

**Ассоциированный с табачным дымом канцерогенез и перспективы  
использования альтернативных систем доставки никотина в  
профилактике онкологических заболеваний**

© 2020 г. Н.Г. Бердникова, А.В. Загурская, В.А. Меньшов, А.В.  
Трофимов, О.И. Яблонская, В.Д. Кънчева, Р.М. Балански

**Carcinogenesis associated with tobacco smoke and prospects for using  
alternative nicotine delivery systems in cancer prevention**

© 2020 N.G. Berdnikova, A.V. Zagurskaya, V.A. Menshov, A.V. Trofimov, O.I.  
Yablonskaya, V.D. Kancheva, R.M. Balansky

*Н.Г. Бердникова*

*Кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник Института  
биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук  
Россия, Москва, 119334, ул. Косыгина, д. 4*

*и*

*доцент Первого Московского государственного медицинского университета  
им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации  
Россия, Москва, 119991, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2*

*N.G. Berdnikova*

*Candidate of Medicine, Senior Scientist of the Emanuel Institute of Biochemical  
Physics, Russian Academy of Sciences,  
ul. Kosygina, 4, Moscow 119334, Russia*

*and*

*Associate Professor of the I.M. Sechenov First Moscow State Medical University,  
ul. Trubetskaya, 8, 2, Moscow, 119991, Russia*

*E-mail: berdnad@mail.ru*

А.В. Загурская

*Управляющая медицинским центром АВЦ & лаборатории ДНКом  
Россия, Москва, 119334 Проспект 60 летия Октября, д.3, к.2*

A.V. Zagurskaya

*Chief Manager of the Medical Center AVC & DNКом Laboratory  
pr. 60 Letiya Oktyabrya, 3-2, 119334 Moscow, Russia  
E-mail: [alla.viktorova.2014v@mail.ru](mailto:alla.viktorova.2014v@mail.ru)*

В.А. Меньшов

*Кандидат химических наук, старший научный сотрудник Института  
биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук  
Россия, Москва, 119334, ул. Косыгина, д. 4*

V.A. Menshov

*Candidate of Chemistry, Senior Scientist of the Emanuel Institute of Biochemical  
Physics, Russian Academy of Sciences,  
ul. Kosygina, 4, Moscow 119334, Russia  
E-mail: [vinoman66@mail.ru](mailto:vinoman66@mail.ru)*

А.В. Трофимов

*Доктор химических наук, заместитель директора Института  
биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук  
Россия, Москва, 119334, ул. Косыгина, д. 4*

A.V. Trofimov

*Doctor of Chemistry, Deputy Director of the Emanuel Institute of Biochemical  
Physics, Russian Academy of Sciences,  
ul. Kosygina, 4, Moscow 119334, Russia*

*E-mail: avt\_2003@mail.ru*

**О.И. Яблонская**

*Кандидат биологических наук, научный сотрудник Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук  
Россия, Москва, 119334, ул. Косыгина, д. 4*

**O.I. Yablonskaya**

*Candidate of Chemistry, Research Scientist of the Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences,  
ul. Kosygina, 4, Moscow 119334, Russia*

*E-mail: olga.yablonsky@gmail.com*

**В.Д. Кънчева**

*Доктор-инженер, профессор Института органической химии с Центром фитохимии Болгарской Академии наук (София, Болгария)  
Болгария, София, 1113, ул. Акад. Бончев, 9*

**V.D. Kancheva**

*Doctor-Engineer, Professor of the Institute of Organic Chemistry with the Center of Phytochemistry, Bulgarian Academy of Sciences  
ul. Acad. Bonchev, 9, Sofia, 1113, Bulgaria*

*E-mail: vessy.kancheva@abv.bg*

**Р.М. Балански**

*Доктор медицинских наук, профессор, заведующий лабораторией химического мутагенеза и канцерогенеза Университетской специализированной больницы активного лечения онкологии  
Болгария, София, 1715, ул. Пловдивско поле, 6*

R.M. Balansky

*Doctor of Medicine, Professor, Head of the Laboratory of Chemical Mutagenesis and Carcinogenesis, University Specialized Hospital for Active Treatment in Oncology*

*ul. Plovdivsko Pole, 1715 Sofia, Bulgaria*

*E-mail: rubalansky@sbaloncology.bg*

---

### **О соблюдении авторских прав**

Все права на представленные здесь материалы принадлежат Авторам настоящей работы. Воспроизведение, распространение или иное использование указанных материалов в любой форме может производиться только с письменного разрешения правообладателей. При использовании ссылка на правообладателей и источник заимствования обязательна.

**© 2020 г. Н.Г. Бердникова, А.В. Загурская, В.А. Меньшов, А.В. Трофимов, О.И. Яблонская, В.Д. Кънчева, Р.М. Балански**

### **All Rights Reserved**

All rights to the materials presented herein belong to the authors of this work. Reproduction, distribution or other use of these materials in any form may be made only with the written permission of the copyright holders. When using, a reference to the copyright holders and to the original source is required.

**© 2020 N.G. Berdnikova, A.V. Zagurskaya, V.A. Menshov, A.V. Trofimov, O.I. Yablonskaya, V.D. Kancheva, R.M. Balansky**

## **Реферат**

В результате проведенного исследования, которое включало анализ литературных данных и наши собственные экспериментальные результаты, показано, что современные системы доставки никотина, альтернативные обычным сигаретам (АСДН), действительно обладают хорошим потенциалом в профилактике онкологических и других характерных для курильщиков заболеваний. Различные АСДН - это инструменты, позволяющие курильщику без психологического стресса снизить риски для здоровья, вызванные негативным действием сигаретного дыма. Однако сама методология применения АСДН еще недостаточно разработана и практически не учитывает индивидуальные потребности и физиологические риски для каждого курильщика, поэтому эффективность АСДН все еще вызывает много вопросов. Все известные на сегодняшний день АСДН условно делятся на три группы: 1) бестабачные имитаторы курения (бестабачные и безникотиновые электронные сигареты), 2) неингаляционные системы доставки никотина (пластыри, жвачки, никпэки, снюс) и 3) системы комбинирования имитации курения и доставки никотина (электронные сигареты и системы нагревания табака, СНТ). Наши исследования показали, что более предпочтительной стратегией для отказа от курения и минимизации биологических рисков является комбинация систем из первой и второй групп, и особенно сочетание безникотиновых электронных сигарет и никотиновых пэков оральной фиксации. По предварительным оценкам, полученным на основании продолжающихся предклинических испытаний, никпэки с разумным содержанием никотина являются одной из самых безопасных и эффективных форм доставки никотина.

**Ключевые слова:** альтернативные системы доставки никотина, табакокурение, предотвращение рака

## **Abstract**

As a result of the study involving the analysis of the literature data and our own experimental results, it has been shown that modern nicotine delivery systems, alternative to conventional cigarettes (ANDS), indeed exhibit a strong potential in the preventing cancer and other diseases characteristic of smokers. Diverse ANDS are the tools that allow a smoker without psychological stress to reduce risks to a health caused by negative influence of cigarette smoke. However, the methodology of using ANDS is still not sufficiently developed and, in fact, does not take into account the individual needs and physiological risks for each smoker, so the effectiveness of ANDS still raises questions. All contemporary ANDS are conventionally divided into three groups: 1) tobacco-free smoking simulators (tobacco-free and nicotine-free electronic cigarettes), 2) non-inhalation nicotine delivery systems (plasters, chewing gums, nicpacks, snus) and 3) systems combining smoking simulation and nicotine delivery (electronic cigarettes and tobacco heating systems, THS). Our studies have demonstrated that the preferred strategy for quitting smoking and minimizing biological risks pertains to a combination of using systems from the first and second groups, and particularly, a combination of nicotine-free electronic cigarettes and nicotine packs of oral fixation. According to preliminary estimates based on ongoing preclinical trials, nicpacks with reasonable nicotine content are one of the safest and most effective forms of nicotine delivery.

**Keywords:** alternative nicotine delivery systems, smoking, cancer prevention

В настоящее время канцерогенез рассматривают как результат воздействия множества экзогенных и эндогенных факторов. По статистике не менее трети всех случаев онкологических заболеваний в той или иной степени связывают с курением, что делает сигаретный дым экзогенным фактором риска номер один [1-5]. Более того, даже после отказа от курения

высокие риски онкологических заболеваний у экс-курильщика сохраняются долгие годы, иногда даже превышая базовые показатели в период курения [6].

Известный факт повреждения ДНК сигаретным дымом представляет серьезную угрозу для здоровья курильщика, в том числе пассивного. Не удивительно, что человечество задумалось об альтернативных способах доставки никотина в организм еще с той поры, когда была доказана связь курения с различными заболеваниями, и прежде всего с такими трудноизлечимыми, как рак легкого. Появление на мировом рынке 15 лет назад первых электронных сигарет (ЭС) поначалу не вызвало никакого ажиотажа и внимания ни со стороны курильщиков, ни со стороны производителей, ни со стороны системы здравоохранения. Первые простейшие с технической точки зрения электронные устройства, имитирующие курение, позиционировались как безопасные средства доставки никотина, которые только внешне были похожи на традиционные сигареты, сильно уступая последним в потребительских свойствах.

Но все изменилось, когда ВОЗ приняла конвенцию по борьбе с табакокурением, что резко ограничило места курения и повысило спрос на альтернативные системы доставки никотина (АСДН) с пониженным биологическим риском. По мере расширения ассортимента и технических возможностей ЭС увеличился и спрос на данные устройства, что стало причиной беспокойства системы здравоохранения относительно безопасности для здоровья уже самих ЭС.

**Целью работы** было оценить возможные онкологические риски, связанные с использованием АСДН, прежде всего таких популярных средств как ЭС, системы нагревания табака (СНТ) и никотиновые продукты оральной фиксации (НПОФ) в сравнении с обычными сигаретами.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Материалы и методы

Для оценки канцерогенных свойств продуктов в составе аэрозолей и дыма сигарет мы использовали экспертную систему OncoLogic™ [7]. OncoLogic™ — это система, которая имитирует мышление и рассуждения человека-специалиста, используя правила, основанные на знаниях о свойствах химических классов для прогнозирования рака. Она определяет базовый уровень опасности от низкой до высокой по оценке влияния заместителей на химические свойства, способные повлиять на канцерогенность вещества.

*Хемилюминесцентная (ХЛ) модель определения оксидативной активности фагоцитов в составе условно-цельной крови.* Цельную кровь получали из вены с ЭДТА-К2. После спонтанного осаждения эритроцитов в течение 1,5-2 часов плазму с лейкоцитами и тромбоцитами отделяли и использовали для тестирования. Фагоцитоз и окислительный взрыв нейтрофилов стимулировали зимозаном в присутствии люминола. ХЛ контролировали на приборе LUM-100 с программным обеспечением PowerGraph (МГУ).

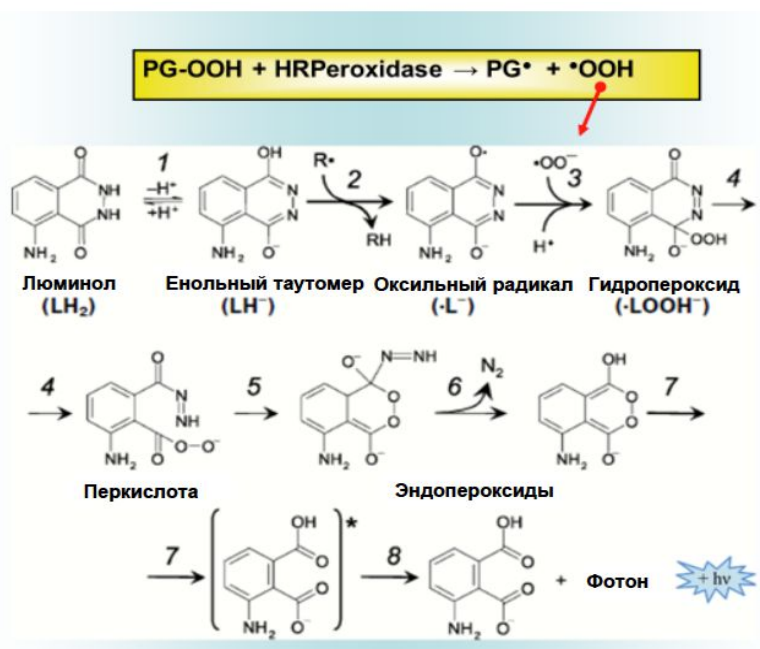


Рис. 1. Хемилюминесцентный метод определения гидропероксидов ПГ в аэрозоле ЭС (принципиальная схема).



*Метод определения концентрации органических пероксидов в аэрозолях ЭС (рис. 1).* Хемилюминесценция с использованием пероксидазы и люминола является одним из наиболее чувствительных и в тоже время простых и быстрых методов определения малых количеств пероксидов наряду с FOX [8]. В данном исследовании концентрацию пероксидов в аэрозоле определяли методом хемилюминесценции с пероксидазой хрена. Вкратце, конденсат аэрозоля и дыма получали с использованием одноканальной курительной машины Borgwaldt A1 путем осаждения на ацетат-целлюлозном фильтре Cambridge filter pad (Borgwaldt KC GmbH). После взвешивания фильтр с конденсатом экстрагировали апирогенным фосфатным буфером в течение 30 мин. Полученный экстракт сразу смешивали с пероксидазой хрена и люминолом в бикарбонатном буфере с рН=8,5. Концентрацию органических пероксидов в экстрактах определяли по калибровочной кривой, полученной для трет-бутилгидропероксида в той же модельной системе.

Экстракты табачных наполнителей сигареты и стиков готовили путем настаивания табачной смеси в течение часа в фосфатном буфере при температуре +50°C. Экстракты дыма и аэрозоля готовили путем барботирования струи напрямую через фосфатный буфер и немедленно использовали для анализа.

Поглотительную способность нейтрофилов и моноцитов оценивали методом проточной цитофлюориметрии в соответствии с указаниями, прилагаемыми к наборам Phagotest® (производство ORPEGEN Pharma, BD Bioscience), в состав которых входили FITC-меченые (флюоресцеин изотиоционат) опсонизированные бактерии *E.coli*. Измерялось общее количество фагоцитирующих моноцитов и гранулоцитов (поглощение одной или более бактерий одной клеткой в % от общего числа клеток).

Тяжелые металлы и микроэлементы в крови определяли методом Масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой (ИСП-МС) [9].

Статистический анализ и визуализацию данных проводили с использованием программ Statgraphics и SigmaPlot.

## **РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

### **Негенотоксические оксидативные механизмы канцерогенеза, связанные с курением.**

Независимо от механизма зарождения, канцерогенез в настоящее время рассматривается как многостадийный процесс накопления мутаций. Условно все канцерогенные агенты сигаретного дыма можно разделить на два класса – генотоксические, то есть образующие аддукты с молекулами ДНК, и негенотоксические (не образующие аддуктов). К первым относят, например, бенз(а)пирен и особенно табакспецифичные нитрозосоединения. В клетках эпителия шейки матки курящих женщин выявлено значительное увеличение аддуктов нитрозаминов с ДНК [10]. Это служит прямым подтверждением роли канцерогенов табачного дыма в этиологии рака шейки матки. К негенотоксическим компонентам относят широкий класс модуляторов оксидативного стресса, которые представляют особый интерес для нашего исследования.

### **Источники редокс активных агентов в составе сигаретного дыма**

С точки зрения физической химии процесса сигаретный дым является сложной дисперсной системой, которая образуется в результате горения, пиролиза, пиросинтеза и возгонки табака. Уникальность сигаретного дыма с точки зрения химии окислительно-восстановительных процессов состоит в том, что на стадии неполного окисления органических веществ табака происходит образование (синтез) широко спектра редокс активных продуктов, и таким образом дым превращается в довольно сбалансированную систему промоторов и ингибиторов окисления. Такое деление во многом условно, поскольку конечные эффекты *in vivo* (впрочем, как и *in vitro*) сильно зависят от концентрации веществ, условий реакции и прочих факторов.

В низких концентрациях полифенолы обычно выступают эффективными ингибиторами перекисного окисления липидов, тогда как в высоких они же могут легко окисляться и ускорять окисление других биомолекул, будь то липидный бислой мембраны или ДНК или функциональный белок. Обращение АО свойств фенольных соединений в широком диапазоне концентраций возможно объяснить каталитическим действием металлов переменной валентности, особенно таких как железо и медь [11], но часто механизмы обращения свойств остаются непонятными.

Аккумуляция полифенолов хинонов в легких при вдыхании сигаретного дыма (гидрохинон и пирокатехин) в сочетании с высокой концентрацией кислорода могут способствовать образованию цикла генерации пероксида водорода и свободных радикалов (рис. 2). Но избыток любых АО сам по себе может быть вреден, поскольку «антиоксидантный стресс» блокирует сигнальные функции эндогенных кислородных радикалов, подавляет клеточный иммунитет и снижает адаптационные возможности организма [12]. По этой причине системная перегрузка антиоксидантами также может стать проблемой для организма, которая в итоге приведет к еще большему оксистрессу и мутациям [13].

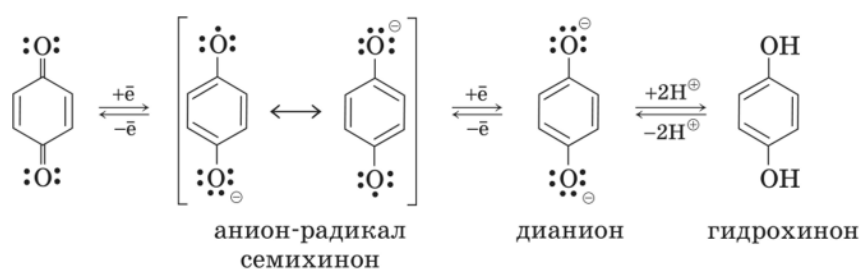


Рис. 2. Редокс превращения хинонов сигаретной смолы с образованием свободных радикалов.

Как показали наши исследования, если при выкуривании сигареты с дымом в организм попадает несколько сотен наномолей  $\text{H}_2\text{O}_2$ , то в водном экстракте дыма, состоящем из смолы, бикарбоната и  $\text{Me}^{n+}$  в течение часа

может накапливаться до нескольких сотен микромолей пероксида, что на 3 порядка превышает его исходный уровень в дыме [14]. Эти свойства сигаретной смолы нашли отражение в ее способности влиять на все три фазы канцерогенеза [15]. И хотя сам по себе пероксид водорода мало опасен для организма в концентрациях менее 2 ppm, активные продукты его распада (гидроксильный и гидроперекисный радикалы) могут представлять локальную угрозу даже в таких количествах.

Но было бы ошибкой считать, что только сигаретный дым генерирует в организме пероксид и свободные радикалы, увеличивая тем самым риск повреждения ДНК. Например, такой богатый источник природных биоАО как зеленый чай тоже активно образует  $H_2O_2$  в полости рта, и при частом употреблении может вызывать рак пищевода [16].

Сигаретный дым, воздействуя на эпителиальные клетки легких и бронхов, вызывает в них хронический окислительный стресс, который приводит к мутациям [17]. Тем не менее, в модельных исследованиях дым часто проявляет АО свойства [18]. Этот факт гораздо лучше объясняет проканцерогенную природу дыма, учитывая патологическую роль антиоксидантов в метастазировании опухоли.

В организме курящего одной из наиболее чувствительных и реактивных к дыму систем является иммунная система. Ее клетки являются мощным источником АФК, реагируя в то же время на малейшие изменения редокс баланса окружающей среды [19]. Это делает возможным использовать фагоциты в качестве универсальной (многофакторной) тест-системы для изучения свойств экзогенных и эндогенных модуляторов оксидстресса (в том числе в составе дыма) как *in vitro*, так и *in vivo* [20]. Особенность нашей методики состояла в том, чтобы исследовать лейкоциты не изолированно от плазмы и других клеток крови, а фактически в составе цельной крови за исключением эритроцитов (условно-цельная кровь). Такой подход был использован впервые в практике исследования («материалы и методы»). Главное преимущество данного метода в сравнении с использованием

цельной крови состоит в том, что исключение эритроцитов позволяет устранить из реакционной среды главный светопоглощающий фактор – гемоглобин, повышая тем самым воспроизводимость результатов и чувствительность метода.

Лейкоцитоз (нейтрофилия) это достаточно типичная для курильщика картина [21]. Считается, что нейтрофилы влияют на канцерогенез в легких, способствуя метаболизму вдыхаемых химических канцерогенов и вызывая усиленное образование промутагенных аддуктов ДНК. При попадании в легкие нейтрофилы активируются для высвобождения активных форм кислорода (АФК), а также ряда ферментов, таких как миелопероксидаза (МРО). МРО участвует в биоактивации вдыхаемых канцерогенов дыма, например, полициклических ароматических углеводородов (ПАУ). Кроме того, она катализирует превращение  $H_2O_2$  в бактерицидное соединение гипохлорит (НОСl). Было убедительно показано, что НОСl является ингибитором восстановления разрывов цепи ДНК [22], а также активности PARP, которая участвует в восстановлении повреждений.

Сигаретный дым снижает фагоцитарную активность нейтрофилов и влияет на хемотаксис, кинезис и клеточную сигнализацию [23]. Кроме того известно, что прайминг нейтрофилов сигаретным дымом увеличивает их способность вызывать повреждение тканей. То есть, дым оказывает мультимодальное действие на фагоциты, которое в той или иной степени связано с генерацией АФК.

Используя модель люминолзависимой ХЛ зимозан-стимулированных нейтрофилов в составе условно-цельной крови (венозная кровь за вычетом эритроцитов) на первом этапе мы исследовали способность фагоцитов генерировать АФК в присутствии экстрактов табака, приготовленных из обычных сигарет и стиков, используемых в системах нагревания табака (СНТ) glo и IQOS. Как оказалось (рис. 3), экстракты табака из обычной сигареты, в отличие от СНТ, обладают мощным стимулирующим действием на активность нейтрофилов, усиливая генерацию АФК. В то же время,

экстракты дыма, полученные после прокурки сигареты, наоборот блокировали генерацию АФК (рис. 4), что негативно сказывалось на фагоцитирующей способности гранулоцитов, но не моноцитов (рис. 5). В сравнении с дымом от обычной сигареты, экстракты аэрозолей, полученных от СНТ, обладали в целом слабой активностью с небольшим перевесом экстрактов IQOS. Полученные результаты убедительно показывают преимущества СНТ в сравнении с обычными сигаретами по воздействию на клеточный иммунитет.

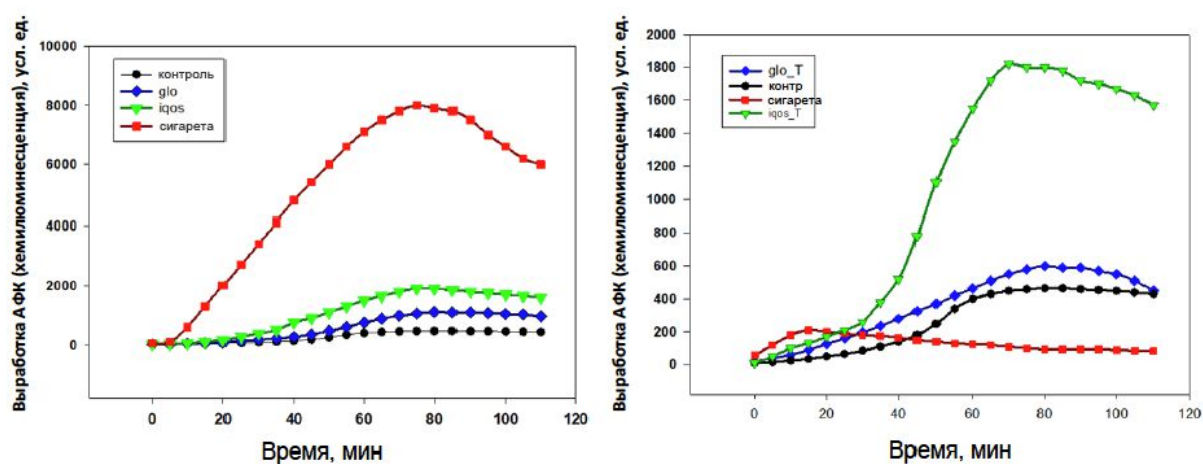


Рис. 3. (слева). Динамика генерации АФК зимозан-стимулированными нейтрофилами в составе условно-цельной крови, взятой у добровольца после добавления экстрактов из содержимого табачных стиков СНТ и обычных сигарет.

Рис. 4. (справа). Влияние экстрактов дыма из обычной сигареты и аэрозолей от двух систем нагревания табака на реактивность циркулирующих нейтрофилов (опыт *in vitro*). Модель зимозан-стимулированной люминол-зависимой генерации АФК.

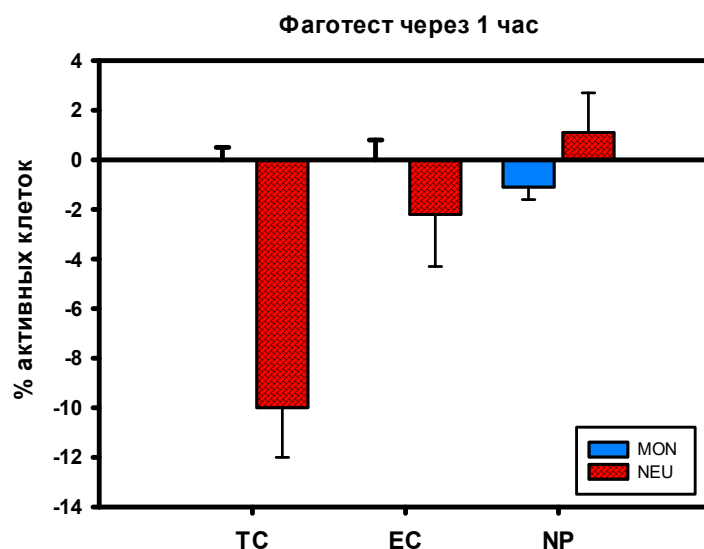


Рис. 5. Изменение % активных моноцитов и гранулоцитов в составе периферической крови добровольцев через час после испытания. ТС – БАТС, ЕС – электронная сигарета 100%ПГ, NP - никотиновый пэк 5,6 мг в течение 45 мин.

На втором этапе мы провели испытания на добровольцах из числа бывших курильщиков. Используя безникотиновые аналоги традиционных сигарет БАТС (сигареты Нирдош) и безникотиновые электронные сигареты БЭС (100% пропиленгликоль), мы сравнили динамику пиковых скоростей генерации АФК клетками фагоцитов (рис. 6). Как оказалось, сразу после выкуривания БАТС и до 60-й минуты после окончания курения пиковая скорость генерации АФК зимозан-стимулированными клетками условно цельной крови была значительно ниже, чем до начала курения с одной стороны, и в сравнении с использованием БЭС, с другой.

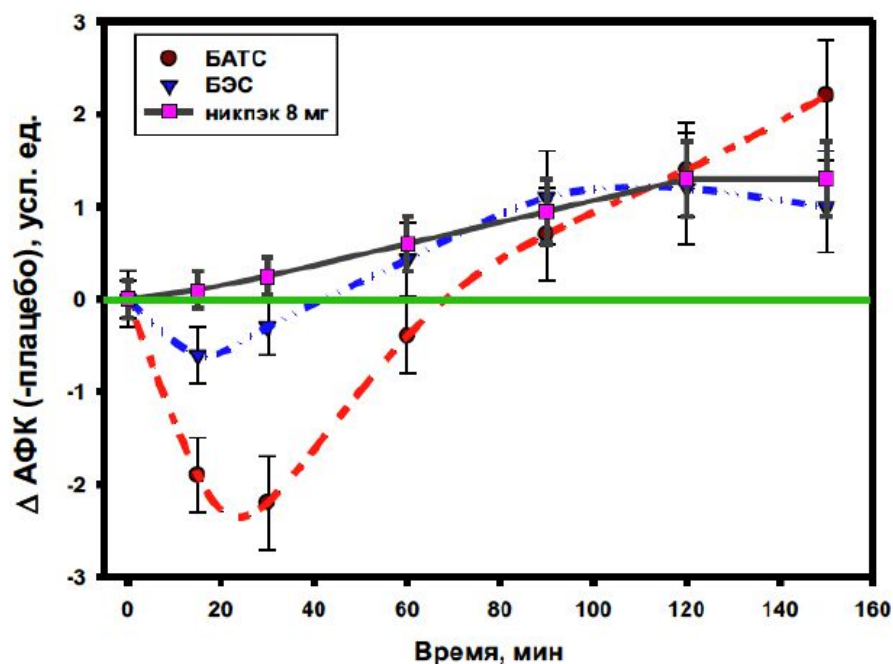


Рис. 6. Динамика пиковых значений генерации АФК нейтрофилами (относительно базового уровня до начала испытания) в составе условно-цельной крови у добровольцев (3 чел, все бывшие курильщики) после выкуривания БАТС (10 затяжек, красная пунктирная линия и круги), БЭС Varopresso со 100%-м ПГ (20 затяжек, синяя штрих-пунктирная и треугольники) в сравнении с никотиновым пэком (малиновая сплошная и квадраты), который использовался в течение 45 мин (содержание никотина 8 мг). Времена забора крови указаны на графиках точками с указанием среднего  $\pm$ SD.

На фоне сигарет использование никотинового пэка LYFT (безтабачный аналог снюса) не оказывало никакого негативного влияния на фагоцитоз и генерацию АФК. Наоборот, в умеренных дозах и достаточно медленных скоростях поступления в организм никотин в чистом виде даже оказывал небольшое стимулирующее действие на лейкоциты.

Отсюда следует сразу несколько важных выводов:

1) как минимум час после выкуривания обычной/безникотиновой сигареты в крови циркулируют компоненты дыма, которые обладают



мощными антирадикальными/антиоксидантными свойствами в отношении генерации АФК стимулированными нейтрофилами,

2) безникотиновый аэрозоль ЭС, сгенерированный из ПГ, *in vivo* также обладает относительно небольшим по величине и по продолжительности ингибирующим действием ( $p < 0,01$ ), а его пик приходится на первые  $15 \pm 5$  мин с момента первой затяжки ЭС.

3) во всех случаях фаза ингибирования генерации АФК нейтрофилами у всех испытуемых сменялась фазой усиления оксидативного взрыва, причем ее продолжительность была дольше, чем у фазы ингибирования.

4) полученные *in vivo* бимодальные (S-образные) эффекты невозможно в полной мере воспроизвести *in vitro*, что говорит о важной роли опосредованных механизмов модуляции прайминга нейтрофилов.

5) никотиновые пэки (никпэки) в отличие от обычных и е-сигарет не имеют выраженной фазы ингибирования функций иммунных клеток, что объясняется плавной фармакокинетикой никотина и минимальным содержанием в их составе балластных веществ. Очевидно, что способ доставки никотина играет важную роль в модуляции иммунитета.

Совсем недавно было обнаружено, что нейтрофилы, полученные от здоровых доноров, способны убивать несколько установленных линий опухолевых клеток человека, но не первичные эпителиальные клетки; в то время как нейтрофилы от больных раком легкого были гораздо менее активными [24]. Что интересно, добавление каталазы в клеточный субстрат значительно уменьшало нейтрофильный клиренс раковых клеток, позволяя предположить, что  $H_2O_2$  необходим для такого иммунного ответа. Вместе с тем, блокирование NADPH-оксидазы не влияло на антираковую активность нейтрофилов, что исключает участие АФК в данном процессе. Поскольку у нейтрофилов отсутствует способность к фагоцитозу раковых клеток [25] противоопухолевая активность нейтрофилов зависела от их дегрануляции, то есть проявлялась исключительно экстрацеллюлярными (мембрано-литическими) механизмами. Одновременно с этим, в ряде исследований было

показано, что пероксид водорода, выступая модулятором многих функций нейтрофилов, стимулирует активность клеток в малых дозах и оказывает иммуносупрессивный эффект в высоких [26]. Интересно, что некоторые типы раковых клеток сами могут активно производить пероксид водорода в количестве, сопоставимом с тем, которое генерирует активированный нейтрофил [27]. То есть, способность генерировать  $H_2O_2$  может быть своего рода защитным механизмом у раковых клеток от воздействия иммунитета.

### **Никотин и его роль в канцерогенезе**

Никотин (наряду с пропиленгликолем) — это один из немногих компонентов, который объединяет различные АСД и традиционные сигареты. У никотина есть механизмы, с помощью которых он может защищать клетки, помимо его влияния на выработку дофамина. Одна из функций никотиновых рецепторов - сдерживать поступление кальция в клетки. Его присутствие увеличивает количество внутриклеточного кальция, что улучшает клеточную выживаемость. Помимо этого, никотин может оказывать антиоксидантное действие, помогая уничтожать токсичные свободные радикалы, образующиеся в качестве побочного продукта обмена веществ, тем самым защищая не только клетки головного мозга, но и другие клетки [28].

Обладая противовоспалительным действием за счет стимуляции парасимпатического отдела АНС, никотин может вносить свой положительный вклад в профилактику канцерогенеза [29]. С другой стороны, прооксидантные и проканцерогенные свойства никотина могут быть опосредованы центральной /периферической нервной системой [30]. В зависимости от вида нейротрансмиттера и типа опухоли эти эффекты могут быть как стимулирующими, так и ингибирующими. Норадреналин и адреналин являются мощными стимуляторами васкуляризации, действуя как путем индукции высвобождения ангиогенных факторов из опухолевых клеток, так и непосредственно на функции эндотелиальных клеток. В результате, активация адренергической системы увеличивает рост различных типов опухолей и, как было показано, опосредует вызванное стрессом

увеличение опухолевой прогрессии. Дофамин, с другой стороны, препятствует передаче сигналов фактору роста VEGF в эндотелиальных клетках, блокирует его ангиогенные функции и ингибирует рост опухоли [31].

Если сигаретный дым представляет собой мощный коктейль канцерогенов и его промоторов, остается большой загадкой, почему не у каждого курильщика, выкуривающего 2 пачки сигарет в день на протяжении 40+ лет, не развиваются такие характерные для курящих заболевания, как ХОБЛ, рак легкого, гипертония, сахарный диабет и др. [32].

### **Канцерогенные металлы и частицы в составе дыма.**

Возможно, одна из причин, почему не у всех курильщиков обнаруживают раковые опухоли, это индивидуальные особенности биоаккумуляции канцерогенов из дыма в разных органах и тканях. Пример тому абсорбция из дыма тяжелых металлов (ТМ), часть из которых обладает доказанными канцерогенными свойствами [33]. Такие элементы, как мышьяк, кадмий, никель и хром Международным Агентством по изучению рака отнесены в первую группу риска [34]. Многочисленные исследования показали, что вышеупомянутые металлы вызывают повреждение ДНК и процессы гибели клеток, что приводит к увеличению риска возникновения рака. Большинство других тяжелых металлов также являются агентами, вызывающими рак [35]. Основной механизм действия для всех этих металлов включает в той или иной степени генерацию оксидстресса [36].

О нахождении наночастиц тяжелых металлов (например, Sn, Ag, Fe, Ni, Al, Cr) в аэрозолях из ЭС докладывалось в нескольких работах [37], и их возникновение может быть результатом разрушения нагревательной спирали в ЭС. Наши собственные исследования также подтвердили факт разрушения спирали внутри испарителя ЭС, о чем свидетельствует фото (рис. 7). Было установлено, что наночастицы металлов и их оксидов могут вызвать оксидстресс, цитотоксичность и острое воспаление легких *in vivo* [38].



Рис. 7. Следы коррозии металла (оксид никеля) у нагревательной спирали (темно бурая пыль) на поверхности впитывающей ткани испарителя после недели активного использования ЭС второго поколения.

Мы провели исследование состава микроэлементов в крови курящих добровольцев до и после перехода на АСДН, в том числе безникотиновую ЭС в комбинации с никотиновыми пэками оральной фиксации (рис. 8). Как оказалось (и это было в некоторой степени сюрпризом), содержание тяжелых металлов (ТМ) в крови заядлых курильщиков до начала использования АСДН не выходило за границы физиологической нормы (и даже были далеки от верхней границы нормы) ни по одному показателю. Тем не менее, после отказа от курения и перехода на АСДН уровень большинства ТМ снизился, и лишь для трех из них он существенно вырос, не выходя, впрочем, за верхние границы нормы. Тем не менее, определенное беспокойство может вызывать рост концентрации хрома на фоне длительного использования ЭС. Большое количество исследований подтвердило, что хром может вызвать рак легких, предстательной железы, почки, печени и некоторых других органах [39]. Хром может привести к увеличению числа микроядер, мутации хромосом, повышению частоты сестринских хроматид, разрыву нитей ДНК, ДНК-белковой сшивке.

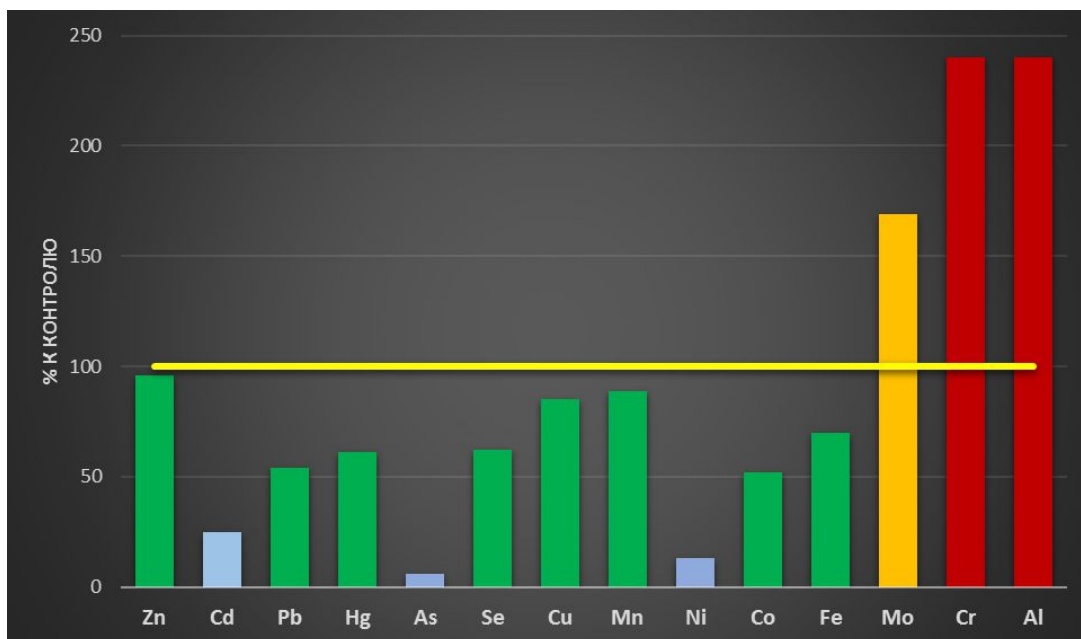


Рис. 8. Относительное изменение содержания тяжелых металлов в сыворотке добровольца спустя 3 мес после отказа от обычных сигарет и начала комбинированного использования безникотиновой электронной сигареты совместно с никотиновыми пэками. До и после перехода курильщика на АСДН все микроэлементы были в пределах физиологической нормы.

Анализ литературных данных и наши собственные исследования показали, что состав и содержание ТМ (так же как других потенциальных токсикантов [40]) в аэрозолях разных ЭС очень сильно различается, что не характерно для обычных сигарет. Более того, он сильно варьирует в зависимости от режима использования ЭС, частоты смены и типа испарителя, состава е-жидкости и многих других условий [41]. В этом плане, обычная сигарета генерирует дым с гораздо меньшей вариабельностью по содержанию ТМ, поскольку ее устройство, способы и режимы эксплуатации не так разнообразны и не требуют технических навыков.

Поскольку металлы попадают в организм не в виде отдельных ионов, а в составе частиц, размер и свойства частиц аэрозоля также могут играть важную роль в механизме доставки токсичных продуктов при использовании

ЭС. При том, что в состав аэрозолей ЭС могут входить различные ТМ с высокой концентрацией (иногда выше, чем в сигаретном дыме), уровень их абсорбции при использовании ЭС по факту оказывается ниже, чем при вдыхании дыма. Прежде всего это происходит по причине различий в дисперсности частиц аэрозоля и дыма, не говоря уже о том, что сами частицы в аэрозолях устроены несколько иначе. Если долю частиц с диаметром менее 2,5 мкм (PM2.5) в сигаретном дыме принять за 100%, то в аэрозоле ЭС эта величина на несколько порядков ниже [42]. То есть, частицы аэрозоля ЭС изначально крупнее и тяжелее частиц дыма, что и определяет худшую фармакокинетику практически всех его компонентов, включая никотин и различные побочные продукты с токсическими свойствами [43]. Однако данный фактор редко когда учитывается при оценке биологических последствий длительного применения ЭС.

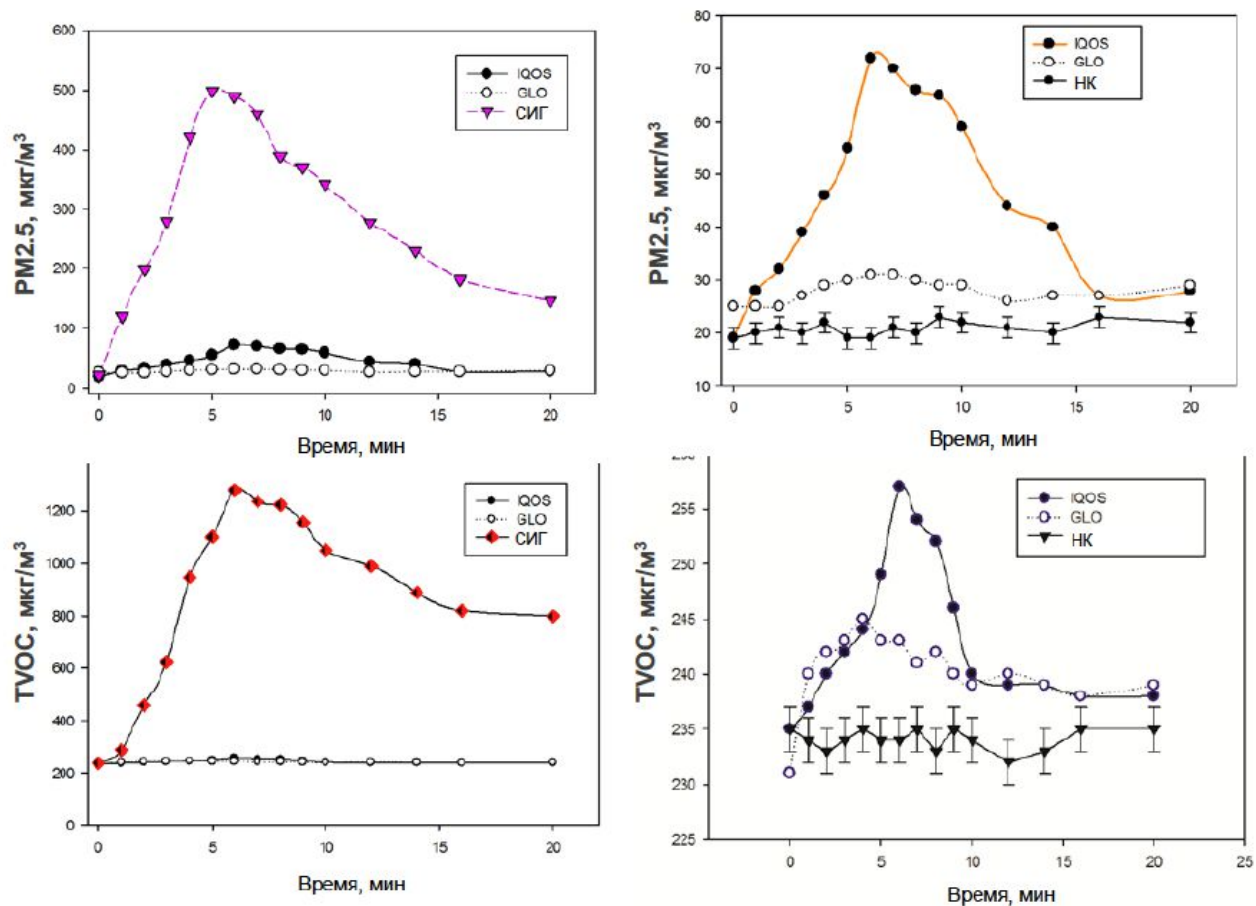


Рис. 9. Анализ воздуха в курительной комнате при использовании традиционных (обычная сигарета - ТС) и альтернативных систем доставки никотина (две системы нагревания табака первого поколения СНТ). Верхние рисунки - общее содержание летучих органических соединений (TVOC) в воздухе курительной комнаты: слева – после использования каждого из трех типов никотиновых продуктов, справа – сравнение между двумя СНТ. Красная линия – выкуренная сигарета. Нижние рисунки – сравнение концентрации частиц диаметром менее 2,5 микрона в воздухе курительной комнаты: слева – между всеми продуктами, справа – только между СНТ. Фиолетовая линия слева - выкуренная сигарета. НК – данные, полученные в некурящей комнате. Газовый анализатор измерял содержание в воздухе летучих органических веществ с потенциалом ионизации ниже 10,6 eV фотоионизационным методом.

Размер частиц во многом определяет и динамику загрязнения воздуха в помещении, где происходило использование ЭС/ТС. Мы сравнили содержание в воздухе частиц PM2.5 и летучих органических соединений (TVOC) после выкуривания обычной сигареты и использования двух систем нагревания табака glo (температура нагрева 240 °C) и IQOS (температура нагрева 350 °C) (оба первого поколения) (рис. 9). Как оказалось, наличие табака в системах доставки никотина само по себе не является определяющим условием динамики загрязнения воздуха. Пиковые концентрации содержания вредной летучей органики (TVOC) в воздухе после выкуривания обычной сигареты были на два порядка выше, чем при использовании СНТ. То же касается и мелкодисперсных частиц.

Мало того, что пиковые концентрации вредных продуктов в воздухе были намного ниже при использовании СНТ, так еще и динамика очищения воздуха от вредных примесей также была в пользу СНТ. Если сравнить между собой две системы нагревания табака, то тут однозначным лидером, в хорошем смысле этого слова, по эмиссии вредных продуктов был glo. Использование одного стика glo в обычном офисном помещении (комната объемом 20 м<sup>3</sup>) без приточной вентиляции едва ли способно сильно ухудшить качество воздуха.

Безусловно, для эмиссии вредных продуктов важное значение имеет температура нагревания табака. Если во время затяжки в сигарете табак тлеет при температуре 900 °C, то в системах нагревания табака она не превышает 350-370 °C. Причем, что характерно, в разных системах нагревания табака различие температур нагрева в 100 °C (между glo и IQOS) уже существенно влияла на показатели эмиссии летучей органики и частиц (особенно частиц диаметром менее 2,5 микрона).

Температура играет важную, но далеко не единственно значимую, роль в физико-химических процессах формирования частиц аэрозолей особенно в таких технически сложных системах, как атомайзеры ЭС. Более того, во многих современных электронных девайсах процесс формирования



частиц является управляемым, позволяя вэйперу точнее добиваться вкусопередачи.

Концентрация и размер частиц в воздухе играют важную роль в патогенезе рака легкого курильщика, но механизмы, лежащие в основе РМ-ассоциированного канцерогенеза, пока еще не до конца ясны. Предварительный анализ генов мелкого/ немелкоклеточного рака легкого с высокой вероятностью показал, что РМ<sub>2,5</sub> является этиологическим фактором рака легкого [44].

### **О пользе исторических изысканий**

Хотя принято считать, что ЭС в их современном виде появились на свет в 2003 году после известного изобретения китайского фармацевта Хон Лика, первая заявка на патент бездымного и безтабачного устройства для доставки в организм никотина был подана в 1963 году, и уже два года спустя была окончательно оформлена (U.S.Patent No. 3,200,819). Устройство было оснащено управляемым батареей нагревательным элементом.

На рынок США первая е-сигарета попала в середине нулевых текущего столетия. И, хотя оно не вызвало бурного ажиотажа и бума продаж, именно с середины нулевых произошел качественный скачок в динамике снижения количества вновь диагностированных случаев рака и смертей от рака (рис. 10).

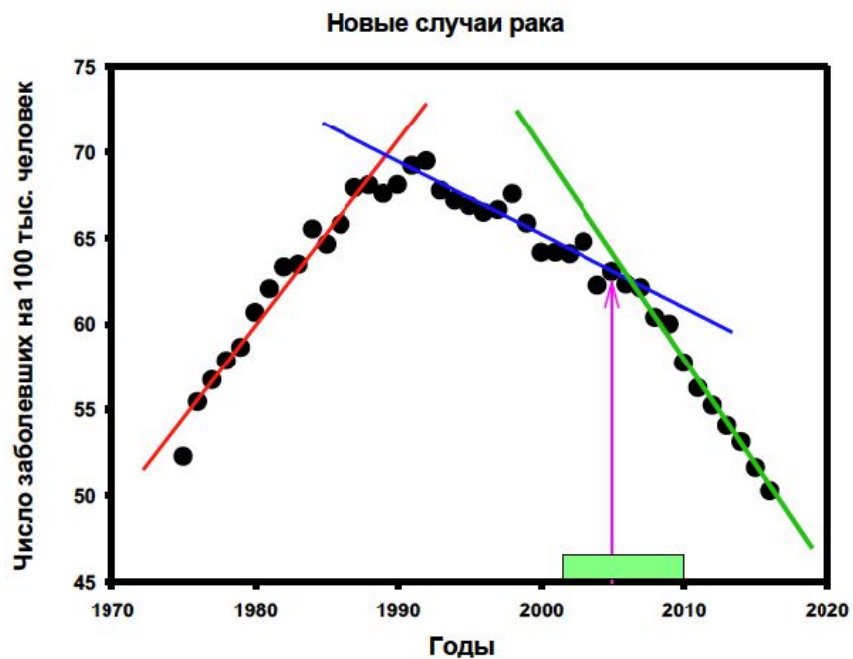


Рис. 10. Число новых диагностированных случаев рака легких и бронхов в расчете на 100 000 мужчин и женщин в год в США (реконструкция по данным Института Рака США). Показаны расчетные линии тренда (красная, синяя и зеленая линии соответствуют линейной аппроксимации на данных временных участках – наши регрессионные модели). Синяя линия – смена тренда в ответ на снижение содержания смолы в сигаретах. Зеленая зона соответствует периоду появления и закрепления на рынке США ЭС.

Из данных рис. 10 четко следует, что в период середины нулевых годов, когда на рынке США появились первые ЭС, наметился новый тренд в диагностировании новых случаев заболевания рака легких и бронхов, который стабильно линейно снижается последние 10 лет. Многие аналитики в США и в мире не склонны считать это простым совпадением. Но интересно, что задолго до появления на свет ЭС, представители Национального института рака (NCI) в США заявляли, что новые марки сигарет с низким содержанием смол существенно снизят смертность, связанную с курением [45]. Однако лишь в конце 80-х годов прошлого столетия после долгой и тяжелой полемики в США наконец получили веские

доказательства прямой связи числа случаев рака легкого с содержанием смолы в сигаретах [46]. Эффективность программы по снижению содержания смолы в сигаретах не заставила себя долго ждать (рис. 10). Не менее долгий и болезненный путь Штаты проделали на пути к пониманию необходимости постепенного отказа от традиционных сигарет в пользу электронных [47]. Хотя этот шаг не был подкреплен вескими аргументами и длительными клиническими испытаниями, подтверждающими безопасность новых устройств, положительные результаты этого масштабного эксперимента также более чем очевидны.

Но как бы очевидными и успешными не казались перспективы ЭС, как полноценных заменителей обычных сигарет, эти устройства все еще очень далеки от совершенства и пока не могут по всем потребительским показателям конкурировать с традиционными сигаретами, проигрывая им прежде всего во вкусопередаче и эффективности доставки никотина. Не все идеально у ЭС и с биологическими рисками, особенно в отдаленной перспективе. Применяемая в современных девайсах технология генерирования аэрозоля с использованием контролируемого нагрева металлической спирали, обмотанной хлопковой тканью, только на первый взгляд кажется идеальной с точки зрения образования побочных продуктов. Если бы аэрозоль ЭС с идеальными по размеру частицами состоял исключительно из никотина, носителя (смесь пропиленгликоля и глицерина) и в некоторых случаях ароматизатора, то тогда можно было бы говорить о совершенной технологии доставки никотина. Но пока, к сожалению, такое не под силу даже самым технически продвинутым устройствам стоимостью несколько сотен долларов. Сама схема генерации аэрозоля была изначально ущербной, а все последующие модификации ЭС создавали только условно новые поколения девайсов с теми же проблемами и недостатками.

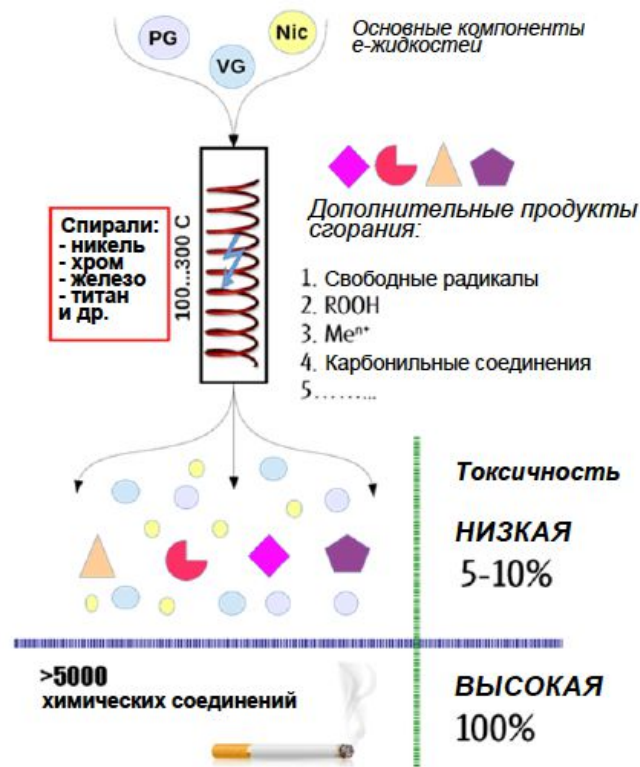


Рис. 11. Принципиальная схема устройства и работы любой e-сигареты (наша версия). Суммарная токсичность дыма обычной сигареты принята за 100%. Относительная суммарная токсичность аэрозолей ЭС в 10-20 раз ниже. По некоторым данным, в составе аэрозолей ЭС можно обнаружить свыше 250 веществ [48].

Наша группа уже более 10 лет занимается исследованием различных модификаций ЭС, представленных как на российском, так и на мировом рынках. На данный момент времени есть четкое понимание, что все девайсы отличаются друг от друга не только дизайном и ценой, но и качеством (наличием вредных примесей) генерируемого аэрозоля (рис. 11). «Грязный» вэйпинг заложен в физической и химической природе ЭС. Особо проблемными являются следующие моменты:

- Частые циклы разогрева-охлаждения спирали рано или поздно приводят к ее разрушению, и в конечном итоге попаданию частиц

металлов в легкие вэйпера. Ни в одном устройстве этот процесс не контролируется.

- Органические впитывающие фитили, используемые для обмотки спиралей, сами становятся источником эмиссии вредных продуктов уже с первых минут от начала пользования девайсами.
- Сомнительной с точки зрения безопасности и здоровья выглядит идея использовать в качестве основы органические растворители. В высоких концентрациях они токсичны для клеток и органов. ЛД<sub>50</sub> у глицерина составляет 4,5 г/кг, а у ПГ 13 г/кг. Кроме того, эти растворители являются термически нестойкими и приводят к образованию токсичных продуктов (рис. 12).
- В конечном итоге, отсутствие статистики вкупе с большим разнообразием нестандартизованных девайсов, работающих по принципу обычного кипятильника, ограничивают возможность долгосрочного прогнозирования биологических рисков как для самих пользователей девайсов, так и для окружающей среды.

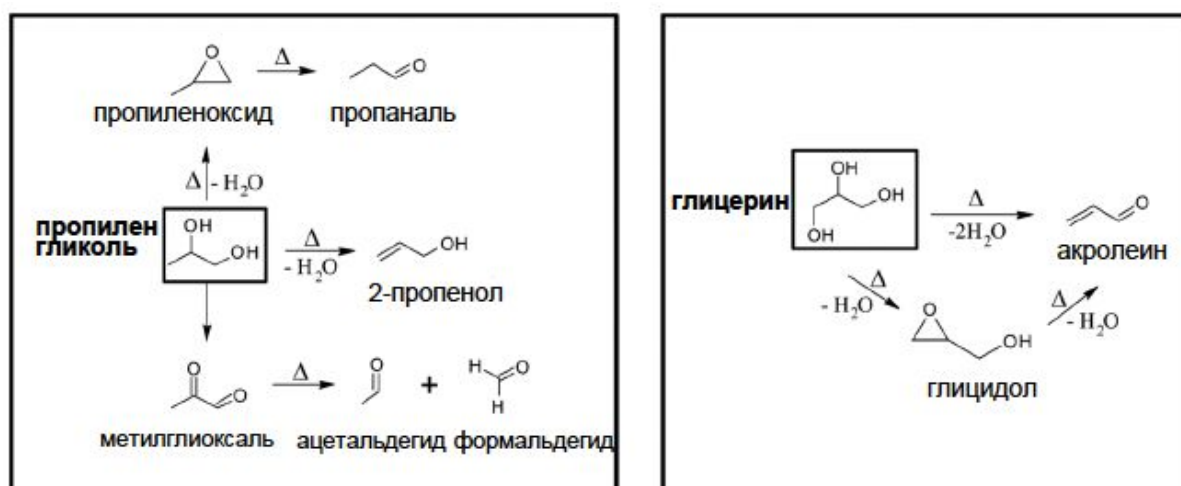


Рис. 12. Механизм образования наиболее типичных токсичных продуктов при окислении е-жидкости в процессе формирования аэрозолей ЭС (конечные стадии).

## **Термический распад ПГ в ЭС с образованием биологически активных продуктов.**

Несколько исследований, описанных в NTP monographs (неканцерогенные эффекты) Департамента Здравоохранения США (2004), указывают на низкий генотоксический потенциал ПГ. Эти выводы базируются на результатах анализов *in vitro* и *in vivo*, полученных четверть века назад [49]. С другой стороны, результаты недавних исследований, проведенных Aye et al. [50] продемонстрировали, что ПГ может вызывать повреждение ДНК *in vitro* в присутствии и отсутствии смеси S9, что приводит к хромосомным мутациям в клетках СНО. Тем не менее, следует отметить, что высокая цитотоксичность определялась лишь при очень высоких концентрациях ПГ (50–150 мг/мл и IC50 для цитотоксичности = 24,1 мг/мл), чтобы оценить его потенциальные эффекты в качестве криопротектора.

В двухлетнем исследовании на крысах также никаких отклонений не наблюдалось среди групп по смертности, поведению или потреблению пищи. Авторы сообщили об отсутствии существенных различий между контрольной и обработанной ПГ группами в анализах крови, весом органов (включая гонады) и весом органов относительно конечной массы тела. **Частота новообразований была одинаковой между контролем и опытными группами.** В опытах на животных также было показано, что ПГ обладает антиаритмическим гипотоническим и легким наркотическим действием равным примерно 1/3 от эффекта этанола [51].

Во всех случаях выявленные патологии при контакте с ПГ наблюдались только при хроническом потреблении достаточно высоких доз. Однако следует подчеркнуть, что в указанных примерах безопасного контакта с ПГ речь шла о применении фармакологически чистых препаратов (реактивов) без присутствия каких-либо примесей. Применительно к аэрозолю ЭС ситуация может резко отличаться из-за возможной термодеструкции молекул.

Наш опыт изучения механизма генерации вредных продуктов в аэрозолях ЭС разного типа (в том числе последнего поколения) говорит о том, что нагревание жидкой органической субстанции (базовых наполнителей ЭС без каких-либо добавок) металлической спиралью до температур всего 140-160°C в течение нескольких секунд уже несет в себе риск образования высокореакционных окисленных продуктов (свободных радикалов, пероксидов и др.), которые неизбежно вызовут отклик в любой биологической системе. В частности, это может привести к дисбалансу ред-окс процессов и повреждению важнейших функциональных молекул как внутри, так и вне клеток.

В частности, наша группа в 2013 году впервые в мире обнаружила органические пероксиды в аэрозолях ЭС и подробно исследовала механизм их образования (Coresta 2016, 2017, 2018). Как оказалось, в основе механизма образования пероксидов лежит свободно-радикальный каталитический процесс окисления ПГ с участием металлов переменной валентности. Более того, процесс образования пероксидов происходит не только в период включения ЭС и нагревания спирали, но и в перерывах между сессиями (в спящем режиме). Перекисное окисление внутри ЭС происходит непрерывно по цепному механизму прежде всего в силу термодинамической нестабильности самих молекул пероксидов, а также в результате их каталитического распада с участием металлов (стадия вырожденного разветвления перекисного окисления (реакция 2, рис. 13). Как установлено экспериментально, энергетически наиболее вероятным местом присоединения молекулы кислорода к ПГ является C2 атом углерода (стадия 1)

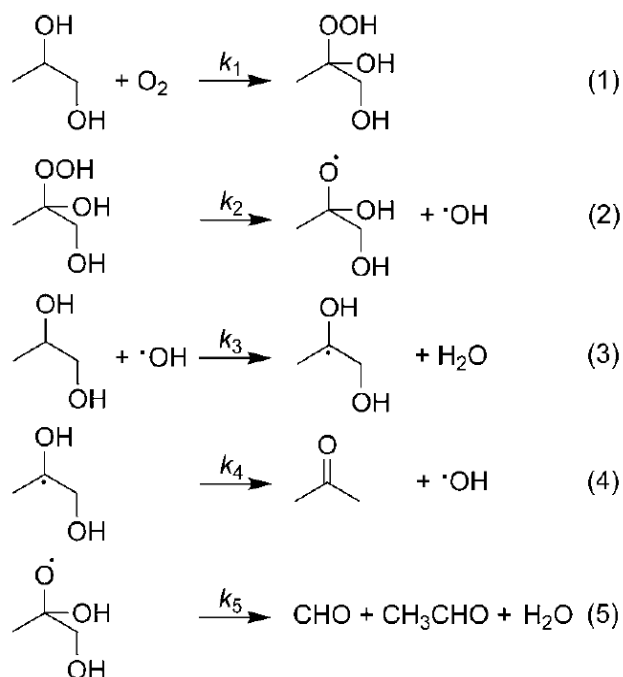


Рис. 13. Перекисный механизм гомогенного некаталитического окисления 1,2 диола с образованием в качестве промежуточного продукта гидроксильного радикала (реакции 2 и 4), а в качестве конечных продуктов двух альдегидов (реакция 5).

Методом ЭПР-спектроскопии было установлено, что при каталитическом окислении в присутствии аденозилкобаламина пропиленгликоль образует главным образом С1-центрированный 1,2-пропандиол-1-ильный радикал, способный присоединять молекулу кислорода с образованием неустойчивого гидропероксида [52]. Однако при других условиях окисления структура радикала может меняться.

Как показали наши исследования, при некоторых особо благоприятных условиях возможно образование до 100 мкмоль органических пероксидов за одну затяжку ЭС длительностью не более 3 сек. Наличие и активность высокореакционных пероксидов, так же, как и свободных 1,2-диольных радикалов, в аэрозолях ЭС позже было подтверждено другими авторами [53]. Состав и высокая концентрация пероксидов (а также продуктов их распада – свободных радикалов) представляют определенную угрозу для любой биологической системы. Достаточно сказать, что некоторые органические пероксиды (в отличие от пероксида водорода) обладают



канцерогенными свойствами [54]. Доказательства рисков базируются на данных фармакокинетики ПГ при ингаляционном способе введения животным в дозе 0,2 г/кг/сут, которые показали высокие концентрации ПГ в крови ( $C_{max}=136 \text{ mg/dL}$ ) [55].

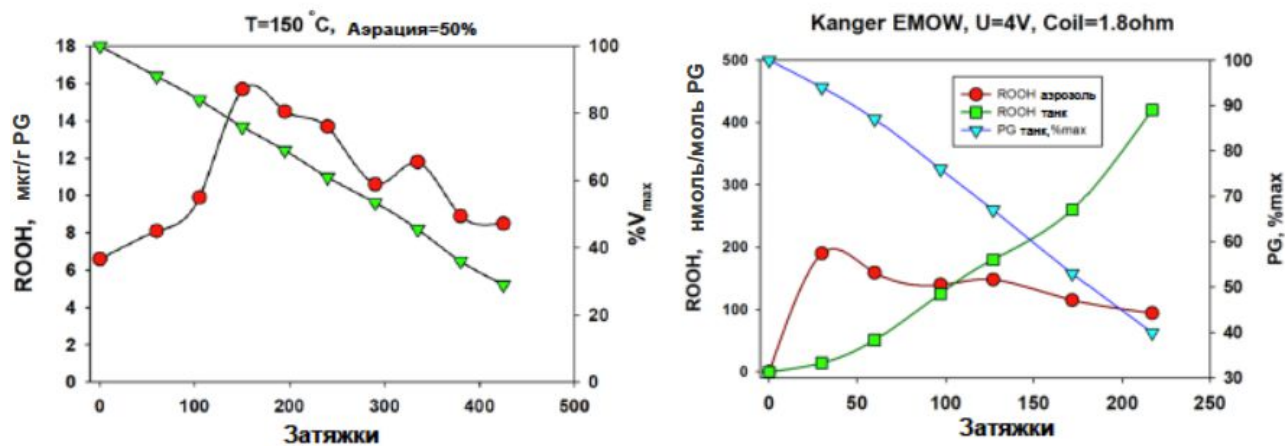
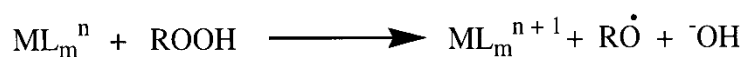


Рис. 14. (Слева). Генерация органических пероксидов во время цикла испарения е-жидкости в ЭС Vaporesso с керамическим типом испарителя (одним из наилучших в линейке испарителей на момент 2017 года) и функцией термоконтроля. Красная линия – динамика концентрации пероксидов в зависимости от количества сделанных затяжек на одной полной заправке танка. Зеленая линия – остаточный объем жидкости в заправочном танке (% от максимального). (Справа) Динамика накопления перекисей в танке ЭС (зеленая линия с квадратами) без функции термоконтроля Kanger EMOW во время пользования устройством и в аэрозоле (красная линия с кругами).

Наши исследования показали, что стандартные условия генерации аэрозоля даже при самом щадящем температурном режиме испарения с использованием наиболее совершенного испарителя на устройстве с безупречным контролем температуры могут приводить к значительному росту концентрации пероксидов в составе аэрозоля (рис. 14 слева). Любое отклонение от этих условий приводит к еще большему образованию пероксидов (рис. 14 справа). Помимо собственно условий и режима

эксплуатации ЭС, важную роль в скорости образования и распада пероксидов играет также выбор испарителя и особенно материала металлической спирали. Установлено, что существует тесная обратная корреляция между сопротивлением спирали и количеством АФК в образуемом аэрозоле ЭС [56]. Примечательно, что присутствие заметных количеств пероксидов нам удалось обнаружить не только в аэрозоле, но и в самом танке в составе жидкости после нескольких первых затяжек. То есть, между испарителем и танком идет непрерывный обмен продуктами реакции. Пока мы можем лишь констатировать, что концентрация пероксидов в аэрозоле не зависит напрямую от их концентрации в танке. Точно не известно, каким образом пероксиды оказываются в танке. Является ли это следствием диффузии пероксидов непосредственно из зоны испарения в объем танка, или их образование происходит *de novo* уже в самом танке, предстоит выяснить в следующих экспериментах.

Попав в организм, органические пероксиды, в отличие от пероксида водорода и высоко активных радикалов, не подвергаются быстрой инактивации антиоксидантными системами и способны относительно длительно циркулировать, накапливаясь в различных органах и тканях. Процесс их разложения с участием различных пероксидаз также происходит не всегда быстро, особенно если концентрация пероксидов невысока, однако и в этом случае продуктами реакции становятся активные пероксильные радикалы [57]. Есть большая вероятность, что пероксид окажется внутри клетки и достигнет ядра. Далее по схеме возможны следующие пути трансформации пероксида (схема 2). В схожей манере с распадом пероксида водорода по реакции Фентона алкилгидропероксиды восстанавливаются комплексами железа ( $ML_m^n$ ) с образованием алкоксильного радикала:



Алкоксильные радикалы, полученные при распаде алкильных пероксидов могут вызывать разрывы нитей ДНК, однако с учетом их микросекундного периода полужизни и относительного долгого диффузного пути их вклад в механизм повреждения скорее всего незначительный. Наоборот, уникальность свойств пероксильного радикала в его исключительно долгом периоде жизни, который позволяет ему свободно диффундировать и достигать биологических целей, расположенных далеко от места зарождения радикала.

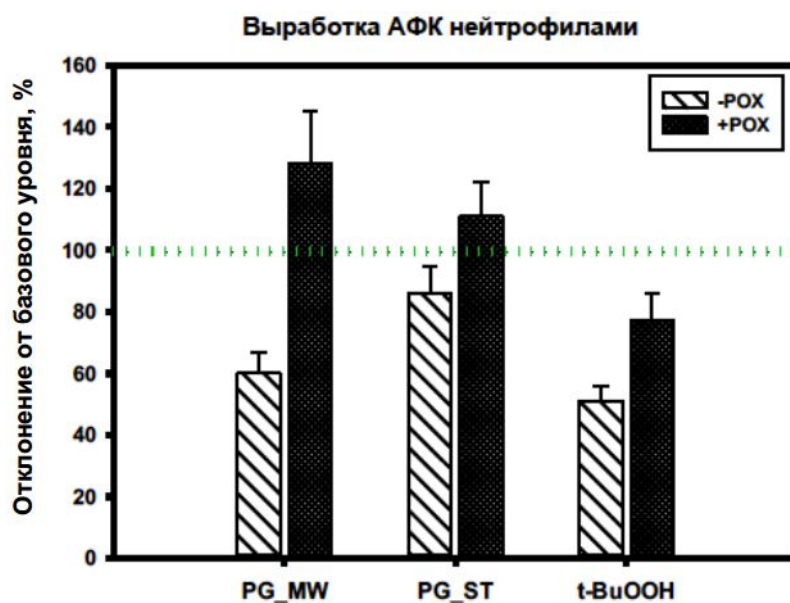


Рис. 15. Люминол-зависимая генерация АФК зимозан-стимулированными нейтрофилами в присутствии 0,1% экстрактов аэрозоля ПГ, полученных по методике Ween (PG-MW) в сравнении со стандартным протоколом (PG\_ST). Экстракты аэрозоля были использованы в двух вариантах: с предварительной обработкой пероксидазой (+POX) и без нее (-POX). В качестве базового уровня, принятого за 100%, принята активность нейтрофилов в плазме в отсутствие добавок. Дополнения к рисунку: Исходная концентрация пероксидов в аэрозоле PG\_MW для первых 45 затяжек ROOH=420 nmol/mol ПГ. Исходная концентрация пероксидов в аэрозоле PG\_ST для первых 45 затяжек ROOH = 108 nmol/mol ПГ. Для сравнения была протестирована гидроперекись третбутила t-BuOOH — 10 μM tert-butylhydroperoxide.

Важнейшим и неотъемлемым биомаркером фагоцитарной активности нейтрофилов является управляемый окислительный взрыв (oxidative burst), связанный с производством АФК мембранным комплексом НАДФН-оксидазы совместно с пероксидазой. Мы сравнили состояние фагоцитарной системы нейтрофилов крови до и после воздействия аэрозоля, состоящего из 100% ПГ и полученного при разных режимах затяжки ЭС. Как оказалось, статистически достоверно окислительный взрыв у нейтрофилов ингибировал лишь тот аэрозоль, который был получен при интенсивном режиме эксплуатации (50 затяжек с интервалом 5 сек) (рис. 15). При обычных режимах эксплуатации ЭС аэрозоль ПГ оказывал минимальное воздействие на фагоциты. Интересно, что предварительная выдержка экстракта переокисленного аэрозоля с пероксидазой полностью нивелировала его супрессивный эффект. Данный факт можно объяснить лишь тем, что в экстрактах аэрозоля изначально присутствовали органические пероксиды, нарушающие работу мембранного комплекса НАДФН-оксидазы. Похоже, что органические пероксиды действительно могут обладать заметным биологическим действием, а их образование во многом зависит от режимов эксплуатации ЭС (рис. 16).



Рис. 16. Управляемые факторы образования АФК при использовании ЭС, связанные с конструктивными элементами, предназначенными для испарения, диспергирования и охлаждения аэрозоля.

## Оценка канцерогенного потенциала органических пероксидов аэрозолей ЭС с использованием программы OncoLogic

Используя программу OncoLogic, мы провели моделирование и оценку канцерогенного потенциала органических пероксидов, образуемых при окислении пропиленгликоля в ЭС. Окончательный результат программа сформировала такой:

*“Structure-activity relationship analysis suggests that alkyl hydroperoxides (R-OOH, especially with R = tert-alkyl) or tert-dialkyl peroxides (ROOR, with R/R' = tert-alkyl) are more likely to be mutagenic/carcinogenic, probably because tert-alkoxy radicals are more stable and have a better chance of remaining reactive or can further generate small alkyl radicals (e.g. methyl radical) that interact with DNA to initiate carcinogenesis. Elements of consideration regarding the carcinogenic potential of organic peroxides include the structure, size and reactivity/stability of the free radicals. Based on structure-activity relationship analysis (SAR), the baseline level of concern of this peroxide-type compound where R1 is propyl and R2 is hydrogen is MODERATE. **The two hydroxyl substituents on R1 are expected to reduce the level of concern. The level of concern has been reduced to MARGINAL**».* Таким образом, благодаря наличию двух гидроксильных заместителей в молекуле пропиленгликоля канцерогенный потенциал образующихся из него пероксидов программа OncoLogic оценивает как незначительный.

### Выводы и заключение

В результате проведенного исследования, которое включало анализ литературных данных и наши собственные экспериментальные данные, можно сделать вывод, что современные системы доставки никотина, альтернативные обычным сигаретам, действительно обладают хорошим потенциалом не только в профилактике онкологических заболеваний, характерных для курильщиков, но и снижения рисков других тяжелых

хронических и острых заболеваний, прежде всего таких как ХОБЛ. По многим показателям риски негативного воздействия АСДН на различные органы и ткани действительно могут быть существенно ниже, чем при воздействии табачного дыма. При лабораторных тестированиях ЭС особое внимание должно быть уделено методической части, так как несоблюдение технологии получения аэрозолей может быть причиной самых разных артефактов.

Несмотря на многочисленные негативные публикации, появившиеся в биомедицинской литературе последние несколько лет относительно содержания токсичных веществ в аэрозолях ЭС, трудно не заметить серьезные и принципиальные различия между обычной сигаретой и ЭС/СНТ. Безусловно, АСДН — это далеко не идеальные продукты с точки зрения возможных биологических рисков в длительной перспективе. Однако все установленные и известные на сегодняшний день риски по совокупности существенно ниже тех рисков, которые обычно принято относить к курению обычных сигарет. Следует также заметить, что технический прогресс в области разработки более совершенных и безопасных устройств во всем мире идет семимильными шагами. Фактически, каждые год-полтора рынок девайсов обновляется на треть в результате мощной конкуренции производителей. Это, в свою очередь, гарантирует быстрый прогресс в области создания более совершенных устройств для доставки в организм никотина тем, кто в нем нуждается.

Вне всяких сомнений, наилучшей стратегией в профилактике онкологических заболеваний у курильщиков является полный отказ от курения. АСДН являются как раз тем инструментом, который помогает курильщику снизить риски для здоровья, связанные с негативным воздействием сигаретного дыма. Однако сама методология применения АСДН еще плохо разработана и практически не учитывает индивидуальные особенности курильщика, поэтому эффективность АСДН все еще вызывает много вопросов. Все известные на сегодняшний день АСДН условно делятся

на три группы: 1) безникотиновые имитаторы курения (травяные и е-сигареты), 2) неингаляционные системы доставки никотина (пластыри, жвачки, никпэки, снюс) и 3) системы комбинирования имитации курения и доставки никотина (е-сигареты и СНТ). Наши исследования показали, что более предпочтительной стратегией для отказа от курения и минимизации биологических рисков является комбинация систем из первой и второй групп, и особенно сочетание безникотиновых е-сигарет и никотиновых пэков оральной фиксации. По предварительным оценкам, полученным на основании продолжающихся предклинических испытаний, никпэки с разумным содержанием никотина являются одной из самых безопасных и эффективных форм доставки никотина.

Работа выполнена в рамках совместного проекта и при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 19-53-18019 Болг\_а) и Национального научного фонда Болгарии (грант № КП-06-Русия-28).

#### Список литературы

1. *Заридзе Д.Г.* Канцерогенез. Руководство для врачей// Москва: Медицина. – 2004. – 576 с.
2. *Мукерия А.Ф., Заридзе Д.Г.* Эпидемиология и профилактика рака легкого //Вестник РОНЦ им. НН Блохина РАМН. – 2010. – Т. 21. – №. 3.
3. *Заридзе Д.Г., Мукерия А.Ф.* Молекулярные маркеры рака легкого //Молекулярная медицина. – 2010. – №. 2. – С. 3-8.
4. *Vineis P., Alavanja M., Buffler P., Fontham E., Franceschi S., Gao Y.T., Gupta P.C., Hackshaw A., Matos E., Samet J., Sitas F.* Tobacco and cancer: recent epidemiological evidence //Journal of the National Cancer Institute. – 2004. – Vol. 96, No. 2. – P. 99-106.
5. *Левшин В.Ф., Заридзе Д.Г.* Табак и злокачественные новообразования //Вопр. онкол. – 2003. – Т. 49. – №. 4. – С. 391-400.
6. *Masayeva B.G., Mambo E., Taylor R.J., Goloubeva O.G., Zhou S., Cohen Y., Minhas K., Koch W., Sciubba J., Alberg A.J., Sidransky D., Califano J.*

Mitochondrial DNA content increase in response to cigarette smoking //Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers. – 2006. – Vol. 15, No. 1. – P. 19-24.

7. *Benigni R., Bossa C., Alivernini S., Colafranceschi M.* Assessment and Validation of US EPA's OncoLogic® Expert System and Analysis of Its Modulating Factors for Structural Alerts // Journal of Environmental Science and Health, Part C. – 2012. Vol. 30, No.2. P. 152-173.
8. *Robinson S., Bevan R., Lunec J., Griffiths H.* Chemiluminescence determination of hydroperoxides following radiolysis and photolysis of free amino acids // FEBS letters. – 1998. - Vol. 430, No. 3. - P. 297-300.
9. *Seregina I.F., Lanskaya S.Y., Okina O.I., Bolshov M.A., Lyapunov S.M., Chugunova O.L., Foktova A.S.* Determination of chemical elements in biological fluids and diagnostic substrates from children by inductively coupled plasma mass spectrometry // Journal of Analytical Chemistry. – 2010. - Vol.65, No.9. – P. 964-972.
10. *Kapeu A.S., Luostarinen T., Jellum E., Dillner J., Hakama M., Koskela P., Lenner P., Löve A., Mahlamaki E., Thoresen S., Tryggvadottir L.* Is smoking an independent risk factor for invasive cervical cancer? A nested case-control study within Nordic biobanks // American journal of epidemiology. – 2009. – Vol. 169, No. 4. – P. 480-480.
11. *Ahmad A., Syed F.A., Singh S., Hadi S.M.* Prooxidant activity of resveratrol in the presence of copper ions: mutagenicity in plasmid DNA // Toxicology Letters. – 2005. – Vol. 159, No.1. – P. 1-2.
12. *Villanueva C., Kross R.D.* Antioxidant-induced stress // International journal of molecular sciences. – 2012. – Vol. 13, No. 2. – P. 2091-2109.
13. *Lu L.Y., Ou N., Lu Q.B.* Antioxidant induces DNA damage, cell death and mutagenicity in human lung and skin normal cells // Scientific reports. – 2013. – Vol. 3, No. 1. – P. 1-11.



14. *Menshov V.A., Trofimov A.V.* Hydrogen peroxide derived from cigarette smoke: “pardon impossible, to be sent to siberia”? // *Mini-Reviews in Organic Chemistry*. – 2011. – Vol. 8, No. 4. – P. 394-400.
15. *Hoffmann D., Wynder E.L.* A study of tobacco carcinogenesis. XI. Tumor initiators, tumor accelerators, and tumor promoting activity of condensate fractions // *Cancer*. – 1971. Vol. 27, No. 4. - P. 848-864.
16. *Islami F., Pourshams A., Nasrollahzadeh D., Kamangar F., Fahimi S., Shakeri R., Abedi-Ardekani B., Merat S., Vahedi H., Semnani S., Abnet C.C.* Tea drinking habits and oesophageal cancer in a high risk area in northern Iran: population based case-control study // *Bmj*. – 2009. – Vol. 338. – P. b929.
17. *Zhang S., Li X., Xie F., Liu K., Liu H., Xie J.* Evaluation of whole cigarette smoke induced oxidative stress in A549 and BEAS–2B cells // *Environmental toxicology and pharmacology*. – 2017. – Vol. 54. – P. 40-47.
18. *Palmina N.P., Maltseva E.L., Chasovskaya T.E., Kasparov V.V., Bogdanova N.G., Menshov V.A., Trofimov A.V.* Effects of different phases of cigarette smoke on lipid peroxidation and membrane structure in liposomes // *Australian Journal of Chemistry*. – 2014. – Vol. 67, No 6. – P. 858-866.
19. *Haddad J.J.* Redox and oxidant-mediated regulation of apoptosis signaling pathways: immuno-pharmaco-redox conception of oxidative siege versus cell death commitment // *International immunopharmacology*. – 2004. – Vol. 4, No. 4. – P. 475-93.
20. *Nishiuchi T., Utsumi T., Kanno T., Takehara Y., Kobuchi H., Yoshioka T., Horton A.A., Yasuda T., Utsumi K.* Inhibition of neutrophil superoxide generation by hypericin, an antiretroviral agent // *Archives of biochemistry and biophysics*. – 1995. – Vol. 323, No. 2. – P. 335-342.
21. *Pedersen K.M., Çolak Y., Ellervik C., Hasselbalch H.C., Bojesen S.E., Nordestgaard B.G.* Smoking and Increased White and Red Blood Cells: A Mendelian Randomization Approach in the Copenhagen General Population Study // *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. – 2019. – Vol. 39, No. 5. – P. 965-977.

22. *Pero R.W., Sheng Y., Olsson A., Bryngelsson C., Lund-Pero M.* Hypochlorous acid/N-chloramines are naturally produced DNA repair inhibitors // *Carcinogenesis*. – 1996. – Vol. 17, No. 1. – P. 13-28.
23. *Kirkham P.A., Spooner G., Rahman I., Rossi A.G.* Macrophage phagocytosis of apoptotic neutrophils is compromised by matrix proteins modified by cigarette smoke and lipid peroxidation products // *Biochemical and biophysical research communications*. – 2004. – Vol.318, No. 1. – P. 32-37.
24. *Yan J., Kloecker G., Fleming C., Bousamra M., Hansen R., Hu X., Ding C., Cai Y., Xiang D., Donniger H., Eaton J.W.* Human polymorphonuclear neutrophils specifically recognize and kill cancerous cells // *Oncoimmunology*. – 2014. – Vol. 3, No. 7. – P. e950163.
25. *Valgardsdottir R., Cattaneo I., Klein C., Introna M., Figliuzzi M., Golay J.* Human neutrophils mediate trogocytosis rather than phagocytosis of CLL B cells opsonized with anti-CD20 antibodies // *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. – 2017. – Vol. 129, No. 19. – P. 2636-44.
26. *Kovalenko E.I., Semenkova G.N., Cherenkevich S.N.* Effect of hydrogen peroxide on ability of neutrophils to generate the reactive oxygen and chlorine species and secrete myeloperoxidase in vitro // *Tsitologiya*. – 2007. – Vol. 49, No. 10. – P. 839-847.
27. *Szatrowski T.P., Nathan C.F.* Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells // *Cancer research*. – 1991. – Vol. 51, No. 3. – P. 794-798.
28. *Malczewska-Jaskóla K., Jasiewicz B., Mrówczyńska L.* Nicotine alkaloids as antioxidant and potential protective agents against in vitro oxidative haemolysis // *Chemico-biological interactions*. – 2016. – Vol. 243. – P. 62-71.
29. *Coussens L.M., Werb Z.* Inflammation and cancer // *Nature*. – 2002. – Vol. 420, No. 6917. – P. 860-867.
30. *Fitzgerald P.J.* Beta blockers, norepinephrine, and cancer: an epidemiological viewpoint // *Clinical epidemiology*. – 2012. – Vol. 4. – P. 151.

31. *Tilan J., Kitlinska J.* Sympathetic neurotransmitters and tumor angiogenesis—link between stress and cancer progression // *Journal of oncology.* – 2010. – Vol. 2010.
32. *Bach P.B., Kattan M.W., Thornquist M.D., Kris M.G., Tate R.C., Barnett M.J., Hsieh L.J., Begg C.B.* Variations in lung cancer risk among smokers // *Journal of the National Cancer Institute.* – 2003. – Vol. 95, No. 6. – P. 470-478.
33. *Son Y.O., Wang L., Poyil P., Budhraja A., Hitron J.A., Zhang Z., Lee J.C., Shi X.* Cadmium induces carcinogenesis in BEAS-2B cells through ROS-dependent activation of PI3K/AKT/GSK-3 $\beta$ / $\beta$ -catenin signaling // *Toxicology and applied pharmacology.* – 2012. – Vol. 264, No. 2. – P. 153-160.
34. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, vol. 100c. A review of human carcinogens. Arsenic, metals, fibres and dusts. International Agency for Research on Cancer, Lyon. 2012.
35. *Tchounwou P.B., Yedjou C.G., Patlolla A.K., Sutton D.J.* Heavy metal toxicity and the environment // *Molecular, clinical and environmental toxicology.* – Springer, Basel, 2012. – P. 133-164.
36. *Valko M., Jomova K., Rhodes C.J., Kuča K., Musílek K.* Redox-and non-redox-metal-induced formation of free radicals and their role in human disease // *Archives of toxicology.* – 2016. – Vol. 90, No. 1. – P. 1-37.
37. *Williams M., Villarreal A., Bozhilov K., Lin S., Talbot P.* Metal and silicate particles including nanoparticles are present in electronic cigarette cartomizer fluid and aerosol // *PloS one.* – 2013. – Vol. 8, No. 3. – P. e57987.
38. *Zhang H., Ji Z., Xia T., Meng H., Low-Kam C., Liu R., Pokhrel S., Lin S., Wang X., Liao Y.P., Wang M.* Use of metal oxide nanoparticle band gap to develop a predictive paradigm for oxidative stress and acute pulmonary inflammation // *ACS nano.* – 2012. – Vol. 6, No. 5. – P. 4349-4368.
39. *Wang Y., Su H., Gu Y., Song X., Zhao J.* Carcinogenicity of chromium and chemoprevention: a brief update // *OncoTargets and therapy.* – 2017. – Vol. 10. – P. 4065.

40. *Helen G.S., Liakoni E., Nardone N., Addo N., Jacob P., Benowitz N.L.* Comparison of Systemic Exposure to Toxic and/or Carcinogenic Volatile Organic Compounds (VOC) during Vaping, Smoking, and Abstention // *Cancer Prevention Research.* – 2020. – Vol. 13, No.2. – P. 153-162.
41. *Belushkin M., Tabin Djoko D., Esposito M., Korneliou A., Jeannet C., Lazzarini M., Jaccard G.* Selected harmful and potentially harmful constituents levels in commercial e-cigarettes // *Chemical Research in Toxicology.* – 2019.
42. *Fernández E., Ballbè M., Sureda X., Fu M., Saltó E., Martínez-Sánchez J.M.* Particulate matter from electronic cigarettes and conventional cigarettes: a systematic review and observational study. *Current environmental health reports.* – 2015. – Vol. 2, No. 4. – P. 423-429.
43. *Fearon I.M., Eldridge A., Gale N., Shepperd C.J., McEwan M., Camacho O.M., Nides M., McAdam K., Proctor C.J.* E-cigarette nicotine delivery: data and learnings from pharmacokinetic studies // *American journal of health behavior.* – 2017. – Vol. 41, No. 1. – P.16-32.
44. *Shu Y., Zhu L., Yuan F., Kong X., Huang T., Cai Y.D.* Analysis of the relationship between PM<sub>2.5</sub> and lung cancer based on protein-protein interactions // *Combinatorial chemistry & high throughput screening.* – 2016. – Vol. 19, No. 2. – P. 100-108.
45. *Parascandola M.* Lessons from the history of tobacco harm reduction: the National Cancer Institute's Smoking and Health Program and the “less hazardous cigarette”. // *Nicotine & tobacco research.* – 2005. – Vol. 7, No. 5. – P. 779-789.
46. *Kaufman D.W., Palmer J.R., Rosenberg L., Stolley P., Warshauer E., Shapiro S.* Tar content of cigarettes in relation to lung cancer // *American journal of epidemiology.* – 1989. – Vol.129, No. 4. – P. 703-711.
47. *Berridge V.* Electronic cigarettes and history // *The Lancet.* – 2014. – Vol. 383, No. 9936. – P. 2204-2205.

48. *García Gómez D., Gaisl T., Barrios Collado C., Vidal de Miguel G., Kohler M., Zenobi R.* Real-time chemical analysis of E-cigarette aerosols by means of secondary electrospray ionization mass spectrometry // *Chemistry—A European Journal*. – 2016. – Vol. 22, No. 7. – P. 2452-2457.
49. *Andersen F.A.* Final report on the safety assessment of propylene-glycol and polypropylene glycols // *Journal of the American College of Toxicology*. – 1994. Vol. 13, No. 6. – P. 437-491.
50. *Aye M., Di Giorgio C., De Mo M., Botta A., Perrin J., Courbiere B.* Assessment of the genotoxicity of three cryoprotectants used for human oocyte vitrification: dimethyl sulfoxide, ethylene glycol and propylene glycol // *Food and chemical toxicology*. – 2010. – Vol. 48, No. 7. – P. 1905-1912.
51. *Lehman A.J., Newman H.W.* Propylene glycol: rate of metabolism absorption, and excretion, with a method for estimation in body fluids // *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. – 1937. – Vol. 60, No. 3. – P. 312-322.
52. *Yamanishi M., Ide H., Murakami Y., Toraya T.* Identification of the 1, 2-propanediol-1-yl radical as an intermediate in adenosylcobalamin-dependent diol dehydratase reaction // *Biochemistry*. – 2005. – Vol. 44, No. 6. – P. 2113-2118.
53. *Zhao J., Zhang Y., Sisler J.D., Shaffer J., Leonard S.S., Morris A.M., Qian Y., Bello D., Demokritou P.* Assessment of reactive oxygen species generated by electronic cigarettes using acellular and cellular approaches // *Journal of hazardous materials*. – 2018. – Vol. 344. – P.549-557.
54. *Termini J.* Hydroperoxide-induced DNA damage and mutations // *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. – 2000. – Vol. 450, No. 1-2. – P. 107-124.
55. *Werley M.S., McDonald P., Lilly P., Kirkpatrick D., Wallery J., Byron P., Venitz J.* Non-clinical safety and pharmacokinetic evaluations of propylene glycol aerosol in Sprague-Dawley rats and Beagle dogs // *Toxicology*. – 2011. – Vol. 287, No. 1-3. – P. 76-90.

56. *Cirillo S., Urena J.F., Lambert J.D., Vivarelli F., Canistro D., Paolini M., Cardenia V., Rodriguez-Estrada M.T., Richie Jr J.P., Elias R.J.* Impact of electronic cigarette heating coil resistance on the production of reactive carbonyls, reactive oxygen species and induction of cytotoxicity in human lung cancer cells in vitro // *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. – 2019. – Vol. 109. – P. 104500.
57. *Kalyanaraman B., Mottley C., Mason R.P.* A direct electron spin resonance and spin-trapping investigation of peroxy free radical formation by hematin/hydroperoxide systems // *Journal of Biological Chemistry*. – 1983. – Vol. 258, No. 6. – P. 3855-3858.

### References

1. [*Zaridze D.G.* Cancerogenesis. 2004. Moscow: Meditsine (in Russ)].
2. [*Mukeria A.F., Zaridze D.G.* Lung cancer epidemiology and prevention. *Vestnik RONC im. N.N. Blohina RAMN*. 2010;21(3) (In Russ)].
3. [*Zaridze D.G., Mukeria A.F.* Molecular markers of lung cancer. *Molekulyarnaja meditsina*. 2010(2):3-8 (In Russ)].
4. *Vineis P., Alavanja M., Buffler P., Fontham E., Franceschi S., Gao Y.T., Gupta P.C., Hackshaw A., Matos E., Samet J., Sitas F.* Tobacco and cancer: recent epidemiological evidence. *Journal of the National Cancer Institute*. 2004 Jan 21;96(2):99-106. doi: 10.1093/jnci/djh014.
5. [*Levshin V.F., Zaridze D.G.* Tabak i zlokachestvennyye novoobrazovaniya. *Vopr. onkol*. 2003;49(4):391-400. (in Russ)].
6. *Masayeva B.G., Mambo E., Taylor R.J., Goloubeva O.G., Zhou S., Cohen Y., Minhas K., Koch W., Sciubba J., Alberg A.J., Sidransky D., Califano J.* Mitochondrial DNA content increase in response to cigarette smoking. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006 Jan; 15(1): 19–24. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-05-0210.

7. *Benigni R., Bossa C., Alivernini S., Colafranceschi M.* Assessment and Validation of US EPA's OncoLogic® Expert System and Analysis of Its Modulating Factors for Structural Alerts. *Journal of Environmental Science and Health, Part C.* 2012 Apr 1;30(2):152-73. doi: 10.1080/10590501.2012.681486.
8. *Robinson S., Bevan R., Lunec J., Griffiths H.* Chemiluminescence determination of hydroperoxides following radiolysis and photolysis of free amino acids. *FEBS letters.* 1998 Jul 3;430(3):297-300. doi: 10.1016/S0014-5793(98)00679-6.
9. *Seregina I.F., Lanskaya S.Y., Okina O.I., Bolshov M.A., Lyapunov S.M., Chugunova O.L., Foktova A.S.* Determination of chemical elements in biological fluids and diagnostic substrates from children by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Analytical Chemistry.* 2010 Sep 1;65(9):964-72. doi: 10.1134/S1061934810090133.
10. *Kapeu A.S., Luostarinen T., Jellum E., Dillner J., Hakama M., Koskela P., Lenner P., Löve A., Mahlamaki E., Thoresen S., Tryggvadottir L.* Is smoking an independent risk factor for invasive cervical cancer? A nested case-control study within Nordic biobanks. *American journal of epidemiology.* 2009 Feb 15;169(4):480-8. doi: 10.1093/aje/kwn354.
11. *Ahmad A., Syed F.A., Singh S., Hadi S.M.* Prooxidant activity of resveratrol in the presence of copper ions: mutagenicity in plasmid DNA. *Toxicology Letters.* 2005 Oct 15;159(1):1-2. doi: 10.1016/j.toxlet.2005.04.001.
12. *Villanueva C., Kross R.D.* Antioxidant-induced stress. *International journal of molecular sciences.* 2012 Feb;13(2):2091-109. doi: 10.3390/ijms13022091.
13. *Lu L.Y., Ou N., Lu Q.B.* Antioxidant induces DNA damage, cell death and mutagenicity in human lung and skin normal cells. *Scientific reports.* 2013 Nov 8;3(1):1-11. doi: 10.1038/srep03169.

14. *Menshov V.A., Trofimov A.V.* Hydrogen peroxide derived from cigarette smoke:“pardon impossible, to be sent to siberia”?. *Mini-Reviews in Organic Chemistry*. 2011 Nov 1;8(4):394-400. doi: 10.2174/157019311797440245.
15. *Hoffmann D., Wynder E.L.* A study of tobacco carcinogenesis. XI. Tumor initiators, tumor accelerators, and tumor promoting activity of condensate fractions. *Cancer*. 1971 Apr;27(4):848-64. doi: 10.1002/1097-0142(197104)27:4<848::AID-CNCR2820270415>3.0.CO;2-4.
16. *Islami F., Pourshams A., Nasrollahzadeh D., Kamangar F., Fahimi S., Shakeri R., Abedi-Ardekani B., Merat S., Vahedi H., Semnani S., Abnet C.C.* Tea drinking habits and oesophageal cancer in a high risk area in northern Iran: population based case-control study. *Bmj*. 2009 Mar 27;338:b929. doi: 10.1136/bmj.b929.
17. *Zhang S., Li X., Xie F., Liu K., Liu H., Xie J.* Evaluation of whole cigarette smoke induced oxidative stress in A549 and BEAS–2B cells. *Environmental toxicology and pharmacology*. 2017 Sep 1;54:40-7. doi: 10.1016/j.etap.2017.06.023.
18. *Palmina N.P., Maltseva E.L., Chasovskaya T.E., Kasparov V.V., Bogdanova N.G., Menshov V.A., Trofimov A.V.* Effects of different phases of cigarette smoke on lipid peroxidation and membrane structure in liposomes. *Australian Journal of Chemistry*. 2014 Jul 7;67(6):858-66. doi: 10.1071/CH13663.
19. *Haddad J.J.* Redox and oxidant-mediated regulation of apoptosis signaling pathways: immuno-pharmaco-redox conception of oxidative siege versus cell death commitment. *International immunopharmacology*. 2004 Apr 1;4(4):475-93. doi: 10.1016/j.intimp.2004.02.002.
20. *Nishiuchi T., Utsumi T., Kanno T., Takehara Y., Kobuchi H., Yoshioka T., Horton A.A., Yasuda T., Utsumi K.* Inhibition of neutrophil superoxide generation by hypericin, an antiretroviral agent. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1995 Nov 10;323(2):335-42. doi: 10.1006/abbi.1995.9956.



21. *Pedersen K.M., Çolak Y., Ellervik C., Hasselbalch H.C., Bojesen S.E., Nordestgaard B.G.* Smoking and Increased White and Red Blood Cells: A Mendelian Randomization Approach in the Copenhagen General Population Study. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology.* 2019 May;39(5):965-77. Doi: 10.1161/ATVBAHA.118.312338.
22. *Pero R.W., Sheng Y., Olsson A., Bryngelsson C., Lund-Pero M.* Hypochlorous acid/N-chloramines are naturally produced DNA repair inhibitors. *Carcinogenesis.* 1996 Jan 1;17(1):13-8. doi: 10.1093/carcin/17.1.13.
23. *Kirkham P.A., Spooner G., Rahman I., Rossi A.G.* Macrophage phagocytosis of apoptotic neutrophils is compromised by matrix proteins modified by cigarette smoke and lipid peroxidation products. *Biochemical and biophysical research communications.* 2004 May 21;318(1):32-7. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.04.003.
24. *Yan J., Kloecker G., Fleming C., Bousamra M., Hansen R., Hu X., Ding C., Cai Y., Xiang D., Donniger H., Eaton J.W.* Human polymorphonuclear neutrophils specifically recognize and kill cancerous cells. *Oncoimmunology.* 2014 Jul 3;3(7):e950163. doi: 10.4161/15384101.2014.950163.
25. *Valgardsdottir R., Cattaneo I., Klein C., Introna M., Figliuzzi M., Golay J.* Human neutrophils mediate trogocytosis rather than phagocytosis of CLL B cells opsonized with anti-CD20 antibodies. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology.* 2017 May 11;129(19):2636-44. doi: 10.1182/blood-2016-08-735605.
26. *Kovalenko E.I., Semenkova G.N., Cherenkevich S.N.* Effect of hydrogen peroxide on ability of neutrophils to generate the reactive oxygen and chlorine species and secrete myeloperoxidase in vitro. *Tsitologiya.* 2007;49(10):839-47.
27. *Szatrowski T.P., Nathan C.F.* Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer research.* 1991 Feb 1;51(3):794-8.

28. *Malczewska-Jaskóła K., Jasiewicz B., Mrówczyńska L.* Nicotine alkaloids as antioxidant and potential protective agents against in vitro oxidative haemolysis. *Chemico-biological interactions*. 2016 Jan 5;243:62-71. doi: 10.1016/j.cbi.2015.11.030.
29. *Coussens L.M., Werb Z.* Inflammation and cancer. *Nature*. 2002 Dec;420(6917):860-7. doi: 10.1038/nature01322.
30. *Fitzgerald P.J.* Beta blockers, norepinephrine, and cancer: an epidemiological viewpoint. *Clinical epidemiology*. 2012;4:151. doi: 10.2147/CLEP.S33695.
31. *Tilan J., Kitlinska J.* Sympathetic neurotransmitters and tumor angiogenesis—link between stress and cancer progression. *Journal of oncology*. 2010;2010. doi: 10.1155/2010/539706.
32. *Bach P.B., Kattan M.W., Thornquist M.D., Kris M.G., Tate R.C., Barnett M.J., Hsieh L.J., Begg C.B.* Variations in lung cancer risk among smokers. *Journal of the National Cancer Institute*. 2003 Mar 19;95(6):470-8. doi: 10.1093/jnci/95.6.470.
33. *Son Y.O., Wang L., Poyil P., Budhraja A., Hitron J.A., Zhang Z., Lee J.C., Shi X.* Cadmium induces carcinogenesis in BEAS-2B cells through ROS-dependent activation of PI3K/AKT/GSK-3 $\beta$ / $\beta$ -catenin signaling. *Toxicology and applied pharmacology*. 2012 Oct 15;264(2):153-60. doi: 10.1016/j.taap.2012.07.028.
34. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, vol. 100c. A review of human carcinogens. Arsenic, metals, fibres and dusts. International Agency for Research on Cancer, Lyon. 2012.
35. *Tchounwou P.B., Yedjou C.G., Patlolla A.K., Sutton D.J.* Heavy metal toxicity and the environment. In *Molecular, clinical and environmental toxicology 2012* (pp. 133-164). Springer, Basel. doi: 10.1007/978-3-7643-8340-4\_6.

36. *Valko M., Jomova K., Rhodes C.J., Kuča K., Musílek K.* Redox-and non-redox-metal-induced formation of free radicals and their role in human disease. *Archives of toxicology*. 2016 Jan 1;90(1):1-37. doi: 10.1007/s00204-015-1579-5.
37. *Williams M., Villarreal A., Bozhilov K., Lin S., Talbot P.* Metal and silicate particles including nanoparticles are present in electronic cigarette cartomizer fluid and aerosol. *PloS one*. 2013 Mar 20;8(3):e57987. doi: 10.1371/journal.pone.0057987.
38. *Zhang H., Ji Z., Xia T., Meng H., Low-Kam C., Liu R., Pokhrel S., Lin S., Wang X., Liao Y.P., Wang M.* Use of metal oxide nanoparticle band gap to develop a predictive paradigm for oxidative stress and acute pulmonary inflammation. *ACS nano*. 2012 May 22;6(5):4349-68. doi: 10.1021/nm3010087.
39. *Wang Y., Su H., Gu Y., Song X., Zhao J.* Carcinogenicity of chromium and chemoprevention: a brief update. *OncoTargets and therapy*. 2017;10:4065. doi: 10.2147/OTT.S139262.
40. *Helen G.S., Liakoni E., Nardone N., Addo N., Jacob P., Benowitz N.L.* Comparison of Systemic Exposure to Toxic and/or Carcinogenic Volatile Organic Compounds (VOC) during Vaping, Smoking, and Abstinence. *Cancer Prevention Research*. 2020 Feb 1;13(2):153-62. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-19-0356.
41. *Belushkin M., Tafin Djoko D., Esposito M., Korneliou A., Jeannet C., Lazzarini M., Jaccard G.* Selected harmful and potentially harmful constituents levels in commercial e-cigarettes. *Chemical Research in Toxicology*. 2019 Dec 20. doi: 10.1021/acs.chemrestox.9b00470.
42. *Fernández E., Ballbè M., Sureda X., Fu M., Saltó E., Martínez-Sánchez J.M.* Particulate matter from electronic cigarettes and conventional cigarettes: a systematic review and observational study. *Current environmental health reports*. 2015 Dec 1;2(4):423-9. doi: 10.1007/s40572-015-0072-x.

43. *Fearon I.M., Eldridge A., Gale N., Shepperd C.J., McEwan M., Camacho O.M., Nides M., McAdam K., Proctor C.J.* E-cigarette nicotine delivery: data and learnings from pharmacokinetic studies. *American journal of health behavior.* 2017 Jan 1;41(1):16-32.
44. *Shu Y., Zhu L., Yuan F., Kong X., Huang T., Cai Y.D.* Analysis of the relationship between PM2.5 and lung cancer based on protein-protein interactions. *Combinatorial chemistry & high throughput screening.* 2016 Feb 1;19(2):100-8.
45. *Parascandola M.* Lessons from the history of tobacco harm reduction: the National Cancer Institute's Smoking and Health Program and the “less hazardous cigarette”. *Nicotine & tobacco research.* 2005 Oct;7(5):779-89. doi: 10.1080/14622200500262584.
46. *Kaufman D.W., Palmer J.R., Rosenberg L., Stolley P., Warshauer E., Shapiro S.* Tar content of cigarettes in relation to lung cancer. *American journal of epidemiology.* 1989 Apr 1;129(4):703-11. doi: 10.1093/oxfordjournals.aje.a115185.
47. *Berridge V.* Electronic cigarettes and history. *The Lancet.* 2014 Jun 28;383(9936):2204-5. doi: 10.1016/S0140-6736(14)61074-6.
48. *García Gómez D., Gaisl T., Barrios Collado C., Vidal de Miguel G., Kohler M., Zenobi R.* Real-time chemical analysis of E-cigarette aerosols by means of secondary electrospray ionization mass spectrometry. *Chemistry—A European Journal.* 2016 Feb 12;22(7):2452-7. doi: 10.1002/chem.201504450.
49. *Andersen F.A.* Final report on the safety assessment of propylene-glycol and polypropylene glycols. *Journal of the American College of Toxicology.* 1994 Dec 1;13(6):437-91.
50. *Aye M., Di Giorgio C., De Mo M., Botta A., Perrin J., Courbiere B.* Assessment of the genotoxicity of three cryoprotectants used for human oocyte vitrification: dimethyl sulfoxide, ethylene glycol and propylene glycol.

Food and chemical toxicology. 2010 Jul 1;48(7):1905-12. doi: 10.1016/j.fct.2010.04.032.

51. *Lehman A.J., Newman H.W.* Propylene glycol: rate of metabolism absorption, and excretion, with a method for estimation in body fluids. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1937 Jul 1;60(3):312-22.
52. *Yamanishi M., Ide H., Murakami Y., Toraya T.* Identification of the 1, 2-propanediol-1-yl radical as an intermediate in adenosylcobalamin-dependent diol dehydratase reaction. *Biochemistry*. 2005 Feb 15;44(6):2113-8. doi: 10.1021/bi0481850.
53. *Zhao J., Zhang Y., Sisler J.D., Shaffer J., Leonard S.S., Morris A.M., Qian Y., Bello D., Demokritou P.* Assessment of reactive oxygen species generated by electronic cigarettes using acellular and cellular approaches. *Journal of hazardous materials*. 2018 Feb 15;344:549-57. doi: 10.1016/j.jhazmat.2017.10.057.
54. *Termini J.* Hydroperoxide-induced DNA damage and mutations. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2000 May 30;450(1-2):107-24. doi: 10.1016/S0027-5107(00)00019-1.
55. *Werley M.S., McDonald P., Lilly P., Kirkpatrick D., Wallery J., Byron P., Venitz J.* Non-clinical safety and pharmacokinetic evaluations of propylene glycol aerosol in Sprague-Dawley rats and Beagle dogs. *Toxicology*. 2011 Sep 5;287(1-3):76-90. Doi: 10.1016/j.tox.2011.05.015.
56. *Cirillo S., Urena J.F., Lambert J.D., Vivarelli F., Canistro D., Paolini M., Cardenia V., Rodriguez-Estrada M.T., Richie Jr J.P., Elias R.J.* Impact of electronic cigarette heating coil resistance on the production of reactive carbonyls, reactive oxygen species and induction of cytotoxicity in human lung cancer cells in vitro. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2019 Dec 1;109:104500. doi: 10.1016/j.yrtph.2019.104500.

57. *Kalyanaraman B., Mottley C., Mason R.P.* A direct electron spin resonance and spin-trapping investigation of peroxy free radical formation by hematin/hydroperoxide systems. *Journal of Biological Chemistry*. 1983 Mar 25;258(6):3855-8.