



Nicotine promotes e-cigarette vapour-induced lung inflammation and structural alterations

Elsa T. Roxlau^{1,10}, Oleg Pak^{1,10}, Stefan Hadzic¹, Claudia F. Garcia-Castro ¹, Marija Gredic¹, Cheng-Yu Wu¹, Julia Schäffer¹, Balachandar Selvakumar^{1,2}, Alexandra Pichl¹, David Spiegelberg¹, Janik Deutscher¹, Mariola Bednorz¹, Katharina Schäfer¹, Simone Kraut¹, Djuro Kosanovic^{1,3}, Esraa M. Zeidan^{1,4}, Baktybek Kojonazarov^{1,5}, Susanne Herold¹, Ievgen Strielkov¹, Andreas Guenther¹, Jochen Wilhelm ^{1,5}, Mohamed M.A. Khalifa⁴, Ashraf Taye⁶, Ralf P. Brandes⁷, Matthias Hecker¹, Friedrich Grimminger¹, Hossein A. Ghofrani ^{1,8}, Ralph T. Schermuly¹, Werner Seeger ^{1,5,9}, Natascha Sommer¹ and Norbert Weissmann¹

SUNAN: ARAŞ.GÖR. SAMİRA SÜLEYMANOVA
MODERATÖR : DOÇ.DR.ASLI GÖREK DİLEKTAŞLI

Sunum Planı

- Özet
- Giriş
- Metod
- Sonuç
- Tartışma

ÖZET

Elektronik sigara (e-sigara) buharı

- Tütün içimine bir alternatif olarak popülerlik kazanmaktadır
- Akut akciğer hasarına neden olabilir
- E-sigara buharındaki nikotinin spesifik rolü ,hava yolları, akciğer parankimi ve vasküler yapı üzerindeki uzun vadeli etkileri bilinmemektedir

ÖZET

- **Nikotin içeren e-sigara buharı ekstraktına (N-ECVE)** veya **Nikotinsiz e-sigara buharı ekstraktına (NF-ECVE)** *in vitro* maruziyet, epitel hücrelerinin ve pulmoner arteriyel düz kas hücrelerinin gen ekspresyonunda değişikliklere ,özellikle N-ECVE fonksiyonel değişikliklere neden oluyor
- Ayrıca, **Nikotin içeren e-sigara buharının (N-ECV)** akut inhalyasyonu pulmoner endotelyal geçirgenliği artırdığı görülmüştür

Farelerin 8 ay boyunca N-ECV'ye uzun süreli *in vivo* maruziyeti bronkoalveolar lavajda (BAL) NF-ECV'ye kıyasla inflamatuvar hücrelerin, özellikle de lenfositlerin sayısını önemli ölçüde artırmıştır

	BAL, lenfosit#	Akciğer Dokusu, lenfosit#
Kontrol	37,0±21,1 cells · mL ⁻¹	4,8±1,1 cells · mm ⁻³
N-ECV	853,4±150,8 hücre · mL ⁻¹	25,7±3,3 hücre · mm ⁻³
NF-ECV	198,6±94,9 hücre · mL ⁻¹	14,1±2,2 hücre · mm ⁻³

ÖZET

- Ayrıca, N-ECV akciğer yapısı ve fonksiyonunda hafif tütün maruziyetine sekonder değişikliklere benzer önemli değişikliklere neden olmuştur
- Benzer değişiklikler NF-ECV grubunda da saptanmıştır
- Pulmoner vasküler yapıda değişiklik gözlenmemiştir

ÖZET

► Sonuçlar:

NF-ECV hücre spesifik etkilerle hafif pulmoner değişikliklere yol açarken, N-ECV'de nikotinin varlığı belirgin endotel hasarı, inflamasyon ve parankimal değişikliklere neden olur

GİRİŞ

- Sigara dumanına (CS) kronik maruziyet dünyada 174 milyondan fazla insanı etkileyen Kronik obstrüktif akciğer hastalığının (KOA) önemli bir tetikleyicisidir
- Tütün dumanı oksidatif stresin artmasına ve bağışıklık hücrelerinin aktivasyonuna , sonuç olarak akciğerde hava yolu destrüksiyonuna ve kronik inflamasyona neden olur

GİRİŞ

- **E-sıvı içeriği** (aromalar, nikotin)
- **Teknik özellikleri** (voltaj, sıcaklık)
- **Kullanıcı alışkanlıkları** (nefes süresi, nefes sayısı)

gibi değişken faktörlerin olması

- **e-sigaraların kısa süredir kullanılıyor olması** nedeniyle uzun vadeli etkileriyle ilgili yeterli güvenilir kaynak bulunmamaktadır

GİRİŞ

- Son yıllarda 2600'den fazla e-sigara veya elektronik sigara ürünü ile ilişkili akut akciğer hasarı vakası bildirilmiştir

GİRİŞ

- Akciğer yapısal değişikliklerinin gelişimine ilişkin *in vivo* çalışmalar yapıldı :

-Bazı çalışmalar 4 ay sonra amfizem belirtileri gösterirken , bazıları N-ECVE (18 mg-mL-1) maruziyetinin 8 ay sonra hiçbir etkisi olmadığını göstermektedir

GİRİŞ

- Ayrıca önceki *in vitro* deneyler **içeriklerine** bağılı olarak farklı e-sigara preparatlarının hücre spesifik sitotoksik etkilerinin de farklı olduğunu ortaya koymuştur

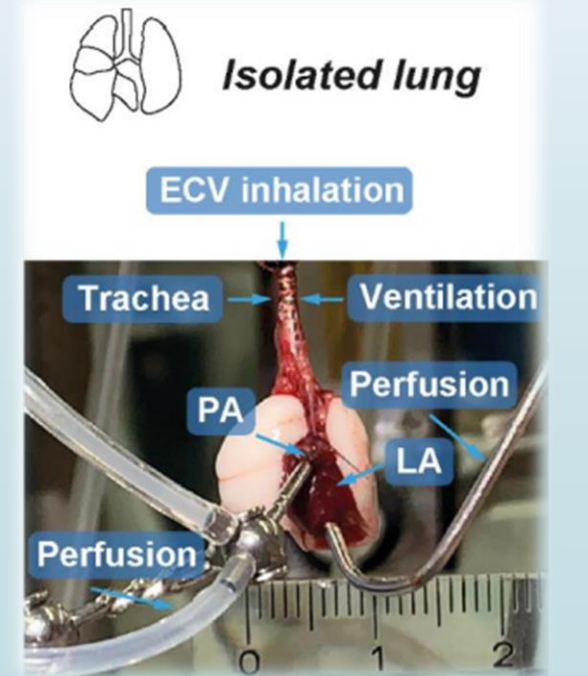
GİRİŞ

Özet olarak bu çalışmada

1. Nikotin içeren e-sigara buharı ekstraktının (N-ECVE) ve nikotin içermeyen e-sigara buharı ekstraktının (NF-ECVE) insan ve fare akciğer hücrelerine *in vitro* etkileri
2. Nikotin içeren e-sigara buharının (N-ECV) ve nikotinsiz e-sigara buharının (NF ECV) fare akciğerlerinde endotel geçirgenliği üzerindeki *ex vivo* etkileri
3. N-ECV ve NF-ECV'nin pulmoner inflamasyon, fonksiyon, yapı ve vasküler yapı üzerindeki uzun süreli *in vivo* etkileri araştırılmıştır

Kullanılan Metotlar

- İzole edilmiş havalandırılmış ve perfüze edilmiş fare akciğerlerinde e-sigara buharı uygulaması
- Hücre kültürü
- Fare pulmoner arter düz kas hücreleri (mPASMC)
- İnsan pulmoner arter düz kas hücreleri (hPASMC)
- Primer fare alveolar epitel tip II hücreleri (mATII)
- 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolyum bromür (MTT)
- LDH sitotoksisite analizi
- Proliferasyon tahlili
- Kantitatif gerçek zamanlı PCR



SONUÇ

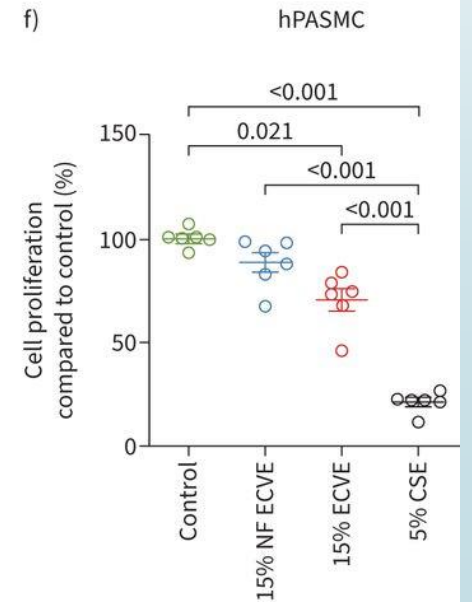
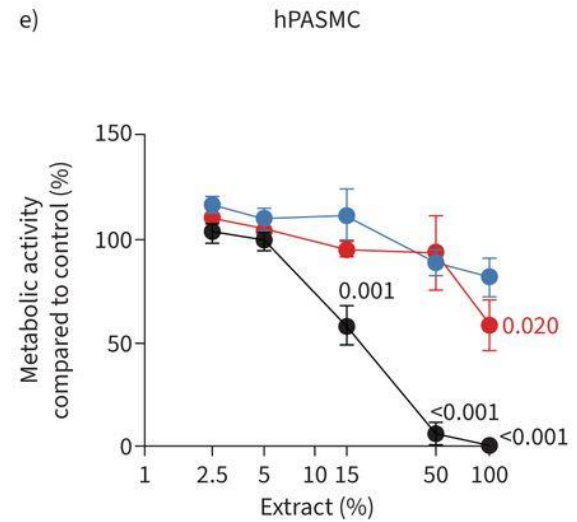
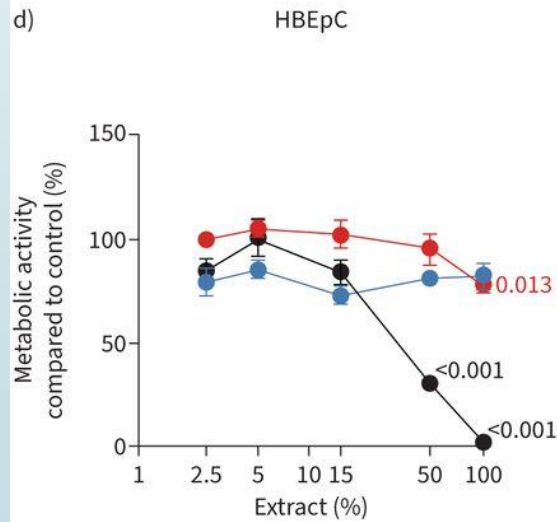
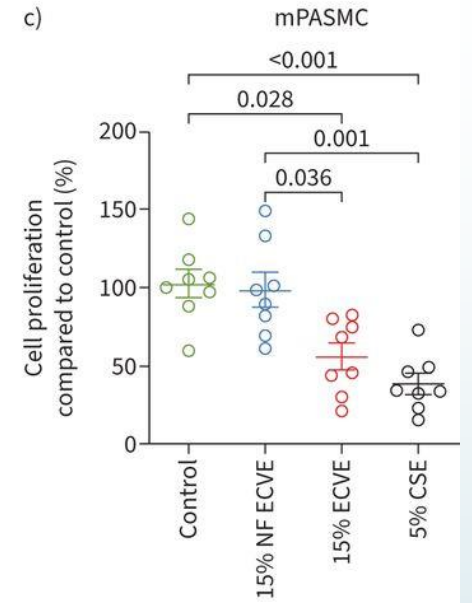
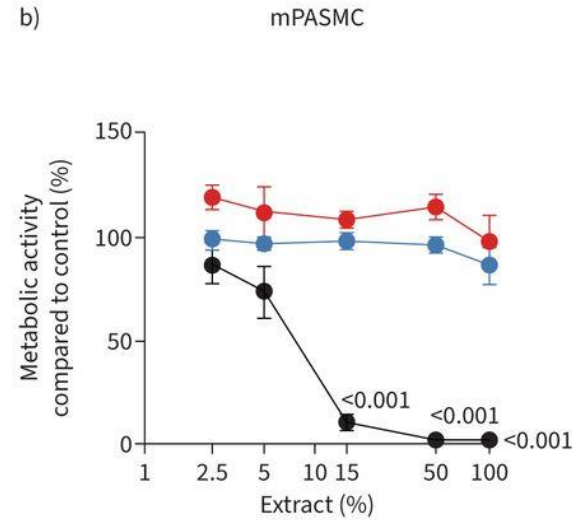
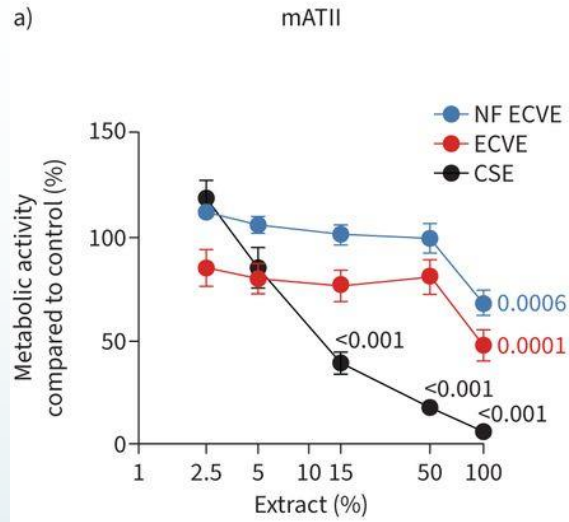
❖ **N-ECVE ve NF ECVE maruziyetinin fare ve insan akciğer hücrelerinin metabolik aktivitesini ve proliferasyonunu farklı şekilde etkilediği görüldü**

- Yüksek doz NF-ECVE tedavisi yalnızca **mATII** hücrelerinde ve **A549** hücrelerinde
- N-ECVE tedavisi ise tüm epitel hücre tiplerinde ve hPASMC'lerde yüksek konsantrasyonlarda metabolik aktiviteyi azaltmıştır
- Düşük doz N-ECVE konsantrasyonları da mPASMC'lerin ve hPASMC'lerin proliferasyonunu azaltmıştır

SONUÇ

- N-ECVE ve NF-ECVE sitotoksik etki göstermemiş veya tedavi edilmemiş kontrollere kıyasla apoptozu indüklememiştir
- CSE'ye maruz kalma ise tüm hücre tiplerinin metabolik aktivitesini ,hücre birleşmesini ve göçünü azaltmış, sitoksisiteye neden olmuş ve apoptozu artırmıştır

SONUÇ



SONUÇ

❖ N-ECVE ve NF ECVE maruziyeti hücre tipine spesifik bir şekilde gen ekspresyonunu değiştirmiştir

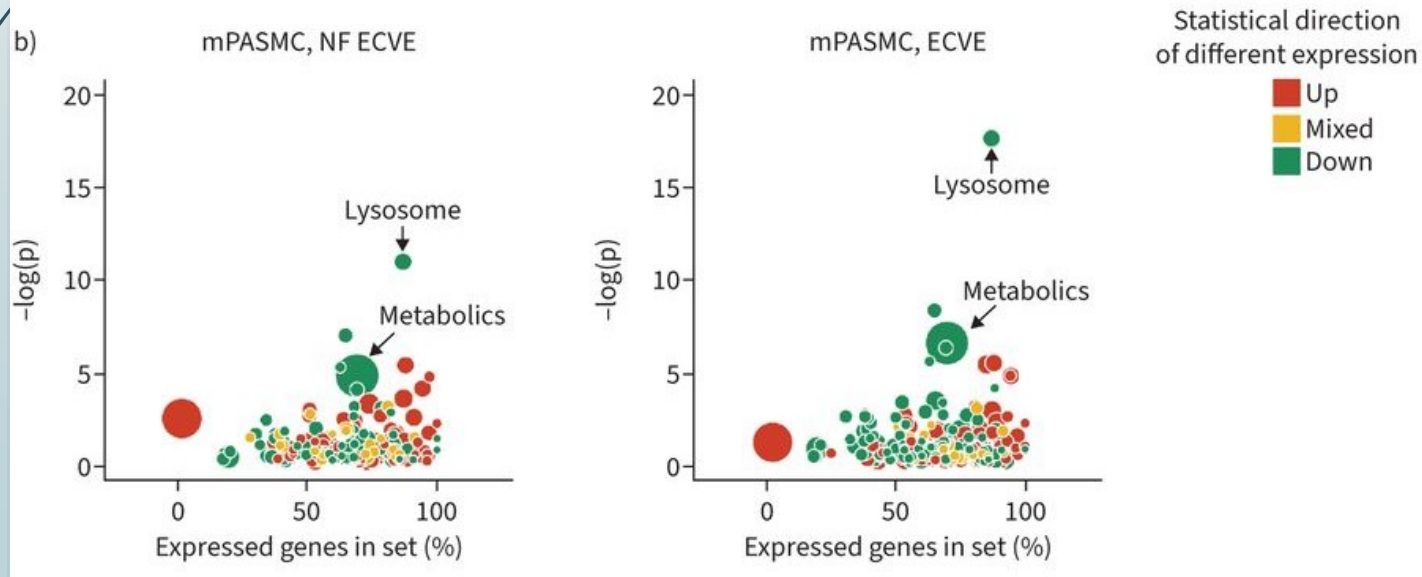
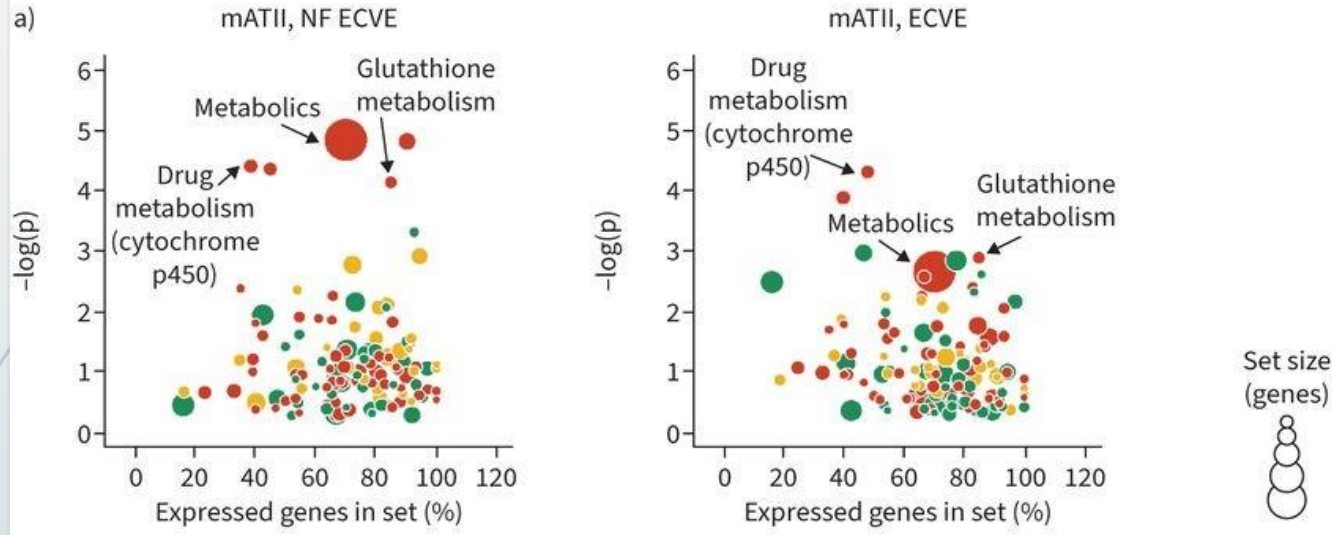
- ▶ mPASMCs ve mATII hücrelerinde sinyal yolları üzerindeki N-ECVE ve NF ECVE etkilerini incelemek için hipotez odaklı ve hipotez odaklı olmayan yaklaşımlar kullanılmıştır
- ▶ İlk olarak, *in vivo* CS maruziyetinden sonra mPASMC'lerde ve mATII hücrelerinde spesifik olarak değişen farklı genler araştırılmıştır
- ▶ NF-ECVE den farklı olarak N-ECVE, mPASMC'lerde spesifik olarak indüklenebilir nitrik oksit sentaz (Nos2) ve siklin A1 (Ccna1) mRNA ekspresyonunu artırmıştır

SONUÇ

- N-ECVE ve NF ECVE maruziyeti sonrası mATII ve mPASMC'lerin mikroarray analizi, bu hücrelerdeki değişikliklerin nikotinden bağımsız olduğunu ortaya koymuştur
- mATII hücrelerinde glutatyonun (GSH) oksitlenmiş glutatyona (GSSG) oranının azaldığı ve otolizozom sisteminin mediatörleri olan mikrotübülle ilişkili proteinler 1A/1B hafif zincir 3B (LC3-II) ve p62'nin mPASMC'lerde azaldığı da gösterildi

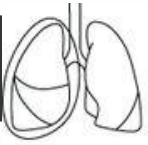


GO enrichment analysis of mRNA

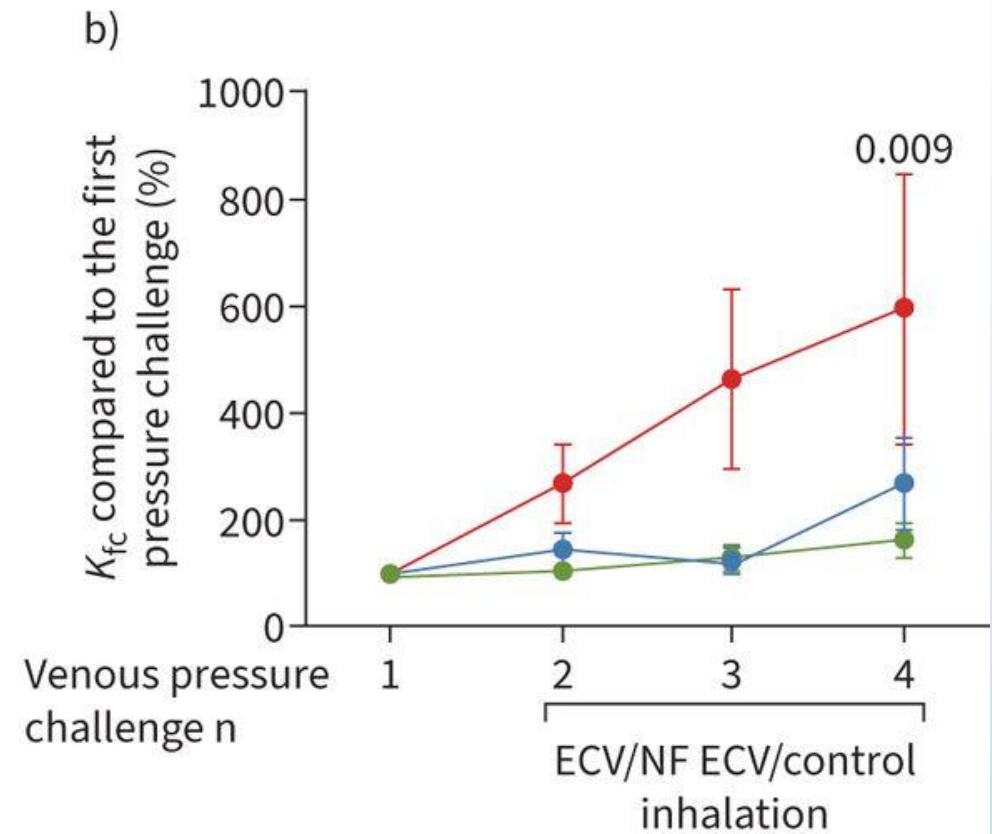
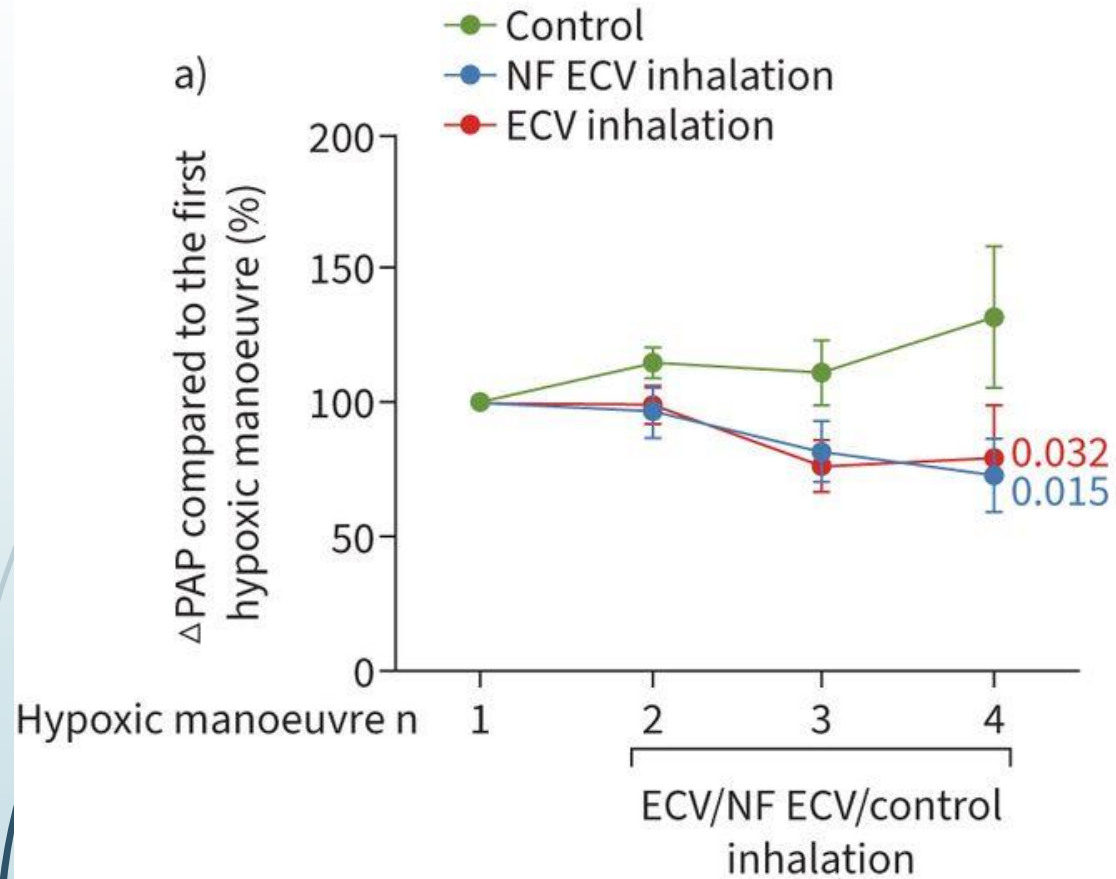


SONUÇ

- ❖ **N-ECV ve NF ECV'nin inhalasyonu endotelial geçirgenliği artirmiştir**
 - Trakea yoluyla tekrarlayan N-ECV veya NF ECV inhalyasyonu her iki grupda pulmoner vazokonstriksiyonu zayıflatmıştır
 - Yalnızca N-ECV'nin solunması kapiller filtrasyon katsayısını (K_{fc}) artirmiştir



Isolated lung



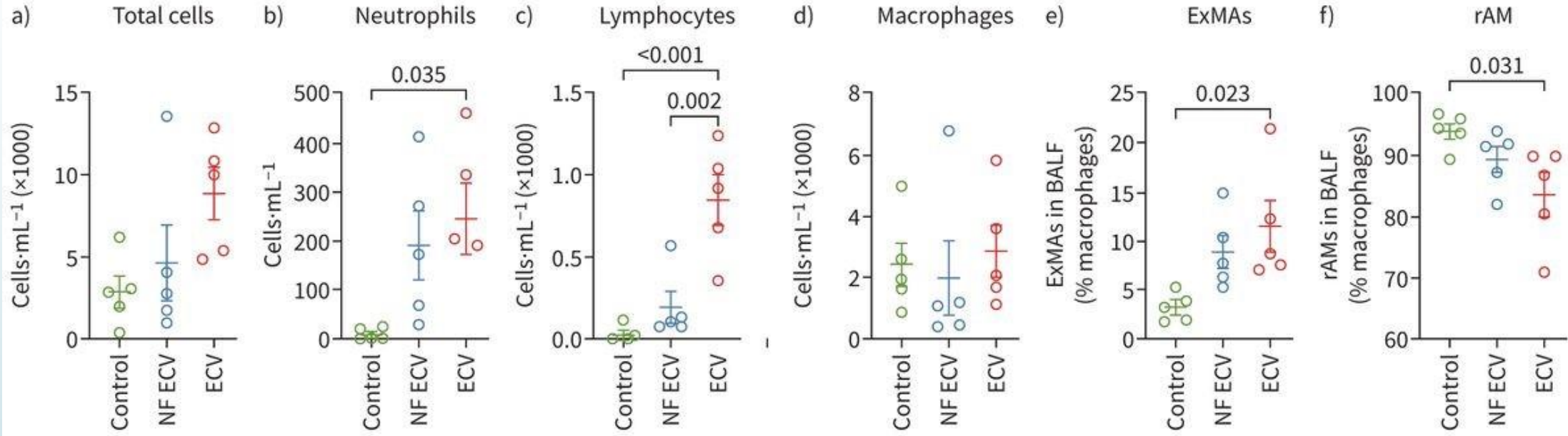
SONUÇ

❖ **Uzun süreli N-ECV maruziyeti pulmoner inflamasyona neden oluyor**

- 8 ay NF ECV veya N-ECV maruziyeti sonrası farelerden alınan BAL'ın flow sitometrisi ve multipleks immünoassay analizi yapılmıştır
- N-ECV'ye maruz kalan farelerin BAL'ında nütrofillerin ve lenfositlerin sayısında önemli ölçüde artış olmuştur
- total makrofaj sayısı değişmemesine rağmen makrofaj popülasyonunu rezident makrofajlardan proinflamatuvar eksüdatif makrofajlara doğru kaydırmıştır



In vivo



SONUÇ

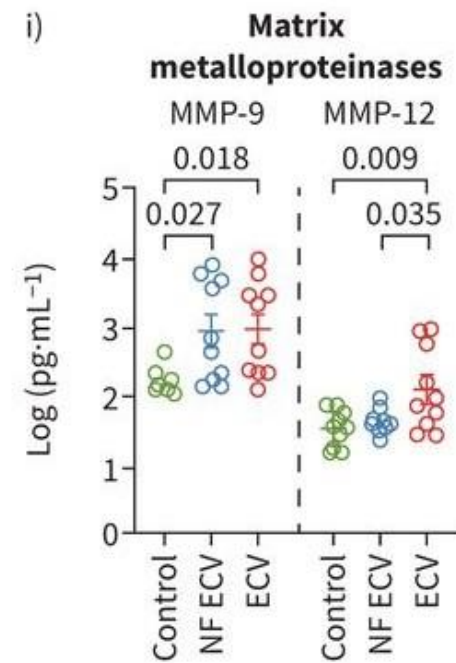
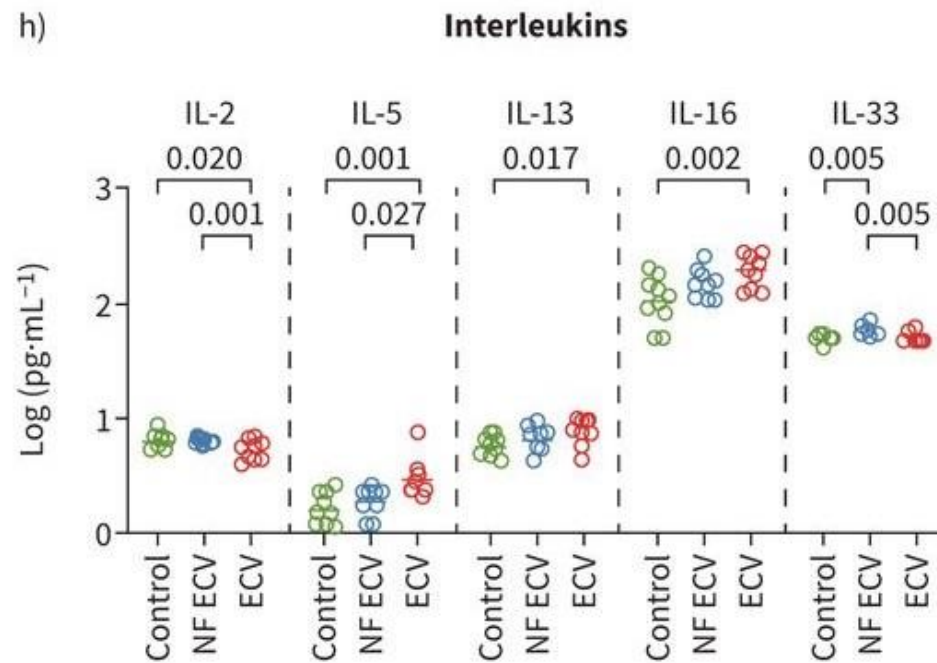
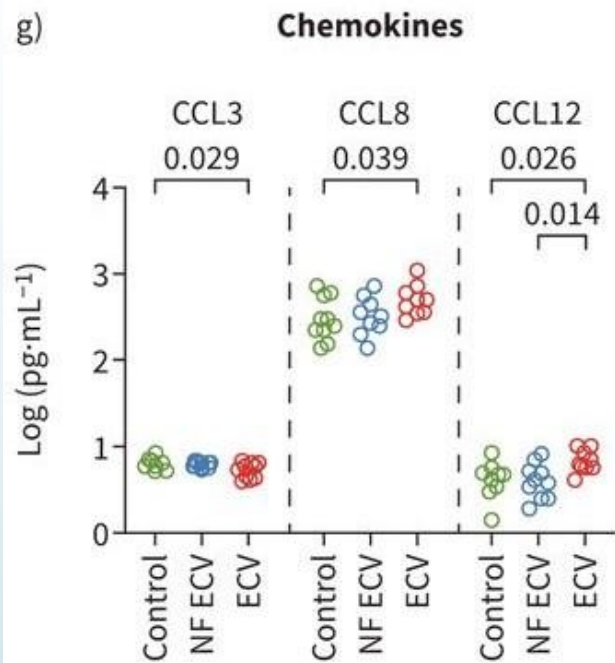
-N-ECV maruziyeti BAL'da

- C-C kemokin ligandlarının (CCL'ler) seviyelerini değiştirdiği:
 - CCL3'ü azaltırken CCL8 ve CCL12 seviyelerini artırdığı
- IL-5, IL-13 ve IL-16'nın seviyelerini artırdığı görüldü

-NF-ECV maruziyeti BAL'da İL-33 seviyelerini artırdığı tespit edildi

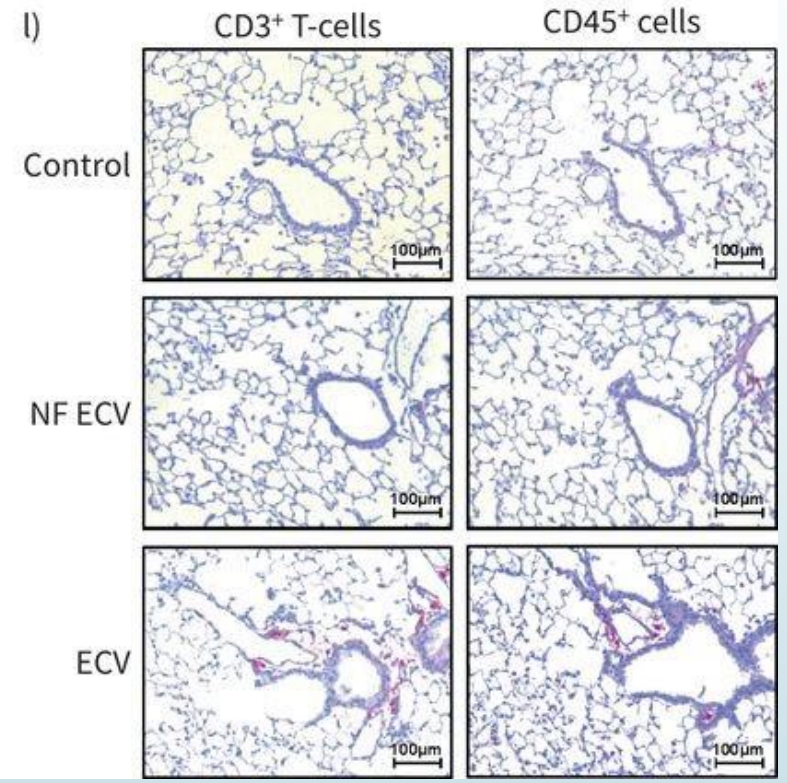
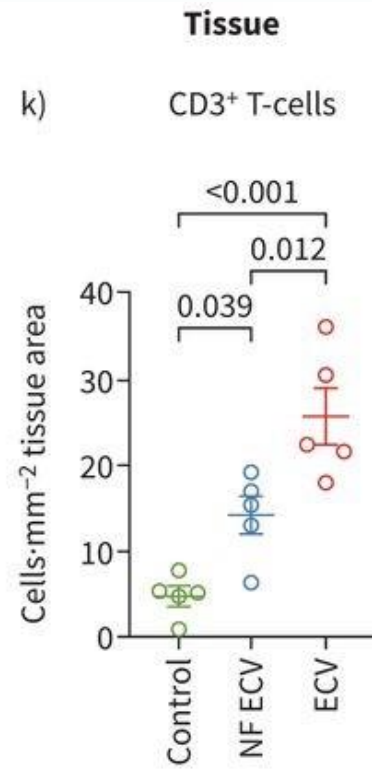
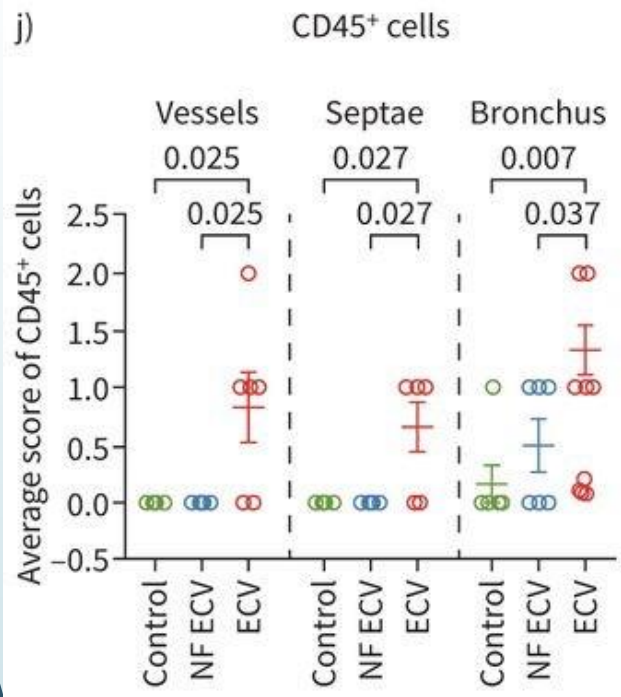
SONUÇ

- N-ECV MMP-9 ve MMP-12 seviyelerini artırırken,
- NF ECV BAL'de sadece MMP-9'u artırmıştır
- Diğer MMP'ler herhangi bir önemli değişiklik ortaya çıkmadı



SONUÇ

- CD45+ için yapılan immunohistokimyasal boyamada N-ECV maruziyeti NF-ECV ile karşılaştırıldığında leykosit birikiminin ve
- CD3+ T-hücrelerinin sayısının da arttığı gösterildi



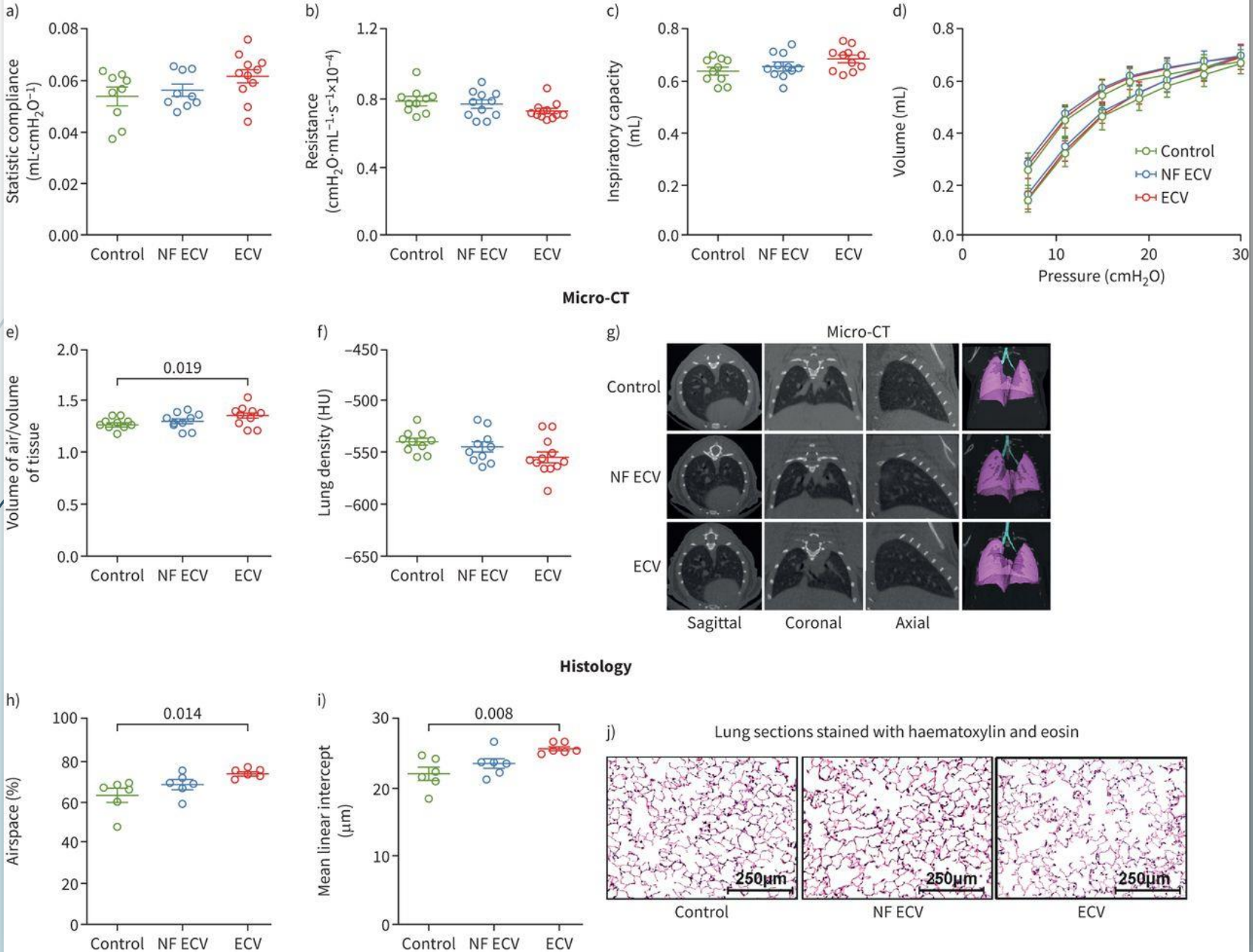
SONUÇ

Uzun süreli ECV maruziyeti akciğerlerin vasküler yapısına etki etmeden yapısal ve fonksiyonel pulmoner değişikliklere neden olmuştur

- ECV'ye *in vivo* maruziyet CS maruziyyeti ile karşılaştırıldığında daha düşük plazma nikotin ve kotinin konsantrasyonları olduğu görüldü
- 8 aylık maruziyet süresince, fareler tüm deney gruplarında benzer kilo artışları göstermiştir
- ECV maruziyyeti olan farelerde hematokrit artışı görüldü

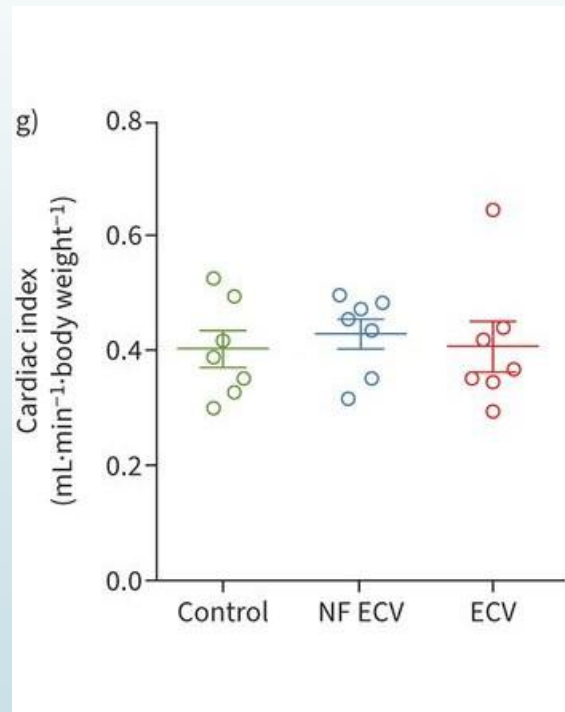
SONUÇ

- ▶ Akciğer fonksiyonun P-değeri meta analizine göre N-ECV'nin CS maruziyeti ile benzer fonksiyonel değişikliklere neden olduğunu göstermektedir. NF ECV grubunda anlamlı farklılıklar tespit edilmedi
- ▶ *in vivo* sadece N-ECV maruziyetinin pulmoner parankimde önemli yapısal değişikliklere neden olduğu mikro-BT görüntüleme ve histolojik analizle gösterilmiştir



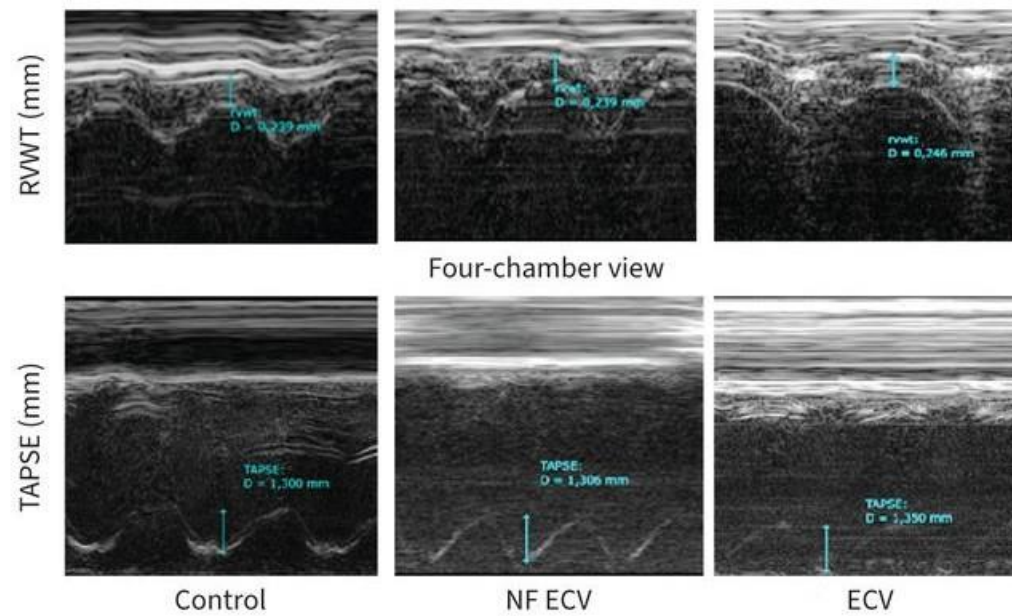
SONUÇ

- uzun süreli N-ECV veya NF ECV maruziyeti sonra PH.da anlamlı değişlikler tespit edilmedi
- Fulton indeksini , sağ ventrikül ve kalp fonksiyonunu önemli ölçüde etkilemediği görüldü



h)

Echocardiography
Modified parasternal short axis



Tartışma :

- Bu alışma N-ECV'nin akut ve kronik akciğer hasarına neden olduğunu göstermektedir
- Hem N-ECV hem de NF ECV *in vitro* pulmoner hücrelerdeki fonksiyonel ve genetik değişiklikler , hava yolu ve parankimal parametreleri etkilemesine rağmen, sadece **N-ECV ex vivo endotelial geçirgenliği** önemli ölçüde artırdı ve uzun süreli maruziyetten sonra CS ile benzer değişiklikler yaptığı görüldü

Tartışma

- *In vitro* deneyler, ECVE ve NF ECVE'nin bazı hücre tiplerinde metabolik aktiviteyi sadece yüksek konsantrasyonlarda azalttığını, ancak sitotoksik etkileri indüklemek veya apoptozu tetiklemek için yetersiz olduğunu gösterdi
- Ayrıca Nikotin, e-sigara buharının metabolik aktivite ve proliferasyon üzerindeki inhibitör etkisini oluşturmaktadır (örn.PASMC'lerde) .
- E-sigara buharı üretiminin genel standardizasyonunun olmaması diğer çalışmalarla karşılaştırma yapılmasını sınırlamıştır

Tartışma

- Bazı çalışmalar nikotin içeriği ve aromasından bağımsız olarak toplanan e-sigara ekstraktlarının **CHO-K1/A549** hücrelerinde hiçbir etkisi olmadığını bildirmiştir
- E-sigara buharına maruz kaldıktan sonra **CALU3** hücre canlılığının doza ve aromaya bağlı olarak azaldığını gözlemlenmiştir

Tartışma

- Son zamanlarda elektronik sigara ile ilişkilendirilen Akut respiratuar distress sendromu (**ARDS**) için fare akciğerlerinde N- ECV inhalasyonunun endotelyal geçirgenlik üzerindeki akut etkilerini araştırdık. N-ECV kapiller geçirgenliği artırdığı ,NF ECV ise artırmadığı görüldü , bu da nikotinin etkisini göstermektedir
- Nikotin vasküler endotel hücrelerinin, PASMC'lerin, hava yolu epitel hücrelerinin ve immun sistem hücrelerinin fonksiyonunu doğrudan değiştirdiği görüldü

Tartışma

- N-ECV'de kullanılan tetrahidrokanabinol veya kannabidiol ARDS ile ilişkili olduğu öne sürülmüş olsa da, verilerimiz e-sigaralardaki nikotinin ARDS gelişimine katkıda bulunabileceğini göstermektedir
- Benzer şekilde CS, pulmoner vasküler geçirgenlik ve endotelyal bariyer fonksiyonundaki değişiklikler nedeniyle ARDS riskini artırmaktadır .
- Endotel geçirgenliğine ek olarak, akut hipoksiye yanıt olarak pulmoner vazoreaktivite, nikotin varlığından bağımsız olarak e-sigara buharından etkilenmiştir

Tartışma

- Bu durum, ECV veya NF ECV'nin, NO-cGMP sinyal yolu ile vazoaaktif mediatörleri etkileyip (CS'ye benzer şekilde) endotelyal salınımını değiştirebileceğini düşündürmektedir

Tartışma

- ▶ BAL analizinde nikotin varlığının CCL8 ve CCL12'deki artışla gösterilen T-hücreleri, eozinofiller ve makrofajlar gibi bağışıklık hücrelerinin birikmesini ve aktivasyonunu arttırdığını ve IL-5 ve IL-13'teki artışla enflamatuvar yanıtı tetiklediğini gösterilmiştir(astım daki mekanizma ile)
- ▶ Bu nedenle,N- ECV'nin alerjik bir reaksiyona neden olduğu ve bronşiyel hiperreaktifliği artırdığı düşünüle bilir

Tartışma

- Nikotin insan BAL'sinde lenfosit seviyelerini artırdığı görüldü
- Çalışmamızda ECV, BAL'de MMP-9 ve MMP-12 seviyelerini önemli ölçüde artırırken, NF ECV sadece MMP-9 seviyelerini artırmıştır.
- MMP-9 ve MMP-12, enflamasyon ve KOAH gelişimi ile ilişkili önemli mediatörlerdir

Tartışma

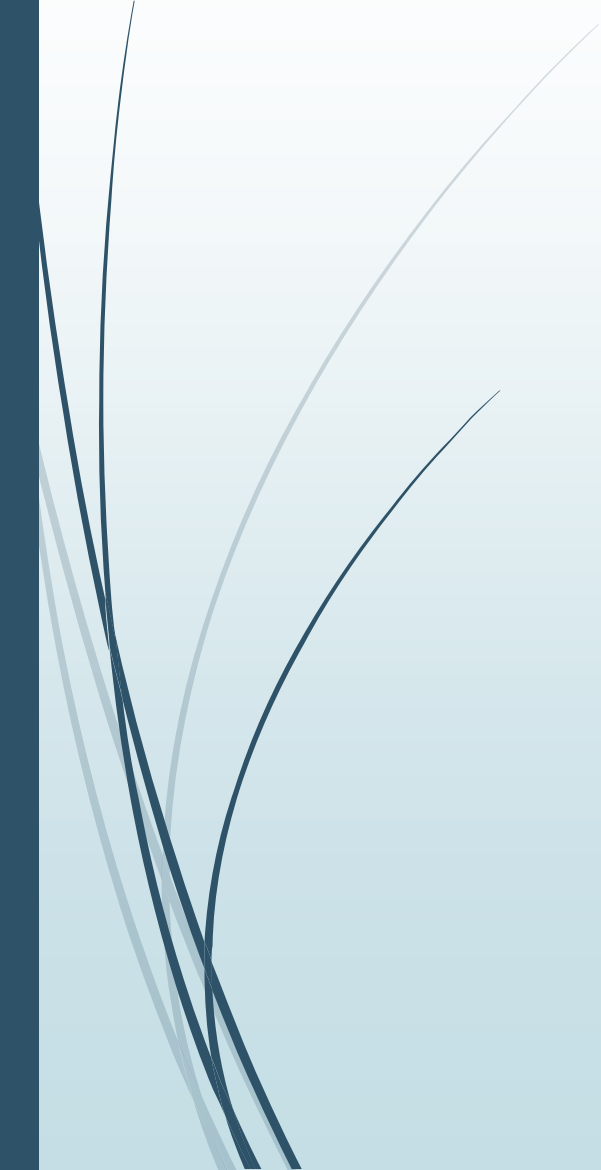
- Çalışmamızdaki $3,8 \pm 0,9$ ng-mL-1 plazma nikotin seviyeleri, insan e-sigara kullanıcılarındaki düşük konsantrasyonlarla karşılaştırılabilir
- Klinik çalışmalarda, e-sigara kullanıcılarının plazmasındaki nikotin seviyeleri, çalışma tasarımına, e-sigara cihazına vb. bağlı olarak ~ 1 ng-mL-1 ile ~ 50 ng-mL-1 arasında değişmektedir.
- İlginç bir şekilde, 3,5 yıl süren prospektif bir insan çalışması, günlük e-sigara kullanan dokuz denekte herhangi bir fonksiyonel veya yapısal değişiklik bulamamıştır

Tartışma

- Akciğer fonksiyonu, hava yolu ve alveolar değişikliklerin aksine, KOAH'ın sık görülen bir komorbiditesi olan PH gelişimini gösteren pulmoner vasküler değişiklikler tespit edilmedi
- kalp fonksiyonu üzerindeki N-ECV'nin neden olduğu herhangi bir değişiklik bulunamadı
- Bu nedenle, ECVE *in vitro* PASMC'yi etkilemesine rağmen, *in vivo* N-ECV pulmoner vasküler remodellingi etkilememiştir

Tartışma

- Özet olarak, e-sigara buharındaki nikotin varlığının akut endotel hasarı, pulmoner inflamasyon ve kronik pulmoner fonksiyonel ve yapısal değişiklikleri artırdığı gösterildi



TEŐEKKÖR EDERİM