

Захистна дія вітаміну Е при гострому введенні нітрохлорбензолу та його хлорпохідних у шлунок щурів

В експериментах на крысах изучено влияние нитробензола и его хлорпроизводных при совместном внутрижелудочном введении с витамином Е. Показано, что при этом изменений перекисного окисления липидов (ПОЛ) в сыворотке крови, печени и селезенке было значительно меньше, чем при введении одних ксенобиотиков. Введенный витамин интенсивно вовлекается в обмен веществ. При этом нормализуется антиокислительная активность исследованных тканей, активно поддерживается равновесие между системой ПОЛ и антиоксидантной системой. На основании полученных результатов сделан вывод о защитном действии витамина Е при его введении с ксенобиотиками. Рекомендуются профилактическое применение витамина Е в диетах для работников химической промышленности.

Вступ

Серед хімічних речовин масового виробництва, що дуже небезпечні для здоров'я людини, нітробензол (НБ) та його хлорпохідні займають одне з перших місць. Метаболізм та біотрансформація цих сполук вивчені досить повно [1, 2, 6, 15, 17]. Але шляхи та напрямки впливу самих ксенобіотиків та їх метаболітів на обмін речовин в організмі не розкриті. Молекулярні механізми їх токсичної дії також до кінця не відомі. З точки зору хімічної структури дуже цікаві вторинні галогенпохідні НБ. Наявність другого замісника помітно впливає на реакційну спроможність усієї сполуки [10]. Вона легко може переходити у відповідний фенол, а потім — у амінофенол. Останні, крім своїх токсичних властивостей, виявляють ще й антиокислювальну (АО) [25]. Така комбінація властивостей не може не вивести з рівноваги АО-гомеостаз організму. Причому зміна його у той чи інший бік несе загрозу обміну речовин. Як ксенобіотики, НБ та його хлорпохідні стимулюють перекисне окислення ліпідів (ПОЛ) [7, 8, 11], а їх ефективність носить тканинспецифічний характер, що виходить з клінічних спостережень інтоксикації цими речовинами [3]. Враховуючи ці відомості, а також спираючись на унікальні властивості вітаміну Е (токоферолу — ТФ) як високоактивного неспецифічного антиокислювача, регулятора роботи АО-ферментів з можливими деякими гуморальними властивостями [14, 24], ми передбачали його високу ефективність як профілактичного засобу при отруєнні ксенобіотиками. Доступність препарату, практична неможливість його передозування, а також властивість перехоплювати вільні радикали без створення центрів ланцюгових реакцій дозволяють широко використовувати вітамін Е як додаток до спеціального раціону харчування, розрахованого для працівників хімічної промисловості.

Оскільки такі експерименти у літературі не описані, то метою нашого дослідження було вивчення захисної дії вітаміну Е при одночасному введенні його з НБ, *o*-нітрохлорбензолом (ОНХБ) та *n*-нітрохлорбензолом (ПНХБ).

Методика

Експерименти провадили на 250 безпородних щурах-самцях масою 200—300 г. Тварин утримували за умов віварію на звичайному збалансованому раціоні. Дію ксенобіотиків вивчали на моделі підгострого впливу — введення їх у шлунок у кількості 1/10 напівлетальної дози (LD_{50}), що складало (мг/кг): для НБ — 70, для ОНХБ — 51, для ПНХБ — 83 [3]. Речовини вводили за допомогою зонда у вигляді 1 %-вого масляного розчину, який готували на соняшниковій олії, кожної доби протягом місяця. Щури контрольної групи отримували олію у такій самій кількості. Паралельно тваринам усіх груп давали ксенобіотики на фоні попереднього інтрашлункового введення α -токоферилацетату (фармакопейного, 30 %-вого розчину в олії) із розрахунку 100 мг/кг [9]. Після закінчення експерименту щурів декапітували, отримували сироватку крові, вилучали печінку та селезінку, заморожували у рідкому азоті і зберігали до аналізу. Після кріоподрібнення та дефростації готували 20 %-ві гомогенати на фосфатному буфері (рН 7,4) і використовували для визначення показників, що вивчали. Вміст первинних продуктів ПОЛ: дієнових, триєнових, оксодієнових та тетраєнових кон'югатів (ДДК, ТК, ОДК, ТТК відповідно) визначали спектрофотометрично [4]. Вміст вторинних продуктів, що реагують з тіобарбітуровою кислотою, зокрема, маленового діальдегіду (МДА), — колориметрично [14]. Загальну антиокислювальну активність (АОА) визначали у моделі термічного автоокислення олеату і виражали у відносних одиницях [12]. Після лужного гідролізу в гексанових екстрактах спектрофотометрично визначали вміст ТФ та його метаболітів: α -токоферилхінону (ТФХ) та окситокоферолу (ОТФ) [16, 22]. Кількість визначених речовин розраховували, користуючись коефіцієнтами молекулярної екстинкції (моль/см): для ДК E_{232} — 27 000, для ТК E_{268} — 43 400, для ОДК E_{276} — 22 000 [22], для ТФ E_{292} — 3170, для ОТФ E_{242} — 8 600 [20]. Вміст ТТК та ТФХ виражали в одиницях екстинкції. Кількість МДА знаходили за калібрувальним графіком, який будували за 1, 1, 3, 3-тетраетоксипропаном (фірма «Merk», Німеччина). Отримані результати обробляли статистично з використанням критерію t Стюдента [13].

Результати та їх обговорення

У таблиці наведено результати, що свідчать про вміст продуктів ПОЛ у тканинах щурів. Показано, що дія НБ та його хлорпохідних у щурів на фоні вітаміну Е суттєво відрізняється від такої у щурів без вітаміну Е. У сироватці крові імовірних відмін вмісту ДК не знаходили. Кількість ТК під впливом ТФ імовірно зменшувалася майже у 15 разів. Досліджувані ксенобіотики при їх довготривалому введенні суттєво зменшували значення цього показника, а на фоні ТФ не змінювали його: він залишався на рівні контролю у сироватці крові (олія та вітамін Е). Така ж закономірність відзначалася і щодо ОДК, вміст яких утримувався постійним у тварин як контрольної групи, так і дослідної (при введенні ксенобіотиків). Це свідчить про участь ТФ у забезпеченні АО-гомеостазу, причому за цих умов ПОЛ практично не доходить до утворення МДА, вміст якого залишався постійним (виняток складали лише тварини, яким вводили нітробензол і вітамін Е, у яких спостерігалось імовірне зменшення значення цього показника, що, однак, не протирічить зробленому припущенню). Необхідно звернути увагу на те, що ТФ сприяв відновленню (практично до рівня контролю) вмісту тетраєнових сполук, який при дії усіх ксенобіотиків різко зменшувався. Така зміна може мати важливе фізіологічне значення,

Вміст продуктів перекисного окислення ліпідів (мкмоль/г) у тканинах щурів при одночасній дії α -токоферолу і ксенобіотиків ($M \pm m$)

Умови досліджу	Дієнові кон'югати	Триснові кон'югати	Оксодієнові кон'югати	Тетраєнові кон'югати***	Малоновий діальдегід
Сироватка крові					
Олія (контроль)	0,35 $\pm$ 0,03	0,15 $\pm$ 0,02	0,24 $\pm$ 0,06	2,21 $\pm$ 0,30	0,22 $\pm$ 0,01
Олія і вітамін Е	0,12 $\pm$ 0,02*	0,01 $\pm$ 0,04	0,02 $\pm$ 0,01	0,70 $\pm$ 0,18**	0,18 $\pm$ 0,01**
Нітробензол	0,08 $\pm$ 0,01	0,01 $\pm$ 0,01	0,01 $\pm$ 0,01	0,16 $\pm$ 0,01	0,22 $\pm$ 0,03
Нітробензол і вітамін Е	0,08 $\pm$ 0,02	0,01 $\pm$ 0,004	0,02 $\pm$ 0,008	0,44 $\pm$ 0,10**	0,14 $\pm$ 0,01**
o-Нітрохлорбензол	0,06 $\pm$ 0,01	0,004 $\pm$ 0,0004	0,01 $\pm$ 0,001	0,20 $\pm$ 0,02	0,13 $\pm$ 0,01
o-Нітрохлорбензол і вітамін Е	0,06 $\pm$ 0,01	0,01 $\pm$ 0,004	0,02 $\pm$ 0,008	0,52 $\pm$ 0,16**	0,16 $\pm$ 0,01
n-Нітрохлорбензол	0,06 $\pm$ 0,01	0,004 $\pm$ 0,001	0,01 $\pm$ 0,001	0,06 $\pm$ 0,01	0,22 $\pm$ 0,02
n-Нітрохлорбензол і вітамін Е	0,04 $\pm$ 0,01*	0,01 $\pm$ 0,001**	0,01 $\pm$ 0,001**	0,28 $\pm$ 0,03**	0,17 $\pm$ 0,02
Печінка					
Олія (контроль)	0,33 $\pm$ 0,02	0,06 $\pm$ 0,007	0,16 $\pm$ 0,01	3,74 $\pm$ 0,36	0,66 $\pm$ 0,07
Олія і вітамін Е	0,28 $\pm$ 0,02	0,12 $\pm$ 0,01**	0,24 $\pm$ 0,02**	3,56 $\pm$ 0,24	0,84 $\pm$ 0,10
Нітробензол	0,52 $\pm$ 0,04	0,22 $\pm$ 0,02	0,44 $\pm$ 0,04	8,62 $\pm$ 0,84	0,84 $\pm$ 0,10
Нітробензол і вітамін Е	0,34 $\pm$ 0,04**	0,12 $\pm$ 0,02**	0,26 $\pm$ 0,04**	5,38 $\pm$ 0,71**	0,74 $\pm$ 0,11
o-Нітрохлорбензол	0,58 $\pm$ 0,06	0,26 $\pm$ 0,02	0,52 $\pm$ 0,04	7,31 $\pm$ 0,86	1,00 $\pm$ 0,08
o-Нітрохлорбензол і вітамін Е	0,30 $\pm$ 0,02**	0,10 $\pm$ 0,01**	0,21 $\pm$ 0,01**	4,16 $\pm$ 0,18**	0,98 $\pm$ 0,06
n-Нітрохлорбензол	0,76 $\pm$ 0,07	0,27 $\pm$ 0,02	0,47 $\pm$ 0,04	10,68 $\pm$ 1,08	1,06 $\pm$ 0,08
n-Нітрохлорбензол і вітамін Е	0,28 $\pm$ 0,02**	0,10 $\pm$ 0,01**	0,24 $\pm$ 0,02**	4,61 $\pm$ 0,50**	0,82 $\pm$ 0,08*
Селезінка					
Олія (контроль)	0,29 $\pm$ 0,05	0,11 $\pm$ 0,02	0,24 $\pm$ 0,04	5,05 $\pm$ 0,83	1,10 $\pm$ 0,21
Олія і вітамін Е	0,33 $\pm$ 0,03	0,02 $\pm$ 0,004**	0,04 $\pm$ 0,008**	1,06 $\pm$ 0,14**	0,57 $\pm$ 0,06**
Нітробензол	0,16 $\pm$ 0,02	0,02 $\pm$ 0,004	0,04 $\pm$ 0,008**	0,83 $\pm$ 0,19	0,94 $\pm$ 0,08
Нітробензол і вітамін Е	0,28 $\pm$ 0,04**	0,05 $\pm$ 0,007**	0,08 $\pm$ 0,01**	1,30 $\pm$ 0,28	0,68 $\pm$ 0,10*
o-Нітрохлорбензол	0,28 $\pm$ 0,04	0,04 $\pm$ 0,01	0,08 $\pm$ 0,02	2,44 $\pm$ 0,39	0,73 $\pm$ 0,06
o-Нітрохлорбензол і вітамін Е	0,20 $\pm$ 0,02	0,04 $\pm$ 0,008	0,09 $\pm$ 0,01	1,48 $\pm$ 0,29*	0,67 $\pm$ 0,06
n-Нітрохлорбензол	0,74 $\pm$ 0,08	0,24 $\pm$ 0,04	0,44 $\pm$ 0,06	8,32 $\pm$ 1,26	1,14 $\pm$ 0,12
n-Нітрохлорбензол і вітамін Е	0,26 $\pm$ 0,04**	0,06 $\pm$ 0,006**	0,10 $\pm$ 0,008**	1,89 $\pm$ 0,16**	0,70 $\pm$ 0,07**

Примітки: п в усіх випадках складає 10; * різниця значень показників між групами без вітаміну Е та з вітаміном Е — у вигляді тенденції, $P < 0,1$; ** різниця імовірна, $P < 0,05$; *** вміст тетраєнів виражали в одиницях D із розрахунку на 1 г тканини.

оскільки до цієї категорії належать найважливіші біологічно активні сполуки типу тромбосанів, простагландинів та інших, які цілеспрямовано синтезуються в організмі [23, 29]. Таким чином, ТФ дозволяє утримувати під контролем необхідний рівень цих гуморальних речовин, що суттєво для стабілізації ендокринного статусу організму.

У печінці зміна усіх вивчених показників, що характеризують початкові стадії ПОЛ, показала, що введення ксенобіотиків разом з ТФ практично не впливає на інтенсивність цього процесу. ТФ забезпечував імовірне зменшення усіх значень показників ПОЛ (вміст ДК, ТК, ОДК і ТТК), кількість яких при дії тільки ксенобіотиків була підвищеною. Вміст МДА фактично не змінювався в усіх випадках, що вказує на утримання організмом ПОЛ під контролем.

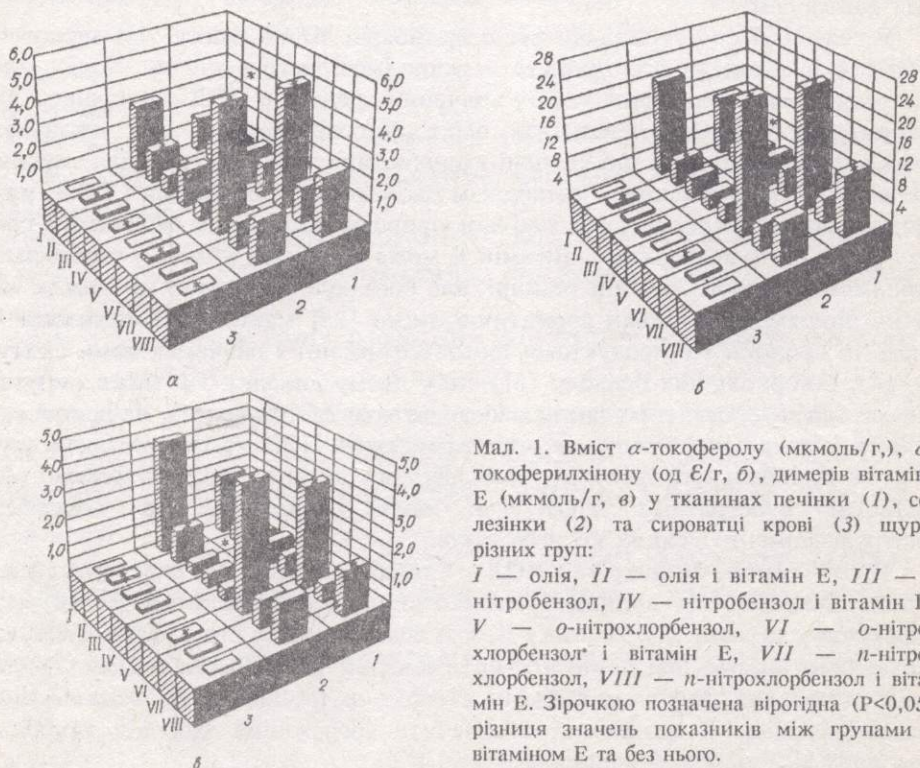
У селезінці спостерігалися різноспрямовані зміни вмісту усіх продуктів ПОЛ, які, однак, не досягали статистично імовірного значення. Хоч загальна тенденція до зниження вмісту вивчених продуктів ПОЛ під впливом ТФ зберігалася у більшості випадків, факт різноспрямованих змін показників може свідчити про те, що вивчені ксенобіотики токсичні саме для тканини селезінки. Їх втручання у метаболізм цього органу торкається і ПОЛ, причому є деяка залежність від хімічної природи сполуки, а, можливо, і продуктів їх біотрансформації. Вітамін Е може приймати участь у стабілізації динамічної рівноваги у цій тканині, але його роль при цьому не завжди має один напрямок. Оскільки ароматичні аміни [25] мають АО-властивості (а саме ці сполуки і є продуктами біотрансформації і вивчених нами сполук — нітрохлорпохідних бензолу [3]), то у цьому випадку ТФ може виступати як прооксидант і тим самим забезпечувати АО-гомеостаз, не даючи при цьому радикальних продуктів, які стимулюють ПОЛ. Можлива також роль ТФ як гуморального фактора, який регулює деякі специфічні реакції між різними субстратами ПОЛ, а також напрямок та швидкість біотрансформації деяких ксенобіотиків.

Таким чином, зміни рівня ПОЛ у тканинах щурів, що спостерігалися у наших дослідках під впливом ксенобіотиків на фоні вітаміну Е, виявили ефективну захисну дію вітаміну Е, яка позначилася у стабілізації ПОЛ. Це дозволило організмові утримати оптимальний рівень метаболізму. На основі отриманих результатів можна стверджувати, що профілактичне вживання вітаміну Е дозволить забезпечити збереження здоров'я людей за умов дії НБ та його хлорпохідних.

При вивченні ефективності ТФ як профілактичного засобу за умов дії ксенобіотиків ми досліджували його вміст і вміст продуктів його перетворення в організмі (мал. 1, а — в), а також загальну АОА тканин (мал. 2). Показано, що введення ТФ практично повністю використовується у метаболічних процесах. Так, у щурів контрольної групи його вміст у сироватці крові підвищувався, а в тканинах — зменшувався. Це свідчить про активний перерозподіл екзогенного ТФ і його внутрішніх резервів при збереженні достатньої кількості в тканинах, причому імовірно зменшувалося його перетворення у хінон та неактивну форму — ОТФ. Ці зміни не супроводжувалися порушенням АО-гомеостазу — АОА залишалася незмінною. За умов дії ксенобіотиків у наших експериментах спостерігався різний напрямок транспорту ТФ і його перетворень, які залежали від особливостей хімічної структури ксенобіотика. Так, при дії НБ у сполученні з вітаміном Е у сироватці крові щурів кількість ТФ зменшувалася, а у печінці та селезінці — мала тенденцію до збільшення. ОНХБ у сполученні з вітаміном Е викликав імовірне збільшення вмісту ТФ у всіх тканинах, ПНХБ — такі ж зміни, як НБ, але менш виражені. Безумовно, мав змінюватися також і напрямок метаболізму самого вітаміну Е. При дії НБ за умов його сполучення з вітаміном Е вміст ТФХ та ОТФ залишався стабільним в усіх тканинах, у разі дії ОНХБ за цих умов вміст ТФХ та ОТФ імовірно збільшувався в усіх тканинах, у разі дії ПНХБ у сполученні з вітаміном Е

вміст ТФХ імовірно підвищувався лише у тканині печінки, а вміст ОТФ імовірно зменшувався у крові, але збільшувався в інших тканинах.

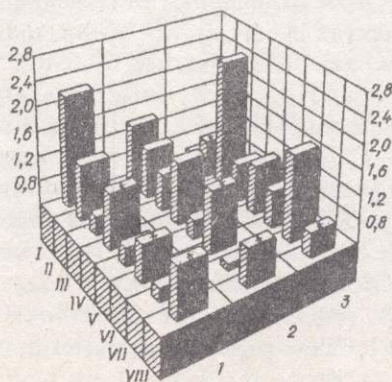
АОА тканин за умов комплексної дії ТФ та ксенобіотиків суттєво модифікувалися (див. мал. 2). Так, у сироватці крові вона імовірно знижувалася в разі дії НБ та ПНХБ, а у печінці та селезінці змінювалася від прооксидантної до антиоксидантної активності.



Мал. 1. Вміст α -токоферолу (мкмоль/г, а), α -токоферилхінону (од Е/г, б), димерів вітаміну Е (мкмоль/г, в) у тканинах печінки (1), селезінки (2) та сироватці крові (3) щурів різних груп:

I — олія, II — олія і вітамін Е, III — нітробензол, IV — нітробензол і вітамін Е, V — *o*-нітрохлорбензол, VI — *o*-нітрохлорбензол і вітамін Е, VII — *p*-нітрохлорбензол, VIII — *p*-нітрохлорбензол і вітамін Е. Зірочкою позначена вірогідна ($P < 0,05$) різниця значень показників між групами з вітаміном Е та без нього.

Співставляючи отримані результати, ми прийшли до висновку, що попереднє введення ТФ дає можливість організмові не тільки максимально ефективно використовувати вітамін Е для контролю інтенсивності ПОЛ, підвищення АОА, але й дуже раціонально регулювати метаболізм самого вітаміну, який виявився дуже чутливим до дії ксенобіотиків. Спираючись на результати наших досліджень, можна рекомендувати вітамін Е як ефективний профілактичний засіб, що затримує виникнення клінічних проявів інтоксикації такими ксенобіотиками, як нітробензол та його хлорпохідні.



Мал. 2. Антиокислювальна активність (відн. од.) тканин печінки (1), селезінки (2) та сироватки крові (3) щурів за умов комплексної дії вітаміну Е та ксенобіотиків. Позначення ті ж самі, що на мал. 1.

A.V.Paranich, L.I.Paranich, E.V.Bugai, L.F.T.Ortis

PROTECTIVE EFFECT OF VITAMIN E IN CASE OF ACUTE ADMINISTRATION OF NITROBENZENE AND ITS CHLORINE DERIVATIVES TO THE RAT STOMACH

The level of lipid peroxidation, content of vitamin E and its metabolites as well as antioxidative activity in the blood serum, liver and spleen of white rats were studied. Toxicological effects of nitrobenzene and nitrochlorbenzenes were decreased by vitamin E.

University, Ministry of Education
of Ukraine, Kharkov

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Адрианов Н.В., Уваров В.Ю. Регуляция активности ферментных систем окисления чужеродных соединений // Вест. АМН СССР. — 1988. — № 2. — С. 24—33.
2. Арчаков А.И., Карузина И.И. Окисление чужеродных соединений и проблемы токсикологии // Там же. — С. 14—23.
3. Василенко Н.М. Токсикология ароматических аминов и нитросоединений бензольного ряда — продуктов анилинокрасочной промышленности: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — Киев, 1980. — 450 с.
4. Гаврилов В.Б., Мишкорудная М.И. Спектрофотометрическое определение содержания гидроперекисей липидов в плазме крови // Лаб. дело. — 1983. — № 3. — С. 33—36.
5. Гонський Я.И., Кодра М.М., Клеш И.М. Состояние свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы у крыс с токсическим повреждением печени. Влияние α -токоферола и диметилсульфоксида // Укр. биохим. журн. — 1991. — 63, № 5. — С. 112—116.
6. Жуков А.А., Жуков Г.Ф. Механизм оксигеназных реакций: основные, промежуточные и побочные продукты оксигеназного цикла // Вест. АМН СССР. — 1988. — № 2. — С. 33—42.
7. Каишкарда Д.А. Изменение гистамин-гистаминазной системы и углеводно-энергетического обмена как критерий токсикологигиенической оценки нитро- и нитрохлорсоединений бензола: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Киев, 1991. — 21 с.
8. Каишкарда Д.А., Колодуб Ф.А. Биохимические критерии оценки ранних признаков неблагоприятного воздействия нитрохлорсоединений бензола // Врачеб. дело. — 1992. — № 5. — С. 62—65.
9. Легонькова Л.Ф., Абакумов Г.З., Бушма М.И., Лукиенко П.И. Изменение активности УДФ-глюкуронозил-, глутатион-S-трансфераз и перекисного окисления липидов микросом печени крыс при γ -облучении и защитное действие α -токоферола // Вопр. мед. химии. — 1990. — 36, № 3. — С. 26—28.
10. Метелица Д.И., Литвинчук А.В., Савенкова М.И. Сопряженное окисление галоидзамещенных фенолов и люминола, катализированное пероксидазой в присутствии антител против нее // Биохимия. — 1992. — 57, № 1. — С. 103—113.
11. Павлова Р.Н., Сорокина В.С., Торопков В.В., Ионина М.А. Сравнение состояния метаболических процессов в эритроцитах и клетках ряда тканей белых крыс в остром токсикологическом эксперименте при воздействии спиртов изопренового ряда // Модельные системы в медико-биохимических исследованиях. — Л.: Наука, 1989. — С. 81—85.
12. Паранич А.В., де Консесао А., Бугай Е.В., Копылов А.В. О роли жирорастворимых витаминов А и Е в профилактике биологических эффектов ионизирующего излучения // Радиобиология. — 1992. — 32, № 5. — С. 743—750.
13. Рокицкий П.Ф. Биологическая статистика // Минск: Выш. шк., 1973. — 318 с.
14. Спиричев В.Б., Матусис И.И., Бронштейн Л.М. Витамин Е // Экспериментальная витаминология. — Минск: Наука и техника, 1979. — С. 20—57.
15. Тимченко А.Н., Данилов В.И., Василенко Н.М. и др. Гигиена труда в производстве красителей. — Киев: Здоров'я, 1986. — 72 с.
16. Afanas'ev I.B., Grabovetskij V.V., Kuprianova N.S. Kinetics and mechanism of the reactions of superoxide ion in solution // J. Chem. Soc. Perkin Trans. — 1987. — Pt. 2, № 3. — P. 281—285.
17. Gandy J., Millner G.C., Bates H.K. et al. Effects of selected chemicals on the glutathione status in the male reproductive system of rat // J. Toxicol. and Env. Helth. — 1990. — 29, № 1. — P. 45—57.
18. Hendelman G.J., Epstein W.L., Machlin L.J. et al. Biopsy method for human adipose with vitamin E and lipid measurements // Lipids. — 1988. — 2, № 6. — P. 598—604.
19. Igwe O.J. Biologically active intermediates generated by the reduced glutathione conjugation pathway // Biochem. and Pharmacol. — 1986. — 35, № 18. — P. 2987—2994.
20. Jore D., Ferradini C., Patterson L.K. γ and pulse radiolytic study of the antioxidant activity of vitamin E // Radiat. Phys. and Chem. — 1986. — 28, № 6. — P. 557—558.