

© 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>) склали 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-Вілка. 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 IgA 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 оксидетильованих 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 оксидетильованих 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; Ме [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 цитокинами [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; Ме [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. Цитокин 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.

## English version: LONG-DURATION ACTION OF OXYETHYLIZED NONYLPHENOLS AND THEIR DERIVATIVES ON CONTENT OF IMMUNOGLOBULINS AND CYTOKINES IN THE BLOOD SERUM OF RATS\*

Marakushin D.I.

Kharkov national medical university, Kharkov

*This research deals with influence of oxyethylized alkylphenols and their derivatives on content of immunoglobulins and cytokines in the blood serum of rats during subacute experiment. Examined detergents in doses 1/10 and 1/100 DL<sub>50</sub> cause a suppression of antibody production, decrease of immunoglobulins A, M, G level, decrease of secretion of IL-1 $\beta$ , 2, 4, 6, 8, 10 and TNF- $\alpha$ . These changes may serve as additional prognostic tests, which characterize adverse action of oxyethylized alkylphenols and their derivatives on the organism of warm-blooded animals.*

Key words: oxyethylized nonylphenols, immunoglobulins, cytokines, immune system

### Introduction

The violation of homeostasis regulatory mechanisms in conditions of intoxication by the xenobiotics is considered as «toxic stress», at which not only nervous and endocrine systems but also immune system interfere in a process [1, 2]. In addition, immune system, carrying out an important role in the adaptation and protective reactions of an organism is one of the first systems undergo to external influence, and tension arising in its activity results in violation of functioning of other systems and provokes pathology [3]. Research of xenobiotics' mechanisms of action, creation of scientifically grounded diagnostic programs, revelation of objective prognostic tests of pathological processes becomes one of priority tasks of modern medicine. The sharp necessity of its decision is related to making progress contamination of environment, worsening of people health, and is based on the scientific ground of criteria which determine the beginning of the state of decompensation of functions of the organism [4]. Oxyethylized nonylphenols (OENP) and their derivatives sodium salts of carboxymethylates of oxyethylized isononylphenols (CM-OENP) are belong to priority contaminants of environment, which have physical and chemical properties and features of structure of molecules like ionogenic detergents. These substances are characterized by considerable output volumes of synthesis, wide usage in different industries of national economy (as basis of industrial issue of plastics, polyurethanes, cleaning agents, emulsifying agents, anticorrosing preparations, hydraulic and cooling fluids, and others like that), entry to the sources of water consumption and due to it possible influence on the organism of man [5, 6]. Mechanisms of action of OENP and their derivatives are studied not enough. Their revelation is the grounds for explanation of measures on the conservation of the environment and health of population.

**The purpose of this research** was to study the content of immunoglobulins and cytokines in the blood serum of rats in conditions of prolonged peroral influence of OENP and their derivatives in doses 1/10, 1/100 and 1/1000 DL<sub>50</sub>.

### Materials and research methods

The standard compounds with scheduled physicochemical properties were used in the work: OENP with number of oxyethylized groups 10 (OENP<sub>10</sub>) and CM-OENP with number of oxyethylized groups 5, 6, 10 (CM-OENP<sub>5-10</sub>). The experimental part of the research was

performed on white rats of WAG population, with mass (180-220) g. The experiments on white rats were performed in compliance with the international principles of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986). Every day before feeding they received orally, through a metal probe, aqueous solutions of xenobiotics with 1/10, 1/100 and 1/1000 of LD<sub>50</sub>. The duration of subacute influence was 45 days. Half-lethal doses (LD<sub>50</sub>) were determined at the levels: OENP<sub>10</sub> – 4,3 g/kg; CM-OENP<sub>5</sub> – 2,8 g/kg; CM-OENP<sub>6</sub> – 2,2 g/kg; CM-OENP<sub>10</sub> – 3,2 g/kg of the animal weight. The proper volumes of water were entered to the animals of control group. Research of immunoglobulin and cytokines content was carried out in 45 days after the beginning of experiment. Every group made up 15 animals. The slaughter of animals was performed by a decapitation, preliminary using thiopental sodium.

The content of immunoglobulins (Ig) A, M, G in the blood serum is determined by method of radial immunodiffusion in a gel by the instrumentality of monospecific serums against immunoglobulins made by FGOUP «NPO Microgen» (Russia). The level of cytokines was determined by an immunoenzyme method with the use of reagents sets «ProCon IL-1 $\beta$ », «ProCon IL-2», «ProCon IL-4», «ProCon IL-6», «ProCon IL-10», «ProCon TNF- $\alpha$ » («Proteinic contour», Russia), «Interleukin-8-IFA-BEST» («Vector-Best», Russia) and analyzer immunoenzyme Stat Fax 303 Plus. The statistical data analysis was performed with the usage of computer programs for statistical data handling Statistica 6.1 (StatSoft, Inc., the USA). The primary statistical data processing begun from verification of hypothesis about correspondence of sample to Gaussian distribution law, using Shapiro-Wilk test. the rightness of conclusion in relation to normality of sample distribution was additionally controlled by the instrumentality of the asymmetry and excess coefficients. Quantitative signs, that had normal distribution, were described by parametric descriptions - mean value of index (M) and standard deviation (s); in the case of absence of normal distribution – nonparametric: median (Me) and interquartile range. The Student's t-test is used for comparison of two normal distributions. If at least one of distribution was not normal, for comparison of independent samples the Mann-Whitney U test was used. For the critical level of statistical significance at verification of statistical hypotheses took  $p < 0,05$ .

\* To cite this English version: Marakushin D.I. Long-duration action of oxyethylized nonylphenols and their derivatives on content of immunoglobulins and cytokines in the blood serum of rats // Problemy ekologii ta medytsyny. - 2013. - Vol 17, № 5-6. - P. 42 -45.

**Results and their discussions**

On 45-day of action OENP and their derivatives in a dose 1/10 DL<sub>50</sub> was observed statistically significant (p<0,001), comparatively with the control, reduction of IgA content in the blood serum of rats: for OENP<sub>10</sub> and CM-OENP<sub>5</sub> at the average in 2 times, for CM-OENP<sub>6</sub> and CM-OENP<sub>10</sub> – almost in 3 times (tabl. 1). The same dynamics of changes of content IgA was determined and for a dose 1/100 DL<sub>50</sub>, but less expressive (reduction at the average in 1,5 times). The dose 1/1000 DL<sub>50</sub> was not effective. Reduction of IgA content testifies about insufficiency of humoral and local immunity. Index of level IgM also significantly (p<0,001), comparatively with the control, decreased on 45-day of peroral introduction of compounds in 1/10 and 1/100 DL<sub>50</sub> at the average accord-

ingly in 2,0 and 1,5 times (tabl. 2). At most this level was registered in the case of action CM-OENP<sub>5</sub>, minimum low – in the case of action OENP<sub>10</sub>. It should be noted that the protracted influence of CM-OENP<sub>5</sub> and CM-OENP<sub>10</sub> in a dose 1/1000 DL<sub>50</sub> was also accompanied by statistically significant (p=0,003 and p=0,032 accordingly) decreasing of IgM content, while OENP<sub>10</sub> and CM-OENP<sub>6</sub> in this dose did not affect the level of this index (p=0,163 and p=0,087). As IgM appear on the first stage of immune respond and mainly are found in a vascular bed, they play an important protective role on the early stages of toxemia. The reveal decrease of IgM content also testifies about insufficiency of humoral immunity, disturbances of their synthesis or intensification of catabolism.

*Table 1*  
The content of immunoglobulin A in the blood serum of rats on 45-day under the influence of oxyethylized nonylphenols and their derivatives (g/l; n=15; Me [25%; 75%] or M±s)

Indices	Dose, DL <sub>50</sub>		
	1/10	1/100	1/1000
OENP <sub>10</sub>	0,29±0,057 p<0,001	0,39 [0,36; 0,41] r<0,001	0,53 [0,48; 0,55] p=0,237
CM-OENP <sub>5</sub>	0,22±0,039 p<0,001	0,33 [0,29; 0,37] p<0,001	0,51±0,031 r=0,69
CM-OENP <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 r=0,384
CM-OENP <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] r=0,019
Control	0,50±0,053		

Note: p – level of statistical significance comparatively with the control

*Table 2*  
The content of immunoglobulin M in the blood serum of rats on 45-day under the influence of oxyethylized nonylphenols and their derivatives (g/l; n=15; Me [25%; 75%] or M±s)

Indices	Dose, DL50		
	1/10	1/100	1/1000
OENP <sub>10</sub>	0,52±0,094 p<0,001	0,63±0,069 p<0,001	0,82±0,062 r=0,163
CM-OENP <sub>5</sub>	0,38±0,043 p<0,001	0,47±0,065 p<0,001	0,7 [0,69; 0,79] r=0,003
CM-OENP <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 r=0,087
CM-OENP <sub>10</sub>	0,46±0,041 p<0,001	0,56±0,046 p<0,001	0,83±0,044 r=0,032
Control	0,81±0,028		

Note: p – level of statistical significance comparatively with the control

The content of IgG in the blood serum of rats on 45-day of influence OENP and their derivatives in a dose 1/10 DL<sub>50</sub> also was significantly below (p<0,001) comparatively with data of the control group (tabl. 3). In this case most substantial decrease of this index is typical for CM-OENP<sub>6</sub> (almost in 2 times), minimal – for OENP<sub>10</sub> (in 1,4 times). The protracted influence of compounds in an effective dose 1/100 DL<sub>50</sub> also resulted in statistically sig-

nificant, comparatively with the control, decreasing of IgG level in blood serum of rats, but it was less expressive (at the average in 1,3 times; p<0,006), than in the case of influence 1/10 DL<sub>50</sub>. Action of compounds in a dose 1/1000 DL<sub>50</sub> did not cause significant changes from the side of IgG. The stable decreasing of IgG level testifies about exhaustion of their protective role.

*Table 3*  
The content of immunoglobulin G in the blood serum of rats on 45-day under the influence of oxyethylized nonylphenols and their derivatives (g/l; n=15; Me [25%; 75%] or M±s)

Indices	Dose, DL <sub>50</sub>		
	1/10	1/100	1/1000
OENP <sub>10</sub>	4,0±0,62 p<0,001	4,5±0,53 r=0,006	5,8 [4,9; 6,5] r=0,455
CM-OENP <sub>5</sub>	2,9±0,53 p<0,001	4,0±0,88 p<0,001	5,1±0,95 r=0,283
CM-OENP <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] r=0,88
CM-OENP <sub>10</sub>	3,3±0,65 p<0,001	4,3 [3,6; 5,0] r=0,002	5,4±0,79 r=0,89
Control	5,5±1,05		

Note: p – level of statistical significance comparatively with the control

An adequate immune response is based on balance of the cellular-mediated and humoral immune reactions, development of which is supported and regulated by cytokines [7-9]. The compounds result in disturbances from the side of cytokinic profile of blood serum of rats (tabl. 4). In the case of their protracted peroral introduction in a dose 1/100 DL<sub>50</sub> it is observed, comparatively with the control, decreasing (p<0,003) of level IL-1β: for CM-OENP<sub>5</sub> – almost in 2 times, CM-OENP<sub>6</sub> and CM-OENP<sub>10</sub> – at the average in 1,8 times, OENP<sub>10</sub> – only in 1,4 times. The proinflammatory cytokine IL-1β has numeral general effects and assists to development of system character of pathological process by formation of autoantibodies and rise of concentration in the blood of the C-reactive

protein. The decrease of this index is the important diagnostic criterion of chronicity of inflammatory process in the organism of rats in conditions of protracted influence of OENP and their derivatives. The decrease of level IL-2 almost in 2 times in conditions of influence CM-OENP<sub>5</sub> (p<0,001) in 1,8 times – CM-OENP<sub>6</sub> (p<0,001), in 1,5 times – CM-OENP<sub>10</sub> (p<0,001) and in 1,3 times – OENP<sub>10</sub> (p=0,003) was marked also on a 45-day in blood serum of rats. IL-2 is considered as a regulator cytokine, able to compensate the displays of immune insufficiency, to proceed in balance T-helpers, that results to regulation of synthesis of anti- and proinflammatory cytokines. The decrease of IL-2 synthesis is confirmation of origin of the T-cell immunodeficiency.

Table 4  
The content of cytokines in the blood serum of rats on 45-day under the influence of oxyethylized nonylphenols and their derivatives in a dose 1/100 DL<sub>50</sub> (ng/l; n=15; Me [25%; 75%] or M±s)

Index	OENP <sub>10</sub>	CM-OENP <sub>5</sub>	CM-OENP <sub>6</sub>	CM-OENP <sub>10</sub>	Control
IL-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
IL-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
IL-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]
IL-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]
IL-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]
IL-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
TNF-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]

Note: p – level of statistical significance comparatively with the control

As a marker of autoimmune and allergic processes IL-4 is considered, which ensures an activation of humoral chain of the immune system, stimulates proliferation and differentiation B-cells, synthesis of IgE, and also inhibits of monocytes and macrophages, synthesis of TNF-α. In the blood serum of rats on 45-day of influence of compounds in a dose 1/100 DL<sub>50</sub> it was showed the decrease (p<0,001), comparatively with the control, level of IL-4 at average in 1,6 times. The decrease of secretion IL-4, in this case, can be accompanied by depression of antigen stimulation T- and B-lymphocytes, macrophages, mass cells, basophiles, stromal cells, hemopoietic precursors.

The protracted action OENP and their derivatives result also to the decrease (p<0,0015) of content IL-6 in the blood serum of animals on the average in 1,7 times. A biological role IL-6, at first, consists in induction of restorative mechanisms and activation of immune defence (activation and differentiation T-cells, maturation of B-cells, intensification of hemopoiesis). It is also known an inhibitory action of IL-6 on the inflammatory reaction by inhibition of synthesis of proinflammatory substances, in that number TNF-α. The decrease of IL-6 level in the condition the protracted action of compounds can result in depression of their functional activity and reduction of humoral immune response. Also a tendency to statistically significant (p<0,001), comparatively with the control,

decreasing of IL-8 content is observed. Most substantial it was for protracted action of OENP<sub>10</sub> in a dose 1/100 DL<sub>50</sub>, namely in 2,4 times. Other compounds decrease content of IL-8 at the average in 1,7 times. Cytokine IL-8 is produced by monocytes and macrophages, executes the role of inducer of acute inflammatory reactions, causing expression of molecules of intercellular adhesion and intensifying of adhesion of neutrophils to the endothelial cells and subendothelial matrix proteins, that testifies about its basic role in mediation of inflammatory response. The decrease of its synthesis is one of the reasons of depression of cellular and humoral immunity.

IL-10 refers to cytokines with expressive anti-inflammatory effect, which is produced T-cells and examined as an antagonist of row other cytokines. IL-10 depresses the synthesis of proinflammatory cytokines, proliferative response of T-cells on antigens and mitogens, and also diminishes a secretion by activated monocytes of IL-β, TNF-α, IL-6. But simultaneously IL-10 can stimulate the synthesis of IgE. In the result it assists to development of humoral component of immune response. OENP<sub>10</sub>, CM-OENP<sub>5</sub>, CM-OENP<sub>6</sub> in an operating dose 1/100 DL<sub>50</sub> on a 45-day of action resulted in decrease (p<0,001) of IL-10 level at the average in 2 times. For CM-OENP<sub>10</sub> the level of IL-10 decrease (p<0,0013) was less expressive, only in 1,3 times. These changes also specify on violation of the functional state of protective systems of the rats organism.

The results of TNF- $\alpha$  content have an important value in metabolic plan. So, the content of this index in the blood serum of rats on 45-day of compounds introduction is statistically decreased ( $p < 0,001$ ), at the average in 1,4 times, comparatively with a control group. TNF- $\alpha$  is produced by both the cells of the immune system and other types of cells (astrocytes, fibroblasts, glial cells, keratinocytes). Low levels of TNF- $\alpha$  in the conditions of protracted influence of the examined compounds can be related to insufficient stimulation of macrophagic defence of the organism.

In general the decrease of cytokines in the blood of rats in the conditions of protracted influence of OENP is the evidence of deep disturbances of immunity, demonstration of development of the secondary immune insufficiency.

### Conclusions

1. In the conditions of protracted influence in doses 1/10 and 1/100 DL<sub>50</sub> OENP and their derivatives result in suppression of antibody synthesis in the organism of rats, that is confirmed by decrease in the blood serum of level of immunoglobulins A, M and G. The dose 1/1000 DL<sub>50</sub> is inactive on the content of immunoglobulins.

2. OENP and their derivatives in the case of the protracted peroral influence in an operating dose 1/100 DL<sub>50</sub> cause substantial disturbances in the system of cytokines – mediators of control of the processes of proliferation, differentiation, apoptosis and functional activity of cellular elements in the homeostatic systems of the organism, that is confirmed by the decrease in the blood serum of rats of secretion IL-1 $\beta$ , 2, 4, 6, 8, 10 and TNF- $\alpha$ .

3. Changes from the side of immunoglobulins and cytokines can serve by additional prognostic tests, that

characterize the unfavorable influence of OENP and their derivatives in doses 1/10 and 1/100 DL<sub>50</sub> on the organism of warm-blooded animals.

### References

1. Postanova M.V. Fiziologicheskie mekhanizmy individual'noy organizazii gomeostaza organizma. - Volgograd: Izd-vo VolGU, 2011. – 356 s.
2. Zabrodskiy P. F. Immunotoksikologiya ksenobiotikov / P. F. Zabrodskiy, V. G. Mandych. - Saratov: SVIBChB, 2007. - 420 s.
3. Tatarin A.A. Neyroimmunoendokrinnye vzaimodeystviya v sisteme mezhkletchnoy funktsional'noy mnogourovnevnoy regulyazii gomeostaza / A.A. Tatarin, N.D. Tatarina, B.G. Andryukov // Zdorov'e. Meditsinskaya ekologiya. Nauka. - 2010. - T. 43, № 3. - S. 13-17.
4. Amanzhol I.A. Reaktsiya organizma na vozdeystvie vrednykh proizvodstvennykh faktorov: ozenka professional'nogo riska / I.A. Amanzhol, Z.T. Muchametzhanova, D.S. Abitayev. – Lambert Academic Publishing, 2013. – 116 s.
5. Detergenti suchasnosti: tekhnologiya virobniztva, ekologiya, ekonomika vikoristannya / V.A. Burlaka, G.B. Rudenko, I.G. Grabar, A.D. Biba. – Zh.: ZhDTU, 2004. – 745 s.
6. Nauchnye osnovy obosnovaniya prognoza potentsial'noy opasnosti detergentov v svyazi s reglamentaziey v vode vodoemov / [Zyganenko A.Ya., Zhukov V.I., Scherban' N.G., Evdokimov V.I. i dr.]. – Belgorod, 2001. – 442 s.
7. Kettlinskiy S.A. Zitokiny / S.A. Kettlinskiy, A.S. Simbirzev. - SPb.: OOO «Izdatel'stvo Foliant», 2008. 552 s.
8. Chuklin S.N. Interleukiny / S.N. Chuklin, A.A. Pereyaslov. - L'vov: Liga-Press, 2005.- 481 s.
9. Kazmirchuk V.E. Klinichna imunologiya i alergologiya / V.E. Kazmirchuk, L.V. Koval'chuk. – Vinnizya: Nova kniga, 2006. - 528 s.

*Матеріал надійшов до редакції 2.12.2013*