

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ**  
**ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ ТВАРИН**

**САЛИГА Юрій Тарасович**

УДК 576.32/.36+543.272:591.481

**ФІЗІОЛОГО-БІОХІМІЧНІ МЕХАНІЗМИ ВПЛИВУ**  
**ХЛОРПРИФОСУ ТА КАРБОФУРАНУ НА ОРГАНІЗМ ТВАРИН**

**03.00.04 – біохімія**

**А в т о р е ф е р а т**  
дисертації на здобуття наукового ступеня  
доктора біологічних наук

**Львів – 2016**

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Інституті біології тварин НААН

**Науковий консультант** – доктор ветеринарних наук,  
професор, академік НААН,  
заслужений діяч науки і техніки України  
**ВЛІЗЛО Василь Васильович**,  
Інститут біології тварин НААН,  
директор

**Офіційні опоненти:** доктор біологічних наук, професор,  
член-кореспондент НАН України  
**Стойка Ростислав Стефанович**,  
Інститут біології клітини НАН України,  
завідувач відділу регуляції  
проліферації клітин та апоптозу;

доктор біологічних наук, професор,  
заслужений діяч науки і техніки України  
**Рибальченко Володимир Корнійович**,  
Київський національний університет  
імені Тараса Шевченка,  
завідувач Науково-дослідного сектору  
«Мембранології і цитології»;

доктор біологічних наук, професор  
**Столяр Оксана Борисівна**,  
Тернопільський національний педагогічний  
університет імені Володимира Гнатюка,  
професор кафедри хімії та методики її навчання,  
керівник НДЛ порівняльної біохімії  
та молекулярної біології.

Захист відбудеться «17» травня 2016 р. об 11<sup>00</sup> годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 35.368.01 в Інституті біології тварин НААН за адресою: 79034, м. Львів, вул. В. Стуса, 38.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту біології тварин НААН за адресою 79034, м. Львів, вул. В. Стуса, 38.

Автореферат розісланий «\_\_» квітня 2016 р.

**Вчений секретар**  
спеціалізованої вченої ради

**О. І. Віщур**

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** Існування людства не можна уявити без використання у побуті, різних галузях промисловості, медицині та інших сферах життєдіяльності різноманітних хімічних засобів. Інсектициди, дефоліанти, десиканти на основі фосфорорганічних (ФОС) і карбаматних сполук (КС) продовжують широко застосовувати в агропромисловому секторі України та інших країн, а також у побуті – в основному для боротьби із різноманітними комахами, що становить суттєві ризики інтоксикацій цими ксенобіотиками та негативного впливу на здоров'я населення (Влізло В. В., 2012; Дзюбенко Н. В., 2015; Проданчук М. Г., 2005; Рибальченко В. К., 2015; Столяр О. Б., 2012; Хан В. В., 2011; Ящук В., 2014; Collombet J. M. 2011; Eaton D. L., 2008; Lil Q., 2006; Needham L. L., 2005; Rauh V., 2011; Schopfer L., 2012).

Відомо, що основний біохімічний механізм дії ФОС і КС ґрунтується на пригніченні активності холінестерази – ензиму, що здійснює гідроліз ацетилхоліну і відіграє важливу роль у процесі синаптичної передачі нервового імпульсу в холінергічних утвореннях. Незважаючи на значну кількість робіт (Куцан О. Т., 2008; Харченко О. А., 2013; Рибальченко В. К., 2014; Філінська О. М., 2010; Яблонська С. В. 2009; Abbruscato T., 2002; Aroniadou-Anderjaska V., 2009; Bajgar J., 2007; Chao L., 2011; Costa L. G., 2006; Dembele K., 2000; Eskenazi B., 2008; Kaur P., 2007; Slotkin T. A., 2014; Testylier G., 2007), присвячених окремим питанням токсичності ФОС і КС, їх механізмів, які не пов'язані з антихолінестеразною дією, приділено недостатньо уваги. Підтвердженням цього є ціла низка неврологічних та нейропсихічних порушень, які можуть бути спричинені дією ФОС і КС і виникнення яких далеко не завжди вдається пояснити лише інгібуванням холінестеразної активності (Campbell N. L., 2010; Chen Y., 2012; Giacobini E., 2003; Levin E. D., 2001).

Одним з визначальних біохімічних механізмів токсичності різноманітних хімічних речовин, у тому числі ксенобіотиків є порушення в організмі про-/антиоксидантного гомеостазу, що для ФОС і КС вивчені недостатньо. Мало дослідженими також є питання біохімічних зв'язків між виникненням явища оксидативного стресу, системою антиоксидантного захисту, механізмами нейротоксичності і роллю окремих хімічних елементів, зокрема металів у цих процесах (Луцак В. І., 2015; Столяр О. Б., 2015; Gandhi S., 2012; Hentze M., 2010).

Виходячи із аналізу сучасної наукової літератури, можна констатувати значну потребу у розширенні та поглибленні досліджень різних аспектів нейротоксичності хлорпірифосу на клітинному рівні, в тому числі і за умов *in vitro*. У цьому напрямку відома низка робіт, проведених на астроцитах, олігодендроцитах, на нейронах кори головного мозку (Campbell C. G., 1997; Garcia S. J., 2002; Howard A. S., 2005; Mense S. M., 2006). Водночас клітини гіпокампу у цьому аспекті практично не вивчені. Особливо актуальним питанням є дослідження нейротоксичності ФОС на клітинно-молекулярному рівні, зокрема з використанням культури нервових клітин, що дозволить встановити глибинні

механізми впливу зазначених сполук на функціональні порушення нервової системи (Chen Y., 2012; Padilla S., 2005; Slotkin T. A., 2009).

Відтак, існує потреба глибшого дослідження біохімічних особливостей токсикологічної та нейрофізіологічної дії сполук згаданих вище класів; встановлення найнебезпечніших з них у контексті екологічних та медико-біологічних, навіть воєнних загроз (ФОС можуть бути використані, як хімічна зброя); розробки нових фізіолого-біохімічних та молекулярно-біологічних методів вивчення впливу окремих ФОС і КС на організм людини і тварин.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.**

Дисертаційна робота виконана у рамках науково-дослідних робіт Інституту біології тварин НААН у період 2003–2015 рр. за темами: ДР 0106U003042 «Дослідити вплив деяких пестицидів і важких металів на функціонування центральної нервової системи тварин та розробити рекомендації щодо попередження інтоксикації», ДР 0111U006136 «Вивчити фізіолого-біохімічні особливості метаболізму у тварин під дією окремих трофічних і біогеохімічних факторів і розробити методи його коригування», у яких автор досліджував біохімічні та фізіологічні особливості дії хлорпірифосу та карбофурану на організм щурів.

**Мета і завдання дослідження.** Метою дисертаційної роботи було з'ясувати деякі біохімічні механізми токсичного впливу на організм щурів хлорпірифосу та карбофурану на різних рівнях – від окремих клітин до цілісного організму, а також науково обґрунтувати нові способи вивчення, захисту і зниження нейротоксичних ефектів цих сполук.

Для досягнення поставленої мети у роботі розв'язували наступні завдання:

- дослідити індикаторні біохімічні показники крові, окремих органів та головного мозку щурів за умов їх гострої або хронічної інтоксикації хлорпірифосом через різні проміжки часу;
- вивчити ключові показники вільнорадикального окиснення та стану антиоксидантної системи крові, окремих органів та головного мозку щурів за їх гострої або хронічної інтоксикації хлорпірифосом через різні проміжки часу;
- дослідити деякі показники мінерального обміну у окремих органах та головному мозку щурів за умов їх гострої або хронічної інтоксикації хлорпірифосом через різні проміжки часу;
- вивчити нейрофізіологічні особливості функціонування центральної нервової системи щурів, які зазнавали гострого або хронічного впливу хлорпірифосу різними дозами, способами та тривалістю його введення в організм;
- дослідити окремі параметри вільнорадикального окиснення та стану антиоксидантної системи, мінерального обміну окремих органів та головного мозку щурів за хронічної інтоксикації щурів карбофураном;
- оцінити нейрофізіологічні параметри функціонування центральної нервової системи щурів, які зазнавали хронічного впливу карбофурану за різних доз його введення в організм;

- розробити методологію вивчення впливу хлорпірифосу на ріст, розвиток і життєздатність нейронів гіпокампу за умов *in vitro*.
- дослідити на культурі нейронів гіпокампу щурів дію різних концентрацій хлорпірифосу, її дозо- і часозалежні особливості впливу на ріст, розвиток і функціонування нейронів, з'ясувати чи механізми нейротоксичності цього чинника пов'язані із явищем оксидативного стресу, що викликається даною сполукою.
- розробити схему біохімічного механізму токсичності ХПФ, який не обмежується загальновідомою антихолінестеразною дією.

*Об'єкт дослідження* – біохімічні та нейрофізіологічні процеси в організмі щурів, культурах нервових клітин за різних умов їх ураження хлорпірифосом і карбофураном.

*Предмет дослідження* – вільнорадикальне окиснення, оксидативний стрес, стан антиоксидантної системи, протеїновий і мінеральний обмін, функціональний стан нервової системи, нейроцитотоксичність та взаємозв'язки цих процесів у щурів та культурах нейронів за гострої та хронічної дії на них хлорпірифосу та карбофурану.

*Методи дослідження:* біохімічні (визначення ензиматичних активностей, вмісту субстратів і продуктів метаболічних реакцій, концентрацій біоактивних хімічних елементів тощо); фізіологічні (дослідження етологічних, патофізіологічних, токсикологічних параметрів тварин, а також окремих систем, тканин та органів); молекулярно-біологічні, імуно-гістохімічні, цитологічні (дослідження нейрофізіологічних, морфологічних параметрів нервових клітин за умов *in vitro*); статистичні.

**Наукова новизна одержаних результатів.** Розроблено і апробовано методологію способу прижиттєвого дослідження впливу хлорпірифосу на ріст, розвиток і життєздатність нейронів гіпокампу за умов *in vitro*. На культурі нейронів гіпокампу щурів вперше досліджено нейротоксичну дію різних концентрацій хлорпірифосу і встановлено, що механізми цієї нейротоксичності безпосередньо пов'язані із явищем оксидативного стресу. На підставі результатів дослідження вмісту низки металів, а саме – Купруму, Мангану, Цинку, Феруму, Магнію, Кобальту і Нікелю в окремих відділах головного мозку та різних органах щурів за умов гострої і хронічної інтоксикацій ХПФ і КФ залежно від доз, тривалості та способів введення цих сполук в організм, встановлено кореляційні взаємозв'язки між ними та біохімічними параметрами системи антиоксидантного захисту. Оцінено стан процесів вільнорадикального окиснення та антиоксидантного захисту у різних відділах головного мозку та різних органах щурів за гострої і хронічної інтоксикацій хлорпірифосом і карбофураном. Доповнено схему фізіолого-біохімічного механізму токсичності ФОС процесами, які не пов'язані з інгібуванням холінестераз. Встановлено, що ключову роль у механізмах нейротоксичності ХПФ і КФ відіграє оксидативний стрес.

**Практичне значення одержаних результатів.** Отримані нові дані про фізіолого-біохімічні особливості нейротоксичної дії карбофурану і хлорпірифосу

та функціонування центральної нервової системи щурів, а також про токсичний ефект цих препаратів на розвиток і функціонування нейронів за умов культури клітин. Ці результати є підґрунтям для розроблення рекомендацій із захисту центральної нервової системи тварин і людини від інтоксикації цими речовинами, а також дозволять вдосконалити існуючі та наблизити створення нових ефективніших способів і засобів захисту, профілактики і лікування організму від нейротоксичного впливу досліджуваних сполук. Отримані результати дозволяють переглянути діючі сьогодні в Україні нормативні документи і чинне законодавство з метою максимального обмеження використання у сільському господарстві, промисловості, побуті препаратів і засобів, до складу яких входить карбофуран або хлорпірифос.

Результати дисертаційного дослідження використовуються у навчальному процесі при викладанні курсів клітинної біохімії, метаболізму ксенобіотиків на кафедрі біохімії і курсів фармакологічної фізіології, фізіології людини і тварин, фізіології центральної нервової системи на кафедрі фізіології людини і тварин у Львівському національному університеті ім. Івана Франка; курсу терапії та клінічної діагностики на кафедрі внутрішніх хвороб тварин та клінічної діагностики, курсу токсикології на кафедрі фармакології і токсикології у Львівському національному університеті ветеринарної медицини і біотехнологій ім. С. З. Гжицького; курсу біохімії на кафедрі біології та хімії у Дрогобицькому державному педагогічному університеті ім. Івана Франка, що підтверджене відповідними актами впровадження.

Результати роботи використані для опису методів поведінкового тестування лабораторних тварин для оцінювання функціонального стану їх нервової системи, що викладено у довіднику «Лабораторні методи досліджень в біології, тваринництві та ветеринарній медицині».

Результати дисертаційного дослідження лягли в основу патенту України на корисну модель № 85700 (від 25. 11. 2013) «Спосіб визначення нейротоксичності хлорпірифосу за умов культури нервових клітин».

**Особистий внесок здобувача.** Автором самостійно обґрунтовано тему і концепцію дисертаційної роботи, розроблено схему і методологію, виконано весь запланований об'єм експериментальних досліджень, аналіз даних наукової літератури за темою дисертації, проведено статистичну обробку одержаних результатів та їх аналіз, сформульовано основні висновки роботи, підготовлено до друку наукові публікації за темою дисертації. В опублікованих у співавторстві наукових працях задекларована частка автора. У обговоренні результатів досліджень, формулюванні висновків брав участь науковий консультант.

**Апробація результатів дисертації.** Результати досліджень, викладені у дисертації, доповідались на методичній і Вченій радах Інституту біології тварин НААН (2003–2015 рр.), міжнародних науково-практичних конференціях: "Актуальні проблеми сучасної біології, тваринництва та ветеринарної медицини" (Львів, 2006, 2008, 2010, 2012, 2014), Міжнародній конференції 3<sup>rd</sup> INMED TINS Conference "The multiple facets of gabaergic synapses" (La Ciotat, 2004), III конференції Українського товариства нейронаук (Донецьк 2005), 2-й

Міжнародній конференції національного нейронаукового товариства Румунії “Neuronal excitability: from molecular level to system” (Bucharest, 2006), IV і V з’їздах Українського біофізичного товариства (Донецьк, 2006, Луцьк, 2011), 9-му колоквиумі французького товариства нейронаук (Bordeaux, 2009), 39-тій щорічній конференції Society of Neuroscience (Chicago, 2009), XVIII, XIX з’їздах Українського фізіологічного товариства (Одеса, 2010, Львів 2014), 35-тому Конгресі федерації європейських біохімічних товариств (Göteborg, 2010), 9-й Міжнародній конференції “Мозок. Енергія. Метаболізм” (Budapest, 2010), X Українському біохімічному з’їзді (Одеса, 2010), Міждисциплінарній науковій конференції “Адаптаційні стратегії живих систем” (Новий Світ, 2012), Всеукраїнській науково-методичній конференції “Пестици хімія та екологія” (Київ, 2012), VI Міжнародній науковій конференції “Психофізіологічні та вісцеральні функції в нормі і патології” (Київ, 2012), II Міжнародному симпозиумі “Молекулярні механізми регулювання синаптичної передачі” (Київ, 2012), 49-му Конгресі європейських токсикологічних товариств “EUROTOX 2013” (Interlaken, 2013.), IV Всеукраїнському з’їзді екологів з міжнародною участю (Вінниця, 2013), науково-практичній конференції “Сучасні аспекти діагностики та лікування захворювань нервової системи” (Київ, 2013), науково-практичній конференції з міжнародною участю “Актуальні питання біології, екології, медицини і фармакології” (Дніпропетровськ, 2013), VI Конгресі Українського товариства нейронаук (Київ, 2014), XI Конгресі Українського біохімічного товариства (Київ, 2014), 51-му Конгресі європейських токсикологічних товариств “EUROTOX 2015” (Porto, 2015), XXVI Науковій сесії Наукового товариства ім. Шевченка (Львів, 2015).

**Публікації.** За матеріалами дисертації опубліковано 50 друкованих праць: 28 статей, з них 25 – у фахових виданнях з біологічних наук (11 без співавторів), 1 патент України на корисну модель, 1 довідник (у співавторстві), 21 тези доповідей. 18 статей опубліковано у наукових періодичних виданнях (з них – 3 закордонні), включених до міжнародних наукометричних баз даних.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, власних досліджень, аналізу і узагальнення результатів досліджень, висновків, списку використаної літератури (770 найменувань, в тому числі 557 латиницею) і додатків (6). Дисертацію викладено на 359 сторінках комп’ютерного тексту, її основна частина становить 270 сторінок, робота містить 107 таблиць і 40 рисунків, з яких 4 повністю займають площу сторінки.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

**Огляд літератури.** У 6-ти підрозділах розглянуто і проаналізовано наявні у літературі дані про біохімічні та фізіологічні особливості впливу на організм тварин фосфорорганічних і карбаматних сполук на прикладі їх представників – хлорпірифосу й карбофурану, відповідно. Описано відомі механізми токсичної дії цих ксенобіотиків на різних рівнях організації організму, висвітлено також їх окремі елементи, які на сьогодні кінцево не з’ясовані і потребують глибших

досліджень. У контексті теми дисертаційної роботи приділено значну увагу огляду літературних джерел, які стосуються про- / антиоксидантних реакцій, явища оксидативного стресу, системи антиоксидантного захисту, а також ролі деяких металів у процесах токсичності досліджуваних сполук. Узагальнено інформацію щодо нейротоксичної дії хлорпірифосу і карбофурану.

**Загальна методика та основні методи досліджень.** Дисертаційна робота виконувалась протягом 2003–2015 років у відділі науково-технічної інформації і приладного забезпечення (2003–2007 рр.) та лабораторії обміну речовин (2007–2015 рр.) Інституту біології тварин НААН. Частину експериментальних досліджень було проведено у Середземноморському інституті нейробіології (м. Марсель, Франція) в рамках міжнародних грантів (2003–2010 рр.).

У першій серії дослідів вивчали інтоксикацію ХПФ за його одноразового введення у дозі 30 мг/кг на фізіолого-біохімічні показники щурів через 1, 3, 6, 10 діб після введення препарату. Дослідження були проведені на 40 статевозрілих самцях білих лабораторних щурів лінії Вістар масою тіла 200–220 г. Було сформовано 2 групи тварин (контрольну і дослідну) по 20 тварин-аналогів у кожній. Тваринам дослідної групи одноразово внутрішньоочеревинно вводили ХПФ у дозі 30 мг/кг. Інтактним тваринам контрольної групи замість ХПФ вводили відповідну кількість фізіологічного розчину. З метою вивчення змін основних біохімічних параметрів крові та тканин різних органів щурів, матеріал для досліджень відбирали через 1, 3, 6, 10 діб після введення препарату. Для цього на всіх етапах із кожної групи відбирали по 5 тварин для евтаназії. У ці ж часові періоди проводили оцінку функціонування ЦНС щурів за допомогою поведінкового тестування.

У другій серії дослідів вивчали інтоксикацію ХПФ у дозах 15 і 30 мг/кг на стан показників АОС у окремих відділах головного мозку та вміст металів у тканинах різних органів щурів. Дослідження були проведені на 30 статевозрілих самцях білих лабораторних щурів лінії Вістар масою тіла 200–220 г. Було сформовано три групи тварин (контрольну (К) і дві дослідні (Д 1 і Д 2) по 10 тварин-аналогів у кожній. Тваринам дослідних груп одноразово внутрішньоочеревинно вводили ХПФ з розрахунку 15 (група Д 1) і 30 мг/кг (група Д 2) маси тіла. Інтактним тваринам контрольної групи замість препарату вводили аналогічний об'єм фізіологічного розчину. Через 24 год. всіх тварин декапітували під етерним наркозом.

У третій серії дослідів вивчали інтоксикацію ХПФ у дозі 15 мг/кг на показники АОС та вміст деяких металів у різних відділах головного мозку щурів. Дослідження були проведені на 20 статевозрілих самцях білих лабораторних щурів лінії Вістар масою тіла 200–220 г. Було сформовано дві групи щурів по 10 тварин у кожній. Тварини дослідної групи щоранку протягом 30 днів перорально отримували ХПФ у дозі 15 мг/кг маси тіла. Кількість ХПФ розраховували при кожному введенні, залежно від маси тварини, яку визначали їх щоденним зважуванням, що дозволило чітко дотримуватися досліджуваної дози препарату протягом усього експерименту. Тварини контрольної групи отримували аналогічний об'єм фізіологічного розчину.



У четвертій серії дослідів вивчали вплив хронічної дермальної інтоксикації ХПФ на фізіолого-біохімічні показники щурів протягом одного місяця. Дослідження були проведені на 30 статевозрілих самцях білих лабораторних щурів лінії Вістар масою тіла 200–220 г. Було сформовано 3 групи (контрольну (К) і дві дослідні (Д 1 і Д 2) по 10 щурів у кожній. Протягом місяця тваринам дослідних груп щоденно в один час дермально аплікували ХПФ, занурюючи їхній хвіст у розчин цієї речовини відповідної концентрації на 3 хв. Вихідним розчином ХПФ слугував препарат з концентрацією діючої речовини 480 г/л. Для експериментів препарат розводили у 50 (група Д 1) і 5 разів (група Д 2). У контрольній групі з інтактними тваринами проводили ті самі маніпуляції, що й у дослідній, але замість ХПФ використовували фізіологічний розчин. На 1, 7, 14 і 30 доби експериментального періоду щурів тестували у ряді установок з метою виявлення змін в характері їхньої поведінки під впливом ХПФ. Зокрема, використовували тестування тварин за методикою відкритого поля, під час якого фіксували такі показники, як: горизонтальна і вертикальна рухова активність і її типи, кількість завмирань, грумінг, кількість дефекацій і уринацій. Також у ході експерименту проводили тестування тварин за допомогою пристрою екстраполяційного позбавлення та темно-світлої камери.

У п'ятій серії дослідів вивчали вплив гострої інтоксикації ХПФ у дозі 50 мг/кг на біохімічні показники крові та тканин різних органів щурів через 15, 30, 45 і 60 хв після введення препарату. Дослідження були проведені на 40 статевозрілих самцях білих лабораторних щурів лінії Вістар масою тіла 200–220 г. Було сформовано 2 групи (контрольну і дослідну) по 20 тварин-аналогів у кожній. Щурам дослідної групи одноразово внутрішньошлунково за допомогою зонду вводили соняшниково-олійний розчин ХПФ з розрахунку 50 мг/кг маси тіла. Інтактним тваринам вводили аналогічний об'єм соняшnikової олії. Декапітацію щурів за анестезії ефіром та відбір біологічного матеріалу проводили через 15, 30, 45 і 60 хв після введення токсиканту.

У шостій серії досліджень вивчали токсичність ХПФ на нейронах гіпокампу за умов культури клітин. У цьому етапі спочатку розробляли методологію прижиттєвого дослідження нейротоксичності ХПФ на первинних культурах нейронів гіпокампу, які отримували з цього відділу мозку 18-добових ембріонів лабораторних щурів. Визначали дію сполуки на виживання та життєздатність нервових клітин через різні проміжки часу протягом 72 годин після внесення ХПФ у інкубаційне середовище у 10 різних концентраціях: від 1 до 100 мкМ. У експериментах *in vitro* як антиоксидантний чинник застосовували 6-гідрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбонову кислоту (Тролокс), який вносили до середовища інкубації у концентрації 100 мкМ.

У сьомій серії досліджень вивчали вплив хронічної інтоксикації карбофураном на біохімічні та нейрофізіологічні показники щурів. При вивченні впливу хронічної дії КФ у дозі 0,2 мг/кг на показники АОС у різних відділах головного мозку і вміст у них Феруму, Купруму, Цинку і Мангану проведено дослідження на 10 статевозрілих самцях білих лабораторних щурів лінії Вістар масою 200–220 г. Було сформовано 2 групи тварин (контрольну і дослідну) по 5

тварин у кожній. Матеріал відбирали через 30 діб після початку перорального введення тваринам КФ. Стан функціонування нервової системи досліджували на 30 статевозрілих самцях білих лабораторних щурів лінії Вістар масою тіла 200–220 г за допомогою поведінкового тестування. Для цього сформували 3 групи тварин (контрольну (К) і 2 дослідні (Д 1 і Д 2) по 10 щурів у кожній, які перорально отримували КФ протягом 30 днів у дозі 0,1 мг/кг і 0,2 мг/кг маси тіла.

Загальну схему досліджень дисертаційної роботи представлено на рис. 1. Загалом, дослідження були проведені на 200 статевозрілих самцях білих лабораторних щурів лінії Вістар масою тіла 180–220 г, яких утримували у стандартних умовах віварію з дотриманням 12-годинного режиму освітлення темнота/світло, необмеженим доступом до питної води та корму. Усі маніпуляції з тваринами проводили відповідно до Європейської конвенції “Про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних і наукових цілей” від 18.03.1986 р., Директиви ЄС № 609 від 24.11.1986 р. і “Загальних етичних принципів експериментів на тваринах”, ухвалених Першим Національним конгресом з біоетики у Києві 2001 р. Комісією з біоетичної експертизи Інституту біології тварин НААН (протокол № 48 від 2 квітня 2015 р.) порушень морально-етичних норм при проведенні дослідів з тваринами не встановлено.

Матеріалом для досліджень були кров, тканини органів, відділи головного мозку щурів (кора великих півкуль, гіпокамп, мозочок), первинні культури клітин гіпокампу.

Визначення активності холінестерази (КФ 3.1.1.8) проводили за методом, описаним А. І. Карпищенком (2002), супероксиддисмутази (КФ 1.15.1.1.) – Є. Є. Дубініною (1983), каталази (КФ 1.11.1.6) – М. А. Королюк (1988), глутатіон-S-трансферази (КФ 2.5.1.18) – W. H. Habig і W. V. Jacoby (1974), глутатіонредуктази (КФ 1.6.4.2) – I. Carlberg (1975), глутатіонпероксидази (КФ 1.11.1.9) – за швидкістю окиснення відновленого глутатіону (Моин В. М., 1986). Концентрацію глутатіону відновленого визначали колориметрично за P. Hissin (1976), вміст гідропероксидів ліпідів визначали за методом, який ґрунтується на спектрофотометричному вимірюванні оптичної густини продуктів реакції з тіоціанатом амонію, сіллю Мора і соляною кислотою (Гаврилов В. Б., 1988), концентрацію ТБК-активних продуктів – за методом Е. Н. Коробейникової (1989). Активність аланінамінотрансферази (КФ 2.6.1.2) і аспартатамінотрансферази (КФ 2.6.1.1) визначали за допомогою уніфікованого динітрофенілгідразинового методу, описаного S. Reitman & S. Frankel (1957), лужної фосфатази (КФ. 3.1.3.1) – за методом P. Kind (1954), вміст сечовини – колориметрично з використанням стандартного набору виробництва НВП «Філісіт Діагностика» (Україна), вміст загального протеїну – за методом J. N. Lowry (1951). Концентрацію металів у тканинах тварин визначали методом атомно-абсорбційної спектрофотометрії на приладі С-115-ПК (Україна), дослідні зразки попередньо мінералізували методом сухого озолення (ГОСТ 286-87-85, 1985).

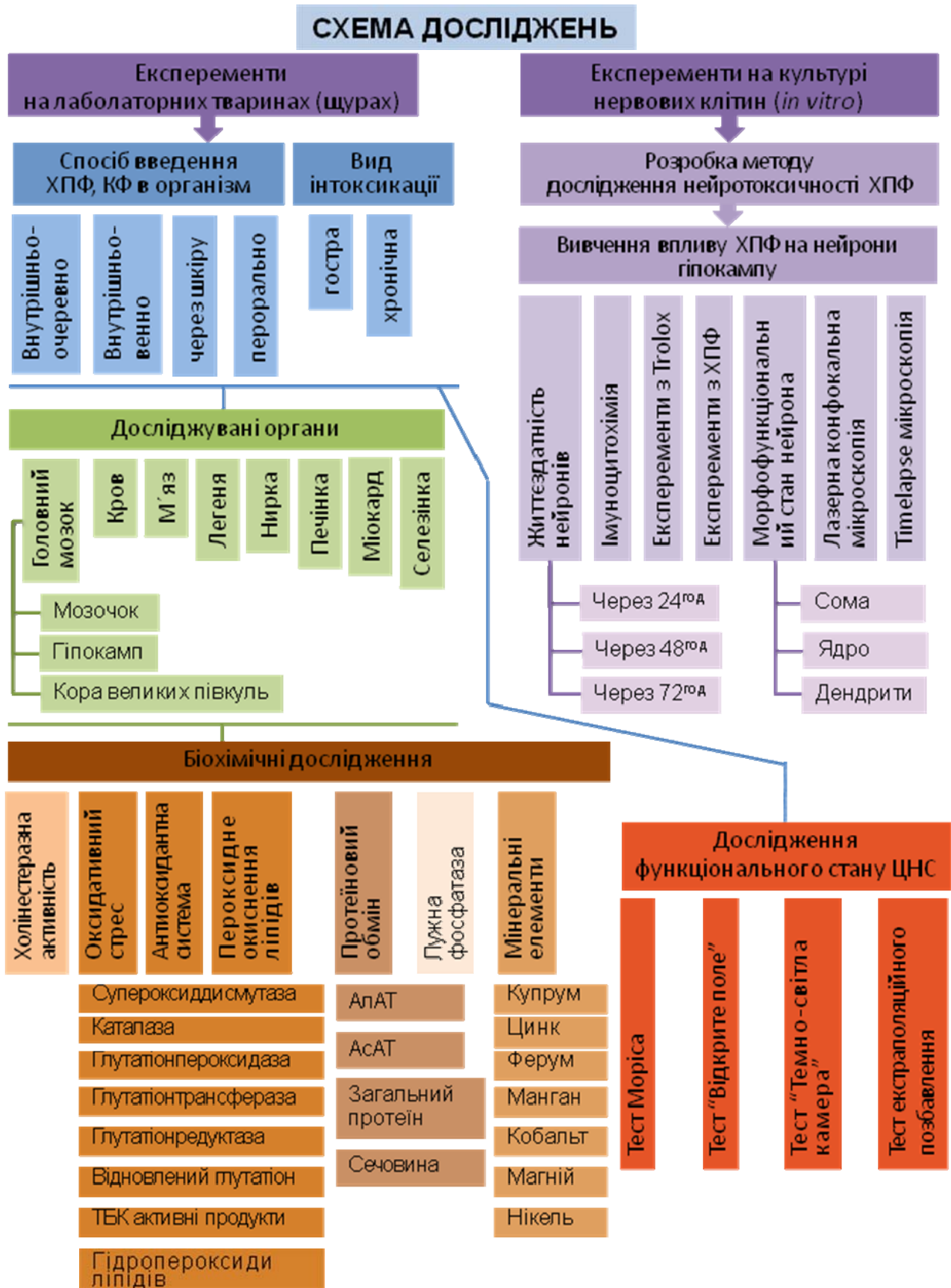


Рис. 1. Схема досліджень, проведених при виконанні дисертаційної роботи

Отримання первинних культур нейронів гіпокампу здійснювали з ембріонів щурів. Нейрони культивували в мінімальному поживному середовищі (MEM) до якого додатково вносили 10 % сироватки Nu фірми BD Biosciences (Франція), 0,45 % глюкози, 1 мМ Натрію пірувату, 1,5 мМ HEPES (4-(2-гідроксиетил)1-піперазинетансульфонова кислота) (Gibco, США), і 10 МО мл<sup>-1</sup> пеніцилін-стрептоміцину, як описано А. Ivanov (2006). Для трансфекції нейронів флуоресцентним протеїновими маркерами використовували метод магнетофекції (Buerli T., 2007). Мікроскопування нервових клітин здійснювали за допомогою конфокального мікроскопа марки «Olympus Fluorview-500». Для аналізу інтенсивності флуоресценції нейронів застосовували програмне забезпечення «MetaMorph» та «ImageJ». Прижиттєву інтервальну мікроскопію нервових клітин у процесі їх росту і розвитку проводили за допомогою інвертованого мікроскопа марки «Nikon TE300», який був обладнаний спеціальною CO<sub>2</sub> камерою (Princeton Instruments) у якій безперервно контролювали рівень вуглекислого газу і температуру. Для дослідження функціонального стану ЦНС щурів проводили шляхом їх тестування за наступними поведінковими методиками: водний лабіринт Морріса (Morris R. G., 1982), тест відкритого поля (Буреш Я., 1991), тест екстраполяційного позбавлення (установка фірми OpenScience) та темно-світлої камери (Bougin M., 2003).

Статистичну обробку отриманих результатів проводили за допомогою пакету програм OriginPro 7.5 (Microcal, США) за стандартним критерієм t-тесту Стьюдента. Досліди проводили у трьох паралелях у кожному варіанті і для результатів цих експериментів розраховували середнє значення «М» та середню похибку «m», які й представлено на діаграмах та графіках у формі стандартних похибок (M±m). Значення при P<0,05 вважали вірогідними.

## РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

**Вплив гострої інтоксикації ХПФ у дозі 30 мг/кг на фізіолого-біохімічні показники щурів через 1, 3, 6, 10 діб після введення препарату.** Оскільки загальноприйнятим індикаторним показником ступеня інтоксикації ФОС і, зокрема ХПФ, є холінестеразна ензиматична активність, було проведено визначення активності бутирилхолінестерази (БХЕ) у сироватці крові щурів на кожному з етапів експерименту. Вірогідне зниження активності БХЕ у сироватці крові тварин дослідної групи, порівняно з контрольними інтактними тваринами було зафіксоване на першу і третю доби дослідження, а саме – на 80,9 (P<0,001) і 42,8 % (P<0,05), відповідно (рис. 2). Протягом перших трьох діб після введення тваринам ХПФ мало місце різке зниження активності БХЕ. Починаючи з 6-ї доби після початку експерименту, активність досліджуваного ензиму вийшла із своїх мінімальних значень, які ми спостерігали на першу добу після введення ХПФ, і зросла майже до рівня показників контрольної групи.

Важливим біохімічним тестом для оцінки метаболічного стану організму є дослідження активності амінотрансфераз – ензимів, які каталізують реакції переамінування. Результати (рис. 3) вказують на підвищення активності аланінамінотрансферази (АлАт) та аспартатамінотрансферази (АсАт) у плазмі крові тварин дослідних груп практично протягом усього періоду експерименту. При цьому, у плазмі крові щурів дослідних груп, яким вводили ХПФ, виявлено вірогідне зростання активності АсАт на 1-шу, 3-тю та 6-ту доби експериментального періоду, порівняно до контролю, відповідно – на 20 ( $P<0,001$ ), 28,3 ( $P<0,01$ ) і на 19 % ( $P<0,05$ ). Стосовно АлАт, то її активність була вірогідно вищою на 1-шу та 6-ту доби після введення вищезгаданої сполуки, відповідно – на 17,2 ( $P<0,05$ ) та 23 % ( $P<0,01$ ), порівняно до плазми крові інтактних щурів. На 10-ту добу активність АлАт та АсАт плазми крові дослідних тварин була практично на одному рівні з показниками контрольної групи.

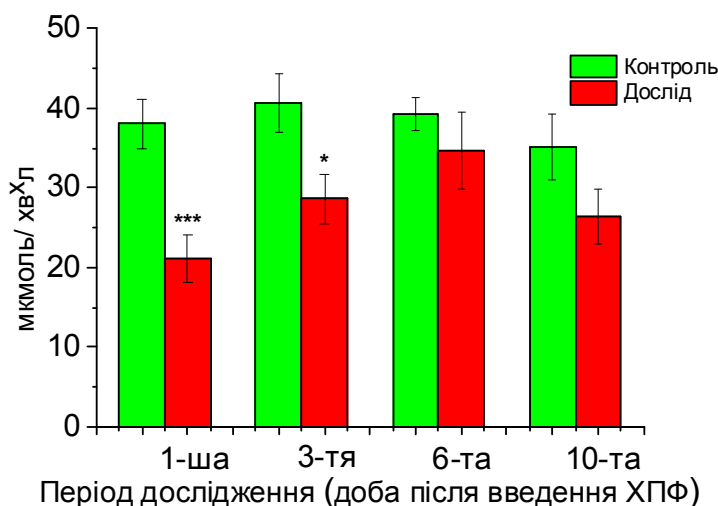


Рис. 2. Активність БХЕ у сироватці крові щурів через 1, 3, 6 і 10 діб після введення ХПФ у дозі 30 мг/кг, ( $M\pm m$ ,  $n=5$ ).

Примітка. У цьому та наступних рисунках: \*, \*\*, \*\*\* – вірогідність відмінностей між показниками контрольних і дослідних груп тварин (\* -  $P<0,05$ ; \*\* -  $P<0,01$ ; \*\*\* -  $P<0,001$ ).

Стосовно АлАт, то її активність була вірогідно вищою на 1-шу та 6-ту доби після введення вищезгаданої сполуки, відповідно – на 17,2 ( $P<0,05$ ) та 23 % ( $P<0,01$ ), порівняно до плазми крові інтактних щурів. На 10-ту добу активність АлАт та АсАт плазми крові дослідних тварин була практично на одному рівні з показниками контрольної групи.

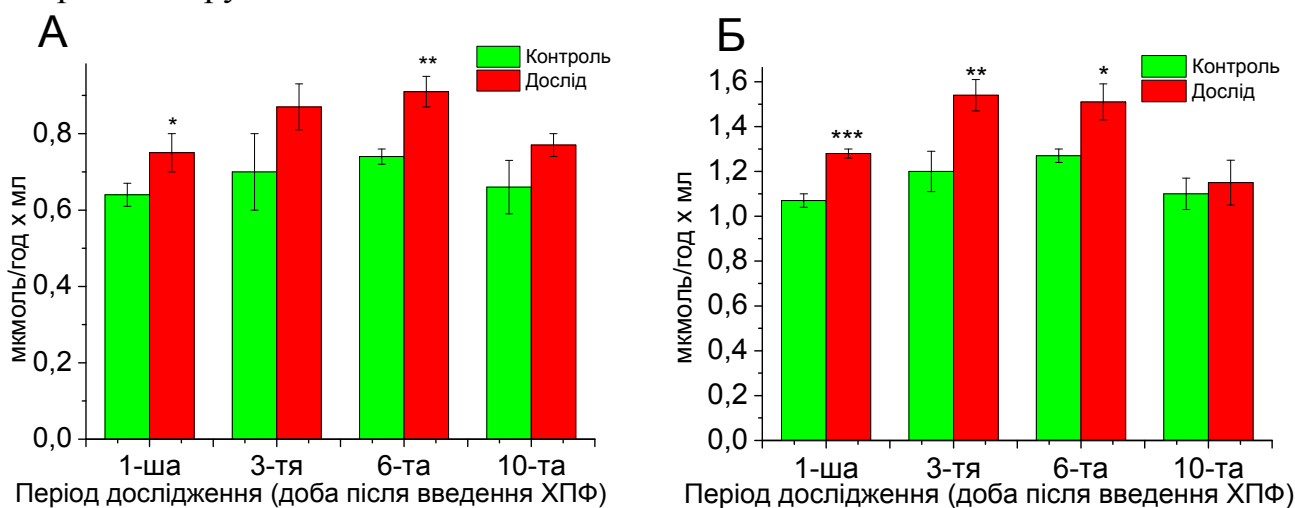


Рис. 3. Активність АлАт (А) і АсАт (Б) у плазмі крові щурів через 1, 3, 6 і 10 діб після введення ХПФ у дозі 30 мг/кг, ( $M\pm m$ ,  $n=5$ ).

Відомо, що при гострих отруєннях різної етіології у крові часто відбувається зростання активності лужної фосфатази (ЛФ) – ензиму, який здійснює дефосфорилування багатьох типів молекул, зокрема: протеїнів, нуклеотидів,

алкалоїдів та ін. У результаті проведених досліджень (рис. 4) було встановлено, що активність ЛФ суттєво зростала у плазмі крові щурів дослідної групи на 1-шу добу після введення ХПФ, а саме – на 40,7 % ( $P < 0,05$ ), порівняно до контролю. На 3-тю добу показник активності ЛФ у тварин контрольної та дослідної груп був на одному рівні. Картина змінилась у наступні періоди досліджень. Зокрема, на 6-ту та 10-ту доби після інтоксикації ХПФ активність ЛФ знижувалась – на 35,6 ( $P < 0,001$ ) та 33,2 % ( $P < 0,05$ ) відповідно, порівняно з тваринами контрольної групи. Це вказує на можливі біохімічні порушення в органах і тканинах щурів дослідної групи. Загалом, одночасне підвищення активностей ЛФ, АлАТ та АсАТ у крові дозволяє припустити виникнення певних деструктивних змін у печінці інтоксикованих тварин.

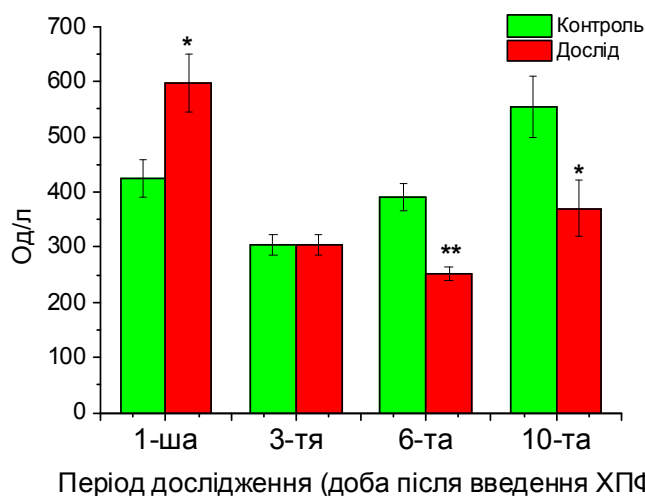


Рис. 4. Активність ЛФ у плазмі крові щурів через 1, 3, 6 і 10 діб після введення ХПФ у дозі 30 мг/кг, ( $M \pm m$ ,  $n=5$ ).

Проведені у цій серії експериментів дослідження окремих параметрів протеїнового обміну показали, що у плазмі крові тварин експериментальної групи вірогідно знижувався вміст загального протеїну на 3-тю та 6-ту доби після введення щурам ХПФ, відповідно – на 16,1 ( $P < 0,05$ ) та 11,5 % ( $P < 0,01$ ). Вміст альбуміну був вірогідно вищим у тварин дослідної групи на 3-тю добу ( $P < 0,01$ ) після введення ХПФ, порівняно до контролю. Аналіз результатів визначення вмісту сечовини в сироватці крові свідчить, що її рівень у інтоксикованих щурів практично не відрізнявся від значень у інтактних тварин. Таким чином, можна констатувати, що інтенсивність катаболізму амінокислот у тварин дослідних груп була практично такою ж, як у інтактних щурів.

Щоб перевірити гіпотезу про важливу роль у біохімічному механізмі токсичної дії досліджуваного ксенобіотику явища оксидативного стресу, значну частину роботи було присвячено вивченню ключових параметрів про- і антиоксидантних процесів у крові та інших тканинах інтоксикованих щурів. Зокрема, проведені нами дослідження дозволили прослідкувати основну динаміку змін показників глутатіонової ланки антиоксидантної системи у крові щурів через 1, 3, 6 та 10 діб після введення дослідним тваринам ХПФ (рис. 5).

Зниження вмісту глутатіону відновленого (ГВ) у еритроцитах, встановлене у ході досліджень, можна пояснити його кон'югацією з продуктами метаболізму ХПФ, а також використанням у процесах біохімічних перетворень активних форм Оксигену (АФО), які, як свідчать дані наукової літератури, індукуються за умов токсичної дії ХПФ на біологічні системи. Однією з причин зменшення глутатіонредуктазної (ГР) активності у гемолізатах еритроцитів за дії ХПФ може

бути зниження вмісту NADH та NADPH, оскільки ГР є ензимом залежним від NADPH, активність якого пригнічується у разі накопичення окисненої форми нуклеотиду (NADP).

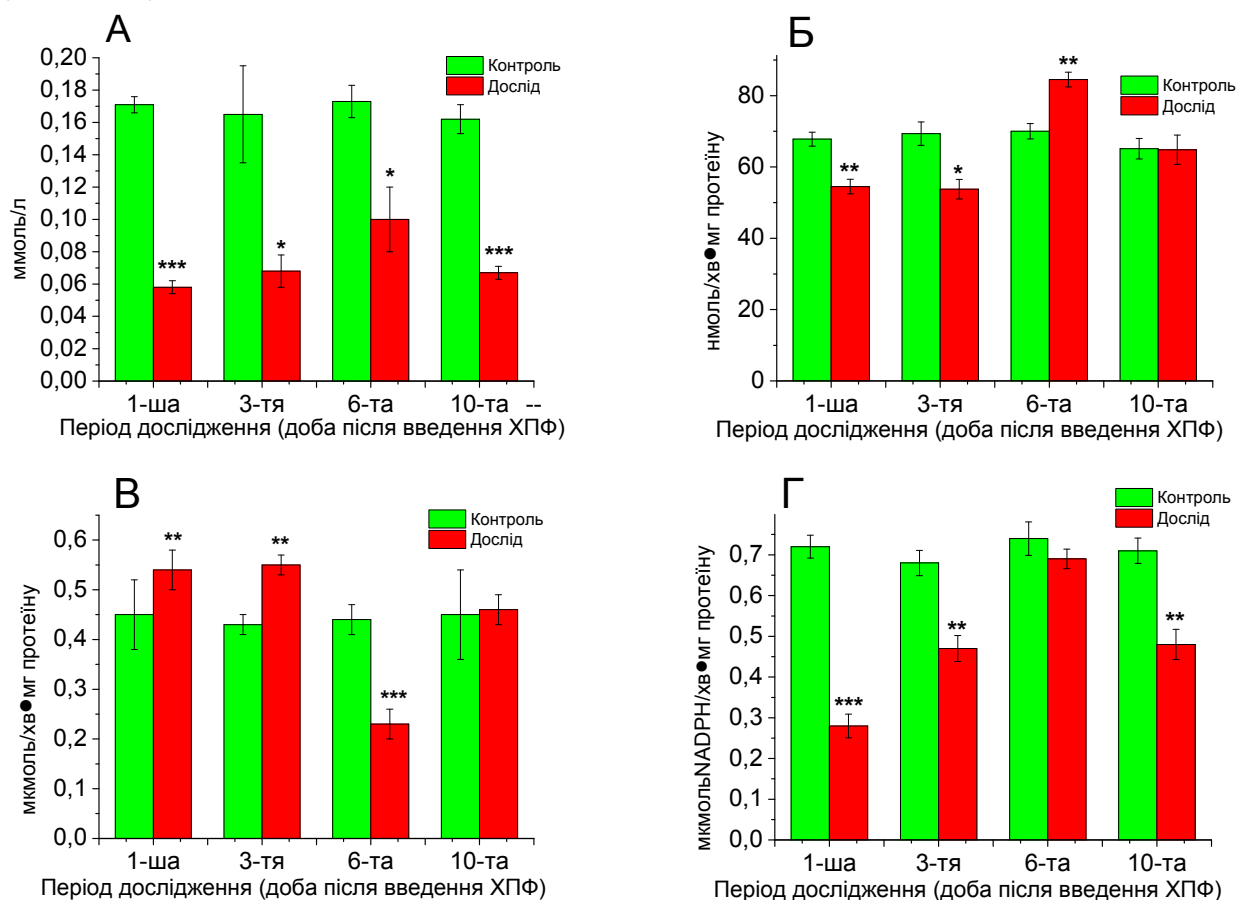


Рис. 5. Вміст глутатіону відновленого (А), активність глутіонпероксидази (Б), глутіонтрансферази (В), глутатіонредуктази (Г) в еритроцитах крові щурів після введення ХПФ у дозі 30 мг/кг, ( $M \pm m$ ,  $n=5$ ).

Водночас, активність глутатіонпероксидази (ГПО) в гемолізатах еритроцитів щурів на 1-шу добу експерименту була вірогідно нижчою у тварин дослідної групи у порівнянні з контролем на 24 % ( $P < 0,01$ ). На 3-тю добу експерименту активність цього ензиму була меншою від контрольних значень на 29 % ( $P < 0,05$ ). Такі зміни могли бути зумовлені вичерпанням доступного пулу глутатіону відновленого та накопиченням продуктів ліпопероксидації. Таке припущення підтверджується даними, згідно з якими активність ГПО знижувалася саме на 1-шу та 3-тю доби після введення щурам ХПФ. Проте, отримані результати показали, що вже починаючи з 6-ої доби активність ГПО у тварин дослідної групи почала зростати і навіть у цей період експерименту переважала контрольне значення на 21 % ( $P < 0,01$ ). На 10-ту добу різниці між ГПО-активністю між контролем і дослідом виявлено не було.

Відомо, що глутатіонтрансфераза (ГТ) значною мірою забезпечує можливість детоксикації екзогенних сполук вже на перших етапах їх проникнення в організм, тому визначення активностей цього ензиму за умов інтоксикації тварин ХПФ має важливе інформативне значення. Як показали результати досліджень

(рис. 5А) на початкових етапах дослідного періоду мало місце вірогідне зростання активності ГТ, а саме: на 1-шу добу – на 20 % ( $P<0,01$ ), на 3-тю – на 28 % ( $P<0,01$ ), порівняно до гемолізатів еритроцитів інтактних тварин. Але на протизагу цій напрямленості змін, на 6-ту добу у тварин дослідної групи, навпаки, мало місце зниження активності цього ензиму на 53 % ( $P<0,001$ ). Цілком ймовірно, що такі різнонапрямлені зміни можуть бути пов'язані із зростанням токсичного навантаження на організм, при якому відбувається індукування цитохрому Р450 і ГТ, яке супроводжується зниженням рівня у клітинах крові вмісту відновленого глутатіону.

Супероксиддисмутаза (СОД) є одним з найважливіших ензимів антиоксидантної системи організму, що здійснює реакцію дисмутації супероксидних аніон-радикалів і перетворює їх на менш реакційно здатні молекули Гідрогену пероксиду. Отримані дані дослідження (рис. 6) свідчать про зниження активності СОД у гемолізатах еритроцитів тварин дослідної групи протягом всього періоду експерименту порівняно до червоних кров'яних клітин інтактних щурів. Слід, однак відзначити, що найвагомніше – приблизно на 50 % ( $P<0,001$ ) зниження активності СОД спостерігали через 3, 6 і 10 діб після введення тваринам токсину.

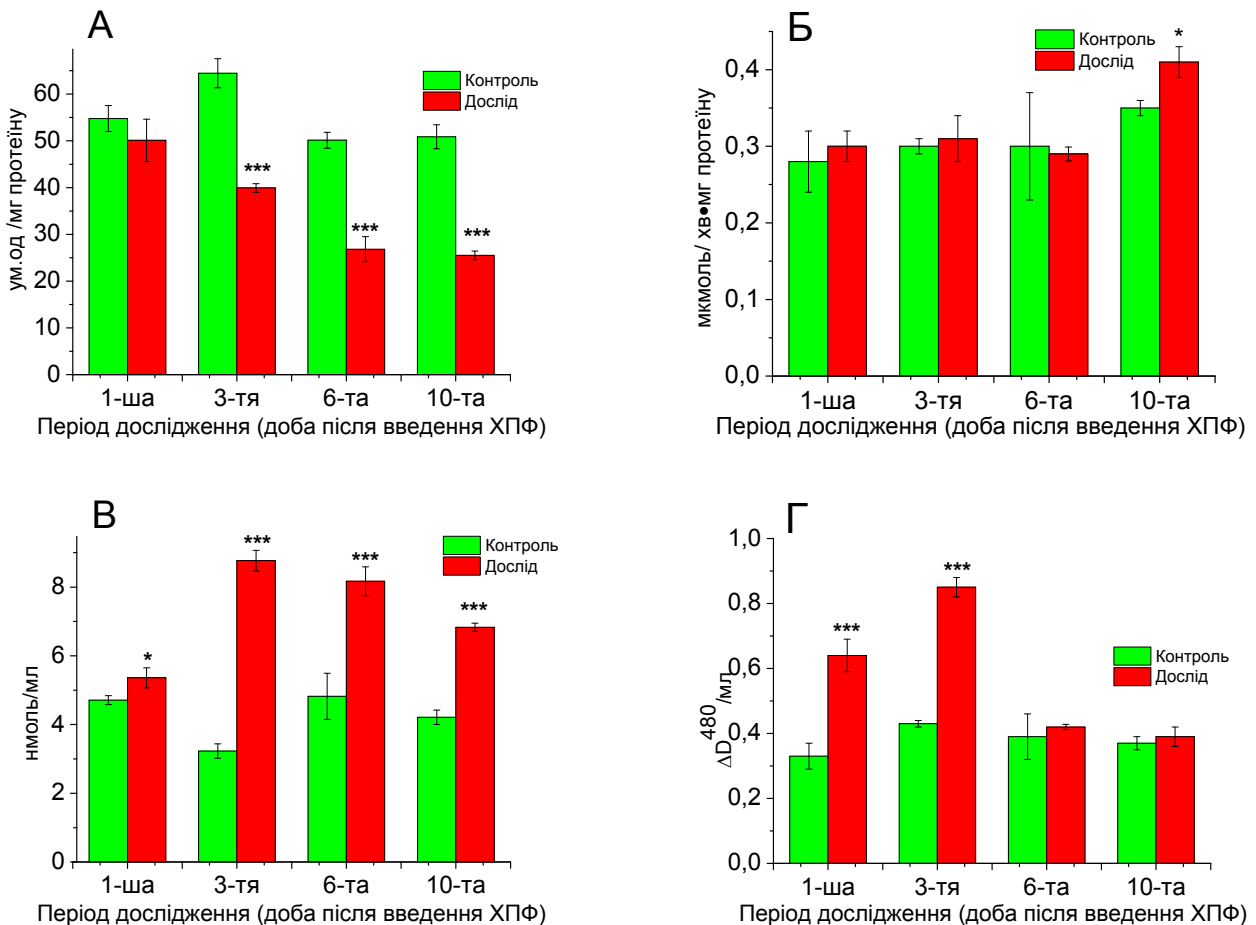


Рис. 6. Активність супероксиддисмутази (А) і каталази (Б) в еритроцитах і вміст ТБК-активних продуктів (В) та гідропероксидів ліпідів (Г) у плазмі крові щурів після введення ХПФ у дозі 30 мг/кг, ( $M\pm m$ ,  $n=5$ ).



Ймовірно, таким чином організм бореться з оксидативним стресом, який виникає у тканинах організму одразу після інтоксикації ХПФ і є найінтенсивнішим протягом перших діб після отруєння. Активність каталази (КАТ) у гемолізатах еритроцитів у контрольній та дослідній групах практично не відрізнялася протягом всього періоду досліджень, за винятком 10-ї доби після застосування ХПФ, коли активність цього ензиму вірогідно зростала на 17 % ( $P < 0,05$ ) у дослідній групі порівняно до контролю.

Встановлено, що за дії ХПФ у плазмі крові тварин дослідної групи вірогідно зростав вміст ТБК-активних продуктів на 1-шу, 6-ту та 10-ту доби після застосування цього ксенобіотика, відповідно – на 14 ( $P < 0,05$ ), 69 ( $P < 0,01$ ) і 62 % ( $P < 0,001$ ). Але найсуттєвіше зростання цього показника (більше ніж у 2,5 раза) спостерігали у плазмі крові щурів на 3-тю добу після застосування ХПФ. Вираженість вказаних процесів була найбільшою в період з 3-ої до 6-ої доби експерименту, що може свідчити про дефіцит ресурсів системи антиоксидантного захисту внаслідок їх виснаження у перші години і доби після інтоксикації організму ХПФ. Також спостерігали вірогідне зростання у плазмі крові гідропероксидів ліпідів (ГПЛ) на 1-шу та 3-тю доби після введення щурам ХПФ – відповідно на 93,9 ( $P < 0,05$ ) та 97,6 % ( $P < 0,001$ ), порівняно до плазми крові інтактних тварин.

Підсумовуючи описані вище результати цього етапу роботи, можна констатувати, що введення дослідним тваринам ХПФ призводило до активації процесів пероксидного окиснення ліпідів, що виражалось, зокрема, у зростанні вмісту ТБК-активних продуктів та ГПЛ у плазмі крові дослідних тварин. Одночасно мало місце зниження активності СОД у гемолізатах еритроцитів крові тварин дослідної групи протягом всього періоду дослідження.

Окрім крові, визначали також аналогічні показники антиоксидантної системи у тканинах різних органів щурів. Результати цих досліджень свідчать про те, що гостре отруєння щурів ХПФ, яке було викликане одноразовим введенням цієї сполуки у дозі 30 мг/кг маси тіла, призводило до тканинно- і часозалежної активації процесів ПОЛ, яка супроводжується нагромадженням продуктів ліпопероксидації та АФО. Останні можуть спричиняти деструктивні явища у мембранах різних клітин, зокрема еритроцитів, гепатоцитів і тим самим – підсилювати ендogenous інтоксикацію організму.

**Вплив гострої інтоксикації ХПФ у дозі 30 мг/кг на вміст металів у тканинах різних органів щурів через 1, 3, 6, 10 діб після введення препарату.** Між мінеральними елементами існують як синергічні, так і антагоністичні взаємодії, які поряд з їх координаційними зв'язками з органічною матрицею (протеїни, ензими, гормони, вітаміни) значною мірою визначають механізми і закономірності більшості фізіолого-біохімічних процесів організму. Відповідно, дисбаланс у елементному гомеостазі з одного боку може призводити до різноманітних порушень метаболізму на молекулярному, клітинному, органному рівнях, а з другого – може про такі порушення сигналізувати. Особливо важливою є роль макро- і мікроелементів у функціонуванні нервової системи, зокрема вони беруть участь у формуванні каталітичних центрів і стабілізації регуляторних

центрів більш ніж 1000 ензимів нервової тканини, що забезпечує підтримку різноманітних енергетичних і пластичних процесів.

Виходячи із сказаного вище, у цій та наступних серіях досліджень проводили визначення концентрацій деяких біохімічно активних металів, а саме – Купруму, Мангану, Цинку, Феруму, Магнію, Кобальту і Нікелю у тканинах різних органів інтоксикованих щурів. Важливими є дослідження впливу інтоксикації щурів ХПФ на вміст металів у тканинах головного мозку тварин (рис. 7). Ці зміни можуть впливати на функціонування нервової системи організму, оскільки ряд елементів (Zn, Fe, Mn, Cu) беруть участь у процесах синтезу численних нейромедіаторів, нейропептидів. Синтез всіх відомих на сьогодні нейропептидів йде за обов'язкової участі іонів Мангану. Інтоксикація щурів призводила до вірогідного зростання вмісту цього елемента на 10-ту добу після застосування ХПФ на 52 % ( $P \leq 0,05$ ), порівняно до контролю (рис. 7А). При дослідженні Цинку (рис. 7Б) у мозку щурів на тлі гострої інтоксикації ХПФ в дозі 30 мг/кг маси тіла встановлено вірогідне зростання його вмісту на 10-ту добу експерименту на 56 % ( $P \leq 0,001$ ). Інтоксикація щурів ХПФ впливала подібним чином і на рівень Феруму у досліджуваних тканинах головного мозку протягом експерименту (рис. 7В). На шосту добу відмічено вірогідне збільшення вмісту цього металу на 21,5 % ( $P \leq 0,05$ ), порівняно з контрольними тканинами.

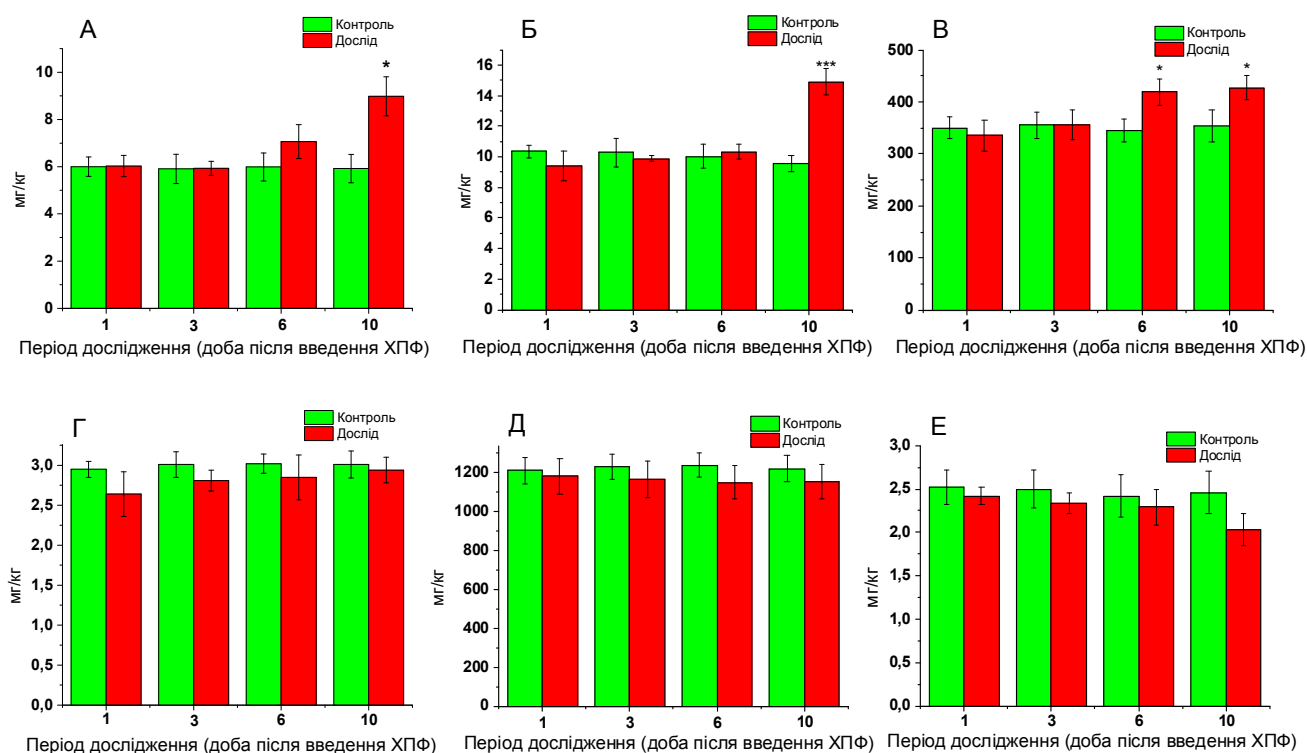


Рис 7. Вміст металів у перерахунку на суху масу (А – Мангану, Б – Цинку, В – Феруму, Г – Купруму, Д – Магнію, Е – Кобальту) у тканинах головного мозку щурів після введення їм ХПФ у дозі 30 мг/кг, ( $M \pm m$ ,  $n=5$ ).

На десяту добу різниця була також вірогідною ( $P \leq 0,01$ ) і склала 21 % зростання у перерахунку на суху масу тканини. Також на всіх етапах експерименту у

тканинах головного мозку тварин дослідної групи спостерігали тенденцію до зниження вмісту Купруму (рис. 7Г).

Аналіз кореляційних зв'язків змін концентрації досліджуваних елементів у мозку тварин за інтоксикації ХПФ у дозі (30 мг/кг) впродовж 10 днів експерименту показав дуже високий позитивний кореляційний зв'язок між Цинком та Манганом – 0,978, що характеризує тісний синергізм між ними. Високий позитивний кореляційний зв'язок був відмічений між Нікелем і Магнієм – 0,892, та між Купрумом і Манганом (0,882), Цинком (0,881), Ферумом (0,842); між Ферумом і Манганом (0,814) і Ферумом та Цинком (0,702). Крім того, у тканинах мозку був відмічений також позитивний середній корелятивний зв'язок змін концентрацій між такими елементами, як: Кобальт і Нікель (0,324).

Також було встановлено тканинно- та часозалежні закономірності вмісту досліджуваних елементів у інших органах інтоксикованих щурів. Результати свідчать, зокрема про зниження вмісту Купруму у тканин більшості органів, що своєю чергою може збільшити сприйнятливість клітин до токсичної дії вільних радикалів. Зменшення вмісту Купруму призводить до зниження здатності клітин синтезувати ключовий антиоксидантний ензим — СОД, тим самим збільшуючи їх чутливість до окисного ушкодження.

**Вплив гострої інтоксикації ХПФ у дозах 15 і 30 мг/кг на стан показників АОС у гіпокампі, мозочку та корі великих півкуль головного мозку щурів.** Оскільки інтенсивність прооксидантно-антиоксидантних процесів у різних відділах головного мозку тварин, як і інших біохімічних реакцій може відрізнятися, було проведено порівняльне дослідження ключових показників, які характеризують стан АОС у тканинах гіпокампу, мозочку та кори великих півкуль. Як видно з рис. 9, активність СОД була вірогідно нижчою у корі півкуль головного мозку тварин першої та другої дослідних груп, відповідно – на 27,2 (P<0,05) та 31,4 % (P<0,05), порівняно до контрольних тканин. Що стосується гіпокампу та мозочку, то у цих відділах головного мозку спостерігалась лише тенденція до зниження цього показника.

Таким чином, отримані результати показують суттєві відмінності активності СОД у різних відділах мозку – найвищу у корі великих півкуль і найнижчу – у мозочку. Це свідчить про різну інтенсивність прооксидантно-антиоксидантних процесів, які в них відбуваються. Однією з причин інгібування активності СОД може бути надмірне збільшення у клітинах

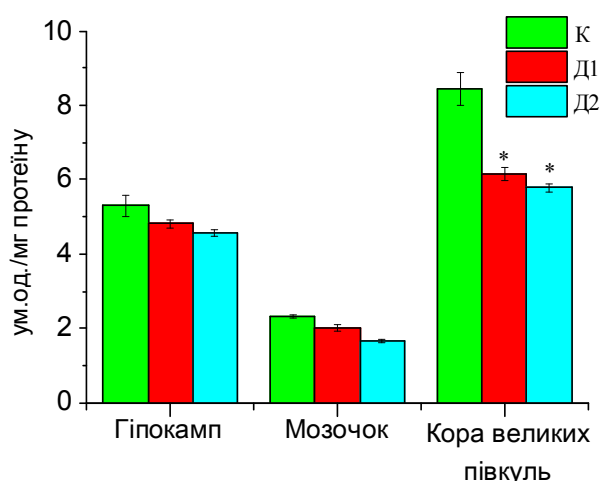


Рис. 8. Активність супероксидисмутазу у різних відділах головного мозку щурів після введення їм ХПФ у дозах 15 (Д1) і 30 мг/кг (Д2), ( $M \pm m$ ,  $n=5$ ).

концентрації синглетного Оксигену, Гідроген пероксиду, гідроксильних радикалів, гідропероксидів ліпідів. Можливо, ХПФ викликає певні конформаційні зміни молекули СОД, внаслідок чого, вона втрачає свою функціональність.

На рис. 9 представлені зміни активності каталази за дії різних доз ХПФ. Необхідно відмітити зниження активності цього ензиму у гіпокампі тварин першої та другої дослідних груп відповідно на 22,6 і 32,6 % ( $P < 0,05$ ) та у мозочку і корі великих півкуль головного мозку другої дослідної групи, відповідно на 19,5 і 49,7 % ( $P < 0,05$ ) порівняно до контролю.

Різноспрямовані зміни активностей СОД і КАТ, які ми спостерігали, свідчать про розбалансованість процесів утворення та утилізації АФО у тканинах мозку щурів інтоксикованих ХПФ. Така ситуація у співвідношенні активностей двох згаданих вище ензимів може також бути пов'язана із загальновідомим фактом, що тканини головного мозку характеризуються відносно низькою каталазною активністю. У свою чергу, зменшення активності КАТ свідчить про зниження реакції, що запобігає накопиченню Гідроген пероксиду, який утворюється при дисмутації супероксидного аніону і при аеробному окисненні відновлених флавопротеїнів.

Отримані дані (рис. 10) свідчать про зниження активності ГПО на 38,2 % у гіпокампі, на 19,4 % ( $P < 0,05$ ) у мозочку і на 27,8 % ( $P < 0,05$ ) у корі півкуль головного мозку щурів другої дослідної групи, тобто за дії вищої дози ХПФ. Що стосується ГПО активності у гомогенатах досліджуваних ділянок мозку першої дослідної групи – то вона вірогідно зменшувалася на 21,9 % ( $P < 0,05$ ) лише у півкулях.

Не виключено, що зниження активності ГПО після дії ХПФ зумовлене вичерпанням пулу ГВ та накопиченням продуктів ПОЛ. Це припущення підтверджується тим, що за результатами досліджень також було виявлено зниження глутатіонредуктазної активності у гомогенатах тканин мозку дослідних груп. Одночасно було встановлено

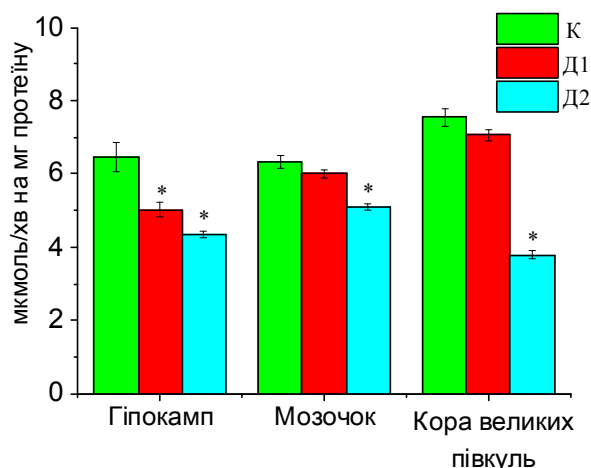


Рис. 9. Активність каталази у різних відділах головного мозку щурів після введення їм ХПФ у дозах 15 (Д1) і 30 мг/кг (Д2), ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )

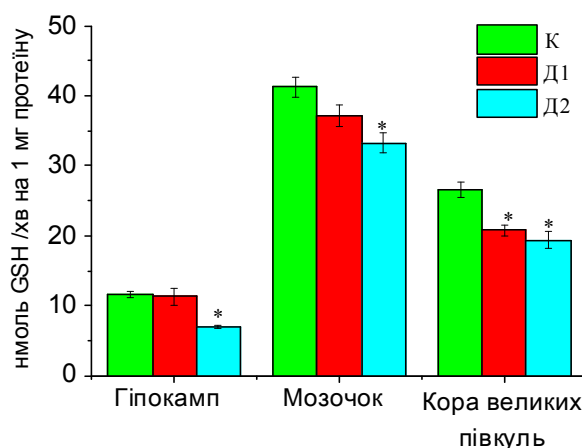
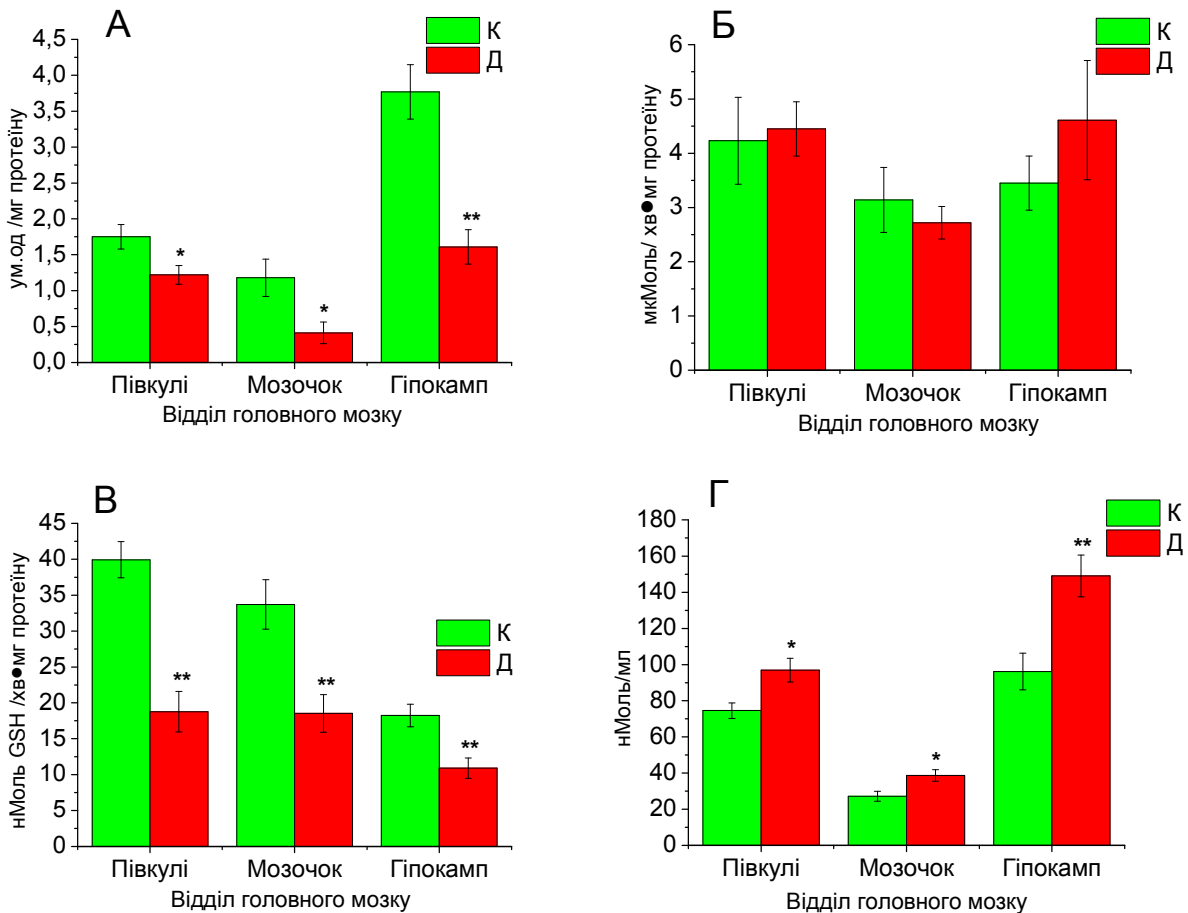


Рис. 10. Активність глутатіонпероксидази у різних відділах головного мозку щурів після введення їм ХПФ у дозах 15 (Д1) і 30 мг/кг (Д2), ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )

зниження вмісту ГВ у тварин першої та другої дослідних груп у гіпокампі (відповідно на 24,1 (P<0,05) та 36,7 % (P<0,05) та півкулях головного мозку (відповідно на 24,5 (P<0,05) та 57,4 % (P<0,05)), порівняно до контролю. Це можна пояснити дією ХПФ, оскільки рівень ГВ та швидкість його обміну можуть бути порушені внаслідок дії хімічних агентів та метаболічних інтермедіатів. Отже, можна припустити, що дія ХПФ пригнічує *de novo* синтез глутатіону відновленого. Але в основному, зниження вмісту ГВ відбувається за рахунок його невідновної втрати при утворенні кон'югатів з ХПФ в глутатіонтрансферазній реакції. Також були виявлені зміни активності ГР у тканинах кори великих півкуль, яка знижувалася в обох дослідних групах на 23,6 (P<0,05) і 38,2 % (P<0,05) відповідно. У мозочку змін активності цього ензиму ми не встановили, проте було виявлено вірогідне її зниження на 15 % у гіпокампі щурів другої дослідної групи.

**Хронічний вплив ХПФ у дозі 15 мг/кг на показники АОС у різних відділах головного мозку щурів.** З результатів, представлених на рис. 11 видно, що у всіх досліджуваних відділах головного мозку щурів хронічна інтоксикація ХПФ призводила до зниження активностей СОД і ГП та одночасне зростання концентрації ТБК-активних продуктів.



**Рис. 11. Активність супероксиддисмутази (А), каталази (Б), глутатіонпероксидази (В) та концентрація ТБК-активних продуктів (Г) у різних відділах головного мозку щурів за хронічного впливу ХПФ у дозі 15 мг/кг ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )**

Водночас, вірогідних відмінностей у активності КАТ зареєстровано не було, не беручи до уваги тенденцію до її незначного зростання у гіпокампі.

У корі півкуль головного мозку дослідної групи спостерігали вірогідне зниження активності СОД на 43,4 % ( $P<0,05$ ) порівняно до контролю. Найсуттєвіше зниження активності цього ензиму було виявлене у мозочку – у 2,8 рази ( $P<0,05$ ) і у гіпокампі – у 2,3 рази ( $P<0,01$ ) відносно контрольних значень. Також спостерігали зниження активності ГПО у півкулях головного мозку – у 2,1 рази ( $P<0,01$ ), мозочку – на 81,8 % ( $P<0,01$ ), гіпокампі – на 67,1 % ( $P<0,01$ ) порівняно з контролем. У свою чергу, вміст ТБК-активних продуктів зростав у корі півкуль на 29,9 % ( $P<0,05$ ), мозочку – на 42,1 % ( $P<0,05$ ) та гіпокампі – на 54,9 % ( $P<0,01$ ).

Загалом, при хронічній інтоксикації ХПФ показники АОС досліджуваних ділянок головного мозку можна розташувати у такому порядку спадання чутливості: гіпокамп, мозочок і кора великих півкуль. Пероральне щоденне введення щурам ХПФ дозі 15 мг/кг маси тіла протягом одного місяця призводило до зниження активностей СОД і ГП та одночасно до зростання концентрації ТБК-активних продуктів у тканинах великих півкуль, мозочка і гіпокампу. Отримані результати підтверджують виникнення оксидативного стресу у тканинах головного мозку тварин, які зазнавали хронічної інтоксикації ХПФ.

**Вплив хронічної дермальної інтоксикації ХПФ на глутатионову систему та вміст продуктів ПОЛ у різних органах щурів.** ГПО каталізує відновлення  $H_2O_2$ , або органічних гідропероксидів за допомогою глутатіону і внаслідок цього захищає клітини та організм у цілому від негативної дії АФО. У наших експериментах (табл. 1) хронічне отруєння щурів ХПФ при його дермальному надходженні викликало зниження активності даного ензиму у тварин першої та другої дослідних груп, відповідно у тканинах нирки – на 26,1 та 41 % ( $P<0,05$ ), печінки – на 23,4 та 52,6 % ( $P<0,05$ ) у порівнянні до щурів контрольної групи.

Таблиця 1

**Активність ГПО (нмоль ГВ/ хв на 1 мг протеїну) у тканинах різних органів щурів за хронічної дермальної дії ХПФ ( $M\pm m$ ,  $n=10$ ),**

Досліджувані органи	Групи тварин		
	к	д1	д2
Нирка	40,12±2,50	31,8±1,99*	28,45±3,71*
Легеня	82,70±3,53	71,10±2,82*	78,62±3,19
Селезінка	14,43±1,61	13,09±1,62	15,42±2,35
Міокард	40,80±3,41	42,8±3,46	50,8±4,73*
Печінка	53,72±1,78	43,52±2,64*	35,19±2,40*
Мозок	46,34±1,32	45,83±5,12	40,45±3,54

Активність ГПО була нижчою у тканинах легені тварин першої дослідної групи на 16,3 % ( $P<0,05$ ) порівняно до контролю. Водночас, у тканинах міокарда тварин другої дослідної групи мало місце незначне зростання активності ГПО

порівняно до контролю. У свою чергу, у тканинах селезінки та мозку всіх груп статистично вірогідних змін активності ГПО не було.

У тканинах селезінки, міокарда і мозку тварин обох дослідних груп ГР-активність практично не відрізнялась від контролю. Тенденцію до незначного зниження ГР-активності спостерігали у тканинах легені обох дослідних груп відносно контролю. Що стосується вмісту відновленого глутатіону, то він був вірогідно нижчим лише у тканинах печінки тварин першої та другої дослідних груп: відповідно на 48,8 та 57,8 % ( $P < 0,05$ ), відносно контрольної. На противагу цьому – у досліджених гомогенатах тканин нирки, легені, селезінки, міокарда і мозку усіх груп, змін у вмісті ГВ виявлено не було. Як показали результати досліджень, вміст гідропероксидів ліпідів був вірогідно вищим у тварин першої та другої дослідних груп у тканинах печінки – відповідно на 61,7 та 78,7 % ( $P < 0,05$ ) і тканинах мозку – відповідно на 98,7 та 91,5 % ( $P < 0,05$ ), порівняно з контролем. Також слід зазначити зростання вмісту даного показника у тканинах нирки тварин першої дослідної групи.

Встановлено, що за хронічної дії ХПФ на організм щурів у переважній більшості їх тканин знижується активність системи антиоксидантного захисту, що виражається, зокрема, у зменшенні активності СОД (табл. 2). Активність СОД після одномісячної дермальної інтоксикації досліджуваних тварин ХПФ була вірогідно нижчою у тканинах міокарда тварин першої та другої дослідних груп – відповідно на 43,5 та 58,8 % ( $P < 0,05$ ), печінки – на 40,94 та 127 % ( $P < 0,05$ ), мозку – на 45 та 52,4 % ( $P < 0,05$ ), порівняно до контрольної групи.

Таблиця 2

**Активність СОД (ум. од./мг протеїну) у тканинах різних органів щурів за хронічної дермальної дії ХПФ ( $M \pm m$ ,  $n=10$ ).**

Досліджувані органи	Групи тварин		
	к	д1	д2
Нирка	5,30±0,17	4,91±0,24	3,35±0,23*
Легеня	11,47±0,84	12,80±1,41	10,04±0,59*
Селезінка	3,40±0,61	2,78±0,28	2,28±0,09
Міокард	4,75±0,58	3,31±0,29*	2,99±0,54*
Печінка	10,94±1,03	7,76±1,08*	4,80±0,74*
Мозок	10,76±1,32	7,42±0,67*	7,06±1,02*

Виявлено зниження активності КАТ у тканинах мозку щурів двох дослідних груп – відповідно на 51,3 та 69 % ( $P < 0,05$ ) у порівнянні до контролю (табл. 3). Очевидно, зниження активності КАТ тканинах мозку слід розглядати в тому числі і, як наслідок деструктивної дії ХПФ на мембрани нейронів. Суттєві зміни саме у мозку, можна пов'язати з більш інтенсивним споживанням ним кисню, порівняно з іншими органами, а мембрани нервових клітин, як вже було зазначено раніше, багаті на поліненасичені жирні кислоти, які можуть виступати субстратами для ПОЛ. Мало місце також вірогідне зниження ензиматичної активності КАТ у тканинах нирки та печінки тварин другої дослідної групи: на 19,1 та 25,6 % ( $P < 0,05$ ) відповідно, порівняно до контролю.

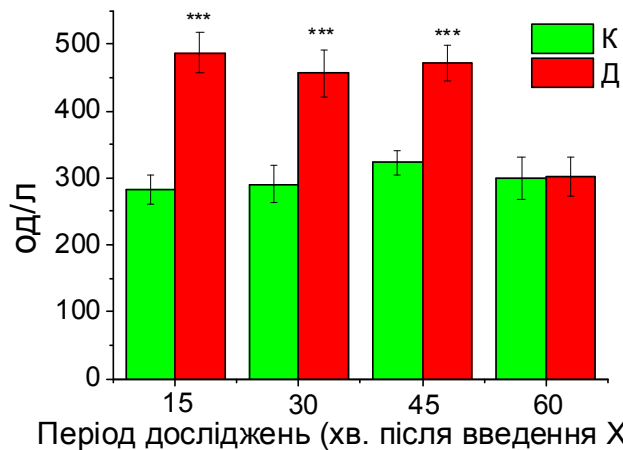
**Активність КАТ (мкмоль/хв•мг протеїну) у тканинах різних органів щурів за хронічної дермальної дії ХПФ ( $M \pm m$ ,  $n=10$ ).**

Досліджуваний орган	Групи тварин		
	к	д1	д2
Нирка	11,89 ±0,88	10,70±0,43	9,98±0,22*
Легеня	16,21±1,14	17,36±1,03	14,06±1,52
Селезінка	8,60±0,61	8,10±0,60	10,62±0,87*
Міокард	12,61±1,19	13,39±0,61	14,62±1,91
Печінка	10,97±0,37	10,00±0,32	8,74±0,21*
Мозок	6,60±0,39	4,36±0,57*	3,93±0,48*

В інших органах, зокрема, селезінці та міокарді спостерігали протилежні зміни, а саме – зростання активності КАТ у тварин другої дослідної групи, порівняно до контролю. Можна припустити, що таке підвищення є результатом компенсаторно-захисних механізмів у відповідь на інтенсифікацію вільнорадикальних процесів.

**Вплив гострої інтоксикації ХПФ у дозі 50 мг/кг на біохімічні показники крові та тканин різних органів щурів через 15, 30, 45 і 60 хв після введення препарату.** В усіх препаратах крові дослідних груп зафіксоване вірогідне зниження активності БХЕ порівняно з контрольними групами інтактних тварин, а саме: на 42,5 % ( $P<0,01$ ) – через 15хв., на 65,5 % ( $P<0,001$ ) – через 30 хв., на 81,1 % ( $P<0,001$ ) – через 45хв. і на 54,6 % ( $P<0,01$ ) – через 60 хв. після введення ксенобіотика Отже, протягом перших 45 хв. після отруєння мало місце різке, зниження активності БХЕ, яке носило практично лінійний характер. Встановлено, що активність ЛФ (рис. 12) у плазмі крові щурів дослідної групи зростала майже вдвічі ( $P<0,001$ ) порівняно до контролю через 15, 30 і 45 хв. після введення ХПФ.

Крім того було встановлено, що гостре отруєння щурів ХПФ, яке було викликане одноразовим введенням цієї сполуки у дозі 50 мг/кг маси тіла, впродовж першої години після інтоксикації призводить до тканинно-залежних і часозалежних змін ряду біохімічних показників, зокрема тих, які характеризують процеси ПОЛ, стан АОС, оксидативний стрес, мікроелементний статус. Інтоксикація тварин ХПФ у дозі 50 мк/кг призводила до зростання у тварин дослідної групи вмісту Магнію у тканинах нирки на 73,6 % ( $P \leq 0,01$ ), міокарду – на 38,2 % ( $P \leq 0,01$ ); зростання вмісту Мангану у тканинах



**Рис. 12. Активність лужної фосфатази в плазмі крові щурів через 15, 30, 45 і 60 хв після введення їм ХПФ у дозі 50 мг/кг, ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )**

легені на 33,5 % ( $P \leq 0,05$ ), міокарду – на 15,9 % ( $P \leq 0,05$ ), мозку – на 35,4 % ( $P \leq 0,05$ ) та зниження вмісту цього



мікроелемента у м'язі на 54 % ( $p \leq 0,001$ ); зростання вмісту Цинку у тканинах нирки – на 34,8 % ( $P \leq 0,05$ ), мозку – на 38,4 % ( $P \leq 0,05$ ) та його зниження у м'язі на 69,3 % ( $P \leq 0,001$ ); зниження вмісту Купруму у тканинах печінки на 31,8 % ( $P \leq 0,01$ ) та зростання його вмісту у м'язовій тканині на 50 % ( $P \leq 0,001$ ); зниження вмісту Кобальту у тканинах нирки на 59,3 % ( $P \leq 0,001$ ), печінки – на 20,5 % ( $P \leq 0,05$ ), легені – на 37,1 % ( $P \leq 0,01$ ), м'язовій тканині – на 29,6 % ( $P \leq 0,05$ ).

**Дослідження токсичної дії ХПФ на нейрони гіпокампу за умов культури клітин.** Було розроблено і апробовано експериментальну схему (Рис. 13), згідно якої спочатку отримували первинну культуру гіпокампіальних клітин, джерелом якої були нейрони виділені з гіпокампів ембріонів щурів 18-добового віку.

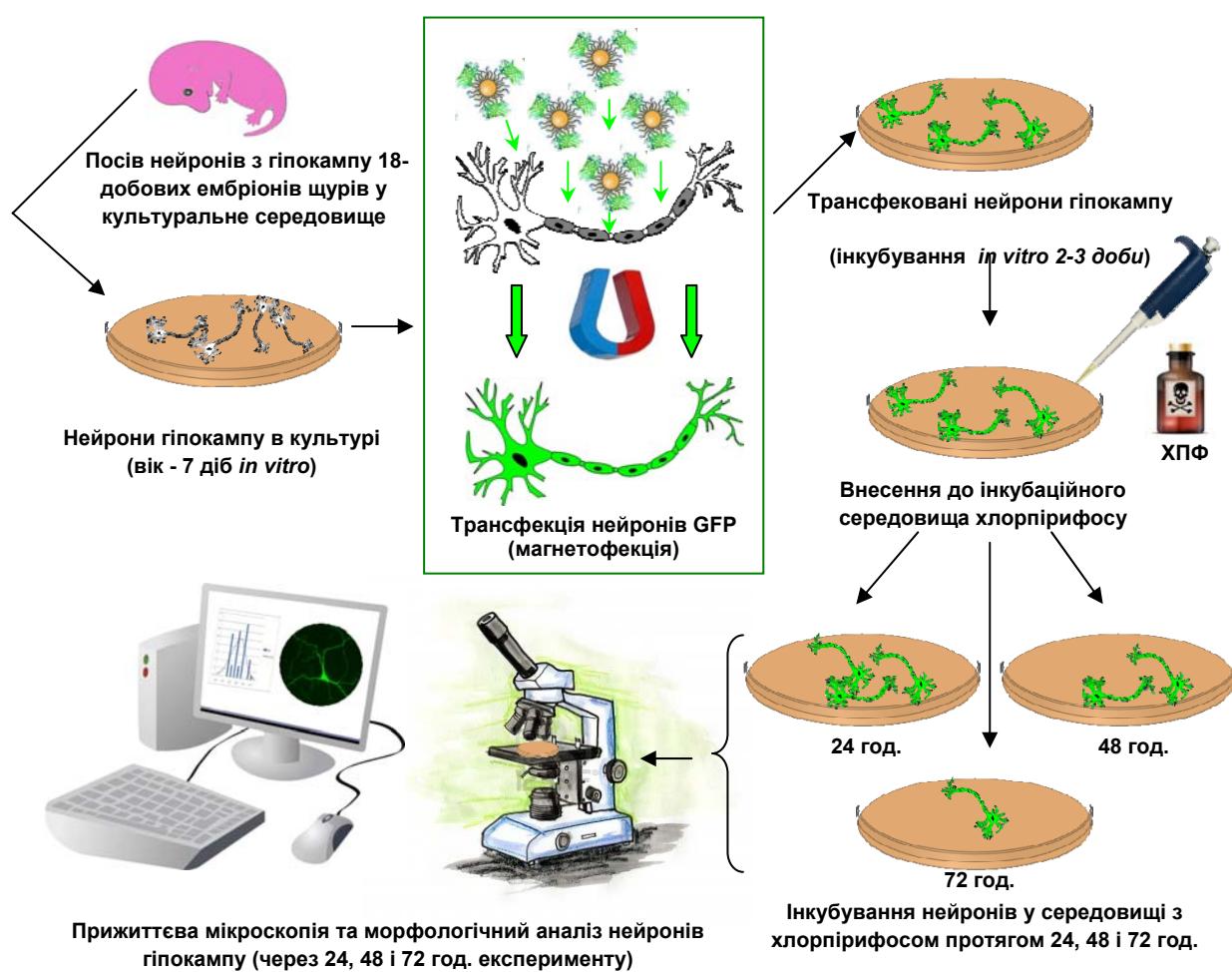


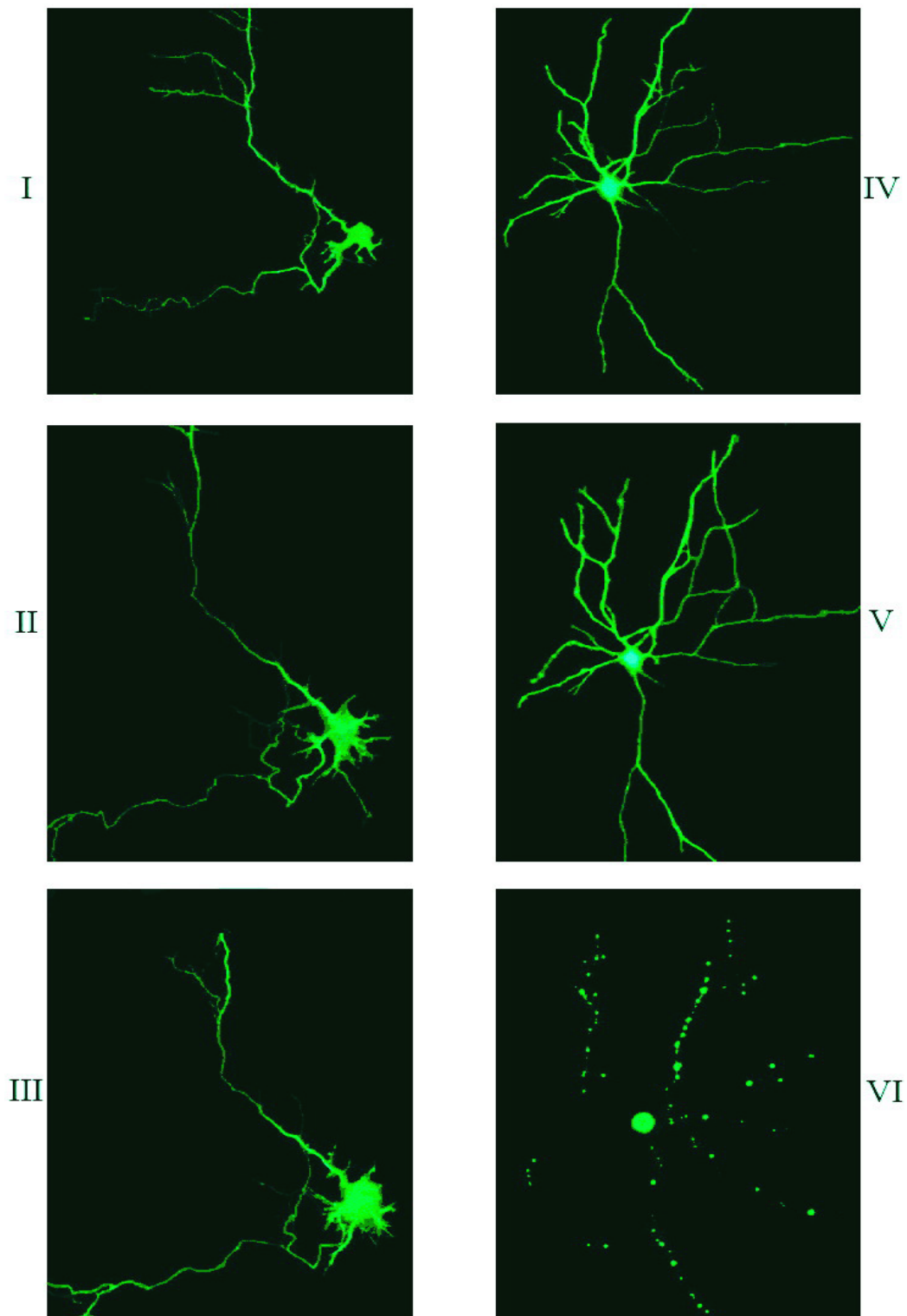
Рис. 13. Схема експериментів *in vitro* з дослідження нейротоксичного впливу хлорпірифосу на нейрони гіпокаму щурів.

Для наступної візуалізації нейронів, культивовану культуру клітин гіпокампу, вік яких становив 7 діб *in vitro* (DIV), трансфекували із використанням зеленого флуоресцентного протеїну (GFP). Для введення у нервові клітини гіпокампу GFP ми застосували магнетофекцію – вискоєфективний метод трансфекції, що дозволяє з використанням магнітного поля здійснювати

перенесення наночастинок з асоційованими на них нуклеїновими кислотами в клітини-мішені. Серед низки інших можливостей цей метод було обрано тому, що він володіє рядом переваг над аналогічними біохімічними і фізичними способами трансфекції, а головне – на відміну від вище перерахованих є нетоксичним, що вкрай важливо для нашої роботи. Через 2-3 доби після трансфекції клітин в інкубаційне середовище дослідних культур додавали ХПФ у різних концентраціях, або інші досліджувані чинники, наприклад, Тролокс. Тоді дослідні та контрольні культури інкубували ще впродовж 1-3 діб, і протягом цього періоду здійснювали контроль їх виживання, росту і розвитку методом прижиттєвої люмінесцентної мікроскопії.

Клітини інкубували у стандартних умовах і через 3 доби після трансфекції, з метою виявлення цитотоксичного ефекту та його дозозалежності, у культуральне середовище вносили ХПФ у концентраціях 5, 15 і 30 мкМ і продовжували культивування клітин ще протягом трьох наступних діб. Впродовж цього періоду, а саме – через 24, 48 і 72 години здійснювали підрахунок живих клітин при кожних експериментальних умовах, а також проводили флуоресцентне мікроскопування вибраних нейронів у вказані проміжки часу. Наголосимо, що проводили візуалізацію та аналіз одних і тих самих нервових клітин щоразу, що дозволяє прослідковувати зміни їх морфологічних параметрів у віковій динаміці. Культури з низьким рівнем трансфекції (<10 нейронів на покривне скельце) в експериментах не застосовували, отримували і аналізували зображення одних і тих же 20-30 трансфєкованих нейронів за кожних окремих умов експерименту, знаходячи їх щоразу за системою координат. На рис. 14 показано один з таких прикладів. Добре видно, що в контролі, тобто, за відсутності у середовищі хлорпірифосу (мікрофото I, II і III) нервова клітина нормально живе і розвивається протягом усього дослідного періоду, зелений флуоресцентний протеїн розміщений у сомі, аксоні, дендритах нейрону рівномірно. На відміну від неї, нейрон, який інкубувався у середовищі з додаванням 15 мкМ хлорпірифосу (мікрофото IV, V і VI), має зовсім інший вигляд, розміщення GFP у тілі нейроцита і його відростках кластеризоване. За таких умов під дією токсиканта відбуваються інтенсивні нейродегенеративні процеси. Через 48 годин інкубації з ХПФ (мікрофото V) спостерігається чітко виражена інтенсивна вакуолізація його аксона та дендритів, що свідчить про наступний лізис клітини і, як наслідок – її загибель, яка була в даному випадку констатована нами на 72 год. після внесення ХПФ до культурального середовища (мікрофото VI).

У наступній частині роботи було перевірено зв'язок з пошкодженням нервових клітин та їх загибеллю *in vitro* за дії ХПФ і оксидативним стресом. У попередніх дослідженнях нейротоксичності ХПФ на культурах первинних нейронів гіпокампу, як вже було описано вище, ми застосовували внесення токсиканта у культуральне середовище у дозах від 1 до 30 мкМ. У наступній частині роботи ми вирішили розширити діапазон концентрацій ХПФ до 100 мкМ.

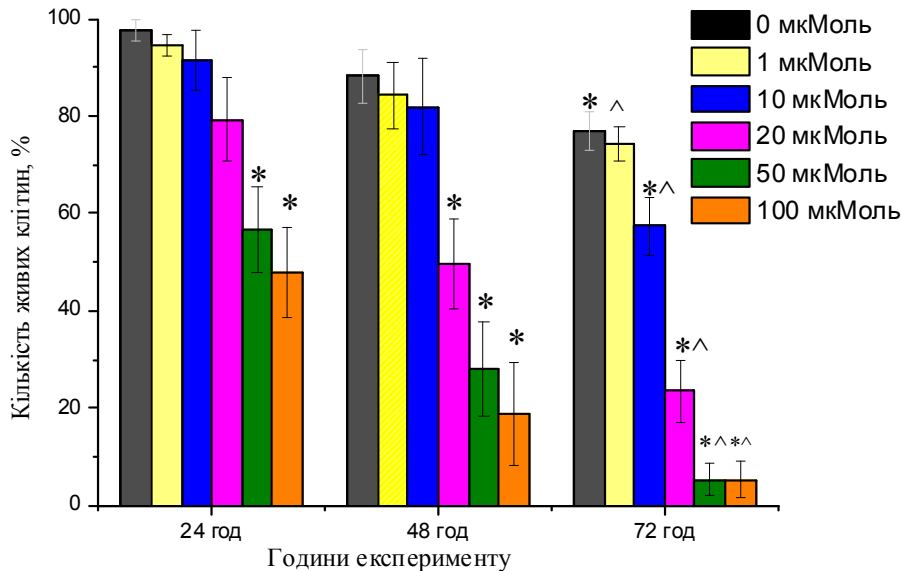


**Рис. 14. Виживання нейронів трансфєкованих зеленим флуоресцентним протеїном у культурах без додавання ХПФ (I, II, III) і аналогічних умовах, але з додаванням у культуральне середовище 15 мкМ ХПФ (IV, V, VI).**

Примітка. I, II, III і IV, V, VI — зображення одних і тих же нейронів, через 24 (I, IV), 48 (II, V) і 72 (III, VI) години після початку експерименту.

Отже, спочатку за аналогією із попередніми серіями дослідів, порівнювали вплив різних концентрацій ХПФ на ріст і виживання нейронів гіпокампу за умов *in vitro*. З цією метою культури клітин гіпокампу, вік яких становив 7 діб *in vitro*

(DIV), трансфекували із використанням GFP для візуалізації морфології нейронів. Через 3 доби після трансфекції клітин в інкубаційне середовище додавали ХПФ у наступному діапазоні концентрацій: 1, 10, 20, 50 і 100 мкМ. Після цього протягом 3 діб підряд отримували флуоресцентні зображення одних і тих же нейронів, що дозволило проводити аналіз їх морфологічних змін і рівня виживання. Дія ХПФ на культури нейронів гіпокампу щурів протягом 24, 48 і 72 годин, починаючи з 3-ої доби після трансфекції викликала значний нейротоксичний ефект (Рис. 15).



**Рис. 15. Виживання нейронів протягом 72 годин експерименту за умов культури клітин при внесенні в інкубаційне середовище ХПФ у концентраціях від 1 до 100 мкМ.**

Примітка. У цьому та наступному рис.:\* - порівняно до 0 мкМ дози ХПФ, ^ - порівняно до першої доби експерименту (24 год.),  $P < 0,05$ .

Підсумовуючи результати отримані в цій частині роботи, ми стверджуємо, що ХПФ призводить до ушкодження та загибелі нейронів гіпокампу за умов *in vitro*. Встановлено відмінності у показниках життєздатності нейронів залежно від концентрації ХПФ у середовищі.

Для перевірки гіпотези про те, що індукована ХПФ нейротоксичність може бути викликана оксидативним стресом, який цією сполукою індукується, ми вирішили порівняти, як нейрони гіпокампу ростимуть в інкубаційному середовищі з внесенням тільки ХПФ, і в тих же умовах, але ще з додаванням антиоксидантного фактора. У якості останнього ми обрали Тролокс – торгова назва французької компанії Hoffman-La Roche's для 6-гідрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбонової кислоти, водорозчинного аналога вітаміну Е. Цей антиоксидант, як і вітамін Е, використовується в ролі біохімічних додатків для зниження впливу оксидативного стресу і порушень, які він може викликати. У результаті було встановлено нейропротекторну дію Тролокса протягом усього періоду експерименту (рис. 16). Через 72 години за всіх досліджуваних концентрацій ХПФ в інкубаційному середовищі, спостерігали статистично вірогідні різниці в кількості живих клітин, які інкубували з додаванням Тролокса і

без нього. Найбільш істотний вплив Тролокса спостерігали за умов, коли в інкубаційне середовище ХПФ був внесений у концентраціях: 20, 50 і 100 мкМ. За умов 50 і 100 мкМ концентрації ХПФ у середовищі статистично вірогідні ( $P < 0,05$ ) зміни у кількості живих клітин мали місце через 48 і 72 години дослідного періоду.

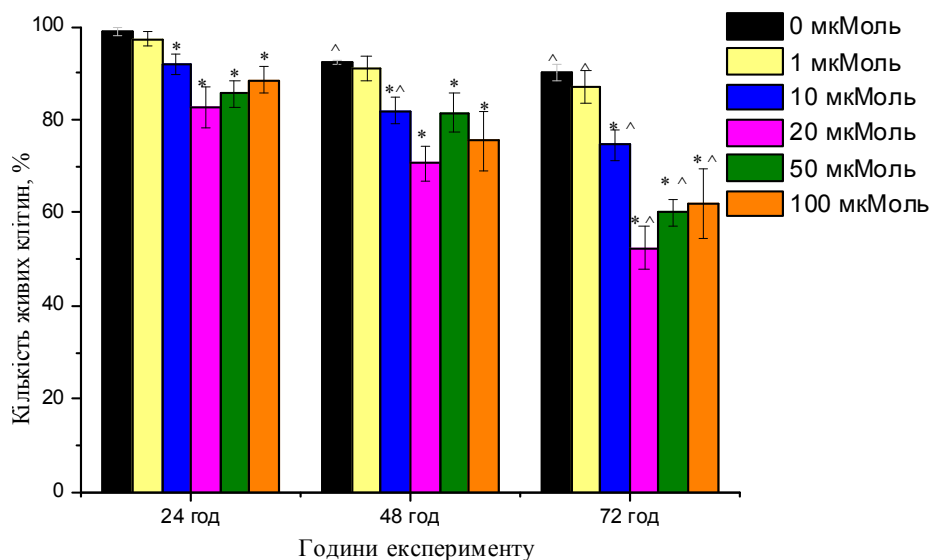


Рис. 16. Вживання нейронів протягом 72 годин експерименту за умов культури клітин при одночасному внесенні у інкубаційне середовище ХПФ у концентраціях від 1 до 100 мкМ і Тролокса у концентрації 100 мкМ.

Загалом, додавання до інкубаційного середовища 100 мкМ Тролокса за всіх умов експерименту забезпечувало виживання понад 60 % нейронів гіпокампу навіть через 72 години досліду. Цікаво, що ХПФ у дозі 20 мкМ проявляв сильніший цитотоксичний ефект у порівнянні з усіма іншими. Це дозволяє говорити про відсутність прямо пропорційної залежності між концентрацією ХПФ в інкубаційному середовищі і рівнем загибелі клітин, що ним викликається.

**Вплив хронічної інтоксикації карбофураном на біохімічні і нейрофізіологічні показники щурів.** З метою з'ясування наслідків хронічного впливу КФ на біохімічні і нейрофізіологічні параметри щурів було проведено ряд експериментів, зокрема досліджено вплив хронічної дії КФ у дозі 0,2 мг/кг на показники АОС у різних відділах головного мозку і вміст у них окремих металів. У табл. 4 представлені зміни активностей глутатіонзалежних ензимів у різних відділах головного мозку щурів за дії КФ. Так, активність ГПО зростала у тканинах кори півкуль на 22,2 % ( $P < 0,001$ ) порівняно з контролем.

Активність цього ензиму у мозочку та гіпокампі не зазнавала суттєвих змін. Вміст ГВ знижувався у тварин дослідної групи у тканинах гіпокампу та мозочку відповідно на 38,9 ( $P < 0,01$ ) та 18,7 % ( $P < 0,01$ ) порівняно до контролю. Активність ГТ була вищою у тканинах півкуль головного мозку та мозочку відповідно у 2,24 ( $P < 0,001$ ) та 2,05 рази ( $P < 0,01$ ) порівняно до контрольної групи. У даному експерименті не було виявлено вірогідних змін у ензиматичній активності ГР,

хоча спостерігали тенденцію до незначного зниження цього показника у тканинах всіх досліджуваних відділів головного мозку інтоксикованих КФ щурів.

Таблиця 4

**Активність глутатіонзалежних ензимів у різних відділах головного мозку щурів за хронічного впливу КФ у дозі 0,2 мг/кг, (M±m, n=5)**

Відділи головного мозку	Групи тварин	ГПО, нМоль/хв·мг протеїну	ГТ, мкМоль/хв·мг протеїну	ГР, мкМольNADPH/хв·мг протеїну	ГВ, ммоль/л
Гіпокамп	К	50,23±2,45	0,34± 0,02	1,41±0,46	0,054 ± 0,006
	Д	50,61±1,93	0,30± 0,05	1,35±0,24	0,033± 0,002**
Кора півкуль	К	39,71±1,15	0,33± 0,04	1,73±0,12	0,076± 0,005
	Д	48,52±1,87***	0,74± 0,06***	1,61±0,57	0,080± 0,004
Мозочок	К	44,65±2,06	0,21± 0,03	1,62±0,21	0,064± 0,002
	Д	49,16±1,57	0,43± 0,05**	1,60±0,18	0,052± 0,003**

У мозочку тварин дослідної групи спостерігали підвищення активності СОД та КАТ у 2,84 (P<0,05) та у 1,36 рази (P<0,05) відносно контрольної групи (табл. 3.109). Водночас, у тканинах гіпокампу активність СОД знижувалась у 4,21 рази (P<0,01) порівняно до контролю.

Таблиця 5

**Активність СОД і КАТ у різних відділах головного мозку щурів за хронічного впливу КФ у дозі 0,2 мг/кг, (M±m, n=5)**

Відділи головного мозку	Групи тварин	СОД, ум.од./ мг протеїну	Каталаза, мкМоль/хв·мг протеїну
Гіпокамп	К	7,25 ± 0,68	3,99 ± 0,47
	Д	1,72 ± 0,35**	4,16 ± 0,23
Кора півкуль	К	0,23 ± 0,09	5,69 ± 0,68
	Д	1,61 ± 0,28	6,77 ± 0,71
Мозочок	К	0,50 ± 0,06**	6,64 ± 0,51
	Д	1,42 ± 0,13	9,04 ± 0,83*

Дослідження вмісту низки металів у різних відділах головного мозку щурів під дією КФ у дозі 0,2 мг/кг показали вірогідне підвищення концентрації Феруму у гіпокампі на 20 % (P≤0,001), а в тканинах мозочку – на 33 % (P≤0,001), тоді як у корі головного мозку різниць у вмісті досліджуваного елемента встановлено не було. Інтоксикація КФ не впливала на вміст Кобальту у різних відділах головного мозку щурів. Встановлено суттєве зниження вмісту Цинку в корі головного мозку на 31 % (P≤0,001), та мозочку – на 46,5 % (P≤0,001). На противагу цьому – у гіпокампі концентрація Цинку зростала на 12,5 % (P≤0,001) у тварин дослідної групи, порівняно до контрольної. Інтоксикація щурів КФ суттєво впливала на вміст Мангану у досліджуваних відділах головного мозку. Зокрема, концентрація цього елемента знижувалась у корі головного мозку на 42,8 % (P≤0,01), у мозочку на

45,5 % ( $P \leq 0,01$ ), а найбільше зниження виявлено у гіпокампі – на 49,2 % ( $P \leq 0,001$ ). Спостерігали суттєве зниження вмісту Купруму у тканині кори головного мозку – на 57,4 % ( $P \leq 0,001$ ) та мозочку – на 61,5 % ( $P \leq 0,001$ ). Цікаво, що водночас у тканинах гіпокампа, вірогідних різниць у концентрації Купруму між дослідною і контрольною групами встановлено не було. З отриманих даних видно, що карбофуран впливав на концентрацію більшості досліджуваних елементів (крім Кобальту) у різних відділах головного мозку тварин.

У дослідженні впливу хронічної інтоксикації КФ у дозах 0,1 мг/кг і 0,2 мг/кг на функціонування нервової системи у щурів за допомогою тестів: відкритого поля, екстраполяційного позбавлення, водного лабіринту Моріса, темно-світлої камери було виявлено ряд статистично вірогідних відмінностей між поведінковими параметрами дослідних груп щурів, що зазнали впливу пестициду КФ, та інтактних тварин контрольної групи.

Отже, отримані у дисертації результати дозволяють сформувати фундаментальні уявлення про фізіолого-біохімічні особливості впливу на організм щурів хлорпірифосу і карбофурану на різних рівнях організації – від окремої клітин до цілісного організму. Запропоновано вдосконалену і доповнену комплексну схему (рис.17) фізіолого-біохімічного механізму токсичності ХПФ і КФ, який не обмежується загальновідомою антихолінестеразною дією, а є також тісно взаємозв'язаний із явищем оксидативного стресу, а також обміном біологічно активних металів у тканинах організму. З'ясовано особливості

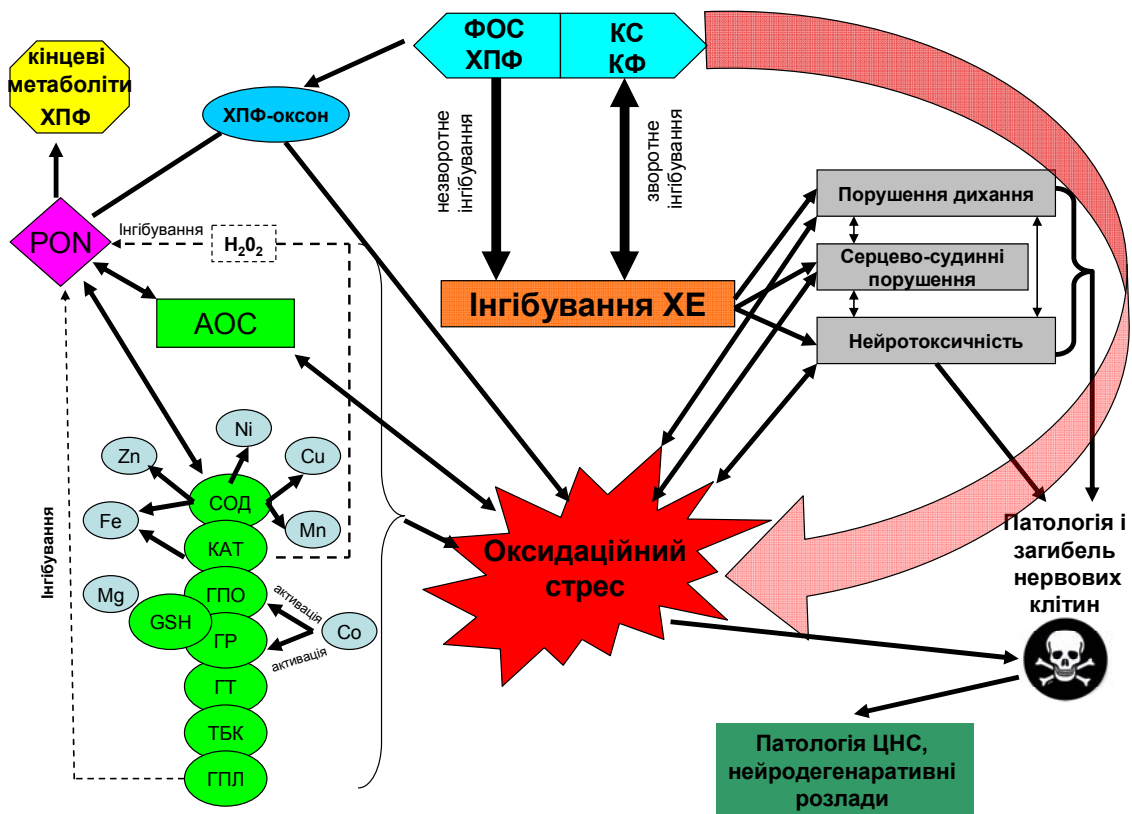


Рис.17. Схема біохімічних механізмів токсичності ХПФ

протікання вільнорадикальних процесів, стану системи антиоксидантного захисту, показники мінерального обміну у різних органах та окремих відділах головного мозку щурів за умов гострої або хронічної інтоксикації тварин досліджуваними ксенобіотиками.

### **Висновки**

У дисертації представлено нові дані про біохімічні і нейрофізіологічні механізми впливу на організм щурів хлорпірифосу та карбофурану. Вирішення цієї проблеми здійснено шляхом вивчення механізмів їх токсичної дії на різних рівнях організації – від окремої клітини (за умов первинної культури нейронів) до цілісного організму. Запропоновано комплексну схему біохімічного механізму токсичності ХПФ, який не обмежується загальновідомою антихолінестеразною дією, а є також тісно взаємозв'язаний із оксидативним стресом. З'ясовано особливості протікання вільнорадикальних процесів, стан системи антиоксидантного захисту, показники мінерального обміну у різних органах та окремих відділах головного мозку щурів за гострої або хронічної інтоксикації тварин досліджуваними ксенобіотиками.

1. Вплив гострої інтоксикації щурів хлорпірифосом у дозі 30 мг/кг на біохімічні показники їх крові через 1, 3, 6, 10 діб після введення препарату в організм проявляється зниженням активності бутирилхолінестерази у сироватці крові, зростанням активності лужної фосфатази у плазмі крові на 1-шу добу і зниженням на 6-ту та 10-ту доби; підвищенням активності аспартатаміно-трансферази і аланінамінотрансферази на 1-шу, 3-тю та 6-ту доби експерименту.

2. Гостра інтоксикація щурів хлорпірифосом у дозі 30 мг/кг призводить до тканинно-залежної і часозалежної активації процесів пероксидного окиснення ліпідів, що супроводжується нагромадженням продуктів ліпопероксидації та активних форм кисню. В еритроцитах дослідної групи виявлено зниження вмісту глутатіону відновленого у всі періоди дослідження; зниження активності глутатіонпероксидази, глутатіонредуктази та супероксиддисмутази; зростання вмісту ТБК-активних продуктів протягом всього періоду досліджень, вмісту гідропероксидів ліпідів на 1-шу та 3-тю доби після введення хлорпірифосу. Вказані зміни свідчать про дефіцит ресурсів антиоксидантної системи і виникнення оксидативного стресу після інтоксикації організму хлорпірифосом.

3. Гостра інтоксикація щурів хлорпірифосом у дозах 15 і 30 мг/кг призводить до пригнічення функціонального стану системи антиоксидантного захисту у окремих відділах головного мозку, що виражається у вірогідному зниженні активності супероксиддисмутази у корі півкуль головного мозку; зниженні каталазної активності у гіпокампі, мозочку і корі великих півкуль; зниженні активності глутатіонпероксидази у гіпокампі, мозочку і у корі півкуль головного мозку; у зниженні вмісту глутатіону відновленого у гіпокампі та півкулях головного мозку.

4. У тканинах мозку та печінки має місце вірогідне зростання активності глутатіонпероксидази на 1-шу добу дії хлорпірифосу та зниження цього показника у подальші періоди дослідження. Встановлено суттєве зниження



активності глутіонредуктази та вмісту глутатіону відновленого у тканинах печінки протягом усього періоду експерименту та у тканинах мозку на 10-ту добу дії хлорпірифосу. Виявлено вірогідно вищий вміст глутатіону відновленого у тканинах мозку тварин дослідної групи на 1-шу добу дослідження з подальшим зниженням його на 6-ту добу, порівняно до тварин контрольної групи.

5. Гостра інтоксикація хлорпірифосом у дозі 50 мг/кг призводить до до тканинно-залежної і часозалежної активації процесів пероксидного окиснення ліпідів, що супроводжується нагромадженням продуктів ліпопероксидації та активних форм кисню. Це, зокрема проявляється у зростанні вмісту ТБК-активних продуктів та гідропероксидів ліпідів у різних органах тварин дослідної групи, зростанні активності глутатіонпероксидази у тканинах печінки, нирки, міокарду, мозочка та гіпокампу, зростанні активності глутатіонтрансферази практично у всіх досліджуваних органах.

6. Хронічний вплив хлорпірифосу у дозі 15 мг/кг на показники антиоксидантної системи у всіх досліджуваних відділах головного мозку щурів викликає статистично вірогідне зниження активності супероксиддисмутази і глутатіонпероксидази та одночасне зростання концентрації ТБК-активних продуктів.

7. Хронічна дермальна інтоксикація щурів хлорпірифосом протягом одного місяця має інгібувальний вплив на антиоксидантну систему організму, що виражається у зниженні активностей її ключових ензимів – супероксиддисмутази і каталази у тканинах нирки, легені, серця, печінки і головного мозку, порівняно з контролем; зниженні активностей супероксиддисмутази і глутатіонпероксидази, зростання вмісту малонового діальдегіду і гідропероксидів ліпідів у гемолізатах еритроцитів дослідних щурів.

8. Встановлено тканинно-залежні та залежні від періоду досліджень закономірності вмісту Купруму, Мангану, Цинку, Феруму, Магнію, Кобальту і Нікелю, а також їх кореляційні зв'язки залежно від тканини, а також кореляції між вмістом перерахованих елементів і показниками антиоксидантної системи, що свідчить про наявність взаємозв'язків між концентраціями у тканинах окремих металів і функціонуванням системи антиоксидантного захисту.

9. У тварин, які одержували хлорпірифос у дозі 30 мг/кг та 50 мг/кг при гострій і хронічній інтоксикації, виявлені статистично достовірні відмінності у поведінці щурів дослідних і контрольних груп. Через добу після введення хлорпірифосу у тварин різко знизилася периферична горизонтальна рухова активність; встановлено, що хлорпірифос чинить негативний вплив на механізми просторової орієнтації та спричиняє порушення довготривалої пам'яті. У щурів дослідних груп одразу після введення хлорпірифосу має місце вірогідне зростання тривожності, порівняно з контролем. Зміни поведінкових параметрів тварин свідчать про порушення нормального функціонування центральної нервової системи щурів під впливом хлорпірифосу.

10. Хронічна інтоксикація карбофураном у дозах 0,1 мг/кг і 0,2 мг/кг викликає порушення у функціональному стані нервової системи тварин, що було

виражено у негативних змінах їх когнітивних особливостей, погіршення короткотривалої і довготривалої пам'яті, зростання тривожності.

11. За хронічного впливу карбофурану у дозах 0,1 мг/кг і 0,2 мг/кг змінювалися показники антиоксидантної системи у всіх досліджуваних відділах головного мозку щурів, зокрема карбофуран викликає статистично вірогідне зниження вмісту глутатіону відновленого у тканинах гіпокампу та мозочка і зростання активності глутатіонтрансферази у тканинах кори півкуль та мозочка.

12. Механізми хлорпірифос-індукованої нейротоксичності безпосередньо пов'язані із оксидативним стресом, що викликається даною сполукою. Хлорпірифос викликає дозозалежне ушкодження та, як наслідок – загибель нейронів гіпокампу *in vitro*.

## СПИСОК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Лабораторні методи досліджень у біології, тваринництві та ветеринарній медицині: довідник / [Влізла В. В., Федорук Р. С., Ратич І. Б. .... Салига Ю. Т. та ін.]; за ред. В. В. Влізла. – Львів: Сполом, 2012. – 764 с. *(Здобувачем взято участь у написанні довідника та інтерпритації даних)*.

2. Салига Ю. Т. Потенційна нейротоксичність хлорпірифосу і способи її вивчення / Ю. Т. Салига // Медична хімія. – 2009. – Т. 11, № 4. – С. 69–72.

3. Салига Ю. Т. Токсичний вплив пестициду карбофурану на центральну нервову систему тварин / Ю. Т. Салига // Агроєкологічний журнал. – Спеціальний випуск, червень 2009. – С. 292–294.

4. Салига Ю. Т. Вплив хлорпірифосу на деякі показники антиоксидантної системи у різних відділах головного мозку щурів / Ю. Т. Салига // Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнології імені С. З. Гжицького. – Серія Біологічні науки. – 2010. – Т. 12, № 2. – С. 260–263.

5. Салига Ю. Т. Карбофуран – біологічні ризики його застосування / Ю. Т. Салига, В. В. Влізла // Біологія тварин. – 2010. – Т. 12, № 2. – С. 75–85. *(Здобувачем виконано експериментальні дослідження, їх узагальнено та написано статтю)*.

6. Salyha Y. Toxic effect of chlorpyrifos on hippocampal neurons in vitro / Y. Salyha // The Animal Biology. – 2010. – Vol. 12, № 1. – P. 163–168.

7. Salyha Y. Biological effects assessment of chlorpyrifos and some aspects of its neurotoxicity / Y. Salyha // Visnyk of Lviv University. – Biology series – 2010. – Is. 54. – P. 3–14.

8. Knocking-down of the KCC2 in rat hippocampal neurons increases intracellular chloride concentration and compromises neuronal survival / C. Pellegrino, O. Gubkina, M. Schaefer, H. Becq, A. Ludwig, M. Mukhtarov, I. Chudotvorova, S. Corby, Y. Salyha, S. Salozhin, P. Bregestovski, I. Medina // J. Physiol. – 2011. – V. 589, Is. 10. – P. 2475–2496. *(Здобувачем виконано експериментальні дослідження та взято участь у написанні статті)*.

9. Деякі показники антиоксидантної системи у еритроцитах щурів за умов хронічного впливу хлорпірифосу / **Ю.Т. Салига**, Н. І. Талоха, О. М. Стефанишин, З. І. Сав'як, Г. Р. Будзан // Медична хімія. – 2011. – Т. 13, № 4. – С. 103–106. *(Здобувачем виконано дослідження, їх узагальнено та написано статтю).*

10. **Салига Ю. Т.** Екстраполяційна поведінка щурів за хронічного впливу на них низьких доз хлорпірифосу / Ю. Т. Салига, Н. І. Талоха, О. М. Стефанишин // Біологія тварин. – 2011. – Т. 13, № 1–2. – С. 286–291. *(Здобувачем виконано експериментальні дослідження, їх узагальнено та написано статтю).*

11. Влізло В. В. Проблеми біологічної безпеки застосування пестицидів в Україні / В. В. Влізло, **Ю. Т. Салига** // Вісник аграрної науки. – 2011. – № 1. – С. 24–27. *(Здобувачем опрацьовано літературні дані написано статтю).*

12. **Салига Ю. Т.** До вивчення деяких параметрів системи антиоксидантного захисту та перекисного окиснення ліпідів у крові щурів за токсичної дії хлорпірифосу / Ю. Т. Салига, В. П. Росаловський // Український морфологічний альманах. – 2012. – Т. 10, № 3. – С. 94–95. *(Здобувачем виконано експериментальні дослідження, їх узагальнено та написано статтю).*

13. **Салига Ю. Т.** Поведінка щурів інтоксикованих хлорпірифосом у тесті “Відкрите поле” / Ю. Т. Салига // Таврійський медико-біологічний вісник. – 2012. – Т. 15, № 4. – С. 332–335.

14. **Salyha Yu.** Glutathione system in erythrocytes of rats intoxicated by chlorpyrifos / Yu. Salyha, V. Rosalovsky, R. Fedyakov // Visn. Lviv Univ. Biol. Ser. – 2012. – № 60. – P. 99–104. *(Здобувачем виконано експериментальні дослідження, їх узагальнено та написано статтю).*

15. **Салига Ю. Т.** Гістологія мозку та печінки щурів за хронічного впливу на них низьких доз хлорпірифосу / Ю. Т. Салига, Ю. В. Мартин // Біологія тварин. – 2012. – Т. 14, – № 1–2. – С. 563–567. *(Здобувачем виконано експериментальні дослідження, їх узагальнено та написано статтю).*

16. **Салига Ю. Т.** Зміни концентрацій Купруму, Цинку, Мангану і Феруму в різних відділах головного мозку щурів за інтоксикації карбофураном / Ю. Т. Салига // Науковий вісник Національного університету біоресурсів і природокористування України. – Серія Біологія, біотехнологія, екологія. – 2012. – Т. 178. – С. 153–158.

17. **Салига Ю. Т.** Глутатіонова система еритроцитів щурів інтоксикованих хлорпірифосом / Ю. Т. Салига, В. П. Росаловський, Р. О. Федяков // – Вісник Львівського університету – Серія біологічна – Вип. 60, – 2012. – С. 99–104. *(Здобувачем виконано експериментальні дослідження, їх узагальнено та написано статтю).*

18. **Салига Ю. Т.** Вміст Феруму та Купруму в тканинах різних органів щурів за інтоксикації хлорпірифосом / Ю. Т. Салига, Є. О. Дзень, І. В. Лучка // Біологія тварин. – 2013. – Т. 15, № 4. – С. 112–118. *(Здобувачем виконано експериментальні дослідження, їх узагальнено та написано статтю).*

19. **Салига Ю. Т.** Показники антиоксидантної системи у головному мозку щурів інтоксикованих хлорпірифосом / Ю. Т. Салига // Біологічні студії. – 2013. – Т. 7, № 3. – С. 85–96.

20. **Salyha Y.** Chlorpyrifos leads to oxidative stress-induced death of hippocampal cells in vitro / Y. Salyha // *Neurophysiology*. – 2013. – V.45, № 3. – P. 193–199.

21. **Салига Ю. Т.** Прижиттєве дослідження впливу хлорпірифосу на нейрони гіпокампу щурів за умов культури клітин / Ю. Т. Салига, В. В. Влізло // *Біологія тварин*. – 2013. – Т. 15, №1. – С. 108–118. *(Здобувачем виконано експериментальні дослідження, їх узагальнено та написано статтю).*

22. **Салига Ю. Т.** Вплив хлорпірифосу на глутатіонову систему та вміст продуктів пероксидного окиснення ліпідів у різних органах щурів / Ю. Т. Салига // *Біологія тварин*. – 2013. – Т. 15, № 2. – С. 122–130.

23. **Салига Ю. Т.** Нейротоксичність фосфорорганічних пестицидів: екологічні та медико-біологічні аспекти / Ю. Т. Салига, В. П. Росаловський, С. В. Грабовська // *Збірник наукових статей IV-го Всеукраїнського з'їзду екологів з міжнародною участю «Екологія – 2013»* – Вінниця, 2013. – С. 413–415. *(Здобувачем виконано дослідження, їх узагальнено та написано статтю).*

24. **Салига Ю. Т.** Супероксиддисмутазна і каталазна активність у тканинах щурів за хронічної інтоксикації хлорпірифосом / Ю. Т. Салига // *Вісник Запорізького національного університету. Біологічні науки* – 2013. – № 2 – С. 108. – 114.

25. Grabovskaya S. V. Do results of the open field test depend on the arena shape? / S. V. Grabovskaya, **Y. T. Salyha** // *Neurophysiology*. – 2014. – V. 46, №. 4. – P. 376–380. *(Здобувачем виконано експериментальні дослідження, їх узагальнено та написано статтю).*

26. Rosalovsky V. P. Changes in glutathione system and lipid peroxidation in rat blood during the first hour after chlorpyrifos exposure / V. Rosalovsky, S. Grabovska, **Y. Salyha** // *Ukr. Biochem. J.* – 2015. – V. 87, Is. 5. – P.124–132. *(Здобувачем виконано експериментальні дослідження, їх узагальнено та написано статтю).*

27. Grabovska S. Neurotoxic effects and other actual risks of chlorpyrifos / S. Grabovska, V. Rosalovsky, **Y. Salyha** // *Living organisms and bioanalytical approaches for detoxification and monitoring of toxic compounds*. – Rzesow, 2015. – P. 195–204. *(Здобувачем опрацьовано літературні дані написано статтю).*

28. **Салига Ю.** Влив хлорпірифосної інтоксикації на біохімічні та еритроцитарні параметри крові щурів. / Ю. Салига, В. Росаловський // *Вісник Львівського університету – Серія біологічна* – Вип. 71. – 2016 – С. 56–64. *(Здобувачем виконано експериментальні дослідження, їх узагальнено та написано статтю).*

29. Пат. 85700 Україна, МПК А61В 10/00 G01N 33/533. Спосіб визначення нейротоксичності хлорпірифосу за умов культури нервових клітин / **Салига Ю. Т.**, Влізло В. В.; Власник Інститут біології тварин НААН. – № u 201307402 ; заявл. 11.06.2011; опубл. 25.11.2013, Бюл. № 22.

30. Нейрохімічний профіль різних відділів головного мозку щурів та його вікові особливості / **Ю. Т. Салига**, З. Я. Стражник, Г. Г. Денис, Ю. Р. Олійник, А. В. Скорохід // *IV з'їзд Українського біофізичного товариства: тези доповідей* – Донецьк, 2006. – С. 226–227. *(Здобувачем здійснено планування експериментів, узагальнено результати експериментальних досліджень, написано тези).*

31. **Salyha Y.** Age-dependent changes in metal levels of rat brain / Y. Salyha, Z. Strazhnyk, R. Koval' // Neuronal excitability: from molecular level to system: 2nd Int. Conf. of the National neuroscience soc. of Romania, 2006.: Abstract book – Bucharest, 2006. – P. 70. *(Здобувачем сплановано експериментальні дослідження, узагальнено результати та написано тези).*

32. **Салыга Ю. Т.** Токсическое действие пестицида карбофурана на центральную нервную систему животных / Ю. Т. Салыга // Биоэкология и ресурсосбережение: VIII междунар. науч.-практ. конф., 2009 г.: – тезисы докл. – Витебск, 2009. – С. 141.

33. **Салига Ю. Т.** Дослідження нейротоксичної дії пестицидів на прикладі карбофурану / Ю. Т. Салига // Екологія. Людина. Суспільство: XII міжнар. наук.-практ. конф., 13–17 травня 2009 р.: тези доп. – Київ, 2009. – С. 30.

34. **Salyha Y.** Some biochemical changes in the brain of young rats subjected to Chlorpyrifos neurotoxicity / N. Talokha, Y. Salyha // FEBS JOURNAL. – 2010. – V. 277. – P.78. *(Здобувачем виконано експериментальні дослідження, їх узагальнено та написано тези).*

35. **Салига Ю. Т.** Дослідження нейротоксичності хлорпірифосу у щурів за допомогою водного тесту Морріса та за умов культури клітин гіпокампа / Ю. Т. Салига, О. В. Слипанюк // Фізіологічний журн. – 2010. – Т. 56, № 2. – С. 49–50. *(Здобувачем виконано експериментальні дослідження, їх узагальнено та написано тези).*

36. **Salyha Y.** Organophosphorus insecticide chlorpyrifos-induced oxidative stress and damage in different parts of rats brain / N. Talokha, Y. Salyha // Abstracts of the 9-th International conference of Brain Energy Metabolism. Budapest, Hungary. – 2010. – P. 155. *(Здобувачем виконано планування експериментального дослідження, проведено аналіз отриманих результатів та написано тези).*

37. **Salyha Y. T.** Biochemical changes in the different regions of young rats brain subjected to chlorpyrifos neurotoxicity / Y. T. Salyha, N. I. Talokha, H. R. Budzan // X Український біохімічний з'їзд.: 13–17 вересня 2010 р.: тези доп.: – Одеса, – Український біохімічний журнал.– 2010. – Т. 82, № 4. – С. 146. *(Здобувачем виконано постановку експериментів, проведено аналіз отриманих результатів, їх узагальнено та написано тези).*

38. Токсичність хлорпірифосу за умов культури молодих нейронів гіпокампу / **Ю. Т. Салига**, І. Р. Медина, І. В. Лучка, З. І. Сав'як // Тези доповідей V з'їзду українського біофізичного товариства. Луцьк, 2011. – С. 119. *(Здобувачем виконано основну частину експериментального дослідження, підготовлено тези до друку).*

39. **Салига Ю. Т.** Фізіолого-біохімічні особливості нейротоксичної дії антихолінестеразних сполук хлорпірифосу і карбофурану / Ю. Т. Салига, В. П. Росаловський // Психофізіологічні та вісцеральні функції в нормі і патології: VI міжнар. наук. конф., 9–11 жовтня 2012 р.: тези доп. – Київ, 2012. – С. 190. *(Здобувачем виконано узагальнення даних та написано тези).*

40. **Salyha Y.** Mechanizm of chlorpyrifos neurotoxicity: cholinesterase inhibition or oxidative stress? / Y. Salyha // Molecular Mechanisms of Synaptic Transmission

Regulation: II international symposium, October 6–9, 2012: abstracts. – Kyiv, 2012. – P. 26–27.

41. **Салига Ю. Т.** Нейротоксичність хлорпірифосу: деякі аспекти його дослідження / Ю. Т. Салига, В. П. Росаловський // Адаптаційні стратегії живих систем: міжн. наук. конф., 11–16 червня 2012 р.: тези доп. – Новий Світ, 2012. – С. 317–318. *(Здобувачем узагальнено результати досліджень та написано тези).*

42. Біологічна безпека застосування фосфорорганічних пестицидів в Україні: чи всі ризики враховані? / **Ю. Т. Салига**, Р.О. Федяков, В.П. Росаловський, С. В. Грабовська // Стратегія збалансованого розвитку агроєкосистем України: міжнар. наук.-практ. конф., 28 березня 2013 р.: Київ, 2013, Матеріали доп. – Київ, 2013. – С. 140–141. *(Здобувачем виконано узагальнення обговорення результатів, написано тези).*

43. **Салига Ю. Т.** Механізм нейротоксичності фосфоорганічних сполук: роль оксидативного стресу / В. П. Росаловський, С. В. Грабовська, Р. О. Федяков, Ю. Т. Салига // Матеріали VI міжнар. конференції «Біорізноманіття. Екологія. Адаптація. Еволюція». – Одеса, 2013. – С. 189. *(Здобувачем проведено частину експериментальних досліджень, узагальнено отримані результати, написано тези).*

44. **Салига Ю. Т.** До біохімії механізмів нейротоксичності хлорпірифосу: зміна акцентів / Ю. Т. Салига // Актуальні питання біології, екології, медицини та фармакології: наук.-практ. конф. з міжнар. участю, 26–27 вер. 2013 р., Дніпропетровськ, 2013: Матеріали конф. – Харків, 2013. – С. 88–89.

45. **Салига Ю. Т.** Зміни концентрацій металів у головному мозку щурів під впливом хлорпірифосу / Ю. Т. Салига // Сучасні аспекти діагностики та лікування захворювань нервової системи: наук.-практ. конф. з міжнар. участю, 19–20 вересня 2013 р.: Український неврологічний журнал. – 2013. – № 3 (28). – С. 149–150.

46. **Salyha Y.** New biochemical and physiological aspects of chlorpyrifos neurotoxicity / V.Rosalovsky, Y. Salyha // Toxicology letters. – 2013. – V. 221S, – P.200. *(Здобувачем виконано експериментальні дослідження, їх узагальнено та написано тези).*

47. **Салига Ю. Т.** Механізми токсичного впливу хлорпірифосу на центральну нервову систему щурів / Ю. Т. Салига, В. П. Росаловський, С. В. Грабовська // Матеріали II конгресу українського товариства нейронаук. – Київ, 2014. – С. 106. *(Здобувачем виконано планування експериментальних досліджень, підготовлено публікацію до друку).*

48. **Салига Ю. Т.** Багатовекторність нейротоксичної дії хлорпірифосу / Ю. Т. Салига, В. П. Росаловський, С. В. Грабовська // Фізіологічний журнал. – 2014. – Т. 60, – № 3. – С. 49–50. *(Здобувачем проаналізовано наукові дані, їх узагальнено та написано тези).*

49. Росаловський В. П. Стан системи антиоксидантного захисту та пероксидного окиснення ліпідів у крові та головному мозку щурів за інтоксикації хлорпірифосом / В. П. Росаловський, **Ю. Т. Салига** // Український біохімічний журнал. – 2014. – Т. 86, № 5. – С. 199–200. *(Здобувачем сплановано роботу і*

виконано частину експериментального дослідження, узагальнено результати і підготовлено тези до друку).

50. Salyha Y. Role of the different calcium-dependent-kinases pathways in development of the GABA-ergic and glutamatergic synapses / Y. Salyha, S. Rama, A. Ivanov [et al.] // The multiple facets of gabaergic synapses: 3rd INMED TINS Conference, September 15–18, 2004.: Abstracts. – La Ciotat, 2004. – P. 15. (Здобувачем виконано експериментальні дослідження, які стосувалися імуноцитохімії нейронів гіпокампу).

## АНОТАЦІЯ

**Салига Ю. Т. Фізіолого-біохімічні механізми впливу хлорпірифосу та карбофурану на організм тварин. – На правах рукопису.**

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія. – Інститут біології тварин НААН, Львів, 2016.

Дисертація присвячена вивченню особливостей біохімічних і фізіологічних механізмів впливу фосфорорганічних і карбаматних сполук хлорпірифосу і карбофурану на організм щурів. Результати дослідження формують нові уявлення про особливості перебігу біохімічних процесів в організмі щурів за дії ХПФ і КФ, вивчено механізми їх токсичної дії на різних рівнях організації – від окремої клітини (за умов первинної культури нейронів) до цілісного організму. Розроблено і апробовано методологію способу прижиттєвого дослідження впливу хлорпірифосу на ріст, розвиток і життєздатність нейронів гіпокампу за умов *in vitro*. На культурі нейронів гіпокампу щурів досліджено нейротоксичну дію різних концентрацій хлорпірифосу і встановлено, що механізми цієї нейротоксичності безпосередньо пов'язані із явищем оксидативного стресу. Запропоновано комплексну схему біохімічного механізму токсичності ХПФ, який не обмежується загальновідомою антихолінестеразною дією, а є також тісно взаємозв'язаним із явищем оксидативного стресу. З'ясовано особливості протікання вільнорадикальних процесів, стану системи антиоксидантного захисту, показники мінерального обміну у різних органах та окремих відділах головного мозку щурів за умов гострої або хронічної інтоксикації тварин.

**Ключові слова:** щурі, хлорпірифос, карбофуран, інтоксикація, оксидативний стрес, антиоксидантна система, центральна нервова система, мозок, нейрон, культура клітин

## АННОТАЦИЯ

**Салыга Ю. Т. Физиолого-биохимические механизмы влияния хлорпирифоса и карбофурана на организм животных. – На правах рукописи.**

Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.00.04 – биохимия. – Институт биологии животных НААН, Львов, 2016.

Диссертация посвящена изучению особенностей биохимических и физиологических механизмов влияния фосфорорганических и карбаматных соединений хлорпирифоса и карбофурана на организм крыс. Результаты исследования формируют новые представления об особенностях протекания биохимических процессов в организме крыс за действия ХПФ и КФ, изучены механизмы их токсического действия на различных уровнях организации - от отдельной клетки (в условиях первичной культуры нейронов) до целостного организма. Разработана и апробирована методология способа прижизненного исследования влияния хлорпирифоса на рост, развитие и жизнеспособность нейронов гиппокампа в условиях *in vitro*. На культуре нейронов гиппокампа крыс исследовано нейротоксическое действие различных концентраций хлорпирифоса и установлено, что механизмы этой нейротоксичности непосредственно связаны с явлением оксидационного стресса. Предложена комплексная схема биохимического механизма токсичности ХПФ, которая не ограничивается общеизвестным антихолинэстеразным действием, а также тесно взаимосвязана с явлением оксидационного стресса. Выявлены особенности протекания свободнорадикальных процессов, состояния системы антиоксидантной защиты, показатели минерального обмена в различных органах и отделах головного мозга крыс при однократной или хронической интоксикации животных.

**Ключевые слова:** крысы, хлорпирифос, карбофуран, интоксикация, оксидативный стресс, антиоксидантная система, центральная нервная система, мозг, нейрон, культура клеток.

## SUMMARY

**Salyha Yu. T. Physiological and biochemical mechanisms of chlorpyrifos and carbofuran influence on animals. – The manuscript.**

Thesis for the degree of doctor of biological sciences, specialty 03.00.04 – biochemistry. – Institute of animal biology NAAS, Lviv, 2016.

The thesis is dedicated to the study of biochemical and physiological features of the mechanisms of influence of organophosphate (OP) and carbamate compounds (chlorpyrifos and carbofuran) on the organism of rats. Organophosphate and carbamate



compounds are the main active substances in many pesticides and household chemicals; they are also used in the chemical industry, medicine, etc. High toxicity of those xenobiotics causes considerable risk of intoxication.

In our investigation the most attention we have paid to the biochemical mechanisms of chlorpyrifos toxicity. It is one of the most common and hazardous of OP compounds, known as the active ingredient of many common broad-spectrum insecticides. One of the key mechanisms of chlorpyrifos effect is its ability to inhibit cholinesterases. Our investigations, as well as research works of different scientists, conducted in recent years have shown the existence of other – cholinesterase-independent mechanisms of influence of this substance on a living organism. Chlorpyrifos may act through other mechanisms, including breaking antioxidant-prooxidant balance. Therefore, despite the fact that oxidative stress induction by chlorpyrifos is proven, many questions remain unanswered in this field. Among number of the study goals one of them was to conduct a comparative analysis of key indicators of the antioxidant defense system in blood, tissues of different organs and main brain regions of rats intoxicated by chlorpyrifos.

Therefore, the detected changes show that, already at first minutes after the exposure, chlorpyrifos caused not only cholinesterase inhibition, but also alterations in glutathione system and lipid peroxidation processes in rat blood and different tissues. This confirms that biochemical toxicity mechanisms of OPs, and particularly chlorpyrifos, are connected with pro/antioxidant reactions and processes. Moreover, the obtained results may become a part of the background for possible construction of pathways and methods for pharmacological correction and protection of cytotoxic damage caused by chlorpyrifos or analogous compounds. Successful implementation of these tasks becomes possible via comprehensive study of the relationship between pro- and antioxidant processes in different systems and tissues, and other molecular mechanisms of adverse effects of organophosphorus poisons, focusing on the role of antioxidant system, lipid peroxidation and anticholinesterase phenomena.

We also set a goal to test the method of intravital microscopy of primary hippocampal cell cultures to study their growth, development and functioning under the condition of adding to the incubation medium of chlorpyrifos, as well as to establish the existence of quantitative changes of these parameters depending on the dose and duration of the studied toxicant. To visualize nerve cells we used their genetic modification with the green fluorescent protein (GFP) by the method of magnetofection. We studied the neurotoxic effects of chlorpyrifos on hippocampal cells *in vitro*, adding the chlorpyrifos into the culture medium in different concentrations. Qualitative and quantitative analysis of neurons incubated during 24, 48 and 72 hours of the experiment was made. Optimal parameters of the method of intravital study of the chlorpyrifos effect on growth, development and the livelihoods of hippocampal neurons in primary cell culture were chosen. It was found that chlorpyrifos adding into the culture medium lead to statistically significant dose-dependent damage and as a consequence — the cell death of hippocampal neurons *in vitro*. Simultaneously, statistically significant differences in parameters of neurons viability depending on the duration of studied organophosphorus compound action were observed. We also observed survival of the

cells incubated in the media with only chlorpyrifos and under the same conditions but with the addition of Trolox as an antioxidant. It was found that Trolox demonstrated clear neuroprotective effects at all concentrations of chlorpyrifos tested during the research period. It is concluded that the negative effect of chlorpyrifos on hippocampal neurons results, to a considerable extent, in the development of oxidative stress.

So, received results allow to form a fundamental understanding of the physiological and biochemical characteristics of chlorpyrifos and carbofuran effects on rats at the different levels of organization - from single cells to whole organism. An enhanced and complemented by pathway of physiological and biochemical mechanisms of chlorpyrifos and carbofuran toxicity, which is not limited to generally known anticholinergic effects, but is also closely linked to the phenomenon of oxidative stress and metabolism of biologically active metals in body tissues was proposed.

**Key words:** rats, chlorpyrifos, carbofuran, intoxication, oxidative stress, antioxidant system, central nervous system, brain, neuron, cell culture.



Підписано до друку 12.04.2016 р.  
Гарнітура “Times New Roman”  
Формат 60x84/16. Папір офсетний.  
Умов. друк. арк. 1,9 Наклад 100 прим.

ТЗОВ «Смарт Систем ЛТД»  
79018, м. Львів, вул. О. Степанівни, 45, корп. 3  
тел./факс: (032)2368236