



T.C.

DÜZCE ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**YENİ NESİL E-SİGARA BİLEŞENLERİNİN İNSAN BRONŞİYAL
EPİTELYAL HÜCRELERİNDE BULUNAN ENaC, CFTR, CaCC
KANALLARI VE SOLUNUM YOLU YÜZEY SIVI YÜKSEKLİĞİ
ÜZERİNE ETKİLERİ**

Özge BEYAZÇİÇEK

DOKTORA TEZİ

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. Recep ÖZMERDİVENLİ

İKİNCİ DANIŞMAN

Prof. Dr. Robert TARRAN

DÜZCE, 2019

TEZ ONAYI

Fizyoloji Anabilim Dalı Doktora Programı Çerçevesinde yürütülmüş olan “**Yeni Nesil E-Sigara Bileşenlerinin İnsan Bronşiyal Epitelyal Hücrelerinde Bulunan ENaC, CFTR, CaCC Kanalları ve Solunum Yolu Yüzey Sıvı Yüksekliği Üzerine Etkileri**” adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

13/12/2019

Prof. Dr. Recep ÖZMERDİVENLİ
Aydın Adnan Menderes Üniversitesi
(Jüri Başkanı)

Prof. Dr. Şerif DEMİR
Düzce Üniversitesi

Prof. Dr. Aydın HİM
Abant İzzet Baysal Üniversitesi

Doç. Dr. Şule AYDIN TÜRKÖĞLU
Abant İzzet Baysal Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Hakan SOYLU
Düzce Üniversitesi

Yukarıdaki Tez, Yönetim Kurulunun 20/12/19 tarih ve 2019/423 sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Adnan ÖZÇETİN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

13.12.2019

Özge BEYAZÇİÇEK

TEŞEKKÜR

İlk günden bu yana güler yüzü ve desteğiyle her zaman yanımda olan tez danışmanım değerli Hocam Prof. Dr. Recep ÖZMERDİVENLİ'ye, tez çalışmam sırasında bana bütün imkânları sağlamaya çalışan değerli Hocalarım Prof. Dr. Şerif DEMİR ve Dr. Öğr. Üyesi Ersin BEYAZÇİÇEK'e, tez çalışmam sırasında bana laboratuvarının tüm imkanlarını tanıyan çok değerli eş danışmanım ve mentorum Prof. Dr. Robert TARRAN'a, maddi ve manevi olarak desteklerini eksik etmeyen ve doktora çalışmalarım boyunca üzerimde çok emekleri olan çok değerli Hocalarım Prof. Dr. Aziz SANCAR ve çok kıymetli eşi Prof. Dr. Gwendolyn SANCAR'a, Prof. Dr. Mehmet KESİMER'e, laboratuvardaki çalışmalarım sırasında yardımlarından ötürü Dr. Michael CHUA'ya, Dr. Arunava GHOSH'a, Dr. Saira AHMAD'a, Dr. Patrick MOORE'a, Dr. Maximillian WOODALL'a, Eric DAVIS'e, Nazlı DEĞER'e, tez çalışmalarım sırasında manevi yardımlarını esirgemeyen Serkan ve Nida ALAÇAM'a doktorayı başarılı bir şekilde bitirmemi sağlayan aileme ve ders aldığım dönemde beni sabırla bekleyen, sınav dönemlerimde her zaman yanımda olan, tez yazım dönemimde bütün yoğun çalışmalarına rağmen benim tez çalışmamla ilgilenen, destek olan sevgili eşim ve meslektaşım Dr. Ersin BEYAZÇİÇEK'e çok teşekkür ederim.

Özge BEYAZÇİÇEK

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER	ii
TABLolar LİSTESİ	vi
ŞEKİL LİSTESİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	ix
ÖZET	1
ABSTRACT	2
1. GİRİŞ ve AMAÇ	3
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Elektronik Sigara	5
2.1.1. Tarihçesi	5
2.1.2. Genel e-sigara tanımları.....	7
2.1.3. E-sigaranın bölümleri	8
2.1.4. E-likit komponentleri ve karakteristik özellikleri	9
2.1.4.1. Aromalar.....	10
2.1.4.2. Mentol	12
2.1.4.3. Nikotin.....	16
2.1.4.3.A. Serbest baz nikotin	17
2.1.4.3.B. Nikotin tuzu	18
2.1.4.3.C. Nikotin benzoat	20
2.1.4.3.D. Nikotin levulinat.....	21
2.1.4.3.E. Nikotin pirüvat.....	21
2.1.4.3.F. E-likitteki nikotin tuzunun solunması	21
2.1.4.3.G. pH.....	22
2.1.4.3.H. Nikotin seviyesi	24
2.1.4.3.I. Elektronik sigaraların nikotin farmakokinetiği.....	25
2.1.4.3.J. E-sigara kullanım davranışının nikotin iletimi üzerine etkisi.....	26
2.1.4.4. Propilen glikol ve vegetable (bitkisel) gliserin.....	26
2.1.5. E-sigara aerosolünün temel özellikleri	29
2.1.5.1. İnhalasyon şeklinin rolü	31
2.1.5.2. İnhalasyon sonrası aerosol dinamiği	33

2.1.6. E-sigara çalışma mekanizması	34
2.1.7. JUUL.....	35
2.1.8. E-sigaranın kullanımı.....	37
2.1.8.1. Dünya pazarındaki yeri.....	38
2.1.8.2. E-sigara pazarlama stratejisi.....	38
2.1.8.3. E-sigaranın ulusal/uluslararası kuruluşlar tarafından düzenlenmesi	39
2.1.9. E-sigaranın klinik önemi.....	39
2.1.10. Nikotin dışındaki kimyasal maddelere maruz kalma	40
2.1.11. E-sigarada pasif içicilik (ikinci el maruziyeti)	41
2.1.12. E-sigaraların sigarayı bıraktırmadaki rolü	41
2.1.13. E-sigara toksisitesi	43
2.1.13.1. Solunum sistemi üzerine etkileri	43
2.1.13.1.A. Akciğerler üzerine etkisi	44
2.1.13.1.B. Solunum Sistemi hücreleri üzerine etkileri	45
2.1.13.2. Kardiyovasküler sistem üzerine etkileri	46
2.1.13.3. İmmün sistemi üzerine etkileri	48
2.1.13.4. Kan hücreleri.....	49
2.1.3.5. Gastrointestinal sistem üzerine etkisi	49
2.1.3.6. Gözler üzerine etkisi	49
2.1.3.7. Merkezi sinir sistemi üzeri etkisi.....	50
2.1.3.8. Üreme sistemi üzerine etkileri	50
2.1.3.9. Fetal ve adölesan gelişimi üzerine etkileri	51
2.1.3.10. Kanser riski	51
2.1.3.11. Diğer riskler.....	52
2.2. Solunum Sistemi	53
2.2.1. Akciğerlerin anatomisi.....	54
2.2.2. Epitelyal heterojenlik	54
2.2.3. Solunum yolunda transselüler ve paraselüler taşınım	56
2.2.4. Submukozal bezler	57
2.2.5. Mukus	57
2.2.6. Solunum yolu yüzey sıvısı	59
2.3. İyon Kanalları.....	61

2.3.1. Epitelyal sodyum kanalları.....	61
2.3.1.1. Epitel dokularında tuzun taşınım mekanizması	62
2.3.1.2. ENaC'ın moleküler yapısı	63
2.3.1.3. ENaC'ın hücresel regülasyonu	65
2.3.1.3.A. Amilorid	66
2.3.1.3.B. Forskolin.....	66
2.3.2. Kalsiyumla aktiflenen klor kanalları (CaCC)	67
2.3.2.1. Üridin trifosfat (UTP).....	68
2.3.3. Kistik fibröz transmembran regülatör (CFTR) iyon kanalı	69
2.3.3.1. Kistik fibröz transmembran regülatör inhibitörü-172.....	70
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	71
3.1. Solunum Yolu Yüzey Sıvı Yüksekliğinin Belirlenmesi.....	71
3.1.1.Kullanılan maddeler.....	71
3.1.2. Gruplar, dozlar ve uygulama süreleri	71
3.1.3. Hücre kültürü	71
3.2. İyon Transportunun Belirlenmesi	73
3.2.1. Kullanılan maddeler.....	73
3.2.2. Gruplar, dozlar ve uygulama süreleri	74
3.2.3. Hücre kültürü	74
3.2.4. Ussing chamber çalışması	75
3.3. Sitotoksosite Testleri	77
3.3.1. Kullanılan maddeler.....	77
3.3.2. Gruplar, dozlar ve uygulama süreleri	78
3.3.3. Hücre kültürü	78
3.4. Otofloresans Çalışması	80
3.4.1. Kullanılan maddeler.....	81
3.4.2. Gruplar, dozlar ve uygulama süreleri	81
3.4.3. Deney prosedürü.....	82
3.4.4. Yüzeyde e-sigara dumanı birikiminin ölçümü.....	82
3.5. İstatistiksel Analizler	84
3.5.1. Solunum yolu yüzey sıvı yüksekliğinin istatistiksel analizi.....	84
3.5.2. İyon transportunun istatistiksel analizi.....	84
3.5.3. Sitotoksosite testlerinin istatistiksel analizi.....	84

3.5.4. Otofloresans verilerin istatistiksel analizi	84
4. BULGULAR	85
4.1. Solunum Yolu Yüzey Sıvı Yüksekliğinin Belirlenmesi	85
4.1.1. Elektronik sigara bileşenlerinin zamana bağlı olarak solunum yolu yüzey sıvı yüksekliği üzerine etkileri	85
4.1.2. Aynı zaman dilimlerinde elektronik sigara bileşenlerinin solunum yolu yüzey sıvı yüksekliği üzerine etkileri	90
4.2. Elektronik sigara bileşenlerinin İyon Değişimi Üzerine Etkisi.....	92
4.2.1. Elektronik sigara bileşenlerinin iyon kanalları üzerine etkileri	93
4.2.2. Elektronik sigara bileşenlerinin transepitelyal bariyer üzerine etkileri	96
4.3. E-sigaralarda bulunan maddelerin sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesi	99
4.4. E-likitlerde bulunan maddelerin otofloresans özelliklerinin değerlendirilmesi	104
4.4.1. E-likitlerde bulunan maddelerin otofloresans özellikleri	104
4.4.2. Yüzeyde e-sigara dumanı birikimi.....	106
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	107
6. KAYNAKLAR.....	127
ÖZGEÇMİŞ.....	155

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 2. 1. E-sigarlardan nikotin alımını etkileyen potansiyel mekanizmalar	10
Tablo 2. 2. Nikotin kaynaklarından salınan nikotin miktarları	17
Tablo 2. 3. Serbest baz nikotin ve nikotin tuzu arasındaki farklar	22
Tablo 2. 4. Elektronik sigara terminolojisi	35
Tablo 2. 5. E-sigaranın akut fizyolojik etkileri	40
Tablo 2. 6. Elektronik sigara tüketiminin sık rapor edilen belirtilerinin bir özeti	52
Tablo 3. 1. E-sigaranın solunum yolu yüzey sıvı yüksekliği üzerine etkisinin belirlenmesinde kullanılan maddeler ve gruplar	71
Tablo 3. 2. E-sigaranın iyon transportu üzerindeki etkilerinin belirlenmesinde kullanılan maddeler ve gruplar	74
Tablo 3. 3. Sitotoksisite testlerinde kullanılan maddeler ve gruplar	78
Tablo 3. 4. E-sigarlarda bulunan maddelerin otofloresans özelliğini belirlemede kullanılan maddeler ve gruplar	81
Tablo 3. 5. E-sigarada kullanılan Fruit Medley e-likittinin ortamda birikiminin belirlenmesinde kullanılan maddeler ve gruplar	82
Tablo 4. 1. Elektronik sigara bileşenlerinin zamana bağlı olarak solunum yolu yüzey sıvı yüksekliği üzerine etkileri	86
Tablo 4. 2. Elektronik sigara bileşenlerinin solunum yolu yüzey sıvı yüksekliği üzerine etkileri	91
Tablo 4. 3. Elektronik sigarlarda bulunan maddelerin iyon değişimi üzerine etkisi ...	94
Tablo 4. 4. E-sig bulunan kimyasalların transepitelyal bariyer üzerinde oluşturdukları elektriksel direnç değişimleri	97
Tablo 4. 5. Elektronik sigarada bulunan kimyasalların doza bağlı sitotoksik etkileri ..	102

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2. 1. Sigara dizaynının değişimi.	6
Şekil 2. 2. Yeni nesil bir e-sigaranın genel yapısı	8
Şekil 2. 3. Vücutta nikotin salınımının popüler yolları.....	16
Şekil 2. 4. Bir e-sigara olarak JUUL.....	19
Şekil 2. 5. Kan nikotin seviyesi değişimi.....	20
Şekil 2. 6. Üsteki resim; E-sig içmenin üç fazı: pufun çekilmesi, aerosolün ağızda tutulması ve aerosolün inhalasyonu	32
Şekil 2. 7. Akciğerlerin yapısı.	54
Şekil 2. 8. Solunum yolu yüzeyinin organizasyonu.....	58
Şekil 2. 9. Normal insan solunum yolu epitelindeki iyon kanallarının, değiştiricilerinin ve pompalarının şematik gösterimi	60
Şekil 2. 10. Epitelde ENaC'nin yeri ve fonksiyonunun şematik gösterimi	62
Şekil 2. 11. Üç alt birimden (α , β , γ) oluşan epitelyal sodyum kanalının (ENaC)	65
Şekil 2. 12. CaCC'ler vasıtasıyla Cl^- akışını kontrol eden faktörler	67
Şekil 3. 1. Ussing Chamberın temel prensibi.....	77
Şekil 3. 2. 3D basılmış 6-kanallı dağıtıcı.....	83
Şekil 4. 1. Elektronik sigara bileşenlerinin zamana bağlı olarak solunum yolu yüzey sıvı yüksekliği üzerine etkileri.....	87
Şekil 4. 2. Elektronik sigara bileşenlerinin zamana bağlı olarak solunum yolu yüzey sıvı yüksekliği üzerine etkilerinin temsili gösterimi.....	88
Şekil 4. 3. Elektronik sigara bileşenlerinin zamana bağlı olarak solunum yolu yüzey sıvı yüksekliği üzerine etkileri.....	89
Şekil 4. 4. Elektronik sigara bileşenlerinin solunum yolu yüzey sıvı yüksekliği üzerine etkileri	90
Şekil 4. 5. Elektronik sigara bileşenlerinin iyon değişimi üzerine etkisinin temsili gösterimi	92
Şekil 4. 6. Elektronik sigaralarda bulunan maddelerin iyon değişimi üzerine etkisi.....	95
Şekil 4. 7. E-sig bulunan kimyasalların transepitelyal bariyer üzerinde oluşturdukları elektriksel direnç değişimleri.....	98
Şekil 4. 8. Toksikite sonucu canlı ve ölü hücrelerin gösterimi	100

Şekil 4. 9. Elektronik sigarada bulunan kimyasalların doza bağlı sitotoksik etkileri ...	103
Şekil 4. 10. E-likitler benzersiz otofloresan profillerine sahiptir. Otofloresan profilindeki tüm e-likitler için sinyal yoğunluğunun ısı haritası	104
Şekil 4. 11. Sekiz e-likittin emisyon spektrumu ve sinyal yoğunluğundaki farklılıkların gösterimi	105
Şekil 4. 12. Fruit Medley likit birikiminin otofloresan ile tayini.....	106



SİMGELER VE KISALTMALAR

µl	Mililitre
µM	Mikro molar
mM	Mili molar
ABC	Atp bağlayıcı protein
Ag/AgCl	Gümüş/gümüş klorür
ALI	Air-liquid interface,
ASICs	Aside duyarlı iyon kanalları
ATP	Adenozin trifosfat
CaCC	Kalsiyumla uyarılmış klor kanalı
cAMP	Siklik adenozin monofosfat
cDNA	Complementary DNA
CFTR	Kistik fibröz transmembran regülatör
CFTRinh-172	<i>Kistik fibröz transmembran regülatör inhibitörü 172</i>
Cl⁻	Klor
cm	Santimetre
CO₂	Karbondioksit
DMEM	Dubelco's modifiye edilmiş eagle medyası
DNA	Deoksiribo nükleik asit
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
E-likit	Elektronik sigara likiti
ENaC	Epitelyal sodyum kanalı
E-sig	Elektronik sigara
E-sigara	Elektronik sigara
ESS	Ekstraselüler sıvı
FDA	Amerikan gıda ve ilaç dairesi
FEMA	Amerikan aroma ve özüt üreticileri birliği
FeNO	Demir nitrik oksit
GRAS	Genel olarak güvenli tanınan maddeler
HBEC	İnsan bronşiyal epitel hücresi
HCO₃⁻	Bikarbonat
HEK-293T	İnsan embriyonik böbrek hücreleri
HSA	Hava-sıvı arayüzü

IF	İntestisyel sıvı
IgE	İmmunoglobulin E
IL	İnterlökin
IP3	İnozitol trifosfat
ISS	İntraselüler sıvı
K⁺	Potasyum
KF	Kistik fibroz
KOAH	Kronik obstrüktif akciğer hastalığı
Li⁺	Lityum
ml	Mililitre
mRNA	Haberci ribo nükleik asit
NA	Sayısal açıklık
Na⁺	Sodyum
Na⁺/K⁺ATPaz	Sodyum potasyum atpaz
nAChRs	Nikotinik asetilkolin reseptörü
ng	Nanogram
NKCC	Sodyum-potasyum-klor kotrasport
Nm	Nanometre
NO	Nitrik oksit
NRT	Nikotin replasman tedavisi
O₂	Oksijen
P2Y	Purinoceptor 2
PBS	Fosfat buffer salin
PCR	Polymerase chain reaction
PG	Propilen glikol
pKa	Bozunum sabiti
ppb	Milyonda bir
RFU	Göreceli floresan birimi
SCNN	Sodium channel epithelial 1 alpha subunit
SYYS	Solunum yolu yüzey sıvı yüksekliği
ug	Mikrogram
UV	Ultraviyole
VG	Vegetable (bitkisel) gliserin

VGCC	Voltaj kapılı ca^{+2} kanalları
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
ΔI_{sc}	Kısa devre akımı farkı
ΔTER	Transepitelyal resistans farkı
ENDS	Elektronik nikotin dağıtım sistemleri



ÖZET

YENİ NESİL E-SİGARA BİLEŞENLERİNİN İNSAN BRONŞİYAL EPİTELYAL HÜCRELERİNDE BULUNAN ENaC, CFTR, CaCC KANALLARI VE SOLUNUM YOLU YÜZEY SIVI YÜKSEKLİĞİ ÜZERİNE ETKİLERİ

Özge BEYAZÇİÇEK

Doktora Tezi, Fiziyojji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı Prof. Dr. Recep ÖZMERDİVENLİ

Aralık 2019, 155 Sayfa

Elektronik nikotin verme sistemi olarak da bilinen elektronik sigaralar (e-sig), tütüne kıyasla nispeten daha güvenli olduğu düşünülen, minimal bir araçla aerosol haline getirilmiş nikotini vermek üzere tasarlanan cihazlardır. E-sigara bileşenlerinin, anormal solunum yolu iyon transport değişiklikleri de dahil olmak üzere protein fonksiyonunda değişikliklere yol açtığını bilinmektedir. Bu çalışmanın amacı, yeni nesil e-sigara bileşenlerinin insan bronşiyal epitelyal hücrelerinde bulunan ENaC, CFTR ve CaCC kanalları, solunum yolu yüzey sıvı (SYYS) yüksekliği ve iyon transportu üzerine etkilerinin araştırılmasıdır. Çalışmada e-sigara bileşenleri olan; nikotin tuzu, benzoik asit, sodyum hidrojen tartar, propilen glikol/vegetable gliserin (PG/VG), serbest baz nikotin ve nikotin tuzu+benzoik asit karışımı kullanılmıştır. Her bir bileşenden 100 µM olacak şekilde 6 grup oluşturulmuştur. Kontrol grubu olarak PBS kullanılmıştır. E-sigara bileşenlerinin iyon kanalları ve solunum yolu yüzey sıvısı üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla *in vivo* solunum yolu epitel morfolojisini taklit eden primer insan bronşiyal epitel hücreleri (HBEC) kullanılmıştır. Elektronik sigarada bulunan bileşenlerin sitotoksik etkilerini belirlemek amacıyla bir immortal hücre hattı olan HEK-293T hücreleri kullanılmıştır. Bunlara ek olarak e-sigara aromalarının üçüncü el maruziyetleri de incelenmiştir. İstatistiksel analizler GraphPad Prism v8.0 programı kullanılarak yapılmıştır. E-sigara bileşenleri uygulanan HBEC kültürlerinde YYS yüksekliğinin zamana bağlı olarak azaldığı belirlenmiştir ($P<0,0001$). E-sigara bileşenlerinin iyon değişimi üzerindeki etkileri belirlemek için yapılan çalışmada gruplar arasında ΔI_{sc} 'ler ve ΔTER 'ler bakımında anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p>0,05$). E-sigara bileşenlerinin 0,0999 µM konsantrasyonundan daha yüksek dozlar sitotoksik bulunmuştur ($p<0,01$). E-sigara bileşenlerinin yüzeylerde birikim miktarları değerlendirildiğinde Fruit Medley aroma grubunun RFU değeri 450 nm'de en yüksek olduğu bulunmuştur. Sonuç olarak e-sigaralarda bulunan bileşenlerin solunum yolu yüzey sıvısı yüksekliğini azalttığı, ENaC, CFTR ve CaCC kanallarını etkilediği, sitotoksik etkilere sahip olduğu bulunmuştur.

Anahtar Kalimeler: CaCC, CFTR, ENaC, E-sigara, HBEC, Solunum yüzey sıvısı

ABSTRACT

THE EFFECTS OF NEW GENERATION E-CIGARETTE COMPONENTS ON ENaC, CFTR, CaCC CHANNELS, and AIRWAY SURFACE LIQUID HEIGHT

Ozge BEYAZCICEK

Doctoral Thesis, Department of Physiology

Advisor Prof. Dr. Recep OZMERDIVENLI

December 2019, 155 Pages

Electronic cigarettes (e-cigarettes), also known as electronic nicotine delivery systems, are devices designed to deliver aerosolized nicotine with a minimal vehicle, which is considered to be relatively safer than tobacco. E-cigarette components are known to cause changes in protein function, including abnormal airway ion transport changes. The aim of this study is to investigate the effects of new generation e-cigarette components on ENaC, CFTR and CaCC channels, airway surface liquid (ASL) height and ion transport in human bronchial epithelial cells. Nicotine salt, benzoic acid, sodium hydrogen tartar, propylene glycol/vegetable glycerin, free base nicotine and nicotine salt + benzoic acid were used as e-cigarette components in the study. Each component were formed as 100 μ M of six groups. PBS was used as control group. Primary human bronchial epithelial cells (HBEC) mimicking respiratory epithelial morphology *in vivo* were used to determine the effects of e-cigarette components on ion channels and airway surface liquid. HEK-293T cells, which are an immortal cell line, were used to determine the effects of cytotoxicity of the components of electronic cigarette. In addition, third hand exposures of e-cigarette flavors were also investigated. Statistical analyzes were performed by using GraphPad Prism v8.0 program. E-cigarette components applied in HBEC cultures it was determined that ASL height decreased by the time ($P < 0.0001$). In the study to determine the effects of e-cigarette components on ion exchange, there was no significant difference between groups in terms Δ Isc and Δ TER ($p > 0.05$). The doses of e-cigarette components higher concentration of 0.0999 μ M were found to be cytotoxic ($p < 0.01$). When the amount of accumulation on the surfaces of e-cigarette components were evaluated, the RFU value of Fruit Medley aroma group was found to be highest at 450 nm. As a result, it was found that the components in e-cigarettes decreased airway surface liquid height, affected ENaC, CFTR and CaCC channels and had cytotoxic effects.

Keywords: Airway surface liquid, CaCC, ENaC, CFTR, E-cigarette, HBEC

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Elektronik nikotin verme sistemi olarak da bilinen elektronik sigaralar veya e-sigaralar (e-sig), tütüne kıyasla nispeten daha güvenli olduğu düşünülen, minimal bir araçla aerosol haline getirilmiş nikotini vermek üzere tasarlanan cihazlardır. Elektronik sigaraların asıl amacı kullanıcıya sigara içiyor hissini tütün kullanmadan vermektir. E-sigara üreticileri elektronik sigaraları, sigarayı azaltmanın ya da tamamıyla bırakmanın bir yolu olarak pazarlanmaktadır. Bu firmalar pazarlama stratejisi olarak e-sigaraların normal sigaraya göre daha sağlıklı olduğu algısını kullanmaktadırlar. Bunun gerekçesi olarak da e-sig ürünlerinin tütün yakmadığından dolayı akciğerlerin normal tütün kullanımıyla aynı kimyasallara maruz kalmayacağı düşüncesinin kullanıcılarda oluşturulmasıdır. Bu nedenle akciğer kanseri ve kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH) gibi sıklıkla kronik tütün dumanının solunmasıyla ilişkili olan akciğer hastalıklarına da neden olmayacağı vurgulanarak çok daha fazla kar elde etmek amaçlanmaktadır.

E-sigara, sadece 10 yıla dayanan geçmişine rağmen Türkiye’de ve tüm dünyada tütün ürünleri arasında en hızlı büyüyen pazarı temsil etmektedir. E-sigaranın ısınarak aerosol üretmesi neticesinde nikotini kullanıcıya ileten bir sisteme sahip olması ve bu işlemi tütün yakmayarak yapması nedeniyle normal sigara içenler yerine e-sig kullananlar olarak tanımlanan nikotin kullanıcılarının sayısı hızla artmaktadır. ABD’de “vaping” yani “e-sigara kullanımı” özellikle erişkin olmayan gençler arasında oldukça yaygındır. Elektronik sigaraların şekilleri birbirinden farklılık gösterebilir; bunlar geleneksel tütün sigaralarına, purolara, pipolara ve hatta kalem veya USB hafıza çubuğu gibi günlük eşyalara benzer şekilde üretilmektedir. Yeniden doldurulabilen tanka sahip olan elektronik sigaralar ise diğer e-sigara markalarından farklı görünebilirler. Tasarımları ve görünüşleri ne olursa olsun, bu cihazlar genellikle benzer bir şekilde çalışır ve benzer bileşenlerden yapılırlar. 460’den fazla farklı e-sigara markası şu anda piyasalarda satılmaktadır. Bunlardan her birinin içerdiği nikotin miktarı ve bileşenleri değişmekle birlikte pek çok elektronik sigara kullanıcıya farklı yapay aroma seçenekleri de sunmaktadır. Ancak bu kadar yaygın kullanımına rağmen günümüzde e-sigaranın hastalık riskleri ve toksisitesi ile ilgili önemli tartışmalar bulunmaktadır. Buna rağmen

e-sig buharının solunmasının akciğer üzerindeki etkileri hala iyi bir şekilde çalışılmamış olup, günümüzde düşük seviyede karakterize edilen sağlık riskini temsil etmektedir. E-sig savunucuları ise, e-sigaralarda GRAS (Genel olarak güvenli tanınan maddeler) listesinde yer alan Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) onaylı bileşenler kullandığı için güvenilir olduğunu ifade etmektedirler. Ancak, GRAS bileşenlerinin büyük çoğunluğu sadece oral olarak test edilmiştir ve akciğer üzerindeki etkileri bilinmemektedir. Bununla birlikte, e-sigaralar şu anda FDA gibi sağlık kuruluşlarının himayesine girmediğinden, tipik toksikolojik değerlendirmeler yapılamamış ve buna bağlı olarak da inhale terapötik ajanlar gibi inhale ürünler için gerekli olan klinik deneyler gerçekleştirilemediğinden dolayı insanlarda ya da hayvanlarda hiçbir güvenlik bilgisi mevcut değildir.

Bu çalışmanın amacı, yeni nesil e-sigara bileşenlerinin insan bronşiyal epitelyal hücrelerinde bulunan ENaC, CFTR ve CaCC kanalları ve solunum yolu yüzey sıvı yüksekliği üzerine etkilerinin araştırılmasıdır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Elektronik Sigara

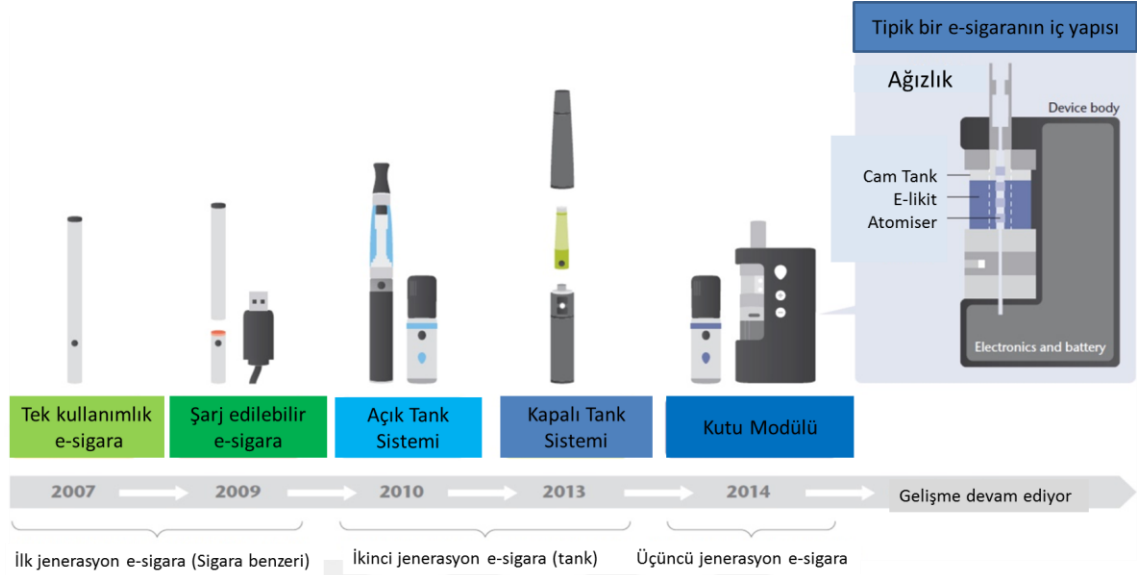
Elektronik sigaralar (e-sigaralar), elektronik nikotin iletim sistemi olarak adlandırılan ürün kategorisinin en yaygın kullanılan ürünlerinden biridir. E-sigaralar; nikotin, çeşitli tatlandırıcılar, propilen glikol ve bitkisel gliserin içeren bir solüsyonu ısıtarak kullanıcıya sigara içme hissi veren nispeten yeni ürünlerdir. Puro, pipo veya nargile sayılabilecek diğer nikotin iletim araçlarındandır¹.

2.1.1. Tarihçesi

İlk elektronik sigara (e-sig) patenti 1965 yılında Herbert A. Gilbert tarafından alınmıştır². Dumansız ve tütünsüz sigarayı icat eden ilk kişidir. Gilbert bir röportajında "Ben mantıklı bir adamım ve mantığım sorunu tanımlamamı ve daha sonra bir çözüm geliştirmemi söyledi..." "Yanan tütünü ve kağıdı; ısıtılmış, nemli ve aromalı bir hava ile değiştirmenin bir yolunu bulmalıydım". Gilbert'in bu açıklamasına baktığımızda, günümüzün büyüyen popüler e-sig reklamlarında görebileceğimiz ısıtma elemanları, dumansız aromalı hava ve aromalı kartuşlar gibi tanıdık tasarım konseptlerini bulabilmekteyiz. Gilbert'in heyecan verici fikri, Hon Lik'in devreye girdiği 2003 yılına kadar onlarca yıl görmezden gelindi.

Yeni elektronik sigara 2003 yılında Çinli bir eczacı olan Hon Lik tarafından icat edilip patenti alındıktan sonra³⁻⁵, ABD pazarına 2007 yılında giriş yapmıştır^{6,7}. Elektronik sigarada bulunan ve e-likit (e-sigara likiti) olarak adlandırılan e-likitler bir rezervuarda tutulur ve genel olarak farklı miktarlarda nikotin, propilen glikol (PG), vegetable (bitkisel) gliserin (VG), su ve değişik aromaları içeriğinde barındırır. Ticari olarak tüketiminin yaygınlaştığı 2007 yılında elektronik sigaralar tek kullanımlık "sigara benzeri" olarak da adlandırılan ilk jenerasyon sigaralardan, ikinci nesil açma ve kapama sistemleriyle birlikte kapalı veya yeniden doldurulabilir bir tank ya da kartuşta (kartomiser) e-likit içeren yeniden kullanılabilir e-sigaralara, buradan da üçüncü yeni nesil olarak ayrı bir batarya, rezervuar ve atomizör bileşenlerinden oluşan en son 'modüler' e-sigaralara dönüşmüştür. Bu en yeni nesil modüler e-sigaralar genellikle, puf sayısını, pil seviyesini, direncini (ohm), kontrol sıcaklığını, gücü (watt) ve voltajı ölçebilen kullanıcı ara yüzlerini içerir (Şekil 2. 1). %0-5 arasında değişen nikotin

konsantrasyonları, değişik aromalı veya aromasız ve farklı PG/VG oranlarıyla birbirinden farklı e-likitlerin oluşturulabilmesi ile birlikte, e-sigara kullanımının kullanıcı tercihlerine göre kişiselleştirilebileceği ortaya çıkmıştır.



Şekil 2. 1. Sigara tasarımının değişimi; yukarıda görülen şekiller her bir kategorideki cihazı temsil etmekte birlikte e-sigara türlerinin zaman içindeki evrimini göstermektedir.

Özellikle İngiltere’de pek çok sağlık kuruluşu tarafından e-sigara kullanımı desteklenmektedir^{8,9}. Bununla birlikte geleneksel sigaraların tüketiminin zararlarını azaltmada e-sigara kullanımının küresel olarak desteklenmesi söz konusu değildir. Örneğin; Yeni Zelanda’da Sağlık Bakanlığı e-sigara kullanımının güvenli olup olmadığını henüz belirlemediğini bildirmiştir. Yine aynı bakanlık tarafından sigarayı bırakmayı düşünenlere ek güvenlik bilgileri mevcut olana kadar sadece nikotin replasman tedavisi (NRT) gibi onaylanmış sigara bırakma ilaçlarını kullanmaları tavsiye edilmiştir. Türkiye, Brezilya ve Singapur gibi ülkelerde tüm e-sigara satışları tamamen yasaklanmışken, Kanada ve Japonya gibi ülkelerde ise sadece nikotin içeren e-sigara satışları yasaklanmıştır. E-sigara türleri daha geniş çapta değerlendirmek için sağlam bilimsel yöntemlere ihtiyaç vardır. İngiltere’de yapılan bir araştırma sigarayı bırakmaya çalışan ve bu nedenle e-sigara kullananların, reçetesiz nikotin replasman tedavisi ilaçları kullananlara göre daha fazla nikotin yoksunluğu hissettiklerini ortaya koymaktadır¹⁰. Son zamanlarda ABD’de¹¹ ve Fransa’da¹² yapılan araştırma sonuçları da bu araştırmayı destekler niteliktedir. Ancak bunun nedeni henüz aydınlatılamamıştır. Sigara içimi yerine kullanılacak herhangi etkili bir ürünün, gerçek sigara içimini iyi

taklit etmesini ve kullanıcıya gerçek sigaradakine yakın miktarda nikotin sağlamasını gerektirmektedir. Bu tür bir ürünün ihtiyacı yaklaşık 40 yıl öncesine dayanmakla birlikte, Prof. Dr. Michael Russell nikotin verimini koruyan yeni tütün ürünlerinin geliştirilmesi ve sigaradaki zararlı bileşenlerin miktarının azaltılması üzerine araştırmalar yapmıştır¹³. İngiltere'deki doktorlar tarafından sigarayı bırakmanın desteklenmesinde ve yeniden sigara içilmesinin önlenmesinde kullanıcılara e-sigara ile nikotin verilmesinin e-sigara olumlu özelliklerinden biri olduğu belirtilmiştir. Nitekim literatür araştırmaları da e-sigara sigarayı bırakmada önemli bir rol oynadığını ortaya koymuştur¹⁴. Bununla birlikte, e-sigara sigarayı bırakmada etkili olduğunu inceleyen kaliteli ve güvenilir çalışmalarının azlığı bu sonuca olan güveni azaltmış, diğer meta-analizler de sigarayı bırakmada e-sigara etkinliğini sorgulamıştır¹⁵. Birbirinden farklı görüşlere rağmen, içerdiği nikotin açısından ve sigara içme davranışına benzemesi nedeniyle e-sigara, sigarayı bırakmak isteyenler tarafından nikotin replasman ilaçlarına göre günümüzde daha fazla tercih edilebilir ürünler haline gelmişlerdir.

Genel olarak, nikotin replasman tedavisinde kullanılan ürünlerden bukkal veya deri yolları ile alınan nikotin emilimi nispeten yavaştır ve bu durum gerçek sigaralarınkine tam olarak benzememektedir^{16,17}. Mevcut nikotin replasman ürünleri sigarayı azaltma ve bırakma çabalarında bir miktar yardım sağlayabilirken, bu çabalarda daha etkili nikotin verilmesi için yeni ürünler geliştirilmesi önerilmiştir^{18,19}. Son zamanlarda yapılan araştırmalar¹⁰ e-sigara nikotin replasman ürünlerine göre sigara içiminin yerini almasının daha fazla kabul edilir olduğunu göstermiştir. Açıkça, yenilikçi ve kabul edilebilir nikotin formları, tütün hasarının azaltılmasında çok önemli bir rol oynayabilir. İngiltere doktorlar birliği tütün zararını ideal biçimde azaltacak olan cihazı; sigarayı bırakmak isteyenlere en az gerçek bir sigaranınki kadar nikotin verebilmeli ve gerçek sigara içimine olabildiğince benzer şekilde tat bırakabilmeli şeklinde tanımlamışlardır.

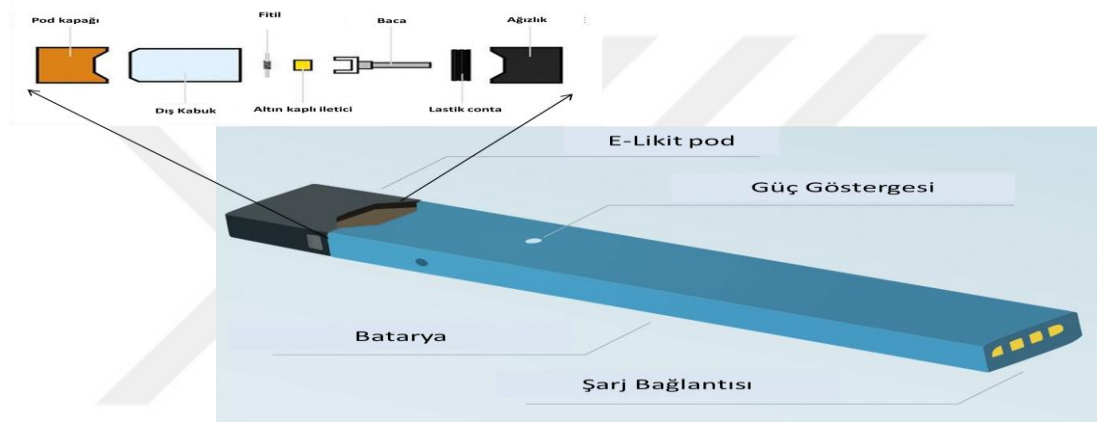
2.1.2. Genel e-sigara tanımları

Tütün sigarası; tütün yaprağının solunması için yakılması gereken tütün ürünlerini içerir. Bu gruba geleneksel sigaralar, purolar, ince ve kısa purolar, nargile ve pipo dahil edilebilir. Elektronik sigara aerosolü; sık sık "buhar" olarak adlandırılrsa da genel anlamda bir e-sigara dumanının gaz süspansiyonu halinde yayılımını ifade etmektedir.

İkinci el aerosol maruziyeti; Sigara kullanmayanların ancak sigara içilen ortamda bulunmalarından kaynaklı olarak bu aerosole maruz kalmalarına verilen isimdir. Üçüncü el aerosol maruziyeti; E-sigara veya sigara içilen ortamda yüzeylerde bulunan nikotin ve diğer toksik maddelere maruziyete verilen isimdir²⁰. Bilimsel literatürde e-sigaralar, tütün bitkisinden elde edilen nikotini içerdiklerinden dolayı genellikle “elektronik nikotin dağıtım sistemleri” olarak adlandırılırlar.

2.1.3. E-sigaranın bölümleri

Bir e-sigara; batarya, ısıtıcı element (atomizer), buharın tutulduğu hazne ve solüsyonun bulunduğu kartuş olmak üzere dört kısımdan oluşur (Şekil 2.2).



Şekil 2. 2. Yeni nesil bir e-sigaranın genel yapısı

Batarya, elektrik akımı aracılığıyla ısıtıcı elementin e-likit solüsyonunu aerosol haline getirecek kadar yüksek sıcaklıklara ulaşmasını sağlayan güç kaynağıdır. E-sigaralarda bulunan bataryalar genellikle silindirik şekilli, lityum iyon ve yeniden şarj edilebilir bataryalardır. Bataryanın boyutu ve şekli, e-sigaranın genel boyutuna ve kullanım kolaylığına göre değişim gösterir. Nitekim daha küçük cihazlar daha kolay taşınabilirlik sağlarken büyük cihazlara oranla daha sık şarj edilmeye ihtiyaç duyar. Lityum iyon bataryalar, geleneksel pillere (1,5 volt) göre, arzu edilen miktarlarda aerosol üretmek için gerekli olan voltajdan daha yüksek voltaj (> 3 volt) sağlar. Bataryaların yanlış kullanımına bağlı olarak aşırı ısınması sonucu ya da yanlışlıkla sigarayı alevle yakmaya çalışma sonucunda patlamaların gerçekleştiği pek çok durumda rapor edilmiştir.

Isıtma elemanı aynı zamanda atomizer olarak da adlandırılmaktadır. Pek çok e-sigara kullanıcısının üretilen aerosol miktarını ve solunarak alınan nikotin miktarını seçmesini sağlayan bir voltmetre içerir.

Kartuş kısmı ise nikotin ve değişik tatlandırıcılar içeren e-likit solüsyonunu aerosol işlemleri gerçekleştirinceye kadar haznesinde barındırır. Bu e-likitin içeriğinde genel olarak propilen glikol, vegetable (bitkisel) gliserin, yapay tatlandırıcılar ve farklı dozlarda nikotin bulunur. Bu içerik kullanıcılar tarafından yeniden kullanılabilir, değiştirilebilir veya önceden doldurulabilir kartuşlara sahip e-sigara markalarında değiştirilebilir. E-sigara solüsyonlarının içeriğindeki seçeneklerin sayısı gün geçtikçe artarken ürünün etiketinde yazan içerik ile içerisinde barındırdığı gerçek içerik ve konsantrasyonları önemli derecede değişkenlik göstermektedir⁴. Örneğin e-sigara likidinde bulunan propilen glikolün (PG) vegetable gliserine (VG) oranı markadan markaya değişiklik gösterip 0:100-100:0 oranında veya bu iki değer arasında olabilir²¹. Nitekim bazı e-sigara markalarında bu iki ana bileşenin birbirine oranı 60:30 iken, bazılarında 55:45, diğerlerinde ise 50:50 oranında olabilmektedir.

2.1.4. E-likit komponentleri ve karakteristik özellikleri

E-likitin içindeki nikotin konsantrasyonuna ek olarak, e-sigaranın ya da e-likitin nikotin maruziyetini etkileyebilecek diğer başka komponentleri ve karakteristik özellikleri de bulunmaktadır. Bu özellikler genel olarak e-sigara kullanım davranışını değiştirerek, nikotini daha lezzetli hale getirerek veya nikotinin kullanıcıya iletimini artırarak nikotin maruziyetini etkilemektedirler. Örneğin, 27 e-sigara ürünü kullanılan ve her bir e-sigara makinesinden 15 puf üretilerek e-sigara buharı üzerine yapılan bir çalışmada; aerosoldeki nikotin kütle fraksiyonu ile e-likitteki nikotin konsantrasyonu arasındaki korelasyonun orta derecede (% 28) olduğu saptanmıştır. Bunun yanı sıra, e-likit (örneğin PG/VG oranı, lezzet) ile e-sigaranın diğer özelliklerinin (tip, marka, elektrik gücü) aerosoldeki nikotin veriminin varyantına önemli ölçüde katkıda bulunduğu ortaya konmuştur²². Ayrıca nikotin emilimini etkileyen (örneğin pH, aerosol partikül boyutu) aerosol özelliklerinin, e-sigara içme davranışının nikotin iletimini nasıl etkilediğinin (örn. deneyimli ve deneyimsiz kullanıcılar arasındaki kullanım modellerinin) ve e-sigara üzerinde yapılan farmakokinetik ve farmakodinamik çalışmaların (absorbsiyon alanı olarak ör., bukkal ve pulmoner) dikkate alınması, e-sigara markalarının nikotin iletim profilini daha iyi anlamak açısından önemlidir. E-likitteki nikotin seviyesi de nikotin iletiminin belirlenmesinde önemli bir faktördür²³. Çeşitli faktörlerin ve bunların e-sigara kullanım davranışlarını ve nikotin verimini nasıl etkileyebileceği Tablo 2.1'de verilmektedir.

Tablo 2. 1. E-sigarlardan nikotin alınımı etkileyen potansiyel mekanizmalar

Konu	Faktör	Başlamayı Kolaylaştırıcı veya Kullanımı devam ettirici etkisi			Nikotin Salmını Ertirici Etkisi			Merkezi Nikotine Etkisi		Diğer
		Tercih edilebilirlik	Algılanan Zarar	Nikotin Bağımlılığı	Aerosol Hacmi/ Aerosoldeki Nikotin	Solunu/ Topografya	Nikotin Emilimi / Biyoyararlanım	Nikotin Metabolizması	nAChR üzerine etkisi?	
E-Likit	Tat (genel)	X	X		~					X
	Mentol	X	X	X		X	X	X	X	
	Tatlandırıcı	X								X
	pH						X			
	PG/VG baz	X			X		X			X
	Alkol			~			X		X	
	Nikotin						X	X		
	Nikotin Konsantrasyonu	X		X	X		X	X		
Donanım	E-sig jenerasyonu/modeli/tipi	X			X					X
	Aktivasyon Mekanizması				X	X				
	Hava akımı/Butonlu									
	Güç/Isı	X			X					X
Kullanım Davranışı	Puf Topografyası ve Kullanıcı Deneyimi Düzeyi				X	X	X			X

X= Destekleyen mekanizma; ~ = ön veri/varsayımsal mekanizma.

2.1.4.1. Aromalar

Günümüz piyasasında e-sigarlalar ile tütün sigaralarını birbirinden ayıran, pek çok farklı türde tatlandırıcı ajan içeren, yeniden doldurulabilir tanka sahip e-sigarlalar için kendine özgü aromalara sahip e-likitler bulunmaktadır. 2009 yılında ABD’de Ailede Sigara İçmeyi Önleme ve Tütün Kontrolü Kanunu ile farklı aromalarla lezzetlendirilmiş tütünün çocuklar ve gençler arasında sigara içmeyi teşvik ettiği endişesi nedeniyle, sigarlarda yapay veya doğal aromaların (tütün veya mentol dışında) kullanılmasını yasaklamıştır²⁴. Nitekim bazı e-sigara aromaları tütünü (sadece tütün ya da tütün-mentol tadında) taklit ederken, bazıları puroyu, diğerleri ise farklı türde yiyecekleri (meyve, tatlı, şeker aromalı) veya içecekleri (alkol içeren veya kahve aromalı) taklit etmektedirler. Bunun yanında bazı aromalar ise kendilerine özel isimler (tek boynuzlu kanı, gerçeklik serumu, yılan yağı... vs.) almaktadırlar. Yapılan bir araştırmada Ocak 2014 itibariyle ABD’de 466 e-likit markasının (her biri kendi internet sitesine sahip) ve 7764 birbirinden farklı aroma olduğunu bildirmiştir. Araştırmadan sonraki 17 ayda ise yaklaşık 11 yeni e-sigara markası ve 242 yeni aroma piyasaya sürülmüştür²⁵. Yeni e-sigara markaları sürekli olarak pazara sunulmaktadır ve 2017 itibariyle piyasalarda olan e-likit markalarının kesin sayısı bilinmemektedir. 2017’den itibaren, Çin’deki yüzlerce üretim tesisi e-sigarlalar için elektronik bir üs imkanı sağlıyor ve dünya çapında, özellikle cihazların paketlenmiş markalara dönüştürüldüğü Avrupa ve Kuzey Amerika’ya ihraç ediyor.

Aromaların sayısının çokluğu ve ürün etiketlerinde içerdiği bileşenleri açıklamaması araştırmalar açısından sorun teşkil etmektedir. Bu nedenle bu aromaların içerdiği özel katkı maddelerinin nikotin alımı üzerine olan etkileriyle ilgili araştırmalar ve dolayısıyla literatür sınırlı kalmaktadır. Yapılan araştırmalarda, farklı aromaların nikotinin zararlı etkilerini maskeleyerek kullanıcıları e-sigaraya başlamaya ya da kullanımını arttırarak devam etmeye teşvik etmekte olduğu ve bu aromaların nikotin iletiminin artması için aerosol içerisinde değişikliklere de sebep olduğu gösterilmiştir²⁶. Ayrıca içerisinde, geri dönüşü olmayan akciğer hastalığına neden olan ancak tüketim açısından güvenli gıdalar arasında yer alan kimyasallar bulunmaktadır. Örneğin tereyağlı veya kremli bir tat sağlamak için kullanılan ve yaygın bir güvenli gıda tatlandırıcı maddesi olan diasetilin (2,3-butanedion) aerosolize olmuş halinin işçiler tarafından solunmasının geri dönüşümsüz bir obstrüktif akciğer hastalığı olan akut başlangıçlı bronşiolit obliteransa neden olduğu gösterilmiştir²⁷⁻²⁹. Gıda içeriklerinin güvenliğini değerlendiren ABD'nin Aroma ve Özüt Üreticileri Birliği (FEMA) olası uçuculuk ve solunumu tahriş edici özellikleri nedeniyle 1037 aroma verici maddeyi listeleterek solunum için potansiyel tehlike olarak tanımlamıştır³⁰. Bu listedeki yaygın e-sigara aroma maddeleri bunlarla sınırlı olmamakla birlikte; diasetil, asetoin, 2,3-pentandion (tereyağı aromaları), kafur, sikloheksanon (mentol aromaları), benzaldehit (kiraz veya badem aromaları), sinamaldehit (tarçın aroması), kresol (deri veya ilaç aroması), bütiraldehit (çikolata aroması) ve izoamil asetat (muz aroması) maddelerini de içermektedir.

Aromaların lezzetli oluşu ve mevcut aromaların çeşitliliği özellikle gençler ve sigara tiryakileri arasında e-sigara kullanımına başlama ya da devam etme hususunda motive edici faktörler olarak gösterilmiştir. Aromalar olarak da mentol, şeker ya da meyve aromalı olanların tütün aromalı olanlara kıyasla daha fazla tercih edildiği belirlenmiştir. Bu noktada kullanıcıların, meyve, şeker ya da mentol aromalı e-sigara ürünlerinin tütün aromalı e-sigara ürününe kıyasla daha az zararlı olduğuna inandıkları ortaya konmuştur³¹.

Genel olarak aroma içeren ürünler e-sigara kullanımını kolaylaştırdığı için ve buna bağlı olarak da e-sigara ile ilişkili olduğu bilinen risklere maruziyeti arttırdığı için zararlıdır. Nitekim e-sigara cihazından üretilen aromasız e-sigara buharına maruz bırakılan insan bronşiyal epitelyal hücreleri üzerinde yapılan *in vitro* bir çalışmada; metabolik aktivite, hücre canlılığı ve sitokin salınımı gibi toksisite indikatörleri karşılaştırılmıştır. Nikotin seviyesi, baz (sadece PG) ve cihaz buhar iletim ayarları açısından aynı olan farklı e-

likitlerin etkileri birbirinden farklı olduğu bulunmuştur. Fakat, bunların yanı sıra e-likitlere aromalar da eklendiği zaman durum daha farklı olmaktadır. Örneğin, özel bir çilek aromasına sahip e-likitin toksisite indikatörler seviyelerinin diğer e-likitlerin toksisite indikatör seviyelerinden daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu durum da aromalardaki bazı katkı maddelerinin inhalasyon yoluyla alınan buharın toksisitesine katkıda bulunduğunu ortaya koymaktadır³². Pek çok e-likitte bulunan aromaların kimyasalları analiz edilmiş olup, bu e-likitlerin birçoğunda solunum yolundaki mukozal dokuda irritasyona neden olan aldehidler tespit edilmiştir. Ayrıca bu aroma kimyasallarının solunması halinde solunum yolunda potansiyel olarak toksik etkiye neden olacak kadar yüksek seviyede (10-40 mg/ml) oldukları tespit edilmiştir³³.

Ticari olarak piyasada bulunan aromalı e-likitlerin sayılarının çok olması, bu aromaların aerosollerindeki konsantrasyonu ve özellikleri üzerine etkilerinin olup olmadığının anlaşılmasını zorlaştırmaktadır. Ancak bu noktada e-likitlerde bulunan farklı aromaların yerine bu aromaların içerdiği ortak kimyasallara (vanilya, etil vanilin, mentol, meyve aromalı e-likitlerdeki meyve esterleri) odaklanmak aerosol üzerine olan etkilerin anlaşılabilmesinde yardımcı olabilir³³⁻³⁶. E-likitlerde en sık kullanılan aromalardan biri de mentoldür.

2.1.4.2. Mentol

Mentol, tütün sigaralarında olduğu gibi e-sigarlarda da genel ve yaygın kullanılan bir bileşenidir. Nitekim yapılan incelemelerde 36 ticari e-likit içinde bulunan mentol seviyesinin (3,700-12,000 ug/g) tütün sigarasındaki mentol seviyesine benzer olduğu bulunmuş olup, tütün sigaralarında olduğu gibi, tütün aromalı ya da mentol aromalı olmayan³⁷ ve etiketinde herhangi bir mentol içeriği yazmayan e-likitlerde bile düşük miktarlarda mentole rastlanmıştır³⁸. Tierney ve arkadaşları tarafından 30 popüler e-sigaradaki aroma bileşenlerinin konsantrasyonlarını tanımlamak amacıyla yapılan çalışmada ise mentol konsantrasyonlarının 5,7 ila 21,6 mg/ml (ağırlıkça% 0,57 ila 2,16) arasında olduğu bildirilmiştir³³. Burada bildirilen konsantrasyonlar, geleneksel mentollü tütün sigaralarının mentol içeriği ile karşılaştırılabilir olsa da (genel olarak sigara başına 3 ila 20 mg), e-likit formülasyonlarını belirleyen bir düzenlemenin olmayışı, üreticilerin istediği kadar aroma verici kimyasalları ekleyebilmesini sağlamaktadır. Nitekim ürünler arasındaki bileşimlerde ve hatta aynı ürünün farklı parti üretimlerinde ortaya çıkan farklılık, bir bireyin bu bileşenlere ne kadar maruz kaldığının belirlenmesini imkânsız

hale getirmektedir. Günümüzde mentol veya diğer mentol bazlı tatlandırıcıların, e-sigara kullanımı bağlamında zararlı bir solunum etkisine sahip olup olmadığı henüz açık değildir²⁴.

Mentol, sigaraların lezzeti ile çekiciliğini arttırmak ve kullanıcıların sigaraya başlamasının veya kullanımının devamının kolaylaştırılmasını sağlamak amacıyla kullanılmaktadır. Mentolün inhalasyonel maruziyetinin doğrudan etkisi ilgili olarak sınırlı sayıda veri bulunmaktadır. Mentolün antitusif (öksürük kesici) özelliklere sahip olduğu bildirilmiş olup³⁹ solunumla ilgili hastalıkların erken semptomlarını maskeleyebileceği rapor edilmiştir⁴⁰. Ayrıca mentolün nikotinin etkisini arttırdığı bilinmektedir. Mentolün serinletici ve yatıştırıcı özelliklerinin (sigaranın neden olduğu irritasyonu ve sigaranın sertliğinin algılanmasını azaltıcı yönde etki eden özellikler) sigaranın zararlı etkilerini maskeleydiği ve bu nedenle sigarayı bırakmayı engelleyebildiğini ortaya konmuştur⁴¹.

Mentol çok düşük dozlarda bile sigaradaki sertliği azaltıp lezzeti artırıcı yönde etki yapabilmektedir. Dolayısıyla mentolün sigaranın sertliğini azaltıcı yönde etkisi ile boğazdaki vuruş etkisi azaltılarak sigaraya başlama veya sigaranın kullanımının devamı sağlanmaktadır. Çok yüksek dozda mentol ise sigarada sertliği yani boğazdaki vuruş etkisini yükselterek düşük nikotin içeren sigaraların bile etkisini arttırabilmektedir⁴². Ayrıca e-likitte veya sigarada bulunan mentolün bağımlılığı artırıcı ya da sigarayı bırakmayı azaltıcı yönde negatif klinik etkileri de bulunmaktadır.

E-sigara ürünlerinin artan popülaritesi, genişleyen pazar ve pek çok çalışmada bildirilen mentol bazlı aromaların neden olduğu alerjik ve solunumsal etki vakaları ile birlikte yasal düzenlemenin eksikliği, bu ürünleri kullanırken veya tavsiye ederken dikkatli olunmasını gerektirir²⁴.

Mentolün tütün ürünlerinde kullanımı ve bu kullanımın sonucu ortaya çıkan etkileri ile ilgili pek çok mekanizm ortaya atılmıştır^{43,44}. Mentolün bu etkileri;

- a) Nikotin ve iritanların olumsuz duyuşsal etkilerini maskelemesi,
- b) Birincil veya şartlı pekiştirici olarak rol alması,
- c) Solunum üzerine olan etkileri,
- d) Nikotin metabolizmasını yavaşlatıcı etkisi, buna bağılı olarak da biyoyararlanımın artmasına neden olması,

- e) Nikotinik asetilkolin reseptör (nAChRs) fonksiyonlarının merkezi düzenlenmesi,
- f) İlaçların (örn; nikotin) transdermal ve transbukkallık emiliminin artırılması.

Mentolün kendi duyuşsal etkileri vardır ve nikotin ile iritanların (tütün sigara dumanı veya e-sigara aerosolleri gibi) duyuşsal etkilerini de etkilemektedir^{43,44}.

Solunum yolu, solunum ile alınan patojenlere, reaktif kimyasallara ve yabancı partiküllerden kaynaklanan hasara karşı oldukça hassastır. Hapşırma ve öksürme gibi pulmoner refleks cevapları, solunum yollarını her gün soluduğumuz potansiyel zararlı maddelerden korumaktadır. Periferik kemosensör ve mekanosensör sinir uçları, solunumun geri besleme kontrolünü sağlamak ve pulmoner refleksleri düzenlemek için solunum mukozası boyunca yoğun olarak dizilir. Pulmoner miyelinsiz afferent lifler (C-lifleri) akciğerlere giren kimyasalları algılar ve solunum yolunu tahriş eden herhangi bir uyarı tarafından uyarıldığında hapşırma, öksürme, bol mukus salgılanması ve ağrı gibi koruyucu yanıtı neden olur. Pulmoner C-lif aktivasyonunu düzenleyen mekanizmalarla ilgili yapılan çalışmalar, solunum yolunu tahriş eden çok çeşitli durumlara, fiziksel uyarılara ve endojen ligandlara cevap veren hücreşel sensörler olarak görev yapan geçici reseptör potansiyel (TRP) kanallarının tanımlanmasına yol açmıştır. Genel olarak TRP kanalları, hücre içi kalsiyum konsantrasyonlarını değıştirerek kas kasılması, hücre çoğalması, hücre ölümü, gen transkripsiyonu ve nörotransmitter salınımı dahil olmak üzere çeşitli hücreşel işlemlerde kritik rol oynayan katyon seçici kanallardır^{45,46}.

Mentol aynı zamanda TRP (geçici reseptör potansiyel) kanalları üzerine de etkilidir ve bu etkisini selektif olmayan TRPM8 (geçici reseptör potansiyeli melastatin 8) agonisti olarak gösterir. Nitekim bu agonist özelliğı mentolün serinletici, analjezik ve irritasyon karşıtı özellik göstermesine neden olur⁴⁷. Kişisel e-sigara ve e-likit kullanım paradigmasında, e-sigaradan alınan yüksek doz mentolün (%3.5) düşük nikotin varlığında irritasyon oluşumunu ve vuruş sertliğini indüklerken, ortamda yüksek nikotin (24mg/ml) varlığının ise bu irritasyonu ve vuruş sertliğini azalttığı belirlenmiştir. Ayrıca mentolün serinletici etkisinin ortamdaki nikotin miktarı ile arttığı bildirilmiştir⁴⁸. Sonuç olarak mentolün çok düşük konsantrasyonlarının bile e-sigaraşların çekiciliğini arttırdığı, ticari olarak temin edilebilen yüksek doz mentolün de yüksek doz nikotinin lezzetini arttırdığı rapor edilmiştir.

Mentol primer ya da sekonder olarak e-sigaranın içinde bulunan kimyasalların etkilerini arttırıcı yönde işlev görebilir^{43,44}. Nitekim e-sigaranın en önemli içeriklerinden olan nikotinin etkisi mentolün aroması ve serinletici hissi ile arttırılabilir⁴⁹. Mentolün nikotin ile birlikte farelere kronik uygulanması $\alpha4\alpha6\beta2^*$ nAChR'leri upregüle ettiği gibi orta beyindeki dopaminerjik nöronlarının ateşlenme sıklığını da sadece nikotin uygulanmasına göre daha fazla arttırdığı bildirilmiştir⁵⁰. Sıçanlarda ise nikotinin TRPM8 kanalını aktifleyen ve serinlik hissi veren mentol veya benzeri başka bir ajanla birlikte uygulanması, bu deney hayvanlarının kendi uygulama sıklığını artırır⁵¹. Bu durum da mentolün e-sigaraaların ya da tütün ürünlerinin etkilerini pekiştirici yönde etki gösterdiğini ortaya koymaktadır.

Mentol solunum üzerindeki etkisinden dolayı nikotin iletimini de arttırabilir^{43,52,53}. Garten, bu etki ile ilgili olarak, soğuk havanın soğuk reseptörlere etki etmesi sonucu solunumu inhibe etmesi gibi mentolün de üst solunum yolundaki soğuk reseptörlerini etkileyerek solunumu inhibe ettiği yönünde bir mekanizma ortaya atmıştır. Solunumun inhibisyonu nefes tutma süresinin uzatarak e-sigarada bulunan ve solunumla akciğerlere alınan nikotin ve diğer bileşenlerin tutulduğu süreyi de uzatmakta ve bu sayede aerosol içeriğindeki bileşenler akciğere kolaylıkla transfer olabilmektedir. Bu uzun süre boyunca akciğerlerde biriken aerosol sonucu basınç da artmakta ve dolayısıyla kana geçen e-likit bileşenlerinin miktarında artma gözlenmektedir²⁶.

Mentolün nikotin metabolizmasını inhibe ettiği yapılan hem *in vitro* çalışmalar⁵⁴ hem de insan laboratuvar çalışmaları ile ortaya konmuştur. Nitekim bu çalışmaların sonucunda sadece bir hafta mentollü sigara kullananların, aynı süre mentolsüz sigara kullananlara göre nikotin metabolizması daha düşük bulunmuştur⁵⁵. Genç erişkinlerde mentollü tütün sigarası kullananların nikotin metabolizma hızı mentollü sigara içmeyenlere göre daha düşüktür⁵⁶. Yavaş nikotin metabolizması nikotinin solunum sisteminde uzun süre kalmasına neden olarak maruziyeti artırır.

Mentol aynı zamanda ventral tegmental alandaki nikotinik asetilkolin reseptörlerinin (nAChR) altbirimlerini de ($\alpha7$, $\alpha4\beta2^*$, $\alpha4\beta6^*$) doğrudan etkilediği için nikotinin akut etkileri üzerinde de rol oynamaktadır⁴⁴. Ayrıca mentol, nikotin absorpsiyonu gibi ilaç absorpsiyonunu da pek çok farklı yolla arttırabilir. Nitekim yapılan çalışmalarla bir terpen olan mentolün hem transdermal olarak hem de tükürük akışını kolaylaştırarak transbukkal yollarla ilaçların geçirgenliğini arttırdığı belirlenmiştir⁴³.

2.1.4.3. Nikotin

Nikotin; dermal, oral veya inhalasyon maruziyeti ile vücut tarafından kolayca emilebilen ve kan beyin bariyeri ile plasenta dahil birçok biyolojik membrandan kolayca geçebilen, bitkisel olarak türetilmiş parasempatomimetik (parasempatik sinir sistemini uyarıcı olan ve aynı zamanda *Solanaceae* familyasındaki tütün gibi bitkilerde bulunan bir alkaloiddir⁵⁷. Tütün dumanının farmakolojik olarak aktif bir bileşeni olan nikotin⁵⁸, genel olarak kardiyovasküler hastalıkların, akciğer hastalıklarının ve akciğer kanserlerinin gelişiminde rol oynayan ana etken olarak kabul edilir. Nikotinin tütün alışkanlığının gelişmesi ve sürdürülmesinde en az bu alışkanlığın bırakılması kadar önemli bir faktör olduğu da bilinen bir gerçektir. Nitekim tütün alışkanlığının bırakılmasında kullanılan nikotin ürünleri; nikotin bantları, nikotin sakızları, deri altına uygulanan ve nikotin barındıran aparatlar ve nazal spreyler olarak sıralanabilir⁵⁸(Şekil 2.3). Bunlara ek olarak tütün alışkanlığını bırakmada alternatif olarak piyasaya sürülen elektronik sigaralar da bulunmaktadır.



Şekil 2. 3. Vücutta nikotin salınımının popüler yolları⁵⁹

Bu e-sigaraların yeniden doldurulabilir e-likitlerinde nikotin konsantrasyonları 0-36mg/ml aralığında değişiklik göstermektedir (Tablo 2.2).

Tablo 2. 2. Nikotin kaynaklarından salınan nikotin miktarları⁵⁹

Nikotin Kaynağı	Miktar (mg)
1 bütün sigara	10-30
1 izmarit	5-7
1 yapraklı sigara	15-40
1 gram çiğneme tütünü	6-8
1 parça nikotin sakızı	2-4
1 nikotin bandı	8-100
1 IQOS heets sigara	15-18
1 ml serbest baz nikotinli e-likit	1-24
1 ml nikotin tuzlu e-likit	1-100

Nitekim bazı kullanıcılar yoğun nikotine sahip solüsyonları tercih etmekle birlikte e-likitlerini de yüksek konsantrasyon içeren nikotine göre ayarlamaktadırlar. E-sigara kullanımında nikotin absorpsiyonu üzerine yapılan çalışmalar büyük ölçüde birbirinden farklılık göstermektedir. Bu nedenle e-sigara buharının, tütün sigarasına göre daha fazla nikotin maruziyetine neden olup olmadığı hala aydınlatılamamıştır²⁴. Nikotinin sistem genelinde fizyolojik etkilerine nörotransmitterlerin salınımını ve metabolizmasını etkileme kabiliyeti aracılık etmekle birlikte artan kan basıncı, artan nabız hızı, plazmada artan serbest yağ asitleri, kan şekeri mobilizasyonu ve kanda artan katekolamin konsantrasyonları da eklenir²⁴.

Nikotin, bir reseptöre bağlanan ve çoğu nikotinic asetilkolin reseptöründe biyolojik bir yanıt üretmek üzere o reseptörü aktive eden bir agonist kimyasal olarak görev yapar⁵⁹. Nörepinefrin ve dopamin salınımının uyarılmasının yanı sıra nikotin, nikotinic asetilkolin reseptörlerini (nAChRs) doğrudan aktive eder²⁴. Nikotinin alfa7-nAChR'nin ekspresyonuna bağlı olan insan bronşiyal epitelyal hücrelerinde solunum yolu yüzey sıvı viskozitesini⁶⁰ ve mukus üretimini arttırdığı rapor edilmiştir⁶¹. Akciğerdeki nikotin kaynaklı antiinflamatuvar yanıt, immün hücrelerin enfeksiyon bölgelerine göçünün azalmasından dolayı solunum yolunun viral enfeksiyonlara karşı artan duyarlılığıyla ilişkilendirilmiştir. Böylece nikotin akciğerdeki inflamasyonu azaltabilse de mukus üretimini artırır ve viral enfeksiyonlar bağlamında yararlı inflamatuvar yanıtı azaltır²⁴.

2.1.4.3.A. Serbest baz nikotin

Genel olarak e-likitlerde kullanılan nikotin “freebase-serbest baz” olarak da adlandırılan nikotindir. Bu nikotin hiçbir şeye bağlanmamış halde bulunmaktadır. 1960’ların başında Philip Morris, sigara dumanındaki nikotini “serbest baz” haline getirmek için amonyak

kullanmaya ve müşterileri sigaraya sürekli bağımlı yapabilmek ve "memnun edebilmek" için gerekli nikotin vuruşuna sahip olan düşük verimli (katranlı veya nikotinli) sigaralar üretmeye başlamıştır⁵⁹. Aslında nikotinin serbest baz haline gelmesi karmaşık bir işlem değildir. Amonyak gibi bir baz, tütün içinde bulunan ve pozitif yüklü olan bir nikotin karboksilik asit tuzundan (örneğin bir malat veya bir tartarat) bir protonu kabul eder. Böylece bir proton alan amonyak (NH₃) bir katyona (NH₄⁺) dönüşür ve böylece pozitif yüklü nikotin asit tuzu nötr hale gelmek için bir protonundan ayrılmış olur. Bu nötr, protonundan ayrılmış nikotin artık bir tuz şeklinde başka bir moleküle (veya anyonlara) bağlı olmaması nedeniyle "serbest baz-freebase" formundadır⁵⁹. Serbest nikotin oldukça uçucudur. Oregon Sağlık ve Bilim Üniversitesi'nden James F. Pankow, serbest baz formundaki nikotinin partikül oranının artırılmasının, gaz fazına geçen nikotin miktarının artmasına yol açacağını vurgulamıştır. Gaz fazına geçmiş nikotin solunum yolunda hızlı ve kolay bir şekilde birikebilir ve serbest baz formundan dolayı, kan-beyin bariyerini daha kolay geçerek nikotini sigara içen için daha "erişilebilir" kılar ve bu nedenle daha güçlü hale getirir⁵⁹. Tütün endüstrisinde çalışan bilim insanları, serbest baz formunun yaygın olarak kullanılmasından çok önce nikotin veriminin pH değişimlerine (asit veya baz ekleyerek) karşı hassas olduğunu biliyorlardı. Nikotinin biyolojik zarlardan emilimi pH'a bağlıdır. Nikotin özellikle herhangi bir yüke sahip olmadığında yüksek pH'taki mukoz membran zarından daha rahat geçiş sağlar. Fizyolojik pH değerlerinde nikotin %69 oranında protonlanır. Nikotinin polaritesi düşüktür ve düşük polariteye sahip ortamlarda kolayca çözünür, bu nedenle cilt yoluyla iyi emilir ve kan-beyin bariyeri yoluyla da beyin dokusuna kolayca nüfuz olur⁵⁹.

2.1.4.3.B. Nikotin tuzu

Doğal nikotin tuzları, serbest baz nikotini ve diğer organik bileşenleri de içeren ve tütün yapraklarında bulunan bir nikotin formudur. Nikotin tuzları, nikotin ve organik asitten (laktik asit ve propiyonik asit gibi iyonize edilebilir -COOH grubunu içeren organik radikalleri içeren moleküllerden oluşur) oluşmasının yanı sıra bu tuzlar etkili bir şekilde kana transfer olması ve nikotinin plazma seviyelerinde hızla artış göstermesinden dolayı kullanıcıya tatmin sağlamaktadır⁵⁹. 2015 yılında PAX Laboratuvarı, bir e-sigara cihazı markası olan JUUL'da kullanılmak üzere kendilerinin ürettiği nikotin tuz formülasyonunun patentini almışlardır (Şekil 2.4). Kompakt düşük sıcaklığa sahip olan bu cihazlarda da, geleneksel bir tütün sigarasının gücüne erişebilmek için her bir e-likit

kapsülünde 59 mg/ml nikotin (nikotin tuzu formunda) bulunan e-likitler kullanır. E-likit endüstrisinde standart nikotin içeriği genel olarak 0-24 mg/ml arasında değişiklik göstermektedir.

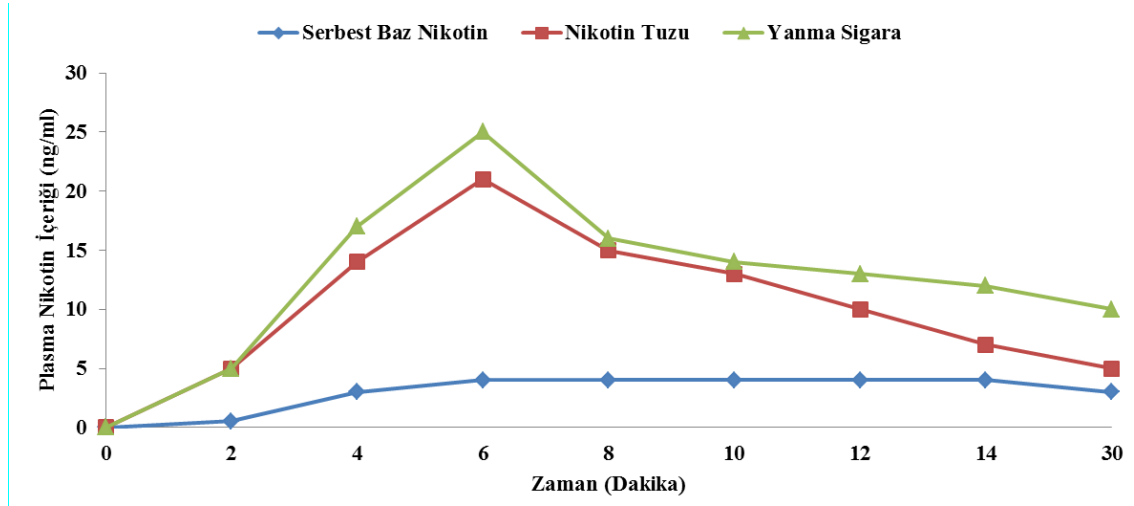
JUUL kapsüllerinde uygun formdaki içeriklerle birlikte kullanılan nikotin tuzu, bu ürünün popüleritesinin hızla artış göstermesinin anahtarı oldu. Bu cihazdaki e-likitin temel özelliği azotlu bir baz olan nikotin benzoat tuzu olup, bu bileşikte serbest baz nikotin, benzoik asit ile reaksiyona girerek nikotin tuzunu oluşturmaktadır⁵⁹. JUUL'da bulunan benzoik asit miktarı yaklaşık olarak 45 mg/ml veya %4.5 iken, nikotin miktarı 60 mg/ml veya %6 oranındadır⁵⁹.



Şekil 2. 4. Bir e-sigara olarak JUUL

Organik asit/nikotin tuzları inhale edilecek şekilde kullanıcıya ayrı ayrı verildiğinde, kuvvetli bazik nikotin de serbest asit de doğrudan akciğerlere ulaşmaz. Bu nedenle nikotin tuzu organik asitle birleştirilerek verilir. Bu durum nikotin tuzunun inhale hale getirilmesine olanak sağladığı için ve serbest bazlı nikotine göre akciğerlere daha kolay iletimini/verimi sağlamaktadır. Bu durum e-sigaralar açısından istenen bir durum olmakla birlikte nikotinin kullanıcıya daha kabul edilebilir bir pH aralığında sunulmasını da sağlar. Serbest hidrojenler olarak da bilinen bu organik asitler pozitif yüklü olup, nikotinin azot merkezine ilgi gösterirler. Bu ilgi, uzun süreli aktivite için nikotin molekülünü stabilize etme ve nikotini oksidatif bozulmaya karşı savunma için önemlidir (Şekil 2.5). Nitekim katyonik bir tuzun, nikotin molekülünün elektronegatif azot merkezine bağlanması tuzsuz bir formülasyona kıyasla maruz kalabileceği oksidatif hasarı engeller⁵⁹. Bununla birlikte, çok sayıda nikotin tuzu bulunmakta ve e-sigaralar için sadece belirli tuzlar kullanılabilir. E-sigaralarda kullanılacak nikotin tuzunun iki önemli özelliğe sahip olması gerekmektedir. Bunlardan ilki,

kullanılacak nikotinin yaklaşık aynı sıcaklıkta glükol ve gliserinle birlikte uçucu bir hale gelebilmeli, diğeri ise insan vücudu tarafından kabul edilebilecek asit formu (gıda ve tıbbi maddelerde bulunanlar gibi) halinde bulunmasıdır. Nikotin tuz örneklerine; Nikotin levulat, piruvat, benzoat ve nikotin salisilat verilebilir⁵⁹.



Şekil 2. 5. Kan nikotin seviyesi değişimi

Ana tuz kombinasyonlarının yararları henüz tam olarak tanımlanmamıştır. Ancak kullanılan bu farklı tuz kombinasyonların tüketici üzerindeki etkileri farklılık göstermekle birlikte, bu kimyasallarla ilgili araştırmalar halen devam etmektedir. Mevcut verilere ve geri bildirimlere dayanarak, aşağıda açıklanan 3 ana tuz kombinasyonunun serbest baz içeren e-sigara içme deneyine benzer bir deneyim yaşattığı belirlenmiştir.

2.1.4.3.C. Nikotin benzoat

Benzoik asit, $C_7H_6O_2$ formülasyonuna sahip olup, renksiz, kristal görünümünde, katı ve basit bir aromatik karboksilik asittir. İsmi uzun zamandır benzoik asitin bilinen tek kaynağı olan benzoin zankının adından türetilmiştir⁵⁹. Benzoik asit, birçok bitkide doğal olarak oluşur ve birçok ikincil metabolitin biyosentezinde bir ara madde olarak hizmet eder. Benzoik asit tuzları, gıda koruyucu olarak kullanılır ve benzoik asit, diğer birçok organik maddenin endüstriyel sentezi için önemli bir öncüdür. Nikotin benzoat serbest baz nikotinin pH değerini düşürerek özellikle yüksek nikotin konsantrasyonlarında yumuşak ve tadı hoş bir nikotin vurumu sağlar. Çalışmalar, benzoik asidin nikotin molekülünün stabilitesini önemli şekilde arttırdığını ve bu nedenle e-likitin aromasını ve lezzetini daha iyi koruyabileceğini göstermektedir⁶².

2.1.4.3.D. Nikotin levulinat

Levulinat asit, buhar haline gelmiş nikotinin akciğerlere daha derin bir şekilde solunmasına izin vererek üst solunum yollarını potansiyel olarak duyarsızlaştırma özelliğine sahiptir. Bazı literatür kaynakları levulinik asidin, nikotinin, normalde nikotine yanıt vermeyen nöronlara bağlanmasını artırabileceğini belirtmektedir⁶².

2.1.4.3.E. Nikotin pirüvat

Araştırmalar, piruvik asidin, özellikle düşük nikotin dozlarında nikotin alımına yardımcı olduğunu göstermektedir. E-sigara üzerinde yapılan çalışmalar, nikotin pirüvatın inhalasyonunun plazma nikotin konsantrasyonlarında hızla artışa neden olarak iyi tolere edilmesi nedeniyle kullanıcıya daha iyi bir memnuniyet duygusu vermekte olduğunu ortaya koymuştur⁵⁹.

Tüm bu tuzların yanı sıra piyasada nikotin salisilat, nikotin tartrat, nikotin glukuronid ve nikotin sitrat gibi asitler de bulunmaktadır.

Sonuç olarak, nikotin tuzunun patentlenen formülasyonu, nikotinin daha etkili bir şekilde iletilmesini sağlar. Bu nedenle kullanıcı da solunum sistemi yoluyla, serbest baz nikotin ile karşılaştırıldığında nikotin tuzuyla daha fazla nikotin tüketebilir. Serbest baz nikotininin sert ve nahoş bir tadı vardır. Buna karşılık, nikotin tuzu formları daha az serttir ve daha az hoş olmayan bir tada sahiptirler. Buna ek olarak serbest baz nikotin bazen tuz formundan daha sık gastrointestinal rahatsızlığa neden olabilmektedir.

2.1.4.3.F. E-likitteki nikotin tuzunun solunması

Nikotin tuzu içeren bir e-likitten solunması ile serbest baz nikotin içeren bir e-likitten solunması birbirinden farklılık gösterir. Bunun nedeni, nikotin tuzu e-likitinin içeriğinde çok yüksek nikotin seviyelerine sahip olmasıdır. Ancak, kullanıcı düşük güçte çalışıp yüksek nikotin seviyesine sahip bir cihaz kullandığında, vücut nikotin doygunluğuna hızla ulaşmasına rağmen kullanıcı yüksek nikotin seviyesine sahip bir e-likit kullanıyor hissine kapılmamaktadır. Bu nedenle nikotin vuruşu yüksek olacağı için e-likit üreticileri düşük güçteki (alt ohm) cihazlarda nikotin tuzu kullanımını önermemektedir. Bu nedenle düşük güçte çalışan cihazlar yerine daha az buhar üreten ama daha yüksek ohm bobin direncine sahip cihazlar kullanılmaktadır.

Nikotin tuzu ile nikotinin etkisi artmış, etkinlik zamanı kısalmış ve nikotinin stabilitesi artmıştır. Ancak nikotin tuzunun negatif yönlerini sıralamak gerekirse; nikotinin boğazdaki vuruş etkisinin azalması, yarar/zarar ile ilgili sınırlı bilginin bulunması, üretim maliyetinin yüksek olması ve cihazlara uyumluluğun azlığı sayılabilir (Tablo 2.3).

Tablo 2. 3. Serbest baz nikotin ve nikotin tuzu arasındaki farklar

Serbest Baz Nikotin	Nikotin Tuzu
Serbest baz nikotin molekülü nikotin tuzuna göre daha uçucudur, ancak insan mukozasına daha az uyumluluk gösterir.	İnsan hücre membranları için nikotin tuzunun solunabilir formu serbest baz nikotinin solunabilir formundan daha biyouyumludur.
Aynı süre içerisinde kandaki serbest baz nikotin seviyesini tütün sigarasıyla aynı seviyeye getirmek ve bununla birlikte inhalasyon rahatlığını sağlamak neredeyse imkânsızdır.	Tütün sigarasına göre bu nikotin emilimi çok hızlıdır ve aynı süre içerisinde kanda ulaşılan maksimum nikotin doyma seviyesi de daha yüksektir.
Serbest baz nikotin, nikotin tuzundan daha az stabil bir bileşiktir.	Nikotin tuzu, serbest baz nikotinden çok daha stabil bir bileşiktir.
Serbest baz sıvı nikotini nikotin tuzuna göre oksidasyona daha yatkındır ve bu durum da serbest baz nikotinin depolama süresini azaltır.	Nikotin tuzunun depolama süresi uzundur. Nikotin tuzu pH seviyesine bağlı olarak daha yumuşak bir vurum gerçekleştirdiği rapor edilmiştir. Nikotin tuzu, nikotinden hızlı ve güçlü bir şekilde verim almak isteyen sert sigara içenler için çekici olabilir.
Kullanıcının dikkat çeken büyük miktarda buhar üretmesi için güçlü bir cihaz kullanması gerekmektedir.	Nikotin tuzu içeren e-likiti güçlü bir cihazla dengelemeye gerek yoktur, bu nedenle nispeten küçük bir cihazla ve ucuz bir maliyetle kullanılabilir
Kullanıcı daha pahalı olan ve çok miktarda serbest baz nikotin içeren e-likit kullanır.	Kullanıcı daha az e-likit kullandığından dolayı daha fazla para tasarrufu sağlar.

2.1.4.3.G. pH

Nikotin genellikle yüksek pH'da iyonize olmayan kolay ve hızlı bir şekilde emilebilen, biyoyararlı, protonlanmamış, serbest baz nikotin olarak da adlandırılan serbest nikotin formundadır. Bu iyonize olmayan nikotin biyolojik membranlardan kolaylıkla geçebilmektedir. Nikotin için bozunum sabiti (pKa) 8.02 olup, bu pH değerinde nikotinin yarısı iyonize olmayan ve daha kolay absorbe edilebilen serbest baz halde bulunur. Nikotini daha alkali hale getirebilmek için hazırlanan tampon çözeltileri nikotinin emilimini arttırmaktadır. Nitekim kullanılacak tamponlama ajanları nikotin

içeren ürüne de doğrudan eklenebilir. Örneğin baca dumanı ile muamele edilmiş (tamponlanmış) bir sigara dumanı daha düşük bir pH'a ve dolayısı ile daha az bir emilim oranına sahipken, sadece hava ile muamele edilmiş bir sigara dumanı yüksek bir pH değerine ve daha fazla emilim oranına sahiptir. Buna ek olarak tamponlanma işlemi emilim alanının doğal bir sonucu olarak da ortaya çıkabilir. Buna örnek olarak bikarbonat içeren ağızdaki tükürük verilebilir. Bikarbonatın varlığı nikotini tamponlama işlevi görür. Ayrıca inhale edilen ve nikotin içeren sigara dumanının akciğer sıvısında (pH:7.4) çözünmesi de emilimi kolaylaştırmaktadır^{63,64}.

Prelinik araştırmalar, nikotin dozlarının emilimi için verilen fizyolojik cevapta ortamın pH'ının önemli olduğunu ortaya koymuştur⁶³. Bu noktada nikotinin mukoz ya da dermal olarak emilimi pH ile doğrusal bir artış gösterir. Bundan avantaj sağlamak isteyen tütün endüstrisi ise nikotinin emilimini arttırmak için ürün içeriğinin pH'ını da arttırmaktadır⁶³. E-likitlerin pH değerleri farklı markalar arasında (pH=4.78-9.60) büyük değişiklik göstermektedir. Nikotin içermeyen e-likitlerin daha düşük pH'a (nötral veya asidik) sahip olduğu, büyük oranda nikotin içeren e-likitlerin pH'ı ise 9'dan daha büyük bulunmuştur. Buna ek olarak farklı markaların e-likitleri aynı miktarda nikotin içermesine rağmen pH değerleri değişiklik gösterebilir. Bu nedenle aynı nikotin miktarıyla listelenen farklı markalara ait e-likitler içeriklerinin farklı pH değerleri ile kullanıcılarına farklı nikotin verimi sağlamaktadırlar⁶⁵. Ayrıca mentol içeriğine sahip e-likitlerin pH'ı da yüksek bulunmuştur. Yapılmış olan başka bir çalışmada 36 farklı e-likit örneğinin pH'ı ölçülmüş olup bu pH değerleri 5.1-9.1 arasında bulunmuştur. Henderson-Hasselbach eşitliği kullanılarak hesaplanan e-likitteki toplam serbest baz nikotin formunun (kolay emilebilir form) %60 ila %90'ı bulunduğu ve e-likitteki nikotin miktarı arttıkça serbest baz nikotin oranının da arttığı ortaya konmuştur³⁷.

E-likitlerin komponentleri ve karakteristikleri ile ilgili sonuç olarak; e-likitlerin çeşitli özellikleri ve bileşenleri nikotin iletimini etkileyebilir. Diğer tüm faktörler sabit tutulduğunda, yüksek nikotin konsantrasyon içeren e-likit daha fazla nikotin iletime neden olur. Aromalar, nikotin içeren e-sigaraların kullanımına başlanmasını veya devam edilmesini sağlayarak ve nikotinin kötü etkilerini maskeleyerek kullanıcıların nikotine maruziyetini arttırmayı kolaylaştırmaktadır. E-likit temelinde bulunan PG/VG'nin nispi oranı nikotin verimini etkileyebilir²⁶.

2.1.4.3.H. Nikotin seviyesi

E-sigara kullanımının en önemli yönlerinden biri, bu cihazların akciğerlere nikotin iletebilme özelliğine sahip olarak tasarlanmalarıdır. Akciğerlere iletebilen nikotin miktarı bir e-sigara ile normal bir tütün sigarası arasında farklılık göstermekle birlikte, farklı firmalara ait e-sigaralar arasında da değişkenlik gösterir. Nitekim akciğerlere iletilen nikotin miktarlarıyla ilgili olarak yapılan bazı çalışmalarla e-sigaralarda bulunan nikotinin tütün sigaralarına kıyasla daha düşük olduğu tespit edilmişken, yapılan pek çok diğer çalışma ile de e-sigarada bulunan nikotinin tütün sigarasına eşdeğer ya da aşan derecelerde bulunduğu ortaya konmuştur²³.

Otomatik sigara makineleriyle yapılan çalışmalar e-sigaraların normal tütün sigaralarına göre her bir pufta daha az miktarda nikotini akciğerlere verdiğini göstermiştir. Ancak bu serumdaki nikotin oranı deneyimli e-sigara kullanıcılarında deneyimsiz e-sigara kullanıcılarına göre daha yüksek orandadır ve hatta deneyimli e-sigara kullanıcısının serumundaki bu oran neredeyse normal sigara içenlerinki kadardır²³. Deneyimli e-sigara içenler ile yapılan bir çalışmada tükürük kotin (nikotinin ana metaboliti) miktarı 322 ng/ml olarak bulunmuştur⁶⁶. Tütün sigarası içenlerde ise ortalama tükürük kotin seviyesi 113 ng/ml olarak bulunurken sigara içmeyenlerde bu oran 2.4 ng/ml olarak rapor edilmiştir⁶⁷.

E-sigaralar e-likitin bulunduğu kartuş kısmı içerisinde sıvı ve konsantre nikotin barındırır. Bu konsantre nikotinin kullanıcı tarafından istemsiz olarak yutulduğu vakalar rapor edilmiştir. Nitekim nikotin solunduğunda, yutulduğunda veya deri ile temas ettiğinde, çocuklar, gençler, hamile kadınlar, emziren kadınlar, kalp hastalığı olan kişiler ve yaşlılar gibi hassas bireylerin sağlığı için tehlikeli arz edebilir⁶⁸. Bunun yanı sıra istemli olarak konsantre likit nikotinin vücuda enjekte edilerek ya da yutularak intihar girişimlerinin gerçekleştirildiği ve hatta bazı vakalarda bu girişimlerin ölümlle sonuçlandığı da rapor edilmiştir. Nikotin akciğerlerde, deride ve mukozada hızlı emilim gösterir ve ölümcül doz 10 ila 60 mg (ya da vücut ağırlığının kilogramı başına 0.5-1.0 mg nikotin⁶⁸) arasında değişir. Bazı e-sigaralarda likit nikotin konsantrasyonu 100mg/ml'dir ve bu oran potansiyel bir letal dozdur. Hatta nikotinsiz olarak satılan bazı e-likitlerde bile nikotine rastlanmıştır⁶⁹⁻⁷¹.

2.1.4.3.I. Elektronik sigaraların nikotin farmakokinetiği

E-sigaraların, sigara kullanıcıları tarafından tütün içeren sigaraların yerine geçmesi için kullanıldığı literatürde yer almaktadır⁷². Günümüzde genellikle sigaranın zararlı etkilerinin, sigara dumanının partikül ve buhar fazlarındaki 6,500 veya daha fazla sayıdaki kimyasal bileşenlerin bazılarına maruz kalınmasından kaynaklandığı kabul edilmektedir⁷³. Bu kimyasallar ya tütünün kendi yaprağı içinde bulunur ya da tütünün pirolizi ve yanması sonucunda oluşan yan ürünlerdir ve sigara dumanının içe çekilmesi ile bu kimyasallar vücuda alınır⁷⁴. Bunun yanı sıra tütünün ve bu tütünün yanması sonucu açığa çıkan zararlı yan ürünlerin solunmasıyla ilgili olarak e-sigaralar, normal bir sigaradan çok daha az toksik olan aerosol üreterek^{75,76} kimyasal toksinlere maruziyeti sigara kullanımına göre oldukça azaltmaktadır^{77,78}. Geleneksel sigaralara kıyasla e-sigaraların daha az toksisiteye maruz bırakma profili nedeniyle e-sigaralar, sigara içenlerin sigarayı azaltmasında veya sigarayı bırakmalarında yardımcı olması amacıyla ya da tütüne maruziyet sonucunda ortaya çıkan zararın azaltılmasında önemli bir rol oynadığından dolayı önerilmektedir^{8,9,78,79}.

Son yıllarda elektronik sigarayla ilgili olarak farmakokinetik çalışmalar yapılmaktadır. Farmakokinetik çalışmalar, bir ilacın ya da kimyasal bileşiğin zamana bağlı olarak absorpsiyonu, dağılımı, metabolizması ve atılımı hakkında bilgi verir. Nikotin farmakokinetiği çalışmaları ise insanlarda nikotin emilimini ortaya koymayı amaçlar. İnsanlar üzerinde yapılan ve tek bir sigara içilmesinin ya da nikotin sakızının çiğnenmesi sonucu kan plazmasındaki nikotin seviyesini gösteren ilk nikotin farmakokinetik çalışması 1970 yılında yayınlanmıştır^{13,80}. İlk elektronik sigarayla ilgili olarak yapılan ve elektronik sigara kullananların plazma nikotin seviyesini gösteren nikotin farmakokinetiği çalışması ise 2010 yılında yayınlanmıştır⁸¹. Daha sonra yapılan nikotin farmakokinetiği çalışmaları ile denekler sigara ya da elektronik sigara kullanmadan önce ve bu sigaraları çalışmada belirlenen zaman aralıklarında kullandıktan sonra kan plazmalarından örnekler alınarak kandaki nikotin miktarının zamana ve doza bağlı olarak ölçülmesi hedeflenmiştir.

Normal sigara içimi sonucunda kan plazmasındaki nikotin oranı 15-20 ng/ml iken⁸²⁻⁸⁴, birinci jenerasyon elektronik sigara kullanımı sonucu kan plazmasındaki nikotin oranı ise 3,5 ng/ml olarak bulunmuştur. Normal sigara içimiyle plazmadaki nikotin seviyesi 5 dakika içerisinde en yüksek seviyesine ulaşmaktadır. Ancak aynı süre e-sigara

kullananlarda en az 20 dakika sürmektedir⁸⁵⁻⁸⁷. Yeni jenerasyon e-sigaralar üzerinde yapılan çalışmaların çoğunda, plazma nikotin seviyesinin ilk jenerasyon e-sigarlarda gözlenen seviyelere göre daha yüksek olduğu bulunmuştur. Yeni nesil bir e-sigara ile normal bir sigara plazma nikotin seviyeleri açısından karşılaştırıldığında ise normal sigara içimi ile plazma nikotin seviyesinin ortalama 18 ng/ml olarak yeni nesil e-sigaradan hala önemli ölçüde yüksek seviyede olduğu bulunmuştur. Aynı çalışmada yeni nesil e-sigarada bulunan en yüksek plazma nikotin değeri ise 11,9 ng/ml olmuştur⁸⁸. Bununla birlikte, diğer çalışmalardan elde edilen veriler, yeni nesil (ikinci ve üçüncü nesil) e-sigaraaların, en yüksek ortalama plazma nikotin değerinin 43.6 ng/ml ulaşmasıyla birlikte, normal sigaralara yakın veya hatta daha yüksek seviyelerde nikotin sağladığını ortaya koymaktadır⁸⁹.

2.1.4.3.J. E-sigara kullanım davranışının nikotin iletimi üzerine etkisi

E-sigara içenlerin cihazı kullanma davranışı için puf topografyası terimi kullanılmakta olup, bu topografya; alınan pufun hacmi, puf süresi, puf sayısı ve puflar arasındaki aralık gibi değişkenleri içerir^{90,91}. Yapılan çalışmalarla puf topografisinin nikotinin iletimi üzerindeki etkileri araştırılmıştır⁹². Nikotinin sistemik alımı puf topografyası nedeniyle kullanıcıdan kullanıcıya değişmekte olup, deneyimli e-sigara kullanıcıları ile deneyimsiz e-sigara kullanıcılarının plazma nikotin düzeyleri farklılık göstermektedir. Deneyimli kullanıcıların yaklaşık 4 saniye gibi uzun puf süresine sahip oldukları ve deneyimsiz e-sigara kullanıcılarının ise normal sigara içenlerinkinin yaklaşık yarısı kadar yani yaklaşık 2 saniye gibi kısa puf süresine sahip olduğu bildirilmiştir^{93,94}. Bu da deneyimli e-sigara kullanıcılarının yeni e-sigaraya başlayanlara göre e-sigaradan daha fazla nikotin alabilme tecrübesinin olduğu düşünülmektedir. Buna bağlı olarak da deneyimli e-sigara kullanıcılarının plazma nikotin seviyeleri deneyimsiz e-sigara kullanıcılarının plazma nikotin düzeyinden iki kat daha yüksek olduğu söylenebilir⁷².

2.1.4.4. Propilen glikol ve vegetable (bitkisel) gliserin

Propilen glikol $CH_3CH(OH)CH_2OH$ kimyasal formülüne sahip organik bir bileşiktir. Propilen glikol neredeyse kokusuz fakat hafif tatlı bir tada sahip olan viskoz, renksiz bir sıvıdır. İçeriğinde iki alkol grubu içeren propilen glikol; su, aseton ve kloroform dahil olmak üzere geniş bir çözücü yelpazesi ile karışım haline gelebilir. Genel olarak, glikoller tahriş edici değildir, çok düşük uçuculuğa ve çok düşük toksisiteye sahiptir.

Propilen glikol (PG) birçok kozmetik üründe, topikal cilt preparatlarında, ilaçlarda ve yiyeceklerde yaygın olarak kullanılan bir bileşendir⁹⁵. Endüstriyel alanda kullanılan propilen glikol propilen oksitten üretilmiştir. Propilen glikol aynı zamanda e-sigara aerosolünü oluşturmak için kullanılan ana maddelerden de biridir. Propilen glikol inhalasyonunun zararlı etkileri hakkındaki veriler oldukça sınırlı sayıdadır. Yapay bir duman jeneratörü ile propilen glikol buharı oluşturularak bu buhara kısa bir süre maruz kalan ve astımlı olmayan bireyler üzerinde yapılan çalışmada göz tahrişi, üst solunum yolu iritasyonu, öksürük ve solunum yolu tıkanıklığı rapor edilmiştir⁹⁶.

Gliserin renksiz, kokusuz, tatlı bir tada sahip, toksik olmayan viskoz bir yapıya sahip maddedir. Gıda endüstrisinde, farmasötik formülasyonlarda tatlandırıcı ve nemlendirici olarak yaygın şekilde kullanılır. Vegetable (bitkisel) gliserin, genellikle e-sigaralarda kullanılan nikotin solüsyonlarına eklenen ve gözle görülebilir bir sigara buharı oluşturan maddedir. Gliserin, palm veya hindistan cevizi yağı ısıtılarak üretilmekle birlikte bir yağ asidi ayırıştırma işlemi ile hayvansal yağdan ve sabundan da üretilir⁹⁷.

E-likitler propilen glikol(PG) ve bitkisel gliserin (vegetable gliserin-VG) olmak üzere e-likit hacminin büyük bölümünü kapsayan, nikotin ile farklı tatlandırıcıları süspansiyonda tutan, yeterli sıcaklığa ulaştığında aerosol haline gelmiş parçacıkların püskürtülmesini sağlayan iki temel ögeyi barındırırlar²⁴. Nikotin, aromalar ve diğer bileşenler ise bu temel yapıya eklenir. Ayrıca e-likitte bulunan bu propilen glikol ve bitkisel gliserin (PG/VG) oranı nikotin verimini etkilemekle birlikte e-sigaradan üretilen aerosolün toksisitesini de belirlemektedir.

Amerikan Federal İlaç Dairesi (FDA), hem PG hem de VG'yi oral tüketim için genel olarak güvenli (GRAS) olarak kabul etmiş olsa da, aerosol haline getirilmiş PG ve VG'nin tekrar tekrar solunmasının etkileri hala yeterince aydınlatılamamıştır. Bu nedenle Quebec Heart ve Lung Enstitüsü'nden Boulay ve ark. nikotin ve aroma içermeyen e-sigara aerosolünün içerdiği %70 PG ve %30 VG içeren bir e-likit hazırlamışlardır. E-likittin 20 sağlıklı gönüllü ve 10 astımlı gönüllü üzerindeki akut etkilerinin araştırılması için çapraz kontrollü plasebo bir çalışma yürütmüşlerdir. Sonuç olarak akut PG ve VG içeren aerosole maruziyetin pulmoner fonksiyon üzerine önemli bir etkisi olmadığı, ancak kronik maruziyetin akciğer fonksiyon bozukluğuna yol açma ihtimali olabileceği rapor edilmiştir⁹⁸.

Yapılan çalışmalar ve çoklu regresyon analizleri ile yüksek miktardaki PG oranının aerosoldeki yüksek miktarda nikotin ile ilişkili olduğu ve kullanıcıya daha fazla nikotin verimi sağladığı ortaya konmuştur ²². Çeşitli e-likitlerin kullanıldığı başka bir çalışmada da kullanıcıların plazma nikotin seviyeleri, içeriğinde PG/VG olan e-likitleri kullananlarda içeriğinde sadece VG olan e-likitleri kullananlara göre daha yüksek çıkmıştır ⁹⁹. Buna ek olarak PG/VG oranı ile toksik bileşenler arasında da ilişki bulunmuştur. Sabit bir e-sigara, nikotin seviyesi, voltaj ayarları, aromasız e-likit ve çeşitli ana bileşenlerin (sadece PG, sadece VG, ve 50/50 PG/VG) kullanıldığı, sigara makinesinden üretilen aerosole maruz bırakılmış insan bronşiyal epitelyal hücreler üzerinde yapılan *in vitro* bir çalışmada PG ve VG'nin azalmış metabolik aktiviteye veya sitokin salınımı gibi toksik etkilere neden olduğu ortaya konmuştur. Azalmış metabolik aktiviteye sadece VG veya 50/50 PG/VG kullanımı sonrasında rastlanırken sadece PG kullanımı ile metabolik aktivitenin azalmadığı belirlenmiştir. Sitokin salınımının artmasında ise sadece PG'ye maruziyetin neden olduğu rapor edilmiştir ³².

Yapılan diğer bir çalışmada, 10 ticari e-sigaraya ait e-likitlerin aerosolizasyon işlemi sonrası içeriği analiz edilmiş olup her bir e-likitin farklı PG/VG oranına sahip olduğu ya da içeriğinde sadece PG veya sadece VG barındırdığı bulunmuştur. Bunun yanı sıra sadece PG içeriğine sahip olan e-likitlerde yüksek miktarda karbonile (formaldehit, asetaldehit, aseton) rastlanmıştır. Karbonilin toksik etkilere neden olduğu, ağız ve boğaz irritasyonlarına neden olduğu varsayıldığı için e-likitte bulunan PG'nin sağlık sorunlarına yol açabileceği düşünülmektedir ¹⁰⁰. Ancak yapılan başka bir çalışmada ise PG/VG ile aerosoldeki karbonil arasında bir ilişkiye rastlanılmamıştır ²².

PG ve VG farklı kaynama noktalarına (PG=186.6°C, VG= 286.9°C) sahip olması, farklı sıcaklıklarda aerosolleşme hızını önemli ölçüde etkileyen moleküler ağırlıktan (PG=76, VG=92) kaynaklanmaktadır ¹⁰¹. İnsan solunum yolu modelinde e-sigaralardaki partikül birikimi ölçmek için içerinde 16 mg nikotin ve PG veya VG'den oluşan e-likitler kullanılmıştır. E-likitler bir sigara makinası aracılığıyla sadece bir puf burundan ventilasyon (1.2m³/s) ve bir puf ağızdan ventilasyon (1.688m³/s) olacak şekilde kullanılmış ve aerosoldeki partikül boyutu ve konsantrasyonu gözlemlenmiştir. Tek puf ile biriken partikül boyutunun sürekli e-sigara maruziyeti ile biriken partikül boyutundan çok daha küçük olduğu belirlenmiştir. Biriken partiküllerin toplam hacmi ise sadece PG içeren e-likitte ait e-sigaraya maruziyet sonrasında sadece VG içeren e-

likitte maruziyete göre daha fazla bulunmuştur. İnsan solunum yolu modeli kullanılarak yapılan çalışmada, aerosolün toplam hacminin %9-17'sinin baş ve solunum yolu gibi venöz emilim alanlarıyla ilişkili olduğu yerlerde, %9-18'inin ise alveol gibi arteryel emilim ile ilişkili olduğu yerlerde biriktiği düşünülmektedir¹⁰¹.

2.1.5. E-sigara aerosolünün temel özellikleri

Günümüzde güvenli olduğu varsayıldığı için kullanımı da oldukça popüler olan^{102,103} e-sigaraaların saldığı aerosolün solunmasının akut ve kronik etkileri hakkında çok az veri bulunmaktadır¹⁰⁴⁻¹⁰⁶. Bu az sayıdaki verilerin nedeni e-sigaradan salınan bu aerosolün solunum sistemine girdikten sonraki özelliklerinin ve dinamiğinin bilinmemesinden kaynaklanmaktadır.

E-sigaraalarda salınan aerosollerin spesifik özellikleri vardır ve bu aerosollerin solunum sistemindeki dinamiği ve birikimi ile ilgili olarak yapılan analizlerde belirtilen spesifik özellikler dikkate alınmalıdır. İnhale edilen aerosol oldukça konsantre olup mikrometre altı boyutta oldukça küçük partiküller içerir. Genellikle "vapor-buhar" olarak adlandırılan e-sigara aerosolü esas olarak; propilen glikol (1,2-propandiol, PG), vegetable gliserin (propan-1,2,3-triol), nikotin, su, tatlandırıcılar (eğer e-likitte bulunuyorsa), koruyucular ve ayrıca bu bileşenlerin bazılarının termal ayrışmasının yan ürünlerini içeren e-likit damlacıklarından oluşur^{77,107}. Bu damlacıkların etrafı hava ve vaptorda bulunan ayrıışmış maddelerin karışımıyla çevrilidir. İşte bu noktada aerosoldeki bileşenlerin fiziksel özellikleri önemlidir. Nitekim e-likit bileşenlerinin büyük bir bölümü yüksek bir kaynama noktasına (PG: 180°C ve gliserol: 300°C) sahip olup buna bağlı olarak düşük uçucu özellik gösterirler. Vegetable gliserinin ya da propilen glikolün kaynama noktasının yüksek olması aerosolün yüksek bir sıcaklığa erişmesine izin verir, ancak bu durum aerosolde bulunan toksik maddelerin salınımına da neden olabilir¹⁰⁸.

Oda sıcaklığında propilen glikolün doymuş buhar basıncı 0.13 mmHg'nın altında iken gliserolün doymuş buhar basıncı ise 0.001 mmHg'nın altındadır. Buna göre, damlacıkların etrafındaki bu buharın konsantrasyonu, 17.6 mmHg'lık denge basıncı ile karakterize edilen tipik su buharı konsantrasyonuna kıyasla daha düşüktür¹⁰⁹. Hem propilen glikol hem de gliserol higroskopiktir, bu durum e-likit damlacıkların hacminin ortamda bulunan nemli havadaki su buharını alarak büyümesine sebep olmaktadır¹⁰⁹.

Eğer tütün sigarasının dumanındaki partiküller ile e-sigaranın aerosolündeki partiküllerin birikimi ve sağlık üzerine olan etkilerini kıyaslamak gerekirse; inhale edilen normal sigara dumanındaki aerosollerin akciğerlerde birikmesi istenmeyen birçok sağlık problemlerine yol açtığı uzun zamandır bilinmektedir. Tütün sigarasının dumanındaki partiküller yüksek oranda ve çoğu kez de kanserojen olan organik maddeleri taşırlar. Bu partiküller bronşiyal bifürkasyonlarda (karinal bölgeler) aktif olarak birikim yapmakla beraber, akciğer kanserinin gelişim noktası da yine aynı anatomik bölge olarak bilinmektedir¹¹⁰. Oysaki normal sigaraların aksine, e-sigara aerosolünden salınan buhar ve damlacıklar çok daha az toksik olmakla birlikte bu durum e-sigaranın insan sağlığı açısından tamamen güvenli olduğu anlamına da gelmemektedir^{111,112}. Çünkü e-sigara buharının vücuda alındıktan sonraki fiziksel özellikleri ile ilgili olarak elde edilen veriler yeterli olmamakla birlikte solunum sistemindeki potansiyel birikim noktalarının belirlenebilmesi için daha fazla çalışma gerekmektedir. Normal sigara dumanından ve e-sigara buharından inhale edilen aerosolün birikim gösterdiği bölgelerdeki dozları, daha önce yaptıkları çalışmalarla, hem pulmoner hem trakeobronşiyal bölgelerde birikmiş olan e-sigara damlacıklarının sayısının bu bölgelerdeki depolanmış tütün sigarası partiküllerinin sayısından yaklaşık iki misli daha yüksek olduğu Manigrasso ve ark. (2015)¹¹³ ile Pichelstorfer ve ark.¹¹⁴ tarafından gösterilmiştir. Bu karşılaştırılma sonucunda araştırmacılar; e-sigara aerosolündeki damlacıkların pıhtılaşmasının ve higroskopik büyümesinin normal sigara partiküllerine kıyasla solunum sisteminde daha fazla birikime neden olduğunu ortaya koymuşlardır. İlginç olarak, Pichelstorfer ve arkadaşlarına göre her iki sigarada da nikotin; biriken parçacıklardan veya damlacıklardan değil, gaz/buhar fazından absorbe edildiğini bildirmişlerdir¹¹⁴. Sosnowski ve Kramek- Romanowska (2016), Çoklu-Yol Parçacık Doz Ölçüm modelini kullanarak solunum parametrelerinin e-sigara aerosolünün (partiküllerin varsayılan ortalama çapı ~200 nm) bölgesel birikimi üzerindeki etkisini hesaplamışlardır. E-sigara aerosolünün daha yavaş ve daha derin inhalasyonun pulmoner bölgede daha güçlü yayılma etkisi nedeniyle damlacık birikmesini artırdığı belirtilmiştir¹¹⁵. Buna ek olarak ortalama damlacık boyutunun e-sigara aerosollerinin bölgesel birikimi üzerindeki etkisi de test edilmiş olup, artmış partikül boyutunun ana solunum yolunda birikim gösterdiği bulunmuşken, bronşiyal ve pulmoner bölgelerdeki birikimin değişmeden kaldığı ortaya konmuştur¹¹⁵. Partikül büyüklüğü solunum sisteminde birikimin olduğu bölgeyi etkiler; bu durumda küçük partiküllerin alt

solunum yoluna kadar kolayca ilerleyerek alveollere daha fazla nikotin iletir¹¹⁶. Yapılan çalışmalarla genel olarak, vegetable gliserinin partikül boyutları propilen glikolün partikül boyutlarından daha büyük olduğu bulunmuştur. Aerosolde nikotinin veya farklı aromaların varlığının aerosoldeki partiküllerin dağılımı üzerinde herhangi bir etkisi bulunamamıştır¹⁰¹. Yapılan çalışmalarla akciğerlere inhale edilen partiküllerin birikimi ile ilgili olarak pek çok matematiksel modelleme belirlenerek hesaplamalar yapılmıştır. Manigrasso ve arkadaşlarına göre maksimum e-sigara aerosolünün akciğerlerde birikim yaptığı nokta, akciğerlere inhalasyonla giren partiküllerin birikim noktalarını tahmin etme amacıyla kullanılan modellerden biri olan stokastik akciğer modelleme sisteminin 16-23 numaralı jenerasyonları arasında, yani alveollerin de dahil olduğu küçük solunum yolunda olduğu tahmin edilmektedir¹¹³. Yapılan bu tahminler, tütün sigara dumanının birikim yaptığı noktaların belirlenmesi için kullanılan Weibel akciğer modelindeki hesaplardan elde edilenlere benzerdir¹¹⁷. E-sigara ile normal sigaranın bronşiyal bifürkasyon bölgesindeki¹¹⁰ benzer birikim noktaları ve şekillerine rağmen, e-sigara damlacıklarının sigaranın yanması sonucu ortaya çıkan mutajenik bileşikleri içermemesinden dolayı daha az toksik olması beklenmektedir. Buna göre, e-sigara kullanımıyla akciğer kanseri riskinin, hem aktif kullanım hem de pasif maruziyet için, önemli ölçüde azaldığı iddia edilmektedir¹¹⁸.

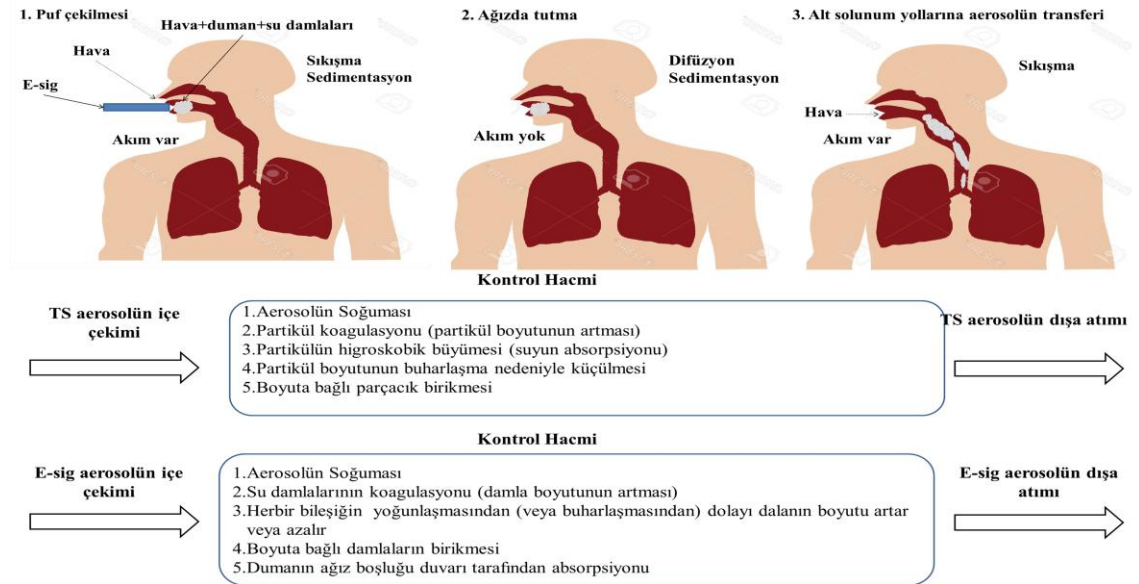
2.1.5.1. İnhalasyon şeklinin rolü

E-sigaralar, normal sigarayı daha önce içmiş ya da halen içmekte olanlar arasında da oldukça sık kullanıldığı için, kullanıcılar arasında e-sigaranın aerosolünü inhale etme şekli alışkanlık gereği normal sigara dumanını inhale etme şekline benzerlik göstermektedir¹¹⁹. Tipik olarak her iki sigara türünde de aerosol veya sigara dumanı öncelikle "puf" olarak adlandırılan halde ağza alınır ve sonrasında birkaç saniye ağızda tutulan bu buhar akciğerlere inhale edilir (Şekil 2.6). E-sigara buharını veya sigara dumanını çekme (puf yapma) ve ağızda bekletme periyotları, termodinamik ve kütle transfer etkilerinden dolayı başlangıçtaki aerosol özelliklerinin değişmesi için belirli bir süre sağlar^{115,120}.

Normal sigaranın ve e-sigaranın benzer inhalasyon şekillerine rağmen, her iki tür sigarada bulunan aerosollerin özelliklerinin farklı olması nedeniyle solunum sisteminde ortaya çıkan aerosol dinamikleri de birbirinden farklı olmaktadır. Normal sigarada tütünün yanması sonucu ortaya çıkan duman; havada asılı ince katı ve yarı uçucu

parçacıklardan oluşurken, e-sigara ise; buhar ve havanın karışımında asılı sıvı damlacıklarından oluşur. E-sigara damlacıkları, e-likitin ısıtılmasıyla üretilen buharın yoğunlaşmasıyla oluşur ve farklı oranlarda e-sıvı bileşenleri ile yan ürünleri içerir. İn hale edilen aerosoller arasındaki farklılık, solunum sistemine alınan partiküllerin dinamik özellikleri için önemli sonuçlar doğurur¹⁰⁹. Buna ek olarak, tütün sigaralarının ve e-sigaralarının hava akışına karşı farklı iç dirence sahip olduğu ve daha az solunum çabası gerektirdiği için normal sigarayı içmenin e-sigara içmekten daha kolay olduğu Trtchounian ve arkadaşları¹²¹ tarafından gösterilmekle birlikte Sosnowski ve Kramek-Romanowska¹¹⁵ tarafından da bu durum desteklenmiştir. Bu gözlem aynı zamanda inhalasyon sırasındaki daha yüksek hava akımı sınırlamasının ağız boşluğunun daralmasına yol açtığı gibi başka sonuçları da ortaya koymaktadır.

Ehtezazi ve arkadaşları, farklı internal aerodinamik dirence sahip inhalatörler yoluyla inspirasyon sırasında üst solunum yolu geometrisini CT taramaları ile ortaya koymuşlardır¹²². Daha yüksek hava akımı obstrüksiyonu bu akışı azaltır, buna bağlı olarak da ağız boşluğu içerisindeki inhale edilen aerosollerin hızı düşük olup ağızda kalma süreleri daha uzun olur. Her iki etki de (oral geometride bir değişiklik ve hava akımının azalması), aerosol partiküllerinin dinamiklerini ve ağız boşluğu ile daha ilerisindeki organlarda aerosolün birikimi etkiler¹⁰⁹.



Şekil 2. 6. Üsteki resim; E-sig içmenin üç fazı: pufun çekilmesi, aerosolün ağızda tutulması ve aerosolün inhalasyonu (aerosol damlacık mekanizması gösterilmektedir.) Aşağıda ise tütün sigaradan aerosol solunduktan sonra termodinamik ve kütle transfer etkilerinin karşılaştırılması yapılmıştır, (TS; Tütün Sigarası, E-Sig; Elektronik Sigara)

2.1.5.2. İnhalasyon sonrası aerosol dinamiği

E-sigaralarla alınan puf volümü oldukça değişken olup, e-sigara markasına bağlı olarak ~30-350 ml arasında olabilir¹²³. Puf sırasındaki havanın akış hızı ~25–100 ml/s ve puf süresi de 0.7–6.9 saniye olarak dağılım gösterir. Genel olarak, normal sigara dumanından solunan aerosol partiküllerinin ve e-sigara buharından solunan damlacıkların benzer bir boyut dağılımına sahip olduğu ve bu iki aerosolünde benzer ya da çok az farklı konsantrasyonda oldukları kabul edilmektedir¹²⁴⁻¹²⁷. Ancak bu benzerliklere rağmen her iki tür sigaranın aerosolünün de kimyasal bileşenleri ile termodinamik durumları açısından farklılık gösterdiği kuşkusuzdur. Zhang ve arkadaşlarına göre ise e-sigara partiküllerinin çapı normal sigara partiküllerinin çapından çok az daha büyük olup, bu partiküllerin alveollere iletimi normal sigara aerosollerinin partiküllerine kıyasla daha az oranda olduğu yönündedir¹⁰¹.

Her iki sigara türünde de puf sonrası aerosol dinamikleri şekil 2.6'da gösterilmiştir. E-sigara aerosolü için; ağız boşluğunda bir süre kalan damlacıklar buharlaşarak hacmini azaltabilir, oluşan buhar tekrar damlacıkların yüzeyinde yoğunlaşarak damlacık boyutunu arttırır ve sonuç olarak bu damlacıklar çökebilir. Eş zamanlı olarak, ağız boşluğu duvarı tarafından bu buhar absorbe edilerek gaz fazındaki kısmi buhar basıncını ve buna bağlı olarak da konsantrasyonu azaltır. Bu durum buharlaşma/yoğunlaşma işlemi için itici gücü değiştirebilir. Bu termodinamik olaylara kütle transfer etkileri, yani ağız boşluğu yüzeyinde partiküllerin yer değiştirmesi ve birikmesi eşlik eder. İnhale edilen aerosolün özelliklerinin ve konsantrasyonunun, üst solunum yolunda kaldığı kısa süre boyunca dinamik olarak değişikliğe uğradığı açık olup, bu durumun aerosolün alt solunum yollarına transferinden sonra partikül damlacıklarının dağılımı ve birikimi üzerinde güçlü bir etkisi vardır¹⁰⁹.

Asgharian ve arkadaşlarına göre, 87°C'de solunan e-sigara buharı, ağız boşluğunun ilk 10 cm'lik kısmında, puf yapılmasını takip eden kısa süre içerisinde vücut ısısına soğutulur¹²⁰. Buna ek olarak yaptıkları hesaplamalarla puf ile alınan e-sigara buharının ve buharın içerdiği damlacıkların %5'inin ağız boşluğunda absorbe edildiği belirlenmişken, e-sigara buharının ana bileşenlerinden olan propilen glikolün %6 oranı ile en yüksek oranda absorbe edildiği, onu %4.5 ile nikotinin takip ettiği ve %4 ile gliserinin en az oranda ağız boşluğunda absorbe edildiği bulunmuştur. Sonuç olarak,

inhale edilen e-sigara bileşenlerini içeren buharın yaklaşık %95'i alt solunum yoluna transfer edilir¹²⁰.

Genel olarak, inhale edilen aerosol partikülleri veya damlacıkları, boyutuna ve akış hızına bağlı olarak yerçekiminden dolayı çökme, difüzyon ve sıkışma ile alt solunum yolunda birikim gösterir^{128,129}. Buna ek olarak, normal sigara dumanının veya e-sigaradaki buharın yoğunlaşması sonucu oluşan partiküllerin ya da damlacıkların boyutları başlangıçta nanometre ölçeğinde olabilir. Aerosol nano-parçacıklarının en yaygın ölçme tekniği, elektrostatik alandaki büyüklüklerine bağlı hareketliliklerine dayanır¹⁰⁹. İngebretsen ve arkadaşları, e-sigara damlacıklarının büyüklüğünün, 10 ila 50 nm aralığında olduğunu belirlemişlerdir¹²⁴. Ancak yapılan aerosol partiküllerinin ölçümlerinin sonuçları kullanılan metoda ve cihaza bağlı olarak değişkenlik göstermektedir.

Sonuç olarak, ortaya çıkan olası sağlık problemleri e-sigaradan nikotinin iletilmesi, salınan buharın ve buhardaki partiküllerin fiziksel özelliklerine bağlıdır¹⁰⁹.

2.1.6. E-sigara çalışma mekanizması

E-sigaralar, nikotin içeren ya da içermeyen ve e-likit olarak adlandırılan bir solüsyonu aerosol (uçucu madde) haline getiren, pille çalışan elektronik cihazlardır. Aerosol, elektronik sigarada bulunan elektrikli bir ısıtma sistemi tarafından manuel olarak aktive edilerek ya da kullanıcı tarafından cihazdan hava çekilirken üretilir. Bu süreç e-likitin buharlaşmasına neden olur ve bu buhar aerosolü oluşturmak üzere yoğunlaşır. İşte bu buharlaşıp yoğunlaşan maddenin solunması nedeniyle elektronik sigaranın içimi için “vaping-yani buharı soluma” terimi kullanılmaktadır¹³⁰.

Kullanıcılar e-sigaradan hava çekerken bir sensör bu hava akışını algılar ve kartuştaki e-likiti ısıtarak buharlaştırır. Aerosol olarak da adlandırılan bu hava kullanıcılara nikotini sağlar ve kullanıcılar nefes verdiğiğinde bu aerosolün bir kısmı ortam havasına salınmış olur. E-sigara aerosolünün sıcaklığı 40°C ila 65°C arasında değişir. Markadan markaya değişmekle birlikte bir kartuş ile 10 ila 250 kez puf yapılabilir ki bu puf sayıları yaklaşık olarak 5-30 sigaraya karşılık gelmektedir. Ayrıca otomatik ya da manuel tip batarya, e-sigara kullanımında önemli bir role sahiptir. Otomatik bataryalı cihaz kullanıcıları e-sigarayı normal bir sigaraymış gibi kullanır, yani e-sigara her an içime

hazır durumdadır. Manuel bataryalı olan e-sigara da ise e-sigarayı kullanıma hazır hale getirmek için cihazı aktifleyen bir düğmeye basılması gereklidir¹³¹.

Birçok e-sigara modelinde kullanıcının üretilen aerosol miktarını ve buna bağlı olarak da solunarak alınan nikotin miktarını seçebilmesine izin veren bir voltmetre bulunmaktadır¹³². Bunun yanı sıra tek kullanımlık e-sigaralarda bulunmaktadır. Diğer pek çok e-sigara ise önceden doldurulmuş ya da manuel olarak doldurulabilen ve yeniden kullanılabilir şekilde tasarlanmıştır (Tablo 2.4).

Tablo 2. 4. Elektronik sigara terminolojisi

Tanım	Açıklama	İlgili diğer tanımlar
Elektronik Sigara	Kartuştaki e-likiti ısıtarak aerosol üretmek için tasarlanmış cihaz	E-sig, dumansız sigara, sigara benzeri, kişisel buharlaştırıcı, vaping cihazı, buhar kalemi, e-nargile
Elektronik Sigara Kullanımı	Isıtılıp buhar haline getirilmiş bir solüsyonun inhale edilmesi ve bunu takip eden zaman diliminde içeri çekilen buharın ekspirasyonu, geleneksel sigara içimine benzer şekildedir	E-sigara içimi “vaping” olarak tanımlanmaktadır. E-sigara kullanıcısına da “vaper” denilmektedir. Bu terimler, üretilen aerosol teknik olarak bir buhar olmadığı için aslında yanlış olarak kullanılmaktadır E-sigaralar tarafından üretilen aerosol, sadece buhar gibi bir gaz fazına değil, aynı zamanda partikül fazına da sahiptir ¹²⁴
Elektronik Sigara Solüsyonu	Solüsyon genellikle propilen glikol ile bitkisel gliserinin karışımını, nikotini ve farklı aromaları içerir	E-likit, E-suyu, Buhar suyu, Duman suyu
Sıcak Sigara	Geleneksel tütün sigarası	
Kullanım Şekilleri	Daha yüksek miktarda solunacak buhar (aerosol) üretmek için değişiklikler yapılabilir.	Sis avcısı,

2.1.7. JUUL

JUUL, bir flaş sürücü şeklinde biçimlendirilmiş dördüncü nesil bir elektronik sigara markası olup yüksek miktarda nikotin içeren solüsyonlar içeren önceden doldurulmuş kartuşlara ve farklı aromalara sahip bir cihazdır²⁰. JUUL’un flaş belleğe sahip görünümü gençler arasında rahat ve gizli bir şekilde kullanılmasına olanak sağlamaktadır.

Cihazda, sadece JUUL'a özgü 0.7 ml solüsyon içeren, pod adı verilen önceden doldurulmuş kartuşlar kullanır. Propilen glikol ve bitkisel gliserine ek olarak JUUL pod benzoik asit (Tütün bitkisinde doğal olarak bulunan bir bileşik) ve nikotini de barındırır²⁰. Ağustos 2018'den itibaren JUUL, %5'lik (59 mg/ml) ve %3'lük (35 mg/ml) iki farklı nikotin konsantrasyonuna sahip kartuşları piyasaya sürmektedir. Her bir kartuş bir paket sigaraya eşdeğer (yaklaşık 200 puf) olup bu kartuşlar; mango, karışık meyve, krem brülée, nane, Virginia tütünü, klasik tütün, mentol ve salatalık olarak sekiz farklı aroma halinde satışa sunulmaktadır²⁰.

JUUL'un son zamanlardaki popülaritesindeki artışının kanıtı olarak, JUUL'un satışlarının ABD e-sigara pazarındaki pazar payının 2017'nin ilk çeyreğindeki %13.6 oranında iken Ağustos 2018'de % 72.1 oranına ulaşması gösterilebilir²⁰.

E-sigara likitlerinin çoğunluğunun nikotin içermekte olduğu bilinmesine rağmen, bu içerdikleri nikotin konsantrasyonu ürünün etiketinde rapor edilenden farklılık gösterebilmektedir. Nitekim bazı e-likitler %0 nikotin içeriğine sahip olarak piyasaya sunulmaktadır. E-likitler genel olarak 0-24 mg/ml nikotin konsantrasyon aralığında etiketlenir. Ancak son yıllarda bir e-sigara markası olan JUUL, benzoik asit içeren ve 59 mg/ml gibi oldukça yüksek bir nikotin konsantrasyonuna sahip bir e-likit piyasaya sürmüştür²⁰. Geleneksel bir tütün sigarasının nikotin absorpsiyonu 1 mg (normal aralık 0.3-2 mg) iken kandaki nikotin seviyesi ortalama olarak 15-30 ng/ml arasındadır^{64,80}.

JUUL kapsüllerinde sunulan e-likit, yüksek düzeyde nikotin, benzoik asit, nemlendirici veya kimyasalları tutucu olarak kullanılan propilen glikol/bitkisel gliserin ve aroma vericileri içerir. Propilen glikol ile bitkisel gliserinin sindirim açısından güvenli olduğu bilinmesine rağmen uzun süre solunmasının güvenliği ile ilgili oldukça sınırlı veri bulunmaktadır.

E-sigaraaların propilen glikol (PG), bitkisel gliserol (VG), benzoik asit, aroma verici kimyasal ile nikotin içerdiği e-likitten önemli bir insan karsinojeni olan benzenin oluşumu araştırılmıştır⁵⁹. Pankow ve arkadaşları tarafından yapılan ve elektronik sigaralardaki benzen oluşumun ölçüldüğü çalışmada üç farklı e-sigara cihazı kullanılmıştır. Bunlardan ilki JUUL e-sigara cihazı olup, bu cihazın kartuşunun aroma seçimi dışında kullanıcı tarafından erişilebilir bir ayarı yoktur. Diğer iki cihaz ise yeniden doldurulabilen ve kullanıcıya bu tanka ve güç ayarına erişim izni veren elektronik sigaralardır. Yapılan çalışmada e-sigara aerosollerindeki benzen, gaz

kromatografisi/kütle spektrometresi ile belirlendi. JUUL'da benzen oluşumu tespit edilmemiştir. Diğer iki tank sisteminde, yüksek güç ayarlarında propilen glikol (PG), bitkisel gliserin (VG) ve diğer katkı maddelerinden olan benzoik asit ve benzaldehitten benzenin oluştuğu belirlenmiştir. Gücü 6 watt ve 13 watt olarak kullanılan ilk cihazda %50/50 PG/VG oranı ile oluşan benzen konsantrasyonları sırasıyla 1.9 ve 750 µg/m³tür. Gücü 6 watt ve 25 watt olarak kullanılan ikinci cihazda, benzen konsantrasyonu düşük güçte saptanamamışken yüksek güçte 1.8 µg/m³ olarak belirlenmiştir. İlk cihazın e-likitinde bulunan benzoik asit ve benzaldehit miktarı ~ 10 mg/ml'de iken, 13 watta bu değerler 5000 ug/m³'e kadar yükselmiştir. Gücü 25 watta çalışan ikinci cihazda bu değerler ≤~100 µg/m³ idi. Bu değerler, geleneksel tütün sigaralarında, yani 200.000 µg/m³'te beklenebilecek değerlerle karşılaştırılabilir. Dolayısıyla, benzenden kaynaklanan riskler e-sigarlarda geleneksel tütün sigaralarından daha düşük olacaktır. Bununla birlikte, ABD'deki ortamdaki benzen hava konsantrasyonları tipik olarak 1 µg/m³tür. Bu nedenle benzen ABD'de bilinen en büyük ve tek kanser riski taşıyan hava zehirleyicisi olarak tanımlanmıştır. Sigara içmeyenler için e-sigarlardan kaynaklanan 100 µg/m³ veya daha yüksek seviyelerde benzene kronik olarak tekrar tekrar maruz kalmak önemsiz bir risk olmayacaktır⁵⁹.

Sonuç olarak, zararlı konsantrasyonlarda benzen tespit edilmemiş olup benzenden kaynaklanan riskler e-sigarlarda geleneksel tütün sigaralarından daha düşük olacaktır⁵⁹.

2.1.8. E-sigaranın kullanımı

ABD'de çocuklar tarafından elektronik sigara kullanımı gün geçtikçe artmaktayken bu artış oranı geleneksel tütün ürünlerinin kullanımına kıyasla oldukça düşüktür. Son yıllarda yapılan kamu araştırmaları sonucunda elde edilen veriler, hem lise hem de ortaokul öğrencileri arasında e-sigara kullanımının arttığını ve daha önce hiç sigara içmemiş olan gençlerin dörtte birinden fazlasının e-sigarayı en az bir kere denediğini göstermiştir¹³³⁻¹³⁵. ABD'de 2014 senesinde gençler arasında e-sigara kullanımının normal sigara tüketimini geçtiği rapor edilmiştir¹³⁶. Yapılan anketler gençlerin e-sigarayı; internet reklamlarından, televizyondan, arkadaşlardan ya da aile üyeleri arasında kullanımı aracılığıyla öğrendiğini ortaya koymaktadır¹³⁷. Lise öğrencileri e-sigarayı genel olarak tütün sigarasına oranla daha güvenilir olduğunu düşündükleri için tercih ettiklerini belirtmişlerdir¹³⁸.

E-sigara kullanımını sadece gençler arasında değil aynı zamanda yetişkinler arasında da gün geçtikçe artan kullanım oranlarına ulaşmaktadır. Son altı yılda normal sigara içiminden e-sigara kullanımına geçen yetişkinlerin oranının 10 kat artış gösterdiği ve dört milyona yakın Amerikalının e-sigara kullandığı yapılan araştırmalarla ortaya konmuştur¹³⁹. Yetişkinlerin e-sigarayı kullanım amaçları gençlerden farklı olarak kullandıkları tütün sigarasını bırakmaya çalışmak ve bunun için de normal sigaradan daha güvenli olduğunu düşündükleri e-sigarayı alternatif bir araç olarak kullandıkları söylenebilir^{10,140}.

Hamilelik sırasında e-sigara kullanımının yaygınlığı veya biyolojik etkileri hakkında şu ana kadar elimizde herhangi bir veri bulunmamaktadır. Nikotin maruziyetinin maternal ve fetal sağlığına zararlı olduğunun araştırılması büyük önem taşımaktadır¹⁴¹.

2.1.8.1. Dünya pazarındaki yeri

E-sigaraların dünya pazarında gün geçtikçe artan bir öneme sahip olmasının başlıca nedeni üreticilerin e-sigarayı, tütün sigarasını bırakmaya yardımcı bir ürün olarak pazarlamasından kaynaklanmaktadır.

Tütün tüketimini azaltmak için çalışan halk sağlığı uzmanları, özellikle gençler arasında e-sigara kullanımının popülaritesinin, yaygınlığının ve satış grafiğinin her geçen gün büyük oranda artmakta olmasından dolayı e-sigaranın halk sağlığı üzerindeki etkisi konusunda giderek daha fazla endişe duymaktadır. E-sigara endüstrisi şaşırtıcı bir hızla büyümekle birlikte gelecek 10 yıl içerisinde tütün endüstrisini yakalayacak konuma gelebileceği öngörülmüyor. 2013 senesinde piyasada 200'den fazla e-sigara markası varken ekonomistler tarafından e-sigara satışlarının aynı sene içerisinde 3 milyar dolar seviyesine çıkacağı tahminleri yapılmıştı. 2017 senesi itibariyle ise 650 üzerinde e-sigara markası ve global e-sigara endüstrisi 10 milyar doları bulmuştu¹⁴².

2.1.8.2. E-sigara pazarlama stratejisi

E-sigara üreticileri e-sigara kullanımını teşvik etmek amacıyla televizyon, internet ve sosyal medya üzerinden reklamlar yayınlamaktadırlar. E-sigara endüstrisindeki en büyük pazarlama stratejileri; normal sigaralara kıyasla e-sigaranın sağlığa olan faydaları, sigarayı azaltmadaki veya bırakmadaki etkisi, buharına minimum derecede pasif maruziyet ve normal sigara içilmesinin yasak olduğu yerlerde bile e-sigara

içiminin gerçekleştirilebilmesi olarak sayılabilir¹⁴³. Nitekim bu pazarlama stratejilerine ek olarak 2012 senesinde büyük bir e-sigara firması televizyon ve internette yayınlanmak üzere ünlü yıldızların yer aldığı bir reklam filmi çekip bu reklamlarla e-sigaraların modern ve göz alıcı olduğu belirtilmeye çalışılmıştır^{68,144}. Sonuç olarak, e-sigara satış rakamlarına bakıldığında bu pazarlama stratejilerinin başarılı olduğu ortaya konmuştur.

Tüm bu pazarlama stratejilerine rağmen e-sigara kullanımı beraberinde büyük bir kaygıyı da taşımaktadır. Bu kaygının ana nedenleri arasında; e-sigaranın sigarayı bıraktırmadaki etkisiyle ilgili veri eksikliği, sigara içmeyenlerde, özellikle çocuklarda ve ergenlerde nikotin bağımlılığı yaratma potansiyeli, geleneksel sigaraların ve e-sigaranın eşzamanlı kullanımının sigarayı bırakma girişimlerini azaltması, e-sigaranın tütün içermeyen ortamları kirletebileceği, e-sigara içiminin normalleştirilebileceği ve sigara içiminin yasaklandığı ortamlarda yeni bir hava kirliliği yaratabileceği olarak sıralanmaktadır^{145,146}.

2.1.8.3. E-sigaranın ulusal/uluslararası kuruluşlar tarafından düzenlenmesi

Amerikan ilaç ve gıda dairesi (FDA), tütün ürünü olarak kullanılan e-sigaranın kullanımını düzenleyen bir yasa teklifinde bulunmuştur. Teklif edilen bu yasa ile elektronik sigaraların küçük yaştakilere satışı aynen geleneksel tütün ürünlerinin küçüklere satışının yasaklandığı gibi bir düzenlemeyi kapsamaktadır¹⁴⁵. İngiltere’de ise e-sigaranın tıbbi ürünler kapsamına alınması gerektiği önerilmiştir¹⁴⁷. Türkiye başta olmak üzere Avustralya, Kanada, Meksika, Singapur, Brezilya, Arjantin ve Kolombiya gibi bazı ülkelerde kullanımının güvenli olduğuna dair veri eksikliği sebebiyle e-sigara satışı tamamen yasaklamıştır⁶⁸. Şubat 2014'te Avrupa Parlamentosu, e-sigaranın düzenlenmesi (solüsyon içeriği, reklamları ve pazarlama stratejilerinin de dahil olduğu), artan piyasası ve pazarı ile birlikte nikotin içeren bir ürün olarak güvenlik ve kalite standartlarının getirilmesi gerektiğiyle ilgili olarak AB Tütün Ürünleri Bildirgesini yayınlamıştır.

2.1.9. E-sigaranın klinik önemi

Günümüzde elektronik sigaralar nikotin kaynağı olarak oldukça popüler bir hale gelmiştir. E-sigara kullanımı; kan basıncı, kalp hızı ve solunum yolu direncindeki artışlar gibi akut fizyolojik etkilere sahiptir (Tablo 2.5). E-sigara kullanımının kronik

etkileri henüz bilinmemektedir. Sigarayı bırakmak için e-sigara kullanımının güvenli ve başarılı olduğuna dair henüz elde edilen güvenilir bir veri yoktur. E-sigaralar akut akciğer hastalığı, atriyal fibrilasyon ve nikotin zehirlenmesine neden olabileceğinden dolayı “güvenli” olarak görülmemektedir.

E-sigara kullanımının başlıca klinik etkileri arasında; mide bulantısı, kusma, baş ağrısı, baş dönmesi, boğulma, e-sigaraların patlamaları sonucu yanık yaralanmaları, üst solunum yolu tahrişi, kuru öksürük, göz kuruluğu, mukus zarı, sitokinler ile proinflatuar mediyatörlerin serbest bırakılması bulunmaktadır. Bunlara ek olarak alerjik solunum yolu inflamasyonu, akciğerlerde solunumla ekspire edilen nitrik oksit (FeNO) sentezinin azalması, bronşiyal gen ekspresyonunda değişiklik ve akciğer kanseri riski de bulunmaktadır¹⁴². Bunun yanı sıra nikotinin deriden, mukoz membrandan, solunum yolundan ve gastrointestinal sistemden hızla emilimi gerçekleşmediği de bilinmektedir¹⁴⁸.

Tablo 2. 5. E-sigaranın akut fizyolojik etkileri

Parametre	Etkiler
Serum CO seviyesi	Birbiriyle çelişen çalışmalardan dolayı serum CO'su üzerine kesin bir etkisi olduğu söylenemez ^{83,149}
Diyastolik kan basıncı	Diyastolik kan basıncında artış ¹⁵⁰
Sistolik kan basıncı	Sistolik kan basıncında anlamlı olmayan bir artış ¹⁵⁰
Ventriküler sistolik ve diyastolik fonksiyon	Herhangi bir etki gözlenmemiştir ¹⁵⁰
Kalp hızı	5 ve 10 dakikalık kullanımdan sonra anlamlı derecede bir artış gözlemlenmiştir ^{83,149}
Kan sayımı	Lökositlerde herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir. ^{151,152}
Ekshale edilen nitrik oksit miktarı	Kullanımdan kısa süre sonra anlamlı derecede azalma gözlemlenmiştir ^{104,153}
Solunum direnci (periferik solunum yolu akış direncinin bir belirtisi olarak)	Anlamlı derecede artış gözlemlenmiştir (% 18) ¹⁰⁴
Solunum yolu direnci	Nikotin barındırmayan e-sigara tüketenlerde dahi anlamlı derecede artış gözlemlenmiştir ^{154,155}

2.1.10. Nikotin dışındaki kimyasal maddelere maruz kalma

Nikotinin yanı sıra tütüne özgü nitrosaminler, tütün alkaloidleri, aldehitler, metaller, uçucu organik bileşikler, polisiklik aromatik hidrokarbonlar, değişik aromalar, çözücüler ve ilaçlar gibi pek çok madde de e-sigara solüsyonlarında tanımlanmıştır¹⁵⁶.

Aerosollerde ve e-sigara kartuşlarında rapor edilen metaller arasında kadmiyum, nikel, kurşun, krom ve arsenik de bulunmaktadır¹⁵⁷. Bir raporda e-sigara solüsyonunda bulunan nikel seviyesinin normal bir tütün sigarasında bulunandan 100 kat daha yüksek olduğu belirtilmiştir¹⁵⁸. E-sigara aerosolünde karbonil bileşikleri de rapor edilmiştir¹⁰⁰. Her bir e-sigara markasının içerdiği sıvı bileşimi farklılık gösterebilir, bu durumda bu cihazların potansiyel toksik özelliklerini genelleştirmeyi zorlaştırmaktadır.

2.1.11. E-sigarada pasif içicilik (ikinci el maruziyeti)

E-sigaraaların içerdiği e-likitlerden nikotine maruz kalma; aerosol haline getirilmiş e-likitin doğrudan kullanıcı tarafından solunmasıyla, bu aerosole ikinci el maruziyet ile veya üçüncü el maruziyet olarak da adlandırılan yüzeylerde biriken emisyonlar ile ya da nikotin içeren e-likit ile etkileşim yoluyla gerçekleşmektedir²⁶.

Normal tütün sigaralarının içildiğinde etrafa yaydığı dumanın aksine e-sigara kullanımı sonunda aerosol olarak da adlandırılan ve içerisinde e-likitte bulunan maddeleri partiküler halde barındıran bir buhar havaya salınır. Havaya salınan bu parçacıkların miktarı ve içeriği hakkında bilgi edinebilmek ve pasif içicilerin bu durumdan ne kadar etkilendiğini belirleyebilmek için hava ile taşınan bu parçacıkların spesifik olarak çalışılması gerekmektedir. İç ortamda e-sigara kullanımının ortama ciddi miktarda aerosol ve nikotin salınımına neden olduğu rapor edilmiştir¹⁵⁹⁻¹⁶¹. Bu konuda yapılmış olan bir çalışmada, farklı konsantrasyonlarda nikotin içeren aerosollerdeki nikotinin iç ortama salınımını 538-8770 ng/l olarak belirlemişken bu oran normal bir sigara tüketiminde 5039-48050 ng/l olarak rapor edilmiştir¹⁶². Nitekim Pellegrino ve arkadaşları e-sigaraalarda bulunan aerosol kaynaklı partiküllerin emisyonlarının normal sigara dumanından yayılan emisyonlardan 15 kat daha düşük olduğunu bulmuşlardır. Ancak normal sigaraya göre düşük emisyon seviyesine rağmen bulunan emisyon değeri Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'nun belirlediği hava kalitesi değerlerini aşmaktadır¹²⁵. Buna ek olarak, e-sigara ile yapılan kapalı ortam çalışmaları ortama salınan e-sigara buharındaki partiküllerin yüzeylere de çöktüğünü ve bu şekilde üçüncü el olarak da adlandırılan bu kimyasallara maruziyete sebep olduğunu kanıtlamıştır¹⁶³.

2.1.12. E-sigaraaların sigarayı bıraktırmadaki rolü

Normal sigara tüketimi, yılda tahmini olarak 480.000'den fazla kişinin ölümüne yol açmaktadır. 40 yaşından önce sigaranın bırakılması tütüne bağlı hastalıklardan ölüm

riskini %90 oranında azaltmaktadır^{164,165}. Normal sigara kullanımına bağılı olarak gün geçtikçe artan ölüm oranlarını azaltma isteğı, elektronik sigara gibi daha güvenilir, sağılıklı ve sigarayı bırakmaya yardımcı alternatiflerin bulunması ihtiyacını ortaya çıkarmıştır¹⁶⁶.

Dünya Sağılık Örgütü'ne göre, e-sigaranın geleneksel sigaraların yerine kullanılması ya da sigara bırakma sürecine yardımcı olarak kullanılabileceğı ile ilgili olarak herhangi bir bilimsel kanıt yoktur. E-sigaralar; onaylanmış nikotin replasman tedavilerinden (nikotin bandı, nikotin sakızı ve pastiller gibi) farklı olarak nikotini doğrudan akciğerlere iletir, bu nedenle e-sig üzerine daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır⁶⁸.

Farklı e-sigara markalarının karşılaştırılması sonucu e-sigara kartuşlarında farklı konsantrasyonlarda nikotin içeriğı ve buna bağılı olarak da değışen aerosol içeriğı olduğı ortaya konulmuştur. Bu e-sigaraların solüsyonlarındaki veya kartuşlarındaki nikotin konsantrasyonu, kullanıcının tercihine göre 0 ila 36 mg/ml arasında değışmekle birlikte "JUUL" gibi e-likit içeriğı kullanıcı tarafından ayarlanamayan kapalı sistemlerde nikotin konsantrasyonu 50 mg/ml'yi bulmaktadır²¹. Ayrıca e-sigara kullanımından sonra, kullanıcıların plazma nikotin seviyeleri ölçülmüş ve yapılan bir çalışmada kullanıcıların hiçbirinde plazma nikotin seviyesinin değışmediğı bulunmuşken^{83,167}, yapılan diğeri bir çalışmada ise kullanıcıların sadece 1/3'ünde plazma nikotin seviyesinin değışmediğı ortaya konmuştur⁸¹. Buna rağmen düzenli olarak e-sigara kullanıcılarında plazma nikotin seviyelerinde artış gözlenebilirken¹⁶⁸, serum kotinin seviyesinin bireyler arasında değışiklik gösterdiğı bulunmuştur⁸⁷.

Elektronik sigaraların sigarayı azaltma da ya da bırakmadaki rolü ile ilgili olarak yayınlanan veriler birbiriyle çelişmektedir. Bugüne kadar yapılan küçük ölçekli deneyler sigarayı bırakmada elektronik sigaraların herhangi bir olumlu etkisi olduğunu göstermemiştir^{81,169,170}. Her ne kadar üreticiler e-sigaraları piyasaya normal sigarayı bırakmaya yardımcı cihazlar olarak pazarlasalar da e-sigaralar sağılık kuruluşları tarafından onaylanmamıştır ve bu cihazların sigarayı bırakmada gerçekten başarılı olduğuna dair herhangi bir kanıt da Dünya Sağılık Örgütüne (DSÖ) henüz sunulmamıştır.

Anketler ve gözlemsel veriler çelişkili sonuçlar ortaya koymuştur. Yapılan büyük ölçekli bir anket çalışması 10 aylık bir e-sigara kullanımı sonrası sigarayı bırakma oranının %81 oranında başarılı olduğunu rapor etmiştir¹⁷¹. Başka bir anket ise, 12 aylık

e-sigara kullanımının, başka herhangi bir nikotin replasmanı kullanmadan, sigarayı bırakmak için yeterli olduğunu belirtmiştir¹⁰. Son zamanlarda sigara içenler ve e-sigara kullananlar üzerinde yapılan uzun süreli bir araştırma göstermiştir ki e-sigara kullananların sigarayı bırakma oranlarının normal sigara içenlerle ya da sigara içip e-sigarayı da sadece birkaç kez deneyenlere kıyasla 6 kat daha fazla olduğu bulunmuştur¹⁷². Buna karşın, sigarayı bırakma amacıyla e-sigara kullanan kanser hastaları üzerinde yapılan bir araştırmada, bu hastaların kanser teşhisinden sonra yeniden sigara içme oranlarının hiç sigara içmeyenlere kıyasla iki kat daha fazla olduğu rapor edilmiştir. Yine aynı çalışmada e-sigara kullanıcılarının daha fazla nikotin bağımlısı olduğu bulunmuştur¹⁷³. Ayrıca, Kore merkezli yapılan bir Web tabanlı araştırma, hâlihazırda sigara içenlerin sigara içmeyenlere göre e-sigara kullanma olasılığının daha yüksek olduğunu göstermiştir.

Yapılmış olan bu çalışmalar ile sadece e-sigara kullanımının ya da e-sigara ile normal sigaranın birlikte kullanımının, normal sigarayı bırakma olasılığını azaltabileceği göstermektedir¹⁷⁴.

2.1.13. E-sigara toksisitesi

E-sigarayla ilgili olarak, içerdiği toksinlerin akciğerlere iletilmesinde kullanıcının e-sigara içme davranışıyla birlikte, e-sigaranın dizaynı ile e-likitin içeriği ve bu içeriklerin konsantrasyonları da etkili olmaktadır²¹. Bu toksinlerin sisteme girişi ve birikim yapması neticesinde akut veya kronik olarak toksik etkiler ortaya çıkmaktadır.

E-sigaralarla ilgili bildirilen yan etkiler genellikle hafif ila orta derecede olup geçicidir. Buna rağmen, e-sigara maruziyetine bağlı sağlık kontrol merkezlerinin aranması gün geçtikçe artmaktadır¹⁴⁸. Bildirilen belirtiler; bulantı, kusma, ağız ve solunum yolu irritasyonu, göğüs ağrısı, baş ağrısı, öksürük, terleme, halsizlik, diyare ve çarpıntıları içermektedir^{87,175}.

2.1.13.1. Solunum sistemi üzerine etkileri

E-sigaranın içerdiği çeşitli kimyasal maddeler ve çok küçük parçacıklar farinkste, alt ve üst solunum yolu sisteminde kuru öksürüğe neden olduğu yapılan bazı çalışmalarda rapor edilmiştir⁷⁷. Buna ek olarak glükolün, gliserol buharlarının ve e-sigaraların buhar

bileşenlerinin da kuru mukoz membrana ve üst solunum yolu irritasyonuna neden olduğu bilinmektedir¹⁷⁶.

E-sigara başlıca bir solunum irritantı olan propilen glikolü içerir. Bir e-sigara buharının kısa süreli pulmoner etkisi normal bir sigara dumanının etkisine benzer olmakla birlikte, bu buhar bronko-restriksiyona neden olur. Markaların çoğu bitkisel gliserin içerir ve e-sigarada bulunan bu madde nedeniyle lipoid pnömoni vakası bildirilmiştir¹⁷⁷. Marini ve arkadaşları¹⁵³, elektronik ve tütün sigaraları tarafından üretilen aerosollerin solunmasının ekspire edilen havadaki demir nitrik oksit düzeyi (FeNO) üzerindeki kısa süreli solunum etkilerini karşılaştırmışlardır. Her sigara/vaping seansından sonra ölçülen ortalama FeNO değerleri nikotin içermeyen e-sigara için; 3.2 ppb, nikotin içeren e-sigara için 2.7 ppb ve tütün sigarası için ise 2.8 ppb olarak bulunmuştur. Nikotin seviyesinin akciğerlerdeki nitrik oksit (NO) sentezini azalttığı ve solunum yolu empedansı ile solunum yolu direncini de arttırdığı belirlenmiştir¹⁷⁸.

E-sigara içiminin toksik ve karsinojen etkileri olduğu bilinmektedir⁷⁷. Akciğer malignite riski taşıyan ve sigara içenlerde bulunan bazı mutasyonları içeren insan bronşiyal hücreleri üzerinde yapılan çalışmalar, e-sigara, normal sigaraya benzer şekilde gen ekspresyonunda değişiklik meydana getirdiğini ortaya koymuştur¹⁷⁹. Lim ve Kim, e-sigara kartuşlarında bulunan ve nikotin içeren solüsyonun solunmasının, solunum yollarında eozinofiller de dahil olmak üzere, inflamatuvar hücrelerin infiltrasyonunu artırarak astım semptomlarını şiddetlendirdiğini rapor etmişlerdir¹⁸⁰. Bu durum, IL-4, IL-5, IL-13 ve IgE üretiminde artışa neden olarak alerjik solunum yolu inflamasyonunu ve solunum yolu aşırı duyarlılığını da artırabilir¹⁸⁰.

2.1.13.1.A. Akciğerler üzerine etkisi

E-sigara güvenliği ya da e-sigara uzun süreli kullanımının sağlık üzerindeki etkileriyle ilgili olarak literatürde sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Her cihazın veya vaping sıvısının kompozisyonu hakkında çok az bilgi mevcuttur, bu nedenle sağlık görevlileri e-sigara bileşenlerinin akciğerler üzerine etkilerini bilmemekle birlikte kanser riskini de belirleyememektedirler.

E-sigaranın akciğerler üzerine olan belirlenmiş yan etkileri vaka raporlarına ve e-likitte bulunan kimyasallarla ilgili olarak bilinen etkilere dayanmaktadır. E-likitin birincil ve en önemli içeriği olan propilen glikole maruz kalmak, genel olarak FDA tarafından

güvenli olarak kabul edilmesine rağmen üst ve alt solunum yolu mukozasında tahrişe neden olabilmektedir. Nitekim e-sigara içilmesinden 1 saat sonra eozinofilik pnömoni vakası bildirilmiştir¹⁸¹. Hastada antibiyotik ve steroidlerle tedavisi sonucu iyileşme gözlenmiştir. Aynı zamanda yine e-likitte bulunan bitkisel gliserine bağlı olarak gözlenen bir lipoid pnömoni vakası bildirilmiştir. Bu hastanın semptomları ve akciğer grafisinin, e-sigara kullanımını bıraktıktan sonra normale döndüğü rapor edilmiştir⁹⁷. Bir başka olgu sunumunda subakut bronşiyolit ile e-sigara kullanımı arasındaki ilişki tarif edilmiştir. Buna göre hastada görülen tüm semptomlar ve pulmoner fonksiyon testleri herhangi bir tedavi uygulanmaksızın e-sigara kullanımının bırakılmasının ardından bazal seviyesine geri dönmüştür¹⁸². Yaygın olmamakla birlikte, bu vakalar e-sigara beklenmedik ve potansiyel olarak ciddi yan etkilerine işaret etmektedir.

2.1.13.1.B. Solunum Sistemi hücreleri üzerine etkileri

Solunum sistemi hücrelerinin e-sigara aerosollerine maruziyetini inceleyen prelinik araştırmalarda genellikle "hava-sıvı ara yüzeyi" olarak da adlandırılan bir metot kullanılmaktadır. Bu metot, bazal yüzeyi sıvı mediaya bakarken apikal yüzeyi ise hava ile temas halinde olan hücrelerin, apikal yüzeyinin belirli uzunluktaki sürelerle e-sigara aerosollerine maruz bırakılması prensibine dayanmaktadır^{178,183,184}. Diğer araştırmacılar ise farklı bir metot uygulayıp hücrenin apikal yüzüne aerosolü eklemek yerine, emici özelliğe sahip bir pete e-sigara aerosolünü iyice emdirilip, daha sonra tamponlu tuz çözeltisi (PBS) veya hücre ortamının içerisinde iyice seyrelterek hücreleri bu aerosollere maruz bırakmışlardır^{185,186}. Ancak e-sigara cihazlarının ve ürettikleri aerosollerinin farklılığı nedeniyle araştırmalarda kullanılan metotlar sadece bununla sınırlı kalmayıp çeşitlilik göstermektedir.

Yapılan bir çalışmada, e-sigaralardaki açık ve kapalı sistem e-likitlerden üretilen aerosollerin insan akciğer hücreleri üzerinde herhangi bir sitotoksik etkisi bulunmamıştır¹⁸⁵. Yapılan bir diğer çalışmada ise, e-sigara aerosolü ve sigara dumanı hücre kültürü mediasında farklı konsantrasyonlarda sulandırılarak, kültürü yapılmış fare fibroblast hücrelerine uygulanmış ve hücreler 24 saat inkübe edilmiştir. Sigara dumanıyla sulandırılan medianın hücreler üzerindeki sitotoksik etkisi (hücre canlılığında < %70'den oran sitotoksik etkinin olduğu anlamına gelir) %12.5'ten daha yüksek konsantrasyonlarda gözlenirken, e-sigara aerosolünün sitotoksik etkisi ise

mediada %100 konsantrasyonda gözlenmiş olup bu durum e-sigara aerosolünün sigara dumanının sitotoksik etkisinden daha az toksisite gösterdiğini ortaya koymuştur¹⁸⁶.

Yapılan pek çok çalışma ile hücrelerin e-sigara aerosollerine maruz kalması sonucunda oksidatif stres düzeyinin arttığı ve bu e-sigara aerosolüne maruz kalıdıktan 24 saat sonra alınan ölçümlerin kontrole (hava) kıyasla epitelyal hücre canlılığını azalttığı ortaya konmuştur^{183,184}. Aerosolize e-sigara likittine nikotin eklenmesinin, bazı çalışmalarda oksidatif stresi arttırdığı bulunmuşken¹⁸⁴ diğerlerinde ise düşürdüğü belirlenmiştir¹⁸³. Yine yapılan bir çalışmada herhangi bir sitotoksik, genotoksik veya inflamatuvar etki bulunmazken¹⁸⁵, bir başka çalışmada ise e-sigara aerosolüne maruz kaldıktan sonra hücre canlılığında çok az bir azalma olduğu gözlemlenmiştir¹⁸⁶.

Klinik bir çalışmada deneklere açık sistem kartuşu bulunan e-sigaradan; negatif kontrol grubuna likit olmadan, diğer gruplara 0 mg/ml nikotin içeren e-likit (nikotinsiz) veya 18mg/ml nikotin içeren e-likit aerosolü 5 dakika boyunca inhale ettirilmiş ve bu deneyde pozitif kontrol olarak normal sigara kullanılmıştır¹⁵³. Güçlü bir vazodilatatör olup kan dolaşımı için de oldukça büyük bir öneme sahip olan NO'nun ekspire edilen değeri deneklerin inhalasyonundan önce ve sonra ölçülmüş olup, normal sigara içenlerde ve diğer gruplarda ekspire edilen NO değerinin azaldığı belirlenmiştir¹⁸⁷. Negatif kontrol grubunda ise ekspire edilen NO oranında anlamlı bir değişiklik meydana gelmemiştir¹⁵³.

2.1.13.2. Kardiyovasküler sistem üzerine etkileri

E-sigara kullanımı, kalp atış hızını ve kan basıncını arttırmakla birlikte kalp hastalığı riski taşıyan veya risk altında olan kişilerde kardiyak olaylara ve aritmilere neden olma potansiyeline sahiptir. Buna rağmen, kardiyak fonksiyonların ekokardiyografik değerlendirilmesini içeren çalışmalarda e-sigara kullanımından sonra kalp fonksiyonlarında herhangi bir değişiklik gözlenmediği bildirilmiştir¹⁵⁰. Sadece 70 yaşında bir kadın hastada e-sigara kullanımı ile paroksizmal atriyal fibrilasyon arasında bir ilişki olduğu bildirilen bir vaka bulunmaktadır¹⁸⁸. Şimdiye kadar tahmin edilen kardiyak etkilerin çoğunun, e-sigaralarda bulunan nikotine bağlı olduğu düşünülmektedir. Geçmişte dumansız tütün ile ilişkili kardiyak olaylar incelenmiş olmasına rağmen, farklı nikotin iletim mekanizmaları göz önüne alındığında elde edilen verileri e-sigarayla ilişkilendirmek oldukça zordur¹⁸⁹. Şu anda e-sigara kullanımına

bağlı tromboz, trombosit reaktivitesi, ateroskleroz veya kan damarı işlevi hakkında yayınlanmış herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

E-sigara aerosolünün kardiyovasküler sistem üzerindeki etkilerini inceleyen sadece birkaç prelinik çalışma bulunmaktadır. Bu yapılan çalışmalardan birinde, normal sigara dumanı ve 200 mg e-sigara aerosolü 20 ml hücre kültürü medyasında çözülüp, tek tabakalı H9C2 kardiyomyoblast hücreleri üzerindeki etkileri test edilmiştir¹⁹⁰. Yapılan bu çalışmada yirmi farklı aroma, konsantrasyonları 6-24 mg/ml arasında değişen nikotin miktarı, farklı PG/VG oranları ile kullanılan ve batarya gücü 3.7-4.5 V arasında değişen e-sigara cihazları test edilmiştir. Ayrıca belirli oranlarda (%100, %50, % 25, %12 ve %6,5) dilüe edilen e-sigara aerosolü ile sigara dumanının hücreler üzerindeki etkileri karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak; 4.5 V'lik bir e-sigaradan üretilen aerosollerin, 3.7 V'lik bir e-sigaradan üretilen aerosole göre hücre canlılığında daha fazla azalmaya yol açtığı bulunmakla birlikte sigara dumanının tüm dilüsyonlarda sitotoksik olduğu gösterilmiştir. Bazı e-sigara aerosollerinin ise sadece daha yüksek konsantrasyonlardaki dilüsyonlarda sitotoksik olduğu rapor edilmiştir. Bu bulgular, solunum yolu hücre kültürü deneylerinde olduğu gibi, e-sigara aerosolünün kardiyomyoblast hücrelerinde de sigara dumanından daha az toksik olduğunu, ancak aerosolün üretildiği cihazın güç çıkışına bağlı olarak hücre canlılığında bazı değişiklikler olabileceğini göstermektedir²¹.

Yapılan bir başka çalışmada ise e-sigara aerosolü ile sigara dumanının hem *in vivo* hem de *in vitro* da etkileri incelenmiştir¹⁹¹. Bu çalışmada e-sigara aerosolü içeriğinde 16 mg/ml nikotin olan e-likitten üretilmiştir. Araştırmacılar, kalp sisteminin gelişimini incelemek için zebra balığı (*Danio rerio*) ve kardiyak farklılaşmayı incelemek için de insan embriyonik kök hücrelerini kullanmış olup, hem e-sigara aerosolünün hem de sigara dumanının gelişimsel kusurlara, kalp malformasyonlarına, perikardiyal ödem ve azalmış kalp fonksiyonuna neden olduğunu bulmuşlardır¹⁹¹. *In vitro* modelde, hem e-sigara aerosolünün hem de sigara dumanının, kardiyak transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonunu azalttığı ve bu durumun hücrel farklılaşmada gecikmeye neden olabileceği bulunmuştur¹⁹¹. Ayrıca normal sigara dumanının *in vitro* da daha fazla negatif etkiye sahip olduğu bu nedenle e-sigara aerosolünden daha toksik olduğu rapor edilmiştir¹⁹¹. Tüm bu sonuçlar birlikte ele alındığında e-sigara aerosolünün zararlı

etkileri olduğunu göstermekte, ancak bu etkilerin normal sigara dumanının etkileriyle kıyaslandığında daha az şiddette olduğu belirlenmiştir²¹.

Yapılan klinik çalışmalarda, sigara içilmesi sonucu ortaya çıkan etkilere benzer şekilde e-sigara kullanımında da, muhtemelen nikotinin etkilerine bağlı olarak, kalp atış hızının ve kan basıncının yükseldiği ortaya konmuştur²¹. E-sigaranın ortaya konan bu akut etkilerine rağmen kardiyovasküler sistemi üzerine uzun vadeli etkileri hala bilinmemektedir. Bir çalışmada, 16 mg/ml nikotin içeren kapalı kartuş sistemine sahip e-sigara kullanımının kalp atım hızını, sistolik ve diyastolik kan basıncını arttırdığını, ancak bu artışın normal sigara kullanımına göre daha az seviyede olduğu gösterilmiştir¹⁹². Daha ileri analizler ise plazma nikotin konsantrasyonu ile kalp atım hızı artışı arasında bir ilişki olduğunu ortaya koymuş olup buna bağlı olarak da, kullanıcıya daha fazla nikotin veren e-sigara kalp atım hızını daha fazla arttırması muhtemeldir²¹. Yapılan başka bir çalışmada sigara dumanının ve e-sigara aerosollerinin damar sertliği üzerine olan etkileri araştırılmış ve akut sigara dumanının sigara içenlerde damar sertliğini arttırdığı bulunmuşken e-sigara kullananlarda böyle bir etki gözlenmemiştir¹⁹³. Diğer bir çalışmada ise sigara içenlerde sigara dumanının ve e-sigara aerosollerinin akut ve pasif etkilerine bakılmış, tam kan sayımında herhangi bir farklılık bulunamamışken, sigara dumanının beyaz kan hücresinin, lenfositlerin ve granüositlerin sayısını arttırdığı belirlenmiştir¹⁵².

Sonuç olarak, kardiyovasküler sistem üzerinde yapılan prelinik çalışmalar, e-sigara kullanımından kaynaklanan bazı gelişimsel ve moleküler etkilerin olabileceğini göstermekle birlikte¹⁹¹ bu akut etkilerin normal sigara kullanımının kardiyovasküler sistem üzerinde ortaya çıkardığı akut etkilere kıyasla daha az seviyede olduğu ortaya konmuştur^{152,193}.

2.1.13.3. İmmün sistemi üzerine etkileri

E-sigara kullanımının diğer pek çok sistemde olduğu gibi immünolojik sistem üzerinde de olumsuz etkileri olabileceği düşünülmektedir. Nitekim e-sigara aerosolünde bulunan nikotinin antibakteriyel savunmayı bozduğu^{194,195} ve makrofaj aktivasyonunu değiştirdiği gösterilmiştir¹⁹⁶⁻¹⁹⁸. Fare modeli kullanılarak yapılan bir dizi deneyde, e-sigara aerosolüne maruziyetin; solunum yolu inflamasyonuna, bakteri ve virüslere karşı verilecek olan immünolojik yanıtın ve bakteriyel fagositozisin bozulmasına yol açtığı

belirlenmiştir¹⁹⁹. Yine aynı maruziyetin virüs kaynaklı morbidite ve mortaliteyi arttırdığı da rapor edilmiştir¹⁹⁹. E-sigara aerosolüne maruz kalan farelerin akciğer hücre kültürü deneyleri de defektif bakteriyel fagositozun olduğunu ortaya koymuştur¹⁹⁹.

Schweitzer ve ark. sıçan, fare ve insan akciğer epitel hücre hatları kullanılarak yaptıkları çalışmada; nikotinde dahil olmak üzere e-sigaranın çözünebilir bileşenlerini içeren aerosol maruziyetinin akciğer endotelial bariyer fonksiyonunun bozulmasına, proinflatuar etkilere ve hücre çoğalmasında azalmaya neden olduğu ortaya konmuştur²⁰⁰.

2.1.13.4. Kan hücreleri

E-sigara aerosolünün kan hücreleri üzerindeki etkilerini araştıran bilim insanları *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar yapılmıştır. Nitekim yapılmış olan *in vivo* bir çalışmada araştırmacılar ne aktif e-sigaraya ne de pasif e-sigaraya 30 dakika maruziyetin lökosit, lenfosit veya granülosit sayılarını etkilemediğini rapor etmişlerdir¹⁵².

Sıçanlar üzerinde yapılan yeni bir çalışmada e-sigaranın hematokrit, hemoglobin, eritrosit ve retikülosit sayısını arttırdığı, fakat lenfosit sayısının ise azaldığı gösterilmiştir. Aynı çalışmada, dolaşımdaki nötrofil sayısının ise kontrol grubuna göre 8 kat daha fazla olduğu belirtilmiştir. Bunun yanı sıra, eozinofil, bazofil ve monosit sayılarında artış olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlılık göstermemiştir²⁰¹.

2.1.3.5. Gastrointestinal sistem üzerine etkisi

Nikotini inhale etmek mide bulantısı, kusma ve baş dönmesine neden olabilir. E-sigara, kartuşlarında bulunan yüksek nikotin konsantrasyonları nedeniyle nikotin toksisitesi riskini arttırmaktadır. Bu sigaraların nikotin seviyesi oldukça değişken olmakla birlikte e-likitlerde 14.8 ila 87.2 mg/ml nikotin bulunmaktadır¹⁴².

2.1.3.6. Gözler üzerine etkisi

Yüksek düzeyde nikotin içeren e-sigara ürünlerine, özellikle de e-likitlere kazara maruziyet boğulma tehlikesiyle ilişkili olabilir²⁰². Nikotin yüksek konsantrasyonlarda oldukça toksiktir. Nitekim bir çocuğun e-likiti yutması halinde ya da ciddi miktarda e-likite dermal olarak maruz kalması halinde yaralanma veya ölüm meydana gelebilir²⁰³. Ordenez ve arkadaşları¹⁴², 5 yaş ve altı çocuklarda e-sigara likit zehirlenmesi ile ilgili

79 vaka bildirmiştir. Bu zehirlenmelerin genellikle inhalasyon, dermal maruziyet ve oküler maruziyet yoluyla meydana geldiği belirtilmiştir. Hastalar bulantı, kusma, baş ağrısı ve baş dönmesi semptomlarıyla kliniklere başvurmuştur¹⁴².

E-sigara buharı ya da dumanı gözlerde tahrişe, kızarıklığa ve kuruluğa neden olmaktadır¹⁷⁶. E-likit hızla absorbe edilebilen bir yapıya sahip olduğu için, gözlerin bu e-likitlere maruz kalması çok risklidir ve göz hasarına neden olabilir¹⁴².

2.1.3.7. Merkezi sinir sistemi üzeri etkisi

Nikotin, insanlar tarafından kişisel olarak kullanılabilen ve bağımlılığa yol açabilen psikomotor bir uyarıcıdır²⁰⁴. Nikotin kan-beyin bariyerini geçip beyin çeşitli bölgelerinde bulunan nikotinik asetilkolin reseptörlerine bağlanır. Beyinde bağımlılıkla ilgili ana yapılar; pek çok bölgenin yanı sıra özellikle orta beyinde bulunan ventral tegmental alan, nükleus akumbens ve prefrontal korteksin bir araya gelerek meydana getirdiği ödül yolağıdır²⁰⁵.

Nikotine maruz kalmanın beyinde nöroplastisite değişikliklerine neden olabileceği tespit edilmiştir. Nikotin prenatal dönemde beyin sapı otonomik çekirdek gelişimini engeller, erken postnatal dönemde neokorteks, hipokampus ve serebellumu değiştirir, ergenlik döneminde ise limbik sistemi ve geç olgunlaşmayı etkiler²⁰⁶.

2.1.3.8. Üreme sistemi üzerine etkileri

Bilimsel literatür, nikotinin hem anneye hem de gelişmekte olan fetüse karşı zararlı olduğunu ve fetüsün gelişen sinir sistemini olumsuz etkilediğini ortaya koymuştur. E-sigaranın içerdiği kimyasallar, karbon monoksit gibi iyi belgelenmiş üreme toksinleri olan kimyasalları barındırmaktadır. Zhang ve arkadaşları, sigara içenlerin semen hacimlerinde, sperm motilitelerinde ve sperm canlılığında önemli bir azalma olduğunu; hareketsiz sperm ve semen lökositleri oranında ise artış gözlemlendiğini rapor etmişlerdir²⁰⁷. Sigara içenlerde sperm hareket parametreleri daha düşüktü. Sigara içenlerde normal morfolojiye sahip spermelerin yüzdesinin önemli ölçüde azaldığı, ileri derecede sigara içenlerde ise bu oranın çok daha düşük olduğu belirlenmiştir. Yu ve arkadaşları, sigara içiminin insan sperminde histon-protamin geçişindeki abnormalitelerle ve protamin mRNA ekspresyonundaki değişikliklerle güçlü bir

biçimde ilişkili olduğunu ortaya koymuştur²⁰⁸. Ayrıca, sigara içimi spermelerin plazma membran bütünlüğünü ve buna bağlı olarak da sperm motilitesini azaltır²⁰⁹.

2.1.3.9. Fetal ve adölesan gelişimi üzerine etkileri

E-sigaranın bağımlılığa neden olmasının yanı sıra, e-sigara ile alınan nikotinin hamilelerde fetal gelişim, adölesanlarda ise beyin gelişimi gibi merkezi sinir sistemi üzerinde etkileri mevcuttur²¹⁰⁻²¹².

Nikotin plasentadan geçmekte olup, uterusun nikotine maruziyeti ile ilgili olarak yapılan prelinik çalışmalarda hamilelik sırasında sigara içen annelerin çocuklarında hiperaktivite, bilişsel bozukluk, anksiyete ve nikotin ile diğer uyarıcı ilaçlara duyarlılık gibi davranış bozuklukları gözlemlenmiştir²¹¹. Bu etkiler muhtemelen nikotinin bir asetilkolin agonisti olması nedeniyle gerçekleşmiş olabilir. Çünkü asetilkolin reseptörleri fetal gelişimin çok erken aşamalarında mevcuttur²¹¹. Bu durum nikotinin fetal dönemdeki etkilerinin sadece merkezi sinir sistemi üzerinde olmayıp aynı zamanda uzun dönem etkileri olarak da ortaya çıkan fertilité, tip 2 diyabet, obezite, hipertansiyon ve solunum fonksiyon bozukluğu gibi negatif etkilere de sahip olduğunu ortaya koymaktadır²¹³. Ayrıca nikotin anne sütüne de geçmekte olup negatif etkisini sadece fetüs üzerinde değil aynı zamanda doğum sonrası dönemde yeni doğan üzerinde de gösterebilir²¹³.

Adölesan dönemi ise, merkezi sinir sisteminde yapısal ve nörokimyasal değişiklikler ile davranış değişikliğinin meydana geldiği bir dönemdir²¹². Nikotin maruziyeti bu gelişimsel değişiklikleri çeşitli mekanizmalar yoluyla etkileyebilir. Yapılan bir prelinik çalışmada, adölesan dönemde kronik nikotin maruziyetinin; bazı nikotinic asetilkolin reseptör alt tiplerini azalttığı, uzun dönemde serotonerjik reseptör fonksiyonunu değiştirdiğini ve dopaminerjik aktiviteyi etkilediği rapor edilmiştir²¹².

2.1.3.10. Kanser riski

E-sigara kullanımının kanser riski üzerindeki uzun dönem etkisi bilinmemektedir. Ancak e-sigara kullanıcıları e-likitlerde bulunan ve karsinojenik etkisi olduğu bilinen maddelere maruz kalabilirler. Yapılan bir çalışmada 12 farklı e-sigara markasından alınan aerosol örnekleri ile normal sigara dumanı karşılaştırılmış ve e-sigara aerosolünün normal sigaraya kıyasla daha az oranda toksik madde içerdiği

bulunmuştur⁷⁷. Aynı şekilde e-sigara aerosolünün karsinojenik seviyesinin normal sigara dumanının karsinojenik seviyesinden 9 ila 450 kat daha düşük olduğu bildirilmiştir. Ancak, daha yüksek voltajlı pillere sahip yeni “tank tipi” e-sigara sistemleri kullanılarak yapılan bir çalışmada, bu e-sigaranın kullanıcılarını tütün dumanına eşit ya da daha fazla derecede karsinojenik formaldehide maruz bıraktığı rapor edilmiştir¹⁰⁰. E-sigaradaki atomizer (ısıtma elemanı), e-sigara buharında karbonil bileşiklerinin oluşmasına neden olur^{100,214}. Buharlaştan gliserol ve propilen glikol gibi likit ürünler; formaldehit, asetaldehit, akrolein, glioksal ve metilglioksala oksitlenir. FDA desteğiyle 2009 yılında yapılan bir çalışmada e-sigara buharında, karsinojen olduğu bilinen dietilen glikol ve nitrozamin maddeleri eser miktarlarda bulunmuştur. Dietilen glikol, çözücü olarak kullanılan organik bir bileşiktir ve günümüzde gıda ve ilaçlarda kullanımı yasaklanmıştır. Nitrozamin ise kozmetikte, pestisitlerde ve çoğu kauçuk ürünlerde bulunan bilinen bir karsinojendir.

2.1.3.11. Diğer riskler

Nikotin; deri, mukoza, akciğer ve gastrointestinal sistemden hızla emilir. E-likitlerde bulunan nikotin, ciddi derecede nikotin toksisitesi riski taşıyabilir (Tablo 2.6)²¹⁵. Christensen ve arkadaşları⁷⁰, 3 ml ve belirlenemeyen konsantrasyonda nikotin içen 13 yaşında bir gencin intihar girişimini rapor etmişlerdir. Hastada bulantı ve titreme görülmüştür.

Tablo 2. 6. Elektronik sigara tüketiminin sık rapor edilen belirtilerinin bir özeti

Etki	Belirtiler
Solunum Sistemi	Üst solunum yolu irritasyonu, kuru öksürük, mukus zarının kuruluğu ¹⁷⁶ , burun kanaması, sitokin ve proinflatuar mediyatörlerin salınımı, alerjik solunum yolu inflamasyonu ¹⁸⁰ , ekshale edilen demir nitrik oksit (FeNO) sentezinde azalma
Sinir Sistemi	Baş ağrısı, baş dönmesi, sinirlilik, uyuşukluk, uykusuzluk ¹⁷¹
GIS	Mide bulantısı, kusma ¹⁴² , ağız kuruluğu, ağız veya dil yaraları/inflamasyon, siyah dil, diş eti kanaması, dişeti iltihabı ¹⁷¹ , mide yanması ve kabızlık
Merkezi Sinir Sistemi	Çarpıntı, göğüs ağrısı ¹⁷¹
Göz	Gözde irritasyon, kızarıklık, göz kuruluğu ve göz hasarı ¹⁷⁶
Boğulma Tehlikesi	Yüksek konsantrasyonlarda e-likitin sindirilmesi sonucu ortaya çıkan boğulma tehlikesi ^{202,203}
Malignite	Bronşiyal hücrelerin gen ekspresyonunda değişiklik ve akciğer kanseri riski ¹⁷⁹
Diğer Belirtiler	Nefes darlığı, titreme ²¹⁵

Durmowicz ise e-sigaranın sağlık üzerine etkisiyle ilgili olarak 74 Őikayet raporu alındığını bildirdi²¹⁵. Bu raporlardan üçü e-sigara kartuşunun yutulmasına bağlı olarak bir bebeğin ölümü gibi küçük çocuk vakalarını içeriyordu. Ayrıca, e-sigara kullanımı baş ağrısına, uyuklamaya, uykusuzluğa, baş dönmesine, diş eti iltihabına ve kara dile neden olduğu bildirilmiŐtir¹⁴². Tüm bunlara ek olarak, bazı vaka raporları da; tekrarlayan ülseratif kolit²¹⁶, lipoid pnömoni⁹⁷, akut eozinofilik pnömoni¹⁸¹, subakut bronşiyal toksisite¹⁸², geri dönüşümlü serebral vazokonstriksiyon sendromu²¹⁷ ve kronik idiyopatik nötrofili¹⁵¹ gibi bazı e-sigaraya bağlı sağlık problemlerini ortaya koymaktadır.

Son olarak, iki hafta boyunca e-sigara kullanımı sonucunda kullanıcılarda azalmış karboksihemoglobine ve artan oksijen satürasyonuna ek olarak kullanıcılar tat, iŐtah ve koku alma duyusunda artış, balgamda ise azalıŐ olduğunu rapor edilmiŐtir²¹⁸.

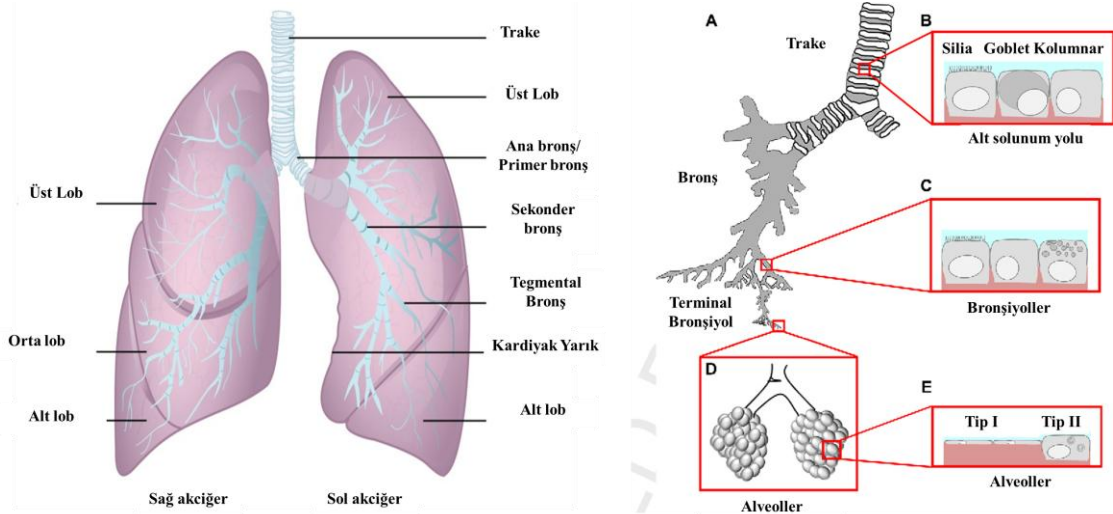
2.2. Solunum Sistemi

İki akciğer ve buraya havayı ulaŐtıran seri solunum yollarından oluşan, dokulara havayı ileten, filtrasyonunu ve gaz değişimini yapan sistemdir. Dokulara oksijeni (O₂) sağlamak ve karbondioksiti (CO₂) uzaklaŐtırmak için akciğer ventilasyonunu, O₂ ve CO₂'nin kanda taşınmasını, alveoller ile kan arasında O₂ ve CO₂ difüzyonunu ve solunumun düzenlenmesi ile pH'nı ayarlanarak homeostazisin devam ettirilmesini sağlar.

Hücre membranı boyunca su ve iyonların geçiŐleri memeli hücrelerinin Şeklinin oluşmasına katkıda bulunur. Bu bölümde aŐıklandıđı gibi hücre hacminin düzenlenmesi oldukça karmaŐıktır ve birÇok fizyolojik süreçler bunu etkilemektedir. Aynı Şekilde, hücreler ekstraselüler ortamın hacminin düzenlenmesinde büyük öneme sahiptir. Bu düzenleme özellikle sıvı tutulumu ile bağlantılı hastalıkların patofizyolojisinden aÇıkça görüleceği gibi büyük önem taşır. Bunlara kistik fibroz (KF), kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOA), ödem, hiponatremi, Liddle sendromu ve salgılı diyare örnekleri verilebilir. Bu kısımda, solunum yolları içerisinde bulunan ekstraselüler sıvı hacminin düzenlenmesindeki önem ve solunum yolunu döŐeyen epitelyal hücrelerinin ekstraselüler solüt ve solventlerin düzenlenmesindeki rolleri aŐıklanacaktır.

2.2.1. Akciğerlerin anatomisi

Pulmoner sistem oksijen alımını ve karbondioksit atılımını düzenler. Böylece gaz değişimi sağlanmaktadır. Bu gazların değişim işlemi, vücudun metabolik ihtiyaçlarını karşılamak için yeterli O₂'nin mevcut olmasını ve solunum asidozunu önlemek için CO₂ atıklarının giderilmesi için hayati öneme sahiptir. Solunum yolu anatomik olarak üst (nazofarengial) ve alt (trake, bronş ve bronşiyoller) solunum yolları ile alveoller alan olarak ayrılmaktadır (Şekil 2.7). Fonksiyonel olarak pulmoner sistem, gaz değişimi daha hassas solunum bölgesinde gerçekleşmeden önce havanın sterilize edilmesi, detoksifiye edilmesi ve nemlendirilmesi için işlev gören iletim ve solunum bölgelerine ayrılabilir. Solunum yolu yaklaşık olarak 21-23 kez ikili dallanma gösterir. İletim solunum yolları kıkırdaklı trakea ve submukozal bezleri içeren bronşların yanı sıra terminal bronşiyollerini içerir. Bunlar solunum ağacının 17. dalına yakındırlar ve gaz alışverişinde yer almazlar. Sonrasında solunum bronşiyollerini, alveoler kanallar ve alveoller gelir. En uçta yerleşmiş olan alveoli yoğun bir kılcal ağ ile çevrilidir. Alveoller, bu kılcal ağ sayesinde kendi kan akışına sahip olmakla birlikte gaz alışverişinin de gerçekleştiği alanlardır. Alveollerin geniş olan ve genişleyebilme özelliğine sahip yüzey alanı ile pulmoner endoteliye yakınlığı, verimli bir gaz değişimi için önemlidir.



Şekil 2. 7. Akciğerlerin yapısı. A: Solunum yollarının dallanması, B: Siliyalı, goblet hücreleri, C: Bronşiyoller, Siliyalı, goblet hücreleri, D: Alveoller, Tip I ve Tip II hücreler

2.2.2. Epitelyal heterojenlik

Diğer organlar gibi solunum yolu lümeni de salgılarıyla birlikte dış dünya ile temas halinde olan ve inhale toksinlere ve patojenlere karşı bariyer görevi gören bir epitel

hücre hattı ile kaplıdır. Solunum yolu epitelinin normal şartlar altında 100 gün gibi nispeten yavaş bir yenilenme süresi vardır.

Büyük solunum yolları yalancı çok katlı yüzey epitelini içermekle birlikte submukozal bezlere de sahiptir. Daha distalde bulunan bronşiyoller ise basit kübik epiteldir. Trake ve bronş epitelleri genel olarak silyalı hücrelerden, goblet hücrelerinden ve bazal hücrelerinden oluşmuştur (Şekil 2.7C). Silyalı hücreler, apikal hücre membranından solunum yolu yüzey sıvısına (SYYS) uzanan tüy benzeri mikrotübül esaslı organelleri olan siliyaları barındırır. Siliyar atım, ileri ve geri vuruşlar ile solunum yolu yüzey sıvısının ve mukusun mukosilyar sıvıda itilerek önce solunum yoluna, en sonunda da atılmak üzere ağıza doğru itilmesi ile gerçekleşir. Goblet hücreleri, silyalı hücreler arasına yerleşmiş müsin içeren hücrelerdir. Normal koşullar altında büyük solunum yolunun yaklaşık %80'i silyalı hücrelerden %20'lik kısmı ise goblet hücrelerinden oluşmaktadır. Bununla birlikte, kronik inflamasyon sırasında, goblet hücresi metaplazisi oluşursa bu oran tersine çevrilebilir. Submukozal bezler ise büyük solunum yollarının yüzeyinde bulunur. Submukozal bezlerin hem silyalı hücreleri hem de seröz hücreleri iyon ve sıvı salgılanmasına katkıda bulunur. Solunum yolundaki epitel doku, büyük solunum yolundan küçük solunum yoluna ilerlerken solunum yolu epiteli, yalancı çok katlı silindirik epitelten basit silindirik epitel fenotipine dönüşür. Örneğin iletimi sağlayan bronşlar ve bronşiyollerde müsin salgılayan goblet hücreleri silyasız epitelyada baskındır. Bronşiyollerin solunum bronşiyollerine geçişi sırasında Clara hücreleri belirlemeye başlar. Clara hücreleri, solunum bronşiyollerinde sürfaktan benzeri salgı üreten, mukussuz ve solunum yolunun basit kübik epitel kısmında bulunan hücrelerdir. Clara hücrelerinin görevleri tam olarak bilinmemesine rağmen birçok araştırmada çeşitli fonksiyonları tanımlanmıştır. Clara hücrelerinde sentezlenen ve salgılanan 10000 dalton ağırlığındaki "Clara hücresi spesifik proteini 1" isimli proteinin lokal inflamasyonu ve immün reaksiyonların düzenlenmesinde rol aldığı düşünülmektedir. Aynı zamanda sürfaktan benzeri apoproteinleri salgılayarak yüzey gerilimini azalttığı belirtilmektedir. Bunlara ek olarak hasarlanmış bronşiyolar epitelin rejenerasyonunda progenitör hücre görevi gördükleri düşünülmektedir.

Alveollerde sadece iki tip hücre mevcuttur: basit alveoler epitel Tip I ve kübik alveoler epitel Tip II hücreleridir. Tip I hücreleri alveoller çevreleyen kılcal ağa yakın yerlerde bulunurlar ve O_2/CO_2 'nin difüzyonunu ve değişimini kolaylaştırmak için son derece

ince bir yapıya sahiptirler. Tip II hücreleri, alveolün sönmesini engellemek ve respirasyon sırasında alveolün genişlemesini sağlamak amacıyla pulmoner sürfaktanın sekresyonundan sorumludur. Buna ek olarak, Tip II hücreleri kök hücre benzeri özellikler taşımakla birlikte gerektiğinde hasar görmüş Tip I hücrelerinin yerini alıp çoğalabilir.

2.2.3. Solunum yolunda transselüler ve paraselüler taşınım

Solunum yolu epiteli interstisyel sıvı dolu bölme ile hava dolu solunum yolu arasında bir bariyer görevi görür. Bununla birlikte, iyonların ve suyun, solunum yolu yüzey sıvısının kompozisyonunu ve hacmini düzenlemek için bu bariyerden geçmesi gerekir. Bu nedenle iyonlar ve su solunum yolu epitelyal bariyerini transselüler ve paraselüler yollar olmak üzere iki yoldan geçebilir. Transselüler yol; iyonlar ile suyun, bazal ve apikal membrandan bir dizi ATP harcayan pompalar, sekonder aktif taşıyıcılar ve pasif kanallar boyunca hareketlerini içerir. İyonların paraselüler hareketi ise transselüler yolun aksine komşu hücreler arasındaki hücreler arası bağlantı ile gerçekleşir. Pulmoner epitelinin transselüler ve paraselüler yolları birlikte solunum yolu yüzey sıvısı (SYYS)'nin içeriğini ve hacmini düzenler.

İnterselüler bağlantılar; sıkı bağlantılar, adherens okludens bağlantıları, neksuslar (gap junction) ve desmozomlar olmak üzere dört farklı türde bulunurlar. Sıkı ve adherens bağlantıları birlikte epitelyal polariteyi sağlayarak apikal ve bazolateral kompartımanları böler. Neksuslar (gap junctionlar) ise interselüler iletişimi sağlarken desmozomlar hücreleri bir arada tutmaya yardımcı olur. Sıkı kavşaklar apikal olarak lokalizedir ve okludin ve çeşitli klaudin proteinleri içeren multimerik protein komplekslerinden oluşur. Solunum yolunda klaudin 1, klaudin2, klaudin3, klaudin4, klaudin5, klaudin7 ve klaudin 8 dahil olmak üzere çeşitli klaudin izoformları tanımlanmıştır. Farklı klaudin proteinlerinin spesifik ekspresyonu, solunum yolu sıkı bağlantılarının farklı iyonlara nispi geçirgenliğini belirler. Örneğin, klaudin 2 katyon seçicidir, klaudin 7 anyon seçicidir. Klaudin 1 ise bariyeri oluşturur. Solunum yolu epitelyasının elektriksel olarak sızdıran sıkı bağlantılara sahip olması suya, anyonlara ve katyonlara karşı oldukça büyük bir geçirgenlik sağlar. Bu fenotipik özellik izotonik bir YYS'nin sürmesini sağlamakla beraber hem absorpsiyon hem de sekresyonun gerçekleşmesi için hayati bir önem taşır. Yeni izole edilmiş insan bronşiyal epiteli yaklaşık 100 ohm cm² transepitelyal resistansa sahipken, primer insan bronşiyal

epitelyal kùltürleri 300 ohm cm² transepitelyal resistanta sahiptir. Buna karşılık, çok pasajlı solunum yolu kùltürleri 1000 ohm cm²'yi aşan yükseklikte ve fizyolojik olmayan bir transepitelyal resistans gösterirler. Epitel bariyer bütünlüğünün değişimi ya da kaybı; solunum sıkıntısı sendromuna ve akut akciğer hasarına neden olabilmektedir. Benzer şekilde; pnömokokal pnömoni sırasında seçici bir şekilde hücre içi bariyer kaybı gözlenmiştir. Bu durum da bağlantı proteinlerinin bozulmasına ve serozal alandan mukozal alana kontrol edilemeyen su ve iyon hareketlerine yol açar.

2.2.4. Submukozal bezler

Submukozal bezler, çoğunlukla kıkırdaklı büyük solunum yolunda lokalize olup, SYYS hacim homeostazına ve bileşimine katkıda bulunmak için iyon, su, mukus ve diğer proteinleri salgılar. Submukozal bezler, her biri farklı bir fizyolojik işlevi olan dört ayrı bölgeye sahiptir. Distal olarak submukozal bezler; iyonları, sıvıları, antimikrobialleri ve diğer proteinleri salgılayan seröz asinini ve tübüleri içerir. Salgılanan akışkanlar solunum yolu lümenine doğru ilerlerken mukoza tübüleri yoğun biçimde paketlenmiş granüllerin ekzositozu yoluyla yüksek moleküler ağırlıklı mün moleküllerini de bu yola ekler. Sıvı ve mukus, submukozal salgının bileşimini değiştirmek için silyasız, uzun tübülerde toplanır. Submukozal bezin dördüncü ve en proksimal bölgesi solunum yolu epitelinin bir uzantısıdır ve silli epitel içerir.

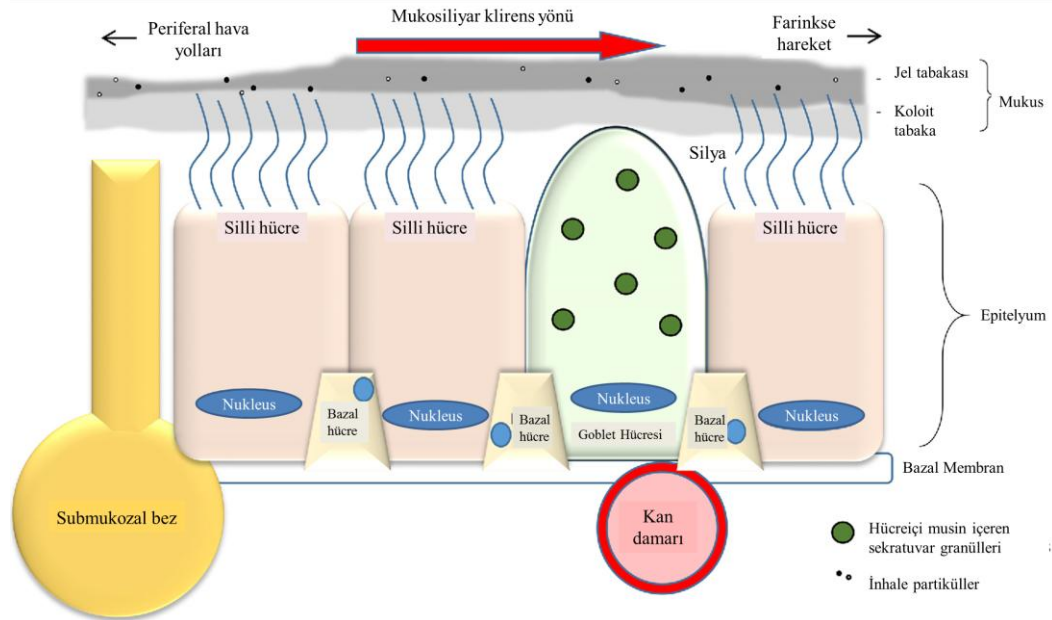
Submukozal bezler parasempatik sinir sistemi tarafından innerve edilir. Seröz ve mukoza hücrelerinin daha önce seçici ve kombinasyon halinde uyarılmaktadır. Ne seröz ne de muköz hücrelerdeki sıvının iyon bileşimi ve vizkozitesi muskarinik uyarılar ile değişmemektedir. Alternatif olarak, α -adrenerjik ve β -adrenerjik stimülasyonun sırasıyla seröz ve mukoza hücreleri için seçici olduğu, bu durumun da düşük ve yüksek viskoziteli ve protein içerikli bir sıvı üretmek için salgılanan sıvı kompozisyonunu değiştirdiği bildirilmiştir. Bu nedenle epitel dokunun hem siliyalı hem de goblet hücreleri ile submukozal bezlerin, büyük solunum yolunda hızlı bir şekilde ek SYYS hacmi sağlayıp mukus klirens oranını artırarak solunum yolundaki SYYS homeostazına katkıda bulunduğuna inanılmaktadır.

2.2.5. Mukus

Mukus salgısı ve klirensi solunum yolunun bütünlüğü ve pulmoner savunma için oldukça önemlidir (Şekil 2.8). Sağlıklı bir akciğerde mukus salgısı günde ortalama 10-

100 ml arasında olduğu tahmin edilmektedir. Solunum yolu mukusu su, karbonhidrat, protein ve lipid içeren viskoelastik bir jeldir. Mukus, solunum yolu yüzey epitelinin goblet hücrelerinin ve submukoza bezlerindeki salgının bir ürünüdür. Mukus, alt solunum yolundan farinks içine hava akımı ve mukosilier boşluk yolu ile taşınır. İnsan trake ve trakeollerde bir uyarıcıya cevap olarak salgılanan mukusun salgılanma kapasitesinin esas olarak bezlere bağlı olduğu görünmektedir. Bununla birlikte, istirahat sırasında goblet hücreleri mukus hacmine; mukoz hücrelerinin bulunduğu distal solunum yoluna kıyasla daha büyük oranda katkıda bulunmaktadır²¹⁹.

Mukus, yüzeysel bir jel olan mukoza tabakası ve epitelyal sillerin arasındaki sıvı ile çevrili olan perisilyar sıvı tabakasından oluşur. Bu iki tabaka sürfaktan denen ince bir tabaka ile birbirinden ayrılmıştır. Sağlıklı bir insanın trakeasında mukus tabakası ortalama 2-5 µm arasında olmakla birlikte bronşiyollerden üst solunum yoluna kadar uzanır. Perisilyar sıvı tabakası hücre yüzeyi ile mukoza tabakası arasında tam bir siliyanın yüksekliğinden biraz daha az derinliğe sahip olarak bulunur. Mukus epitel dokuyu yabancı maddelerden ve sıvı kaybından korur. Mukusun derinliği ve bileşimi solunum yolundaki salgı bezlerinin salgı yapmasına, goblet hücrelerinin deşarjına ve yüzey epiteli boyunca aktif iyon taşınmasına bağlıdır²¹⁹.



Şekil 2. 8. Solunum yolu yüzeyinin organizasyonu. Musinler, goblet hücreleri ve submukoza bezler tarafından salgılanır ve solunum yolu yüzeyinde mukus oluşturur. Mukosilyer klirens, yabancı parçacıkların alt solunum yollarından farinkse doğru geçişine yardımcı olmak için mukusun siliyalar tarafından hareket ettirildiği işlemdir.

Tükürük; alt solunum yolu salgıları, nazofarengal ve orofarengal materyaller (salya dahil), mikroorganizmalar ve hücrelerden oluşur. Mukusun hipersekresyonu ve klirens bozukluğu olduğunda, anormal solunum salgıları pulmoner fonksiyonu bozabilir, akciğer savunmasını azaltabilir ve enfeksiyon ve muhtemelen neoplazi riskini artırabilir²¹⁹.

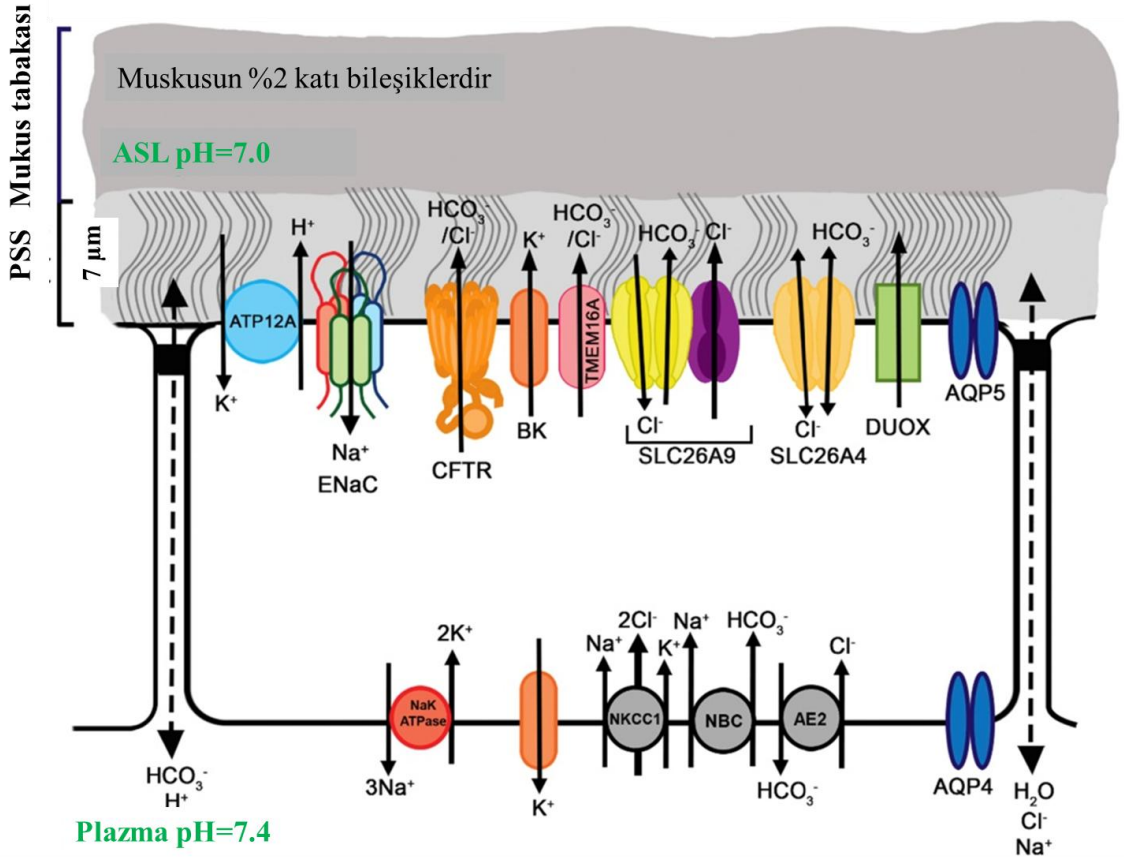
2.2.6. Solunum yolu yüzey sıvısı

Solunum yolu, akciğerin sterilizesini korumada önemli bir rol oynayan ince bir tabakaya sahip solunum yolu yüzey sıvısı (SYYS) ile kaplıdır. Solunum yolu yüzey sıvısı iki kısımdan oluşur: ilk olarak havadaki partikülleri ve bakterileri yakalayan kısım ile ikinci olarak mukusu kayganlaştıran, mukusu siliyadan belirli bir uzaklıkta tutan ve bu mukusu siliyar atımlarıyla veya öksürük yoluyla temizleyen perisiliyar sıvı tabakasından oluşur. Sürekli mukus taşınmasını sağlamak için solunum yolu yüzey sıvısının hacmi ve bileşimi sıkı bir şekilde düzenlenmektedir. Normal bir solunum yolunda perisiliyar likit tabakası ortalama $7\mu\text{m}$ iken²²⁰ solunum yolu yüzey sıvısının bileşimi değişebildiğinden ortalama $7\text{-}70\mu\text{m}$ arasında değiştiği belirlenmiştir²²¹.

Solunum yolu yüzey sıvısı; antibakteriyel ajanlar (örn; lizozim ve laktoferrin), migratör hücreler (örn; nötrofiller ve makrofajlar), pürinler gibi sinyal molekülleri ve sitokinler ile ekto-enzimleri içerir. Bu sayede solunum yolu yüzey sıvısı, akciğerin enfeksiyona karşı korunmasında büyük rol oynayan sıkı düzenlenmiş bir katman oluşturur²²⁰.

Solunum yolu yüzey sıvısının optimal hidrasyonu için iyonların ve suyun hem transselüler hem de paraselüler olarak hareketi gereklidir. Solunum yolunda bulunan epitel delikli ve suya geçirgendir. Solunum yolu yüzey sıvısı plazmayla izotoniktir ve solunum yolu yüzey sıvısının hacmi çözünenlerin kütlesi ile ayarlanır. Solunum yolu yüzey sıvısının hacmini etkileyen başlıca iyonlar Cl^- , Na^+ ve sudur. Cl^- ve Na^+ iyonları $\sim 100\text{-}130\text{ mM}$ konsantrasyonunda bulunurlar. Bu hacmin ayarlanmasında Cl^- sekresyonu ile Cl^- iyonu solunum yolu yüzey sıvısına doğru hareket eder, aynı anda Na^+ iyonu ise Cl^- 'a ters yönde hücre içine alınır (Şekil 2.9). Bu noktada su paraselüler olarak hareket eder, böylece iyon ve volüm artar ama bu iyonların konsantrasyonları değişmez. Bununla birlikte K^+ ($\sim 20\text{ mM}$) ve HCO_3^- ($\sim 10\text{ mM}$) de mevcut olup solunum yolu yüzey sıvısının hacminin homeostazında görev alırlar. Ancak diğer iyonlar kadar yüksek konsantrasyonlarda olmadığından dolayı solunum yolu yüzey sıvısının hacmini esas olarak etkilemekten çok bu hacmi düzenleyici rol oynarlar²²².

Bazolateral olarak, elektrokimyasal gradyanlar $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPaz}$ tarafından kurulmakla birlikte potasyum da membran potansiyelini belirlemeye yardımcı olan bazolateral K^+ kanalı aracılığıyla geri dönüştürülür. Sodyum absorpsiyonu için Na^+ , hücreye apikal membrandan ENaC yoluyla girer ve bazolateral $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPaz}$ aracılığıyla dışarı pompalanır. Klorun sekresyonunda ise 2Cl^- , NKCC (Sodyum-potasyum-klor kotrasport) kanalı aracılığıyla bazolateral membrandan hücreye alınır ve apikal membrandan CFTR ile sekrete edilir²²².



Şekil 2. 9. Normal insan solunum yolu epitelindeki iyon kanallarının, değiştiricilerinin ve pompalarının şematik gösterimi (PSS; perisilyar sıvı, SYYS; Solunum yolu yüzey sıvısı, Megan J. Webster and Robert Tarran'dan değiştirilerek alınmıştır²²²)

Solunum yolu epitelyal iyon taşınması elektrokimyasal gradyanlar tarafından belirlenir. Bu taşınım ATP harcayan bir kanal olan bazolateral $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPaz}$ yoluyla 3Na^+ iyonunun dışarı, 2K^+ iyonunun ise içeri girmesiyle gerçekleşir ve bu mekanizma iyon gradyanının olduğu birincil mekanizmadır. Sodyumun absorpsiyonu için Na^+ iyonu bir epitelyal sodyum kanalı olan ENaC aracılığıyla apikal membrandan $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPaz}$

tarafından oluşturulan gradyan nedeniyle hücre içine girer. Daha sonra Na^+ iyonu bazolateral membrandan dışarı pompalanırken, potasyum bazolateral K^+ kanalı aracılığıyla hücreye geri alınır. Klor sekresyonu için ise Na^+/K^+ ATPaz kanalından Na^+ dışarı salınıp aynı kanaldan K^+ içeri alınırken, Cl^- iyonları da $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$ kotransport (NKCC1) tarafından hücre içerisine alınır²²².

Apikal olarak Cl^- iyonları CFTR veya Ca^{+2} ile uyarılmış Cl^- kanalı (CaCC) tarafından sekrete edilir. Solunum yolu yüzey sıvısındaki yüksek NaCl konsantrasyonu nedeniyle ENaC, CFTR ve CaCC kanalının solunum yolu yüzey sıvı hacmindeki rolü ve önemi büyüktür²²².

2.3. İyon Kanalları

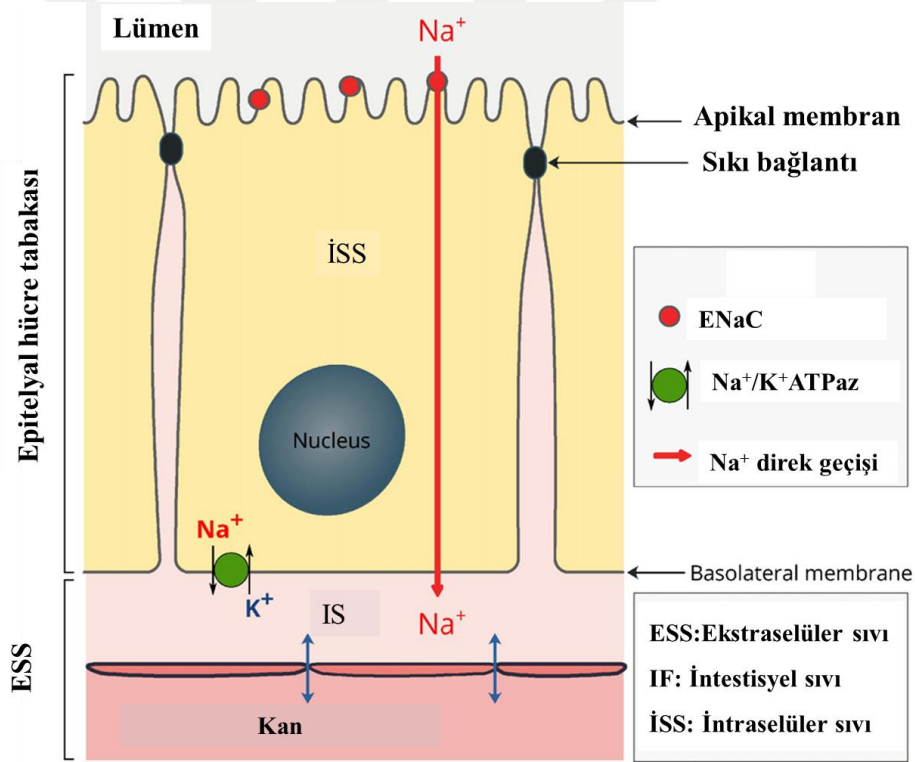
2.3.1. Epitelyal sodyum kanalları

Epitel dokular genel olarak, iki vücut bölmesi arasında bir bariyer oluşturmak ve bir bölmeden diğerine taşınmayı kolaylaştırmak amacıyla bölmeler arasındaki bileşimi düzenleyen yapılardır. Birçok epitel dokusu, vücudun toplam tuz ve su dengesini korumak için tuz ile suyun hareketinden sorumludur. Tuz ve su dengesinin düzenlenmesi, primer aktif sodyum (Na^+) transportu ve sekonder aktif klorür (Cl^-) transportu ile bunu takiben ozmotik olarak suyun transportunu içerir. Yani suyun taşınması genellikle tuz gibi ozmotik ekivalentlerin hareketine bağlıdır. Bu durum ise kan ozmolaritesini, kan basıncı ve kan hacmini kontrol etmede sodyum transportunun ne kadar önemli olduğunu ortaya koymaktadır. Sodyum taşınması için hormonal olarak kontrol edilen ana mekanizma epitelyal sodyum kanallarıdır (ENaC'ler)²²³. Bu kanallar amiloride duyarlı olduğundan dolayı amiloride duyarlı iyon kanalları olarak da adlandırılırlar. Epitel sodyum kanalı (ENaC) çoğunlukla sıkı ya da yüksek dirençli epitelde bulunur. Yapısal olarak aktif bir kanal olan ENaC, apikal hücre zarı boyunca lümeninden epitel hücreye Na^+ iyonlarının akışını sağlar²²⁴.

Hücre içerisine ENaC tarafından absorbe edilen Na^+ iyonları daha sonra bazolateral membran üzerinde bulunan Na^+/K^+ ATPaz etkisiyle hücreden interstisyel sıvıya pompalanır (Şekil 2.10). ENaC, hücre dışı sıvıdaki Na^+ miktarını modüle ettiği için hücre dışı sıvı hacminin ve kan basıncının düzenlenmesinde önemli bir role sahiptir. ENaC'nin aktivitesi, renin-anjiyotensin-aldosteron sistemi ve Na^+ , Cl^- , protonlar,

gerilmeler ve proteazlar dahil olmak üzere çeşitli hücre dışı faktörler tarafından düzenlenir²²⁴.

Su ve tuz dengesinin düzenlenmesi hem tuz emilimini hem de tuz salgısını düzenleme yeteneğini gerektirir. ENaC kanalı akciğerde, distal kolonda, böbrekte ve ter kanalları gibi epitellerin apikal yüzünde eksprese olurlar²²⁵. Akciğerlerde gerçekleşen ENaC aracılı sodyum transportu, kan basıncının kontrolünün yanı sıra, alveolar alanda normal sıvı akışından ve buna bağlı olarak akciğerlerdeki gaz değişiminden sorumludurlar. ENaC fonksiyonundaki veya ENaC düzenlemesindeki anormallikler, toplam vücut Na^+ homeostazı, kan hacmi, kan basıncı ve akciğer sıvı dengesi bozuklukları ile ilişkilendirilmiştir. ENaC'lar ayrıca; distal kolon, ter kanalları tükürük kanalları, iç kulak, lingual epitel, keratinositler, lenfositler, vasküler endotelyum ve göz (retina, mercek ve pigmentli siliyer cisim ve iris içindeki epitel) gibi diğer dokularda da eksprese edilir²²³.



Şekil 2. 10. Epitelde ENaC'nin yeri ve fonksiyonunun şematik gösterimi.

2.3.1.1. Epitel dokularında tuzun taşınım mekanizması

Epitel dokudan suyun ve tuzun taşınımı genel olarak dokunun her iki tarafı arasındaki tuz konsantrasyon farkı ve elektrik akım farkı ile ilişkilidir. Canlı bir kurbağa derisinin epitel dokusunun elektrik potansiyeli üretme kabiliyeti 1857'de Emil du Bois-

Reymond'un keşfinden beri bilinmektedir. Bu dönemde elektrik potansiyelinin önemi tam olarak bilinmiyordu ancak ölü kurbağa derisinin epitel dokusunda bulunmadığı için bu potansiyel "hayati güç" olarak tanımlanıyordu. Transepitelyal potansiyel ile ilgili olarak pek çok çalışma yapılmış olmasına rağmen bu potansiyelin kaynağı Koefoed-Ussing ve Zerahn'ın (1951) çalışmalarına kadar tam olarak aydınlatılamamıştır. Koefoed-Ussing ve Zerahn'ın yaptıkları çalışma ile kurbağa derisi biyoelektrik potansiyelinin aktif sodyum transportu aracılığı ile meydana geldiğini, bu taşınımın apikal membranda pasif ancak oldukça seçici olduğu, bazolateral membranda ise sodyum taşınımının aktif olduğunu açıkça göstermişlerdir. Yapısal olarak aktif bir kanal olan ENaC, apikal hücre zarı boyunca lümeden epitel hücreye Na⁺ iyonlarının akışını sağlamaktadır²²³. Koefoed-Johnsen ve Ussing'in hüresel epitelyal sodyum absorpsiyon modeli tüm sodyum taşıyan epitelyal dokularda tekrar tekrar doğrulanmıştır²²³.

Seçici sodyum iyon kanalları diüretikler veya amilorid ile bloke edilebilir. Ussing'in çalışmasında sodyumun membrandan geçişinin mekanizması belirsizliğini korumuşken 1967'de potasyum tutucu bir diüretik olan amilorid ile bu mekanizma aydınlatılmıştır. Nitekim amiloridin apikal uygulanmasından sonra kurbağa derisinin potansiyeli sıfıra yakın bir şekilde tersine çevirebilmiştir. Bu sonuç ile de sodyum girişinin bir iyon kanalı ile gerçekleştiği düşüncesi güç kazanmıştır. Birçok epitelden alınan mikroelektrot kayıtları sodyumun elektrogradyan yönünde yokuş aşağı (çok yoğun olandan az yoğun olana) kaydığını ortaya koymuştur. Bu fikir Lindemann ve Van Driessche (1977) tarafından kurbağa derisindeki spesifik sodyum kanallarının amilorid tarafından bloke edildiği bulgusu ile daha da geçerlilik kazanmıştır. Amilorid ile inhibe edilebilir epitelyal Na⁺ kanallarının deneysel sonuçları, yapılan patch-clamp çalışmaları ile en sonunda tam olarak doğrulanmıştır. Koefoed-Johnsen ve Ussing modellerini yayınladıktan 35 yıl sonra Canessa ve ark. moleküler çalışmaları ile günümüzde ENaC olarak adlandırılan epitelyal Na⁺ kanalı için olan genleri tanımlamışlardır²²³.

2.3.1.2. ENaC'ın moleküler yapısı

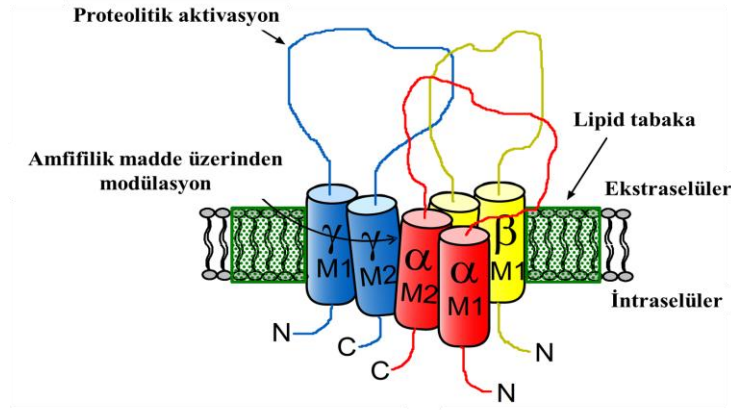
Epitelyal sodyum kanalları, trimerik bir stokiyometride düzenlenmiş üç homolog alt birimden (α , β ve γ) oluşmaktadır (Şekil 211). Her alt birim; SCNN1A (alfa), SCNN1B (beta) ve SCNN1G (gama) olarak farklı bir gen tarafından kodlanır. Bu altbirimler büyük ekstraselüler domain ile intraselüler N ve C uçlarının birbirine bağlanması ile membranın her iki tarafını kapsayan domainleri içerir. Ekstraselüler domain, ENaC'ın

α , β , ve γ domaininin ikincil transmembran domaininin yanında yer alan M2 bölgesi, kanal iletkenliğini etkilemekle birlikte aynı zamanda amiloridin bağlandığı yerdir²²⁵.

ENaC altbirimleri ENaC/dejenerin süper ailesinin bir üyesidir. ENaC, transepitelyal Na absorpsiyonu için hız sınırlayıcı bir adımdır. ENaC'a ek olarak bu süper aile aside duyarlı iyon kanallarını (ASICs) da içerir²²⁴. Fonksiyonel ENaC α , β , ve γ altbirimlerinden oluştuğundan dolayı heterotrimerik bir yapı oluştururken aynı (ENaC/dejenerin) gen ailesine ait olan aside duyarlı kanallar (ASIC) ise homotrimerik bir yapı oluşturur²²³. ENaC'ın fonksiyonu ve yapısı aynı gen ailesine ait homolog aside duyarlı iyon kanalı 1'in (ASIC1) kristal yapısına olan benzerliklere dayanarak yapılmıştır²²³. Bu aside duyarlı kanalın (ASIC) kristal yapısını kullanarak yapılan homoloji çalışmaları (biyolojide "homoloji" kelimesi, sadece sekans ve yapısal benzerliği değil, fonksiyonel denkliği tanımlamak için de kullanılır) ENaC'ın heteromerik bir transmembran protein olduğunu ve alt birimlerinden bir por oluştuğunu göstermiştir. Bu porun ise Na^+ , Li^+ ile K^+ 'a oldukça seçici geçirgen olduğunu ve küçük molekülü amilorid antagonistine duyarlı olduğunu göstermiştir²²⁵.

ENaC'ın potasyuma göre sodyuma geçirgenlik oranını belirlemek zordur ancak bu oranın en az 1/100 (K^+/Na^+) oranında olduğu tahmin edilmektedir. ENaC, K^+ 'dan büyük iyonlara geçirgen değildir²²³.

ENaC alt birimlerinin ilk sekansları, sıçan ve insan dokularından izole edilen mRNA'lardan klonlanan cDNA'lara dayanıyordu. Daha sonra hızlı genom dizilim tekniklerinin geliştirilmesi ile artan sayıdaki türlerde ENaC/Dejenerin süper aile üyelerinin sekanslarının belirlenmesine yol açmıştır²²⁴. Epitelyal Na^+ kanalları için cDNA'lar; sıçanın distal kolonundan α ENaC'nin cDNA'sını izole etmek için ekspresyon klonlama yöntemlerini kullanan iki grup araştırmacı tarafından belirlenmiştir²²³.



Şekil 2. 11. Üç alt birimden (α , β , γ) oluşan epitelyal sodyum kanalının (ENaC)

Her ne kadar farklı ENaC kanallarında α , β ve γ alt birimlerinin farklı kombinasyonları olmasına rağmen bu kanalların tümü; potasyuma göre sodyuma daha geçirgendir, düşük bir tek taraflı iletkenliğe sahiptir. Diüretikler ve amilorid tarafından inhibe edilirler ve tipik olarak sodyum taşıyan epitel hücrelerin apikal zarlarında bulunurlar. ENaC'ın β alt biriminin mutasyonu azalmış renal ENaC aktivitesine bağlı olarak Na^+ atılımının (natriürezisi) artması ve azalmış pulmoner ENaC aktivitesinden dolayı mukus klirensinin artması nedeniyle psödohipoaldosteronizme neden olur²²⁵.

2.3.1.3. ENaC'ın hücresel regülasyonu

Distal nefron ve kolon gibi Na^+ iyonunu absorbe eden sıkı epitel dokuları boyunca sodyumun taşınımı toplam vücut sodyum seviyelerini belirleyen ana faktördür ve aynı zamanda akciğer epiteli içindeki sodyum iletimi, akciğer sıvı dengesinin ana belirleyicisidir. Bu epitel dokularında sodyumun geri emilimi iki aşamada gerçekleşir. İlk aşamada sodyum iyonu hücrelerin apikal membranından ENaC kanalı boyunca, bazolateral Na/K-ATPaz pompasından aktif bir şekilde hücre dışına taşınmadan önce girer. Apikal membrandaki ENaC'ın aktivitesi sodyumun taşınım hızını belirler²²³. Epitel hücrelerinin sitozolü içindeki toplam ENaC alt biriminin sayısı, apikal membrandaki ENaC alt birim sayılarına (işlevsel olarak sodyumu hücreye taşıyabilen) kıyasla nispeten yüksektir²²³. Amilorid ve forskolin gibi bazı bileşikler ENaC aktivitesini ciddi anlamda etkilemektedir.

2.3.1.3.A. Amilorid

Yukarıda da belirtildiği gibi ENaC kanalları amiloride duyarlı olması ve onun tarafından inhibe edilmesi nedeniyle bu kanallar amiloride duyarlı iyon kanalları olarak da adlandırılmaktadır.

Amilorid, distal nefronda (distal kıvrımlı tübül ve kortikal toplama kanalı), akciğerde ve kolonda bulunan epitelyal sodyum kanallarını inhibe ederek çalışır. Bu ENaC'lar, apikal zara yayılan M1 ve M2 olmak üzere iki domainden oluşur. Hücre içi C ve N termini, hücre dışı ise 2 veya 3 sistein bakımından zengin alan içeren büyük bir domain vardır²²⁶. Sodyum iyonları, tübüler hücrelerdeki ENaC'tan geçebilmek için elektrokimyasal gradyan boyunca yokuş aşağı hareket eder. Bu elektrokimyasal gradyan farkı Na/K ATPaz'dan kaynaklanır. Sodyumun hücre içine emilimi apikal membranda bir depolarizasyon meydana getirmekle birlikte lümeninde negatif transepitelyal potansiyel bir fark da yaratır. Bu potansiyel fark, apikal potasyum kanallarından potasyum salgılanmasını ve ardından potasyum atılımını artırır. Amilorid, apikal membranın hiperpolarizasyonunda bir azalmaya ve bunu takip ederek potasyum, hidrojen, kalsiyum ve magnezyum salgılanmasında azalmaya yol açan ENaC'ları seçici olarak inhibe eder²²⁷. Amilorid ENaC'leri inhibe ettiği için hafif natriürezise de yol açabilir.

2.3.1.3.B. Forskolin

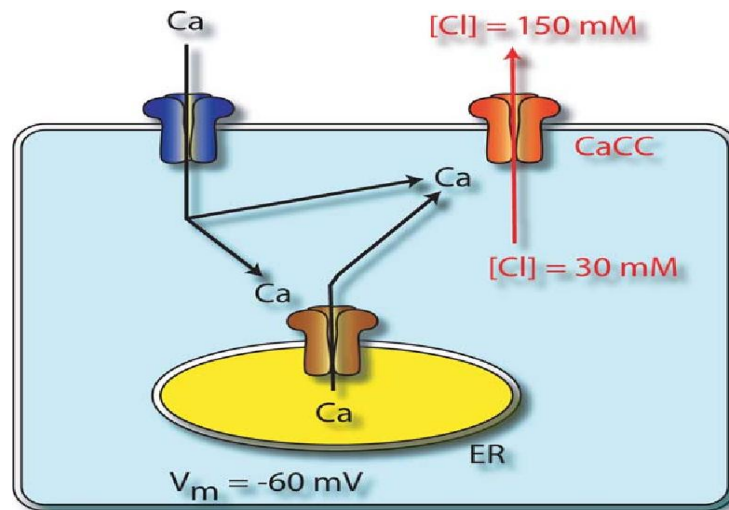
Forskolin, Hint *Coleus forskohlii* bitkisinin köklerinden üretilen bir diterpendir. Forskolin geleneksel tıpta yüzyıllardır kullanılmakta olup, uygun maliyeti ve belgelenen güvenilirliğinden dolayı geniş bir kullanım alanına sahiptir. Forskolin, ATP'den cAMP üreten ve böylece hücre içi cAMP konsantrasyonlarını yükselten adenilat siklaz enzimini doğrudan aktive eder²²⁸.

Forskolin apikal Cl⁻ kanalları ile bazolateral Na⁺/K⁺ ATPaz kanallarını aktifleyerek Cl⁻ iyonlarının sekresyonunu sağlar. Nitekim bu durum da forskolinin hücre içi cAMP seviyesini arttırmasıyla gerçekleşir²²⁹. Amilorid ile ENaC inhibisyonundan sonra, cAMP agonisti forskolin, akımda güçlü bir artış meydana getirmekte olup bu durum da CFTRinh-172 tarafından neredeyse tamamen inhibe edilen CFTR'ın aktivasyonuna yol açar.

2.3.2. Kalsiyumla aktiflenen klor kanalları (CaCC)

Birçok hücre tipi, sitozolik Ca^{+2} konsantrasyonları tarafından aktive edilen bir Cl^- kanalını eksprese eder. Bu kanallar pek çok farklı hücre tipinde bulunabilirler. Bu farklı hücre tipine nöronları, çeşitli epitel hücrelerini, olfaktörleri, fotoreseptörleri, kalp, düz ve iskelet kası hücrelerini, sertoli hücrelerini, mast hücrelerini, nötrofilleri, lenfositleri, rahim kası hücrelerini, kahverengi yağ adipositlerini, hepatositleri, insülin salgılayan beta hücrelerini, meme bezlerindeki hücreleri ve ter bezleri hücrelerini dahil edebiliriz. CaCC'ler epitelyal salgılamada, kardiyak kas ve nöronlardaki membran uyarılabilirliğinde, kokunun iletiminde, vasküler tonun düzenlenmesinde ve fotoreseptör ışık tepkilerinin modülasyonunda ve fonksiyonlarında önemli rol oynarlar.

CaCC'ler vasıtasıyla Cl^- iyonunun hareket yönünü; membran potansiyeli, Cl^- konsantrasyon gradyanı ve kalsiyum konsantrasyonu olmak üzere üç faktör belirler. Çoğu hücrede dinlenme zar potansiyeli ekstraselüler Cl^- 'un dinlenme potansiyelinden daha negatiftir. Sonuç olarak, Ca^{+2} konsantrasyonu arttığında Cl^- hücreden çıkar, bu da plazma membranında depolarizasyona neden olur (Şekil 2.12). Bazı hücrelerde bu depolarizasyon voltaj kapılı Ca^{+2} kanallarının (VGCC'ler) açılma olasılığını artırarak içeriye ek Ca^{+2} iyon girişini sağlar ve depolarizasyona neden olur. Osmotik kuvvetler ve yük eşitliği gereksinimi nedeniyle, Cl^- akışına su ve Na^+ akışı eşlik eder. Eğer hücre dışı membran potansiyelinden daha pozitif ise CaCC'lerin açılması hiperpolarizasyona yol açabilir.



Şekil 2. 12. CaCC'ler vasıtasıyla Cl^- akışını kontrol eden faktörler. Ca^{+2} iyonu plazma zarı boyunca kalsiyum kanallarından akması veya Ca^{+2} 'nın endoplazmik retikulum (ER) gibi dahili depolardan salınması CaCC'lerin açılmasını uyarır

Solunum yolu epiteli, mukoza hidrasyonu ve enfeksiyona karşı korunma için önemli olan solunum yolu yüzey sıvısının seviyesini kontrol etmek için iyon taşıma mekanizmalarını kullanır. Solunum yoluna sıvı sekresyonu, Cl^- 'un elektrokimyasal gradyanına karşı hücrede Cl^- biriktiren ve bazal olarak yerleşmiş taşıyıcılar ile ekstraselüler alana Cl^- akışına elektrokimyasal gradyan yönünde izin veren ve apikalde bulunan Cl^- kanalları ile gerçekleşir. Solunum yolu epitel hücreleri, apikal membranlarında bulunan CaCC'leri ve kistik fibroz transmembran regülatörünü (CFTR) birlikte eksprese eder. ATP veya UTP ile uyarılan solunum yolu epitel hücreleri, Ca^{+2} 'a bağımlı Cl^- salgısı sağlar. UTP, inozitol trifosfat 3 (IP3) üretimini ve ardından Ca^{+2} salımını arttırmak için Gq-birleşik P2Y purinerjik reseptörlerini uyarır. Bu durum da kısa devre akımı ile trakeal epitel hücre hattının solunum yolu yüzey sıvısını artırır²³⁰. P2Y reseptörlerinin ATP ve UTP gibi hücre dışı nükleotidler tarafından aktive edilmesi, çeşitli hücrel sinyalleşme süreçleri ile solunum yolu epitelindeki iyon taşınmasının düzenlenmesinde çok önemli bir rol oynar. İnsan solunum yollarında, P2Y reseptörlerinin aktivasyonu, inozitol trisfosfat (IP3) aracılı Ca^{+2} sinyal yolundan Ca^{+2} ile aktive olan klorür kanallarını (CaCC) aktive ederek Cl^- sekresyonunu artırır²²⁹.

Solunum yolu mukoza tabakasının kontrolü, CFTR ve CaCC'ler arasındaki etkileşim ile düzenlenmiştir. Mukoza tabakasının bazal seviyesi CFTR tarafından kontrol edilirken CaCC kanalları solunum yolu yüzey sıvı tabakasının akut bir düzenleyicisi olarak görev yapar. CFTR ve CaCC'lerin her ikisinin de apikal Cl^- kanalları olduğu göz önüne alındığında, CaCC'lerin aktivasyonunun kistik fibrozis için bir tedavi olarak hizmet edebileceği, ancak bu durumun CaCC'lerin spesifik aktivatörlerinin olmaması ve bu kanalların moleküler yapısı hakkındaki belirsizlik nedeniyle gerçekleşemeyeceği öne sürülmektedir²³⁰.

2.3.2.1. Üridin trifosfat (UTP)

Kistik fibrozda (CF) solunum yolu epitel hücreleri tarafından yapılan klor salgısı bozuktur. CFTR, cAMP ve protein kinaz A (PKA) aracılığıyla aktive edilmesine karşın, Ca^{+2} ile aktiflenen klor kanalları (CaCC) UTP gibi Ca^{+2} agonistleri tarafından aktive edilir²²⁹. P2Y reseptörlerinin ATP ve UTP gibi hücre dışı nükleotidler tarafından aktive edilmesi, çeşitli hücrel sinyalleşme süreçleri ile solunum yolu epitelindeki iyon taşınmasının düzenlenmesinde çok önemli bir rol oynar. İnsan solunum yollarında, P2Y

reseptörlerinin aktivasyonu, inozitol trisfosfat (IP3) aracılı Ca^{+2} sinyal yolundan Ca^{+2} ile aktive olan klorür kanallarını (CaCC) aktive ederek Cl^{-} sekresyonunu artırır²²⁹.

2.3.3. Kistik fibröz transmembran regülatör (CFTR) iyon kanalı

Kistik fibröz transmembran regülatör (CFTR) iyon kanalı biyomedikal anlamda oldukça önemli bir moleküldür. CFTR, ATP bağlayıcı protein (ABC) taşıyıcı ailesinin bir üyesidir. Vücuttaki epitel hücrelerinde bir anyon ve klor kanalı görevi gören bir membran proteindir²³¹. Bakterilerden insana kadar tespit edilen binlerce ABC taşıyıcısı arasından CFTR, ATP kapılı iyon kanalı olarak işlev gördüğü bilinen tek aile üyesidir.

CFTR geninin mutasyonu ölümcül bir hastalık olan kistik fibrozise neden olur. Allelik heterojenitenin yüksek olduğu kistik fibroziste yaklaşık 1500 mutasyon bildirilmiştir. En sık rastlanan mutasyon fenil alanin amino asidinin 508. pozisyonundaki delesyonudur. Bazı mutasyonlar azalmış ya da eksik protein üretimi ile sonuçlanan defektif CFTR biyosentezine neden olur. Diğer mutasyonlar yanlış katlanmış veya disfonksiyonel protein üretimine neden olan mutasyonlardır.

CFTR kanalında meydana gelen defekt esas olarak klor ve bikarbonat taşınımını etkiler. CFTR ve özellikle ENaC gibi diğer iyon kanallarının etkileşimi kistik fibrozisin patofizyolojisinde önemlidir. Epitel dokularındaki fonksiyonel CFTR eksikliği, akciğerin, bağırsağın, pankreasın ve böbreğin tuz homeostazisini bozar. CFTR mutasyonlarının meydana getirdiği solunum yolundaki mukus klirensindeki bozulma, tekrarlayan enfeksiyonlara, kronik inflamasyonlara ve nihayetinde solunum yetmezliğine yol açar²³².

CFTR, ağırlıklı olarak cAMP ile düzenlenen bir klorür kanalı olarak işlev görür, ancak aynı zamanda bikarbonatın, suyun ve daha az miktarda başka anyonların salgılanmasına da aracılık eder. Solunum yolu mukusu normal işlevlerini sürdürebilmek için bikarbonatın varlığına oldukça bağlıdır. Azalmış anyon konsantrasyonları mukusun yapısını bozarak solunum yolu mukusunun viskozitesinin artmasına neden olur.

CFTR kanalını açmak için ATP gerekli olmasına rağmen, kanal bir kez açıldığında elektrokimyasal gradyanlar boyunca iyonların pasif hareketi vardır. Solunum yolu epitelindeki CFTR proteini, yakınlardaki epitelyal sodyum kanalları (ENaC) üzerinde inhibe edici bir etkiye sahiptir. Apikal zarında bulunan CFTR kanalının ve ENaC'ın, klorür ve sodyum taşınmasıyla oluşturulan ozmotik gradyan ile solunum yolu yüzey sıvı

hidrasyonunun düzenlenmesinde hayati bir rol oynadığı düşünülmektedir⁶². CFTR'ın yokluğunda ENaC upregüle olur ve bu durum da Na⁺'nın hücre dışından hücre içine reabsorbe edilmesine yol açar. Hücre içine alınan Na⁺ iyonu kendisiyle birlikte suyu da hücre içine sürükleyerek hücre dışında Na⁺ ve su eksikliğine neden olur. CFTR'ın yokluğu ile klor sekrete edilemeyip, suyun ve Na⁺'nın hücre içine alınması solunum yolunda kalın ve dehidrate olmuş mukus birikimine yol açar. Bu kalın mukus gaz alış-verişine engel olmakla birlikte bakterilerin yaşamına uygun bir ortam da meydana getirir.

2.3.3.1. Kistik fibröz transmembran regülatör inhibitörü-172

Son yıllarda kistik fibröz transmembran regülatör kanalını inhibe eden iki inhibitör keşfedilmiştir, bunlar; CFTR-172 ve GlyH-101'dir. Ancak yapılan pek çok çalışmada CFTR-172 yaygın olarak kullanılmaktadır. CFTR-172, kistik fibröz transmembran regülatör kanalını bloke ederek Cl⁻ iyon taşınımını bozmaktadır²³³.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Solunum Yolu Yüzey Sıvı Yüksekliğinin Belirlenmesi

3.1.1. Kullanılan maddeler

Çalışmada fosfat buffer salin (PBS) (Thermo Fisher, Gibco, Waltham, Massachusetts, ABD) nikotin tuzu, benzoik asit, sodyum hidrojen tartar, propilen gliserol ve vegetable gliserin ile serbest baz nikotin (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, ABD) kullanıldı.

3.1.2. Gruplar, dozlar ve uygulama süreleri

Maddelerin solunum yolu yüzey sıvısı yüksekliği üzerine etkilerini belirlemek amacıyla Tablo 3.1 de gösterilen gruplar oluşturuldu. Aynı zamanda ilgili tabloda maddelerin uygulama dozları ve uygulama süreleri de belirtildi.

Tablo 3. 1. E-sigaranın solunum yolu yüzey sıvı yüksekliği üzerine etkisinin belirlenmesinde kullanılan maddeler ve gruplar

Grup	Uygulanan Madde	Doz (µM)	Uygulama Süresi (saat)
Kontrol	PBS	100	24
Nikotin Tuzu	Nikotin tuzu	100	24
Serbest Baz Nikotin	Serbest baz nikotin	100	24
Benzoik Asit	Benzoik asit	100	24
Sodyum Tartar	Sodyum tartar	100	24
PG/VG	Propilen gliserol+vegetable gliserin (%55/45 oranında)	55 +45	24
Nikotin Tuzu + Benzoik Asit	Nikotin tuzu + benzoik asit	100	24

3.1.3. Hücre kültürü

Solunum yolu yüzey sıvısının fizyolojisinin incelenmesi için *in vivo* solunum yolu epitel morfolojisini taklit eden uygun hücre kültürü modelleri geliştirilmiştir. Yapılan bu çalışmada kullanılan insan akciğeri primer bronşiyal epitelyal hücreleri (HBEC) North Carolina Üniversitesi Doku kültürü Biriminden temin edildi. Temin edilen bu primer

hücreler 6.5 mm çapındaki, por açıklığı 0.4 µm olan transparan (Oxyphen AG Giessereistrasse, Wetzikon, İsviçre) Oxyphen transvellere eklendi. Her bir transvelde 50.000 hücre olması için hücre kültürü prosedürü aşağıdaki gibi yapıldı.

İlk olarak transveller kollajen (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, ABD) ile kaplandı ve kuruması için 24 saat steril kabinde bekletildi. Bu sürenin sonunda ise 30 dakika boyunca UV'de sterilize edilerek hücrelerin ekimine hazır hale getirildi. Ardından Doku Kültürü Biriminden temin edilen primer bronşiyal epitel hücreleri 500 G'de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatant kısmı atıldı. Diğer taraftan yine doku kültürü biriminden alınan antifungal/antibakteriyel ajanlar bu hücre kültürü için spesifik olarak doku kültürü birimi tarafından hazırlanan medya (ALI, North Carolina Üniversitesi, Kistik Fibrozis Merkezi Doku Tedarik ve Hücre Kültürü Birimi, North Carolina, ABD) ile karıştırıldı. Hazırlanan karışım süpernatandan geriye kalan hücrenin bulunduğu tüpe transvel başına istenen hücre sayına göre oranlanarak eklendi. Her transvele 50.000 primer insan bronşiyal epitelyal hücresi ekildi. Bu hücreler pasajlanmadan P₀ halinde çalışmalarda kullanıldı. Son olarak bu transvellerin asılı olarak bulunduğu 24 kuyucuklu plakelere medyalar eklendi. Hücrelerin farklılaşması ve siliyalı bir yapıya ulaşması için bu hücrelerin apikal tarafı havaya bazolateral tarafı sıvı medyaya (HSA) bakacak şekilde 37°C'de %5 CO₂ ve %95 O₂'de 21 gün inkübe (Nuaire, 2100 Fernbrook Lane Plymouth, MN, ABD) edildi. İnkübasyon süresinde transvellerin iki günde bir medyaları değiştirilirken haftada bir hücreler PBS ile yıkandı.

Farklılaşmanın tamamlanmasıyla birlikte bu hücreler PBS, 100 µM nikotin tuzu, 100 µM benzoik asit, 100 µM PG/VG (%55/45 oranında), 100µM serbest baz nikotin, 100µM sodyum hidrojen tartar, 100 µM nikotin tuzu + benzoik asit karışımı hücrelere uygulandı.

Çalışmaya başlamadan önce tüm hücreler PBS ile 30 dakika boyunca yıkandı. Ependorflara her bir grup için farklı dozlarda kimyasallardan 100 µl eklendi. Ardından her bir farklı grubun maddesini içeren ependorfun içine konfokal mikroskopide görüntüleme için kullanılan 0,1 mg Dekstran (Invitrogen, Tetramethylrhodamine, 10,000 MW, Neutral) boyası eklendi. Daha sonra her bir grubun hücrelerine bu madde ve boya karışımından her transvele 14 µl eklendi. Hücreleri barındıran transveller konfokal mikroskopideki görüntünün net çıkması için ringer solüsyonlu plakelere transfer edildi.

İnsan primer akciğer bronşiyal epitelyal hücre kültürü oda havasıyla temas ettiğinde solunum yolu yüzey sıvısı istenmeyen bir durum olan kolaylıkla buharlaşabilme özelliğine sahiptir. Buharlaşmanın engellenmesi için perfluorokarbon kullanıldı. Perfluorokarbon oksijene geçirgendir ve zamanla buharlaştığından, solunum yolu yüzey sıvısı üzerine herhangi bir etkisi gözlemlenmemektedir²³⁴. Solunum yolu yüzey sıvı hacminin belirli aralıklarla yapılan ölçümleri sırasında buharlaşmayı engellemek için her seferinde transveller mikroskoba yerleştirilmeden hemen önce her bir transvele 40µl gelecek şekilde perfluorokarbon maddesinden eklendi. Ardından 0.saat, 2.saat, 6. saat ve 24.saat için solunum yolu yüzey sıvı yüksekliği ölçümleri alındı.

Bu sürenin sonunda ise klor kanallarını aktive ettiği, buna bağlı olarak da SYYS yüksekliğini arttırarak pozitif bir kontrol görevi yapan adenezinden 50 µl alınarak her bir transvele eklendi. Transveller 10 dakika inkübatörde bekletildikten sonra 0. dakikada SYYS yüksekliğinin ölçümleri alındı. Bu ölçümlerden sonra hücre 30 dakikalığına tekrar inkübatöre konuldu. Otuz dakikadan sonra tekrar SYYS yüksekliğinin ölçümleri alındı.

Hücre kültürünün (transvelin) alt tarafından görüntü elde etmek için; yüksek sayısal açıklık (1.2-1.3 NA) kullanıldı. Lenslerin üzerine gliserol damlatılarak görüntüler dikey (XZ) modda, lensi ters çevrilmiş konfokal mikroskobide (Leica Microsystems SP5, Almanya) görüntülendi. Transvellere ekilen hücreler, merceğin üstünde bulunan ve orta kısmına lamel konulan demir bir halkaya yerleştirilip görüntülendi. Bu sistem ile hem nitel hem de nicel solunum yolu yüzey sıvı hacmi hakkında veri elde edilmektedir.

3.2. İyon Transportunun Belirlenmesi

3.2.1. Kullanılan maddeler

E-sigaralarda bulunan maddelerin iyon transportu üzerindeki etkileri belirlemek için çalışmamızda fosfat buffer salin (PBS) (Thermo Fisher, Gibco, Waltham, Massachusetts, ABD) nikotin tuzu, benzoik asit, sodyum hidrojen tartar, propilen gliserol ve vegetable gliserin, serbest baz nikotin ile nikotin tuzu+benzoik asit karışımı (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, ABD) kullanılmıştır.

3.2.2. Gruplar, dozlar ve uygulama süreleri

E-sigaraalarda bulunan maddelerin iyon transportu üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla Tablo 3.2 de gösterilen gruplar oluşturuldu. Aynı zamanda ilgili tabloda maddelerin uygulama dozları ve uygulama süreleri de verildi.

Tablo 3. 2. E-sigaranın iyon transportu üzerindeki etkilerinin belirlenmesinde kullanılan maddeler ve gruplar

Grup	Uygulanan Madde	Doz (μM)	Uygulama Süresi (gün)
Kontrol	PBS	100	21
Nikotin Tuzu	Nikotin tuzu	100	21
Serbest Baz Nikotin	Serbest baz nikotin	100	21
Benzoik Asit	Benzoik asit	100	21
Sodyum Tartar	Sodyum tartar	100	21
PG/VG	Propilen gliserol+vegetable gliserin (%55/45 oranında)	55 +45	21
Nikotin Tuzu + Benzoik Asit	Nikotin tuzu + benzoik asit	100	21

3.2.3. Hücre kültürü

İyon transportunun incelenmesi için *in vivo* solunum yolu epitel morfolojisini taklit eden uygun hücre kültürü modelleri geliştirilmiştir. Yapılan bu çalışmada kullanılan insan akciğeri primer bronşiyal epitelyal hücreleri (HBEC) North Carolina Üniversitesi Doku kültürü Biriminden temin edildi. Temin edilen bu primer hücreler 12 mm çapındaki por açıklığı 0.4 μm olan transparan transvellere (Corning Costar, katalog no:3460) ekildi. Her bir transvelde 200000 hücrenin olmasının sağlanması için hücre kültürü prosedürü aşağıdaki gibi yapıldı.

Bu prosedürde ilk olarak transveller kollajen (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, ABD) ile kaplandı ve kuruması için 24 saat steril kabinde bekletildi. Bu sürenin sonunda ise 30 dakika boyunca UV'de sterilize edilerek hücrelerin ekimine hazır hale getirildi. Ardından Doku Kültürü Biriminden temin edilen primer bronşiyal epitel hücreleri 12000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilerek süpernatant kısmı atıldı. Diğer taraftan yine doku kültürü biriminden alınan antifungal/antibakteriyel ajanlar bu hücre kültürü için spesifik olarak doku kültürü birimi tarafından hazırlanan medya (HSA, North Carolina Üniversitesi, Kistik Fibrozis Merkezi Doku Tedarik ve Hücre Kültürü Birimi, North

Carolina, ABD) ile karıştırıldı. Hazırlanan karışım süpernatandan geriye kalan hücrenin bulunduğu tüpe transvel başına istenen hücre sayına göre oranlanarak eklendi. Daha sonra her transvele 200000 primer insan bronşiyal epitelyal hücresi ekildi. Bu hücreler pasajlanmadan P₀ halinde çalışmalarda kullanıldı. Transvellere hücre ekiminden sonra, transvellerin asılı olarak bulunduğu 12 kuyucuklu platalere medyalar eklendi. Hücrelerin farklılaşması ve silyalı bir yapıya ulaşması için bu hücrelerin apikal tarafı havaya bazolateral tarafı sıvı medyaya bakacak şekilde 37°C'de %5 CO₂ ve %95 O₂'de 21 gün boyunca inkübe edildi. İnkübasyon süresinde transvellerin iki günde bir medyaları değiştirilirken haftada bir hücreler PBS ile yıkandı.

Farklılaşmanın tamamlanmasıyla birlikte bu hücrelerin apikal kısmına deneye başlamadan 24 saat önce hücrelerin medyalarına ENaC kanallarını eksprese eden 100 nM deksametazon eklendi. 24 saat sürenin ardından ise PBS, 100 µM nikotin salt, 100µM benzoik asit, 100µM PG/VG (%55/45 oranında), 100µM serbest baz nikotin, 100µM sodyum hidrojen tartarat, 100 µM nikotin tuzu-benzoik asit karışımı hücrelere uygulandı.

3.2.4. Ussing chamber çalışması

Ussing chamber sisteminde kullanılan cihaz, 1950'lerde kurbağa derisinde yer alan iyon taşınımının bir göstergesi olan kısa devre akımını (I_{sc}) ölçmek için icat eden Danimarkalı zoolog Hans Ussing'in adını almıştır. Ussing chamber cihazı bağırsak mukozası ve akciğerler gibi doğal dokulardaki iyon transportunu ölçmek için kullanılmaktadır.

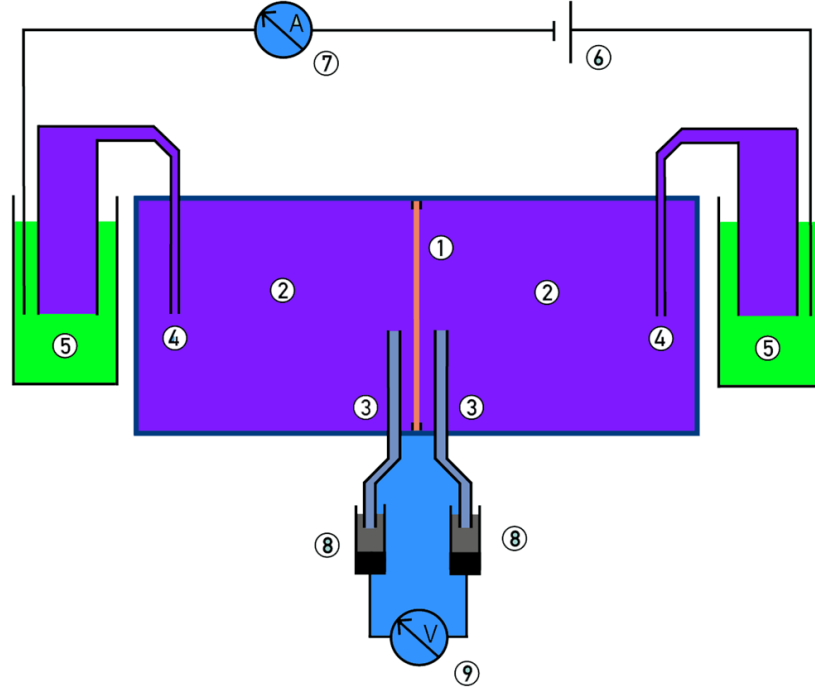
Ussing chamber yöntemi kullanılarak elde edilen elektrofizyolojik transport ölçümleri 1951'den beri bilinen bir yöntemdir. Objektif bir transepitelyal taşıma ölçüm sisteminin kurulması için bu sistemdeki dış kuvvetleri etkileyen etmenler; hidrostatik basınç, konsantrasyon gradyanı ve transepitelyal potansiyel farkıdır. Bu üç kuvvetin, hem pasif hem de aktif transepitelyal taşınmanın objektif olarak ölçülmesi için eşitlenmesi gerekir. Ussing chamber tekniği ise tüm bu şartları yerine getirir. Hidrostatik basınç ile konsantrasyon gradyanı, her iki chamberin (haznenin) de aynı seviyede (hacimde) aynı tamponla doldurulmasıyla eşitlenir. Kısa devre akımının uygulanmasıyla (I_{sc}) spontan transepitelyal potansiyel farkı 0 mV'ta kısa devre yaparak elektriksel transepitelyal gradyan ortadan kaldırılır. Bu durumda I_{sc} tüm aktif epitel iyonlarının taşınmalarının

net miktarına eşittir. Bununla birlikte, hangi iyon tiplerinin rol aldığını ayırt etmek mümkün değildir. Rol alan iyon tiplerini belirlemek için bu kanalları aktive veya inhibe etmek gerekmektedir.

Çalışmada kullanılan Ussing Chamber'ın (Physiologic Instruments, World Trade Drive, Suite 6 San Diego, CA, ABD) plastik olan chamber kısmı ince hücre tabakasının yer aldığı ve insan bronşiyal epitel hücrelerin ekilmiş olduğu 12 mm'lik transvel ile birbirinden ayrılmaktadır (Şekil 3.1). Bu transvele ekili hücrelerin apikal kısmı chamberin bir tarafına bakarken bazolateral kısmı da diğer tarafına bakmaktadır. Ussing Chamber cihazının chamberlarının her iki tarafı da fizyolojik bir solüsyon olan ve 115 mM NaCl, 2.4 mM K₂HPO₄, 0.4 mM KH₂PO₄, 24 mM NaHCO₃, 10 mM glukoz, 1.2 mM CaCl₂, 1.2 mM MgCl₂ içeren 5 ml Krebs Bikarbonat Ringer solüsyonuyla dolduruldu. Hücre kültürü Ussing Chamber'e yerleştirildiğinde yüzeyinde bulunan tüm solunum yolu yüzey sıvısı Ringer solüsyonu ile yıkandığından uzaklaşır.

Deneyler sırasında bu solüsyon %5 CO₂ ve %95 hava ile muamele edilmiş olup solüsyon 37°C'de tutuldu. Chamberi birbirinden ayıran kısımda bulunan epitel dokunun hem apikal hem de bazolateral tarafına bağlanmış Ag/AgCl elektrotları ile voltaj elektrotları bulunmaktadır. Ag/AgCl elektrotları akımı ölçerken voltaj elektrotu da transepitelyal resistans voltaj akımını ölçer.

Ussing Chamber deneyi sırasında; ilk olarak transvellere 15 dakikalık bazal kayıtlar alındı. 15 dakikanın sonunda bir ENaC kanalı inhibitörü olan amiloridden 50 µl apikal olarak eklendikten sonra 15 dakika daha kayıt alındı. Bu sürenin sonunda cAMP'yi ve dolayısı ile de CFTR kanalını uyardığı bilinen forskolin maddesinden 5 µl apikal olarak uygulandı ve 15 dakikalık kayıt alındı. Ardından bir CFTR kanal blokörü olan CFTRinh 172 maddesinden 5 µl apikal olarak eklenerek 15 dakikalık kayıt daha alındı. Son olarak ise Ca⁺² ile uyarılmış Cl⁻ kanallarını uyaran UTP maddesinden 5 µl apikal olarak eklenmiş olup yine 15 dakika kayıt alındı ve deney sonlandırıldı.



Şekil 3. 1. Ussing Chamberın temel prensibi: (1) epitel dokusu, (2) Ringer çözeltisi içeren iki yarım chamber, (3) ve (4) Agar-Ringer köprüler (5) Doymuş Ag-AgCl çözeltisi (6) değişken DC kaynağı (7) ampermetre (8) Ag-/AgCl elektrot (9) voltmetre

3.3. Sitotoksisite Testleri

E-likitlerde bulunan maddelerin sitotoksik etkilerini belirlemek amacıyla yapılan sitotoksisite testleri yüksek çözünürlüklü görüntüleme cihazı (Cytation 5) kullanılarak gerçekleştirildi.

3.3.1. Kullanılan maddeler

E-likitlerde bulunan maddelerin sitotoksik etkilerini araştırmak amacıyla yapılan sitotoksik çalışmalarda kontrol olarak fosfat buffer salin (PBS) (Thermo Fisher, Gibco, Waltham, Massachusetts, ABD) ile birlikte diğer maddeler; nikotin tuzu, benzoik asit, sodyum tartar, propilen glikol ve vegetable gliserin, serbest baz ile nikotin tuzu+benzoik asit karışımı (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, ABD) kullanıldı.

3.3.2. Gruplar, dozlar ve uygulama süreleri

E-sigara likitlerinde bulunan maddelerin sitotoksik etkilerini belirlemek amacıyla Tablo 3.3 de gösterilen gruplar oluşturuldu. Aynı zamanda ilgili tabloda maddelerin uygulama dozları ve uygulama süreleri de belirtildi.

Tablo 3.3. Sitotoksikite testlerinde kullanılan maddeler ve gruplar

Grup	Uygulanan Madde	Doz (mM)	Uygulama Süresi (saat)
Kontrol	PBS	-	24
Nikotin Tuzu	Nikotin tuzu	$9,99.10^{-7}$ -30	24
Serbest Baz Nikotin	Serbest baz nikotin	$9,99.10^{-7}$ -30	24
Benzoik Asit	Benzoik asit	$9,99.10^{-7}$ -30	24
Sodyum Tartar	Sodyum tartar	$9,99.10^{-7}$ -30	24
PG/VG	Propilen gliserol+vegetable gliserin (%55/45 oranında)	$9,99.10^{-7}$ -30	24
DMSO	DMSO	$9,99.10^{-7}$ -30	24
Nikotin Tuzu + Benzoik Asit	Nikotin tuzu + benzoik asit	$9,99.10^{-7}$ -30	24

3.3.3. Hücre kültürü

Bu çalışmada bir immortal hücre hattı olan ve North Carolina Üniversitesi Doku Kültürü Biriminden temin edilen insan embriyonik böbrek hücreleri (HEK-293T Hücreleri) kullanıldı.

Hücre kültürüne başlamadan önce fetal bovine serum (FBS) ile penisilin/streptomisin karıştırılarak 50 ml'lik falkon tüplere bölündü ve daha sonra kullanılmak üzere -20°C 'de saklandı. Hücre kültüründe kullanılan medyayı hazırlamak için ise steril kabinde Dubelco's modifiye edilmiş Eagle medyası (DMEM, Gibco) ile daha önce hazırlanmış FBS ve penisilin/streptomisin karışımı 500 ml'lik steril şişede karıştırılarak daha sonra kullanılmak üzere $+4^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı. Doku kültürü birimine ait nitrojen tankından alınan hücreler hızlıca sıcak su banyosunda çözüldü ve T75 flasklarına ekildi. T75 flasklarda bulunan hücreler %80 yoğunluğa ulaştığında split prosedürü gerçekleştirildi. Bu prosedürde ilk olarak eski medya aspire edildi, yerine ise hücreleri mukustan temizleyen fosfat buffer salinden (PBS) 5 ml eklendi ve hücre yüzeyi yıkandıktan kısa bir süre sonra aspire edildi. Bu yıkama işleminin ardından 2 ml %0,05 Tripsin EDTA eklenip 3-4 dakika sonunda hücre tabakasının birbirinden ayrılıp ayrılmadığını mikroskop altında

bakıldı. Tabakaların birbirinden ayrılmasından hemen sonra, Tripsin EDTA'nın enzimatik aktivitesini durdurmak için daha önce hazırlanmış DMEM medyadan 5 ml ekleyip pipetaj işlemi ile hücrelerin birbirinden ayrılmasını sağlandı. Ardından pipet ile flaskta bulunan hücre-medya karışımını 15 ml'lik konik tüplere koyup 500 G'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj işlemi sonunda toplamda 7 ml olan tripsin ve medya karışımının bulunduğu süpernatant kısmı atılarak, yerine 7 ml DMEM medya eklendi ve pipetaj ile hücrelerin medyanın içerisinde homojen dağıtılması sağlandı. Hemositometre ile hücre sayımı gerçekleştirildi. T75 flasklarına yeteri kadar hücre ve medya konularak ekim tamamlandı. Kùltürler 37°C'de %5'lik CO²'de inkübatörde tutuldu.

Çalışmada 2 adet 384 kuyucuklu plate, multichannel mikropipet ve 300 µl'lik filtreli pipet ucu, hücrenin plate tabanına tutunmasını sağlamak amacıyla Poli-L-lysin, ve kullanılan malzemelerin döküldüğü rezervuar (reagent reservoir) kullanıldı. Deneye başlamadan önce iki adet 384 kuyucuklu platemizin tabanı multichannel mikropipetle her bir kuyucuğa 40 µl gelecek şekilde Poli-L-lysin ile dolduruldu ve poli-L-Lysin yüzeye tamamıyla işlemesi için 20 dakika beklendi. Bu sürenin ardından fazla poli-L-lysin platelerden atıldı. Diğer taraftan HEK293T hücreleri %80 yoğunluğa ulaştığında split prosedürü uygulandı.

Hücreler santrifüj edildikten sonra süpernatant kısmı atılıp yerine medya eklendi ve hücreler medya ile yeniden karıştırılarak tüpün içinden 10 µl örnek alınıp hemositometrede sayımı gerçekleştirildi. Sayımdan sonra belirli sayıdaki hücreler 22.5 ml'lik medya ile karıştırıp rezervuara döküldü ve her bir kuyucuğa 50 milyon hücre gelecek şekilde 50 µl multichannel pipetle alınarak kuyucuklara ekimi yapıldı. Bu işlemin ardından plateler, plate santrifüjüne alınıp 2000 G'de 5-6 saniye santrifüj edildikten sonra 6 saat süre ile inkübatöre konuldu. Bu sürenin sonuna yaklaşırken ana plate olarak da adlandırılan 96 kuyucuklu iki plate alınıp bu platelerin ikisi de aynı şekilde ikişerli sütunlara ayrıldı. Bu sütunlardan sol tarafına o gruptan 100 µl, sağdakine ise 35 µl ekledik. 100µl eklediğimiz grubun yapılan seyreltilmelerden sonraki konsantrasyonu %30 iken, 35 µl eklenen grubun seyreltilmelerden sonraki konsantrasyonu ise %10'dur. Yani ana platedeki en yüksek e-likit konsantrasyonu %30 iken en düşük e-likit konsantrasyonu %10'dur. Daha sonra ana platede düşük miktarda e-likit eklenen kuyucuk 100µl'ye tamamlanması için medya eklendi. Dolu olan en alt kuyucuklar dışında diğer boş olan kuyucuklara ise 90µl medya konuldu. Bunun

ardından multichannel pipet ile en alttaki 100 µl dolu olan kuyucuklardan 10 µl alınıp bir üst satırdaki kuyucuya eklenerek pipetaj yapıldı. Her satırdan 10 µl alındı ve bir üstündeki kuyucuya tüm sütun kuyucukları bitinceye kadar eklenip pipetaj işlemine devam edildi.

Sonuç olarak hazırlanmış olduğumuz ana platede grupların maddeleri en alt kuyucukta en yoğunken en üst kuyucukta en az yoğunlukta hazırlanmış oldu. 6 saatin sonunda hücrelerin olduğu 384 well plate her üç sütunu bir gruba ait olacak şekilde ayrıldı ve farklı e-likit konsantrasyonlarının hazırlandığı ana plate kabine konuldu. Ardından ana plateden grupların olduğu kuyucuklardan multichannel pipet yardımıyla her bir kuyucuğa e-likitlerden 20µl gelecek şekilde hücrelerin bulunduğu plateye eklendi ve pipetaj yapıldıktan sonra 24 saatliğine inkübatöre konuldu. Logaritmik dilütasyon sonunda elde edilen konsantrasyonlar $9,99.10^{-7}$ ila 30 µM arasındaki değerlerdeydi.

Görüntüleme için immunofloresans bir boya olan Calcein AM (Thermo Fisher Scientific, Invitrogen, Life Technologies Corporation, Oregon, ABD) ve Propidium iyot (Life Technologies, Corporation, Oregon, ABD) boyları kullanıldı. Boyaların çalışma için hazırlanması sürecinde ilk olarak 50 ml'lik iki tüp alındı ve içerisine 20 ml Ringer solüsyonu konuldu. Ardından karanlıkta ve soğukta muhafaza edilen Calcein AM şişesinin içerisine 16.1 µl DMSO (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, ABD) eklendi ve karıştırılıp 12 µl'si Ringer solüsyon ile dolu tüpe boşaltıldı. Yine karanlıkta ve soğukta muhafaza edilen Propidium iyot boyasından ise 40 µl alınarak Calcein AM'in eklendiği aynı tüpe konuldu ve boyama yapılacak zamana kadar her iki tüpte karanlıkta muhafaza edildi. 24 saatlik sürenin sonunda 384 well plate steril kabine alındı ve medya kısmı 8 kanallı 3D yazıcı ile üretilmiş aparat ile aspire edildi. Ardından içerisinde immunofloresans boyları barındıran Ringer solüsyonu boyama işleminin gerçekleşmesi için rezervuara döküldü. Yine multichannel pipet yardımıyla her bir kuyucuğa 40µl boya gelecek şekilde kuyucuklar dolduruldu. 30 dakika boyunca inkübatöre konulan ve ışığa duyarlı boya içerdikleri için karanlıkta muhafaza edilen bu platerler bu sürenin sonunda okunması için Cytation 5 cihazına konuldu.

3.4. Otofloresans Çalışması

Üçüncü el maruziyet, ürün içildiğinde veya buharlaştırıldığında ortama salınan partiküllerin yüzeylerde birikmesiyle temas sonrası transdermal olarak alınmasıdır. Bu

durum ciddi sağlık sorunlarına neden olabilmektedir. Bu çalışmada aynı zamanda e-sigara buharına maruz kalan yüzeylerde birikimin olup olmadığını maddelerin otofloresans özelliklerinden yararlanılarak test edildi. Otofloresans, ortamda flüoresan boyaların yokluğunda, belirli bir dalga boyu ile eksite edilen biyolojik ve kimyasal yapılarından uzun dalga boylu ışığın yayılımıdır.

Bu çalışmada herhangi bir hücre kullanılmamış olup amacımız 8 farklı aroma içeren JUUL e-likitlerinin her birinin otofloresans özelliğinin belirlenmesiydi. Otofloresans limleri Tecan Infinite Pro Plate reader cihazı (Tecan Infinite Pro Plate m1000, Avusturya) ile gerçekleştirildi.

3.4.1. Kullanılan maddeler

E-sigaralarda bulunan maddelerin otofloresans özelliğini belirlemek için alışmamızda Juul marka elektronik sigaranın (JUUL, San Fransisco, Kaliforniya, ABD) farklı aromalara sahip olan “ soğuk nane (Cool mint)”, “Fruit Medley”, “virjinya tütünü (Virginia Tobacco), “klasik tütün (Classic Tobacco)”, “Mango”, “Creme Brulee”, “Soğuk salatalık (Cool Cucumber)” ve “klasik mentol (Classic Mentol)” aromaları kullanıldı.

3.4.2. Gruplar, dozlar ve uygulama süreleri

E-sigaralarda bulunan maddelerin otofloresans özelliğini belirlemek amacıyla Tablo 3.4 de gösterilen gruplar oluşturuldu. Aynı zamanda ilgili tabloda maddelerin uygulama dozları ve uygulama süreleri de belirtildi.

Tablo 3. 4. E-sigaralarda bulunan maddelerin otofloresans özelliğini belirlemede kullanılan maddeler ve gruplar

Grup	Uygulanan Madde	Doz (l)	Uygulama sıklığı
Kontrol	PBS	50	1
Mango	Mango	50	1
Virjinya tütünü	Virginia tobacco	50	1
Klasik tütün	Classic tobacco	50	1
Creme Brulee	Creme brulee	50	1
Klasik Mentol	Classic mentol	50	1
Soğuk Salatalık	Cool cucumber	50	1
Soğuk nane	Cool mint	50	1
Fruit Medley	Fruit medley	50	1

3.4.3. Deney prosedürü

İlk olarak birbirinden farklı her bir e-likitten 50 µl örnek alınarak 96 well platenin (saydam tabanlı ve saydam kapaklı) sadece 8 kuyucuğa (her bir kuyucuğa farklı e-likit gelecek şekilde) konuldu. Ardından bu e-likitler farklı dalga boylarında eksite edilerek en otofloresans özelliğe sahip olan e-likit saptanmaya çalışıldı. E-likitler 250 nm-600 nm dalga boyları arasında eksite edildi. Ölçüm sonucunda en yüksek otofloresans özelliğe sahip e-likit “Fruit Medley” aromalı olarak tespit edildi. Bir sonraki aşamada ise en yüksek otofloresans özelliğine sahip olarak bulunan bu e-likit ile buharlaştırma (vaping) deneyi gerçekleştirildi.

3.4.4. Yüzeyle e-sigara dumanı birikiminin ölçümü

Yapılan bu çalışmada Fruit Medley aromalı e-likitin en yüksek otofloresans özelliğine sahip olduğu belirlendikten sonra bu e-likitin ortamda birikiminin olup olmadığı yapılan deneyle ortaya konulması amaçlandı. Bunun için oluşturulan deney planı Tablo 3.5’te verildi. Ölçümler Tecan Infinite Pro plate reader (Tecan Infinite Pro Plate m1000, Avusturya) cihazı ile gerçekleştirildi.

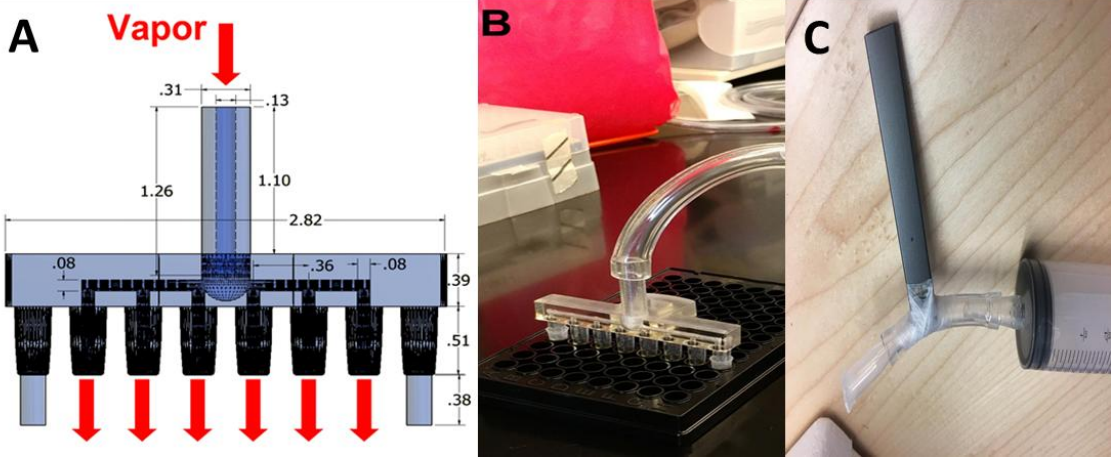
Tablo 3. 5. E-sigarada kullanılan Fruit Medley e-likitin ortamda birikiminin belirlenmesinde kullanılan maddeler ve gruplar

Grup	Uygulanan Madde	Miktar	Birim	Uygulama sıklığı(Puf)
Kontrol	PBS	75	µl	-
Fruit Medley	Fruit Medley	70	ml	1
Fruit Medley	Fruit Medley	70	ml	5
Fruit Medley	Fruit Medley	70	ml	10
Fruit Medley	Fruit Medley	70	ml	20

İlk olarak saydam tabanlı ve saydam kapaklı olan 96 well plate alınıp her bir kuyucuğun içerisine oluşabilecek herhangi bir yansımayı engellemesi için 75 µl PBS ekledi. Ardından vaping sırasında e-sigara buharının kuyucuk sütunları arasında birbiriyle karışmasını önlemek amacıyla tüm kuyucukların üzerini PCR için kullanılan silikon bantlarla kapatıldı.

Sütunları birer boşluk kalacak şekilde sadece PBS, 1 puf, 5 puf, 10 puf, 20 puf olarak ayırdı. Sadece PBS grubunu kontrol olarak kullanıp ilk başta Tecan plate reader’da daha

önce e-likitlerin otofloresans özelliğini ölçerken en yüksek piki veren uyarım/salınım dalga boyu olan 350/430 nm’de ölçümü yapıldı. Diğer vaping gruplarını da yine aynı dalga boylarında ölçüldü. E-sigara dumanı üflenirken enjektör ve 8 kanallı 3D manifold olarak adlandırılan ve kuyucuklara e-sigara buharını ileten bir sistem kullanıldı (Şekil 3). Sekiz kanallı olan çoğaltıcı ilk ve son kanalları kuyucuklara yerleştirmenin tam sağlanması için kapalı olup sadece altı kanalı açık ve aktif durumdadır (Şekil 3.2). Bu sistemde ince bir boru ve enjektör yardımıyla bir pompa sistemi oluşturularak JUUL marka e-sigaranın Fruit medley aroması içeren kartuşundan 70 ml e-sigara buharı 100 ml’lik enjektöre çekilerek plastik bir boru ve 3D manifold yardımıyla kuyucuklar e-sigara dumanına maruz bırakıldı. PBS kontrol grubu olarak ölçüldükten sonra diğer bir sütun 1 puf yapıp ölçüldü, bir diğeri 5 puftan sonra ölçüldü, diğer sütunlarda 10 ve 20 puftan sonra otofloresans özellikleri bakımından ölçüldü. Puf yapılırken enjektöre çekilen 70 ml e-sigara buharı oldukça yavaş bir şekilde kuyucuklara enjekte edildi. Daha öncede belirtildiği gibi bu ölçümler en yüksek otofloresans özelliğe sahip olduğunu bulunan “Fruit Medley” aromalı e-likitin 350 nm dalga boyundaki uyarımda 430 nm dalga boyundaki salınımında en yüksek piki verdiği gözlemlendiği için vaping deneyi boyunca bu uyarım/salınım dalga boyları kullanıldı.



Şekil 3. 2. 3D basılmış 6-kanallı dağıtıcı, aynı anda 6 kuyucuğa duman vermek için kullanılır. (A) Çoğaltıcının şematik çizimi, (B) 96 kuyucuklu plate ve 6 kanallı dağıtıcı, (C) Juul marka e-sig ve buharlaştırma düzeneği

3.5. İstatistiksel Analizler

3.5.1. Solunum yolu yüzey sıvı yüksekliğinin istatistiksel analizi

Tüm SYYS yüksekliği ölçümleri ilk olarak D'Agostino ve Pearson omnibus normallik testine tabi tutuldu. SYYS yükseklik verileri normal dağılım göstermediği için gruplar arasındaki farklılık non-parametrik Kruskal-Wallis testi ile incelendi ve farklı grupların belirlenmesinde çoklu karşılaştırma yöntemi olan Dunn's testi kullanıldı. İstatistiksel analiz GraphPad Prism 8.0 kullanılarak yapıldı. Tüm değerler ortalama±SD olarak gösterildi ve $p < 0.05$ anlamlı kabul edildi. Tüm deneyler en az 3 kez tekrarlandı. İstatistiksel analiz GraphPad Prism v8.0 programı kullanılarak yapıldı.

3.5.2. İyon transportunun istatistiksel analizi

İstatistiksel analiz GraphPad Prism 8.0 kullanılarak yapıldı. Tüm değerler ortalama ± SD olarak gösterildi. Veriler non-parametrik ANOVA ile analiz edildi ve $p < 0.05$ anlamlı kabul edildi. Tüm deneyler en az 3 kez tekrarlandı.

3.5.3. Sitotoksosite testlerinin istatistiksel analizi

Sitotoksosite testlerinde elde edilen veriler ilk olarak D'Agostino ve Pearson omnibus normallik testine tabi tutuldu. Verileri normal dağılım göstermediği için gruplar arasındaki farklılık non-parametrik Kruskal-Wallis testi ile incelendi ve farklı grupların belirlenmesinde çoklu karşılaştırma yöntemi olan Dunn's testi kullanıldı. İstatistiksel analiz GraphPad Prism 8.0 kullanılarak yapıldı. Tüm değerler ortalama±SD olarak gösterildi ve $p < 0.05$ anlamlı kabul edildi. Tüm deneyler en az 3 kez tekrarlandı. İstatistiksel analiz GraphPad Prism v8.0 programı kullanılarak yapıldı.

3.5.4. Otofloresans verilerin istatistiksel analizi

İstatistiksel analiz GraphPad Prism v8.0 kullanılarak yapıldı. Tüm değerler ortalama ± SD olarak gösterildi. Veriler non-parametrik ANOVA ile analiz edildi ve $p < 0.05$ anlamlı kabul edildi. Tüm deneyler en az 3 kez tekrarlandı.

4. BULGULAR

4.1. Solunum Yolu Yüzey Sıvı Yüksekliğinin Belirlenmesi

4.1.1. Elektronik sigara bileşenlerinin zamana bağlı olarak solunum yolu yüzey sıvı yüksekliği üzerine etkileri

Normal solunum yolu epitelleri, etkili bir klirensin sağlanması ve mukusun hidratlanması için yeterli bir SYYS hacminin muhafaza edilmesi gerekir. Bunun için solunum yolu epitelleri Na^+ emilimini ve Cl^- sekresyonunu dengeler. E-sigarada bulunan bileşenlerin SYYS yüksekliğinin düzenlenmesi üzerindeki etkilerini incelemek için HBEC'ler Tablo 3.1'de belirtilen bileşenlere 0, 2, 6 ve 24 saat maruz bırakıldı.

Elektronik sigara bileşenlerinin zamana bağlı olarak solunum yolu yüzey sıvı yüksekliği üzerine etkileri bakıldığında SYYS yüksekliği 0. saat haricinde geri kalan zaman dilimlerinde (2 saat, 6 saat ve 24 saat) azalma gösterdiği belirlendi. Veriler daha ayrıntılı incelendiğinde aşağıdaki sonuçlar elde edildi (Tablo 4.1, Şekil 4.1-3).

Kontrol grubunun zamana bağlı olarak solunum yolu yüzey sıvı yüksekliği değişimlerine bakıldığında 0. saatteki SYYS yüksekliğinin 2, 6, 24 ve adenozin uygulaması sonrası 0 ve 30. dakikalarına göre daha yüksek olduğu saptandı (sırasıyla $p=0,0157$, $p<0,0001$, $p<0,0001$, $p<0,0001$, $p<0,0001$). Kontrol grubunun 2. saatteki SYYS yüksekliğinin 24 ve adenozin uygulaması sonrası 0 ve 30. dakikalarına göre daha yüksek olduğu saptandı ($p<0,0001$). Kontrol grubunun 2 ve 6. saatleri arasında SYYS yüksekliğinde azalma gözlenmesine rağmen bu durum istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,1910$). Kontrol grubunun 6. saatteki SYYS yüksekliğinin 24. saatte göre daha yüksek olduğu belirlendi($p=0,0418$). Kontrol grubunun diğer zaman dilimleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$).

Nikotin tuzu uygulanan nikotin grubunun zamana bağlı olarak solunum yolu yüzey sıvı yüksekliği değişimlerine bakıldığında 0. saatteki SYYS yüksekliğinin 6, 24 ve adenozin uygulaması sonrası 0 ve 30. dakikalarına göre daha yüksek olduğu saptandı (sırasıyla $p=0,0056$, $p<0,0001$, $p<0,0001$, $p<0,0001$, $p<0,0001$). Fakat nikotin tuzu grubunun 0 ve 2. saatleri arasında SYYS yüksekliğinde azalma gözlenmesine rağmen bu durum

istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,3034$). Nikotin tuzu grubunun 2. saatteki SYYS yüksekliğinin 24 ve adenozin uygulaması sonrası 0 ve 30. dakikalarına göre daha yüksek olduğu saptandı ($p<0,0001$). Nikotin tuzu grubunun 2 ve 6. saatleri arasında SYYS yüksekliğinde istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir azalma saptandı ($p=0,6851$). Nikotin tuzu grubunun 6. saatteki SYYS yüksekliğinin 24 ve adenozin uygulaması sonrası 0 ve 30. dakikalarına göre daha yüksek olduğu saptandı (sırasıyla $p<0,0001$, $p=0,0003$ ve $p=0,0110$). Nikotin tuzu grubunun diğer zaman dilimleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$).

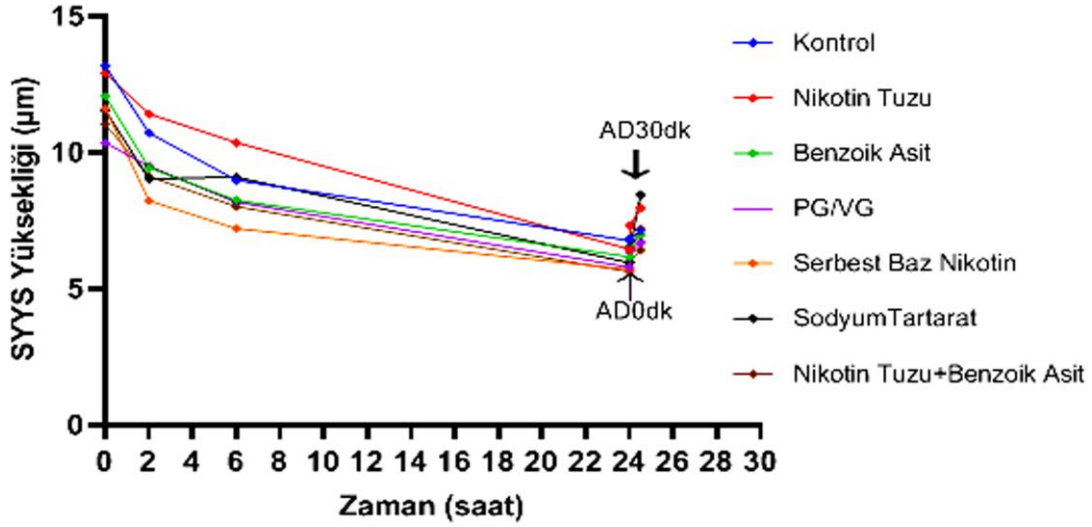
Tablo 4. 1. Elektronik sigara bileşenlerinin zamana bağlı olarak solunum yolu yüzey sıvı yüksekliği üzerine etkileri

Gruplar		0S	2S	6S	24S	AD0dk	AD30dk	P
Kontrol	Min	8,577	6,057	4,743	4,436	5,096	5,614	<0,0001
	Mak	28,620	16,130	16,488	14,133	13,343	13,895	
	Ort	13,171	10,723	8,977	6,770	6,833	7,144	
Nikotin Tuzu	Min	6,245	5,363	4,664	4,368	4,664	5,210	<0,0001
	Mak	25,395	17,421	22,238	12,495	10,721	12,922	
	Ort	12,895	11,412	10,361	6,449	7,316	7,966	
Benzoik Asit	Min	7,917	4,834	4,977	4,067	5,022	5,824	<0,0001
	Mak	15,464	17,995	17,512	14,992	12,308	13,280	
	Ort	12,064	9,442	8,245	6,169	6,576	6,972	
PG/VG	Min	6,097	4,385	4,436	4,345	5,096	5,022	<0,0001
	Mak	18,759	25,139	14,445	10,864	10,981	9,288	
	Ort	10,350	9,489	8,174	5,793	6,363	6,696	
Serbest Baz Nikotin	Min	6,859	5,204	5,193	4,465	5,159	5,574	<0,0001
	Mak	15,974	14,293	16,187	10,004	10,675	14,714	
	Ort	11,605	8,219	7,207	5,709	6,424	7,193	
Sodyum Tartarat	Min	8,519	5,175	6,029	4,431	5,085	5,471	<0,0001
	Mak	16,710	20,464	17,614	11,779	9,714	32,652	
	Ort	11,545	9,034	9,089	5,952	6,448	8,441	
Nikotin Tuzu+Benzoik Asit	Min	6,080	5,363	5,528	4,698	4,965	5,409	<0,0001
	Mak	20,452	17,842	19,349	7,513	7,223	8,440	
	Ort	11,038	9,113	8,019	5,619	5,978	6,421	

*S: saat; AD0dk: Adenozin 0 dakika; AD30dk: Adenozin 30 dakika. **Değerler µm cinsinden verilmiştir.

Benzoik asit uygulanan benzoik asit grubunun zamana bağlı olarak solunum yolu yüzey sıvı yüksekliği değişimlerine bakıldığında 0. saatteki SYYS yüksekliğinin 2, 6, 24 ve adenozin uygulaması sonrası 0 ve 30. dakikalarına göre daha yüksek olduğu belirlendi (sırasıyla $p=0,0045$, $p<0,0001$, $p<0,0001$, $p<0,0001$, $p<0,0001$). Benzoik asit grubunun 2. saatteki SYYS yüksekliğinin 24 ve adenozin uygulaması sonrası 0 ve 30. dakikalarına göre daha yüksek olduğu görüldü ($p=0,0001$, $p=0,0013$ ve $p=0,0094$).

Benzoik asit grubunun 2 ve 6. saatleri arasında SYYS yüksekliğinde azalma gözlenmesine rağmen bu durum istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,5700$). Benzoik asit grubunun diğer zaman dilimleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark belirlenmedi ($p>0,05$).

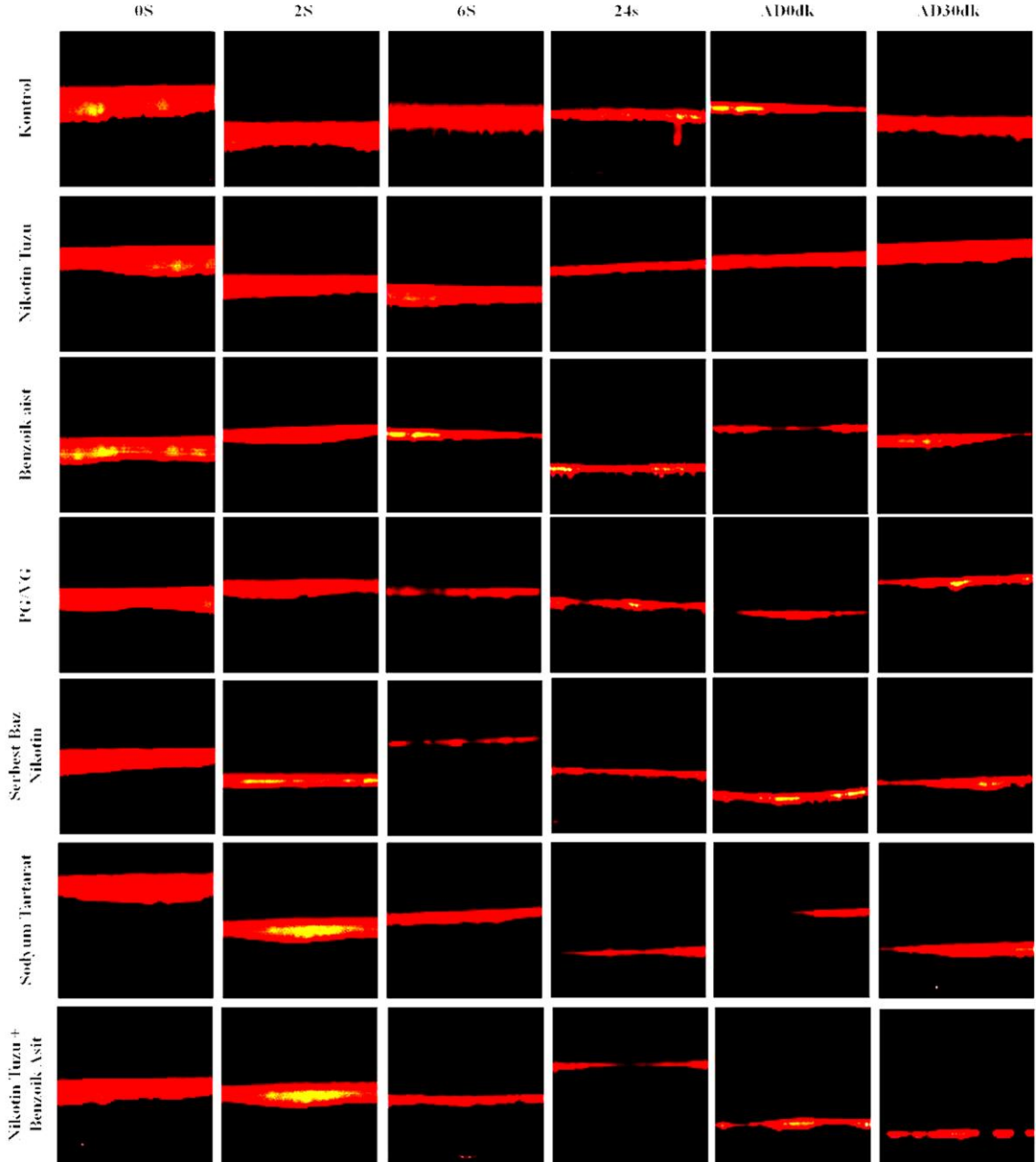


Şekil 4. 1. Elektronik sigara bileşenlerinin zamana bağlı olarak solunum yolu yüzey sıvı yüksekliği üzerine etkileri (SYYS: solunum yolu yüzey sıvısı; AD0dk: Adenozin 0 dakika; AD30dk: Adenozin 30 dakika)

PG/VG uygulanan PG/VG grubunun zamana bağlı olarak solunum yolu yüzey sıvı yüksekliği değişimlerine bakıldığında 0. saatteki SYYS yüksekliğinin 6, 24 ve adenozin uygulaması sonrası 0 ve 30. dakikalarına göre daha yüksek olduğu saptandı (sırasıyla $p=0,0400$, $p<0,0001$, $p<0,0001$, $p<0,0001$, $p<0,0001$). Buna karşın PG/VG grubunun 0 ve 2. saatleri arasında SYYS yüksekliğinde istatistiksel olmayan bir azalma gözlemlendi ($p=0,8552$). PG/VG grubunun 2. saatteki SYYS yüksekliğinin 24 ve adenozin uygulaması sonrası 0 ve 30. dakikalarına göre daha yüksek olduğu belirlendi (sırasıyla $p<0,0001$, $p=0,0004$ ve $p=0,0024$). PG/VG grubunun 2 ve 6. saatleri arasında SYYS yüksekliğinde istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir azalma saptandı ($p=0,4844$). PG/VG grubunun 6. saatteki SYYS yüksekliğinin 24. saate göre daha yüksek olduğu saptandı ($p=0,0173$). PG/VG grubunun diğer zaman dilimleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$).

Serbest baz nikotin uygulanan serbest baz nikotin grubunun zamana bağlı olarak solunum yolu yüzey sıvı yüksekliği değişimlerine bakıldığında 0. saatteki SYYS yüksekliğinin 2, 6, 24 ve adenozin uygulaması sonrası 0 ve 30. dakikalarına göre daha

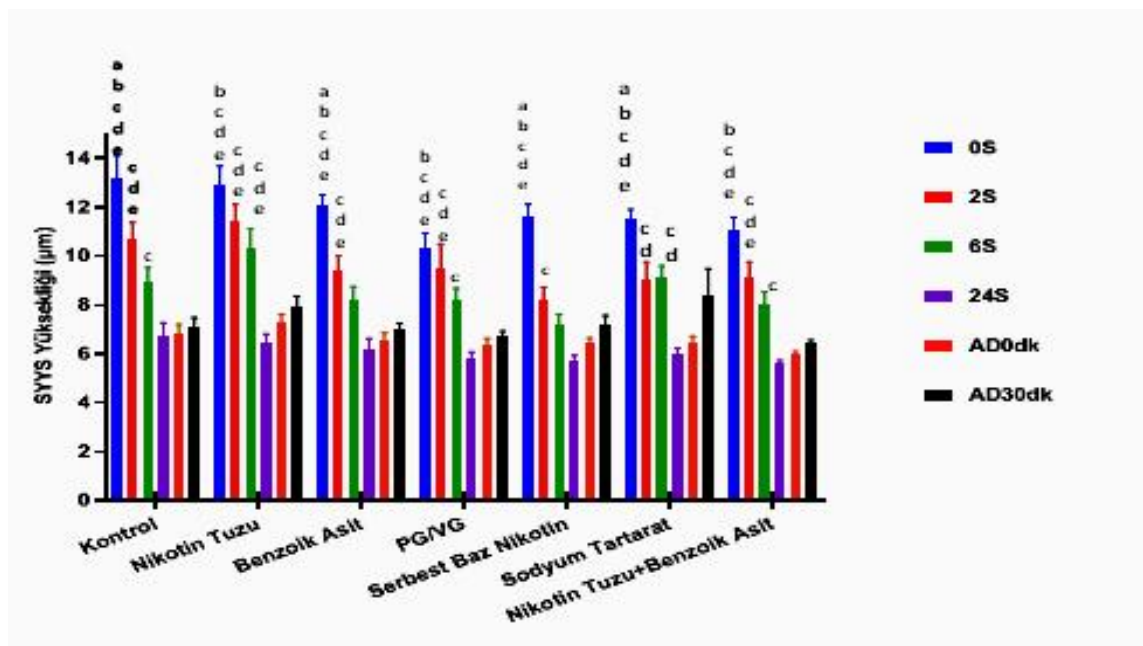
yüksek olduğu saptandı (tüm p değerleri $p < 0,0001$). Serbest baz nikotin grubunun 2. saatteki SYYS yüksekliğinin 24 saatte göre daha yüksek olduğu belirlendi ($p = 0,0097$). Serbest baz nikotin grubunun diğer zaman dilimleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark belirlenmedi ($p > 0,05$).



Şekil 4. 2. Elektronik sigara bileşenlerinin zamana bağlı olarak solunum yolu yüzey sıvı yüksekliği üzerine etkilerinin temsili gösterimi (AD0dk: Adenozin 0 dakika; AD30dk: Adenozin 30 dakika)

Sodyum hidrojen tartarat uygulanan sodyum tartarat grubunun zamana bağlı olarak solunum yolu yüzey sıvı yüksekliği değişimlerine bakıldığında 0. saatteki SYYS yüksekliğinin 2, 6, 24 ve adenozin uygulaması sonrası 0 ve 30. dakikalarına göre daha

yüksek olduğu belirlendi (sırasıyla $p=0,0096$, $p=0,0124$, $p<0,0001$, $p<0,0001$, $p=0,0004$). Sodyum tartarat grubunun 2. saatteki SYYS yüksekliğinin 24 ve adenozin uygulaması sonrası 0 dakikasına göre daha yüksek görüldü ($p=0,0005$ ve $p=0,0068$). Benzer şekilde sodyum tartarat grubunun 2. saatine göre 6. saat ve adenozin uygulaması sonrası 30. dakikasına SYYS yüksekliğinde azalma görüldü (sırasıyla $p=0,0004$ ve $p=0,0052$). Sodyum tartarat grubunun 24. saatteki SYYS yüksekliğinin adenozin uygulaması sonrası 0 dakikasına göre daha yüksek görüldü ($p=0,0106$). Sodyum tartarat grubunun diğer zaman dilimleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark belirlenmedi. ($p>0,05$).



Şekil 4. 3. Elektronik sigara bileşenlerinin zamana bağlı olarak solunum yolu yüzey sıvı yüksekliği üzerine etkileri (a: 2. s göre anlamlı; b: 6. s göre anlamlı; c: 24. s göre anlamlı; d: AD0dk göre anlamlı; e: AD30dk göre anlamlı; SYYS: solunum yolu yüzey sıvısı; S: saat; AD0dk: Adenozin 0 dakika; AD30dk: Adenozin 30 dakika)

Nikotin tuzu ve benzoik asidin kombine uygulandığı nikotin tuzu+benzoik asit grubunun zamana bağlı olarak solunum yolu yüzey sıvı yüksekliği değişimlerine bakıldığında 0. saatteki SYYS yüksekliğinin 6, 24 ve adenozin uygulaması sonrası 0 ve 30. dakikalarına göre daha yüksek olduğu saptandı (sırasıyla $p=0,0007$, $p<0,0001$, $p<0,0001$, $p<0,0001$). Buna karşın nikotin tuzu+benzoik asit grubunun 0 ve 2. saatleri arasında SYYS yüksekliğinde istatistiksel olmayan bir azalma gözlemlendi ($p=0,0997$). Nikotin tuzu+benzoik asit grubunun 2. saatine göre SYYS yüksekliğinin 24 ve adenozin uygulaması sonrası 0 ve 30. dakikalarına göre azaldığı belirlendi (sırasıyla $p<0,0001$, $p=0,0004$ ve $p=0,0040$). Nikotin tuzu+benzoik asit grubunun 2 ve 6. saatleri arasında

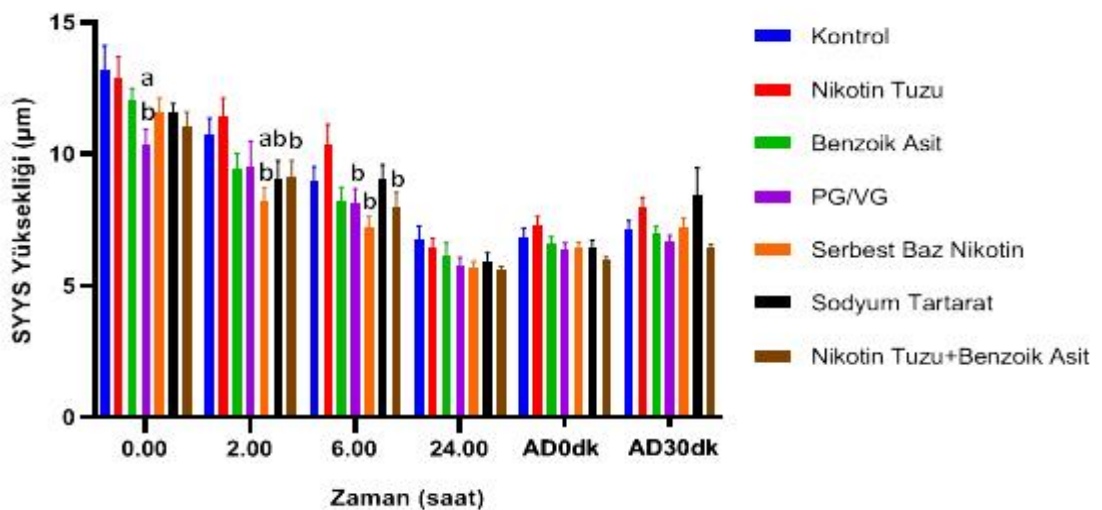
SYYS yüksekliğinde istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir azalma saptandı ($p=0,6804$). Nikotin tuzu+benzoik asit grubunun 6. saatteki SYYS yüksekliğinin 24. saate göre daha yüksek olduğu saptandı ($p=0,0159$). Nikotin tuzu+benzoik asit grubunun diğer zaman dilimleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$).

4.1.2. Aynı zaman dilimlerinde elektronik sigara bileşenlerinin solunum yolu yüzey sıvı yüksekliği üzerine etkileri

Gruplar arasında yapılan karşılaştırmalar sonucunda Şekil 4.4'de gösterilen farklılıklar elde edildi. Veriler daha ayrıntılı incelendiğinde ise aşağıdaki sonuçlar elde edildi (Tablo 4.2).

Grupların 0. saatteki SYYS değerleri karşılaştırıldığında PG/VG grubunun SYYS yüksekliğinin kontrol ve nikotin tuzu gruplarına göre daha düşük olduğu saptandı (sırasıyla $p=0,0033$ ve $p=0,0091$). Aynı zaman diliminde diğer gruplar arasında ise istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$).

Grupların 2. saatteki SYYS değerleri karşılaştırıldığında serbest baz nikotin grubunun SYYS yüksekliğinin kontrol ve nikotin tuzu gruplarına göre daha düşük olduğu saptandı (sırasıyla $p=0,0150$ ve $p=0,0003$). Diğer yandan nikotin tuzu grubunun SYYS yüksekliği sodyum tartarat ve nikotin tuzu+benzoik asit gruplarına göre istatistiksel olarak daha yüksek bulundu (sırasıyla $p=0,0195$ ve $p=0,0276$). Aynı zaman diliminde diğer gruplar arasında ise istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$).



Şekil 4. 4. Elektronik sigara bileşenlerinin solunum yolu yüzey sıvı yüksekliği üzerine etkileri (a: Kontrol grubuna göre anlamlı; b:Nikotin tuzu grubuna göre anlamlı; SYYS: solunum yolu yüzey sıvısı; AD0dk: Adenozin 0 dakika; AD30dk: Adenozin 30 dakika)

Grupların 6. saatteki SYYS değerleri karşılaştırıldığında nikotin tuzu grubunun SYYS yüksekliğinin PG/VG, serbest baz nikotin ve nikotin tuzu+benzoik asit gruplarına göre daha yüksek olduğu saptandı (sırasıyla $p=0,0438$ $p=0,0003$ ve $p=0,0229$). Aynı zaman diliminde diğer gruplar arasında ise istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$).

Grupların 24. saatteki SYYS değerleri karşılaştırıldığında kontrol grubunun SYYS yüksekliğinin diğer gruplara göre daha yüksek olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$). Benzer şekilde aynı zaman diliminde diğer gruplar arasında ise istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p=0,269$).

Gruplara 24 saat sonra adenozin uygulamasının 0 dakikasında alınan SYYS ölçümlerinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p=0,0570$). Fakat bu zaman diliminde nikotin tuzu grubunun SYYS değerleri diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir yüksekliğe sahipti ($p>0,05$).

Tablo 4. 2. Elektronik sigara bileşenlerinin solunum yolu yüzey sıvı yüksekliği üzerine etkileri

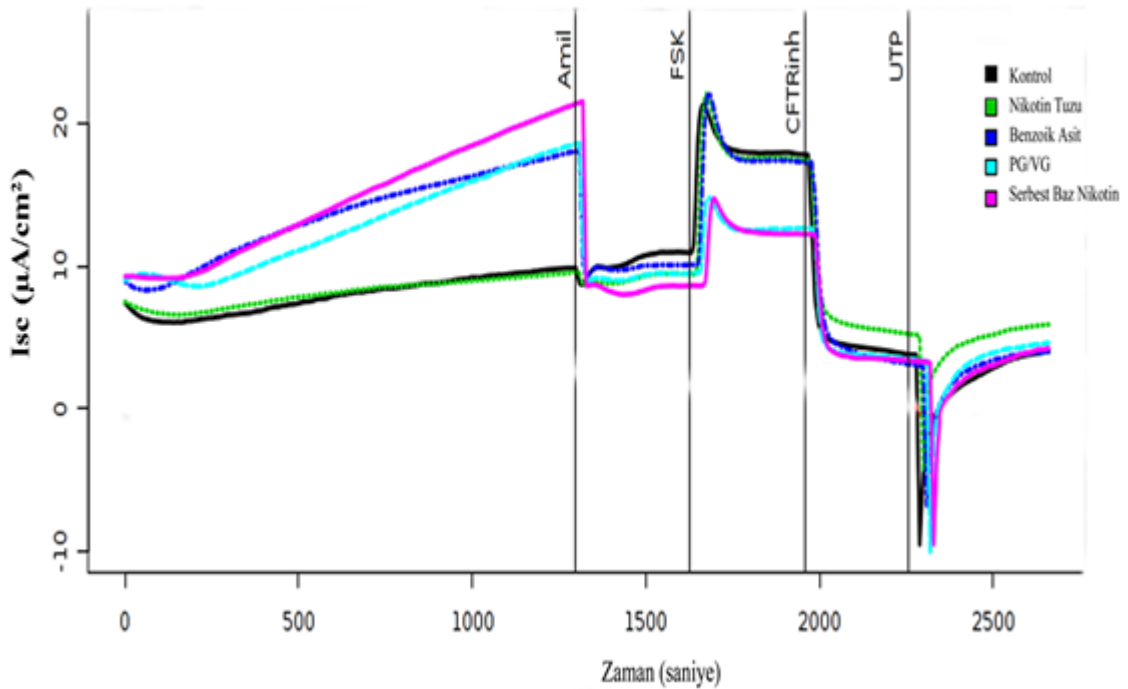
Gruplar		0 s	2s	6s	24s	AD0dk	AD30dk
Kontrol	Min	8,577	6,057	4,743	4,436	5,096	5,614
	Mak	28,620	16,130	16,488	14,133	13,343	13,895
	Ort	13,171	10,723	8,977	6,770	6,833	7,144
Nikotin Tuzu	Min	6,245	5,363	4,664	4,368	4,664	5,210
	Mak	25,395	17,421	22,238	12,495	10,721	12,922
	Ort	12,895	11,412	10,361	6,449	7,316	7,966
Benzoik Asit	Min	7,917	4,834	4,977	4,067	5,022	5,824
	Mak	15,464	17,995	17,512	14,992	12,308	13,280
	Ort	12,064	9,442	8,245	6,169	6,576	6,972
PG/VG	Min	6,097	4,385	4,436	4,345	5,096	5,022
	Mak	18,759	25,139	14,445	10,864	10,981	9,288
	Ort	10,350	9,489	8,174	5,793	6,363	6,696
Serbest Baz Nikotin	Min	6,859	5,204	5,193	4,465	5,159	5,574
	Mak	15,974	14,293	16,187	10,004	10,675	14,714
	Ort	11,605	8,219	7,207	5,709	6,424	7,193
Sodyum Tartarat	Min	8,519	5,175	6,029	4,431	5,085	5,471
	Mak	16,710	20,464	17,614	11,779	9,714	32,652
	Ort	11,545	9,034	9,089	5,952	6,448	8,441
Nikotin Tuzu+Benzoik Asit	Min	6,080	5,363	5,528	4,698	4,965	5,409
	Mak	20,452	17,842	19,349	7,513	7,223	8,440
	Ort	11,038	9,113	8,019	5,619	5,978	6,421
	P	0,026	0,028	0,005	0,269	0,057	0,07

*S: saat; AD0dk: Adenozin 0 dakika; AD30dk: Adenozin 30 dakika. **.değerler μm cinsinden verilmiştir.

Gruplara 24 saat sonra adenzin uygulamasının 30 dakikasinda alınan SYYS ölçümlerinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p=0,0700$). Fakat bu zaman diliminde nikotin tuzu grubunun SYYS değerleri diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir yüksekliğe sahip olduğu belirlendi ($p>0,05$).

4.2. Elektronik sigara bileşenlerinin İyon Değişimi Üzerine Etkisi

Elektronik sigaralarda bulunan bileşenlerin insan bronşiyal epitelyal hücrelerde bulunan iyon kanalları üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla; ENaC kanallarının fonksiyonları belirlemek amacıyla bir ENaC kanalı inhibitörü olan amilorid kullanıldı. cAMP ile aktiflenen CFTR kanallarının fonksiyonları belirlemek amacıyla bir hücre içi cAMP artırıcısı olan forskolin kullanıldı. Ardından bir CFTR kanal blokörü olan CFTRinh 172 kullanıldı. Son olarak ise Ca^{+2} ile uyarılmış Cl^- kanallarını uyaran UTP kullanıldı iyon dağılımında meydana gelen değişimler ussing chamber aracılığıyla kayıt edildi. Elde edilen veriler ΔI_{sc} ve ΔTER olarak analiz edildi. Maddelerin eklenmesinden sonra meydana gelen değişimler Şekil 4.5’de temsili olarak gösterilmiştir.



Şekil 4. 5. Elektronik sigara bileşenlerinin iyon değişimi üzerine etkisinin temsili gösterimi

4.2.1. Elektronik sigara bileşenlerinin iyon kanalları üzerine etkileri

Elektronik sigara bileşenlerinin iyon değişimi üzerindeki etkileri belirlemek için yapılan çalışmada gruplar arasında ΔI_{sc} 'ler bakımında anlamlı farklılık saptanmadı ($p > 0,05$) (Tablo 4.3, Şekil 6.).

Gruplar daha ayrıntılı incelendiğinde, maddelerin ilk uygulandığı zaman dilimini temsil eden bazal aktivite süresince alınan ΔI_{sc} 'ler değerlendirildiğinde gruplar arasında herhangi bir anlamlı fark belirlenmedi ($p = 0,137$).

ENaC fonksiyonlarını ölçmek amacıyla ENaC kanallarının amilorid ile inhibisyonundan sonra maddelerin etkinliğini gösteren ΔI_{sc} 'ler incelendiğinde, kontrol grubuna göre diğer grupların (Nikotin tuzu ve nikotin tuzu + benzoik asit grupları hariç) ΔI_{sc} 'leri düşük olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p = 0,427$). Benzer şekilde Nikotin tuzu ve nikotin tuzu+ benzoik asit gruplarının ΔI_{sc} 'leri kontrol grubuna göre yüksek olmasına rağmen anlamlı fark bulunmadı ($p = 0,427$).

CFTR'ın aktivasyonuna artırarak klor iyonlarının sekresyonunu uyaran forskolin uygulamasından sonra gruplardan alınan hem FSK (pik) hem de FSK (plato) ΔI_{sc} değerleri bakımından gruplar arasında fark belirlenmedi (sırasıyla $p = 0,373$ ve $p = 0,658$).

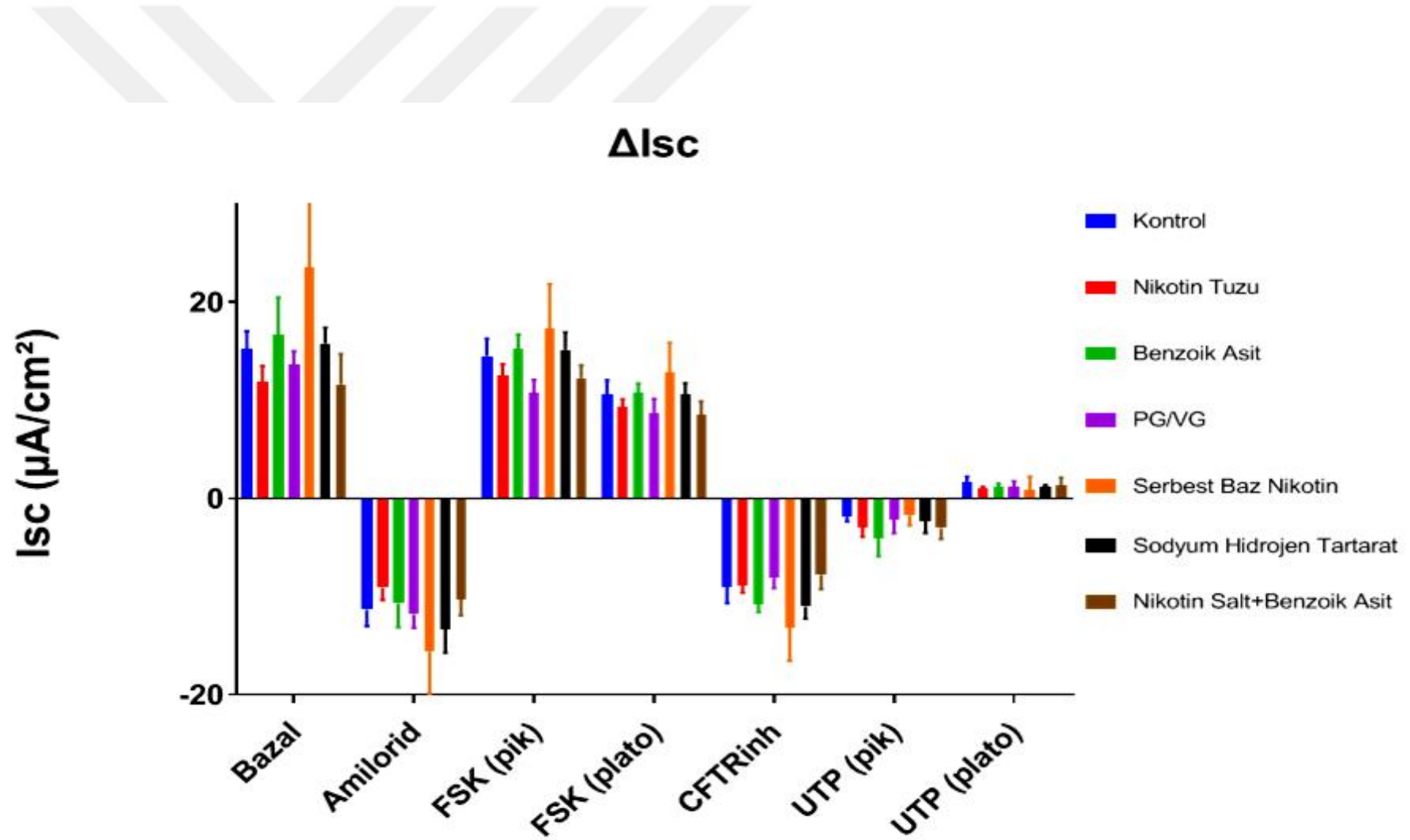
Maddelerin CFTR kanalları üzerine etkilerini belirlemek amacıyla bir CFTR inhibitörü olan CFTRinh-172 uygulamasından sonra alınan ΔI_{sc} değerleri incelendiğinde serbest baz nikotin grubunun ΔI_{sc} 'leri kontrol ve diğer gruplara göre daha yüksek çıkmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p = 0,150$).

E-sigarada bulunan maddelerin kalsiyumla aktiflenen klor kanallarının aktivitesi üzerindeki etkisini ölçmek amacıyla bir CaCC aktivatörü olan UTP uygulaması sonrası alınan kayıtlar incelendiğinde hem UTP (pik) hem de UTP (plato) ΔI_{sc} değerleri bakımından gruplar arasında anlamlı fark bulunmadı (sırasıyla $p = 0,844$ ve $p = 0,954$).

Tablo 4. 3. Elektronik sigaralarda bulunan maddelerin iyon değişimi üzerine etkisi

Parametre	Kontrol	Nikotin Tuzu	Benzoik Asit	PG/VG	Serbest Baz Nikotin	Sodyum Tartar	Nikotin Tuzu + Benzoik Asit	P	
Bazal	Minimum	6,668057	0,745058	-3,85557	9,634665	9,478842	9,481396	-10,6709	0,137
	Maksimum	26,93704	19,53244	46,91311	16,43215	43,89967	25,37881	20,53465	
	Ortalama	15,20174	11,85563	16,64827	13,59582	23,51808	15,78408	4,931875	
Amilorid	Min	-23,8001	-16,674	-22,3637	-15,8208	-27,6583	-27,0707	-17,1542	0,427
	Mak	-4,82712	1,920121	-7,8031	-7,33903	-7,15596	-4,45417	-4,49419	
	Ortalama	-11,3231	-9,08729	-12,5691	-11,7978	-15,569	-13,3405	-10,8242	
FSK (pik)	Min	7,539988	5,829334	7,11424	7,408006	10,20602	7,638761	4,587855	0,373
	Mak	26,37931	19,15949	25,15912	14,40985	29,3885	26,40912	16,84342	
	Ortalama	14,50653	12,47093	15,16961	10,74825	17,30621	15,11318	10,71564	
FSK (plato)	Min	5,606243	4,43714	5,577292	5,481924	7,093804	5,00083	-1,44669	0,658
	Mak	18,72352	13,27481	15,2358	12,78349	18,78057	17,35262	12,02737	
	Ortalama	10,57472	9,326293	10,77993	8,752346	12,76284	10,59879	5,29034	
CFTRinh	Min	-15,5594	-13,5286	-15,2494	-11,1026	-22,7766	-19,5495	-11,8826	0,150
	Mak	4,612548	-5,96983	-5,90256	-6,06605	-7,49145	-5,7825	2,9334	
	Ortalama	-8,96423	-8,86747	-10,7763	-8,08835	-13,1251	-10,9826	-4,4746	
UTP (pik)	Min	-4,17829	-10,7552	-20,4342	-7,28454	-4,13316	-13,6214	-8,45109	0,844
	Mak	-0,05194	-0,07663	-0,05024	-0,01873	0,063862	0,028099	-0,03065	
	Ortalama	-1,8664	-2,95219	-4,11156	-2,13163	-1,70129	-2,28596	-4,24087	
UTP (plato)	Min	-2,02826	-0,31335	-1,67319	-0,43	-2,55704	-0,00085	-4,25833	0,954
	Mak	5,996227	2,305848	2,934252	2,567257	3,874302	2,18749	4,339218	
	Ortalama	1,598101	0,962189	1,121728	1,169614	0,863842	1,129624	0,040444	

*FSK: forskolin, UTP: Üridin trifosfat, birimler $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ olarak değerlendirilmiştir



Şekil 4. 6. Elektronik sigaralarda bulunan maddelerin iyon değişimi üzerine etkisi

4.2.2. Elektronik sigara bileşenlerinin transepitelyal bariyer üzerine etkileri

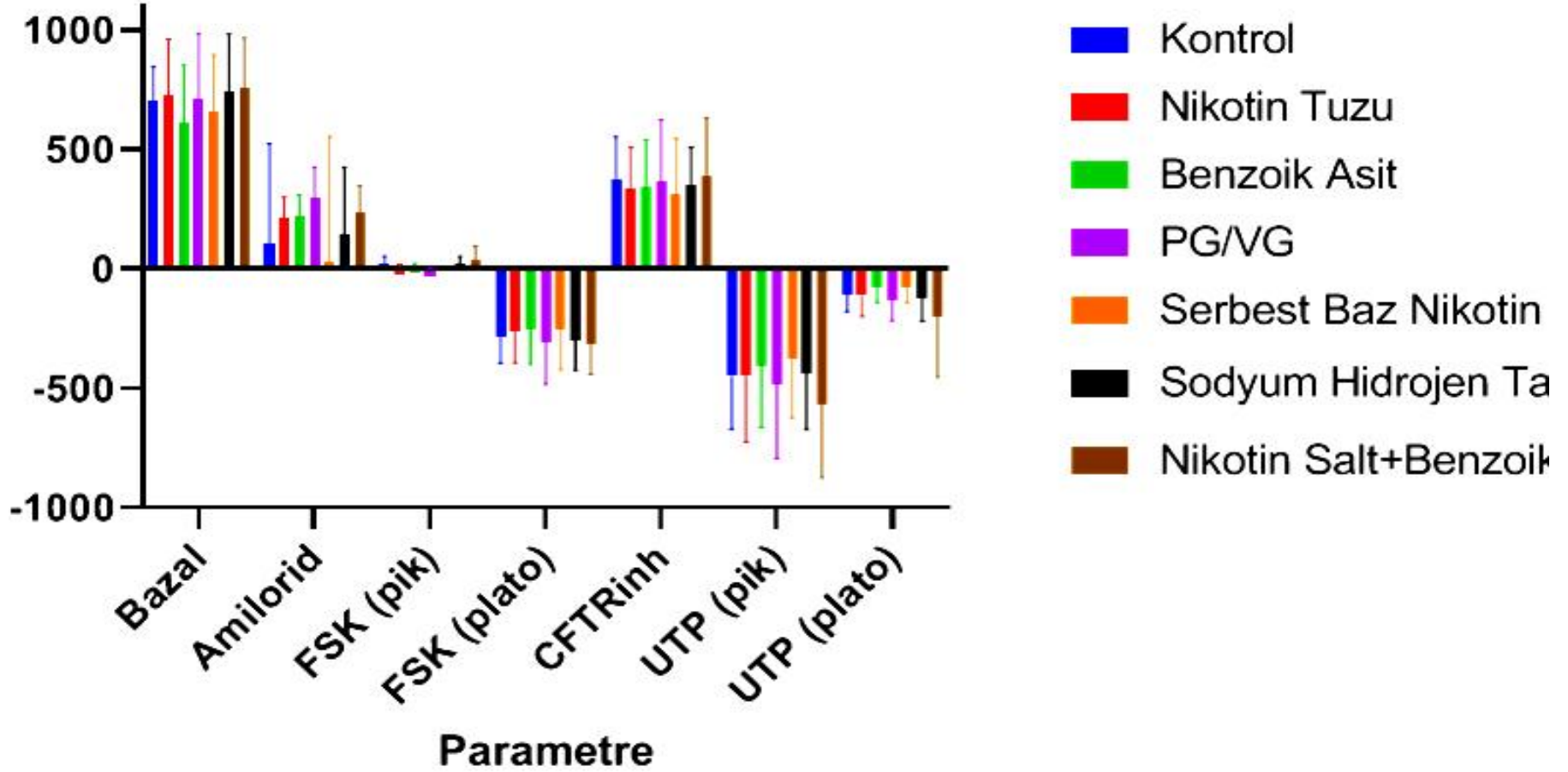
Transepitelyal/transendotel elektriksel direnç (TER), hücre kültüründe sıkı bağlantı (tight junction) dinamiklerinin bütünlüğünü ölçmek için yaygın olarak kullanılan nicel bir tekniktir. TER değerleri, hücresel bariyerlerin bütünlüğünün güçlü bir göstergesidir ve ilaç veya kimyasalların bu bariyerler boyunca taşınmasının değerlendirilmesinde sıklıkla kullanılmaktadır. TER ölçümleri hücre hasarı olmadan gerçek zamanlı olarak yapılabilmekte ve genellikle geniş bir frekans spektrumunda ohm direnci ölçmeye veya empedansı ölçmeye dayanmaktadır. Bu amaçla e-sig bulunan kimyasalların transepitelyal bariyer üzerinde oluşturdukları elektriksel direnç değişimlerini değerlendirmek için yapılan çalışmada aşağıdaki sonuçlar elde edildi.

Elektronik sigara bileşenlerinin iyon değişimi üzerindeki etkileri belirlemek için yapılan çalışmada gruplar arasında Δ TER'ler bakımında anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0,05$) (Tablo 4.4 ve Şekil 4.7). Gruplar daha ayrıntılı incelendiğinde, maddelerin ilk uygulandığı zaman dilimini temsil eden bazal aktivite süresince alınan Δ TER'ler değerlendirildiğinde gruplar arasında herhangi bir anlamlı fark belirlenmedi ($p=0,654$). ENaC fonksiyonlarını ölçmek amacıyla ENaC kanallarının amilorid ile inhibisyonundan sonra maddelerin etkinliğini gösteren Δ TER'ler incelendiğinde, kontrol grubuna göre diğer grupların (nikotin tuzu ve benzoik asit grupları hariç) Δ TER'leri yüksek olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p=0,868$). Benzer şekilde nikotin tuzu ve benzoik asit gruplarının Δ TER'leri kontrol grubuna göre daha düşük olmasına rağmen anlamlı fark bulunmadı ($p=0,0,775$). CFTR'ın aktivasyonunu artırarak klor iyonlarının sekresyonunu uyaran forskolin uygulamasından sonra gruplardan alınan hem FSK (pik) hem de FSK (plato) Δ TER değerleri bakımından gruplar arasında anlamlı fark belirlenmedi (sırasıyla $p=0,397$ ve $p=0,977$). Maddelerin CFTR kanalları üzerine etkilerini belirlemek amacıyla bir CFTR inhibitörü olan CFTRinh-172 uygulamasından sonra alınan Δ TER değerleri incelendiğinde serbest baz nikotin grubunun Δ TER değerleri kontrol ve diğer gruplara göre daha yüksek çıkmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p=0,992$). E-sigarada bulunan maddelerin kalsiyumla aktiflenen klor kanallarının aktivitesi üzerindeki etkisini ölçmek amacıyla bir CaCC aktivatörü olan UTP uygulaması sonrası alınan kayıtlar incelendiğinde hem UTP (pik) hem de UTP (plato) Δ TER değerleri bakımından gruplar arasında anlamlı fark bulunmadı (sırasıyla $p=0,857$ ve $p=0,438$).

Tablo 4. 4. E-sig bulunan kimyasalların transepitelyal bariyer üzerinde oluşturdukları elektriksel direnç değişimleri

Parametre		Kontrol	Nikotin Tuzu	Benzoik Asit	PG/VG	Serbest Baz Nikotin	Sodyum Tartar	Nikotin Tuzu + Benzoik Asit	P
Bazal	Minimum	488,66	493,58	324,64	357,28	331,71	123,51	533,93	0,654
	Maksimum	965,68	1119,63	971,10	946,46	1105,60	961,88	1235,55	
	Ortalama	706,46	790,51	715,23	656,43	744,70	614,51	757,86	
Amilorid	Min	91,54	89,33	115,19	188,32	114,62	90,75	14,50	0,868
	Mak	378,76	384,35	369,39	468,15	373,79	356,83	396,28	
	Ortalama	230,03	224,91	222,59	296,86	284,60	227,72	232,21	
FSK (pik)	Min	-2,43	-19,29	-7,77	-2,63	0,29	-11,40	-31,97	0,397
	Mak	101,22	35,98	34,67	5,30	27,46	97,28	180,13	
	Ortalama	21,04	5,01	11,23	0,66	7,19	20,37	30,14	
FSK (plato)	Min	-450,21	-420,25	-448,58	-559,01	-405,04	-441,67	-549,46	0,977
	Mak	-113,13	-112,94	-101,12	-63,62	-63,34	-133,94	-150,36	
	Ortalama	-301,67	-310,58	-278,60	-306,89	-252,40	-324,11	-317,07	
CFTRinh	Min	81,21	14,20	-4,03	23,66	30,04	15,28	158,50	0,992
	Mak	742,74	577,16	617,99	749,00	585,45	530,55	932,01	
	Ortalama	408,41	414,25	375,79	365,28	314,55	389,52	393,34	
UTP (pik)	Min	-756,69	-960,04	-736,40	-873,54	-588,68	-789,24	-1174,95	0,857
	Mak	-178,15	-270,92	-120,89	-13,41	-28,65	-210,44	-174,83	
	Ortalama	-490,85	-545,36	-444,14	-482,53	-378,31	-478,06	-569,27	
UTP (plato)	Min	-199,42	-240,83	-158,16	-247,58	-159,56	-303,55	-854,10	0,438
	Mak	7,88	9,14	23,89	-11,55	-9,51	-26,85	-21,75	
	Ortalama	-115,68	-126,56	-85,67	-129,36	-77,11	-132,27	-199,68	

*FSK: forskolin, UTP: Üridin trifosfat, birimler TER ($\Omega.cm^2$) olarak değerlendirilmiştir



Şekil 4. 7. E-sig bulunan kimyasalların transepitelyal bariyer üzerinde oluşturdukları elektriksel direnç değişimleri

4.3. E-sigarlarda bulunan maddelerin sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesi

Elektronik sigarada bulunan bileşenlerin sitotoksik etkilerini belirlemek amacıyla bir immortal hücre hattı olan HEK-293T hücreleri 24 saat boyunca e-likitlerde bulunan bileşenlere maruz bırakıldı ve Cytation 5 cihazına ile analiz edildi. Çalışmada logaritmik seyreltme ile $9,99.10^{-7}$ ila 30 mM konsantrasyonlarda hazırlanan maddelere maruz kalan hücrelerin canlı/ölü oranları hesaplanarak aşağıdaki sitotoksik etkiler elde edildi (Şekil 4.8).

Gruplar arasında yapılan istatistiksel analizler sonunca $9,99.10^{-7}$ mM ila 0,03 mM arasındaki konsantrasyonlarda gruplar arasında anlamlı fark gözlenmedi ($p>0,05$) (Tablo 4.5 ve Şekil 4.9).

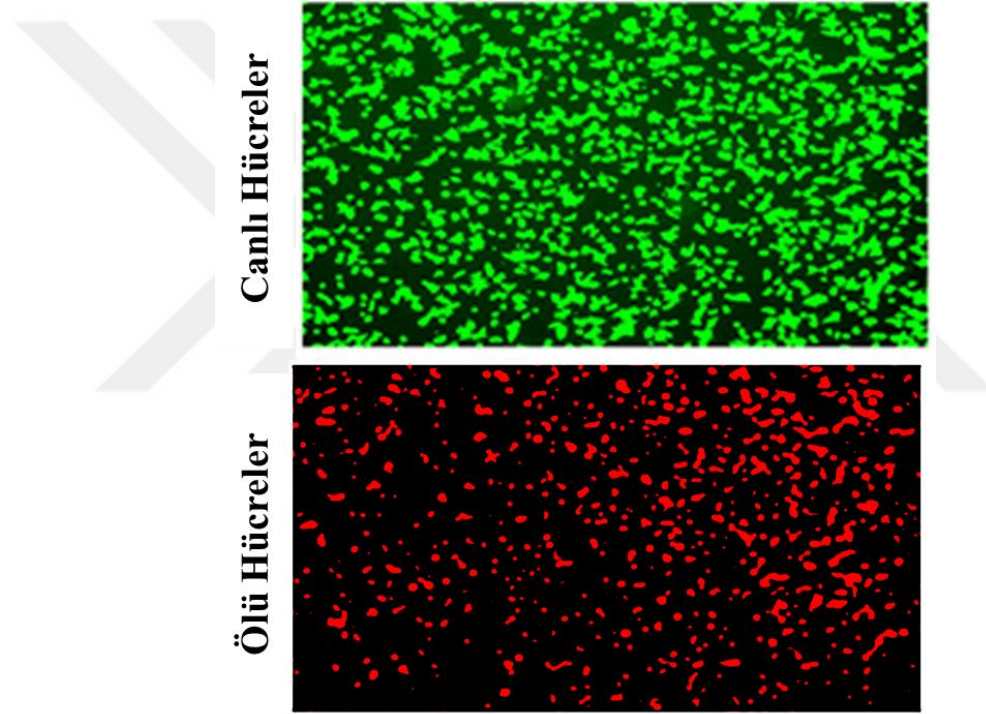
Gruplar 0,0999 mM konsantrasyonda karşılaştırıldığında PG/VG grubunun sitotoksik etkisi serbest baz nikotine göre daha düşük olduğu saptandı ($p=0,002$). Serbest baz nikotin ve nikotin tuzu grupları karşılaştırıldığında, serbest baz nikotinin nikotin tuzuna göre daha toksik olduğu bulundu ($p=0,004$). Benzer şekilde serbest baz nikotinin sodyum tartarat ve benzoik asit grupları ile karşılaştırıldığında serbest baz nikotinin aynı dozdaki sitotoksik etkisinin daha fazla olduğu belirlendi (sırasıyla $p=0,0135$ ve $p=0,002$). Diğer gruplara arasında ise istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$).

Gruplar 0,3 mM konsantrasyonda karşılaştırıldığında serbest baz nikotinin bu dozunun diğer tüm gruplara göre daha toksik olduğu bulundu ($p<0,0001$). Diğer gruplara arasında ise istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$).

Gruplar 0,999 mM konsantrasyonda karşılaştırıldığında serbest baz nikotinin bu dozunun diğer tüm gruplara göre daha toksik olduğu bulundu ($p<0,0001$). Diğer gruplara arasında ise istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$).

Gruplar 3 mM konsantrasyonda karşılaştırıldığında serbest baz nikotinin bu dozunun diğer tüm gruplara göre daha toksik olduğu bulundu ($p<0,0001$). Aynı zamanda DMSO grubunun 3 μ M dozu kontrol, nikotin tuzu ve PG/VG gruplarının aynı dozuna göre daha toksik olduğu bulundu ($p<0,05$). Diğer gruplara arasında ise istatistiksel olarak anlamlı fark görülmedi ($p>0,05$).

Gruplar 9,99 mM konsantrasyonda karşılaştırıldığında sodyum tartarat grubu hariç diğer tüm grupların bu dozları kontrol grubuna göre daha toksik olduğu bulundu ($p<0,0001$). Benzer şekilde benzoik asit grubunun sitotoksik etkisi kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu bulundu ($p=0,045$). Benzoik asit ve sodyum tartarat gruplarının toksik etkisi PG/VG, DMSO, nikotin tuzu, serbest baz nikotine ve nikotin tuzu+benzoik gruplarına göre daha düşük bulunurdu ($p<0,0001$). Grupların 9,99 mM konsantrasyondaki toksik etkileri çoktan aza doğru sıralandığında serbest baz nikotin, PG/VG, nikotin tuzu+benzoik asit, DMSO ve nikotin tuzu şeklinde olduğu görüldü ($p<0,05$). Diğer gruplara arasında ise istatistiksel olarak anlamlı fark görülmedi ($p>0,05$).



Şekil 4. 8. Toksikite sonucu canlı ve ölü hücrelerin gösterimi

Gruplar 30 mM konsantrasyonda karşılaştırıldığında tüm grupların bu dozları kontrol grubuna göre daha toksik olduğu saptandı ($p<0,0001$). Aynı dozda nikotin tuzu grubunun sitotoksik etkisi diğer tüm gruplara göre daha toksik bulundu ($p<0,01$). Benzer şekilde DMSO grubunun sitotoksik etkisi serbest baz nikotin grubuna göre daha yüksek olduğu bulundu (sırasıyla $p=0,024$). Sodyum tartarat grubunun toksik etkisi nikotin tuzu grubuna göre daha toksik bulundu ($p<0,0098$). Benzoik asit grubunun sitotoksik etkisi sodyum tartarat, serbest baz nikotin ve nikotin tuzu+benzoik gruplarına

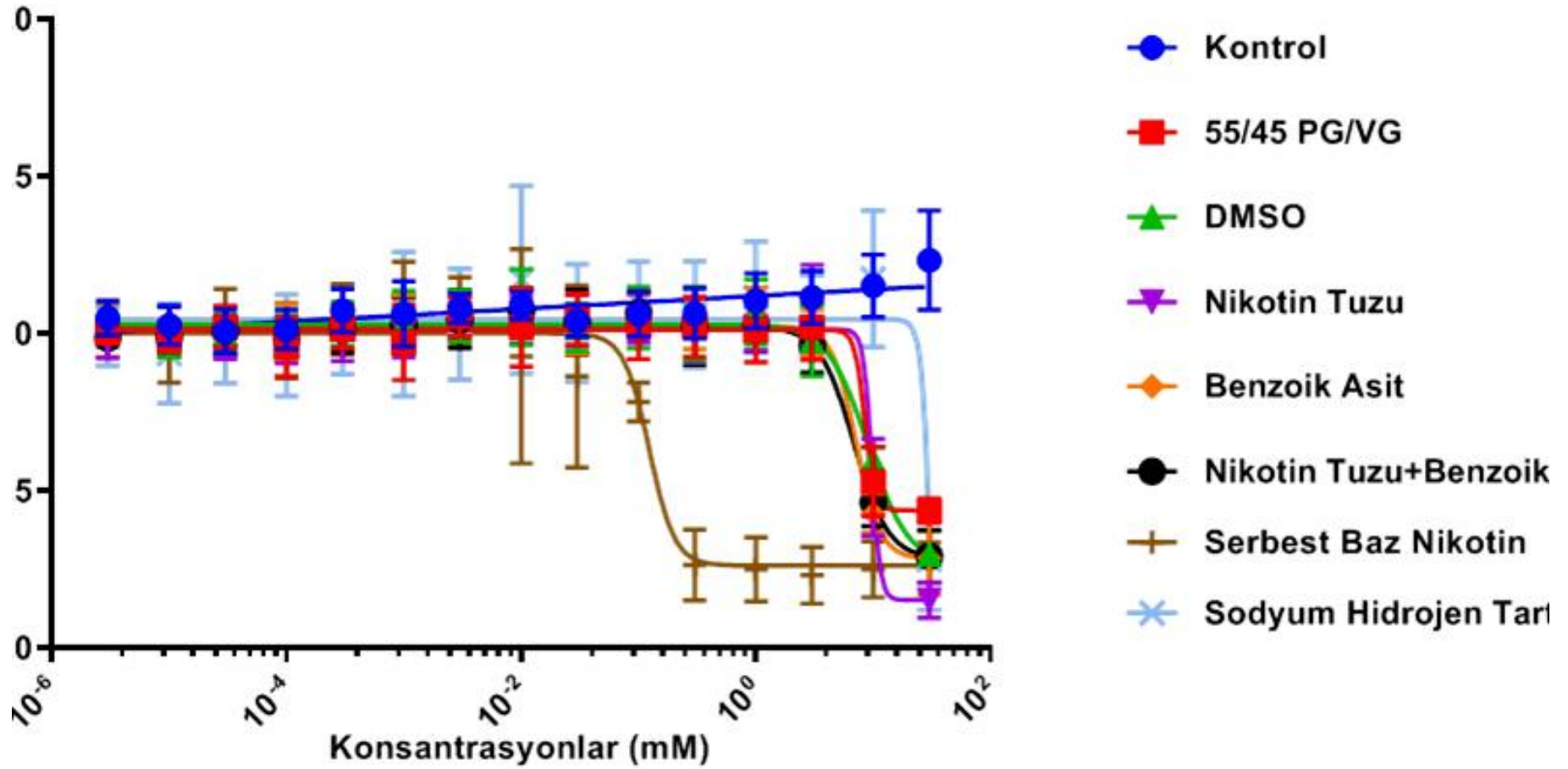
göre daha yüksek olduğu saptandı ($p<0,01$). Grupların 30 mM konsantrasyondaki toksik etkileri çoktan aza doğru sıralandığında nikotin tuzu, DMSO, benzoik asit, PG/VG, sodyum tartarat, nikotin tuzu+benzoik asit ve serbest baz nikotin tuzu şeklinde olduğu görüldü ($p<0,05$). Diğer gruplara arasında ise istatistiksel olarak anlamlı fark görülmedi ($p>0,05$).



Tablo 4. 5. Elektronik sigarada bulanan kimyasalların doza bağlı sitotoksik etkileri

Gruplar	Kons	9,99.10 ⁻⁷	3.10 ⁻⁶	9,99.10 ⁻⁶	3.10 ⁻⁵	9,99.10 ⁻⁵	3.10 ⁻⁴	9,99.10 ⁻⁴	3.10 ⁻³	9,99.10 ⁻³	0,03	0,0999	0,3	0,999	3	9,99	30
Kontrol	Min	0,580	0,946	0,641	0,848	0,835	0,734	0,847	0,948	0,728	0,992	0,733	0,855	0,807	0,936	0,889	1,035
	Mak	1,203	1,216	1,047	1,173	1,228	1,278	1,210	1,256	1,881	1,344	1,344	1,441	1,388	1,378	1,542	1,809
	Ort	0,907	1,047	0,950	0,971	0,959	0,922	0,973	1,047	1,099	1,102	0,989	1,031	0,954	1,054	1,176	1,293
PG/VG	Min	0,889	0,790	0,814	0,779	0,727	0,769	0,856	0,867	0,961	0,943	1,010	0,934	1,011	0,839	0,172	0,142
	Mak	1,128	1,097	1,556	1,244	1,299	1,225	1,325	1,288	1,855	1,273	1,408	1,488	1,453	1,309	0,427	0,290
	Ort	0,995	0,976	1,031	0,980	0,980	0,991	1,032	1,028	1,172	1,095	1,137	1,121	1,179	1,047	0,337	0,202
DMSO	Min	0,646	0,454	0,771	0,537	0,691	0,475	0,751	0,610	0,573	0,518	0,768	0,808	0,701	0,751	0,243	0,062
	Mak	1,139	1,054	1,205	1,198	1,422	1,227	1,310	1,360	1,947	1,109	1,426	1,461	1,302	1,256	0,663	0,211
	Ort	0,960	0,856	1,002	0,885	1,052	0,861	1,009	0,919	1,085	0,922	0,996	0,998	1,015	0,934	0,500	0,128
Nikotin Tuzu	Min	0,604	0,912	0,808	0,848	0,705	0,818	0,769	0,815	0,931	0,828	0,892	0,838	0,941	0,898	0,131	0,031
	Mak	1,118	1,152	1,363	1,214	1,184	1,311	1,276	1,357	1,687	1,399	1,382	1,474	1,431	1,510	1,354	0,093
	Ort	0,905	1,010	0,988	1,025	0,977	1,050	0,997	1,088	1,163	1,109	1,106	1,110	1,136	1,166	0,586	0,056
Sodyum Hidrojen Tartarat	Min	0,934	0,841	0,628	0,791	0,711	0,858	0,599	0,749	0,932	0,648	0,970	0,733	0,841	0,851	0,952	0,124
	Mak	1,215	1,136	1,161	1,209	1,296	1,283	1,382	1,297	1,902	1,257	1,379	1,274	1,393	1,325	1,595	0,613
	Ort	1,064	0,991	0,937	0,965	0,963	1,012	1,030	1,030	1,172	1,034	1,099	1,061	1,116	1,062	1,175	0,282
Benzoik Asit	Min	0,950	0,867	0,790	0,801	0,779	0,801	0,736	0,890	0,942	0,973	0,821	0,905	0,910	0,813	0,700	0,071
	Mak	1,178	1,085	1,330	1,215	1,256	1,338	1,259	1,305	2,366	1,306	1,333	1,222	1,388	1,240	1,078	0,275
	Ort	1,078	0,966	1,022	0,974	0,992	1,020	1,016	1,051	1,271	1,102	1,127	1,037	1,074	1,029	0,928	0,157
Serbest Baz Nikotin	Min	0,644	0,853	0,777	0,888	0,779	0,902	0,875	0,799	0,129	0,292	0,702	0,127	0,140	0,089	0,123	0,278
	Mak	1,127	1,119	1,188	1,232	1,163	1,286	1,225	1,176	1,282	1,245	0,850	0,397	0,414	0,325	0,394	0,397
	Ort	0,970	1,010	0,964	1,034	0,978	1,046	1,113	1,071	0,928	0,864	0,782	0,263	0,250	0,231	0,251	0,335
Nikotin Tuzu+Benzoik Asit	Min	0,929	0,931	0,909	0,939	0,901	0,918	0,901	0,879	0,969	0,895	0,988	0,806	0,937	0,852	0,345	0,189
	Mak	1,089	1,036	1,041	1,077	1,122	1,144	1,146	1,179	1,190	1,198	1,188	1,223	1,187	1,076	0,556	0,469
	Ort	1,016	0,986	0,987	1,009	0,984	1,016	1,029	1,046	1,069	1,037	1,066	1,023	1,028	0,964	0,464	0,292
P	0,0590	0,4960	0,9310	0,3210	0,9730	0,4820	0,8010	0,2420	0,6310	0,0760	0,0090	0,0004	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001

*Konsantrasyonlar mM cisinden verilmiştir.



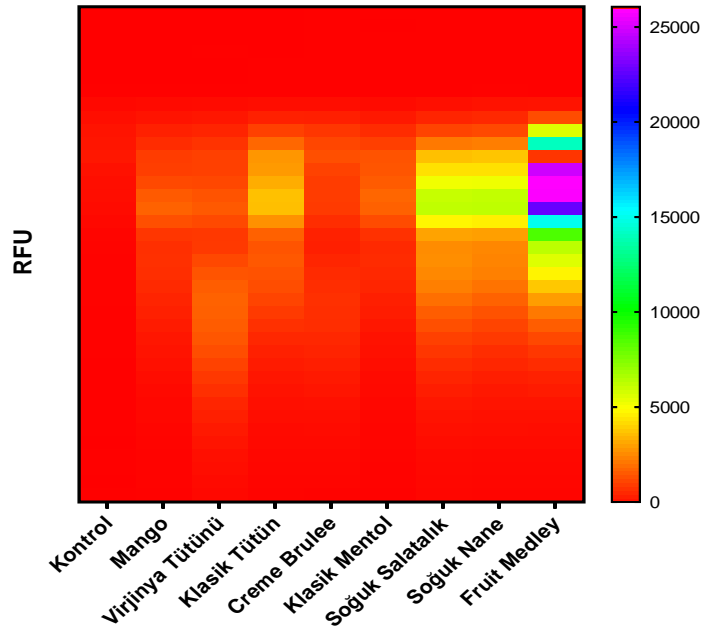
Şekil 4. 9. Elektronik sigarada bulunan kimyasalların doza bağlı sitotoksik etkileri

4.4. E-likitlerde bulunan maddelerin otofloresans özelliklerinin değerlendirilmesi

4.4.1. E-likitlerde bulunan maddelerin otofloresans özellikleri

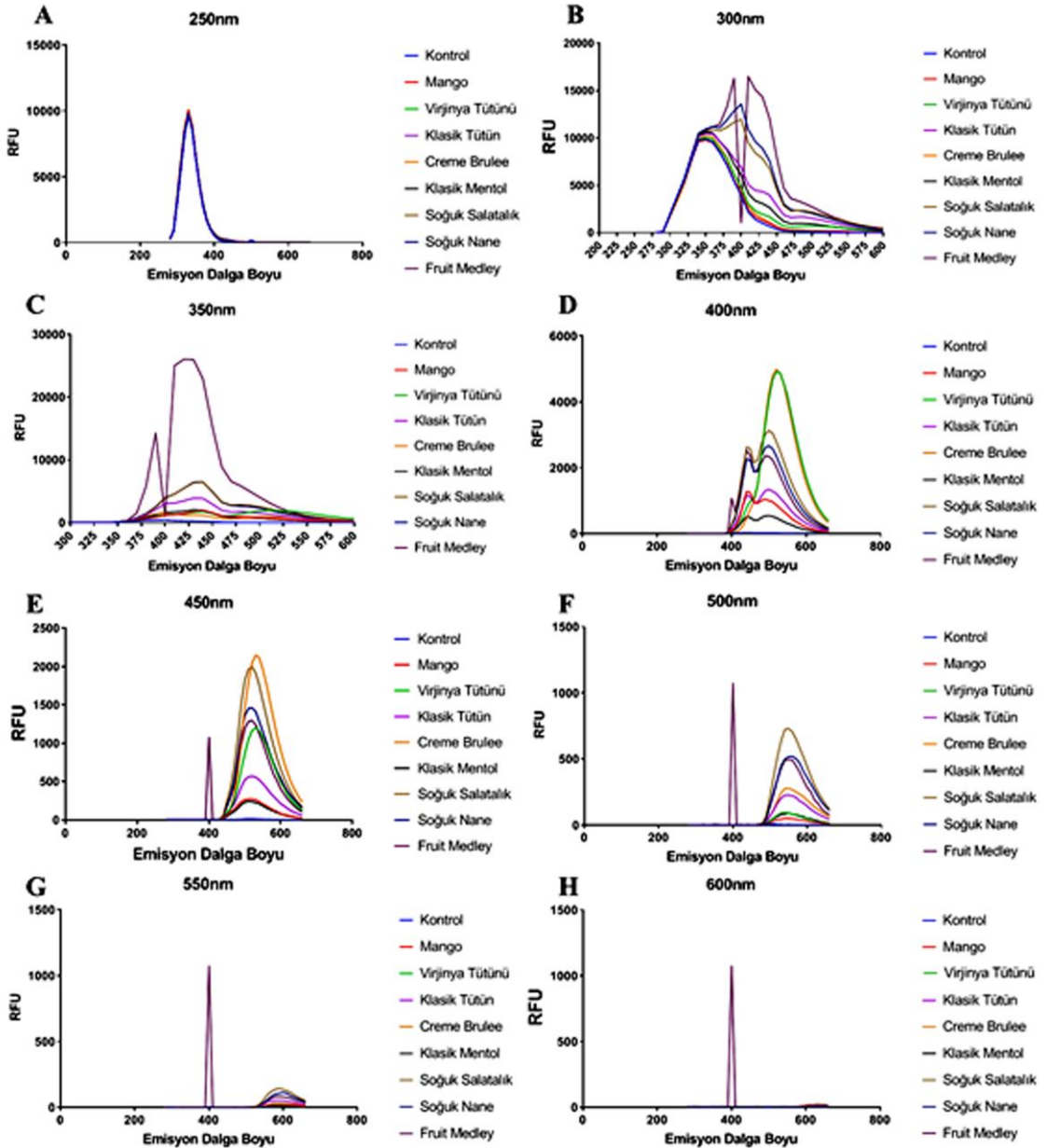
Elektronik sigara ürünleri içildiğinde veya buharlaştırıldığında ortama salınan partiküllerin yüzeylerde birikmesiyle temas sonrası transdermal olarak alınması şeklinde tanımlanan üçüncü el maruziyetin belirlenmesi amacıyla, e-likitlerde bulunan 8 farklı aroma otofloresans özelliklerinden yararlanılarak test edildi. Test sonucunda elde edilen veriler aşağıdaki gibidir. Aynı zamanda otofloresans profilindeki tüm e-likitler için sinyal yoğunluğunun 350 nm'deki ısı haritası Şekil 4.10'da gösterildi.

E-likitler görünüm olarak oldukça çeşitlilik göstermektedir. Renkleri renksizden kahverengiye, sarıya, yeşile veya kırmızıya kadar değişebilir. Bunun için 96 well plate 8 farklı e-likit aroması eklenerek otofloresans özellikleri belirlendi. Eksitasyon için, floresan mikroskopide yaygın olarak kullanılan dalga boylarını seçildi (300, 350, 400, 450, 500, 550 ve 600 nm). Daha sonra Tecan Infinite Pro plaka okuyucu kullanarak monokromatör modunda emisyon taramaları yapıldı. Belirtilen dalga boylarında uyarılan 8 e-likit (mango, Virjinya tütünü, klasik tütün, creme brulee, klasik mentol, soğuk salatalık, soğuk nane ve fruit medley) için tipik eksitasyon/emisyon taramaları, Şekil 4.11'de gösterilmektedir.



Şekil 4. 10. E-likitler benzersiz otofloresans profillerine sahiptir. Otofloresans profilindeki tüm e-likitler için sinyal yoğunluğunun ısı haritası (350 nm için)

Farklı dalga boyları kullanılarak 8 e-likit aromasının tepe floresan dağılımları incelenmiştir. E-likitler 250, 550 ve 600 nm uyarımda, emisyon monomodaldı (Şekil 4. 11). 3-4 e-likit 400, 450 ve 500 nm dalga boylarında tepe uyarımlara sahip iken, 550 ve 600 nm daha düşük uyarımlara sahip olduğu belirlendi (Şekil 4. 11). 300, 350 ve 400 nm dalga boyunda test edildiğinde bimodal idi. Değerler daha ayrıntılı incelendiğinde Fruit Medley grubunun RFU değeri 450 nm’de daha en yüksek bulunurken (Şekil 4.11), diğer aromaların RFU değeri fruit medleye göre daha düşük bulundu.

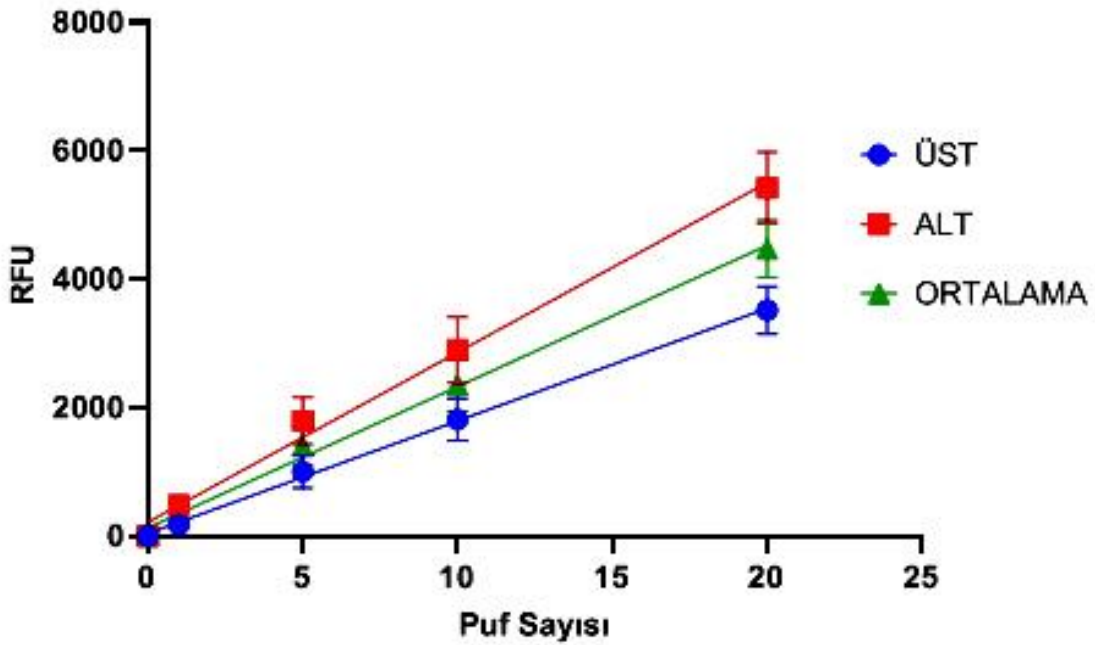


Şekil 4. 11. Sekiz e-likittin emisyon spektrumu ve sinyal yoğunluğundaki farklılıkların gösterimi

4.4.2. Yüzeyde e-sigara dumanı birikimi

Fruit Medley aromalı e-likitin en yüksek otofloresans özelliğine sahip olduğu belirlendikten sonra bu e-likitin ortamda birikiminin olup olmadığı test edildi. Bunu yapmak için, 3D printer ile hazırlanmış 6 kanallı çoğaltıcı kullanıldı. Bu sistemde ince bir boru ve enjektör yardımıyla bir pompa sistemi oluşturularak JUUL marka e-sigaranın Fruit medley aroması içeren kartuşundan 70 ml e-sigara buharı 100 ml'lik enjektöre çekilerek plastik bir boru ve 3D manifold yardımıyla kuyucuklar e-sigara dumanına maruz bırakıldı. PBS kontrol grubu olarak ölçüldükten sonra diğer bir sütun 1 puf yapıp ölçüldü, bir diğeri 5 puftan sonra ölçüldü, diğer sütunlarda 10 ve 20 puftan sonra otofloresans özellikleri bakımından 350/430 nm (eksitasyon/emisyon) plateler alttan ve üstten okutuldu. Veriler, buharlaşma sonrası fruit medley otofloresansı ile fruit medley e-likit otofloresansı ile korele olduğu bulundu. Floresan yoğunluğunun artan puf sayısı ile doğrusal olarak arttığı görüldü (Şekil 4.12).

Regresyon çizgisinin eğimleri, fruit medley için alttan, üstten ve ortalama olarak sırasıyla $175,4 \pm 41,8$ ($R^2=0,896$), $264,6 \pm 64,6$ ($R^2=0,891$) ve $220,0 \pm 51,9$ ($R^2=0,898$) olarak saptandı.



Şekil 4. 12. Fruit Medley likit birikiminin otofloresans ile tayini

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Milyonlarca insan e-sigara kullanmaktadır veya başlama aşamasındadır. E-sigaranın popülerliğine rağmen, sağlık üzerindeki etkileri hakkında çok az şey bilinmektedir. E-sigara kullanımının potansiyel riskleri ve yararları hakkındaki algılar halk, e-sigara kullanıcıları, sağlık hizmeti sağlayıcıları ile halk sağlığı alanında çalışan bilim insanları arasında büyük farklılıklar göstermektedir. Örneğin, e-sigara kullanımının, yanıcı tütün sigaralarına kıyasla daha düşük bağımlılık riski yaratıp yaratmadığı bir tartışma konusudur. Aynı şekilde, e-sigara emisyonlarında, özellikle de hiç tütün ürünlerini kullanmamış olan gençler ve genç yetişkinler gibi bireylerde, e-sigara emisyonlarında bulunan potansiyel toksik maddelere maruz kalmalarından dolayı oluşabilecek hasarlar konusunda belirsizlikler vardır. Ayrıca, e-sigaraların gençleri tütün sigaralarını kullanmaya başlamasına teşvik edeceği endişeleri de ortaya çıkmıştır. Nispeten e-sigaranın yeni piyasaya sürüldüğü göz önüne alındığında, e-sigaraların sağlık üzerindeki etkileri konusunda bilimsel kanıtların oluşması için çok az sürenin geçtiği ve kronik kullanımının zararlı/yararlı sonuçlarının ortaya çıkması için daha uzun süreye ihtiyaç duyulduğu görülmektedir.

Popüleritedeki artışa paralel olarak da e-sigara kullanımının herhangi bir pulmoner tehlike oluşturup oluşturmadığını tespit etmek için bilim dünyasında özel bir çaba vardır. Yapılan çalışmalarda tütün dumanı gibi, e-sigara buharının da solunum yolu primer epitelyal hücre modelinde ENaC, CaCC ve en önemlisi de klinik olarak büyük bir öneme sahip olan CFTR'ı etkileyerek iyon kanallarının disfonksiyonuna neden olduğu görülmektedir.

Normal solunum yolu epitelleri, etkili bir klirensin sağlanması ve mukusun hidratlanması için yeterli bir solunum yolu yüzey sıvısı hacminin muhafaza edilmesi gerekir. Bunun için solunum yolu epitellerinde Na⁺ emilimi ile Cl⁻ sekresyonu dengede olmalıdır. Mevcut çalışmada e-sigarada bulunan bileşenlerin SYSY yüksekliğinin düzenlenmesi üzerindeki etkilerini incelemek için primer insan bronşiyal epitel hücreleri; nikotin tuzu, serbest baz nikotin, benzoik asit, sodyum tartar, PG/VG ve nikotin tuzu+benzoik asit karışımı bileşenlerine 0, 2, 6 ve 24 saat maruz bırakılmıştır.

Elektronik sigara bileşenlerinin zamana bağlı olarak solunum yolu yüzey sıvı yüksekliği üzerine etkilerine bakıldığında 0. saatteki SYYS yüksekliğinin zaman (2, 6, 24, AD0DK ve AD30DK) ilerledikçe azaldığı saptanmıştır. Veriler daha ayrıntılı incelendiğinde e-sigarlarda bulunan nikotin tuzunun 100 µM dozunun SYYS yüksekliği üzerine etkisine bakıldığında, 2. saat dilimi haricinde diğer zaman dilimlerinde ölçülen SYYS değerlerinin zamana bağlı olarak azaldığı saptanmıştır. 2. saatteki SYYS değerleri ise 0. saat dilimine göre daha düşük bulunmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir değer olarak belirlenmemiştir. E-sigarlarda bulunan benzoik asidin 100 µM dozunun SYYS yüksekliği üzerine etkisine bakıldığında, 0. saat diliminde ölçülen SYYS değerlerinin zamana bağlı olarak azaldığı saptanmıştır. PG/VG kombinasyonundan 100 µM uygulanan HBEC'lerden alınan SYYS değerlerine bakıldığında 0. saatteki SYYS yüksekliğinin 6, 24 ve adenzin uygulaması sonrası 0 ve 30. dakikalarına göre daha yüksek olduğu saptanmıştır. Buna karşın 0 ve 2. saatleri arasında SYYS yüksekliğinde istatistiksel olmayan bir azalma gözlemlenmiştir. E-sigarlarda kullanılan serbest baz nikotinin 100 µM dozunun SYYS yüksekliği üzerine etkisine bakıldığında, 0. saat diliminde ölçülen SYYS değerlerinin zamana bağlı olarak süre geçtikçe azaldığı saptanmıştır. Sodyum hidrojen tartarat uygulanan sodyum tartarat grubunun zamana bağlı olarak solunum yolu yüzey sıvı yüksekliği değişimlerine bakıldığında 0. saatteki SYYS yüksekliğinin 2, 6, 24 ve adenzin uygulaması sonrası 0 ve 30. dakikalarına göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Nikotin tuzu ve benzoik asidin kombine uygulandığı nikotin tuzu+ benzoik asit grubunun zamana bağlı olarak solunum yolu yüzey sıvı yüksekliği değişimlerine bakıldığında 0. saatteki SYYS yüksekliğinin 6, 24 ve adenzin uygulaması sonrası 0 ve 30. dakikalarına göre daha yüksek olduğu saptanmıştır. Diğer bir ifade ile SYYS yüksekliği zaman geçtikçe azalmıştır.

E-sigarlarda bulunan kimyasalların uygulandığı aynı zaman dilimlerinde gruplar arasında fark saptanmıştır. Sıfırinci saat diliminde PG/VG grubunun SYYS yüksekliğinin kontrol ve nikotin tuzu gruplarına göre daha düşük olduğu saptanmıştır. İkinci saatteki SYYS değerleri karşılaştırıldığında serbest baz nikotin grubunun SYYS yüksekliğinin kontrol ve nikotin tuzu gruplarına göre daha düşük olduğu belirlenmiştir. Aynı zaman diliminde nikotin tuzu grubunun SYYS yüksekliği sodyum tartarat ve nikotin tuzu+ benzoik asit gruplarına göre daha yüksek olduğu görülmüştür. Grupların 6. saatteki SYYS değerleri karşılaştırıldığında nikotin tuzu grubunun SYYS yüksekliğinin PG/VG, serbest baz nikotin ve nikotin tuzu+ benzoik asit gruplarına göre

daha yüksek olduğu saptanmıştır. Grupların 24. Saat dilimlerindeki SYYS değerleri karşılaştırıldığında kontrol grubunun SYYS yüksekliğinin diğer gruplara göre daha yüksek olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Diğer zaman dilimlerinde ise gruplar arasında anlamlı fark tespit edilmemiştir.

Kısa devre akımları (Isc) aktif epitel iyonlarının taşınmalarının net miktarına eşittir. Bununla birlikte, hangi iyon tiplerinin rol aldığını ayırt etmek mümkün değildir. Rol alan iyon tiplerini belirlemek için bu kanalları aktive veya inhibe etmek gerekmektedir.

Elektronik sigara bileşenlerinin iyon kanalları aracılığıyla iyon değişimi üzerindeki etkileri belirlemek için yapılan çalışmada, gruplar arasında Δ Isc'ler bakımından fark bulunmamıştır. ENaC fonksiyonlarını ölçmek amacıyla ENaC kanallarının amilorid ile inhibisyonundan sonra maddelerin etkinliğini gösteren Δ Isc'ler incelendiğinde, kontrol grubuna göre diğer grupların (Nikotin tuzu ve nikotin tuzu + benzoik asit grupları hariç) Δ Isc'leri düşük olmasına rağmen anlamlı fark saptanmamıştır. Benzer şekilde Nikotin tuzu ve nikotin tuzu+ benzoik asit gruplarının Δ Isc'leri kontrol grubuna göre yüksek olmasına rağmen maddelerin etkinliği bakımından gruplar arasında fark saptanmamıştır. CFTR'ın aktivasyonuna artırarak klor iyonlarının sekresyonunu uyaran forskolin uygulamasından sonra gruplardan alınan Δ Isc değerlerinde fark tespit edilmemiştir. Maddelerin CFTR kanalları üzerine etkilerini belirlemek amacıyla bir CFTR inhibitörü olan CFTRinh-172 uygulamasından sonra alınan Δ Isc değerleri incelendiğinde serbest baz nikotin grubunun Δ Isc'leri kontrol ve diğer gruplara göre daha yüksek bulunmuş fakat bu yükseklik anlamlılık arz etmemekteydi. Benzer şekilde e-sigarada bulunan maddelerin kalsiyumla aktiflenen klor kanallarının (CaCC) aktivitesi üzerindeki etkisini ölçmek amacıyla bir CaCC aktivatörü olan UTP uygulaması sonrası alınan kayıtlar incelendiğinde Δ Isc değerleri bakımından gruplar arasında anlamlı fark bulunmamıştır.

Transepitelyal/transendotelyal elektriksel direnç (TER), hücre kültüründe sıkı bağlantı (tight junction) dinamiklerinin bütünlüğünü ölçmek için yaygın olarak kullanılan nicel bir tekniktir. TER değerleri, hücresel bariyerlerin bütünlüğünün güçlü bir göstergesidir ve ilaç veya kimyasalların bu bariyerler boyunca taşınmasının değerlendirilmesinde sıklıkla kullanılmaktadır. TER ölçümleri hücre hasarı olmadan gerçek zamanlı olarak yapılabilmekte ve genellikle geniş bir frekans spektrumunda Ohm direnci ölçmeye veya empedansı ölçmeye dayanmaktadır. Bu kapsamda elektronik sigara bileşenlerinin iyon değişimi üzerindeki etkileri belirlemek için yaptığımız çalışmada gruplar arasında

Δ TER'ler bakımından herhangi bir fark saptanmamıştır. Maddelerin ilk uygulandığı zaman dilimini temsil eden bazal aktivite süresince alınan Δ TER değerleri, ENaC fonksiyonlarını ölçmek amacıyla ENaC kanallarının amilorid ile inhibisyonundan sonra maddelerin etkinliğini gösteren Δ TER değerleri, CFTR'ın aktivasyonunu artırarak klor iyonlarının sekresyonunu uyaran forskolin uygulamasından sonra gruplardan alınan Δ TER değerleri, CFTR kanalları üzerine etkilerini belirlemek amacıyla bir CFTR inhibitörü olan CFTRinh-172 uygulamasından sonra alınan Δ TER değerleri ve bir CaCC aktivatörü olan UTP uygulaması sonrası alınan Δ TER değerleri bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmemiştir.

İyon transportu, SYYS için yeterli su temini sağlamada önemli bir rol oynar. Mukus hidrasyonu ve siliyer hareket için kritik öneme sahiptir. Çünkü uygun perisiliyer sıvı seviyesi silyaların etkinliği için gereklidir. Hem mukus hidrasyonu hem de siliyer hareketler, mukosiliyer fonksiyonun gerçekleşmesi için kritik öneme sahiptir. İyon transportunun yeterli solunum yolu yüzey sıvısı hacmi için önemi, azalmış Cl^- sekresyonu ve artmış Na^+ absorpsiyonunun neden olduğu solunum yolu yüzey dehidrasyonu ve buna bağlı mukosiliyer fonksiyon bozukluğunun olduğu çoklu solunum yolu hastalıkları ile gösterilmektedir. CFTR mutasyonlarının neden olduğu kistik fibrozis hastalığı örnek verilebilecek önemli rahatsızlıklardan biridir. Bununla birlikte diğer kanallar apikal Cl^- sekresyonu için gerekli olan elektrokimyasal gradyana doğrudan katkıda bulunur. Örneğin, yakın zamanda TMEM16²³⁵ olarak tanımlanan kalsiyumla aktiflenen klor kanalları (CaCC) Cl^- salgılar ve bu kanal solunum yolu hidrasyonu için oldukça büyük bir önem arz etmektedir²³⁶. Ek olarak, bazolateral K^+ kanalları, Cl^- hareketi için gereken elektrokimyasal gradyanı koruyarak apikal Cl^- transportuna katkıda bulunur²³⁷.

Mall ve ark, insan burun dokusundaki UTP kaynaklı Cl^- akımlarının, hem clotrimazole duyarlı, kalsiyumla aktive edilmiş K^+ kanallarına hem de klofilium'a duyarlı voltajla aktive edilmiş K^+ kanallarına bağlı olduğunu bulmuşlardır²³⁷. Bernard ve ark ayrıca, kalsiyumla aktive edilmiş K^+ kanallarının, insan bronşiyal hücre hattında kalsiyum bağımlı klorür salgılanmasına katkıda bulunduğunu bildirmişlerdir²³⁸.

Solunum yolu epitel hücrelerinin apikal yüzeylerine fizyolojik ATP salınımı, su dengesinin²²⁰ ve dolayısıyla mukosiliyer taşınmanın²³⁹ düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Apikal ATP'nin P2Y2 reseptörleri ile Ca^{+2} geçirgenliğini arttırdığı iyi

bilinmektedir. Voltaja bağımlı potasyum kanallarının hücre içi kalsiyuma duyarlı olması, bu kanalları insan bronşiyal epitelinde SYYS hacminin düzenlenmesinde önemli kılmaktadır. Bu kanallar epitelde özellikle apikal olarak salınan ATP'ye bağlı iyon transportu cevabında rol oynar²⁴⁰. Mevcut çalışma e-sig bileşenlerine maruz bırakılan HBEC kültür ortamına uygulanan UTP'nin hücre içi Ca^{+2} iyon transportunu artırarak CaCC aracılığıyla Cl^- çıkışını arttırması beklenmesine rağmen, bu durum istatistiksel olarak gözlemlenmemiştir. İyon değişiminde herhangi bir farklılık bulunmamasına rağmen, SYYS seviyesinin azalması kullanılan e-sig bileşiklerinin bu kanalları inhibe ettiğini düşündürmektedir. Bu durum özellikle nikotin tuzu + benzoik asit grubunda daha belirgin gözlemlenmiştir. Bu da e-sigara bileşenlerinin HBEC membranlarında bulunan iyon kanallarının fonksiyonlarını azalttığını göstermektedir.

Rayner ve ark farklılaştırılmış primer normal insan bronşiyal epitel (NHBE) kültürlerinde akut sigara ve ENDS preparatlarına maruz bırakılan hücrelerin mukosilyer klirensle ilgili fonksiyonlarını değerlendirmişlerdir²⁴¹. Çalışmada ENaC ve CFTR kanallarının iyon transport kapasitelerine ussing chamber kullanılarak bakılmıştır. Yapılan çalışmada 24 saat sadece ENDS nikotinine maruz bırakılan hücrelerdeki kanalların fonksiyonlarında herhangi bir değişikliğin olmadığı, fakat sadece sigara uygulanan hücrelerde bulunan iyon kanallarının fonksiyonlarında belirgin düşüş olduğu gözlemlenmiştir. Eşit nikotin konsantrasyonlarını içeren sigara ve ENDS ürün preparatları laktat dehidrogenaz (LDH) salınımı ve TEER ile ölçülen sitotoksositeyi ortaya çıkarmamasına rağmen, bu preparatların her iki iyon kanalını etkilemesi ilginçtir. Bu, sigara ürünü preparatlarının toksisite seviyelerinin altındaki konsantrasyonlarda bile fizyolojik süreçleri inhibe edebileceğini göstermektedir. CFTR kanal fonksiyonlarının sigara dumanı ile azalması çok sayıdaki çalışma ile gösterilmiştir²⁴²⁻²⁴⁴. Sigara dumanının ERK1/2 yolunu aktive ettiği^{243,244} ve hücre içi kalsiyum seviyelerini yükselttiği²⁴⁵, bununda CFTR kanal fonksiyonlarının bozulmasına neden gösterilmiştir. Bu durumda SYYS dehidrasyonuna yol açtığı bildirilmiştir²⁴⁴. Literatürdeki bu bulgular verilerimizle uyumluluk göstermektedir. Çalışmamızda tüm gruplarda zamana bağlı olarak SYYS yüksekliğinde azalmanın olduğu tespit edilmiştir. Bu durumda büyük olasılıkla maddelerin CFTR ve ENaC ve CaCC kanallarının fonksiyonlarını bozarak göstermektedir.

Nikotin içeren e-sigaraların solunması solunum yolu hiper-reaktivitesini, distal solunum yolu genişlemesini, mûsin üretimini, sitokin ve proteaz ekspresyonunu arttırdığı, fakat nikotin içermeyen e-sigara buharına maruz kalmanın bu akciğer parametrelerini etkilemediği bildirilmiştir. Nikotin içeren e-sigara buharına maruz kalan NHBE hücreleri, bozulmuş siliyer harekete, azalmış SYYS hacmi, kistik fibroz transmembran regülatörü ve ATP ile uyarılan K^+ kanallarının iyon iletkenliğinde bozulmanın olduğu bildirilmiştir. Bulgularımız literatürle SYYS yüksekliği bakımından uyumluluk göstermesine rağmen, bileşenlerin iyon transportu üzerindeki etkileri bakımından farklılık arz etmektedir. Mevcut çalışmada bileşenlerin iyon transportunu artırıcı veya azaltıcı bir etkisi tespit edilmemiştir.

Chung ve ark 2019 yılında e-sig buharının solunum yolu mukosilyer fonksiyonu üzerine etkilerini araştırmak için yaptıkları *in vitro* çalışmasında, nikotin içeren e-sig buharının SYYS yüksekliğini ve mukus viskozitesini olumsuz yönde etkilediğini göstermişlerdir. Yapılan bu çalışmada nikotinin HBEC kültüründe hem SYYS hacim azalmasına hem de mukus viskozitesini artırıcı yönde etki gösterdiğini rapor etmişlerdir²⁴⁶. Benzer bulgular Garcia-Arcos ve ark tarafından normal insan bronşiyal epitel (NHBE) hücreleri üzerinde yaptıkları çalışmada da gösterilmiştir²⁴⁷. İlgili çalışmada normal insan bronşiyal epitel hücreleri 0 ve 100 mM nikotine maruz bırakılmıştır. Bu bulgular verilerimizle uyumluluk göstermektedir. Fakat nikotin tuzu uygulanan gruptan elde edilen SYYS yüksekliğindeki azalma diğer gruplara göre daha az olmuştur.

Chung ve ark 2019 yaptıkları çalışmada test edilen diğer bir kimyasal ise sodyum tartarattır. Nebulizant olarak kullanılan negatif yüklü nikotin tartarat tuzu hücre kültüründe reseptör aracılıklı Ca^{+2} akımını uyarır ve bunun sonucunda mukosilyer fonksiyon bozukluğuna neden olur²⁴⁶. Mevcut çalışmada kullanılan bileşenlerden biri de sodyum tartarattır. Sodyum tartarat SYYS yüksekliğini zamana bağlı olarak azaltmıştır. Ca^{+2} uyarıcı UTP kullanılmasına rağmen iyon transportu üzerinde herhangi bir etkisi tespit edilmemiştir.

E-sig buharı CFTR, Ca^{+2} ve voltajla aktiflenen K^+ kanalları boyunca apikal iyon transportunu azaltmaktadır. Uzun süreli nikotin kullanan sıçanlarda bozulmuş CFTR ilişkili Cl^- akımının olduğu bildirilmiştir²²¹. CFTR ve Ca^{+2} aktiflenen K^+ kanallarının dinamik iyon transportu yeterli siliyer hareket için gerekli olan $\sim 7 \mu m$ SYYS

yüksekliğinin korunmasına yardımcı olmaktadır. Bu nedenle apikal iyon akışının sürekli olarak azalması SYYS yüksekliğinin azalmasına ve siliyer hareketin bozulmasına neden olabilir.

E-sigarlardaki yüksek nikotin konsantrasyonları, nikotini protonlayan ve kullanıcılar tarafından solunduğunda daha az sert hale getiren yüksek benzoik asit konsantrasyonuna bağlanır. Yüksek nikotin konsantrasyonunun ve protonasyonunun benzoik asit ile birleşmesi, e-sig kullanımına ve ardından bağımlılığa neden olmaktadır. Bu durum özellikle JUUL marka e-sigara ürünlerinin ergen ve yeni tüketiciler tarafından tüketilmesini kolaylaştırmaktadır²⁴⁸. Mevcut çalışmada benzoik asit zamana bağlı olarak solunum yüzey sıvısını azaltmasına rağmen iyon transportu üzerinde herhangi bir etkisi gözlemlenmemiştir. Bu bulgu literatür verisi olmadığından karşılaştırılamamıştır. Benzer şekilde serbest baz nikotinde zamana bağlı olarak solunum yüzey sıvısını azaltmasına rağmen iyon transportu üzerinde herhangi bir etkisi gözlemlenmemiştir. Bu bulgu da literatür verisi olmadığından karşılaştırılamamıştır.

Nikotik asetilkolin reseptörleri (nAChR) solunum yollarında eksprese edilen ligand kapılı iyon kanallarıdır²⁴⁹. nAChR aktivasyonu, sitozolik Ca^{+2} seviyelerini artırır ve solunum yolu epitelinde CFTR'yi inhibe edebilir²⁵⁰. Mevcut çalışmada nikotin tuzuna maruz kalan PHBEC hücrelerinde ölçülen SYYS yüksekliğinin azalması muhtemelen nikotin tuzunun nAChR aktiflemesi sonucu CFTR inhibisyonuna bağlı olarak gerçekleşmiş olabilir.

Propilen glikol, e-likitlerde bir baz oluşturmanın yanı sıra, polyester üretiminde ve buz çözücü/antifriz olarak yaygın kullanılan bir kimyasaldır. İntravenöz propilen glikol, akut böbrek ve merkezi sinir sistemi toksisitesine neden olabilir²⁵¹. Daha önceki yapılan çalışmalarla propilen glikolün renal glikoz taşınmasını ve korneal $Na^{+}/K^{+}ATPaz$ aktivitesini inhibe ettiği gösterilmiştir²⁵². Propilen glikol ve vegetable gliserin, gıdalara önerilen miktarlarda eklenmesi durumunda “genellikle güvenli olarak tanımlanan” maddeler olarak sınıflandırılır. Ancak, bu güvenilir etiketi inhalasyon güvenliği için geçerli olmamakla birlikte propilen glikole kısa süreli mesleki maruziyetler pulmoner fonksiyon üzerinde irritasyona neden olur ya da az veya hiç bir belirti göstermez²⁵³. Bu durum da propilen glikolün duyuusal bir irritan olarak görev yapacağını göstermektedir. Propilen glikol, solunum yolunu inerve eden duyu sinirlerinde eksprese edilen iki tahriş edici reseptör olan TRPV1 ve TRPA1'i aktive eder. Bu reseptörler astım modellerinde

astım inflamasyonunu ve solunum yolu hiper-reaktivitesini teşvik eder²⁵⁴. Kronik e-sigara içenlerin akciğerlerinde MUC5AC protein konsantrasyonları artış göstermiştir²⁵⁵. Nikotin olmadan sadece PG/VG ile primer solunum yolu epitelyasında e-sigara buharına maruziyetten sonra müsin ekspresyonu artmıştır. Pulmoner ve immün hücreler üzerindeki etkileriyle ilgili olarak daha fazla çalışmalara ihtiyaç vardır. Propilen glikol ve vegetable gliserin, akciğerlerde eksprese edilen AQP3'de dahil olmak üzere akuaporinler aracılığıyla hücelere girebilir²⁵⁶. Bu durum da PG/VG intraselüler etkileri olabileceğini ve VG'nin ise biyolojik membranları etkileyebileceğini göstermektedir²⁵⁷. Nitekim bununla uyumlu olarak, PG/VG, solunum yolu epiteline membran akışkanlığını azaltmıştır. Membran akışkanlığındaki bu düşüş, endositozu (fagositozu), ekzositozu ve plazma zarı protein-protein etkileşimlerini etkileyebilir. Literatürdeki bu bulgular verilerimizle uyumluluk göstermektedir. Toksikolojinin temel prensibi olan "Zehri belirleyen dozdur" ilkesine dayanarak, kronik e-sigara kullanımına bağlı ortaya çıkan yüksek dozda solunan PG/VG, nikotinden bağımsız olarak daha önce de belirtilen etkilere yol açar. Bu nedenle, e-sigara kullanıcılarının soluduğu dozlarda PG/VG inhalasyon güvenliğinin belirsizliği hala korunmaktadır.

Elektronik sigarada bulunan bileşenlerin sitotoksik etkilerini belirlemek amacıyla bir immortal hücre hattı olan HEK-293T hücreleri 24 saat boyunca $9,99 \cdot 10^{-7}$ ila 30 mM konsantrasyonlardaki e-likitlere maruz bırakılmıştır. E-likitlerin $9,99 \cdot 10^{-7}$ mM ila 0,03 mM arasındaki konsantrasyonlarda herhangi bir sitotoksik etki gözlemlenmezken, 0,0999 mM ve daha yüksek konsantrasyonlarda ise sitotoksik etkiler gözlemlenmeye başlanılmıştır. Serbest baz nikotin grubunun 0,0999 mM ve daha yüksek konsantrasyonu kontrol ve diğer gruplara göre daha toksik olduğu saptanmıştır. Diğer grupların ise 3 mM ve daha yüksek konsantrasyonu kontrol grubuna göre daha toksik olduğu gözlemlenmiştir.

Sassano ve ark 2018 yılında HEK293T hücreleri ile yaptıkları sitotoksik çalışmada 148 adet e-likiti test etmişlerdir. Çalışmada PG/VG'ye maruz bırakılan hücrelerin canlılığında azalma olduğunu bildirmişler²⁵⁸. Benzer bir çalışma Rowell ve ark tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada PG/VG'nin de dahil olduğu 13 farklı bileşik CALU3 hücre hattında test edilmiş ve hücre çoğalması/hücre canlılığının doza bağımlı olarak azaldığını rapor etmişlerdir²⁵⁹. Bu veriler bulgularımızı desteklemektedir. Aynı çalışmada nikotinin de doza bağımlı olarak hücre çoğalması/hücre canlılığını azaltarak

sitotoksik etkiye sahip olduğu bildirilmiştir²⁵⁹. Bahl ve ark, 40 adet aromalı e-likitin etkilerini insan embriyonik kök hücreleri, fare sinir kök hücreleri ve insan pulmoner fibroblastlarında test etmiş ve etkilerine göre "sitotoksik olmayan" "orta derecede sitotoksik" ve "yüksek sitotoksik" olarak sınıflandırmışlardır. Ayrıca sitotoksitenin, nikotin yerine bu e-likitlerde bulunan bazı kimyasal bileşenlerden kaynaklandığını da bildirmişlerdir²⁶⁰. Mevcut çalışmada hem nikotin tuzu hem de nikotin tuzu+benzoik asitin toksik bulunması literatürle uyumluluk göstermektedir.

Behar ve ark ayrıca, 10 tarçın aromalı e likitin, MTT testi kullanılarak insan embriyonik kök hücreleri ve pulmoner fibroblastlar üzerindeki etkilerini test etmiş ve tüm aromaların, fibroblastlardan daha çok kök hücreleri üzerinde sitotoksitate sergilediklerini bulmuşlardır²⁶¹.

Nikotin, tütün dumanının ve e-sigaranın bağımlılık ve kullanımının sürdürülmesini sağlayan bağımlılık maddesidir. Nikotin fizyolojik etkilerini, hem sinir sisteminde hem de akciğerde eksprese edilen ligand kapılı iyon kanalları olan nAChR'ler vasıtasıyla gösterir^{33,262}. Nikotinin, CALU3 hücrelerinde birçok nAChR alt birimini eksprese ettiği bildirilmiştir. nAChR'nin düşük dozda nikotin ile uyarılması, sitoplazmik Ca^{+2} seviyelerinde bir artışa neden olur²⁶³. Bu artıştaki sitotoksositeye neden olan nikotin seviyesinin 2.89 mg/ml nikotin (17.8 mM) olduğu tespit edilmiştir²⁵⁹. Mevcut çalışmada 0,0999 mM ve daha yüksek dozları kullanılan nikotin tuzunun benzer etkileri gösterilmiştir.

Schweitzer ve ark²⁶⁴, 1-20 mM nikotine maruz kalan akciğer endotel hücrelerinde hücre çoğalmasının doza bağlı olarak azaldığını bildirmişlerdir. Garcia-Acros ve ark²⁶⁵ bronş epiteline PG/VG+36 mg/ml nikotin içeren aerosolün ve tek başına nikotinin siliyer ritim sıklığını, mukozal klirensini ve CFTR aktivitesini azalttığını, ve patojenlere karşı savunmanın önlendiğini bildirmişlerdir. Bununla birlikte, Lam ve ark²⁶⁶, 100 nM nikotinin, nAChR'lerinin gen ekspresyonunu arttırdığını, West ve ark²⁶⁷, insan bronşiyal epitelinde 1 nM-10 mM nikotine maruz kaldıktan sonra hücre sayısında bir artış olduğunu bildirmişlerdir. Sonuçlarımız ve Garcia-Acros ve arkadaşlarının²⁶⁵ sonuçları, e-likitlerde görülen son derece yüksek nikotin seviyelerinin spesifik olmayan sitotoksik etkilerini göstermektedir. Bunun aksine, aerosolize nikotine maruziyetten 4 saat sonra yapılan ölçümlerde nikotinin hücre canlılığı üzerinde etkisinin olmadığı görülmüştür. Fakat CFTR iletkenliğinin azaldığı bildirilmiştir. Aynı çalışmada NHBE hücreleri 5 gün

boyunca nikotine maruz bırakılmıştır. Bu uzun süreli maruziyet sonucunda hücre canlılığında herhangi bir etki gözlemlenmezken, CFTR iletkenliğinde azalma olduğu bildirilmiştir.

Sheerwood ve ark. aroma verici ajanların medyada dilüe edilerek HBE hücreleri üzerindeki etkileri ile ilgili olarak yaptıkları çalışmada, yüksek konsantrasyonların hücre ölümüne neden olduğu, düşük konsantrasyonların ise CFTR aracılığıyla membran iyon iletiminde değişikliklere neden olduğunu bildirmişlerdir²⁶⁸. Diğer bir çalışmada araştırmacılar, e-sigara aerosolünün konsantre halinin medyada dilüe edilerek primer akciğer endotelyal hücrelerine uyguladıklarında hücre çoğalmasının ve akciğer endotelyal bariyer fonksiyonunun azaldığını belirtmişlerdir²⁶⁴. Aug ve ark 2015, medyada dilüe edilen e-likitlerin PHBEC üzerindeki etkileriyle ilgili olarak yaptıkları çalışmada hücresel stres seviyesinin arttığını ortaya koymuşlardır²⁶⁹. Bunu destekleyen diğer bir çalışmada Scheffler ve ark tarafından 2015 yılında yapılmıştır. Bu çalışmada e-sigara aerosolünün PHBEC’de oksidatif stresi arttırdığını ve hücre canlılığının azalttığını ortaya koymuşlardır¹⁸⁴. Hwang ve ark. 2016, e-sigara aerosolünün ve ekstraktının A549 hücreleri üzerindeki etkileriyle ilgili olarak yaptıkları çalışmada, maruziyetle birlikte önemli derecede hücre ölümlerini bildirmişlerdir²⁷⁰. Cervellati ve ark yaptıkları çalışmada bunu desteklemektedir¹⁷⁸. E-sigara aerosolünün konsantre halinin medyada dilüe edilerek A549 hücreleri üzerindeki etkileriyle ilgili olarak yapılan diğer bir çalışmada hücre ölümlerinin artan nikotin seviyeleriyle artış gösterdiğini ortaya koymuşlardır²⁷¹. Bulgularımız literatür ile uyumluluk göstermektedir. Fakat bu bulgulara tezat olan bazı çalışmalarda bulunmaktadır. Wu ve ark. 2014 yılında e-likitleri medyada dilüe ederek yaptığı bir çalışmada hücre canlılığı üzerinde herhangi bir etkiye rastlanmadığını bildirmişlerdir²⁷². E-sigara aerosolünün PHBE hücreleri üzerindeki etkileriyle ilgili olarak yapılan diğer bir çalışmada, hücre canlılığı üzerinde herhangi bir etki bulunamadığı, fakat tütün sigarasına kıyasla artmış partikül birikimi olduğunu belirlemişlerdir. Misra ve ark yaptıkları çalışmada bunu desteklemektedir¹⁸⁵.

Otofloresans, floresan boyaların yokluğunda, uyarılmadan sonra biyolojik ve kimyasal bileşiklerden, daha uzun dalga boylu ışığın yayılmasıdır. Otofloresansın yaygın biyolojik örnekleri arasında tirozin ve triptofan, nikotinamid adenin dinükleotidi ve klorofil gibi amino asitler bulunur. Ek olarak, benzen halkaları içeren birçok polisiklik

aromatik hidrokarbon içeren bileşiklerde otofloresandır. Gerçekten de, benzen, naftalen ve diğer polisiklik aromatik hidrokarbonlar, tütün dumanında bulunur ve katran fazının otofloresansına katkıda bulunur²⁷³. E-likitlerde bulunan bazı aromalarda sinnamaldehit ve vanilin içeren benzen halkaları bulunduğundan, e sıvıların otofloresan olabileceğini bildirilmiştir. Bu nedenle mevcut çalışmada, otofloresans için ticari olarak temin edilen mango, Virjinya tütünü, klasik tütün, creme brulee, klasik mentol, soğuk salatalık, soğuk nane ve fruit medley olmak üzere 8 farklı e-likit test edilmiştir. Ayrıca bu otofloresansın e-likit buhar birikimi için yeni bir marker olma potansiyeli ve üçüncü el duman maruziyetinin bir markerı olarak hizmet edip/edemeyeceğini de test edilmiştir.

Mevcut çalışmada e-sıvıların oldukça otofloresan olduğu bulunmuştur. Gerçekten de, emisyon taramaları, otofloresans ile ilgili olarak e-likitler arasında çok fazla heterojenlik olduğunu ortaya çıkarmıştır. Yani hem sinyal gücü hem de tepe emisyonunun dağılımı bir e-likitten diğerine önemli ölçüde değişmiştir. Bu da e-likitlerin çoğunun benzersiz bir floresans profiline sahip olduğu göstermektedir. E-likitler 250, 550 ve 600 nm uyarımda, emisyon monomodal iken, 3-4 e-likit 400, 450 ve 500 nm dalga boylarında tepe uyarımlara sahip iken, 550 ve 600 nm uyarımda daha düşük uyarımlara sahip olduğu belirlenmiştir. 300, 350 ve 400 nm dalga boyunda test edildiğinde bimodal bulunmuşlardır. Fruit Medley grubunun RFU değeri 450 nm'de diğer tüm e-likitlere göre en yüksek bulunurken, diğer aromaların RFU değeri fruit medleye göre daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Bu yeni özelliklerin laboratuvarında e-likitlerin incelenmesinde yararlı olacağı ve yapay okumalardan kaçınmak için dikkate alınması gerektiği düşünülmektedir. Örneğin, hücreleri boyamak için kullanılan flüoresan boyalar, analizlerde e-likit otofloresansı etkileyen ve yapay olarak daha yüksek okumalar verme potansiyelini taşımaktadır. Bununla birlikte, otofloresansın, e-sig buharı birikiminin bir işareti olarak kullanılabilmesi düşünülmektedir.

Mevcut çalışmada Fruit Medley aromalı e-likitin en yüksek otofloresans özelliğine sahip olduğu belirlendikten sonra bu e-likitin buharlaştırıldıktan sonra ortamda birikiminin olup olmadığı test edilmiştir. Bunu yapmak için ilk olarak saydam tabanlı ve saydam kapaklı olan 96'lı kuyucuklu plate alınmış ve her bir kuyucuğun içerisine oluşabilecek herhangi bir yansımayı engellemesi için 75 µl PBS eklenmiştir. Ardından vaping sırasında e-sigara buharının kuyucuk sütunları arasında birbiriyle karışmasını önlemek amacıyla tüm kuyucukların üzeri PCR için kullanılan silikon bantlarla

kapatılmıştır. Sütunları birer boşluk kalacak şekilde sadece PBS, 1 puf, 5 puf, 10 puf, 20 puf olarak ayrılmıştır. PBS kontrol grubu olarak ölçüldükten sonra 1 puf, 5 puf, 10 puf ve 20 puf yapıp otofloresans özellikleri bakımından 350/430 nm (eksitasyon/emisyon) plateler alttan ve üstten okutulmuştur. Veriler, buharlaşma sonrası fruit mendley otofloresansı ile fruit medley e-likit otofloresansı ile korele olduğu bulunmuştur. Yani floresan yoğunluğunun artan puf sayısı ile doğrusal olarak arttığı görülmüştür.

E-sıvıların buharlaştırıldıktan sonra fiziko-kimyasal özellikleri hakkında bazı tartışmalar yapılmaktadır. Yani, oluşan sıvı bir buhar mı yoksa bir aerosol formu mudur²⁷⁴? Bir aerosol, hava veya gaz içine dağılmış parçacıkların koloidal bir süspansiyonu olarak tanımlanırken, bu buharda bir maddenin gaz fazı olarak tanımlanmaktadır. Son yayınlar, e-likitlerin farklı büyüklükteki mikron altı ve nanopartiküllerden oluştuğunu göstermektedir^{275,276}. E-likit aerosolü solunduğunda, bu partiküllerin içindeki veya üzerindeki potansiyel toksik kimyasallar solunum yolunda birikir²⁷⁵. Bu partiküller doğal solunum temizleme mekanizmalarından kaçabilme yeteneklerinden dolayı daha büyük aerosol parçacıklarına göre daha yüksek bir risk potansiyeli oluşturmaktadır. Ayrıca, mikron altı parçacıklar solunum yolları boyunca birikir ve solunum yolunda büyük aerosol parçacıklarından daha derinde tutulur. Bu durumda onları daha zararlı duruma getirmektedir²⁷⁷. Elektronik sigara kullanımının daha yeni olması nedeniyle, literatürde e-likitlerin buharlaştırılmasından sonraki durumu ile ilgili çok az bilgi bulunmaktadır. Çalışmalarda e-sigara buharının yaklaşık %50'sinin podlardaki filtre pedinden geçtiği ve geri kalan kısmının filtre pedi tarafından yakalandığı bildirilmiştir²⁷³. Partikül büyüklüğünün ve bileşiminin farklı koşullar altında belirlenmesi için daha fazla sayıda çalışma yapılması gerekse de, bu çalışmada hem filtre edilmiş hem de filtre edilmemiş e-sig buharı otomatik floresan ve standart bir plaka okuyucu kullanılarak tespit edilmiştir. Bilinmeyen e-sig maruz kalma yollarından biri de üçüncü el maruziyetidir. Tütün ürünlerine üçüncü elden maruz kalma, genellikle göz ardı edilen ve çocukların sağlığına zararlı olabilecek tütün dumanına maruz kalma potansiyeli olan bir maruziyet yoludur²⁷⁸. Çalışmalarda toz, hava ve yüzeylerde bulunan üçüncü el duman kirleticilerin, sigara içildikten sonra ve hatta temizlikten sonra bile birkaç ay boyunca kapalı bir ortamda/yüzeyde kaldığı gösterilmiştir²⁷⁹. Bu da tütün dumanında mevcut olan 4.000'den fazla zararlı kimyasal maddeye maruz kalma potansiyeli olan bir yol sağlar²⁷⁸. Mevcut çalışmada yüzeylerde potansiyel üçüncü el e-sig maruziyetini belirlemek için, e-sig buharı birikiminin bir belirleyicisi olan

otofloresans özelliğinden yararlanılmıştır. Yapılan çalışmada yüzeye üflenen puf sayısı artıkça yüzeyde birikiminin de arttığı gösterilmiştir.

E-sigaraları incelemek için farklı maruz kalma paradigmaları kullanılmıştır. E-likitlerin *in vitro* sistemlere doğrudan eklenmesi, gerçek dünyadaki buharı temsil etmemektedir. Buna rağmen binlerce e-likitin ticari olarak temin edilebildiği göz önüne alındığında, incelenen e-likit maruziyetinden elde edilen verilerin önemi oldukça büyüktür. Yoğunlaşan e-likit buharının çalışmalarda kullanılması ise ara bir yaklaşımdır, çünkü buharlaşma zaman içinde değişebilir ve kısa ömürlü reaktif ürünlerin etkileri kaçırılabilir. Bu nedenle e-likit aerosolüne doğrudan maruziyet daha kesin sonuçlar verebilir. Ancak, sigaranın iyi çalışılmış puff topografisinin ve önerilen standart dozaj yaklaşımlarının aksine e-sigara topografyaları yeni cihazlar ortaya çıktıkça değişmekte olmasından ötürü yeterince anlayışamamıştır. Belirli standartların eksikliği nedeniyle, aerosolün üretildiğini ve hedef hücrelerine ulaştığını doğrulamak için dozimetre yapılmalıdır. E-likitler ve buharı, çeşitli hücre kültür sistemleri ve maruz kalma modelleri kullanılarak *in vitro* olarak incelenmiştir. İmmortal hücresel sistemler, çok sayıda e-likiti incelemek için faydalı olsa da, e-sigarada kullanılan e-likit buharının *in vivo* ortama en yakın benzerlik gösteren primer pulmoner hücreler üzerindeki etkilerine daha çok odaklanılmıştır. Mevcut çalışmada da e-likit doğrudan primer insan bronşiyal epitelyal hücreleri uygulanmıştır.

Ayrıca e-sigaralar geleneksel sigaraların ürettiğine benzer seviyelerde ve geniş kapsamlı etkileri olduğu bilinen bir solunum yolu toksik maddesi olan akroleini piroliz (ısıl bozunum) yoluyla ürettiği tespit edilmiştir. Sinamaldehit ve diasetil (patlamış mısır aroması) gibi solunum yollarını olumsuz yönde etkilediği bilinen lezzet verici katkı maddelerinin beklenmeyen etkilerini önlemek için, daha geleneksel bir "tütün" aromalı e-likitler kullanılmıştır. Bu durum ise temel e-likit bileşenlerinin buharlaşmasının iyon taşınmasını ve akrolein üretimini nasıl etkilediğinin belirlenmesine olanak sağlamaktadır. Bu bulgular, şimdiye kadar bilinmeyen e-sigara kullanımının, yani kronik bronşit ve KOAH şiddetinin başlangıcı ve ilerlemesi ile ilişkili olduğu bilinen akroleine maruz kalma toksisitesini göstermektedir. Hem aromaları itibariyle hem de araçları itibariyle e-likitler gelişmeye devam ettikçe, solunum yolu iyon transportu üzerindeki etkilerini değerlendirmek için ek bir incelemeye ihtiyaç duyulacağına dikkat edilmelidir.

E-sigaralar; cihaz gücüne, likit bileşenlerine ve kullanım şekline bağlı olarak bağımlılığa neden olan nikotini ya da diğer toksik maddeleri içeren aerosolü üreten cihazlardır^{92,107,108,280}. Bu ürünlerin kullanımı dünya çapında günden güne artış göstermektedir. E-sigaralar tarafından salınan aerosollerin özellikle solunum sistemi^{183,184} ve immünolojik etkileri¹⁹⁹ üzerine olan potansiyel etkileri yeni yeni anlaşılmaya başlanmaktadır. Aerosolde bulunan nikotinin kardiyovasküler sistemi etkileyebileceği de ortaya konmuştur⁹⁹. Yapılan bazı çalışmalarda, e-sigara ile sisteme iletilen nikotinin hamile kullanıcılarda fetal gelişimi ya da adölesan dönemdeki kullanıcılarda beyin gelişimini etkileyebileceği endişesini doğuracak veriler ortaya konmuştur²¹. Bununla birlikte, e-sigaradan salınan nikotinin vücut sistemine girdiğine dair^{72,168,281} bolca kanıt sunulmuş olup, yapılan çalışma sonucunda normal sigara ile e-sigara kullanımı sonrası plazma nikotin konsantrasyonlarının ölçümlerinin 10 puf sonrası birbirine yakın değerde olduğu bulunmuştur²⁸².

Bullen ve arkadaşları, sigarayı bırakmada nikotin bandına karşı e-sigaraların etkinliğini araştıran en büyük çalışmalardan birini yürütmüşlerdir²⁸³. Bu çalışma hâlihazırda sigara içen ve sigarayı bırakmayı isteyen 657 gönüllü katılımcı ile gerçekleştirilmiştir. Denekler sırasıyla 16mg nikotin e-sigara grubu, 21mg nikotin bandı veya plasiyo e-sigara gruplarına rastgele ayrıldı. Katılımcılar 6 aylık bir süre boyunca, 1.ve 3. aylarda yapılan değerlendirmelerle takip edildi. 6 ayın sonunda sigarayı bırakma oranları nikotin içeren e-sigara kullananlarda %7.3 iken, nikotin bandı kullananlarda %5.3, plasiyo e-sigara kullananlarda ise bu oran %4.1 olarak belirlenmiştir²⁸³. Yapılan çalışma bu alanda yapılmış olan en büyük araştırmalardan biri olmasına rağmen sigarayı bırakma oranı beklentilerin oldukça altında kalmıştır. Sonuç olarak nikotin içeren e-sigara, nikotin bandı ve plasiyo e-sigaraya kıyasla sigarayı bırakmada önemli ölçüde büyük bir etki göstermemiştir¹⁶⁶.

E-sigaralar daha öncede belirtildiği üzere, normal sigaralara kıyasla daha güvenilir bir alternatif olarak tüketicilerin kullanımına sunulmaktadır. E-sigaraların akut etkilerini belirleyebilmek amacıyla Flouris ve arkadaşları, 30 sağlıklı katılımcıyı değerlendirmek için 15 kişilik sigara içenlerden ve 15 kişilik hiç sigara içmemişlerden oluşan denekleri 2 gruba ayırdı⁶. Sigara içen katılımcılar 30 dk kontrol olarak oda havasına, 30 dk aktif tütün dumanına (en sevdikleri markanın 2 sigarasına) ve 30 dk aktif e-sigara dumanına maruz bırakıldılar. Sigara içmeyenler ise kontrol olarak oda havasına, bir saat boyunca

pasif olarak tütün dumanına (kapalı bir ortamda bulunan deneklere normal sigaranın dumanı üflenerek) ve bir saat de pasif e-sigara dumanına (kapalı bir ortamda bulunan deneklere e-sigaranın buharı üflenerek) maruz bırakılmışlardır. Spirometre ile oda havasına, sigara dumanına ve e-sigara buharına maruziyetten önce, hemen sonra ve bir saat sonra ölçümler alınmıştır. Araştırmacılar, FEV1 veya FEV1/FVC'de e-sigara maruziyetine bağlı herhangi bir değişikliğin saptanmadığını, oysa ki normal sigaraya maruziyet sonucunda FEV1/FVC oranının %7.2 oranında azaldığını tespit etmişlerdir⁶.

E-sigaranın sağlık üzerindeki akut etkileri ile ilgili yapılan araştırmalar, kullanıcı değişkenleri, deneyim ve cihazlar arasındaki farklar nedeniyle sınırlıdır. Vansickel ve arkadaşları, e-sigara kullanıcılarının nikotin ve karbon monoksit (CO) maruziyetini karakterize etmek ve aktif “vaping” den kaynaklanan çeşitli akut etkileri değerlendirmek için kullanılacak stabil bir klinik laboratuvar metodunu ortaya koymaya çalışmıştır. Bu araştırmaya 32 yetişkin e-sigara kullanıcısı; 150 dakika kendi tükettikleri marka e-sigara, 150 dakika, “NPRO” marka e-sigara (18mg kartuş), 150 dakika “Hydro” marka e-sigara (16mg kartuş) ve 150 dakikada sham (plasebo grubu) olarak belirlenen 4 gruptan birine dahil edildi. Plazma nikotin seviyesi, solunan karbonmonoksit (CO) miktarı ve kalp atım hızı ölçülmüş, ayrıca sigara içme isteğindeki azalmayı ölçmek amacıyla anketler kullanılmıştır⁸³. Sonuçlar, sadece kendi kullandıkları marka e-sigara kullanımından sonra plazma nikotin düzeylerinde, solunan karbonmonoksit miktarında ve kalp hızında artış olduğunu gösterdi. İlginç bir şekilde, plasebo grubunda nikotin içermeyen e-sigaranın akut kullanımı, sigara kullanımı için azalan bir istek ve tatmin duygusu göstermiştir⁸³.

Vansickel ve arkadaşları, e-sigara kullanımının daha ileri etkilerini değerlendirmek amacıyla e-sigara kullanım deneyimine sahip 8 yetişkini beş saatten oluşan 4 aşamaya tabi tutmuşlardır. Bu aşamalar; Bazal evre, e-sigara cihazından 10 puf, 1 saatlik ad libitum puf periyodu ve bunu takip eden 2 saatlik puf yapılmayan dinlenme periyodu olarak belirlenmiştir. Katılımcılar; günde 2-3ml nikotin solüsyonu ya da 2 kartuş tüketimi ile en az 3 aylık e-sigara kullanım deneyimlerine sahiptiler. Deney için katılımcılar kendi e-sigara cihazlarını ve tercih ettikleri aroma ile yoğunluğu kullanmışlardır. Önceki çalışmadaki gibi plazma nikotin seviyesi, solunan karbonmonoksit (CO) miktarı ve kalp atım hızı ölçülmüş, ayrıca sigara içme isteğindeki azalmayı ölçmek amacıyla anketler kullanılmıştır²⁸⁴. Çalışmada elde edilen veriler bazal

ölçümlerle karşılaştırıldığında plazma nikotin seviyesinin ve kalp hızının ilk puftan sonraki 5 dakika içerisinde arttığı ve ad libitum puf periyodu boyunca da yüksek kaldığını ortaya koymuştur. Buna ek olarak, denekler bazal dönemle kıyaslanınca e-sigara kullanımının "uyanmaya yardımcı", "sakinleştirici" ve "odaklanmaya yardımcı" etkileri olduğunu belirtmişlerdir¹⁶⁸. Sadece e-sigara kullananlarla yapılan önceki çalışmaya kıyasla elde edilen bu bulgular deneyimli e-sigara kullanıcılarında nikotin iletimindeki daha uzun puf süresinin etkisini yansıtmaktadır.

Sigarayı bırakan astımlı hastalarda daha az semptomlar ortaya çıkmakla birlikte hastaların akciğer fonksiyonlarında iyileşmeler gözlenmiştir²⁸⁵⁻²⁸⁷. Bu bilgiye dayanarak araştırmacılar e-sigara kullanımının astımlı hastalar üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Yapılan araştırmacıların sonucunda ise günlük düzenli sigara kullanan astımlı hastaların yalnızca e-sigara kullanımına geçmesiyle ya da e-sigara kullanımı neticesinde normal sigara kullanımını azaltmalarıyla birlikte solunum yolu aşırı duyarlılığının azaldığı, akciğer fonksiyonunda ve astım kontrolünde gelişme olduğu ortaya konmuştur²⁸⁴.

Son olarak e-sigaranın faydalı yönlerini özetlemek gerekirse; ilk olarak e-sigara kullanımı, tüketicide normal sigara içme davranışına benzer bir etki ortaya çıkardığı için, tütün sigarasının bırakılmasına potansiyel olarak katkıda bulunabilir. Bunun yanı sıra hafif ya da orta dereceli astımlı ve sigara içen hastaların e-sigara kullanımının, normal sigara tüketen hastalara kıyasla solunum yolu aşırı duyarlılığını azalttığı belirlenmiştir. Normal sigara tüketenlerde solunumla verilen karbonmonoksit gazında artış bulunmuşken e-sigara tüketenlerde böyle bir artışa rastlanılmamıştır. Buna ek olarak, normal sigara tüketenlerin kanında lökosit, lenfosit ve granüosit sayılarında artış gözlenirken e-sigara kullananlarda böyle bir artışa rastlanılmamıştır¹⁶⁶.

Pek çok araştırmacı için en büyük korku ise e-sigaranın kısa vadede ya da uzun vadede öngörülemeyen sağlık sorunlarına yol açabileceğidir. Bu zararlar e-sigara buharının toksik ve kanserojenik bileşiklerinden, akciğer fonksiyonları üzerindeki zararlı etkilerinden ve diğer bazı beklenmedik sonuçlarından kaynaklanmaktadır. E-sigaranın potansiyel zararları bireysel kullanımın ötesine geçip, e-sigara buharına maruz kalanları ya da bu buhar odadan tamamıyla çıkmasına rağmen içerdiği partiküllerin kullanım esnasında yüzeye çökmesiyle birlikte bu yüzeylerle temas halinde olan bireyleri de etkileyebilmektedir^{163,288}. E-sigaraların üretim yöntemleri değiştikçe, üretilen daha yeni

ürünler kullanıcıları daha yüksek seviyelerde karsinojene maruz bırakabilmektedirler. Dolayısıyla hekimlerin bu cihazları tanıma ve olası yan etkileri hakkında bilgi sahibi olma sorumlulukları vardır^{289,290}. Yeniden doldurulabilir kartuşlarda bulunan e-likitlerin içeriğinde nikotin, gliserin, propilen glikol, su ve çeşitli aromaların karışımı bulunmaktadır. Ancak bu kimyasal bileşikler buharlaşma sürecinde kimyasal reaksiyonlar meydana getirerek orijinal e-likitte bulunmayan potansiyel olarak zararlı bileşiklere dönüşebilirler⁷⁷. E-sigara sıvısının bileşimi ile ilgili endişe verici diğer bir konu ise, nikotin içermediği iddia edilen ürünlerde bile nikotinin bulunması ve pek çok satış noktasının herhangi bir gözetim ya da düzenleme olmaksızın kendi e-likit formüllerini tüketiciye sunmalarıdır. Tüm bu bulgular e-sigara kullanımı ile ortaya çıkabilecek olası zararlara işaret etmektedir^{77,291}.

E-sigaranın zararlı yönlerinin özetlenmesi gerekirse, öncelikle e-sigaralar ikinci ve üçüncü el maruziyet etkilerine sahip olup, aerosolünde bulunan kimyasal bileşikler e-likitin ısınma sürecinde değişikliğe uğradığı için, orijinal e-likitte bulunanlardan farklı olabilir. E-sigara astımlı hastalarda TH2 solunum yolu inflamasyonunu ve solunum yolu aşırı duyarlılığını arttırabilir. E-sigaranın glikol bileşenine kısa ve uzun dönem maruziyet akciğer fonksiyonu üzerinde etkilere sahiptir. E-sigara likitlerinin aerosolü düşük seviyelerde de olsa çeşitli toksik maddeler içerir. Isıtmanın derecesine bağlı olarak e-sigarada bulunan toksik maddeler normal sigarada bulunan toksik maddelerin seviyesini geçebilir. E-sigaranın hamilelik sırasında fetus üzerindeki potansiyel etkileri endişe verici olabilir. E-likitin intihar amaçlı kullanılması ya da kazara yüksek dozda tüketilmesi ihtimali, büyük bir tehlikeye yol açabileceği endişelerine yol açmaktadır¹⁶⁶.

E-sigaranın iyi varsayılan ve kötü olduğu bilinen özelliklerinin yanı sıra bir de endişe verici bir yönü bulunmaktadır. 2012-2013 yılında yapılan ulusal tütün kullanım anketi, e-sigara kullanımının en fazla 18-24 yaşları arasındaki gençlerde %8.3 oranında yaygın olduğunu ve bu oranın yetişkinler arasındaki e-sigara içme oranına kıyasla iki kat daha fazla olduğunu ortaya koymuştur²⁹². Son zamanlarda yapılan pek çok çalışma e-sigara kullanımının popülaritesindeki bu artışın nedenini araştırmaktadır. Aktif sigara kullanıcılarının e-sigara kullanma nedenleri arasında yeni bir şey denemek, geleneksel sigarayı azaltmayı veya bırakmayı denemek ya da diğer tütün ürünlerinin yerine e-sigarayı kullanmayı denemek yer almaktaydı^{293,294}. Daha önce hiç e-sigara denememiş olan yetişkinler e-sigara kullanmayı meraktan dolayı, bir aile üyesinin e-sigara

kullanmasından dolayı ya da girdikleri bir ortamda kendilerine e-sigara kullanımı teklif edildiği için denediklerini ifade etmişlerdir²⁹⁵. Gençler arasında kullanımının en büyük nedenleri de yine merak, farklı bir tat arayışı ve tabii ki arkadaş çevresi tarafından teşvik edilmedi²⁹⁶. Anketlerden elde edilen rakamlar e-sigara popülaritesinin her geçen gün artmasıyla birlikte pazarının da dünya genelinde 3.5 milyar dolara ulaştığını ortaya koymaktadır¹⁶⁶. Son yıllardaki e-sigara popülaritesindeki artışın en büyük nedeni, şirketlerin e-sigara reklamlarını sosyal medya üzerinden yapmasından kaynaklanmaktadır^{166,297,298}. E-sigara çoğu zaman, tütün sigarası kullanımına göre daha sağlıklı, daha ucuz ve daha temiz bir alternatif olarak gösterildiğinden, pazarlama noktasında sigara içenlerin ilgisini çekmede oldukça etkilidir^{1,299,300}. Pazarlama taktiği açısından e-sigaranın güvenli olduğuna dair verilen garanti oldukça sınırlı sayıdaki bilimsel kanıtlara dayanmaktadır. Buna ek olarak yapılan çalışmalar e-sigara tüketicilerinin farklı tür sigara ve uyuşturucu (nargile, kokain, mariuana...vb) kullanımına da yatkınlık gösterdiklerini ortaya koymuştur^{134,301}.

ABD' de tütün ürünleri FDA'nin tütün ürünleri merkezi tarafından, Aile içinde sigarayı tüketimini önleme ve Tütün Kontrol Yasası kapsamında düzenlenmektedir. Şu anda ABD'de e-sigara satışının ve kullanımının düzenlenmesi sadece eyalet ve lokal yönetimler düzeyindedir. FDA, 2014 Nisan ayında ulusal olarak Tütün Kontrol Yasası'nın denetimine tabi olarak e-sigaranın da değerlendirilmesi gerektiğini öngören bir yasa teklifinde bulunmuştur. Yapılan teklifte, e-sigara satışına 18 yaş sınırı getirilmekle birlikte e-sigaranın üzerine nikotin bağımlılığı konusunda sağlığa zararlı uyarılar eklenmesi belirtilmiş, ancak bu düzenlemeler henüz yürürlüğe geçmemiştir³⁰². Türkiye gibi pek çok ülke ise e-sigaranın satışını tamamen yasaklayan politikaları uzun zaman önce yürürlüğe koymuştur³⁰³.

E-sigaraların bu endişe verici yönlerini özetlemek gerekirse; sınırlı sayıda güvenilir çalışmanın olması, farklı cihazlar arasındaki değişkenlikler, e-likitin içeriği ile etiketinde yazan içeriğin birbiriyle tutarlı olmaması, yasal düzenleme eksikliği, halk arasında tüketiminin serbest olması, artan popülaritesi, küçük yaştakilere satışı, ve potansiyel olarak diğer tütün ürünlerine ya da uyuşturucu kullanımına yöneltmesi olarak belirtilebilir¹⁶⁶.

E-sigaralar güçlü psikoaktif maddeler (nikotin veya nikotin tuzu) içermesine rağmen, pazarlanmasından önce sıkı testler gerektirmez. Buna karşın yeni bir farmasötik ürünün

piyasaya sürülmesi için, hayvan modellerinde prelinik toksikoloji ve ardından sağlam klinik denemeleri de içeren bir dizi çalışmaların yapılmasını gerektirir. Bu nedenledir ki e-sigaraların da diğer farmakosötik maddelerin geçtiği gibi prelinik aşamalardan geçmesi ve hayvan modelleri üzerinde çalışmalar yapılması önerilmektedir. Hayvanlarda prelinik toksikolojik çalışmalar yürütmek oldukça basit olsa da, insanlarda “klinik deneme” tipi çalışmalar yapmak etik görüşlere yol açmaktadır. Çünkü e-sigaraları sigara içmeyen sağlıklı kişilere vermek etik dışı olacaktır. Bununla birlikte, mevcut sigara içen pek çok kişinin akciğer patolojisi geliştirme sürecinde olduğu ve e-sigara kullanıcılarının akciğerlerinin de değişime uğradığı göz önüne alındığında, mevcut sigara içicilerde klinik çalışmalar yapılmasının uygun bir şekilde bilgilendirici olup olmayacağı da büyük bir soru işaretidir. Potansiyel terapötikler için kullanılan aynı yaklaşımı kullanarak e-sigara satıcılarını ve genel halkı farklı e-likitlerin göreceli etkileri konusunda bilgilendirmek için titiz ve şeffaf prelinik çalışmaların yapılması, ileriye dönük olarak yapılacak doğru bir adım olacaktır. Kuşkusuz, şimdi e-sigaranın milyarlarca dolarlık bir pazar olduğu göz önüne alındığında, e-sigara şirketleri bu çalışmaları destekleyecek bütçelere sahip gibi görünmektedir.

Sonuç olarak, elektronik sigaralarda bulunan nikotin tuzu, serbest baz nikotin, benzoik asit, sodyum tartar, PG/VG ve nikotin tuzu + benzoik asit gibi e-likitlerin uygulaması primer insan bronşiyal epitel hücrelerinde solunum yolu yüzey sıvısı yüksekliğini azalmıştır. Bu azalma büyük olasılıkla bileşenlerin HBEC membranlarında bulunan ve SYYS hacmini düzenlemesinde görev alan CFTR, ENaC ve CaCC kanallarının fonksiyonlarının bozulmasıyla ortaya çıkmış olabilir.

Elektronik sigaralarda bulunan nikotin tuzu, serbest baz nikotin, benzoik asit, sodyum tartar, PG/VG ve nikotin tuzu + benzoik asit gibi e-likitlerin uygulaması primer insan bronşiyal epitel hücrelerinde iyon transportunu azaltmasına rağmen, bu azalma anlamlılık arz etmemektedir. Hem agonist hem de antagonistler kullanılmasına rağmen iyon değişiminin gözlemlenmemesi büyük olasılıkla bu kimyasalların iyon transportunda görev alan CFTR, ENaC ve CaCC kanallarının fonksiyonlarının bozulmasından kaynaklanıyor olabilir.

Elektronik sigaralarda bulunan nikotin tuzu, serbest baz nikotin, benzoik asit, sodyum tartar, PG/VG ve nikotin tuzu + benzoik asit gibi e-likitlerin 0,0999 mM ve daha yüksek konsantrasyonlarda uygulaması insan embriyonik böbrek hücrelerinde (HEK-293T)

sitotoksositeye neden olmuştur. HEK-293T hücrelerinde nikotin tuzu + benzoik asitin kombine uygulandığı grubun en toksik olduğu bulundu. Bu durum özellikle benzoik asitin nikotin tuzunun etkinliğini artırarak nAChR aktivitesini artırması ve bunun sonucunda hücre içi aşırı Ca²⁺ iyon artışına neden olmasından kaynaklanıyor olabilir.

E-sigara likitlerinde bulunan mango, Virjinya tütünü, klasik tütün, creme brulee, klasik mentol, soğuk salatalık, soğuk nane ve fruit medley, otofloresans özellikleri bakımından heterojenlik göstermiştir. Bu heterojenite de e-likit buhar birikimi için yeni bir marker olma potansiyeli ve üçüncü el duman maruziyetinin bir markeri olma potansiyelini taşımaktadır. E-likitlerin bu otofloresans özellikleri biyolojik deneylerde e-likitlerin varlığının tespit edilmesi, birikme miktarının belirlenmesi ve dış yüzeylerde üçüncü el maruz kalmasının tespiti de dahil olmak üzere birçok uygulamaya sahip olduğunu ve araştırmacılar tarafından kullanılabileceğini ön görmekteyiz. Yani, bu otofloresansın laboratuvar da hem hücre kültürlerine veya *in vivo* da hem de sert yüzeylere, birinci, ikinci ve üçüncü el maruziyet durumlarını değerlendirmek için kullanılacak bir birikim markeri olarak yararlı olacağını düşünmekteyiz. Ayrıca, e-likit otofloresansı, örneğin indüklenmiş balgam veya nazal lavajda, maruziyetin yeni bir biyolojik belirleyicisi olabilir. E-likitlerin ve e-sigara cihazlarının sürekli yenilenmesi nedeniyle, atomizasyon ve buhar/aerosol geliştirme araştırmalarında araştırmacılara birikim ve dağılım konusunda bilgi vermektedir. Daha önemlisi, verilerimiz buharlaştırılmış e-likitlere maruziyetin halk sağlığı için bir risk oluşturduğu ve bu nedenle üçüncü el maruziyeti daha iyi anlamak için daha fazla araştırma yapılması gerektiğini göstermektedir.

Genel olarak, e-sigaralar ve ilgili ürünler hakkındaki mevcut bilgilerimizin çok sınırlı olması, e-sig artan popülaritesinin neden olduğu etkiler ile insan sağlığı üzerindeki etkilerle ilgili bilgi eksikliğimiz arasındaki boşluk hızla genişlemektedir. Bu ürünlerle ilgili sonuçlar çıkarmadan önce kolay ve ciddi bir şekilde göz önünde bulundurulması gereken birçok faktör vardır. Sonuç olarak e-sigara satıcılarını ve genel halkı farklı e-likitlerin göreceli etkileri konusunda bilgilendirmek için titiz ve şeffaf prelinik çalışmaların yapılması ileriye dönük olarak yapılacak doğru bir adım olacaktır.

6. KAYNAKLAR

1. Grana R, Benowitz N, Glantz SA. E-cigarettes: a scientific review. *Circulation*. 2014;129(19):1972-1986.
2. Gilbert HA. Smokeless non-tobacco cigarette. Google Patents; 1965.
3. Grana R, Benowitz N, Glantz SA. Background paper on e-cigarettes (electronic nicotine delivery systems). 2013.
4. Brown CJ, Cheng JM. Electronic cigarettes: product characterisation and design considerations. *Tob Control*. 2014;23 Suppl 2:ii4-10.
5. Henningfield JE, Zaatari G. Electronic nicotine delivery systems: emerging science foundation for policy. BMJ Publishing Group Ltd; 2010.
6. Flouris AD, Chorti MS, Poulianiti KP, et al. Acute impact of active and passive electronic cigarette smoking on serum cotinine and lung function. *Inhal Toxicol*. 2013;25(2):91-101.
7. Harrell PT, Simmons VN, Correa JB, Padhya TA, Brandon TH. Electronic nicotine delivery systems ("e-cigarettes"): review of safety and smoking cessation efficacy. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2014;151(3):381-393.
8. McNeil A, Brose L, Calder R, Hitchman S, Hajek P, McRobbie H. E-cigarettes: an evidence update. A report commissioned by Public Health England. Public Health England. 2015;111.
9. McNeill A, Brose LS, Calder R, Bauld L, Robson D. Evidence review of e-cigarettes and heated tobacco products 2018. A report commissioned by Public Health England. London: Public Health England. 2018;6.
10. Brown J, Beard E, Kotz D, Michie S, West R. Real-world effectiveness of e-cigarettes when used to aid smoking cessation: a cross-sectional population study. *Addiction*. 2014;109(9):1531-1540.
11. Zhu SH, Zhuang YL, Wong S, Cummins SE, Tedeschi GJ. E-cigarette use and associated changes in population smoking cessation: evidence from US current population surveys. *BMJ*. 2017;358:j3262.
12. Pasquereau A, Guignard R, Andler R, Nguyen-Thanh V. Electronic cigarettes, quit attempts and smoking cessation: a 6-month follow-up. *Addiction*. 2017;112(9):1620-1628.

13. Russell M. Low-tar medium-nicotine cigarettes: a new approach to safer smoking. *Br Med J.* 1976;1(6023):1430-1433.
14. Hartmann-Boyce J, McRobbie H, Bullen C, Begh R, Stead LF, Hajek P. Electronic cigarettes for smoking cessation. *Cochrane Database Syst Rev.* 2016;9:CD010216.
15. Kalkhoran S, Glantz SA. E-cigarettes and smoking cessation in real-world and clinical settings: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Respir Med.* 2016;4(2):116-128.
16. Fant RV, Henningfield JE, Shiffman S, Strahs KR, Reitberg DP. A pharmacokinetic crossover study to compare the absorption characteristics of three transdermal nicotine patches. *Pharmacology Biochemistry and Behavior.* 2000;67(3):479-482.
17. Lunell E, Curvall M. Nicotine delivery and subjective effects of Swedish portion snus compared with 4 mg nicotine polacrilex chewing gum. *Nicotine & Tobacco Research.* 2011;13(7):573-578.
18. Rennard SI, Glover ED, Leischow S, et al. Efficacy of the nicotine inhaler in smoking reduction: A double-blind, randomized trial. *Nicotine & tobacco research.* 2006;8(4):555-564.
19. Caldwell BO, Crane J. Combination nicotine metered dose inhaler and nicotine patch for smoking cessation: a randomized controlled trial. *Nicotine & Tobacco Research.* 2016;18(10):1944-1951.
20. Walley SC, Wilson KM, Winickoff JP, Groner J. A Public Health Crisis: Electronic Cigarettes, Vape, and JUUL. *Pediatrics.* 2019;143(6):e20182741.
21. Breland A, Soule E, Lopez A, Ramoa C, El-Hellani A, Eissenberg T. Electronic cigarettes: what are they and what do they do? *Ann N Y Acad Sci.* 2017;1394(1):5-30.
22. El-Hellani A, Salman R, El-Hage R, et al. Nicotine and Carbonyl Emissions From Popular Electronic Cigarette Products: Correlation to Liquid Composition and Design Characteristics. *Nicotine Tob Res.* 2018;20(2):215-223.
23. Schroeder MJ, Hoffman AC. Electronic cigarettes and nicotine clinical pharmacology. *Tob Control.* 2014;23 Suppl 2:ii30-35.
24. Clapp PW, Jaspers I. Electronic Cigarettes: Their Constituents and Potential Links to Asthma. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2017;17(11):79.

25. Zhu SH, Sun JY, Bonnevie E, et al. Four hundred and sixty brands of e-cigarettes and counting: implications for product regulation. *Tob Control*. 2014;23 Suppl 3:iii3-9.
26. DeVito EE, Krishnan-Sarin S. E-cigarettes: Impact of E-Liquid Components and Device Characteristics on Nicotine Exposure. *Curr Neuropharmacol*. 2018;16(4):438-459.
27. Kreiss K, Gomaa A, Kullman G, Fedan K, Simoes EJ, Enright PL. Clinical bronchiolitis obliterans in workers at a microwave-popcorn plant. *New England Journal of Medicine*. 2002;347(5):330-338.
28. van Rooy FG, Rooyackers JM, Prokop M, Houba R, Smit LA, Heederik DJ. Bronchiolitis obliterans syndrome in chemical workers producing diacetyl for food flavorings. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2007;176(5):498-504.
29. Barrington-Trimis JL, Samet JM, McConnell R. Flavorings in electronic cigarettes: an unrecognized respiratory health hazard? *JAMA*. 2014;312(23):2493-2494.
30. Alert N. Preventing Lung Disease in Workers Who Use or Make Flavorings. NIOSH Publication No. 2004-110. 2003.
31. Cooper M, Harrell MB, Perez A, Delk J, Perry CL. Flavorings and Perceived Harm and Addictiveness of E-cigarettes among Youth. *Tob Regul Sci*. 2016;2(3):278-289.
32. Leigh NJ, Lawton RI, Hershberger PA, Goniewicz ML. Flavourings significantly affect inhalation toxicity of aerosol generated from electronic nicotine delivery systems (ENDS). *Tob Control*. 2016;25(Suppl 2):ii81-ii87.
33. Tierney PA, Karpinski CD, Brown JE, Luo W, Pankow JF. Flavour chemicals in electronic cigarette fluids. *Tob Control*. 2016;25(e1):e10-15.
34. Farsalinos KE, Gillman IG, Melvin MS, et al. Nicotine levels and presence of selected tobacco-derived toxins in tobacco flavoured electronic cigarette refill liquids. *Int J Environ Res Public Health*. 2015;12(4):3439-3452.
35. Havel CM, Benowitz NL, Jacob P, 3rd, St Helen G. An Electronic Cigarette Vaping Machine for the Characterization of Aerosol Delivery and Composition. *Nicotine Tob Res*. 2017;19(10):1224-1231.

36. Garcia-Gomez D, Gaisl T, Barrios-Collado C, Vidal-de-Miguel G, Kohler M, Zenobi R. Real-Time Chemical Analysis of E-Cigarette Aerosols By Means Of Secondary Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Chemistry*. 2016;22(7):2452-2457.
37. Lisko JG, Tran H, Stanfill SB, Blount BC, Watson CH. Chemical Composition and Evaluation of Nicotine, Tobacco Alkaloids, pH, and Selected Flavors in E-Cigarette Cartridges and Refill Solutions. *Nicotine Tob Res*. 2015;17(10):1270-1278.
38. Han S, Chen H, Zhang X, Liu T, Fu Y. Levels of Selected Groups of Compounds in Refill Solutions for Electronic Cigarettes. *Nicotine Tob Res*. 2016;18(5):708-714.
39. Plevkova J, Kollarik M, Poliacek I, et al. The role of trigeminal nasal TRPM8-expressing afferent neurons in the antitussive effects of menthol. *Journal of Applied Physiology*. 2013;115(2):268-274.
40. Willis DN, Liu B, Ha MA, Jordt S-E, Morris JB. Menthol attenuates respiratory irritation responses to multiple cigarette smoke irritants. *The FASEB Journal*. 2011;25(12):4434-4444.
41. Lee YO, Glantz SA. Menthol: putting the pieces together. *Tobacco Control*. 2011;20(Suppl 2):ii1.
42. Yerger VB, McCandless PM. Menthol sensory qualities and smoking topography: a review of tobacco industry documents. *Tobacco Control*. 2011;20(Suppl 2):ii37-ii43.
43. Ahijevych K, Garrett BE. Menthol pharmacology and its potential impact on cigarette smoking behavior. *Nicotine & Tobacco Research*. 2004;6(Suppl_1):S17-S28.
44. Wickham R. Focus: Addiction: How Menthol Alters Tobacco-Smoking Behavior: A Biological Perspective. *The Yale journal of biology and medicine*. 2015;88(3):279.
45. Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. The calcium entry pas de deux. *Science*. 2000;287(5458):1604-1605.
46. Montell C. The TRP superfamily of cation channels. *Science Signaling*. 2005;2005(272):re3-re3.

47. Journigan VB, Zaveri NT. TRPM8 ion channel ligands for new therapeutic applications and as probes to study menthol pharmacology. *Life sciences*. 2013;92(8-9):425-437.
48. Rosbrook K, Green BG. Sensory Effects of Menthol and Nicotine in an E-Cigarette. *Nicotine Tob Res*. 2016;18(7):1588-1595.
49. Caggiula AR, Donny EC, Palmatier MI, Liu X, Chaudhri N, Sved AF. The role of nicotine in smoking: a dual-reinforcement model. The motivational impact of nicotine and its role in tobacco use: Springer; 2008:91-109.
50. Henderson BJ, Wall TR, Henley BM, Kim CH, McKinney S, Lester HA. Menthol enhances nicotine reward-related behavior by potentiating nicotine-induced changes in nAChR function, nAChR upregulation, and DA neuron excitability. *Neuropsychopharmacology*. 2017;42(12):2285.
51. Wang T, Wang B, Chen H. Menthol facilitates the intravenous self-administration of nicotine in rats. *Front Behav Neurosci*. 2014;8:437.
52. Garten S, Falkner RV. Role of mentholated cigarettes in increased nicotine dependence and greater risk of tobacco-attributable disease. *Preventive medicine*. 2004;38(6):793-798.
53. Eccles R. Menthol and related cooling compounds. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 1994;46(8):618-630.
54. MacDougall JM, Fandrick K, Zhang X, Serafin SV, Cashman JR. Inhibition of human liver microsomal (S)-nicotine oxidation by (-)-menthol and analogues. *Chemical research in toxicology*. 2003;16(8):988-993.
55. Benowitz NL, Herrera B, Jacob P. Mentholated cigarette smoking inhibits nicotine metabolism. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2004;310(3):1208-1215.
56. Fagan P, Pokhrel P, Herzog TA, et al. Nicotine metabolism in young adult daily menthol and nonmenthol smokers. *Nicotine & Tobacco Research*. 2015;18(4):437-446.
57. Yildiz D. Nicotine, its metabolism and an overview of its biological effects. *Toxicol*. 2004;43(6):619-632.
58. Jung BH, Chung BC, Chung S-J, Shim C-K. Different pharmacokinetics of nicotine following intravenous administration of nicotine base and nicotine hydrogen tartarate in rats. *Journal of controlled release*. 2001;77(3):183-190.

59. NICOTINE SALTS E-LIQUID OVERVIEW. 2018; http://www.vaporclassification.com/reports/NICOTINE_SALTS_E-LIQUID.pdf
60. Chen EY, Sun A, Chen C-S, Mintz AJ, Chin W-C. Nicotine alters mucin rheological properties. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2014;307(2):L149-L157.
61. Gundavarapu S, Wilder JA, Mishra NC, et al. Role of nicotinic receptors and acetylcholine in mucous cell metaplasia, hyperplasia, and airway mucus formation in vitro and in vivo. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2012;130(3):770-780. e711.
62. Bowen S-J, Hull J. The basic science of cystic fibrosis. *Paediatrics and Child Health*. 2015;25(4):159-164.
63. Tomar SL, Henningfield JE. Review of the evidence that pH is a determinant of nicotine dosage from oral use of smokeless tobacco. *Tobacco Control*. 1997;6(3):219-225.
64. Benowitz NL, Hukkanen J, Jacob P. Nicotine chemistry, metabolism, kinetics and biomarkers. *Nicotine psychopharmacology*: Springer; 2009:29-60.
65. Stepanov I, Fujioka N. Bringing attention to e-cigarette pH as an important element for research and regulation. *Tob Control*. 2015;24(4):413-414.
66. Etter JF, Bullen C. Saliva cotinine levels in users of electronic cigarettes. *Eur Respir J*. 2011;38(5):1219-1220.
67. Etter J-F, Due TV, Perneger TV. Saliva cotinine levels in smokers and nonsmokers. *American Journal of Epidemiology*. 2000;151(3):251-258.
68. Knorst MM, Benedetto IG, Hoffmeister MC, Gazzana MB. The electronic cigarette: the new cigarette of the 21st century? *J Bras Pneumol*. 2014;40(5):564-572.
69. Cameron JM, Howell DN, White JR, Andrenyak DM, Layton ME, Roll JM. Variable and potentially fatal amounts of nicotine in e-cigarette nicotine solutions. *Tob Control*. 2014;23(1):77-78.
70. Christensen LB, van't Veen T, Bang J. Three cases of attempted suicide by ingestion of nicotine liquid used in e-cigarettes. Paper presented at: *Clinical Toxicology*2013.

71. Cervellin G, Luci M, Bellini C, Lippi G. Bad news about an old poison. A case of nicotine poisoning due to both ingestion and injection of the content of an electronic cigarette refill. *Emergency Care Journal*. 2013;9(2):18.
72. Farsalinos KE, Spyrou A, Stefopoulos C, et al. Nicotine absorption from electronic cigarette use: comparison between experienced consumers (vapers) and naive users (smokers). *Sci Rep*. 2015;5:11269.
73. Rodgman A, Perfetti TA. The chemical components of tobacco and tobacco smoke. CRC press; 2016.
74. Baker RR, Massey ED, Smith G. An overview of the effects of tobacco ingredients on smoke chemistry and toxicity. *Food and Chemical Toxicology*. 2004;42:53-83.
75. Azzopardi D, Patel K, Jaunky T, et al. Electronic cigarette aerosol induces significantly less cytotoxicity than tobacco smoke. *Toxicol Mech Methods*. 2016;26(6):477-491.
76. Taylor M, Carr T, Oke O, et al. E-cigarette aerosols induce lower oxidative stress in vitro when compared to tobacco smoke. *Toxicol Mech Methods*. 2016;26(6):465-476.
77. Goniewicz ML, Knysak J, Gawron M, et al. Levels of selected carcinogens and toxicants in vapour from electronic cigarettes. *Tob Control*. 2014;23(2):133-139.
78. McRobbie H, Phillips A, Goniewicz ML, et al. Effects of Switching to Electronic Cigarettes with and without Concurrent Smoking on Exposure to Nicotine, Carbon Monoxide, and Acrolein. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2015;8(9):873-878.
79. London RCoPo. Nicotine without smoke tobacco harm reduction. Royal College of Physicians of London; 2016.
80. Armitage A, Turner D. Absorption of nicotine in cigarette and cigar smoke through the oral mucosa. *Nature*. 1970;226(5252):1231.
81. Bullen C, McRobbie H, Thornley S, Glover M, Lin R, Laugesen M. Effect of an electronic nicotine delivery device (e cigarette) on desire to smoke and withdrawal, user preferences and nicotine delivery: randomised cross-over trial. *Tob Control*. 2010;19(2):98-103.

82. Digard H, Proctor C, Kulasekaran A, Malmqvist U, Richter A. Determination of nicotine absorption from multiple tobacco products and nicotine gum. *Nicotine & Tobacco Research*. 2012;15(1):255-261.
83. Vansickel AR, Cobb CO, Weaver MF, Eissenberg TE. A clinical laboratory model for evaluating the acute effects of electronic "cigarettes": nicotine delivery profile and cardiovascular and subjective effects. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2010;19(8):1945-1953.
84. Fearon IM, Eldridge A, Gale N, et al. E-cigarette Nicotine Delivery: Data and Learnings from Pharmacokinetic Studies. *Am J Health Behav*. 2017;41(1):16-32.
85. Farsalinos KE, Spyrou A, Tsimopoulou K, Stefopoulos C, Romagna G, Voudris V. Nicotine absorption from electronic cigarette use: comparison between first and new-generation devices. *Sci Rep*. 2014;4:4133.
86. D'Ruiz CD, Graff DW, Yan XS. Nicotine delivery, tolerability and reduction of smoking urge in smokers following short-term use of one brand of electronic cigarettes. *BMC Public Health*. 2015;15:991.
87. Dawkins L, Corcoran O. Acute electronic cigarette use: nicotine delivery and subjective effects in regular users. *Psychopharmacology (Berl)*. 2014;231(2):401-407.
88. Hajek P, Przulj D, Phillips A, Anderson R, McRobbie H. Nicotine delivery to users from cigarettes and from different types of e-cigarettes. *Psychopharmacology (Berl)*. 2017;234(5):773-779.
89. Dawkins LE, Kimber CF, Doig M, Feyerabend C, Corcoran O. Self-titration by experienced e-cigarette users: blood nicotine delivery and subjective effects. *Psychopharmacology (Berl)*. 2016;233(15-16):2933-2941.
90. Puustinen P, Olkkonen H, Kolonen S, Tuomisto J. Microcomputer-aided measurement of puff parameters during smoking of low-and medium-tar cigarettes. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*. 1987;47(7):655-660.
91. Breland AB, Buchhalter AR, Evans SE, Eissenberg T. Evaluating acute effects of potential reduced-exposure products for smokers: clinical laboratory methodology. *Nicotine & Tobacco Research*. 2002;4(Suppl_2):S131-S140.

92. Talih S, Balhas Z, Eissenberg T, et al. Effects of user puff topography, device voltage, and liquid nicotine concentration on electronic cigarette nicotine yield: measurements and model predictions. *Nicotine Tob Res.* 2015;17(2):150-157.
93. Hua M, Yip H, Talbot P. Mining data on usage of electronic nicotine delivery systems (ENDS) from YouTube videos. *Tob Control.* 2013;22(2):103-106.
94. Farsalinos KE, Romagna G, Tsiapras D, Kyrzopoulos S, Voudris V. Evaluation of electronic cigarette use (vaping) topography and estimation of liquid consumption: implications for research protocol standards definition and for public health authorities' regulation. *Int J Environ Res Public Health.* 2013;10(6):2500-2514.
95. Jacob SE, Scheman A, McGowan MA. Propylene glycol. *Dermatitis.* 2018;29(1):3-5.
96. Wieslander G, Norbäck D, Lindgren T. Experimental exposure to propylene glycol mist in aviation emergency training: acute ocular and respiratory effects. *Occupational and Environmental Medicine.* 2001;58(10):649-655.
97. McCauley L, Markin C, Hosmer D. An unexpected consequence of electronic cigarette use. *Chest.* 2012;141(4):1110.
98. Boulay M-È, Henry C, Bossé Y, Boulet L-P, Morissette MC. Acute effects of nicotine-free and flavour-free electronic cigarette use on lung functions in healthy and asthmatic individuals. *Respiratory research.* 2017;18(1):33.
99. Yan XS, D'Ruiz C. Effects of using electronic cigarettes on nicotine delivery and cardiovascular function in comparison with regular cigarettes. *Regulatory Toxicology and Pharmacology.* 2015;71(1):24-34.
100. Kosmider L, Sobczak A, Fik M, et al. Carbonyl compounds in electronic cigarette vapors: effects of nicotine solvent and battery output voltage. *Nicotine Tob Res.* 2014;16(10):1319-1326.
101. Zhang Y, Sumner W, Chen DR. In vitro particle size distributions in electronic and conventional cigarette aerosols suggest comparable deposition patterns. *Nicotine Tob Res.* 2013;15(2):501-508.
102. Palazzolo DL. Electronic cigarettes and vaping: a new challenge in clinical medicine and public health. A literature review. *Front Public Health.* 2013;1:56.
103. Rom O, Pecorelli A, Valacchi G, Reznick AZ. Are E-cigarettes a safe and good alternative to cigarette smoking? *Ann N Y Acad Sci.* 2015;1340:65-74.

104. Vardavas CI, Anagnostopoulos N, Kougias M, Evangelopoulou V, Connolly GN, Behrakis PK. Short-term pulmonary effects of using an electronic cigarette: impact on respiratory flow resistance, impedance, and exhaled nitric oxide. *Chest*. 2012;141(6):1400-1406.
105. Schober W, Szendrei K, Matzen W, et al. Use of electronic cigarettes (e-cigarettes) impairs indoor air quality and increases FeNO levels of e-cigarette consumers. *Int J Hyg Environ Health*. 2014;217(6):628-637.
106. Farsalinos KE, Gillman G. Carbonyl Emissions in E-cigarette Aerosol: A Systematic Review and Methodological Considerations. *Front Physiol*. 2017;8:1119.
107. Jensen RP, Luo W, Pankow JF, Strongin RM, Peyton DH. Hidden formaldehyde in e-cigarette aerosols. *N Engl J Med*. 2015;372(4):392-394.
108. Talih S, Balhas Z, Salman R, Karaoghlanian N, Shihadeh A. "Direct Dripping": A High-Temperature, High-Formaldehyde Emission Electronic Cigarette Use Method. *Nicotine Tob Res*. 2016;18(4):453-459.
109. Sosnowski TR, Odziomek M. Particle Size Dynamics: Toward a Better Understanding of Electronic Cigarette Aerosol Interactions With the Respiratory System. *Front Physiol*. 2018;9:853.
110. Balásházy I, Hofmann W, Heistracher T. Local particle deposition patterns may play a key role in the development of lung cancer. *Journal of Applied Physiology*. 2003;94(5):1719-1725.
111. Kaisar MA, Prasad S, Liles T, Cucullo L. A decade of e-cigarettes: limited research & unresolved safety concerns. *Toxicology*. 2016;365:67-75.
112. Lodrup Carlsen KC, Skjerven HO, Carlsen KH. The toxicity of E-cigarettes and children's respiratory health. *Paediatr Respir Rev*. 2018;28:63-67.
113. Manigrasso M, Buonanno G, Fuoco FC, Stabile L, Avino P. Aerosol deposition doses in the human respiratory tree of electronic cigarette smokers. *Environ Pollut*. 2015;196:257-267.
114. Pichelstorfer L, Hofmann W, Winkler-Heil R, Yurteri CU, McAughey J. Simulation of aerosol dynamics and deposition of combustible and electronic cigarette aerosols in the human respiratory tract. *Journal of Aerosol Science*. 2016;99:125-132.

115. Sosnowski TR, Kramek-Romanowska K. Predicted Deposition of E-Cigarette Aerosol in the Human Lungs. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv.* 2016;29(3):299-309.
116. Heyder J. Deposition of inhaled particles in the human respiratory tract and consequences for regional targeting in respiratory drug delivery. *Proceedings of the American Thoracic Society.* 2004;1(4):315-320.
117. Robinson RJ, Yu C. Deposition of cigarette smoke particles in the human respiratory tract. *Aerosol Science & Technology.* 2001;34(2):202-215.
118. Scungio M, Stabile L, Buonanno G. Measurements of electronic cigarette-generated particles for the evaluation of lung cancer risk of active and passive users. *Journal of Aerosol Science.* 2018;115:1-11.
119. Behar RZ, Hua M, Talbot P. Puffing topography and nicotine intake of electronic cigarette users. *PLoS One.* 2015;10(2):e0117222.
120. Asgharian B, Price OT, Rostami AA, Pithawalla YB. Deposition of inhaled electronic cigarette aerosol in the human oral cavity. *Journal of Aerosol Science.* 2018;116:34-47.
121. Trtchounian A, Williams M, Talbot P. Conventional and electronic cigarettes (e-cigarettes) have different smoking characteristics. *Nicotine Tob Res.* 2010;12(9):905-912.
122. Ehtezazi T, Horsfield MA, Barry PW, O'callaghan C. Dynamic change of the upper airway during inhalation via aerosol delivery devices. *Journal of aerosol medicine.* 2004;17(4):325-334.
123. Robinson R, Hensel E, Morabito P, Roundtree K. Electronic cigarette topography in the natural environment. *PloS one.* 2015;10(6):e0129296.
124. Ingebrethsen BJ, Cole SK, Alderman SL. Electronic cigarette aerosol particle size distribution measurements. *Inhal Toxicol.* 2012;24(14):976-984.
125. Pellegrino RM, Tinghino B, Mangiaracina G, et al. Electronic cigarettes: an evaluation of exposure to chemicals and fine particulate matter (PM). *Ann Ig.* 2012;24(4):279-288.
126. Fuoco FC, Buonanno G, Stabile L, Vigo P. Influential parameters on particle concentration and size distribution in the mainstream of e-cigarettes. *Environ Pollut.* 2014;184:523-529.

127. Glasser AM, Collins L, Pearson JL, et al. Overview of Electronic Nicotine Delivery Systems: A Systematic Review. *Am J Prev Med.* 2017;52(2):e33-e66.
128. Pirozynski M, Sosnowski TR. Inhalation devices: from basic science to practical use, innovative vs generic products. Expert opinion on drug delivery. 2016;13(11):1559-1571.
129. R Sosnowski T. Selected engineering and physicochemical aspects of systemic drug delivery by inhalation. *Current pharmaceutical design.* 2016;22(17):2453-2462.
130. Fearon IM, Eldridge AC, Gale N, McEwan M, Stiles MF, Round EK. Nicotine pharmacokinetics of electronic cigarettes: A review of the literature. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2018;100:25-34.
131. Bertholon JF, Becquemin MH, Annesi-Maesano I, Dautzenberg B. Electronic cigarettes: a short review. *Respiration.* 2013;86(5):433-438.
132. Saitta D, Ferro GA, Polosa R. Achieving appropriate regulations for electronic cigarettes. *Ther Adv Chronic Dis.* 2014;5(2):50-61.
133. Centers for Disease C, Prevention. Notes from the field: electronic cigarette use among middle and high school students - United States, 2011-2012. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2013;62(35):729-730.
134. Bunnell RE, Agaku IT, Arrazola RA, et al. Intentions to smoke cigarettes among never-smoking US middle and high school electronic cigarette users: National Youth Tobacco Survey, 2011-2013. *Nicotine Tob Res.* 2015;17(2):228-235.
135. Dutra LM, Glantz SA. Electronic cigarettes and conventional cigarette use among U.S. adolescents: a cross-sectional study. *JAMA Pediatr.* 2014;168(7):610-617.
136. Eggers ME, Lee YO, Jackson K, Wiley JL, Porter L, Nonnemaker JM. Youth use of electronic vapor products and blunts for administering cannabis. *Addict Behav.* 2017;70:79-82.
137. Cho JH, Shin E, Moon SS. Electronic-cigarette smoking experience among adolescents. *J Adolesc Health.* 2011;49(5):542-546.
138. Sutfin EL, McCoy TP, Morrell HE, Hoepfner BB, Wolfson M. Electronic cigarette use by college students. *Drug Alcohol Depend.* 2013;131(3):214-221.

139. Besaratinia A, Tommasi S. An opportune and unique research to evaluate the public health impact of electronic cigarettes. *Cancer Causes Control*. 2017;28(10):1167-1171.
140. Pokhrel P, Fagan P, Little MA, Kawamoto CT, Herzog TA. Smokers who try e-cigarettes to quit smoking: findings from a multiethnic study in Hawaii. *Am J Public Health*. 2013;103(9):e57-62.
141. Suter MA, Mastrobattista J, Sachs M, Aagaard K. Is there evidence for potential harm of electronic cigarette use in pregnancy? *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2015;103(3):186-195.
142. Meo SA, Al Asiri SA. Effects of electronic cigarette smoking on human health. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2014;18(21):3315-3319.
143. Foulds J, Veldheer S, Berg A. Electronic cigarettes (e-cigs): views of aficionados and clinical/public health perspectives. *Int J Clin Pract*. 2011;65(10):1037-1042.
144. Noel JK, Rees VW, Connolly GN. Electronic cigarettes: a new 'tobacco' industry? *Tob Control*. 2011;20(1):81.
145. Benowitz NL, Goniewicz ML. The regulatory challenge of electronic cigarettes. *JAMA*. 2013;310(7):685-686.
146. Britton J. Electronic cigarettes. *Thorax*. 2013;68(10):904-905.
147. Hajek P. Electronic cigarettes for smoking cessation. *Lancet*. 2013;382(9905):1614-1616.
148. Ordonez JE, Kleinschmidt KC, Forrester MB. Electronic cigarette exposures reported to Texas poison centers. *Nicotine Tob Res*. 2015;17(2):209-211.
149. Vakali S, Tsikrika S, Gennimata SA, et al. E-Cigarette acute effect on symptoms and airway inflammation: comparison of nicotine with a non-nicotine cigarette. Paper presented at: Tobacco induced diseases 2014.
150. Farsalinos KE, Tsiapras D, Kyrzopoulos S, Savvopoulou M, Voudris V. Acute effects of using an electronic nicotine-delivery device (electronic cigarette) on myocardial function: comparison with the effects of regular cigarettes. *BMC Cardiovasc Disord*. 2014;14:78.
151. Farsalinos KE, Romagna G. Chronic idiopathic neutrophilia in a smoker, relieved after smoking cessation with the use of electronic cigarette: a case report. *Clin Med Insights Case Rep*. 2013;6:15-21.

152. Flouris AD, Poulianiti KP, Chorti MS, et al. Acute effects of electronic and tobacco cigarette smoking on complete blood count. *Food Chem Toxicol.* 2012;50(10):3600-3603.
153. Marini S, Buonanno G, Stabile L, Ficco G. Short-term effects of electronic and tobacco cigarettes on exhaled nitric oxide. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2014;278(1):9-15.
154. Gennimata S-A, Palamidas A, Kaltsakas G, et al. Acute effect of e-cigarette on pulmonary function in healthy subjects and smokers. *Eur Respiratory Soc*; 2012.
155. Palamidas A, Gennimata SA, Kaltsakas G, et al. Acute effect of an e-cigarette with and without nicotine on lung function. Paper presented at: Tobacco induced diseases 2014.
156. Hadwiger ME, Trehy ML, Ye W, Moore T, Allgire J, Westenberger B. Identification of amino-tadalafil and rimonabant in electronic cigarette products using high pressure liquid chromatography with diode array and tandem mass spectrometric detection. *J Chromatogr A.* 2010;1217(48):7547-7555.
157. Cheng T. Chemical evaluation of electronic cigarettes. *Tob Control.* 2014;23 Suppl 2:ii11-17.
158. 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.
159. Schripp T, Markewitz D, Uhde E, Salthammer T. Does e-cigarette consumption cause passive vaping? *Indoor Air.* 2013;23(1):25-31.
160. Czogala J, Goniewicz ML, Fidelus B, Zielinska-Danch W, Travers MJ, Sobczak A. Secondhand exposure to vapors from electronic cigarettes. *Nicotine Tob Res.* 2014;16(6):655-662.
161. Ballbe M, Martinez-Sanchez JM, Sureda X, et al. Cigarettes vs. e-cigarettes: Passive exposure at home measured by means of airborne marker and biomarkers. *Environ Res.* 2014;135:76-80.
162. McAuley TR, Hopke PK, Zhao J, Babaian S. Comparison of the effects of e-cigarette vapor and cigarette smoke on indoor air quality. *Inhal Toxicol.* 2012;24(12):850-857.
163. Goniewicz ML, Lee L. Electronic cigarettes are a source of thirdhand exposure to nicotine. *Nicotine Tob Res.* 2015;17(2):256-258.

164. Jha P, Ramasundarahettige C, Landsman V, et al. 21st-century hazards of smoking and benefits of cessation in the United States. *New England Journal of Medicine*. 2013;368(4):341-350.
165. Health UDo, Services H. The health consequences of smoking—50 years of progress: a report of the Surgeon General. Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, Office on Smoking and Health. 2014;17.
166. Cooke A, Fergeson J, Bulkhi A, Casale TB. The Electronic Cigarette: The Good, the Bad, and the Ugly. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2015;3(4):498-505.
167. Eissenberg T. Electronic nicotine delivery devices: ineffective nicotine delivery and craving suppression after acute administration. *Tobacco control*. 2010;19(1):87-88.
168. Vansickel AR, Eissenberg T. Electronic cigarettes: effective nicotine delivery after acute administration. *Nicotine Tob Res*. 2013;15(1):267-270.
169. Dawkins L, Turner J, Hasna S, Soar K. The electronic-cigarette: effects on desire to smoke, withdrawal symptoms and cognition. *Addict Behav*. 2012;37(8):970-973.
170. Polosa R, Caponnetto P, Morjaria JB, Papale G, Campagna D, Russo C. Effect of an electronic nicotine delivery device (e-Cigarette) on smoking reduction and cessation: a prospective 6-month pilot study. *BMC Public Health*. 2011;11:786.
171. Farsalinos KE, Romagna G, Tsiapras D, Kyrzopoulos S, Voudris V. Characteristics, perceived side effects and benefits of electronic cigarette use: a worldwide survey of more than 19,000 consumers. *Int J Environ Res Public Health*. 2014;11(4):4356-4373.
172. Biener L, Hargraves JL. A longitudinal study of electronic cigarette use among a population-based sample of adult smokers: association with smoking cessation and motivation to quit. *Nicotine Tob Res*. 2015;17(2):127-133.
173. Borderud SP, Li Y, Burkhalter JE, Sheffer CE, Ostroff JS. Electronic cigarette use among patients with cancer: characteristics of electronic cigarette users and their smoking cessation outcomes. *Cancer*. 2014;120(22):3527-3535.
174. Lee S, Grana RA, Glantz SA. Electronic cigarette use among Korean adolescents: a cross-sectional study of market penetration, dual use, and

- relationship to quit attempts and former smoking. *J Adolesc Health*. 2014;54(6):684-690.
175. Cantrell FL. Adverse effects of e-cigarette exposures. *J Community Health*. 2014;39(3):614-616.
176. Callahan-Lyon P. Electronic cigarettes: human health effects. *Tob Control*. 2014;23 Suppl 2:ii36-40.
177. Cordoba Garcia R. [The challenge of electronic cigarettes]. *Aten Primaria*. 2014;46(6):307-312.
178. Cervellati F, Muresan XM, Sticozzi C, et al. Comparative effects between electronic and cigarette smoke in human keratinocytes and epithelial lung cells. *Toxicol In Vitro*. 2014;28(5):999-1005.
179. Park SJ, Walser TC, Perdomo C, et al. Abstract B16: The effect of e-cigarette exposure on airway epithelial cell gene expression and transformation. *Clinical Cancer Research*. 2014;20(2 Supplement):B16-B16.
180. Lim HB, Kim SH. Inhalation of e-Cigarette Cartridge Solution Aggravates Allergen-induced Airway Inflammation and Hyper-responsiveness in Mice. *Toxicol Res*. 2014;30(1):13-18.
181. Thota D, Latham E. Case report of electronic cigarettes possibly associated with eosinophilic pneumonitis in a previously healthy active-duty sailor. *J Emerg Med*. 2014;47(1):15-17.
182. Hureaux J, Drouet M, Urban T. A case report of subacute bronchial toxicity induced by an electronic cigarette. *Thorax*. 2014;69(6):596-597.
183. Lerner CA, Sundar IK, Yao H, et al. Vapors produced by electronic cigarettes and e-juices with flavorings induce toxicity, oxidative stress, and inflammatory response in lung epithelial cells and in mouse lung. *PLoS One*. 2015;10(2):e0116732.
184. Scheffler S, Dieken H, Krischenowski O, Forster 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;12(4):3915-3925.
185. Misra M, Leverette RD, Cooper BT, Bennett MB, Brown SE. Comparative in vitro toxicity profile of electronic and tobacco cigarettes, smokeless tobacco and

- nicotine replacement therapy products: e-liquids, extracts and collected aerosols. *Int J Environ Res Public Health*. 2014;11(11):11325-11347.
186. Romagna G, Alliffranchini E, Bocchietto E, Todeschi S, Esposito M, Farsalinos KE. Cytotoxicity evaluation of electronic cigarette vapor extract on cultured mammalian fibroblasts (ClearStream-LIFE): comparison with tobacco cigarette smoke extract. *Inhal Toxicol*. 2013;25(6):354-361.
187. Kharitonov SA, Robbins RA, Yates D, Keatings V, Barnes PJ. Acute and chronic effects of cigarette smoking on exhaled nitric oxide. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1995;152(2):609-612.
188. Monroy A, Hommel E, Smith ST, Raji M. Paroxysmal atrial fibrillation following electronic cigarette use in an elderly woman. *Clin Geriatr*. 2012;20(3):28-32.
189. Willis D, Popovech M, Gany F, Zelikoff J. Toxicology of smokeless tobacco: Implications for immune, reproductive, and cardiovascular systems. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*. 2012;15(5):317-331.
190. Farsalinos KE, Romagna G, Alliffranchini E, et al. Comparison of the cytotoxic potential of cigarette smoke and electronic cigarette vapour extract on cultured myocardial cells. *Int J Environ Res Public Health*. 2013;10(10):5146-5162.
191. Palpant NJ, Hofsteen P, Pabon L, Reinecke H, Murry CE. Cardiac development in zebrafish and human embryonic stem cells is inhibited by exposure to tobacco cigarettes and e-cigarettes. *PLoS One*. 2015;10(5):e0126259.
192. Yan XS, D'Ruiz C. Effects of using electronic cigarettes on nicotine delivery and cardiovascular function in comparison with regular cigarettes. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2015;71(1):24-34.
193. Szołtysek-Bołdys I, Sobczak A, Zielińska-Danch W, Bartoń A, Koszowski B, Kośmider L. Influence of inhaled nicotine source on arterial stiffness. *Przegląd lekarski*. 2014;71(11):572-575.
194. Giebelen IA, Leendertse M, Florquin S, van der Poll T. Stimulation of acetylcholine receptors impairs host defence during pneumococcal pneumonia. *European Respiratory Journal*. 2009;33(2):375-381.
195. Matsunaga K, Klein TW, Friedman H, Yamamoto Y. Involvement of nicotinic acetylcholine receptors in suppression of antimicrobial activity and cytokine

- responses of alveolar macrophages to *Legionella pneumophila* infection by nicotine. *The Journal of Immunology*. 2001;167(11):6518-6524.
196. Wongtrakool C, Grooms K, Ping X-D, et al. In utero nicotine exposure promotes M2 activation in neonatal mouse alveolar macrophages. *Pediatric research*. 2012;72(2):147.
 197. Slotkin TA. If nicotine is a developmental neurotoxicant in animal studies, dare we recommend nicotine replacement therapy in pregnant women and adolescents? *Neurotoxicology and teratology*. 2008;30(1):1-19.
 198. Mahapatra SK, Bhattacharjee S, Chakraborty SP, Majumdar S, Roy S. Alteration of immune functions and Th1/Th2 cytokine balance in nicotine-induced murine macrophages: immunomodulatory role of eugenol and N-acetylcysteine. *International Immunopharmacology*. 2011;11(4):485-495.
 199. Sussan TE, Gajghate S, Thimmulappa RK, et al. Exposure to electronic cigarettes impairs pulmonary anti-bacterial and anti-viral defenses in a mouse model. *PLoS One*. 2015;10(2):e0116861.
 200. Schweitzer KS, Chen SX, Law S, et al. Endothelial disruptive proinflammatory effects of nicotine and e-cigarette vapor exposures. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2015;309(2):L175-187.
 201. Cirillo S, Vivarelli F, Turrini E, et al. The Customizable E-cigarette Resistance Influences Toxicological Outcomes: Lung Degeneration, Inflammation, and Oxidative Stress-Induced in a Rat Model. *Toxicological Sciences*. 2019;172(1):132-145.
 202. Fairchild AL, Bayer R, Colgrove J. The renormalization of smoking? E-cigarettes and the tobacco "endgame". *N Engl J Med*. 2014;370(4):293-295.
 203. Bam TS, Bellew W, Berezhnova I, et al. Position statement on electronic cigarettes or electronic nicotine delivery systems. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2014;18(1):5-7.
 204. Watkins SS, Koob GF, Markou A. Neural mechanisms underlying nicotine addiction: acute positive reinforcement and withdrawal. *Nicotine & Tobacco Research*. 2000;2(1):19-37.
 205. Laviollette SR, Van Der Kooy D. The neurobiology of nicotine addiction: bridging the gap from molecules to behaviour. *Nature reviews neuroscience*. 2004;5(1):55.

206. Dwyer JB, McQuown SC, Leslie FM. The dynamic effects of nicotine on the developing brain. *Pharmacology & therapeutics*. 2009;122(2):125-139.
207. Zhang ZH, Zhu HB, Li LL, Yu Y, Zhang HG, Liu RZ. Decline of semen quality and increase of leukocytes with cigarette smoking in infertile men. *Iranian journal of reproductive medicine*. 2013;11(7):589.
208. Yu B, Qi Y, Liu D, et al. Cigarette smoking is associated with abnormal histone-to-protamine transition in human sperm. *Fertility and sterility*. 2014;101(1):51-57. e51.
209. Li W-W, Li N, Wu Q-Y, et al. Cigarette smoking affects sperm plasma membrane integrity. *Zhonghua nan ke xue= National journal of andrology*. 2012;18(12):1093-1096.
210. England LJ, Bunnell RE, Pechacek TF, Tong VT, McAfee TA. Nicotine and the Developing Human: A Neglected Element in the Electronic Cigarette Debate. *Am J Prev Med*. 2015;49(2):286-293.
211. Pauly JR, Slotkin TA. Maternal tobacco smoking, nicotine replacement and neurobehavioural development. *Acta Paediatrica*. 2008;97(10):1331-1337.
212. Yuan M, Cross SJ, Loughlin SE, Leslie FM. Nicotine and the adolescent brain. *The Journal of physiology*. 2015;593(16):3397-3412.
213. Bruin JE, Gerstein HC, Holloway AC. Long-term consequences of fetal and neonatal nicotine exposure: a critical review. *Toxicological sciences*. 2010;116(2):364-374.
214. Uchiyama S, Ohta K, Inaba Y, Kunugita N. Determination of carbonyl compounds generated from the E-cigarette using coupled silica cartridges impregnated with hydroquinone and 2,4-dinitrophenylhydrazine, followed by high-performance liquid chromatography. *Anal Sci*. 2013;29(12):1219-1222.
215. Durmowicz EL. The impact of electronic cigarettes on the paediatric population. *Tob Control*. 2014;23 Suppl 2:ii41-46.
216. Camus M, Gallois C, Marteau P. Ulcerative colitis and electronic cigarette: what's the matter? *Am J Gastroenterol*. 2014;109(4):608-609.
217. Vannier S, Ronziere T, Ferre J, Lassalle V, Verin M. Reversible cerebral vasoconstriction syndrome triggered by an electronic cigarette: case report. *European journal of neurology*. 2015;22(5):e64-e65.

218. van Staden SR, Groenewald M, Engelbrecht R, Becker PJ, Hazelhurst LT. Carboxyhaemoglobin levels, health and lifestyle perceptions in smokers converting from tobacco cigarettes to electronic cigarettes. *S Afr Med J*. 2013;103(11):865-868.
219. Rubin BK. Physiology of airway mucus clearance. *Respiratory care*. 2002;47(7):761-768.
220. Tarran R. Regulation of airway surface liquid volume and mucus transport by active ion transport. *Proceedings of the American Thoracic Society*. 2004;1(1):42-46.
221. Roomans GM, Kozlova I, Nilsson H, Vanthanouvong V, Button B, Tarran R. Measurements of airway surface liquid height and mucus transport by fluorescence microscopy, and of ion composition by X-ray microanalysis. *Journal of Cystic Fibrosis*. 2004;3:135-139.
222. Webster MJ, Tarran R. Slippery When Wet: Airway Surface Liquid Homeostasis and Mucus Hydration. *Current topics in membranes*. 2018;81:293-335.
223. LTai T, Ma H-P, Eaton DC. Epithelial Sodium Channels (ENaCs). In: Devor KLHDC, ed. *Ion Channels and Transporters of Epithelia in Health and Disease*. New York, NY: Springer New York; 2016:569-641.
224. Hanukoglu I, Hanukoglu A. Epithelial sodium channel (ENaC) family: phylogeny, structure–function, tissue distribution, and associated inherited diseases. *Gene*. 2016;579(2):95-132.
225. Moore PJ, Tarran R. The epithelial sodium channel (ENaC) as a therapeutic target for cystic fibrosis lung disease. *Expert opinion on therapeutic targets*. 2018;22(8):687-701.
226. Kashlan OB, Sheng S, Kleyman TR. On the interaction between amiloride and its putative α -subunit epithelial Na⁺ channel binding site. *Journal of Biological Chemistry*. 2005;280(28):26206-26215.
227. Shah S, Anjum S, Littler W. Use of diuretics in cardiovascular diseases:(1) heart failure. *Postgraduate medical journal*. 2004;80(942):201-205.
228. Sapio L, Gallo M, Illiano M, et al. The natural cAMP elevating compound forskolin in cancer therapy: is it time? *Journal of cellular physiology*. 2017;232(5):922-927.

229. Namkung W, Finkbeiner WE, Verkman AS. CFTR-adenylyl cyclase I association responsible for UTP activation of CFTR in well-differentiated primary human bronchial cell cultures. *Molecular biology of the cell*. 2010;21(15):2639-2648.
230. Hartzell C, Putzier I, Arreola J. Calcium-activated chloride channels. *Annu. Rev. Physiol*. 2005;67:719-758.
231. Meng X, Clews J, Kargas V, Wang X, Ford RC. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) and its stability. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2017;74(1):23-38.
232. Zhang Z, Chen J. Atomic structure of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Cell*. 2016;167(6):1586-1597. e1589.
233. Kelly M, Trudel S, Brouillard F, et al. Cystic fibrosis transmembrane regulator inhibitors CFTRinh-172 and GlyH-101 target mitochondrial functions, independently of chloride channel inhibition. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2010;333(1):60-69.
234. Worthington EN, Tarran R. Methods for ASL measurements and mucus transport rates in cell cultures. *Cystic Fibrosis: Springer*; 2011:77-92.
235. Caputo A, Caci E, Ferrera L, et al. TMEM16A, a membrane protein associated with calcium-dependent chloride channel activity. *Science*. 2008;322(5901):590-594.
236. Rock JR, O'Neal WK, Gabriel SE, et al. Transmembrane protein 16A (TMEM16A) is a Ca²⁺-regulated Cl⁻ secretory channel in mouse airways. *Journal of Biological Chemistry*. 2009;284(22):14875-14880.
237. Mall M, Gonska T, Thomas J, et al. Modulation of Ca²⁺-activated Cl⁻ secretion by basolateral K⁺ channels in human normal and cystic fibrosis airway epithelia. *Pediatric research*. 2003;53(4):608.
238. Bernard K, Bogliolo S, Soriani O, Ehrenfeld J. Modulation of calcium-dependent chloride secretion by basolateral SK4-like channels in a human bronchial cell line. *The Journal of membrane biology*. 2003;196(1):15-31.
239. Davis CW, Lazarowski E. Coupling of airway ciliary activity and mucin secretion to mechanical stresses by purinergic signaling. *Respiratory physiology & neurobiology*. 2008;163(1-3):208-213.

240. Manzanares D, Gonzalez C, Ivonnet P, et al. Functional apical large conductance, Ca²⁺-activated, and voltage-dependent K⁺ channels are required for maintenance of airway surface liquid volume. *Journal of Biological Chemistry*. 2011;286(22):19830-19839.
241. Rayner RE, Makena P, Prasad GL, Cormet-Boyaka E. Cigarette and ENDS preparations differentially regulate ion channels and mucociliary clearance in primary normal human bronchial 3D cultures. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2019;317(2):L295-L302.
242. Rab A, Rowe SM, Raju SV, Bebok Z, Matalon S, Collawn JF. Cigarette smoke and CFTR: implications in the pathogenesis of COPD. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2013;305(8):L530-L541.
243. Xu RX, Zhao Y, Gao S, et al. Functional characterization of a plastidal cation-dependent O-methyltransferase from the liverwort *Plagiochasma appendiculatum*. *Phytochemistry*. 2015;118:33-41.
244. Clunes LA, Davies CM, Coakley RD, et al. Cigarette smoke exposure induces CFTR internalization and insolubility, leading to airway surface liquid dehydration. *The FASEB Journal*. 2012;26(2):533-545.
245. Rasmussen JE, Sheridan JT, Polk W, Davies CM, Tarran R. Cigarette smoke-induced Ca²⁺ release leads to cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) dysfunction. *Journal of Biological Chemistry*. 2014;289(11):7671-7681.
246. Chung S, Baumlin N, Dennis JS, et al. Electronic Cigarette Vapor with Nicotine Causes Airway Mucociliary Dysfunction Preferentially via TRPA1 Receptors. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2019(ja).
247. Garcia-Arcos I, Geraghty P, Baumlin N, et al. Chronic electronic cigarette exposure in mice induces features of COPD in a nicotine-dependent manner. *Thorax*. 2016;71(12):1119-1129.
248. Omaiye EE, McWhirter KJ, Luo W, Pankow JF, Talbot P. High-Nicotine Electronic Cigarette Products: Toxicity of JUUL Fluids and Aerosols Correlates Strongly with Nicotine and Some Flavor Chemical Concentrations. *Chemical research in toxicology*. 2019;32(6):1058-1069.

249. Maus AD, Pereira EF, Karachunski PI, et al. Human and rodent bronchial epithelial cells express functional nicotinic acetylcholine receptors. *Molecular pharmacology*. 1998;54(5):779-788.
250. Maouche K, Medjber K, Zahm J-M, et al. Contribution of $\alpha 7$ nicotinic receptor to airway epithelium dysfunction under nicotine exposure. *Proceedings of the national academy of sciences*. 2013;110(10):4099-4104.
251. Yaucher NE, Fish JT, Smith HW, Wells JA. Propylene glycol-associated renal toxicity from lorazepam infusion. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*. 2003;23(9):1094-1099.
252. Blake DA, Whitehart DR, Yu H, Vogel T, Roberts DD. Common cryopreservation media deplete corneal endothelial cell plasma membrane Na⁺, K⁺ ATPase activity. *Current eye research*. 1996;15(3):263-271.
253. Dalton P, Soreth B, Maute C, Novaleski C, Banton M. Lack of respiratory and ocular effects following acute propylene glycol exposure in healthy humans. *Inhalation toxicology*. 2018;30(3):124-132.
254. Niedermirtl F, Eberhardt M, Namer B, et al. Etomidate and propylene glycol activate nociceptive TRP ion channels. *Molecular pain*. 2018;14:1744806918811699.
255. Reidel B, Radicioni G, Clapp PW, 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;197(4):492-501.
256. Verkman A. Aquaporins in clinical medicine. *Annual review of medicine*. 2012;63:303-316.
257. Pocivavsek L, Gavrilov K, Cao KD, et al. Glycerol-induced membrane stiffening: the role of viscous fluid adlayers. *Biophysical journal*. 2011;101(1):118-127.
258. Sassano MF, Davis ES, Keating JE, et al. Evaluation of e-liquid toxicity using an open-source high-throughput screening assay. *PLoS biology*. 2018;16(3):e2003904.
259. Rowell TR, Reeber SL, Lee SL, et al. Flavored e-cigarette liquids reduce proliferation and viability in the CALU3 airway epithelial cell line. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2017;313(1):L52-L66.

260. Bahl V, Lin S, Xu N, Davis B, Wang YH, Talbot P. Comparison of electronic cigarette refill fluid cytotoxicity using embryonic and adult models. *Reprod Toxicol.* 2012;34(4):529-537.
261. Behar R, Davis B, Wang Y, Bahl V, Lin S, Talbot P. Identification of toxicants in cinnamon-flavored electronic cigarette refill fluids. *Toxicology in vitro.* 2014;28(2):198-208.
262. Albuquerque EX, Pereira EF, Alkondon M, Rogers SW. Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. *Physiological reviews.* 2009;89(1):73-120.
263. Clarke P, Reuben M. Release of [3H]-noradrenaline from rat hippocampal synaptosomes by nicotine: mediation by different nicotinic receptor subtypes from striatal [3H]-dopamine release. *British journal of pharmacology.* 1996;117(4):595-606.
264. Schweitzer KS, Chen SX, Law S, et al. Endothelial disruptive proinflammatory effects of nicotine and e-cigarette vapor exposures. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology.* 2015;309(2):L175-L187.
265. Garcia R, Allem JP, Baezconde-Garbanati L, Unger JB, Sussman S. Employee and customer handling of nicotine-containing e-liquids in vape shops. *Tob Prev Cessat.* 2016;2(Suppl).
266. Lam DC-I, Girard L, Ramirez R, et al. Expression of nicotinic acetylcholine receptor subunit genes in non-small-cell lung cancer reveals differences between smokers and nonsmokers. *Cancer research.* 2007;67(10):4638-4647.
267. West KA, Brognard J, Clark AS, et al. Rapid Akt activation by nicotine and a tobacco carcinogen modulates the phenotype of normal human airway epithelial cells. *The Journal of clinical investigation.* 2003;111(1):81-90.
268. Sherwood CL, Boitano S. Airway epithelial cell exposure to distinct e-cigarette liquid flavorings reveals toxicity thresholds and activation of CFTR by the chocolate flavoring 2,5-dimethylpyrazine. *Respir Res.* 2016;17(1):57.
269. Aug A, Altraja S, Kilk K, Porosk R, Soomets U, Altraja A. E-Cigarette Affects the Metabolome of Primary Normal Human Bronchial Epithelial Cells. *PLoS One.* 2015;10(11):e0142053.

270. Hwang JH, Lyes M, Sladewski K, et al. Electronic cigarette inhalation alters innate immunity and airway cytokines while increasing the virulence of colonizing bacteria. *J Mol Med (Berl)*. 2016;94(6):667-679.
271. Husari A, Shihadeh A, Talih S, Hashem Y, El Sabban M, Zaatari G. Acute Exposure to Electronic and Combustible Cigarette Aerosols: Effects in an Animal Model and in Human Alveolar Cells. *Nicotine Tob Res*. 2016;18(5):613-619.
272. Wu Q, Jiang D, Minor M, Chu HW. Electronic cigarette liquid increases inflammation and virus infection in primary human airway epithelial cells. *PLoS One*. 2014;9(9):e108342.
273. Davis ES, Sassano MF, Goodell H, Tarran R. E-liquid autofluorescence can be used as a marker of vaping deposition and third-hand vape exposure. *Scientific reports*. 2017;7(1):7459.
274. El-hellani A, Salman R, El-Hage R, et al. Nicotine and carbonyl emissions from popular electronic cigarette products: correlation to liquid composition and design characteristics. *Nicotine and Tobacco Research*. 2016;20(2):215-223.
275. Mikheev VB, Brinkman MC, Granville CA, Gordon SM, Clark PI. Real-Time Measurement of Electronic Cigarette Aerosol Size Distribution and Metals Content Analysis. *Nicotine Tob Res*. 2016;18(9):1895-1902.
276. Alderman SL, Song C, Moldoveanu SC, Cole SK. Particle size distribution of e-cigarette aerosols and the relationship to Cambridge filter pad collection efficiency. *Beiträge zur Tabakforschung/Contributions to Tobacco Research*. 2015;26(4):183-190.
277. Geiser M, Kreyling WG. Deposition and biokinetics of inhaled nanoparticles. *Particle and fibre toxicology*. 2010;7(1):2.
278. Roberts ME, Doogan NJ, Stanton CA, et al. Rural Versus Urban Use of Traditional and Emerging Tobacco Products in the United States, 2013-2014. *Am J Public Health*. 2017;107(10):1554-1559.
279. Matt GE, Quintana PJ, Zakarian JM, et al. When smokers quit: exposure to nicotine and carcinogens persists from thirdhand smoke pollution. *Tobacco control*. 2017;26(5):548-556.

280. Bekki K, Uchiyama S, Ohta K, Inaba Y, Nakagome H, Kunugita N. Carbonyl compounds generated from electronic cigarettes. *Int J Environ Res Public Health*. 2014;11(11):11192-11200.
281. Oncken CA, Litt MD, McLaughlin LD, Burki NA. Nicotine concentrations with electronic cigarette use: effects of sex and flavor. *Nicotine Tob Res*. 2015;17(4):473-478.
282. Spindle TR, Breland AB, Karaoghlanian NV, Shihadeh AL, Eissenberg T. Preliminary results of an examination of electronic cigarette user puff topography: the effect of a mouthpiece-based topography measurement device on plasma nicotine and subjective effects. *Nicotine Tob Res*. 2015;17(2):142-149.
283. Bullen C, Howe C, Laugesen M, et al. Electronic cigarettes for smoking cessation: a randomised controlled trial. *Lancet*. 2013;382(9905):1629-1637.
284. Polosa R, Morjaria J, Caponnetto P, et al. Effect of smoking abstinence and reduction in asthmatic smokers switching to electronic cigarettes: evidence for harm reversal. *Int J Environ Res Public Health*. 2014;11(5):4965-4977.
285. Tønnesen P, Pisinger C, Hvidberg S, et al. Effects of smoking cessation and reduction in asthmatics. *Nicotine & tobacco research*. 2005;7(1):139-148.
286. Chaudhuri R, Livingston E, McMahon AD, et al. Effects of smoking cessation on lung function and airway inflammation in smokers with asthma. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2006;174(2):127-133.
287. To T, Daly C, Feldman R, McLimont S. Results from a community-based program evaluating the effect of changing smoking status on asthma symptom control. *BMC Public Health*. 2012;12(1):293.
288. Kuschner WG, Reddy S, Mehrotra N, Paintal HS. Electronic cigarettes and thirdhand tobacco smoke: two emerging health care challenges for the primary care provider. *Int J Gen Med*. 2011;4:115-120.
289. Sugerman DT. E-cigarettes. *JAMA*. 2014;311(2):212-212.
290. Grana RA, Ling PM, Benowitz N, Glantz S. Electronic cigarettes. *Cardiology patient page. Circulation*. 2014;129(19):e490-492.
291. Famele M, Ferranti C, Abenavoli C, Palleschi L, Mancinelli R, Draisci R. The chemical components of electronic cigarette cartridges and refill fluids: review of analytical methods. *Nicotine Tob Res*. 2015;17(3):271-279.

292. Agaku IT, King BA, Husten CG, et al. Tobacco product use among adults-- United States, 2012-2013. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2014;63(25):542-547.
293. Schmidt L, Reidmohr A, Harwell TS, Helgerson SD. Prevalence and reasons for initiating use of electronic cigarettes among adults in Montana, 2013. *Prev Chronic Dis.* 2014;11:E204.
294. Vickerman KA, Carpenter KM, Altman T, Nash CM, Zbikowski SM. Use of electronic cigarettes among state tobacco cessation quitline callers. *Nicotine Tob Res.* 2013;15(10):1787-1791.
295. Pepper JK, Ribisl KM, Emery SL, Brewer NT. Reasons for starting and stopping electronic cigarette use. *Int J Environ Res Public Health.* 2014;11(10):10345-10361.
296. Kong G, Morean ME, Cavallo DA, Camenga DR, Krishnan-Sarin S. Reasons for Electronic Cigarette Experimentation and Discontinuation Among Adolescents and Young Adults. *Nicotine Tob Res.* 2015;17(7):847-854.
297. Huang J, Kornfield R, Szczypka G, Emery SL. A cross-sectional examination of marketing of electronic cigarettes on Twitter. *Tob Control.* 2014;23 Suppl 3:iii26-30.
298. Grana RA, Glantz SA, Ling PM. Electronic nicotine delivery systems in the hands of Hollywood. *Tobacco control.* 2011;20(6):425-426.
299. Grana RA, Ling PM. "Smoking revolution": a content analysis of electronic cigarette retail websites. *Am J Prev Med.* 2014;46(4):395-403.
300. Pepper JK, Emery SL, Ribisl KM, Southwell BG, Brewer NT. Effects of advertisements on smokers' interest in trying e-cigarettes: the roles of product comparison and visual cues. *Tob Control.* 2014;23 Suppl 3:iii31-36.
301. Coleman BN, Apelberg BJ, Ambrose BK, et al. Association between electronic cigarette use and openness to cigarette smoking among US young adults. *Nicotine Tob Res.* 2015;17(2):212-218.
302. Crowley R. Health Public Policy Committee of the American College of Physicians. Electronic nicotine delivery systems: executive summary of a policy position paper from the American College of Physicians. *Ann Intern Med.* 2015;162(8):583-584.

303. Series R. Electronic cigarettes—an overview. *Tob Prev Tob Control*. 2013;19:1-39.



ÖZGEÇMİŞ

1986 yılında İzmit'e doğdu. İlk ve orta öğretimimi Gaziantep'te tamamladıktan sonra, 2005 yılında başladığı Gaziantep Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden 2009 yılında Yüksek Şeref derecesiyle mezun oldu. Aynı yıl, Georgia State Üniversitesi'nde bu bölümde yüksek lisans eğitimime başladım. Yüksek lisans eğitimi sırasında, Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı'nda Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı kapsamında araştırma görevlisi olarak atandım. Aynı yıl Fizyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisansa başladım. Yüksek lisans eğitiminin sonunda, "Ramamisinin Maternal Agresyon Üzerine Etkisi" konulu yüksek lisans tezini tamamladım. Doktorasını "Sıçanlarda Akut ve Kronik Uygulanan Elajik Asidin Penisilin ile Oluşturulmuş Epileptiform Aktivite Üzerine Etkisi" konulu tez ile tamamladım. Evli ve iki çocuk babasıdır.