

Захисний ефект вітаміну Є при тотальній ішемії ізольованих органів щурів

Изучали содержание продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и жирорастворимых витаминов в изолированных печени и сердце крыс после тотальной ишемии этих органов. Ишемия смещает антиокислительный (АО) баланс в сторону ПОЛ и образования метаболитов витамина Е различной меры деструкции. Показано, что в условиях такого смещения возможны реакции восстановления исходного токоферола в случае, когда в организм предварительно вводили физиологические дозы витамина Е. В миокарде защитный эффект токоферола значительно больше, чем в печени.

Вступ

Відомо, що система перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) та антиокислювальна (АО) система відіграють важливу роль у молекулярних механізмах формування неспецифічної резистентності організму. Показники, що характеризують функціонування цих систем, можуть використовуватися для прогнозування стану організму та диференціювання стадій захворювання [2]. Неспецифічна резистентність на фізіологічному рівні має різноманітні механізми. У перший перехідний період від миттєвої до довгострокової адаптації якраз і відбуваються суттєві зміни активності ПОЛ та АО, внаслідок чого виснажуються резерви жиророзчинних антиоксидантів [5].

Ішемія органів веде до швидкої витрати макроергів та вивільнення, наприклад, у серці помітної кількості лінолеату, арахідонату та пальмітату [9, 17]. Такі зміни можуть, з одного боку, значно стимулювати систему ПОЛ [16], а з іншого, — мобілізувати систему АО. Проте активність АО-ферментів у таких умовах зменшується [7], тому роль неферментних антиоксидантів стає визначальною. Напрямок реакцій ПОЛ визначається конкретними обставинами. Так, наприклад, вітамін Є попереджує ПОЛ у присутності холестерину та ненасичених жирних кислот, але дає прооксидантний ефект у присутності Fe^{2+} та ненасичених жирних кислот [19]. Крім того, Fe^{3+} у відсутності хелаторів легко реагує з α -токоферолом і дає α -токоферилхінон [12]. Метаболізм α -токоферолу (ТФ) пов'язаний з убіхіноновою системою, завдяки чому можливі певні переходи, які за своєю чергою пов'язані зі зміною кількості і ТФ і КоQ. Наприклад, у разі шоку в м'язах людини вміст ТФ подвоюється, а кількість Q_{10} та Q_9 зменшується, але вдвоє збільшується вміст Q_{10}H_2 [10]. Захисний ефект ТФ у разі ішемії відомий, але полегшуючий вплив ТФ на активність АО-ферментів, на жаль, не повний [4]. У попередніх дослідженнях ми показували, що в умовах тотальної ішемії ізольованих органів зменшується кількість деяких вітамерів ТФ. Проте, при визначенні ж загального ТФ ці зміни маскуються, тобто можливо, існує механізм відновлення втрат цієї незамінної сполуки на молекулярному рівні особливо в умовах додаткового введення його в організм. У цьому зв'язку метою нашого дослідження було вивчення загального вмісту жиророзчинних вітамінів та їх метаболітів в ізольованих органах щурів в умовах тотальної ішемії, інтенсивності різних реакцій у системі ПОЛ та впливу на ці показники екзогенного вітаміну Є.

Експерименти провадили на двох групах статевонезрілих щурів самок лінії Вістар віком 1 міс. Одна група тварин отримувала звичайний раціон віварію (контроль), друга група тварин — додатково до раціону фармакопейний α -токоферилацетат (80 мг/кг, 30 %-вий масляний розчин) протягом двох тижнів. Тварин декапітували, вилучали серце та печінку. Половину кожного органу вміщували у вологому бюксі до водяної лазні (37 °C) для моделювання умов тотальної ішемії [1] протягом 1 год. Контрольну частину органу зразу ж клали до рідкого азоту, як і ішемізовану. З тканин після кріоподрібнення готували 10 %-вий гомогенат на фосфатному буфері (pH 7,4). У гомогенатах тканин після лужного гідролізу та екстрагування гексаном [6] визначали оптичну щільність при таких характерних максимумах поглинання світла: для α -токоферолу при 292 нм, для дімеру ТФ (ОТФ) при 242 нм, для α -токоферилхінону (ТФХ) при 272 нм, для вітаміну А при 328 нм, для β -каротину при 451 нм [8]. Вимірювання провадили на спектрофотометрі марки «Spekord M-40». Перерахунок результатів виконували, користуючись коефіцієнтами молярної екстинкції ϵ , які складали для 242 нм 8 600, для 292 нм 3 170, для 328 нм 1 550, для 451 нм 2 580 моль⁻¹·см⁻¹, кількість ТФХ визначали у відносних одиницях екстинкції (% екст.). Паралельно вимірювали вміст таких первинних продуктів ПОЛ, як дієнові, триєнові, оксодієнові кон'югати (ДК, ТК, ОДК відповідно) та тетраєнові. Для визначення кількості кожного з кон'югатів виконували перерахунок, користуючись відповідними коефіцієнтами молярної екстинкції (моль⁻¹·см⁻¹), які для ДК складали 27 000 (ϵ_{232}), для ТК — 43 400 (ϵ_{268}), для ОДК — 22 000 (ϵ_{276}). Кількість тетраєнів визначали у відносних одиницях екстинкції (% екст.). Результати обробляли статистично, провадили кореляційний та компонентний аналізи. Останній аналіз здійснювали за оригінальною методикою, люб'язно запропонованою Юхник В. Ф., на ЕОМ. Цей спосіб дає можливість не тільки порівняти досліджувані параметри, але й вилучити серед них вагоміші.

Результати та їх обговорення

Наведені в табл. 1 результати свідчать про те, що додаткове згодовування молодим щурам фізіологічних доз вітаміну Е практично не впливає на його вміст у тканині серця та печінки. Ішемія органів суттєво змінювала АО баланс: реакції ПОЛ прискорювалися, вміст ТФ у тканині печінки збільшувався, а вітаміну А та каротину дещо зменшувався, мали тенденцію до збільшення також і продукти обміну вітаміну Е. Майже така сама картина спостерігалася і в тканині серця, але вміст в ній вітаміну А мав тенденцію до збільшення. Відомі тісні метаболічні взаємозв'язки вихідних форм жиророзчинних вітамінів, у яких вони можуть відновлюватися один за рахунок іншого [3]. Важливе місце у таких реакціях відновлення займає ТФХ, але його вміст у тканинах тварин контрольної групи дуже незначний [20]. Наші спостереження таких взаємозв'язків у печінці підтвердили ці тези, а саме — кореляція між вмістом ТФ, ТФХ, ОТФ, А та β -каротину була дуже тісною (г складав в межах від 0,8 до 0,999), а компонентний аналіз висвітив ключову роль у їхньому балансі ОТФ (74 %) та ТФХ (24 %). Під компонентами розуміють вимірювані параметри, наведені вище, а вираз їх зміни у відсотках — це відносні значення, які характеризують якісні перетворення вивчених показників. Отже, в даному випадку, найбільш важливими показниками, від зміни яких залежить зміна інших, є вміст ОТФ і ТФХ у тканинах деяких органів. Це може свідчити про те, що у печінці щурів контрольної групи активно функціонує Red — Ох-система ТФ, яка забезпечує його відновлення. Після ішемії взаємозв'язок між вмістом ТФ, його метаболітів та вітаміну А змінювався на протилежний (г складав від 0,998 у контролі до 0,99 після

ішемії). У цьому разі ключова роль належить ОТФ, внесок якого у зміну параметрів сягає 92 %. Це може свідчити, що в умовах ішемії ТФ швидше переходить у форму, в якій він втрачає свої АО властивості.

У серці загальна закономірність зміни вивчених параметрів була такою ж, як і у печінці, але функціональна вага параметрів дещо відрізнялася — роль ОТФ у контролі зменшувалась до 62 %. Після ішемії серця метаболізм жиророзчинних вітамінів також змінювався, але інакше, ніж у печінці (табл. 2). Компонентний аналіз показав, що в разі введення в організм додаткової кількості вітаміну Є, його роль в регулюванні АО-балансу при ішемії стає вирішальною і сягає 80 %. Причому саме ТФ зберігає і забезпечує високу метаболічну активність вітаміну А, роль якого підвищується до 20 %. Роль ОТФ зменшується, але збільшується роль ТФХ та ТФ. Це свідчить про активне функціонування системи відновлення ТФ, кількість якого, внаслідок цього, збільшується. Така закономірність може знаходитися в основі механізму, що забезпечує процеси на молекулярному та субфізіологічному рівнях, що було показано [11] більш виразним відновленням

Таблиця 1. Зміна вмісту жиророзчинних вітамінів, їх метаболітів та первинних продуктів перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) в тканинах печінки і серця щурів в умовах попереднього введення в організм вітаміну Є та тотальної ішемії ізольованих органів ($M \pm m$)

Досліджувана речовина	Печінка			
	Контроль	Дослід		
		Ішемія	Вітамін Є	Ішемія та вітамін Є
Вітамін та його метаболіт (мкмоль/г)				
вітамін А	1,83±0,34	1,62±0,07	1,40±0,24	1,46±0,12
β-каротин	0,58±0,18	0,32±0,02	0,32±0,02	—
α-токоферол	0,72±0,08	1,42±0,09*	0,64±0,20	0,46±0,06
окси-α-токоферол	1,08±0,11	1,46±0,08	1,24±0,54	0,97±0,14
Первинні продукти ПОЛ (мкмоль/г):				
дієнові кон'югати	0,67±0,18	0,91±0,10	1,10±0,07*	1,45±0,12
оксодієнові кон'югати	0,18±0,01	0,25±0,03	0,26±0,02*	0,38±0,08
триєнові кон'югати	0,08±0,01	0,12±0,02	0,11±0,01*	0,18±0,05
тетраєнові кон'югати (Д/г)	2,55±0,62	4,23±0,55	4,80±0,34*	5,43±0,48
Досліджувана речовина	Серце			
	Контроль	Дослід		
		Ішемія	Вітамін Є	Ішемія та вітамін Є
Вітамін та його метаболіт (мкмоль/г)				
вітамін А	2,82±1,13	4,66±0,52	2,48±0,98	3,08±0,86
β-каротин	0,49±0,04	0,46±0,20	0,61±0,10	0,66±0,26
α-токоферол	2,14±0,66	4,80±0,62	2,31±0,93	2,22±0,58
окси-α-токоферол	2,44±0,96	6,66±0,92	2,91±0,68	3,80±0,86
Первинні продукти ПОЛ (мкмоль/г):				
дієнові кон'югати	0,63±0,12	1,28±0,21	0,82±0,06	0,85±0,09
оксодієнові кон'югати	0,42±0,24	0,34±0,02	0,14±0,01	0,26±0,04
триєнові кон'югати	0,08±0,01	0,16±0,02	0,06±0,01	0,12±0,02
тетраєнові кон'югати (Д/г)	2,66±0,32	6,68±0,23	1,87±0,14*	3,88±0,79

Примітка. В усіх випадках $n=8$; * $P<0,05$ — імовірна різниця у порівнянні з контролем.

скорочувальної функції міокарду у разі ішемії на тлі попереднього введення вітаміну Є. Наші дані, отримані в умовах *in situ*, можуть свідчити (у загальних рисах) про мобілізацію системи відновлення ТФ, яка працює у серці більш ефективно ніж у печінці.

Порівняння результатів, які характеризують загальний АО-баланс, показало вирішальну роль початкових реакцій ПОЛ, а серед них — тих реакцій, які дають такі сполуки як ДК та ТК (табл. 3). Причому важливість ДК для серця більш значна ніж для печінки, а важливість ТК — навпаки. Це, безумовно, залежить від хімічного складу жирних кислот у ліпідах органів, від активності фосфоліпаз в них, а крім того є ще й можливість синтезу високоненасичених речовин, які мають високу біологічну активність (лейкотриєнів, тромбоксанів та простагландинів), це, як відомо, конкуруючий з ПОЛ шлях метаболізму високоненасичених жирних кислот.

Таблиця 2. Зміна функціональної ваги вітамінів та їх метаболітів в тканинах печінки і серця у щурів в умовах попереднього введення в організм вітаміну Є та тотальної ішемії ізольованих органів, % контролю

Досліджувана речовина	Печінка				Серце			
	Конт-роль	Дослід			Контроль	Дослід		
		Іше-мія	Віта-мін Є	Вітамін Є та ішемія		Іше-мія	Вітамін Є	Вітамін Є та ішемія
α-Токоферол	—	—	—	—	—	—	18	—
Окси-α-токофе-рол	80	84	90	74	97	84	43	60
α-Токоферил-хінон	20	16	8	24	—	15	34	34

Примітка. Інші досліджувані речовини не відіграють помітної ролі.

Таблиця 3. Результат порівняльного аналізу відносної ролі кожної досліджуваної речовини у антиокислювальному балансі, %

Орган	Первинні продукти перекисного окислення ліпідів				Вітаміни та їх метаболіти				
	дієни	триєни	тетра-єни	оксо-дієни	α-токо-ферол	оксо-α-токоферол	α-токофе-рилхінон	рети-нол	β-каротин
Печінка	44	33	4	16	<1	1	<1	<1	<1
Серце	64	13	6	9	<1	4	2	<1	<1

Таким чином, отримані результати свідчать про можливість корекції фізіологічними дозами вітаміну Є напрямку реакцій ПОЛ та метаболізму жиророзчинних вітамінів в умовах тотальної ішемії серця та печінки. Для міокарду його захисна роль більша ніж для печінки. Вживання вітаміну Є з їжею у дозах, порівняних з тими, що знаходяться у самих продуктах, суттєво не впливаючи на його вміст у досліджуваних органах, все ж зміщує напрямок його перетворення у Red — Ох-реакціях у бік відновлення, а не окислювальної деструкції.

A. V. Paranych, A. Yukhnik

ANTIOXIDATIVE BALANCE UNDER CONDITIONS OF TOTAL ISCHEMIA OF ISOLATED ORGANS IN RATS AND PROTECTIVE EFFECT OF VITAMIN E

The content of lipid peroxidation (LPO) products and fat-soluble vitamins in the isolated liver and heart of rats total ischemia of organs has been studied. Ischemia shifts the antioxidative balance towards LPO and formation of vitamin E metabolites

of different destruction degree. It is shown that under such conditions the reactions of initial tocopherol reduction are possible in the case of preliminary introduction of physiological doses of vitamin E into the organism. In the myocardium the protective effect of tocopherol is much higher than in the liver.

A. M. Gorky University, Ministry
of Public Education of Ukraine, Kharkov

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Биленко М. В. Ишемические и реперфузионные повреждения органов (молекулярные механизмы, пути предупреждения и лечения).— М., 1989.— 368 с.
2. Бугров С. А., Лозинский П. А., Некрасов В. И. Антиоксидантная система и перекисное окисление липидов при моделировании острой гипоксии // Модельные системы в медицинских и биохимических исследованиях.— М.: Медицина, 1989.— С. 56—59.
3. Вальдман А. Р. Витамины в животноводстве.— Рига: Зинатне, 1977.— 352 с.
4. Васильева Л. П., Полохович Г. С., Маслова Г. Т., Боборико Т. Л. Оценка некоторых показателей перекисного окисления липидов при ишемии и инфаркте миокарда на фоне антиоксидантной терапии / Биохимия: Минск.— 1989.— С. 15—19.
5. Гуляева Н. В., Левшина И. П., Обидин А. Б. Показатели свободнорадикального окисления липидов и антирадикальной защиты мозга — нейрхимические корреляты развития адаптационного синдрома // Журн. высш. нервн. деят.— 1988.— 38, вып. 4.— С. 731—737.
6. Паранич А. В., Солошенко Э. Н. Определение витамина Е в сыворотке крови больных лекарственной болезнью // Лаб. дело.— 1987.— № 9.— С. 682—685.
7. Савов В. М., Диденко В. В., Досамбетова Р. С. и др. Перекисное окисление липидов в миокарде при экспериментальном инфаркте // Биол. науки.— 1985.— № 5.— С. 30—33.
8. Скурихин И. М. (ред.) Химический состав пищевых продуктов.— М.: Легкая и пищевая промышленность.— 1984.— Т. 3.— 328 с.
9. Табидзе Л. В., Ритов В. Б., Каган В. Е., Козлов Ю. П. Защита витамином Е саркоплазматического ретикулула от повреждающего действия свободных жирных кислот // Бюл. эксперим. биологии и медицины.— 1983.— 96, № 11.— С. 48—50.
10. Antonelli M., Corbucci G. G., Buji M. et al. Determination of reduced and oxidized ubiquinones, and tocopherol in human muscular tissue // Oxygen Free Radicals in shock.— Florence: Int. Workshop, 1985.— P. 29—33.
11. Findler M., Sobel-Baraki H., Hochhauser E., Vidne B. A. Difference in vitamin E's ability to protect young versus old rats myocardium from ischemic damage // Pflugers Arch.— 1989.— V, Suppl. N 1.— P. 8.
12. Fukuzawa K., Kishikawa K., Tadokoro T. et al. The effect of α -tocopherol on site-specific lipid peroxidation induced by iron in changed micelles // Arch. biochem. and biophys.— 1988.— 260, N 1.— P. 153—160.
13. Handelman G. J., Epstein W. L., Machlin L. G. et al. Biopsy method for adipose with vitamin E and lipid measurements // Lipids.— 1988.— 23, N 6.— P. 598—604.
14. Jore D., Ferradini C., Patterson L. K. γ and pulse radiolytic study of the antioxidant activity of vitamin E // Radiat. Phys. Chem.— 1986.— 28, N 5/6.— P. 557—558.
15. Kim R. S., La Bella F. Comparison of analytical methods for monitoring autoxidation profiles of authentic lipids // J. Lipid. Res.— 1987.— 28, N 6.— P. 1110—1117.
16. Lindsay T., Walker P. M., Mickle A. G., Romashin A. D. Measurement of hydroxy-conjugated dienes after ischemia-reperfusion in canine skeletal muscle // Amer. J. Physiol.— 1988.— 254, N 3, Pt. 2.— P. H578—H583.
17. Nakamura K., Ichihara K., Abiko Y. Effect of lidocaine on the accumulation of non-esterified fatty acids in the ischemic perfused rat heart // Eur. J. Pharmacol.— 1989.— 169, N 1.— P. 259—267.
18. Powell W. S. High pressure liquid chromatography of arachidonic acid metabolites involved in inflammation // Chromatogr. Lipid Biomed. Res. and Clin. Diagn.— Amsterdam e. a., 1987.— P. 76—106.
19. Urzini F., Maiorino M., Coassin M., Roveri A. Microsomal lipid peroxidation: physiological control by vitamin E, glutathione and phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase // Med., Biochem. and Chem. Aspects of Free Radicals (Proceeding of the 4th Biennien General Meeting of the Society for Free Radical Research, Kyoto, Japan, 9—13 April 1988): Elsevier Science Publishers, B. V.— Amsterdam: Netherlands, 1989.— P. 417—424.
20. Vatassery G. T., Smith W. E. Determination of α -tocopherolquinone (vitamin E Quinone) in human serum, platelets, and red cell membrane samples // Analyt. Biochem.— 1987.— 167, N 2.— P. 411—417.

Харків. ун-т ім. О. М. Горького
М-ва освіти України

Матеріал надійшов
до редакції 14.04.92