

## PERUBAHAN JUMLAH SEL PURKINJE SEREBELUM TIKUS WISTAR JANTAN SETELAH PEMAPARAN ROKOK ELEKTRIK

Etha Rambung<sup>1</sup>

<sup>1</sup>. Fakultas Kedokteran Universitas Ciputra Surabaya  
etha.rambung@ciputra.ac.id

### ABSTRAK

Desain produk, rasa, pemasaran dan persepsi keselamatan rokok elektrik telah meningkatkan daya tarik rokok elektrik bagi anak muda di seluruh dunia sehingga penggunaannya terus meningkat. Hal ini dapat menjadi salah satu ancaman dalam upaya menurunkan prevalensi perokok usia 10-18 tahun di Indonesia. Rokok elektrik menyebabkan stress oksidatif sedangkan otak rentan terhadap stress oksidatif karena membutuhkan oksigen dalam jumlah besar. Penelitian eksperimental dengan desain *posttest only control* ini bertujuan untuk mengetahui perubahan struktur histologi dan jumlah sel Purkinje serebelum tikus wistar jantan setelah pemaparan rokok elektrik. Penelitian ini menggunakan sampel 32 ekor tikus wistar (*Rattus norvegicus*) jantan yang dibagi kedalam 4 kelompok perlakuan yaitu kelompok A (tanpa perlakuan), kelompok B (dimasukkan ke dalam kandang paparan), kelompok C (diberikan paparan rokok elektrik sebanyak 15 kali di dalam kandang paparan), dan kelompok D (diberikan paparan rokok elektrik sebanyak 30 kali di dalam kandang paparan). Paparan rokok elektrik diberikan selama 50 hari, kemudian dikorbankan dan dibuat sampel dengan pewarnaan *Hematoxylin Eosyn* (HE). Hasil penelitian menunjukkan bahwa jumlah sel purkinje serebelum tikus wistar jantan yang dipapari rokok elektrik menurun secara signifikan dan terdapat perbedaan signifikan jumlah sel pada pemaparan 15 kali dengan 30 kali serta terjadi kariolisis pada sel. Rokok elektrik menyebabkan kerusakan inti dan penurunan jumlah sel Purkinje Serebelum tikus wistar jantan.

**Kata kunci :** Rokok elektrik., Stress oksidatif., Sel Purkinje Serebelum

### ABSTRACT

Design, taste, marketing and perceptions of safety from e-cigarettes have increased the appeal of e-cigarettes to young people around the world so that their use continues to increase. This is one of the threats in efforts to reduce the prevalence of smokers aged 10-18 years in Indonesia. Electric cigarettes cause oxidative stress while the brain is vulnerable to oxidative stress because it requires large amounts of oxygen. This experimental study with a posttest only control design aimed to determine changes in histological structure and number of male Wistar rat cerebellum Purkinje cells after exposure to electric cigarettes. This study used a sample of 32 male wistar rats (*Rattus norvegicus*) which were divided into 4 treatment groups: group A (without treatment), group B (put in an exposure cage), group C (given exposure to electric cigarettes 15 times in a cage exposure), and group D (given exposure to e-cigarettes 30 times in the exposure cage). Exposure to e-cigarettes was given for 50 days, then sacrificed and samples were made with Hematoxylin Eosyn (HE) staining. The results showed that the number of cerebellar purkinje cells in male Wistar rats exposed to electric cigarettes decreased significantly and there was a significant difference in the number of cells between 15 and 30 exposures and karyolysis occurred in the cells. E-cigarettes cause core damage and decrease in the number of Purkinje cells in the cerebellum of male wistar rats.

**Keywords:** E-cigarette., Oxidative stress., Purkinje cells of cerebellum

### PENDAHULUAN

Penggunaan rokok elektrik meningkat secara dramatis di kalangan anak muda di seluruh dunia. Desain

produk, rasa, pemasaran, dan persepsi keselamatan dan penerimaan telah meningkatkan daya tarik rokok elektrik bagi anak muda<sup>1</sup>. Rokok elektrik telah menjadi produk

tembakau yang paling umum digunakan di kalangan anak muda sejak 2014. Sekitar 1 dari setiap 30 siswa SMP (3,3%) dan sekitar 1 dari setiap 7 siswa SMA (14,1%) di Amerika melaporkan telah menggunakan rokok elektrik dalam 30 hari terakhir pada tahun 2022<sup>2</sup>. Riset Kesehatan Dasar (RISKESDAS) Kementerian Kesehatan Republik Indonesia tahun 2018 melaporkan bahwa prevalensi perokok usia 10-18 tahun di Indonesia yang ditargetkan turun 5,4% tahun 2019, tetapi kenyataan yang terjadi malah meningkat secara konsisten<sup>3</sup>. Menurut hasil survei *Global Adult Tobacco Survey* (GATS) terjadi peningkatan 10 kali lipat prevalensi perokok elektrik dari 0,3% (2011) menjadi 3% (2021) dan peningkatan 19,2% prevalensi perokok remaja usia 13-15 tahun<sup>4</sup>.

Rokok elektrik adalah perangkat elektronik untuk memanas cairan rokok elektrik yang disebut *e-liquid* sehingga dapat menghasilkan uap. Uap yang dihasilkan akan dihirup melalui corong. Bagian-bagian rokok elektrik adalah katrid, elemen pemanas dan baterai. Elektrik liquid terletak di dalam kartrid<sup>5</sup>.

Bahan utama yang terkandung dalam *e-liquid* adalah propilen glikol (PG) dan gliserol (Gly). Selain itu *e-liquid* juga dapat mengandung nikotin. Zat lain yang terkandung dalam *e-liquid* adalah aldehida, elemen renik, senyawa organik volatil (VOC), fenol, hidrokarbon aromatik polisiklik (PAH), dan logam berat. Zat-zat ini berfungsi untuk memberi rasa dan membentuk asap. Asap rokok elektrik juga mengandung ratusan senyawa yang berbeda. Sebagian zat tersebut terbentuk selama penguapan yang menyebabkan terjadinya dekomposisi termal<sup>6</sup>.

Rokok elektrik dapat menyebabkan stress oksidatif<sup>7</sup>. Hal ini disebabkan karena rokok elektrik menghasilkan *reactive oxygen species* (ROS) dan bersifat sitotoksik sehingga dapat menyebabkan kematian sel<sup>8</sup>. ROS dihasilkan dalam *e-liquid* dan aerosol rokok elektrik. Aerosol rokok elektrik juga dapat menyebabkan peningkatan sitokin pro-inflamasi dan penurunan kadar glutathione paru-paru yang berperan dalam menjaga keseimbangan redoks seluler<sup>9</sup>.

Sekitar 20% dari total oksigen basal dikonsumsi oleh otak. Otak membutuhkan oksigen dalam jumlah besar untuk memenuhi kebutuhan *adenosin trifosfat* (ATP) yang dibutuhkan dalam aktivitas neuron. Kekurangan oksigen akan menyebabkan kegagalan fungsi saraf dan iskemia<sup>10</sup>. Tingginya konsumsi oksigen dan kandungan lemak otak menyebabkan otak rentan mengalami stress oksidatif. Stress oksidatif dapat berdampak buruk terhadap fungsi sistem saraf pusat. Beberapa gangguan neurodegeneratif akibat stress oksidatif adalah Alzheimer, Parkinson dan Penyakit Huntington<sup>11</sup>.

Besarnya resiko stress oksidatif pada otak akibat paparan rokok elektrik mendorong dilakukannya penelitian ini. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh paparan rokok elektrik terhadap struktur histologis dan jumlah sel purkinje serebelum tikus wistar jantan.

## BAHAN DAN METODE

Penelitian ini menggunakan metode eksperimental dengan desain *posttest only control*. Penelitian ini telah mendapat persetujuan dari Komite Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Ciputra (FKUC) Surabaya (No.144/EC/KEPK- FKUC/IV/2022).

Sampel penelitian dihitung berdasarkan rumus Frederer menggunakan 32 ekor tikus wistar (*Rattus norvegicus*) jantan usia 3 bulan dengan kriteria inklusi berat badan 200-250 g, dalam kondisi sehat (bulu halus, mengkilat, gerakan aktif, mata jernih, feces baik dan tidak lembek) dan kriteria eksklusi adalah berat badan < 200 gram atau > 250 g, tikus sakit (tidak aktif atau memiliki kelainan anatomi), dan tikus mati sebelum atau selama perlakuan. Sampel terbagi 4 kelompok perlakuan yaitu kelompok A (tanpa perlakuan), kelompok B (dimasukkan ke dalam kandang paparan), kelompok C (diberikan paparan rokok elektrik sebanyak 15 kali di dalam kandang paparan), dan kelompok D (diberikan paparan rokok elektrik sebanyak 30 kali di dalam kandang paparan). Sampel penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus L.*) strain Wistar jantan,

Paparan rokok elektrik diberikan selama selama 5 menit/hari selama 50 hari didalam kandang perlakuan dengan model aquarium kaca berbentuk persegi panjang dengan ukuran 50 x 42 x 26 cm. Setelah perlakuan tikus dimasukkan kembali ke dalam kandang pemeliharaan. Pada hari ke 50, setelah pemaparan, tikus *dieuthanasia* dengan menggunakan ketamin. Kemudian dilakukan dekapitasi untuk mengambil sampel serebelum. Setelah itu sampel dimasukkan ke dalam botol berisi larutan formaldehide dan dibuat sediaan histologi dengan pewarnaan *Hematoxylin Eosyn* (HE).

Penghitungan jumlah sel purkinje serebelum menggunakan mikroskop triokuler olympus dengan pembesaran 400x dan sediaan histologis dengan pewarnaan HE. Sel yang dihitung yang memiliki inti sel bulat lonjong utuh dengan sitoplasma utuh dan batas yang jelas. Sel dengan inti pecah dan kromatin rusak (karioreksis) atau inti mati dan menghilang (kariolisis) tidak termasuk dalam penghitungan. Pengamatan dilakukan pada 5 lapangan dari masing-masing slide.

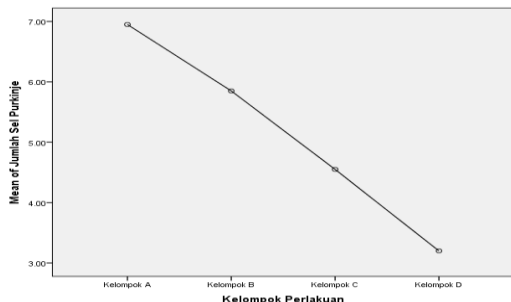
Hasil pengamatan diolah menggunakan SPSS (*statistical product and service solutions*) dengan analisa menggunakan *Annova*, dan *Post HOC LSD*.

## HASIL

Penghitungan jumlah sel purkinje serebelum tikus wistar jantan bertujuan untuk mengetahui pengaruh paparan rokok elektrik terhadap jumlah sel purkinje serebelum.

Data hasil penghitungan yang diperoleh menunjukkan perbedaan jumlah sel purkinje serebelum pada keempat kelompok perlakuan. Rerata jumlah sel Purkinje yang paling sedikit ditemukan pada kelompok paparan rokok elektrik 30 kali (Gambar 1).

Hasil analisa menggunakan *Saphiro Wilk* didapatkan data jumlah sel purkinje serebelum pada seluruh kelompok terdistribusi normal dan hasil *Levene Test* menunjukkan data jumlah sel purkinje serebelum homogen (tabel 1).



**Gambar 1.** Rerata jumlah sel purkinje serebelum pada masing-masing kelompok perlakuan

**Tabel 1.** Hasil penghitungan jumlah sel purkinje

| Kelompok perlakuan | X±SD         | Uji <i>Saphiro Wilk</i> | <i>Levene Test</i> |
|--------------------|--------------|-------------------------|--------------------|
| A (n=8)            | 6,95 ± 0,51  | 0,174**                 |                    |
| B (n=8)            | 5,85 ± 0,92  | 0,730**                 | 0,672***           |
| C (n=8)            | 4,55 ± 0,58  | 0,516**                 |                    |
| D (n=8)            | 3,20 ± 0,51* | 0,327**                 |                    |

\* Jumlah sel purkinje paling sedikit, \*\* Distribusi normal, \*\*\*Homogen

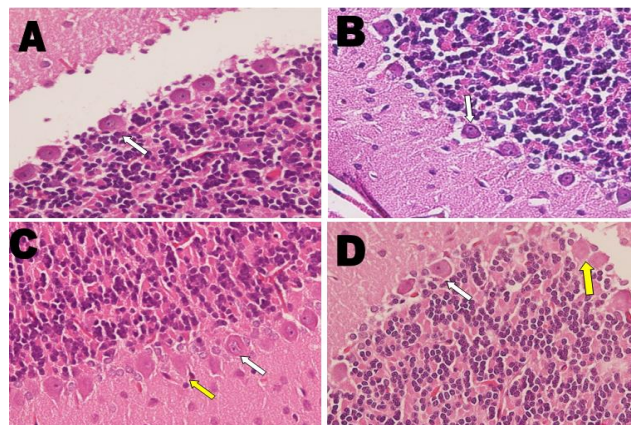
Selanjutnya dilakukan Uji *Annova* dan ditemukan bahwa ada perbedaan signifikan jumlah sel purkinje serebelum antara kelompok percobaan (P=0,000). Pada uji *Post HOC LSD* ditemukan bahwa terdapat perbedaan jumlah sel purkinje serebelum yang signifikan di antara seluruh kelompok percobaan (tabel 2).



**Tabel 2.** Hasil perbandingan jumlah sel purkinje serebelum antara kelompok perlakuan dengan uji *Post HOC LSD*.

| Kelompok perlakuan | A      | B      | C      | D      |
|--------------------|--------|--------|--------|--------|
| A (n=8)            | -      | 0,002* | 0,000* | 0,000* |
| B (n=8)            | 0,002* | -      | 0,000* | 0,000* |
| C (n=8)            | 0,000* | 0,000* | -      | 0,000* |
| D (n=8)            | 0,000* | 0,000* | 0,000* | -      |

\* Signifikan

Pada pengamatan struktur histologis serebelum ditemukan bahwa jumlah sel Purkinje pada kelompok yang mendapat paparan rokok elektrik lebih sedikit dibandingkan kelompok yang tidak mendapat paparan. Selain itu beberapa inti sel pada kelompok yang mendapat paparan rokok elektrik mengalami lisis (kariolisis) (Gambar 2).



**Gambar 2.** Perbedaan jumlah sel purkinje pada masing-masing kelompok (A,B,C dan D). Gambar panah  menunjukkan sel purkinje dengan inti yang utuh. Pada kelompok A dan B tampak jumlah sel purkinje dengan inti yang lebih banyak di bandingkan kelompok C dan D. Gambar panah  menunjukkan sel purkinje yang mengalami kariolisis. Tampak bahwa sel purkinje pada kelompok C dan D yang mendapatkan paparan rokok elektrik mengalami kariolisis (Pewarnaan Hematoksilin Eosin (HE) dan pembesaran 400x).

## PEMBAHASAN

Hasil analisis diatas menunjukkan bahwa terjadi penurunan jumlah sel purkinje serebelum tikus wistar jantan yang signifikan setelah pemaparan asap rokok elektronik dibandingkan dengan kelompok kontrol. Perbedaan jumlah sel purkinje serebelum yang signifikan juga ditemukan antara kelompok yang diberikan pemaparan rokok elektrik sebanyak 15 kali dibandingkan dengan pemaparan 30 kali. Hasil analisis juga menunjukkan bahwa inti sel purkinje pada kelompok yang diberikan pemaparan rokok elektrik mengalami kematian (kariolisis). Hal ini menunjukkan bahwa pemaparan rokok elektrik menyebabkan kerusakan dan kematian inti sel purkinje sehingga mengakibatkan penurunan jumlah sel purkinje serebelum tikus wistar jantan. Kerusakan inti sel ini mungkin dipicu oleh stress oksidatif dan peroksidasi lipid akibat paparan rokok elektrik<sup>7</sup>.

Rokok elektrik mengandung cairan (*e-liquid*) dan aerosol yang dapat menghasilkan ROS. Produksi ROS dan *reactive nitrogen species* (RNS) berlebihan di sistem saraf pusat menyebabkan mekanisme neurodegenerasi yang terkait dengan berbagai akibat terhadap neuron. ROS dan RNS yang sangat reaktif, jika diproduksi berlebihan atau tidak didetoksifikasi dapat menimbulkan penuaan dan penyakit yang merusak sel karena terjadinya perubahan oksidatif struktur makromolekul seperti lipid, protein, dan asam nukleat. Perubahan ini menyebabkan disfungsi molekul-molekul tersebut dan mungkin merupakan peristiwa awal yang menyebabkan terjadinya cedera saraf<sup>8,12,13</sup>.

Peningkatan kadar ROS yang tidak seimbang akibat paparan rokok elektrik menyebabkan terjadinya stress oksidatif. Otak sangat rentan terhadap kerusakan yang

diinduksi oleh stress oksidatif dibandingkan organ lain karena permintaan oksigen yang tinggi pada otak, kelimpahan redoks logam aktif (besi dan tembaga), oksidasi tingkat tinggi asam lemak tak jenuh ganda, dan fakta bahwa neuron adalah sel pasca-mitosis dengan pengisian yang relatif terbatas oleh sel progenitor selama masa hidup suatu organisme. Agen penginduksi stress oksidatif, seperti *paraquat* atau *xanthine/xanthine oxidase*, menyebabkan kematian neuron yang luas di lapisan sel granula serebelum. Neuron granula serebelum sangat sensitif terhadap stress oksidatif<sup>12</sup>.

Stress oksidatif dapat menyebabkan peroksidasi lipid. Peroksidasi lipid menghasilkan *Malondialdehyde* (MDA) yang dapat merusak DNA sehingga menyebabkan kerusakan mitokondria dan menurunkan produksi ATP. Penurunan ATP akan menyebabkan gangguan metabolisme sehingga terjadi kematian sel. Selain itu, peroksidasi lipid menyebabkan perubahan struktur protein membran. Perubahan ini mengakibatkan kerusakan dan peningkatan permeabilitas membran sehingga terjadi kematian sel<sup>14,15</sup>.

Stress oksidatif juga dapat menghambat fungsi pompa kalsium dan pompa natrium kalium karena protein penyusun pompa ini mengandung unsur SH yang rentan terhadap stress oksidatif. Bila pompa kalsium terganggu akan menyebabkan peningkatan kalsium sitosol yang mengaktifasi berbagai enzim. Bila pompa natrium kalium yang terganggu akan memicu ketidakseimbangan ion dalam sel sehingga menyebabkan kematian sel<sup>16</sup>.

Paparan uap rokok elektrik selama 3 hari menyebabkan peningkatan pembentukan ROS di korteks frontal otak dan penurunan regulasi *neuron nitric oxide synthases* (nNOS) di tingkat mRNA serta protein pada keseluruhan homogenat otak. Uap rokok elektrik juga menginduksi lingkungan pro-oksidatif dan inflamasi yang bergantung pada NADPH Oxidase (NOX-2) dalam sirkulasi serebral<sup>17</sup>.

Penelitian lain melaporkan bahwa PG dan Gly jika dipanaskan akan teroksidasi menjadi aldehida dan terdeteksi di aerosol rokok elektrik. PG akan menyebabkan penghambatan proliferasi dan viabilitas sel dengan meningkatkan kerusakan DNA dan penghentian siklus sel dalam human *small airway epithelial cells* (SAEC). PG juga mempromosikan apoptosis pada SAEC. PG dapat merusak SAEC secara langsung dan merupakan agen berbahaya pada sistem pernapasan manusia<sup>18,19</sup>.

Hasil penelitian ini sejalan dengan studi in vitro dan in vivo yang menunjukkan bahwa rokok elektrik menginduksi stres oksidatif yang mirip dengan rokok tradisional, menginduksi sitokin inflamasi, mengganggu penyembuhan luka, dan memiliki efek berbahaya pada fibroblas gingiva dan sel ligamen periodontal<sup>20-23</sup>. Penelitian klinis menunjukkan dampak rokok elektrik pada sistem saraf adalah kejang, sinkop, tremor, sakit kepala, pusing, malaise, nausea, fatigue, dehidrasi dan stroke<sup>24</sup>.

## SIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan dari penelitian ini adalah paparan rokok elektrik terhadap tikus wistar jantan menyebabkan kerusakan inti dan penurunan jumlah sel purkinje serebelum tikus wistar jantan. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut pemeriksaan tes fungsi serebelum untuk melihat gejala klinis yang mungkin terjadi akibat penggunaan rokok elektrik. Diharapkan hasil ini dapat menjadi bahan edukasi terutama bagi pemuda dan remaja terkait bahaya rokok elektrik.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada seluruh pimpinan Universitas Ciputra khususnya Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Ciputra yang telah mendukung dan memfasilitasi terlaksananya penelitian ini. Terima kasih kepada seluruh civitas akademika Fakultas Kedokteran Universitas Ciputra yang telah mendukung penelitian ini. Terima kasih kepada Staf Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga yang telah membantu dalam penelitian ini.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Ferkol TW, Farber HJ, Grutta S La, Leone FT, Marshall HM, Neptune E, et al. Electronic cigarette use in youths: A position statement of the Forum of International Respiratory Societies. *Eur Respir J*. 2018;51(5).
2. CDC. Youth and Tobacco Use | Smoking and Tobacco Use | CDC [Internet]. Office on Smoking and Health, National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion. 2022. Available from: [https://www.cdc.gov/tobacco/data\\_statistics/fact\\_sheet/s/youth\\_data/tobacco\\_use/index.htm](https://www.cdc.gov/tobacco/data_statistics/fact_sheet/s/youth_data/tobacco_use/index.htm)
3. P2PTM Kemenkes. Pengendalian Konsumsi Hasil Produk Tembakau Lainnya ( HPTL ) Prevalensi Merokok : Target Dan Realita. Kemenkes. 2020;1-18.
4. Rokom. Sehat Negeriku [Internet]. Kemenkes Beberkan Masalah Permasalahan Kesehatan Jiwa di Indonesia. 2021. Available from: <https://sehatnegeriku.kemkes.go.id/baca/rilis-media/20211007/1338675/kemenkes-beberkan-masalah-permasalahan-kesehatan-jiwa-di-indonesia/>
5. Marques P, Piqueras L, Sanz MJ. An updated overview of e-cigarette impact on human health. *Respir Res*. 2021;22(1):1-14.
6. Kulhánek A, Baptistová A. Chemical composition of electronic cigarette e-liquids: Overview of current evidence of toxicity. *Adiktologie*. 2020;20(3-4):137-44.
7. Rambung E. Electric Cigarettes'S Effect To the Mda Levels in Blood of Wistar Rat. *Hum Care J*. 2020;5(1):233.
8. Ma T, Wang X, Li L, Sun B, Zhu Y, Xia T, et al. HHS Public Access. 2022;95(1):195-205.

9. Lerner CA, Sundar IK, Yao H, Gerloff J, Ossip DJ, McIntosh S, et al. Vapors produced by electronic cigarettes and E-juices with flavorings induce toxicity, oxidative stress, and inflammatory response in lung epithelial cells and in mouse lung. *PLoS One*. 2015;10(2):1–26.
10. Cobley JN, Fiorello ML, Bailey DM. 13 Reasons Why the Brain Is Susceptible To Oxidative Stress. *Redox Biol*. 2018;15(February):490–503.
11. Salim S. Oxidative stress and the central nervous system. *J Pharmacol Exp Ther*. 2017;360(1):201–5.
12. Wang X, Michaelis EK. Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain. *Front Aging Neurosci*. 2010;2(MAR):1–13.
13. Tooy M, Tendean L, Satiawati L. Perbandingan kualitas spermatozoa tikus wistar (*rattus norvegicus*) yang diberi paparan asap rokok dengan asap rokok elektronik. *J e-Biomedik*. 2016;4(2).
14. Dabrowska N, Wiczowski A. Analytics of oxidative stress markers in the early diagnosis of oxygen DNA damage. *Adv Clin Exp Med*. 2017;26(1):155–66.
15. Kuncorowati CN, Urfah SM, Maulana DYD, Bahrudin M. Effect of Electronic Cigarette on Brain Prefrontal Cortex of Male Wistar Rats. *J Med Res*. 2020;6(3):98–102.
16. Saichudin. Stres Oksidatif Pemicu Utama Kematian Sel Purkinje Otak Kecil (*Cerebellum*). *J Sport Sci*. 2014;4(1):09.
17. Kuntic M, Oelze M, Steven S, Kröller-Schön S, Stamm P, Kalinovic S, et al. Short-term e-cigarette vapour exposure causes vascular oxidative stress and dysfunction: evidence for a close connection to brain damage and a key role of the phagocytic NADPH oxidase (NOX-2). *Eur Heart J*. 2019;1–13.
18. Conklin DJ, Ogunwale MA, Chen Y, Theis WS, Nantz MH, Fu XA, et al. Electronic cigarette-generated aldehydes: The contribution of e-liquid components to their formation and the use of urinary aldehyde metabolites as biomarkers of exposure. *Aerosol Sci Technol*. 2018;52(11):1219–32.
19. Komura M, Sato T, Yoshikawa H, Nitta NA, Suzuki Y, Koike K, et al. Propylene glycol, a component of electronic cigarette liquid, damages epithelial cells in human small airways. *Respir Res*. 2022;23(1):1–12.
20. Aghaloo T, Kim JJ, Gordon T, Behrsing HP. In vitro models, standards, and experimental methods for tobacco products. *Adv Dent Res*. 2019;30(1):16–21.
21. Baltacıoğlu E, Akalin FA, Alver A, Değer O, Karabulut E. Protein carbonyl levels in serum and gingival crevicular fluid in patients with chronic periodontitis. Vol. 53, *Archives of Oral Biology*. 2008. p. 716–22.
22. Javed F, Kellesarian S V., Sundar IK, Romanos GE, Rahman I. Recent updates on electronic cigarette aerosol and inhaled nicotine effects on periodontal and pulmonary tissues. *Oral Dis*. 2017;23(8):1052–7.
23. Sundar IK, Javed F, Romanos GE, Rahman I. E-cigarettes and flavorings induce inflammatory and pro-senescence responses in oral epithelial cells and periodontal fibroblasts. *Oncotarget*. 2016;7(47):77196–204.
24. Esteban-Lopez M, Perry MD, Garbinski LD, Manevski M, Andre M, Ceyhan Y, et al. Health effects and known pathology associated with the use of E-cigarettes. *Toxicol Reports*. 2022;9(April):1357–68.