

Хрипач Л.В., Михайлова Р.И., Журков В.С., Князева Т.Д., Алексеева А.В., Савостикова О.Н., Коганова З.И., Водякова М.А., Салихова Д.И., Малюгина А.В.

БИОХИМИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ПОВРЕЖДЕНИЯ ОРГАНИЗМА ПРИ ПЕРОРАЛЬНОМ ВВЕДЕНИИ КРЫСАМ ОДНОСЛОЙНЫХ УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБОК В КОМБИНАЦИИ С АНТИОКСИДАНТНЫМ ПРЕПАРАТОМ «АЕВИТ»

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 119121, Москва

Введение. Токсичность химически инертных углеродных нанотрубок (УНТ) связывают с развитием асептического воспаления, в котором большую роль играет окислительный стресс. Данное исследование было проведено с целью установить, в какой степени введение антиоксидантов может снизить повреждающее действие УНТ в опыте на лабораторных животных.

Материал и методы. Самцам крыс Wistar вводили внутривидовым зондом взвесь однослойных УНТ марки Tuball в растительном масле в дозах 0,05 и 0,5 мг/кг/день в течение двух недель без модификатора или в комбинации с препаратом «Аевит» (смесь ретинола и α -токоферола в дозах 25 000 МЕ/кг/день и 25 мг/кг/день соответственно). Контрольным животным вводили растительное масло или «Аевит» без УНТ. В пробах крови животных определяли 10 показателей окислительного стресса и 12 клинико-лабораторных показателей состояния организма.

Результаты. «Аевит» не влиял на использованные показатели, но в комбинации с УНТ усиливал его прооксидантное действие и вызывал появление биохимических маркеров мальабсорбции предположительно за счёт замедления ретинолом репарации эпителиоцитов кишечника, повреждаемых нанотрубками.

Обсуждение. Отсутствие защитного действия со стороны токоферола, который обычно снимает прооксидантные эффекты повышенных концентраций ретинола, можно объяснить наложением двух механизмов: 1) два компонента препарата «Аевит» при введении его с УНТ, возможно, разделяются в пространстве, поскольку только ретинол имеет изопреноидную боковую цепь, необходимую для образования донорно-акцепторных комплексов с поверхностью УНТ; 2) влияние ретинола на процессы размножения, дифференцировки и заживления ран не связано с его анти- или прооксидантными свойствами и осуществляется на уровне транскрипции генов-мишеней путём связывания ретиноевой кислоты с ядерными рецепторами RARs и RXRs. Полученные данные позволяют предположить, что механизмом увеличения заболеваемости раком легкого в группах риска проектов ATBC и CARET является не прооксидантное действие ретинола и его предшественника β -каротина, а регуляторное торможение ретиноевой кислотой скорости репарации эпителиоцитов легочной ткани, повреждаемых компонентами сигаретного дыма и волокнами асбеста.

Заключение. «Аевит» (и, по-видимому, любые препараты, содержащие ретиноиды) не может быть рекомендован для обеспечения безопасности организма человека и животных при пероральном поступлении УНТ. Объяснить полученные данные можно только сочетанием двух функциональных активностей ретинола, являющегося антиоксидантом и одним из регуляторов дифференцировки, что, в свою очередь, приводит к новому предположению о механизмах неудачного завершения проектов ATBC и CARET.

Ключевые слова: крысы Wistar; однослойные углеродные нанотрубки; ретинол; α -токоферол; пробы крови; биохимические показатели; окислительный стресс; мальабсорбция.

Для цитирования: Хрипач Л.В., Михайлова Р.И., Журков В.С., Князева Т.Д., Алексеева А.В., Савостикова О.Н., Коганова З.И., Водякова М.А., Салихова Д.И., Малюгина А.В. Биохимические маркеры повреждения организма при пероральном введении крысам однослойных углеродных нанотрубок в комбинации с антиоксидантным препаратом «Аевит». Гигиена и санитария. 2018; 97(11): 1122-6. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0016-9900-2018-97-11-1122-6>

Для корреспонденции: Хрипач Людмила Васильевна, доктор биол. наук, зав. лаб. биохимических и молекулярно-генетических методов исследования ФГБУ «ЦСП» МЗ РФ. E-mail: lkhrpach@mail.ru

Khripach L.V., Mikhaylova R.I., Zhurkov V.S., Knyazeva T.D., Alekseeva A.V., Savostikova O.N., Koganova Z.I., Vodyakova M.A., Salikhova D.I., Malyugina A.V.

BIOCHEMICAL MARKERS OF DAMAGE IN RATS EXPOSED BY ORAL GAVAGE TO SINGLE-WALLED CARBON NANOTUBES IN COMBINATION WITH ANTIOXIDANT PREPARATION "AEVIT"

Centre for Strategic Planning, Russian Ministry of Health, Moscow, 119991, Russian Federation

Introduction. The toxicity of carbon nanotubes (CNT), which are chemically inert particles, is thought to be connected with responses of aseptic inflammation and oxidative stress. This study was conducted to determine how far antioxidants may reduce CNT toxicity in laboratory animals.

Material and methods. Male Wistar rats were administered by oral gavage with 0.05 or 0.5 mg/kg/day of Tuball© single-walled CNT in vegetable oil for 2 weeks, without a modifier or in combination with Aevit© (mixture of retinol and α -tocopherol given in doses 25,000 IU/kg/day and 25 mg/kg/day correspondingly). Control animals received oil or Aevit without CNT. 10 markers of oxidative stress and 12 clinical chemistry markers were determined in the rat blood samples.

Results. Aevit didn't influence the above biochemical markers, but combination "Aevit + CNT" increased the prooxidant action of CNT and arose biochemical signs of malabsorption, presumably as a result of retinol inhibitory action onto repair of intestinal epithelial cells, damaged by CNT.

Discussion. The lack of tocopherol protective action, which usually removes prooxidant effects of high retinol concentrations, can be explained by superposition of two mechanisms: 1) two components of Aevit, in the presence of CNT, may be separated in space, since only retinol has isoprenoid side chain needed for the formation of donor-acceptor complexes with CNT surface; 2) the effects of retinol on cell reproduction, differentiation and wound healing is not related to its anti- or pro-oxidant properties but takes place at the level of target genes transcription after binding of retinoic acid with nuclear receptors RARs and RXRs. The data obtained allowed supposing the mechanism of lung cancer increases in ATBC and CARET trials was not prooxidant action of retinol and its precursor β -carotene, but regulatory inhibition of lung epitheliocytes reparation during its continued damage by cigarette smoke and asbestos fibers by retinoic acid.

Conclusion. *Aevit (and, probably, other retinoid-containing preparations) can't be recommended to ensure the safety of humans and animals during oral CNT intake. The results obtained explanation needs both functional activities of retinol, which is simultaneously antioxidant and one of the nuclear regulators; this, in turn, leads to the new assumption about the mechanisms of unsuccessful outcomes in ATBC and CARET trials.*

Key words: *Wistar rats; single-walled carbon nanotubes; retinol; α -tocopherol; blood samples; biochemical markers; oxidative stress; malabsorption.*

For citation: Khripach L.V., Mikhaylova R.I., Zhurkov V.S., Knyazeva T.D., Alekseeva A.V., Savostikova O.N., Koganova Z.I., Vodyakova M.A., Salikhova D.I., Malyugina A.V. Biochemical markers of damage in rats exposed by oral gavage to single-walled carbon nanotubes in combination with antioxidant preparation "Aevit". *Gigiena i Sanitariya (Hygiene and Sanitation, Russian journal)* 2018; 97(11): 1122-6. (In Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0016-9900-2018-97-11-1122-6>

For correspondence: *Ludmila V. Khripach*, MD, Ph.D., DSci., head of the Laboratory of biochemical methods and methods of molecular genetics, Centre for Strategic Planning, Russian Ministry of Health, Moscow, 119991, Russian Federation. E-mail: lkhrpach@mail.ru

Information about authors: Khripach L.V., <http://orcid.org/0000-0003-0170-3085>.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

Received: 11 December 2017

Accepted: 18 October 2018

Введение

Всестороннее изучение наноматериалов, в том числе оценка их безопасности, является одним из приоритетных направлений современных естественных наук. В соответствии с этим приоритетным направлением за последние годы нами был проведён ряд экспериментов по изучению влияния нано- и микрочастиц на биохимические показатели состояния организма лабораторных животных. В одном из этих исследований было показано, что хроническое введение крысам многослойных углеродных нанотрубок [УНТ] марки «Таунит» в концентрациях 0,75 и 1,5 мг/л питьевой воды (расчётные дозы 0,04 и 0,07 мг/кг/сутки) сопровождалось выраженными изменениями изучавшихся биохимических показателей в пробах крови животных, с увеличением показателей окислительного стресса на ранние сроки эксперимента и изменением содержания в крови маркеров повреждения печени и почек, начиная с пяти недель [1].

В данной работе мы публикуем результаты подострого эксперимента по введению крысам однослойных УНТ, которые, по литературным данным, считаются более опасными, чем многослойные, в силу своей повышенной жёсткости [2]. Поскольку углеродные наноматериалы являются химически инертными, их токсичность обычно связывают с развитием асептического воспаления, в котором большую роль играет окислительный стресс. Поэтому в качестве модификатора повреждающего действия УНТ в данном эксперименте был выбран известный фармакологический препарат «Аевит» – смесь антиоксидантных витаминов А и Е.

Материал и методы

В эксперименте использовались самцы крыс линии Wistar развозки Филиала «Андреевка» ФГБУН «НЦБМТ» ФМБА РФ с исходным весом 170–200 г. Препарат однослойных УНТ марки Tuball [3] (OCSiAl, внешний диаметр 1–3 нм) в виде взвеси в растительном масле вводили животным внутрижелудочным зондом в дозах 0,05 и 0,5 мг/кг в день в течение двух недель. Содержимое капсул «Аевит» растворяли в растительном масле в 200 раз и вводили крысам внутрижелудочно в количестве 1 мл на 100 г массы тела, что соответствовало введению 25 мг/кг α -токоферола и 25 000 МЕ/кг ретинола в день также в течение двух недель. Расчет доз «Аевит» был ориентирован на верхнюю границу рекомендуемой суточной дозы для человека (3 капсулы в день) и пересчитывался с помощью межвидовых коэффициентов, учитывающих соотношение массы и поверхности тела [4]. Контрольной группе крыс вводили эквивалентное количество растительного масла.

В пробах крови животных определяли следующие биохимические показатели окислительного стресса: интенсивность люминол-зависимой хемилюминесценции сыворотки крови [5], её антирадикальную активность с использованием стабильного радикала 2,2-дифенил-1-пикрилгидразила [6], содержание малонового диальдегида [7] и восстановленного глутатиона [8] в гемолизатах, активность антиоксидантных

ферментов супероксиддисмутазы [9], каталазы [10], глутатионпероксидазы [11] и глутатионредуктазы [12] в гемолизатах. Кроме того, в сыворотке крови животных определяли активность лизосомального фермента β -N-ацетилглюкозаминидазы [12], содержание кортизола с использованием тест-наборов для иммуноферментного анализа «Кортизол-ИФА-БЕСТ» (ЗАО «Вектор-Бест», РФ) и ряд стандартных клинико-лабораторных показателей состояния организма (содержание в сыворотке общего белка, альбумина, креатинина, общего холестерина, триглицеридов, фосфора и глюкозы; сывороточную активность трансаминаз АЛТ/АСТ, щелочной фосфатазы, лактатдегидрогеназы и α -амилазы) с использованием клинических тест-наборов и контрольных материалов марки SpinReact (SpinReact S.A., Испания).

Статистический анализ полученных данных проводился с использованием компьютерной программы Statistica for Windows v. 7.0. Достоверность межгрупповых различий перенных определяли двусторонним тестом Манна – Уитни.

Результаты

Как показано в таблице, только для 4 из 22 использованных нами биохимических показателей состояния организма были найдены достоверные межгрупповые различия, причём почти все они были получены в группе животных, получавших по 0,5 мг/кг/день УНТ в комбинации с антиоксидантным препаратом «Аевит». К этим достоверно изменявшимся показателям относятся следующие: активность антиоксидантных ферментов глутатионредуктазы (ГР) и супероксиддисмутазы (СОД) в гемолизатах, содержание восстановленного глутатиона (GSH) в гемолизатах и содержание триглицеридов (ТГ) в сыворотке крови. Остальные 18 биохимических показателей, перечисленных в разделе «Материал и методы», не имели достоверных межгрупповых различий.

В целом полученные нами данные, представленные в таблице и на рис. 1–3, свидетельствуют о следующих закономерностях. Введение крысам УНТ в дозе 0,05 мг/кг/день (отдельно или в комбинации с «Аевит», как и введение «Аевит» без УНТ) не приводило к достоверным изменениям изучавшихся биохимических показателей по сравнению с контрольной группой животных. При увеличении дозы УНТ до 0,5 мг/кг/день выявлено достоверное изменение одного из 22 показателей – снижение активности защитного фермента ГР в гемолизатах на 38% ($p = 0,008$).

Введение этой же дозы УНТ в комбинации с «Аевит» защищало животных от снижения активности ГР – небольшой эффект оставался (рис. 1), но он уже был, по крайней мере, формально, статистически недостоверным (см. таблицу, $p = 0,052$). Однако параллельно возникли достоверные изменения двух других показателей окислительного стресса – снижение содержания GSH в клетках крови на 20%; $p = 0,01$ и увеличение в них активности СОД на 13,5%; $p = 0,026$ (см. таблицу и рис. 1). Кроме того, на фоне «Аевит» наблюдалось дозозависимое снижение содержания ТГ в сыворотке крови крыс (рис. 2) с достоверным трендом индивидуальных значений в ряду «Аевит» – «0,05 мг/кг/день

Достоверные межгрупповые различия биохимических показателей в пробах крови подопытных крыс ($M \pm SE$)*

Группа	Глутатионредуктаза, ммоль/час/л	Глутатион, мкмоль/л	Супероксиддисмутаза, мкмоль/мин/мл	Триглицериды, ммоль/л
Контроль (введение растворителя – растительного масла)	58,4 ± 5,1	611 ± 30	5,2 ± 0,2	1,67 ± 0,26
Введение УНТ в дозе 0,05 мг/кг/день	64,5 ± 7,3	550 ± 68	5 ± 0,5	1,73 ± 0,13
Введение УНТ в дозе 0,5 мг/кг/день	36,4 ± 4,3	619 ± 33	4,7 ± 0,4	1,54 ± 0,15
Введение препарата «Аевит»	45,4 ± 5,9	560 ± 38	5,1 ± 0,4	1,88 ± 0,16
Введение УНТ в дозе 0,05 мг/кг/день в комбинации с препаратом «Аевит»	53,8 ± 4,4	522 ± 30	4,7 ± 0,3	1,53 ± 0,22
Введение УНТ в дозе 0,5 мг/кг/день в комбинации с препаратом «Аевит»	44,3 ± 3,9	488 ± 29	5,9 ± 0,2	1,26 ± 0,06
	$p = 0,008$ (1)	$p = 0,01$ (1)	$p = 0,026$ (1)	$p = 0,008$ (4)
		$p = 0,01$ (3)	$p = 0,01$ (3)	$p = 0,07$ (3)

Примечание. * – данные для остальных 18 показателей, перечисленных в разделе «Материал и методы», но не имевших достоверных межгрупповых различий, опущены; в скобках – номер группы крыс, по отношению к которой определялась достоверность различий.

УНТ+Аевит» – «0,5 мг/кг/день УНТ+Аевит» ($N = 18$; $R = -0,579$; $p = 0,012$) и достоверным уравнением «доза – эффект»:

$$TG = 1,2022 - 0,2305 \cdot (\lg_{10} D_{\text{УНТ}}),$$

где TG – содержание триглицеридов в сыворотке крови крыс в мМ; $D_{\text{УНТ}}$ – доза УНТ в мг/кг/день при внутривенном введении в течение двух недель; \lg_{10} – десятичные логарифмы суточной дозы УНТ (при логарифмировании доза 0 мг/кг/день заменена на дозу 0,001 мг/кг/день).

Ни один из этих трёх эффектов не был найден у животных, получавших УНТ без добавления «Аевит» (см. таблицу). Следует также отметить, что вышеприведённое уравнение содержания TG в сыворотках крыс, получавших УНТ в комбинации с «Аевит», было единственным достоверным уравнением «доза–эффект» в данном исследовании, хотя монотонные изменения среднегрупповых значений или медиан при увеличении дозы УНТ наблюдались и для других показателей. Наиболее

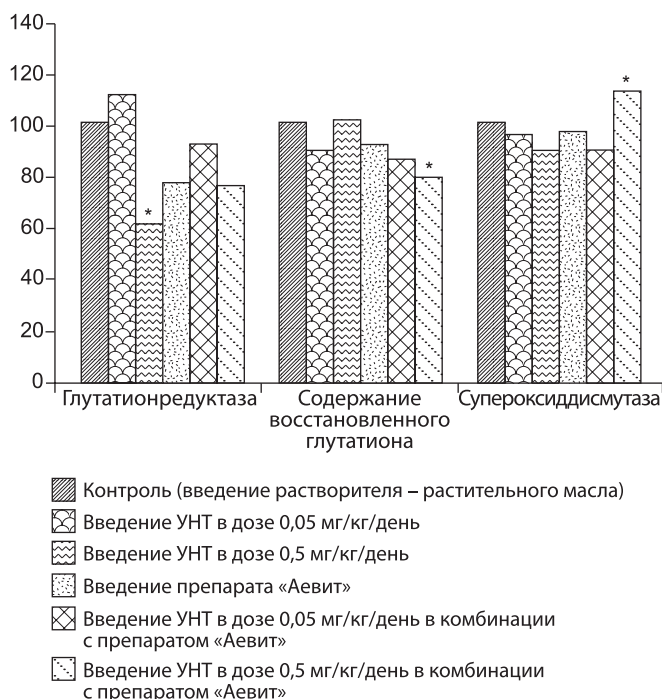


Рис. 1. Активность глутатионредуктазы, супероксиддисмутазы и содержание восстановленного глутатиона, выраженные в процентах от соответствующих контрольных значений, в пробах крови крыс после 2-недельного внутривенного введения УНТ Tuball в дозах 0; 0,05 и 0,5 мг/кг/день и после введения этих же доз УНТ в комбинации с препаратом «Аевит».

близким к достоверному был тренд снижения сывороточных концентраций *GSH* у крыс, получавших УНТ в комбинации с «Аевит» ($n = 20$; $R = -0,350$; $p = 0,13$); все остальные показатели давали уравнения с значениями $p > 0,2$ или изменялись немонотонно.

Дозозависимое снижение сывороточной концентрации TG при введении УНТ на фоне «Аевит», по-видимому, связано с развитием синдрома мальабсорбции (снижение скорости всасывания питательных веществ в тонком кишечнике при деструктивных и воспалительных процессах в его слизистой оболочке). В пользу такого механизма свидетельствуют параллельные тренды изменения некоторых других клинико-лабораторных показателей, не достигающие границы достоверности, но характерные именно для синдрома мальабсорбции (см. рис. 3). Увеличение активности щелочной фосфатазы и снижение активности трансаминаз считаются ранними проявлениями этого синдрома и интерпретируются обычно как последствия нарушения всасывания витаминов *D* и *B6* соответственно; значительно позднее начинает падать содержание в сыворотке общего белка и содержание гемоглобина в эритроцитах.

Обсуждение

Цитоморфологические признаки повреждения эпителиоцитов ЖКТ при пероральном введении однослойных и многослойных УНТ описывались неоднократно [13, 14], но в этом ис-

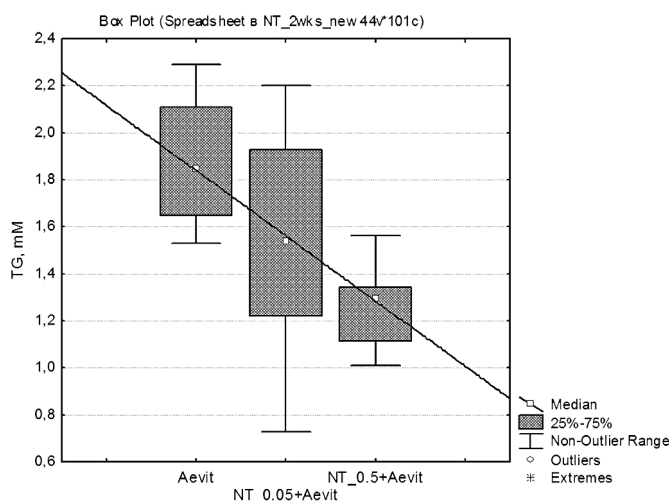


Рис. 2. Зависимость «доза УНТ – эффект» для содержания триглицеридов в сыворотке крови крыс при введении УНТ Tuball в дозах 0; 0,05 и 0,5 мг/кг/день в комбинации с «Аевит». Тренд индивидуальных значений TG в ряду «Аевит» – «0,05 мг/кг/день УНТ+Аевит» – «0,5 мг/кг/день УНТ+Аевит»: $[TG] = 1,2022 - 0,2305 \lg_{10} D$ ($r = -0,579$; $p = 0,012^*$; $N = 18$)

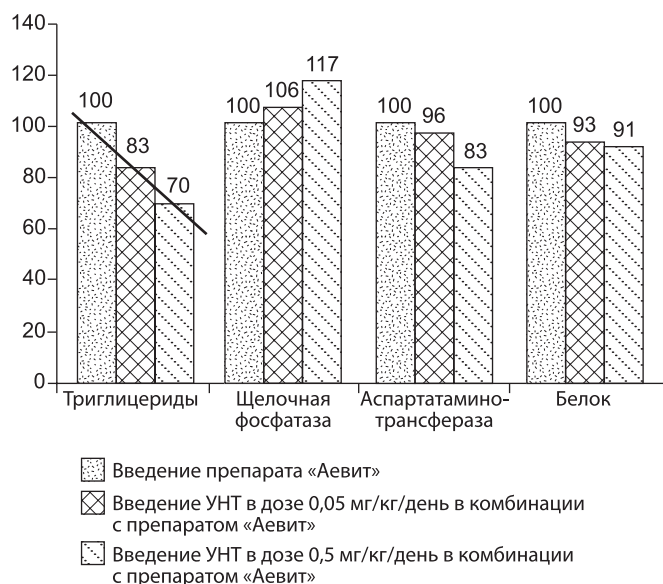


Рис. 3. Зависимости «доза УНТ – эффект» для содержания триглицеридов (ТГ), общего белка, активностей щелочной фосфатазы (ЩФ) и аспартатаминотрансферазы (АСТ) в сыворотке крови крыс после 2-недельного внутривидеального введения УНТ Tuball в дозах 0; 0,05 и 0,5 мг/кг/день в комбинации с «Аевит». Данные представлены в процентах от соответствующих значений в группе «Аевит». Тренд индивидуальных значений достоверен только для содержания ТГ.

следовании биохимические маркеры мальабсорбции появлялись только при введении УНТ в комбинации с «Аевит». Учитывая растущее количество работ по неблагоприятным последствиям применения повышенных доз ретиноидов в опытах на культурах клеток и лабораторных животных [15–21], можно достаточно уверенно предположить, что входящий в состав «Аевит» ретинол тормозил скорость репарации повреждённых нанотрубками участков слизистой оболочки ЖКТ. Неблагоприятные эффекты повышенных концентраций ретиноидов, которые проявляются не всегда, но во многих случаях, авторы вышеперечисленных работ связывали с накоплением соответствующих радикальных форм, способных инициировать свободнорадикальные реакции, в результате чего антиоксидантный эффект ретиноидов сменялся на прооксидантный.

Проведённый нами эксперимент находится в одном ряду с вышеперечисленными работами по следующим позициям:

Использованная нами доза ретинола (26000 МЕ/кг/день, см. раздел «Материал и методы») достаточно высока; в частности, она на порядок превосходит минимальную дозу, при которой Oliveira с соавт. [15] в сходных экспериментальных условиях (внутрижелудочное введение ретинола крысам Wistar в течение 7 дней в диапазоне доз 1000–9000 МЕ/кг/день) уже обнаруживали небольшие, но достоверные изменения показателей окислительного стресса в гомогенатах печени животных.

Среди цитированных выше работ [15–21] встречаются и такие, в которых ретинол вызывал признаки повреждения тест-объекта только в комбинации с дополнительным воздействием (принудительной физической нагрузкой крыс [17] или облучением клеток мышиной лимфомы ультрафиолетом [20]), что полностью соответствует полученным нами эффектам.

В то же время описанные к настоящему времени прооксидантные эффекты повышенных доз ретинола относятся к его введению в виде чистого вещества и снимаются добавлением токоферола [16], а в нашем эксперименте использовалась смесь ретинола с токоферолом в виде готового препарата «Аевит». Анализируя литературные данные по химическим и биологическим свойствам ретинола более широко, можно выделить, по крайней мере, две причины, по которым защитная комбинация «ретинол + токоферол» не сработала в проведённом нами опыте.

Два компонента «Аевит» при введении его с углеродными нанотрубками, возможно, разделяются в пространстве, т. к. в работе [23] показано, что изопреноидная боковая цепь ретинола, β -каротина и ликопена обеспечивает их быстрое связывание с наружной и внутренней поверхностями однослойных УНТ с образованием электронных донорно-акцепторных комплексов. Возможность аналогичного связывания токоферолов с поверхностью УНТ не изучалась, но с точки зрения механизма, постулированного в статье [23], такое взаимодействие маловероятно, т. к. связывающееся вещество должно иметь конъюгированные двойные связи атомов углерода, аналогичные имеющимся на поверхности УНТ, а боковая цепь токоферолов не содержит двойных связей. Поэтому не исключено, что входящий в состав «Аевит» токоферол всасывался в кровь, а часть ретинола оставалась в депонированном виде в кишечнике и оказывала преимущественно местное действие.

Токоферол может подавить прооксидантный эффект повышенных концентраций ретинола, но не может нейтрализовать эффекты ретинола как сигнальной молекулы. Согласно современным представлениям, влияние ретиноидов на процессы размножения и дифференцировки клеток (и, следовательно, на скорость репарации эпителиоцитов кишечника крыс в нашем эксперименте) осуществляется на уровне транскрипции генов путём связывания активного метаболита – ретиноевой кислоты – со специфическими ядерными рецепторами двух типов, *RARs* и *RXR*s. Антиоксидантные свойства ретинола не играют в этом механизме никакой роли. В настоящее время найдено более 100 различных генов-мишеней, участвующих в процессах эмбрионального развития, дифференцировки или опухолевого роста, для которых доказано или предполагается наличие в промоторах участков связывания с гетеродимерами *RAR* – *RXR* [22]. В экспериментах на животных показано, что предобработка кожи или роговицы глаза ретиноидами до нанесения раны ускоряет эпителизацию, в то время как местное или системное введение ретиноидов на фоне уже имеющегося повреждения эпителия (вариант, соответствующий условиям нашего опыта) замедляет процесс заживления раны [24–28].

Таким образом, проведённый нами эксперимент, благодаря использованию не вполне обычного прооксидантного фактора, впервые устанавливает связь между двумя разобщёнными «кондитами» неблагоприятных эффектов ретиноидов, сформированными в рамках свободнорадикальной и репаративной биологии, поскольку объяснить полученные данные можно только учитывая обе функциональные активности ретинола, являющегося одновременно антиоксидантом и одним из регуляторов метаболизма.

С этой точки зрения интересно, что схема нашего эксперимента (прооксидантное повреждение + антиоксидант) является функциональным аналогом широкомасштабных проектов ATBC и CARET, предпринятых в 90-х годах прошлого столетия как пробные попытки снижения онкологической заболеваемости населения длительным приёмом антиоксидантных витаминов [29–35]. Однако сочетание постоянного окислительного стресса (в результате неумеренного курения или профессиональной экспозиции асбестом) с приёмом ретиноидов (β -каротина в течение 6 лет в проекте ATBC и ретинола с β -каротином в течение 4 лет в проекте CARET) привело к неожиданному достоверному увеличению заболеваемости участников проекта раком лёгкого с соотношением шансов 1,18 и 1,42 по отношению к подвыборкам, принимавшим плацебо.

Неудачное завершение этих проектов традиционно связывают с прооксидантным действием повышенных концентраций ретиноидов, хотя таким способом трудно объяснить, почему в двух других аналогичных проектах, с формированием выборок из некурящих и не имеющих профессиональной экспозиции жителей Китая [29] и США [32], приём β -каротина даже в более высоких дозах в течение 5 и 12 лет практически не влиял на заболеваемость участников раком лёгкого.

Учитывая результаты представленного в данной статье эксперимента на животных, можно предположить, что механизмом увеличения заболеваемости раком лёгкого у злостных курильщиков и рабочих асбестовой промышленности в проектах ATBC и CARET было не прооксидантное действие ретинола и его предшественника β -каротина, а регуляторное торможение рети-

новой кислотой скорости репарации эпителиоцитов лёгочной ткани, повреждаемых компонентами сигаретного дыма и волокнами асбеста. При этом одновременно объясняется и отсутствие неблагоприятных эффектов ретиноидов в проектах [29] и [32], поскольку их функциональным аналогом в нашем эксперименте является группа крыс, получавших только «Аевит» и не имевших признаков мальабсорбции.

Заключение

Результаты проведённого эксперимента ещё раз подтверждают, что использование антиоксидантных витаминов для защиты организма от повреждающих воздействий не всегда приводит к благополучному результату и подчеркивает важную роль экспериментального моделирования для выявления неудачных комбинаций прооксидантов с антиоксидантами. Полученные результаты впервые позволяют предположить, что неудачное завершение проектов ATBC и CARET было обусловлено не прооксидантным действием повышенных концентраций ретинола и его предшественника β -каротина, а влиянием ретинола как сигнальной молекулы на процессы репарации лёгочных эпителиоцитов у курильщиков и рабочих производства асбеста. С научно-практической точки зрения, полученные результаты свидетельствуют о том, что ретиноиды не могут быть рекомендованы для снижения повреждающего действия УНТ у рабочих соответствующих производств.

Финансирование. Авторы заявляют об отсутствии финансовой поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература (пп. 2, 3, 7–9, 15–35 см. References)

- Хрипач Л.В., Рахманин Ю.А., Михайлова Р.И., Князева Т.Д., Коганова З.И., Железняк Е.В. и др. Влияние углеродных нанотрубок и активированного угля на биохимические показатели состояния организма при хроническом введении препаратов крысам с питьевой водой. *Гигиена и санитария*. 2014; 5: 36-43.
- Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. Под ред. Р.У. Хабриева. Москва: «Медицина», 2005: 48-49.
- Шестаков В.А., Бойчевская Н.О., Шерстнев М.П. Хемилюминесценция плазмы крови в присутствии перекиси водорода. *Вопросы мед. химии*. 1979; 2: 132-137.
- Хрипач Л.В., Железняк Е.В., Князева Т.Д., Коганова З.И., Салихова Д.И., Гришин Д.А. Методы оценки оксидантного равновесия в биологических образцах, основанные на использовании окрашенных модельных радикалов. *Гигиена и санитария*. 2016; 9: 884-990.
- Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е. Метод определения активности каталазы. *Лаб. дело*. 1988; 16: 16-19.
- Арутюнян А.В., Дубинина Е.Е., Зыбина Н.Н. Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма (под ред. В.Х. Хавинсона). С.-Петербург: ИКФ «Фоллиант», 2000: 78-80.
- Методические указания к оценке биохимических, морфологических, иммунологических и физиологических показателей ранних изменений функциональных реакций человека при воздействии факторов окружающей среды. М. - Пермь, 1986. - 138 С.
- Беляева Н.Н., Михайлова Р.И., Сычева Л.П., Савостикова О.Н., Зеленкина Е.А., Гасимова З.М. и др. Оценка влияния многослойных углеродных нанотрубок на морфофункциональное клеточное состояние тонкого кишечника мышей. *Гигиена и санитария*. 2012; 6: 58-61.
- Масютин А.Г., Ерохина М.В., Сычевская К.А., Гусев А.А., Васюкова И.А. и др. Многостенные углеродные нанотрубки индуцируют патологические изменения в органах пищеварительной системы мышей. *Бюлл. экп. биол. мед.* 2016; 161(1): 143-148.

References

- Khripach L.V., Rakhmanin Ju.A., Mikhajlova R.I., Knyazeva T.D., Koganova Z.I., Zhelezniak E.V. et al. Biochemical effects of chronic peroral administration of carbon nanotubes and activated charcoal in drinking water in rats. *Gig. Sanit.* 2014; 5: 36-43. (In Russian).
- Occupational Exposure to Carbon Nanotubes and Nanofibers (DHHS/CDC/NIOSH Publication No. 2013-145), April 2013; 51 P. Available from <http://www.cdc.gov/niosh/pubs>
- Krestinin A.V., Dremova N.N., Knerel'man E.I., Blinova L.N., Zhigalina V.G., Kiselev N. A. Characterization of SWCNT products manufactured in Russia and the prospects for their industrial application. *Nanotechnol. Russ.* 2015; 10(7-8): 537-548.
- Guidelines for experimental (preclinic) study of new pharmacological drugs. Ed. by R.U. Khabriev. Moscow: «Meditsina», 2005: 48-49. (In Russian).
- Shestakov V.A., Boichevskaia N.O., Sherstnev M.P. Chemiluminescence of blood plasma in the presence of hydrogen peroxide. *Vopr. Med. Khim.* 1979; 2: 132-137. (In Russian).

- Khripach L.V., Zhelezniak E.V., Knyazeva T.D., Koganova Z.I., Salikhova D.I., Grishin D.A. Methods of oxidative state assessment in biologic samples, based on coloured model radicals. *Gig. Sanit.* 2016; 9: 884-890. (In Russian).
- Stocks J., Dormandy T.L. A direct thiobarbituric acid-reacting chromogen in human red blood cells. *Clin. Chim. Acta.* 1969; 27: 117-120.
- Ellman G.L. Tissue sulphhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 1959; 82: 70-77.
- Sun N., Zigmun S. An improved spectrophotometric assay for superoxide dismutase based on epinephrine autoxidation. *Analyt. Biochem.* 1978; 90(1): 81-89.
- Koroljuk M.A., Ivanova L.I., Majorova I.G., Tokarev B.E. A method of determining catalase activity. *Lab. Delo.* 1988;(1):16-19. (In Russian).
- Methods for the assessment of free radical oxidation and antioxidant system in the organism (ed. by V.H. Khavinson). Sankt-Peterburg: «Foliant», 2000. (In Russian).
- Guidelines for the assessment of biochemical, morphological, immunological and physiological markers of early changes in functional reaction of human organism onto environmental factors. Moscow-Perm', 1986: 8-10. (In Russian).
- Belyaeva N.N., Mikhailova R.I., Sycheva L.P., Savostikova O.N., Zelenkina E.A., Gasimova Z.M. et al. Assessing the impact of multi-walled carbon nanotubes on the morphofunctional cellular state of the small intestine in mice. *Gig. Sanit.* 2012; 6: 58-61. (In Russian).
- Masyutin A.G., Erokhina M.V., Sychevskaya K.A., Smirnova E.A., Onishchenko G.E., Gusev A.A. et al. Multiwalled carbon nanotubes induce pathological changes in the digestive organs of mice. *Bull. Experim. Biol. Med. (Moscow)*. 2016; 161(1): 143-148. (In Russian).
- Oliveira M.R., Oliveira M.W., Lorenzi R., da Rocha R.F., Moreira J.C. Short-term vitamin A supplementation at therapeutic doses induces a pro-oxidative state in the hepatic environment and facilitates calcium-ion-induced oxidative stress in rat liver mitochondria independently from permeability transition pore formation. *Cell Biol. Toxicol.* 2009; 25: 545-560.
- Roehrs R., Freitas D.R., Masuda A., Henriques J.A., Guecheva T.N. et al. Effect of vitamin A treatment on superoxide dismutase-deficient yeast strains. *Arch. Microbiol.* 2010; 192(3): 221-228.
- Petiz L.L., Kunzler A., Bortolin R.C., Gasparotto J., Matté C. et al. Role of vitamin A oral supplementation on oxidative stress and inflammatory response in the liver of trained rats. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* 2017; 42(11): 1192-1200.
- Oliveira M.R. Vitamin A and retinoids as mitochondrial toxicants. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2015; 2015:140267. doi: 10.1155/2015/140267.
- Alakhras R.S., Stephanou G., Demopoulos N.A., Nikolopoulos S.S. Genotoxicity of all-trans retinoic acid (ATRA) and its steroidal analogue EA-4 in human lymphocytes and mouse cells in vitro. *Cancer Lett.* 2011; 306: 15-26.
- Mei N., Hu J., Xia Q., Fu P.P., Moore M.M., Chen T. Cytotoxicity and mutagenicity of retinol with ultraviolet A irradiation in mouse lymphoma cells. *Toxicol. In Vitro.* 2010; 24(2): 439-444.
- Polyakov N.E., Leshina T.V., Konovalova T.A., Kispert L.D. Carotenoids as scavengers of free radicals in a Fenton reaction: antioxidants or pro-oxidants? *Free Radic. Biol. Med.* 2001; 31: 398-404.
- Theodosiou M., Laudet V., Schubert M. From carrot to clinic: an overview of the retinoic acid signaling pathway. *Cell. Mol. Life Sci.* 2010; 67: 1423-45
- Stobinski L., Mazurkiewicz J., Lin H.M., Tomasik P. Complexes of carbon nanotubes with selected carotenoids. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2005; 5(12): 2121-2127.
- Hung V.C., Lee J.Y., Zitelli J.A. Topical tretinoin and epithelial wound healing. *Arch. Dermatol.* 1989; 125(1): 65-69.
- Kitano Y., Yoshimura K., Uchida G., Sato K., Harii K. Pretreatment with topical all-trans-retinoic acid is beneficial for wound healing in genetically diabetic mice. *Arch. Dermatol. Res.* 2001; 293(10): 515-521.
- Tseng S.C., Hirst L.W., Farazdaghi M., Green W.R. Inhibition of conjunctival transdifferentiation by topical retinoids. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1987; 28(3): 538-542.
- Abdelmalek M., Spencer J. Retinoids and wound healing. *Dermatol. Surg.* 2006; 32(10): 1219-1230.
- Arboleda B., Cruz N.I. The effect of systemic isotretinoin on wound contraction in guinea pigs. *Plast. Reconstr. Surg.* 1989; 83(1): 118-121.
- Blot W.J., Li J.-Y., Taylor P.R., Li B. Nutrition intervention trials in Linxian, China: supplementation with specific vitamin/mineral combinations, cancer incidence, and disease-specific mortality in the general population. *J. Nat. Cancer Inst.* 1993; 85(18): 1483-1491. doi: 10.1093/jnci/85.18.1483.
- The ATBC Cancer Preventive Group. The effect of vitamin E and beta carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers. *New Engl. J. Med.* 1994; 330: 1029-1035.
- Omenn G.S., Goodman G.E., Thornquist M.D., Balmes J., Cullen M.R. et al. Effects of a combination of beta-carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. *New Engl. J. Med.* 1996; 334: 1150-1155.
- Hennekens C.H., Buring J.E., Manson J.E., Stampfer M., Rosner B. et al. Lack of effect of long-term supplementation with β -carotene on the incidence of malignant neoplasms and cardiovascular disease. *New Engl. J. Med.* 1996; 334: 1145-1149.
- Albanes D. β -Carotene and lung cancer: a case study. *Am. J. Clin. Nutr.* 1999; 69 (suppl): 1345S-1350S. doi: 10.1093/ajcn/69.6.1345S
- Bowen D.J., Thornquist M.D., Anderson K., Barnett M., Powell C. et al. Stopping the active intervention: CARET. *Control. Clin. Trials.* 2003; 24: 39-50.
- Goodman G.E., Thornquist M.D., Balmes J., Cullen M.R., Meyskens F.L. et al. The beta-carotene and retinol efficacy trial: incidence of lung cancer and cardiovascular disease mortality during 6-year follow up after stopping beta-carotene and retinol supplements. *J. Nat. Cancer Inst.* 2004; 96(23): 1743-1750.

Поступила 11.12.2017

Принята к печати 18.10.2018