

Ocena potencjału nowych produktów tytoniowych o zmodyfikowanym ryzyku w zakresie redukcji ryzyka rozwoju raka płuca

Julia Hoeng, Serge Maeder, Patrick Vanscheeuwijck, Manuel C. Peitsch

PMI R&D, Philip Morris Products S.A

STRESZCZENIE

Palenie jest główną przyczyną raka płuca. Ryzyko rozwoju raka płuca wzrasta wraz z liczbą wypalonych papierosów i czasem trwania palenia, natomiast maleje z chwilą zaprzestania palenia. Opracowanie potencjalnych produktów tytoniowych o zmodyfikowanym ryzyku (cMRTP, *candidate modified risk tobacco products*) ma na celu zapewnienie palaczom, którzy nie zrezygnują z palenia, alternatywnych w stosunku do papierosów rozwiązań, które powodowałyby mniejsze ryzyko wystąpienia szkód zdrowotnych i zapadnięcia na choroby tytoniozależne. Konieczna jest ocena potencjału cMRTP w zakresie redukcji ryzyka, w tym potencjału do zmniejszenia ryzyka zachorowania na raka płuca. Dokonanie oceny cMRTP pod kątem potencjału redukcji ryzyka zachorowania na raka płuca jest utrudnione przez: (i) brak klinicznych markerów ryzyka, które mogą wskazywać na przyszły rozwój raka płuca, (ii) późne rozpoznanie raka płuca (dekady palenia) oraz (iii) powolną redukcję podwyższonego ryzyka z chwilą rzucenia palenia i *a fortiori* z chwilą przejścia na stosowanie cMRTP. Dlatego jest prawdopodobne, że tylko wieloletnie badania epidemiologiczne zapewnią definitywne odpowiedzi na to pytanie i pozwolą najpierw zweryfikować, czy cMRTP redukuje ryzyko raka płuca, a jeśli tak, to również określić ilościowo redukcję ryzyka raka płuca związaną z cMRTP. Aby to było możliwe, produkty cMRTP musiałyby być dostępne na rynku i duża liczba obecnych palaczy musiałaby stosować wyłącznie cMRTP. W tym miejscu proponujemy, aby podejście oparte na tym mechanizmie stanowiło mocną podstawę, by pokazać jeszcze w fazie przed wprowadzeniem produktu na rynek, że prawdopodobnie przejście na cMRTP znacząco zredukuje ryzyko raka płuca. Podejście to opiera się na przyczynowym łańcuchu zdarzeń, który prowadzi od palenia do choroby, i stanowi przyczynek zarówno do nieklinicznych, jak i klinicznych badań, oraz jest zgodne z zasadami toksykologii systemów. Omawiamy także kilka ważnych wyzwań będących nieodłączną częścią oceny cMRTP, jak również kluczowe aspekty dotyczące stosowania tych produktów.

Słowa kluczowe: potencjalne produkty tytoniowe o zmodyfikowanym ryzyku, ocena niekliniczna i kliniczna, rak płuca, uszkodzenia DNA, stan zapalny

Adres do korespondencji:

Manuel C. Peitsch

Manuel.Peitsch@pmi.com

Julia Hoeng

Julia.Hoeng@pmi.com

Serge Maeder

Serge.Maeder@pmi.com

Patrick Vanscheeuwijck

Patrick.Vanscheeuwijck@pmi.com

PMI R&D, Philip Morris Products S.A., Quai

Jeanrenaud 5, 2000 Neuchatel, Szwajcaria

Tłumaczenie z:

Internal and Emergency Medicine

2019; 14: 821-34. <https://doi.org/10.1007/s11739-019-02045-z>

Copyright © by author

Copyright © for translation by

Medical Education. All rights reserved.

WSTĘP

Palenie papierosów jest jedną z głównych, możliwych do uniknięcia przyczyn zachorowań i zgonów; powoduje poważne choroby, takie jak: choroby sercowo-naczyniowe (CVD, *cardiovascular disease*), przewlekłą obturacyjną chorobę płuc (POChP) oraz raka płuca. Ogromną większość chorób związanych z paleniem powodują zawarte w dymie papierosowym substancje toksyczne¹, które wydzielają się głównie podczas spalania tytoniu². Naczelny Lekarz Stanów Zjednoczonych stwierdził, że „obciążenie zgonami i chorobami wywołanymi korzystaniem z tytoniu w Stanach Zjednoczonych jest w ogromnej mierze spowodowane przez papierosy i inne produkty tytoniowe do palenia” [1]. Nikotyna, chociaż jest groźna i wywołuje uzależnienie, stanowi ważny czynnik, dla którego ludzie palą, ale nie jest główną przyczyną chorób [2].

Od wielu dekad starania mające na celu redukcję szkód powodowanych przez palenie są ukierunkowane na zapobieganie rozpoczynaniu palenia i promowanie jego rzucenia [3, 4]. Niedawno opracowana strategia *tobacco harm reduction* (THR) prezentuje trzecie, uzupełniające podejście, które może pomóc zredukować niekorzystne efekty palenia [5]. Nowoczesna strategia THR opiera się na przejściu na mniej szkodliwe produkty, które emitują znacznie niższe poziomy substancji toksycznych, jednocześnie dostarczając nikotynę w ilościach porównywalnych z papierosami [2, 6]. Jak zauważył McNeil [7]: „Biorąc pod uwagę, że nikotyna sama w sobie nie jest bardzo niebezpiecznym środkiem, zachęcanie palaczy do uzyskiwania tej substancji ze źródeł, które nie wiążą się z procesem spalania tytoniu, może zmniejszyć wskaźnik zachorowań i zgonów bez konieczności walki z uzależnieniem od nikotyny”. To nowe podejście jest uzupełnieniem rozwiązań zmierzających do zmniejszenia rozpowszechnienia palenia i ma na celu zapewnienie palaczom, którzy nie rzucą palenia, nowych produktów tytoniowych lub zawierających nikotynę, ale znacząco mniej toksycznych niż papierosy. Amerykańska ustawa o zapobieganiu paleniu i kontroli używania tytoniu w rodzinie (FSPTCA) uwzględnia koncepcję THR oraz definiuje produkt tytoniowy o zmodyfikowanym ryzyku (MRTP, *modified risk tobacco product*) jako każdy wyrób tytoniowy, który jest sprzedawany lub dystrybuowany do użytku w celu zmniejszenia szkód zdrowotnych lub ryzyka wystąpienia chorób tytoniozależnych, związanych ze sprzedawanymi komercyjnie konwencjonalnymi produktami tytoniowymi [8].

Wyroby cMRTP (*candidate modified risk tobacco products*) to produkty opracowane tak, aby uniknąć spalania tytoniu i tym

samym znacząco zmniejszyć emisję substancji toksycznych, a jednocześnie móc dostarczyć dostateczną ilość nikotyny, gwarantującą satysfakcję sensoryczną, oraz umożliwić zachowanie rytuału zbliżonego do tego charakterystycznego dla papierosów. cMRTP, które dostarczają aerozol zawierający nikotynę, bazują głównie na dwóch technologiach. Pierwsza to papierosy elektroniczne (e-papierosy) generujące aerozol z aromatyzowanego płynu (e-liquid) za pomocą elementu grzewczego składającego się z grzałki i podajników płynu. Ogólnie rzecz biorąc, e-liquid to mieszanina takich składników, jak: gliceryna roślinna (VG, *vegetable glycerin*), glikol propylenowy (PG, *propylene glycol*), woda, nikotyna i substancje smakowe. Druga to urządzenia do podgrzewania tytoniu, które podgrzewają substrat tytoniowy w temperaturach znacznie poniżej tej potrzebnej do spalania, wykorzystując one albo źródło ciepła na bazie węgla, albo elektronicznie sterowany element podgrzewający. Prowadzi to do wytworzenia aerozolu składającego się przede wszystkim z wody, VG, nikotyny i substancji smakowych zawartych w substracie tytoniowym. Każda z tych technologii dostarcza różne ilości nikotyny, jak również niskie ilości innych substancji toksycznych, co wynika z ograniczonej degradacji cieplnej podgrzewanego substratu. Dlatego stosowanie produktów MRTP nie będzie pozbawione ryzyka.

Produkt cMRTP może być autoryzowany przez amerykańską Agencję ds. Żywności i Leków (FDA, Food and Drug Administration) jako MRTP zgodnie z przepisami ustawy FSPTCA, jeśli produkt rzeczywiście będzie znacząco (Część A) redukował szkody zdrowotne oraz ryzyko chorób tytoniozależnych u poszczególnych użytkowników tytoniu oraz będzie (Część B) wpływał korzystnie na zdrowie populacji, zarówno użytkowników produktów tytoniowych, jak i osoby, które obecnie nie używają wyrobów tytoniowych [9]. To oznacza, że produkt cMRTP może się przyczynić do redukcji szkód zdrowotnych w skali populacji, jeśli będzie niósł za sobą znacznie niższe ryzyko niż papierosy dla poszczególnych użytkowników tytoniu oraz znaczna liczba obecnych dorosłych palaczy będzie chętna do przejścia na ten produkt. Z uwagi na to, że produkty MRTP nie są pozbawione ryzyka, oznacza to także, iż nie powinny one przyciągać osób, które obecnie nie używają wyrobów tytoniowych (tj. tych, które nigdy nie paliły, lub byłych palaczy) oraz powinien być używany przez obecnych palaczy zamiast papierosów, a nie dodatkowo – oprócz nich [6].

Głównym celem pracy jest opisanie możliwego podejścia do oceny ryzyka raka płuca, które spełnia wymogi Części A procedury wspomnianej powyżej. Kluczowe aspekty dotyczące Części B

¹ Ogólny termin obejmujący szkodliwe i potencjalnie szkodliwe składniki, wolne rodniki i nanocząsteczki na bazie węgla.

² Podczas gdy większość substancji toksycznych wydzielają się w procesach spalania, specyficzne dla tytoniu nitrozoaminy (TSNA, *tobacco-specific nitrosamines*) są uwalniane z tytoniu.

zostały podkreślone w ustępie *Postępowanie w przypadku używania produktu*.

Jak już opisano, istnieje szeroka i zmieniająca się gama produktów cMRTP o różnych poziomach emisji i w konsekwencji różnym ryzyku wywołania choroby nowotworowej [10]. Dlatego ważne jest, aby ocenić każdy produkt cMRTP pod względem jego potencjału redukcji szkód i ryzyka choroby, co zostało omówione w ustępie *Wyzwania*. Jednak ocena taka powinna być przeprowadzona z uwzględnieniem danych dotyczących epidemiologii palenia i rzucania palenia. W skrócie – skuteczne produkty cMRTP muszą charakteryzować się profilem ryzyka, które (i) jest znacząco niższe niż to powodowane przez palenie papierosów oraz (ii) zbliża palacza do rzucenia palenia, co stanowi najlepszą możliwą opcję dla palaczy [6].

OD WYZWAŃ DO POTENCJALNEGO PODEJŚCIA DO OCENY RYZYKA ZACHOROWANIA NA RAKA PŁUCA

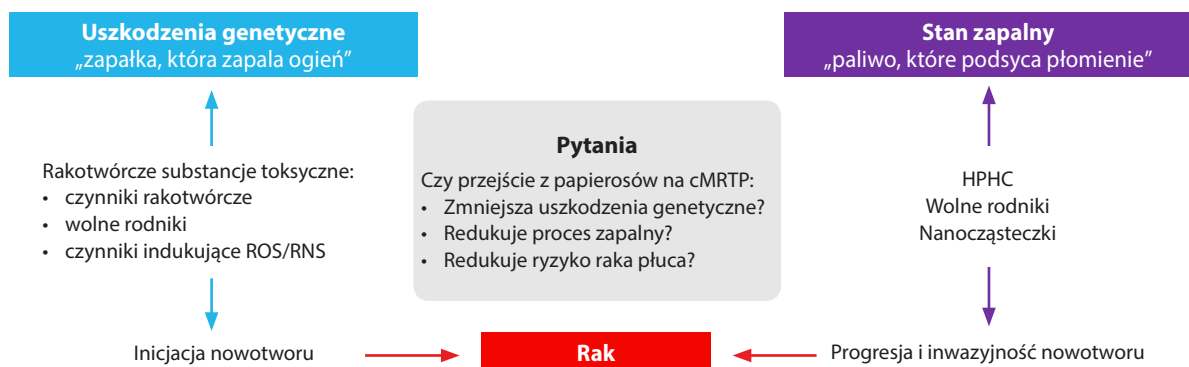
Palenie jest główną przyczyną raka płuca i ryzyko to wzrasta wraz z liczbą wypalonych papierosów oraz czasem trwania palenia [3, 11]. Wiadomo również, że ryzyko raka płuca zaczyna maleć z chwilą zaprzestania palenia [12, 13] i zmniejsza się powoli wraz z upływem czasu (ok. 50% redukcji podwyższonego ryzyka 10 lat po rzuceniu palenia) [14]. Ten spadek ryzyka zachorowania na raka płuca z chwilą zaprzestania palenia wynika z przerwy w ekspozycji na substancje toksyczne zawarte w dymie papierosowym. Dokonanie oceny cMRTP pod kątem potencjału redukcji ryzyka zachorowania na raka płuca przed wprowadzeniem lub wkrótce po wprowadzeniu produktu na rynek jest utrudnione ze względu

na: (i) brak klinicznych predykcyjnych markerów ryzyka, pozwalających przewidywać przyszły rozwój raka płuca, (ii) późne występowanie objawów raka płuca (dekady palenia) oraz (iii) powolną redukcję podwyższonego ryzyka z chwilą rzucenia palenia i *a fortiori* z chwilą przejścia na cMRTP. Dlatego jest prawdopodobne, że tylko wieloletnie badania epidemiologiczne dadzą definitywne odpowiedzi na to kluczowe pytanie i pozwolą (a) zweryfikować, czy cMRTP redukuje ryzyko raka płuca, oraz (b), jeśli tak – określić ilościowo redukcję podwyższonego ryzyka raka płuca związaną z przejściem na cMRTP. Aby to było możliwe, produkty cMRTP musiałyby być dostępne na rynku i wykorzystywane jako jedyne wyroby tytoniowe przez dużą liczbę obecnych palaczy. W tym kontekście proponujemy, aby podejście oparte na tym mechanizmie stanowiło mocną podstawę, by pokazać jeszcze przed wprowadzeniem produktu na rynek, że przejście na cMRTP może znacząco zredukować u palacza ryzyko raka płuca. Podejście to opiera się na uprzednio opisanym przyczynowym łańcuchu zdarzeń, który prowadzi od palenia papierosów do rozwoju choroby [6] i opiera się na zasadach toksykologii systemów (ryc. 1) [15].

Rak płuca związany z paleniem papierosów jest indukowany wskutek chronicznego narażenia na rakotwórcze substancje toksyczne zawarte w dymie tytoniowym. Te substancje zapoczątkowują kluczowe procesy prowadzące do rozwoju nowotworu. Rakotwórcze substancje toksyczne zawarte w dymie papierosowym, takie jak: TSNA, metabolity wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (PAH, *polycyclic aromatic hydrocarbons*), wolne rodniki (w tym reaktywne formy tlenu [ROS, *reactive oxygen species*] oraz reaktywne formy azotu [RNS, *reactive nitrogen species*]), jak również różne aldehydy, powodują uszkodze-

RYCINA 1.

Podejście do raka płuca w oparciu o hipotezę Balkwill i Mantovaniego: „Jeśli uszkodzenia genetyczne są zapalką, która zapala ogień raka, to pewne rodzaje stanu zapalnego mogą stanowić paliwo, które podsyca płomienie”. Rakotwórcze substancje toksyczne obejmują czynniki rakotwórcze, wolne rodniki, jak również czynniki indukujące ROS/RNS.



cMRTP (*candidate modified risk tobacco products*) – potencjalny produkt tytoniowy o zmodyfikowanym ryzyku; HPHC (*harmful and potentially harmful constituents*) – szkodliwe i potencjalnie szkodliwe składniki.

nia genetyczne, które mogą prowadzić do utraty mechanizmów kontroli prawidłowego wzrostu i proliferacji komórek [16–18]. Substancje toksyczne w dymie papierosowym powodują także przewlekły stan zapalny [19–21], który sprzyja rozwojowi nowotworu [22, 23]. Przewlekły stan zapalny i stres oksydacyjny zostały uznane za kluczowe mechanizmy leżące u podstaw wszystkich głównych chorób związanych z paleniem (Raport Naczelnego Lekarza USA 2010, *Jak dym tytoniowy wywołuje choroby: biologiczne i behawioralne podstawy chorób związanych z paleniem*) [3].

Balkwill i Mantovani wysunęli hipotezę, że „jeśli uszkodzenia genetyczne są zapalną, która zapala ogień raka, to pewne rodzaje stanu zapalnego mogą stanowić paliwo, które podsyca płomień” [24]. Ta hipoteza jest spójna z dwoma charakterystycznymi czynnikami, „niestabilnością genomu i mutacjami” oraz „zapaleniem sprzyjającym rozwojowi nowotworu”, które prowadzą do nabycia cech charakterystycznych dla raka, zdefiniowanych przez Hanahana i Weinberga [25]. To umożliwia określenie ram do opracowania podejścia mającego na celu ocenę cMRTP pod względem ich potencjału redukcji ryzyka raka płuca. Podejście to jest oparte na trzech istotnych pytaniach, na które można odpowiedzieć, wykorzystując dane z badań nieklinicznych i klinicznych, jeszcze przed wprowadzeniem na rynek cMRTP (ryc. 1):

- Czy przejście z papierosów na cMRTP redukuje uszkodzenia genetyczne?
- Czy przejście z papierosów na cMRTP zmniejsza proces zapalny?
- Czy przejście z papierosów na cMRTP zmniejsza ryzyko raka płuca?

W oparciu o hipotezę Balkwill i Mantovani pozytywna odpowiedź na pierwsze dwa pytania powinna prowadzić do pozytywnej odpowiedzi na trzecie. Pozytywna odpowiedź na wszystkie trzy pytania wskazywałaby, że jest dość prawdopodobne, że przejście z palenia papierosów na cMRTP redukuje ryzyko raka płuca.

Ocena ryzyka zachorowania na raka płuca

Zaproponowane podejście bazuje na odpowiedzi na trzy pytania sformułowane w poprzednim ustępie w oparciu o dowody naukowe wskazujące, że aerozol cMRTP w porównaniu z dymem papierosowym ma znacząco zredukowany wpływ na dyskretnie zdarzenia przyczynowo-skutkowe, które łączą palenie z chorobą [6]. Te kroki skupiają się na szczegółowej analizie: (i) składu aerozolu cMRTP, (ii) narażenia ludzi na substancje toksyczne oraz (iii) wpływu aerozolu na mechanizmy biologiczne związane z toksycznością i rozwojem choroby w badaniach laboratoryjnych i klinicznych [6].

Pytanie 1. Czy przejście z papierosów na cMRTP redukuje uszkodzenia genetyczne?

Dym papierosowy zawiera wiele rakotwórczych substancji toksycznych, takich jak: czynniki rakotwórcze, wolne rodniki i czynniki indukujące ROS/RNS. Palenie papierosów prowadzi do absorpcji tych rakotwórczych substancji toksycznych, wiele z nich może łączyć się z DNA bezpośrednio lub po aktywacji poprzez drogi enzymatyczne [26], tworząc addukty DNA. DNA może być także zmienione w wyniku uszkodzeń oksydacyjnych indukowanych przez wolne rodniki, takie jak ROS i RNS, zawarte w dymie papierosowym lub wytworzone endogennie przez komórki narażone na składniki dymu papierosowego [27–30].

Uszkodzenia DNA aktywują złożone mechanizmy kontrolne i systemy naprawcze komórki [17]. Z uwagi na to, że ten system naprawczy nie jest pozbawiony błędów, łańcuch DNA zostaje przerywany i może dojść do substytucji nukleotydów, a nagromadzenie się zmian genetycznych powoduje w konsekwencji niestabilność genomu. W większości przypadków błędy te prowadzą do powstania dysfunkcyjnych komórek lub do zaprogramowanej śmierci komórki. Jednakże czasem może to stanowić przyczynę mutacji aktywujących w onkogenach, w genach czynników wzrostu i ich receptorów lub mutacji dezaktywujących w supresorach nowotworowych, co z kolei prowadzi do zmian w czynności komórek. Zmiany te mogą skutkować generowaniem populacji komórek nowotworowych z potencjałem do tworzenia guzów nowotworowych w środowisku tkankowym objętym przewlekłym stanem zapalnym [16, 31].

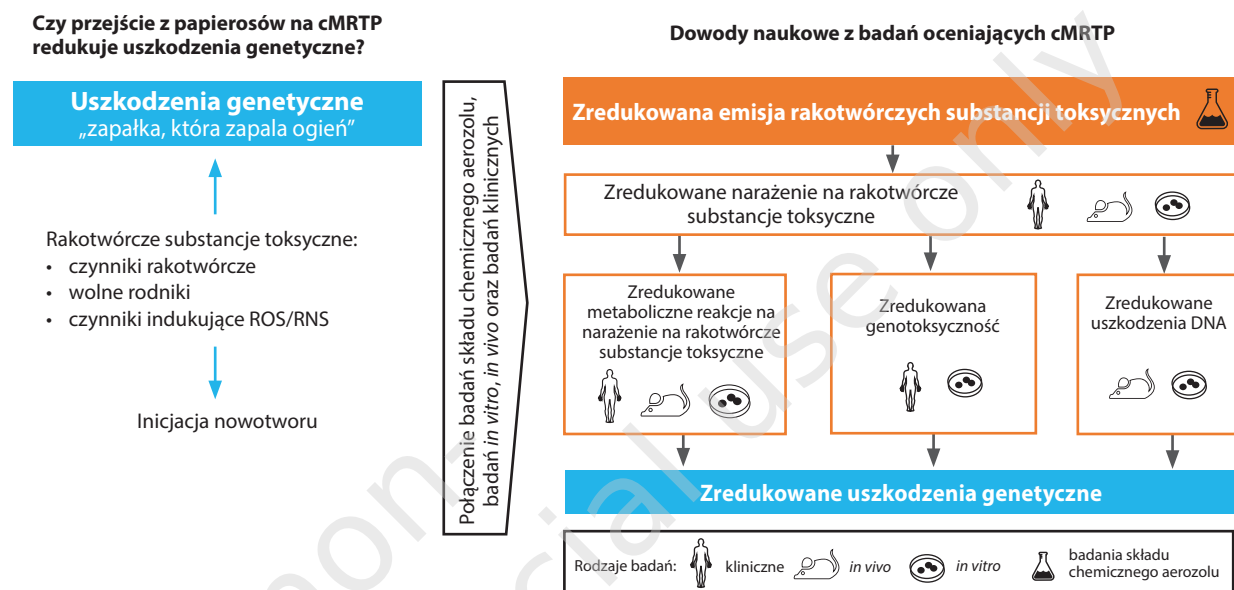
Przyczynowo-skutkowy łańcuch zdarzeń łączący palenie tytoniu z uszkodzeniami genetycznymi

Aby odpowiedzieć na pierwsze pytanie, musimy wziąć pod uwagę przyczynowo-skutkowy łańcuch zdarzeń łączący palenie z uszkodzeniami genetycznymi: „Emisja rakotwórczych substancji toksycznych” powoduje „narażenie na rakotwórcze substancje toksyczne”, co z kolei prowadzi do „metabolicznych reakcji na narażenie ze strony substancji toksycznych, genotoksyczności i uszkodzenia DNA”. Redukcja emisji rakotwórczych substancji toksycznych powinna zatem prowadzić do zmniejszenia narażenia na te substancje toksyczne, do redukcji uszkodzeń DNA i genotoksyczności oraz redukcji metabolicznych reakcji na to narażenie.

W celu zgromadzenia wyników badań dla każdego etapu w tym przyczynowo-skutkowym łańcuchu zdarzeń należy równolegle przeprowadzić badania składu chemicznego aerozolu, badania przedkliniczne oraz kliniczne (ryc. 2).

RYCINA 2.

Czy przejście z papierosów na cMRTP redukuje uszkodzenia genetyczne? Połączenie badań klinicznych, badań na modelach zwierzęcych *in vivo*, badań *in vitro* na komórkach ludzkich oraz badań chemicznych aerozolu może zapewnić niezbędne dowody, by odpowiedzieć na to pytanie. Rakotwórcze substancje toksyczne obejmują czynniki rakotwórcze, wolne rodniki, jak również czynniki indukujące ROS/RNS.



cMRTP (candidate modified risk tobacco products) – potencjalny produkt tytoniowy o zmodyfikowanym ryzyku.

1. **Emisja rakotwórczych substancji toksycznych.** Przesłanką, dla której cMRTP powoduje mniejsze uszkodzenia genetyczne niż papierosy, jest to, że cMRTP musi emitować znacząco niższe stężenia rakotwórczych substancji toksycznych niż papierosy. Emisja zarówno rakotwórczych, jak i nierakotwórczych szkodliwych i potencjalnie szkodliwych składników (HPHC, *harmful and potentially harmful constituents*) może być zmierzona w aerozolu cMRTP, a także w dymie papierosowym metodami chemii analitycznej. Stężenia HPHC [32–34] emitowane przez cMRTP mogą być tym samym porównane z tymi emitowanymi przez referencyjne papierosy, takie jak 3R4F z Uniwersytetu Kentucky. W kontekście ryzyka raka nie należy skupiać się jedynie na redukcji znanych czynników rakotwórczych zawartych w dymie papierosowym, trzeba również ustalić, czy emisja wolnych rodników (w tym ROS i RNS) jest mniejsza [35].
2. **Narażenie na rakotwórcze substancje toksyczne.** Znacząca redukcja emisji rakotwórczych substancji toksycznych powinna prowadzić do znaczącej redukcji narażenia na te substancje u uczestników badań klinicznych, którzy przerywają się z palenia papierosów na używanie cMRTP. Poziomy redukcji ekspozycji powinny być zbliżone do poziomów redukcji obserwowanych u osób badanych, które powstrzymały się od palenia przez okres trwania badania [36–39]. Bezpośrednią konsekwencją redukcji narażenia na rakotwórcze

substancje toksyczne dzięki przejściu na wyroby tytoniowe cMRTP powinna być także znacząca redukcja mutagenności w stosunku do układu moczowego (biomarkera całkowitej ekspozycji genotoksycznej) w porównaniu z ciągłym paleniem papierosów. Genotoksyczność wobec układu moczowego powinna być zbliżona do obserwowanej u osób, które odstawiły palenie [37]. Redukcja ekspozycji na rakotwórcze substancje toksyczne powinna zostać również oceniona zarówno w badaniach *in vitro* [40], jak i *in vivo* [41]. Jest to istotny krok dla kontroli jakości i interpretacji badań przedklinicznych.

3. **Reakcje metaboliczne na ekspozycję na rakotwórcze substancje toksyczne.** Znacząca redukcja narażenia na czynniki rakotwórcze (w tym PAH), wolne rodniki (w tym ROS i RNS) oraz inne oksydacyjne czynniki stresogenne (takie jak aldehydy) powinna prowadzić do istotnego obniżenia aktywności metabolizmu ksenobiotycznego i odpowiedzi na stres oksydacyjny.

Aktywacja i/lub zwiększenie ekspresji wielu enzymów metabolizmu ksenobiotycznego wynika z narażenia na substancje chemiczne, które mogą służyć jako substraty. PAH obecne w dymie, takie jak benzo[a]piren, prowadzą do zwiększonej ekspresji enzymów należących do rodzin cytochromów P450 1A (CYP1A) i 1B (CYP1B). Dlatego enzymy te są użyteczne

nymi markerami w ocenie reakcji na ekspozycję. W szczególności CYP1A2, ważny w procesach eliminacji środowiskowych substancji chemicznych, jest silnie indukowany przez PAH. Redukcja narażenia na PAH powinna zatem prowadzić do redukcji ekspresji genów *CYP1A* i *CYP1B*, ilości białek i aktywności enzymatycznej.

Stres oksydacyjny wynika z zaburzenia równowagi pomiędzy stężeniami oksydantów i antyoksydantów. Ten brak równowagi pozwala ROS i innym formom reaktywnym, zawartym w dymie papierosowym lub generowanym endogennie, na bezpośrednie oddziaływanie na komponenty komórkowe, co prowadzi do uszkodzenia lipidów, białek i DNA. Glutation (GSH) to silny i niezbędny wewnątrzkomórkowy zmiatacz wolnych rodników i czynnik detoksykacji oksydantów. Dla przykładu ROS utlenia GSH do dwusiarczku GSH (GSSH), podczas gdy pozostałe HPHC zawarte w dymie papierosowym, takie jak akroleina [42], będą łączyły się z GSH za pośrednictwem innych mechanizmów. Podsumowując, mechanizmy detoksykacji oksydantów będą prowadziły do wyczerpania puli GSH, jeśli narażenie na oksydanty będzie większe niż zdolność komórki do wyprodukowania i odzyskania utlenionego GSH. Próbuąc przeciwdziałać wyczerpaniu puli GSH, komórki narażone na dym papierosowy będą zwiększały ekspresję enzymów zaangażowanych w biosyntezę nowego GSH (GCLM i GCLC) oraz konwersję GSSH do GSH (GSR). Redukcja narażenia na wolne rodniki i inne oksydacyjne czynniki stresogenne powinna zatem prowadzić do zmniejszenia ubytku GSH i równoległej redukcji ekspresji genów odpowiedzi na stres oksydacyjny, w tym tych zaangażowanych w podtrzymanie puli GSH.

W ramach badań klinicznych i badań *in vivo* możliwa jest ocena wpływu zaprzestania przez palacza palenia papierosów i rozpoczęcia stosowania cMRTP na odpowiedź na ekspozycję poprzez pomiar odpowiednich biomarkerów. Na przykład możliwy jest pomiar aktywności enzymu CYP1A2 w osoczu, która powinna być zredukowana w wyniku przejścia z palenia papierosów na stosowanie cMRTP w podobnym stopniu co w wyniku abstynencji od palenia [37]. Podobnie narażenie na dym papierosowy powinno indukować ekspresję zarówno genów, jak i białek wątrobowego CYP1A2 u myszy, podczas gdy ekspozycja na aerosol cMRTP nie powinna wywoływać takich skutków [43]. Zarówno w badaniach klinicznych, jak i nieklinicznych badaniach *in vivo* można ocenić poziom stresu oksydacyjnego za pośrednictwem pomiaru stężenia w moczu biomarkerów, takich jak 8-epi-prostaglandyna F2α [44], dwualdehyd malonowy lub 4-hydroksynonenal [41]. Ich

stężenia powinny być zredukowane w podobnym stopniu po całkowitej zmianie palenia papierosów na stosowanie cMRTP i w wyniku abstynencji od palenia.

Różnice w metabolizmie ksenobiotyków i reakcjach na stres oksydacyjny mogą być także ocenione w organotypowych kulturach ludzkiego nabłonka dróg oddechowych hodowanego na granicy faz powietrze–ciecz (ALI, *air-liquid interface*). Wykazano np., że ekspozycja tych hodowli na dym papierosowy dobrze odzwierciedla liczne zmiany ekspresji genów indukowane przez palenie i obserwowane podczas biopsji dróg oddechowych palaczy [45]. Ekspozycja na aerosol cMRTP powinna zatem powodować w tych kulturach znacznie zmniejszoną i tymczasową ekspresję genów zaangażowanych w metabolizm ksenobiotyków (np.: CYP1A1, CYP1B1, AKR1B1/C, ALDH3A1) oraz stres oksydacyjny (np.: NQO1, TXNRD1, GCLM/C, GSR, SRXN1) w stosunku do efektu dymu papierosowego [40, 46].

Ponadto aerosol cMRTP powinien mieć mniejszy wpływ na wewnątrzkomórkową pulę GSH i powstawanie ROS niż dym papierosowy. Te punkty końcowe w badaniach toksyczności mogą być przykładowo ocenione w normalnych hodowlach ludzkich komórek nabłonka oskrzeli przy zastosowaniu *high-content screening* [47, 48]. Tego typu badania mogą dodatkowo dostarczyć użytecznych pomiarów ekspresji genów, których wyniki mogą być wykorzystane do porównania metabolizmu ksenobiotyków i reakcji na stres oksydacyjny wywołanych przez aerosol cMRTP i dym papierosowy [42, 47].

4. **Genotoksyczność.** Bezpośrednim następstwem redukcji emisji rakotwórczych substancji toksycznych w aerozolach cMRTP powinna być znacznie zredukowana mutagenność i genotoksyczność, wykazana w standardowych testach komórkowych, takich jak: test Ames, test mikrojader *in vitro* i test na komórkach chłoniaka mysiego [32, 50].
5. **Uszkodzenie DNA.** Aby potwierdzić zredukowaną genotoksyczność aerosolu cMRTP, biologiczna reakcja na uszkodzenia DNA może być oceniona *in vitro*. Zakres pęknięć podwójnej nici DNA jest odzwierciedlony już we wczesnej fazie reakcji na uszkodzenia DNA (DDR, *DNA damage responses*) przez wzrost stężenia γH2AX [50]. Badanie mające na celu ocenę stężenia γH2AX w ludzkich komórkach nabłonka oskrzeli może być zatem wykorzystane do oceny różnicy w zakresie pęknięć podwójnej nici DNA pomiędzy ekspozycją na aerosol cMRTP a ekspozycją na dym papierosowy [47, 48]. Dlatego badania *in vitro* oraz *in vivo* pozwalają zmierzyć względne poziomy ekspresji genów zaangażowanych w mechanizmy DDR oraz dostarczają dowodów potwierdza-

jących, że aerozol cMRTP powoduje mniej uszkodzeń DNA niż dym papierosowy w narażonych tkankach [40, 41, 46].

Podsumowując, znacząca redukcja na wszystkich etapach przyczynowo-skutkowego łańcucha reakcji łączącego palenie papierosów z uszkodzeniami genetycznymi wykazałaby, że aerozol cMRTP powoduje mniej uszkodzeń genetycznych niż dym papierosowy (ryc. 2). To zaś wskazywałoby, że przejście palacza na stosowanie cMRTP ograniczy ryzyko indukcji nowotworu.

Pytanie 2. Czy zastąpienie palenia papierosów stosowaniem cMRTP redukuje stan zapalny?

Stan zapalny a rak

Wiele nowotworów powstaje w obszarach przewlekłego stanu zapalnego, który odgrywa główną rolę w inwazji i progresji guzów nowotworowych, a także w powstawaniu przerzutów, w dużej mierze poprzez aktywację mechanizmów za pośrednictwem cytokin, zaangażowanych w naprawę tkanek, proliferację komórek i angiogenezę [20, 22, 51–53]. Ponadto stan zapalny może się także przyczyniać do inicjacji nowotworu, ponieważ aktywowane komórki zapalne mogą sprzyjać tworzeniu się ROS i RNS, co z kolei może indukować uszkodzenia genetyczne [20, 22]. W konsekwencji redukcji stanu zapalnego powinna towarzyszyć redukcja ryzyka zachorowania na raka, co potwierdzają najnowsze obserwacje, zgodnie z którymi zmniejszenie nasilenia stanu zapalnego (np. poprzez przewlekłe stosowanie niesteroidowych leków przeciwzapalnych) może redukować śmiertelność w raku jelita grubego i raku płuca [54–56]. Ostatnie badania obejmujące leczenie przeciwzapalne pacjentów z POChP i CVD wykazały obniżenie ryzyka rozwoju raka płuca jako schorzenia współistniejącego w tej populacji pacjentów [57, 58].

Stan zapalny ma szczególne znaczenie patofizjologiczne w przypadku chorób płuc i raka płuca, ponieważ przewlekłe zapalenie oskrzeli wywoływane przez ekspozycję na azbest, krzemionkę, dym i inne toksyny wziewne prowadzi do ciągłej reakcji zapalnej, co znacząco zwiększa ryzyko rozwoju raka płuca [59]. Potwierdza to także fakt, że rak płuca jest często schorzeniem współistniejącym z POChP, czyli najważniejszą zapalną chorobą płuc wywołaną przez narażenie na dym. W rzeczy samej wykazano, że stadium I lub II POChP oraz obecność rozedmy płuc to jedne z najsilniejszych niezależnych czynników ryzyka rozwoju raka płuca, a współczynnik ryzyka wynosi odpowiednio 1,4 i 3,5, jak zaobserwowano w badaniu *Pittsburgh Lung Screening Study* [23, 60]. Nie jest to zaskakujące, ponieważ u podłoża POChP

i raka płuca leżą wspólne mechanizmy patogenezy, takie jak stres oksydacyjny i przewlekły proces zapalny [59].

Zapalenie płuc wynikające z narażenia na dym jest wywoływane przez cząstki stałe i częściowo aldehydy, co prowadzi do podwyższenia stężeń m.in. interleukiny 8 (IL-8) i białka chemotaktycznego monocytów typu 1 (MCP-1) zarówno w płucach myszy, jak i człowieka [19, 61, 62]. Uważa się także, że narażenie na dym prowadzi do aktywowania inflammasomu białka receptorowego NOD-podobnego 3 (NLRP3) [63] wraz z następczym miejscowym uwolnieniem aktywnej interleukiny 1 β (IL-1 β), co indukuje proces zapalny, a tym samym może prowadzić u myszy zarówno do przewlekłego zwłóknienia, jak i do raka [64]. W 1996 r. Kuschner i wsp. wykazali, że liczby makrofagów, neutrofilów oraz stężenie IL-1 β i IL-8 są zwiększone w mikrośrodowisku płucnym palaczy w zakresie zależnym od dawki [19]. Od dawna wiadomo, że u myszy aktywacja inflammasomu oraz IL-1 β przyspiesza inwazyjność nowotworu, jego wzrost i rozprzestrzenianie się przerzutów [65]. Dla przykładu u myszy z niedoborem IL-1 β nie rozwinęły się ani miejscowe guzy, ani przerzuty do płuc po miejscowej lub dożyłnej inokulacji komórek czerniaka, co sugeruje, że zapalenie indukowane przez IL-1 β ma wpływ na inwazyjność już istniejących komórek nowotworowych [65]. Obserwacja ta, dotycząca modelu zwierzęcego, znalazła ostatnio potwierdzenie w wynikach badania *Canakinumab Anti-inflammatory Thrombosis Outcomes Study* (CANTOS) [58]. Terapia z zastosowaniem kanakinumabu, przeciwciała monoklonalnego przeciwko IL-1 β , doprowadziła do zależnej od dawki redukcji stężeń markerów zapalnych, takich jak wysokoczułe białko C-reaktywne i interleukina 6 (IL-6), jak również do redukcji zachorowalności i śmiertelności z powodu raka płuca. Podsumowując, obserwacje te pokazują, że przewlekła aktywacja inflammasomu NLRP3 i następczy stan zapalny również odgrywają rolę w rozwoju raka płuca.

Nanocząstki oparte na węglu

Oprócz HPHC i wolnych rodników procesy niecałkowitego spalania generują również stałe nano- i mikrocząstki na bazie węgla [66]. Ponieważ spalanie tytoniu nie jest całkowite, dym papierosowy zawiera także stałe nanocząstki na bazie węgla (cbNP) [67], co jest spójne z procesami uczestniczącymi w powstawaniu sadzy podczas spalania [66]. Nanocząstki cbNP składają się, przynajmniej w części, z substancji humusopodobnych [67] oraz PAH [68] otaczających rdzeń z węgla elementarnego.

HPHC są głównym elementem związanym z toksycznością dymu papierosowego, ważne jest jednak również uwzględnienie skutków zdrowotnych cbNP, generowanych podczas spalania tytoniu, a także ich wpływu na uszkodzenie płuc. Liczne badania

in vivo oraz *in vitro* wykazały, że nanocząstki o bardzo szerokim zakresie rozmiarów, kształtów i składu powodują zapalenie płuc [69, 70]. Wykazano też, iż ekspozycja osób na sadzę złożoną z nanocząstek stanowi przyczynę zwiększenia stężenia cytokin prozapalnych oraz pogorszenia funkcji płuc [71].

Narażenie płuc na działanie drobnych cząstek stałych, takich jak kryształy MSU, azbest i krzemionka krystaliczna, prowadzi do utrzymującego się procesu zapalnego, głównie za pośrednictwem inflamasomu NLRP3 [72]. Podobnie narażenie płuc myszy na nanocząstki sadzy powoduje aktywację inflamasomu NLRP3, co z kolei prowadzi do uszkodzenia i rozedmy płuc [73]. Jest to zgodne z poprzednimi obserwacjami, że narażenie na cbNP prowadzi do zwiększenia stężeń IL-1 β u myszy [73] oraz ludzi [71]. Wykazano także, iż cbNP akumulują się w komórkach dendrytycznych prezentujących antygen pochodzących z rozedmowej tkanki płucnej palaczy [73] oraz iż dym papierosowy aktywuje inflamasom NLRP3 [63], co jest również zgodne z obserwacją, że stężenia IL-1 β są podwyższone w płucach palaczy [19].

Podsumowując, wskazane badania sugerują, iż cząstki cbNP mogą mieć udział w prozapalnym działaniu dymu papierosowego.

Przyczynowo-skutkowy łańcuch zdarzeń łączący palenie ze stanem zapalnym

Aby odpowiedzieć na drugie pytanie, musimy wziąć pod uwagę przyczynowo-skutkowy łańcuch zdarzeń łączący palenie z zapa-

leniem płuc: „Emisja substancji toksycznych” stanowi przyczynę „narażenia na substancje toksyczne”, a to prowadzi do „zapalenia płuc”.

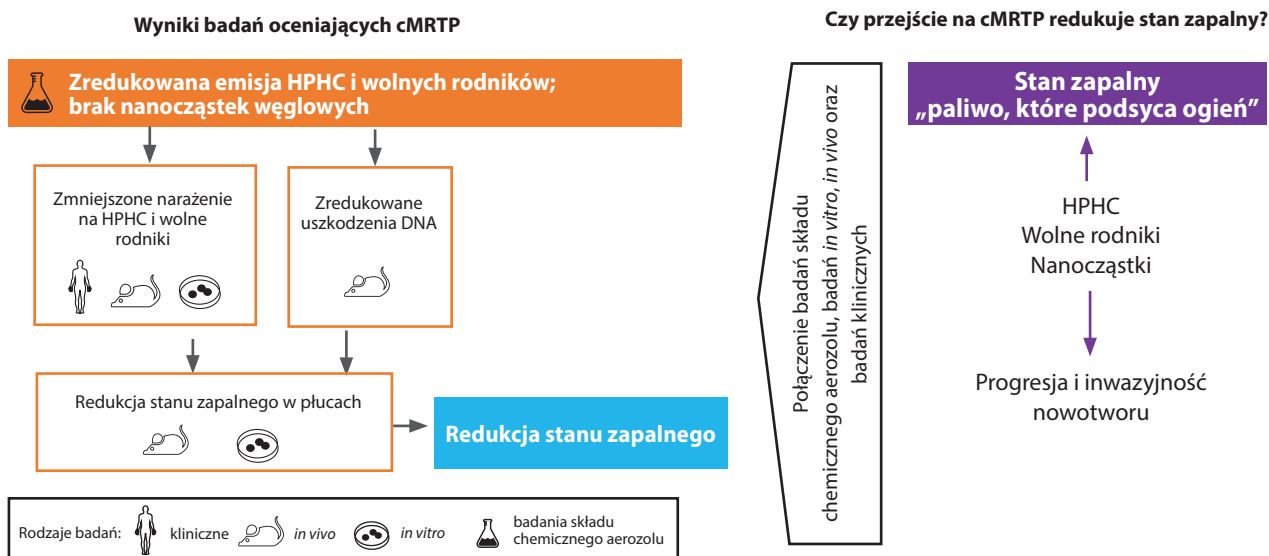
Redukcja emisji substancji toksycznych powinna zatem prowadzić do redukcji narażenia na substancje toksyczne, co z kolei powinno prowadzić do redukcji stanu zapalnego w płucach.

Połączenie kilku linii dowodowych może być wykorzystane do odpowiedzi na drugie pytanie (ryc. 3).

1. **Emisja substancji toksycznych.** Jak zaznaczono w poprzednim ustępie, cMRTP emitują znacznie niższe stężenia zarówno rakotwórczych, jak i nierakotwórczych HPHC [32–35], w tym aldehydy, o których wiadomo, że aktywują procesy zapalne (np. uwolnienie IL-8 i MCP-1) [61, 62]. Co ważne, aerozole cMRTP powinny w założeniu składać się jedynie z kropelek cieczy i zawierać mało lub nie zawierać wcale cbNP z powodu braku spalania w tych produktach. Aby zweryfikować ten argument, opracowaliśmy niedawno metodę ilościowego oznaczania stężenia cbNP w dymie papierosowym i aerozolu cMRTP. Metoda ta wymaga usunięcia z dymu lub aerozolu ich lotnych składników, innymi słowy – fazy ciekłej cząstek aerozolu, przed oznaczeniem ilości pozostałych cząstek stałych. Wykonuje się to za pomocą komercyjnie dostępnego termodenudera Dekati® w temperaturze 300°C [74]. Analiza materiału przy użyciu skaningowego mikroskopu elektronowego wykazała, że dym papierosa referencyjnego 3R4F zawierał ok. 6×10^{11} ultradrobnych cząstek stałych, których

RYCINA 3.

Czy zastąpienie palenia papierosów stosowaniem cMRTP redukuje stan zapalny? Połączenie danych z badań klinicznych, badań na zwierzętach (*in vivo*), badań *in vitro* oraz badań składu chemicznego aerozolu może zapewnić odpowiedź na to pytanie.



cMRTP (candidate modified risk tobacco products) – potencjalny produkt tytoniowy o zmodyfikowanym ryzyku; HPHC (harmful and potentially harmful constituents) – szkodliwe i potencjalnie szkodliwe składniki.

mediana średnicy wynosiła 75 nm (90% cząstek miało średnicę 20–120 nm) [74]. Przy uwzględnieniu rozkładu rozmiaru tych cząstek [74] oraz gęstości węgla odpowiadającej grafitowi ($1,8\text{--}2,1\text{ g/cm}^3$) obliczona masa całkowita 6×10^{11} cząstek wynosi 626–730 μg /papieros. Udział frakcji cząstek o wielkości pomiędzy 20 a 100 nm to 291–340 μg /papieros. Oznaczone cząstki cbNP składały się głównie z węgla, niewielkich ilości tlenu oraz śladowych ilości potasu, chloru, glinu i krzemu [74]. Dla kontrastu – przeanalizowany aerosol cM RTP nie zawierał mierzalnej ilości stałych cbNP [74]. Dlatego aerozole cM RTP, czy to generowane przez wyroby tytoniowe do podgrzewania, czy też przez e-papierosy, powinny w założeniu składać się wyłącznie z cząstek cieczy. Toksyczność takich kropelek/cząstek cieczy stanowi funkcję ich składu chemicznego, tj. substancji toksycznych, które zawierają.

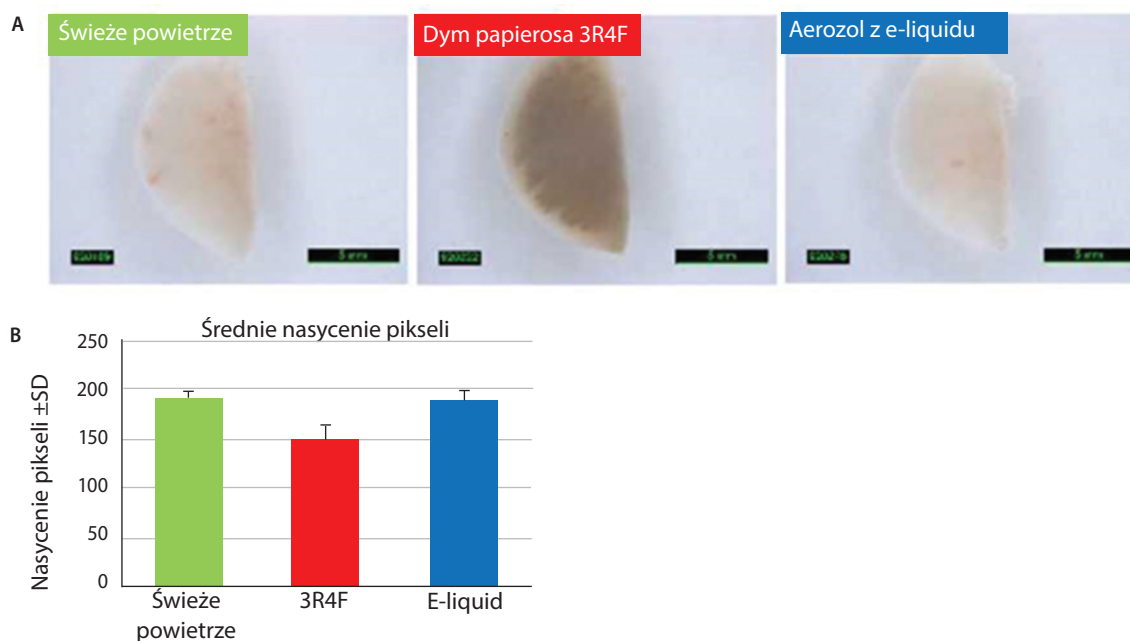
2. **Narażenie na substancje toksyczne.** Podobnie jak w przypadku zmniejszonego narażenia na czynniki rakotwórcze, o czym mowa w poprzednim ustępie, redukcja całkowitej emisji substancji toksycznych powinna prowadzić do znacznej redukcji narażenia na substancje toksyczne zarówno w badaniach laboratoryjnych, jak i klinicznych. Podczas gdy poziomy ekspozycji na różne nierakotwórcze HPHC, takie jak

tlenek węgla i akroleina, mogą być oznaczane w badaniach klinicznych, jak zarysowano powyżej, ekspozycja na cbNP nie może podlegać takiej ocenie. Dlatego też muszą być zastosowane alternatywne metody badawcze. Dla przykładu odnotowaliśmy fakt, że dym papierosowy, w przeciwieństwie do aerozolu w podgrzewanym produkcie tytoniowym, powoduje odbarwienie stomatologicznych żywic kompozytowych wykorzystanych do wypełnień, jak również przebarwia ludzką zębinę i szkliwo [75]. Ponadto w ostatnim, 6-miesięcznym badaniu inhalacji e-liquidem przeprowadzonym u myszy zaobserwowaliśmy, że płuca myszy narażonych na działanie dymu papierosowego miały ciemny kolor, podczas gdy te narażone na działanie aerozolu z e-liquidu były takiego samego, jasnego koloru jak u myszy wystawionych na świeże powietrze (ryc. 4). Dym papierosowy zawiera wiele substancji chromogennych, ale przebarwienia stomatologicznych żywic kompozytowych i płuca u myszy najprawdopodobniej są spowodowane odkładaniem się cbNP.

3. **Stan zapalny płuca.** Wspomniane redukcje narażenia na substancje toksyczne powinny w następnej kolejności prowadzić do redukcji stanu zapalnego płuca.

RYCINA 4.

Zmiana barwy tkanki płuca. **A.** Myszy były narażone przez 3 h dziennie, 5 dni na tydzień, przez 6 miesięcy na działanie świeżego powietrza, dymu papierosa referencyjnego 3R4F lub aerozolu smakowego e-liquidu zawierającego 66,7% PG, 28,5% VG, 4,8% nikotyny i 0,12% mieszanki substancji smakowych. Stężenie nikotyny wynosiło 36,7 $\mu\text{g/l}$ w badanej atmosferze. Płuca zostały przepłukane roztworem chlorku sodu buforowanym fosforanami (PBS, *phosphate buffered saline*), aby pobrać popłuczyny oskrzelowo-pęcherzykowe (BALF, *bronchoalveolar lavage fluid*). Przepłukane lewe płuca zostały zobrażowane w trakcie zanurzenia w PBS. **B.** Średnie nasycenie pikseli na zdjęciu płuca określono przy użyciu oprogramowania do analizy obrazu Visiopharm®; zakres nasycenia pikseli od 0 (czarne) do 255 (białe).



Rozległość zapalenia płuc można zmierzyć w mysim modelu choroby. Badania te powinny potwierdzić, że narażenie na dym papierosowy powoduje stan zapalny w płucach (kontrola dodatnia), podczas gdy aerozole cMRTP mają bardzo ograniczony efekt w tym zakresie [41]. Ponadto niezbędny jest schemat badania obejmujący zarówno grupę uczestników, u których palenie papierosów zostało zastąpione wyrobami cMRTP, jak i grupę uczestników, którzy zupełnie zaprzestali palenia (narażenie na dym papierosowy przez kilka miesięcy, a następnie narażenie na działanie aerozolu cMRTP lub świeżego powietrza, także przez kilka miesięcy), aby móc ocenić (i) skutki zmiany w narażeniu symulujące zamierzone stosowanie cMRTP (tj. przejście obecnych palaczy na MRTP) oraz (ii) porównać skutek przejścia na wyroby cMRTP ze skutkami zaprzestania palenia. W badaniach tych rozległość zapalenia płuc można ocenić za pomocą analizy BALF (kwantyfikacja komórek zapalnych, takich jak neutrofile i makrofagi, oraz markery molekularne, takie jak cytokiny i chemokiny), histopatologii (ocena naciekania płuc przez komórki zapalne, takie jak neutrofile i barwione makrofagi) oraz analizy ekspresji genów i białek w płucach [41]. Wpływ narażenia na dym papierosowy i aerozol cMRTP na zapalenie płuc może być także badany *in vitro* [40, 46] przy użyciu pomiarów ekspresji genów i stężenia białek.

Badania wykazały, że niektóre markery stanu zapalnego w obrębie płuc są podwyższone u palaczy (neutrofile, makrofagi, IL-1 β , IL-8, IL-6 oraz MCP-1) [19]. Szczególnie interesujące jest to, iż markery te okazały się także podwyższone u myszy narażonych na dym papierosowy, ale nie były podwyższone w wyniku narażenia myszy na działanie aerozolu cMRTP [41]. Ponadto zamiana ekspozycji z dymu papierosowego na aerozol cMRTP lub świeże powietrze (w celu zasymulowania całkowitego zaprzestania palenia) doprowadziła do redukcji stężeń tych markerów zapalnych [41]. Potwierdza to nie tylko fakt, że badania na myszach mogą stanowić dobry model do badania biologii człowieka [58, 65], lecz także, iż inflamasom NLRP3 jest aktywowany przez narażenie na dym papierosowy zarówno u myszy, jak i u ludzi oraz może odgrywać rolę w procesach zapalnych uczestniczących w rozwoju raka płuca [58, 65]. Ponadto dym papierosowy indukował ekspresję różnych markerów zapalnych, w tym IL-1 β , w organotypowych kulturach ludzkiego nabłonka dróg oddechowych, które są hodowane na granicy faz powietrze–ciecz. Dla kontrastu – aerozole cMRTP dostarczające ekwiwalentne stężenia nikotyny miały niewielki wpływ lub nie miały żadnego wpływu na markery zapalne w tych kulturach [40, 46]. Wreszcie – można też ocenić reakcje immunologiczne komórek na narażenie na aerozol cMRTP przy użyciu linii komórkowych lub komórek pierwotnych i porównać je z tymi, które wywołuje dym papierosowy. Badania

wykazują, że reakcje komórek immunologicznych są mniej indukowane przez aerozole cMRTP niż w przypadku dymu papierosowego, w szczególności jeśli chodzi o uwalnianie chemokin i cytokin, takich jak IL-8 czy TNF- α [76, 77].

W badaniach klinicznych wpływ palenia papierosów na uogólniony stan zapalny można ocenić np. w pomiarze liczby krążących białych krwinek i stężenia białka C-reaktywnego, podczas gdy bezpośrednia ocena ilościowa stanu zapalnego płuc jest trudniejsza, ponieważ wymaga bardziej inwazyjnego zabiegu. Sugeruje się, że niewielkie pozytywne zmiany w czynności płuc i objawach ze strony układu oddechowego u palaczy, którzy przeszli na cMRTP na 6–12 miesięcy, mogą być zastępczym wskaźnikiem redukcji stanu zapalnego w płucach [78, 79]. Zagadnienie to wymaga dalszych badań, w szczególności w celu sprawdzenia, czy przejście na wyroby cMRTP wywołuje skutki zbliżone do tych, które wynikają z rzucenia palenia. Potrzebne jest również zidentyfikowanie innych odpowiednich markerów stanu zapalnego płuc, które można byłoby wykorzystać w badaniach klinicznych. Podsumowując, znacząca redukcja na wszystkich etapach przyczynowo-skutkowego łańcucha zdarzeń łączącego palenie z przewlekłym stanem zapalnym płuc wykazałaby, że cMRTP wywołuje w płucach mniejszy stan zapalny niż dym papierosowy (ryc. 3). To zaś wskazywałoby, iż aerozol cMRTP prawdopodobnie w znacznie mniejszym stopniu niż dym papierosowy odpowiada za inicjację procesu nowotworowego, a także progresję i inwazyjność raka.

Pytanie 3. Czy zastąpienie palenia papierosów stosowaniem cMRTP zmniejsza ryzyko rozwoju raka płuca?

Uzasadnione jest oczekiwanie, że aerozole cMRTP, które wywierają istotnie mniejszy wpływ na oba kluczowe mechanizmy zaangażowane w rozwój raka, zgodnie z hipotezą Balkwill i Mantovaniego (uszkodzenia genetyczne i stan zapalny) [24], powinny również wiązać się ze zredukowanym ryzykiem rozwoju raka płuca w stosunku do palenia papierosów. Aby potwierdzić tę hipotezę, w świetle braku długoterminowych badań epidemiologicznych, należy zastosować badania niekliniczne *in vitro* i *in vivo*. Badania *in vitro* na liniach komórkowych pozwalają ocenić względny wpływ dymu papierosowego i aerozolu cMRTP na molekularne i komórkowe markery nowotworzenia. Dla przykładu test transformacji linii komórkowej Bhas 42 (wywodzącej się z fibroblastów mysich) może być wykorzystany do wykazania, że aerozole cMRTP powodują znacznie mniejszą transformację komórkową niż dym papierosowy [49]. Podobnie długotrwała ekspozycja (do 12 tygodni) komórek ludzkiego nabłonka oskrzelowego BEAS-2B może posłużyć wykazaniu, że zmiany czynnościowe i molekularne związane z karcynogenezą są istotnie

mniejsze po ekspozycji na aerozol cMRTP niż w przypadku narażenia na dym papierosowy [80].

Badania karcynogenności *in vivo*, takie jak 18-miesięczne badania chronicznego narażenia na dym, można przeprowadzić na myszach A/J w celu porównania wpływu aerozolu cMRTP i dymu papierosowego na zachorowalność na raka płuca. Myszy A/J są wyjątkowo podatne na rozwój raka płuca i stanowią szeroko stosowany model badania karcynogenności. U tych wsobnych myszy często rozwijają się spontaniczne, łagodne zmiany w płucach (gruczolaki), które czasami mogą przekształcać się w guzy nowotworowe (gruczolakoraki). Szczep myszy A/J jest wysoce podatny na substancje toksyczne/związki, które są rakotwórcze, a narażenie na takie czynniki powoduje, że u wielu zwierząt rozwijają się oba typy guzów. Ponadto cechą charakterystyczną narażenia na czynnik rakotwórczy u tych myszy jest pojawienie się wielu nowotworów płuca u każdego zwierzęcia (mnogość) [81]. Badania narażenia myszy A/J na dym papierosowy wykazały, że prowadzi ono do rozwoju nowotworów płuca [81]. Chociaż badania tego rodzaju są złożone i wymagają wykorzystania modelu zwierzęcego, to umożliwiają kompleksową, toksykologiczną ocenę wszystkich powiązanych przyczynowo zdarzeń łączących palenie z chorobą [6, 15]. Oznacza to, że w tym samym badaniu można ocenić stan zapalny płuc (analiza BALF, analiza ekspresji genów i białek, histopatologia), zmiany rozedmowe (histopatologia), czynność płuc i karcynogenezę (histopatologia) wraz z ekspozycją na czynnik rakotwórczy (biomarkery narażenia, reakcje metaboliczne na narażenie na czynnik rakotwórczy [ekspresja genów i białek]) oraz odpowiedź na uszkodzenia DNA w oparciu o dane dotyczące ekspresji genów. To pozwala na spójne i zintegrowane przedstawienie skutków biologicznych inhalacji aerozolu cMRTP w porównaniu z działaniem dymu papierosowego.

Podsumowując, znaczące obniżenie stężeń markerów kancerogenezy *in vitro* oraz markerów rozwoju nowotworów *in vivo* może wskazywać, że aerozol cMRTP jest mniej rakotwórczy niż dym papierosowy. Oprócz pozytywnej odpowiedzi zarówno na pierwsze, jak i na drugie pytanie, oznacza to, że palacze, którzy zastępują palenie papierosów stosowaniem wyrobów cMRTP, mają dużą szansę na zmniejszenie ryzyka rozwoju raka płuca.

Wyzwania

Podczas wdrażania opisanego podejścia istnieje wiele wyzwań, poza już wspomnianym brakiem klinicznych markerów ryzyka rozwoju raka płuca i przewlekłego stanu zapalnego płuc. Najważniejsze z nich mieszczą się w następujących kategoriach:

1. **Ocena narażenia w ramach badań nieklinicznych.** Badania niekliniczne powinny być zaplanowane tak, aby uwzględ-

niały dwie zasady. Pierwsza dotyczy tego, że powinny one zawsze porównywać skutki stosowania cMRTP ze skutkami palenia papierosów (biorąc pod uwagę to, że celem cMRTP jest zastąpienie papierosów) oraz, gdy to możliwe, wykorzystywać rzucenie palenia jako punkt odniesienia zgodnie z tym, co opisano wcześniej [6]. Druga zasada odnosi się do tego, że o ile to możliwe, badania powinny pokrywać zakres dawki substancji szkodliwych, który obejmuje realistyczną dawkę narażenia występującego u człowieka. Uwzględnienie tych dwóch zasad pozwala ogólnie wyliczyć: (i) dawkę aerozolu cMRTP, przy której wykazuje on ten sam skutek co dym papierosowy, (ii) relatywne skutki wyrażone wartością procentową oraz (iii) resztkowy efekt rzucenia palenia; co ważne, te wyniki mogą być przedstawione w kontekście rzeczywistych poziomów narażenia występujących u człowieka. Osiągnięcie powyższego może być trudne, dlatego należy zwrócić szczególną uwagę na wybór zakresów dawki narażenia, które mogą się opierać na: (i) współczynnikach przeliczenia narażenia zwierząt i ludzi w przypadku badań *in vivo* [82] oraz (ii) danych pochodzących z badań *in vitro* na komórkach ludzkich [83, 84].

2. **Metody badań nieklinicznych.** W celu usprawnienia oceny cMRTP istnieje potrzeba opracowania bardziej odpowiednich ludzkich modeli *in vitro*, które stopniowo będą zastępowały modele *in vivo* oparte na gryzoniach. Chociaż wykorzystanie złożonych organotypowych kultur nabłonka oddechowego wyhodowanych na styku powietrze–ciecz jest krokiem we właściwym kierunku, to nie są one reprezentatywne dla pęcherzyków płucnych, a ponadto brakuje im komórek immunologicznych, fibroblastów i komórek śródbłonka obecnych w płucach. Istnieje więc potrzeba opracowania współhodowli na granicy faz powietrze–ciecz, które będą w stanie jak najdokładniej naśladować fizjologiczne środowisko płuc i pęcherzyków płucnych.
3. **Różnorodność cMRTP.** Liczne rodzaje cMRTP zostały już opracowane i nadal będą rozwijane. Prawdopodobnie będą się one różniły pod względem emisji substancji toksycznych, co potencjalnie prowadzi do zróżnicowanego zakresu ryzyka swoistego dla danego produktu [10]. Dlatego każdy produkt cMRTP musiałby przejść kompleksowe badania zgodnie z tym, co opisano wcześniej [6]. Jednakże wątpliwe jest, czy podejście to będzie realne w dłuższej perspektywie czasowej, głównie ze względu na koszty i czas. Należy zatem rozwinąć bardziej pragmatyczne podejście, które pozwoli wypracować konsensus naukowy i regulacyjny. Kluczowe dla tego podejścia jest: (i) wykorzystanie uzgodnionych produktów referencyjnych do porównania z dopuszczonymi do sprzedaży MRTP oraz (ii) metodologii pomostowych, które

pozwalają na porównanie cMRTP z produktami referencyjnymi w oparciu o ograniczoną liczbę badań (patrz wyzwanie 4).

4. **Metodologie pomostowe.** Aby poradzić sobie z obecną i przyszłą różnorodnością cMRTP oraz ocenić je pod kątem ich potencjału redukcji ryzyka w sposób pragmatyczny, konieczne będzie opracowanie metodologii pomostowych, które umożliwią naukowo uzasadnione porównanie dowolnego cMRTP z referencyjnym MRTP. Takie metodologie powinny pozwolić na bezpośrednie porównanie: (i) emisji substancji toksycznych, (ii) szerokiego zakresu markerów toksyczności oraz (iii) redukcji narażenia na substancje toksyczne w celu wykazania, że dany cMRTP jest ekwiwalentny lub lepszy niż referencyjny MRTP. Jednakże będą one dotyczyły jedynie cech produktów, podczas gdy wzorce ich użytkowania będą musiały zostać ocenione odrębnie.

Użytkowanie produktów

Aby w pełni ocenić potencjał cMRTP w zakresie redukcji ryzyka, należy również określić, jak dany produkt będzie faktycznie wykorzystany przez konsumentów. Żeby się upewnić, że wprowadzenie cMRTP na rynek będzie miało korzystny wpływ w skali całej populacji, powinno się wziąć pod uwagę, jak dany produkt będzie wykorzystywany przez palaczy, a także czy będzie stosowany przez osoby niepalące [9]. Istnieje uzasadniona obawa, że dostępność produktów o ograniczonym ryzyku może prowadzić do wzrostu ogólnej konsumpcji produktów nikotynowych w populacji. Ryzyko to można ocenić dla każdego cMRTP.

Po pierwsze, produkt cMRTP powinien być wystarczająco atrakcyjny dla dorosłych palaczy, aby zachęcić ich do pełnego przejścia, innymi słowy – całkowitego zastąpienia papierosów przez cMRTP. Ponadto średni poziom dziennej konsumpcji nikotyny nie powinien wzrosnąć wskutek opisanego przejścia. Te ważne parametry cMRTP można określić na podstawie oceny: satysfakcji z używania produktu, głodu nikotynowego, ekspozycji na nikotynę i dziennej konsumpcji w badaniach klinicznych prowadzonych w formie ambulatoryjnej [44].

Po drugie, cMRTP nie powinien przyciągać osób niepalących, w tym byłych palaczy. Prawdopodobieństwo, że cMRTP będzie przyciągać osoby niepalące powinno zostać ocenione przed wprowadzeniem produktu na rynek w badaniach obejmujących ocenę postrzegania i zachowania konsumentów [8, 11]. Powszechność stosowania produktu może być monitorowana w badaniach prowadzonych po wprowadzeniu urządzenia na rynek [8].

Po trzecie, bardzo ważne jest precyzyjne sformułowanie wszelkich informacji związanych z cMRTP, a także skrupulatne przygotowanie etykiet i materiałów komunikacyjnych, aby zagwarantować, że zamierzone przekazy i ostrzeżenia są wyczerpujące, nie wprowadzają w błąd [85] oraz są zrozumiałe dla potencjalnych użytkowników. Zrozumienie tych informacji musi być przebadane na reprezentatywnej próbie populacji, która powinna otrzymać jasny komunikat, że: (i) najlepszym wyborem dla palacza jest rzucenie nałogu, (ii) cMRTP nie jest pozbawiony ryzyka, (iii) cMRTP jest uzależniający, ponieważ zawiera nikotynę oraz (iv) cMRTP nie stanowi alternatywy dla całkowitego rzucenia nałogu. Ponadto wyroby cMRTP, podobnie jak inne produkty tytoniowe, nigdy nie powinny być sprzedawane małoletnim.

PODSUMOWANIE

W ostatnim czasie zostało opisane podejście mające na celu określenie potencjału rakotwórczego i całociowego ryzyka rozwoju raka związanego z zastępczą terapią nikotynową oraz wybranymi produktami cMRTP [10]. Podejście to bazuje na porównaniu ryzyka zachorowania na raka związanego z inhalacją aerozolu z cMRTP z ryzykiem wywoływanym przez dym papierosowy, aparaty do inhalacji nikotyny, a także powietrze otoczenia. Potencjał rakotwórczy stanowi pochodną poziomów emisji poszczególnych substancji rakotwórczych, przebadanych w ramach analizy chemicznej oraz ich jednostkowych ryzyk inhalacyjnych (tj. podwyższone ryzyko zachorowania na raka w okresie całego życia wynikające z ciągłej ekspozycji inhalacyjnej na znormalizowane stężenie czynnika rakotwórczego). Całociowe ryzyko zachorowania na raka jest w tym przypadku obliczane na podstawie potencjału rakotwórczego przy uwzględnieniu stężenia karcynogenów inhalowanych dziennie przez palacza. Mimo że podejście to dostarcza właściwą wstępną ocenę potencjału redukcji ryzyka u palacza dzięki wykorzystaniu cMRTP, to dla wzmocnienia siły dowodów naukowych powinno być ono uzupełnione o wyniki badań prowadzonych w układach żywych (takich jak te opisane powyżej).

Pierwszym powodem takiego stanu rzeczy jest to, że aerozole wytwarzane przez nowe cMRTP są złożonymi mieszaninami zarówno znanych, jak i nieznanymi składników, najprawdopodobniej zawierających substancje o nieznanym ryzyku inhalacyjnym. Drugim powodem jest zaś to, że nie wiadomo, czy te mieszaniny zachowują się zgodnie z liniową kumulacją skutków wywoływanych przez poszczególne składniki, czy też pojawiają się skutki synergiczne.

Wszystkie eksperymentalne systemy biologiczne mają swoje ograniczenia. W skrócie – ludzkie układy *in vitro* nie odzwierciedlają wszystkich aspektów interakcji komórkowych i organizacji tkanek, modele zwierzęce *in vivo* nie zawsze odzwierciedlają ludzką biologię, a badania kliniczne z udziałem ludzi są utrudnione ze względu na ograniczenia czasowe i kosztowe, jak również dostępność kluczowych próbek biologicznych (które są łatwo dostępne w badaniach na modelach zwierzęcych). Dlatego zaproponowaliśmy podejście, które integruje dane z wielu poziomów: badań *in vitro*, *in vivo* oraz badań klinicznych, umożliwiając uzupełnienie ograniczeń każdego systemu eksperymentalnego danymi pochodzącymi z innych systemów, w celu porównania wpływu aerozolu cMRTP z wpływem dymu papierosowego na kluczowe mechanizmy biorące udział w rozwoju chorób odtytoniowych. Opisana powyżej kompleksowość dowodów naukowych powinna być uwzględniana w procesie oceny potencjału redukcji ryzyka u palaczy zamieniających palenie tytoniu na stosowanie cMRTP.

Zaproponowane tutaj podejście do oceny redukcji ryzyka raka płuca u palaczy po przejściu na stosowanie cMRTP jest oparte na hipotezie Balkwill i Mantovaniego [24]. Dwa kluczowe szlaki, uszkodzenia genetyczne oraz przewlekły stan zapalny, mogą być podzielone na bardziej szczegółowe zdarzenia przyczynowo-skutkowe, co zapewni precyzyjną ocenę. Jest bardzo mało prawdopodobne, że cMRTP, który redukuje ryzyko rozwoju raka płuca u palacza, nie będzie ograniczał uszkodzeń genetycznych oraz rozwoju stanu za-

palnego w tkance płucnej, w tym wszystkich pośrednich etapów tych procesów. Analogicznie jest bardzo mało prawdopodobne, że cMRTP, który nie emituje znacząco niższych stężeń substancji toksycznych, będzie istotnie redukował uszkodzenia genetyczne oraz stan zapalny, a w konsekwencji ryzyko raka płuca. Dlatego proponujemy, aby opisane podejście było postrzegane jako uzasadniona naukowo, alternatywna ocena potencjału cMRTP w zakresie redukcji ryzyka, możliwa do przeprowadzenia na długo przed uzyskaniem danych z badań epidemiologicznych.

Ponadto ważne jest, aby pamiętać, że wpływ stosowania cMRTP na redukcję ryzyka na poziomie populacji będzie zmaksymalizowany, jeśli palacze całkowicie zastąpią palenie papierosów stosowaniem tego produktu (porzucają papierosy), podczas gdy ich codzienne narażenie na nikotynę pozostanie na stabilnym poziomie lub będzie zmniejszone, oraz jeśli cMRTP nie przyciągnie osób niepalących.

Wreszcie – należy zawsze pamiętać i stale komunikować, że: (i) najlepszym wyborem dla palacza jest rzucenie nałogu, (ii) produkty cMRTP nie są pozbawione ryzyka, (iii) produkty cMRTP są uzależniające, ponieważ zawierają nikotynę, oraz (iv) produkty cMRTP nie stanowią alternatywy dla całkowitego zaprzestania stosowania nikotyny. Najważniejszą kwestią, którą należy podkreślić, jest to, że produkty cMRTP, tak jak każdy inny wyrób tytoniowy, nigdy nie powinny być sprzedawane nieletnim.

Piśmiennictwo

1. US Department of Health and Human Services. The health consequences of smoking 50 years of progress: a report of the surgeon general, 2014. Centers for Disease Control and Prevention (US), Atlanta, USA, 2014. <http://www.surgeongeneral.gov/library/reports/50-years-of-progress/index.html> (access: 27.01.2017).
2. Royal College of Physicians. Nicotine without smoke: tobacco harm reduction. A report by the Tobacco Advisory Group of the Royal College of Physicians, London, 2016. <https://www.rcplondon.ac.uk/projects/outputs/nicotine-without-smoke-tobaccoharm-reduction-0> (access: 8.02.2019).
3. Office of the Surgeon General, U. S. How tobacco smoke causes disease: the biology and behavioral basis for smoking-attributable disease: a report of the surgeon general. Centers for Disease Control and Prevention (US), Atlanta 2010.
4. Zhu S-H, Lee M, Zhuang Y-L et al. Interventions to increase smoking cessation at the population level: how much progress has been made in the last two decades? *Tobacco Control*. 2012; 21: 110-8.
5. Ashley DL, Burns D, Djordjevic M et al. The scientific basis of tobacco product regulation. *World Health Org Tech Rep Ser*. 2008; 951: 1-277.
6. Smith M, Clark B, Luedicke F et al. Evaluation of the Tobacco Heating System 2.2. Part 1. Description of the system and the scientific assessment program. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2016; 81(suppl 2): S17-S26.
7. McNeil A. Reducing harm from nicotine use. Fifty years since smoking and health. Progress, lessons and priorities for a smoke-free UK. Royal College of Physicians, London 2012.
8. Family Smoking Prevention and Tobacco Control Act. Family Smoking Prevention and Tobacco Control Act (FSPTCA). Public Law. 2009; 111-31.
9. Food and Drug Administration (FDA). Modified Risk Tobacco Product Applications, Draft Guidance for Industry [Internet]. 2012. <http://www.fda.gov/downloads/TobaccoProducts/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/UCM297751.pdf> (access: 21.12.2018).
10. Stephens WE. Comparing the cancer potencies of emissions from vapourised nicotine products including e-cigarettes with those of tobacco smoke. *Tob Control*. 2017; 27: 10-7.
11. Flanders WD, Lally CA, Zhu BP et al. Lung cancer mortality in relation to age, duration of smoking, and daily cigarette consumption: results from Cancer Prevention Study II. *Cancer Res*. 2003; 63: 6556-62.
12. Carter BD, Abnet CC, Feskanich D et al. Smoking and mortality-beyond established causes. *N Engl J Med*. 2015; 372: 631-40.
13. Choi S, Chang J, Kim K et al. Effect of smoking cessation and reduction on the risk of cancer in Korean men: a population based study. *Cancer Res Treat*. 2017. <https://doi.org/10.4143/crt.2017.326>.
14. Fry JS, Lee PN, Forey BA et al. How rapidly does the excess risk of lung cancer decline following quitting smoking? A quantitative review using the negative exponential model. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2013; 67: 13-26.
15. Sturla SJ, Boobis AR, FitzGerald RE et al. Systems toxicology: from basic research to risk assessment. *Chem Res Toxicol*. 2014; 27: 314-29.
16. Abbas T, Keaton MA, Dutta A. Genomic instability in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013; 5: a012914.

17. Jorgensen ED, Zhao H, Traganos F et al. DNA damage response induced by exposure of human lung adenocarcinoma cells to smoke from tobacco- and nicotine-free cigarettes. *Cell Cycle*. 2010; 9: 2170-6.
18. Hecht SS. Lung carcinogenesis by tobacco smoke. *Int J Cancer*. 2012; 131: 2724-32.
19. Kuschner W, D'Alessandro A, Wong H et al. Dose-dependent cigarette smoking-related inflammatory responses in healthy adults. *Eur Respir J*. 1996; 9: 1989-94.
20. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*. 2010; 140: 883-99.
21. Lee J, Taneja V, Vassallo R. Cigarette smoking and inflammation: cellular and molecular mechanisms. *J Dent Res*. 2012; 91: 142-9.
22. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature*. 2002; 420: 860-7.
23. Durham AL, Adcock IM. The relationship between COPD and lung cancer. *Lung Cancer*. 2015; 90: 121-7.
24. Balkwill FR, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*. 2001; 357: 539-45.
25. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011; 144: 646-74.
26. Penning TM. Human Aldo-Keto reductases and the metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Chem Res Toxicol*. 2014; 27: 1901-17.
27. Faux SP, Tai T, Thorne D et al. The role of oxidative stress in the biological responses of lung epithelial cells to cigarette smoke. *Biomarkers*. 2009; 14(suppl 1): 90-6.
28. Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis K et al. Pulmonary oxidative stress, inflammation and cancer: respirable particulate matter, fibrous dusts and ozone as major causes of lung carcinogenesis through reactive oxygen species mechanisms. *Int J Environ Res Public Health*. 2013; 10: 3886-907.
29. Kawanishi S, Ohnishi S, Ma N et al. Crosstalk between DNA damage and inflammation in the multiple steps of carcinogenesis. *Int J Mol Sci*. 2017; 18: 1808.
30. Helfinger V, Schroder K. Redox control in cancer development and progression. *Mol Aspects Med*. 2018; 63: 88-98.
31. Sethi G, Shanmugam MK, Ramachandran L et al. Multifaceted link between cancer and inflammation. *Biosci Rep*. 2012; 32: 1-15.
32. Schaller J-P, Keller D, Poget L et al. Evaluation of the tobacco heating system 2.2 part 2: chemical composition, genotoxicity, cytotoxicity, and physical properties of the aerosol. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2016; 81(suppl 2): S27-S47.
33. Forster M, Fiebelkorn S, Yurteri C et al. Assessment of novel tobacco heating product THP1.0. Part 3. Comprehensive chemical characterisation of harmful and potentially harmful aerosol emissions. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2018; 93: 14-33.
34. Farsalinos KE, Yannovits N, Sarri T et al. Carbonyl emissions from a novel heated tobacco product (IQOS): comparison with an e-cigarette and a tobacco cigarette. *Addiction*. 2018. <https://doi.org/10.1111/add.14365>.
35. Pryor WA, Church DF, Evans MD et al. A comparison of the free radical chemistry of tobacco-burning cigarettes and cigarettes that only heat tobacco. *Free Radic Biol Med*. 1990; 8: 275-9.
36. O'Connell G, Graff DW, D'Ruiz CD. Reductions in biomarkers of exposure (BoE) to harmful or potentially harmful constituents (HPHCs) following partial or complete substitution of cigarettes with electronic cigarettes in adult smokers. *Toxicol Mech Methods*. 2016; 26: 443-54.
37. Luedicke F, Picavet P, Baker G et al. Effects of switching to the menthol tobacco heating system 2.2, smoking abstinence or continuing cigarettes on biomarkers of exposure: a randomized controlled, open-label, multicentre study in sequential confinement and ambulatory settings (part 1). *Nicotine Tob Res*. 2018; 20: 161-72.
38. Goniewicz ML, Gawron M, Smith DM et al. Exposure to nicotine and selected toxicants in cigarette smokers who switched to electronic cigarettes: a longitudinal within-subjects observational study. *Nicotine Tob Res*. 2017; 19: 160-7.
39. Yuki D, Takeshige Y, Nakaya K et al. Assessment of the exposure to harmful and potentially harmful constituents in healthy Japanese smokers using a novel tobacco vapor product compared with conventional cigarettes and smoking abstinence. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2018; 96: 127-34.
40. Iskandar AR, Titz B, Sewer A et al. Systems toxicology meta-analysis of in vitro assessment studies: biological impact of a modified-risk tobacco product aerosol compared with cigarette smoke on human organotypic cultures of the respiratory tract. *Toxicol Res*. 2017; 6: 631-53.
41. Phillips B, Veljkovic E, Boue S et al. An 8-month systems toxicology inhalation/cessation study in Apoe^{-/-} mice to investigate cardiovascular and respiratory exposure effects of a candidate modified risk tobacco product, THS 2.2, compared with conventional cigarettes. *Toxicol Sci*. 2016; 149: 411-32.
42. Gonzalez Suarez I, Sewer A, Walker P et al. A Systems Biology approach for evaluating the biological impact of environmental toxicants in vitro. *Chem Res Toxicol*. 2014; 27: 367-76.
43. Lo Sasso G, Titz B, Nury C et al. Effects of cigarette smoke, cessation and switching to a candidate modified risk tobacco product on the liver of Apoe^{-/-} mice – a systems toxicology analysis. *Inhalat Toxicol*. 2016; 28: 226-40.
44. Luedicke F, Picavet P, Baker G et al. Effects of switching to the menthol tobacco heating system 2.2, smoking abstinence, or continued cigarette smoking on clinically relevant risk markers: a randomized, controlled, open-label, multicenter study in sequential confinement and ambulatory settings (part 2). *Nicotine Tob Res*. 2018; 20: 173-82.
45. Mathis C, Poussin C, Weisensee D et al. Human bronchial epithelial cells exposed in vitro to cigarette smoke at the air-liquid interface resemble bronchial epithelium from human smokers. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2013; 304: L489-L503.
46. Haswell LE, Corke S, Verrastro I et al. In vitro RNA-seq-based toxicogenomics assessment shows reduced biological effect of tobacco heating products when compared to cigarette smoke. *Sci Rep*. 2018; 8: 1145.
47. Gonzalez Suarez I, Martin F, Marescotti D et al. In vitro systems toxicology assessment of a candidate modified risk tobacco product shows reduced toxicity compared to a conventional cigarette. *Chem Res Toxicol*. 2016; 29: 3-18.
48. Taylor M, Thorne D, Carr T et al. Assessment of novel tobacco heating product THP1.0. Part 6: a comparative in vitro study using contemporary screening approaches. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2018; 93: 62-70.
49. Thorne D, Breheny D, Proctor C et al. Assessment of novel tobacco heating product THP1.0. Part 7: comparative in vitro toxicological evaluation. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2018; 93: 71-83.
50. Nakamura AJ, Rao VA, Pommier Y et al. The complexity of phosphorylated H2AX foci formation and DNA repair assembly at DNA double-strand breaks. *Cell Cycle*. 2010; 9: 389-97.
51. Mantovani A. Molecular pathways linking inflammation and cancer. *Curr Mol Med*. 2010; 10: 369-73.
52. Apte RN, Krelina Y, Song X et al. Effects of micro-environment- and malignant cell-derived interleukin-1 in carcinogenesis, tumour invasiveness and tumour-host interactions. *Eur J Cancer*. 2006; 42: 751-9.
53. Porta C, Larghi P, Rimoldi M et al. Cellular and molecular pathways linking inflammation and cancer. *Immunobiology*. 2009; 214: 761-77.
54. Cuzick J, Otto F, Baron JA et al. Aspirin and non-steroidal anti-inflammatory drugs for cancer prevention: an international consensus statement. *Lancet Oncol*. 2009; 10: 501-7.
55. Rothwell PM, Fowkes FG, Belch JF et al. Effect of daily aspirin on long-term risk of death due to cancer: analysis of individual patient data from randomised trials. *Lancet*. 2011; 377: 31-41.
56. Parimon T, Chien JW, Bryson CL et al. Inhaled corticosteroids and risk of lung cancer among patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007; 175(7): 712-9.
57. Lee CH, Hyun MK, Jang EJ et al. Inhaled corticosteroid use and risks of lung cancer and laryngeal cancer. *Respir Med*. 2013; 107: 1222-33.
58. Ridker PM, MacFadyen JG, Thuren T et al. Effect of interleukin-1beta inhibition with canakinumab on incident lung cancer in patients with atherosclerosis: exploratory results from a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*. 2017; 390: 1833-42.
59. Walser T, Cui X, Yanagawa J et al. Smoking and lung cancer: the role of inflammation. *Proc Am Thorac Soc*. 2008; 5: 811-5.

60. de Torres JP, Wilson DO, Sanchez-Salcedo P et al. Lung cancer in patients with chronic obstructive pulmonary disease. Development and validation of the COPD Lung Cancer Screening Score. *Am J Respir Crit Care Med*. 2015; 191: 285-91.
61. Moretto N, Facchinetti F, Southworth T et al. alpha, beta-Unsaturated aldehydes contained in cigarette smoke elicit IL-8 release in pulmonary cells through mitogen-activated protein kinases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2009; 296: L839-L48.
62. van der Toorn M, Slebos DJ, de Bruin HG et al. Critical role of aldehydes in cigarette smoke-induced acute airway inflammation. *Respir Res*. 2013; 14: 45.
63. Eltom S, Belvisi MG, Stevenson CS et al. Role of the inflammasome-caspase 1/11-IL-1/18 axis in cigarette smoke driven airway inflammation: an insight into the pathogenesis of COPD. *PLoS One*. 2014; 9: e112829.
64. Dostert C, Petrilli V, Van Bruggen R et al. Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science*. 2008; 320: 674-7.
65. Voronov E, Shouval DS, Krelm Y et al. IL-1 is required for tumor invasiveness and angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100: 2645-50.
66. Lighty JS, Veranth JM, Sarofim AF. Combustion aerosols: factors governing their size and composition and implications to human health. *J Air Waste Manag Assoc*. 2000; 50: 1565-618.
67. Fariss MW, Gilmour MI, Reilly CA et al. Emerging mechanistic targets in lung injury induced by combustion-generated particles. *Toxicol Sci*. 2013; 132: 253-67.
68. Lindner K, Strobele M, Schlick S et al. Biological effects of carbon black nanoparticles are changed by surface coating with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Part Fibre Toxicol*. 2018; 14: 8.
69. Sahu D, Kannan GM, Vijayaraghavan R. Carbon black particle exhibits size dependent toxicity in human monocytes. *Int J Inflam*. 2014: 827019.
70. Braakhuis HM, Park MV, Gosens I et al. Physicochemical characteristics of nanomaterials that affect pulmonary inflammation. *Part Fibre Toxicol*. 2014; 11: 18.
71. Zhang R, Dai Y, Zhang X et al. Reduced pulmonary function and increased pro-inflammatory cytokines in nanoscale carbon black-exposed workers. *Part Fibre Toxicol*. 2014; 11: 73.
72. Ather JL, Martin RA, Ckless K et al. Inflammasome activity in non-microbial lung inflammation. *J Environ Immunol Toxicol*. 2014; 1: 108-17.
73. You R, Lu W, Shan M et al. Nanoparticulate carbon black in cigarette smoke induces DNA cleavage and Th17-mediated emphysema. *eLife*. 2015; 4: e09623.
74. Pratte P, Cosandey S, Goujon Ginglinger C. Investigation of solid particles in the mainstream aerosol of the tobacco heating system THS2.2 and mainstream smoke of a 3R4F reference cigarette. *Hum Exp Toxicol*. 2017; 36: 1115-20.
75. Zanetti F, Zhao X, Pan J et al. Effects of cigarette smoke and tobacco heating aerosol on color stability of dental enamel, dentin and composite resin restorations. *Quintessence Int*. 2019; 50: 1-12.
76. van der Toorn M, Frentzel S, De Leon H et al. Aerosol from a candidate modified risk tobacco product has reduced effects on chemotaxis and transendothelial migration compared to combustion of conventional cigarettes. *Food Chem Toxicol*. 2015; 86: 81-7.
77. Poussin C, Laurent A, Peitsch MC et al. Systems toxicology-based assessment of the candidate modified-risk tobacco product THS2.2 for the adhesion of monocytic cells to human coronary arterial endothelial cells. *Toxicology*. 2015; 339: 73-86.
78. Ansari SM, Lama N, Blanc N et al. Evaluation of biological and functional changes in healthy smokers switching to the tobacco heating system 2.2 versus continued tobacco smoking: protocol for a randomized, controlled, multicenter study. *JMIR Res Protoc*. 2018; 7: 11294.
79. Cibella F, Campagna D, Caponnetto P et al. Lung function and respiratory symptoms in a randomized smoking cessation trial of electronic cigarettes. *Clin Sci (Lond)*. 2016; 130: 1929-37.
80. van der Toorn M, Sewer A, Marescotti D et al. The biological effects of long-term exposure of human bronchial epithelial cells to total particulate matter from a candidate modified-risk tobacco product. *Toxicol In Vitro*. 2018; 50: 95-108.
81. Witschi H. A/J mouse as a model for lung tumorigenesis caused by tobacco smoke: strengths and weaknesses. *Exp Lung Res*. 2005; 31: 3-18.
82. Alexander DJ, Collins CJ, Coombs DW et al. Association of inhalation toxicologists (AIT) working party recommendation for standard delivered dose calculation and expression in non-clinical aerosol inhalation toxicology studies with pharmaceuticals. *Inhal Toxicol*. 2008; 20: 1179-89.
83. Marchand M, Brossard P, Merdjan H et al. Nicotine population pharmacokinetics in healthy adult smokers: a retrospective analysis. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*. 2017; 42: 943-54.
84. Benowitz NL, Hukkanen J, Jacob P 3rd. Nicotine chemistry, metabolism, kinetics and biomarkers. *Handb Exp Pharmacol*. 2009; 192: 29-60.
85. Leone FT, Carlsen KH, Chooljian D et al. Recommendations for the appropriate structure, communication, and investigation of tobacco harm reduction claims. An official American thoracic society policy statement. *Am J Respir Crit Care Med*. 2018; 198: e90-e105.

Finansowanie:

Philip Morris International jest jedynym źródłem finansowania i sponsorem tego opracowania.
Zgodność z normami etycznymi.

Konflikt interesów:

Julia Hoeng, Serge Maeder, Patrick Vanscheeuwijck oraz Manuel C. Peitsch są pracownikami Philip Morris International.

Oświadczenie o prawach człowieka i prawach zwierząt:

Wszystkie procedury obejmujące zwierzęta zostały przeprowadzone w akredytowanym przez AAALAC (American Association for the Accreditation of Laboratory Animal Care) i licencjonowanym przez AVA (Agri-Food & Veterinary Authority of Singapore) ośrodku badawczym za zgodą Komisji Instytucjonalnej Opieki nad Zwierzętami (Institutional Animal Care and Use Committee) oraz wykonane zgodnie z wytycznymi ustanowionymi przez National Advisory Committee for Laboratory Animal Research (NACLAR, 2004). Żadne nowe badania kliniczne nie zostały przeprowadzone na potrzeby niniejszej publikacji.

Świadoma zgoda:

Świadoma zgoda nie ma zastosowania.

Otwarty dostęp:

Niniejszy artykuł jest rozpowszechniany zgodnie z atrybucją Creative Commons 4.0, Licencja Międzynarodowa (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), która pozwala na nieograniczone korzystanie, dystrybucję oraz kopiowanie na dowolnym nośniku pod warunkiem zamieszczenia odpowiedniej informacji o faktycznym autorze (autorach) źródła wraz z linkiem do licencji Creative Commons oraz informacją o zmianach, o ile zostały wprowadzone.