

Aus der Klinik für Gefäß- und Endovaskularchirurgie

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Hubert Schelzig

Einfluss von E-Zigaretten auf die Gefäßsteifigkeit im in-vitro-Modell

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von

Hsiang-han Liu

2026

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter/in: Prof. Dr. med. Markus Wagenhäuser

Zweitgutachter/in: Prof. Dr. med. Hug Aubin

Zusammenfassung

E-Zigaretten werden häufig als vermeintlich gesündere Alternative zu konventionellen Zigaretten gesehen und werden zunehmend genutzt. Während Tabakkonsum als etablierter Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen gilt, ist bisher weitestgehend unklar, wie sich der Konsum von E-Zigaretten auf das Gefäßsystem auswirkt. Ein entscheidender Faktor in der Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen ist die Zunahme der Gefäßsteifigkeit, welche für Erkrankungen wie arteriellen Hypertonus, Atherosklerose und deren Folgeerkrankungen prädisponieren kann. Einige Studien legen eine Assoziation von E-Zigarettenkonsum und erhöhter Gefäßsteifigkeit nahe, die Ursachen dafür sind jedoch unzureichend verstanden.

In dieser Arbeit wurde der Einfluss verschiedener Inhaltsstoffe in E-Zigaretten-Dampf auf unterschiedliche Zellen der Gefäßwand hinsichtlich der Gefäßsteifigkeit evaluiert. Zu diesem Zweck wurden humane glatte Muskelzellen und Endothelzellen der Aorta mit verschiedenen Substanzen, die in E-Zigaretten-Dampf vorkommen, darunter Nikotin, Acrolein, Acetaldehyd, Formaldehyd und Propylenglykol, behandelt. Anschließend wurden Expressionsveränderungen von Proteinen des extrazellulären Matrix-Umbaus und inflammatorischer Gewebeantwort mittels Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion, sowie auf Proteinebene mittels Westernblot-Analyse untersucht. Zusätzlich wurden funktionelle Assays für die Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies und für die Matrix-Metalloproteinase-Aktivität durchgeführt. Darüber hinaus erfolgten histologische Analysen an murinen Aortenproben im Rahmen einer *in-vivo* Exposition.

Dabei zeigte sich eine reduzierte Expression von Elastin und eine erhöhte Expression von Typ-3-Kollagen in glatten Muskelzellen, sowie eine erhöhte Expression der proinflammatorischen Proteine Interleukin 8 und intercellular adhesion molecule 1 in Epithelzellen nach Behandlung mit den genannten Substanzen. Diese quantitativen Veränderungen der Strukturproteine wurden in der Westernblot-Analyse bestätigt. Zudem wurden eine erhöhte reaktive Sauerstoffspezies-Produktion in Epithelzellen, sowie eine erhöhte Matrix-Metalloproteinase-Aktivität in glatten Muskelzellen als Anzeichen eines vermehrten Umbaus der extrazellulären Matrix beobachtet. Zusammenfassend legen die experimentellen Ergebnisse nahe, dass die Bestandteile des E-Zigaretten-Dampfs in verschiedenen Zellen der Gefäßwand eine pro-inflammatorische Gewebeantwort und einen vermehrten Umbau der Gefäßwand begünstigen könnten, was zu einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Folgeerkrankungen beitragen könnte.

Abstract

E-cigarettes are often seen as a supposedly healthier alternative to conventional cigarettes and have become increasingly popular in recent years. While tobacco consumption is an established risk factor for cardiovascular disease, it is still largely unclear how the consumption of e-cigarettes affects the vascular system. A decisive factor in the development of cardiovascular diseases is the increase in vascular stiffness, which can predispose to diseases such as arterial hypertension, atherosclerosis and related diseases. The available evidence shows an association between e-cigarette use and increased vascular stiffness, but the underlying mechanisms are still unknown. In this study, the influence of different ingredients of combustion products of e-cigarettes on different cells of the vascular wall with regard to vascular stiffness was evaluated. Human smooth muscle cells and endothelial cells of the aorta were treated with different chemical compounds present in e-cig vapor, including nicotine, acrolein, acetaldehyde, formaldehyde and propylene glycol. Subsequently, expression changes of structural and proinflammatory proteins were analysed by reverse transcription polymerase chain reaction and at protein level by Western blot analysis. In addition, functional assays were used to evaluate the level of reactive oxygen species production and matrix metalloproteinase activity.

Exposure to the different chemical compounds resulted in a significantly reduced expression of elastin and increased expression of type 3 collagen in smooth muscle cells, as well as increased expression of proinflammatory proteins interleukin 8 and intercellular adhesion molecule 1 in epithelial cells. These quantitative changes in structural proteins were further confirmed by Western blot analysis. In addition, increased ROS production in epithelial cells and increased matrix metalloproteinase activity in smooth muscle cells were observed as signs of increased tissue remodelling enzyme activity. In conclusion, the experimental results suggest that the components of e-cigarette vapor may promote a pro-inflammatory tissue response and increased vascular wall remodeling in various cells of the vascular wall, which may contribute to an increased risk of cardiovascular disease.

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius	ml	Milliliter
A	Ampere	MMP	Matrix-Metalloproteinase
AAA	Abdominales Aortenaneurysma	mRNA	Boten- Ribonukleinsäure
Abb.	Abbildung	nAChR	nikotinerge Acetylcholinrezeptor
CD40	Cluster of differentiation 40	nm	Nanometer
CO₂	Kohlenstoffdioxid	nM	Nanomolar
COL3A1	Typ-III-Kollagen	NO	Stickstoffmonoxid
Ct	Cycle-Threshold	NTC	No Template Control
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	µl	Mikroliter
DNA	Desoxyribonukleinsäure	µM	Mikromolar
EC	Humane Aortenendothelzellen	pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
ELN	Elastin	pH	potentia hydrogenii
eNOS	Endotheliale Stickstoffmonoxid- Syntase	qPCR	quantitative Polymerase- Kettenreaktion
E-Zig	E-Zigarette	RIPA	Radioimmunoprecipitation Assay
FBS	Fetale Bovinserum	RNA	Ribonukleinsäure
g	Gramm	ROS	Reaktive Sauerstoffspiezies
x g	G-Kraft	RT	Reverse Transkription
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat- Dehydrogenase	SEL	Selektin
HDL	High-Density-Lipoprotein	VSMC	Vaskuläre glatte Muskelzellen
ICAM	Intercellular adhesion molecule	TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
IL	Interleukin	TGFβ-1	Gewebewachstumsfaktor-Beta-1
K-Zig	Konventionelle Zigaretten	TIMP	Tissue inhibitor of metalloproteinases
LDL	Low-Density-Lipoprotein	V	Volt
M	Molar	VCAM	Vascular cell adhesion protein
mg	Milligramm	WST	Water-Soluble Tetrazolinium
mM	Millimolar		

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Erhöhte Gefäßsteifigkeit und assoziierte Erkrankungen	1
1.2 Der Einfluss von Zigarettenkonsum auf das kardiovaskuläre System	3
1.2.1 Reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies.....	4
1.2.2 Acrolein.....	5
1.2.3 Acetaldehyd	6
1.2.4 Formaldehyd	7
1.2.5 Nikotin	7
1.3 Eigenschaften von E-Zigaretten	8
1.4 Die Einflüsse von E-Zigaretten-Dampf auf Endothelfunktion	10
1.5 Die potenzielle Wirkung von E-Zigaretten-Dampf auf den Umbau in der Tunica media	12
1.6 Fragestellung	13
2 Material und Methoden	14
2.1 Material	14
2.1.1 Allgemeine Labormaterialien.....	14
2.1.2 Chemikalien und Lösungen	16
2.1.3 Zellkultur	17
2.1.4 Software	17
2.1.5 Primer	18
2.1.6 Test-Kits	18
2.1.7 Antikörper	19
2.2 Zellkultivierung.....	20
2.2.1 Zellkulturmedien	20
2.2.2 Passagieren der Zellen.....	20
2.2.3 Zellzahlbestimmung	21
2.3 Aufbereitung der Chemikalien.....	21
2.3.1 Zellviabilitätsassay	22
2.3.2 Arbeitskonzentrationen für nachfolgende Experimente	23
2.4 Zellviabilitätsassay	23
2.4.1 Prinzip der WST-1-Assay	23
2.4.2 Durchführung	24
2.5 ROS-Assay.....	25
2.6 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion	26
2.6.1 Prinzip der qPCR.....	26
2.6.2 Probegewinnung und RNA-Isolation	27
2.6.3 cDNA-Synthese.....	28

2.6.4 quantitative PCR.....	29
2.6.5 Auswertung	29
2.7 Proteinanalyse	30
2.7.1 Proteinisolation.....	30
2.7.2 Messung der Proteinkonzentration.....	31
2.7.3 Elektrophorese und Westernblot-Analyse.....	31
2.7.4 Zusammensetzung der angewendeten Puffer	33
2.8 MMP-Assay	34
2.8.1 Probevorbereitung	35
2.8.2 Detektion der MMP-Aktivität	35
2.9 Analyse der histologischen Bilder muriner Aorten nach E-Zigaretten-Exposition	35
2.9.1 Probegewinnung für histologischen Bilder	36
2.9.2 Auswertung der histologischen Bilder	37
3 Ergebnisse.....	39
3.1 Zellviabilitätsassay	39
3.2 ROS-Assay.....	42
3.3 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion	44
3.3.1 Expressionsveränderungen der glatten Muskelzellen	44
3.3.2 Expressionsveränderungen der Endothelzellen.....	45
3.4 Western-Blot-Proteinanalyse	48
3.4.1 Veränderungen der Protein-Menge bei den glatten Muskelzellen	48
3.4.2 Veränderungen der Protein-Menge bei den Endothelzellen.....	51
3.5 MMP-Assay	52
3.6 Analyse der histologischen Bilder muriner Aorten nach E-Zigaretten-Exposition	53
3.6.1 Adulte Mäuse	53
3.6.2 Junge Mäuse.....	53
4 Diskussion	55
4.1 Entzündungsreaktionrn im Endothel durch das E-Zigaretten-Aerosol	56
4.1.1 Oxidativer Stress im Endothel	56
4.1.2 Die Endotheldysfunktion und inflammatorische Veränderungen	57
4.2 Der Umbau in der Tunica media durch das Aerosol von E-Zigaretten.....	61
4.2.1 Die veränderte Produktion der Bestandteile der extrazellulären Matrix	62
4.2.2 Expression und Aktivität der am Gefäßwandumbau beteiligten Enzyme	64
4.2.3 Die Veränderungen der Tunica media in Tiermodellen	66
4.3 Fazit.....	68
5 Literaturverzeichnis.....	70
Danksagung	80

1 Einleitung

1.1 Erhöhte Gefäßsteifigkeit und assoziierte Erkrankungen

Gefäßsteifigkeit kann als ein Sammelbegriff für die Dehnbarkeit bzw. die elastischen Eigenschaften eines Gefäßes betrachtet werden. Dabei können sich Veränderungen in den verschiedenen Schichten der Gefäßwand auf die Gefäßsteifigkeit auswirken (1).

Die Gefäßwand einer Arterie besteht aus drei Schichten: Tunica intima, Tunica media und Tunica adventitia. Die Tunica intima besteht aus Endothelzellen und einer Basalmembran. Sie fungieren nicht nur als Diffusionsbarriere, sondern regulieren auch die Leukozyten-Adhäsion auf dem Gefäßendothel und den Tonus der vaskulären glatten Muskelzellen in der Tunica media (2). Die regulierenden Funktionen erfolgen durch die Expression verschiedener Zytokine, Adhäsionsmoleküle und Stickstoffmonoxid (NO). Bei einer Dysfunktion kann es zu Strukturveränderungen in der Gefäßwand kommen, die dann wiederum die Hämodynamik beeinflussen können (3).

In der Tunica media befinden sich die vaskulären glatten Muskelzellen (VSMCs) eingebettet in der extrazellulären Matrix, welche hauptsächlich aus Elastinfasern und Kollagenfasern vom Typ I und Typ III besteht. Die VSMCs dienen nicht nur der Regulation der Lumenweite und des Gefäßtonus durch Kontraktion und Dilatation, sondern sind auch an der Produktion der extrazellulären Matrix beteiligt. Die extrazelluläre Matrix ist für die Elastizität und die Compliance des Gefäßes verantwortlich und gewährleistet die Windkesselfunktion der arteriellen Gefäße (2). Bei der Windkesselfunktion geht es um eine Aufrechterhaltung eines kontinuierlichen Blutflusses, unabhängig von der systolischen oder diastolischen Phase des Herzzyklus. Eine Veränderung der Zusammensetzung der extrazellulären Matrix kann zu einer Beeinträchtigung der Hämodynamik und der Stabilität der Gefäßwand führen. Die Tunica adventitia besteht aus Bindegewebe, das aus Elastin- und Kollagenfasern aufgebaut ist. Außerdem umfasst die Tunica adventitia Versorgungsgefäße der großen Arterien, die als Vasa vasorum bezeichnet werden, und die Verankerung der Gefäße an Nachbarstrukturen (4, 5).

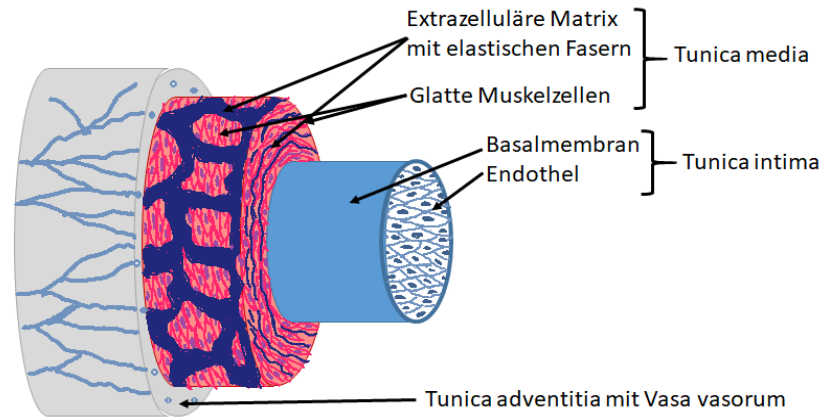


Abb. 1: Aufbau der Gefäßwand. Die Gefäßwand kann in drei Schichten unterteilt werden. Die Tunica intima besteht aus dem Endothel und reguliert die Barrierefunktion, die Adhäsion von Leukozyten und die Gefäßweite. Die Tunica media enthält glatte Muskelzellen und die von ihnen produzierte und aus Elastin- und Kollagenfasern bestehende extrazelluläre Matrix, die für den Gefäßtonus und die Gefäßstabilität verantwortlich ist. Die Tunica adventitia besteht aus Bindegewebe und enthält die Versorgungsgefäße der großen Arterien. Außerdem verankert sie die Gefäße an Nachbarstrukturen. Eigene Darstellung nach Lüllmann-Rauch, Taschenlehrbuch Histologie (6).

Bei einer erhöhten Gefäßsteifigkeit kann die Windkesselfunktion der Aorta bei einem Verlust der Elastizität nicht mehr gewährleistet werden, wodurch die Entwicklung einer isolierten systolischen Hypertonie begünstigt wird. Eine Zunahme der Steifigkeit der Aorta führt zudem zu einer Erhöhung der Blutdruckamplitude, was zu einem höheren systolischen und einem geringeren diastolischen Druck führt. Außerdem kann es zu mikrovaskulären Schäden in den Nieren und im Gehirn kommen, wodurch wiederum die Entwicklung von Niereninsuffizienz und vaskuläre Demenz begünstigt wird (7-9). Darüber hinaus gewährleistet die Windkesselfunktion auch den Bluteinfluss in die Koronararterien während der Diastole, weshalb eine verminderte Windkesselfunktion eine subendokardiale Ischämie und damit die Entwicklung einer Herzinsuffizienz begünstigt (10).

Veränderte hämodynamische Kräfte bei arterieller Hypertonie können mit einer gestörten Barrierefunktion des Endothels verbunden sein, wodurch atherosklerotische Veränderungen begünstigt werden (11). Bei Atherosklerose handelt es sich um eine degenerative Erkrankung der Gefäßwand, bei der es zur Bildung von Plaques kommt. Durch Atherosklerose können Stenosen in den Arterien entstehen, etwa im Rahmen einer peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (pAVK) in den Arterien der unteren Extremität, in den Koronararterien des Herzens, oder an der Bifurkation der A. carotis. Durch Plaquebildung kommt es außerdem zu einer sukzessiven Versteifung der

Gefäßwand, was zu einem höheren systolischen Blutdruck führen kann (12, 13). Darüber hinaus treten auch stärkere Scherkräfte auf, wodurch weitere Schäden des Endothels begünstigt werden können (14). Konsekutiv führt ein höherer systolischer Blutdruck zur weiteren Endothelschädigung, wodurch im Sinne einer Negativspirale die Entstehung von Atherosklerose weiter vorangetrieben wird.

1.2 Der Einfluss von Zigarettenkonsum auf das kardiovaskuläre System

Zigarettenkonsum ist ein zentraler Risikofaktor für eine Vielzahl von Erkrankungen, wie Neoplasien, pulmonale und kardiovaskuläre Erkrankungen (15, 16). Dabei besteht ein enger Zusammenhang zwischen Zigarettenkonsum und einem deutlich höheren Risiko für Myokardinfarkt, Schlaganfall und plötzlichem Herztod, sowie bei aktivem und ehemaligem Zigarettenkonsum eine höhere Prävalenz von arterieller Hypertonie und Aortenaneurysmen (17-24). Außerdem führt aktiver Zigarettenkonsum zu einer höheren Re-Stenosierungsrate nach peripherer oder kardialer Angioplastie (25).

In einer Vielzahl von klinischen Studien konnte nachgewiesen werden, dass Zigarettenkonsum mit einer Entwicklung von Gefäßspasmen und atherosklerotischen Veränderungen der Koronararterien und der cerebral versorgenden Gefäße bis hin zur pAVK assoziiert ist (26-32). Ein wesentlicher protektiver Faktor gegenüber Vasospasmen und atherosklerotischen Veränderungen ist Stickstoffmonoxid (NO), das in den Endothelzellen synthetisiert wird und wesentlich zur Endothelfunktion beiträgt (33). Zigarettenkonsum führt zu einer Reduktion der Aktivität der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS), was dann auch zu einer geringeren NO-Synthese führt (34, 35). Eine geringere NO-Menge ist sowohl mit einer beeinträchtigten flussvermittelten und endothelabhängigen Vasodilatation der versorgenden Gefäße, als auch einer stärkeren Adhäsion von Monozyten am Endothel verbunden, wodurch die Bildung von atherosklerotischen Veränderungen begünstigt wird (36-39).

Darüber hinaus besteht ein Zusammenhang zwischen Zigarettenkonsum und einer erhöhten Gefäßsteifigkeit, die unterschiedliche Auswirkungen auf das Herz-Kreislauf-System hat und insbesondere arterielle Hypertonie fördert (40-42). Dabei wird die Windkesselfunktion der Aorta durch die erhöhte Gefäßsteifigkeit beeinträchtigt und die Versteifung der Gefäße führt zu einer verstärkten Pulswellenreflexion. Beide Faktoren

begünstigen die Entwicklung einer arteriellen Hypertonie (21). Durch das im Zigarettenrauch enthaltene Nikotin wird auch das sympathische Nervensystem stimuliert, was mit einer Erhöhung der Herzarbeit und des Gefäßtonus verbunden ist (43). Wie genau der Zigarettenkonsum zu einer erhöhten Gefäßsteifigkeit führt, ist Gegenstand intensiver Forschung. Dabei scheinen Umbauprozesse der Gefäßwand eine zentrale Rolle zu spielen (44). So konnten beispielsweise im Serum von Zigarettenkonsumierenden höhere Konzentrationen von Matrix-Metalloproteinasen (MMP) nachgewiesen werden (45).

Die im Vorgehenden beschriebenen Effekte des Zigarettenkonsums sind vor allem auf die Verbrennungsprodukte im Rauch zurückzuführen. Bei der Verbrennung konventioneller Zigaretten entstehen mehr als 9.000 bekannte chemische Verbindungen und insbesondere reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies, Aldehyde, wie Acrolein, Acetaldehyd und Formaldehyd, und Nikotin, die eine wichtige Rolle bei den Schädigungen des kardiovaskulären Systems spielen (15, 43). Auf diese unterschiedlichen Verbindungen wird in den folgenden Abschnitten eingegangen.

1.2.1 Reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies

Die reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies können entweder direkt als Teer oder Rauchpartikel im Zigarettenrauch vorliegen oder endogen nach der Aufnahme anderer Verbrennungsprodukte durch eine Aktivierung von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten gebildet werden. Der damit verbundene oxidative Stress kann einerseits Endothelzellen direkt schädigen, indem Lipide in der Membran peroxidiert oder Nukleinsäureketten im Zellkern unterbrochen werden (46-48). Andererseits wird durch oxidativen Stress die Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid (NO) reduziert, indem NO zu nicht-vasoaktivem Stickstoffdioxid (NO₂) oder Peroxynitrit (ONOO⁻) oxidiert wird. Die regulierenden Funktionen von NO, wie etwa die Hemmung von Leukozyten-Adhäsion und Thrombozyten-Aktivierung und Förderung der Gefäßdilatation, können durch eine geringere Bioverfügbarkeit von NO beeinträchtigt werden (49-51).

In der aktuellen wissenschaftlichen Literatur besteht weitgehend Konsens darüber, dass die durch langfristigen Tabakkonsum entstehende reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies das Endothel schädigen. Dabei werden Entzündungen, Alterung und eine Dysregulation des Zellzyklus jeweils durch eine höhere Expression proinflammatorischer Zytokine, reduzierte Zellproliferation und DNA-Schäden gefördert.

Dadurch wird wiederum die Entwicklung von Atherosklerose, arterieller Hypertonie und Aortenaneurysmen begünstigt (21, 52, 53). In weiteren klinischen Studien wurde beobachtet, dass eine Blockade reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies durch einen Rauchstopp oder Antioxidantien wie Vitamin C nach langjährigem Tabakkonsum zu einer Verbesserung der Endothelfunktion führt (37, 54). Diese Studien stützen die Annahme, dass reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies, die bei der Verbrennung von Tabak entstehen, eng mit Endothelpathologien assoziiert sind.

1.2.2 Acrolein

Acrolein um ein hochreaktives ungesättigtes Aldehyd, das beispielsweise bei Verbrennungsprozessen von (E-)Zigaretten entsteht (55, 56). Außerdem bildet Acrolein einen Bestandteil der allgemeinen Luftverschmutzung (57, 58). Weil Acrolein alveolengängig ist, wird es primär pulmonal aufgenommen (59). Durch seine amphiphilen Eigenschaften kann Acrolein auch leicht durch Zellmembranen diffundieren (60). Das aufgenommene Acrolein kann dann mit dem in der DNA enthaltenen Guanin und Aminosäuren, wie Cystein, Lysin und Histidin, reagieren, wodurch Proteinexpression modifiziert werden kann. Modifizierte Proteinexpression kann sich wiederum auf verschiedene biochemische Prozesse auswirken, wobei es etwa durch die Aktivierung von NF- κ B zu einer Verstärkung von Entzündungsprozessen und durch die Aktivierung des Bcl-2-Signalwegs zu einer vermehrten Zellapoptose kommen kann (61, 62). Außerdem wird das Enzym Aldosereduktase, das oxidativen Stress im endoplasmatischen Retikulum kompensiert, durch Acrolein inaktiviert (63-65). Es konnte auch nachgewiesen werden, dass die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) bei einer Exposition mit Acrolein supprimiert werden kann. Bei einer chronischen Exposition kann es zu einer Verschiebung des Gleichgewichts zwischen aktiven eNOS-Dimeren und inaktiven eNOS-Monomeren kommen, wodurch oxidativer Stress in den vaskulären Endothelzellen begünstigt wird (66).

Darüber hinaus kann Acrolein das Gleichgewicht zwischen *High-density-* und *Low-density-*Lipoproteinen (HDL und LDL) beeinflussen. Dabei kann Acrolein zum einen Apolipoprotein A-1 modifizieren, das einen Hauptbestandteil von HDL bildet, und zum anderen mit LDL konjugieren. Das konjugierte Acrolein-LDL hat eine höhere Affinität zu Makrophagen als oxidiertes LDL, welches wiederum an Atherogenese beteiligt ist. Darüber hinaus wurden in einer Studie von Conklin et al. humane Bypass-Materialien

(Arteria thoracica interna und Vena saphena) Acrolein in Konzentrationen von 1-1000 μM ausgesetzt, wobei bei beiden Bypass-Materialien eine Hyperkontraktion beobachtet werden konnte, wodurch koronare Vasospasmen im Zusammenhang mit einer Acrolein-Aufnahme erklärt werden könnten (67-69).

Außerdem wurde in unterschiedlichen Studien festgestellt, dass bei einer Exposition gegenüber Acrolein proinflammatorische Reaktionen in verschiedenen Zelltypen induziert werden. Dabei konnten etwa eine stärkere Adhäsion von Monozyten an Endothelzellen und höhere Spiegel der proinflammatorischen Zytokine Interleukin-6 und Interleukin-8 (IL-6 und 8) in Pneumozyten nachgewiesen werden (70-74).

1.2.3 Acetaldehyd

Bei Acetaldehyd handelt es sich um einen Stoff, der nicht nur im Zigarettenrauch vorkommt, sondern auch in der Industrie als Zwischenprodukt bei der Herstellung chemischer Substanzen verwendet wird. Über die Luftverschmutzung kann Acetaldehyd in die Umwelt gelangen und als Metabolit von Alkohol wird er auch im menschlichen Körper gebildet (75).

Durch seine hohe Reaktivität kann Acetaldehyd Proteine in immunologisch unterscheidbare Proteinaddukte konvertieren, die im hepatischen und kardialen Endothel Immun- und Entzündungsreaktionen induzieren (76, 77). In unterschiedlichen Studien konnte bereits nachgewiesen werden, dass eine Exposition gegenüber Acetaldehyd zu einer verstärkten Expression der Adhäsionsmoleküle *intercellular adhesion molecule 1* (ICAM-1) in pankreatischen Zellen und einer Erhöhung der Spiegel des proinflammatorischen Zytokins Interleukin-8 (IL-8) in hepatischen und pulmonalen Zellen führt (74, 78, 79).

Außerdem kann Acetaldehyd die Proliferation der arteriellen glatten Muskulatur stimulieren (80). Die Proliferationsrate der glatten arteriellen Muskulatur ist bei gesunden erwachsenen Individuen in der Regel äußerst gering. Bei einem Einfluss externer Noxe kann aber eine höhere Rate der Zellvermehrung beobachtet werden, wobei es zu einer verstärkten Produktion von Bestandteilen der extrazellulären Matrix kommt. Dazu gehören Kollagen und Elastin, die die Gefäßwand-Architektur und damit auch deren biomechanische Eigenschaften beeinflussen (81-84).

1.2.4 Formaldehyd

Formaldehyd kann entweder exogen über die Luftverschmutzung aus Industrie- und Fahrzeugabgasen und Zigarettenrauch als auch endogen als Metabolit von Lebensmitteln aufgenommen werden.

Durch seine hohe Reaktivität kann Formaldehyd mit DNA-Nukleoprotein-Verbindungen interagieren, wodurch es zu Konformationsänderungen und einer beeinträchtigten Reparaturfähigkeit der DNA kommen kann. Dadurch können Endothelzellen geschädigt werden, wodurch pro-atherosklerotische Entwicklungen begünstigt werden (85-88). In einer Publikation von Yu et al. wird beschrieben, dass eine höhere Methylamin-Menge durch die Nahrungsaufnahme zu einer stärkeren endogenen Produktion von Formaldehyd führt, was im Mausmodell zu Endothelschäden und atherosklerotische Veränderungen führte (89). Außerdem wurde bei einer Exposition gegenüber Formaldehyd in nasalen mikrovaskulären Endothelzellen eine Zunahme der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und *vascular cell adhesion protein 1* (VCAM-1) beobachtet (90). Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass Formaldehyd zytotoxische Effekte auf humane Endothelzellen der Aorta hat (91). In einer klinischen Studie führte eine 90-minütige Exposition gegenüber Formaldehyd in der Arteria carotis von Probanden zu einer Verdickung der Tunica intima und der Tunica media. Diese Verdickung kann als akute Entzündungsreaktion mit Infiltration von Monozyten interpretiert werden (92).

1.2.5 Nikotin

Bei Nikotin handelt es sich um eine chemische Verbindung, die an nikotinerge Acetylcholinrezeptoren (nAChRs) bindet und dadurch die neuronale Freisetzung von Noradrenalin im sympathischen Nervensystem stimuliert. Noradrenalin führt zu einer Steigerung der Herzarbeit und einer Vasokonstriktion im systemischen Kreislauf, was letztlich zu einer Erhöhung des Blutdrucks führt (43). Außerdem kann Nikotin proinflammatorische Wirkungen auf zellulärer Ebene hervorrufen. Dieser Effekt konnte in zwei Studien mit humanen Gingiva- und bronchialen Epithelzellen nachgewiesen werden, in denen nach einer Stimulation eine stärkere Freisetzung von IL-8 festgestellt werden konnte, einem proinflammatorischen Zytokin (93, 94). IL-8 kann neutrophile Granulozyten chemotaktisch anlocken, deren Extravasation ins Subendothelium fördern und die Monozytenproduktion beschleunigen (95). Die proinflammatorische Wirkung

von Nikotin kann, in Kombination mit der Induktion von oxidativem Stress, zu einer Beeinträchtigung der Endothelfunktion führen. Es wurde aber auch beobachtet, dass eine Aktivierung der $\alpha 7$ -nAChRs durch Nikotin die Proliferation und Migration der Endothelzellen fördert (43, 96). Darüber hinaus wurde beobachtet, dass Nikotin durch eine Freisetzung des Gewebewachstumsfaktors-Beta-1 ($TGF\beta$ -1) auch den fibrotischen Umbau des Myokards begünstigen kann. $TGF\beta$ -1 stimuliert Fibroblasten und induziert Kollagensynthese (97). Eine über das physiologische Maß hinausgehende Produktion von Typ-I- und Typ-III-Kollagen und die Akkumulation in der extrazellulären Matrix kann zu einer fibrotischen Veränderung des Gewebes führen, was zu einer Beeinträchtigung der kontraktiven Funktion des Myokards und der elastischen Funktion der arteriellen Gefäßwand führen kann (98-100).

In mehreren klinischen Studien konnte allerdings auch nachgewiesen werden, dass sich bei der Verabreichung von nikotinhaltigen bzw. für die Raucherentwöhnung eingesetzten Medikamenten das kardiovaskuläre Risiko nicht erhöht, was auf Relevanz von weiteren Verbrennungsprodukten im Zigarettenrauch in diesem Kontext hinweist (101-103).

1.3 Eigenschaften von E-Zigaretten

E-Zigaretten (E-Zigs) bestehen im Wesentlichen aus einer Batterie, einem Erhitzer und einer Flüssigkeitskammer für das E-Liquid (**Abb. 2**). Bei den verschiedenen Generationen von E-Zigs gibt es Unterschiede beim Aufbau und der Menge des aufgenommenen Nikotins. Beim Konsum wird durch Unterdruck Luft in das Gerät eingeblasen und mit den erhitzten E-Liquids vermischt, wodurch ein Aerosol gebildet wird (104).

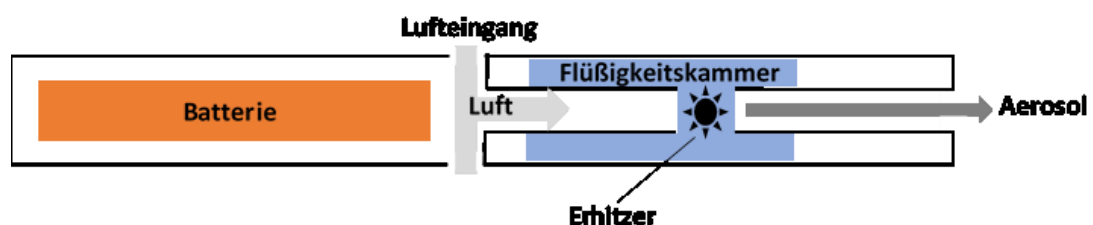


Abb. 2 Aufbau einer E-Zigarette. Die Luft wird in das Gerät eingeblasen und mit dem erhitzten E-Liquid vermischt, wodurch das Aerosol entsteht. Eigene Darstellung.

Seit der Markteinführung in den USA im Jahr 2007 werden E-Zigs häufig als weniger gesundheitsschädliche Substitution für konventionelle Zigaretten (K-Zigs) propagiert.

Dies begründet sich in der Annahme, dass bei E-Zigs im Vergleich zu K-Zigs die Zusammensetzung der gesundheitsschädigenden Verbrennungsprodukte einfacher und in Menge reduziert ist (105). Im Jahr 2016 wurde vom Royal College of Physicians in Großbritannien die Nutzung von E-Zigs statt K-Zigs zur Reduzierung der Gesundheitsschäden empfohlen (106). Darüber hinaus zeigte sich in mehreren klinischen Studien, dass der Konsum von E-Zigs im Vergleich mit K-Zigs mit geringeren hämodynamischen Veränderungen assoziiert ist. In einer Studie von Vlachopoulos et al. ergaben sich bei Probanden, die E-Zigs im Zeitraum von 5 Minuten oder 30 Minuten konsumierten, im Vergleich mit Probanden, die in 5 Minuten K-Zigs rauchten, eine langsamere Steigerung und geringere Spitzenwerte des systolischen Blutdrucks und der Pulswellengeschwindigkeit (107). In einer Studie von Franzen et al. konnte außerdem nachgewiesen werden, dass es bei E-Zig-Konsum im Vergleich mit K-Zig-Konsum zu einer geringeren Steigerung des peripheren systolischen und diastolischen Drucks, des zentralen diastolischen Drucks, der Herzfrequenz und der Pulswellengeschwindigkeit kommt, was im Wesentlichen auf das enthaltene Nikotin zurückgeführt wurde (108). In einer Studie von St. Helen et al. zeigte sich, dass die Plasmakonzentration von Nikotin bei E-Zigs-Konsum langsamer ansteigt als beim K-Zigs-Konsum (109).

E-Liquids enthalten in der Regel Nikotin, Propylenglykol, pflanzliches Glycerin und Aromastoffe. Im Unterschied zu K-Zigs wird bei E-Zigs kein Tabak verbrannt, sondern E-Liquid gedampft, wodurch sich die Zusammensetzung des Aerosols deutlich verändert, sodass etwa kein Kohlenstoffmonoxid entsteht (110).

E-Liquids enthalten Nikotin in der Regel in einer Konzentration von 3-48 mg/ml. Dabei sollte allerdings beachtet werden, dass die tatsächliche Konzentration im Aerosol geräteabhängig ist (111).

Durch das Erhitzen des Propylenglykols und des pflanzlichen Glycerins können Propylenoxid, Acetal, Glyoxal, Methylglyoxal, Glycidol und unterschiedliche Aldehyde entstehen, wie Acetaldehyd, Formaldehyd und Acrolein (112-114). Mit Hinblick auf die Wirkung auf das kardiovaskuläre System erscheinen vor allem die Aldehyde als relevant. Die beim Verdampfen entstehende Menge ist dabei stark von der Temperatur des Geräts abhängig, sodass bei verschiedenen E-Zig-Modellen unterschiedliche Aldehyd-Spiegel im Aerosol gemessen wurden (110, 112). Propylenglykol kommt ebenfalls in relevanter

Menge im E-Zig-Dampf vor, mögliche toxische Effekte wurden bisher aber kaum untersucht (115).

Im Vergleich mit den anderen Bestandteilen der E-Liquids können die Verbrennungsprodukte der Aromastoffe stark variieren. So können etwa Alkohol und verschiedene Aldehyde entstehen. Zu den bekannten toxischen Verbindungen gehören etwa Diacetyl und Benzaldehyd, die potenziell pulmonale Schäden verursachen können (116). Allerdings kann angesichts der aktuellen empirischen Datenlage noch nicht abschließend beurteilt werden, ob es durch den Einsatz von Aromastoffen möglicherweise zu zusätzlichen gesundheitsschädlichen Wirkungen kommt (110).

In der Studie von Teasdale et al. wurden die humanen koronararteriellen Endothelzellen dem gesamten Aerosol ausgesetzt, das sowohl pro- als auch antiinflammatorische Verbrennungsprodukte enthält (105). In der vorliegenden Arbeit erfolgte im Gegensatz eine separate Exposition der Zellen gegenüber verschiedenen chemischen Verbindungen, um eine differenzierte Untersuchung der Wirkungen einzelner Verbrennungsprodukte zu ermöglichen.

1.4 Die Einflüsse von E-Zigaretten-Dampf auf Endothelfunktion

Dysfunktion des Endothels umfasst eine Beeinträchtigung der physiologischen Funktionen des Gefäßendothels, zu denen u. a. die Regulation der Gefäßweite und der Gefäßpermeabilität, der Modulation der adhäsiven und chemotaktischen Eigenschaften von Immunzellen bei akuten und chronischen Entzündungen und die Hemmung der Thrombozyten-Aggregation gehören (33, 117). Die Aufrechterhaltung der physiologischen Funktionen des Endothels erfolgt vor allem durch Stickstoffmonoxid (NO), das durch die endotheliale NO-Synthase (eNOS) aus L-Arginin und Sauerstoff synthetisiert wird (33).

Die Ätiologie einer Endotheldysfunktion ist in den meisten Fällen auf einen Mangel an Stickstoffmonoxid (NO) zurückzuführen, induziert durch eine Überproduktion von ROS, Entzündungsprozesse und eine reduzierte eNOS-Aktivität (118).

NO ist wegen seines ungepaarten Elektrons hochreaktiv, weshalb es mit reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in das nicht bioverfügbare Peroxynitrit (ONOO-) umgewandelt werden kann (33). Darüber hinaus sollte berücksichtigt werden, dass eNOS NO lediglich

in Dimer-Form synthetisieren kann. Bei Anwesenheit von Peroxynitrit kann das eNOS-Dimer entkoppeln, wodurch es zu einer reduzierten NO-Synthese kommen kann (119, 120).

Im Rahmen einer klinischen Studie konnte bei Probanden, die über einen Zeitraum von sieben Tagen eine festgelegte Menge von E-Zigs konsumiert haben, eine Zunahme von Markern für oxidativen Stress und eine Verringerung der Bioverfügbarkeit von NO im Blut festgestellt werden (121). In einer experimentellen Studie konnte nachgewiesen werden, dass die Exposition mit dem Extrakt von E-Zig-Dampf in kultivierten venösen Endothelzellen zu einem Anstieg des ROS-Spiegels führt, während eine Behandlung mit einem Antioxidans die ROS-induzierte Apoptose deutlich reduziert (122). In einer weiteren Studie wurde eine höhere Anzahl von endothelialen Vorläuferzellen bei Probanden beobachtet, die E-Zigs konsumierten, sodass die durch einen E-Zig-Konsum induzierte ROS-Produktion sowohl die Endothelfunktion als auch das Überleben der Endothelzellen beeinträchtigen kann (123).

Bei Endotheldysfunktion kann die Immunregulation durch die Inhibition der Rekrutierung und Adhäsion von Leukozyten durch den Mangel von NO nicht adäquat umgesetzt werden (124, 125). Die Entzündungsreaktion der Tunica intima durch Leukozyten, zu denen Monozyten und Makrophagen gehören, kann in drei Schritte unterteilt werden, nämlich Rekrutierung, Adhäsion und Infiltration. Die proinflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-8 fungieren als Chemokine und locken Leukozyten an. Am Entzündungsort werden die Leukozyten durch Adhäsionsmoleküle, wie ICAM1, VCAM1 und P-Selektin, angeheftet, sodass sie durch das Endothel dringen können (5, 126, 127). Dabei scheint eine verdickte Tunica intima ein Frühzeichen von Gefäßversteifung zu sein. In der Studie von Li et al. konnte durch immunohistochemische Färbung gezeigt werden, dass bei einer Intimaverdickung verstärkt ICAM1-Moleküle exprimiert werden (128, 129).

In der vorliegenden Arbeit wird daher die Frage untersucht, ob die Komponenten im E-Zig-Dampf eine verstärkte Bildung von ROS und entzündungsrelevanten Molekülen im Endothel induzieren können.

1.5 Die potenzielle Wirkung von E-Zigaretten-Dampf auf den Umbau in der Tunica media

Neben den Veränderungen der Endothelfunktion in der Tunica intima kann auch eine Veränderung der Zusammensetzung der extrazellulären Matrix in der Tunica media zu einer erhöhten Gefäßsteifigkeit beitragen. Wesentliche Prozesse hierbei sind der Abbau oder auch die Fragmentierung elastischer Fasern und der Einbau von Kollagenfasern (130, 131). Dabei sind insbesondere eine verstärkte Expression und Aktivität von Proteasen, Reparaturdefekte der extrazellulären Matrix durch eine verminderte Elastin-Synthese und eine chronische Inflammationsreaktion von zentraler Bedeutung (132).

Eine Gruppe von Proteasen, die am Abbau von Elastin in der Tunica media der humanen Aorta wesentlich beteiligt ist, sind die MMPs (133, 134). MMPs werden von VSMCs produziert und können spezifische Komponenten der extrazellulären Matrix, etwa Elastin, Kollagen und Elastin, proteolytisch abbauen. Ihre Expression wird in kranken und entzündlichen Geweben häufig hochreguliert (135, 136). In einer klinischen Studie konnte eine erhöhte Konzentration von MMP-2 und MMP-9 im Serum von Patienten mit einer dilatierten Aorta ascendens nachgewiesen werden, was als Indikator für eine verminderte Gefäßwand-*Compliance* verwendet werden kann (137). Außerdem wurde in einer Studie festgestellt, dass die Expression und Aktivität von MMP-2 und MMP-9 in Mauseorten bei chronischer Exposition gegenüber Nikotin erhöht waren (138).

Die aktuelle Studienlage zum Zusammenhang zwischen E-Zig-Konsum und der Aktivität von MMPs leitet sich vor allem aus Arbeiten im Kontext von pulmonalen Zellen und Geweben ab. In einer Studie konnte eine erhöhte Aktivität von MMP-2 und MMP-9 nach bronchoalveolären Lavage der Konsumierenden von E-Zigs gemessen werden (139). Allerdings liegen bisher nur unzureichende Daten zum Zusammenhang zwischen E-Zig-Konsum und der Proteasenaktivität im Gefäßsystem vor. Deshalb wird in der vorliegenden Arbeit der Frage nachgegangen, ob das E-Zig-Dampf die Proteasenmenge und -aktivität in der Tunica media der humanen Aorta verändern kann.

1.6 Fragestellung

Während die negativen Auswirkungen von Tabakrauch auf das Gefäßsystem bereits eingehend erforscht wurden, wurde die Frage nach den Effekten von E-Zig-Dampf bzw. den darin enthaltenen Chemikalien auf das Gefäßsystem bisher nur unzureichend untersucht.

Im Rahmen der vorliegenden experimentellen Arbeit wurden zwei zentrale zelluläre Gruppen der Gefäßwand betrachtet, nämlich die Endothelzellen (ECs) der Tunica intima und die glatten Muskelzellen (VSMCs), als wesentlicher Bestandteil der Tunica media. Die Zellen wurden *in vitro* gegenüber chemischen Verbindungen exponiert, die häufig im E-Zig-Dampf vorkommen, insbesondere Nikotin, Acrolein, Propylenglykol, Acetaldehyd und Formaldehyd.

Dabei wurden zwei Fragestellungen untersucht:

1. Begünstigen die genannten chemischen Verbindungen Endotheldysfunktion durch erhöhte ROS-Bildung und Regulation pro-inflammatorischer Proteine?
2. Beeinflussen die genannten Bestandteile des E-Zig-Aerosols VSMCs mit Hinblick auf Expression von Strukturproteinen und tragen sie damit zu den Umbauprozessen der extrazellulären Matrix bei?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Allgemeine Labormaterialien

Utensil	Modell	Firma
Absaugsystem	Integra Vacusafe	Integra Bioscience
Autoklav	VX-95	Systemec
Aufnahmesystem für Western-Blot	ChemiDoc MP Imaging System	Bio-Rad
Brutschrank	HERA cell 240	Heraeus
Direktverdrängerpipettenspitzen	Combitips advanced	Eppendorf
Einkanalpipetten	Eppendorf-Research; 10, 100, 1000 µl	Eppendorf
Einkanalpipetten	Eppendorf-Research plus; 10, 20, 100, 200, 1000 µl	Eppendorf
Einkanalpipetten	Pipetman P10, P20, P200, P1000	Gilson
Einmal-Stangenpipetten	Stripetten 1ml, 2ml, 5ml, 10ml, 25ml	Greiner Bio-One
Filterpipettenspritzen	10µl, 100µl, 1000µl	Starlab
Gefrierschrank	HERAfreeze HFU T- Serie	Thermo Scientific
Gefrierschrank	Liebherr -20°C	Liebherr
Imaging System	ChemiDoc™MP	Bio-Rad
Küvette	3 ml	Sarstedt Deutschland
Kühlschrank	FKU 1800 Index 20K/001	Liebherr
Kühl-Gefrier-Kombination	CNP 2013 Index 20C/001	Liebherr
Mehrfachdispenser	Multipette Plus	Eppendorf
Mikroskop	CKX 41	Olympus
Mikrozentrifuge	PerfectSpin Mini	Peqlab

Multilabel Reader	Victor X4	Perkin Elmer
Nitrozellulosemembran	0,45 µm	Thermo Scientific
PCR-Thermocycler	Flex Cycler 2	Analytik Jena
Pipettierhelfer	Easypet	Eppendorf
Pipettierhelfer	Hirschmann	Hirschmann
Pipettierhelfer	neo Accupette 3-9905	Neolab
Pipettierhelfer	Powerpette	VWR
Pipettenspritzen	10µl, 100µl, 1000µl	Starlab
Pipettenspritzen	200µl	Sarstedt Deutschland
qPCR-Gerät	CFX96 Real-Time System	Bio-Rad
qPCR-Gerät	C1000 Touch Thermal Cycler	Bio-Rad
Reagenzglasschütter	Vortex Genie 2	Scientific Industries
Reagiergefäße	1,5ml, 2ml	Sarstedt Deutschland
Schütter	MTS 4	IKA-Labortechnik
Schütter	Duomax 1030	Heidolph
Sicherheitswerkbank, Klasse II	Safe 2020	Thermo Scientific
Spectrophotometer	Nanodrop 2000c	Peqlab
Kugelmühle	TissueLyser LT	Qiagen
Wasserbad	WNE14	Memmert
Werkbank	Safe 2020	Thermo Scientific
Zellkultur-Platten	96-Well	Sarstedt Deutschland
Zellkultur-Platten	Cellstar 100x20mm	Greiner Bio-One
Zellschaber		Sarstedt Deutschland
Zentrifuge	Centrifuge 5424	Eppendorf
Zentrifuge	Megafuge 40R	Thermo Scientific
Zentrifuge	Fresco 17	Thermo Scientific
Zentrifugenröhrchen	Falcon 15ml, 50ml	Sarstedt Deutschland

2.1.2 Chemikalien und Lösungen

Chemikalie	Hersteller
Acetaldehyd	Sigma Aldrich
Acrolein	Restek
Acrylamid	Merck KGaA (Sigma-Aldrich)
APS	Merck KGaA (Sigma-Aldrich)
Bradford-Reagenz	Merck KGaA (Sigma-Aldrich)
BSA	Merck KGaA (Sigma-Aldrich)
Chloroform	Sigma Aldrich
Clarity Max™ Western ECL Substrate	Bio-Rad
dNTP-Mix (25x)	Thermo Scientific
DTT	Merck KGaA (Sigma-Aldrich)
EDTA	Merck KGaA (Sigma-Aldrich)
Ethanol	VWR
Formaldehyd	Rockland
Glycin	Merck KGaA (Sigma-Aldrich)
IGEPAL® CO-520	Merck KGaA (Sigma-Aldrich)
NaCl	Merck KGaA (Sigma-Aldrich)
Nikotin	Merck KGaA (Sigma-Aldrich)
Nukleasen-freies Wasser	Thermo Scientific
Methanol	Merck KGaA (Sigma-Aldrich)
Milchpulver	Merck KGaA (Sigma-Aldrich)
PageRuler Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific
PBS	Thermo Scientific
Propylenglykol	Sigma Aldrich
Qiazol-Lysereagenz	Qiagen
Reverse-Transkriptase (MultiScribe)	Thermo Scientific
Reverse Transkription Buffer (10x)	Thermo Scientific
Reverse Transkription Random Primers (10x)	Thermo Scientific
SDS	Merck KGaA (Sigma-Aldrich)
SYBR-Green	Thermo Scientific
TBS	Merck KGaA (Sigma-Aldrich)
TEMED	Merck KGaA (Sigma-Aldrich)

Tris-Base	Merck KGaA (Sigma-Aldrich)
Trypan Blue	Merck KGaA (Sigma-Aldrich)
Trypsin-EDTA	Sigma Aldrich
Tween 20	Merck KGaA (Sigma-Aldrich)
WST-1 Reagenz	Roche

2.1.3 Zellkultur

Primärzellen	Firma
humane aortale glatte Muskelzellen (HAoSMC), humane Aortenendothelzellen (HAoEC)	Sigma Aldrich PromoCell
Medien	Firma
DMEM	Thermo Scientific
Endothelial Cell Growth Medium MV Kit	PromoCell

2.1.4 Software

Software	Firma
Bio-Rad CFX Manager (CFX Manager™, Software, Bio-Rad Laboratories. Inc. Version 3.1)	Bio-RAD
GraphPad Prism 9.1.2	Graphpad Software La Jolla
ImageLab 4.1	Bio-RAD
Microsoft Office	Microsoft
NanoDrop 2000/2000c	Thermo Fisher Scientific
Perkin Elmer 2030 Manager	Perkin Elmer
Image J	National Institutes of Health, die USA

2.1.5 Primer

Primer	Angewendte Zellline	Hersteller	Katalognummer	Verdünnung gegen ddH₂O
GAPDH	VSMC, EC	Biomol GmbH	VHPS-3541	1:3
ICAM1	EC	Biomol GmbH	VHPS-4429	1:3
VCAM1	EC	OriGene	HP230503	1:3
IL6	EC	Biomol GmbH	VHPS-4559	1:3
IL8	EC	Biomol GmbH	VHPS-4563	1:3
CD40	EC	Biomol GmbH	VHPS-9433	1:3
SEL-P	EC	Biomol GmbH	VHPS-8223	1:3
COL3A1	VSMC	Qiagen	330001PPH00439 F	Ohne Verdünnung
ELN	VSMC	Biomol GmbH	VHPS-2951	1:3
MMP2	VSMC	Qiagen	330001PPH00151B	Ohne Verdünnung
TIMP2	VSMC	Qiagen	QT00017759	Ohne Verdünnung

2.1.6 Test-Kits

Test-Kit	Hersteller
MMP Activity Assay Kit (Fluorometric - Green)	abcam
RNeasy Kit	Qiagen
ROS/Superoxide Detection Assay Kit (Cell-based)	abcam

2.1.7 Antikörper

Primäre Antikörper	Angewendte Zelllinie	Molekuläre Gewicht des Zielproteins	Hersteller	Katalognummer	Verdünnung
β-Actin (rabbit monoclonal)	EC, VSMC	Ca. 40 kDa	Cell Signaling	8584	1:3000
ICAM1 (mouse monoclonal)	EC	85-110 kDa	Antibodie s-online	ABIN 94178	1:1000
IL8 (rabbit polyclonal)	EC	Ca. 11 kDa	Sigma Aldrich	HPA 057179	1:1000
ELN (rabbit polyclonal)	VSMC	Ca. 80 kDa	Bioss	bs-1756R	1:1000
COL3A1 (rabbit polyclonal)	VSMC	Ca. 180 kDa	Thermo Scientific	PA5-34787	1:2000
TIMP2 (mouse monoclonal)	VSMC	Ca. 24 kDa	Sigma Aldrich	SAB420 0814-25	1:1000
Sekundäre Antikörper					
Sekundäre Antikörper			Hersteller	Katalognummer	Verdünnung
Pierce goat anti-rabbit IgG (H+L) Peroxidase conjugated			Thermo Scientific	31460	1:15000
Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody			Cell Signaling	7076	1:15000

2.2 Zellkultivierung

Das Ziel der Zellkulturexperimente bestand darin, den Einfluss der chemischen Verbindungen auf den humanen Endothelzellen (ECs) und den humanen vaskulären glatten Muskelzellen (VSMCs) *in vitro* zu untersuchen.

Die folgenden Bedingungen galten während der Zellkulturverfahren: Vor Beginn jeder Zellbehandlung wurden die Zellen unter dem CKX41 Inversmikroskop betrachtet. Die Standard-Zellkulturmedien wurden im Wasserbad auf 37°C vorgewärmt. Eine sterile und kontaminationsfreie Zellkultivierung wurde durch das Arbeiten unter der biologischen Sicherheitswerkbank, Klasse II gewährleistet. Vor Benutzung wurden die Sicherheitsbank und alle Materialien mit 70% EtOH desinfiziert. Die für die Experimente verwendeten Zellen befanden sich zwischen der vierten bis zehnten Passage.

Die ECs und die VSMCs wurden auf 10 cm Zellkulturschalen in 7 ml Zellkulturmedium kultiviert. An jedem dritten Tag wurde das alte Zellkulturmedium abgenommen. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen in 7 ml frischem Zellkulturmedium bei 37°C und 95% Luftfeuchtigkeit im Inkubator, der mit 5% CO₂ begast wurde, kultiviert.

2.2.1 Zellkulturmedien

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit zwei verschiedenen Zellkulturmedien gearbeitet: ECs wurden mit *Endothelial Cell Growth Medium MV Kit* kultiviert. VSMCs wurden mit dem Standard-Zellkulturmedium DMEM kultiviert, welches zu 20% mit fätalem Bovinserum (FBS) und zu 1% mit Penicillin/Streptomycin (PEN/STREP) angereichert wurde.

2.2.2 Passagieren der Zellen

Sobald die Zellen eine Konfluenz von 80 – 90% erreicht hatten, wurden diese passagiert: Das alte Zellkulturmedium wurde abgenommen und die Zellen wurden mit DPBS gewaschen, um altes Medium zu entfernen. 1,5 ml Trypsin-EDTA-Lösung wurde auf die Zellkulturschale gegeben, um die adhärennten Zellen von den Schalen abzulösen. Unter dem CKX41 Inversmikroskop wurde die Zellablösung kontrolliert. Durch Zugabe von 4,5 ml Standard-Zellkulturmedium wurde die Trypsinwirkung beendet. Die Zelllösung wurde in einem Zentrifugenröhrchen gegeben und bei 200 x g fünf Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Flüssigkeitsüberstand wurde entfernt, die Zellen in

PBS erneut gelöst und bei gleicher Einstellung zentrifugiert. Wiederum wurde der Flüssigkeitsüberstand entfernt und das Zellpellet gelöst, diesmal in frischem und der jeweiligen Zelllinie entsprechendem Zellkulturmedium. Die Zelllösung wurde auf neue Zellkulturschalen verteilt – im Verhältnis 1:2 oder 1:3.

2.2.3 Zellzahlbestimmung

Eine Neubauer Zählkammer wurde durch das Anbringen des Deckglases auf die zwei Glasstege vorbereitet. Die Zellzahl der Zellen wurde zu Beginn der Experimente bestimmt. Hierfür wurden 3 µl des in frischem Zellkulturmedium gelösten Zellpellets mit 27 µl Trypan Blau vermischt und 10-fach verdünnt. 10 µl dieser Mischung wurde auf eine Neubauer Zählkammer an den Rand des Deckglases pipettiert. Die Zählung der Zellen erfolgte unter dem CKX41 Inversionsmikroskop, wobei jeweils fünf von insgesamt neun Feldern auf jeder Seite, insgesamt zehn Felder, gezählt wurden. Die Berechnung der Zellzahl erfolgte gemäß folgender Formel:

$$\frac{\text{Gesamt gezählte Zellanzahl}}{10 \text{ Felder}} = \text{Durchschnittliche Zellzahl pro Feld}$$
$$\frac{\text{Durchschnittliche Zellzahl pro Feld} \times 10 - \text{Fach} - \text{Verdünnung}}{1 \times 10^{-4}(\text{Volume, ml})}$$
$$= \text{Zellzahl pro Millimeter}$$

Die Zellsuspension mit bekannter Zellkonzentration wurde dann, in Abhängigkeit vom jeweiligen Experiment, mit einer definierten Zellzahl in Petrischalen oder Zellkulturschalen ausgesät.

2.3 Aufbereitung der Chemikalien

Die erworbenen Chemikalien wurden in molaren Einheiten umgerechnet und sind wie folgt angegeben: Nikotin: 6,22 M; Acrolein: 15 M; Acetaldehyd: 17,69 M; Formaldehyd: 4,34 M; Propylenglykol: 13,62 M. Die jeweiligen Substanzen wurden in einer Reihe, maximal 10-fach bei jedem Vorgang, mit sterilem Wasser verdünnt.

Um die chemischen Eigenschaften der Substanzen, insbesondere solcher mit niedrigen Siedepunkten (beispielsweise Acetaldehyd mit 20,2 °C), während der Aufbereitung zu bewahren, wurden alle Prozesse auf mit UV-Strahlung behandeltem Eis durchgeführt. Zusätzlich wurden das sterile Wasser und die Pipettenspitzen zuvor auf 4 °C gekühlt.

2.3.1 Zellviabilitätsassay

Wie in der Einleitung dargelegt, wurden die Chemikalien in verschiedenen Verdünnungsstufen getestet. Die ausgewählten Konzentrationen jeder Chemikalie sind in **(Tabelle 1)** dargestellt.

Tabelle 1: Die ausgewählten Konzentrationen der Chemikalien.

Chemikalien	Konzentrationen
Nikotin	1nM, 100nM, 1 μ M, 100 μ M, 1mM
Acrolein	0,5 μ M, 1 μ M, 2 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 25 μ M
Acetaldehyd	0,5 μ M, 1 μ M, 2 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 25 μ M
Formaldehyd	0,5 μ M, 1 μ M, 2 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 25 μ M
Propylenglykol	50 μ M, 200 μ M, 1mM, 5mM

Der hier beschriebene Versuch wurde in 96-Wellen-Platten durchgeführt. Dabei wurde die letzte Verdünnung durch Zugabe von Kulturmedium auf ein Volumen von 100 μ l in jedes Well vorgenommen. Um potenzielle Pipettierfehler zu minimieren, wurde das Experiment so konzipiert, dass jedes Pipettiervolumen mindestens 1,5 μ l betrug.

Im Folgenden wird zur Veranschaulichung des Vorgehens die Dosierung von Propylenglykol beispielhaft erläutert: Propylenglykol wurde mit einer Stockkonzentration von 13,62 M verwendet. Im ersten Schritt wurde eine Mischung aus 10 μ l Propylenglykol und 90 μ l sterilem Wasser in einem Eppendorf-Röhrchen hergestellt. In der Folge wurde eine weitere Verdünnung vorgenommen, indem 10 μ l der zuvor hergestellten Mischung mit 90 μ l sterilem Wasser vermischt wurden. Dadurch konnte eine Lösung mit einer Konzentration von 136,2 mM erzielt werden. Die Testlösung mit einer Konzentration von 5 mM wurde durch Zugabe von 3,8 μ l der Ausgangslösung pro Well pipettiert. Der verbliebene Anteil wurde erneut zehnfach verdünnt, was einer Konzentration von 13,62 mM entsprach. In der Folge wurden 7,7 μ l der Lösung in jedes Well für eine Testkonzentration von 1 mM pipettiert. Die verbleibende Lösung wurde wiederum fünfmal verdünnt, was einer Konzentration von 2,72 mM entspricht. In der Folge wurden 7,7 μ l der Lösung in jedes Well für eine Testkonzentration von 200 μ M pipettiert, sowie 1,9 μ l für 50 μ M.

Die Vorgehensweise bei der Verwendung anderer Chemikalien folgte dem gleichen Prinzip.

2.3.2 Arbeitskonzentrationen für nachfolgende Experimente

Auf Basis der Resultate des Zellviabilitätsassays, welche im Abschnitt 3.1 im Detail erläutert werden, wurden die finalen Arbeitskonzentrationen der Chemikalien definiert (**Tabelle 2**), welche für sämtliche nachfolgenden Experimente in dieser Arbeit zum Einsatz kamen. Die Verdünnung erfolgte gemäß dem im vorherigen Abschnitt dargelegten Prinzip.

Tabelle 2: Die finalen Arbeitskonzentrationen jeweiligen Chemikalien, die in folgenden Experimenten angewendet wurden.

Chemikalie	Arbeitskonzentration
Nikotin	100 μM
Acrolein	2 μM
Propylenglykol	50 μM
Acetaldehyd	25 μM
Formaldehyd	5 μM

2.4 Zellviabilitätsassay

Im Rahmen dieser Arbeit lag der Fokus auf der Untersuchung der Veränderungen von Zellen unter der Behandlung mit verschiedenen Chemikalien. Ein ausgeprägter Zelluntergang wurde daher als Störfaktor betrachtet und sollte nach Möglichkeit vermieden werden. Das Ziel dieser Untersuchung bestand in der Ermittlung von Konzentrationen der Chemikalien, bei deren Unterschreitung eine ausreichende Überlebensrate der Zellen gewährleistet werden konnte.

2.4.1 Prinzip der WST-1-Assay

Zur Evaluierung der Überlebensrate der Zellen unter Behandlung mit den Chemikalien wurde der WST-1-Assay (Water-Soluble Tetrazolinium) eingesetzt. Beim WST-Reagenz (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-Benzol-Disulfonat) handelt es sich um einen hellrötlichen Farbstoff, der durch mitochondriale Succinyl-Tetrazolinium-Reduktase zu dunkel-rötlichem Formazan gespalten wird (**Abb. 3**). Die mitochondriale Succinyl-Tetrazolinium-Reduktase ist ausschließlich in der Atmungskette der Mitochondrien lebensfähiger Zellen lokalisiert. Der Vergleich der Menge des gebildeten Formazans in behandelten Zellen im Verhältnis zur Kontrolle erlaubt demnach

die Ableitung des Anteils der überlebenden Zellen. Das entstandene Formazan ist löslich im Kulturmedium, sodass dessen Menge durch Absorptionsmessungen bei einer Wellenlänge von 450 nm bestimmt werden kann.

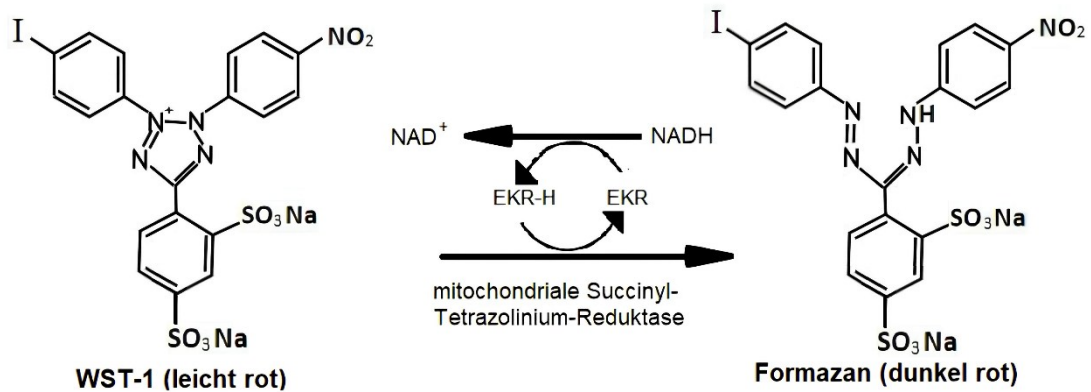


Abb. 3: Strukturänderung der WST-1-Reagenz. WST-1 wird zu Formazan reduziert, während das Elektronenkoppelreagenz (EKR) oxidiert wird. Die oxidierte Form des Elektronenkoppelreagenzes wird anschließend unter Verbrauch von NADH wieder zu EKR-H reduziert. Eigene Darstellung modifiziert nach Yin et al. (140)

2.4.2 Durchführung

Sowohl ECs als auch VSMCs waren zum Zeitpunkt der Untersuchung zwischen der dritten und zehnten Passage. Die Kultivierung erfolgte gemäß dem zuvor genannten Protokoll. Im Rahmen des vorliegenden Versuchs wurden die Zellen geteilt und in einer 96-Well-Platte angezüchtet. Dabei wurden jeweils 1×10^4 Zellen und 100 μ l Kulturmedium pro *Well* verwendet. Die Kultivierung erfolgte über einen Zeitraum von 24 Stunden. In der Folge wurden die Zellen gemäß den zuvor erwähnten Konzentrationsschemen für weitere 24 Stunden behandelt.

Im Anschluss an die Behandlungen wurde in jedes Well eine Menge von 10 μ l des WST-1-Reagenzes gegeben. Die Kultivierung erfolgte im Dunkeln über einen Zeitraum von zwei Stunden, anschließend wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen.

2.5 ROS-Assay

Im Rahmen dieses Experiments wurde der durch die Behandlung induzierte oxidative Stress sowie die Superoxide mit dem *ROS/Superoxide Detection Assay Kit* quantifiziert. Der oxidative Stress wird dabei als Fluorescein (Anregung/Emission = 490/525 nm) und die Superoxide als Rhodamin (Anregung/Emission = 550/620 nm) detektiert.

Die ECs der zehnten Passage wurden gesplittet und 24 Stunden vor der Behandlung in einer speziell für die Fluorometrie konzipierten 96-Well-Platte ausgesät, wobei jeweils 1×10^4 Zellen und 100 μ l Kulturmedium pro Well verwendet wurden. Für jede Bedingung waren acht Replikate vorgesehen.

Da die Reaktionen der Zellen nach einer 24-stündigen Exposition gegenüber den Chemikalien beobachtet werden sollten, um eine einheitliche Grundlage für die Auswertung zu schaffen, wurde die Behandlung mit den Chemikalien 24 Stunden vor der Detektion begonnen. Die Konzentrationen der zu testenden Chemikalien wurden gemäß den Angaben in Abschnitt 3.1 festgelegt.

Die Detektion erfolgte gemäß dem vom Hersteller bereitgestellten Protokoll. Als positive und negative Kontrolle wurden jeweils 400 μ M Pyocyanin, ein ROS-Inducer, und 5 mM N-Acetyl-L-Cystein, ein ROS-Inhibitor, mit Endkonzentrationen eingesetzt. In Übereinstimmung mit den Empfehlungen des Herstellers sollte die Inkubation mit dem ROS/Superoxide Detection Mix nach der Induktion für die positive Kontrolle durch den ROS-Inducer 30 bis 60 Minuten dauern. Um vollständigere und zuverlässigere Ergebnisse zu erhalten, wurde die Platte 30, 45 und 60 Minuten inkubiert und insgesamt dreimal mit dem *Multilabel-Reader Victor X4* bei beiden Wellenlängen gemessen.

2.6 quantitative Polymerase-Kettenreaktion

Im Rahmen dieses Experiments wurde untersucht, inwiefern Chemikalien Einfluss auf genetische Expressionsveränderungen in Zellkulturen nehmen. Der Fokus der Untersuchung lag dabei auf Entzündungsmarkern und Adhäsionsmolekülen bei ECs, sowie auf Kollagen, Elastin und *Extracellular-Matrix-Remodelling-Proteine* bei VSMCs. Die ausgewählten Primer, die auf Zielgene abzielten, die potenziell am Umbauprozess der Gefäßwand beteiligt sein konnten, sind zusammen mit ihren Abkürzungen in (**Tabelle 3**) aufgeführt:

Tabelle 3: Die Primerliste.

Zelllinie	Ausgewählte Primer
EC	ICAM-1, VCAM-1, IL-6, IL-8, CD40, P-Selektin (SELP)
VSMC	Kollagen Typ III (COL3A1), Elastin (ELN), Matrix-Metalloproteinase-2 (MMP2), Tissue-Inhibitor of Metalloproteinase-2 (TIMP2)

Des Weiteren wurde GAPDH, welches in beiden Zellarten exprimiert wurde, als Housekeeper-Primer verwendet. Die Gegenüberstellung der Ct-Werte von GAPDH und des jeweiligen Primers erlaubte eine Normalisierung der Expressionsstärke jeder Probe. Das detaillierte Verfahren wurde im nachfolgenden Abschnitt "Auswertung" näher erläutert.

2.6.1 Prinzip der qPCR

Die konventionelle PCR basiert auf der Bildung von Bindungen zwischen den zugefügten Primern und Nukleotiden unter Einwirkung der Polymerase. Die nachfolgende Messung der Expressionsstärke erfolgt mittels Elektrophorese.

Im Gegensatz dazu erfolgt bei der Echtzeit-quantitativen PCR (qPCR) eine Messung der DNA-Menge während der Reaktion. Dazu werden den Reagenzien DNA-bindende Farbstoffe beigefügt. Im Rahmen dieses Experiments wurde *SYBR-Green* als Farbstoff eingesetzt. Der DNA-Farbstoff-Komplex absorbiert blaues Licht mit einer Wellenlänge von 494 nm und emittiert grünes Licht mit einer Wellenlänge von 521 nm, welches vom Detektor erfasst wird. Im Verlauf der Reaktion nimmt die Stärke des Lichtsignals mit zunehmender DNA-Menge zu, bis die vorab festgelegte Schwelle für die Signalstärke erreicht wird. Der Ct-Wert gibt die Anzahl der Replikationszyklen an, in deren Verlauf die zuvor beschriebenen Vorgänge stattfinden. Die Schwelle wird so festgelegt, dass sie sich am untersten Punkt des linearen Bereichs der Signalstärke-Kurve befindet (**Abb. 4**).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass ein niedriger Ct-Wert eine geringe Anzahl an Replikationszyklen erfordert und eine hohe Genexpression impliziert.

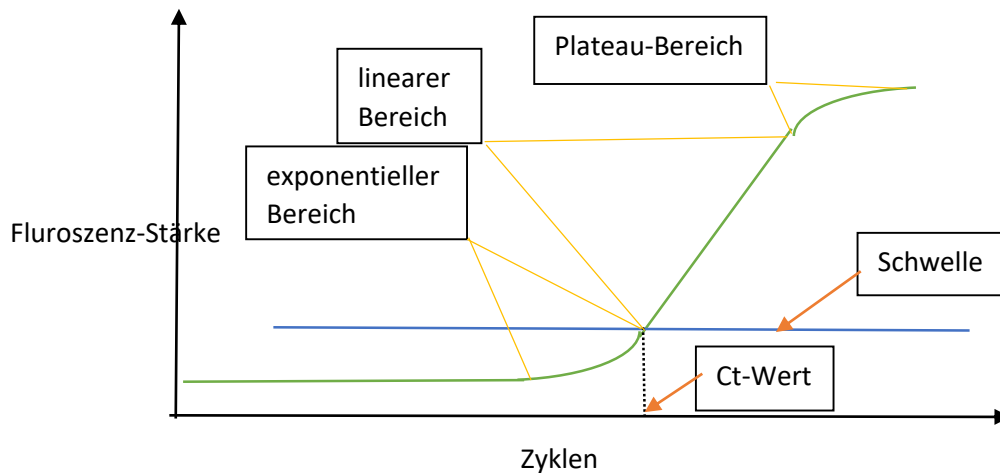


Abb. 4: Die Fluoreszenz-Kurve einer qPCR. Die Kurve der Fluoreszenzstärke lässt sich in drei Phasen unterteilen. Initial exponentieller Anstieg, dann linearer Anstieg, und dann Plateaubereich. Die Festlegung der Schwelle erfolgt im untersten Punkt des linearen Bereichs, wobei die Anzahl der Zyklen, bei denen die Kurve die Schwelle erreicht, als Ct-Wert definiert wird. Eigene Darstellung.

2.6.2 Probegewinnung und RNA-Isolation

Die Zellen wurden gesplittet und mit einer Konzentration von 1×10^5 Zellen pro Mikroliter Kulturmedium in 10-cm-Petrischalen ausgesät. Jede Petrischale enthielt 7 ml Kulturmedium, was einer Gesamtzahl von 7×10^5 Zellen pro Schale entsprach.

Nach der Aussaat der Zellen in die Kulturmedien wurde eine 24-stündige Ruhephase eingelegt, bevor die Chemikalien appliziert wurden. Die Konzentrationen der Chemikalien wurden gemäß den Angaben in Abschnitt 3.1 festgelegt.

Nach Abschluss der Behandlungen wurden die Zellen mit einem Zellschaber von der Petrischale abgeschabt und in 700 μ l QIAzol-Lysereagenz geladen. Anschließend wurde die Mischung mit einem Volumen von 90 μ l Chloroform vermischt. Im Anschluss wurden die Proben bei einer Temperatur von 4 °C und einer Zentrifugationsgeschwindigkeit von 800 x g für einen Zeitraum von 30 Minuten zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden 350 μ l der oberen, klaren Schicht der zentrifugierten Proben zusammen mit 350 μ l Ethanol in *RNeasy MinElute Spin Columns* übertragen. Die nachfolgenden Schritte wurden in Übereinstimmung mit dem Protokoll des RNeasy-Kits durchgeführt.

2.6.3 cDNA-Synthese

Die Konzentration der RNA in den Proben wurde mit dem NanoDrop 2000 erfasst und auf den gleichen Konzentrationswert verdünnt. Die gleich konzentrierten Proben wurden zusammen mit dem *Master-Mix*, in ein Reaktionsgefäß auf Eis pipettiert (**Tabelle 4**). Als negative Kontrolle wurde bei jeder cRNA-Synthese eine Probe ohne Reversetranskriptase (negative RT) eingesetzt, um sicherzustellen, dass die RNA-Proben frei von DNA sind.

Tabelle 4: Die Zusammensetzung von *Master-Mix* für cDNA-Synthese. (RT: reverse Transkription)

Bestandteil von <i>Master-Mix</i>	Volumen für Versuchsproben (μl)	Volumen für negative RT (μl)
10x RT Buffer	3	3
25x dNTP Mix	1,2	1,2
10x RT Random Primers	3	3
Reverse Transkriptase	1,5	0
Nukleasen-freies Wasser	6,3	7,8
RNA-Probe	15	15

Das Gemisch wurde dann in dem PCR-Thermocycler unter folgendem Programm in cDNA synthetisiert (**Tabelle 5**).

Tabelle 5: Das Temperaturchema der cDNA-Synthese.

Temperatur	Zeit
25°C	10 Minuten
37°C	90 Minuten
37°C	30 Minuten
85°C	5 Minuten
16°C	Hold

2.6.4 quantitative PCR

Die cDNA-Proben wurden jeweils mit einer Menge von 1 µl in jedes *Well* der qPCR-Platte auf Eis pipettiert. Im Anschluss wurde eine 19-µl-Lösung aus *Master-Mix*, bestehend aus *SYBR-Green*, ddH₂O und Primer, hinzugefügt, sodass sich ein Gesamtvolumen von 20 µl pro *Well* ergab (**Tabelle 6**). Die Zusammensetzung des *Master-Mixes* ist primer-abhängig und lautet wie folgt:

Tabelle 6: Die Zusammensetzung von *Master-Mix* für qPCR.

Bestandteil von <i>Master-Mix</i>	Volumen jeder Welle (µl), für Primer aus Biomol/Origen	Volumen jeder Welle (µl), für Primer aus Qiagen
SYBR-Green	10	10
Primer	0,25	1
Nukleasen-freies Wasser	8,75	8

Zur Verifizierung der DNA-Freiheit des *Master-Mixes* wurde bei jedem *Master-Mix* eine *No Template Control* (NTC) als negative Kontrolle durchgeführt. In diesem Zusammenhang wurde ein Volumen von 1 µl der cDNA-Probe durch ein Volumen von 1 µl nukleasefreiem Wasser ersetzt.

Im Anschluss wurde die Platte mit einer Folie versiegelt, kurz zentrifugiert und sodann in den Automaten für den Lauf eingelegt. Das Laufschemata ist in **Tabelle 7** dargestellt:

Tabelle 7: Laufschemata der qPCR.

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (Sekunden)	Zyklen
Initiation	95	180	1
Denaturierung	95	10	45
Glühen, Elongation, Ablesen	60	60	

2.6.5 Auswertung

Die relative Genexpressionsstärke der Zellen, welche einer Intervention unterzogen wurden, wurde im Vergleich zur Kontrollgruppe als *Fold-Change* dargestellt. Die Berechnung erfolgte gemäß folgender Formel:

$$\Delta Ct = Ct_{\text{getester Primer}} - Ct_{\text{GAPDH}}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{Probe}} - \Delta Ct_{\text{Kontrolle}}$$

$$\text{Fold Change} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

2.7 Proteinanalyse

Im Rahmen der Untersuchung genetischer Expressionsveränderungen auf Proteinebene wurde eine Western-Blot-Proteinanalyse durchgeführt. Die Proteine wurden sowohl aus ECs als auch aus VSMCs isoliert und mittels Gelelektrophorese basierend auf ihrem Molekulargewicht getrennt. Im Anschluss wurden die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran übertragen, wo sie durch Bindung mit primären Antikörpern nachgewiesen wurden. Im Anschluss wurden die primären Antikörper mit sekundären Antikörpern inkubiert, wodurch in Verbindung mit dem Clarity Western ECL-Substrate chemilumineszente Signale erzeugt wurden. Die Intensität dieser Signale korrelierte mit der Menge des in der Probe enthaltenen Proteins. Die erzeugten Signale wurden durch ein Imaging-System erfasst und im Anschluss einer Quantifizierung unterzogen.

Die Proteine, deren genetische Expression in der qPCR signifikant verändert war, wurden einer quantitativen Analyse unterzogen. In Anlehnung an die Ergebnisse der quantitativen PCR (siehe Abschnitt 3.3) wurden für das vorliegende Proteinassay die folgenden Antikörper eingesetzt:

Zelllinie	Antikörper
EC	ICAM-1
VSMC	Kollagen Typ III (COL3A1), Elastin (ELN), Tissue-Inhibitor of Metalloproteinase-2 (TIMP2)

Des Weiteren wurde β -Aktin, welches von beiden Zellarten translatiert wird, als Housekeeping-Antikörper eingesetzt. Dies diente der Normalisierung der Auswertung hinsichtlich der gemessenen Bandstärke der Versuchsgruppe.

2.7.1 Proteinisolation

Die Zellen wurden in einer Dichte von 1×10^5 Zellen pro Mikroliter Kulturmedium in 10-cm-Petrischalen ausgesät. Jede Petrischale wies ein Volumen von 7 ml Kulturmedium auf, was einer Gesamtzahl von 7×10^5 Zellen pro Schale entsprach. Im Anschluss an die Aussaat wurden die Zellen für die Dauer von 24 Stunden unbehandelt belassen, bevor sie einer weiteren Behandlung mit den Chemikalien über einen Zeitraum von ebenfalls 24 Stunden unterworfen wurden. Die Konzentrationen der Chemikalien wurden gemäß den Angaben in Abschnitt 3.1 festgelegt.

Nach der Behandlung wurden die Zellen mit einem Zellschaber von der Petrischale in 120 μ l RIPA-Puffer abgeschabt und in Eppendorf-Reaktionsgefäße mit Metallkugeln

geladen. Zur Lyse der Zellen wurden die Reaktionsgefäße mit den Metallkugeln in den Tissue-Lyser gegeben und drei Mal mit einer Frequenz von 50 Hz für jeweils 15 Sekunden geschüttelt. Anschließend wurden die Proben bei 4 °C mit einer Rotationsgeschwindigkeit von 13.000 rpm für 30 Minuten zentrifugiert, woraufhin der Überstand in frische Reaktionsgefäße übertragen wurde. Für die Messung der Proteinkonzentration wurden 20 µl der Proben verwendet, während das restliche Volumen mit dem Protease-Inhibitor im Verhältnis 1:10 gemischt und bei -80 °C für bis zu acht Wochen gelagert wurde.

2.7.2 Messung der Proteinkonzentration

Die Messung wurde mittels Bradford-Assay durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden 980 µl Bradford-Reagenz mit entweder 20 µl Proteinprobe oder 20 µl RIPA-Puffer als blanke Referenz vermischt. Die gesamte Lösung wurde in Küvetten geladen und mit dem Spektralphotometer NANODROP 2000c vermessen. Infolge der erfolgten Messungen wurden die Proben unter Zugabe des RIPA-Puffers auf eine homogene Proteinkonzentration verdünnt.

2.7.3 Elektrophorese und Westernblot-Analyse

Die Elektrophorese wurde unter Verwendung eines SDS-Polyacrylamid-Gels durchgeführt. Das Gel lässt sich in zwei Bestandteile gliedern: das Sammelgel und das Trenngel. Im Sammelgel erfolgt eine Anreicherung der Proteine auf einer Ebene, während im Trenngel eine Separation der Proteine nach ihrem Molekulargewicht erfolgte. Die beiden unterscheiden sich im Anteil des Polyacrylamids. Eine Übersicht über die Zusammensetzung beider Gele findet sich in **Tabelle 8**.

Tabelle 8: Die Zusammensetzung vom Sammelgel und Trenngel.

Zutaten	Sammelgel	Trenngel
Acrylamid	2,25 ml	12,0 ml
VE-Wasser	8,82 ml	10,35 ml
TEMED	14,99 µl	14,99 µl
10% APS	149,9 µl	149,9 µl
Puffer	3,78 ml Upper-Puffer	7,47 ml Lower-Puffer

Das erstarrte Gel wurde in der Halterung montiert und anschließend in einen Laufpuffer eingetaucht.

Des Weiteren wurde eine Denaturierung der Proteinproben vorgenommen. Ein Volumen von 22,5 µl jeder Proteinprobe wurde entnommen und mit 7,5 µl 4x Lämmli-Puffer in einem Eppendorf-Reagenzgefäß gemischt. In der Folge wurde die Mischung für zehn Minuten auf 95 °C erhitzt, um die Proteine zu denaturieren.

Im Anschluss wurden die denaturierten Proteinproben sowie der Marker *PageRuler Prestained Protein Ladder* in das Gel geladen. Der PageRuler ermöglicht die Darstellung der Höhe bestimmter molekularer Gewichte auf dem Gel mithilfe von sichtbaren Bändern. Die Konzentration der Proteine erfolgte zunächst durch Elektrophorese mit einer elektrischen Spannung von 90 V für 10 Minuten im Sammelgel. Im Anschluss wurden sie mit 120 V für 90–120 Minuten im Trenngel nach ihren molekularen Gewichten getrennt.

Im Anschluss an die Elektrophorese erfolgte eine Übertragung der Proteine vom Gel auf eine Nitrozellulosemembran. In diesem Prozess erfolgte die Platzierung des Gels sowie der Nitrozellulosemembran in der mit 1 x Blotting-Puffer gefüllten Blotting-Kammer, gefolgt von der Anlage eines Stroms von 0,8 A für 30 Minuten.

Im Anschluss erfolgte eine einstündige Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen an der Membran mittels Blotto B, während gleichzeitig die ersten Antikörper vorbereitet wurden. Die Antikörper wurden jeweils mit Blotto B verdünnt. In der Folge wurde die Membran über Nacht bei einer Temperatur von 4 °C mit den verdünnten ersten Antikörpern inkubiert.

Nach einer dreimaligen Waschung mit 1x TBS-Puffer erfolgte eine Inkubation der Membran bei Raumtemperatur über den Zeitraum einer Stunde mit dem sekundären Antikörper.

Im Anschluss an die Inkubation mit dem sekundären Antikörper erfolgte eine erneute Waschung der Membran mit 1x TBS-Puffer. Im nächsten Schritt wurde das Clarity Western ECL-Substrate gemischt und ein Milliliter davon für jede Membran verwendet. Nach der zehnminütigen Inkubation wurden die Signale unter Verwendung des Imaging-Systems und des Programms ImageLab detektiert, dokumentiert und ausgewertet.

Um die Signalstärke jeder Probe zu normalisieren, wurde ein Antikörper gegen β-Aktin als Housekeeper eingesetzt. Die Membran wurde über Nacht bei 4 °C mit diesem Antikörper inkubiert und am darauffolgenden Tag nach einer dreimaligen Waschung

unter Verwendung des Imaging-Systems abfotografiert. Die Auswertung wurde mit dem Programm ImageJ durchgeführt, wobei die Signalstärke anhand der zuvor vorgenommenen Normierung ermittelt wurde.

2.7.4 Zusammensetzung der angewendeten Puffer

10x Blotting-Puffer	Tris base	145,6 g
	Glycin	71,3 g
	SDS	9,25 g
	VE-Wasser	Ad 500 ml
1x Blotting-Puffer	10x Blotting-Puffer	25 ml
	VE-Wasser	175 ml
	Methanol	50 ml
Blotto B	TBST 0,1%	100 ml
	Milchpulver	1g
	BSA	1g
10x Protease-Inhibitor	10mM Tris-HCL	10 ml
	500mM NaCl	12,5 ml
	10mM EDTA	2 ml
	10mM DTT	0,154 g
	Glycerin	20 ml
	BSA	10 mg
	VE-Wasser	Ad 100 ml
4x Lämmli-Puffer	SDS	8 g
	1M Tris-HCL	2 ml
	Glycerol	40 ml
	β-Mercaptoethanol	8 ml
	Bromophenol blue	0,3 g
	VE-Wasser	Ad 100 ml
Lower-Puffer	1,5M Tris base	90,885 g
	VE-Wasser	Ad 400 ml
	0,4% SDS	2 g

RIPA-Puffer	VE-Wasser	44,875 ml
	4M NaCl	1,875 ml
	1% IGEPAL	0,5 ml
	20% SDS	250 µl
	1M Tris pH8,0	2,5 ml
10x Laufpuffer	Glycin	142,4 g
	Tris base	30,3 g
	SDS	10g
	VE-Wasser	Ad 1000 ml
10x TBS	Tris base	24,2g
	NaCl	80g
	VE-Wasser	800 ml
	37% HCl	ca.13 g, bis pH7,4 erreicht
	VE-Wasser	Ad 1000 ml
0,1% TBST	10x TBS	25 ml
	VE-Wasser	225 ml
	Tween 20	250 ml
Upper-Puffer	0,5M Tris base	30,285 g
	4% SDS	20 g
	VE-Wasser	Ad 500 ml

2.8 MMP-Assay

Die katalytische Wirkung einer Enzymklasse kann in zwei Aspekten betrachtet werden: der Enzymmenge und der Enzymaktivität. In vorangehenden Experimenten, darunter qPCR und Westernblot-Analyse, wurde die Menge der Matrixmetalloprotease jeweils auf der Ebene der genetischen Expression und der Proteintranslation bestimmt. Im Rahmen dieses Experiments wurde ein besonderes Augenmerk auf die Aktivität von MMP-2 gelegt. Zur Durchführung der Untersuchung wurde das *MMP Activity Assay Kit (Fluorometric – Green)* verwendet.

2.8.1 Probevorbereitung

Die VSMCs der dritten Passage wurden auf eine spezielle 96-Wellen-Platte für Fluorometrie aufgeteilt, wobei jeweils 1×10^4 Zellen und 100 μl Kulturmedium pro Well vorgesehen sind. Für jede Bedingung wurde die Durchführung von sechs Replikaten umgesetzt. Nach einem Zeitraum von 24 Stunden erfolgte eine weitere Behandlung der Zellen mit den fünf Chemikalien über einen Zeitraum von ebenfalls 24 Stunden. Die Konzentrationen der Chemikalien wurden gemäß den Angaben im Abschnitt 3.1 gewählt.

2.8.2 Detektion der MMP-Aktivität

Die Detektion wurde gemäß dem vom Hersteller bereitgestellten Protokoll durchgeführt.

Zu diesem Zweck wurde das Kulturmedium abgesaugt und durch 25 μl Assay-Puffer ersetzt. Zur Kontrolle des Assay-Buffers wurden weitere sechs *Wells* ohne Zellen mit jeweils 25 μl des genannten Lösungsmittels befüllt. Im Anschluss wurden 25 μl der 2x *APMA Working Solution* hinzugefügt, sodass das Gesamtvolumen in jedem *Well* 50 μl beträgt. Anschließend wurde die Mischung bei einer Temperatur von 37 °C für eine Stunde inkubiert, um die Aktivierung von MMP-2 zu induzieren. Zur Kontrolle der *APMA Working Solution* wurden weitere sechs *Wells* mit jeweils 50 μl Assay-Buffer ohne *APMA Working Solution* befüllt.

Nach der Inkubation wurde pro *Well* 50 μl von *Working Solution* mit verdünntem *MMP Green Substrate* hinzugefügt und für weitere 45 Minuten unter Raumtemperatur inkubiert. Die Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von 485 nm (Anregung) und 525 nm (Emission).

2.9 Analyse der histologischen Bilder muriner Aorten nach E-Zigaretten-Exposition

Als Teil dieser Arbeit wurden zudem vorliegende Bilder von histologischen Schnitten von murinen Aorten analysiert, welche im Rahmen eines Kollaborationsprojekts gewonnen wurden. In dieser Arbeit wurden in den entsprechenden Bild-Dateien eine Elastin-Quantifizierung der histologischen Schnitte vorgenommen. Die tierexperimentellen Arbeiten und histologische Gewebeaufarbeitung selbst waren nicht Teil dieser Arbeit. Zum besseren Verständnis und Interpretation der Daten wird der genaue Versuchsaufbau dennoch entsprechend dargelegt, um die Ergebnisse der Bildanalyse in den entsprechenden Kontext zu rücken.

2.9.1 Probegewinnung für histologischen Bilder

Die Versuche an Tieren sowie die Anfertigung der histologischen Präparate wurden ausschließlich an der Stanford University in den USA durchgeführt. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Analyse der so entstandenen histologischen Schnittbilder.

Die Protokolle aller Tierexperimente wurden vom "Administrative Panel on Laboratory Animal Care at Stanford University" (<http://labanimals.stanford.edu>) bzw. vom "VA Institutional Animal Care and Use Committee" genehmigt und entsprachen den Richtlinien der "National Institutes of Health" und des "U.S. Department of Agriculture" für die Haltung und Verwendung von Tieren in der Forschung (Protokollnummer: TSA1819). Die Versuche wurden an C57BL/6J-Mäusen durchgeführt, welche vom Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) erworben wurden. Für die Dauer von drei Wochen wurden männliche 6- und 14-Wochen alte C57BL/6J-Mäuse täglich E-Zig-Dampf mithilfe des *SciReq InExpose system* (SCIREQ, Montreal, Kanada) ausgesetzt. Das verdampfte E-Liquid hatte eine Zusammensetzung von einer Nikotinmenge von 24 mg/ml mit/oder 50 % Propylenglykol, 50 % pflanzlichem Glycerol auf. Die Exposition der Tiere erfolgte durch Inhalation von E-Zig-Dampf über einen Zeitraum von 60 Minuten pro Tag für insgesamt drei Wochen, wobei die Expositionsdauer neun Sekunden pro Minute betrug. Die verwendete E-Zig war ein Gerät der dritten Generation mit einem temperaturkontrollierten Erhitzer, dessen Temperatur auf 230 °C eingestellt wurde. Die Kontrollgruppe wurde für den gleichen Zeitraum wie die Versuchsgruppe in das *SciReq InExpose System* gesetzt, allerdings wurde ihnen ausschließlich Raumluft zugeführt.

Nach Ende der Expositionszeit wurden die Tiere gemäß dem Protokoll terminiert und die Aorta mit kalter Kochsalzlösung durch Herzpunktion gespült. Im Anschluss wurden die thorakalen und infrarenalen Segmente in 4 % Paraformaldehyd überführt und für 24 Stunden inkubiert. Im nächsten Schritt erfolgte die Kryoschutzbehandlung in 25 % Saccharose in PBS für ebenfalls 24 Stunden. Danach wurden die Proben für weitere 24 Stunden in 50 % Saccharose in PBS eingelegt. Schließlich wurden die Proben in ein optimales Schneidetemperatur-Medium (OCT-Medium, Tissue-Tek) eingebettet. Im Anschluss wurden Kryoschnitte mit einer Dicke von 7 µm systematisch gesammelt und gemäß dem Standardprotokoll für die Färbung mit Hämatoxylin-Eosin und Elastica Van Gieson behandelt. Die histologischen Schnitte wurden in verschiedenen Vergrößerungen fotografiert und die Bilder für die weitere Analyse übermittelt.

2.9.2 Auswertung der histologischen Bilder

Im Folgenden wurde die relative Menge der Elastinfasern in einem zweidimensionalen histologischen Bild definiert. Dazu wurde das Verhältnis zwischen der Fläche der Elastinfasern und der Gesamtfläche des Schnittes herangezogen. Zur automatischen Darstellung der Fläche in Pixeln wurde das Plug-in "Colour Deconvolution" von ImageJ verwendet. Die Trennung verschiedener Strukturen erfolgte anhand ihrer unterschiedlichen Rot-Grün-Blau- (RGB-)Werte, welche durch die Färbung dargestellt wurden. Das Plug-in beinhaltet bereits eine Auswahl an Vektoren für einige gängige Färbungen, wie beispielsweise HE und Giemsa. Allerdings war der Vektor für die Elastika-Färbung, in diesem Kontext erforderlich war, noch nicht inkludiert. Zur Bestimmung des Vektors wurde die Option "from ROI" gewählt. Die Auswahl von zwei bis drei Farben ermöglichte die Anzeige der RGB-Werte. Die Werte wurden in den Source-Code des Plug-ins integriert und basierend auf dem neu bestimmten Vektor wurden die Bilder getrennt. Im vorliegenden Beispiel wurden die Farben der Elastinfasern sowie des umliegenden Gewebes ausgewählt. Ein exemplarisches Beispiel ist in **Abbildung 5** dargestellt.

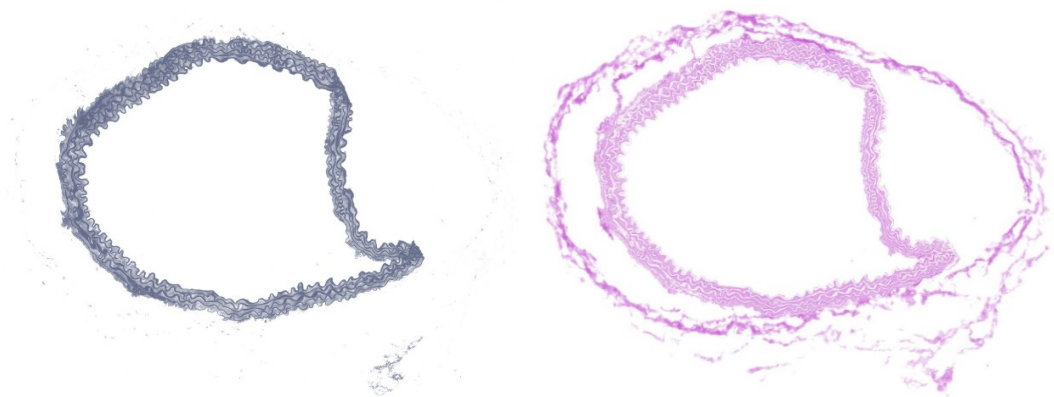


Abb. 5: Ein Beispiel von einem farbegetrennten histologischen Bild der Maus-Aorta. Die linke Seite zeigt lediglich die Strukturen, deren gefärbte Elastinfasern den gleichen RGB-Wert aufweisen. Der übrige Teil dieses histologischen Schnittes ist auf der rechten Seite zu sehen.

Allerdings wurde gemäß **Abbildung 5** auch Hintergrundrauschen erfasst. Um präzisere Messungen zu ermöglichen, wurde an dieser Stelle eine Messungsschwelle manuell mittels der Threshold-Funktion von Image J definiert. Die Erfassung erfolgte ausschließlich für diejenigen Bereiche, deren Farbstärke die festgelegte Schwelle überschreitet. Der in **Abbildung 6** dargestellte Prozess veranschaulicht diesen Vorgang.

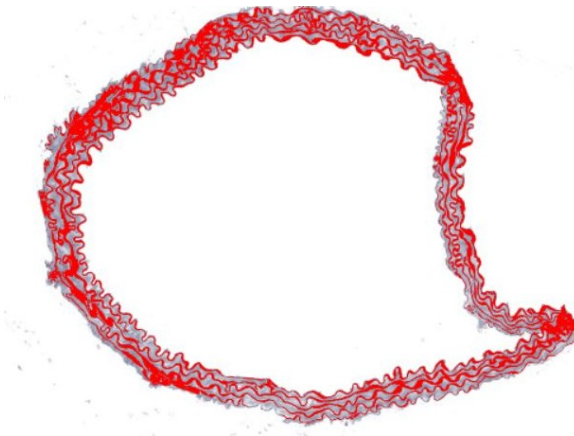


Abb. 6: Manuell gesetzte Messungsschwelle. Die Messungsschwelle wurde so eingestellt, dass lediglich der rot markierte Teil, d. h. die Elastinfasern ohne Hintergrundrauschen, erfasst wird.

Die erfassten Flächen wurden letztendlich in Weiß und der Hintergrund in Schwarz dargestellt. Die Pixelanzahl in den weißen Flächen, somit die Größe der zu messenden Areale, wurde mithilfe der Messfunktion des Programms Image J ermittelt (**Abb. 7**)

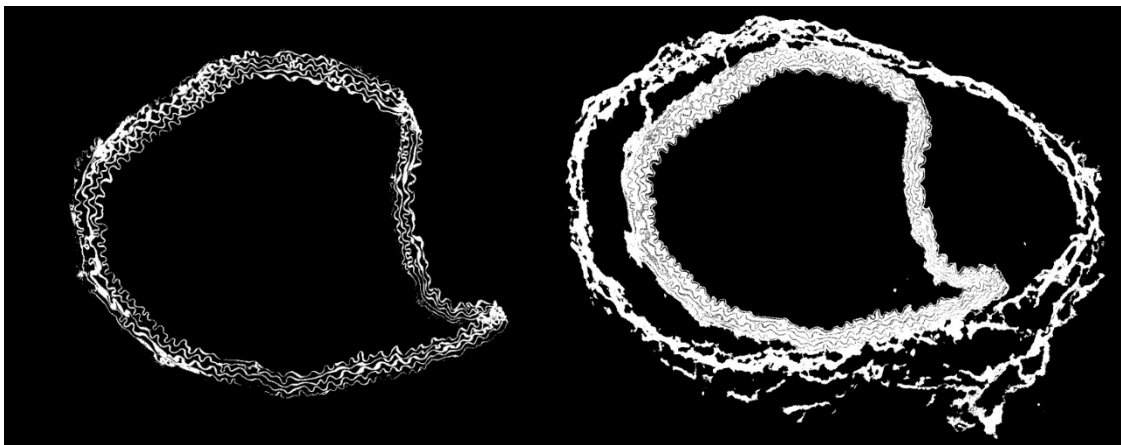


Abb. 7: Areale, die die Schwelle überschreiten und gemessen werden. Die weißen Areale wurden unter Zuhilfenahme einer Pixelmessung quantifiziert, woraus sich der Anteil der Elastinfasern berechnen ließ.

Die ermittelten Ergebnisse dienen der Berechnung des Verhältnisses zwischen Elastinfasern und der gesamten Schnittfläche, um auf diese Weise die relative Menge an Elastin abzuschätzen.

3 Ergebnisse

3.1 Zellviabilitätsassay

Aus der Literatur ließen sich keine verlässlichen Konzentrationsmengen der untersuchten Chemikalien nach E-Zig Konsum ableiten. Zur Untersuchung in einem *in vitro* Setting galt es zu beachten, dass eine zu hohe Konzentration der Chemikalien zu vermehrten Zelluntergang führen kann, wodurch die Erforschung der zellulären Reaktion beeinträchtigt würde, während eine zu niedrige Konzentration innerhalb kurzer Expositionszeiträume (24 Stunden) keine signifikanten zellulären Reaktionen zur Folge haben könnte. Zur Ermittlung der optimalen Konzentration für jede Chemikalie wurde daher zunächst ein Zellviabilitätsassay mit WST-1 durchgeführt. Die nachfolgenden **Abbildungen 8 bis 12** illustrieren die Zellviabilität jeder Zelllinie unter Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen und unterschiedlichen Chemikalien. Die optische Dichte der Kontrolle wurde in jedem Replikat als 1 definiert, sodass die Zellviabilität der Versuchsgruppen als relative optische Dichte im Vergleich zur Kontrolle dargestellt werden konnten.

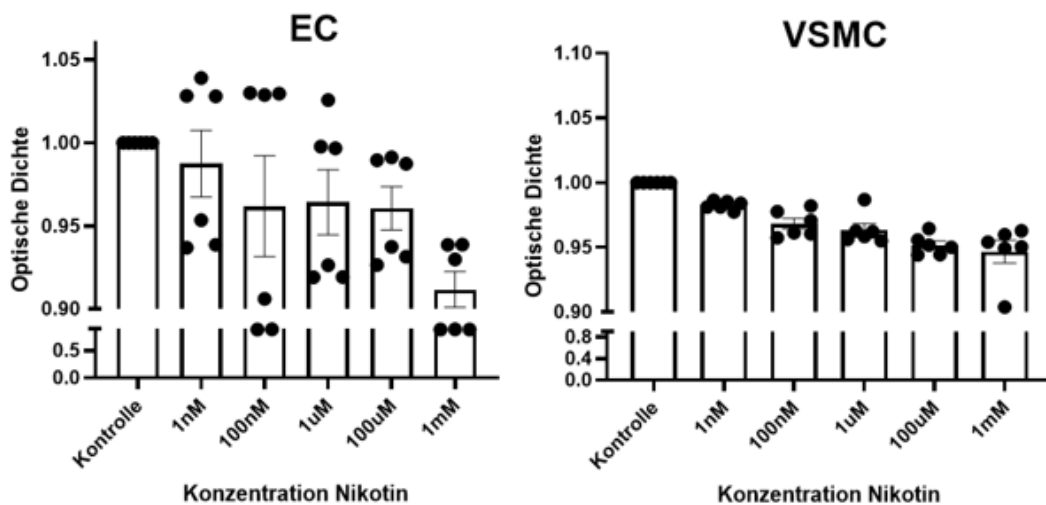


Abb. 8: Zellviabilität unter Behandlung von Nikotin in verschiedenen Konzentrationen. EC und VSMC wurden den verschiedenen Chemikalien in den genannten Konzentrationen von Nikotin für 24h ausgesetzt (n=6) und die Zellviabilität relativ zur Kontrolle bestimmt.

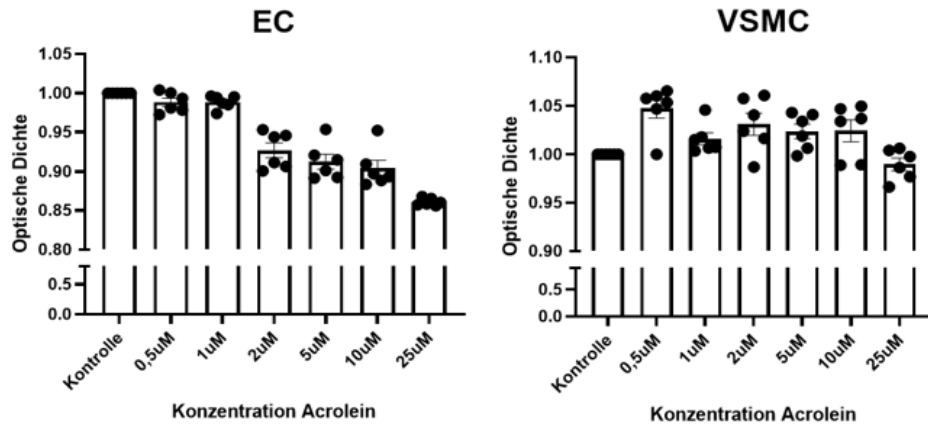


Abb. 9: Zellviabilität unter Behandlung von Acrolein in verschiedenen Konzentrationen. EC und VSMC wurden den verschiedenen Chemikalien in den genannten Konzentrationen von Acrolein für 24h ausgesetzt (n=6) und die Zellviabilität relativ zur Kontrolle bestimmt.

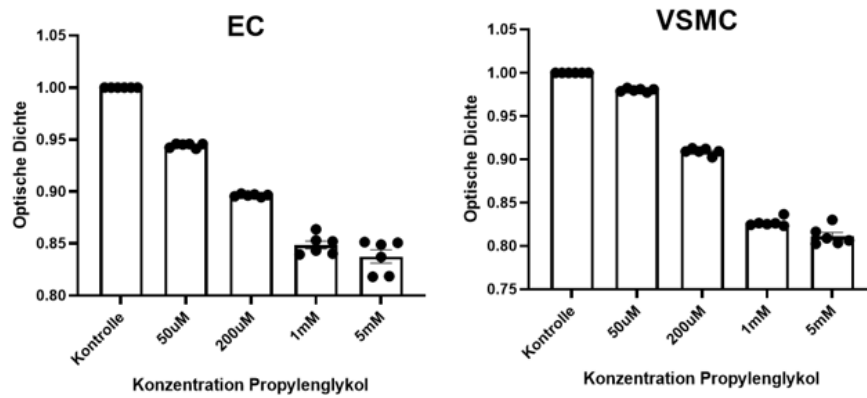


Abb. 10: Zellviabilität unter Behandlung von Propylenglykol in verschiedenen Konzentrationen. EC und VSMC wurden den verschiedenen Chemikalien in den genannten Konzentrationen von Propylenglykol für 24h ausgesetzt (n=6) und die Zellviabilität relativ zur Kontrolle bestimmt.

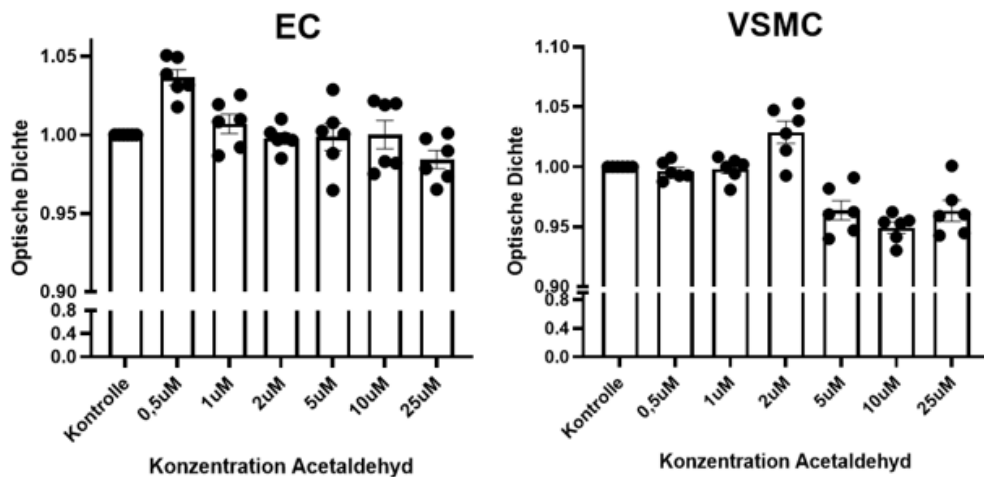


Abb. 11: Zellviabilität unter Behandlung von Acetaldehyd in verschiedenen Konzentrationen. EC und VSMC wurden den verschiedenen Chemikalien in den genannten Konzentrationen von Acetaldehyd für 24h ausgesetzt (n=6) und die Zellviabilität relativ zur Kontrolle bestimmt.

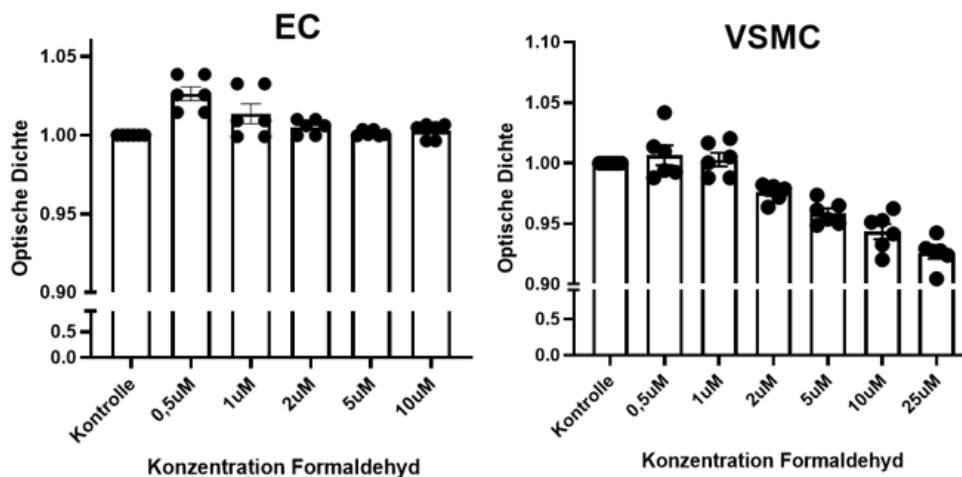


Abb. 12: Zellviabilität unter Behandlung von Formaldehyd in verschiedenen Konzentrationen. EC und VSMC wurden den verschiedenen Chemikalien in den genannten Konzentrationen von Formaldehyd für 24h ausgesetzt (n=6) und die Zellviabilität relativ zur Kontrolle bestimmt.

Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurden die Arbeitskonzentrationen der Chemikalien für die nachfolgenden Experimente definiert. Die Entscheidung über die Arbeitskonzentrationen erfolgte anhand zweier Kriterien:

1. Die Arbeitskonzentration jeder einzelnen Chemikalie sollte bei beiden Zelllinien identisch sein.
2. Die Arbeitskonzentration sollte so hoch wie möglich sein, wobei die Vitalität der Zellen unter dieser Konzentration mindestens 95 % betragen muss.

Die unterstehende Tabelle präsentiert die festgelegten Konzentrationen, die in den nachfolgenden Experimenten zum Einsatz kamen.

Chemikalie	Endgültige Konzentration
Nikotin	100 µM
Acrolein	2 µM
Propylenglykol	50 µM
Acetaldehyd	25 µM
Formaldehyd	5 µM

3.2 ROS-Assay

Die Fragestellung, ob die in E-Zig-Dampf enthaltenen Chemikalien oxidativen Stress in den Gefäßendothelzellen induzieren und somit zu einer endothelialen Dysfunktion beitragen können, wurde durch einen ROS-Assay in ECs untersucht. Der ROS-Assay wurde in acht technischen Replikaten gemäß den Empfehlungen des Herstellers durchgeführt. In den nachfolgenden Abbildungen werden die Ergebnisse der durch die Behandlung induzierten ROS (**Abb. 13**) und Superoxide (**Abb. 14**) in verschiedenen Inkubationszeiten mit *ROS/Superoxide Detection Mix* dargestellt.

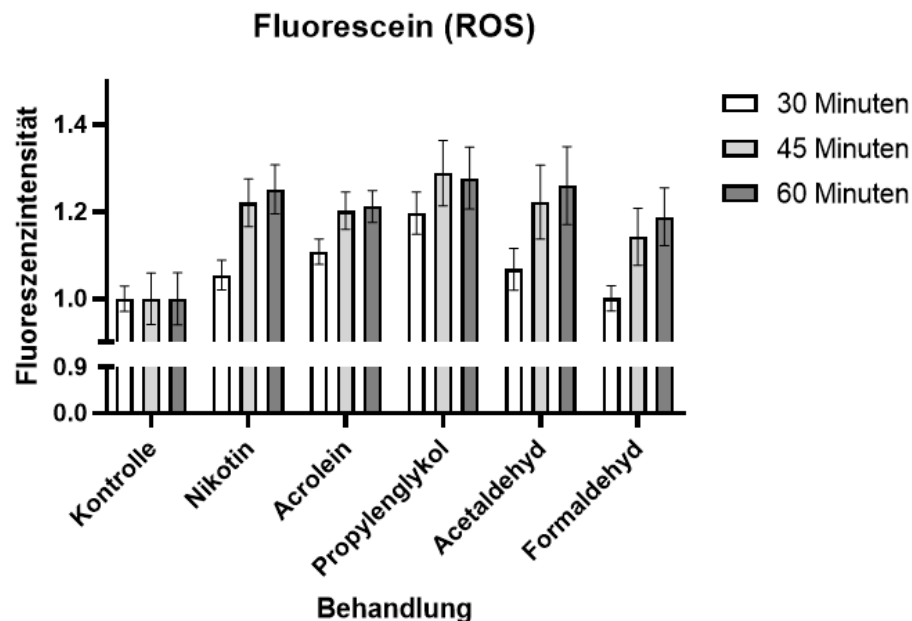


Abb. 13: Detektierte Fluorescein-Stärke mit verschiedenen Inkubationsdauer mit *ROS/Superoxide Detection Mix*. Die Fluoreszenzstärke korrelierte mit der Intensität der durch die Behandlung induzierten ROS. Bei jeder Messung wurde der Mittelwert der Kontrollgruppe als 1 definiert, sodass die Versuchsgruppen entsprechend ihrer detektierten Fluoreszenzstärke in Bezug auf die Kontrolle umgerechnet werden konnten. n=8

Hierbei zeigte sich, dass die Inkubationsdauer die Ergebnisse beeinflusst, obschon der Hersteller eine Zeitspanne zwischen 30 und 60 Minuten empfiehlt. Es wurde ein deutlicher Unterschied der gemessenen Fluoreszenzstärke zwischen den Versuchsbedingungen mit den Inkubationszeiten, die jeweils 30 und 45 Minuten betragen, festgestellt. Aus diesem Grund erfolgte die Auswertung auf Basis der Ergebnisse der Versuchsbedingung mit einer 45-minütigen Inkubation. Die Ergebnisse zeigten, dass die Behandlungen mit allen Chemikalien zu einer etwa 1,2-fachen Induktion von ROS im Vergleich zur Kontrolle führten.

Rhodamin (Superoxide)

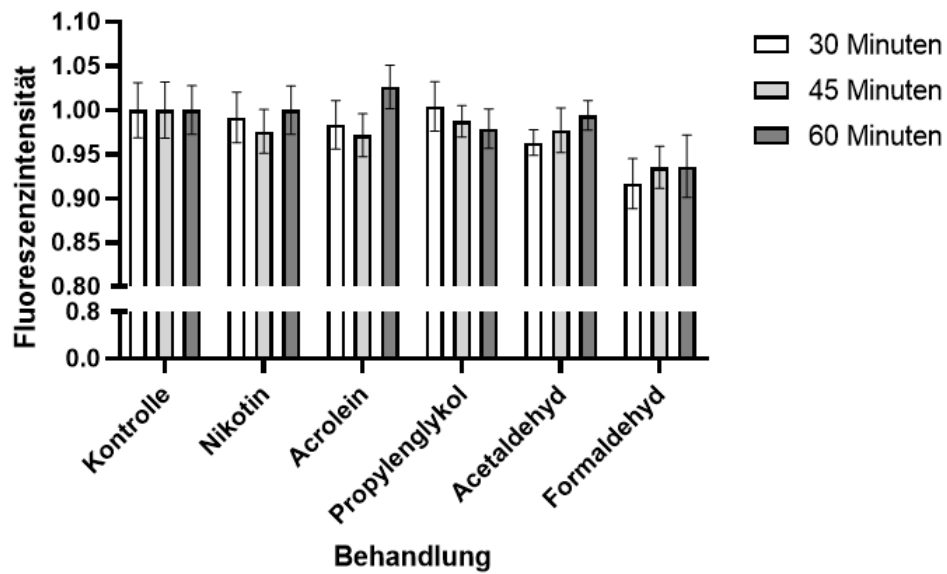


Abb. 14: Detektierte Rhodamin-Stärke mit verschiedenen Inkubationsdauer mit *ROS/Superoxide Detection Mix*. Die Rhodaminstärke korrelierte mit der Intensität der durch die Behandlung induzierten Superoxide. Bei jeder Messung wurde der Mittelwert der Kontrollgruppe als 1 definiert, sodass die Versuchsgruppen entsprechend ihrer detektierten Rhodaminstärke in Bezug auf die Kontrolle umgerechnet werden konnten. n=8

Im Vergleich zu Fluroscein ließ sich bei Rhodamin kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Inkubationszeiten sowie zwischen der Kontrollgruppe und den Versuchsgruppen feststellen.

3.3 Quantitative Polymerasen-Kettenreaktion

Die vorliegenden Untersuchungen zielten darauf ab, die biologischen Auswirkungen der VSMCs und ECs bei Exposition mit E-Zig-Dampf abzuschätzen. Zu diesem Zweck wurden die durch die Behandlung mit den fünf Chemikalien induzierten Expressionsveränderungen mittels quantitativer qPCR analysiert.

3.3.1 Expressionsveränderungen der glatten Muskelzellen

Im Rahmen der durchgeführten Experimente wurde zunächst die Expression der Gene in VSMCs analysiert, welche eine wesentliche Rolle bei der Bildung und Umgestaltung der extrazellulären Matrix in der Tunica media spielen. Die Genexpression von ELN zeigte sich unter den Behandlungen mit sämtlichen fünf Chemikalien im Vergleich zur Kontrolle vermindert. (Abb. 15 A) Gleichzeitig wurde eine signifikant erhöhte Expression von COL3A1 nach Nikotin Behandlung festgestellt, wobei sich nach Acrolein Exposition eine signifikant reduzierte Expression zeigte. Die Versuchsgruppe, die gegenüber Propylenglykol, Acetaldehyd und Formaldehyd exponiert wurden, zeigte keine statistisch signifikanten Veränderungen der Genexpressionen (Abb. 15 B).

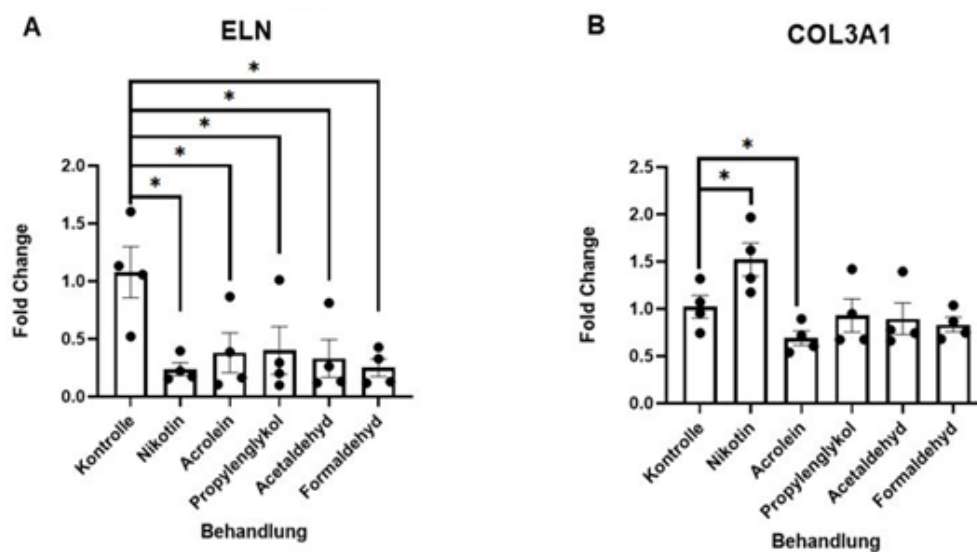


Abb. 15: Die Expressionsveränderungen von Elastin und Typ-III-Kollagen, durch die Behandlungen der 5 Chemikalien. (A) Die durchschnittlichen Fold-Changes von Elastin (ELN) zeigten bei allen Behandlungen einen Wert von unter 0,5, was auf eine signifikante Reduktion der Expression hindeutet. (B) Die Expressionsveränderungen des Typ-III-Kollagens (COL3A1) manifestierten sich ausschließlich in Reaktion auf die Behandlung mit Nikotin und Acrolein. Allerdings zeigten sich die Veränderungen nicht einheitlich. So war die Genexpression unter der Behandlung mit Nikotin signifikant hochreguliert, während sie unter der Behandlung mit Acrolein signifikant herunterreguliert war. n=4, *: p<0,05

Im Bezug auf Proteine, die den Umbau der ECM beeinflussen, sind die MMPs sowie deren Antagonisten TIMPs, von entscheidender Bedeutung. Obgleich keine signifikante Expressionsmodulation von MMP2 festgestellt wurde, zeigte sich TIMP2 nach Behandlung mit Formaldehyd signifikant vermindert exprimiert, während nach Acrolein-Exposition eine signifikant erhöhte Expression gesehen werden konnte (**Abb. 16**).

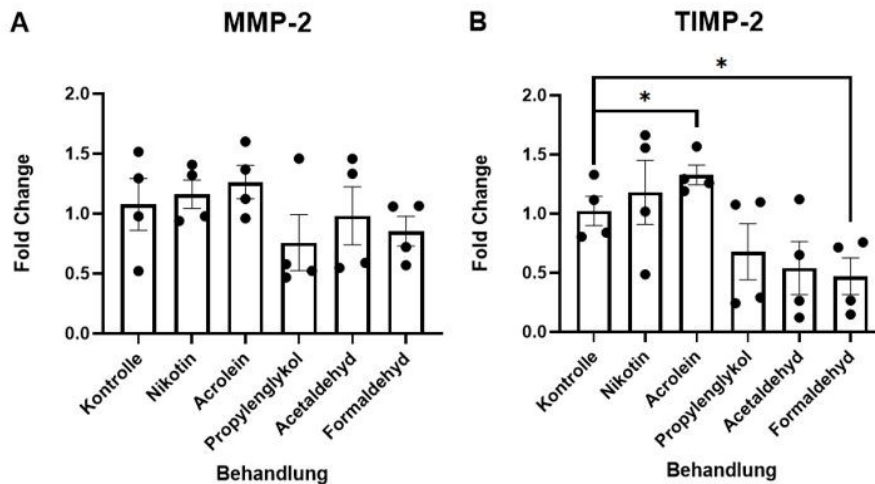


Abb. 16: Die genetischen Expressionsveränderungen von MMP-2 und TIMP-2, durch die Behandlungen der 5 Chemikalien. (A) Es konnte keine signifikanten Veränderungen der Expression von MMP-2 festgestellt werden. (B) Signifikante Expressionsveränderungen von TIMP-2 waren unter den Behandlungen mit Acrolein und Formaldehyd festzustellen. n=4, *: p<0,05

3.3.2 Expressionsveränderungen der Endothelzellen

Im Gegensatz zu VSMCs wurde bei ECs der Fokus auf die inflammatorische Regulation, sowie die Adhäsion von Immunzellen und Thrombozyten gelegt. IL-8 lockt durch die chemotaktische Eigenschaft Leukozyten an den Ort der Inflammation an. Bei den Versuchsgruppen, die gegenüber Nikotin und Acetaldehyd exponiert wurden, konnte eine signifikant erhöhte Expression von IL-8 festgestellt werden. Im Gegensatz dazu konnte keine signifikante Veränderung der Genexpression von IL-6 gesehen werden (**Abb. 17**).

Neben den proinflammatorischen Zytokinen gilt auch Andock-Proteine für Entzündungszellen Makrophagen und Leukozyten als Anzeichen für inflammatorische Reaktion. Im Rahmen dieses Experimentteils wurde P-Selektin untersucht. Dabei konnte eine leicht erhöhte Expression unter den Behandlungen mit Acetaldehyd und Formaldehyd festgestellt werden, welche jedoch nicht statistisch signifikant war (**Abb. 18**).

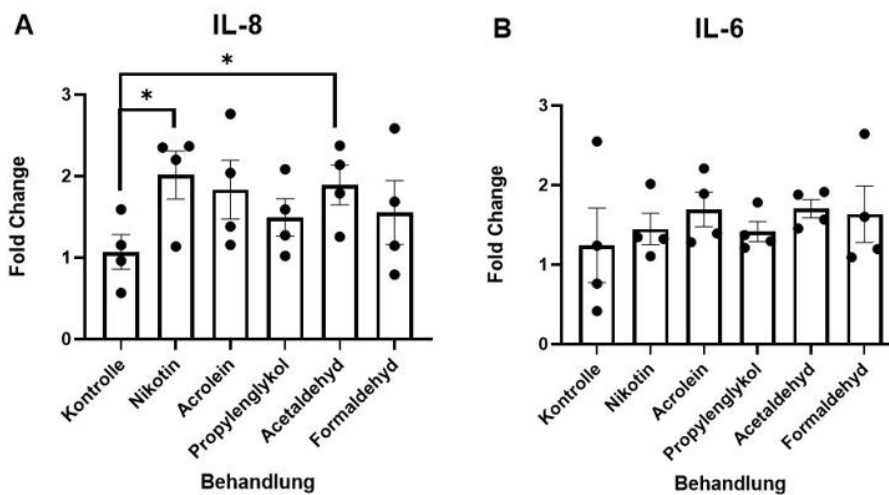


Abb. 17: Die genetischen Expressionsveränderungen von IL-8 und IL-6, durch die Behandlungen der 5 Chemikalien. (A) Unter den Behandlungen wurde eine 1,5- bis 2-fache vermehrte Expression von IL-8 beobachtet. (B) Die Expressionsveränderungen von IL-6 waren statistisch nicht signifikant, es ließ sich jedoch eine Erhöhung bei sämtlichen Versuchsgruppen im Vergleich zur Kontrolle feststellen. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse ließ sich ableiten, dass die untersuchten Chemikalien eine proinflammatorische Wirkung aufwiesen. n=4, *: p<0,05

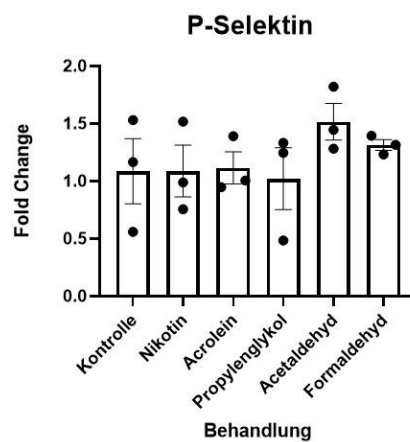


Abb. 18: Die genetischen Expressionsveränderungen von P-Selektin durch die Behandlungen der 5 Chemikalien. Unter den Behandlungen mit Acetaldehyd und Formaldehyd ließ sich eine leicht erhöhte Expression von P-Selektin beobachten, wobei beide Ergebnisse jedoch nicht signifikant waren. n=3

Weiter wurden ICAM-1 und VCAM-1 als Adhäsionsmarker für das angeborene Immunsystem und CD40 für das erworbene Immunsystem untersucht. Die Expression von ICAM-1 zeigte unter den untersuchten Chemikalien eine signifikante Erhöhung, während die Veränderungen von VCAM-1 und CD40 nicht signifikant waren (**Abb. 19**).

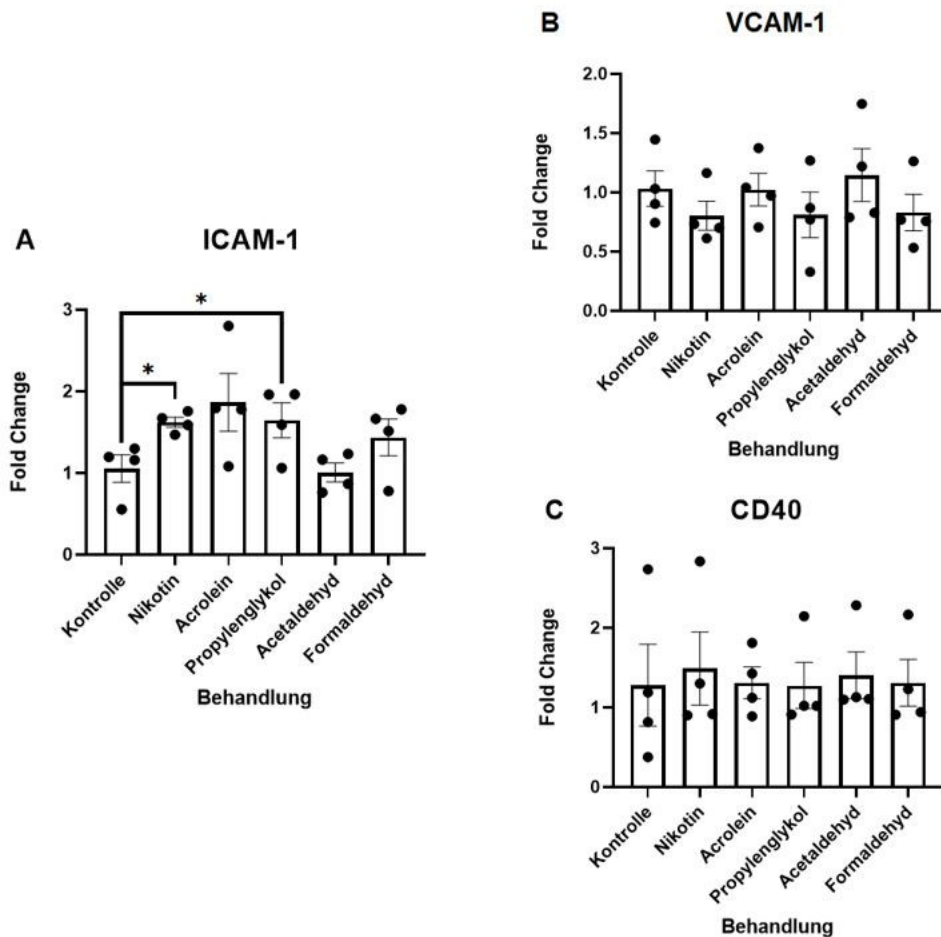


Abb. 19: Die genetischen Expressionsveränderungen von ICAM1, VCAM1 und CD40, durch die Behandlungen der 5 Chemikalien. (A) Die gesteigerte Genexpression von ICAM1 ließ sich unter allen Behandlungen, mit Ausnahme der Behandlung mit Acetaldehyd, nachweisen. (B) Die Veränderungen der Expression von VCAM1 waren nicht signifikant. (C) Die Veränderungen der Expression von CD40 waren nicht signifikant. n=4, *: p<0,05

3.4 Western-Blot-Proteinanalyse

Im Anschluss an die durchgeführte qPCR wurde eine Western-Blot-Proteinanalyse durchgeführt, um die zuvor festgestellten genetischen Expressionsveränderungen durch die genannten Behandlungen auf Proteinebene zu untersuchen. Das Ziel des Experiments war, die Proteine als funktionelle Einheit des Umbauprozesses der Gefäßwand quantitativ darzustellen.

In den nachfolgenden Abschnitten erfolgt die Präsentation der mittels ImageJ ausgewerteten Ergebnisse in relativen Mengen im Vergleich zu den Kontrollen.

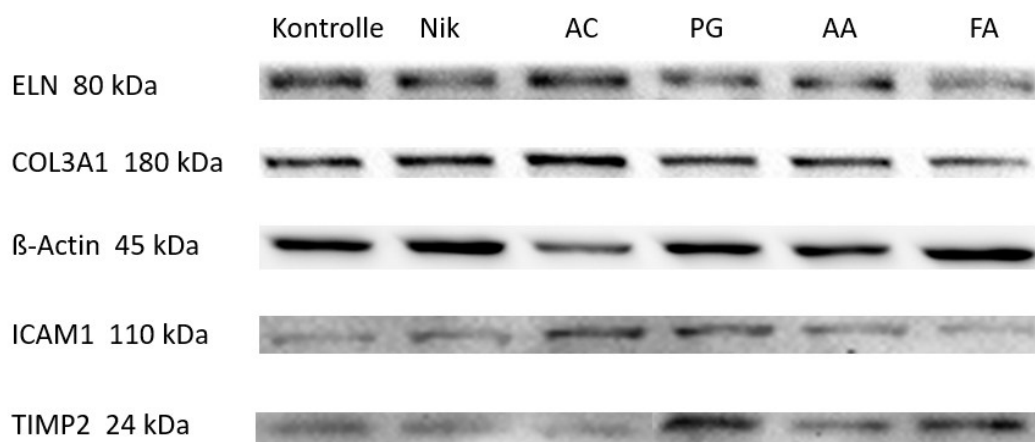


Abb. 20: Die Darstellung der zellulären Proteine mittels Western-Blot. Die Trennung der zellulären Proteine erfolgte mittels Elektrophorese nach ihrem jeweiligen molekularen Gewicht. Die Abbildung zeigt die unterschiedlichen Mengen der Proteine, die durch verschiedene Intensitäten der chemilumineszenten Signale dargestellt wurden. Im Anschluss wurden die Signale mittels ImageJ quantitativ in Graustufen ausgewertet.

3.4.1 Veränderungen der Protein-Menge bei den glatten Muskelzellen

Die Ergebnisse der qPCR zeigten, dass die Expression des Elastin-kodierenden Gens unter den untersuchten chemischen Substanzen signifikant reduziert war. Diese Tendenz konnte auch bei der Messung des Elastin-Gehalts in den VSMCs beobachtet werden, wobei die Ergebnisse bis auf die Versuchsgruppe, die mit Acrolein exponiert wurde, statistisch signifikant waren. **(Abb. 21)**

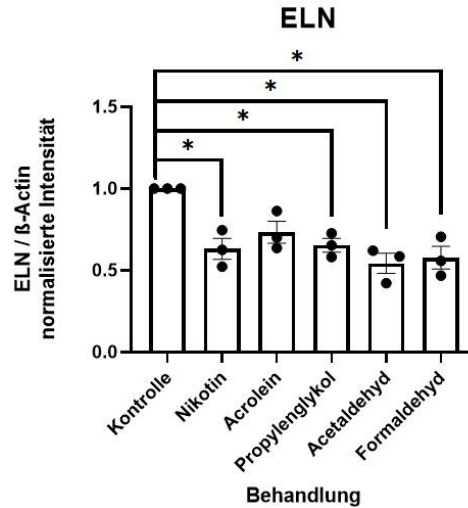


Abb. 21: Die Veränderung des Elastin-Gehalts durch die Behandlungen der 5 Chemikalien. Die Behandlung mit diversen Chemikalien führte zu einer signifikanten Reduktion von Elastin in VSMC. Die Reduktion war statistisch signifikant, mit Ausnahme der Versuchsgruppe, die Acrolein ausgesetzt war. $n=3$, *: $p<0,05$

Im Vergleich zu den Ergebnissen der qPCR, die eine signifikante Zunahme der COL3A1-Genexpression unter Nikotinbehandlung und eine signifikante Abnahme unter Acroleinbehandlung ergab, zeigte sich auf Proteinebene eine allgemeine Tendenz zu erhöhten Proteinmengen. Diese lagen um den Faktor 1,2 bis 1,5 höher als in der Kontrollgruppe. Insbesondere in der Versuchsgruppe mit Acetaldehydexposition war der Anstieg statistisch signifikant (**Abb. 22**).

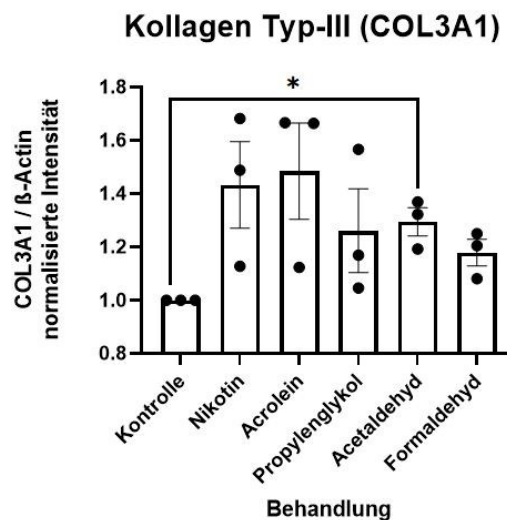


Abb. 22: Die Veränderung des Gehalts von Typ-III-Kollagen durch die Behandlungen der 5 Chemikalien. Die Behandlung mit diversen Chemikalien führte zu einer Erhöhung der Typ-III-Kollagen-Mengen in VSMC. Bei Acetaldehyd-Exposition ließ sich eine signifikante Veränderung nachweisen. $n=3$, *: $p<0,05$

Die Ergebnisse der qPCR zeigten, dass die TIMP2-Expression unter den Behandlungen mit Nikotin und Acrolein erhöht und unter Propylenglykol, Acetaldehyd und Formaldehyd erniedrigt war. Die tatsächlichen Proteinmengen entsprachen jedoch nur teilweise den zuvor beschriebenen Beobachtungen auf Expressionsebene. Es konnte eine Erhöhung der Proteinkonzentrationen unter den Behandlungen mit Nikotin und Acrolein festgestellt werden, wobei die Nikotin-Gruppe eine erhöhte Proteinmenge aufwies. Demgegenüber zeigten die Gruppen, die mit Propylenglykol, Acetaldehyd und Formaldehyd behandelt wurden, im Vergleich zur Kontrolle keine Veränderung (**Abb. 23**).

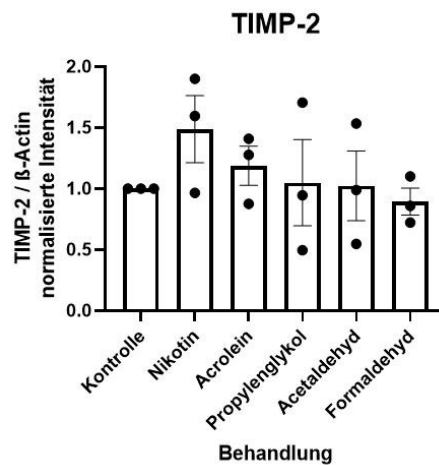


Abb. 23: Die Veränderung des TIMP2-Gehalts durch die Behandlungen der 5 Chemikalien. Die Behandlungen mit Nikotin und Acrolein führten zu erhöhten Mengen von TIMP2 in VSMC. Demgegenüber wiesen die anderen drei Gruppen keine signifikanten Veränderungen im Vergleich zur Kontrolle auf. Diese Unterschiede sind jedoch nicht statistisch signifikant. n=3, *: p<0,05

3.4.2 Veränderungen der Protein-Menge bei den Endothelzellen

Im Rahmen der qPCR konnte eine erhöhte Genexpression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 unter den Behandlungen mit Acrolein, Nikotin, Propylenglykol und Formaldehyd beobachtet werden, wobei die Ergebnisse in einigen Fällen statistisch signifikant ausfielen. Bei den Versuchsgruppen, die mit Acrolein, Propylenglykol, Acetaldehyd und Formaldehyd behandelt wurden, konnten kaum Veränderungen im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden. Eine Erhöhung wurde in der Versuchsgruppe, die mit Nikotin behandelt wurde, beobachtet, wobei diese jedoch statistisch nicht signifikant war. (Abb. 24)

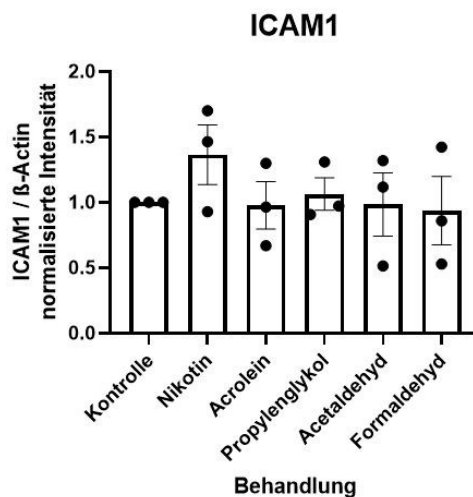


Abb. 24: Die Veränderung des ICAM1-Gehalts durch die Behandlungen der 5 Chemikalien. Im Vergleich zur Kontrollgruppe wiesen die Versuchsgruppen, die Acrolein, Propylenglykol, Acetaldehyd und Formaldehyd ausgesetzt wurden, keine signifikanten Veränderungen auf. Die Versuchsgruppe, die einer Nikotinbehandlung ausgesetzt war, wies eine erhöhte Menge des ICAM1 auf, wobei jedoch kein statistisch signifikanter Unterschied festzustellen war. n=3, *: p<0,05

3.5 MMP-Assay

Im Anschluss an die qualitative Bestimmung der Matrix-Metalloproteinasen (MMP) in vorangehenden Experimenten erfolgte die Darstellung der katalytischen Aktivität der MMP.

Das *MMP Activity Assay Kit* (Fluorometrie, grüner Farbstoff) wurde verwendet, wobei die Inkubationszeit gemäß dem Protokoll für MMP2 ausgewählt wurde.

Wie in **Abbildung 25** dargestellt, konnte nach Exposition mit allen getesteten Chemikalien eine signifikante Steigerung der MMP-Aktivität um etwa 1,5-fach beobachtet werden.

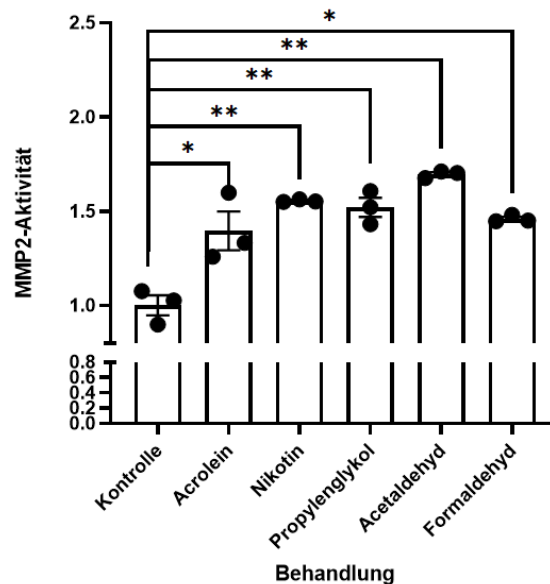


Abb. 25: Die Veränderungen der MMP2-Aktivität nach den Expositionen mit den Chemikalien. Unter der Behandlung verschiedener Chemikalien konnten signifikante, um ca. 1,5-fache Steigerungen katalysierender Aktivitäten von MMP2 nachgewiesen werden. n=3, *: p<0,05, **: p<0,01.

3.6 Analyse der histologischen Bilder muriner Aorten nach E-Zigaretten-Exposition

Zur Evaluation des Einflusses von E-Zig-Dampf auf das Gefäßsystem *in vivo*, wurden im Rahmen dieser Arbeit histologische Schnitte von Aorten von Mäusen, die E-Zig-Dampf ausgesetzt wurden, untersucht.

Nach der Behandlung mit Nikotin und/oder Propylenglykol wurden die thorakale und infrarenale Aorta von jungen (6 Wochen) und adulten (14 Wochen) Mäusen entnommen und histologisch aufgearbeitet. Da E-Zigs insbesondere bei jüngeren Menschen beliebt sind und bekannt ist, dass die elastische Eigenschaft der Gefäße bei jüngeren Individuen ausgeprägter ist, bestand das Ziel der Untersuchung darin zu evaluieren, wie die Exposition gegenüber E-Zigs bei unterschiedlichen Altersgruppen ihre Wirkung entfaltet.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die histologischen Schnittbilder analysiert, um festzustellen, ob die Menge der Elastinfasern in der Tunica Media der Maus-Aorten durch die Behandlungen verändert wurde.

3.6.1 Adulte Mäuse

In der Studiengruppe der adulten Mäuse im Alter von 14 Wochen konnte beobachtet werden, dass Expositionen mit Nikotin und/oder Propylenglykol zu einer Abnahme der relativen Elastinmenge führten, wobei dies vorallem auf die thorakalen Aortenabschnitte zutraf.

Die Elastinanteile in den jeweiligen Schnitten der Versuchsgruppen, die mit Nikotin und/oder Propylenglykol behandelt worden waren, wurden mit dem Durchschnitt des Elastinanteils der Raumluf-exponierten Kontrollgruppe verglichen. Der Durchschnitt der Kontrollgruppe wurde als 1 definiert.

Die relativen Elastinanteile unter verschiedenen Expositionsbedingungen sind in **Abbildung 26** dargestellt.

3.6.2 Junge Mäuse

Bei jüngeren Mäusen im Alter von sechs Wochen zeigten sich unterschiedliche Veränderungsmuster im Vergleich zu den adulten Tieren.

In der Versuchsgruppe, die gegenüber Propylenglykol allein exponiert war, wurde keine signifikante Veränderung des Elastinanteils festgestellt. Allerdings wurde bei der

Exposition gegenüber Nikotin und Propylenglykol sowohl in der thorakalen als auch in der infrarenalen Aorta eine signifikante Reduktion des Elastinanteils festgestellt.

Die relativen Elastinanteile unter verschiedenen Expositionsbedingungen sind in **Abbildung 27** dargestellt.

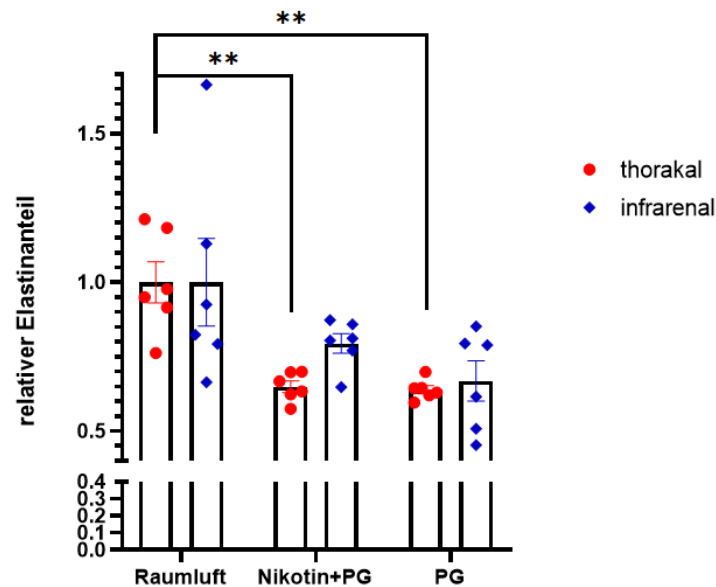


Abb. 26: Die Veränderungen der Elastinanteile nach verschiedenen Behandlungen bei adulten Mäusen. Nach Exposition mit Nikotin und/oder Propylenglykol (PG) konnte eine Reduktion des Elastingehalts in den histologischen Schnitten der Aorten älterer Mäuse beobachtet werden. Dabei zeigte sich eine besonders ausgeprägte Reduktion des Elastinanteils in der thorakalen Aorta, die zudem statistisch signifikant war. n=6, **: p<0,01

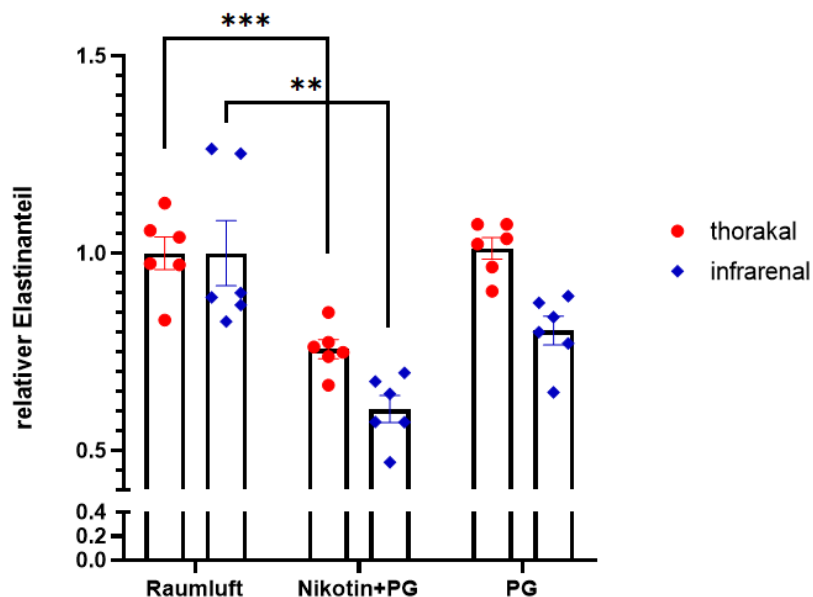


Abb. 27: Die Veränderungen der Elastinanteile nach verschiedenen Behandlungen bei jüngeren Mäusen. Nach der Exposition mit Nikotin und Propylenglykol (PG) konnte eine Reduktion der Elastinanteile in histologischen Schnitten der Aorten jüngerer Mäuse beobachtet werden. PG allein zeigte im Gegensatz dazu keine signifikante Wirkung. Im Vergleich zur älteren Kohorte war auch die infrarenale Aorta von einer Reduktion des Elastinanteils betroffen. n=6, **: p<0,01, ***: p<0,001

4 Diskussion

Seit ihrer Markteinführung steigt die Zahl von E-Zig-Konsumenten stetig, während die Auswirkungen auf das kardiovaskuläre System noch weitestgehend unklar sind.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, welche Einflüsse häufig im E-Zig-Dampf vorkommende chemischen Verbindungen auf zwei unterschiedliche Typen von Gefäßwandzellen ausüben. Der Fokus lag dabei auf der ROS-Entstehung und den Entzündungsreaktionen in ECs, sowie der Proteaseaktivität in der extrazellulären Matrix der Tunica media. Darüber hinaus wurde die Synthesefunktion analysiert und in Zusammenhang mit der Reparaturfähigkeit der VSMCs gesetzt. In diesem Zusammenhang ging es darum, die durch den Konsum von E-Zigs potenziell verursachten Gesundheitsrisiken durch eine erhöhte Gefäßsteifigkeit und die damit verbundenen Mechanismen auf zellulärer Ebene besser zu verstehen.

Wesentliche chemische Verbindungen, die im E-Zig Dampf enthalten sind, umfassen Nikotin, Acrolein, Propylenglykol, Acetaldehyd und Formaldehyd, wobei alle diese Stoffe als potenziell relevant für die Entstehung von kardiovaskuläre Erkrankungen betrachtet werden. Die Serumkonzentrationen der einzelnen chemischen Verbindungen, die vom Körper beim E-Zig-Konsum aufgenommen werden, hängen in erheblichem Maße von den jeweiligen E-Zig-Modellen, von der Zusammensetzung des E-Liquids und vom individuellen Konsumverhalten ab. Als Referenz wurden unterschiedliche Studien ausgewählt, in denen die fünf oben genannten chemischen Verbindungen in ECs oder VSMCs untersucht wurden (141-145). Dabei sollte beachtet werden, dass in diesen Studien mit einem breiteren Konzentrationsintervall gearbeitet wurde und die Ergebnisse jeweils nur für eine einzelne Zellart erzielt wurden. In der Publikation von Dai et al. wurde eine dosisabhängige Beziehung zwischen Exposition gegenüber E-Zig-Dampf und Expression proinflammatorischer Zytokine sowie unterschiedliche Effekte von Exposition an diversen Zellarten aufgezeigt (146). Weil es in der vorliegenden Arbeit primär nicht um eine Analyse der Konzentrationsabhängigkeit, sondern um eine Untersuchung der zellulären Antworten beider Zelllinien auf die chemischen Verbindungen geht, wurde eine einheitliche Arbeitskonzentration sowohl für ECs als auch für VSMCs festgelegt. Diese Konzentrationen wurden so ausgewählt, dass sie innerhalb der in den oben genannten Studien beschriebenen Intervalle liegen, keinen übermäßigen Zelltod verursachen, aber dennoch messbare Auswirkungen auf die Zellen beobachtet werden können. Unter der Voraussetzung einer Mindestzellviabilität von 95

% wurde die Arbeitskonzentration für alle Experimente in der vorliegenden Arbeit einheitlich festgelegt.

Wegen der multifaktoriellen Einflüsse auf die Serumkonzentrationen dieser chemischen Verbindungen und der fehlenden Möglichkeit einer vollständigen Erfassung der physiologischen Serumkonzentrationen bei unterschiedlichem Konsumverhalten im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten die konzentrationsabhängigen zellulären Antworten in zukünftigen Studien untersucht werden.

4.1 Entzündungsreaktionen im Endothel durch das E-Zigaretten-Aerosol

Die endotheliale NO-Synthase (eNOS) in den ECs bildet einen wesentlichen Faktor für die Aufrechterhaltung der Endothelfunktion und damit auch für die Regulation der Gefäßsteifigkeit. Dem durch eNOS produzierten NO kommen dabei mehrere Funktionen zu: Zum einen kann das im Endothel produzierte NO den Tonus der VSMCs in der Tunica media regulieren und zum anderen ist es für die Regulation der Gefäßpermeabilität und der adhäsiven und chemotaktischen Eigenschaften von Immunzellen bei akuten und chronischen Inflammations-Reaktionen verantwortlich.

Bei oxidativem Stress kann NO in eine nicht-bioverfügbare Form umgewandelt werden und die Produktionskapazität der eNOS nimmt ab, wodurch Endothelfunktionen beeinträchtigt werden, die durch NO aufrechterhalten werden.

In der klinischen Studie von Carnevale et al. wurde eine reduzierte Bioverfügbarkeit von NO im Endothel bereits nach neun Zügen von E-Zigs beschrieben (121). Es konnte ebenso in mehreren Studien nachgewiesen werden, dass viele Komponenten im E-Zig-Dampf oxidativen Stress durch ROS induzieren können. Zu diesen Komponenten gehören Nikotin, Acrolein und Formaldehyd (33, 63, 64, 85-87).

4.1.1 Oxidativer Stress im Endothel

Im Gegensatz zu K-Zigs üben E-Zigs, wie in der Publikation von Dai et al. dargelegt, zwar geringere Einflüsse auf den *Remodeling*- und Reparaturmechanismus des kardiovaskulären Systems aus, jedoch wurde in dieser Studie bei einer chronischen Exposition gegenüber E-Zigs ein erhöhter ROS-Spiegel festgestellt (146).

In den vorliegenden Experimenten zeigten sich das ROS-Niveau nach Exposition nicht nur gegenüber den in den vorher genannten Studien beschriebenen Substanzen, wie Nikotin, Acrolein und Formaldehyd, sondern auch gegenüber Propylenglykol und Acetaldehyd signifikant erhöht. In allen Versuchsgruppen wurde im Vergleich mit der Kontrollgruppe eine um den Faktor 1,2 erhöhte Fluoreszenzstärke festgestellt, was eine erhöhte ROS-Produktion aufzeigt. Demgegenüber konnten nach der gleichen Behandlung und Inkubationsdauer keine signifikanten Veränderungen bei den Spiegeln von Superoxiden nachgewiesen werden. In zahlreichen Studien wurde beschrieben, dass Nikotin, Acrolein und Formaldehyd Peroxide als ROS in ECs induzieren können (86, 147, 148). Obwohl in einer Studie von Dikalov et al. sowohl Wasserstoffperoxid als auch Superoxid nachgewiesen werden konnten, beschrieben Dreher und Junod in ihrer Studie, dass Superoxid intrazellulär spontan oder enzymvermittelt in ROS umgewandelt wird, wie Wasserstoffperoxid oder Hydroxyl-Radikale (147, 149). Dadurch könnten die gemessenen Diskrepanzen zwischen den ROS- und der Superoxidspiegel erklärt werden. Darüber hinaus wurde in der Studie von Ody et al. aufgezeigt, dass Wasserstoffperoxid und Hydroxyl-Radikale und weniger Superoxide für die Induktion von Endotheldysfunktion relevant sind (150). Die im Rahmen dieser Arbeit gesammelten Ergebnisse stimmen dahingehend mit der verfügbaren Literatur überein und weisen darauf hin, dass EC-schädigende Radikale in verstärktem Maße vorhanden sind. Jedoch wurde keine direkte Nachweismöglichkeit für den Spiegel von einzelnen ROS-Arten, wie etwa Wasserstoffperoxid und Hydroxyl-Radikale, untersucht. Um die Korrelation zwischen unterschiedlichen ROS-Arten und dadurch induzierten Zellschädigungen zu analysieren, sind spezifische Studien in der Zukunft erforderlich.

Die Resultate der vorliegenden Arbeit stützen die Annahme, dass alle fünf getesteten chemischen Verbindungen im E-Zig-Dampf oxidativen Stress in Endothelzellen induzieren können, was wiederum die Entwicklung einer Endotheldysfunktion begünstigen könnte.

4.1.2 Die Endotheldysfunktion und inflammatorische Veränderungen

Eine erhöhte ROS-Aktivität und eine Verringerung der entzündungsmodulierenden Wirkung des Endothels können zu einer Beeinträchtigung der Barrierefunktion des Endothels führen (11). Eine Entzündungsreaktion im Gefäßendothel ist mit einer

stärkeren Präsenz von Adhäsionsmolekülen und einem höheren Spiegel von proinflammatorischen Zytokinen verbunden, wodurch negative Gefäßveränderungen begünstigt werden (12). Die Adhäsionsmoleküle an der luminalen Oberfläche von ECs lassen sich in zwei Subgruppen unterteilen: Immunglobuline (z. B. ICAM-1, VCAM-1 und PECAM-1) und Selektine (z. B. E-Selektin und P-Selektin) (151-153). Die unterschiedlichen Arten der Adhäsionsmoleküle weisen eine Spezifität zu bestimmten Immunzellen auf (154). Im Falle einer Entzündung wird eine vermehrte Expression von ICAM-1 beobachtet, was wiederum die Adhäsion und Transmigration der Monozyten und neutrophilen Granulozyten fördert, demgegenüber zeigt VCAM-1 eine höhere Affinität für Lymphozyten (151, 155). In diversen Studien zur Atherogenese wurde eine erhöhte Expression von ICAM-1 und VCAM-1 beobachtet, während PECAM-1 keine signifikante Erhöhung aufwies (127, 156, 157). Darüber hinaus wurde in einigen Studien die Expression von E-Selektin, nicht jedoch von P-Selektin, in unterschiedlichen ECs nach der Behandlung mit Nikotin oder K-Zig-Kondensat erhöht beobachtet (158, 159).

In der Studie von Makwana et al. wurden humane aortale ECs für 24 Stunden jeweils gegenüber K-Zig-Kondensat, E-Zig-Kondensat und Nikotin *in-vitro* exponiert. Hierbei zeigte sich eine erhöhte ICAM-1-Expression, wohingegen keine signifikanten Veränderungen von VCAM-1 und E-Selektin beobachtet werden konnten (160). In weiteren Arbeiten zeigte sich nach Exposition von ECs gegenüber Acrolein eine verstärkte Adhäsion der Monozyten und bei einer Exposition gegenüber Formaldehyd eine stärkere Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 (70, 90). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die fünf getesteten Komponenten des E-Zig-Dampfs zu einer Veränderung der Genexpression und der Produktion von Adhäsionsmolekülen in ECs führen.

Mittels qPCR und der Westernblot-Proteinanalyse wurde bei der Exposition gegenüber Nikotin und Propylenglykol eine erhöhte Genexpression bzw. eine höhere Molekülmenge von ICAM-1 festgestellt, aber nicht von VCAM-1. Diese Ergebnisse zeigen eine Übereinstimmung mit der Studie von Makwana et al., in der ECs eine Exposition gegenüber E-Zig-Kondensat ausgesetzt wurden. Allerdings konnten Albaugh et al. bei einer Exposition gegenüber Nikotin in umbilikal-venösen Endothelzellen immunhistochemisch eine verstärkte Expression von ICAM-1 und VCAM-1 nachweisen (161). In der Studie von Kim et al. ergab sich bei einer Exposition gegenüber

Formaldehyd in nasalen mikrovaskulären Endothelzellen ebenso eine stärkere Expression von ICAM-1 und VCAM-1 (90).

In der Studie von Albaugh et al. wurden eine geringe Nikotin-Konzentration von 10 nM und eine kürzere Expositionsdauer von drei Stunden eingesetzt. Damit ist unwahrscheinlich, dass eine zu kurze Expositionsdauer und eine zu niedrige Konzentration die Ursachen der nicht signifikanten Expressionsveränderung von VCAM-1 bei einer Exposition gegenüber Nikotin in der vorliegenden Arbeit sind. Die Ergebnisse dieser Arbeit fallen mit Hinblick auf die Expressionsveränderungen von ICAM-1 bei einer Exposition gegenüber Nikotin vergleichbar aus. Dabei liegt nahe, dass das Endothel der Vena umbilicalis und der Aorta bei der Expression der Adhäsionsmoleküle nach Exposition gegenüber Nikotin unterschiedliche zelluläre Antworten aufweist. Um diese Annahme bestätigen zu können, ist eine vergleichende Untersuchung der Reaktionen des Endothels unterschiedlicher Gefäße unter gleichen Bedingungen bei einer Exposition gegenüber Nikotin erforderlich. In der Studie von Kim et al. wurde bei einer Exposition gegenüber Formaldehyd ab einer Konzentration von 3,3 μM und flüchtigen organischen Verbindungen mit einer Konzentration von 0,1 $\mu\text{g/mL}$ eine verstärkte Expression von ICAM-1 und VCAM-1 in den nasalen mikrovaskulären Endothelzellen festgestellt. In der gleichen Studie zeigte sich, dass eine alleinige Exposition gegenüber flüchtigen organischen Verbindungen nicht zu Expressionsveränderungen führt, wodurch die beobachtete Wirkung am ehesten auf die Behandlung mit Formaldehyd zurückzuführen ist. Darüber hinaus sollte auch hier berücksichtigt werden, dass die Zelleigenschaften des Endothels je nach Lokalisation im Gefäßsystem differieren können. In dieser Studie wurde erstmalig eine erhöhte Genexpression von ICAM-1 nach Exposition gegenüber Propylenglykol beschrieben, wobei in der Literatur keine vergleichbaren Studie gefunden wurden.

In zahlreichen Studien wurde beschrieben, dass eine Exposition gegenüber verschiedenen chemischen Verbindungen eine verstärkte Produktion von proinflammatorischen Zytokinen in unterschiedlichen Zellarten stimulieren kann. In den Studien von Kashiwagi et al. und Tsai et al. wurden Gingiva- und bronchiale Endothelzellen Nikotin mit einer Konzentration von jeweils 1 mM und 5 μM ausgesetzt, wobei jeweils eine signifikante Erhöhung der IL-8-Expression und der IL-8-Menge festgestellt wurde (93, 94). In den Studien von Wu et al. und Saiki et al. wurden humane umbilikale Endothelzellen gegenüber Acrolein mit Konzentrationen von jeweils 5-20 μM und 25-50 μM exponiert.

In beiden Studien zeigte sich jeweils eine erhöhte Proteinmenge und eine stärkere Genexpression von IL-6 (72, 162). In der vorliegenden Untersuchung der Genexpression und Proteinmenge der proinflammatorischen Zytokine wurde deshalb analysiert, ob ähnliche Phänomene auch in humanen aortalen ECs auftreten.

In der aktuellen Forschungsliteratur gibt es unterschiedliche Studien, die sich vor allem mit den proinflammatorischen Auswirkungen des Konsums von K-Zigs auf Pneumozyten beschäftigen. In anderen Studien wurden die Auswirkungen der untersuchten chemischen Verbindungen auf hepatische oder pankreatische Zellen beim Alkoholkonsum untersucht. Ein systematischer Vergleich der eigenen Ergebnisse mit den Ergebnissen in anderen Publikationen ist daher nur eingeschränkt möglich.

Die erhöhte Genexpression von IL-8 wurde auch in der vorliegenden Arbeit nicht nur bei einer Exposition gegenüber Nikotin, sondern auch bei einer Exposition gegenüber Acetaldehyd beobachtet. In den Studien von Kashiwagi et al. und Tsai et al. wird nur die Exposition gegenüber Nikotin beim Endothel in anderen Organen beschrieben, weshalb die eigenen Ergebnisse als neu betrachtet werden können.

Im Vergleich mit den Studien von Wu et al. und Saiki et al. hat sich die Expressionsveränderung von IL-6 in der vorliegenden Arbeit bei den Expositionen gegenüber allen fünf Chemikalien als nicht statistisch signifikant erwiesen. Dabei wurde eine Arbeitskonzentration von 2 μM Acrolein verwendet. In den Studien von Wu et al. und Saiki et al. konnte dagegen eine signifikante Expressionsveränderung von IL-6 erst ab einer Konzentration von jeweils 5 μM und 25 μM nachgewiesen werden. Deshalb liegt nahe, dass die Ergebnisse mit einer statistisch nicht signifikanten Erhöhung auf die Konzentration zurückzuführen sind. Um diese Annahme bestätigen zu können, sind weitere Untersuchungen erforderlich, in denen der Fokus auf die konzentrationsabhängige zelluläre Antwort gerichtet wird. Außerdem liegt es nahe, dass es Unterschiede bei den Zellantworten des aortalen und des umbilikalen Endothels gibt.

Es kann aber auch nicht ausgeschlossen werden, dass die von den in der Literatur beschriebenen abweichenden methodischen Faktoren zu den nicht signifikanten Ergebnissen beigetragen haben. Dabei sollte allerdings beachtet werden, dass die Messungen in allen Versuchsgruppen mindestens viermal wiederholt wurden, wobei eine tolerierbare Standardabweichung festgestellt werden konnte.

Zusammenfassend zeigte sich in der vorliegenden Untersuchung nach Exposition gegenüber Nikotin, Propylenglykol und Acetaldehyd eine signifikante Hochregulation der proinflammatorischen Proteine und der dafür kodierenden Gene, welche in Teilen auch so in der verfügbaren Literatur beschrieben wird. Auch wenn es sich um hierbei um stark simplifizierte *in vitro* Modelle handelt, könnte dies daraufhin deuten, dass die Aufnahme dieser chemischen Komponenten durch den Konsum von E-Zigs das Risiko für Veränderungen der Gefäßwand erhöht.

Es verbleiben jedoch weitere proinflammatorische Mechanismen, die hinsichtlich ihres Zusammenhangs mit dem Konsum von E-Zigaretten und Gefäßpathologien noch zu erforschen sind. In einer Studie von Mulorz et al. konnte gezeigt werden, dass E-Zig Exposition experimentelles abdominales Aortenaneurysma-Wachstum begünstigt, was insbesondere auf das enthaltene Nikotin und eine Suppression der anti-inflammatorischen MikroRNA-24 zurückgeführt wurde (163). In der Studie von Taki et al. wurde ebenfalls eine herunterregulierende Wirkung von Nikotin auf die Transkription von MikroRNA-80 und -228 beschrieben, was zu einer erhöhten Anfälligkeit für Entzündungsprozesse führt (164). Die Frage, ob die übrigen Substanzen im E-Zig-Dampf einen ähnlichen Effekt aufweisen, muss durch weitere Studien erörtert werden.

4.2 Der Umbau in der Tunica media durch das Aerosol von E-Zigaretten

Die Tunica media, die durch glatte Muskulatur und deren extrazelluläre Matrix aus Elastin- und Kollagenfasern gebildet wird, fungiert als Regulator des Gefäßtonus und der Elastizität der Gefäßwand. Typ-I- und Typ-III-Kollagen stellen die vorherrschenden Kollagenarten in der Aorta dar. Typ-III-Kollagen kommt vor allem in der Tunica media vor, während Typ-I-Kollagen hauptsächlich in der Tunica adventitia lokalisiert ist (165). In einer Studie von Pöschl et al. wurde zudem die Relevanz von Typ-IV-Kollagen für die Stabilisierung der Basalmembran in der Tunica media dargelegt, wobei bei einer Mutation des Typ-IV-Kollagen-Gens letale Verläufe bereits in der embryonalen Entwicklungsphase führen (166). In der vorliegenden Arbeit wurde aus den genannten Gründen der Fokus auf Typ-III-Kollagen gelegt.

Elastin in der Tunica media nimmt den größten Einfluss auf die Gefäßelastizität und -steifigkeit. Während Kollagen die Stabilität der Gefäßwand und die Zugfestigkeit bei höherer Druckbelastung sicherstellt, gewährleistet Elastin die Rückstellkraft bei

niedrigerer Druckbelastung (167). In der vorliegenden Arbeit wurde der Sachverhalt einer intensiven Untersuchung auf Gen- und Proteinebene, sowie *in-vivo* unterzogen.

Neben Kollagen und Elastin wurden Fibronectin und Proteoglykane als weitere Bestandteile der extrazellulären Matrix identifiziert. Fibronectin agiert als "Klebstoff" der Bestandteile der Tunica media und übt keine direkten mechanischen Einflüsse auf die Gefäßwand aus. Proteoglykane hingegen weisen variable Funktionen auf (168). Proteoglykane sind essentiell für die Kollagenformation und ihre Seitenketten können als Speicher für Lipoproteine, Wachstumsfaktoren und Zytokine dienen (165, 169).

In diesem Abschnitt wird auf die Veränderung der Konsistenz der Tunica media eingegangen, die auf einen Abbau bzw. eine reduzierte Produktion von Elastinfasern und einen kompensatorischen Einbau von Typ-III-Kollagenfasern zurückgeführt werden kann. Dies kann zu einer Beeinträchtigung der elastischen Eigenschaften und Abweichungen bei der *Compliance* eines Gefäßes führen.

Zum einen können die durch die chemischen Verbindungen im E-Zig-Dampf induzierte stärkere Produktion und eine hochregulierte Aktivität der Proteasen zu einer Fragmentierung der Elastinfasern führen. Zu diesen Enzymen gehören u. a. die MMPs und ihre Inhibitoren, nämlich TIMPs (138, 170, 171). Zum anderen kann die Produktion von Elastin und Typ-III-Kollagen durch VSMCs auf unterschiedlichen Ebenen der Proteinexpression durch die chemischen Verbindungen im E-Zig-Dampf beeinflusst werden und zwar von der Gen-Regulation bis zur posttranslationalen Ebene (172, 173).

4.2.1 Die veränderte Produktion der Bestandteile der extrazellulären Matrix

Nach einer 24-stündigen Exposition gegenüber fünf Chemikalien wurde die Expression von Elastin- und Typ-III-Kollagen durch qPCR quantifiziert. Dabei konnte bei der Exposition gegenüber allen fünf getesteten Chemikalien eine signifikante Abnahme der Genexpression von Elastin festgestellt werden. Die Ergebnisse vorangegangener Studien am Mausmodell legen nahe, dass bei einer Exposition gegenüber E-Zigs eine vermehrte Elastinfragmentierung beobachtet wurde (172). Obwohl diese Ergebnisse nicht direkt mit den eigenen übereinstimmen, kann eine beeinträchtigte Reparaturfähigkeit bei Schäden auf eine Abnahme der Genexpression zurückgeführt werden. Darüber hinaus wurde in mehreren Studien darauf hingewiesen, dass Acrolein, Acetaldehyd und Formaldehyd das Potenzial besitzen, die Genexpression zu modifizieren (174-176). Damit ist es plausibel, dass die untersuchten Chemikalien die Genexpression von Elastin beeinflussen können.

Allerdings ergab sich bei der Genexpression von Typ-III-Kollagen keine homogene Tendenz hinsichtlich der Veränderungen. Bei der Exposition gegenüber Nikotin konnte eine signifikante Erhöhung der Expression beobachtet werden, während es gegenüber Acrolein zu einer Verringerung der Expression kam. Bei den Versuchsgruppen mit den anderen drei Chemikalien konnten keine signifikanten Veränderungen festgestellt werden.

Bei den Ergebnissen auf der Proteinebene wurde eine einheitliche und signifikante Reduktion der Menge von Elastin festgestellt, was den Ergebnissen auf der Expressionsebene und den Aussagen in der Literatur entspricht. Abweichend von den Ergebnissen auf der Expressionsebene ergab sich bei der Menge des Typ-III-Kollagens allerdings nur bei der Exposition gegenüber Acetaldehyd ein statistisch signifikanter Anstieg.

Eine erhöhte Gefäßsteifigkeit durch den Abbau von Elastinfasern und einen sekundären kompensatorischen Einbau von Kollagenfasern bildet ein generelles Merkmal altersbedingter Veränderungen der Gefäßwand. (130, 131). Dabei ist es aber auch möglich, dass die Exposition gegenüber den Komponenten von E-Zig-Dampf eine verstärkte Produktion von Kollagen aus VSMCs als primäre Antwort induzieren kann. Nach den eigenen Ergebnissen kann die Exposition gegenüber Nikotin und Acetaldehyd dazu führen, dass VSMCs verstärkt Kollagen produzieren. Die Frage, ob der verstärkte Kollageneinbau in die Tunica media eher auf die primäre oder die sekundäre Antwort zurückzuführen ist, konnte in der vorliegenden Arbeit nicht abschließend geklärt werden. Um die Annahme zu bestätigen, dass der kompensatorische Kollageneinbau auf die sekundäre Antwort zurückzuführen ist, sollten weitere Untersuchungen durchgeführt werden. Dabei können *in-vivo*-Untersuchungen mit einer langfristigen Exposition gegenüber E-Zig-Dampf oder *in-vitro*-Untersuchungen mit einem mechanischen Reiz eingesetzt werden. Allerdings kann eine Exposition gegenüber Acrolein auch zu einer reduzierten Kollagenproduktion der VSMCs führen. In einer Studie von Raveendran et al. konnte nach einer Exposition gegenüber einem Extrakt eines K-Zig-Aerosols eine Reduktion der Menge des Typ-I-Kollagens in kultivierten VSMCs nachgewiesen werden (177). In dieser Studie wurde das gesamte Aerosol mit mehr als 9.000 Komponenten eingesetzt, weshalb die reduzierte Menge des Typ-I-Kollagens auf die summierte Wirkung aller Komponenten zurückgeführt wurde. Ein Vergleich mit den vorliegenden Daten ist deshalb nur bedingt möglich.

Außerdem ergab sich beim Typ-III-Kollagen eine Diskrepanz zwischen der genetischen Expression und der Proteinexpression. In verschiedenen Arbeiten wurde die Beziehung zwischen mRNA und Protein analysiert, wobei festgestellt wurde, dass es nicht immer eine lineare Korrelation zwischen der genetischen Regulation und der Proteinebene gibt (178, 179). Unterschiede zwischen der Menge der mRNA und der Menge der Proteine in einer Zelle können auf verschiedene Faktoren zurückgeführt werden. Zum einen hängt die Translation von mRNA zu den Proteinen vom Zellzyklus ab, der durch variable äußere Faktoren beeinflusst werden kann. Zum anderen konnte eine unterschiedliche Stabilität von mRNA und Proteinen festgestellt werden, was zu Unterschieden beim messbaren Anteil führen kann. Ein weiterer Grund ist, dass einige Signalwege, wie beispielsweise der mTOR/S6K-Weg, die Proteinsynthese auch unabhängig von der Menge der mRNA regulieren können (180). Deshalb sollten die biochemischen Variationen der Translation und die Möglichkeiten einer Aktivierung unterschiedlicher Signalwege durch die Exposition gegenüber den ausgewählten Chemikalien in anderen Studien genauer untersucht werden.

In der vorliegenden Studie führte eine Exposition von VSMCs gegenüber den fünf untersuchten Komponenten des E-Zig-Dampfs zu einer geringeren Produktion von Elastin. Dadurch kann es nach dem Abbau der Elastinfasern durch unterschiedliche Mechanismen zu einer Beeinträchtigung der Fähigkeit der Gefäßwand zur Reparatur von Schäden kommen. Nach der Exposition konnten unterschiedliche Veränderungen des Typ-III-Kollagens auf der genetischen und der Proteinebene festgestellt werden. Insbesondere in einer Kombination mit einem kompensatorischen Kollageneinbau kann daher eine erhöhte Gefäßsteifigkeit zur Folge haben. In weiteren Studien sollte untersucht werden, ob die Exposition gegenüber E-Zig-Dampf die Hauptursache für die Veränderung des Kollagengehalts ist, und zu welchen posttranskriptionalen Modifikationen der das Typ-III-Kollagen kodierenden Gene es dabei kommt.

4.2.2 Die Expression und Aktivität der am Gefäßwandumbau beteiligten Enzyme

Der Umbauprozess in der Tunica media wird durch Proteasen induziert, wobei insbesondere die MMP-2 eine wesentliche Rolle spielt. MMP-2 fungiert als Gelatinase und spaltet eine Vielzahl von Proteinarten, darunter Fibronectin, Typ-IV/V-Kollagen aber auch Elastin (181, 182). Dabei konnte eine erhöhte Konzentration von MMP-2 sowohl bei pathologisch dilatierten Gefäßen als auch bei Gefäßproben mit einem höheren

Wert von Fibrillin-1, einem Abbauprodukt von Elastin, nachgewiesen werden (137, 183). In den Studien von Simova et al., Wagenhäuser et al. und Ghosh et al. wurde zwar die Rolle von beiden MMP-2 und -9 bei Gefäßwandumbau erwähnt, allerdings werden unterschiedliche MMPs durch unterschiedliche Zellen exprimiert (137-139). Während MMP-2 durch Mesenchymzellen, einschließlich VSMCs, exprimiert wird, wird MMP-9 hauptsächlich durch infiltrierende Makrophagen produziert und kommt in VSMC-Monokulturen nur in geringem Maße vor (184, 185). In der vorliegenden Arbeit wurde neben der Menge der von VSMCs produzierten Strukturproteine untersucht, inwiefern die Exposition gegenüber den fünf ausgewählten Chemikalien zu Veränderungen der Konzentration und der Aktivität von MMP-2 führt.

Bei dem MMP-Assay zeigte sich eine signifikante Steigerung der enzymatischen Aktivität von MMPs durch alle fünf getesteten Chemikalien um den Faktor 1,5.

Bei der quantitativen Analyse durch qPCR wurde festgestellt, dass sich die Genexpression von MMP-2 dabei nicht signifikant verändert hat. Deshalb kann angenommen werden, dass die stärkere katalysierende Wirkung der Protease bei der Exposition gegenüber den Chemikalien primär nicht auf eine verstärkte Genexpression, sondern auf andere Mechanismen zurückzuführen ist.

Das Protein TIMP-2 fungiert als natürlich vorkommender Inhibitor von MMP-2, wobei es eine Bindung mit dem aktiven Zentrum von MMP-2 eingeht (186). Außerdem übt TIMP-2 auch einen Einfluss auf die Aktivierung von MMP-2 aus, da für die Aktivierung von MMP-2 eine Komplexbildung zwischen TIMP-2 und Pro-MMP-2 essentiell ist. Die Bindung des Komplexes an der Zelloberfläche durch eine *Membrane-Type-1-Matrix-Metalloproteinase* (MT1-MMP) führt zur Aktivierung von Pro-MMP-2, wobei die Bindung einer zweiten MT1-MMP als Aktivator für Pro-MMP-2 wirkt. Überschüssige Mengen von TIMP-2 können jedoch an die aktivierende MT1-MMP binden, was einen Mechanismus für die Hemmung der Aktivität von MMP-2 darstellt (187, 188). Die Menge von TIMP-2 beeinflusst deshalb die katalysierende Wirkung von MMP-2.

Die durchgeführte qPCR führte zu uneinheitlichen Veränderungen der Genexpression von TIMP-2 in Abhängigkeit von den verwendeten Chemikalien. Dabei ergab sich bei der Behandlung mit Acrolein eine signifikant höhere, bei der Behandlung mit Formaldehyd allerdings eine signifikant geringere Expression. Diese signifikanten Veränderungen konnten aber auf der Proteinebene durch eine Westernblot-Analyse nicht

mehr nachgewiesen werden. Demnach zeigte sich in dem hier angewendeten experimentellen Setting keine Veränderung der Enzymmenge von TIMP-2 als Antwort auf die Behandlung mit den fünf untersuchten Komponenten von E-Zig-Dampf.

Aus den vorgestellten Untersuchungsergebnissen kann abgeleitet werden, dass die fünf Komponenten die Aktivität des Enzyms MMP-2 erhöhen und auch die Fragmentierung von Elastin in der Tunica media fördern können, wobei die Enzymaktivität multifaktoriell beeinflusst wird. Aufgrund der Ergebnisse der quantitativen Analysen von MMP-2 und TIMP-2 scheint es unwahrscheinlich, dass die Enzymaktivität durch eine erhöhte Genexpression des Enzyms oder eine Beteiligung der Inhibitoren beeinflusst wird. Neben diesen beiden Faktoren könnten auch posttranslationale Modifikationen zu einer veränderten Enzymaktivität führen, etwa Phosphorylierung, Acetylierung und Methylierung. Außerdem wurde in einer Studie die Abhängigkeit der MMP-2-Aktivität von unterschiedlichen pH-Werten untersucht, wobei ein direkter Einfluss des pH-Werts auf die Aktivität von MMP-2 nachgewiesen werden konnte (189). Eine potentielle Veränderung des pH-Werts durch Zugabe der verschiedenen Chemikalien wurde im Rahmen der hier vorgestellten Experimente nicht untersucht. Des Weiteren ist zu bemerken, dass MMP-9 aus Makrophagen *in-vivo* eine signifikante Rolle beim Umbau der Tunica media einnimmt. Die Einflüsse der untersuchten Chemikalien auf der Expression von MMP-9, sowie die Interaktionen unterschiedlicher MMPs sind in der vorliegenden *in-vitro*-Arbeit begrenzt und bedürfen weiterer Klärungen.

4.2.3 Die Veränderungen der Tunica media in Tiermodellen

Die Auswertung der histologischen Schnittbilder zeigte unterschiedliche Anteile an Elastinfasern zwischen jungen und adulten Tieren.

Es ist bekannt, dass die thorakale Aorta aufgrund ihrer mechanischen Belastung und Struktur einen höheren Elastingehalt aufweist (190). Darüber hinaus konnte bei älteren Gefäßen festgestellt werden, dass die Elastinfasern eine geringere Stabilität und eine verminderte Fähigkeit zur Selbstreparatur aufweisen (191, 192). Deshalb kann die stärkere Reduktion des Elastingehalts bei der thorakalen Aorta der adulten Tieren bei der Exposition im Vergleich mit den jüngeren Tieren als ein Erklärungsansatz herangezogen werden. Im Unterschied dazu ergab sich in der infrarenalen Aorta im Vergleich mit anderen Aortenabschnitten ein geringerer Elastingehalt, der bei gealterten Gefäßen noch stärker ausgeprägt war (193). Die nicht signifikanten Veränderungen könnten damit erklärt

werden, dass die ausgewählte Analysemethode nicht sensitiv genug ist, um kleinere Veränderungen nachzuweisen.

In den jungen Tieren zeigte sich nur in der Gruppe, die gegenüber E-Zig Dampf mit Nikotin exponiert wurde, eine signifikante Abnahme des Elastingehalts. Mit Hinblick auf die eigenen *in-vitro*-Untersuchungen könnte dies, auf eine erhöhte Aktivität von MMP-2 durch Stimulation durch Nikotin und Propylenglykol zurückzuführen sein. In der *in-vivo*-Studie von Wang et al. wurde sowohl eine hochregulierte Expression als auch eine gesteigerte Proteinmenge von MMP-2, sowie eine daraus resultierende Elastindegeneration bei Mäusen im Alter von 12 bis 16 Wochen nach einer Nikotin-Infusion über einen Zeitraum von sechs Wochen beschrieben (194). In dieser Studie sowie in der vorliegenden Arbeit wurde aber nur die alleinige Wirkung einzelner chemischer Verbindungen untersucht. Deshalb kann angenommen werden, dass die Veränderung bei der Exposition gegenüber Propylenglykol allein wegen der besseren Reparaturfähigkeit bei der jüngeren Maus nicht signifikant bleiben würde, während die addierte Wirkung des Nikotin-Propylenglykol-Gemischs über die Reparaturfähigkeit hinausgehen würde, sodass es zu manifesten Veränderungen der Wandstruktur kommen kann. Es liegen aktuell keine Studien vor, die sich gezielt mit der Wechselwirkung unterschiedlicher Chemikalien auf den Elastingehalt der Gefäßwand beschäftigen. Für eine Bestätigung dieser Annahme müssten demnach die addierten Wirkungen der Komponenten untersucht werden.

Außerdem sollte darauf hingewiesen werden, dass mit der verwendeten Methode lediglich eine Abschätzung des Elastingehalts möglich war. Dabei wurde für eine Quantifizierung der Elastinfasern die Fläche in zweidimensionalen histologischen Schnittbildern berechnet und die Ergebnisse wurden dann mit der Kontrollgruppe verglichen. Die damit verbundene Ungenauigkeit könnte die statistisch nicht signifikanten Ergebnisse bei den Versuchsgruppen der infrarenalen Aorta der adulten Kohorte und der Versuchsgruppe mit einer Exposition gegenüber Propylenglykol der jüngeren Kohorte erklären. In zukünftigen Studien sollte mit quantitativen Techniken wie Massenspektrometrie untersucht werden, inwiefern die in der vorliegenden Arbeit mit der beschriebenen Methode ermittelten Resultate mit der tatsächlichen Ausprägung des Elastingehalts korrelieren.

Darüber hinaus besteht Potenzial für weitere Forschungen zur Veränderung in Tiermodellen bei chronischen Expositionen, die sich auf das realitätsnahe Konsumverhalten beziehen. In der Studie von Olfert et al. wurden die Langzeiteffekte einer achtmonatigen, chronischen Exposition gegenüber E-Zigs im murinen Modell untersucht. Diese Studie diente dazu, den E-Zig-Konsum von Menschen in der Phase der Adoleszenz und frühen Erwachsenenzeit zu simulieren, während sich die vorliegende Arbeit mit den separaten Reaktionen in unterschiedlichen Altersgruppen sowie mit der Wirkung einzelner Komponenten im E-Zig-Dampf befasst. In der genannten Studie wurde eine erhöhte Gefäßsteifigkeit durch Flussgeschwindigkeitsmessung sowie Kraftaufnehmer festgestellt, deren Tendenz zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit im Einklang steht und beide Studien sich in Bezug auf die Untersuchungsbedingungen gegenseitig ergänzen (195). In dieser Studie wurde zudem eine verschlechterte Reaktion auf Vasodilatoren wie Acetylcholin sowie eine minimale, jedoch signifikante Abnahme der Ejektionsfraktion des Herzens beschrieben. Diese bieten das Potenzial, diese Aspekte durch die Untersuchungsbedingungen der vorliegenden Arbeit zu evaluieren.

In der vorliegenden Studie konnte nachgewiesen werden, dass eine Exposition gegenüber Nikotin und/oder Propylenglykol auch unter *in-vivo*-Bedingungen zu einer Reduktion der Elastinfasern in der Tunica media führt. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass die Aorta mit höherem Alter eine besondere Anfälligkeit für solche Veränderungen aufweist. Daraus lässt sich ableiten, dass der E-Zig-Dampf zu einem Elastinverlust in der Tunica media beitragen kann, wobei dieser Effekt bei einer Kombination mit der altersbedingten Degeneration noch stärker ausfallen kann. Die in der vorliegenden Arbeit etablierte Methode ermöglichte aber nur eine grobe Abschätzung des Elastingehalts. Die Sensitivität und die Spezifität der Methode sind noch nicht bekannt und sollten deshalb in zukünftigen Studien untersucht werden.

4.3 Fazit

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die untersuchten, im E-zig Dampf vorkommenden chemischen Verbindungen, die Gen- und Proteinregulation von ECs und VSMCs beeinflussen. Dabei konnten sowohl pro-inflammatorische, als auch den ECM-Umbau beeinflussende Veränderungen identifiziert werden. Dabei legen die Ergebnisse nahe, dass durch Exposition gegenüber E-Zigs Elastinfragmentierung und

Reparaturmechanismen in der Tunica media beeinträchtigt werden können. Diese Mechanismen könnten langfristige Gefäßveränderungen begünstigen, welche etwa eine erhöhte Gefäßsteifigkeit als Folge haben könnten.

In der vorliegenden Arbeit konnte bestätigt werden, dass die Acrolin, Propylenglykol, Acrolein, Nikotin und Acetaldehyd ROS-Bildung im Gefäßendothel und eine verstärkte Expression von Adhäsionsmolekülen und proinflammatorischen Zytokinen induzieren, was in anderen Studien hauptsächlich für andere Zelllinien beschrieben wurde, beispielsweise Pneumozyten und Hepatozyten. Die Entzündungsreaktionen im Gefäßendothel könnten dabei eine Endotheldysfunktion hervorrufen, die wiederum unterschiedliche pathologische Veränderungen in der Gefäßwand begünstigen kann.

Aus unterschiedlichen Studien zur Veränderung der Komposition der extrazellulären Matrix der Tunica media ist bekannt, dass im Rahmen degenerativer Veränderungen Elastin abgebaut und Kollagen kompensatorisch eingebaut wird, was in einer erhöhten Gefäßsteifigkeit münden kann. In der Analyse der histologischen Bilder aus einem Tiermodell konnte nachgewiesen werden, dass sich die inhalative Exposition gegenüber E-Zig-Dampf mit Nikotin und/oder Propylenglykol auf den Elastingehalt der Mauseorta auswirkt. In diesem Zusammenhang konnte auf zellulärer Ebene gezeigt werden, dass die Bestandteile von E-Zig-Dampf die Aktivität von MMP-2 in der Tunica media hochregulieren und zeitgleich die Produktion von Elastin in humanen aortalen VSMC reduziert wird. Des Weiteren konnte eine Kollagenproduktion durch VSMC festgestellt werden, die durch die Exposition gegenüber den Hauptsubstanzen im E-Zig-Dampf induziert wurde.

Die hier gezeigten Ergebnisse legen nahe, dass die im E-Zig Dampf enthaltenen chemischen Verbindungen das Potential haben, Zellen des Gefäßsystems zu schädigen. Die vorgestellten Ergebnisse bezüglich des reduzierten Elastingehalts der murinen Aorten unterstützen diese Aussage zudem in einem – stark simplifizierten- in-vivo Modell. Die Übertragbarkeit der Resultate ist dennoch deutlich eingeschränkt. Es gilt die Folgen bei langfristigen Expositionen zu prüfen. Außerdem sollten die genauen biochemischen Mechanismen der posttranskriptionalen und posttranslationalen Modifikation und die Wechselwirkungen zwischen den Komponenten und unterschiedlichen intrazellulären Signalwegen in weiteren Studien genauer untersucht werden.

5 Literaturverzeichnis

1. Lacolley P, Regnault V, Segers P, Laurent S. Vascular Smooth Muscle Cells and Arterial Stiffening: Relevance in Development, Aging, and Disease. *Physiol Rev.* 2017;97(4):1555-617.
2. Welsch U, Deller T, Kummer W. *Lehrbuch histologie*: Elsevier, Urban & Fischer; 2014.
3. Förstermann U, Xia N, Li H. Roles of Vascular Oxidative Stress and Nitric Oxide in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Circ Res.* 2017;120(4):713-35.
4. Aumüller G, Aust G, Conrad A, Engele J, Kirsch J, Maio G, et al. *Duale Reihe Anatomie*: Thieme Stuttgart; 2020.
5. Schmidt RF, Lang F, Heckmann M. *Physiologie des menschen: mit pathophysiologie*: Springer-Verlag; 2011.
6. Lüllmann-Rauch R, Asan E. *Taschenlehrbuch Histologie*. 7 ed. Stuttgart; New York: Georg Thieme Verlag; 2024.
7. O'Rourke MF, Safar ME. Relationship between aortic stiffening and microvascular disease in brain and kidney: cause and logic of therapy. *Hypertension.* 2005;46(1):200-4.
8. Mitchell GF, van Buchem MA, Sigurdsson S, Gotal JD, Jonsdottir MK, Kjartansson Ó, et al. Arterial stiffness, pressure and flow pulsatility and brain structure and function: the Age, Gene/Environment Susceptibility--Reykjavik study. *Brain.* 2011;134(Pt 11):3398-407.
9. Briet M, Boutouyrie P, Laurent S, London GM. Arterial stiffness and pulse pressure in CKD and ESRD. *Kidney Int.* 2012;82(4):388-400.
10. Ohtsuka S, Kakihana M, Watanabe H, Sugishita Y. Chronically decreased aortic distensibility causes deterioration of coronary perfusion during increased left ventricular contraction. *J Am Coll Cardiol.* 1994;24(5):1406-14.
11. Ross R, Glomset JA. The pathogenesis of atherosclerosis (first of two parts). *N Engl J Med.* 1976;295(7):369-77.
12. Gimbrone MA, Jr., García-Cardeña G. Vascular endothelium, hemodynamics, and the pathobiology of atherosclerosis. *Cardiovasc Pathol.* 2013;22(1):9-15.
13. Brandes RLFSRFS-VG. *Physiologie des Menschen : mit Pathophysiologie*2020.
14. Riede U-NWM. *Allgemeine und Spezielle Pathologie : mit 626 Abbildungen, 76 Tabellen und 50 Fallberichten*2017.
15. Centers for Disease C, Prevention, National Center for Chronic Disease P, Health P, Office on S, Health. *Publications and Reports of the Surgeon General. How Tobacco Smoke Causes Disease: The Biology and Behavioral Basis for Smoking-Attributable Disease: A Report of the Surgeon General.* Atlanta (GA): Centers for Disease Control and Prevention (US); 2010.
16. National Center for Chronic Disease P, Health Promotion Office on S, Health. *Reports of the Surgeon General. The Health Consequences of Smoking—50 Years of Progress: A Report of the Surgeon General.* Atlanta (GA): Centers for Disease Control and Prevention (US); 2014.
17. Dawber TR, Moore FE, Mann GV. II. Coronary Heart Disease in the Framingham Study. *Int J Epidemiol.* 2015;44(6):1767-80.
18. Håheim LL, Holme I, Hjermmann I, Leren P. Smoking habits and risk of fatal stroke: 18 years follow up of the Oslo Study. *J Epidemiol Community Health.* 1996;50(6):621-4.
19. Shinton R, Beevers G. Meta-analysis of relation between cigarette smoking and stroke. *Bmj.* 1989;298(6676):789-94.
20. Kannel WB, Thomas HE, Jr. Sudden coronary death: the Framingham Study. *Ann N Y Acad Sci.* 1982;382:3-21.
21. Viridis A, Giannarelli C, Neves MF, Taddei S, Ghiadoni L. Cigarette smoking and hypertension. *Curr Pharm Des.* 2010;16(23):2518-25.
22. Strachan DP. Predictors of death from aortic aneurysm among middle-aged men: the Whitehall study. *Br J Surg.* 1991;78(4):401-4.
23. Carter BD, Abnet CC, Feskanich D, Freedman ND, Hartge P, Lewis CE, et al. Smoking and mortality--beyond established causes. *N Engl J Med.* 2015;372(7):631-40.

24. Morris PB, Ference BA, Jahangir E, Feldman DN, Ryan JJ, Bahrami H, et al. Cardiovascular Effects of Exposure to Cigarette Smoke and Electronic Cigarettes: Clinical Perspectives From the Prevention of Cardiovascular Disease Section Leadership Council and Early Career Councils of the American College of Cardiology. *J Am Coll Cardiol*. 2015;66(12):1378-91.
25. Benowitz NL, Gourlay SG. Cardiovascular toxicity of nicotine: implications for nicotine replacement therapy. *J Am Coll Cardiol*. 1997;29(7):1422-31.
26. Sugiishi M, Takatsu F. Cigarette smoking is a major risk factor for coronary spasm. *Circulation*. 1993;87(1):76-9.
27. Caralis DG, Deligonul U, Kern MJ, Cohen JD. Smoking is a risk factor for coronary spasm in young women. *Circulation*. 1992;85(3):905-9.
28. Nobuyoshi M, Abe M, Nosaka H, Kimura T, Yokoi H, Hamasaki N, et al. Statistical analysis of clinical risk factors for coronary artery spasm: identification of the most important determinant. *American heart journal*. 1992;124(1):32-8.
29. Tell GS, Polak JF, Ward BJ, Kittner SJ, Savage PJ, Robbins J. Relation of smoking with carotid artery wall thickness and stenosis in older adults. The Cardiovascular Health Study. The Cardiovascular Health Study (CHS) Collaborative Research Group. *Circulation*. 1994;90(6):2905-8.
30. Howard G, Burke GL, Szklo M, Tell GS, Eckfeldt J, Evans G, et al. Active and passive smoking are associated with increased carotid wall thickness: the Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Archives of internal medicine*. 1994;154(11):1277-82.
31. Willigendael EM, Teijink JA, Bartelink M-L, Kuijken BW, Boiten J, Moll FL, et al. Influence of smoking on incidence and prevalence of peripheral arterial disease. *Journal of vascular surgery*. 2004;40(6):1158-65.
32. Lu L, Mackay D, Pell J. Meta-analysis of the association between cigarette smoking and peripheral arterial disease. *Heart*. 2014;100(5):414-23.
33. Cyr AR, Huckaby LV, Shiva SS, Zuckerbraun BS. Nitric Oxide and Endothelial Dysfunction. *Crit Care Clin*. 2020;36(2):307-21.
34. Su Y, Han W, Giraldo C, De Li Y, Block ER. Effect of cigarette smoke extract on nitric oxide synthase in pulmonary artery endothelial cells. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 1998;19(5):819-25.
35. Powell JT, Higman DJ. Smoking, nitric oxide and the endothelium. *Br J Surg*. 1994;81(6):785-7.
36. Barua RS, Ambrose JA, Eales-Reynolds L-J, DeVoe MC, Zervas JG, Saha DC. Dysfunctional endothelial nitric oxide biosynthesis in healthy smokers with impaired endothelium-dependent vasodilatation. *Circulation*. 2001;104(16):1905-10.
37. Celermajor DS, Sorensen KE, Georgakopoulos D, Bull C, Thomas O, Robinson J, et al. Cigarette smoking is associated with dose-related and potentially reversible impairment of endothelium-dependent dilation in healthy young adults. *Circulation*. 1993;88(5):2149-55.
38. Tsao PS, Buitrago R, Chan JR, Cooke JP. Fluid flow inhibits endothelial adhesiveness: nitric oxide and transcriptional regulation of VCAM-1. *Circulation*. 1996;94(7):1682-9.
39. Cooke M, John P, Dzau M, Victor J. Nitric oxide synthase: role in the genesis of vascular disease. *Annual review of medicine*. 1997;48(1):489-509.
40. Rhee M-Y, Na S-H, Kim Y-K, Lee M-M, Kim H-Y. Acute effects of cigarette smoking on arterial stiffness and blood pressure in male smokers with hypertension. *American journal of hypertension*. 2007;20(6):637-41.
41. Mahmud A, Feely J. Effect of smoking on arterial stiffness and pulse pressure amplification. *Hypertension*. 2003;41(1):183-7.
42. Kim JW, Park CG, Hong SJ, Park SM, Rha SW, Seo HS, et al. Acute and chronic effects of cigarette smoking on arterial stiffness. *Blood pressure*. 2005;14(2):80-5.
43. Benowitz NL, Burbank AD. Cardiovascular toxicity of nicotine: Implications for electronic cigarette use. *Trends Cardiovasc Med*. 2016;26(6):515-23.

44. Zieman SJ, Melenovsky V, Kass DA. Mechanisms, pathophysiology, and therapy of arterial stiffness. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25(5):932-43.
45. Nakamura T, Ebihara I, Shimada N, Koide H. Effect of cigarette smoking on plasma metalloproteinase-9 concentration. *Clinica chimica acta.* 1998;276(2):173-7.
46. Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis K. Tobacco smoke: involvement of reactive oxygen species and stable free radicals in mechanisms of oxidative damage, carcinogenesis and synergistic effects with other respirable particles. *Int J Environ Res Public Health.* 2009;6(2):445-62.
47. Church DF, Pryor WA. Free-radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications. *Environ Health Perspect.* 1985;64:111-26.
48. Burke A, FitzGerald GA. Oxidative stress and smoking-induced vascular injury. *Progress in cardiovascular diseases.* 2003;46(1):79-90.
49. Halliwell B, Gutteridge JM. *Free radicals in biology and medicine*: Oxford university press, USA; 2015.
50. Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circulation research.* 2000;87(10):840-4.
51. Moncada S, Higgs E. Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. *European journal of clinical investigation.* 1991;21(4):361-74.
52. Csiszar A, Podlutzky A, Wolin MS, Losonczy G, Pacher P, Ungvari Z. Oxidative stress and accelerated vascular aging: implications for cigarette smoking. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2009;14(8):3128-44.
53. Madamanchi NR, Vendrov A, Runge MS. Oxidative stress and vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25(1):29-38.
54. Heitzer T, Just H, Münzel T. Antioxidant vitamin C improves endothelial dysfunction in chronic smokers. *Circulation.* 1996;94(1):6-9.
55. Faroon O, Roney N, Taylor J, Ashizawa A, Lumpkin MH, Plewak DJ. Acrolein environmental levels and potential for human exposure. *Toxicol Ind Health.* 2008;24(8):543-64.
56. Faroon O, Roney N, Taylor J, Ashizawa A, Lumpkin MH, Plewak DJ. Acrolein health effects. *Toxicol Ind Health.* 2008;24(7):447-90.
57. Wang GW, Guo Y, Vondriska TM, Zhang J, Zhang S, Tsai LL, et al. Acrolein consumption exacerbates myocardial ischemic injury and blocks nitric oxide-induced PKCepsilon signaling and cardioprotection. *J Mol Cell Cardiol.* 2008;44(6):1016-22.
58. Dwivedi AM, Johanson G, Lorentzen JC, Palmberg L, Sjögren B, Ernstgård L. Acute effects of acrolein in human volunteers during controlled exposure. *Inhal Toxicol.* 2015;27(14):810-21.
59. Nemmar A, Hoet PH, Vanquickenborne B, Dinsdale D, Thomeer M, Hoylaerts MF, et al. Passage of inhaled particles into the blood circulation in humans. *Circulation.* 2002;105(4):411-4.
60. Negre-Salvayre A, Coatrieux C, Ingueneau C, Salvayre R. Advanced lipid peroxidation end products in oxidative damage to proteins. Potential role in diseases and therapeutic prospects for the inhibitors. *Br J Pharmacol.* 2008;153(1):6-20.
61. Jacobs AT, Marnett LJ. Systems analysis of protein modification and cellular responses induced by electrophile stress. *Acc Chem Res.* 2010;43(5):673-83.
62. Cai J, Bhatnagar A, Pierce WM, Jr. Protein modification by acrolein: formation and stability of cysteine adducts. *Chem Res Toxicol.* 2009;22(4):708-16.
63. Srivastava M, Atwater I, Glasman M, Leighton X, Goping G, Caohuy H, et al. Defects in inositol 1,4,5-trisphosphate receptor expression, Ca(2+) signaling, and insulin secretion in the *anx7(+/-)* knockout mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(24):13783-8.
64. Keith RJ, Haberzettl P, Vladyskovskaya E, Hill BG, Kaiserova K, Srivastava S, et al. Aldose reductase decreases endoplasmic reticulum stress in ischemic hearts. *Chem Biol Interact.* 2009;178(1-3):242-9.

65. Alwis KU, deCastro BR, Morrow JC, Blount BC. Acrolein Exposure in U.S. Tobacco Smokers and Non-Tobacco Users: NHANES 2005-2006. *Environ Health Perspect.* 2015;123(12):1302-8.
66. Ismahil MA, Hamid T, Haberzettl P, Gu Y, Chandrasekar B, Srivastava S, et al. Chronic oral exposure to the aldehyde pollutant acrolein induces dilated cardiomyopathy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2011;301(5):H2050-60.
67. Watanabe K, Nakazato Y, Saiki R, Igarashi K, Kitada M, Ishii I. Acrolein-conjugated low-density lipoprotein induces macrophage foam cell formation. *Atherosclerosis.* 2013;227(1):51-7.
68. Kim CE, Lee SJ, Seo KW, Park HM, Yun JW, Bae JU, et al. Acrolein increases 5-lipoxygenase expression in murine macrophages through activation of ERK pathway. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2010;245(1):76-82.
69. Conklin DJ, Bhatnagar A, Cowley HR, Johnson GH, Wiechmann RJ, Sayre LM, et al. Acrolein generation stimulates hypercontraction in isolated human blood vessels. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2006;217(3):277-88.
70. Sithu SD, Srivastava S, Vladykovskaya EN, Bhatnagar A, D'Souza SE. Environmental aldehyde, acrolein regulates endothelial cell adhesion molecules. *Wiley Online Library;* 2007.
71. Crowley LN, Le BL, Cicalo C, Brown J, Li Y, Kim YJ, et al. Acrolein, an environmental toxicant and its applications to in vivo and in vitro atherosclerosis models: An update. *Environmental Toxicology and Pharmacology.* 2022;93:103890.
72. Saiki R, Hayashi D, Ikuo Y, Nishimura K, Ishii I, Kobayashi K, et al. Acrolein stimulates the synthesis of IL-6 and C-reactive protein (CRP) in thrombosis model mice and cultured cells. *Journal of Neurochemistry.* 2013;127(5):652-9.
73. Moretto N, Bertolini S, Iadicco C, Marchini G, Kaur M, Volpi G, et al. Cigarette smoke and its component acrolein augment IL-8/CXCL8 mRNA stability via p38 MAPK/MK2 signaling in human pulmonary cells. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology.* 2012;303(10):L929-L38.
74. Mio T, Romberger DJ, Thompson AB, Robbins RA, Heires A, Rennard SI. Cigarette smoke induces interleukin-8 release from human bronchial epithelial cells. *American journal of respiratory and critical care medicine.* 1997;155(5):1770-6.
75. Von Burg R, Stout T. Acetaldehyde. *J Appl Toxicol.* 1991;11(5):373-6.
76. Hill GE, Miller JA, Baxter BT, Klassen LW, Duryee MJ, Tuma DJ, et al. Association of malondialdehyde-acetaldehyde (MAA) adducted proteins with atherosclerotic-induced vascular inflammatory injury. *Atherosclerosis.* 1998;141(1):107-16.
77. Tuma DJ, Thiele GM, Xu D, Klassen LW, Sorrell MF. Acetaldehyde and malondialdehyde react together to generate distinct protein adducts in the liver during long-term ethanol administration. *Hepatology.* 1996;23(4):872-80.
78. Masamune A, Kikuta K, Satoh M, Satoh A, Shimosegawa T. Alcohol activates activator protein-1 and mitogen-activated protein kinases in rat pancreatic stellate cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 2002;302(1):36-42.
79. Gutierrez-Ruiz M, LE GQ, Hernandez E, Bucio L, Souza V, Llorente L, et al. Cytokine response and oxidative stress produced by ethanol, acetaldehyde and endotoxin treatment in HepG2 cells. *The Israel Medical Association Journal: IMAJ.* 2001;3(2):131-6.
80. Hatch E, Morrow D, Liu W, Cahill PA, Redmond EM. Differential effects of alcohol and its metabolite acetaldehyde on vascular smooth muscle cell Notch signaling and growth. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2018;314(1):H131-h7.
81. Owens GK, Kumar MS, Wamhoff BR. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol Rev.* 2004;84(3):767-801.
82. Folkow B. Physiological aspects of primary hypertension. *Physiol Rev.* 1982;62(2):347-504.

83. Intengan HD, Schiffrin EL. Structure and mechanical properties of resistance arteries in hypertension: role of adhesion molecules and extracellular matrix determinants. *Hypertension*. 2000;36(3):312-8.
84. Mulvany MJ, Baumbach GL, Aalkjaer C, Heagerty AM, Korsgaard N, Schiffrin EL, et al. Vascular remodeling. *Hypertension*. 1996;28(3):505-6.
85. Metz B, Kersten GF, Hoogerhout P, Brugghe HF, Timmermans HA, de Jong A, et al. Identification of formaldehyde-induced modifications in proteins: reactions with model peptides. *J Biol Chem*. 2004;279(8):6235-43.
86. Lin Z, Luo W, Li H, Zhang Y. The effect of endogenous formaldehyde on the rat aorta endothelial cells. *Toxicol Lett*. 2005;159(2):134-43.
87. Zhang Y, Yang Y, He X, Yang P, Zong T, Sun P, et al. The cellular function and molecular mechanism of formaldehyde in cardiovascular disease and heart development. *J Cell Mol Med*. 2021;25(12):5358-71.
88. Baker RR. The generation of formaldehyde in cigarettes--Overview and recent experiments. *Food Chem Toxicol*. 2006;44(11):1799-822.
89. Yu PH, Deng YL. Endogenous formaldehyde as a potential factor of vulnerability of atherosclerosis: involvement of semicarbazide-sensitive amine oxidase-mediated methylamine turnover. *Atherosclerosis*. 1998;140(2):357-63.
90. Kim W, Terada N, Nomura T, Takahashi R, Lee S, Park J, et al. Effect of formaldehyde on the expression of adhesion molecules in nasal microvascular endothelial cells: the role of formaldehyde in the pathogenesis of sick building syndrome. *Clinical & Experimental Allergy*. 2002;32(2):287-95.
91. Langford SD, Trent MB, Boor PJ. Cultured rat vascular smooth muscle cells are resistant to methylamine toxicity: no correlation to semicarbazide-sensitive amine oxidase. *Cardiovasc Toxicol*. 2001;1(1):51-60.
92. Stute NL, Stickford JL, Augenreich MA, Kimball KC, Cope JM, Bennett C, et al. Arterial stiffness and carotid distensibility following acute formaldehyde exposure in female adults. *Toxicol Ind Health*. 2021;37(9):535-46.
93. Tsai JR, Chong IW, Chen CC, Lin SR, Sheu CC, Hwang JJ. Mitogen-activated protein kinase pathway was significantly activated in human bronchial epithelial cells by nicotine. *DNA Cell Biol*. 2006;25(5):312-22.
94. Kashiwagi Y, Yanagita M, Kojima Y, Shimabukuro Y, Murakami S. Nicotine up-regulates IL-8 expression in human gingival epithelial cells following stimulation with IL-1 β or P. gingivalis lipopolysaccharide via nicotinic acetylcholine receptor signalling. *Arch Oral Biol*. 2012;57(5):483-90.
95. Dutta P, Courties G, Wei Y, Leuschner F, Gorbato R, Robbins CS, et al. Myocardial infarction accelerates atherosclerosis. *Nature*. 2012;487(7407):325-9.
96. Lee J, Cooke JP. Nicotine and pathological angiogenesis. *Life Sci*. 2012;91(21-22):1058-64.
97. Jensen K, Nizamutdinov D, Guerrier M, Afroze S, Dostal D, Glaser S. General mechanisms of nicotine-induced fibrogenesis. *Faseb j*. 2012;26(12):4778-87.
98. Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol*. 2008;214(2):199-210.
99. Segura AM, Frazier OH, Buja LM. Fibrosis and heart failure. *Heart Fail Rev*. 2014;19(2):173-85.
100. Harvey A, Montezano AC, Lopes RA, Rios F, Touyz RM. Vascular Fibrosis in Aging and Hypertension: Molecular Mechanisms and Clinical Implications. *Can J Cardiol*. 2016;32(5):659-68.
101. Murray RP, Bailey WC, Daniels K, Bjornson WM, Kurnow K, Connett JE, et al. Safety of nicotine polacrilex gum used by 3,094 participants in the Lung Health Study. Lung Health Study Research Group. *Chest*. 1996;109(2):438-45.

102. Mills EJ, Thorlund K, Eapen S, Wu P, Prochaska JJ. Cardiovascular events associated with smoking cessation pharmacotherapies: a network meta-analysis. *Circulation*. 2014;129(1):28-41.
103. Joseph AM, Norman SM, Ferry LH, Prochazka AV, Westman EC, Steele BG, et al. The safety of transdermal nicotine as an aid to smoking cessation in patients with cardiac disease. *N Engl J Med*. 1996;335(24):1792-8.
104. Brown CJ, Cheng JM. Electronic cigarettes: product characterisation and design considerations. *Tob Control*. 2014;23 Suppl 2(Suppl 2):ii4-10.
105. Teasdale JE, Newby AC, Timpson NJ, Munafo MR, White SJ. Cigarette smoke but not electronic cigarette aerosol activates a stress response in human coronary artery endothelial cells in culture. *Drug Alcohol Depend*. 2016;163:256-60.
106. Britton J, Arnott D, McNeill A, Hopkinson N. Nicotine without smoke-putting electronic cigarettes in context. *Bmj*. 2016;353:i1745.
107. Vlachopoulos C, Ioakeimidis N, Abdelrasoul M, Terentes-Printzios D, Georgakopoulos C, Pietri P, et al. Electronic Cigarette Smoking Increases Aortic Stiffness and Blood Pressure in Young Smokers. *J Am Coll Cardiol*. 2016;67(23):2802-3.
108. Franzen KF, Willig J, Cayo Talavera S, Meusel M, Sayk F, Reppel M, et al. E-cigarettes and cigarettes worsen peripheral and central hemodynamics as well as arterial stiffness: A randomized, double-blinded pilot study. *Vasc Med*. 2018;23(5):419-25.
109. St Helen G, Havel C, Dempsey DA, Jacob P, 3rd, Benowitz NL. Nicotine delivery, retention and pharmacokinetics from various electronic cigarettes. *Addiction*. 2016;111(3):535-44.
110. Benowitz NL, Fraiman JB. Cardiovascular effects of electronic cigarettes. *Nat Rev Cardiol*. 2017;14(8):447-56.
111. Wagener TL, Floyd EL, Stepanov I, Driskill LM, Frank SG, Meier E, et al. Have combustible cigarettes met their match? The nicotine delivery profiles and harmful constituent exposures of second-generation and third-generation electronic cigarette users. *Tob Control*. 2017;26(e1):e23-e8.
112. Sleiman M, Logue JM, Montesinos VN, Russell ML, Litter MI, Gundel LA, et al. Emissions from Electronic Cigarettes: Key Parameters Affecting the Release of Harmful Chemicals. *Environ Sci Technol*. 2016;50(17):9644-51.
113. Jensen RP, Luo W, Pankow JF, Strongin RM, Peyton DH. Hidden formaldehyde in e-cigarette aerosols. *N Engl J Med*. 2015;372(4):392-4.
114. 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):1219-22.
115. Margham J, McAdam K, Forster M, Liu C, Wright C, Mariner D, et al. Chemical composition of aerosol from an e-cigarette: a quantitative comparison with cigarette smoke. *Chemical research in toxicology*. 2016;29(10):1662-78.
116. Barrington-Trimis JL, Samet JM, McConnell R. Flavorings in electronic cigarettes: an unrecognized respiratory health hazard? *Jama*. 2014;312(23):2493-4.
117. Immunology of cardiovascular homeostasis and pathology. [Place of publication not identified: SPRINGER INTERNATIONAL PU; 2018.
118. Incalza MA, D'Oria R, Natalicchio A, Perrini S, Laviola L, Giorgino F. Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases. *Vascul Pharmacol*. 2018;100:1-19.
119. Landmesser U, Dikalov S, Price SR, McCann L, Fukai T, Holland SM, et al. Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *J Clin Invest*. 2003;111(8):1201-9.

120. Kuzkaya N, Weissmann N, Harrison DG, Dikalov S. Interactions of peroxynitrite, tetrahydrobiopterin, ascorbic acid, and thiols: implications for uncoupling endothelial nitric oxide synthase. *J Biol Chem.* 2003;278(25):22546-54.
121. Carnevale R, Sciarretta S, Violi F, Nocella C, Loffredo L, Perri L, et al. Acute Impact of Tobacco vs Electronic Cigarette Smoking on Oxidative Stress and Vascular Function. *Chest.* 2016;150(3):606-12.
122. Anderson C, Majeste A, Hanus J, Wang S. E-Cigarette Aerosol Exposure Induces Reactive Oxygen Species, DNA Damage, and Cell Death in Vascular Endothelial Cells. *Toxicol Sci.* 2016;154(2):332-40.
123. Antoniewicz L, Bosson JA, Kuhl J, Abdel-Halim SM, Kiessling A, Mobarrez F, et al. Electronic cigarettes increase endothelial progenitor cells in the blood of healthy volunteers. *Atherosclerosis.* 2016;255:179-85.
124. Zeiher AM, Fisslthaler B, Schray-Utz B, Busse R. Nitric oxide modulates the expression of monocyte chemoattractant protein 1 in cultured human endothelial cells. *Circ Res.* 1995;76(6):980-6.
125. Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88(11):4651-5.
126. Murphy K, Weaver C. *Janeway's immunobiology: Garland science; 2016.*
127. Gimbrone MA, Jr., Garcia-Cardena G. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circ Res.* 2016;118(4):620-36.
128. Lakatta EG. Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part III: cellular and molecular clues to heart and arterial aging. *Circulation.* 2003;107(3):490-7.
129. Li Z, Froehlich J, Galis ZS, Lakatta EG. Increased expression of matrix metalloproteinase-2 in the thickened intima of aged rats. *Hypertension.* 1999;33(1):116-23.
130. Mengden T, Hausberg M, Heiss C, Mitchell A, Nixdorff U, Ott C, et al. Arterielle Gefäßsteifigkeit – Ursachen und Konsequenzen. *Der Kardiologe.* 2016;10(1):38-46.
131. Cocciolone AJ, Hawes JZ, Staiculescu MC, Johnson EO, Murshed M, Wagenseil JE. Elastin, arterial mechanics, and cardiovascular disease. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2018;315(2):H189-H205.
132. Norman PE, Curci JA. Understanding the effects of tobacco smoke on the pathogenesis of aortic aneurysm. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013;33(7):1473-7.
133. Basalyga DM, Simionescu DT, Xiong W, Baxter BT, Starcher BC, Vyavahare NR. Elastin degradation and calcification in an abdominal aorta injury model: role of matrix metalloproteinases. *Circulation.* 2004;110(22):3480-7.
134. Ishii T, Asuwa N. Collagen and elastin degradation by matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of matrix metalloproteinase in aortic dissection. *Hum Pathol.* 2000;31(6):640-6.
135. Yan C, Boyd DD. Regulation of matrix metalloproteinase gene expression. *J Cell Physiol.* 2007;211(1):19-26.
136. Seo KW, Lee SJ, Kim YH, Bae JU, Park SY, Bae SS, et al. Mechanical stretch increases MMP-2 production in vascular smooth muscle cells via activation of PDGFR- β /Akt signaling pathway. *PLoS One.* 2013;8(8):e70437.
137. Simova J, Skvor J, Reissigova J, Dudra J, Lindner J, Capek P, et al. Serum Levels of Matrix Metalloproteinases 2 and 9 and TGFBR2 Gene Screening in Patients with Ascending Aortic Dilatation. *Folia Biologica.* 2013.
138. Wagenhäuser MU, Schellinger IN, Yoshino T, Toyama K, Kayama Y, Deng A, et al. Chronic Nicotine Exposure Induces Murine Aortic Remodeling and Stiffness Segmentation- Implications for Abdominal Aortic Aneurysm Susceptibility. *Front Physiol.* 2018;9:1459.
139. Ghosh A, Coakley RD, Ghio AJ, Muhlebach MS, Esther CR, Jr., Alexis NE, et al. Chronic E-Cigarette Use Increases Neutrophil Elastase and Matrix Metalloprotease Levels in the Lung. *Am J Respir Crit Care Med.* 2019;200(11):1392-401.

140. Yin LM, Wei Y, Wang Y, Xu YD, Yang YQ. Long term and standard incubations of WST-1 reagent reflect the same inhibitory trend of cell viability in rat airway smooth muscle cells. *Int J Med Sci.* 2013;10(1):68-72.
141. Villablanca AC. Nicotine stimulates DNA synthesis and proliferation in vascular endothelial cells in vitro. *J Appl Physiol (1985).* 1998;84(6):2089-98.
142. Park YS, Taniguchi N. Acrolein induces inflammatory response underlying endothelial dysfunction: a risk factor for atherosclerosis. *Ann N Y Acad Sci.* 2008;1126:185-9.
143. Woodall M, Jacob J, Kalsi K, Schroeder V, Davis E, Kenyon B, et al. E-cigarette constituents propylene glycol and vegetable glycerin decrease glucose uptake and its metabolism in airway epithelial cells in vitro. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology.* 2020;319(6):L957-L67.
144. Redmond EM, Morrow D, Kundimi S, Miller-Graziano CL, Cullen JP. Acetaldehyde stimulates monocyte adhesion in a P-selectin- and TNFalpha-dependent manner. *Atherosclerosis.* 2009;204(2):372-80.
145. Tyihák E, Bocsi J, Timár F, Rácz G, Szende B. Formaldehyde promotes and inhibits the proliferation of cultured tumour and endothelial cells. *Cell Prolif.* 2001;34(3):135-41.
146. Dai Y, Yang W, Song H, He X, Guan R, Wu Z, et al. Long-term effects of chronic exposure to electronic cigarette aerosol on the cardiovascular and pulmonary system in mice: A comparative study to cigarette smoke. *Environ Int.* 2024;185:108521.
147. Dikalov S, Itani H, Richmond B, Arslanbaeva L, Vergeade A, Rahman SJ, et al. Tobacco smoking induces cardiovascular mitochondrial oxidative stress, promotes endothelial dysfunction, and enhances hypertension. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology.* 2019;316(3):H639-H46.
148. Park YS, Misonou Y, Fujiwara N, Takahashi M, Miyamoto Y, Koh YH, et al. Induction of thioredoxin reductase as an adaptive response to acrolein in human umbilical vein endothelial cells. *Biochemical and biophysical research communications.* 2005;327(4):1058-65.
149. Dreher D, Junod AF. Differential effects of superoxide, hydrogen peroxide, and hydroxyl radical on intracellular calcium in human endothelial cells. *J Cell Physiol.* 1995;162(1):147-53.
150. Ody C, Junod AF. Effect of variable glutathione peroxidase activity on H₂O₂-related cytotoxicity in cultured aortic endothelial cells. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1985;180(1):103-11.
151. Albelda SM. Endothelial and epithelial cell adhesion molecules. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1991;4(3):195-203.
152. Williams AF, Barclay AN. The immunoglobulin superfamily--domains for cell surface recognition. *Annu Rev Immunol.* 1988;6:381-405.
153. Muller WA, Weigl SA, Deng X, Phillips DM. PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. *J Exp Med.* 1993;178(2):449-60.
154. Osborn L. Leukocyte adhesion to endothelium in inflammation. *Cell.* 1990;62(1):3-6.
155. Pober JS, Cotran RS. The role of endothelial cells in inflammation. *Transplantation.* 1990;50(4):537-44.
156. Davies MJ, Gordon JL, Gearing AJ, Pigott R, Woolf N, Katz D, et al. The expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, PECAM, and E-selectin in human atherosclerosis. *J Pathol.* 1993;171(3):223-9.
157. Cybulsky MI, Iiyama K, Li H, Zhu S, Chen M, Iiyama M, et al. A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis. *J Clin Invest.* 2001;107(10):1255-62.
158. Giebe S, Cockcroft N, Hewitt K, Brux M, Hofmann A, Morawietz H, et al. Cigarette smoke extract counteracts atheroprotective effects of high laminar flow on endothelial function. *Redox Biol.* 2017;12:776-86.
159. Alamanda V, Singh S, Lawrence NJ, Chellappan SP. Nicotine-mediated induction of E-selectin in aortic endothelial cells requires Src kinase and E2F1 transcriptional activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012;418(1):56-61.

160. Makwana O, Smith GA, Flockton HE, Watters GP, Lowe F, Breheny D. Impact of cigarette versus electronic cigarette aerosol conditioned media on aortic endothelial cells in a microfluidic cardiovascular model. *Sci Rep.* 2021;11(1):4747.
161. Albaugh G, Bellavance E, Strande L, Heinburger S, Hewitt CW, Alexander JB. Nicotine induces mononuclear leukocyte adhesion and expression of adhesion molecules, VCAM and ICAM, in endothelial cells in vitro. *Ann Vasc Surg.* 2004;18(3):302-7.
162. Wu X, Li C, Mariyam Z, Jiang P, Zhou M, Zeb F, et al. Acrolein-induced atherogenesis by stimulation of hepatic flavin containing monooxygenase 3 and a protection from hydroxytyrosol. *Journal of Cellular Physiology.* 2019;234(1):475-85.
163. Mulorz J, Spin JM, Mulorz P, Wagenhäuser MU, Deng A, Mattern K, et al. E-cigarette exposure augments murine abdominal aortic aneurysm development: role of Chil1. *Cardiovasc Res.* 2023;119(3):867-78.
164. Taki FA, Pan X, Zhang B. Chronic nicotine exposure systemically alters microRNA expression profiles during post-embryonic stages in *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Physiol.* 2014;229(1):79-89.
165. Barallobre-Barreiro J, Loeys B, Mayr M, Rienks M, Verstraeten A, Kovacic JC. Extracellular Matrix in Vascular Disease, Part 2/4: JACC Focus Seminar. *J Am Coll Cardiol.* 2020;75(17):2189-203.
166. Pöschl E, Schlötzer-Schrehardt U, Brachvogel B, Saito K, Ninomiya Y, Mayer U. Collagen IV is essential for basement membrane stability but dispensable for initiation of its assembly during early development. *Development.* 2004;131(7):1619-28.
167. Chow MJ, Turcotte R, Lin CP, Zhang Y. Arterial extracellular matrix: a mechanobiological study of the contributions and interactions of elastin and collagen. *Biophys J.* 2014;106(12):2684-92.
168. Halper J. Basic Components of Vascular Connective Tissue and Extracellular Matrix. *Adv Pharmacol.* 2018;81:95-127.
169. Geng Y, McQuillan D, Roughley PJ. SLRP interaction can protect collagen fibrils from cleavage by collagenases. *Matrix Biol.* 2006;25(8):484-91.
170. Jacob-Ferreira AL, Palei AC, Cau SB, Moreno H, Jr., Martinez ML, Izidoro-Toledo TC, et al. Evidence for the involvement of matrix metalloproteinases in the cardiovascular effects produced by nicotine. *Eur J Pharmacol.* 2010;627(1-3):216-22.
171. O'Toole TE, Zheng YT, Hellmann J, Conklin DJ, Barski O, Bhatnagar A. Acrolein activates matrix metalloproteinases by increasing reactive oxygen species in macrophages. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2009;236(2):194-201.
172. Damay VA, Setiawan, Lesmana R, Akbar MR, Lukito AA, Tarawan VM, et al. Aerobic Exercise versus Electronic Cigarette in Vascular Aging Process: First Histological Insight. *Int J Vasc Med.* 2023;2023:8874599.
173. Zainalabidin S, Budin SB, Ramalingam A, Lim YC. Aortic remodelling in chronic nicotine-administered rat. *Korean J Physiol Pharmacol.* 2014;18(5):411-8.
174. Chen D, Fang L, Li H, Jin C. The effects of acetaldehyde exposure on histone modifications and chromatin structure in human lung bronchial epithelial cells. *Environ Mol Mutagen.* 2018;59(5):375-85.
175. Cheah NP, Pennings JL, Vermeulen JP, van Schooten FJ, Opperhuizen A. In vitro effects of aldehydes present in tobacco smoke on gene expression in human lung alveolar epithelial cells. *Toxicol In Vitro.* 2013;27(3):1072-81.
176. Thompson CA, Burcham PC. Genome-wide transcriptional responses to acrolein. *Chem Res Toxicol.* 2008;21(12):2245-56.
177. Raveendran M, Senthil D, Utama B, Shen Y, Dudley D, Wang J, et al. Cigarette suppresses the expression of P4Halpa and vascular collagen production. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;323(2):592-8.
178. Liu Y, Beyer A, Aebersold R. On the dependency of cellular protein levels on mRNA abundance. *Cell.* 2016;165(3):535-50.

179. Keene JD. RNA regulons: coordination of post-transcriptional events. *Nature Reviews Genetics*. 2007;8(7):533-43.
180. Dufner A, Thomas G. Ribosomal S6 kinase signaling and the control of translation. *Experimental cell research*. 1999;253(1):100-9.
181. Wolosowicz M, Prokopiuk S, Kaminski TW. The Complex Role of Matrix Metalloproteinase-2 (MMP-2) in Health and Disease. *Int J Mol Sci*. 2024;25(24).
182. Van Doren SR. Matrix metalloproteinase interactions with collagen and elastin. *Matrix Biol*. 2015;44-46:224-31.
183. Fedak PW, de Sa MP, Verma S, Nili N, Kazemian P, Butany J, et al. Vascular matrix remodeling in patients with bicuspid aortic valve malformations: implications for aortic dilatation. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2003;126(3):797-806.
184. Davis V, Persidskaia R, Baca-Regen L, Itoh Y, Nagase H, Persidsky Y, et al. Matrix metalloproteinase-2 production and its binding to the matrix are increased in abdominal aortic aneurysms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998;18(10):1625-33.
185. Dilmé JF, Bellmunt S, Camacho M, Solà-Vilà D, Romero JM, Escudero JR, et al. Influence of cardiovascular risk factors on levels of matrix metalloproteinases 2 and 9 in human abdominal aortic aneurysms. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2014;48(4):374-81.
186. Bernardo MM, Fridman R. TIMP-2 (tissue inhibitor of metalloproteinase-2) regulates MMP-2 (matrix metalloproteinase-2) activity in the extracellular environment after pro-MMP-2 activation by MT1 (membrane type 1)-MMP. *Biochem J*. 2003;374(Pt 3):739-45.
187. Laronha H, Caldeira J. Structure and function of human matrix metalloproteinases. *Cells*. 2020;9(5):1076.
188. Corcoran ML, Hewitt RE, Kleiner Jr DE, Stetler-Stevenson WG. MMP-2: expression, activation and inhibition. *Enzyme and Protein*. 1996;49(1-3):7-19.
189. Amaral SFD, Scaffa PMC, Rodrigues RDS, Nesadal D, Marques MM, Nogueira FN, et al. Dynamic Influence of pH on Metalloproteinase Activity in Human Coronal and Radicular Dentin. *Caries Res*. 2018;52(1-2):113-8.
190. Tsamis A, Krawiec JT, Vorp DA. Elastin and collagen fibre microstructure of the human aorta in ageing and disease: a review. *J R Soc Interface*. 2013;10(83):20121004.
191. Wagenseil JE, Mecham RP. Vascular extracellular matrix and arterial mechanics. *Physiological reviews*. 2009;89(3):957-89.
192. Greenwald SE. Ageing of the conduit arteries. *J Pathol*. 2007;211(2):157-72.
193. Halloran BG, Davis VA, McManus BM, Lynch TG, Baxter BT. Localization of aortic disease is associated with intrinsic differences in aortic structure. *Journal of Surgical Research*. 1995;59(1):17-22.
194. Wang S, Zhang C, Zhang M, Liang B, Zhu H, Lee J, et al. Activation of AMP-activated protein kinase $\alpha 2$ by nicotine instigates formation of abdominal aortic aneurysms in mice in vivo. *Nat Med*. 2012;18(6):902-10.
195. Olfert IM, DeVallance E, Hoskinson H, Branyan KW, Clayton S, Pitzer CR, et al. Chronic exposure to electronic cigarettes results in impaired cardiovascular function in mice. *J Appl Physiol (1985)*. 2018;124(3):573-82.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich während des gesamten Promotionsverlaufs unterstützt haben.

Zunächst danke ich Herrn Prof. Dr. med. Markus Wagenhäuser und Herrn Dr. med. Joscha Mulorz für die Möglichkeit, diese Doktorarbeit erstellen zu können, sowie für die intensive wissenschaftliche Betreuung. Bereits bei der Festlegung des Themas konnte ich mich darauf verlassen, dass die Kommunikation bei Fragen und Unklarheiten immer problemlos erfolgen kann. Vor allem ist es für alle Beteiligten eine größere Herausforderung, dass ich als Nicht-Muttersprachlerin eine wissenschaftliche Literatur auf Deutsch schreibe. Außerdem danke ich Frau Dr. rer. nat. Wiebke Ibing herzlich für die Betreuung und Unterstützung vor Ort im Labor. Bei fast allen Anliegen und Problemen rund um die Doktorarbeit konnte ich wertvolle Ratschläge und Lösungen von ihr erhalten. Darüber hinaus danke ich Frau Astrid Hoffmann für die technische Unterstützung und ihre reichlichen Erfahrungen beim experimentellen Teil dieser Doktorarbeit.

Ein weiterer Dank geht an Frau Kiku Takeuchi, M. Sc., meine beste Kollegin im Labor. Die gegenseitige Begleitung hat mir in schwierigeren Phasen sehr geholfen.

Ein besonderer Dank geht an meine Eltern, Herrn Prof. Hsi-Chuan Liu und Frau Hsing-Chun Chen, für ihre bedingungslose Unterstützung. Auch wenn ich für das Medizinstudium mehr als 10.000 Kilometer weit wegziehen musste, haben sie mir immer das Gefühl gegeben, dass ich immerhin noch eine Familie habe. Sie haben außerdem meinen Charakter und meine Wertvorstellungen maßgeblich beeinflusst, sodass ich bis heute vieles gut bewältigen kann.

Zudem möchte ich mich bei all meinen Freunden in Deutschland bedanken. Sie lassen mich hier in einem mir völlig fremden Land wie zu Hause fühlen.

Am Ende danke ich allen Mitgliedern des *Optoelectronics-, Medical Physics- und Biomedical Engineering-Labs* an der *National Taiwan University*. Die Erfahrungen dort haben mir sehr dabei geholfen, mich schnell in der Laborarbeit zurechtzufinden.