

Роль неспецифического протеолиза в развитии альтеративных изменений легочной ткани при использовании электронных сигарет

Л.Л.Алиев, М.А.Алиев ✉, П.Е.Максимова, Т.П.Макалиш, А.В.Кубышкин, Е.Ю.Зяблицкая, А.В.Григорьянц, Я.Кариофиллидис, Д.И.Митрушкин

Институт «Медицинская академия имени С.И.Георгиевского» Крымского федерального автономного образовательного учреждения высшего образования «Крымский федеральный университет имени В.И.Вернадского» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации: 295051, Россия, Республика Крым, Симферополь, бульвар Ленина, 5 / 7

Резюме

В последние годы число людей, использующих электронные сигареты (ЭС), неуклонно растет во всем мире. Действие ЭС основано на нагревании и испарении компонентов смеси, содержащей пропиленгликоль, растительный глицерин, никотин и ароматизаторы. По данным некоторых исследований сообщается не только о тяжелых формах повреждения легких, вызванных использованием ЭС, но и смертельных исходах, что обуславливает целесообразность проведения исследований, посвященных изучению патогенетических механизмов развития таких осложнений. Одним из механизмов является активация неспецифического протеолиза, сопровождающегося деструкцией соединительнотканых компонентов гематоальвеолярного барьера. **Целью** исследования явилось изучение динамики показателей протеиназ-ингибиторной системы, а также ее роли в развитии морфологической альтерации легочной ткани при экспериментальном моделировании воздействия ЭС. **Материалы и методы.** Экспериментальные исследования проведены на белых крысах-самцах ($n = 24$) линии *Wistar* массой тела 160–180 г. Моделирование использования ЭС проводилось путем интервального воздействия испарений курительных смесей с использованием POD-системы, подключенной к двухканальному компрессору. **Результаты.** Данные анализа состояния неспецифической протеиназ-ингибиторной системы в бронхоальвеолярном смыве и сыворотке крови у крыс, а также результаты морфологических исследований свидетельствуют об активации трипсиноподобных протеиназ и истощении локального антитриптического потенциала, вызывающих биохимическую альтерацию с последующим развитием структурных изменений тканей легких. Последние характеризуются развитием застойных явлений, лейкоцитарной инфильтрацией, а также разрастанием стромы. Кроме того, при воздействии содержащих никотин смесей наблюдались изменения состояния протеиназ-ингибиторной системы, а на системном уровне — сыворотки крови. Последние характеризуются компенсаторным повышением антитриптической активности. **Заключение.** Таким образом, результаты исследования свидетельствуют об активации трипсиноподобных протеиназ в бронхоальвеолярном смыве, оказывающих повреждающее воздействие на ткань легких, вследствие которого развиваются нарушения тканевой гемодинамики, экстравазация лейкоцитов, ремоделирование и утолщение гематоальвеолярного барьера.

Ключевые слова: электронные сигареты, неспецифические протеиназы, ингибиторы протеолиза, воспаление.

Конфликт интересов. Конфликт интересов авторами не заявлен.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, программа «Приоритет-2030» № 075-15-2021-1323.

Этическая экспертиза. Исследование проводилось в соответствии с принципами Хельсинкской декларации и одобрено комитетом по биоэтике Федерального автономного образовательного учреждения высшего образования «Крымский федеральный университет имени В.И.Вернадского» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (протокол № 6 от 07.06.19).

© Алиев Л.Л. и соавт., 2023

Для цитирования: Алиев Л.Л., Алиев М.А., Максимова П.Е., Макалиш Т.П., Кубышкин А.В., Зяблицкая Е.Ю., Григорьянц А.В., Кариофиллидис Я., Митрушкин Д.И. Роль неспецифического протеолиза в развитии альтеративных изменений легочной ткани при использовании электронных сигарет. *Пульмонология*. 2023; 33 (3): 342–349. DOI: 10.18093/0869-0189-2023-33-3-342-349

The role of nonspecific proteolysis in the development of alterative changes in lung tissue when using electronic cigarettes

Leonid L. Aliyev, Mukhamed A. Aliyev ✉, Polina E. Maksimova, Tatiana P. Makalish, Anatoly V. Kubyshekin, Evgeniya Yu. Zhablitskaya, Armen V. Grigoryants, Yannis Karyophyllidis, Dmitry I. Mitrushkin

Institute “Medical Academy named after S.I.Georgievsky”, V.I.Vernadsky Crimean Federal University, Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation: bulv. Lenina 5/7, Simferopol, 295051, Crimea Republic, Russia

Abstract

In recent years, the number of electronic cigarettes (ES) users has been growing steadily around the world. ES heat and vaporize components of a mixture of propylene glycol, vegetable glycerin, nicotine, and flavors. Reports of severe forms of lung injury caused by the use of ES, some of which have resulted in death, urge studying the pathogenetic mechanisms of such complications. One of the mechanisms is the activation of nonspecific proteolysis accompanied by the destruction of connective tissue components of the blood-air barrier. **Aim of the study.** To study the dynamics of the proteinase-inhibitor system indicators and its role in the morphological changes of lung tissue in experimental modeling of the effects of ES. **Methods.** Experimental studies were performed in 24 white male Wistar rats weighing 160 – 180 g. ES use of was simulated by intermittent exposure

to smoke mixture vapors using a POD system connected to a two-channel compressor. **Results.** Analysis of the state of the nonspecific proteinase inhibitory system in rat broncho-alveolar lavage and blood serum and the results of morphological studies indicate activation of trypsin-like proteinases and depletion of the local antitryptic potential, leading to biochemical changes with subsequent structural changes in lung tissue. The latter are characterized by congestion, leukocyte infiltration, and stromal proliferation. In addition, exposure to nicotine-containing mixtures has been shown to affect the proteinase inhibitory system and blood serum composition, which is associated with a compensatory increase in antitrypsin activity. **Conclusion.** The results of the study indicate the activation of trypsin-like proteinases in broncho-alveolar lavage, which have a damaging effect on lung tissue, leading to disturbances in tissue hemodynamics, extravasation of leukocytes, remodeling and thickening of the blood-air barrier.

Key words: electronic cigarettes, non-specific proteinases, proteolysis inhibitors, inflammation.

Conflict of interests. The authors have no conflicts of interest to declare.

Funding. The study was financially supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation within the Priority 2030 Program No.075-15-2021-1323.

Ethical expertise. The study was conducted in accordance with the principles of the Helsinki Declaration. The study was approved by the Ethics Committee of the V.I.Vernadsky Crimean Federal University, Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (Minutes No.6 dated June 07, 19).

© Aliyev L.L. et al., 2023

For citation: Aliyev L.L., Aliyev M.A., Maksimova P.E., Makalish T.P., Kubyshev A.V., Zyablitskaya E.Yu., Grigoryants A.V., Karyophyllidis Ya., Mitrushkin D.I. The role of nonspecific proteolysis in the development of alternative changes in lung tissue when using electronic cigarettes. *Pul'monologiya*. 2023; 33 (3): 342–349 (in Russian). DOI: 10.18093/0869-0189-2023-33-3-342-349

В последние годы число людей, использующих электронные сигареты (ЭС), неуклонно растет во всем мире. По результатам эпидемиологических исследований в США потребителями ЭС являются 6,7 % взрослого населения и 11,3 % учащихся старших классов [1, 2]. В Российской Федерации (2016) постоянными потребителями ЭС являлись 3,5 % взрослых людей, в возрасте 15–24 лет – 9,7 % [3]. Высокая популярность ЭС во многом связана с меньшей токсичностьювейпов. Действие ЭС основано на нагревании и испарении компонентов смеси, содержащей пропиленгликоль, растительный глицерин, никотин и ароматизаторы. При этом никотин не является обязательным компонентом смеси. Считается, что применение ЭС менее опасно, чем традиционные виды курения [4]. Тем не менее в последние годы накоплены сведения о развитии серьезных функциональных и структурных нарушений, происходящих в организме при воздействии ЭС. Доказано, что нагревание компонентов смесей приводит к образованию ряда токсичных и мутагенных соединений, в частности, акролеина и формальдегида [5]. Кроме того, применениевейпов сопровождается активацией свободнорадикальных процессов [6].

В 2019 г. в США стали появляться свидетельства о тяжелых формах повреждения легких в результате использования ЭС, кроме того, зафиксированы летальные случаи. Всего в 46 штатах и на 1 территории США зарегистрировано 805 случаев повреждения легких, связанных с курением ЭС [7, 8]. Факт развития острого повреждения легких, вызванного воздействием ЭС, устанавливается на основании следующих 3 критериев:

- обнаружение легочных инфильтратов;
- применение ЭС в течение последних 90 дней в анамнезе;
- отсутствие других возможных причин острого повреждения легких (тяжелые формы инфекции, онкологические и ревматические заболевания) [9].

Однако патогенез повреждения легких при воздействии ЭС остается практически неизученным. Согласно современным представлениям, основу большинст-

ва форм острого повреждения легких составляют универсальные неспецифические альтеративные механизмы. Одним из таких механизмов является активация неспецифического протеолиза, сопровождающегося разрушением соединительнотканых элементов аэрогемаического барьера. Кроме того, гиперпротеолиз сопровождается каскадной активацией воспалительных медиаторов пептидной природы, повышающих проницаемость эндотелия и активирующих хемотаксис лейкоцитов, чем может быть объяснено формирование инфильтратов [10]. Следует отметить, что компоненты применяемых в ЭС смесей не являются классическими флогогенами, что позволяет предположить наличие ассоциированных механизмов инициации процесса альтерации.

Целью исследования явилось изучение динамики показателей протеиназ-ингибиторной системы, а также ее роль в развитии морфологической альтерации легочной ткани при экспериментальном моделировании воздействия ЭС.

Материалы и методы

Экспериментальные исследования, соответствующие принципам биоэтики, проведены на белых крысах-самцах ($n = 24$) линии *Wistar* массой тела 160–180 г.

Животные были разделены на 3 группы:

- 1-я ($n = 8$) – интактные животные (контрольная группа);
- 2-я ($n = 8$) – подопытные животные, подвергавшиеся воздействию паров безникотиновой курительной смеси *Armage French Pipe*, содержащей пропиленгликоль, глицерин, пищевой ароматизатор (кофе);
- 3-я ($n = 8$) – подопытные животные, подвергавшиеся воздействию паров курительной смеси *Armage French Pipe*, содержащей никотин (6 мг / мл), пропиленгликоль, глицерин, пищевой ароматизатор (кофе).

Моделирование использования ЭС проводилось посредством интервального воздействия испарений курительных смесей с использованием POD-системы

(Китай), подключенной к двухканальному компрессору *Mouse AIR PUMP M-106* (Китай) производительностью 150 л / ч в камере емкостью 29 л. Аналогичный компрессор применялся для одновременного нагнетания атмосферного воздуха в камеру. Воздействие паров ЭС осуществлялось ежедневно в течение 40 суток. Продолжительность воздействия составляла 30 мин.

Эвтаназия животных проводилась под тиопенталовым наркозом путем пересечения общей сонной артерии. Забор бронхоальвеолярного смыва осуществлялся путем 3-кратного промывания дыхательных путей раствором 0,9%-ного NaCl с применением трахеального доступа. В качестве контроля служили интактные животные 1-й группы ($n = 8$).

При проведении экспериментальных исследований соблюдались принципы и положения Руководства по уходу и использованию лабораторных животных (*United States National Institutes of Health – USNIH*) № 85-23, международных правил *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (2009) с учетом Конвенции Совета Европы о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 1986).

Определение активности компонентов протеиназной ингибиторной системы осуществлялось с применением ферментативных методов [11] на спектрофотометре *Biomat 5* (Великобритания). Трипсиноподобная активность (ТПА) определялась по скорости отщепления *N*-бензоил-L-аргинина от синтетического субстрата этилового эфира *N- α -Benzoil-L-arginine ethyl ester hydrochloride* (BAEE) (*Sigma*). Определение эластазоподобной активности (ЭПА) проводилось на основании изучения скорости гидролиза синтетического субстрата *Boc-L-alanine-4-nitrophenil ester* (Boc-Ala-ONp) (*Sigma*). Определение концентрации α_1 -ингибитора протеиназ (АТА) осуществлялось на основании торможения расщепления трипсином BAEE. Аналогично определялась активность кислотостабильных ингибиторов (КСИ) после предварительной подготовки сыворотки путем прогревания в кислой среде.

Для проведения морфологических исследований ткань легких разрезалась в горизонтальной плоскости на тканевые блоки. Материал фиксировался в 10%-ном растворе формалина, проводился через спирты возрастающей концентрации, хлороформ и заливался в парафин. Гистологические срезы толщиной 5–7 мкм окрашивались гематоксилином и эозином и исследовались при помощи светового микроскопа *Leica MD 2000* (*Leica*, Германия).

Для оценки количественных показателей состояния легочной ткани использовался сканер гистопрепаратов *Leica Aperio CS 2* (*Leica*, Германия). В полученных изображениях проводилась морфометрия соотношения стромы и суммарного просвета альвеол и воздухопроводящих путей (Σпросвет) при 8-кратном увеличении с помощью функции наложения на каждое поле зрения сетки. Результаты измерения экспортировались в *Microsoft Excel*.

Статистическая обработка полученных данных проводилась с помощью программы *Statistica 10*. Нормальность распределения признака определялась

методом Шапиро–Уилка. Поскольку данные распределялись с отличием от нормального, для выявления отличий между группами использовался непараметрический метод Манна–Уитни, а данные описательной статистики представлены в виде медианы (*Me*) и первого и последнего квартилей (*Me* (Q1; Q4)). Отличия между группами считались статистически достоверными при вероятности ошибки $p \leq 0,05$. Для выявления связи между изменениями показателей активности различных ферментов в крови и смывах из легких использовался корреляционный анализ. Для оценки степени влияния фактора курения использовался однофакторный анализ ANOVA.

Исследование одобрено комитетом по биоэтике Федерального автономного образовательного учреждения высшего образования «Крымский федеральный университет имени В.И.Вернадского» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (протокол № 6 от 07.06.19).

Результаты

Результаты исследований активности ферментов и их ингибиторов на органном и организменном уровнях представлены в табл. 1.

Моделирование длительного воздействия ЭС с парением даже безникотиновой смеси сопровождается интенсификацией процессов неспецифического протеолиза. Об этом свидетельствует повышение активности трипсиноподобных протеиназ в бронхоальвеолярном смыве у крыс, дышавших смесью без никотина, на 47,2 % ($p < 0,05$) по сравнению с показателями у интактных животных. Применение курительной смеси, содержащей в своем составе никотин, сопровождается еще более выраженным повышением уровня ТПА. Так, активность трипсиноподобных протеиназ при концентрации никотина 6 мг / мл в 3-й группе возрастает на 120,4 % ($p < 0,01$) по отношению к таковой у животных 1-й группы (контроль), что на 49,7 % ($p < 0,05$) выше показателей у крыс 2-й группы.

В то же время динамика активности эластазоподобных протеиназ в бронхоальвеолярном смыве экспериментальных животных не подвергается столь значительным изменениям. При применении безникотиновой смеси у крыс 2-й группы наблюдалось умеренное (на 37,6 %) снижение уровня ЭПА ($p < 0,05$) по отношению к контролю. Изменения ЭПА в бронхоальвеолярном смыве у животных 3-й группы статистически недостоверны.

Подобная динамика активности сериновых протеиназ в бронхоальвеолярном смыве у экспериментальных животных может свидетельствовать об активации неспецифических механизмов альтерации, способных вызвать выраженные структурные и функциональные нарушения органов дыхания. В то же время снижение активации эластазоподобных ферментов (при вдыхании смеси без никотина) или отсутствие динамики (при вдыхании смеси с никотином) косвенно свидетельствует о том, что эти изменения не связаны с развитием бактериального воспаления в респираторном тракте, поскольку ос-

Таблица 1

Показатели активности ферментов протеиназ-ингибиторной системы в бронхоальвеолярном смыве и крови при экспериментальном моделировании воздействия электронных сигарет; Me (Q1; Q4)

Table 1

Indicators of the activity of proteinase-inhibitory system enzymes in bronchoalveolar lavage and blood during experimental modeling of the effects of electronic cigarettes; Me (Q1; Q4)

Биоматериал	Исследуемый показатель	Группа		
		1-я (интактные животные)	2-я (без никотина)	3-я (никотин 6 мг / мл)
Кровь	АТА, ИЕ / мл	40,04 (30,49; 47,32)	42,76 (34,13; 49,82)	40,50 (34,34; 44,14)
	КСИ, ИЕ / мл	5,26 (3,50; 6,50)	7,48 (4,30; 8,31)	4,81 (2,64; 5,13)
	ТПА, мкМ / мл × мин	102,60 (72,30; 129,29)	92,48 (67,64; 125,77)	116,52 (92,74; 122,39)
	ЭПА мкМ / мл × мин	1,77 (1,53; 1,88)	1,81 (1,64; 2,26)	1,41 (1,33; 1,57)* **
Смывы	АТА, мИЕ / мг	233,98 (217,20; 252,01)	207,86 (176,17; 229,30)	148,69 (116,74; 179,69)*
	КСИ, мИЕ / мг	264,78 (242,40; 349,46)	185,85 (155,66; 193,86)*	271,66 (217,41; 672,38)**
	ТПА мкМ / мг × мин	10,53 (82,90; 183,83)	16,32 (15,18; 20,10)	29,25 (13,33; 35,23)*
	ЭПА мкМ / мг × мин	124,80 (82,90; 183,83)	48,63 (41,34; 52,84)*	58,74 (48,44; 71,82)*

Примечание: АТА – α-ингибитор протеиназ; КСИ – кислотостабильные ингибиторы; ТПА – трипсиноподобная активность; ЭПА – эластазоподобная активность; * – отличия от контрольной группы; ** – отличия между двумя экспериментальными группами.

Note: *, differences from the control group; **, differences between the two experimental groups.

новным источником эластазы в дыхательных путях являются нейтрофильные гранулоциты, активность которых при бактериальном воспалении закономерно возрастает. Это подтверждено результатами гистологических исследований.

Экспериментальное моделирование воздействия ЭС на органы дыхания у крыс сопровождается изменениями локального ингибиторного потенциала. Так, применение паров курительной смеси, содержащей 6 мг / мл никотина, приводит к снижению активности антитриптических ингибиторов в бронхоальвеолярном смыве на 32,4 % ($p < 0,05$) по отношению к контрольным значениям у интактных животных. В то же время воздействие безникотиновой смеси не сопровождается значимыми изменениями АТА в смывах. Практически зеркальной динамикой характеризуется изменение уровня КСИ в бронхоальвеолярных смывах у экспериментальных животных. Если на фоне экспериментального применения безникотиновой смеси изменения уровня КСИ, так же, как и АТА, были статистически недостоверными, то в группе животных, подвергшихся воздействию паров содержащей никотин смеси, уровень КСИ повысился на 41,1 % ($p < 0,05$) по отношению к контролю. Такая динамика может свидетельствовать о способности тех или иных компонентов напрямую избирательно подавлять активность антитриптических ингибиторов. В таком случае повышение уровня КСИ рассматривается в качестве локальной компенсаторной реакции, поскольку известно, что КСИ продуцируются в т. ч. легкими. Такая реакция оказывается достаточной для поддержания ингибиторного контроля над эластазоподобными протеиназами, однако она неспособна сдержать повышение ТПА. В любом случае такая картина свидетельствует об активации неспецифических механизмов биохимической альтерации, способной привести к низкоинтенсивному субклиническому воспалению и структурным изменениям легких.

Противоречивыми оказались изменения показателей неспецифического протеолиза и в сыворотке крови. Следует отметить, что экспериментальное моделирование воздействия безникотиновой смеси практически не отражается на состоянии протеиназ-ингибиторной системы крови. Динамика всех изучаемых показателей в этой группе остается статистически недостоверной. В то же время экспериментальное моделирование применения содержащей никотин смеси сопровождается умеренным (на 24,4 %) снижением уровня ЭПА ($p < 0,05$) на фоне повышения активности антитриптических ингибиторов на 34,2 % ($p < 0,05$) по отношению к контрольным значениям у крыс интактной группы. Такая динамика может объясняться развитием как системного компенсаторного ответа на локальное истощение антитриптического потенциала, так и на развитие системной гипоксии, развивающейся вследствие реализации вазотропных эффектов никотина. Полученные результаты свидетельствуют о том, что ключевым компонентом курительных смесей, оказывающим системное воздействие, является никотин.

По результатам статистической обработки показано, что при вдыхании смеси с никотином наблюдается достоверное снижение активности ЭПА в крови по сравнению с контролем и группой животных, дышавших смесью, свободной от никотина. Также у животных 3-й группы, вдыхавших 6 мг / мл никотина, в смывах наблюдалось статистически достоверное снижение активности АТА по сравнению с таковой у крыс группы контроля, повышение активности КСИ по сравнению с крысами, дышавшими смесью без никотина, повышение активности ТПА и снижение активности ЭПА в смывах по сравнению с контролем. В смывах у крыс, дышавших смесью без никотина, отмечено снижение активности КСИ и ЭПА по сравнению с таковой у животных контрольной группы. Эта динамика подтверждена данными корреляционного анализа.

По данным корреляционного анализа показано, что сильная отрицательная зависимость у животных контрольной группы между активностью ЭПА в крови и КСИ в смывах ($r = -0,9274$; $p = 0,008$) ослабевает у крыс, дышавших безникотиновой смесью ($r = -0,6731$; $p = 0,143$), а у животных 3-й группы, вдыхавших 6 мг / мл никотина, исчезает вовсе. В то же время у животных, вдыхавших никотин, возникает сильная отрицательная зависимость между активностью КСИ крови и ТПА смывов ($r = 0,9244$; $p = 0,008$), не наблюдаемая более ни в одной группе; также отмечена статистически достоверная связь между активностью ЭПА в крови и смывах ($r = -0,8123$; $p = 0,050$) у крыс, дышавших смесью без никотина ($r = -0,6471$; $p = 0,165$), и животных контрольной группы ($r = -0,2180$; $p = 0,385$).

Обнаружена сильная положительная корреляция между активностью АТА и ТПА в крови у животных контрольной группы ($r = 0,9900$; $p = 0,001$) и у крыс, дышавших смесью без никотина ($r = 0,9050$; $p = 0,002$). В группе животных, вдыхавших никотин, эта связь ослабла и потеряла достоверность. Среди ферментов в смывах статистически значимых связей не выявлено. По данным факториального анализа показано, что наиболее сильно подвержены фактору курения такие показатели, как активность КСИ в крови и АТА, ТПА и ЭПА в смывах.

Таким образом, можно сделать вывод о том, что курение как никотиновых, так и безникотиновых сигарет приводит к изменениям в протеиназ-ингибиторной системе на молекулярном уровне, в первую очередь, в очаге повреждения, т. е. в тканях легких, а затем и в крови. Данные изменения проявляются разнонаправленным изменением активности ферментов, что приводит к развитию альтерации.

Развитие биохимической альтерации на фоне экспериментального моделирования воздействия ЭС сопровождается структурными нарушениями легочной ткани (см. рисунок). Так, экспериментальное моделирование воздействия паров безникотиновой смеси вызывает выраженные застойные явления в сосудах легких. Структурные изменения межалвеолярных перегородок характеризуются их утолщением, инфильтрацией лимфоцитами и эозинофилами. Часто

скопления эозинофилов встречаются в перибронхиальной зоне, в которой также видны гиперплазированные лимфоидные фолликулы. Скопления мононуклеаров встречаются на всем протяжении срезов, полученных из образцов легочной ткани, и не только в непосредственной близости от бронхов. В меньшей степени выражены скопления сидерофагов. Легочная паренхима характеризуется уменьшением «воздушности», уплощением альвеол и редукцией межалвеолярных перегородок. Характерна мозаичность поражения – встречаются немногочисленные области эмфизематозно расширенных альвеол. В бронхиолах отмечена десквамация эпителия, просвет их в большинстве случаев свободен, содержит незначительное количество серозной жидкости.

При моделировании воздействия содержащей никотин смеси также наблюдаются умеренно выраженные застойные явления в сосудах легких (полнокровие микроциркуляторного русла), небольшое количество серозной жидкости в альвеолах и бронхиолах, экстравазальные скопления клеток крови в межалвеолярных перегородках и просвете альвеол. Отмечена инфильтрация межалвеолярных перегородок мононуклеарными клетками и сидерофагами. Характерно расширение альвеол с образованием мешотчатых эмфиземоподобных пространств, истончение и разрыв (в т. ч. в виде шпор) межалвеолярных перегородок. В единичных бронхиолах наблюдаются десквамированный эпителий и выраженная перибронхиальная инфильтрация лимфоцитами и эозинофилами, а также умеренно выраженный фиброз.

Как видно, на срезах большой площади после фиксации и проводки сложно отдельно подсчитать легочную паренхиму, представленную альвеолоцитами 1-го и 2-го типов, а также эпителием бронхов. В связи с этим приемлемо и значимо производить расчет соотношения площади среза, занимаемого:

- клетками, представленными преимущественно стромой;
- просветом альвеол и воздухопроводящих путей.

Показателем площади паренхимы на таких срезах можно пренебречь. В результате проведения морфометрических исследований (табл. 2) установлено, что статистически достоверно повышается площадь, за-

Таблица 2
Соотношение стромы и суммарного просвета альвеол и воздухопроводящих путей в ткани легкого при экспериментальном моделировании воздействия электронных сигарет; %

Table 2
The ratio of stroma and total lumen of alveoli and airways in lung tissue in experimental modeling of the effects of electronic cigarettes; %

Показатель	1-я группа (интактные животные)		2-я группа (без никотина)		3-я группа (никотин 6 мг / мл)	
	stroma + эпителий	Σпросвет	stroma + эпителий	Σпросвет	stroma + эпителий	Σпросвет
Среднее значение	42,05	59,10	45,90	51,25	51,55*	55,20
Медиана	40,50	57,50	47,00	52,00	51,00	54,00
Стандартная ошибка среднего	1,87	2,63	1,43	2,64	2,64	2,25

Примечание: * – достоверное отличие от значений контрольной группы.

Note: *, significant difference from the control group.

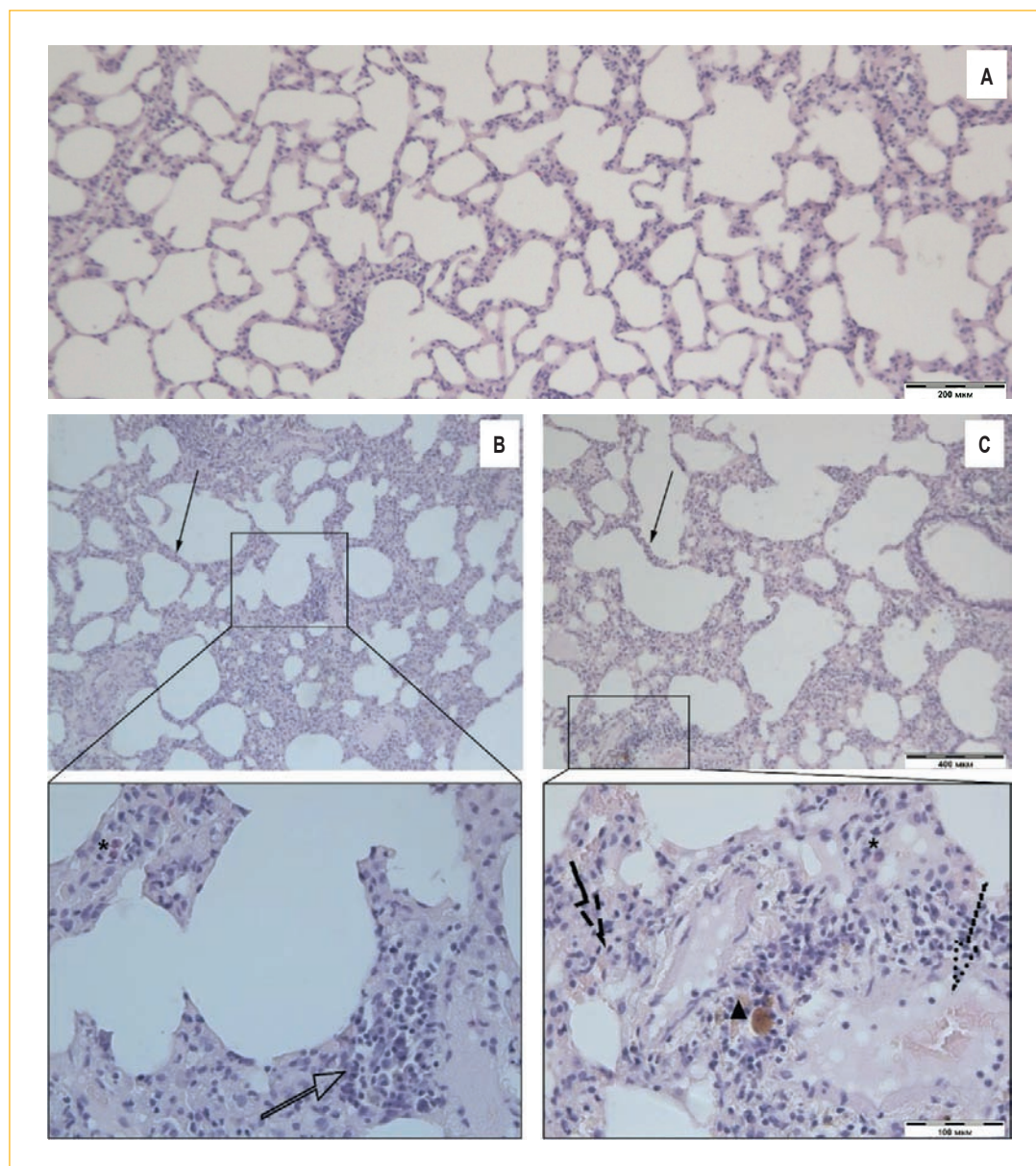


Рисунок. Результаты гистологических исследований легких у крыс, подвергшихся воздействию электронных сигарет (парафиновые срезы, окраска гематоксилином и эозином: А – контроль, $\times 200$; В – опыт без никотина, $\times 100$; С – опыт с никотином, $\times 100$. В рамках приведен фрагмент среза с увеличением $\times 400$

Примечание: $\longrightarrow$ – утолщение межальвеолярных перегородок; $\longrightarrow$ – периваскулярная лимфоидная инфильтрация; $---\rightarrow$ – полнокровие капилляров; $---\rightarrow$ – стаз эритроцитов; * – эозинофилы; $\blacktriangle$ – сидерофар.

Figure. The results of histological studies in the lungs of rats exposed to electronic cigarettes (paraffin sections, staining with hematoxylin and eosin: A, control, $\times 200$; B, experience without nicotine, $\times 100$; C, experience with nicotine, $\times 100$. A fragment of a slice with $\times 400$ is shown in the frame
Note: $\longrightarrow$ – thickening of the interalveolar septa; $\longrightarrow$ – perivascular lymphoid infiltration; $---\rightarrow$ – congestion of capillaries; $---\rightarrow$ – erythrocyte stasis; * – eosinophils; $\blacktriangle$ – siderophagus.

нимаемая стромой в группе крыс, подвергшихся экспозиции парами никотина, в отличие от аналогичного показателя у крыс контрольной группы ($p = 0,013$) (см. рисунок). При сравнительном анализе показателей суммарной площади просвета и стромы легких между животными остальных исследуемых групп показано отсутствие статистически достоверных различий.

По данным морфометрии продемонстрировано, что суммарная площадь стромы в гистологических срезах легких, полученных от белых крыс, находившихся в условиях экспозиции парами никотина, существенно выше, чем у животных контрольной группы. Это позволяет предположить, что длитель-

ное применение содержащих никотин смесей может быть причиной развития интерстициальных заболеваний легких, при которых наблюдается разрастание соединительной ткани [12].

Обсуждение

По результатам большинства исследований вейпинга проверяется нулевая гипотеза о том, что ЭС так же токсичны, как и сигареты. Предполагается, что эти продукты потенциально могут нанести эквивалентный вред в отношении относительного риска, токсичности для целевых тканей и механизма, од-

нако по данным исследования с использованием установленных конечных точек курения горячего табака выявлено меньше доказательств воздействия на здоровье, связанного с вейпингом, по сравнению с обычными сигаретами. В то время как аэрозоли ЭС содержат меньше токсичных химических веществ, чем дым, компоненты электронных жидкостей и функции устройств гораздо более разнообразны и настраиваемы, чем сигареты. Это еще более усложняет поведение потребителей, которое диктует частоту воздействия, массу аэрозоля, объем вдыхания и осаждение частиц. Важно отметить, что по результатам исследований по сравнению воздействия ЭС на людей, не употребляющих табак, представлены неоднозначные результаты: продемонстрированы и неблагоприятные молекулярные и физиологические изменения при вейпинге, и отсутствие изменений риска для здоровья. Ярким примером последствий для здоровья, уникальных для вейпинга, была вспышка в 2018–2019 гг. травмы легких, связанной с использованием ЭС и вейпинга (*E-cigarette and Vaping use-Associated Lung Injury – EVALI*), при этом большинство случаев были связаны с присутствием ацетата витамина Е или других добавок в электронных жидкостях [13–16].

Разнообразие результатов является подтверждением актуальности темы и необходимости дальнейших исследований влияния ЭС на органы и системы как на молекулярном, так и микроскопическом уровне.

Заключение

Таким образом, результаты анализа динамики показателей протеиназ-ингибиторной системы при экспериментальном моделировании воздействия паров ЭС свидетельствуют об активации трипсиноподобных протеиназ в бронхоальвеолярном смыве, оказывающих повреждающее воздействие на ткань легких, вследствие чего развиваются нарушения тканевой гемодинамики, экстравазация лейкоцитов, ремоделирование и утолщение гематоальвеолярного барьера. Локальный гиперпротеолиз сопровождается истощением антитриптического потенциала и компенсаторной активацией локально синтезируемых кислотостабильных ингибиторов. При этом степень проявлений биохимической альтерации зависит от состава курительной смеси и более выражена при применении содержащих никотин смесей. Изменения протеиназ-ингибиторного баланса на системном уровне возникают при применении содержащих никотин смесей и характеризуются компенсаторной активацией ингибиторного потенциала.

Литература / References

1. Kasza K.A., Ambrose B.K., Conway K.P. et al. Tobacco-product use by adults and youths in the United States in 2013 and 2014. *N. Engl. J. Med.* 2017; 376 (4): 342–353. DOI: 10.1056/NEJMsa1607538.
2. Gentzke A.S., Wang T.W., Jamal A. et al. Tobacco product use among middle and high school students – United States, 2020. *MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.* 2020; 69 (50): 1881–1888. DOI: 10.15585/mmwr.mm6950a1.
3. World Health Organization. WHO report on the global tobacco epidemic 2021: addressing new and emerging products. Geneva; 2021. Available at: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240032095>
4. Cao D.J., Aldy K., Hsu S. et al. Review of health consequences of electronic cigarettes and the outbreak of electronic cigarette, or vaping, product use-associated lung injury. *J. Med. Toxicol.* 2020; 16 (3): 295–310. DOI: 10.1007/s13181-020-00772-w.
5. Seitz C.M., Kabir Z. Burn injuries caused by e-cigarette explosions: a systematic review of published cases. *Tob. Prev. Cessat.* 2018; 4: 32. DOI: 10.18332/tpc/94664.
6. Wang L., Wang Y., Chen J. et al. A review of toxicity mechanism studies of electronic cigarettes on respiratory system. *Int. J. Mol. Sci.* 2022; 23 (9): 5030. DOI: 10.3390/ijms23095030.
7. Schier J.G., Meiman J.G., Layden J. et al. Severe pulmonary disease associated with electronic-cigarette-product use – interim guidance. *MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.* 2019; 68 (36): 787–790. DOI: 10.15585/mmwr.mm6836e2.
8. Perrine C.G., Pickens C.M., Boehmer T.K. et al. Characteristics of a multistate outbreak of lung injury associated with E-cigarette use, or vaping – United States, 2019. *MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.* 2019; 68 (39): 860–864. DOI: 10.15585/mmwr.mm6839e1.
9. Cherian S.V., Kumar A., Estrada-Y-Martin R.M. E-cigarette or vaping product-associated lung injury: a review. *Am. J. Med.* 2020; 133 (6): 657–663. DOI: 10.1016/j.amjmed.2020.02.004.
10. Halpin D.M.G. Precision medicine in chronic obstructive pulmonary disease. *Chin. Med. J. (Engl.)*. 2022; 135 (10): 1156–1162. DOI: 10.1097/CM9.0000000000002042.
11. Hachem A., Gartenhaus R.B. Oncogenes as molecular targets in lymphoma. *Blood.* 2005; 106 (6): 1911–1923. DOI: 10.1182/blood-2004-12-4621.
12. Meyer N.J., Gattinoni L., Calfee C.S. Acute respiratory distress syndrome. *Lancet.* 2021; 398 (10300): 622–637. DOI: 10.1016/S0140-6736(21)00439-6.
13. Corriden R., Moshensky A., Bojanowski C.M. et al. E-cigarette use increases susceptibility to bacterial infection by impairment of human neutrophil chemotaxis, phagocytosis, and NET formation. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2019; 318 (1): C205–214. DOI: 10.1152/ajpcell.00045.2019.
14. Wills T.A., Pagano I., Williams R.J., Tam E.K. E-cigarette use and respiratory disorder in an adult sample. *Drug Alcohol Depend.* 2019; 194: 363–370. DOI: 10.1016/j.drugalcdep.2018.10.004.
15. Osei A.D., Mirbolouk M., Orimoloye O.A. et al. Association between e-cigarette use and cardiovascular disease among never and current combustible-cigarette smokers. *Am. J. Med.* 2019; 132 (8): 949–954. e2. DOI: 10.1016/j.amjmed.2019.02.016.
16. Polosa R., Cibella F., Caponnetto P. et al. Health impact of E-cigarettes: a prospective 3.5-year study of regular daily users who have never smoked. *Sci. Rep.* 2017; 7 (1): 13825. DOI: 10.1038/s41598-017-14043-2.

Поступила: 25.07.22

Принята к печати: 20.04.23

Received: July 25, 2022

Accepted for publication: April 20, 2023

Информация об авторах / Authors Information

Алиев Леонид Леонидович — к. м. н., доцент кафедры общей и клинической патофизиологии Института «Медицинская академия имени С.И.Георгиевского» Крымского федерального автономного образовательного учреждения высшего образования «Крымский федеральный университет имени В.И.Вернадского» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации; тел.: (3652) 554-940; e-mail: all.spitfire@mail.ru (ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-9401-4398>)

Leonid L. Aliyev, Candidate of Medicine, Associate Professor, Department of General and Clinical Pathophysiology, Institute “Medical Academy named after S.I.Georgievsky”, V.I.Vernadsky Crimean Federal University, Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation; tel.: (3652) 554-940; e-mail: all.spitfire@mail.ru (ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-9401-4398>)

Алиев Мухамед Ахметович — студент VI курса Института «Медицинская академия имени С.И.Георгиевского» Крымского федерального автономного образовательного учреждения высшего образования «Крымский федеральный университет имени В.И.Вернадского» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации; тел.: (3652) 554-940; e-mail: aliev.muhammed17@gmail.com (ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7096-9587>)

Mukhamed A. Aliyev, 6th year student, Institute “Medical Academy named after S.I.Georgievsky”, V.I.Vernadsky Crimean Federal University, Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation; tel.: (3652) 554-940; e-mail: aliev.muhammed17@gmail.com (ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7096-9587>)

Максимова Полина Евгеньевна — студентка VI курса Института «Медицинская академия имени С.И.Георгиевского» Крымского федерального автономного образовательного учреждения высшего образования «Крымский федеральный университет имени В.И.Вернадского» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации; тел.: (3652) 554-940; e-mail: pmaksq@mail.ru (ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5920-8664>)

Polina E. Maximova, 6th year student, Institute “Medical Academy named after S.I.Georgievsky”, V.I.Vernadsky Crimean Federal University, Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation; tel.: (3652) 554-940; e-mail: pmaksq@mail.ru (ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5920-8664>)

Макашиш Татьяна Павловна — к. б. н., ведущий научный сотрудник Центральной научно-исследовательской лаборатории Института «Медицинская академия имени С.И.Георгиевского» Крымского федерального автономного образовательного учреждения высшего образования «Крымский федеральный университет имени В.И.Вернадского» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации; тел.: (3652) 554-896; e-mail: gemini_m@list.ru (ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1884-2620>)

Tatiana P. Makalish, Candidate of Biology, Leading Researcher, Central Research Laboratory, Institute “Medical Academy named after S.I.Georgievsky”, V.I.Vernadsky Crimean Federal University, Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation; tel.: (3652) 554-896; e-mail: gemini_m@list.ru (ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1884-2620>)

Кубышкин Анатолий Владимирович — д. м. н., профессор кафедры общей и клинической патофизиологии Института «Медицинская академия имени С.И.Георгиевского» Крымского федерального автономного образовательного учреждения высшего образования «Крымский федеральный университет имени В.И.Вернадского» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации; тел.: (3652) 554-968; e-mail: kubyshkin_av@mail.ru (ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9400-1826>)

Anatoly V. Kubyshevskiy, Doctor of Medicine, Professor, Department of General and Clinical Pathophysiology, Institute “Medical Academy named after S.I.Georgievsky”, V.I.Vernadsky Crimean Federal University, Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation; tel.: (3652) 554-968; e-mail: kubyshkin_av@mail.ru (ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9400-1826>)

Зяблицкая Евгения Юрьевна — д. м. н., ведущий научный сотрудник, заведующая Центральной научно-исследовательской лабораторией Института «Медицинская академия имени С.И.Георгиевского» Крымского федерального автономного образовательного учреждения высшего образования «Крымский федеральный университет имени В.И.Вернадского» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации; тел.: (3652) 554-896; e-mail: evgu79@mail.ru (ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5920-8664>)

Evgeniya Yu. Zyblytskaya, Doctor of Medicine, Leading Researcher, Head of the Central Research Laboratory, Institute “Medical Academy named after S.I.Georgievsky”, V.I.Vernadsky Crimean Federal University, Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation; tel.: (3652) 554-896; e-mail: evgu79@mail.ru (ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5920-8664>)

Григорьянц Армен Владимирович — к. м. н., доцент кафедры патологической анатомии с секционным курсом Института «Медицинская академия имени С.И.Георгиевского» Крымского федерального автономного образовательного учреждения высшего образования «Крымский федеральный университет имени В.И.Вернадского» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации; тел.: (3652) 554-707; e-mail: arame@yandex.ru

Armen V. Grigoryants, Candidate of Medicine, Associate Professor, Department of Pathological Anatomy with a sectional course, Institute “Medical Academy named after S.I.Georgievsky”, V.I.Vernadsky Crimean Federal University, Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation; tel.: (3652) 554-707; e-mail: arame@yandex.ru

Кариофиллидис Яннис — лаборант Центральной научно-исследовательской лаборатории Института «Медицинская академия имени С.И.Георгиевского» Крымского федерального автономного образовательного учреждения высшего образования «Крымский федеральный университет имени В.И.Вернадского» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации; тел.: (3652) 554-896; e-mail: jianis.doc@mail.ru

Yannis Karyophyllidis, Laboratory Assistant, Central Research Laboratory, Institute “Medical Academy named after S.I.Georgievsky”, V.I.Vernadsky Crimean Federal University, Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation; tel.: (3652) 554-896; e-mail: jianis.doc@mail.ru

Митрушкин Дмитрий Игоревич — к. м. н., ассистент кафедры внутренней медицины № 1 Института «Медицинская академия имени С.И.Георгиевского» Крымского федерального автономного образовательного учреждения высшего образования «Крымский федеральный университет имени В.И.Вернадского» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации; тел.: (3652) 554-930; e-mail: dr.dimoshka2003@mail.ru (ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8794-6928>)

Dmitry I. Mitrushkin, Candidate of Medicine, Assistant, Department of Internal Medicine No.1, Institute “Medical Academy named after S.I.Georgievsky”, V.I.Vernadsky Crimean Federal University, Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation; tel.: (3652) 554-930; e-mail: dr.dimoshka2003@mail.ru (ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8794-6928>)

Участие авторов

Алиев Л.Л. — концепция и дизайн исследования

Алиев М.А. — сбор и обработка материала, проведение экспериментального этапа исследования

Максимова П.Е. — написание текста, проведение экспериментального этапа исследования

Макашиш Т.П. — статистическая обработка

Кубышкин А.В. — редактирование текста

Зяблицкая Е.Ю. — редактирование текста

Григорьянц А.В. — морфометрия

Кариофиллидис Я. — проведение экспериментального этапа исследования

Митрушкин Д.И. — написание текста.

Все авторы внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации, несут ответственность за целостность всех частей статьи.

Authors Contribution

Aliev L.L. — concept and design of the study

Aliev M.A. — collection and processing of the material, conducting the experimental stage of the study

Maksimova P.E. — writing the text, conducting the experimental stage of the study

Makalish T.P. — statistical processing

Kubyshevskiy A.V. — text editing

Zyblytskaya E.Yu. — text editing

Grigoryants A.V. — morphometry

Karyophyllidis Ya. — conducting the experimental stage of the study

Mitrushkin D.I. — writing the text

All authors have made a significant contribution to the search, analysis, preparation of the article, read and approved the final version before publication, and accepted responsibility for the integrity of all parts of the article.