama analizirana je primenom metode metaboličkog obeležavanja zasnovane na alkinskom analogu puromicina, OP-puromicinu. Analiza ukupne sinteze proteina u BEAS-2B ćelijama tretiranim kPGVG i kTEC kondenzatima pokazala je značajno smanjenje sinteze proteina u poređenju sa netretiranom kontrolom (Slika 21 A, B). Nije uočena značajna razlika u nivou ukupne sinteze proteina između kPGVG i kTEC tretmana.



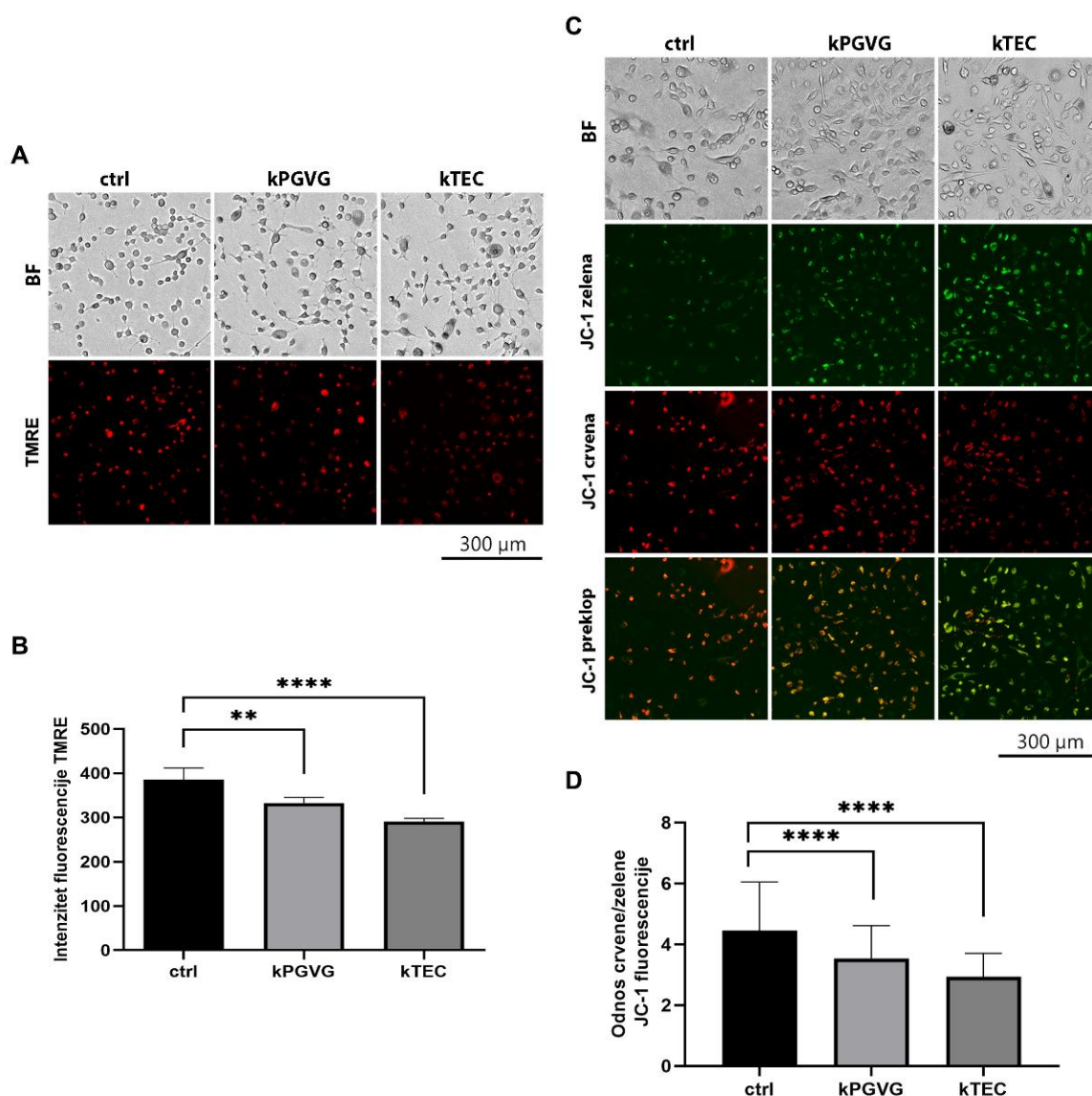
Slika 21. Kondenzat aerosola tečnosti za e-cigarete smanjuje globalnu sintezu proteina u BEAS-2B ćelijama.

(A) Metaboličko obeležavanje novonastalih proteina OP-puromicinom u BEAS-2B ćelijama tretiranim kTEC i kPGVG uslovima. Jedra su obojena Hoechst 33342 bojom. Fotografije su snimljene sistemom *ImageXpress® Pico Automated Cell Imaging System* i predstavljaju reprezentativne rezultate tri nezavisna eksperimenta. Dužina skale: 100 μ m.

(B) Intenzitet fluorescencije OP-puromicina (a.u.) kvantifikovan je u softveru *CellReporterXpress* i prikazan kao srednja vrednost $\pm$ SD u odnosu na kontrolu (ctrl). Statistička analiza sprovedena je primenom one-way ANOVA testa sa Dunnett post hoc analizom; * $p < 0,05$.

4.8. Uticaj kondenzata aerosola tečnosti za e-cigarete na mitohondrijski membranski potencijal u BEAS-2B ćelijama

Mitohondrijski membranski potencijal ispitan je radi procene efekta kTEC i kPGVG tretmana na mitohondrijsku funkciju u BEAS-2B ćelijama, primenom fluorescentnih katjonskih boja TMRE i JC-1. U ćelijama tretiranim kTEC i kPGVG, došlo je do značajnog smanjenja intenziteta TMRE fluorescentnog signala što ukazuje na smanjenje mitohondrijskog potencijala (Slika 22 A, B). Slično tome, bojenje JC-1 bojom pokazalo je povećan udeo JC-1 monomera koji emituju zeleni fluorescentni signal u odnosu na agregate koji emituju crveni signal, što ukazuje na izraženo smanjenje mitohondrijskog membranskog potencijala u kTEC i kPGVG tretiranim ćelijama (Slika 17 C, D). Zajedno posmatrani, ovi rezultati ukazuju da izlaganje kTEC i kPGVG dovodi do mitohondrijske depolarizacije. Ovi rezultati su u skladu sa nalazima transkriptomske i proteomske analize.



Slika 22. Kondenzat aerosola tečnosti za e-cigarete smanjuje mitohondrijski membranski potencijal u BEAS-2B ćelijama.

(A) Bojenje mitohondrija bojom TMRE u BEAS-2B ćelijama nakon tretmana kPGVG i kTEC uslovima. Prikazane su reprezentativne slike snimljene sistemom *ImageXpress® Pico Automated Cell Imaging System*. Dužina skale: 300 μ m. BF - svetlo polje (eng. *brightfield*)

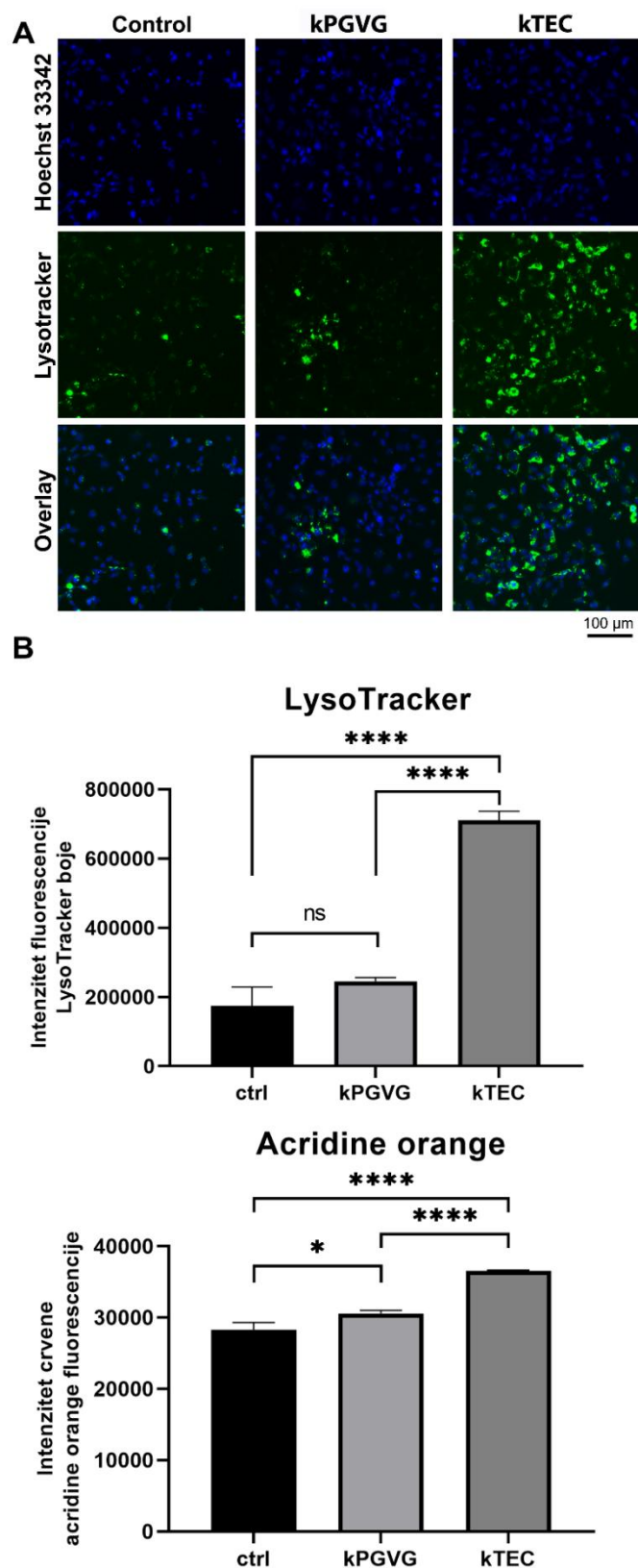
(B) Kvantifikacija intenziteta TMRE fluorescencije (a.u.), određena u softveru *CellReporterXpress* i prikazana kao srednja vrednost $\pm$ SD. Statistička analiza sprovedena je primenom one-way ANOVA testa sa Dunnett post hoc analizom (** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$).

(C) Analiza mitohondrijskog membranskog potencijala korišćenjem JC-1 boje. Regioni visoke mitohondrijske polarizacije prikazani su crvenom fluorescencijom (JC-1 agregati), dok depolarizovane mitohondrije emituju zelenu fluorescenciju (monomerni JC-1). Prikazane slike su reprezentativne za tri nezavisna eksperimenta. Dužina skale: 300 μ m.

(D) Odnos intenziteta crvene i zelene JC-1 fluorescencije (a.u.) kvantifikovan je u softveru *Fiji* i prikazan kao srednja vrednost $\pm$ SEM. Statistička analiza sprovedena je primenom one-way ANOVA testa sa Dunnett post hoc analizom; (**** $p < 0,0001$).

4.9. Uticaj kondenzata aerosola tečnosti za e-cigarete na intenzitet lizozomskog signala u BEAS-2B ćelijama

S obzirom na uočeno obogaćenje kategorije lizozoma u okviru aspekta ćelijske komponente na nivou proteoma (Slika 16), ispitan je i uticaj kondenzata aerosola tečnosti za e-cigarete na lizozomski sistem u BEAS-2B ćelijama. Fluorescentno obeležavanje lizozoma vršeno je primenom boje *LysoTracker*, dok je boja *Acridine orange* korišćena za detekciju kiselih vezikula u koje spadaju i lizozomi. Intenzitet signala lizozoma obeleženih *LysoTracker* bojom u kTEC tretiranim ćelijama je bio značajno povećan u poređenju sa netretiranom kontrolom i u poređenju sa kPGVG, dok su ćelije tretirane kPGVG pokazale blago povećanje intenziteta lizozomskog signala (Slika 23 A, B). Slično tome, intenzitet signala kiselih vezikula detektovanih *Acridine orange* bojom, bio je značajno povećan u kTEC tretmanu u odnosu na netretirane ćelije i kPGVG-tretirane ćelije. Takođe, kPGVG tretman je pokazao statistički značajnu razliku u odnosu na netretiranu kontrolu (Slika 23 B). Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima analize proteoma BEAS-2B ćelija. Iako je kasnijim osvrtom na rezultate transkriptoma uočeno i smanjenje ekspresije pojedinih gena koji pripadaju GO kategoriji lizozomi (GO:0005764), ova kategorija se nije nalazila među značajno promenjenim u analizama funkcionalnog obogaćenja (ORA i GSEA), što ukazuje na značaj proteomike kao komplementarnog pristupa u detekciji biološki relevantnih promena.



Slika 23. Uticaj kondenzata aerosola tečnosti za e-cigarete na lizosomalni signal u BEAS-2B ćelijama.

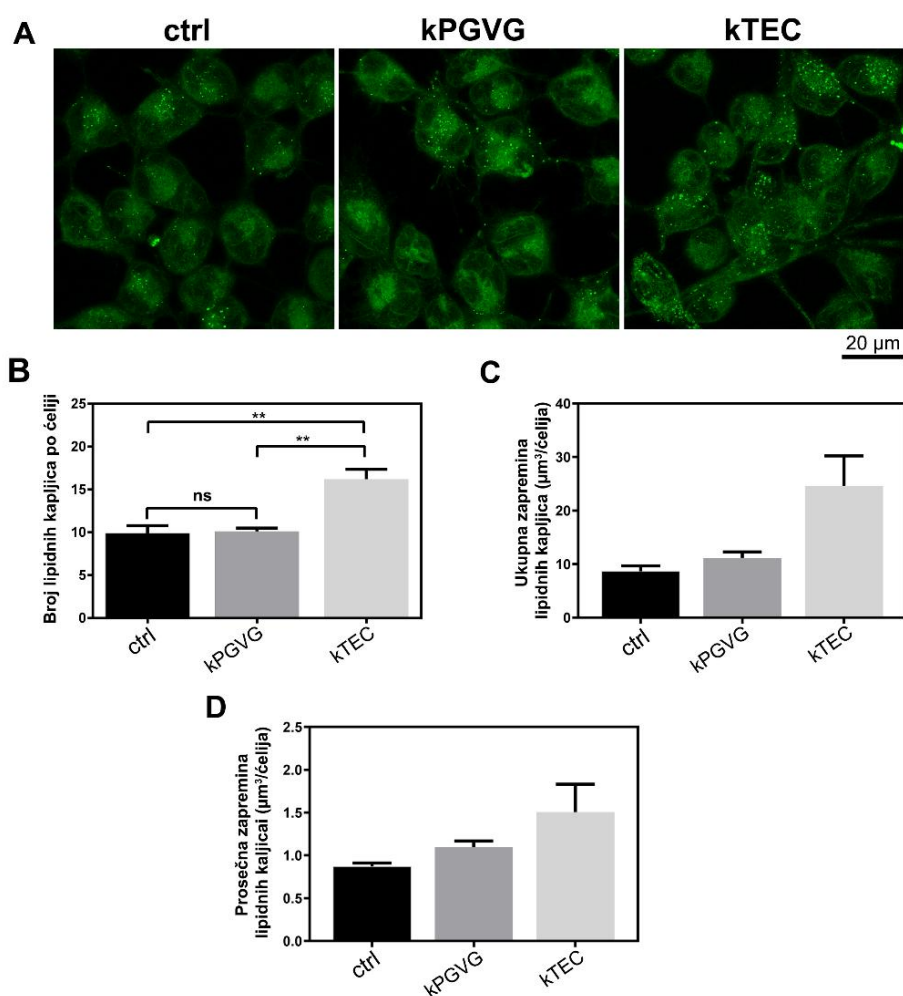
(A) Obeležavanje lizozoma bojom *LysoTracker* u BEAS-2B ćelijama nakon tretmana kPGVG i kTEC uslovima, vizualizovano sistemom *ImageXpress® Pico Automated Cell Imaging System*. Jedra su obojena bojom Hoechst 33342. Prikazane su reprezentativne slike tri nezavisna eksperimenta. Dužina skale: 100 μ m.

(B) Kvantifikacija intenziteta fluorescencije *LysoTracker* boje i crvene fluorescencije *Acridine orange* boje (a.u.), snimljene i analizirane na sistemu *ImageXpress® Pico Automated Cell Imaging System*. Intenzitet fluorescencije određen je u softveru *CellReporterXpress* i prikazan kao srednja vrednost $\pm$ SD u odnosu na netretiranu kontrolu.

Statistička analiza sprovedena je primenom one-way ANOVA testa sa Dunnett post hoc analizom; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$, ns - nema značajnosti.

4.10. Uticaj kondenzata aerosola tečnosti za e-cigarete na akumulaciju neutralnih lipida u BEAS-2B ćelijama

Kako bi se analizirao efekat kTEC i kPGVG na akumulaciju lipida u BEAS-2B ćelijama, analizirano je prisustvo neutralnih lipida fluorescentnim obeležavanjem *BODIPY*TM 493/503 bojom. Bojenje pomoću *BODIPY*TM 493/503 pokazalo je statistički značajno povećan broj lipidnih kapljica u ćelijama tretiranim kTEC u poređenju sa kontrolnim i kPGVG uzorcima (Slika 24 A, B), što ukazuje na akumulaciju neutralnih lipida u kTEC uslovima. Pored broja lipidnih kapljica, kvantifikovana je i ukupna zapremina lipidnih kapljica, kao i prosečna zapremina lipidnih kapljica po ćeliji (Slika 24 C, D). Iako je i u ovim analizama uočen isti trend povećanja u kTEC tretmanima u odnosu na kPGVG i netretiranu kontrolu, razlike nisu dostigle statističku značajnost. Ovi rezultati su u skladu sa analizom transkriptoma BEAS-2B ćelija nakon tretmana kondenzatima aerosola tečnosti za e-cigarete u kojima je pokazana pojačana ekspresija transkripata povezanih sa metabolizmom lipida (Slika 14).



Slika 24. Uticaj kondenzata aerosola tečnosti za e-cigarete na neutralne lipide u BEAS-2B ćelijama.

(A) BEAS-2B ćelije obeležene su fluorescentnom bojom *BODIPY*TM 493/503 radi detekcije neutralnih lipida. Prikazane su reprezentativne slike kontrolnih (ctrl), kPGVG i kTEC tretiranih ćelija. Fluorescentne vezikularne strukture pozitivne na neutralne lipide označene su strelicama. Skala: 20 μm . Snimanje je izvršeno konfokalnim

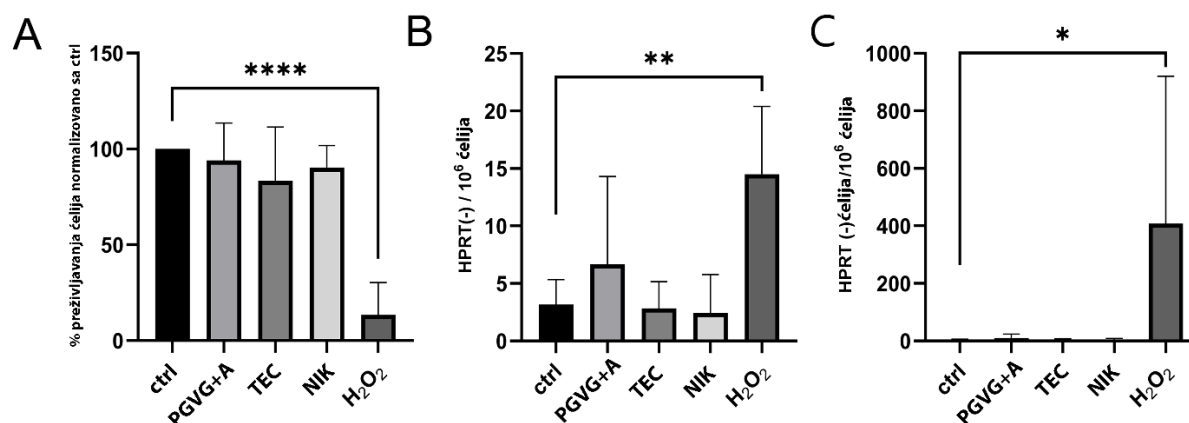
mikroskopom Leica TCS SP8. (C) Broj lipidnih kapljica po ćeliji, (D) ukupna zapremina lipidnih kapljica po ćeliji i (E) prosečna zapremina lipidnih kapljica

Kvantifikacija lipidnih kapljica izvršena je korišćenjem softvera *Fiji*, a rezultati su prikazani kao srednja vrednost $\pm$ SEM. Statistička značajnost određena je primenom jednofaktorske ANOVA analize uz Tukey post-hoc test. Statistički značajne razlike označene su simbolima ** ($p < 0,01$), dok ns označava odsustvo statistički značajne razlike. Rezultati su reprezentativni za dva nezavisna eksperimenta.

Pored funkcionalnih promena uočenih u BEAS-2B ćelijama, u nastavku je ispitan i potencijal tečnosti za e-cigarete da indukuju genetička oštećenja, primenom testova mutagenosti i genotoksičnosti na V79 ćelijskoj liniji.

4.11. Procena mutagenog potencijala tečnosti za e-cigarete u V79 ćelijama korišćenjem HPRT testa

U *in vitro* testovima korišćene su tečnosti za e-cigarete u koncentraciji od 1,38%, što odgovara koncentraciji nikotina od 250 $\mu\text{g/mL}$ u TEC tretmanu, za koju je MTT esejom potvrđeno da nije citotoksična (Slika 6). Nakon tretmana TEC, PGVG+A i nikotinom nije uočen porast broja HPRT-deficijentnih ćelija, što ukazuje da ispitivane tečnosti za e-cigarete, u primenjenim koncentracijama, ne ispoljavaju mutageni potencijal u V79 ćelijama (Slika 24 A-C). Vodonik-peroksid (H_2O_2), za koji je prethodno opisano da deluje kao mutagen u V79 ćelijama (153), korišćen je kao pozitivna kontrola u ovom testu (Slika 25).



Slika 25. Mutageni efekti tečnosti za e-cigarete u V79 ćelijama.

(A) Sposobnost formiranja kolonija V79 ćelija nakon 72 h tretmana (PGVG+A, TEC, NIK) i 1 h tretmana H_2O_2 , normalizovana u odnosu na kontrolu (ctrl).

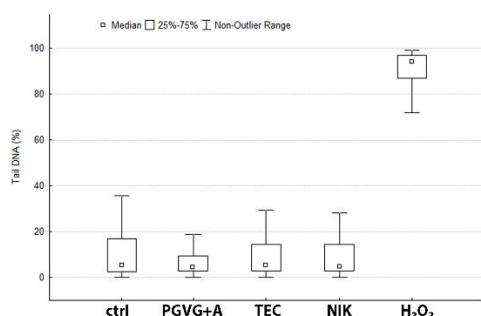
(B) Broj HPRT(-) ćelija na 1×10^6 zasejanih V79 ćelija nakon 6 dana oporavka od tretmana.

(C) Broj HPRT(-) ćelija na 1×10^6 ćelija normalizovan na sposobnost formiranja kolonija. Podaci u panelima A-C prikazani su kao srednja vrednost $\pm$ SEM iz šest nezavisnih eksperimenata.

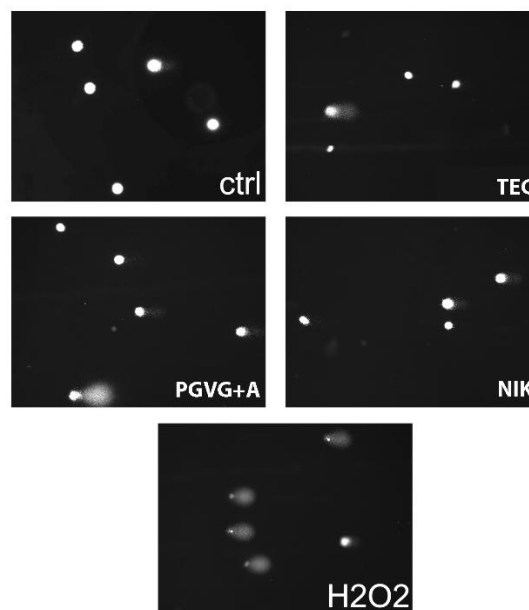
4.12 Procena genotoksičnosti tečnosti za e-cigarete u V79 ćelijama kometa testom

Genotoksični potencijal tečnosti za e-cigarete ispitan je kometa testom, čiji su rezultati bili u saglasnosti sa nalazima HPRT testa, jer nije uočeno statistički značajno povećanje oštećenja DNK nakon tretmana tečnostima za e-cigarete i nikotinom u datim koncentracijama (Slika 26 A, B).

A



B



Slika 26. Genotoksični efekti tečnosti za e-cigarete u V79 ćelijama.

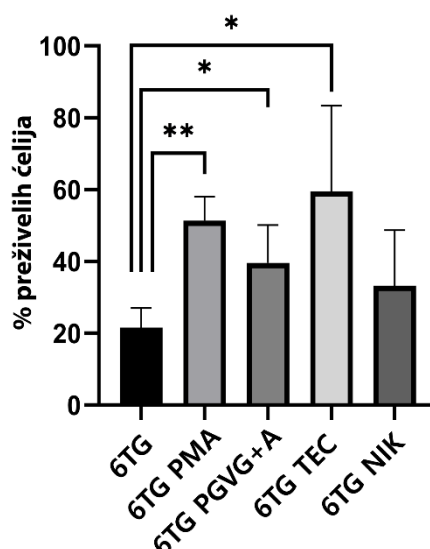
(A) Nivo oštećenja DNK određen komet testom, izražen kao procenat DNK u repu (eng. *tail DNA* %) nakon 72 h tretmana (PGVG+A, TEC, NIK) i 1 h tretmana H₂O₂. Podaci su reprezentativni za tri nezavisna eksperimenta.

(B) Reprezentativne fotografije komet struktura (eng. *tail DNA*) u tretiranim V79 ćelijama.

4.13. Uticaj tečnosti za e-cigarete na metaboličku kooperaciju u V79 ćelijama

U nastavku je analiziran uticaj tečnosti za e-cigarete na međućelijsku komunikaciju u V79 ćelijama praćenjem metaboličke kooperacije i određivanjem ekspresije Cx43. Metabolička kooperacija u V79 ćelijama ispitana je primenom testa zasnovanog na ko-kulturi HPRT-deficijentnih ćelija sa WT ćelijama, koje putem međućelijske komunikacije prenose toksične metabolite 6TG i time čine HPRT-deficijentne ćelije osetljivim na 6TG. Supstance koje narušavaju međućelijsku komunikaciju, posebno putem pukotinastih veza, dovode do povećanja broja 6TG-rezistentnih kolonija u ko-kulturi.

Primena testa metaboličke kooperacije pokazala je da tretmani tečnostima za e-cigarete, kako PGVG+A tako i TEC, dovode do značajnog povećanja broja 6TG-rezistentnih kolonija u ko-kulturama WT i 6TG-R V79 ćelija ($39,59 \pm 4,71\%$ i $59,51 \pm 10,67\%$, redom, u poređenju sa $21,52 \pm 2,4\%$ u kontrolnim uslovima; $p < 0,01$), što ukazuje na poremećaj međućelijske komunikacije između WT ćelija i HPRT-deficijentnih ćelija (6TG-R) (Slika 27). Forbol-12-miristat-13-acetat (PMA) korišćen je kao pozitivna kontrola u ovom testu.



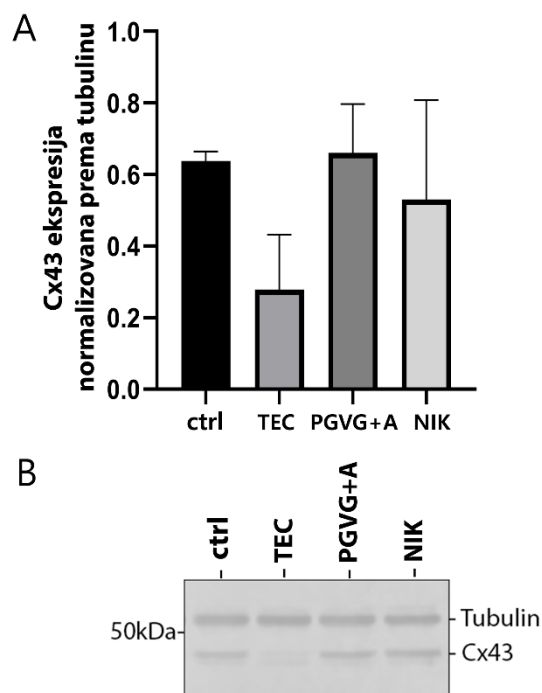
Slika 27. Uticaj tečnosti za e-cigarete na metaboličku kooperaciju.

(A) Metabolička kooperacija: broj preživelih 6TG-R kolonija u mešovitim kokulturama (100 6TG-R i $0,75 \times 10^6$ WT ćelija), normalizovan na kontrolu zasejavanja (100 6TG-R ćelija tretiranih na isti način kao kokulture). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ u odnosu na kontrolu.

Na osnovu rezultata HPRT mutagenog testa (Slika 25), povećanje broja 6TG-rezistentnih kolonija ne može se pripisati nastanku novih HPRT-deficijentnih ćelija nakon tretmana, već ukazuje na narušavanje metaboličke kooperacije između ćelija.

4.14. Uticaj tečnosti za e-cigarete na ekspresiju proteina Cx43 u V79 ćelijama

Cx43 predstavlja ključni strukturni protein pukotinastih veza u plućima, koje imaju značajnu ulogu u međucelijskoj metaboličkoj kooperaciji. Ekspresija Cx43 u V79 ćelijama je analizirana primenom *Western blot* analize. U TEC tretmanu uočeno je smanjenje nivoa Cx43 ($44 \pm 25,3\%$), dok u ostalim tretmanima nije zabeležena statistički značajna promena ekspresije ovog proteina ($103 \pm 17,9\%$ za PGVG+A i $82,1 \pm 39,7\%$ za NIK) u poređenju sa kontrolom (Slika 28).



Slika 28. Uticaj tečnosti za e-cigarete na ekspresiju proteina Cx43 u V79 ćelijama.

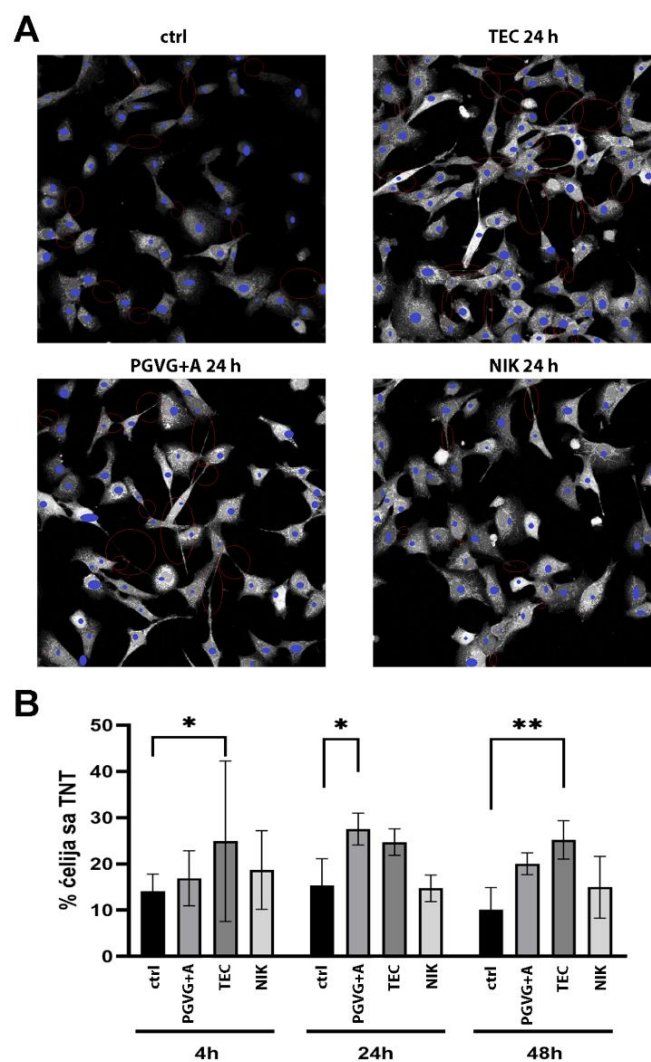
(A) Denzitometrijska kvantifikacija ekspresije proteina Cx43 normalizovana na tubulin. Podaci su prikazani kao srednja vrednost $\pm$ SEM iz tri nezavisna eksperimenta.

(B) Reprezentativni *Western blot* prikaz Cx43 i tubulina kao endogenog kontrolnog proteina u V79 ćelijama nakon 72 h tretmana.

Ovi rezultati ukazuju na to da smanjena ekspresija Cx43 u TEC tretmanu može delimično objasniti smanjenu metaboličku kooperaciju. Međutim, odsustvo značajne promene u ekspresiji Cx43 u PGVG+A tretmanu, uprkos uočenom smanjenju metaboličke kooperacije, sugerise da smanjena ekspresija Cx43 nije jedini mehanizam odgovoran za ovaj efekat, već da su u njega uključeni i dodatni poremećaji funkcije pukotinastih veza.

4.15. Uticaj tečnosti za e-cigarete na formiranje tunelskih nanotuba u BEAS-2B ćelijama

Tunelske nanotube su tanke strukture bogate aktinom koje povezuju ćelije i omogućavaju složenu međućelijsku komunikaciju i čija se dinamika nastajanja menja u uslovima stresa. Kvantifikacija TNT u BEAS-2B ćelijama pokazala je da izlaganje tečnostima za e-cigarete dovodi do vremenski zavisnih promena u broju ćelija koje formiraju TNT (Slika 29).



Slika 29. Formiranje TNT u BEAS-2B ćelijama nakon izlaganja komponentama tečnosti za e-cigarete.

(A) Reprezentativne konfokalne mikroskopske slike BEAS-2B ćelija obojenih *CellTrace™ Violet* bojom nakon 24 h tretmana (ctrl, TEC, PGVG+A i NIK). TNT strukture označene su crvenim elipsama, dok su pojedinačne ćelije obeležene plavim krugovima. Kvantifikacija TNT i ukupnog broja ćelija vršena je manuelno.

(B) Procenat TNT-pozitivnih ćelija nakon 4 h, 24 h i 48 h tretmana. Podaci su prikazani kao srednja vrednost $\pm$ SD. Statistička analiza sprovedena je primenom two-way ANOVA testa uz Dunnett-ovu post hoc analizu; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ u odnosu na kontrolu.

Nakon 4 h tretmana, uočena je statistički značajna razlika u procentu ćelija sa TNT između kontrolnih i ćelija tretiranih sa TEC. Nakon 24 h izlaganja, tretman PGVG+A doveo je do značajnog povećanja procenta ćelija sa TNT u poređenju sa kontrolom, dok je TEC tretman pokazao isti trend ali bez statističke značajnosti. Tretman nikotinom nije pokazao značajnu promenu. Nakon 48 h, uočen je izražen porast TNT-pozitivnih ćelija u TEC i PGVG+A uslovima u odnosu na kontrolu, gde je samo TEC tretman imao statističku značajnost, dok je u nikotinskom tretmanu zabeležen niži procenat u poređenju sa TEC uslovom. Ovi rezultati ukazuju na dinamičku modulaciju TNT formiranja u BEAS-2B ćelijama tokom izlaganja različitim komponentama tečnosti za e-cigarete.

5. Diskusija

Upotreba e-cigareta predstavlja rastući globalni trend. Ipak, uprkos njihovoj širokoj upotrebi, još uvek nedostaju sveobuhvatni podaci o njihovim efektima na zdravlje, tako da *in vitro* metode imaju ključnu ulogu u razumevanju njihovog biološkog dejstva.

U dosadašnjim istraživanjima, na transkripcionom nivou, pokazano je da e-cigarete dovode do aktivacije oksidativnog i ksenobiotičkog stresa, remodelovanja epitela disajnih puteva, kao i smanjenja ekspresije gena uključenih u formiranje i funkciju cilija, što može kompromitovati mukocilijarni klirens koji je jedan od glavnih mehanizama odbrane respiratornog sistema (154,155). Pored toga, zabeležene su promene u ekspresiji gena za ribozomske proteine i gena uključenih u metabolizam fosfolipida, masnih kiselina i triacilglicerola nakon izlaganja aerosolima e-cigareta (156,157). Takođe, zabeleženi su i poremećaji u ekspresiji mitohondrijskih gena, inflamatornim putevima (158) kao i posttranskripcionoj regulaciji putem mikroRNK (159).

Važno je istaći da biološki efekti e-cigareta zavise od njihovog sastava. Prisustvo nikotina i aroma u tečnostima za e-cigarete značajno utiče na ćelijski odgovor. Aerosoli sa nikotinom izazivaju širi transkriptomski odgovor u poređenju sa formulacijama bez nikotina (154,156), dok aromatizovane e-cigarete, poput onih sa aromom mente, dovode do izraženijih promena u ekspresiji gena u odnosu na duvanske arome (31).

Uprkos postojećim nalazima, sistematsko razumevanje transkriptomskih promena u bronhijalnim epitelnim ćelijama, u kontekstu raznovrsnih i brzo promenljivih proizvoda e-cigareta i dalje je ograničeno. Zbog toga su dodatna, dobro kontrolisana istraživanja neophodna za preciznije definisanje molekularnih mehanizama i razumevanje njihovih potencijalnih dugoročnih efekata na respiratorni sistem.

Za razliku od transkriptomskih pristupa, koji odražavaju promene u ekspresiji gena, proteomske analize obuhvataju regulatorne i posttranslacione mehanizme, pružajući realističniji prikaz poremećaja strukturnih, signalnih i metaboličkih puteva u ćeliji. Na taj način, proteomika predstavlja ključnu dopunu transkriptomskim podacima u proučavanju kompleksnih bioloških odgovora na izlaganje aerosolima e-cigareta.

Dosadašnje proteomske studije dosledno pokazuju da aerosoli e-cigareta indukuju oksidativni stres i narušavaju redoks homeostazu u plućnom tkivu (112). Različite studije pokazale su da postoje stotine proteina sa izmenjenom regulacijom u plućnim ćelijama nakon izlaganja aerosolima e-cigareta, pri čemu su pogođeni ključni ćelijski procesi, uključujući ćelijsku adheziju, poremećaje u proteinskim komponentama ribozoma, migracija ćelija i prenos signala (100,108,112,160). Uz to, pokazano je da dovode i do aktivacije inflamatornih procesa u disajnim putevima. Proteomske analize ćelija sputuma i BAL korisnika e-cigareta ukazuju na pojačanu aktivaciju neutrofila i izmenjenu sekreciju mucina, kao i povišene nivoe različitih proteaza (100,106,107). Zanimljivo je da proteomski profili korisnika e-cigareta pokazuju delimična preklapanja sa profilima uočenim kod osoba sa astmom, naročito neutrofilnog fenotipa astme (161), što ukazuje na moguće zajedničke biološke mehanizme i potencijalne dugoročne implikacije po respiratorno zdravlje.

Zajedno, studije koje analiziraju promene u transkriptomu, kao i one usmerene na proteom, sugerišu da e-cigarete, pri uporedivim dozama nikotina, dovode do manjeg broja diferencijalno ekspimiranih gena i proteina i slabijeg narušavanja inflamatornih mreža u odnosu na konvencionalne cigarete (100,162–164), ali značajne promene u ekspresiji proteina i dalje su jasno prisutne i tačni molekularni

obrasci i puni opseg signalnih puteva pogođenih složenom interakcijom sastava tečnosti za e-cigarete, karakteristika uređaja i protokola izlaganja još uvek nisu u potpunosti razjašnjeni.

I pored rastućeg broja studija, i dalje postoji nedostatak sveobuhvatne *shotgun (bottom-up)* proteomske analize na različitim tipovima plućnih ćelija. Ovaj pristup omogućava sistematsku identifikaciju i kvantitativnu analizu velikog broja proteina u kompleksnim uzorcima bez prethodnog izbora molekula od interesa, čime se omogućava dubinsko profilisanje proteoma i detekcija molekularnih promena izazvanih spoljašnjim uticajima (165).

U ovoj studiji ispitivan je uticaj komponenti tečnosti za e-cigarete na dve ćelijske linije poreklom od pluća, humanoj plućnoj epitelnoj liniji BEAS-2B i plućnim fibroblastima kineskog hrčka V79. BEAS-2B ćelije su imortalizovane humane bronhijalne epitelne ćelije, dobijene iz netumorskog bronhijalnog epitela (166). U fiziološkom kontekstu, ove ćelije odgovaraju respiratornom epitelu provodnog dela pluća, koji oblaže bronhije i bronhiole i koje među prvim dolaze u kontakt sa inhaliranim supstancama (167). One omogućavaju proučavanje odgovora epitela na ksenobiotike, oksidativni stres i druge štetne faktore iz spoljašnje sredine, kao i mehanizama vezanih za integritet i funkciju epitelnog sloja. V79 ćelijska linija predstavlja plućne fibroblaste poreklom iz netumorskog tkiva kineskog hrčka. Ovo je dobro okarakterisan *in vitro* model široko korišćen u toksikološkim i genotoksikološkim ispitivanjima, zahvaljujući svojoj genetskoj stabilnosti, visokoj osetljivosti na mutagene agense i izraženoj sposobnosti formiranja klonova (168). Dugogodišnja primena ove ćelijske linije u standardizovanim toksikološkim testovima omogućava pouzdanu procenu genotoksičnih efekata i metaboličke kooperacije. Iako poreklom ne pripada humanom respiratornom sistemu, ovaj model pruža značajne informacije o osnovnim mehanizmima ćelijskog odgovora na ispitivane supstance, uz potrebu za oprezom pri interpretaciji rezultata u kontekstu humanog sistema.

U okviru ove teze efekat akutnog izlaganja ćelija komponentama tečnosti za e-cigarete i kondenzatima aerosola tečnosti za e-cigarete je praćen na nivou ekspresije gena i na nivou proteoma, metodama RNK-sekvenciranja i masene spektrometrije, nakon čega su neki od rezultata dobijenih metodama omika potvrđeni funkcionalnim esejima. Uporedna analiza transkriptomskih i proteomskih podataka predstavlja ključni pristup za sveobuhvatno i holističko razumevanje ćelijskih odgovora na spoljašnje uticaje, jer prevazilazi ograničenja koja su svojstvena analizama zasnovanim na jednoj od ove dve platforme (100,169). Iako transkriptomski podaci pružaju dragocene informacije o regulaciji ekspresije gena i poremećenim signalnim putevima, nivo mRNK ne mora uvek direktno odražavati funkcionalne količine proteina niti posttranslacione modifikacije koje u najvećoj meri određuju ćelijsku aktivnost i realno biološko stanje. Ovo potvrđuju nalazi koji ukazuju da je korelacija između nivoa mRNK i nivoa proteina često samo umerena, što znači da se na osnovu transkriptomskih podataka ne može potpuno pouzdano predvideti ekspresija proteina (170). Dinamička priroda prometa proteina (eng. *protein turnover*), koja podrazumeva kontinuiranu sintezu i razgradnju proteina, kao i različite posttranslacione modifikacije, značajno utiču na funkciju, stabilnost i interakcije proteina, a ovi aspekti nisu obuhvaćeni analizom ekspresije gena. Dodatno, integrativne studije velikog obima ukazuju da je količina proteina u ćeliji u velikoj meri oblikovana regulacijom translacije i brzinom degradacije proteina, čime se dodatno naglašava značaj prometa proteina kao jednog od ključnih determinanata funkcionalnog proteoma (171). Nasuprot tome, proteomske analize omogućavaju direktan uvid u promene u količini proteina i njihovim modifikacijama, ali same po sebi ne moraju uvek objasniti da li uočene promene potiču primarno iz transkripcione regulacije ili iz posttranskripcionih i posttranslacionih mehanizama (100).

U tom kontekstu, primena transkriptomskih i proteomskih analiza primenjena u ovom radu omogućava šire sagledavanje molekularnih poremećaja izazvanih izloženošću aerosolima tečnosti za e-cigarete i potpunije tumačenje biološkog odgovora ćelija na e-cigarete.

5.1. Translacija i proteostaza nakon izlaganja komponentama tečnosti za e-cigarete

U plućnom tkivu, održavanje proteostaze predstavlja ključni mehanizam za očuvanje funkcije ćelija koje su stalno izložene inhalacionim agensima. Proteostaza obuhvata koordinaciju sinteze, uvijanja i degradacije proteina, pri čemu translacija određuje brzinu i obim sinteze novih proteina, čime direktno utiče na sposobnost ćelije da nadoknadi oštećene ili degradirane proteine i održi stabilnost proteoma. U epitelu disajnih puteva i plućnim fibroblastima, ovi procesi su posebno značajni zbog potrebe za brzom zamenom oštećenih proteina i održavanjem funkcionalnog integriteta barijere (172). Narušavanje proteostaze može dovesti kako do gubitka funkcije proteina usled nedovoljne količine pravilno savijenih molekula, tako i do sticanja toksičnih svojstava kroz agregaciju pogrešno savijenih proteina, čime se dodatno kompromituje ćelijska funkcija. Poremećaji proteostaze prepoznati su kao važan faktor u razvoju različitih plućnih bolesti, uključujući HOBP (173,174), astmu (172,175) i plućnu fibrozu (176). Takođe, pokazano je da spoljašnji faktori poput pušenja cigareta mogu negativno uticati na proteostazu u plućima (177,178).

U ovoj tezi, analiza BEAS-2B ćelija ukazala je na izražene promene u procesima citoplazmatske translacije i biogeneze ribozoma nakon izlaganja kondenzatu aerosola e-cigareta. Ove promene su identifikovane na transkripcionom nivou (Slika 11 i 12), a dodatno potvrđene analizom proteoma, kroz smanjenu zastupljenost ribozomalnih proteina (Slika 15), kao i na funkcionalnom nivou, koji je pokazao redukovanu *de novo* sintezu proteina (Slika 21). Ovi rezultati ukazuju na smanjen kapacitet ćelije za sintezu proteina, što može imati direktne posledice po održavanje ćelijske homeostaze. U aspektu molekulskih funkcija, primećen je smanjen doprinos strukturnih komponenti ribozoma, a u okviru bioloških procesa, manja zastupljenost procesa uvijanja i metabolizma proteina u odnosu na kontrolu (Slika 15). Pored toga, i u okviru analize transkriptoma i proteoma zabeležena smanjena šaperonska aktivnost (Slika 13, 15) (179). Ovi nalazi ukazuju na smanjen kapacitet ćelije da održava stabilnost proteoma nakon izlaganja kondenzatima aerosola tečnosti za e-cigarete.

Nalazi ovog istraživanja uklapaju se u ograničen, ali rastući korpus podataka koji ukazuje na osetljivost translacionog aparata na izlaganje e-cigaretama. Park i saradnici su pokazali smanjenu ekspresiju ribozomalnih gena i redukciju sinteze proteina u primarnim bronhijalnim epitelnim ćelijama nakon izlaganja tečnostima za e-cigarete (157), dok su Shen i saradnici pokazali translaciju kao jedan od procesa najviše pogođenih u primarnim humanim plućnim epitelnim ćelijama (156). U studiji Park i kolega korišćena je tečnost za e-cigarete sa aromom vanile, a uočena redukcija translacionih procesa bila je komplementarna nalazima dobijenim u našem modelu. Ova podudarnost sugerise da efekat translacione represije verovatno nije striktno vezan za specifičnu aromu, već može predstavljati opšti odgovor na određene zajedničke komponente formulacije ili produkte njihove termalne razgradnje.

Važno je istaći da su promene u analizi transkriptomskog odgovora BEAS-2B ćelija identifikovane bez primene unapred definisanog LFC kriterijuma, kako bi se obuhvatio širi spektar suptilnih promena u ekspresiji gena izazvanih izlaganjem kondenzatu aerosola tečnosti za e-cigarete. Ovakav pristup se pokazao posebno značajnim za identifikaciju promena u procesima translacije i biogeneze ribozoma, koje su se manifestovale kao promene manjeg intenziteta, ali su bile konzistentne na nivou funkcionalnih kategorija. Ovaj nalaz ukazuje na to da i relativno male promene u ekspresiji gena mogu imati značajan funkcionalni efekat kada zahvataju osnovne ćelijske procese. Primena strožih LFC kriterijuma verovatno bi dovela do isključivanja upravo ovakvih promena, što može predstavljati jedno od objašnjenja zašto translaciona represija nije široko prepoznata u ranijim transkriptomskim studijama efekata e-cigareta. Sličan pristup upotreбили su Haswell i kolege prilikom analize

transkriptoma komercijalno dostupnog rekonstituisanog humanog bronhijalnog epitela, radi procene uticaja aerosola e-cigareta (180), argumentujući da je na taj način omogućena analiza suptilnih promena u ćelijama.

Slični obrasci translacione disrupcije opisani su i u BEAS-2B ćelijama izloženim ultrafinim česticama nastalih sagorevanjem dizela ili biomase (181). Ipak, u poređenju sa dominantnim fokusom literature na inflamatorne i oksidativne puteve, translacija ostaje relativno slabo istražen aspekt odgovora na e-cigarete, što otvara prostor za razmatranje translacionog aparata kao potencijalno rane i osetljive mete inhalacionog stresa.

Proteomski podaci dobijeni u V79 plućnim fibroblastima dodatno osnažuju ovu interpretaciju. Izlaganje V79 ćelija tečnostima za e-cigarete i samom nikotinu dovelo je do smanjenja ukupnog broja identifikovanih proteina (Slika 18), pri čemu je najizraženiji efekat zabeležen u uslovu tretmana kompletnom tečnošću za e-cigarete (TEC), što ukazuje na mogući kombinovani doprinos različitih komponenti. S obzirom na to da su i tečnosti za e-cigarete i kondenzati njihovih aerosola pokazali efekat na proteostazu, može se pretpostaviti da su za ovaj odgovor odgovorne komponente zajedničke za oba tipa tretmana. Ovakav nalaz ukazuje da posmatrani efekti verovatno ne potiču primarno od produkata termalne razgradnje, već od supstanci koje čine osnovni sastav tečnosti i koje su u nekoj meri termostabilne. Ovu pretpostavku je, međutim, neophodno dodatno eksperimentalno ispitati i potvrditi.

Rangiranje i analiza obogaćenja bioloških procesa u V79 fibroblastima pluća nakon tretmana tečnostima za e-cigarete pokazala je redukciju aspekta biogeneze malih subjedinica ribozoma pokazanu promenom u njihovom relativnom rangiranju (Slika 20), čime je posredno translaciona represija potvrđena i u modelu fibroblasta (182). Ovi nalazi takođe su u saglasnosti sa podacima Park i saradnika (157), ali ih proširuju na drugi ćelijski tip i drugačiji eksperimentalni sistem.

Zajedno posmatrano, transkriptomski, proteomski i funkcionalni podaci u dva različita plućna ćelijska modela, BEAS-2B i V79, dosledno ukazuju da translacioni aparat i ribozomalna biogeneza predstavljaju osetljivu metu izlaganja komponentama tečnosti za e-cigarete. Izostavljanje LFC praga u transkriptoskoj analizi omogućilo je detekciju ovih kvantitativno suptilnih, ali funkcionalno koordinisanih promena, koje bi u suprotnom mogle ostati prikrivene. Ovi rezultati sugerišu da poremećaj translacije ne predstavlja izolovani nalaz, već konzistentan element ćelijskog odgovora, sa potencijalnim implikacijama za dugoročno očuvanje proteostaze i funkcionalne stabilnosti plućnog epitela i fibroblasta nakon izlaganja e-cigaretama.

5.2. Mitohondrijska homeostaza nakon izlaganja komponentama tečnosti za e-cigarete

Mitohondrije imaju centralnu ulogu u održavanju funkcije plućnih ćelija, ne samo kroz produkciju energije, već i kroz učešće u metaboličkim procesima, redoks ravnoteži i regulaciji apoptoze i održavanju ćelijske homeostaze (183). Poremećaji mitohondrijske funkcije prepoznati su kao važan element u patogenezi plućnih bolesti. U HOBP, oni se manifestuju kroz povećanu produkciju ROS u mitohondrijama, smanjenim antioksidativnim kapacitetom, kao i smanjenim brojem mitohondrija što doprinosi oksidativnom stresu i oštećenju tkiva (184–186). U astmi, mitohondrije imaju važnu ulogu u regulaciji inflamatornog odgovora i funkcije epitela, pri čemu poremećaj njihove funkcije može dovesti do apoptoze epitelnih ćelija. Ovi procesi dodatno su potpomognuti povećanom produkcijom ROS u inflamatornom okruženju (186,187). Izloženost duvanskom dimu dodatno pojačava ove

poremećaje kroz indukciju oksidativnog stresa i oštećenje mitohondrijskih komponenti (186,188,189).

Mitohondrijska homeostaza se u ovom istraživanju izdvojila kao jedna od dosledno pogođenih ćelijskih meta nakon izlaganja komponentama tečnosti i kondenzata aerosola tečnosti za e-cigarete, pri čemu su promene detektovane na transkriptomskom, proteomskom i funkcionalnom nivou. U BEAS-2B ćelijama, represija translacije je obuhvatila i gene koji kodiraju mitohondrijske ribozomske proteine (MRPS i MRPL familije) (Slika 12 E, G), uz smanjeno obogaćenje setova gena povezanih sa mitohondrijskom translacijom i mitohondrijskom ekspresijom gena (179). Ovo je potvrđeno i na proteomskom nivou kroz smanjenje relativnog doprinosa mitohondrijskih komponenti (Slika 15, 16). Ovakav obrazac ukazuje na poremećaj u održavanju mitohondrijskog proteoma i potencijalno kompromitovanu sintezu komponenti respiratornog lanca. Funkcionalna analiza pokazala je značajnu promenu potencijala mitohondrijske membrane, utvrđenu primenom TMRE i JC-1 bojenja (Slika 22) (179). Budući da je održavanje mitohondrijskog membranskog potencijala ključno za oksidativnu fosforilaciju i sintezu ATP-a, njegovo smanjenje predstavlja indikator mitohondrijske disfunkcije, koji u našem modelu prati transkriptomске promene u mitohondrijskoj translaciji. Ovi rezultati su u skladu sa prethodnim studijama koje pokazuju da aerosoli e-cigareta narušavaju mitohondrijalnu respiraciju, smanjuju nivoe respiratornih kompleksa i produkciju ATP-a.

U plućnim fibroblastima pokazano je da aerosoli indukuju mitohondrijski oksidativni stres i destabilizaciju respiratornog kompleksa IV, uz istovremenu fragmentaciju DNK (139), što ukazuje na direktan uticaj na integritet respiratornog lanca. U epitelnim modelima dodatno je potvrđeno da aromatizovane e-cigarete dovode do smanjenja nivoa respiratornih kompleksa I, II i IV, kao i do poremećaja maksimalne mitohondrijske respiracije (190). Sličan obrazac mitohondrijske disfunkcije opisan je i u radu Clapp i saradnika (191), gde je izlaganje aromatičnim komponentama tečnosti za e-cigarete dovelo do smanjenja produkcije ATP-a i disrupcije mitohondrijske respiracije u bronhijalnim epitelnim ćelijama.

Većina studija koje su fokusirane na mitohondrije primarno je usmerena na respiratorne komplekse, membranski potencijal i oksidativni stres, odnosno na respiratornu aktivnost mitohondrija. Međutim, dostupni su i podaci koji ukazuju na to da je upotreba ovih proizvoda povezana sa promenama u ekspresiji gena uključenih u mitohondrijsku funkciju. Tommasi i saradnici (158) pokazali su, analizom leukocita korisnika e-cigareta, da je upotreba ovih proizvoda povezana sa promenama u ekspresiji gena uključenih u mitohondrijsku funkciju i inflamatorne signalne puteve. Ovi nalazi ukazuju da korišćenje e-cigareta može biti praćeno disregulacijom mitohondrijskih gena kao delom šireg stresnog odgovora. Zajedno sa našim podacima, ovakvi rezultati sugerišu da promene u respiratornoj aktivnosti mogu biti praćene, ili čak prethodno uslovljene, promenama u regulaciji mitohondrijskog proteoma.

Rezultati ove teze sugerišu da modulacija mitohondrijske translacije može predstavljati potencijalni molekularni mehanizam koji prethodi izraženijoj respiratornoj disfunkciji (179), čime se dodatno nadograđuju dosadašnji nalazi u ovoj oblasti. Ovime se mitohondrijska translacija nameće kao potencijalno važno mesto regulacije u odgovoru ćelije na komponente tečnosti za e-cigarete, povezujući promene na nivou ekspresije gena sa kasnijim funkcionalnim poremećajima mitohondrijske energetske funkcije.

Li i kolege su u studiji (192) sprovedenoj na *in vivo* modelu miševa izloženih aerosolu tečnosti za e-cigarete, ukazali da komponente aerosola mogu indukovati promene u ekspresiji gena uključenih u oksidativnu fosforilaciju i mitohondrijsku dinamiku, uz izražen doprinos oksidativnog stresa i oštećenja mitohondrijske DNK. Iako je reč o sistemskom modelu, a ne o izolovanom epitelnom

sistemu, ovi nalazi su u skladu sa proteomskim rezultatima dobijenim u BEAS-2B ćelijama, gde je uočen smanjen relativni doprinos mitohondrijskih proteina i promena njihovog hijerarhijskog rangiranja unutar funkcionalnih kategorija (179). Takav obrazac može odražavati ranu metaboličku reorganizaciju ćelije usled mitohondrijskog stresa, a ne nužno trajno strukturno oštećenje mitohondrija.

Sličan trend mitohondrijske disfunkcije uočen je i u V79 fibroblastima, gde je proteomska analiza pokazala smanjenje relativne zastupljenosti proteina anotiranih kao mitohondrijski, kao i manji broj identifikovanih mitohondrijskih proteinskih vrsta u tretiranim uzorcima (Slika 19) (182). Iako ovaj nalaz sam po sebi ne omogućava direktan zaključak o smanjenju mitohondrijske mase, on ukazuje na narušavanje mitohondrijske homeostaze u uslovima izlaganja komponentama tečnosti za e-cigarete. Dodatno, odsustvo pojedinih enzima u V79 ćelijama tretiranim TEC, uključujući glutaminazu i dihidrofolat reduktazu, sugerise da dolazi do reorganizacije mitohondrijskog proteoma. Uključivanje glutaminskog metabolizma među pogođene procese može predstavljati adaptivni odgovor na mitohondrijski stres, ali i obrazac koji se povezuje sa proliferativnim fenotipovima (Slika 20) (182).

Rezultati dobijeni u ovom istraživanju mogu se sagledati i u kontekstu studije Lerner i saradnika (139), koji su pokazali da izlaganje aerosolu tečnosti za e-cigarete dovodi do oksidativnog stresa u mitohondrijama i destabilizacije kompleksa IV respiratornog lanca u plućnim fibroblastima. U navedenoj studiji, primenjene doze aerosola, pored indukcije mitohondrijskog oksidativnog stresa, dovele su i do fragmentacije DNK, potvrđene komet testom – istom metodom koja je korišćena i u našem istraživanju za procenu genotoksičnosti. Za razliku od tih nalaza, u našem modelu su promene u mitohondrijskom proteomu detektovane pri dozama tečnosti koje nisu izazvale genotoksičnost i citotoksičnost u V79 fibroblastima. Ova razlika ukazuje da mitohondrijske perturbacije mogu nastupiti i pri koncentracijama koje ne dovode do detektabilnog oštećenja DNK, što dodatno osnažuje pretpostavku da su mitohondrije rana i osetljiva meta izlaganja komponentama tečnosti za e-cigarete.

Dodatnu dimenziju razumevanju mitohondrijskog odgovora na izlaganje aerosolima e-cigareta pruža studija Chitteti i saradnika (111). Autori su pokazali da mladi, zdravi korisnici e-cigareta imaju povišene markere oksidativnog oštećenja u plazmi, uključujući povećane nivoe karbonila proteina, 4-HNE i cirkulišuće mitohondrijske DNK. Dodatno, plazma korisnika bila je sposobna da u *in vitro* modelu indukuje mitohondrijski stres i porast ROS u endotelijalnim i epitelnim ćelijama, ukazujući na postojanje cirkulišućih medijatora koji sistemski utiču na mitohondrijsku funkciju. Ovi nalazi su u skladu sa našim podacima koji ukazuju na mitohondrije kao centralnu metu odgovora na komponente tečnosti za e-cigarete.

Zajedno posmatrano, rezultati u BEAS-2B i V79 modelu ukazuju da poremećaj mitohondrijske translacije, smanjen relativni doprinos mitohondrijskih proteina i funkcionalne promene u membranskom potencijalu predstavljaju konzistentne elemente ćelijskog odgovora. Iako u ovom istraživanju nisu direktno merene respiratorna aktivnost, produkcija reaktivnih kiseoničnih vrsta niti mitohondrijska masa, uočene promene mogu se tumačiti kao indikatori mitohondrijskog stresa i funkcionalne perturbacije, a ne kao dokaz ireverzibilnog oštećenja. Konzistentnost nalaza između dva ćelijska modela dodatno osnažuje zaključak da izlaganje komponentama tečnosti za e-cigarete narušava mitohondrijsku homeostazu kao deo šireg poremećaja ćelijske ravnoteže.

5.3. Indukcija enzima metabolizma ksenobiotika CYP1A1 i CYP1B1 u BEAS-2B ćelijama nakon izlaganja kondenzatima aerosola tečnosti za e-cigarete

Metabolizam ksenobiotika predstavlja ključni odbrambeni mehanizam respiratornog epitela, pri čemu enzimi iz porodice citohroma 450 imaju centralnu ulogu (193). U BEAS-2B ćelijama, transkriptomsko poređenje kTEC tretmana sa kPGVG pokazalo je da su najizraženije indukovani geni *CYP1A1* i *CYP1B1*, enzimi iz porodice citohroma P450 koji predstavljaju mete aktivacije aril-hidrokarbonskog receptora (AhR) i učestvuju u metabolizmu ksenobiotika u plućima. Njihova aktivnost uključuje transformaciju komponenti duvanskog dima u oblike pogodnije za eliminaciju ili, alternativno, u reaktivnije i potencijalno štetne metabolite (bioaktivacija) (194,195).

U respiratornom epitelu, vezivanje policikličnih aromatičnih ugljovodonika (PAH) i srodnih aromatičnih jedinjenja iz dima i aerosola za AhR dovodi do njegove translokacije u jedro i transkripcione indukcije, između ostalog, gena *CYP1A1* i *CYP1B1* (196). Rezultati ove teze u skladu su sa studijama u kojima je ovakav obrazac indukcije dokumentovan kod pušača i korisnika e-cigareta (195,197), kao i u transkriptomskoj analizi plućnog tkiva korisnika e-cigareta, gde je *CYP1A1* identifikovan kao najizraženije indukovani gen u poređenju sa subjektima koji ne koriste e-cigarete (198). Povišena ekspresija *CYP1A1* zabeležena je i u primarnim bronhijalnim epitelnim ćelijama diferenciranim na modelu diferencijacije na granici vazduh-tečnost (eng. *air liquid interface*, ALI) nakon izlaganja aerosolu tečnosti za e-cigarete (156), dok su *CYP1A1* i *CYP1B1* indukovani i u oralnim keratinocitima izloženim kondenzatu aerosola, kao i u plućima pacova nakon *in vivo* izlaganja (111,199).

Indukcija *CYP1A1* i *CYP1B1* ima šire biološke implikacije od samog metabolizma ksenobiotika. Poznato je da katalitička aktivnost *CYP1A1* može biti praćena povećanom produkcijom ROS, a indukcija njegove ekspresije u određenim modelima povezana je sa smanjenjem mitohondrijske aktivnosti i kvaliteta, kao i porastom mitohondrijskih ROS (200,201). Ovi podaci mogu predstavljati potencijalnu vezu indukcije *CYP1A1* sa mitohondrijskom perturbacijom, što je posebno relevantno u kontekstu naših nalaza mitohondrijskog stresa u BEAS-2B ćelijama (179). Iako u ovom radu nije direktno merena aktivnost CYP enzima niti produkcija ROS uslovljena njihovom aktivacijom, prethodne studije ukazuju da indukcija *CYP1A1/CYP1B1* može predstavljati jedan od potencijalnih izvora redoks disbalansa u epitelnim ćelijama izloženim kondenzatima aerosola tečnosti za e-cigarete (200,201).

Sa onkološkog aspekta, *CYP1B1* je jedan od glavnih ekstrahepatičnih citohroma uključenih u bioaktivaciju kancerogena i često je povišeno eksprimiran u tumorskom tkivu u poređenju sa susednim normalnim tkivom, što ga čini potencijalnom metom za dizajn pro-lekova (202). Njegova uloga u kancerogenezi povezuje se sa sposobnošću generisanja reaktivnih metabolita, ali i sa modulacijom signalnih puteva koji regulišu proliferaciju i rezistenciju na terapiju. Iako indukcija *CYP1A1/CYP1B1* gena u našem modelu ne implicira direktno kancerogeni potencijal, činjenica da su ovi enzimi centralni u metaboličkoj aktivaciji prokarcinogena i da su dosledno indukovani u različitim modelima izlaganja e-cigaretama ukazuje da njihova ekspresija predstavlja važan biomarker biološkog odgovora na izloženost komponentama aerosola e-cigareta (203).

Posebno je značajna uloga *CYP1B1* u regulaciji lipidnog metabolizma. Pokazano je da je *CYP1B1* povećan u alveolarnim epitelnim ćelijama tipa II (AT2) kod pacijenata sa HOBP, kao i nakon izlaganja dimu cigareta, gde njegova prekomerna ekspresija promovira akumulaciju lipida, dok inhibicija ili siRNA-posredovana supresija *CYP1B1* smanjuje lipidnu akumulaciju, mitohondrijski ROS i apoptozu (200). Dodatno, i ekstrakt aerosola tečnosti za e-cigarete indukuje lipidnu akumulaciju koja je ublažena inhibicijom *CYP1B1*. Ovi nalazi sugerišu da *CYP1B1* može imati

direktnu ulogu u narušavanju lipidne homeostaze (200). U našem modelu BEAS-2B ćelija, uočen je porast ekspresije *CYP1B1* gena paralelno sa pojavom lipidnih kapljica nakon tretmana kondenzatom aerosola tečnosti za e-cigarete (179), što otvara hipotezu da bi indukcija ovog enzima mogla doprineti uočenoj akumulaciji lipida. Međutim, s obzirom na to da je ova funkcionalna veza primarno potvrđena u AT2 modelima, neophodna su dodatna istraživanja u bronhijalnim epitelnim ćelijama, uključujući primenu selektivnih inhibitora *CYP1B1* i praćenje lipidne akumulacije nakon izlaganja kondenzatima, kako bi se ova hipoteza eksperimentalno potvrdila.

Zajedno posmatrano, indukcija gena *CYP1A1* i *CYP1B1* u BEAS-2B ćelijama tretiranim kondenzatima aerosola tečnosti za e-cigarete ukazuje na aktivaciju AhR-zavisnog ksenobiotičkog odgovora, sa potencijalnim implikacijama za redoks ravnotežu, mitohondrijsku funkciju i lipidni metabolizam. Iako direktna uzročna veza između *CYP1B1* indukcije i akumulacije lipida u našem modelu još nije potvrđena, postojeća literatura pruža osnovu za hipotezu da bi ovaj enzim mogao predstavljati mehanističku vezu između hemijske izloženosti i metaboličkih promena u plućnom epitelu, što predstavlja relevantan pravac za dalja istraživanja.

5.4. Akumulacija neutralnih lipida i lizozomalni sistem u BEAS-2B ćelijama nakon izlaganja kondenzatima aerosola tečnosti za e-cigarete

Metabolizam lipida ima ključnu ulogu u održavanju funkcije pluća. Poremećaji metabolizma lipida opisani su u brojnim plućnim oboljenjima, uključujući pneumoniju, HOBP, plućnu fibrozu, tuberkulozu i akutno oštećenje pluća, i često se manifestuju akumulacijom LLM (204). Među plućnim ćelijama, najizraženiju metaboličku aktivnost u ovom domenu imaju AT2, čija je osnovna funkcija sinteza, sekrecija i reciklaža surfaktanta, kompleksne smeše koja se pretežno sastoji od fosfolipida, proteina i neutralnih lipida (205). Pored njih, značajnu ulogu imaju i alveolarni makrofagi, koji učestvuju u razgradnji surfaktanta (206).

Lipoidna pneumonija, kao jedno od oboljenja povezanih sa poremećajem metabolizma lipida, deli se na egzogeni i endogeni oblik. Egzogeni lipoidna pneumonija nastaje usled aspiracije ili inhalacije supstanci koje sadrže lipide, poput mineralnih ulja ili tečnosti za e-cigarete, dok endogena (holesterolska) lipoidna pneumonija nastaje kao posledica unutrašnje akumulacije lipida, usled opstrukcije disajnih puteva, ćelijske nekroze ili metaboličkih poremećaja (207,208). Zabeleženi su i slučajevi akutne egzogene lipoidne pneumonije kod korisnika e-cigareta, pre svega kod osoba koje koriste proizvode koji sadrže THC ulja, slično slučajevima povezanim sa EVALI sindromom (209).

Dok su poremećaji metabolizma lipida dobro okarakterisani u AT2 ćelijama i LLM u različitim plućnim oboljenjima, znatno je manje podataka o akumulaciji lipida u bronhijalnim epitelnim ćelijama.

Tokom analize transkripcionim podataka BEAS-2B ćelija tretiranih kondenzatima aerosola tečnosti za e-cigarete, uočeno je obogaćenje procesa povezanih sa metabolizmom lipida. Ovaj fenomen je zatim potvrđen mikroskopskom analizom gde je utvrđeno povećano prisustvo lipidnih kapljica u ćelijama tretiranim kTEC (Slika 24) (179). Ranije pomenuta studija Zhu i saradnika je istraživala povezanost poremećaja lipidnog metabolizma u AT2 ćelijama pacijenata sa HOBP *ex vivo*, i u *in vivo* AT2 ćelijama miševa izloženih duvanskom dimu kao i *in vitro* A549 ćelijama tretiranim ekstraktom duvanskom dima sa povećanom ekspresijom *CYP1B1*. Naši rezultati su u saglasnosti sa ovom studijom, pokazujući da je ovaj fenomen akumulacije lipida i povišene ekspresije *CYP1B1* u ćelijama nakon tretmana e-cigaretama prisutan i u plućnim epitelnim ćelijama, a ne samo u AT2 (200). Slični

nalazi zabeleženi su i *in vivo*, gde su u bronhoalveolarnoj lavaži (BAL) korisnika e-cigareta, kao i kod miševa hronično izloženih e-cigaretama, opisani LLM (135,210). Zanimljiva studija Madisona i kolega opisuje povećan nivo intracelularnih fosfolipida u BAL ćelijama nakon produženog izlaganja aerosolu tečnosti za e-cigarete, što je, u kombinaciji sa promenjenim fenotipom makrofaga, rezultovalo izmenjenim lipidnim profilom surfaktanta u plućima, oslabljenim urođenim imunskim odgovorom i povećanom podložnosti inhalacionim patogenima. (210) U ovoj studiji je takođe uočen povećan sadržaj lizozoma u alveolarnim makrofagima miševa nakon četvoromesečnog izlaganja e-cigaretama (210).

Tokom analize proteoma BEAS-2B ćelija nakon izlaganja kondenzatima aerosola tečnosti za e-cigarete (Slika 16) uočena je promena u redosledu relativnog rangiranja ćelijskih komponenti, gde su lizozomi prešli sa šestog mesta u netretiranim ćelijama na četvrto mesto u kTEC i kPGVG tretiranim BEAS-2B ćelijama (179). Ovo ukazuje da potencijalnu povećanu zastupljenost lizozoma u tretiranim ćelijama, što je i potvrđeno mikroskopskom analizom u kojoj je uočen porast lizozomalnog sadržaja u BEAS-2B ćelijama (Slika 23). Promene u lizozomalnom sistemu mogu ukazivati na prilagođavanje ćelijskog metabolizma uslovima stresa i na pojačanu potrebu za razgradnjom oštećenih makromolekula i organela, što je u skladu sa prisustvom ireverzibilno oštećenih proteina i lipidnih kapljica u našem modelu (179).

Lizozomi u plućima imaju važnu ulogu u održavanju ćelijske homeostaze, naročito u alveolarnim makrofagima i epitelnim ćelijama, gde učestvuju u razgradnji fagocitovanog materijala, uključujući patogene, oštećene organele i lipidne komponente nastale usled kontinuirane izloženosti inhalacionim agensima. U fiziološkim uslovima, njihova kisela sredina i hidrolitički enzimi omogućavaju efikasno odvijanje autofagije i fagocitoze, čime se održavaju proteostaza i lipidna homeostaza. Na taj način sprečava se akumulacija nedovoljno razgrađenog materijala i posledična aktivacija inflamatornih odgovora (211,212).

Poremećaj lizozomske aktivnosti doprinosi razvoju različitih plućnih oboljenja. U HOBP, oksidativni stres može dovesti do permeabilizacije lizozomske membrane u makrofagima (212), dok je u plućnoj fibrozi zabeležena narušena acidifikacija u epitelnim i fibroblastnim ćelijama (213). Takođe, bolesti lizozomskog skladištenja (eng. *lysosomal storage disorders*), kao što su Gaucher bolest, Niemann-Pick bolest i Fabry bolest, povezane su sa razvojem intersticijalnih bolesti pluća, koje zahvataju vezivno tkivo pluća (214).

Poznato je i da lizozomi predstavljaju mesto akumulacije finih čestica (PM2.5) (215), dok su aerosoli e-cigareta identifikovani kao jedan od njihovih izvora (216), pa se njihov potencijalni doprinos uočenim promenama ne može isključiti.

Dalje razjašnjenje ovih mehanizama zahteva dodatna istraživanja usmerena na funkciju lizozoma, dinamiku autofagijskog fluksa, mehanizma akumulacije lipida kao brzinom njihove razgradnje nakon prestanka tretmana. Važno je istaći da su promene u lipidnom metabolizmu i povećana zastupljenost lizozoma u našem modelu uočene već nakon 24 časa izlaganja (179), ali pokazuju sličnosti sa obrascima opisanim u studijama dugotrajne izloženosti e-cigaretama, što ukazuje da i kratkotrajni tretmani mogu otkriti biološki relevantne promene povezane sa hroničnim efektima (210).

Primena paralelne analize transkriptoma i proteoma omogućila je uočavanje povećane zastupljenosti lizozoma, što je identifikovano kroz promene u relativnom rasporedu ćelijskih komponenti u proteomskim analizama. Ova promena nije bila uočena na nivou transkriptoma, dok je funkcionalni esej potvrdio njenu značajnost. Ovakav nalaz ukazuje na prednost kombinovanja različitih metodoloških pristupa čime se nadomešćuju nedostaci pojedinačnih metoda i stvara se prostor za

dalja istraživanja usmerena ka detaljnijem razumevanju uloge lizozoma u odgovoru plućnih ćelija na izlaganje komponentama tečnosti za e-cigarete.

5.5. Modifikacije proteina kao hemijski otisak izlaganja komponentama tečnosti za e-cigarete

Većina studija o toksičnosti e-cigareta fokusirana je na oksidativni stres, inflamaciju i promene ekspresije gena. Međutim, proteini predstavljaju neposredne efektore ćelijske funkcije, a njihove posttranslacione i hemijske modifikacije određuju njihovu stabilnost, interakcije, aktivnost i distribuciju unutar ćelije. U tom kontekstu, globalno profilisanje PM omogućava detekciju ranih, potencijalno ireverzibilnih molekularnih promena koje prethode jasnim fenotipskim ishodima koje ne moraju biti reflektovane na nivou ekspresije gena.

Pokazano je da duvanski dim predstavlja značajan izvor reaktivnih kiseoničnih i azotnih vrsta koje dovode do oksidativnog i nitrozativnog stresa, pri čemu su proteini jedna od glavnih meta ovih reaktivnih molekula (115). Kao posledica, dolazi do modifikacija proteina, među kojima je među najčešće opisanim karbonilacija, povezana sa promenama u strukturi i funkciji proteina (217). U plućima pušača i pacijenata sa HOBP zabeležen je porast karbonilacije proteina, koji je u korelaciji sa težinom bolesti. Ova modifikacija može narušiti strukturu i funkciju proteina i time doprineti razvoju bolesti, ali i dovesti do stvaranje autoantitela usmerenih protiv karbonilovanih proteina (174). Povećani nivoi karbonilnih grupa proteina zabeleženi su pored pluća i u serumu pušača (218). Pored toga, duvanski dim indukuje i nitraciju proteina, uključujući formiranje 3-nitrotirozina (3-NT), što dodatno utiče na funkcionalnost proteina i ćelijsku signalizaciju (217,219). Kod pacijenata obolelih od astme i HOBP, zabeležen je povišen nivo 3-NT u sputumu (220). Ove modifikacije mogu doprineti inflamaciji i razvoju HOBP i malignih bolesti pluća (115,221). Takođe, lipidna peroksidacija indukovana duvanskim dimom dovodi do formiranja reaktivnih aldehida, poput 4-HNE, koji može kovalentno modifikovati proteine i time uticati na njihovu strukturu, funkciju i uključenost u signalne puteve povezane sa inflamacijom i ćelijskim stresom (222). Nasuprot tome, podaci o modifikacijama proteina indukovanim e-cigaretama su i dalje oskudni, što ukazuje na nedostatak istraživanja u ovoj oblasti. Ova disertacija značajno doprinosi ovom polju istraživanja, jer je jedan od prvih koji detaljno opisuje nastale promene u modifikacijama proteina pod dejstvom e-cigareta.

U ovoj tezi, analiza proteoma ukazala je na značajne promene u obrascima modifikacija proteina nakon izlaganja komponentama tečnosti za e-cigarete. Detektovane modifikacije uključuju oksidativne i karbonilne promene, kao i različite kovalentne adukte, što ukazuje na kombinovano delovanje reaktivnih kiseoničnih vrsta i elektrofilnih jedinjenja prisutnih u aerosolima. Ovakav obrazac sugerise da izlaganje e-cigaretama ne utiče samo na regulaciju ekspresije proteina, već i na njihovu hemijsku strukturu i funkcionalnost.

Podaci iz ove teze pokazuju da izlaganje kondenzatu aerosola tečnosti za e-cigarete, posebno kTEC, u BEAS-2B ćelijama dovodi do proširenja repertoara PM klasifikovanih kao hemijski derivati u odnosu na kontrolu (Slika 17) (179). Posebno je relevantno prisustvo toksičnih (eng. *biohazard*) modifikacija, koje ne predstavljaju regulisane PM već hemijski nametnute kovalentne adukte. Ovakav spektar promena ukazuje da aerosol ne deluje isključivo putem indukcije oksidativnog stresa, već da njegove reaktivne komponente mogu direktno i kovalentno interagovati sa bočnim lancima proteina.

U tom kontekstu, O-diizopropilfosforilacija, hemijski indukovana posttranslaciona modifikacija slična fosforilaciji, uočena je nakon tretmana kTEC (179). Ovaj kovalentni adukt, povezan sa

izlaganjem toksičnim organofosfornim jedinjenjima, može podstaći umrežavanje proteina i dovodi se u vezu sa neurotoksičnošću (223).

Prisustvo naftalen-2,3-dikarbaldehida, reaktivnog aromatičnog dialdehida poznatog po formiranju stabilnih adukata sa lizinom i N-terminalnim aminima (224), potvrđuje da aerosol sadrži gasovite aromatične aldehide sposobne za trajno kovalentno “obeležavanje” proteina (179).

Sličan obrazac zapažen je i u V79 fibroblastima tretiranim tečnostima za e-cigarete (PGVG +A i TEC), dok je sam nikotin pokazao znatno slabiji efekat (Tabela 2) (182). Ovo sugerise da nikotin sam po sebi nije dovoljan da objasni opaženi PM profil, već da su kompleksne mešavine aromatičnih i degradacionih produkata ključni izvor reaktivnih vrsta.

Prisustvo 4-HNE, detektovano je isključivo u V79 ćelijama tretiranim tečnostima za e-cigarete, TEC i PGVG+A (Tabela 2). 4-HNE je dobro okarakterisan marker oksidativnog stresa i lipidne peroksidacije (182,225,226), a istovremeno i reaktivni signalni molekul sposoban da formira stabilne adukate sa proteinima i DNK i moduliše redoks-osetljive transkripcione puteve (227). Povećani nivoi 4-HNE opisani su i u eksperimentalnim studijama koje su ispitivale efekte aerosola e-cigareta i duvanskog dima, gde je 4-HNE detektovan u plućima miševa i u keratinocitima nakon izlaganja ovim aerosolima (228,229). Povišeni nivoi 4-HNE povezani su sa različitim patološkim stanjima, uključujući HOBP (222) i promene u nemalignom tkivu u neposrednoj blizini tumora (230,231). Nasuprot tome, smanjenje koncentracije ovog reaktivnog aldehida dovedeno je u vezu sa kliničkim poboljšanjem kod pacijenata sa plućnom arterijskom hipertenzijom (232) i sa redukcijom oksidativnog stresa nakon izlaganja duvanskom dimu (233). Ovi podaci podržavaju pretpostavku da izlaganje komponentama e-cigareta može dovesti do promena povezanih sa oksidativnim stresom i lipidnom peroksidacijom.

Trinitrobenzen, modifikacija izazvana visoko toksičnim jedinjenjem (234), detektovan je u BEAS-2B ćelijama tretiranim kTEC (179), kao i u V79 fibroblastima izloženim TEC i PGVG+A (182), što ga čini zajedničkim molekularnim potpisom oba modela (Tabela 1, 2). Ovakva konzistentnost ukazuje da nitro-aromatične komponente tečnosti za e-cigarete mogu sistematski generisati stabilne proteinske adukate nezavisno od ćelijskog tipa.

Karbonilacione modifikacije nastale direktnom oksidacijom, Michael-ovom adicijom produkata lipidne peroksidacije i formiranjem naprednih produkata glikacije (AGE) bile su prisutne u oba modela (Tabela 1, 2) (179,182). U BEAS-2B ćelijama detektovana je modifikacija bis(hidroksifenilglioksal) arginina, koja ukazuje na prisustvo reaktivnih α -dikarbonilnih vrsta i potencijalno formiranje AGE (Tabela 1) (179), molekula povezanih sa inflamacijom i hroničnim bolestima, uključujući dijabetes (235), aterosklozu (236,237) i neurodegenerativne poremećaje (238). Takve modifikacije mogu kompetitivno ometati fiziološke argininske PTM i poremetiti signalne mreže uključene u stresni odgovor.

Zanimljiv aspekt predstavlja detekcija 2-aminotirozina (2-AT) u BEAS-2B ćelijama nakon kTEC tretmana, uprkos odsustvu 3-NT (Tabela 1) (179). S obzirom da 2-AT može nastati redukcijom 3-NT, njegovo prisustvo može predstavljati stabilniji molekularni otisak prethodnog nitroksidativnog stresa. Poznato je da je 3-NT povišen u disajnim putevima pacijenata sa hroničnim plućnim bolestima i nakon izlaganja duvanskom dimu (220,239), što otvara mogućnost da 2-AT bude dugotrajniji biomarker oštećenja izazvanog aerosolom.

Posebno je intrigantna pojava karbofurana (2,3-dihidro-2,2-dimetil-7-benzofuranol N-metil karbamata) kao kovalentne modifikacije serinskih ostataka u BEAS-2B ćelijama tretiranim kTEC ali ne i kPGVG i kontroli (179). S obzirom da je karbofuran zabranjen insekticid u SAD, EU i Kanadi zbog svoje visoke toksičnosti (240), njegova analogna modifikacija u proteomu implicira nastanak

reaktivnih benzofuranskih elektrofilnih degradacionih produkata tokom termalne obrade aroma ili aditiva. Ova neenzimska, ksenobiotikom indukovana PM razlikuje se od oksidacije posredovane ROS i ukazuje na to da aerosoli e-cigareta sadrže reaktivne aromatične karbamatne vrste sposobne da ciljaju kritične aminokiselinske ostatke u proteinima. Budući da su N-metil karbamatne modifikacije ireverzibilne, pogođeni proteini moraju biti uklonjeni putem proteolitičkih sistema, što dodatno opterećuje proteostazu (241).

Važno je naglasiti da veliki deo detektovanih modifikacija pripada kategoriji ireverzibilnih karbonilacionih i ksenobiotičkih adukata (179). Za razliku od reverzibilnih regulatornih PTM, ove promene zahtevaju uklanjanje modifikovanih proteina putem degradacionih puteva. U skladu sa tim, u BEAS-2B ćelijama je zabeleženo povećanje lizosomalne komponente, što može predstavljati adaptivni odgovor na akumulaciju kovalentno modifikovanih i potencijalno nefunkcionalnih proteina (Slika 23). U BEAS-2B ćelijama, detekcija N-metilkarbamatnih i drugih aromatičnih adukata (Tabela 1) implicira direktno hemijsko oštećenje proteina koje može destabilizovati proteom i povećati opterećenje proteostatskih sistema. Kada se ovi rezultati sagledaju zajedno sa uočenom translacionom represijom na transkriptomskom i proteomskom nivou (179), ukazuju da aerosol e-cigareta nameće dvostruki stres - istovremeno smanjuje sintezu novih proteina i povećava kovalentna oštećenja postojećih proteina.

5.5.1. Metodološki izazovi u analizi modifikacija proteina

Iako je identifikacija proteina rutinski deo savremene proteomike, globalno kvantitativno mapiranje modifikacija proteina i dalje je metodološki izazovno. Otvoreni (eng. *unspecified*) pristupi pretraživanju omogućavaju detekciju neočekivanih modifikacija, ali nose rizik pogrešne atribucije, posebno kada se hemijski derivati iz *Unimod* baze poklapaju sa masenim pomacima koji mogu nastati i endogeno i egzogeno (179). Dodatno, maseni pomaci različitih struktura mogu biti izobarski, što zahteva strogu validaciju i oprez u interpretaciji. Uprkos primeni *de novo* analize i otvorenog pretraživanja (182,242), trenutna tehnologija ne omogućava uvek jednoznačno razlikovanje strukturnih izomera, što predstavlja inherentno ograničenje polja (243). Ova ograničenja ne umanjuju biološki značaj nalaza, već naglašavaju potrebu za komplementarnim validacionim pristupima. Treba naglasiti da je sistematsko mapiranje modifikacija proteina u kontekstu izlaganja e-cigaretama tek u začetku, te je literatura u ovoj oblasti i dalje ograničena, što dodatno naglašava potrebu za daljim istraživanjima.

Međutim, upravo ovakav pristup koji kombinuje globalno mapiranje sa funkcionalnom interpretacijom predstavlja naredni korak u razumevanju inhalacione toksičnosti. Umesto da se aerosol e-cigareta posmatra isključivo kao izvor oksidativnog stresa, naši podaci sugerišu da on deluje kao kompleksna hemijska smeša sposobna da kovalentno preoblikuje ćelijski proteom. Ova perspektiva pomera fokus sa prolaznih redoks promena na trajne hemijske otiske koji mogu imati dugoročne funkcionalne posledice.

5.6. Promene u međućelijskoj komunikaciji nakon izlaganja komponentama tečnosti za e-cigarete: pukotinaste veze i TNT

U plućima, očuvanje tkivne homeostaze i koordinacija odgovora na stalne spoljašnje izazove zavise od efikasne razmene informacija između različitih ćelijskih populacija. Ova složena mreža interakcija omogućava funkcionalni integritet plućnog tkiva, koji je od presudnog značaja za efikasnu razmenu gasova, ali i za zaštitu od inhaliranih štetnih agenasa i patogena (244,245), tako da istraživanja koja obuhvataju i međućelijsku komunikaciju omogućavaju vernije sagledavanje biološkog odgovora plućnog tkiva u uslovima delovanja spoljašnjih faktora.

Razmena signala između ćelija ostvaruje se putem više komplementarnih mehanizama, među kojima posebno mesto zauzimaju pukotinaste veze, građene od proteina koneksina, pri čemu je Cx43 jedan od najzastupljenijih (246). Pukotinaste veze omogućavaju direktnu razmenu jona, malih metaboličkih molekula, signalnih molekula i mikroRNK između susednih ćelija, čime se obezbeđuje sinhronizovan odgovor ćelija unutar tkiva (246). Ovakva koordinacija od suštinskog je značaja za procese kao što su širenje kalcijumskih signala, koji učestvuju u regulaciji pokretljivosti cilija i sekreciji surfaktanta u respiratornom epitelu (246).

Stabilna i efikasna razmena molekula između ćelija u tkivu ponekad se opisuje konceptom „ćelijske parabioze“, koji naglašava funkcionalnu međuzavisnost ćelija i značaj međusobne komunikacije za očuvanje ćelijskog zdravlja i prevenciju akumulacije oštećenja povezanih sa starenjem (247). Putem pukotinastih veza ostvaruje se i metaboličko sprežanje između ćelija, koje omogućava da tkivo funkcioniše kao koherentna celina i da se finije regulišu specifične plućne funkcije, uključujući sekreciju surfaktanta i odgovor na mehaničke i hemijske stimulanse (248–250).

Međutim, ovako fino uravnotežen sistem međućelijske komunikacije izuzetno je osetljiv na spoljašnje uticaje. Izloženost različitim inhalacionim toksinima, poput duvanskog dima, suspendovanih čestica i drugih ksenobiotika, može značajno poremetiti signalne puteve uključene u međućelijsku komunikaciju i narušiti funkciju pukotinastih veza (251–253).

Posledično, različiti zagađivači mogu dovesti do narušavanja ćelijske homeostaze i integriteta epitelne barijere disajnih puteva, što pogoduje pojačanim inflamatornim odgovorima i remodelovanju tkiva (254–256).

Pored pukotinastih veza, u poslednje dve decenije prepoznat je i dodatni oblik direktne međućelijske komunikacije, TNT. Ove tanke membranske strukture prvi put su opisane 2004. godine kao novi tip veze između ćelija (257). TNT predstavljaju F-aktinom bogate membranske mostove prečnika približno 50-200 nm koji mogu povezivati ćelije na rastojanjima većim od nekoliko prečnika ćelije (257,258).

Za razliku od drugih citoplazmatskih protruzija, TNT ne učestvuju u ćelijskoj adheziji i formiraju se kao otvoreni citoplazmatski kanali (259). Od njihovog otkrića, TNT su identifikovane između brojnih tipova ćelija *in vitro*, ali i u tkivima *in vivo* (258–264).

Ćelije kroz TNT razmenjuju komponente citoplazme, od malih metabolita do čitavih ćelijskih organela. Pokazano je da ćelije mogu biti električki kuplovane preko TNT (265), mogu da razmenjuju kalcijumski fluks (259) kao i razne metabolite, citoplazmatske i membranske proteine (266). Najveća novina koja je pratila otkriće TNT je to što kroz ovaj vid ćelijske komunikacije dolazi do razmene organela između ćelija, tako je zabeležena razmena mitohondrija (264), lizozoma (267), endozoma (259), endoplazmatskog retikuluma i Goldžijevog aparata (268) itd. Istraživanja su takođe pokazale da TNT mogu da imaju ulogu u transferu priona i virusa kao što su respiratorni virusi influence A (269,270), SARS-CoV-2 virus (271) kao i virus humane imunodeficijencije (eng. *human immunodeficiency virus*, HIV) među ćelijama (272,273).

Formiranje TNT često je indukovano različitim oblicima ćelijskog stresa, uključujući oksidativni stres (274), hipoksiju (275), hemoterapiju (276), deprivaciju seruma i metabolički stres (276), i smatra se adaptivnim mehanizmom međućelijske komunikacije koji omogućava razmenu signalnih molekula, proteina, RNK i organela između ćelija. U stresnim uslovima TNT se često formiraju između stresiranih i nestresiranih ćelija, što ukazuje na njihovu potencijalnu ulogu u koordinaciji ćelijskog odgovora na stres (268,276).

Rezultati dobijeni u ovom istraživanju ukazuju da izlaganje komponentama tečnosti za e-cigarete može uticati na različite mehanizme međućelijske komunikacije. Važno je napomenuti da su u eksperimentima sa V79 ćelijama korišćene koncentracije tretmana koje nisu pokazale citotoksične,

mutagene ili genotoksične efekte (Slika 25, 26), što ukazuje da poremećaji komunikacije predstavljaju rani odgovor ćelije na izlaganje, nezavisan od direktnog oštećenja DNK (182).

U V79 fibroblastima zabeleženo je značajno smanjenje metaboličke kooperacije (Slika 27), što ukazuje na narušavanje funkcionalnosti komunikacije putem pukotinastih veza. Ovaj nalaz je u skladu sa smanjenjem nivoa Cx43 (Slika 28), ključne komponente pukotinastih veza, ali i sa proteomskim nalazima koji ukazuju na povećanu zastupljenost proteina uključenih u fokalnu adheziju (Slika 19) (182), naročito nakon tretmana TEC.

Fokalne adhezije predstavljaju dinamične komplekse proteina koji povezuju citoskelet ćelije sa ekstracelularnim matriksom i učestvuju u prenosu mehaničkih signala i regulaciji ćelijske migracije (277,278). Među identifikovanim proteinima u V79 ćelijama nakon oba tretmana, TEC i PGVG+A, nalazi se i FAK-1, centralni regulator signalnih mreža povezanih sa ćelijskom adhezijom, čija je povećana ekspresija često opisana u tumorskim ćelijama i povezana sa razvojem malignih svojstava ćelija (279,280). Aktivacija signalnih puteva povezanih sa fokalnim adhezijama, uključujući FAK-1, opisana je kao jedno od obeležja fibroblasta u plućnoj fibrozi (281). U tom kontekstu, povećana zastupljenost proteina fokalnih adhezija u tretiranim V79 ćelijama može ukazivati na potencijalno povećanu migratornu sposobnost ćelija izloženih PGVG+A, TEC i nikotinu, što je osobina koja se povezuje sa procesima kao što su fibroza pluća i invazija tumorskih ćelija. Poznato je i da povećana ćelijska pokretljivost često prati smanjenje međućelijske komunikacije putem pukotinastih veza (282), što bi moglo doprineti objašnjenju smanjene metaboličke kooperacije u tretiranim V79 ćelijama (182). Pokazano je i da e-cigarete smanjuju ekspresiju Cx43 u osteoblastima, što je komplementarno našim rezultatima, dok su efekti nikotina na ekspresiju Cx43 u plućima zavisni od tipa ćelije (283–286). Da bi se utvrdio efekat e-cigareta na migratornu sposobnost V79 ćelija, neophodna su dodatna eksperimentalna ispitivanja.

Poremećaj metaboličke kooperacije može imati značajne posledice za koordinaciju ćelijskog odgovora na oštećenje, jer narušavanje komunikacije putem pukotinastih veza kompromituje sposobnost ćelija da razmenjuju metaboličke i signalne molekule neophodne za održavanje tkivne homeostaze.

Suprotno tome, u BEAS-2B epitelnim ćelijama zabeleženo je povećanje broja TNT nakon izlaganja tečnostima za e-cigarete (Slika 29). Povećana formacija TNT može predstavljati adaptivni odgovor ćelija na stres, koji omogućava intenzivniju razmenu signalnih molekula i sa jedne strane može doprineti očuvanju ćelijske funkcije kroz redistribuciju oštećenih ili funkcionalnih organela, dok sa druge strane može omogućiti širenje stresnih signala ili oštećenih molekula kroz ćelijsku populaciju. Ovo je veoma zanimljiv aspekt dejstva tečnosti za e-cigarete i kada se uzme u obzir mitohondrijski stres kojem su ćelije izložene usled uticaja tečnosti za e-cigarete, trebalo bi ispitati da li dolazi do povećanog transfera mitohondrija između stresiranih (tečnosti za e-cigarete) i netretiranih ćelija kao i da li je taj transfer dominantno u korist „oslobađanja“ od oštećenih mitohondrija ili „spašavanja“ slanjem zdravih mitohondrija u stresirane ćelije.

Kada se ovi nalazi sagledaju zajedno, oni ukazuju da efekti izlaganja e-cigaretama prevazilaze nivo izolovanog ćelijskog odgovora na stres i obuhvataju i promene u načinu na koji ćelije međusobno komuniciraju. Smanjena komunikacije putem pukotinastih veza u fibroblastima, uz istovremeno povećanje TNT-posredovanih veza u epitelnim ćelijama, sugerise reorganizaciju mreže međućelijskih interakcija u uslovima izlaganja komponentama tečnosti za e-cigarete. Takve promene mogu imati značajne posledice po koordinaciju ćelijskih odgovora u tkivu, uključujući procese inflamacije, reparacije i remodelovanja pluća.

Uočene razlike između V79 i BEAS-2B modela mogu odražavati odgovore na stres izazvan komponentama tečnosti za e-cigarete specifične za određeni tip ćelije, pri čemu su u fibroblastima dominantne promene povezane sa narušavanjem komunikacije putem pukotinastih veza i reorganizacijom adhezivnih puteva, što može biti povezano i sa potencijalno povećanom

migratornom sposobnošću ovih ćelija, dok epitelne ćelije pokazuju povećano formiranje TNT struktura, što može ukazivati na aktivaciju alternativnih puteva direktne međućelijske komunikacije u uslovima ćelijskog stresa.

Iako se smatra da e-cigarete sa aromom duvana izazivaju slabije izražene ćelijske efekte u poređenju sa nekim drugim aromama, poput mentola (31), u ovom radu su i pod tim uslovima uočene jasne promene u ćelijskom odgovoru. Korišćenje ove arome u skladu je sa savremenim regulatornim trendovima koji ograničavaju upotrebu drugih aroma u e-cigaretama (287,288). Značaj uočenih promena dodatno je naglašen činjenicom da su detektovane u modelu koji se smatra manje biološki aktivnim u odnosu na pojedine druge formulacije.

U tom kontekstu, rezultati ovog istraživanja doprinose širem razumevanju bioloških efekata e-cigareta, ukazujući da njihov uticaj ne obuhvata samo intracelularne procese poput oksidativnog stresa, translacione represije ili modifikacija proteina, već i fundamentalne mehanizme međućelijske komunikacije koji omogućavaju integrisani odgovor tkiva na spoljašnje stimulse. Posmatrano na nivou plućnog tkiva, takve promene mogu uticati na koordinaciju ćelijskih funkcija i time predstavljati jedan od mehanizama kroz koje dugotrajno izlaganje e-cigaretama doprinosi razvoju patoloških promena u respiratornom sistemu.

Dobijeni rezultati ukazuju da izlaganje komponentama tečnosti za e-cigarete narušava ključne regulatorne procese u plućnim ćelijama, uključujući proteostazu, funkciju mitohondrija, metabolizam lipida i međućelijsku komunikaciju, i to pri uslovima koji ne dovode do citotoksičnosti ili genotoksičnosti. Ovakav obrazac promena sugerise da e-cigarete mogu pokretati rane molekularne događaje koji su već prepoznati kao deo patogeneze hroničnih plućnih oboljenja, poput HOBP, astme i plućne fibroze, ali i stanja povezanih sa poremećajem metabolizma lipida, uključujući lipoidnu pneumoniju. Kombinacija poremećaja proteostaze, mitohondrijske funkcije i lipidnog metabolizma, uz indukciju enzima metabolizma ksenobiotika i akumulaciju kovalentnih modifikacija proteina, ukazuje na sličnosti sa odgovorima ćelija na druge inhalacione štetne agense. Posebno je značajno da su ove promene detektovane na više nivoa (transkriptomskom, proteomskom i funkcionalnom), što ukazuje na njihovu biološku konzistentnost. U tom kontekstu, translacioni aparat i mitohondrijska homeostaza izdvajaju se kao osetljive mete delovanja komponenti tečnosti za e-cigarete, dok detektovane hemijske modifikacije proteina, naročito ireverzibilni adukti, mogu predstavljati potencijalne rane biomarkere izloženosti. Iako dobijeni u *in vitro* modelima i u uslovima akutne izloženosti, ovi nalazi ukazuju da i kratkotrajni kontakt sa komponentama tečnosti za e-cigarete može inicirati procese relevantne za razvoj poremećaja funkcije pluća, sa mogućim implikacijama za povećan rizik od nastanka hroničnih bolesti pluća.

6. Zaključci

U ovoj disertaciji ispitan je uticaj komponenti tečnosti za e-cigarete i kondenzata njihovih aerosola na ćelijama poreklom iz pluća (BEAS-2B i V79), primenom komplementarnih transkriptomskih, proteomskih i funkcionalnih pristupa, čime je omogućeno sveobuhvatno sagledavanje ranog ćelijskog odgovora na akutno izlaganje. Na osnovu postavljenih ciljeva i dobijenih rezultata u okviru ove doktorske disertacije, izvedeni su sledeći zaključci:

1. Maksimalna necitotoksična koncentracija komponenti tečnosti za e-cigarete je iznosila 1,38% za V79 ćelije, dok je maksimalna necitotoksična koncentracija kondenzata njihovih aerosola ispitivanih na BEAS-2B ćelijama iznosila 2%.
2. Tretmani primenjeni u ovom radu doveli su do narušavanja procesa translacije u oba tipa plućnih ćelija. Efekat je uočen na nivou transkriptoma, proteoma i u funkcionalnom testu, a pokazao se nezavisnim od prisustva nikotina i arome.
3. U oba tipa plućnih ćelija tretmani primenjeni u ovom radu izazvali su poremećaj mitohondrijske homeostaze, što je potvrđeno analizom transkriptoma i proteoma, kao i funkcionalnim esejem, pri čemu efekat nije zavisio od prisustva arome i nikotina.
4. Rezultati ove teze ukazuju na poremećaj mitohondrijske translacije kao mehanizam koji doprinosi mitohondrijskoj disfunkciji nakon tretmana komponentama tečnosti za e-cigarete.
5. Kondenzati aerosola tečnosti za e-cigarete, naročito one koje sadrže aromu i nikotin, aktiviraju ksenobiotički metabolizam u BEAS-2B ćelijama, na šta ukazuje povećana ekspresija *CYP1A1* i *CYP1B1* gena. Ovi enzimi su povezani i sa metabolizmom lipida i povećanim oksidativnim stresom u mitohondrijama.
6. U BEAS-2B ćelijama dolazi do narušavanja metabolizma lipida i povećanog broja lipidnih kapljica usled tretmana kondenzatima aerosola tečnosti za e-cigarete. Ovi efekti bili su izraženiji u ćelijama tretiranim kondenzatima aerosola e-tečnosti sa aromom i nikotinom, i mogu biti povezani sa povećanom ekspresijom *CYP1B1* gena.
7. Tretmani kondenzatima aerosola tečnosti za e-cigarete, naročito sa aromom i nikotinom, dovode do povećanja sadržaja lizozoma u BEAS-2B ćelijama, što ukazuje na povećanu potrebu za razgradnjom ćelijskim komponenti.
8. Tretmani korišćeni u ovom radu dovode do povećanja broja i raznovrsnosti modifikacija proteina u oba tipa plućnih ćelija, pri čemu je posebno izražen porast ireverzibilnih modifikacija klasifikovanih kao hemijski derivati i toksične modifikacije.
9. Nije primećen mutageni ni genotoksični efekat tečnosti za e-cigarete pri koncentracijama korišćenim u ovom radu.
10. Komponente tečnosti za e-cigarete menjaju obrasce međućelijske komunikacije u plućnim ćelijama.
 - U V79 ćelijama dolazi do smanjenja metaboličke kooperacije posredovane pukotinastim vezama nakon tretmana. Ovaj efekat je bio izraženiji u tretmanima sa nikotinom i aromom, ukazujući da kombinacija nikotina i arome ima sinergistički efekat na smanjenje međućelijske komunikacije.
 - U BEAS-2B ćelijama dolazi do dinamičnog povećanja broja TNT između ćelija nakon tretmana, što ukazuje na to da se ćelije nalaze u stanju stresa.

Zajedno posmatrano, rezultati ovog istraživanja ukazuju na to da izlaganje plućnih ćelija komponentama tečnosti za e-cigarete dovodi do kompleksnog poremećaja ćelijske homeostaze koji obuhvata promene u translaciji, funkciji mitohondrija i lizozoma, lipidnom metabolizmu, međućelijskoj komunikaciji, kao i u post-translacionim modifikacijama proteina.

7. Literatura:

1. Warren R, Klinkhammer K, Lyu H, Knopp J, Yuan T, Yao C, et al. Cell competition drives bronchiolization and pulmonary fibrosis. *Nat Commun*. 2024 Dec 5;15(1):10624. doi:10.1038/s41467-024-54997-2 PubMed PMID: 39639058; PubMed Central PMCID: PMC11621346.
2. Patwa A, Shah A. Anatomy and physiology of respiratory system relevant to anaesthesia. *Indian J Anaesth*. 2015 Sep;59(9):533–41. doi:10.4103/0019-5049.165849 PubMed PMID: 26556911; PubMed Central PMCID: PMC4613399.
3. Khan YS, Carey FJ. Histology, Lung. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 [cited 2025 Sep 2]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK534789/> PubMed PMID: 30521210.
4. Haddad M, Sharma S. Physiology, Lung. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 [cited 2026 Jan 15]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK545177/> PubMed PMID: 31424761.
5. Powers KA, Dhamoon AS. Physiology, Pulmonary Ventilation and Perfusion. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 [cited 2026 Jan 15]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK539907/> PubMed PMID: 30969729.
6. Vučović D. Fiziologija respiratornog sistema / Physiology of the respiratory system. *SJAIT* 2014/1-2; 2014.
7. Brinkman JE, Sharma S. Physiology, Pulmonar [Internet]. 2025. PubMed PMID: 29494033.
8. Medicine LibreTexts [Internet]. 2020 [cited 2026 Jan 15]. 20.4: The Processes of the Respiratory System. Available from: [https://med.libretexts.org/Bookshelves/Anatomy_and_Physiology/Human_Anatomy_\(OERI\)/20%3A_Respiratory_System/20.04%3A_The_Processes_of_the_Respiratory_System](https://med.libretexts.org/Bookshelves/Anatomy_and_Physiology/Human_Anatomy_(OERI)/20%3A_Respiratory_System/20.04%3A_The_Processes_of_the_Respiratory_System)
9. Respiratory System - an overview | ScienceDirect Topics [Internet]. [cited 2025 Aug 27]. Available from: <https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/respiratory-system>
10. Medicine LibreTexts [Internet]. 2020 [cited 2026 Jan 15]. 20: Respiratory System. Available from: [https://med.libretexts.org/Bookshelves/Anatomy_and_Physiology/Human_Anatomy_\(OERI\)/20%3A_Respiratory_System](https://med.libretexts.org/Bookshelves/Anatomy_and_Physiology/Human_Anatomy_(OERI)/20%3A_Respiratory_System)
11. Rock JR, Hogan BLM. Epithelial progenitor cells in lung development, maintenance, repair, and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2011;27:493–512. doi:10.1146/annurev-cellbio-100109-104040 PubMed PMID: 21639799.
12. Whitsett JA, Alenghat T. Respiratory epithelial cells orchestrate pulmonary innate immunity. *Nat Immunol*. 2015 Jan;16(1):27–35. doi:10.1038/ni.3045
13. Li F, He J, Wei J, Cho WC, Liu X. Diversity of Epithelial Stem Cell Types in Adult Lung. *Stem Cells Int*. 2015;2015:728307. doi:10.1155/2015/728307 PubMed PMID: 25810726; PubMed Central PMCID: PMC4354973.
14. Whitsett JA, Weaver TE. Alveolar Development and Disease. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2015 Jul;53(1):1–7. doi:10.1165/rcmb.2015-0128PS PubMed PMID: 25932959; PubMed Central PMCID: PMC4566117.

15. Deprez M, Zaragosi LE, Truchi M, Becavin C, Ruiz García S, Arguel MJ, et al. A Single-Cell Atlas of the Human Healthy Airways. *Am J Respir Crit Care Med*. 2020 Dec 15;202(12):1636–45. doi:10.1164/rccm.201911-2199OC
16. Sikkema L, Ramírez-Suástegui C, Strobl DC, Gillett TE, Zappia L, Madissoon E, et al. An integrated cell atlas of the lung in health and disease. *Nat Med*. 2023 Jun;29(6):1563–77. doi:10.1038/s41591-023-02327-2
17. Holt PG, Strickland DH, Wikström ME, Jahnsen FL. Regulation of immunological homeostasis in the respiratory tract. *Nat Rev Immunol*. 2008 Feb;8(2):142–52. doi:10.1038/nri2236 PubMed PMID: 18204469.
18. Varelle M, Kieninger E, Edwards MR, Regamey N. The airway epithelium: soldier in the fight against respiratory viruses. *Clin Microbiol Rev*. 2011 Jan;24(1):210–29. doi:10.1128/CMR.00014-10 PubMed PMID: 21233513; PubMed Central PMCID: PMC3021210.
19. Shaykhiev R, Otaki F, Bonsu P, Dang DT, Teater M, Strulovici-Barel Y, et al. Cigarette smoking reprograms apical junctional complex molecular architecture in the human airway epithelium in vivo. *Cell Mol Life Sci*. 2011 Mar;68(5):877–92. doi:10.1007/s00018-010-0500-x PubMed PMID: 20820852; PubMed Central PMCID: PMC3838912.
20. Gao W, Li L, Wang Y, Zhang S, Adcock IM, Barnes PJ, et al. Bronchial epithelial cells: The key effector cells in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease? *Respirology*. 2015;20(5):722–9. doi:10.1111/resp.12542
21. White ES. Lung Extracellular Matrix and Fibroblast Function. *Annals ATS*. 2015 Mar;12(Supplement 1):S30–3. doi:10.1513/AnnalsATS.201406-240MG
22. DeLeon-Pennell KY, Barker TH, Lindsey ML. Fibroblasts: The arbiters of extracellular matrix remodeling. *Matrix Biology*. 2020 Sep 1;Fibroblasts: The arbiters of matrix remodeling91–92:1–7. doi:10.1016/j.matbio.2020.05.006
23. Pardo A, Selman M. Lung Fibroblasts, Aging, and Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Annals ATS*. 2016 Dec;13(Supplement_5):S417–21. doi:10.1513/AnnalsATS.201605-341AW
24. Kendall RT, Feghali-Bostwick CA. Fibroblasts in fibrosis: novel roles and mediators. *Front Pharmacol*. 2014 May 27;5. doi:10.3389/fphar.2014.00123
25. Ghonim MA, Boyd DF, Flerlage T, Thomas PG. Pulmonary inflammation and fibroblast immunoregulation: from bench to bedside. *J Clin Invest*. 133(17):e170499. doi:10.1172/JCI170499 PubMed PMID: 37655660; PubMed Central PMCID: PMC10471178.
26. WHO global report on trends in prevalence of tobacco use 2000-2025, fourth edition [Internet]. [cited 2025 Oct 1]. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240039322>
27. Dai X, Gakidou E, Lopez AD. Evolution of the global smoking epidemic over the past half century: strengthening the evidence base for policy action. *Tob Control*. 2022 Mar;31(2):129–37. doi:10.1136/tobaccocontrol-2021-056535 PubMed PMID: 35241576.
28. Kaufman AR, Twesten JE, Suls J, McCaul KD, Ostroff JS, Ferrer RA, et al. Measuring Cigarette Smoking Risk Perceptions. *Nicotine Tob Res*. 2020 Oct 29;22(11):1937–45. doi:10.1093/ntr/ntz213
29. Rodgman A, Perfetti TA. *The Chemical Components of Tobacco and Tobacco Smoke*. Boca Raton: CRC Press; 2008. 1840 p. doi:10.1201/9781420078848

30. Morgan JC, Byron MJ, Baig SA, Stepanov I, Brewer NT. How people think about the chemicals in cigarette smoke: a systematic review. *J Behav Med.* 2017 Aug 1;40(4):553–64. doi:10.1007/s10865-017-9823-5
31. Wang M, Cheng Q, Wu Z, Fan L, Zeng L, Chen H. Multidimensional assessment of the biological effects of electronic cigarettes on lung bronchial epithelial cells. *Sci Rep.* 2024 Feb 23;14(1):4445. doi:10.1038/s41598-024-55140-3
32. SmokeHaz - CHEST [Internet]. [cited 2026 Jan 15]. Available from: [https://journal.chestnet.org/article/S0012-3692\(16\)48547-8/fulltext](https://journal.chestnet.org/article/S0012-3692(16)48547-8/fulltext)
33. Prevalence and attributable health burden of chronic respiratory diseases, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017 - The Lancet Respiratory Medicine [Internet]. [cited 2026 Jan 15]. Available from: [https://www.thelancet.com/journals/lanres/article/piis2213-2600\(20\)30105-3/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lanres/article/piis2213-2600(20)30105-3/fulltext)
34. Wu CT, Li GH, Huang CT, Cheng YC, Chen CH, Chien JY, et al. Acute Exacerbation of a Chronic Obstructive Pulmonary Disease Prediction System Using Wearable Device Data, Machine Learning, and Deep Learning: Development and Cohort Study. *JMIR mHealth and uHealth.* 2021 May 6;9(5):e22591. doi:10.2196/22591
35. WHO global report: mortality attributable to tobacco [Internet]. [cited 2025 Oct 2]. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241564434>
36. Hackshaw A, Morris JK, Boniface S, Tang JL, Milenković D. Low cigarette consumption and risk of coronary heart disease and stroke: meta-analysis of 141 cohort studies in 55 study reports. *BMJ.* 2018 Jan 24;360:j5855. doi:10.1136/bmj.j5855 PubMed PMID: 29367388; PubMed Central PMCID: PMC5781309.
37. Glantz SA, Parmley WW. Passive smoking and heart disease. Epidemiology, physiology, and biochemistry. *Circulation.* 1991 Jan;83(1):1–12. doi:10.1161/01.cir.83.1.1 PubMed PMID: 1984876.
38. Ambrose JA, Barua RS. The pathophysiology of cigarette smoking and cardiovascular disease. *JACC.* 2004 May 19;43(10):1731–7. doi:10.1016/j.jacc.2003.12.047
39. Law MR, Morris JK, Wald NJ. Environmental tobacco smoke exposure and ischaemic heart disease: an evaluation of the evidence. *BMJ.* 1997 Oct 18;315(7114):973–80. doi:10.1136/bmj.315.7114.973 PubMed PMID: 9365294; PubMed Central PMCID: PMC2127675.
40. Smoking and Cardiovascular Disease | Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology [Internet]. [cited 2026 Jan 16]. Available from: https://www.ahajournals.org/doi/full/10.1161/ATVBAHA.113.300156?utm_source=chatgpt.com
41. Tobacco [Internet]. [cited 2025 Feb 21]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/tobacco>
42. Ambient (outdoor) air pollution [Internet]. [cited 2026 Jan 23]. Available from: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/ambient-\(outdoor\)-air-quality-and-health](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/ambient-(outdoor)-air-quality-and-health)
43. Air Quality, Energy and Health [Internet]. [cited 2026 Jan 23]. Available from: <https://www.who.int/teams/environment-climate-change-and-health/air-quality-energy-and-health>
44. Murray CJL, Aravkin AY, Zheng P, Abbafati C, Abbas KM, Abbasi-Kangevari M, et al. Global burden of 87 risk factors in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet.* 2020 Oct 17;396(10258):1223–49. doi:10.1016/S0140-6736(20)30752-2 PubMed PMID: 33069327.

45. Putaud JP, Van Dingenen R, Alastuey A, Bauer H, Birmili W, Cyrys J, et al. A European aerosol phenomenology – 3: Physical and chemical characteristics of particulate matter from 60 rural, urban, and kerbside sites across Europe. *Atmospheric Environment*. 2010 Mar 1;44(10):1308–20. doi:10.1016/j.atmosenv.2009.12.011
46. Kelly FJ, Fussell JC. Size, source and chemical composition as determinants of toxicity attributable to ambient particulate matter. *Atmospheric Environment*. 2012 Dec 1;60:504–26. doi:10.1016/j.atmosenv.2012.06.039
47. Li N, Sioutas C, Cho A, Schmitz D, Misra C, Sempf J, et al. Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage. *Environ Health Perspect*. 2003 Apr;111(4):455–60. doi:10.1289/ehp.6000 PubMed PMID: 12676598; PubMed Central PMCID: PMC1241427.
48. Donaldson K, Stone V, Seaton A, MacNee W. Ambient particle inhalation and the cardiovascular system: potential mechanisms. *Environ Health Perspect*. 2001 Aug;109(Suppl 4):523–7. doi:10.1289/ehp.01109s4523 PubMed PMID: 11544157; PubMed Central PMCID: PMC1240575.
49. Lung Cancer, Cardiopulmonary Mortality, and Long-term Exposure to Fine Particulate Air Pollution - PMC [Internet]. [cited 2026 Jan 24]. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4037163/>
50. Turner MC, Krewski D, Pope CA, Chen Y, Gapstur SM, Thun MJ. Long-term ambient fine particulate matter air pollution and lung cancer in a large cohort of never-smokers. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011 Dec 15;184(12):1374–81. doi:10.1164/rccm.201106-1011OC PubMed PMID: 21980033.
51. The Effect of Air Pollution on Lung Development from 10 to 18 Years of Age | New England Journal of Medicine [Internet]. [cited 2026 Jan 24]. Available from: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa040610>
52. Schraufnagel DE, Balmes JR, Cowl CT, De Matteis S, Jung SH, Mortimer K, et al. Air Pollution and Noncommunicable Diseases. *Chest*. 2019 Feb;155(2):409–16. doi:10.1016/j.chest.2018.10.042 PubMed PMID: 30419235; PubMed Central PMCID: PMC6904855.
53. E-Cigarette Direct [Internet]. 2023 [cited 2026 Jan 16]. The History of the Vaping: It goes back further than you think... Available from: <https://www.ecigarettedirect.co.uk/blogs/ashtray-blog/history-electronic-cigarette>
54. ECigaretteDirect [Internet]. [cited 2025 Apr 28]. An Interview with the Inventor of the Electronic Cigarette, Herbert A Gilbert. Available from: <https://www.ecigarettedirect.co.uk/ashtray-blog/2013/10/interview-inventor-e-cigarette-herbert-a-gilbert.html>
55. Boseley S. Hon Lik invented the e-cigarette to quit smoking – but now he’s a dual user. *The Guardian* [Internet]. 2015 Jun 9 [cited 2025 Apr 1]. Available from: <https://www.theguardian.com/society/2015/jun/09/hon-lik-e-cigarette-inventor-quit-smoking-dual-user>
56. Grana R, Benowitz N, Glantz SA. E-Cigarettes. *Circulation*. 2014 May 13;129(19):1972–86. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.114.007667 PubMed PMID: 24821826; PubMed Central PMCID: PMC4018182.
57. Montjean D, Pagé MHG, Bélanger MC, Benkhalifa M, Miron P. An Overview of E-Cigarette Impact on Reproductive Health. *Life*. 2023 Mar 18;13(3). doi:10.3390/life13030827
58. National Academies of Sciences E, Division H and M, Practice B on PH and PH, Systems C on the R of the HE of END, Eaton DL, Kwan LY, et al. E-Cigarette Devices, Uses, and Exposures. In: *Public Health Consequences of E-Cigarettes* [Internet]. National Academies Press (US); 2018 [cited 2025 Oct 23]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507187/>

59. Chemical Composition of Electronic Cigarette e-Liquids: Overview of Current Evidence of Toxicity. *ADIKTOLOGIE Journal*. 2020;(03-04/2020). doi:10.35198/01-2020-002-0007
60. Zhao T, Shu S, Guo Q, Zhu Y. Effects of design parameters and puff topography on heating coil temperature and mainstream aerosols in electronic cigarettes. *Atmospheric Environment*. 2016 Jun 1;134:61–9. doi:10.1016/j.atmosenv.2016.03.027
61. Rahman MS, Sultana KR, Cho Y, Yumshtyk A, Kaya T, Matida E. Effects of heating power and nicotine concentration on aerosol size distribution of a vaping device. *Aerosol Science and Technology*. 2024 Jun 2;58(6):706–18. doi:10.1080/02786826.2024.2321254
62. Marques P, Piqueras L, Sanz MJ. An updated overview of e-cigarette impact on human health. *Respir Res*. 2021 May 18;22(1):151. doi:10.1186/s12931-021-01737-5
63. Gordon T, Karey E, Rebuli ME, Escobar YNH, Jaspers I, Chen LC. E-Cigarette Toxicology. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 2022 Jan 6;62(Volume 62, 2022):301–22. doi:10.1146/annurev-pharmtox-042921-084202
64. Alshareef HZ, Omaye ST. Toxicology of Commonly Found Ingredients in E-Cigarettes: A Brief Review. *Health*. 2021 Nov 30;13(11):1396–409. doi:10.4236/health.2021.1311100
65. Hess CA, Olmedo P, Navas-Acien A, Goessler W, Cohen JE, Rule AM. E-cigarettes as a source of toxic and potentially carcinogenic metals. *Environ Res*. 2017 Jan;152:221–5. doi:10.1016/j.envres.2016.09.026 PubMed PMID: 27810679; PubMed Central PMCID: PMC5135636.
66. Williams M, Villarreal A, Bozhilov K, Lin S, Talbot P. Metal and silicate particles including nanoparticles are present in electronic cigarette cartomizer fluid and aerosol. *PLoS One*. 2013;8(3):e57987. doi:10.1371/journal.pone.0057987 PubMed PMID: 23526962; PubMed Central PMCID: PMC3603976.
67. Dinu V, Kilic A, Wang Q, Ayed C, Fadel A, Harding SE, et al. Policy, toxicology and physicochemical considerations on the inhalation of high concentrations of food flavour. *npj Sci Food*. 2020 Oct 7;4(1):15. doi:10.1038/s41538-020-00075-y
68. Barhdadi S, Mertens B, Van Bossuyt M, Van De Maele J, Anthonissen R, Canfyn M, et al. Identification of flavouring substances of genotoxic concern present in e-cigarette refills. *Food Chem Toxicol*. 2021 Jan;147:111864. doi:10.1016/j.fct.2020.111864 PubMed PMID: 33217530.
69. Sachdeva J, Karunanathan A, Shi J, Dai W, Kleinman MT, Herman D, et al. Flavoring Agents in E-cigarette Liquids: A Comprehensive Analysis of Multiple Health Risks. *Cureus*. 2023 Nov;15(11):e48995. doi:10.7759/cureus.48995 PubMed PMID: 38111420; PubMed Central PMCID: PMC10726647.
70. Muthumalage T, Prinz M, Ansah KO, Gerloff J, Sundar IK, Rahman I. Inflammatory and Oxidative Responses Induced by Exposure to Commonly Used e-Cigarette Flavoring Chemicals and Flavored e-Liquids without Nicotine. *Front Physiol*. 2018 Jan 11;8:1130. doi:10.3389/fphys.2017.01130 PubMed PMID: 29375399; PubMed Central PMCID: PMC5768608.
71. Clapp PW, Pawlak EA, Lackey JT, Keating JE, Reeber SL, Glish GL, et al. Flavored e-cigarette liquids and cinnamaldehyde impair respiratory innate immune cell function. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2017 Aug 1;313(2):L278–92. doi:10.1152/ajplung.00452.2016 PubMed PMID: 28495856; PubMed Central PMCID: PMC5582929.
72. Behar RZ, Davis B, Wang Y, Bahl V, Lin S, Talbot P. Identification of toxicants in cinnamon-flavored electronic cigarette refill fluids. *Toxicol In Vitro*. 2014 Mar;28(2):198–208. doi:10.1016/j.tiv.2013.10.006 PubMed PMID: 24516877.

73. Wu D, O'Shea DF. Potential for release of pulmonary toxic ketene from vaping pyrolysis of vitamin E acetate. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2020 Mar 24;117(12):6349–55. doi:10.1073/pnas.1920925117
74. Zhu SH, Sun JY, Bonnevie E, Cummins SE, Gamst A, Yin L, et al. Four hundred and sixty brands of e-cigarettes and counting: implications for product regulation. *Tobacco Control*. 2014 Jul 1;23(suppl 3):iii3–9. doi:10.1136/tobaccocontrol-2014-051670 PubMed PMID: 24935895.
75. Landry RL, Groom AL, Vu THT, Stokes AC, Berry KM, Kesh A, et al. The role of flavors in vaping initiation and satisfaction among U.S. adults. *Addictive Behaviors*. 2019 Dec 1;99:106077. doi:10.1016/j.addbeh.2019.106077
76. Meshram L. Persistence Market Research [Internet]. [cited 2025 Dec 30]. E-Cigarette Market Size, Share & Forecast 2025 - 2032. Available from: <https://www.persistencemarketresearch.com/market-research/e-cigarette-market.asp>
77. Statista [Internet]. [cited 2026 Jan 16]. E-Cigarettes - Worldwide | Statista Market Forecast. Available from: <https://www.statista.com/outlook/cmo/tobacco-products/e-cigarettes/worldwide>
78. Global State of Tobacco Harm Reduction [Internet]. [cited 2025 Apr 1]. Vaping. Available from: <https://gsthr.org/resources/vaping/>
79. Kilibarda B, Nikolić N, Jovanović V, Gudelj Rakić J, Tošić M. Evropsko školsko istraživanje o upotrebi psihoaktivnih supstanci među učenicima u Srbiji 2019. [Internet]. Beograd: Institut za javno zdravlje Srbije „Dr Milan Jovanović Batut”; 2020. p. 52. Available from: <https://www.batut.org.rs/download/izdvajamo/EvropskoSkolskoIstrazivanje2019.pdf>
80. Wills TA, Soneji SS, Choi K, Jaspers I, Tam EK. E-cigarette use and respiratory disorders: an integrative review of converging evidence from epidemiological and laboratory studies. *Eur Respir J*. 2021 Jan;57(1):1901815. doi:10.1183/13993003.01815-2019 PubMed PMID: 33154031; PubMed Central PMCID: PMC7817920.
81. Rha MS, Cho HJ, Yoon JH, Kim CH. Association between the use of electronic cigarettes and the prevalence of chronic rhinosinusitis and allergic rhinitis: a nationwide cross-sectional study. *Rhinology*. 2022 Feb 1;60(1):20–8. doi:10.4193/Rhin21.287 PubMed PMID: 34941973.
82. Xie W, Tackett AP, Berlowitz JB, Harlow AF, Kathuria H, Galiatsatos P, et al. Association of Electronic Cigarette Use with Respiratory Symptom Development among U.S. Young Adults. *Am J Respir Crit Care Med*. 2022 Jun 1;205(11):1320–9. doi:10.1164/rccm.202107-1718OC PubMed PMID: 35089853; PubMed Central PMCID: PMC9873120.
83. Effects of e-cigarettes and vaping devices on cardiac and pulmonary physiology - Tsai - 2020 - The Journal of Physiology - Wiley Online Library [Internet]. [cited 2026 Jan 16]. Available from: <https://physoc.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1113/JP279754>
84. Tao X, Zhang J, Meng Q, Chu J, Zhao R, Liu Y, et al. The potential health effects associated with electronic-cigarette. *Environmental Research*. 2024 Mar 15;245:118056. doi:10.1016/j.envres.2023.118056
85. Tsai M, Byun MK, Shin J, Crotty Alexander LE. Effects of e-cigarettes and vaping devices on cardiac and pulmonary physiology. *The Journal of Physiology*. 2020;598(22):5039–62. doi:10.1113/JP279754
86. Bittoni M, Carbone D, Harris R. Vaping, Smoking and Lung Cancer Risk. *J Oncol Res Ther*. 2024;9(3):10229. doi:10.29011/2574-710x.10229 PubMed PMID: 39210964; PubMed Central PMCID: PMC11361252.

87. E-Cigarettes | Circulation [Internet]. [cited 2026 Jan 16]. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCULATIONAHA.114.007667>
88. Wagner NJ, Camerota M, Propper C. Prevalence and Perceptions of Electronic Cigarette Use during Pregnancy. *Matern Child Health J.* 2017 Aug;21(8):1655–61. doi:10.1007/s10995-016-2257-9 PubMed PMID: 28084577; PubMed Central PMCID: PMC5509528.
89. Goniewicz ML, Kuma T, Gawron M, Knysak J, Kosmider L. Nicotine Levels in Electronic Cigarettes. *Nicotine Tob Res.* 2013 Jan 1;15(1):158–66. doi:10.1093/ntr/nts103
90. Vansickel AR, Eissenberg T. Electronic Cigarettes: Effective Nicotine Delivery After Acute Administration. *Nicotine Tob Res.* 2013 Jan 1;15(1):267–70. doi:10.1093/ntr/ntr316
91. Lambers DS, Clark KE. The maternal and fetal physiologic effects of nicotine. *Seminars in Perinatology.* 1996 Apr 1;Social and Illicit Drug Use in Pregnancy20(2):115–26. doi:10.1016/S0146-0005(96)80079-6
92. Mezzacappa E, Buckner JC, Earls F. Prenatal cigarette exposure and infant learning stimulation as predictors of cognitive control in childhood. *Developmental Science.* 2011;14(4):881–91. doi:10.1111/j.1467-7687.2011.01038.x
93. Jaber R, Blaga OM, Dascăl MD, Meghea CI. E-Cigarette Use and Its Associated Factors Among Pregnant Individuals Who Currently or Formerly Smoked Cigarettes From Romania. *Tob Use Insights.* 2025 Oct 15;18:1179173X251377173. doi:10.1177/1179173X251377173 PubMed PMID: 41116798; PubMed Central PMCID: PMC12535625.
94. Georgopoulou K, Sarantaki A, Katsaounou P, Lykeridou A, Georgakopoulou VE, Diamanti A. Impact of electronic nicotine delivery systems (ENDS) on fetal outcomes: A systematic review and meta-analysis. *Pneumon.* 2024 Aug 30;37(3):1–13. doi:10.18332/pne/191738
95. Patanavanich R, Thatasawakul C, Youngcharoen K, Soponvashira V, Pichetsin P. Health Effects from Secondhand Exposure to E-Cigarettes: A Systematic Review of Peer-Reviewed Articles from 2004–2024. *International Journal of Environmental Research and Public Health.* 2025 Sep;22(9):1408. doi:10.3390/ijerph22091408
96. Amalia B, Fu M, Tigova O, Ballbè M, Paniello-Castillo B, Castellano Y, et al. Exposure to secondhand aerosol from electronic cigarettes at homes: A real-life study in four European countries. *Science of The Total Environment.* 2023 Jan 1;854:158668. doi:10.1016/j.scitotenv.2022.158668
97. Costantino S, Torre A, Randazzese SF, Mollica SA, Motta F, Busceti D, et al. Association between Second-Hand Exposure to E-Cigarettes at Home and Exacerbations in Children with Asthma. *Children.* 2024 Mar 18;11(3). doi:10.3390/children11030356
98. Protano C, Manigrasso M, Avino P, Vitali M. Second-hand smoke generated by combustion and electronic smoking devices used in real scenarios: Ultrafine particle pollution and age-related dose assessment. *Environment International.* 2017 Oct 1;107:190–5. doi:10.1016/j.envint.2017.07.014
99. Hamberger ES, Halpern-Felsher B. Vaping in adolescents: epidemiology and respiratory harm. *Curr Opin Pediatr.* 2020 Jun;32(3):378–83. doi:10.1097/MOP.0000000000000896 PubMed PMID: 32332328; PubMed Central PMCID: PMC7285995.
100. Yang W, Yang X, Jiang L, Song H, Huang G, Duan K, et al. Combined biological effects and lung proteomics analysis in mice reveal different toxic impacts of electronic cigarette aerosol and combustible cigarette smoke on the respiratory system. *Arch Toxicol.* 2022;96(12):3331–47. doi:10.1007/s00204-022-03378-z PubMed PMID: 36173423; PubMed Central PMCID: PMC9521563.

101. Guraka A, Mierlea S, Drake SJ, Shawa IT, Waldron J, Corcoran M, et al. A comprehensive toxicological analysis of panel of unregulated e-cigarettes to human health. *Toxicology*. 2024 Dec 1;509:153964. doi:10.1016/j.tox.2024.153964
102. Park JA, Alexander LEC, Christiani DC. Vaping and Lung Inflammation and Injury. *Annu Rev Physiol*. 2022 Feb 10;84:611–29. doi:10.1146/annurev-physiol-061121-040014 PubMed PMID: 34724436; PubMed Central PMCID: PMC10228557.
103. Vivarelli F, Granata S, Rullo L, Mussoni M, Candeletti S, Romualdi P, et al. On the toxicity of e-cigarettes consumption: Focus on pathological cellular mechanisms. *Pharmacological Research*. 2022 Aug 1;182:106315. doi:10.1016/j.phrs.2022.106315
104. Wang L, Wang Y, Chen J, Liu P, Li M, Wang L, et al. A Review of Toxicity Mechanism Studies of Electronic Cigarettes on Respiratory System. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022 May 1;23(9). doi:10.3390/ijms23095030
105. Scott A, Lugg ST, Aldridge K, Lewis KE, Bowden A, Mahida RY, et al. Pro-inflammatory effects of e-cigarette vapour condensate on human alveolar macrophages [Internet]. 2018 Dec 1. doi:10.1136/thoraxjnl-2018-211663
106. Ghosh A, Coakley RD, Ghio AJ, Muhlebach MS, Esther CR, Alexis NE, et al. Chronic E-Cigarette Use Increases Neutrophil Elastase and Matrix Metalloprotease Levels in the Lung. *Am J Respir Crit Care Med*. 2019 Dec;200(11):1392–401. doi:10.1164/rccm.201903-0615OC
107. Reidel B, Radicioni G, Clapp PW, Ford AA, Abdelwahab S, Rebuli ME, et al. E-Cigarette Use Causes a Unique Innate Immune Response in the Lung, Involving Increased Neutrophilic Activation and Altered Mucin Secretion. *Am J Respir Crit Care Med*. 2018 Feb 15;197(4):492–501. doi:10.1164/rccm.201708-1590OC
108. Singh DP, Begum R, Kaur G, Bagam P, Kambiranda D, Singh R, et al. E-cig vapor condensate alters proteome and lipid profiles of membrane rafts: impact on inflammatory responses in A549 cells. *Cell Biol Toxicol*. 2021 Oct 1;37(5):773–93. doi:10.1007/s10565-020-09573-x
109. Kabéle M, Lyytinen G, Bosson JA, Hedman L, Antoniewicz L, Lundbäck M, et al. Nicotine in E-cigarette aerosol may lead to pulmonary inflammation. *Respiratory Medicine*. 2025 Jun 1;242. doi:10.1016/j.rmed.2025.108101 PubMed PMID: 40239848.
110. Roxlau ET, Pak O, Hadzic S, Garcia-Castro CF, Gredic M, Wu CY, et al. Nicotine promotes e-cigarette vapour-induced lung inflammation and structural alterations. *European Respiratory Journal*. 2023 Jun 22;61(6). doi:10.1183/13993003.00951-2022 PubMed PMID: 37105573.
111. Chitteti R, Zuniga-Hertz JP, Masso-Silva JA, Shin J, Niesman I, Bojanowski CM, et al. E-cigarette-induced changes in cell stress and mitochondrial function. *Free Radical Biology and Medicine*. 2025 Feb 16;228:329–38. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2025.01.004
112. Wang J, Zhang T, Johnston CJ, Kim SY, Gaffrey MJ, Chalupa D, et al. Protein thiol oxidation in the rat lung following e-cigarette exposure. *Redox Biology*. 2020 Oct 1;37:101758. doi:10.1016/j.redox.2020.101758
113. Anderson C, Majeste A, Hanus J, Wang S. E-Cigarette Aerosol Exposure Induces Reactive Oxygen Species, DNA Damage, and Cell Death in Vascular Endothelial Cells. *Toxicol Sci*. 2016 Dec;154(2):332–40. doi:10.1093/toxsci/kfw166 PubMed PMID: 27613717.
114. Lee HW, Park SH, Weng MW, Wang HT, Huang WC, Lepor H, et al. E-cigarette smoke damages DNA and reduces repair activity in mouse lung, heart, and bladder as well as in human lung and bladder cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018 Feb 13;115(7):E1560–9. doi:10.1073/pnas.1718185115 PubMed PMID: 29378943; PubMed Central PMCID: PMC5816191.

115. Caliri AW, Tommasi S, Besaratinia A. Relationships among smoking, oxidative stress, inflammation, macromolecular damage, and cancer. *Mutat Res.* 2021;787:108365. doi:10.1016/j.mrrev.2021.108365 PubMed PMID: 34083039; PubMed Central PMCID: PMC8287787.
116. Bishop E, Miazzi F, Bozhilova S, East N, Evans R, Smart D, et al. An in vitro toxicological assessment of two electronic cigarettes: E-liquid to aerosolisation. *Curr Res Toxicol.* 2024 Jan 12;6:100150. doi:10.1016/j.crttox.2024.100150 PubMed PMID: 38298371; PubMed Central PMCID: PMC10827682.
117. Emma R, Fuochi V, Distefano A, Partsinevelos K, Rust S, Zadjali F, et al. Cytotoxicity, mutagenicity and genotoxicity of electronic cigarettes emission aerosols compared to cigarette smoke: the REPLICA project. *Sci Rep.* 2023 Oct 30;13(1):17859. doi:10.1038/s41598-023-44626-1
118. Al-Otaibi HM, Baqasi AM, Alhadrami HA. Genotoxicity and mutagenicity assessment of electronic cigarette liquids. *Annals of Thoracic Medicine.* 2024 Jul 4;19(3):222. doi:10.4103/atm.atm_59_24 PubMed PMID: 39144536.
119. Queimado L, Wagener T, Ganapathy V. Electronic cigarette aerosols induce DNA damage and reduce DNA repair: Consistency across species. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018 Jun 12;115(24):E5437–8. doi:10.1073/pnas.1807411115 PubMed PMID: 29802233; PubMed Central PMCID: PMC6004470.
120. A Review of Pulmonary Toxicity of Electronic Cigarettes in the Context of Smoking: A Focus on Inflammation | Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention | American Association for Cancer Research [Internet]. [cited 2026 Apr 5]. Available from: <https://aacrjournals.org/cebpa/article/26/8/1175/283058/A-Review-of-Pulmonary-Toxicity-of-Electronic?guestAccessKey=>
121. Leigh NJ, Lawton RI, Hershberger PA, Goniewicz ML. Flavourings significantly affect inhalation toxicity of aerosol generated from electronic nicotine delivery systems (ENDS). *Tobacco Control.* 2016 Nov 1;25(Suppl 2):ii81–7. doi:10.1136/tobaccocontrol-2016-053205 PubMed PMID: 27633767.
122. Gerloff J, Sundar IK, Freter R, Sekera ER, Friedman AE, Robinson R, et al. Inflammatory Response and Barrier Dysfunction by Different e-Cigarette Flavoring Chemicals Identified by Gas Chromatography-Mass Spectrometry in e-Liquids and e-Vapors on Human Lung Epithelial Cells and Fibroblasts. *Appl In Vitro Toxicol.* 2017 Mar 1;3(1):28–40. doi:10.1089/aivt.2016.0030 PubMed PMID: 28337465; PubMed Central PMCID: PMC5338075.
123. Masso-Silva JA, Byun MK, Crotty Alexander LE. Acute and chronic effects of vaping electronic devices on lung physiology and inflammation. *Current Opinion in Physiology.* 2021 Aug 1;22:100447. doi:10.1016/j.cophys.2021.06.001
124. Gellatly S, Pavelka N, Crue T, Schweitzer KS, Day BJ, Min E, et al. Nicotine-Free e-Cigarette Vapor Exposure Stimulates IL6 and Mucin Production in Human Primary Small Airway Epithelial Cells. *J Inflamm Res.* 2020 Apr 16;13:175–85. doi:10.2147/JIR.S244434 PubMed PMID: 32368126; PubMed Central PMCID: PMC7170627.
125. 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 Feb 6;10(2):e0116732. doi:10.1371/journal.pone.0116732
126. Glyoxal and Methylglyoxal as E-cigarette Vapor Ingredients-Induced Pro-Inflammatory Cytokine and Mucins Expression in Human Nasal Epithelial Cells - Soyoung Kwak, Yoon Seok Choi, Hyung Gyun Na, Chang Hoon Bae, Si-Youn Song, Yong-Dae Kim, 2021 [Internet]. [cited 2026 Apr 5]. Available from: https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1945892420946968?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%20pubmed

127. Song SY, Na HG, Kwak SY, Choi YS, Bae CH, Kim YD. Changes in Mucin Production in Human Airway Epithelial Cells After Exposure to Electronic Cigarette Vapor With or Without Nicotine. *Clin Exp Otorhinolaryngol*. 2021 Aug;14(3):303–11. doi:10.21053/ceo.2020.01907 PubMed PMID: 33355840; PubMed Central PMCID: PMC8373839.
128. Gonzalez-Suarez I, Marescotti D, Martin F, Scotti E, Guedj E, Acali S, et al. In Vitro Systems Toxicology Assessment of Nonflavored e-Cigarette Liquids in Primary Lung Epithelial Cells. *Applied In Vitro Toxicology*. 2017 Mar 1;3(1):41–55. doi:10.1089/aivt.2016.0040
129. Fourth generation e-cigarette vaping induces transient lung inflammation and gas exchange disturbances: results from two randomized clinical trials | *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* | American Physiological Society [Internet]. [cited 2026 Apr 5]. Available from: <https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/ajplung.00492.2018>
130. Bahl V, Lin S, Xu N, Davis B, Wang Y huan, Talbot P. Comparison of electronic cigarette refill fluid cytotoxicity using embryonic and adult models. *Reprod Toxicol*. 2012 Dec;34(4):529–37. doi:10.1016/j.reprotox.2012.08.001 PubMed PMID: 22989551.
131. Ma T, Wang X, Li L, Sun B, Zhu Y, Xia T. Electronic cigarette aerosols induce oxidative stress-dependent cell death and NF- κ B mediated acute lung inflammation in mice. *Arch Toxicol*. 2021 Jan;95(1):195–205. doi:10.1007/s00204-020-02920-1 PubMed PMID: 33159582; PubMed Central PMCID: PMC7855759.
132. Glynos C, Bibli SI, Katsaounou P, Pavlidou A, Magkou C, Karavana V, et al. Comparison of the effects of e-cigarette vapor with cigarette smoke on lung function and inflammation in mice. *APSselect*. 2018 Oct;5(10):L662–72. doi:10.1152/ajplung.00389.2017@apsselect.2018.5.issue-10
133. Kaur G, Pinkston R, Mclemore B, Dorsey WC, Batra S. Immunological and toxicological risk assessment of e-cigarettes. *Eur Respir Rev*. 2018 Feb 28;27(147):170119. doi:10.1183/16000617.0119-2017 PubMed PMID: 29491036; PubMed Central PMCID: PMC9489161.
134. Acute exposure to e-cigarettes causes inflammation and pulmonary endothelial oxidative stress in nonsmoking, healthy young subjects | *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* | American Physiological Society [Internet]. [cited 2026 Apr 5]. Available from: https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/ajplung.00110.2019?utm_source=Securitylab.ru
135. Shields PG, Song MA, Freudenheim JL, Brasky TM, McElroy JP, Reisinger SA, et al. Lipid laden macrophages and electronic cigarettes in healthy adults. *EBioMedicine*. 2020 Oct;60:102982. doi:10.1016/j.ebiom.2020.102982 PubMed PMID: 32919101; PubMed Central PMCID: PMC7494450.
136. Yayan J, Franke KJ, Biancosino C, Rasche K. Comparative systematic review on the safety of e-cigarettes and conventional cigarettes. *Food Chem Toxicol*. 2024 Mar;185:114507. doi:10.1016/j.fct.2024.114507 PubMed PMID: 38331086.
137. Zhao J, Zhang Y, Sisler JD, Shaffer J, Leonard SS, Morris AM, et al. Assessment of reactive oxygen species generated by electronic cigarettes using acellular and cellular approaches. *J Hazard Mater*. 2018 Feb 15;344:549–57. doi:10.1016/j.jhazmat.2017.10.057 PubMed PMID: 29102637; PubMed Central PMCID: PMC5848214.
138. 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* [Internet]. [cited 2026 Apr 5]. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article%3Fid=10.1371/journal.pone.0116732>
139. Lerner CA, Rutagarama P, Ahmad T, Sundar IK, Elder A, Rahman I. Electronic cigarette aerosols and copper nanoparticles induce mitochondrial stress and promote DNA fragmentation in lung fibroblasts.

Biochem Biophys Res Commun. 2016 Sep 2;477(4):620–5. doi:10.1016/j.bbrc.2016.06.109 PubMed PMID: 27343559; PubMed Central PMCID: PMC4967027.

140. Scheffler S, Dieken H, Krischenowski O, Förster C, Branscheid D, Aufderheide M. Evaluation of E-cigarette liquid vapor and mainstream cigarette smoke after direct exposure of primary human bronchial epithelial cells. *Int J Environ Res Public Health*. 2015 Apr 8;12(4):3915–25. doi:10.3390/ijerph120403915 PubMed PMID: 25856554; PubMed Central PMCID: PMC4410224.
141. Carnevale R, Sciarretta S, Violi F, Nocella C, Loffredo L, Perri L, et al. Acute Impact of Tobacco vs Electronic Cigarette Smoking on Oxidative Stress and Vascular Function. *Chest*. 2016 Sep;150(3):606–12. doi:10.1016/j.chest.2016.04.012 PubMed PMID: 27108682.
142. Kelesidis T, Tran E, Arastoo S, Lakhani K, Heymans R, Gornbein J, et al. Elevated Cellular Oxidative Stress in Circulating Immune Cells in Otherwise Healthy Young People Who Use Electronic Cigarettes in a Cross-Sectional Single-Center Study: Implications for Future Cardiovascular Risk. *J Am Heart Assoc*. 2020 Sep 8;9(18):e016983. doi:10.1161/JAHA.120.016983 PubMed PMID: 32896211; PubMed Central PMCID: PMC7726977.
143. McAlinden KD, Lu W, Ferdowsi PV, Myers S, Markos J, Larby J, et al. Electronic Cigarette Aerosol Is Cytotoxic and Increases ACE2 Expression on Human Airway Epithelial Cells: Implications for SARS-CoV-2 (COVID-19). *Journal of Clinical Medicine*. 2021 Mar 3;10(5). doi:10.3390/jcm10051028
144. van Meerloo J, Kaspers GJL, Cloos J. Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Methods Mol Biol*. 2011;731:237–45. doi:10.1007/978-1-61779-080-5_20 PubMed PMID: 21516412.
145. Shevchenko A, Tomas H, Havlis J, Olsen JV, Mann M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat Protoc*. 2006;1(6):2856–60. doi:10.1038/nprot.2006.468 PubMed PMID: 17406544.
146. Smiljanic K, Prodic I, Apostolovic D, Cvetkovic A, Veljovic D, Mutic J, et al. In-depth quantitative profiling of post-translational modifications of Timothy grass pollen allergome in relation to environmental oxidative stress. *Environment International*. 2019 May 1;126:644–58. doi:10.1016/j.envint.2019.03.001
147. Stout JT, Caskey CT. HPRT: GENE STRUCTURE, EXPRESSION, AND MUTATION. *Annual Review of Genetics*. 1985 Dec 1;19(Volume 19, 1985):127–48. doi:10.1146/annurev.ge.19.120185.001015
148. Veld CWO het, van Hees-Stuivenberg S, van Zeeland AA, Jansen JG. Effect of nucleotide excision repair on hprt gene mutations in rodent cells exposed to DNA ethylating agents. *Mutagenesis*. 1997 Nov 1;12(6):417–24. doi:10.1093/mutage/12.6.417 PubMed PMID: 9412994.
149. Kolarević S, Milovanović D, Kračun-Kolarević M, Kostić J, Sunjog K, Martinović R, et al. Evaluation of genotoxic potential of avarol, avarone, and its methoxy and methylamino derivatives in prokaryotic and eukaryotic test models. *Drug Chem Toxicol*. 2019 Mar;42(2):130–9. doi:10.1080/01480545.2017.1413108 PubMed PMID: 29299944.
150. Qiu B, Simon MC. BODIPY 493/503 Staining of Neutral Lipid Droplets for Microscopy and Quantification by Flow Cytometry. *Bio Protoc*. 2016 Sep 5;6(17):e1912. doi:10.21769/BioProtoc.1912 PubMed PMID: 28573161; PubMed Central PMCID: PMC5448404.
151. Newbold RF, Amos J. Inhibition of metabolic cooperation between mammalian cells in culture by tumor promoters. *Carcinogenesis*. 1981;2(3):243–9. doi:10.1093/carcin/2.3.243 PubMed PMID: 7273309.

152. Chen D, Tang TX, Deng H, Yang XP, Tang ZH. Interleukin-7 Biology and Its Effects on Immune Cells: Mediator of Generation, Differentiation, Survival, and Homeostasis. *Front Immunol.* 2021 Dec 2;12:747324. doi:10.3389/fimmu.2021.747324 PubMed PMID: 34925323; PubMed Central PMCID: PMC8674869.
153. Ziegler-Skylakakis K, Andrae U. Mutagenicity of hydrogen peroxide in V79 Chinese hamster cells. *Mutat Res.* 1987 Sep;192(1):65–7. doi:10.1016/0165-7992(87)90127-8 PubMed PMID: 3657837.
154. Moses E, Wang T, Corbett S, Jackson GR, Drizik E, Perdomo C, et al. Molecular Impact of Electronic Cigarette Aerosol Exposure in Human Bronchial Epithelium. *Toxicol Sci.* 2017 Jan;155(1):248–57. doi:10.1093/toxsci/kfw198 PubMed PMID: 27701119; PubMed Central PMCID: PMC5216655.
155. Cao W, Li J, Che L, Yang R, Wu Z, Hu G, et al. Single-cell transcriptomics reveals e-cigarette vapor-induced airway epithelial remodeling and injury. *Respir Res.* 2024 Sep 28;25(1):353. doi:10.1186/s12931-024-02962-4
156. Shen Y, Wolkowicz MJ, Kotova T, Fan L, Timko MP. Transcriptome sequencing reveals e-cigarette vapor and mainstream-smoke from tobacco cigarettes activate different gene expression profiles in human bronchial epithelial cells. *Sci Rep.* 2016 Apr 4;6(1):23984. doi:10.1038/srep23984
157. Park HR, Vallarino J, O’Sullivan M, Wirth C, Panganiban RA, Webb G, et al. Electronic cigarette smoke reduces ribosomal protein gene expression to impair protein synthesis in primary human airway epithelial cells. *Sci Rep.* 2021 Sep 1;11(1):17517. doi:10.1038/s41598-021-97013-z
158. Tommasi S, Pabustan N, Li M, Chen Y, Siegmund KD, Besaratinia A. A novel role for vaping in mitochondrial gene dysregulation and inflammation fundamental to disease development. *Sci Rep.* 2021 Nov 23;11(1):22773. doi:10.1038/s41598-021-01965-1
159. Solleti SK, Bhattacharya S, Ahmad A, Wang Q, Mereness J, Rangasamy T, et al. MicroRNA expression profiling defines the impact of electronic cigarettes on human airway epithelial cells. *Sci Rep.* 2017 Apr 24;7(1):1081. doi:10.1038/s41598-017-01167-8 PubMed PMID: 28439113; PubMed Central PMCID: PMC5430826.
160. Ghosh A, Coakley RC, Mascenik T, Rowell TR, Davis ES, Rogers K, et al. Chronic E-Cigarette Exposure Alters the Human Bronchial Epithelial Proteome. *Am J Respir Crit Care Med.* 2018 Jul 1;198(1):67–76. doi:10.1164/rccm.201710-2033OC PubMed PMID: 29481290; PubMed Central PMCID: PMC6034122.
161. Hickman E, Alexis NE, Rager JE, Jaspers I. Airway Proteotypes of E-Cigarette Users Overlap with Those Found in Asthmatics. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2024 Apr;70(4):326–8. doi:10.1165/rcmb.2023-0381LE
162. Herr C, Tsitouras K, Niederstraßer J, Backes C, Beisswenger C, Dong L, et al. Cigarette smoke and electronic cigarettes differentially activate bronchial epithelial cells. *Respir Res.* 2020;21:67. doi:10.1186/s12931-020-1317-2 PubMed PMID: 32164736; PubMed Central PMCID: PMC7068890.
163. Perez MF, Yurieva M, Poddutoori S, Mortensen EM, Crotty Alexander LE, Williams A. Transcriptomic responses in the blood and sputum of cigarette smokers compared to e-cigarette vapers. *Respir Res.* 2023 May 18;24(1):134. doi:10.1186/s12931-023-02438-x PubMed PMID: 37208747; PubMed Central PMCID: PMC10196320.
164. Tsolakos N, Haswell LE, Miazzi F, Bishop E, Antoranz A, Pliaka V, et al. Comparative toxicological assessment of cigarettes and new category products via an *in vitro* multiplex proteomics platform. *Toxicology Reports.* 2024 Jun 1;12:492–501. doi:10.1016/j.toxrep.2024.04.006

165. Titz B, Elamin A, Martin F, Schneider T, Dijon S, Ivanov NV, et al. Proteomics for systems toxicology. *Comput Struct Biotechnol J*. 2014 Aug 27;11(18):73–90. doi:10.1016/j.csbj.2014.08.004 PubMed PMID: 25379146; PubMed Central PMCID: PMC4212285.
166. BEAS-2B - CRL-3588 | ATCC [Internet]. [cited 2026 Jan 15]. Available from: <https://www.atcc.org/products/crl-3588>
167. Hogan B, Tata PR. Cellular organization and biology of the respiratory system. *Nat Cell Biol*. 2019 Jul 25;s41556-019-0357–7. doi:10.1038/s41556-019-0357-7
168. Hamster cell line V79 [Internet]. [cited 2026 Mar 31]. Available from: <https://www.ebiohippo.com/en/hamster-cell-line-v79.html>
169. Wan J, Johnson M, Schilz J, Djordjevic MV, Rice JR, Shields PG. Evaluation of In Vitro Assays For Assessing the Toxicity of Cigarette Smoke and Smokeless Tobacco. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009 Dec;18(12):3263–304. doi:10.1158/1055-9965.EPI-09-0965 PubMed PMID: 19959677; PubMed Central PMCID: PMC2789344.
170. Payne SH. The utility of protein and mRNA correlation. *Trends Biochem Sci*. 2015 Jan;40(1):1–3. doi:10.1016/j.tibs.2014.10.010 PubMed PMID: 25467744; PubMed Central PMCID: PMC4776753.
171. Abreu R de S, Penalva LO, Marcotte EM, Vogel C. Global signatures of protein and mRNA expression levels. *Mol Biosyst*. 2009 Dec;5(12):1512–26. doi:10.1039/b908315d PubMed PMID: 20023718; PubMed Central PMCID: PMC4089977.
172. Balch WE, Sznajder JI, Budinger S, Finley D, Laposky AD, Cuervo AM, et al. Malfolded Protein Structure and Proteostasis in Lung Diseases. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014 Jan 1;189(1):96–103. doi:10.1164/rccm.201306-1164WS PubMed PMID: 24033344; PubMed Central PMCID: PMC3919126.
173. Min T, Bodas M, Mazur S, Vij N. Critical role of proteostasis-imbalance in pathogenesis of COPD and severe emphysema. *J Mol Med (Berl)*. 2011 Jun;89(6):577–93. doi:10.1007/s00109-011-0732-8 PubMed PMID: 21318260; PubMed Central PMCID: PMC3128462.
174. Kirkham PA, Caramori G, Casolari P, Papi AA, Edwards M, Shamji B, et al. Oxidative stress-induced antibodies to carbonyl-modified protein correlate with severity of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011 Oct 1;184(7):796–802. doi:10.1164/rccm.201010-1605OC PubMed PMID: 21965015; PubMed Central PMCID: PMC3398415.
175. Dastghaib S, Kumar PS, Aftabi S, Damera G, Dalvand A, Sepanjnia A, et al. Mechanisms Targeting the Unfolded Protein Response in Asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2021 Jan;64(1):29–38. doi:10.1165/rcmb.2019-0235TR PubMed PMID: 32915643; PubMed Central PMCID: PMC12042654.
176. Budinger GRS. Proteostasis Takes Center Stage in Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2019 Jun;60(6):605–6. doi:10.1165/rcmb.2018-0400ED PubMed PMID: 30849235; PubMed Central PMCID: PMC6543744.
177. van Rijt SH, Keller IE, John G, Kohse K, Yildirim AÖ, Eickelberg O, et al. Acute cigarette smoke exposure impairs proteasome function in the lung. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2012 Nov;303(9):L814–23. doi:10.1152/ajplung.00128.2012
178. Cantin AM, Richter MV. Cigarette smoke-induced proteostasis imbalance in obstructive lung diseases. *Curr Mol Med*. 2012 Aug;12(7):836–49. doi:10.2174/156652412801318746 PubMed PMID: 22697342.

179. Trifunovic S, Kušić-Tišma J, Smiljanić K, Rankov AD, Dinić J, Ljujić M. Acute E-Cigarette Aerosol Condensate Exposure Disrupts the Transcriptome and Proteome Profiles of Human Bronchial Epithelial BEAS-2B Cells. *Cells*. 2026 Mar 16;15(6). doi:10.3390/cells15060525
180. Haswell LE, Baxter A, Banerjee A, Verrastro I, Mushonganon J, Adamson J, et al. Reduced biological effect of e-cigarette aerosol compared to cigarette smoke evaluated in vitro using normalized nicotine dose and RNA-seq-based toxicogenomics. *Sci Rep*. 2017 Apr 18;7(1):888. doi:10.1038/s41598-017-00852-y
181. Grilli A, Bengalli R, Longhin E, Capasso L, Proverbio MC, Forcato M, et al. Transcriptional profiling of human bronchial epithelial cell BEAS-2B exposed to diesel and biomass ultrafine particles. *BMC Genomics*. 2018 Apr 27;19(1):302. doi:10.1186/s12864-018-4679-9 PubMed PMID: 29703138; PubMed Central PMCID: PMC5923024.
182. Trifunovic S, Smiljanić K, Sickmann A, Solari FA, Kolarevic S, Divac Rankov A, et al. Electronic cigarette liquids impair metabolic cooperation and alter proteomic profiles in V79 cells. *Respiratory Research*. 2022 Jul 15;23(1):191. doi:10.1186/s12931-022-02102-w
183. Cloonan SM, Choi AMK. Mitochondria in lung disease. *J Clin Invest*. 126(3):809–20. doi:10.1172/JCI81113 PubMed PMID: 26928034; PubMed Central PMCID: PMC4767339.
184. Kirkham PA, Barnes PJ. Oxidative stress in COPD. *Chest*. 2013 Jul;144(1):266–73. doi:10.1378/chest.12-2664 PubMed PMID: 23880677.
185. Meyer A, Zoll J, Charles AL, Charloux A, de Blay F, Diemunsch P, et al. Skeletal muscle mitochondrial dysfunction during chronic obstructive pulmonary disease: central actor and therapeutic target. *Exp Physiol*. 2013 Jun;98(6):1063–78. doi:10.1113/expphysiol.2012.069468 PubMed PMID: 23377494.
186. Sureshbabu A, Bhandari V. Targeting mitochondrial dysfunction in lung diseases: emphasis on mitophagy. *Front Physiol*. 2013 Dec 26;4:384. doi:10.3389/fphys.2013.00384 PubMed PMID: 24421769; PubMed Central PMCID: PMC3872744.
187. Simoes DCM, Psarra AMG, Mauad T, Pantou I, Roussos C, Sekeris CE, et al. Glucocorticoid and estrogen receptors are reduced in mitochondria of lung epithelial cells in asthma. *PLoS One*. 2012;7(6):e39183. doi:10.1371/journal.pone.0039183 PubMed PMID: 22761735; PubMed Central PMCID: PMC3384641.
188. van der Toorn M, Slebos DJ, de Bruin HG, Leuvenink HG, Bakker SJL, Gans ROB, et al. Cigarette smoke-induced blockade of the mitochondrial respiratory chain switches lung epithelial cell apoptosis into necrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2007 May;292(5):L1211–1218. doi:10.1152/ajplung.00291.2006 PubMed PMID: 17209140.
189. van der Toorn M, Rezayat D, Kauffman HF, Bakker SJL, Gans ROB, Koëter GH, et al. Lipid-soluble components in cigarette smoke induce mitochondrial production of reactive oxygen species in lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2009 Jul;297(1):L109–114. doi:10.1152/ajplung.90461.2008 PubMed PMID: 19411310; PubMed Central PMCID: PMC2711811.
190. Lamb T, Muthumalage T, Rahman I. Pod-based menthol and tobacco flavored e-cigarettes cause mitochondrial dysfunction in lung epithelial cells. *Toxicology Letters*. 2020 Oct 15;333:303–11. doi:10.1016/j.toxlet.2020.08.003
191. Clapp PW, Lavrich KS, van Heusden CA, Lazarowski ER, Carson JL, Jaspers I. Cinnamaldehyde in flavored e-cigarette liquids temporarily suppresses bronchial epithelial cell ciliary motility by dysregulation of mitochondrial function. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2019 Mar 1;316(3):L470–86. doi:10.1152/ajplung.00304.2018 PubMed PMID: 30604630; PubMed Central PMCID: PMC6459291.

192. Li J, Huynh DL, Cornwell WD, Tang MS, Simborio H, Huang J, et al. Electronic cigarettes induce mitochondrial DNA damage and trigger toll-like receptor 9-mediated atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2021 Feb;41(2):839–53. doi:10.1161/ATVBAHA.120.315556 PubMed PMID: 33380174; PubMed Central PMCID: PMC8608030.
193. Philpot RM, Smith BR. Role of cytochrome P-450 and related enzymes in the pulmonary metabolism of xenobiotics. *Environ Health Perspect.* 1984 Apr;55:359–67. doi:10.1289/ehp.8455359 PubMed PMID: 6376107; PubMed Central PMCID: PMC1568372.
194. Anttila S, Raunio H, Hakkola J. Cytochrome P450-mediated pulmonary metabolism of carcinogens: regulation and cross-talk in lung carcinogenesis. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2011 May;44(5):583–90. doi:10.1165/rcmb.2010-0189RT PubMed PMID: 21097654.
195. Kim JH, Sherman ME, Curriero FC, Guengerich FP, Strickland PT, Sutter TR. Expression of cytochromes P450 1A1 and 1B1 in human lung from smokers, non-smokers, and ex-smokers. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2004 Sep 15;199(3):210–9. doi:10.1016/j.taap.2003.11.015 PubMed PMID: 15364538.
196. Fujii-Kuriyama Y, Mimura J. Molecular mechanisms of AhR functions in the regulation of cytochrome P450 genes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005 Dec 9;338(1):311–7. doi:10.1016/j.bbrc.2005.08.162 PubMed PMID: 16153594.
197. The levels of polycyclic aromatic hydrocarbons in traditional cigarettes and E-cigarettes in Saudi Arabia markets: a comparative risk assessment study | *BMC Public Health* | Springer Nature Link [Internet]. [cited 2026 Mar 10]. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1186/s12889-024-18398-w>
198. Kidane B, Kahnamoui S, Srinathan S, Liu R, Tan L, Morris M, et al. Lung transcriptome of e-cigarette users reveals changes related to chronic lung disease. *Eur Respir J.* 2024 Feb;63(2):2301623. doi:10.1183/13993003.01623-2023 PubMed PMID: 38359961.
199. Tommasi S, Caliri AW, Caceres A, Moreno DE, Li M, Chen Y, et al. Dereglulation of Biologically Significant Genes and Associated Molecular Pathways in the Oral Epithelium of Electronic Cigarette Users. *Int J Mol Sci.* 2019 Feb 10;20(3):738. doi:10.3390/ijms20030738 PubMed PMID: 30744164; PubMed Central PMCID: PMC6386888.
200. Zhu Y, Gamare S, Polverino F, Owen CA, Somanath PR, Wang X, et al. CYP1B1 Mediates Cigarette Smoke–Induced Lipid Accumulation in Alveolar Type 2 Cells. *FASEB J.* 2025 Sep 30;39(18):e71062. doi:10.1096/fj.202501439RR PubMed PMID: 40971194; PubMed Central PMCID: PMC12448152.
201. Zhou B, Wang X, Li F, Wang Y, Yang L, Zhen X, et al. Mitochondrial activity and oxidative stress functions are influenced by the activation of AhR-induced CYP1A1 overexpression in cardiomyocytes. *Mol Med Rep.* 2017 Jul;16(1):174–80. doi:10.3892/mmr.2017.6580 PubMed PMID: 28498411; PubMed Central PMCID: PMC5482149.
202. Badal S, Delgoda R. CYP1B1: Friend or Foe A critical review. *OA Biochemistry.* 2013 Apr 1;1. doi:10.13172/2052-9651-1-1-601
203. Kwon YJ, Shin S, Chun YJ. Biological roles of cytochrome P450 1A1, 1A2, and 1B1 enzymes. *Arch Pharm Res.* 2021 Jan 1;44(1):63–83. doi:10.1007/s12272-021-01306-w
204. Zhu Y, Choi D, Somanath PR, Zhang D. Lipid-Laden Macrophages in Pulmonary Diseases. *Cells.* 2024 May 22;13(11):889. doi:10.3390/cells13110889 PubMed PMID: 38891022; PubMed Central PMCID: PMC11171561.
205. Nkadi PO, Merritt TA, Pillers DAM. An overview of pulmonary surfactant in the neonate: genetics, metabolism, and the role of surfactant in health and disease. *Mol Genet Metab.* 2009 Jun;97(2):95–101.

doi:10.1016/j.ymgme.2009.01.015 PubMed PMID: 19299177; PubMed Central PMCID: PMC2880575.

206. Agudelo CW, Samaha G, Garcia-Arcos I. Alveolar lipids in pulmonary disease. A review. *Lipids Health Dis.* 2020 Jun 3;19(1):122. doi:10.1186/s12944-020-01278-8 PubMed PMID: 32493486; PubMed Central PMCID: PMC7268969.
207. Krishnan S, Sankari A, Landsberg D. Lipoid Pneumonia. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2026 [cited 2026 Mar 31]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554577/> PubMed PMID: 32119464.
208. Hadda V, Khilnani GC. Lipoid pneumonia: an overview. *Expert Rev Respir Med.* 2010 Dec;4(6):799–807. doi:10.1586/ers.10.74 PubMed PMID: 21128754.
209. Davidson K, Brancato A, Heetderks P, Mansour W, Matheis E, Nario M, et al. Outbreak of Electronic-Cigarette–Associated Acute Lipoid Pneumonia — North Carolina, July–August 2019. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2019 Sep 13;68(36):784–6. doi:10.15585/mmwr.mm6836e1 PubMed PMID: 31513559; PubMed Central PMCID: PMC6755817.
210. Madison MC, Landers CT, Gu BH, Chang CY, Tung HY, You R, et al. Electronic cigarettes disrupt lung lipid homeostasis and innate immunity independent of nicotine. *J Clin Invest.* 2020 Apr 7;129(10):4290–304. doi:10.1172/JCI128531 PubMed PMID: 0.
211. Ryter SW, Choi AMK. Autophagy in the Lung. *Proc Am Thorac Soc.* 2010 Feb 15;7(1):13–21. doi:10.1513/pats.200909-101JS PubMed PMID: 20160144; PubMed Central PMCID: PMC3137145.
212. Persson HL, Sioutas A, Jacobson P, Vainikka LK. Human Lung Macrophages Challenged to Oxidants ex vivo: Lysosomal Membrane Sensitization is Associated with Inflammation and Chronic Airflow Limitation. *J Inflamm Res.* 2020 Nov 16;13:925–32. doi:10.2147/JIR.S280419 PubMed PMID: 33235481; PubMed Central PMCID: PMC7678820.
213. Tian K, Yu M, Jiang M, Gao Z, Zheng D, Shi W, et al. Lysosomal Acidification: A New Perspective on the Pathogenesis and Treatment of Pulmonary Fibrosis. *Compr Physiol.* 2025 Jun;15(3):e70023. doi:10.1002/cph4.70023 PubMed PMID: 40534185.
214. Borie R, Crestani B, Guyard A, Lidove O. Interstitial lung disease in lysosomal storage disorders. *Eur Respir Rev.* 2021 Apr 29;30(160):200363. doi:10.1183/16000617.0363-2020 PubMed PMID: 33927007; PubMed Central PMCID: PMC9489062.
215. Nie B, Liu X, Lei C, Liang X, Zhang D, Zhang J. The role of lysosomes in airborne particulate matter-induced pulmonary toxicity. *Sci Total Environ.* 2024 Apr 1;919:170893. doi:10.1016/j.scitotenv.2024.170893 PubMed PMID: 38342450.
216. Fernández E, Ballbè M, Sureda X, Fu M, Saltó E, Martínez-Sánchez JM. Particulate Matter from Electronic Cigarettes and Conventional Cigarettes: a Systematic Review and Observational Study. *Curr Environ Health Rep.* 2015 Dec;2(4):423–9. doi:10.1007/s40572-015-0072-x PubMed PMID: 26452675.
217. Barnes PJ. Oxidative Stress in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Antioxidants (Basel).* 2022 May 13;11(5):965. doi:10.3390/antiox11050965 PubMed PMID: 35624831; PubMed Central PMCID: PMC9138026.
218. Yeh CC, Barr RG, Powell CA, Mesia-Vela S, Wang Y, Hamade NK, et al. No effect of cigarette smoking dose on oxidized plasma proteins. *Environ Res.* 2008 Feb;106(2):219–25. doi:10.1016/j.envres.2007.09.008 PubMed PMID: 17996865; PubMed Central PMCID: PMC2268894.

219. Ricciardolo FLM, Caramori G, Ito K, Capelli A, Brun P, Abatangelo G, et al. Nitrosative stress in the bronchial mucosa of severe chronic obstructive pulmonary disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2005 Nov 1;116(5):1028–35. doi:10.1016/j.jaci.2005.06.034 PubMed PMID: 16275371.
220. Sugiura H, Ichinose M, Tomaki M, Ogawa H, Koarai A, Kitamuro T, et al. Quantitative assessment of protein-bound tyrosine nitration in airway secretions from patients with inflammatory airway disease. *Free Radic Res*. 2004 Jan;38(1):49–57. doi:10.1080/10715760310001633817 PubMed PMID: 15061653.
221. Reactive Oxygen and Nitrogen Species–Induced Protein Modifications: Implication in Carcinogenesis and Anticancer Therapy | Cancer Research | American Association for Cancer Research [Internet]. [cited 2026 Mar 31]. Available from: <https://aacrjournals.org/cancerres/article/78/21/6040/631722/Reactive-Oxygen-and-Nitrogen-Species-Induced?guestAccessKey=>
222. Rahman I, van Schadewijk AAM, Crowther AJL, Hiemstra PS, Stolk J, MacNee W, et al. 4-Hydroxy-2-Nonenal, a Specific Lipid Peroxidation Product, Is Elevated in Lungs of Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002 Aug 15;166(4):490–5. doi:10.1164/rccm.2110101
223. Lockridge O, Schopfer LM. Review: Organophosphorus toxicants, in addition to inhibiting acetylcholinesterase activity, make covalent adducts on multiple proteins and promote protein crosslinking into high molecular weight aggregates. *Chem Biol Interact*. 2023 May 1;376:110460. doi:10.1016/j.cbi.2023.110460 PubMed PMID: 36963650; PubMed Central PMCID: PMC10100150.
224. Use of 2,3-Naphthalenedicarboxaldehyde Derivatization for Single-Cell Analysis of Glutathione by Capillary Electrophoresis and Histochemical Localization by Fluorescence Microscopy | Analytical Chemistry [Internet]. [cited 2026 Mar 10]. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ac00119a010>
225. Breitzig M, Bhimineni C, Lockey R, Kolliputi N. 4-Hydroxy-2-nonenal: a critical target in oxidative stress? *Am J Physiol Cell Physiol*. 2016 Oct 1;311(4):C537–43. doi:10.1152/ajpcell.00101.2016 PubMed PMID: 27385721; PubMed Central PMCID: PMC5129750.
226. Mihalas BP, De Iuliis GN, Redgrove KA, McLaughlin EA, Nixon B. The lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal contributes to oxidative stress-mediated deterioration of the ageing oocyte. *Sci Rep*. 2017 Jul 24;7(1):6247. doi:10.1038/s41598-017-06372-z PubMed PMID: 28740075; PubMed Central PMCID: PMC5524799.
227. Pecorelli A, Woodby B, Prieux R, Valacchi G. Involvement of 4-hydroxy-2-nonenal in pollution-induced skin damage. *Biofactors*. 2019 Jul;45(4):536–47. doi:10.1002/biof.1513 PubMed PMID: 31087730.
228. Kuntic M, Oelze M, Steven S, Kröller-Schön S, Stamm P, Kalinovic S, et al. Short-term e-cigarette vapour exposure causes vascular oxidative stress and dysfunction: evidence for a close connection to brain damage and a key role of the phagocytic NADPH oxidase (NOX-2). *Eur Heart J*. 2020 Jul 7;41(26):2472–83. doi:10.1093/eurheartj/ehz772 PubMed PMID: 31715629; PubMed Central PMCID: PMC7340357.
229. Sticozzi C, Belmonte G, Pecorelli A, Arezzini B, Gardi C, Maioli E, et al. Cigarette smoke affects keratinocytes SRB1 expression and localization via H₂O₂ production and HNE protein adducts formation. *PLoS One*. 2012;7(3):e33592. doi:10.1371/journal.pone.0033592 PubMed PMID: 22442701; PubMed Central PMCID: PMC3307738.
230. Jakovčević A, Žarković K, Jakovčević D, Rakušić Z, Prgomet D, Waeg G, et al. The Appearance of 4-Hydroxy-2-Nonenal (HNE) in Squamous Cell Carcinoma of the Oropharynx. *Molecules*. 2020 Feb 16;25(4). doi:10.3390/molecules25040868

231. Okamoto K, Toyokuni S, Uchida K, Ogawa O, Takenawa J, Kakehi Y, et al. Formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and 4-hydroxy-2-nonenal-modified proteins in human renal-cell carcinoma. *Int J Cancer*. 1994 Sep 15;58(6):825–9. doi:10.1002/ijc.2910580613 PubMed PMID: 7523311.
232. Semen K, Yelisseyeva O, Jarocka-Karpowicz I, Kaminskyy D, Solovey L, Skrzydlewska E, et al. Sildenafil reduces signs of oxidative stress in pulmonary arterial hypertension: Evaluation by fatty acid composition, level of hydroxynonenal and heart rate variability. *Redox Biol*. 2016 Apr;7:48–57. doi:10.1016/j.redox.2015.11.009 PubMed PMID: 26654977; PubMed Central PMCID: PMC4683386.
233. Paul T, Salazar-Degracia A, Peinado VI, Tura-Ceide O, Blanco I, Barreiro E, et al. Soluble guanylate cyclase stimulation reduces oxidative stress in experimental Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *PLoS One*. 2018;13(1):e0190628. doi:10.1371/journal.pone.0190628 PubMed PMID: 29304131; PubMed Central PMCID: PMC5755849.
234. Toxicity and Microbial Degradation of Nitrobenzene, Monochloronitrobenzenes, Polynitrobenzenes, and Pentachloronitrobenzene - Arora - 2014 - *Journal of Chemistry* - Wiley Online Library [Internet]. [cited 2026 Mar 10]. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1155/2014/265140>
235. Yamagishi S ichi, Maeda S, Matsui T, Ueda S, Fukami K, Okuda S. Role of advanced glycation end products (AGEs) and oxidative stress in vascular complications in diabetes. *Biochim Biophys Acta*. 2012 May;1820(5):663–71. doi:10.1016/j.bbagen.2011.03.014 PubMed PMID: 21440603.
236. Del Turco S, Basta G. An update on advanced glycation endproducts and atherosclerosis. *Biofactors*. 2012;38(4):266–74. doi:10.1002/biof.1018 PubMed PMID: 22488968.
237. Prasad A, Bekker P, Tsimikas S. Advanced glycation end products and diabetic cardiovascular disease. *Cardiol Rev*. 2012;20(4):177–83. doi:10.1097/CRD.0b013e318244e57c PubMed PMID: 22314141.
238. Li J, Liu D, Sun L, Lu Y, Zhang Z. Advanced glycation end products and neurodegenerative diseases: mechanisms and perspective. *J Neurol Sci*. 2012 Jun 15;317(1–2):1–5. doi:10.1016/j.jns.2012.02.018 PubMed PMID: 22410257.
239. Jin H, Webb-Robertson BJ, Peterson ES, Tan R, Bigelow DJ, Scholand MB, et al. Smoking, COPD, and 3-nitrotyrosine levels of plasma proteins. *Environ Health Perspect*. 2011 Sep;119(9):1314–20. doi:10.1289/ehp.1103745 PubMed PMID: 21652289; PubMed Central PMCID: PMC3230408.
240. López-Bao JV, Mateo-Tomás P. Wipe out highly hazardous pesticides to deter wildlife poisoning: The case of carbofuran and aldicarb. *Biological Conservation*. 2022 Nov 1;275:109747. doi:10.1016/j.biocon.2022.109747
241. Blake LI, Cann MJ. Carbon Dioxide and the Carbamate Post-Translational Modification. *Front Mol Biosci*. 2022;9:825706. doi:10.3389/fmolb.2022.825706 PubMed PMID: 35300111; PubMed Central PMCID: PMC8920986.
242. Đukić T, Smiljanić K, Mihailović J, Prodić I, Apostolović D, Liu SH, et al. Proteomic Profiling of Major Peanut Allergens and Their Post-Translational Modifications Affected by Roasting. *Foods*. 2022 Dec 9;11(24). doi:10.3390/foods11243993
243. Cvetić T, Savić A, Jovanović V, Prodić I, Radosavljević J, Sickmann A, et al. Why Protein Modifications Matter for Digestibility: The Case of Ara h 1 Peanut Allergen and Trypsin Cleavage. *J Agric Food Chem*. 2025 Aug 20;73(33):21186–98. doi:10.1021/acs.jafc.5c05871
244. Berry SB, Haack AJ, Theberge AB, Brighenti S, Svensson M. Host and Pathogen Communication in the Respiratory Tract: Mechanisms and Models of a Complex Signaling Microenvironment. *Front Med*. 2020 Sep 10;7. doi:10.3389/fmed.2020.00537

245. Rannels DE. Gap junction communication in alveolar epithelial cells. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2001 Jun;280(6):L1083–4. doi:10.1152/ajplung.2001.280.6.L1083
246. Swartzendruber JA, Nicholson BJ, Murthy AK. The Role of Connexin 43 in Lung Disease. *Life*. 2020 Dec;10(12):12. doi:10.3390/life10120363
247. Radman M. Cellular parabiosis and the latency of age-related diseases. *Open Biol*. 2019 Mar 27;9(3):180250. doi:10.1098/rsob.180250 PubMed PMID: 30914007; PubMed Central PMCID: PMC6451360.
248. Boitano S, Safdar Z, Welsh DG, Bhattacharya J, Koval M. Cell-cell interactions in regulating lung function. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2004 Sep;287(3):L455–9. doi:10.1152/ajplung.00172.2004
249. Brózman O, Novák J, Bauer AK, Babica P. Airborne PAHs inhibit gap junctional intercellular communication and activate MAPKs in human bronchial epithelial cell line. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2020 Oct 1;79:103422. doi:10.1016/j.etap.2020.103422
250. Sharing signals: connecting lung epithelial cells with gap junction channels | *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* | American Physiological Society [Internet]. [cited 2026 Jan 15]. Available from: <https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/ajplung.00078.2002>
251. Carlson J, Price L, Deng H. Nrf2 and the Nrf2-Interacting Network in Respiratory Inflammation and Diseases. *Nrf2 and its Modulation in Inflammation*. 2020 May 22;85:51–76. doi:10.1007/978-3-030-44599-7_3 PubMed PMID: null; PubMed Central PMCID: PMC7241096.
252. Eckhardt CM, Wu H. Environmental Exposures and Lung Aging: Molecular Mechanisms and Implications for Improving Respiratory Health. *Curr Envir Health Rpt*. 2021 Dec 1;8(4):281–93. doi:10.1007/s40572-021-00328-2
253. Wu X, Lin L, Yan H, Zheng F, Ding Y, Yao H. Exposure to environmental xenobiotics and lung tissue function: A comprehensive review on biological mechanisms and pathways. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2025 Dec 1;308:119438. doi:10.1016/j.ecoenv.2025.119438
254. Aghapour M, Ubags ND, Bruder D, Hiemstra PS, Sidhaye V, Rezaee F, et al. Role of air pollutants in airway epithelial barrier dysfunction in asthma and COPD. *European Respiratory Review*. 2022 Mar 23;31(163). doi:10.1183/16000617.0112-2021
255. Lee PH, Park S, Lee YG, Choi SM, An MH, Jang AS. The Impact of Environmental Pollutants on Barrier Dysfunction in Respiratory Disease. *Allergy, Asthma & Immunology Research*. 2021 Nov;13(6):850–62. doi:10.4168/aair.2021.13.6.850
256. Manzano-Covarrubias AL, Yan H, Luu MDA, Gadjdjo PS, Dolga AM, Schmidt M. Unravelling the signaling power of pollutants. *Trends Pharmacol Sci*. 2023 Dec;44(12):917–33. doi:10.1016/j.tips.2023.09.002 PubMed PMID: 37783643.
257. Rustom A, Saffrich R, Markovic I, Walther P, Gerdes HH. Nanotubular highways for intercellular organelle transport. *Science*. 2004 Feb 13;303(5660):1007–10. doi:10.1126/science.1093133 PubMed PMID: 14963329.
258. Onfelt B, Nedvetzki S, Benninger RKP, Purbhoo MA, Sowinski S, Hume AN, et al. Structurally distinct membrane nanotubes between human macrophages support long-distance vesicular traffic or surfing of bacteria. *J Immunol*. 2006 Dec 15;177(12):8476–83. doi:10.4049/jimmunol.177.12.8476 PubMed PMID: 17142745.

259. Gerdes HH, Rustom A, Wang X. Tunneling nanotubes, an emerging intercellular communication route in development. *Mechanisms of Development*. 2013 Jun 1;Neural Development130(6):381–7. doi:10.1016/j.mod.2012.11.006
260. Watkins SC, Salter RD. Functional connectivity between immune cells mediated by tunneling nanotubules. *Immunity*. 2005 Sep;23(3):309–18. doi:10.1016/j.immuni.2005.08.009 PubMed PMID: 16169503.
261. Austefjord MW, Gerdes HH, Wang X. Tunneling nanotubes: Diversity in morphology and structure. *Commun Integr Biol*. 2014 Jan 1;7(1):e27934. doi:10.4161/cib.27934 PubMed PMID: 24778759; PubMed Central PMCID: PMC3995728.
262. Koyanagi M, Brandes RP, Haendeler J, Zeiher AM, Dimmeler S. Cell-to-cell connection of endothelial progenitor cells with cardiac myocytes by nanotubes: a novel mechanism for cell fate changes? *Circ Res*. 2005 May 27;96(10):1039–41. doi:10.1161/01.RES.0000168650.23479.0c PubMed PMID: 15879310.
263. Domhan S, Ma L, Tai A, Anaya Z, Beheshti A, Zeier M, et al. Intercellular communication by exchange of cytoplasmic material via tunneling nano-tube like structures in primary human renal epithelial cells. *PLoS One*. 2011;6(6):e21283. doi:10.1371/journal.pone.0021283 PubMed PMID: 21738629; PubMed Central PMCID: PMC3124493.
264. Mitochondrial transfer between cells can rescue aerobic respiration | PNAS [Internet]. [cited 2026 Mar 10]. Available from: <https://www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.0510511103>
265. Wang X, Veruki ML, Bukoreshtliev NV, Hartveit E, Gerdes HH. Animal cells connected by nanotubes can be electrically coupled through interposed gap-junction channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010 Oct 5;107(40):17194–9. doi:10.1073/pnas.1006785107
266. Onfelt B, Nedvetzki S, Yanagi K, Davis DM. Cutting edge: Membrane nanotubes connect immune cells. *J Immunol*. 2004 Aug 1;173(3):1511–3. doi:10.4049/jimmunol.173.3.1511 PubMed PMID: 15265877.
267. Naphade S, Sharma J, Gaide Chevonnay HP, Shook MA, Yeagy BA, Rocca CJ, et al. Brief reports: Lysosomal cross-correction by hematopoietic stem cell-derived macrophages via tunneling nanotubes. *Stem Cells*. 2015 Jan;33(1):301–9. doi:10.1002/stem.1835 PubMed PMID: 25186209; PubMed Central PMCID: PMC4270893.
268. Wang Y, Cui J, Sun X, Zhang Y. Tunneling-nanotube development in astrocytes depends on p53 activation. *Cell Death Differ*. 2011 Apr;18(4):732–42. doi:10.1038/cdd.2010.147 PubMed PMID: 21113142; PubMed Central PMCID: PMC3131904.
269. Roberts KL, Manicassamy B, Lamb RA. Influenza A Virus Uses Intercellular Connections To Spread to Neighboring Cells. *Journal of Virology*. 2015 Jan 12;89(3):1537–49. doi:10.1128/jvi.03306-14
270. Lv W, Li Z, Wang S, He J, Zhang L. A role for tunneling nanotubes in virus spread. *Front Microbiol*. 2024 Feb 16;15. doi:10.3389/fmicb.2024.1356415
271. Tunneling nanotubes provide a route for SARS-CoV-2 spreading | Science Advances [Internet]. [cited 2026 Apr 24]. Available from: <https://www.science.org/doi/full/10.1126/sciadv.abo0171>
272. Gousset K, Zurzolo C. Tunnelling nanotubes: a highway for prion spreading? *Prion*. 2009;3(2):94–8. doi:10.4161/pri.3.2.8917 PubMed PMID: 19471116; PubMed Central PMCID: PMC2712606.
273. Membrane nanotubes physically connect T cells over long distances presenting a novel route for HIV-1 transmission | Nature Cell Biology [Internet]. [cited 2026 Mar 10]. Available from: <https://www.nature.com/articles/ncb1682>

274. Zhang Y. Tunneling-nanotube: A new way of cell-cell communication. *Commun Integr Biol.* 2011 May;4(3):324–5. doi:10.4161/cib.4.3.14855 PubMed PMID: 21980570; PubMed Central PMCID: PMC3187898.
275. Tunneling nanotube formation is stimulated by hypoxia in ovarian cancer cells | Oncotarget [Internet]. [cited 2026 Mar 10]. Available from: <https://www.oncotarget.com/article/9504/text/>
276. Kretschmer A, Zhang F, Somasekharan SP, Tse C, Leachman L, Gleave A, et al. Stress-induced tunneling nanotubes support treatment adaptation in prostate cancer. *Sci Rep.* 2019 May 24;9(1):7826. doi:10.1038/s41598-019-44346-5
277. Burridge K. Focal adhesions: a personal perspective on a half century of progress. *FEBS J.* 2017 Oct;284(20):3355–61. doi:10.1111/febs.14195 PubMed PMID: 28796323; PubMed Central PMCID: PMC5643231.
278. Winograd-Katz SE, Fässler R, Geiger B, Legate KR. The integrin adhesome: from genes and proteins to human disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014 Apr;15(4):273–88. doi:10.1038/nrm3769 PubMed PMID: 24651544.
279. Bauer MS, Baumann F, Daday C, Redondo P, Durner E, Jobst MA, et al. Structural and mechanistic insights into mechanoactivation of focal adhesion kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019 Apr 2;116(14):6766–74. doi:10.1073/pnas.1820567116 PubMed PMID: 30877242; PubMed Central PMCID: PMC6452671.
280. Sulzmaier FJ, Jean C, Schlaepfer DD. FAK in cancer: mechanistic findings and clinical applications. *Nat Rev Cancer.* 2014 Sep;14(9):598–610. doi:10.1038/nrc3792 PubMed PMID: 25098269; PubMed Central PMCID: PMC4365862.
281. Giménez A, Duch P, Puig M, Gabasa M, Xaubet A, Alcaraz J. Dysregulated Collagen Homeostasis by Matrix Stiffening and TGF- β 1 in Fibroblasts from Idiopathic Pulmonary Fibrosis Patients: Role of FAK/Akt. *International Journal of Molecular Sciences.* 2017 Nov 16;18(11). doi:10.3390/ijms18112431
282. Aftab Q, Sin WC, Naus CC. Reduction in gap junction intercellular communication promotes glioma migration. *Oncotarget.* 2015 May 10;6(13):11447–64. doi:10.18632/oncotarget.3407 PubMed PMID: 25926558; PubMed Central PMCID: PMC4484468.
283. Tsai CH, Yeh HI, Tian TY, Lee YN, Lu CS, Ko YS. Down-regulating effect of nicotine on connexin43 gap junctions in human umbilical vein endothelial cells is attenuated by statins. *Eur J Cell Biol.* 2004 Jan;82(12):589–95. doi:10.1078/0171-9335-00348 PubMed PMID: 15035434.
284. Haussig S, Schubert A, Mohr FW, Dhein S. Sub-chronic nicotine exposure induces intercellular communication failure and differential down-regulation of connexins in cultured human endothelial cells. *Atherosclerosis.* 2008 Jan;196(1):210–8. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2007.04.024 PubMed PMID: 17553504.
285. Muresan XM, Cervellati F, Sticozzi C, Belmonte G, Chui CH, Lampronti I, et al. The loss of cellular junctions in epithelial lung cells induced by cigarette smoke is attenuated by corilagin. *Oxid Med Cell Longev.* 2015;2015:631758. doi:10.1155/2015/631758 PubMed PMID: 25802682; PubMed Central PMCID: PMC4354730.
286. Shaito A, Saliba J, Husari A, El-Harakeh M, Chhour H, Hashem Y, et al. Electronic Cigarette Smoke Impairs Normal Mesenchymal Stem Cell Differentiation. *Sci Rep.* 2017 Oct 27;7(1):14281. doi:10.1038/s41598-017-14634-z PubMed PMID: 29079789; PubMed Central PMCID: PMC5660168.
287. Notification Detail | TRIS - European Commission [Internet]. [cited 2026 Mar 10]. Available from: <https://technical-regulation-information-system.ec.europa.eu/en/notification/18358>

288. Products C for T. Enforcement Priorities for Electronic Nicotine Delivery System (ENDS) and Other Deemed Products on the Market Without Premarket Authorization [Internet]. FDA; 2020 [cited 2026 Mar 10]. Available from: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/enforcement-priorities-electronic-nicotine-delivery-system-ends-and-other-deemed-products-market>

BIOGRAFIJA

Sara Trifunović rođena je 13. septembra 1988. godine u Suresnesu, Francuska. Osnovne i master studije završila je na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu 2013. i 2014. godine, na studijskom programu biohemije, stekavši zvanje master biohemičara.

Nakon završetka studija bila je angažovana na Hemijskom fakultetu, najpre kao volonter, a potom i kao stručni saradnik u grupi profesorke Tanje Ćirković Veličković, do septembra 2016. godine.

Iste godine odlazi na Mediteranski institut za istraživanje života (Mediterranean Institute for Life Sciences - MedILS) u Splitu, Hrvatska, gde se u grupi profesora Miroslava Radmana zapošljava kao mladi istraživač. Uspostavljanjem saradnje između MedILS-a i Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo (IMGGI), 2017. godine prelazi na IMGGI i upisuje doktorske akademske studije na studijskom programu Molekularna biologija, modul Molekularna biologija eukariota na Biološkom fakultetu, Univerzitet u Beogradu. Eksperimentalni deo doktorske disertacije realizovala je u Grupi za molekularnu biologiju na Institutu za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo Univerziteta u Beogradu. Narednih pet godina paralelno je radila na MedILS-u i IMGGI-ju, u okviru zajedničkog istraživačkog projekta. Od 2022. godine zaposlena je na IMGGI-ju.

Sara Trifunović je prvi autor na dve publikacije proistekle iz doktorske disertacije (kategorije M21 i M21a), i koautor na tri publikacije (dva kategorije M21a+ i jedan kategorije M21), kao i na sedam saopštenja prezentovanih na nacionalnim i međunarodnim naučnim skupovima.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Сара Трифуновић

Број индекса М3010/2017

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Биолошки одговор ћелијских линија бронхијалног епитела (BEAS2B) и фибробласта плућа (V79) на компоненте течности за електронске цигарете

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, _____

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Сара Трифуновић

Број индекса М3010/2017

Студијски програм Молекуларна биологија

Наслов рада Биолошки одговор ћелијских линија бронхијалног епитела (BEAS2B) и фибробласта плућа (V79) на компоненте течности за електронске цигарете

Ментори др Мила Љујић

др Милош Бркушанин

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, _____

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Биолошки одговор ћелијских линија бронхијалног епитела (BEAS2B) и фибробласта плућа (V79) на компоненте течности за електронске цигарете

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)

2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)

3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)

5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)

6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, _____

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.