

UČINAK HLOR-AROMATIČNIH JEDINJENJA NA IZOLOVANE HEPATOCITE

M. Popović¹, J. Nerudova², K. Đaković-Švajcer³ i S. Pavkov¹

Institut za hemiju, Prirodoslovno-matematički fakultet, Novi Sad¹, Institut za higijenu i epidemiologiju, Prag, ČSSR², Zavod za farmakologiju i toksikologiju Medicinskog fakulteta, Novi Sad³

(Primljeno 13. V. 1987)

Ispitan je efekt 1,2-dihlorbenzena, 1,2,3,4-tetrahlchlorbenzena, 1,2,3,5-tetrahlchlorbenzena, pentahlorbenzena, heksahlorbenzena i Arohlora 1254 na aktivnost enzima lipoperoksidaze i ksantinoksidaze, sadržaj citohroma P-450 i glutationa u izolovanim hepatocitima. Vijabilnost hepatocita bila je smanjena kod primene svih ispitivanih supstancija. 1,2-dihlorbenzen je smanjio sadržaj citohroma P-450 kao i aktivnost enzima, a ostali hlchlorbenzeni povećavali su aktivnosti enzima, ali nisu uticali na sadržaj citohroma P-450. Arohlor 1254 je povećao sadržaj citohroma P-450, a nije uticao na enzimsku aktivnost. Svi ispitivani spojevi su smanjili sadržaj glutationa.

Svi živi organizmi imaju sposobnost da transformišu molekule koje su potpuno strane njihovom organizmu.

Osnovni organ za transformaciju ksenobiotika je jetra, ali se transformacije mogu odigravati i u drugim organima kao što su: srce, pluća, koža, bubrezi i slično. Jetra je najčešće glavno mesto stvaranja reaktivnih intermedijera, a ujedno i glavno mesto interakcije i toksičnog dejstva reaktivnih metabolita. Stabilni metaboliti mogu iz jetre cirkulacijom stići do drugih organa i tako izazvati oštećenja.

Živa ćelija je razvila nekoliko odbrambenih mehanizama protiv štetnog dejstva ksenobiotika i toksičnih metabolita, koji mogu nastati u samoj ćeliji. Jednu od glavnih uloga u ovom mehanizmu ima redukovani glutation (GSH) (1) zajedno sa GSH peroksidazom i GSH transferazom (2).

Jetra od svih organa ima najveći sadržaj GSH (5–10 mmola/g jetre) (3). Posle smanjenja količine GSH uočena je i *in vivo* i u izolovanim hepatocitima povećana koncentracija jetrenih lipida (4).

Većina ksenobiotika se metaboliše putem grupe enzima poznate pod imenom "oksidaze mešovite funkcije" –OMF, koje se nalaze u endoplazmatičnom retiku-

lumu ćelija. Aktivno mesto OMF enzimatskog sistema je citohrom P-450 koji nije identičan kod svih bioloških vrsta pa čak ni u svim tkivima istog organizma.

Kao što sadržaj GSH i aktivnost enzima, koji vrše konjugaciju GSH za supstrat, mogu bitno menjati toksičnost pojedinih ksenobiotika tako i aktivnost OMF i sadržaj citohroma P-450 u hepatocitima može menjati procese biotransformacije ksenobiotika u toksične ili netoksične metabolite.

Cilj našeg rada je bio da se utvrdi uticaj nekih hlorbenzena i Arohlor 1254 na biotransformacijske i konjugacione procese u hepatocitima određivanjem sadržaja citohroma P-450 i glutationa, te merenjem aktivnosti enzima ksantinoksidaze i lipoperoksidaze. Toksični efekat spojeva utvrđivan je određivanjem vijabilnosti hepatocita. Ispitivana jedinjenja imaju toksikološki značaj budući da se veoma često koriste u industriji kao elektroizolacione tečnosti, u kondenzatorima i transformatorima, hidraulične tečnosti, dodaci termootpornim bojama, plastici i drugo.

MATERIJAL I METODE

Spojevi

Za istraživanje su korišćeni: 1,2,4,5-tetrahlorbenzen (1,2,4,5-TB), pentahlorbenzen (PB), 1,2-dihlorbenzen (1,2-DB), 1,2,3,4-tetrahlorbenzen (1,2,3,4-TB), heksahlorbenzen (HB) i smeša polihalogenovanih bifenila - Arohlor 1254 p.a. čistoće (Merck).

Puferi

Hank-1 pufer, pH 7,4, 134 mM NaCl, 0,49 mM KCl; 0,813 mM $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,337 mM $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$, 0,441 mM KH_2PO_4 , 26 mM $NaHCO_3$, 0,5 mM EGTA (etilenglikol bis (β -aminoetil eter) N,N'-tetraoctena kiselina); HEPES (N-2-hidroksietil-piperazin-N'-2-ctansulfonska kiselina); Hank-2 pufer: 100 cm³ Hank-1 pufer sa 150 mg kolagenaze, 0,4 mM $CaCl_2 \cdot H_2O$. Krebs-bikarbonatni pufer, pH 7,4, 4,2 mM NaCl, 4,8 mM KCl, 0,96 mM KH_2PO_4 , 1,2 mM $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 4,2 mM $CaCl_2 \cdot H_2O$, 24 mM $NaHCO_3$. TRIS · HCL pufer, pH 7,4: 50 mM tris (hidroksimetil) aminometan hidroklorid se rastvori u 250 mM saharozi koja sadrži 150 mM KCl i 10 mM $MgCl_2$.

Priprava hepatocita

Za dobivanje hepatocita korišćeni su polno zreli beli pacovi soja Wistar, oba pola, telesne mase od 200 do 400 g, koji su imali slobodan pristup hrani i vodi.

Izolovanje suspenzije hepatocita je vršeno po metodi *Moldeusa i saradnika* (5). Anesteziranom pacovu otvori se trbušni zid i u venu kavu injicira heparin (500 UJ u 0,1 cm³); vena porte se zaseče i uvuče kanila (1-1,5cm duboko), koja je povezana sa peristaltičkom pumpom. Vena se podveže i oko 3 min se vrši ispiranje Hank-1 puferom, dok se krv ne ispere. Zatim se jetra izvadi pažljivo, zajedno sa kanilom i prenese u termostat gde se na temperaturi od 37 °C nalazi Hank-2 pufer. Tokom rada, protok pufera je 80 do 100 cm³ u minuti, sa stalnim protokom gasa karbogenea (95% O₂ i 5% CO₂) pri pritisku od 400 paskala. Recirkulacija kroz jetru vrši se 6-8 min, a zatim se nabubrela jetra skida sa kanile i stavlja

u Krebs–bikarbonatni pufer sa 1% BSA (govedi serumski albumin). Tkivo se mace- rira pincetom, profiltrira kroz jedan sloj gaze i posle stajanja od 10 do 15 min se odlije rastvor sa hepatocitima koji se u daljem postupku koriste.

Izolovane ćelije (hepatocite) jetre pacova inkubirali smo 3 sata na 37 °C sa tes- tiranim spojevima. U svim pokusima konačne koncentracije spojeva izražene u molovima na 2×10^6 ćelija/cm³ bile su: $3,5 \times 10^{-6}$ za 1,2–DB; $3,2 \times 10^{-6}$ za 1,2,3,4 – TB; 1,2,3,5,– TB i PB te 3×10^{-6} za HB i Arohlor 1254. Vijabilnost hepatoci- ta određivana je metodom sa Trypan blue a sadržaj citohroma P–450 meren je prema metodi *Omura i Sato* (6). Od suspenzije hepatocita (koja sadrži 2×10^6 ćelija/cm³) uzme se 3 cm³, pre i posle eksperimenta, doda se 1 cm³ TRIS · HCl pufera. Kroz uzorak se propušta CO, najmanje 1 minut, podeli se u dve kivete, a u referentnu kivetu se doda Na–dionit (Na₂S₂O₄) i meri se promena apsorbance na 448, tj. 450 nm. Molarna apsorbivnost redukovanoj citohroma P–450 je $1,04 \times 10^5$ dm³/mol/cm.

Aktivnost ksantinoksidaze je određena metodom *Bergmayera* (7), a aktivnost li- poperoksidaze metodom *Buegea i Austa* (8). Sadržaj glutationa (GSH) je meren po metodi *Kapetanovića* (9) sa DTNB (ditiobisnitrobenzojeva kiselina). Dobiveni rezultati obrađeni su statistički, Studentovim t-testom. Sva biohemijaska merenja su vršena na spektrofotometrima PYE UNICAM SP 1800 I SPECOL 21 VEB, CARL ZEISS JENA u kivetama s optičkim putem od 1cm i volumenom od 3 cm³. Vijabilnost je praćena Zeissovim binokularnim mikroskopom. Izolovanje hepato- cita je vršeno mini protočnom peristaltičkom pumpom TIP S–32 UNIPAN, Wars- zava. Statistička obrada je urađena na računaru DELTA 340/11.

REZULTATI

Dobiveni rezultati prikazani su na slikama 1–5.

Na slici 1. prikazana je vijabilnost hepatocita. Nakon tročasovne inkubacije vi- jabilnost je bila značajno smanjena u svim ogledima. Najjače je smanjio vijabil- nost hepatocita 1,2–DB, i to u odnosu na kontrolu više od 50%.

Slika 2. prikazuje sadržaj citohroma P–450 u izolovanim hepatocitima. Uticali su samo 1,2–DB i Arohlor 1254. U prisustvu Arohlor 1254 sadržaj citohroma P–450 porastao je od $0,48 \pm 0,005$ na $0,60 \pm 0,077$ nmol po 2×10^6 ćelija/cm³ a uz 1,2–DB se smanjio na $0,26 \pm 0,091$ nmol po 2×10^6 ćelija/cm³.

Kao što prikazuje slika 3. sadržaj GSH u hepatocitima je bio smanjen pod dej- stvom svih ispitivanih spojeva od 63 do 19% od kontrolne vrednosti. Najjače dej- stvo ispoljio je 1,2–DB.

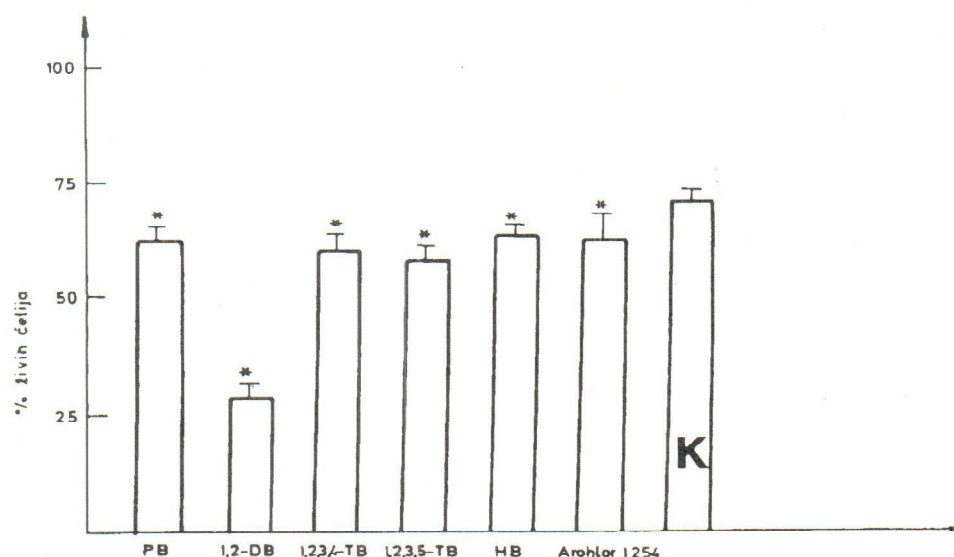
Uticaj spojeva na aktivnosti enzima pokazan je na slikama 4. i 5.

Aktivnost lipoperoksidaze (slika 4) značajno je povećana kod inkubacije hepato- citita sa 1,2,3,4–TB i HB (približno 1,6 puta), a smanjena kod inkubacije hepato- citita sa 1,2–DB. Ostali ispitivani spojevi nisu statistički značajno menjali aktiv- nost lipoperoksidaze.

Na aktivnost ksantinoksidaze (slika 5) ispitivani spojevi utiču približno isto kao i na aktivnosti lipoperoksidaze.

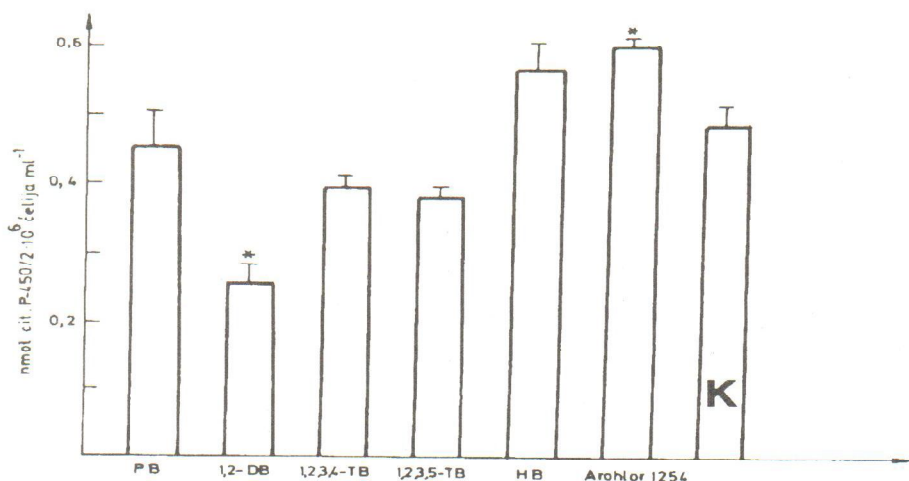
DISKUSIJA

Uticaj hloraromatika na aktivnost jetrenih enzima i kapacitet metabolisanja je u najvećem broju slučajeva ispitivan *in vivo*. Nađeno je da 1,3,5-trihlorbenzen u dozama od 50, 100 i 200 mg/kg ne povećava sadržaj citohroma P-450; istovremeno je (kod doziranja od 100 i 200 mg/kg) povećana aktivnost citohrom-*c*-reduktaze, a u jednoj od primenjenih doza 1,3,5-trihlorbenzen ne deluje na aktivnost benzo(a)pirenhidroksilaze i azoreduktaze (10). U našim ogledima jedino je 1,2-dihlorbenzen smanjio sadržaj citohroma P-450 u hepatocitima, dok su ostali hlorisani benzeni bili bez efekta. Aktivnost lipoperoksidaze je pod dejstvom 1,2-dihlorbenzena takođe bila smanjena. Poznato je da je aktivnost lipoperoksidaze ovisna o koncentraciji glutaciona u hepatocitu. Naime, u slučaju smanjivanja količine glutaciona u jetri dolazi do porasta aktivnosti lipoperoksidaze i pojačane peroksidacije lipida (4). Zbog toga je veoma interesantan naš nalaz da 1,2-dihlorbenzen, koji je smanjio aktivnost lipoperoksidaze, dovodi i do smanjenja sadržaja glutaciona u hepatocitu. Vijabilnost hepatocita je pod dejstvom ove supstance takođe značajno smanjena. Iz svega se može zaključiti da se toksički efekt 1,2-dihlorbenzena na hepatocit razlikuje od toksičnih efekata ostalih ispitivanih hlorisanih benzena.



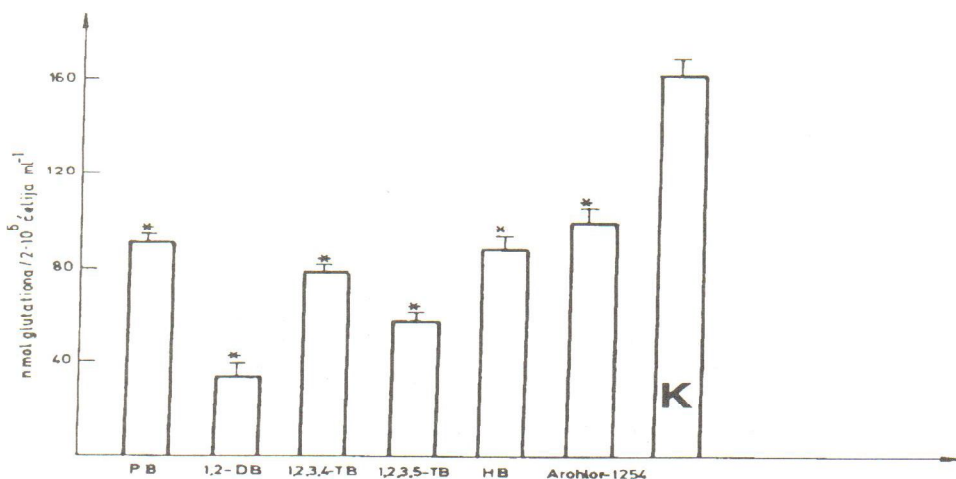
Sl. 1 Uticaj spojeva na vijabilnost hepatocita

Na slici je prikazan procenat živih ćelija (hepatocita) nakon tročasovne inkubacije sa ispitivanim supstancama na 37 °C. Koncentracije spojeva navedene su u tekstu. Stupci označavaju srednju vrednost \pm SD od pet određivanja. Kontrola je označena sa K i srednja je vrednost od pet određivanja. Zvezdicama su označene vrednosti značajno različite od kontrole ($p < 0,05$ do $p < 0,001$).



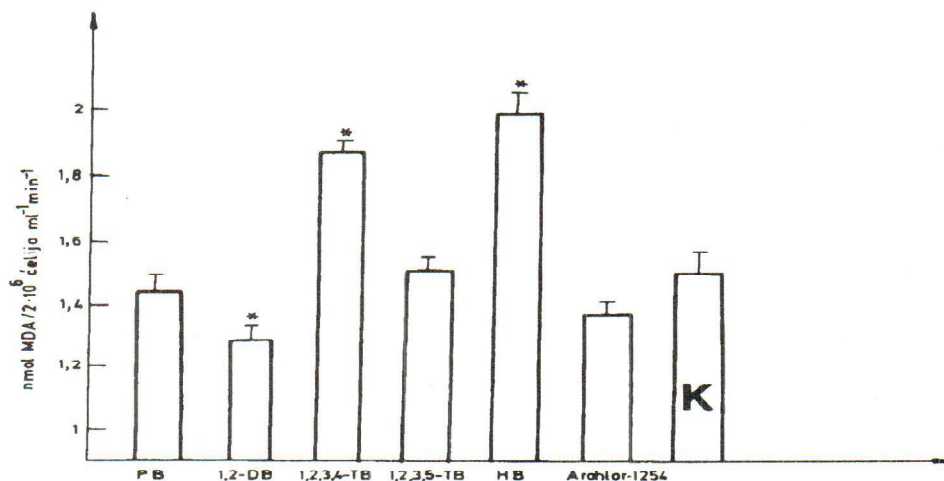
Sl. 2. Uticaj spojeva na sadržaj citohroma P-450 u hepatocitima.

Svaki stubac predstavlja srednju vrednost \pm SD od određivanja na pet uzoraka izolovanih hepatocita. Kontrola K srednja je vrednost od pet određivanja. Zvezdicama su označene vrednosti značajno različite od kontrole ($p < 0,05$ do $p < 0,001$). Koncentracije spojeva su navedene u tekstu.



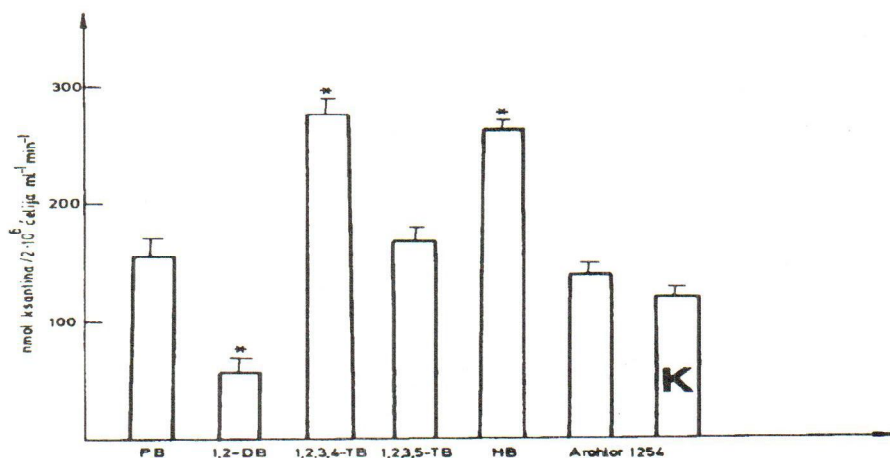
Sl. 3. Uticaj spojeva na sadržaj glutaciona u hepatocitima

Na slici su prikazani rezultati dobiveni nakon tročasovne inkubacije hepatocita sa spojevima čija je koncentracija data u tekstu. Kontrola je označena sa K i predstavlja srednju vrednost \pm SD od pet merenja. Zvezdicama su označene vrednosti značajno različite od kontrole ($p < 0,05$ do $p < 0,001$).



Sl. 4. Uticaj spojeva na aktivnost lipoperoxidaze u hepatocitima.

Svaki stubac predstavlja srednje vrednosti \pm SD od pet uzoraka. Zvezdicama su označene vrednosti značajno različite od kontrole ($p < 0,05$ do $p < 0,001$). Koncentracije spojeva su navedene u tekstu. Kontrola (K) je takođe srednja vrednost od pet određivanja.



Sl. 5. Uticaj spojeva na aktivnosti ksantinoksidaze u hepatocitima.

Kontrola (K) predstavlja srednju vrednost pet merenja. Koncentracija spojeva je data u tekstu. Svaki stubac predstavlja srednju vrednost \pm SD od pet merenja. Zvezdicama su označene vrednosti značajno različite od kontrole.

Polihalogenovani bifenili (PCB) su kao i sva poliaromatična ciklička jedinjenja dobri induktori enzima. Od polihalogenovanih bifenila, u ogleđima na pacovima i kunićima (11), upotreabili su smesu polihalogenovanih bifenila, Arahlor 1006; doza od 50 mg/kg ip. u toku 4 dana izazvala je kod pacova porast sadržaja citohroma P-450, povećanje aktivnosti etilmorfin-N-demetilaze i benzo(a)pirenhidroksilaze. Kod kunića (100 mg/kg ip. 4 dana) ista supstanca je takođe izazvala porast sadržaja citohroma P-450 uz istovremeno smanjenje aktivnosti benzo(a)pirenhidroksilaze i benzfetamin-N-demetilaze. U našim ogleđima je Arohlor 1254, takođe mešavina polihalogenovanih bifenila, izazvao porast sadržaja citohroma P-450 u hepatocitima, a da pri tome nije menjao aktivnost lipoperoksidaze i ksantinoksidaze. Iz ovoga je vidljivo da su polihalogenovani bifenili snažni i konstantni induktori citohroma P-450 bez obzira na životinjsku vrstu kod koje deluju kao i na vrstu tkiva na koje deluju. Sposobnost indukcije citohroma P-450 izgleda ne ovisi ni o hemijskoj strukturi polihalogenovanih bifenila.

Ispitivanjem dejstva celog niza alifatskih i aromatičnih halogenih derivata nađeno je da oni sa citohromom P-450 grade spektre tipa I, bez obzira na funkcionalnu grupu u molekulu, iz čega sledi da je to karakteristika samog halogena (12).

Najverovatnije je i indukcija citohroma P-450 izazvana halogenom u samom molekulu (u našem slučaju hlor), a ne strukturama aromatičkog jedinjenja. Izostanak efekta na sadržaj citohroma P-450 pri primeni 1,2,3,4-tetrahlorbzena, 1,2,3,5-tetrahlorbzena, pentahlorbenzena i heksahlorbenzena može se objasniti njihovom malom koncentracijom i relativno kratkim vremenom inkubacije.

Dejstvo PCB na enzimsku aktivnost razlikuje se s obzirom na životinjsku vrstu, vrstu tkiva kao i strukturu same supstance (13). Ovim možemo objasniti i rezultate našeg ogleđea.

Sve ispitivane supstance dovele su do opadanja sadržaja glutaciona u hepatocitu. Ovo je najverovatnije posledica konjugacije ispitivanih ksenobiotika sa hepatičkim glutationom, što treba da predstavlja osnovni put njihove detoksikacije. Odsutnost povećane aktivnosti lipoperoksidaze u uslovima smanjene koncentracije glutaciona takođe se može objasniti kratkim izlaganjem hepatocita dejstvu ovih halogenih aromatičkih jedinjenja.

Literatura

1. *Plaa, L.G., Witshi, H.*: Chemicals, drugs and lipid peroxidation. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 16 (1976) 125–141.
2. *Younes, M., Siegers, P.C.*: Mechanistic aspects of enhanced lipid peroxidation following glutathione depletion in vivo. *Chem. Biol. Interactions*, 34 (1981) 257–266.
3. *Sugiyama, Y., Kaplowitz, N.*: Binding of glutathione by rat liver cytosol. *Pharmacology*, 28 (1984) 61–66.
4. *Anundy, I., Hogberg, J., Stead, H.A.*: Glutathione depletion in isolated hepatocytes: its relation to lipid peroxidation and cell damage. *Acta Pharmacol.* 45 (1979) 45–51.
5. *Moldeus, P., Hogberg, I., Orenius, S.*: Isolation and use of liver cells. U: *Methods in Enzymology*, Vol. LII, Academic Press, New York 1978, str. 60–70.

6. Omura, T., Sato, R.: Fractional solubilization of hemoproteins and partial purification of carbon monoxide binding cytochrome from liver microsomes. *Biochem. Biophys. Acta*, 71 (1963) 224–226.
7. Bergmayer, U.H.: *Methoden der enzymatischen Analyse*. Verlag Chemie Weinheim 1970.
8. Buege, A.I., Aust, D.S.: Microsomal lipid peroxidation. U: *Methods in Enzymology*, Vol. LII. Academic Press, New York 1978, str. 306–310.
9. Kapetanović, I.M. and Mieyal, I.I.: Inhibition of Acetoaminophen-induced hepatotoxicity by phenacetin and its alkoxy analogs. *J.Pharmacol. Exp.Ther.* 209 (1979) 25–30.
10. Carlson, P.G.: Halogenated benzenes, effect on xenobiotic metabolism and toxicity of other chemicals. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 298 (1977) 159–169.
11. Tzsu-Huei Ueng, Alvares, P.A.: Selective induction and inhibition of liver and lung cytochrome P-450 dependent monooxygenases by the PCB₃ mixture, Aroclor 1016. *Toxicology*, 35 (1985) 83–94.
12. Ivanetich, M.K., Lucas, S., Marsh, A.J., Ziman, R.M., Katz, I.D., Bradshaw, I.I.: Organic compounds: their interactions with degradation of hepatic microsomal drug-metabolizing enzymes in vitro. *Drug Metabolism and Disposition*, 6 (1978) 218–225.
13. Blumberg, E.W.: Enzymic modification of environmental intoxications: the role of cytochrome P-450. *Quarterly Reviews of Biophysics II*, 4 (1978) 481–545.

Summary

THE EFFECT OF CHLORINATED AROMATIC COMPOUNDS ON ISOLATED HEPATOCYTES

The effects of 1,2-dichlorobenzene, 1,2,3,4-tetrachlorobenzene, 1,2,3,5-tetrachlorobenzene, pentachlorobenzene, hexachlorobenzene and Aroclor 1254 on hepatocyte functions were investigated. The viability of hepatocytes as well as glutathione concentration were decreased in all treatments. 1,2-dichlorobenzene diminished the content of cytochrome P-450 and decreased lipoperoxydase and xantinoxydase activities. Under the same conditions the other compounds investigated increased lipoperoxydase and xantinoxydase activities without influencing cytochrome P-450 content. Aroclor 1254 increased the content of cytochrome P-450 in hepatocytes, but had no effect on enzyme activities.

Department of Chemistry, Faculty of Science and Mathematics, Novi Sad¹, Institute for Hygiene and Epidemiology, Prague, Czechoslovakia² and Department of Pharmacology and Toxicology, Medical Faculty, Novi Sad³

Received for publication
May 13, 1987