

© Маракушин Д.І.  
УДК 577.27:543.395:616-099-092.9

## ТРИВАЛИЙ ВПЛИВ ОКСИЕТИЛЬОВАНИХ НОНІЛФЕНОЛІВ ТА ЇХ ПОХІДНИХ НА ВМІСТ ІМУНОГЛОБУЛІНІВ ТА ЦИТОКІНІВ У СИРОВАТЦІ КРОВІ ЩУРІВ\*

Маракушин Д.І.

Харківський національний медичний університет, м. Харків

*Изучено влияние оксиэтилированных нонилфенолов и их производных на содержание иммуноглобулинов и цитокинов в сыворотке крови крыс в условиях подострого эксперимента. Исследуемые детергенты в дозах 1/10 и 1/100 ДЛ<sub>50</sub> приводят к супрессии антителообразования в организме крыс, снижению в сыворотке крови уровня иммуноглобулинов А, М и G и снижению секреции ИЛ-1β, 2, 4, 6, 8, 10 и ФНО-α. Эти изменения могут служить дополнительными прогностическими тестами, которые характеризуют неблагоприятное влияние оксиэтилированных нонилфенолов и их производных на организм теплокровных животных.*

Ключевые слова: оксиэтилированные нонилфенолы, иммуноглобулины, цитокины, иммунная система.

Порушення механізмів регулювання гомеостазу за умов інтоксикації ксенобіотиками останнім часом розглядають як «токсичний стрес», при якому в процес втручаються не тільки нервова та ендокринна, але й імунна система [1, 2]. Крім того, імунна система, виконуючи важливу роль в адаптаційних та захисних реакціях організму, однією з перших піддається зовнішньому впливу, а виникаюче в її діяльності напруження призводить до порушення функціонування інших систем та виникнення патології [3]. Дослідження механізмів дії ксенобіотиків, розробка науково обґрунтованих діагностичних програм і виявлення об'єктивних прогностичних критеріїв перебігу патологічних процесів стає однією з пріоритетних задач сучасної медицини. Гостра необхідність її вирішення пов'язана з прогресуючим забрудненням довкілля, погіршенням здоров'я людини та базується на науковому обґрунтованні критеріїв, що визначають початок стану декомпенсації функції організму [4]. До пріоритетних забруднювачів навколишнього середовища відносяться оксиетильовані нонілфеноли (ОЕНФ) та їх похідні - натрієві солі карбоксиметилатів оксиетильованих ізононілфенолів (КМ-ОЕНФ), які за фізико-хімічними властивостями та особливостями будови молекул належать до іоногенних детергентів. Ці сполуки характеризуються досить значними об'ємами синтезу, широким використанням у різних галузях народного господарства (як основа промислового випуску пластмас, поліуретанів, миючих засобів, емульгаторів, антикорозійних препаратів, гідравлічних та охолоджуючих речовин тощо), надходженням до джерел питного водопостачання та завдяки цьому можливим впливом на організм людини [5, 6]. Механізми дії ОЕНФ та їх похідних з урахуванням динаміки показників захисно-компенсаторних зсувів в організмі вивчено недостатньо, а саме їх розкриття є підставою для обґрунтування заходів з охорони довкілля та здоров'я населення.

Метою даного дослідження було вивчення в сироватці крові щурів вмісту імуноглобулінів і цитокінів за

умов тривалого перорального впливу ОЕНФ та їх похідних у дозах 1/10, 1/100 і 1/1000 ДЛ<sub>50</sub>.

### Матеріали та методи дослідження

У роботі використано зразки речовин з регламентованими фізико-хімічними характеристиками: ОЕНФ з числом оксиетильованих груп 10 (ОЕНФ<sub>10</sub>) та КМ-ОЕНФ з числом оксиетильованих груп 5, 6, 10 (КМ-ОЕНФ<sub>5-10</sub>). Експерименти проведено на статевозрілих щурах-самцях лінії WAG, масою (180-220) г. Проведення процедур з експериментальними тваринами здійснено згідно з вимогами Європейської конвенції з біоетики. Їх піддавали пероральній затравці за допомогою зонда водними розчинами речовин щоденно одноразово протягом 45 діб у дозах 1/10, 1/100 і 1/1000 ДЛ<sub>50</sub>. Середньолетальні дози (ДЛ<sub>50</sub>) складали для ОЕНФ<sub>10</sub> – 4,3 г/кг; КМ-ОЕНФ<sub>5</sub> – 2,8 г/кг; КМ-ОЕНФ<sub>6</sub> – 2,2 г/кг; КМ-ОЕНФ<sub>10</sub> – 3,2 г/кг маси тіла. Тваринам контрольної групи вводили відповідні об'єми питної води. Дослідження вмісту імуноглобулінів і цитокінів здійснювали через 45 діб після початку експерименту. У кожній групі було по 15 тварин. Забій проводили шляхом декапітації, попередньо анестезуючи тіопенталом натрію. Вміст імуноглобулінів (Ig) А, М, G у сироватці крові визначали методом радіальної імунодифузії в гелі за допомогою моноспецифічних сироваток проти імуноглобулінів виробництва ФГУП «НПО Микроген» (Росія). Рівень цитокінів визначали імуноферментним методом з використанням наборів реагентів «ProCon IL-1β», «ProCon IL-2», «ProCon IL-4», «ProCon IL-6», «ProCon IL-10», «ProCon TNF-α» («Протеиновый контур», Росія), «Интерлейкин-8-ИФА-БЕСТ» («Вектор-Бест», Росія) і аналізатора імуноферментного Stat Fax 303 Plus. Статистичний аналіз даних проводили з використанням комп'ютерного пакета прикладних програм для обробки статистичної інформації Statistica 6.1 (StatSoft, Inc., США). Первинне статистичне опрацювання даних починали з перевірки припущення про відповідність вибірок закону гаусівського розподілу, застосовуючи критерій Шапіро-Віллка. Додатково правильність позитивного висновку щодо

\* Цитування при атестації кадрів: Маракушин Д.І. Тривалий вплив оксиетильованих нонілфенолів та їх похідних на вміст імуноглобулінів та цитокінів у сироватці крові щурів // Проблеми екології і медицини. – 2013. – Т. 17, № 5-6. – С. 38 –41

нормальності розподілу вибірок контролювали за допомогою коефіцієнтів асиметрії та ексцесу. Кількісні ознаки, що мали нормальний розподіл, описували параметричними характеристиками - середнім значенням показника (M) та середнім квадратичним відхиленням (s); у разі відсутності нормального розподілу непараметричними - медіаною (Me) та інтерквартильним розмахом. Для порівняння двох нормальних розподілів застосовували t-критерій Стьюдента. Якщо принаймні один з розподілів не був нормальним, то для порівняння незалежних вибірок застосовували критерій Манна-Уїтні. За критичний рівень значущості при перевірці статистичних гіпотез приймали  $p < 0,05$ .

### Результати та їх обговорення

На 45-ту добу дії ОЕНФ та їх похідних у дозі 1/10 ДЛ<sub>50</sub> спостерігалася статистично значуща ( $p < 0,001$ ), порівняно з контролем, зменшення вмісту IgA в сироватці крові щурів: для ОЕНФ<sub>10</sub> і КМ-ОЕНФ<sub>5</sub> в середньому в 2 рази, а для КМ-ОЕНФ<sub>6</sub> і КМ-ОЕНФ<sub>10</sub> – майже в 3 рази (табл. 1). Така ж динаміка змін вмісту IgA визначалася й для дози 1/100 ДЛ<sub>50</sub>, але менш виразна

(зменшення в середньому в 1,5 рази). Доза 1/1000 ДЛ<sub>50</sub> виявилася недіючою. Зниження вмісту Ig A свідчить про недостатність гуморального та місцевого імунітету. Показник рівня IgM також достовірно значуще ( $p < 0,001$ ), порівняно з контролем, знижувався на 45-ту добу перорального введення речовин у 1/10 і 1/100 ДЛ<sub>50</sub> в середньому відповідно в 2,0 і 1,5 рази (табл. 2). Максимально високим цей рівень був зареєстрований у випадку дії КМ-ОЕНФ<sub>5</sub>, мінімально низьким – у випадку дії ОЕНФ<sub>10</sub>. Слід відзначити, що тривалий вплив КМ-ОЕНФ<sub>5</sub> і КМ-ОЕНФ<sub>10</sub> у дозі 1/1000 ДЛ<sub>50</sub> також супроводжувався статистично значущим ( $p = 0,003$  і  $p = 0,032$  відповідно) зниженням вмісту IgM, тоді як ОЕНФ<sub>10</sub> і КМ-ОЕНФ<sub>6</sub> у цій дозі не впливали на рівень цього показника ( $p = 0,163$  і  $p = 0,087$ ). Оскільки IgM з'являються на першому етапі імунної відповіді та в основному знаходяться у судинному руслі, вони відіграють важливу захисну роль на ранніх стадіях токсемії. Виявлене зниження вмісту IgM також свідчить про недостатність гуморального імунітету, порушення їх синтезу або посилення катаболізму.

Таблиця 1  
Вміст імуноглобуліну А у сироватці крові щурів на 45-добу впливу оксигетильованих нонілфенолів та їх похідних (г/л; n=15; Me [25%; 75%] або M±s)

Речовина	Доза, ДЛ50		
	1/10	1/100	1/1000
ОЕНФ <sub>10</sub>	0,29±0,057 p<0,001	0,39 [0,36; 0,41] p<0,001	0,53 [0,48; 0,55] p=0,237
КМ-ОЕНФ <sub>5</sub>	0,22±0,039 p<0,001	0,33 [0,29; 0,37] p<0,001	0,51±0,031 p=0,69
КМ-ОЕНФ <sub>6</sub>	0,19 [0,17; 0,20] p<0,001	0,35 [0,28; 0,37] p<0,001	0,49±0,028 p=0,384
КМ-ОЕНФ <sub>10</sub>	0,18 [0,15; 0,22] p<0,001	0,29±0,037 p<0,001	0,46 [0,43; 0,48] p=0,019
Контроль	0,50±0,053		

Примітка: p – рівень значущості порівняно з контролем

Таблиця 2  
Вміст імуноглобуліну М у сироватці крові щурів на 45-добу впливу оксигетильованих нонілфенолів та їх похідних (г/л; n=15; Me [25%; 75%] або M±s)

Речовина	Доза, ДЛ50		
	1/10	1/100	1/1000
ОЕНФ <sub>10</sub>	0,52±0,094 p<0,001	0,63±0,069 p<0,001	0,82±0,062 p=0,163
КМ-ОЕНФ <sub>5</sub>	0,38±0,043 p<0,001	0,47±0,065 p<0,001	0,7 [0,69; 0,79] p=0,003
КМ-ОЕНФ <sub>6</sub>	0,42 [0,38; 0,44] p<0,001	0,52 [0,49; 0,56] p<0,001	0,76±0,037 p=0,087
КМ-ОЕНФ <sub>10</sub>	0,46±0,041 p<0,001	0,56±0,046 p<0,001	0,83±0,044 p=0,032
Контроль	0,81±0,028		

Примітка: p – рівень значущості порівняно з контролем

Вміст IgG у сироватці крові щурів на 45-добу дії ОЕНФ та їх похідних у дозі 1/10 ДЛ<sub>50</sub> також був достовірно нижчим ( $p < 0,001$ ) порівняно з даними групи контролю (табл. 3). У даному випадку найбільш суттєвим зниження цього показника характерно для КМ-ОЕНФ<sub>6</sub> (майже в 2 рази), найменш – для ОЕНФ<sub>10</sub> (в 1,4 рази). Тривалий вплив речовин у діючій дозі 1/100 ДЛ<sub>50</sub> та-

кож призводив до статистично значущого, порівняно з контролем, зниження рівня IgG у сироватці крові щурів, але воно було менш виразним (в середньому в 1,3 рази;  $p < 0,006$ ), ніж у випадку дії 1/10 ДЛ<sub>50</sub>. Дія речовин у дозі 1/1000 ДЛ<sub>50</sub> не викликала достовірно значущих змін з боку IgG. Стієке зниження рівня IgG свідчить про виснаження їх захисної ролі.

Таблиця 3  
Вміст імуноглобуліну G у сироватці крові щурів на 45-добу впливу оксигетильованих нонілфенолів та їх похідних (г/л; n=15; Me [25%; 75%] або M±s)

Речовина	Доза, ДЛ50		
	1/10	1/100	1/1000
ОЕНФ <sub>10</sub>	4,0±0,62 p<0,001	4,5±0,53 p=0,006	5,8 [4,9; 6,5] p=0,455
КМ-ОЕНФ <sub>5</sub>	2,9±0,53 p<0,001	4,0±0,88 p<0,001	5,1±0,95 p=0,283
КМ-ОЕНФ <sub>6</sub>	2,6 [2,4; 3,2] p<0,001	3,9±0,71 p<0,001	5,0 [4,8; 6,4] p=0,88
КМ-ОЕНФ <sub>10</sub>	3,3±0,65 p<0,001	4,3 [3,6; 5,0] p=0,002	5,4±0,79 p=0,89
Контроль	5,5±1,05		

Примітка: p – рівень значущості порівняно з контролем

Адекватна імунна відповідь базується на балансі клітинно-опосередкованих і гуморальних імунних реакцій, розвиток яких підтримується та регулюється цитокінами [7-9]. Речовини призводили до порушень з боку цитокінового профілю сироватки крові щурів (табл. 4). У разі їх тривалого перорального введення у дозі 1/100 ДЛ50 спостерігали, порівняно з контролем, зниження (p<0,003) рівня ІЛ-1β: для КМ-ОЕНФ<sub>5</sub> – майже в 2 рази, КМ-ОЕНФ<sub>6</sub> і КМ-ОЕНФ<sub>10</sub> – в середньому в 1,8 рази, ОЕНФ<sub>10</sub> – лише в 1,4 рази. Прозапальний цитокін ІЛ-1β має чисельні загальні ефекти і сприяє розвитку системного характеру патологічного процесу шляхом формування аутоантитіл і підвищення концентрації у крові С-реактивного білка. Зниження цього

показника є важливим діагностичним критерієм хронічного перебігу запального процесу в організмі щурів за умов тривалого впливу ОЕНФ та їх похідних. На 45-добу в сироватці крові щурів відзначалося також зниження рівня ІЛ-2 майже в 2 рази за умов впливу КМ-ОЕНФ<sub>5</sub> (p<0,001), в 1,8 рази – КМ-ОЕНФ<sub>6</sub> (p<0,001), в 1,5 рази – КМ-ОЕНФ<sub>10</sub> (p<0,001) та в 1,3 рази – ОЕНФ<sub>10</sub> (p=0,003). ІЛ-2 розглядається як регуляторний цитокін, здатний компенсувати прояви імунної недостатності, відновлювати баланс Т-хелперів, що призводить до регуляції продукції проти- та прозапальних цитокінів. Зниження продукції ІЛ-2 є підтвердженням виникнення Т-клітинного імунодефіциту.

Таблиця 4  
Вміст цитокінів у сироватці крові щурів на 45-добу впливу оксигетильованих нонілфенолів та їх похідних у дозі 1/100 ДЛ<sub>50</sub> (нг/л; n=15; Me [25%; 75%] або M±s)

Показник	ОЕНФ <sub>10</sub>	КМ-ОЕНФ <sub>5</sub>	КМ-ОЕНФ <sub>6</sub>	КМ-ОЕНФ <sub>10</sub>	Контроль
ІЛ-1β	40,2 [30,7; 50,5] p<0,001	29,3±6,36 p<0,001	30,3±5,69 p=0,0018	32,5 [29,0; 46,0] p<0,001	56,9±7,05
ІЛ-2	48,3±8,53 p=0,003	30,6±6,12 p<0,001	36,5 [25,8; 40,1] p<0,001	43,9 [32,1; 50,0] p<0,001	64,7±17,1
ІЛ-4	29,5 [26,0; 39,4] p<0,001	20,3 [17,5; 29,0] p<0,001	26,3±8,37 p<0,001	32,0 [27,9; 39,0] p<0,001	40,9 [39,4; 60,3]
ІЛ-6	24,4±6,04 p<0,001	18,9 [12,0; 28,5] p<0,001	28,9 [19,2; 30,2] p=0,0015	23,1±5,88 p<0,001	39,8 [35,0; 50,6]
ІЛ-8	31,8±6,58 p<0,001	20,1 [17,0; 27,0] p<0,001	25,1±6,27 p<0,001	30,5 [28,0; 44,5] p<0,001	48,4 [44,0; 59,0]
ІЛ-10	25,0 [19,3; 31,0] p<0,001	20,0 [15,1; 22,5] p<0,001	24,7 [17,0; 29,0] p<0,001	32,7±7,57 p=0,0013	43,9±9,66
ФНП-α	110,0 [90,6; 118,6] p<0,001	97,8 [80,5; 108,3] p<0,001	85,8±11,84 p=0,0016	118,0±9,39 p<0,001	136,8 [123,8; 148,4]

Примітка: p – рівень значущості порівняно з контролем

Як маркер аутоімунних і алергійних процесів розглядають ІЛ-4, який обумовлює активацію гуморального ланцюга імунної системи, стимулює проліферацію та диференціювання В-клітин, синтез загального ІgE, а також інгібує моноцити й макрофаги, продукцію ФНП-α. У сироватці крові щурів на 45-ту добу впливу речовин у дозі 1/100 ДЛ<sub>50</sub> виявлялося зниження (p<0,001), порівняно з контролем, рівня ІЛ-4 в середньому в 1,6 рази. Зниження секреції ІЛ-4, у даному випадку, може супроводжуватися пригніченням антигенної стимуляції Т- і В-лімфоцитів, макрофагів, тучних клітин, базофілів, стромальних клітин, гемопоетичних попередників тощо.

Тривала дія ОЕНФ та їх похідних призводила також до зниження (p<0,0015) в сироватці крові тварин вмісту ІЛ-6 в середньому в 1,7 рази. Біологічна роль ІЛ-6, по-перше, полягає в індукції відновлювальних механізмів та активації імунного захисту (активація і диференціювання Т-клітин, визрівання В-клітин, посилення гемопоезу). Поряд з цим також відома гальмівна дія ІЛ-6 на запальну реакцію шляхом гальмування синтезу ряду прозапальних субстанцій, в тому числі ФНП-α. Виявлене зниження рівня ІЛ-6 за умов тривалої дії речовин може призвести до пригнічення їх функціональної активності та зниження гуморальної імунної відповіді. Аналогічно спостерігалася тенденція до

статистично значущого ( $p < 0,001$ ), порівняно з контролем, зниження вмісту ІЛ-8. Найбільш суттєвим це виявилось для тривалої дії ОЕНФ<sub>10</sub> у дозі 1/100 ДЛ<sub>50</sub>, а саме в 2,4 рази. Інші речовини знижували вміст ІЛ-8 в середньому в 1,7 рази. Цитокін ІЛ-8 продукується моноцитами та макрофагами, виконує роль індуктора гострих запальних реакцій, викликаючи експресію молекул міжклітинної адгезії та посилюючи адгезію нейтрофілів до ендотеліальних клітин і субендотеліальних матричних білків, що свідчить про його основну роль в опосередкуванні запальної відповіді. Зниження його продукції є однією з причин пригнічення клітинного та гуморального імунітету.

До цитокінів з виразним протизапальним ефектом відноситься ІЛ-10, який продукується Т-клітинами й розглядається як антагоніст ряду інших цитокінів. ІЛ-10 пригнічує продукцію прозапальних цитокінів, проліферативну відповідь Т-клітин на антигени й мітогени, а також зменшує секрецію активованими моноцитами ІЛ-1 $\beta$ , ФНП- $\alpha$ , ІЛ-6. Але одночасно ІЛ-10 може стимулювати синтез ІgE. У результаті він сприяє розвитку гуморальної складової імунної відповіді. ОЕНФ<sub>10</sub>, КМ-ОЕНФ<sub>5</sub>, КМ-ОЕНФ<sub>6</sub> у діючій дозі 1/100 ДЛ<sub>50</sub> на 45-добу дії призводили до зниження ( $p < 0,001$ ) рівня ІЛ-10 в середньому в 2 рази. Для КМ-ОЕНФ<sub>10</sub> падіння ( $p < 0,0013$ ) рівня ІЛ-10 було менш виразним, лише в 1,3 рази. Ці зміни також вказують на порушення функціонального стану захисних систем організму щурів.

У імунометаболічному плані важливе значення мають результати щодо вмісту ФНП- $\alpha$ . Так, у сироватці крові щурів на 45-ту добу введення речовин вміст цього показника статистично значуще ( $p < 0,001$ ) знижувався, в середньому в 1,4 рази, порівняно з контрольною групою. ФНП- $\alpha$  продукується як клітинами імунної системи, так й іншими типами клітин (астроцитами, фібробластами, гліальними клітинами, кератиноцитами). Низькі рівні ФНП- $\alpha$  за умов тривалого впливу досліджуваних речовин можуть бути пов'язані з недостатньою стимуляцією макрофагального захисту організму.

У цілому зниження цитокінів в крові щурів за умов тривалої дії ППЕ є свідченням глибоких порушень імунітету, проявом розвитку вторинного імунної недостатності.

### Висновки

1. ОЕНФ та їх похідні за умов тривалої дії у дозах 1/10 і 1/100 ДЛ<sub>50</sub> призводять до супресії антитілотворення в організмі щурів, що підтверджується зниженням в сироватці крові рівня імуноглобулінів А, М і G. Доза 1/1000 ДЛ<sub>50</sub> виявляється недіючою на вміст імуноглобулінів. 2. ОЕНФ та їх похідні у разі тривалого перорального впливу у діючій дозі 1/100 ДЛ<sub>50</sub> викликають суттєві порушення у системі цитокінів – медіаторів контролю процесів проліферації, диференціювання, апоптозу та функціональної активності клітинних елементів у гомеостатичних системах організму, що підтверджується зниженням у сироватці крові щурів секреції ІЛ-1 $\beta$ , 2, 4, 6, 8, 10 та ФНП- $\alpha$ . 3. Зміни з боку імуноглобулінів та цитокінів можуть слугувати додатковими прогностичними тестами, що характеризують несприятливий вплив ОЕНФ та їх похідних у дозах 1/10 і 1/100 ДЛ<sub>50</sub> на організм теплокровних тварин.

### Література

1. Постанова М.В. Физиологические механизмы индивидуальной организации гомеостаза организма. - Волгоград: Изд-во ВолГУ, 2011. - 356 с.
2. Забродский П. Ф. Иммунотоксикология ксенобиотиков / П. Ф. Забродский, В. Г. Мандыч. - Саратов: СВИБХБ, 2007. - 420 с.
3. Татаркин А.А. Нейроиммуноэндокринные взаимодействия в системе межклеточной функциональной многоуровневой регуляции гомеостаза / А.А. Татаркин, Н.Д. Татаркина, Б.Г. Андрюков // Здоровье. Медицинская экология. Наука. - 2010. - Т. 43, № 3. - С. 13-17.
4. Аманжол И.А. Реакция организма на воздействие вредных производственных факторов: оценка профессионального риска / И.А. Аманжол, З.Т. Мухаметжанова, Д.С. Абитаев. - Lambert Academic Publishing, 2013. - 116 с.
5. Детергенти сучасності: технологія виробництва, екологія, економіка використання / В.А. Бурлака, Г.Б. Руденко, І.Г. Грабар, А.Д. Біба. - Ж.: ЖДТУ, 2004. - 745 с.
6. Научные основы обоснования прогноза потенциальной опасности детергентов в связи с регламентацией в воде водоемов / [Цыганенко А.Я., Жуков В.И., Щербань Н.Г., Евдокимов В.И. и др.]. - Белгород, 2001. - 442 с.
7. Кетлинский С.А. Цитокины / С.А. Кетлинский, А.С. Симбирцев. - СПб.: ООО «Издательство Фолиант», 2008. 552 с.
8. Чуклин С.Н. Интерлейкины / С.Н. Чуклин, А.А. Переяслов. - Львов: Лига-Пресс, 2005. - 481 с.
9. Казмірчук В.Є. Клінічна імунологія і алергологія / В.Є. Казмірчук, Л.В. Ковальчук. - Вінниця: Нова книга, 2006. - 528 с.