

## СТАН ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОЇ РІВНОВАГИ В ОРГАНІЗМІ ЩУРІВ ПРИ ТРИВАЛОМУ ВПЛИВІ ОКСИЕТИЛЬОВАНИХ НОНІЛФЕНОЛІВ ТА ЇХ ПОХІДНИХ

Харківський національний медичний університет (м. Харків)

Робота виконана у рамках науково-дослідної роботи Харківського національного медичного університету «Вивчення механізмів біологічної дії простих полієфірів у зв'язку з проблемою охорони навколишнього середовища», № держ. реєстрації 0110U001812.

**Вступ.** Сучасні напрями медичної науки потребують своєчасного глибокого вивчення впливу хімічних факторів довкілля на здоров'я людини [3, 11]. Перш за все це пов'язано зі збільшенням синтезу промислових органічних речовин, які знаходять широкого кола застосування [1]. До останніх 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. ОЕНФ та їх похідні характеризуються досить значними об'ємами синтезу, широким використанням у різних галузях народного господарства (як основа промислового випуску пластмас, поліуретанів, миючих засобів, емульгаторів, антикорозійних препаратів, гідралічних та охолоджуючих речовин тощо), надходженням до джерел питного водопостачання та завдяки цьому можливим впливом на здоров'я людини [5, 8].

Однією з ключових ланок механізму дії багатьох хімічних факторів на організм вважається активація вільнорадикальних процесів, що реалізується у вигляді перекидного окиснення ліпідів (ПОЛ) [9]. Посилення цих процесів призводить, як правило, до порушення існуючого у фізіологічних умовах балансу між анти- та прооксидантами у бік підвищення активності останніх, тобто виникнення оксидативного стресу [10]. Неконтрольована генерація активних форм кисню при оксидативному стресі супроводжується порушенням структурно-функціонального стану клітинних мембран, процесів внутрішньоклітинного метаболізму, суттєвими змінами гомеостазу [2]. У зв'язку з цим, необхідність корекції оксидативного стресу, як однієї з причин виникнення екологічно обумовленої патології в осіб, які тривалий час контактують з хімічними факторами виробництва, має суттєве значення. Відсутність у науковій літературі даних щодо дії ОЕНФ та їх

похідних на стан прооксидантно-антиоксидантної рівноваги зумовлює актуальність проведення такого роду досліджень з метою всебічного розкриття механізмів дії на організм та розроблення засобів їх корекції.

**Метою** даного дослідження було визначення вмісту малонового діальдегіду, активності супероксиддисмутази та каталази в крові щурів за умов тривалого перорального впливу оксиетильованих нонілфенолів та їх похідних у дозах 1/10 і 1/100 ДЛ50.

**Об'єкт і методи дослідження.** У роботі використано зразки речовин з регламентованими фізико-хімічними характеристиками: ОЕНФ з числом оксиетильованих груп 8, 12 (ОЕНФ<sub>8,12</sub>) та КМ-ОЕНФ з числом оксиетильованих груп 4, 5 (КМ-ОЕНФ<sub>4,5</sub>). Експерименти проведено на статевозрілих щурах-самцях лінії WAG, масою (180-220) г. Утримання тварин та експерименти проводилися відповідно до положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей» (Страсбург, 1985), «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001).

Тварин піддавали пероральній затравці за допомогою зонда водними розчинами речовин щоденно одноразово протягом 45 діб у дозах 1/10 і 1/100 ДЛ50. Середньолетальні дози (ДЛ50) складали для ОЕНФ<sub>8</sub> – 5,1 г/кг; ОЕНФ<sub>12</sub> – 3,4 г/кг; КМ-ОЕНФ<sub>4</sub> – 6,1 г/кг; КМ-ОЕНФ<sub>5</sub> – 2,8 г/кг маси тіла. Тваринам контрольної групи вводили відповідні об'єми питної води. Дослідження показників проводили через 45 діб після початку експерименту. У кожній групі було по 15 тварин. Щурів декапітували, попередньо анестезуючи тіопенталом натрію. Вміст малонового діальдегіду (МДА) визначали за методом [12], що базується на реакції з тіобарбітуровою кислотою, яка за умов високої температури та кислого середовища відбувається з утворенням забарвленого триметинового комплексу з максимумом поглинання при 532 нм. Активність супероксиддисмутази (СОД) (КФ 1.15.1.1) еритроцитів визначали спектрофотометричним методом за ступенем інгібування відновлення нітросинього тетразолію [4]. Активність каталази (КФ 1.11.1.6) визначали у гемолізаті крові

Таблиця 1

**Вміст малонового діальдегіду у сироватці крові щурів на 45-добу впливу оксиетильованих нонілфенолів та їх похідних (мкмоль/л; n = 15; Me [25 %; 75 %] або M ± s)**

Речовина	Доза, ДЛ50	
	1/10	1/100
ОЕНФ <sub>8</sub>	7,2 ± 1,4; p < 0,001	5,0 ± 1,92; p < 0,001
ОЕНФ <sub>12</sub>	4,0 ± 1,25; p = 0,002	3,2 ± 1,12; p = 0,09
КМ-ОЕНФ <sub>4</sub>	5,8 [5,0; 7,4]; p < 0,001	4,0 ± 1,31; p = 0,002
КМ-ОЕНФ <sub>5</sub>	4,2 ± 1,39; p = 0,002	3,7 ± 1,23; p = 0,009
Контроль	2,3 [1,9; 3,4]	

**Примітка:** p – рівень значущості порівняно з контролем.

спектрофотометричним методом при 230 нм [6]. 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. 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 Стюдента. 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 досліджень та їх обговорення.** У сироватці крові щурів на 45-ту добу дії досліджуваних речовин у дозі 1/10 ДЛ50 спостерігалось статистично значуще (p < 0,002), порівняно з контролем, зростання рівня МДА: в 3 рази для ОЕНФ<sub>8</sub>, в 2,5 рази для КМ-ОЕНФ<sub>4</sub>, в 1,8 рази для КМ-ОЕНФ<sub>5</sub> та 1,7 рази для ОЕНФ<sub>12</sub> (табл. 1). Слід підкреслити, що доза 1/100 ДЛ50 по відношенню до сироваткового МДА виявилася діючою для всіх речовин, окрім ОЕНФ<sub>12</sub> (p = 0,09). Так, спостерігалось підвищення вмісту МДА у разі впливу ОЕНФ<sub>5</sub> в 2,2 рази (p < 0,001), КМ-ОЕНФ<sub>4</sub> в 1,7 рази (p = 0,002) та КМ-ОЕНФ<sub>5</sub> в 1,6 рази (p = 0,009). Таким чином, зі збільшенням тривалості впливу ОЕНФ та їх похідних на організм щурів кількість продуктів ПОЛ зростає і, як наслідок, підвищується небезпека пошкодження мембранних структур. Згідно даних літератури продукти ПОЛ, зокрема МДА, є маркерами виникаючих патологічних станів, що зміщують прооксидантно-антиоксидантну

рівновагу у бік накопичення прооксидантів [10]. Для підтвердження цього у щурів визначали активність ферментів першої лінії антиоксидантного захисту.

На 45-ту добу дії речовин у дозі 1/10 ДЛ50 спостерігалось статистично значуще (p < 0,001), по відношенню до контролю, зниження активності СОД: в 2,5; 2,2; 1,7 та 1,5 рази відповідно для КМ-ОЕНФ<sub>4</sub>, КМ-ОЕНФ<sub>5</sub>, ОЕНФ<sub>12</sub> та ОЕНФ<sub>8</sub> (табл. 2). У випадку 1/100 ДЛ50 виявлялася протилежна динаміка змін. ОЕНФ<sub>12</sub> та КМ-ОЕНФ<sub>5</sub> викликали статистично достовірне (p < 0,001), порівняно з контролем, зниження активності еритроцитарної СОД, що можна розглядати як зрив метаболічної адаптації та антиоксидантного захисту в організмі експериментальних тварин. ОЕНФ<sub>8</sub> та КМ-ОЕНФ<sub>4</sub>, навпаки, у дозі 1/100 ДЛ50 призводили до підвищення активності СОД відповідно в 1,2 (p = 0,006) та 1,5 (p < 0,001) рази, що можна трактувати як захисно-приспосувальну реакцію організму на тривалий вплив речовин. На цьому тлі тривалий вплив всіх досліджуваних речовин супроводжувався зниженням активності каталази крові: в середньому в 1,6 рази у випадку дози 1/10 ДЛ50; в 1,4 рази – 1/100 ДЛ50. Виявлене зниження активності каталази та СОД є однією з причин розвитку оксидативного стресу, так як дані ферменти відповідальні за видалення первинних активних форм кисню – супероксидних аніон-радикалів і перекису водню [10].

Стан антиоксидантних систем та процесів ПОЛ добре відображає антиоксидантно-прооксидантний індекс (АПІ) – співвідношення активності каталази до вмісту МДА (табл. 3). У всіх експериментальних групах тварин чітко простежувалося статистично значуще (p < 0,026), порівняно з контролем, зниження значення АПІ: майже в 4 і 2,3 рази для ОЕНФ<sub>8</sub> відповідно у дозі 1/10 і 1/100 ДЛ50; в 3 і 1,7 рази для КМ-ОЕНФ<sub>4</sub>; в 2,7 і 2 рази для КМ-ОЕНФ<sub>5</sub>; в 1,8 і 1,4 рази для ОЕНФ<sub>12</sub>.

Отримані результати переконливо свідчать про значне напруження функціонування в організмі експериментальних тварин прооксидантно-антиоксидантної рівноваги у бік збільшення продукції

Таблиця 2

**Активність супероксиддисмутази еритроцитів та каталази крові щурів на 45-добу впливу оксиетильованих нонілфенолів та їх похідних (n = 15; Me [25 %; 75 %] або M ± s)**

Речовина	Доза, ДЛ50	Супероксиддисмутаза, моль/хвЧг гемоглобіну	Каталаза, мкмоль/хв-г гемоглобіну
ОЕНФ <sub>8</sub>	1/10	9,9 ± 2,02; p < 0,001	278 [228; 335]; p < 0,001
	1/100	20,5 [19,2; 28,4]; p = 0,006	340 [305; 410]; p < 0,001
ОЕНФ <sub>12</sub>	1/10	7,7 [7,2; 8,2]; p < 0,001	379,4 ± 38,15; p = 0,004
	1/100	11,1 ± 2,10; p < 0,001	367 [330; 476]; p = 0,036
КМ-ОЕНФ <sub>4</sub>	1/10	11,2 ± 2,08; p < 0,001	354,7 ± 37,68; p < 0,001
	1/100	25,4 ± 6,81; p = 0,001	405,7 ± 47,95; p = 0,031
КМ-ОЕНФ <sub>5</sub>	1/10	6,7 [5,5; 8,2]; p < 0,001	255,9 ± 44,78; p < 0,001
	1/100	10,4 [7,7; 13,4]; p < 0,001	316,4 ± 53,11; p < 0,001
Контроль		17,0 ± 3,98	488 [390; 505]

**Примітка:** p – рівень значущості порівняно з контролем.

**Таблиця 3**

**Антиоксидантно-прооксидантний індекс у щурів на 45-добу впливу оксиетильованих нонілфенолів та їх похідних (ум. од.; n = 15; Me [25 %; 75 %] або M ± s)**

Речовина	Доза, ДЛ50	
	1/10	1/100
ОЕНФ <sub>а</sub>	42,8 ± 16,86; p < 0,001	81,7 ± 36,47; p < 0,001
ОЕНФ <sub>12</sub>	104,1 ± 36,66; p < 0,001	137,4 ± 52,28; p = 0,026
КМ-ОЕНФ <sub>4</sub>	61,3 ± 15,95; p < 0,001	111,8 ± 41,63; p = 0,001
КМ-ОЕНФ <sub>5</sub>	69,7 [44,6; 88,9]; p < 0,001	96,6 ± 40,7; p < 0,001
Контроль	188,5 ± 61,53	

**Примітка:** p – рівень значущості порівняно з контролем.

активних форм кисню, активації процесів ПОЛ, здатних перебороти бар'єр антиоксидантного захисту. Ці результати добре узгоджуються з даними літератури щодо індукованого впливу іоногенних детергентів на пероксидні процеси в організмі теплокровних тварин [7]. Крім того, літературні джерела свідчать про можливість ОЕНФ приймати участь в окисно-відновлювальних процесах, викликати збільшення активних форм кисню та розвиток оксидативного стресу на тлі виснаження антиоксидантних ресурсів [8].

## **Висновки.**

1. На тлі тривалої інтоксикації ОЕНФ та їх похідними у дозах 1/10 і 1/100 ДЛ50 у крові щурів

ініціюється зсув прооксидантно-антиоксидантної рівноваги у бік прооксидантів, що підтверджується підвищенням рівня малонового діальдегіду на тлі зниження активності ферментів першої лінії антиоксидантного захисту – супероксиддисмутази еритроцитів та каталази крові.

2. Продукти перекисного окиснення ліпідів внаслідок високої реактогенної здатності та вибіркової у біологічній дії можуть виступати в якості основного ланцюга, що лімітує стан стійкості організму до тривалого впливу ОЕНФ та їх похідних через зміну фізико-хімічних характеристик клітинних мембран, активності мембрано-локалізованих та ліпідозалежних ферментів, реактивності нейроендокринної, імунної та інших систем організму.

3. Інтенсифікація процесу перекисного окиснення ліпідів на тлі виснаження антиоксидантних ресурсів є однією з патогенетичних ланок механізмів дії ОЕНФ та їх похідних, що необхідно враховувати при розробленні засобів їх корекції.

**Перспективи подальших досліджень.** У подальшому планується провести комплекс досліджень, спрямованих на вивчення структурно-функціонального стану клітинних мембран при тривалому впливі ОЕНФ та їх похідних.

## **Література**

1. 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.
2. Апоптоз и окислительный стресс / Н. Ю. Часовских, Н. В. Рязанцева, В. В. Новицкий. – Сибирский медицинский университет. – Томск : Печатная мануфактура, 2009. – 148 с.
3. Белозерова С. М. Особенности формирования заболеваемости в условиях индустриального труда и новых технологий / С. М. Белозерова // Медицина труда и промышленная экология. – 2011. – № 3. – С. 13-19.
4. Гуревич В. С. Сравнительный анализ двух методов определения активности супероксиддисмутаза / В. С. Гуревич, К. Н. Конторщикова // Лабораторное дело. – 1990. – № 4. – С. 44-47.
5. Детергенти сучасності: технологія виробництва, екологія, економіка використання / В. А. Бурлака, Г. Б. Руденко, І. Г. Грабар [та ін.]. – Житомир : ЖДТУ, 2004. – 745 с.
6. Дубинина Е. Е. Сравнительный анализ активности супероксиддисмутаза и каталазы эритроцитов и цельной крови у новорожденных детей при хронической гипоксии / Е. Е. Дубинина, Л. Ф. Ефимова, Л. Н. Софронова, А. Л. Геронимус // Лабораторное дело. – 1988. – № 8. – С. 16-19.
7. Медико-биологические аспекты проблемы охраны водных объектов от загрязнения поверхностно-активными веществами / Р. И. Кратенко, Ю. К. Резуненко, О. В. Зайцева и др.; Под ред. В. И. Жукова. – Х. : Торнадо, 2000. – 394 с.
8. 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. – 442с.
9. Новиков К. Н. Свободно-радикальные процессы в биологических системах при воздействии факторов окружающей среды / К. Н. Новиков, Котелевцев С. В., Ю. П. Козлов. – М. : РУДН, 2011. – 199 с.
10. Окислительный стресс: патологические состояния и заболевания / Е. Б. Меншикова, Н. К. Зенков, В. З. Ланкин [и др.]. – М. : АРТА, 2008. – 284 с.
11. Оценка воздействия химического загрязнения окружающей среды как фактора риска для здоровья человека: аналитический обзор // Вестник ТГПУ. – 2010. – Вып. 3 (93). – С. 156-161.
12. Федорова Т. Н. Реакции с тиобарбитуровой кислотой для определения малонового диальдегида крови методом флуориметрии / Т. Н. Федорова, Т. С. Коршунова, Э. Г. Ларский // Лабораторное дело. – 1983. – № 3. – С. 25-28.

**УДК 612.015.12:616-099-092.9:543.395**

## **СТАН ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОЇ РІВНОВАГИ В ОРГАНІЗМІ ЩУРІВ ПРИ ТРИВАЛОМУ ВПЛИВІ ОКСИЕТИЛЬОВАНИХ НОНІЛФЕНОЛІВ ТА ЇХ ПОХІДНИХ**

**Маракушин Д. І.**

**Резюме.** Вивчено стан прооксидантно-антиоксидантної рівноваги за умов тривалого впливу оксиетильованих нонілфенолів та їх похідних. У дозах 1/10 і 1/100 ДЛ50 оксиетильовані нонілфеноли ініціюють зсув прооксидантно-антиоксидантної рівноваги у бік прооксидантів. Продукти перекисного окиснення

ліпідів лімітують стійкість організму до тривалого впливу оксиетильованих нонілфенолів та їх похідних через зміну фізико-хімічних характеристик клітинних мембран, активності мембрано-локалізованих ферментів, реактивності нейроендокринної та імунної систем.

**Ключові слова:** оксиетильовані нонілфеноли, прооксиданти, антиоксиданти, щури.

УДК 612. 015. 12:616-099-092. 9:543. 395

### **СОСТОЯНИЕ ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОГО РАВНОВЕСИЯ В ОРГАНИЗМЕ КРЫС ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ ВЛИЯНИИ ОКСИЭТИЛИРОВАННЫХ НОНИЛФЕНОЛОВ И ИХ ПРОИЗВОДНЫХ**

**Маракушин Д. И.**

**Резюме.** Изучено состояние прооксидантно-антиоксидантного равновесия в условиях длительного воздействия оксиэтилированных нонилфенолов и их производных. В дозах 1/10 и 1/100 ДЛ50 оксиэтилированные нонилфенолы инициируют сдвиг прооксидантно-антиоксидантного равновесия в сторону прооксидантов. Продукты перекисного окисления липидов лимитируют устойчивость организма к длительному действию оксиэтилированных нонилфенолов и их производных через изменение физико-химических характеристик клеточных мембран, активности мембрано-локализованных ферментов, реактивности нейро-эндокринной и иммунной систем.

**Ключевые слова:** оксиэтилированные нонилфенолы, прооксиданты, антиоксиданты, крысы

UDC 612. 015. 12:616-099-092. 9:543. 395

### **The State of the Prooxidative-Antioxidative Balance in the Rats Organism during the Long-Term Influence of Oxyethylized Nonylphenols and their Derivatives**

**Marakushin D. I.**

**Abstract.** The purpose of the present work was a determination of malonic dialdehyde content, activity of superoxide dismutase and catalase in the blood of rats in conditions of the long-term influence of oxyethylized nonylphenols and their derivatives at a dose of 1/10 and 1/100 DL50.

The standards of compounds with scheduled physical-chemical properties were used in the work: OENP with number of oxyethylized groups 8, 12 (OENP 8,12) that CM-OENP with number of oxyethylized groups 4, 5 (CM-OENP 4,5). The experiments were carried out on white rats of WAG population. The duration of subacute influence was 45 days. 15 animals were in every group. The content of malonic dialdehyde (MDA) was determined by method, which is based on the reaction with thiobarbituric acid. The activity of superoxide dismutase (SOD) was determined by a spectrophotometric method on degree of tetrazolium blue inhibition-renewal. The activity of catalase in the blood was determined by a spectrophotometric method ( $\lambda_{\text{abs}} = 230 \text{ nm}$ ).

The statistically significant ( $p < 0,002$ ), comparatively with the control, an increase of MDA level is revealed in blood of rats on 45-day of the influence of studied compounds at a dose of 1/10 DL50: by 3 times for OENP<sub>8</sub>, by 2,5 times for CM-OENP<sub>4</sub>, by 1,8 times for CM-OENP<sub>5</sub> and by 1,7 times for OENP<sub>12</sub>. The dose of 1/100 DL50 in relation to serum MDA was effective for all compounds, except for OENP<sub>12</sub> ( $p = 0,09$ ). The statistically significant ( $p < 0,001$ ) decrease of SOD activity was observed on 45-day of compounds influence at a dose of 1/10 DL50: by 2,5; 2,2; 1,7 and 1,5 times accordingly for CM-OENP<sub>4</sub>, CM-OENP<sub>5</sub>, OENP<sub>12</sub> and OENP<sub>8</sub>. The opposite dynamics of changes was revealed in the case of 1/100 DL50. OENP<sub>12</sub> and CM-OENP<sub>5</sub> caused statistically significant ( $p < 0,001$ ), comparatively with the control, decrease of SOD activity, that it is possible to consider as a derangement of the metabolic adaptation and antioxidative defence in the organism of experimental animals. And vice versa OENP<sub>8</sub> and CM-OENP<sub>4</sub>, at a dose of 1/100 DL50 led to the increase of SOD activity accordingly by 1,2 ( $p = 0,006$ ) and 1,5 ( $p < 0,001$ ) times, that may be to interpret as a protectively-adaptive reaction of an organism on the long-term influence of studied compounds. On this background the long-term influence of all studied compounds was accompanied by the decrease of catalase activity: at the average by 1,6 times in the case of dose 1/10 DL50; by 1,4 times – 1/100 DL50.

In all experimental groups of animals the statistically significant decrease of API value ( $p < 0,026$ ), comparatively with the control is revealed: almost by 4 and 2,3 times for OENP<sub>8</sub> accordingly at a dose of 1/10 and 1/100 DL50; by 3 and 1,7 times for CM-OENP<sub>4</sub>; by 2,7 and 2 times for CM-OENP<sub>5</sub>; by 1,8 and 1,4 times for OENP<sub>12</sub>.

Oxyethylized nonylphenols at a dose of 1/10 and 1/100 DL50 initiate the alteration of prooxidative-antioxidative balance sideways to prooxidants. The Products of lipid peroxidation limit stability of the organism to long-term influence of oxyethylized nonylphenols and their derivatives through change of physico-chemical features of cellular membranes, activity of membrane-localized enzymes, reactivity of neuroendocrine and immune systems.

Hereafter it is planned to carry out the complex of the researches directed on the study of the structural-functional state of the cellular membranes under the influence of OENP and their derivatives.

**Keywords:** oxyethylized nonylphenols, prooxidants, antioxidants, rats.

*Рецензент – проф. Костенко В. О.*

*Стаття надійшла 18. 08. 2014 р.*