

## ВПЛИВ ОКСИЕТИЛЬОВАНИХ НОНІЛФЕНОЛІВ ТА ЇХ ПОХІДНИХ НА ПРОЦЕСИ ЛІПОПЕРОКСИДАЦІЇ ТА ОКИСНОЇ МОДИФІКАЦІЇ БІЛКІВ В ОРГАНІЗМІ ЩУРІВ

©Д. І. Маракшин

*Харківський національний медичний університет*

**РЕЗЮМЕ.** У статті наведено дані про зміну стану процесів ліпопероксидації та окисної модифікації білків в організмі щурів за умов тривалого впливу оксиетильованих нонілфенолів та їх похідних. Встановлено, що тривала інтоксикація оксиетильованими нонілфенолами та їх похідними у дозах 1/10 і 1/100 ДЛ50 у сироватці крові щурів ініціює процеси оксидативного стресу з деструкцією білкових і ліпідних молекул. Продукти перекисного окислення ліпідів та окисної модифікації білків внаслідок високої реактогенної здатності та вибіркової дії можуть виступати в якості основного ланцюга, що лімітує стан стійкості організму до тривалого впливу оксиетильованих нонілфенолів та їх похідних через зміну фізико-хімічних характеристик клітинних мембран, активності мембрано-локалізованих та ліпідозалежних ферментів, реактивності нейроендокринної, імунної та інших систем організму.  
**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** оксиетильовані нонілфеноли, дієнові кон'югати, ТБК-реактанти, шифові основи.

**Вступ.** Однією з ключових ланок механізму дії багатьох ксенобіотиків (КБ) на організм вважається активація вільнорадикальних процесів, що реалізується у вигляді перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) та окисної модифікації білків (ОМБ) [1–4]. 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 [5]. Неконтрольована генерація активних форм кисню при оксидативному стресі супроводжується порушенням структурно-функціонального стану клітинних мембран, процесів внутрішньоклітинного метаболізму, суттєвими змінами гомеостазу [6]. У зв'язку з цим, необхідність корекції оксидативного стресу, як однієї з причин виникнення екологічно обумовленої патології в осіб, які тривалий час контактують з КБ, має суттєве значення.

До поширених на даний час КБ належать іоногенні детергенти, інтенсифікація виробництва яких зумовила забруднення ними водних об'єктів господарсько-питного та культурно-побутового призначення [7]. До числа високоперспективних у народногосподарському відношенні іоногенних детергентів належать оксиетильовані нонілфеноли (ОЕНФ) та їх похідні – натрієві солі карбоксиметилатів оксиетильованих ізононілфенолів (КМ-ОЕНФ). Останні характеризуються досить значними об'ємами синтезу, широким використанням (як основи промислового випуску пластмас, пінопластів, поліуретанів, миючих засобів, емульгаторів, антикорозійних препаратів, гідравлічних та охолоджуючих речовин тощо), надходженням до джерел питного водопостачання населення, та, завдяки цьому, можливим впливом на організм людини [8]. Стан процесів ПОЛ та ОМБ за умов тривалого впливу ОЕНФ та їх похідних, дані щодо кількісного вмісту їх продуктів вивчені недостатньо, а саме їх урахування є необхідним для всебічного

розкриття механізмів дії на організм та розроблення засобів їх корекції.

**Метою дослідження** було визначення у сироватці крові щурів вмісту дієнових кон'югатів, ТБК-реактантів, шифових основ та кетон-динітрофенілгідразонів за умов тривалого перорального впливу оксиетильованих нонілфенолів та їх похідних у дозах 1/10 і 1/100 ДЛ50.

**Матеріал і методи дослідження.** У роботі використано зразки речовин з регламентованими фізико-хімічними характеристиками: ОЕНФ з числом оксиетильованих груп 12 (ОЕНФ<sub>12</sub>) та КМ-ОЕНФ з числом оксиетильованих груп 5 (КМ-ОЕНФ<sub>5</sub>). Експерименти проведено на статевозрілих щурах-самцях лінії WAG, масою 180–220 г. Утримання та маніпуляції над тваринами виконувались відповідно до основних принципів у сфері біоетики. Тварин піддавали пероральній затравці за допомогою зонда водними розчинами речовин щоденно одноразово протягом 45 днів у дозах 1/10 і 1/100 ДЛ50. Середньолетальні дози (ДЛ50) складали для ОЕНФ<sub>12</sub> – 3,4 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 днів після початку експерименту. У кожній групі було по 15 тварин. Щурів декапітували, попередньо анестезуючи тіопенталом натрію. Вміст дієнових кон'югатів (ДК) визначали спектрофотометричним методом при 233 нм з попередньою екстракцією гептан-ізопропаноловою сумішшю [9]. Вміст ТБК-реактантів визначали за методом [10], що базується на реакції між малоновим діальдегідом і тіобарбітуровою кислотою, яка за умов високої температури та кислого середовища відбувається з утворенням забарвленого триметинового комплексу з максимумом поглинання при 532 нм. Шифові основи екстрагували сумішшю Фолча (хлороформ-метанол) з подальшим спектрофлуориметричним визначенням в хлороформ-

ному екстракті при довжині хвилі збудження 360 нм та довжині хвилі емісії 430 нм [11]. Оцінку інтенсивності окисної модифікації білків сироватки крові проводили за допомогою модифікованого спектрофотометричного методу О. Є. Дубініної та співавт. [12], який ґрунтується на реакції взаємодії окислених амінокислотних залишків білків з 2,4-динітрофенілгідразином з утворенням 2,4-динітрофенілгідразонів (ДНФГ), які реєстрували при 356, 370 і 430 нм. 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 застосо-

ували критерій Манна-Уїтні. За критичний рівень значущості при перевірці статистичних гіпотез приймали  $p < 0,05$ .

**Результати й обговорення.** На 45-ту добу дії КМ-ОЕНФ<sub>5</sub> і ОЕНФ<sub>12</sub> у дозі 1/10 ДЛ50 в сироватці крові щурів спостерігалось статистично значуще ( $p < 0,002$ ), порівняно з контролем, підвищення вмісту ДК, відповідно в 1,5 і 1,3 раза (табл. 1). Для дози 1/100 ДЛ50 збільшення вмісту ДК виявилось недостовірним ( $p = 0,16$  та  $p = 0,11$ ). Крім того, у сироватці крові щурів при тривалій дії речовин у дозі 1/10 ДЛ50 визначалося зростання ( $p < 0,002$ ) рівня ТБК-реактивів: в 1,8 і 1,7 раза відповідно для КМ-ОЕНФ<sub>5</sub> і ОЕНФ<sub>12</sub> (табл. 1). Слід підкреслити, що доза 1/100 ДЛ50 по відношенню до сироваткових ТБК-реактивів виявилась діючою лише для КМ-ОЕНФ<sub>5</sub> (зростання в 1,6 раза,  $p = 0,009$ ). Для шифових основ також відмічалось статистично значуще, порівняно з контролем, підвищення майже в 3 рази ( $p < 0,001$ ) в результаті дії речовин у дозі 1/10 ДЛ50. Така сама динаміка зміни цього показника спостерігалась й за умов впливу 1/100 ДЛ50: збільшення ( $p < 0,001$ ) при цьому становило 2,9 і 2,2 раза відповідно для КМ-ОЕНФ<sub>5</sub> і ОЕНФ<sub>12</sub>.

Таблиця 1. Вміст продуктів перекисного окислення ліпідів у сироватці крові щурів на 45 добу впливу оксидетильованих нонілфенолів та їх похідних (n=15; Me [25 %; 75 %] або M±s)

Речовина	Доза, ДЛ50	Дієнові кон'югати, мкмоль/л	ТБК-реактанти, мкмоль/л	Шифові основи, ум.од/мл	Шифові основи/ (ДК+ТБК-реактанти)
ОЕНФ <sub>12</sub>	1/10	5,5 [5,2; 7,0] p=0,002	4,0±1,25 p=0,002	4,6±1,39 p<0,001	0,46±0,174 p<0,001
	1/100	5,2 [3,7; 5,8] p=0,16	3,2±1,12 p=0,09	3,5±1,04 p<0,001	0,42 [0,31; 0,5] p<0,001
КМ-ОЕНФ <sub>5</sub>	1/10	6,5±1,35 p<0,001	4,2±1,39 p=0,002	4,6 [3,9; 5,9] p<0,001	0,5±0,149 p<0,001
	1/100	5,2±1,57 p=0,11	3,7±1,23 p=0,009	4,6±0,83 p<0,001	0,54±0,154 p<0,001
Контроль		4,3±1,19	2,3 [1,9; 3,4]	1,6±0,52	0,24±0,081

Примітка. p – рівень значущості порівняно з контролем.

Для з'ясування динаміки спрямованості процесів ПОЛ розраховували коефіцієнт співвідношення шифові основи/(ДК+ТБК-реактанти) (табл. 1). Результати показали, що значення цього коефіцієнта за умов дії ОЕНФ<sub>12</sub> і КМ-ОЕНФ<sub>5</sub> у дозах 1/10 і 1/100 ДЛ50 статистично значуще ( $p < 0,001$ ), порівняно з контролем, збільшувалося в середньому в 2 рази. Це, у свою чергу, переконливо свідчить про спрямованість процесів ПОЛ у бік утворення токсичних кінцевих продуктів – шифових основ. Однією з найімовірніших причин зниження рівня первинних і вторинних продуктів ПОЛ на тлі збільшення рівня кінцевих продуктів може бути виснаження активності первинних «аварійних» антиоксидантів. Отримані результати добре

узгоджуються з даними літератури щодо індукованого впливу іоногенних детергентів на пероксидні процеси в організмі теплокровних тварин [13]. Крім того, літературні джерела свідчать про можливість ОЕНФ брати участь в окисно-відновлювальних процесах, викликати збільшення активних форм кисню та розвиток оксидативного стресу на тлі виснаження антиоксидантних ресурсів [8].

На 45-ту добу впливу ОЕНФ<sub>12</sub> та КМ-ОЕНФ<sub>5</sub> у дозах 1/10 і 1/100 ДЛ50 спостерігалась активація процесів ОМБ, що підтверджувалося статистично значущим, порівняно з контролем, підвищенням у сироватці крові вмісту нейтральних альдегід-ДНФГ і кетон-ДНФГ (356 і 370 нм), а також основних альдегід-ДНФГ (430 нм) (табл. 2). Слід під-

креслити, що для контрольної групи тварин також характерна наявність ДНФГ, що свідчить про перебіг цих процесів за фізіологічних умов.

Крім того, в контрольній групі щурів рівень ДНФГ нейтрального характеру в 9–11 разів перевищував вміст ДНФГ основного характеру, що збігається з даними літератури [12]. Тривалий вплив ОЕНФ<sub>12</sub> та КМ-ОЕНФ<sub>5</sub> у дозі 1/10 ДЛ50 сприяв статистично значущому ( $p < 0,001$ ), порівняно з контролем, зростанню рівня ДНФГ нейтрального характеру в 1,5–2 рази. Для дози 1/100 ДЛ50 зберігалася така сама тенденція, але вона була менш виразна: вміст нейтральних ДНФГ збільшувався в 1,2–1,9 рази ( $p < 0,024$ ). На цьому

тлі спостерігалось статистично достовірне зростання рівня альдегід-ДНФГ основного характеру при 430 нм: в середньому в 2 рази при дії 1/10 ДЛ50 ( $p < 0,001$ ) та 1,5 рази при дії 1/100 ДЛ50 ( $p < 0,014$ ). Істотні зміни рівня основних альдегід-ДНФГ можуть бути пов'язані з посиленням глікозилюванням білків за умов токсичного стресового стану. Доведено, наприклад, збільшення вмісту продуктів неферментативного глікозилювання білків при оксидативному стресі [14]. У цілому, збільшення у сироватці крові експериментальних тварин рівня окисномодифікованих білків може свідчити про виснаження резервно-адаптаційних можливостей організму за умов тривалого впливу ОЕНФ та їх похідних [15].

Таблиця 2. Вміст альдегід- та кетондинітрофенілгідрозонів у сироватці крові щурів на 45-добу впливу оксиетильованих нонілфенолів та їх похідних (од. опт. щільності/г білка,  $n=15$ ; Ме [25 %; 75 %] або  $M \pm s$ )

Речовина	Доза, ДЛ50	356 нм	370 нм	430 нм
ОЕНФ <sub>12</sub>	1/10	56,1±6,68 $p < 0,001$	54,1±5,56 $p < 0,001$	7,0 [6,4; 8,8] $p < 0,001$
	1/100	40,0 [38,5; 42,3] $p < 0,001$	45,1 [39,5; 47,0] $p < 0,001$	4,7±1,32 $p = 0,003$
КМ-ОЕНФ <sub>5</sub>	1/10	62,1±6,90 $p < 0,001$	50,0 [46,9; 53,8] $p < 0,001$	6,5±2,46 $p < 0,001$
	1/100	52,6±6,38 $p < 0,001$	40,0 [36,7; 45,0] $p = 0,024$	4,2±1,16 $p = 0,014$
Контроль		27,6±8,80	34,0 [28,7; 42,1]	3,1±1,16

Примітка.  $p$  – рівень значущості порівняно з контролем.

**Висновки.** 1. На тлі тривалої інтоксикації ОЕНФ та їх похідними у дозах 1/10 і 1/100 ДЛ50 у сироватці крові щурів ініціюються процеси оксидативного стресу з деструкцією білкових і ліпідних молекул, що відображається підвищенням рівня дієнових кон'югатів, ТБК-реактивних, шифових основ та динітрофенілгідрозонів.

2. Продукти перекисного окислення ліпідів та окисної модифікації білків 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 окислення ліпідів і окисної модифікації білків 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 активності системи антиперекисного та антирадикального захисту при тривалому впливі ОЕНФ та їх похідних.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Ксенобіотики: накопичення, детоксикація та виведення з живих організмів / [Цудзевич Б. О., Столяр О. Б., Калініна І. В., Юкало В. Г.]. – Тернопіль : Видавництво ТНТУ ім. І. Пулюя, 2012. – 384 с.

2. Новиков К. Н. Свободно-радикальные процессы в биологических системах при воздействии факторов окружающей среды / К. Н. Новиков, С. В. Котелевцев, Ю. П. Козлов. – М. : РУДН, 2011. – 199 с.

3. Резуненко Ю. К. Вплив поліолів на основі гліцеролу, етилен- і пропіленгліколю на процеси вільнорадикального окислення в організмі щурів / Ю. К. Резуненко, В. О. Прокопов, В. І. Жуков // Світ медицини та біології. – 2012. – № 2. – С. 143–146.

4. Окислительная модификация белков: проблемы и перспективы исследования / Л. Е. Муравлева, В. Б. Молотов-Лучанский, Д. А. Клюев [и др.] // Фундаментальные исследования. – 2010. – № 1. – С. 74–78.

5. Окислительный стресс: патологические состояния и заболевания / [Е. Б. Меншикова, Н. К. Зенков, В. З. Ланкин та ін.]. – М. : АРТА, 2008. – 284 с.

6. Часовских Н. Ю. Апоптоз и окислительный стресс / Н. Ю. Часовских, Н. В. Рязанцева, В. В. Новицкий. – Томск : Печатная мануфактура, 2009. – 148 с.

7. Детергенти сучасності: технологія виробництва, екологія, економіка використання / [В. А. Бурлака, Г. Б. Руденко, І. Г. Грабар, А. Д. Біба]. – Ж. : ЖДТУ, 2004. – 745 с.

Огляди літератури, **оригінальні дослідження**, погляд на проблему

8. Научные основы обоснования прогноза потенциальной опасности детергентов в связи с регламентацией в воде водоемов / [Цыганенко А. Я., Жуков В. И., Щербань Н. Г. и др.]. – Белгород, 2001. – 442 с.
9. Косухин А. Б. Экстракция липидов смесью гептан-изопропанол для определения диеновых конъюгатов / А. Б. Косухин, Б. С. Ахметова // Лабораторное дело. – 1987. – № 6. – С. 335–337.
10. Федорова Т. Н. Реакции с тиобарбитуровой кислотой для определения малонового диальдегида крови методом флюориметрии / Т. Н. Федорова, Т. С. Коршунова, Э. Г. Ларский // Лабораторное дело. – 1983. – № 3. – С. 25–28.
11. Rice-Evans C. A. Techniques in free radical research / C. A. Rice-Evans, A. T. Diplock, M.C.R. Symons. – Elsevier, 1991. – 309 p.
12. Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод ее определения / Е. Е. Дубинина, С. О. Бупмистров, Д. А. Ходов [и др.] // Вопросы медицинской химии. – 1995. – Т. 41, № 1. – С. 24–26.
13. Медико-биологические аспекты проблемы охраны водных объектов от загрязнения поверхностно-активными веществами / [Р. И. Кратенко, Ю. К. Резу-ненко, О. В. Зайцева и др.]; под ред. В. И. Жукова. – Х. : Торнадо, 2000. – 394 с.
14. Munch G. Enhanced glycation of hemoglobin and plasma proteins is associated with increased lipid peroxide levels in non-diabetic hypertensive subjects / G. Munch, R. Keis, A. Wessels // Arch. Med. Res. – 2007. – Vol. 38, № 8. – P. 822–826.
15. Токсикологические последствия окислительной модификации белков при различных патологических состояниях (обзор литературы) / Ю. И. Губский, И. Ф. Беленичев, Е. Л. Левицкий [и др.] // Проблемы токсикологии. – 2005. – № 3. – С. 20–27.

## **THE INFLUENCE OF OXYETHYLIZED NONYLPHENOLS AND THEIR DERIVATIVES ON THE PROCESSES OF LIPOPEROXIDATION AND OXIDIZING MODIFICATION OF PROTEINS IN ORGANISM OF RATS**

**©D. I. Marakushin**

*Kharkov national medical university*

**SUMMARY.** In the article the data are resulted about disorder of the state of lipoperoxidation processes and oxidizing modification of proteins in the rats organism under the long-term influence of oxyethylized nonylphenols and their derivatives. It is revealed, that the long-term intoxication by oxyethylized nonylphenols and their derivatives at doses of 1/10 and 1/100 DL50 in the serum of rats blood initiate the processes of oxidative stress with destruction of protein and lipidic molecules. The products of lipid peroxidation and oxidizing modification of proteins as a result of high reactogenic ability and selectivity in biological action can play the role of a basic chain, that limits the state of steadiness of an organism to the long-term influence of oxyethylized nonylphenols and their derivatives through the change of physical and chemical properties of cellular membranes, activity of membrane-localized and lipiddepending enzymes, reactivity of neuroendocrinous system, immune and other systems of an organism.

**KEY WORDS:** oxyethylized nonylphenols, diene conjugates, TBA-reactants, Schiff bases.

Отримано 04.02.2015