

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ  
ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ ТВАРИН

На правах рукопису

**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**

Дисертація на здобуття наукового ступеня  
доктора біологічних наук

Науковий консультант:

**ВЛІЗЛЮ Василь Васильович**

доктор ветеринарних наук,

професор, академік НААН

**Львів – 2016**

## ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ І ТЕРМІНІВ.....	6
ВСТУП .....	8
РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ .....	15
1.1 Біохімічні основи токсичності фосфорорганічних і карбаматних сполук	15
1.2 Фосфорорганічні сполуки: загальна характеристика та біохімічні механізми токсичної дії .....	19
1.2.1 Поширення ФОС і шляхи їх надходження до організму.....	19
1.2.2 Хімічна структура ФОС і біохімічні механізми їх токсичності..	20
1.2.3 Метаболізм ФОС в організмі. ....	23
1.2.4 Механізми нейротоксичності ФОС. ....	26
1.2.5 Хлорпірифос: загальна характеристика та деякі аспекти його токсичності	28
1.3 Карбофуран: загальна характеристика, шляхи надходження до організму та механізми їх токсичної дії.....	35
1.4 Вільнорадикальні явища та біохімічні особливості про-, антиоксидантних процесів у механізмах нейротоксичності .....	38
1.4.1 Оксидативний стрес та його біохімічні особливості.....	38
1.4.2 Оксидативний стрес і функціонування ЦНС.....	45
1.5 Біохімічна роль металів у функціонуванні ЦНС та механізмах нейротоксичності	47
1.6 Біохімічна роль деяких металів у механізмах виникнення оксидативного стресу та функціонуванні системи антиоксидантного захисту. ....	50
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	56
2.1 Схема досліджень.....	56
2.2 Препарати карбофурану і хлорпірифосу, які використовували в дослідженнях .....	60
2.3. Загальні принципи експериментів з лабораторними тваринами.....	61
2.4. Відбір експериментального матеріалу від лабораторних тварин.....	63
2.4.1 Препарування кори великих півкуль, гіпокампа, мозочка. ....	64
2.5. Біохімічні показники, які визначали в дослідженнях.....	65

2.5.1 Активність холінестерази (КФ 3.1.1.8). .....	65
2.5.2 Активність супероксиддисмутази (КФ 1.15.1.1.) .....	67
2.5.3 Активність каталази (КФ 1.11.1.6). .....	68
2.5.4 Активність глутатіон-S-трансферази (КФ 2.5.1.18). .....	68
2.5.5 Активність глутатіонпероксидази (КФ 1.11.1.9). .....	69
2.5.6 Активність глутатіонредуктази (КФ 1.6.4.2). .....	70
2.5.7 Концентрація глутатіону відновленого. ....	71
2.5.8 Вміст гідропероксидів ліпідів. ....	71
2.5.9 Концентрація ТБК-активних продуктів. ....	72
2.5.10 Активність амінотрансфераз – аланінамінотрансферази (К Ф 2.6.1.2) та аспаратамінотрансферази (К Ф 2.6.1.1). .....	73
2.5.11 Активність лужної фосфатази (КФ. 3.1.3.1).. .....	74
2.5.12 Вміст сечовини. ....	75
2.5.13 Вміст загального протеїну. ....	76
2.5.14 Вміст альбуміну. ....	76
2.5.15 Коцентрація окремих хімічних елементів у тканинах тварин. ....	77
2.6. Дослідження на первинних культурах нервових клітин .....	78
2.6.1 Отримання первинних культур нейронів гіпокампу з ембріонів щурів. 78	
2.6.2 Культивування первинних культур нейронів гіпокампу щурів in vitro. . 80	
2.6.3. Трансфекція нейронів гіпокампу щурів in vitro. ....	81
2.6.4. Імуноцитохімічні дослідження нейронів гіпокампу щурів. ....	82
2.6.5 Конфокальна мікроскопія нейронів гіпокампу щурів. ....	83
2.6.6 Прижиттєва мікроскопія нейронів гіпокампу щурів. ....	83
2.7. Світлова мікроскопія тканин головного мозку та печінки щурів (гістологічні дослідження). ....	84
2.8. Проведення поведінкових тестів на лабораторних тваринах .....	84
2.8.1 Водний лабіринт Морріса.....	85
2.8.2 Тест «Відкрите поле».....	86
2.8.3 Тест «Екстраполяційне позбавлення».....	88
2.8.4 Тест «Темно-світла камера» .....	89
2.9. Статистична обробка результатів і кореляційний аналіз .....	90
РОЗДІЛ 3 РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	92

3.1 Вплив гострої інтоксикації ХПФ у дозі 30 мг/кг на фізіолого-біохімічні показники щурів через 1, 3, 6, 10 діб після введення препарату .....	92
3.1.1 Вплив гострої інтоксикації ХПФ у дозі 30 мг/кг на біохімічні показники крові щурів через 1, 3, 6, 10 діб після введення препарату .....	92
3.1.2 Вплив гострої інтоксикації ХПФ у дозі 30 мг/кг на ключові показники АОС крові щурів через 1, 3, 6, 10 діб після введення препарату.....	97
3.1.3 Вплив гострої інтоксикації ХПФ у дозі 30 мг/кг на показники АОС мозку, печінки і селезінки щурів через 1, 3, 6, 10 діб після введення препарату.....	104
3.1.4 Вплив гострої інтоксикації ХПФ у дозі 30 мг/кг на на вміст металів у тканинах різних органів щурів через 1, 3, 6, 10 діб після введення препарату .....	108
3.1.5 Вплив гострої інтоксикації ХПФ у дозі 30 мг/кг на поведінкові параметри щурів.....	128
3.2 Вплив гострої інтоксикації 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.....	136
3.2.1 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 .....	136
3.2.2 Вплив гострої інтоксикації ХПФ у дозі 15 мг/кг на вміст металів у тканинах різних органів щурів.....	141
3.3 Вплив хронічної інтоксикації ХПФ у дозі 15 мг/кг на стан показників АОС та вміст металів у окремих відділах головного мозку щурів.....	147
3.3.1 Вплив хронічної інтоксикації ХПФ у дозі 15 мг/кг на показники АОС у різних відділах головного мозку щурів .....	147
3.3.2 Вплив хронічної інтоксикації ХПФ у дозі 15 мг/кг на вміст деяких металів у тканинах різних органів щурів... ..	149
3.4 Вплив хронічної дермальної інтоксикації ХПФ на фізіолого-біохімічні показники щурів .....	152
3.4.1 Хронічний дермальний вплив ХПФ на показники АОС у тканинах різних органів щурів. ....	153

3.4.2 Дослідження хронічного дермального впливу ХПФ на гістологічні параметри у тканинах печінки і різних відділів мозку щурів. ....	162
3.4.3 Дослідження хронічного дермального впливу ХПФ на поведінку щурів. ....	166
3.5 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.....	175
3.5.1 Вплив гострої інтоксикації ХПФ у дозі 50 мг/кг на стан показників АОС у різних органах щурів. ....	177
3.5.2 Дослідження впливу інтоксикації ХПФ у дозі 50 мг/кг на вміст металів у тканинах різних органів щурів.....	202
3.6 Дослідження токсичності ХПФ на нейрони гіпокампу за умов <i>in vitro</i> .....	210
3.6.1 Розробка методології дослідження нейротоксичного впливу ХПФ на первинні культури клітин гіпокампу. ....	210
3.6.2 Дослідження нейротоксичного впливу ХПФ на первинні культури клітин гіпокампа за звичайних умов та при додаванні у середовище Тролокса. ....	219
3.7. Вплив хронічної інтоксикації карбофураном на біохімічні і нейрофізіологічні показники щурів .....	227
3.7.1. Вплив хронічної інтоксикації КФ у дозі 0,2 мг/кг на показники АОС у різних відділах головного мозку щурів.....	227
3.7.2. Дослідження вмісту Феруму, Купруму, Цинку і Мангану у різних відділах головного мозку щурів під дією КФ у дозі 0,2 мг/кг.. ....	229
3.7.3. Дослідження впливу хронічної інтоксикації КФ у дозах 0,1 мг/кг і 0,2 мг/кг на функціонування нервової системи у щурів. ....	232
АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ .....	245
ВИСНОВКИ.....	274
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ .....	278
ДОДАТКИ .....	360

**ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ І ТЕРМІНІВ**

АДФ	—	аденозиндифосфат
АлАТ	—	аланінамінотрансфераза
АОС	—	антиоксидантна система
АсАТ	—	аспартатамінотрансфераза
АТФ	—	аденозинтрифосфат
АФН	—	активні форми Нітрогену
АФО	—	активні форми Оксигену
АХ	—	ацетилхолін
АХЕ	—	ацетилхолінестераза
БХЕ	—	бутирилхолінестераза
ВР	—	вільні радикали
ВРО	—	вільнорадикальне окиснення
ГАМК	—	гамааміномасляна кислота
ГЕБ	—	гематоенцефалічний бар'єр
ГПЛ	—	гідропероксили ліпідів
ГПО	—	глутатіонпероксидаза
ГР	—	глутатіонредуктаза
ГТ	—	глутатіонтрансфераза
Г-S-T	—	глутатіон-S-трансфераза
ДМСО	—	диметилсульфоксид
ЕДТА	—	етилендіамінтетраоцтова кислота
КАТ	—	каталаза
КС	—	карбаматні сполуки
КФ	—	карбофуран
ЛД <sub>50</sub>	—	напівлетальна доза
ЛДГ	—	лактатдегідрогеназа
ЛФ	—	лужна фосфатаза

МДА	—	малоновий диальдегід
НАД	—	нікотинамідаденіндинуклеотид
НАДН	—	нікотинамідаденіндинуклеотид відновлений
НАДФ	—	нікотинамідаденіндинуклеотид фосфат
НАДФН	—	нікотинамідаденіндинуклеотид фосфат відновлений
НСТ	—	нітросиній тетразолій
$O^{\cdot -}$	—	супероксидний аніон-радикал
ПНС	—	периферична нервова система
ПОЛ	—	перекисне окиснення ліпідів
СОД	—	супероксиддисмутаза
ТБК	—	тіобарбітурова кислота
ТХО	—	трихлороцтова кислота
ФОС	—	фосфорорганічні сполуки
ЦНС	—	центральна нервова система
ХЕ	—	холінестераза
ХПФ	—	хлорпірифос
GFP	—	зелений флуоресцентний білок
ГВ	—	глутатіон відновлений
GSSG	—	глутатіон окиснений
Hb	—	гемоглобін
MEM	—	мінімальне поживне середовище
MetHb	—	метгемоглобін
ROOH	—	гідропероксид

## ВСТУП

**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 [4, 20, 26, 52, 66, 68, 94, 129, 202, 205, 206, 304, 346, 347, 412, 413, 482, 561, 619, 658, 761].

Відомо, що основний біохімічний механізм дії ФОС і КС ґрунтується на пригніченні активності холінергази – ензиму, що здійснює гідроліз ацетилхоліну і відіграє важливу роль у процесі синаптичної передачі нервового імпульсу в холінергічних утвореннях. Незважаючи на значну кількість робіт [96, 98, 232, 240, 256, 294, 309, 327, 344, 354, 363, 461, 462, 472, 478, 676-680, 683-686, 706, 724], присвячених окремим питанням токсичності ФОС і КС, їх механізмів, які не пов'язані з антихолінергазною 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 холінергазної активності [281, 282, 298, 393, 408, 409, 453, 459, 472, 478, 499, 501, 541, 726, 749].

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 [195, 245, 277, 278, 350, 375, 384, 406, 429, 452, 692, 693].

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 [282, 388, 389, 439, 541]. 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 [202, 265, 266, 298, 367, 380, 381, 394, 582, 684, 685].

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 [269]); розробки нових фізіолого-біохімічних та молекулярно-біологічних методів вивчення впливу окремих ФОС і КС на організм людини і тварин [86, 87].

#### **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 антихолінергічною дією.

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

*Предмет дослідження* – оксидативний стрес, вільнорадикальне окиснення, стан антиоксидантної системи, протеїновий і мінеральний обміни, 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, імуногістохімічні, 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 дозволяють 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

колоквіумі 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.

## РОЗДІЛ 1

### ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

#### 1.1 Біохімічні основи токсичності фосфорорганічних і карбаматних сполук

ФОС і КС можуть викликати токсичні ефекти у більшості систем організму, індукувати глибокі зміни у центральній нервовій системі (ЦНС), перш за все, шляхом інгібування ензимів холінеразного ряду [3, 20, 32, 93, 97, 184, 200, 201, 203, 205, 237-240, 283]. І хоча ФОС і КС, представниками яких є відповідно ХПФ і КФ – два різних за хімічною організацією класи сполук, їх об'єднує з біохімічної точки зору саме ця функціональна особливість (рис. 1.1).

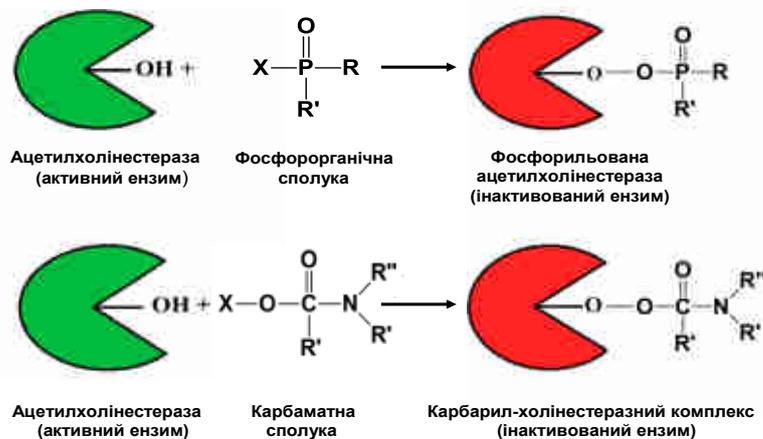


Рис. 1.1. Схема антихолінестеразних реакцій ФОС і КС.

Інгібування цими ксенобіотиками ацетилхолінестерази (АХЕ) порушує ефективний розпад молекул ацетилхоліну (АХ). Механізми холінергічної токсичності ФОС і КС можна хімічно диференціювати за характером модифікації серину в активному центрі АХЕ (фосфорилування або карбамілювання) [378, 530], але, по суті, їх спільною рисою є порушення розпаду АХ. Хоча в деяких випадках, дія ФОС та КС може суттєво відрізнятися за

швидкістю розвитку, тривалістю, типовими ознаками і симптомами і т. д. [378, 409, 492]. Можливі відмінності між антихолінестеразною дією навіть в межах одного класу цих сполук, однак основна послідовність фізіолого-біохімічних процесів, котрі настають після пригнічення АХЕ є однаковою для всіх її інгібіторів, що потрапляють до організму. Зниження холінестеразної активності призводить до зростання рівнів АХ і його нагромадження з постійною активацією холінорецепторів постсинаптичних клітин. Такий зсув у напрямку підвищення активації холінергічних рецепторів викликає появу функціональних ознак і симптомів холінергічної токсичності [360, 387]. Більшість з них виникають внаслідок інгібування АХЕ в периферичній нервовій системі (ПНС). Такі симптоми, як синдром посиленої саливації, сльозіння, сечовипускання і дефекації, брадикардія та міоз є насамперед результатом інгібування АХЕ, накопичення АХ і надмірної стимуляції мускаринових рецепторів у ПНС. Інші поширені ознаки холінергічної токсичності (наприклад, м'язові фасцикуляції, тахікардія і гіпертонія) пов'язані з надмірною стимуляцією нікотинових рецепторів [204, 687]. Для кращого розуміння біохімії антихолінестеразних процесів, які індукуються ФОС і КС варто детальніше зупинитися на описі ензимів групи холінестераз, що робимо нижче.

*Холінестерази* – це група ензимів з класу гідролаз карбонових кислот, субстратами яких є складні ефіри холіну з оцтовою, пропіоновою або масляною кислотами. Є два типи холінестераз: істинна холінестераза (ХЕ) і псевдохолінестераза [16, 32, 70, 78, 253, 525, 602]. Істинна холінестераза за систематичною номенклатурою має назву – ацетилхолінгідролаза (КФ 3.1.1.7) і тривіальну – ацетилхолінестераза (АХЕ), каталізує реакцію гідролітичного розщеплення естерного зв'язку в молекулі АХ. Псевдохолінестераза, або бутирилхолінестераза (БХЕ) має ширшу субстратну специфічність, каталізує гідроліз не тільки АХ, але й інших субстратів, зокрема бутирилхоліну. За систематичною номенклатурою цей ензим має назву ацетилхолін-ацилгідролаза (КФ 3.1.1.8) і тривіальну – холінестераза (ХЕ). АХЕ зосереджена переважно в мозку, еритроцитах, м'язах, нервових клітинах. ХЕ локалізується головним

чином у печінці, підшлунковій залозі і крові. У невеликих кількостях ХЕ міститься і в ЦНС. Вважають, що роль ХЕ нервової системи полягає у захисті АХЕ від негативної дії таких естерів холіну, які практично не розщеплюються АХЕ, але можуть утворюватися в організмі (пропіонілхолін, бутирилхолін, валерілхолін і ін.), а ХЕ їх руйнує [33, 70, 225, 244, 251, 253, 296, 317, 366, 489, 530, 565, 670].

АХЕ є одним з ензимів, що відіграють ключову роль у забезпеченні специфічної функціональної активності нервової системи, зокрема у механізмах синаптичної передачі. АХЕ функціонує шляхом гідролітичного руйнування ацетилхоліну (АХ), в результаті чого, він втрачає свою фізіологічну активність, що безпосередньо впливає на передачу нервового імпульсу. Медіаторна роль АХЕ відома з 1921 року, коли це явище вперше продемонстрував Отто Леві [16, 32-33, 530, 600].

АХЕ відіграє ключову роль у процесах нейрогуморальної та синаптичної передачі: у холінергічних синапсах вона каталізує гідроліз АХ, і, як наслідок, припиняє вплив цього медіатора на холінорецептор, який відповідає за збудження нервового волокна. При інгібуванні АХЕ звільнення рецепторів від АХ відбувається дуже повільно (тільки за допомогою дифузії), і на рівні нейротрансмітер – постсинаптична мембрана передача нервових імпульсів блокується. Це викликає дезорганізацію багатьох процесів організму, а при важких отруєннях може призвести до летальних наслідків [77]. АХЕ є ензимом (переважно представленим у нервово-м'язових синапсах і центральній холінергічній нервовій системі), який завершує синаптичну передачу шляхом гідролітичного розкладання АХ на неактивні продукти – холін і оцтову кислоту [16, 32, 77, 225].

АХ – перша сполука, що була ідентифікована як нейротрансмітер ЦНС. Не всі відділи ЦНС містять АХ; ділянками мозку з його високою концентрацією є гіпоталамус, мигдалини, таламус, передні спинномозкові корінці. Медіаторна функція АХ відома, як у ЦНС, так у ПНС, де АХ взаємодіє з рецепторами двох типів: мускариновими та нікотиновими. Різниця між цими рецепторами полягає

в тому, що вони по-різному відповідають на дію агоністів. Так, М-холінорецептори вибірково збуджуються мускарином, а Н-холінорецептори – нікотинном. Крім того, різні типи холінорецепторів відмінні за механізмом отримання сигналу і його передачі на ефекторну клітину (нейрон, міоцит, залозиста клітина) [121, 670]. Н-холінорецептори відіграють регуляторну роль стану йонних каналів постсинаптичної мембрани для  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ . У свою чергу, М-холінорецептори являють собою рецептори зв'язані з так званими G-протеїнами. Відомо також, що в деяких мускарин-чутливих холінергічних синапсах Н-холінорецептори виявляються на пресинаптичних мембранах, і таким чином регулюють їхню активність. Загальна схема функціонування холінергічних синапсів включає в себе ряд взаємопов'язаних етапів [121]. Спочатку відбувається синтез АХ із ацетату і холіну за допомогою ацетилхолінтрансферази. Утворений АХ депонується у пресинаптичних везикулах. За появи у нервовому закінченні сигналу збудження, АХ вивільняється у синаптичну щілину, де взаємодіє з мембранними холінорецепторами. Водночас має місце руйнування виділеного АХ за допомогою АХЕ, і як наслідок – порушення, чи зупинка процесу передачі нервового імпульсу. Нарешті, вивільнений холін захоплюється пресинаптичними структурами [121].

Інгібіторами холінестераз є деякі природні та синтетичні сполуки: ФОС, ефіри N-алкілкарбамінових кислот (КС), четвертинні амонієві основи, гетероциклічні сполуки, що містять третинний або четвертинний атом Нітрогену. ФОС і КС іноді називають «напівсубстратами» або «поганими субстратами» [16]. Оскільки, ФОС добре розчинні у жирах, вони легко долають гематоенцефалічний бар'єр (ГЕБ) і діють безпосередньо на холінергічні синапси мозку. Взаємодіючи шляхом фосфорилування активного центру АХЕ, ФОС є незворотніми інгібіторами цього ензиму [121].

Як ФОС, так і КС порушують холінергічну нейротрансмісію шляхом інгібування АХЕ. Проте, КС на відміну від ФОС, важко проходять через ГЕБ [98, 317, 378, 409, 687]. Оскільки процеси дихання регулюються холінергічною

системою, то пригнічення дихальних центрів у мозку вважається основною причиною смерті внаслідок дії інгібіторів ХЕ, які проходять через ГЕБ [133, 278, 435, 455, 460, 474, 482, 492, 760]. Надмірна стимуляція холінергічних рецепторів викликає ексайтотоксичність і дисфункцію холінергічних нейронів, що згодом може викликати їх вторинне пошкодження і хронічні психоневрологічні наслідки [229, 288, 435, 565, 596, 745].

Таким чином, зміни спричинені антихолінергічною дією ФОС і КС можуть негативно впливати на цілий ряд функцій і систем організму [18, 25, 30, 63, 78, 110, 198, 210, 220, 221, 252, 274, 354, 367, 410, 499, 544, 604, 654, 677, 743].

## **1.2 Фосфорорганічні сполуки: загальна характеристика та біохімічні механізми токсичної дії**

### **1.2.1 Поширення ФОС і шляхи їх надходження до організму.**

Перші ФОС були синтезовані у ХІХ сторіччі, але широко використовувати їх почали лише у 1930-ті роки. Німецький хімік Герхард Шредер синтезував багато промислових ФОС, одну з яких – паратіон – досі застосовують як пестицид [309]. На початку Другої Світової війни розробка ФОС повернула у напрямку високотоксичних речовин, які використовували як хімічну зброю, що вражає нервову систему – наприклад, зарин, зоман, табун. Після війни, у 40-50х рр, вивчення ФОС було знову орієнтоване на створення менш токсичних речовин [409]. Використання ФОС значно зросло у 70-х роках минулого століття, після заборони хлорорганічних пестицидів. Сьогодні у господарській діяльності використовуються близько 200 ФОС, в тому числі понад 150 різних пестицидів, серед яких є інсектициди (хлорпірифос, карбофос, метафос, хлорофос та ін.), акаріциди (метилпірофос, октаметил і ін.), фунгіциди (піразофос, хінозан, інезін і ін.), гербіциди (фалон, бенсулід та ін.) і регулятори росту рослин (етефон, фосфон-Д і ін.) [92, 94, 96, 99, 103,

107, 188]. Відносно низька водорозчинність багатьох ФОС, їх здатність акумулюватися в ґрунті і стічних водах, а також порівняно низькі швидкості їх природного розпаду є факторами екологічного ризику. Аналізи продуктів харчування свідчать про наявність в них ФОС навіть після технологічної обробки і тривалого терміну зберігання [4, 26, 31, 52, 62, 64, 128-130, 512]. ФОС можуть вражати значну частину населення при використанні в домашньому господарстві, під час сільськогосподарських робіт чи вживання забрудненої ними води та їжі [131, 132, 209, 242, 252, 561, 619, 665, 709, 735].

ФОС можуть потрапляти в організм через дихальні шляхи, шлунково-кишковий тракт і через шкіру. Симптоми інтоксикації ФОС при інгаляційному ураженні розвиваються значно швидше, ніж при надходженні через рот або шкіру. При інгаляції ФОС смерть може наступити протягом 1-10 хвилин після впливу токсиканта. У разі надходження цих сполук із забрудненою ними їжею, симптоми інтоксикації розвиваються протягом 0,5 години. Резорбція з поверхні шкіри діючої дози високотоксичних речовин відбувається протягом 1-10 хвилин, однак прихований період може тривати протягом 0,5-2 годин [115, 133, 148, 167, 205-206 ].

### **1.2.2 Хімічна структура ФОС і біохімічні механізми їх токсичності.**

ФОС є ефірами ортофосфорної або алкілфосфонових кислот, а також їх похідних. Загальна хімічна структура ФОС (Рис. 1.2.) включає центральний атом фосфору (P) та характерний фосфорний (P=O) чи тіофосфорний (P=S) зв'язок. Символом X позначена відхідна група, що заміщується (нуклеофільним витісненням) Оксигеном серину в активному центрі АХЕ. У високотоксичних бойових речовинах група X містить Флуор (F), що має високу схильність до гідролізу і спричиняє надзвичайно активне інгібування АХЕ. У менш токсичних ФОС X зазвичай містить алкільні або арильні групи. Бічні групи R1 та R2 зазвичай є алкоксильними. Активна форма ФОС, що приєднується до активного центру АХЕ, є оксонною структурою, в якій центральний атом Фосфору приєднаний до атому Оксигену.

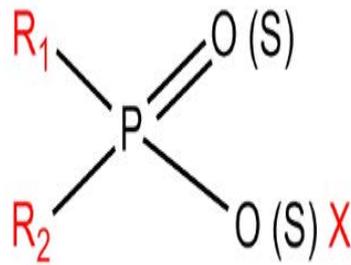


Рис. 1.2. Загальна структурна формула ФОС.

Примітка. R1 і R2 можуть бути різними або однаковими алкілами, алкоксилами, алкіламінами; X-залишок органічної або неорганічної кислоти (галогени, ціангрупа, залишок нітрофенолу), у багатьох ФОС - залишок заміщеної фосфорної кислоти.

Більшість сучасних ФОС володіють тійним (P=S) зв'язком. У цьому випадку тійна група мусить бути спершу перетворена на оксонну за допомогою СУР ензимів (цитохрому Р450) – і лише після цього ФОС може інгібувати АХЕ [251].

Найважливішим фактором, що визначає токсичність ФОС, є реакційна здатність фосфорного центру, яка, в свою чергу, визначається природою і розміром груп, зв'язаних з атомом Фосфору. Сполуки, в яких атом Фосфору ковалентно зв'язаний з атомом Оксигену, токсичніші за аналогічні сполуки з атомом Сульфуру в такому ж положенні. Так, параоксон, в якому атом Фосфору утворює подвійний зв'язок з атомом Оксигену, приблизно в 20 разів токсичніший за паратіон з аналогічним Р-С зв'язком [62, 454].

ФОС характеризуються багатовекторною дією на організм, яка впливає на всі нервові структури, в яких передача імпульсів здійснюється за допомогою АХ – НС, секреторні залози, гладка мускулатура бронхів, кишечника, судин; серце, гангліонарні і нервово-м'язові синапси, мозкова речовина надниркових залоз (Рис. 1.3.) [32, 78]. Крім іншого, при ФОС-інтоксикаціях організму мають місце порушення центральної гемодинаміки, виражені зміни системи згортання крові та її реологічних властивостей, порушення мікроциркуляції крові та інші явища, що протікають на тлі стресу. Відбувається накопичення АХ, що викликає спочатку гіперефекти на рівні синапсу, а потім АХ надходить у кров, де проявляє вже дистантну дію [181, 184, 211, 343, 386, 402, 442, 456, 657, 681].



Рис. 1.3. Загальна схема антихолінестеразної дії ФОС, (за [200]).

В результаті вивільнення базофілами гістаміну підвищується проникність стінок дрібних судин, розвивається спазм гладкої мускулатури та інші загальні порушення в організмі.

Узагальнені відомості про первинні токсичні реакції ФОС, що значною мірою визначають виникнення і перебіг спричинених ними інтоксикацій, а також їх віддалені наслідки представлені на рис. 1.4.



Рис. 1.4. Способи дії ФОС та їх мішені.

**1.2.3 Метаболізм ФОС в організмі.** Механізми біологічної дії ФОС можна розділити на синаптичні та ті, які безпосередньо не пов'язані з функціонуванням цих нейрональних структур, тобто – позасинаптичні, або дистантні. До останніх, зокрема належить активація процесів ПОЛ із утворенням вторинних токсичних продуктів, внаслідок чого істотно порушується перебіг обмінних процесів. Первинні продукти ПОЛ (гідропероксиди ліпідів), будучи речовинами вельми нестійкими, досить швидко руйнуються з утворенням вторинних продуктів ПОЛ: альдегідів (зокрема МДА), кетонів, спиртів і епоксидів [279, 299, 304, 370]. Продукти ПОЛ значною мірою спричиняють агрегацію тромбоцитів, зменшення синтезу простагландинів, а також руйнування клітинних мембран і підвищення їхньої проникності [236, 312, 403].

Метаболізм ФОС після потрапляння в організм, як і інших ксенобіотиків, головним чином проходить у печінці, меншою мірою в легенях і кишечнику. Ензими за здатністю гідролізувати ФОС поділяють на дві підгрупи: арилдіалкілфосфатази, що включають параоксонази, органофосфатгідролазу і фосфотриестеразу (КФ 3.1.8.1) і діізопропілфторфосфатази, що включають зоманазу, зариназу і кислу органофосфатангідролазу (К.Ф. 3.1.8.2.). Таким чином, ця класифікація заснована на типі хімічного зв'язку, який розщеплюється в процесі каталізу. Арилдіалкілфосфатази каталізують розщеплення Р-О і Р-С зв'язків, а діізопропілфторфосфатази - Р-Р зв'язок [62, 620, 729].

Метаболізм ФОС проходить у 2 етапи: у фазі I метаболічні ензими активують сполуку введенням функціональних груп, у яких можуть відбуватися реакції фази II. Ензими фази II приєднують різноманітні функціональні групи, такі як глюкуронова кислота, сульфат, гліцин, глютамінова кислота, роблячи можливим виведення метаболіту з організму [235, 250]. Фаза I (Рис. 1.5.) включає окиснення та гідроліз.

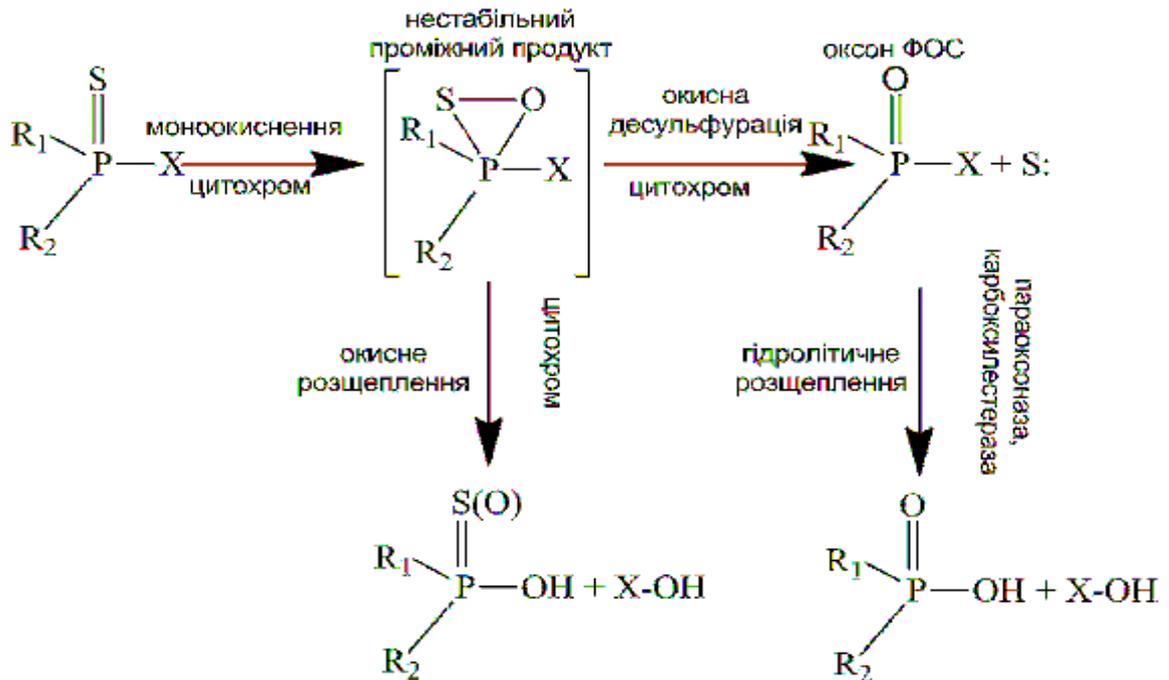


Рис. 1.5. Реакції першої стадії метаболізму ФОС.

Примітка. Цитохром – цитохром P 450.

Окиснення – найважливіша реакція у перетворенні тіонової форми ФОС в активний інгібітор АХЕ. За допомогою ензимів родини P450 (CYP), атом Сульфуру у тіонової формі зв'язує один атом Оксигену, утворюючи нестійку проміжну сполуку, яка розкладається з утворенням метаболіту ФОС-оксону та активної форми Сульфуру (оксидативна десульфурація) [34]. ФОС-оксонові метаболіти є сильними інгібіторами АХЕ, тому ця реакція є ключовою для більшості нейротоксичних ефектів, спричинених ФОС. Вплив активного атому Сульфуру, побічного продукту реакції, наразі невідомий. Він може взаємодіяти з сусідніми молекулами протеїну та, наприклад, деактивувати ензими CYP, зв'язуючись із їхніми активними центрами [309].

Після окиснення відбувається гідроліз ФОС, за допомогою ензиму естерази А, також названого параоксоназою (PON1) (Рис. 1.6). Ця реакція є ключовою для процесу детоксикації ФОС [235]. Детоксикація ФОС відбувається, коли параоксоназа розщеплює ФОС до диетилфосфату та відхідної групи. ФОС також гідролізуються карбоксилестеразою, що відрізняється від пароксонази самоактивацією під час гідролізу [482, 492].

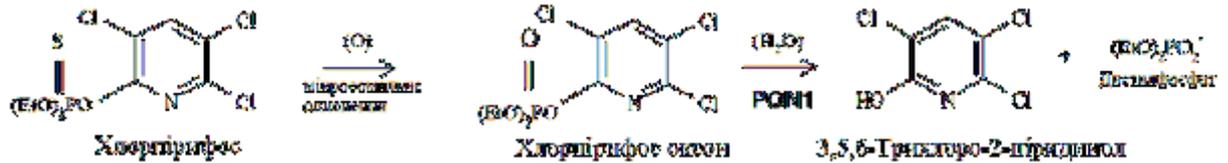
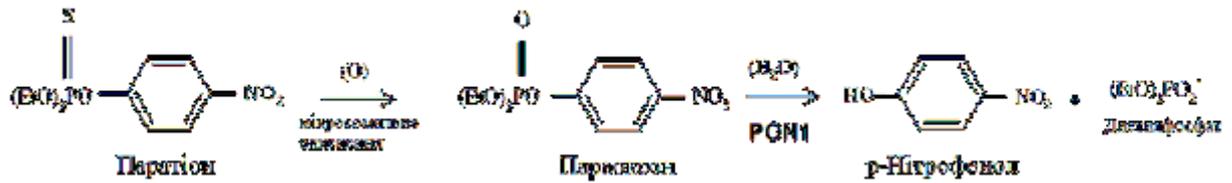


Рис. 1.6 Реакції гідролітичного розщеплення ФОС (А – паратіону, Б – хлорпірифосу) параоксоназою PON1, за [235].

У ссавців параоксоназа існує у двох формах: мембранозв'язаній і циркулюючій в крові. Вміст параоксонази в сироватці в кілька разів переважає кількість ензиму в органах і тканинах. В організмі параоксоназа тісно взаємодіє з комплексом ліпопротеїнів високої щільності. Відомо, що параоксоназа ссавців є  $\text{Ca}^{2+}$  залежним ензимом і має два метало-зв'язуючі центри [62].

При вивченні рекомбінантних параоксоназ [62, 454] було встановлено, що істотну роль у прояві каталітичної активності ензима до параоксону відіграють 12 амінокислотних залишків. Серед них: залишки гістидину, які, як передбачається, можуть бути промоторами нуклеофілу в активному центрі; SH-група Cys-283, здатна служити нуклеофілом активного центру; залишки аспарагінової і глутамінової кислот, що беруть участь в координації йонів  $\text{Ca}^{2+}$  і залишок триптофану, який, завдяки своїй гідрофобності може впливати на зв'язування субстрату [454].

У першій фазі метаболізму ФОС, окрім оксидативної десульфурації та гідролізу, можуть також відбуватися реакції оксидативного видалення бічних ланцюгів (деалкілація) чи оксидативного відщеплення відхідної групи. Останнє відбувається після утворення нестійкого проміжного продукту з СУР та завершується реакцією десульфурації. Оскільки десульфурація активує ФОС, а оксидативне відщеплення відхідної групи їх детоксифікує, то

вихідна токсичність ФОС залежить від рівноваги цих двох реакцій. Продукт окиснення часто є більш гідрофільною речовиною, яка може простіше включатися в другу фазу метаболізму, що уможлиблює її швидке виведення з організму [409]. Метаболіти ФОС, що утворюються у першій фазі метаболізму, з'єднуються з гідрофільними групами за допомогою каталізу ензимами II-ї фази та виводяться з сечею. Детоксифікуючі реакції відбуваються виключно у II-й фазі.

**1.2.4 Механізми нейротоксичності ФОС.** Як було відзначено вище, ФОС блокують функціонування АХЕ, спричиняючи накопичення надлишкового АХ у синаптичній щілині [32, 70, 251, 409, 489, 498, 529, 589, 600, 670]. Це викликає такі нейротоксичні ефекти, як нервово-м'язовий параліч та цілий ряд інших (Рис. 1.7). ФОС інгібують АХЕ, формуючи ковалентний зв'язок між ФОС та активним центром АХЕ. Спонтанний гідроліз ФОС з активного центру АХЕ є дуже повільним, а часом незворотним, спричиняючи довготривалий токсичний ефект [251, 303].

Симптоми гострого отруєння ФОС можуть бути поділені відповідно до місця акумуляції АХ в організмі. На додачу до гострих симптомів, деякі ФОС можуть спричинити такі, що виникають за кілька днів після отруєння [746].

Хоча нейротоксичність ФОС описана добре, про вторинні механізми їхньої активності та вплив хронічного вживання ФОС на нецільові (не нервові) тканини та органи відомо мало. Нещодавні дослідження дозволили відкрити кілька вторинних мішеней ФОС, які можуть порушувати низку біологічних процесів. До ензимів, які інгібуються ФОС, як виявилось, належать також карбоксилази, що беруть участь у метаболізмі ксенобіотиків. Їх інгібування ФОС може блокувати метаболічне перетворення багатьох речовин. ФОС можуть впливати на метаболізм ксенобіотиків також за допомогою активного атому Сульфуру, який вивільняється у першій фазі метаболізму та сильно інгібує ензими СУР. ФОС також інгібують ліпази, які відіграють важливу роль у клітинній сигналізації.

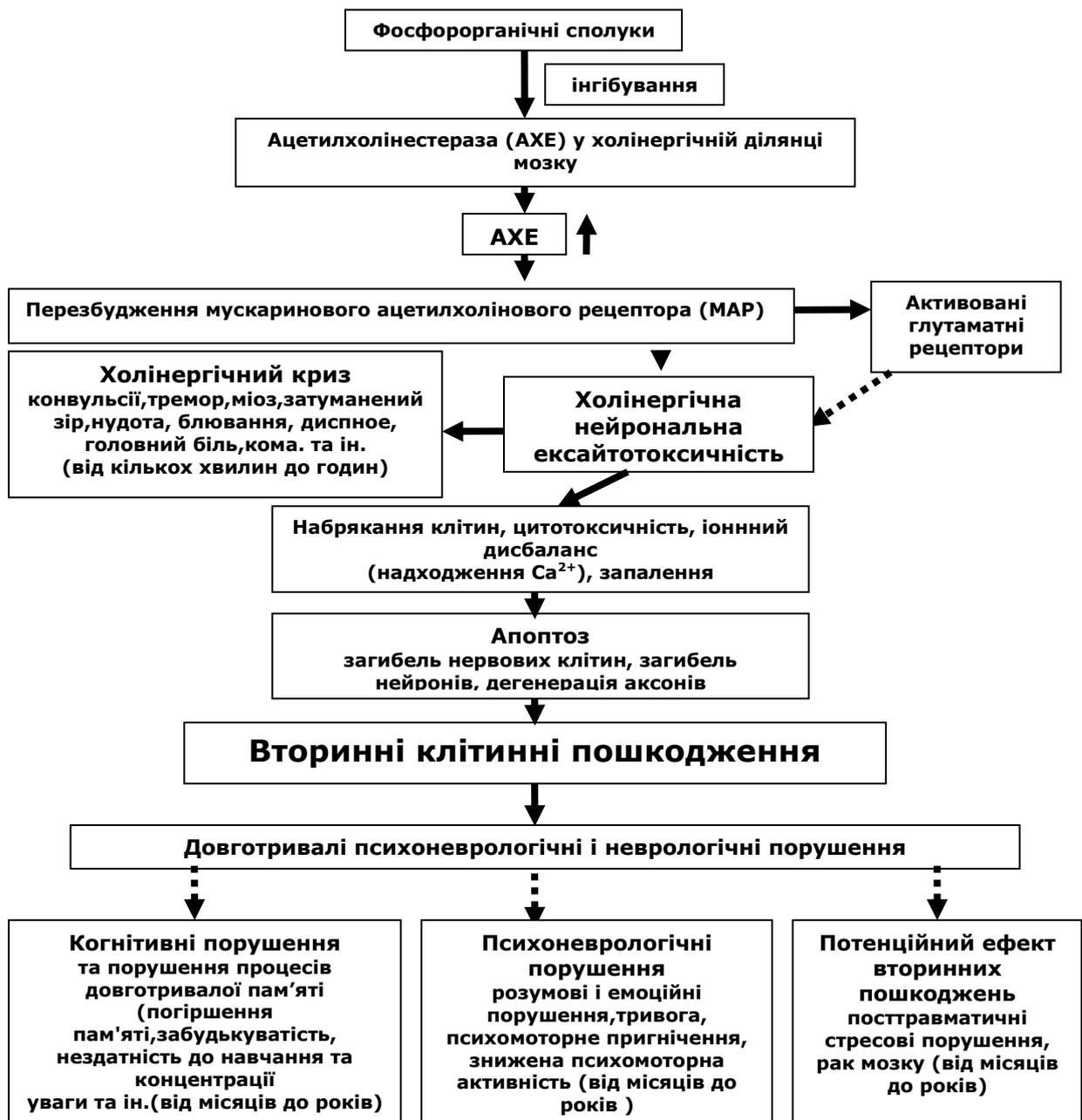


Рис. 1.7. Механізм пошкодження нервових клітин за дії ФОС (за [298]).

Крім того, ФОС можуть ушкоджувати сигнальні шляхи, активуючи протеїнкіназу С. Однак ця активація найвірогідніше є непрямую, шляхом опосередкованого ФОС формування реактивних форм кисню (АФО), які активують протеїнкіназу С. Показано, що утворення АФО, індуковане ФОС, та оксидативний стрес також пов'язані з апоптозом у різноманітних тканинах [292, 427, 461, 465].

У дослідженнях *in vitro* та *in vivo* було виявлено інші мішені дії ФОС, п'ять з яких є особливо чутливими [500]: 1) малатіон та малаоксон інгібують лізилоксидазу в гомогенатах ембріонів *Xenopus*, що свідчить про їх вплив на посттрансляційну модифікацію колагену, який спричиняє морфологічні дефекти сполучної тканини [235]; 2) ХПФ та ХПФ-оксон активують зв'язуючий протеїн  $Ca^{2+}$ /сАМР відповіді у культурі нейронів щурів, що припускають, як можливий механізм нейротоксичності [660]; 3) параоксон викликає апоптотичну клітинну смерть у клітинах лейкемічної лінії шляхом руйнування мітохондрій, що призводить до активації каспази-9 [688]; 4) етиларакхидоніл флуорофосфат та діізопропілфлуорофосфат інгібують ацетилгідролазу – фактор активації тромбоцитів; 5) фенітротіон *in vitro* активує антагоніст андрогенового рецептора та інгібує розвиток андроген-залежних тканин *in vivo* [688].

**1.2.5 Хлорпірифос: загальна характеристика та деякі аспекти його токсичності.** ХПФ – один з найпоширеніших пестицидів із класу ФОС, що використовується у сільському господарстві, побуті та промисловості. Він з'явився на світовому ринку у 1965 році та досі популярний для боротьби з комахами у сільському господарстві, домашніх господарствах, садах, будівництві. Торгові назви ХПФ: «Бродан», «Детмол UA», «Dowco 179», «Дурсбан», «Empire», «Ерадекс», «Лорсбан», «Paqueant», «Piridane», «Scout» та інші. На сьогодні, тільки в Сполучених Штатах Америки зареєстровано понад 850 продуктів на основі ХПФ. Незважаючи на нещодавні обмеження використання у домашньому господарстві, прийняті в деяких країнах, він залишається популярним пестицидом у всьому світі. Використання ХПФ дозволено в близько 100 країнах світу, в тому числі в Україні, США, Канаді, Великобританії, Іспанії, Франції, Італії, Японії, Австралії, Новій Зеландії. Цим інсектицидом обробляють зерно, бавовну, польові культури, фрукти, горіхи та овочі, а також газони та декоративні рослини. Він також зареєстрований як засіб для безпосередньої обробки овець та індиків, конюшень, господарських будівель, комор, комерційних установ [586, 631].

**Фізико-хімічні властивості ХПФ.** ХПФ (IUPAC: O,O-діетил O-3,5,6-трихлоро-2-піридил фосфотіоат; CAS: O,O-діетил O-(3,5,6-трихлоро-2-піридинил) фосфотіоат); номер CAS: 2921-88-2; хімічна формула:  $9\text{H}_{11}\text{Cl}_3\text{NO}_3\text{PS}$  (Рис. 1.8); молекулярна маса: 350,62.

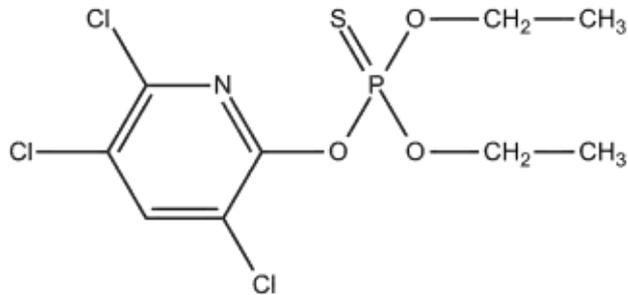


Рис. 1.8. Структурна формула ХПФ.

ХПФ – майже біла кристалічна тверда речовина з сильним ароматом меркаптану. Розчинність його у воді становить 2 мг/л (при 25°C), він добре розчиняється у бензолі, ацетоні, хлороформі, дисульфіді карбону, діетиловому ефірі, ДМСО, метиленхлориді, етанолі та метанолі. Точка плавлення ХПФ знаходиться у діапазоні 41,5–44°C, коефіцієнт розподілу - 4,6990; півперіод гідролізу – 72 дні (при рН 7); півперіод водного фотолізу: 76,9 днів; аеробний водний метаболізм (t<sub>1/2</sub>): 153,8 днів; анаеробний водний метаболізм (t<sub>1/2</sub>): 81,5 днів [242, 735].

**Взаємодія ХПФ з навколишнім середовищем.** ХПФ помірно стійкий у ґрунті та має середній коефіцієнт стійкості та часткового поглинання 8498. Період піврозпаду ХПФ у ґрунті в середньому становить від 60 до 120 днів, однак може варіювати від 2 тижнів до понад року, залежно від типу ґрунту, клімату та інших умов [242]. Завдяки неполярності молекули, він є слабо розчинним у воді (<2 ppm), схильний виділятися з водного середовища та осідати на органічних частках. Згідно з даними досліджень, цей пестицид у воді є нестабільним, а рівень його гідролізу зростає з підвищенням температури – у 2,5-3 рази на кожні 10°C. Гідроліз ХПФ посилюється у лужному середовищі. У воді з рН 7,0 та 25°C період піврозпаду становить від 35 до 78 днів [221, 666, 678].

Відомо, що інші пестициди можуть взаємодіяти з ХПФ з утворенням синергічних, адитивних та/або антагоністичних токсичних взаємодій [346, 631, 677, 712]. Якщо ХПФ присутній у середовищі разом з іншими хімікатами, то їх сумарна токсичність може бути вищою за токсичність окремих компонентів, може видозмінюватися через інші фактори середовища, або, навіть, зменшуватися завдяки присутності у суміші антагоністичних речовин. Різноманітність хімічних взаємодій, про які є доступні дані, показує, що токсичний ефект ХПФ в поєднанні з іншими пестицидами, може бути пов'язаний з багатьма факторами: 1) вид організмів, що піддається впливу; 2) речовини, з яких складається суміш; 3) співвідношення концентрацій ХПФ та інших ксенобіотиків; 4) тривалість впливу речовин.

**Метаболічні шляхи ХПФ.** Метаболізм ХПФ в організмах ссавців ґрунтовно описав його у своїй роботі Ларрі Л. Нідхем [561]. ХПФ активно поглинається через шлунково-кишковий тракт з їжею, в легенях при вдиханні або через шкіру при потраплянні на неї.

ХПФ не має значного потенціалу біоаккумуляції. У щурів при його оральному надходженні – 90% ксенобіотика виводиться з сечею, 10% – з фекаліями [688]. Основний метаболіт, виявлений у сечі щурів після одноразового прийому ХПФ – трихлорпіридинол (ТХП), який не інгібує холінестеразу та не є мутагеном. Відомо, що у щурів, собак та інших тварин детоксикація відбувається швидко [688]. Після одноразового перорального прийому період піврозпаду ХПФ у крові становить близько 1 доби [688].

У печінці ХПФ активується залежною від цитохрому Р450 десульфуратацією з утворенням ХПФ-оксону. Цей оксон швидко гідролізується до 3,5,6,-трихлор-2-піридинолу та діетилфосфату мікросомальними естеразами, що включають РОН1 та ХПФ-оксоназу, або неензиматичним гідролізом (Рис. 1.9.). Виявлення метаболітів ХПФ у сечі ускладнено тим, що ті самі речовини належать до нормальних метаболітів організму ссавців [235, 561, 612-614].

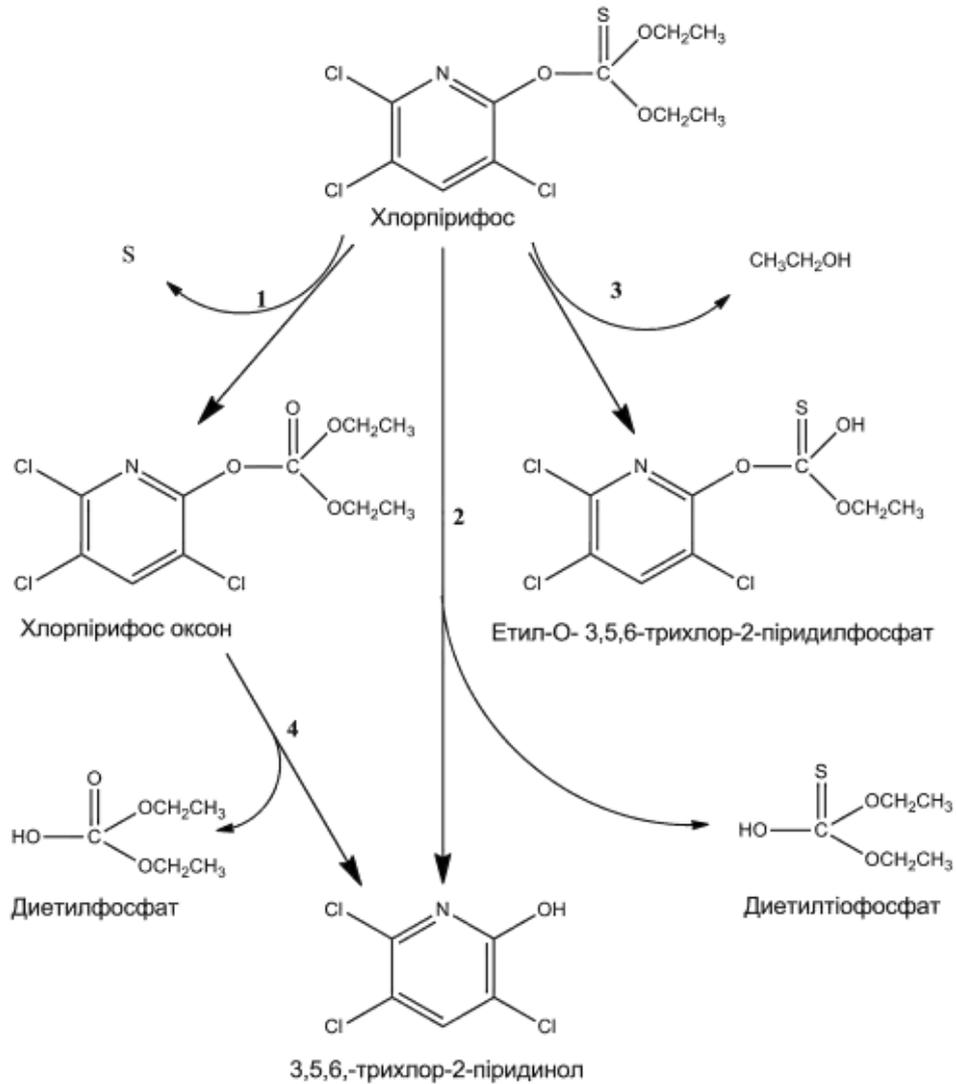


Рис. 1.9 Метаболічні шляхи хлорпірифосу (адаптовано із [606]).

**Загальні токсикологічні характеристики ХПФ.** Як вже було зазначено, ХПФ використовується для знищення комах, однак він токсичний також і для більшості інших живих організмів, у т.ч. для людини. Відомі  $LD_{50}$ -دوزи для ссавців у разі гострого отруєння вказують на те, що ХПФ є помірно токсичним для малих ссавців при гострому оральному надходженні. Оральна  $LD_{50}$  для щурів коливається в межах від 95 до 270 мг/кг [629, 724]. Для мишей  $LD_{50}$  ХПФ становить 60 мг/кг, для кролів – 100 мг/кг, для курчат – 32 мг/кг, для морських свинок – 500-504 мг/кг, для овець – 800 мг/кг [684]. Дermalна  $LD_{50}$  становить понад 2000 мг/кг для щурів та від 1000 до 2000 для кролів.  $LD_{50}$  при 4-годинній інгаляції для щурів становить понад 0,2 мг/л [705]. Для птахів токсичність ХПФ варіює від помірної до високої [742]. Визначені технічні значення  $LD_{50}$  для гострого орального прийому для птахів

різних видів становлять від 5,62 до 476 мг/кг [742]. ХПФ є дуже токсичним для риб та водних безхребетних [309, 354]. У тестах гострої токсичності у них було виявлено інгібування АХЕ за дуже низьких концентрацій цього ксенобіотика. Токсичність ХПФ для риб може залежати від температури води.

Дослідження на тваринах показали, що системна токсичність ХПФ для новонароджених є дуже високою, а  $LD_{50}$  для них є на порядок нижчою, ніж для дорослих організмів [543, 602, 603, 743]. Для людини ХПФ вважається помірно токсичним [360, 389, 679]. Отруєння ХПФ може вражати нервову, серцево-судинну та дихальну системи. Він також подразнює шкіру та очі [316, 387, 389].

Тривале або повторне потрапляння ХПФ до організму може спричиняти ті самі ефекти, що й гострий вплив, включаючи відтерміновані симптоми. Зокрема, у персоналу, які працюювали з ХПФ описані випадки погіршення пам'яті та концентрації уваги, дезорієнтації у просторі, важких депресій, дратівливості, запаморочень, головного болю, проблем мовлення, лунатизму, надмірної сонливості або, навпаки, безсоння [252, 541, 629].

**Нейротоксичність ХПФ.** АХ відіграє важливу роль в розвитку мозку та всієї ЦНС [488, 489, 742]. Тому інгібування АХЕ та наступна акумуляція АХ імовірно можуть порушувати цей розвиток. В той самий час, молоді щурі швидше відновлюються після інгібування АХЕ, ніж дорослі, що пояснюється перш за все активнішим синтезом у них нових молекул АХЕ [602, 603, 689].

Більшість неврологічних симптомів отруєння ХПФ є наслідками інгібування АХЕ та наступної надмірної холінергічної стимуляції. Основні симптоми, пов'язані з надмірною холінергічною активністю, включають головний біль, потовиділення, нудоту, блювоту, діарею, спазми в очеревині, брадикардію, порушення зору, міоз, бронхоспазм та надлишкову секрецію слизової, набряк легенів, задишку, м'язові спазми, слино-, сльозотечу, нетримання сечі [488]. У дорослих та дітей короточасне вдихання невизначених концентрацій ХПФ пов'язане з парестезіями та запамороченням [665, 629, 680]. Окрім того, короткотривалий вплив ХПФ може викликати появу ознак нейротоксичності за тижні чи місяці після зникнення початкових симптомів.

Водночас, відновлення після отруєння ХПФ, якщо таке відбувається, є значно повільнішим навіть у порівнянні з іншими ФОС. Також було показано, що ХПФ викликає погіршення когнітивних функцій у щурів після гострого та повторного введення, а також викликає відстрочені сенсорні невропатії у людини [724]. Крім того, ступінь інгібування АХЕ не корелює з настанням токсичного ефекту чи дозою. Ці дані підтверджують нові підходи до розгляду додаткових механізмів токсичності ХПФ [724].

Результати досліджень А.В. Террі показують, що поріг виникнення неврологічних наслідків (який зазвичай асоціюють з вищими дозами ХПФ) може бути підвищеним при введенні підпорогових доз ФОС, навіть таких речовин як ХПФ, які зазвичай вважаються помірно токсичними. Одним з можливих механізмів цього є пролонговане інгібування швидкого аксонального транспорту [724].

Важливо також зазначити, що сам ХПФ може мати нейротоксичні властивості навіть за відсутності перетворення в оксон чи інші метаболіти. Хоча багато наслідків токсичного впливу ХПФ вважаються оборотними після припинення надходження токсиканта, спостереження цитотоксичності *ex vivo* показують, що за певних умов введення деякі впливи можуть бути тривалими [724].

Існує гіпотеза про те, що ХПФ та його метаболіти видозмінюють протеїновий транскрипційний фактор  $Ca^{2+}/cAMP$  (CREB – cAMP response element-binding protein), ключову молекулу в розвитку та функціонуванні мозку [660]. Вказується на те, що зміни CREB відбуваються незалежно від інгібування АХЕ. Було проведено вестерн-блот аналіз лізатів первинної культури нейронів кори, які були піддані впливові ХПФ, ХПФ-оксону та трихлорпіридинолу (ТХП) протягом години. У культурах, отруєних ТХП, протягом тижня спостерігалось зниження рівня фосфорильованої (активованої) форми CREB (pCREB), без значних змін у загальному вмісті CREB чи  $\alpha$ -тубуліну. Потрібно відмітити, що рівень pCREB у нейронах кори зріс на 300-400% порівняно до контрольних рівнів. Рівень pCREB у нейронах гіпокампу також зріс після впливу ХПФ, однак pCREB у культурі астроцитів змін не зазнав. Включення інгібітора Р-450 SKF-525A не пригнічувало впливу ХПФ на рівень pCREB, що свідчить про те, що метаболізм ХПФ та

ХПФ-оксону не обов'язково викликає зростання pCREB. Виявлене у цьому дослідженні зростання pCREB свідчить про те, що ХПФ та його метаболіти можуть бути активними в кількостях, значно нижчих за ті, які інгібують АХЕ. Це може пояснити багато змін у розвитку нервової системи та поведінці, пов'язаних з токсичністю ХПФ [660].

Накопичені дані, перш за все стосовно гризунів, показують, що гостре чи тривале введення ХПФ та/або його метаболітів може суттєво пошкоджувати ЦНС чи спричиняти помітні зміни у функціонуванні нейронів, що зберігаються після припинення впливу, особливо протягом раннього постнатального періоду [274, 281, 682, 684, 685, 743]. Схоже на те, що або токсичний вплив на розвиток нейронів не залежить від інгібування АХЕ, або навіть короткий період впливу інгібування АХЕ може впливати на токсичність [679, 681]. Неодноразово демонстрували, що токсичність ХПФ не обмежується інгібуванням АХЕ, а може також включати інші механізми. Наприклад, у дослідженнях *in vitro* та *in vivo* на трьох рівнях розвитку від ДНК до клітини та цілого тваринного організму було показано, що ХПФ значно більш токсичний, ніж вважалось раніше, через більшу кількість варіантів активності [612]. ХПФ порушує зв'язування з ДНК ядерних факторів транскрипції (AP-1 та Sp1), які управляють реплікацією та диференціацією клітини. Також ХПФ діє на внутрішньоклітинні сигнальні каскади, що беруть участь у клітинній диференціації.

Відомо, що ХПФ може викликати поведінкові порушення у щурів на 2 та 3 постнатальних тижнях [316, 496, 553], що відповідає періоду новонародженості у людини [724]. Цей період виходить за межі основного часу нейрогенезу у більшості регіонів мозку, але є часом піку гліо- та синаптогенезу. Згідно з деякими авторами, глія, що розвивається, є навіть більш чутливою до дії ХПФ, ніж нейрони [389, 612, 614].

Порушення, викликані пренатальним впливом ХПФ, спостерігаються навіть за доз, нижчих від порогу виявлення інгібування АХЕ, наприклад, значно нижчих за 70% інгібування АХЕ, необхідного для розвитку системної токсичності у дорослих [316, 630]. Ці дані свідчать, що за нейротоксичний

вплив ХПФ на розвиток можуть відповідати й інші механізми, окрім інгібування АХЕ [309, 496, 553, 679].

### **1.3 Карбофуран: загальна характеристика, шляхи надходження до організму та механізми їх токсичної дії**

КФ є одним з найтоксичніших представників карбаматних сполук. КФ (синоніми: адіфур, бетафур, брифур, дайфуран, карборан, куратер, фуран, фурадан, хінуфур) відомий перш за все, як метил-карбаматний інсектицид широкого спектру дії. На світовому ринку КФ вперше з'явився 1965 року. Майже за півстолітню історію свого застосування КФ став надзвичайно популярним пестицидом в усьому світі. Так тільки у Сполучених Штатах ще донедавна річний об'єм його використання сягав 1 мільйона фунтів [704, 716, 766]. Також у США зареєстровано ще 11 N-метил карбаматів, дія яких аналогічна ефекту КФ [533]. Проте, починаючи з липня 2008 року, КФ в США поступово виводиться з ужитку і невдовзі має буде повністю заборонений. Водночас, стали значно строгішими вимоги до вмісту залишкових кількостей цього пестициду у воді та продуктах харчування, оскільки КФ визнано небезпечним для дітей [704]. Агенство з охорони навколишнього середовища США вже заборонило продаж вітчизняної та імпортової продукції, у якій можуть бути сліди КФ. В Україні КФ продовжують використовувати, хоча з 2011 року він офіційно недозволений.

КФ (2,3-дигідро-2,2-диметилбензофуран-7-іл метилкарбамат; CAS: 2,3-дигідро-2,2-диметил-7-бензофураніл метилкарбамат,  $C_{12}H_{15}NO_3$ , молекулярна маса 221,26) [125, 472, 766] є кристалічною речовиною білого кольору з легким феноловим запахом, відноситься до групи карбаматів, похідних карбамінової кислоти. Його розчинність у воді при 20°C становить 320 мг/л. У інших речовинах

КФ має наступну розчинність при 25°C: в ацетоні – 150 г/кг, ацетонітрилі – 140 г/кг, бензолі – 40 г/кг, диметилсульфоксиді – 270 г/кг, циклогексаноні – 90 г/кг та 200 г/л у дихлорметані при 20°C. При кімнатній температурі КФ нестабільний у лужних розчинах, але стабільний у нейтральних та кислих. При 20°C його DT50 (період піврозпаду) становить більше місяця при рН 4, 121 день при рН 7 та 31 годину при рН 9. При нагріванні з лугами і кислотами КФ швидко розкладається, а в спиртових розчинах лугів він розкладається при кімнатній температурі. Руйнується під дією гіпохлориту кальцію.

КФ та його препаративні форми відносяться до високотоксичних хімічних речовин. Відомо, що при ентеральному та інгаляційному шляхах надходження в організм, даний пестицид проявляє резорбтивно-токсичну і подразнюючу дію на слизові оболонки дихальних шляхів та очей [110, 126, 210, 283]. ЛД<sub>50</sub> КФ для щурів становить 8,0 мг/кг, для мишей – 14,4 мг/кг, собак – 15,0 мг/кг), а інгаляційна токсичність (ЛК<sub>50</sub> (4 год.) для щурів – 0,075 мг/л повітря (аерозоль)). Інгаляційна СК<sub>50</sub> або – середня смертельна концентрація, КФ для ссавців (щурі) становить 0,05 мг/л, для риб гостра 96-годинна СК<sub>50</sub> – 0,362 мг/л, а цей же показник для донних мікроорганізмів перебуває в межах 0,015-0,017 мг/л [358].

Механізм токсичної дії похідних карбамінової кислоти, в тому числі – КФ вивчений досить добре. Загальновідомо, що за механізмом дії КФ є зворотнім інгібітором АХЕ (Рис. 1.10.).

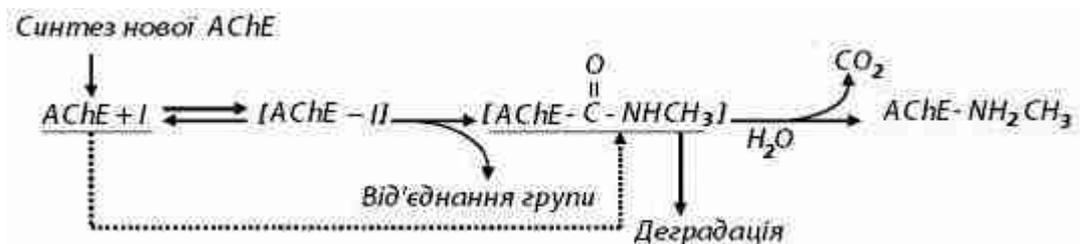


Рис. 1.10. Схема інгібування ацетилхолінестерази карбофураном і його метаболітом 3-гідроксикарбофураном. I – інгібітор (карбофуран або 3-гідроксикарбофуран). [766].

КФ крім комах і найпростіших є також високотоксичний для людини і теплокровних тварин при пероральному та інгаляційному надходженні. В

умовах хронічного впливу КФ призводить до загально токсичної дії на організм з переважним впливом на холінореактивні системи, проявляє канцерогенну та ембріотоксичну активність, репродуктивну токсичність [110, 210, 215, 283, 327, 473, 533, 580, 594, 604, 757, 755, 760]. Нещодавніми дослідженнями було встановлено, що КФ викликає хромосомні аберації у мишей [297], а у N-нітрозокарбофурану показані мутагенні властивості [757]. Ці та інші факти підкреслюють надзвичайно високу різнопланову токсичність карбофурану на живий організм [52, 69, 132, 297, 358, 365, 718].

Метаболізм карбофурану протікає аналогічно до інших арилових ефірів N-метилкарбамінової кислоти. Основними метаболічними перетвореннями є окиснення і гідроліз (рис. 1.11.). Після зворотнього зв'язування КФ АХЕ, її реактивація відбувається повільно.

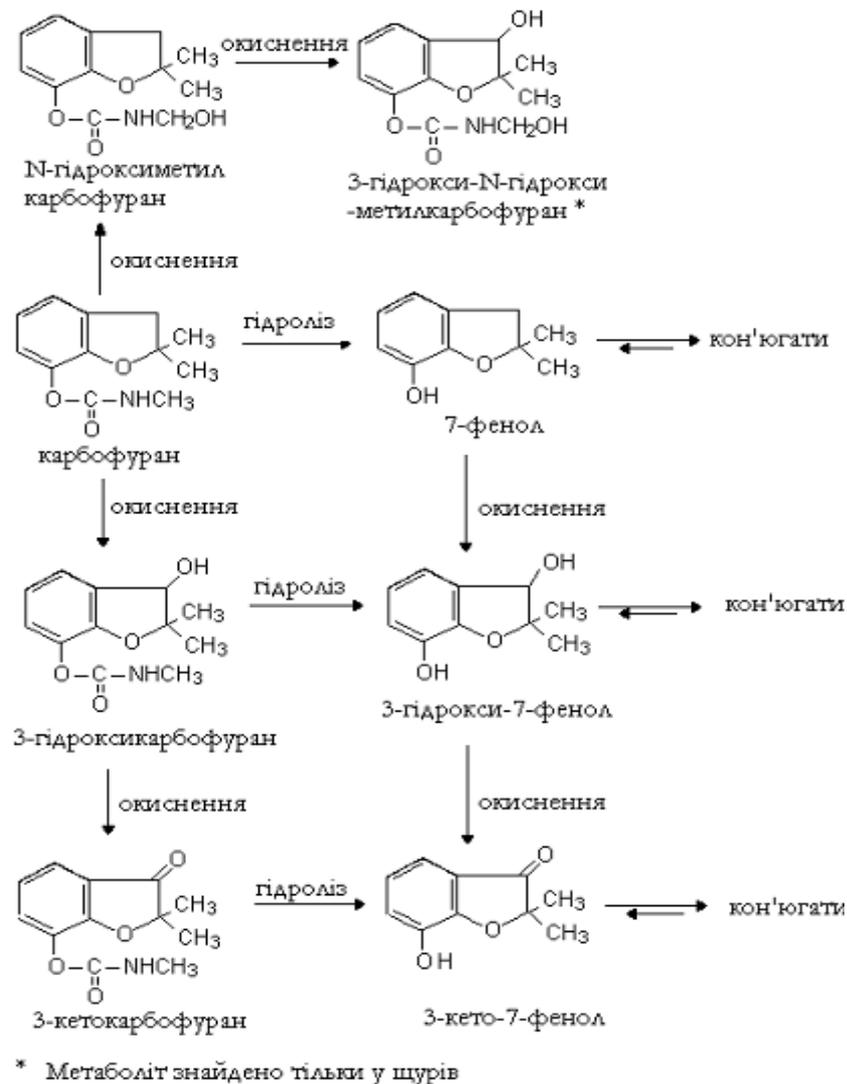


Рис. 1.11. Метаболізм карбофурану

## 1.4 Вільнорадикальні явища та біохімічні особливості про-, антиоксидантних процесів у механізмах нейротоксичності

**1.4.1 Оксидативний стрес та його біохімічні особливості.** Переважна більшість організмів для забезпечення своїх енергетичних потреб та інших процесів життєдіяльності потребує великої кількості Оксигену. Життя без нього за винятком анаеробних організмів неможливе. Парадоксально, але цей самий хімічний елемент є джерелом так званих активних форм Оксигену (АФО), які, навпаки, є надзвичайно токсичними для живої клітини [21, 23, 236, 301, 384, 471, 493, 515, 516, 518-520, 562, 576-579, 584, 595, 674]. Токсичність і хімічна активність Оксигену залежить від його електронної структури. Ідентичні спінові стани його двох зовнішніх електронних орбіталей забезпечують кінетичну стабільність Оксигену, за винятком тих випадків, коли у присутності відповідного каталізатора ці стани порушуються, що призводить до часткового відновлення Оксигену. Частково відновлені форми Оксигену мають вищу активність тому, що вільні радикали є дуже нестабільними і у зв'язку з цим мусять або приймати, або бути донором електронів. Отже, вільні радикали – це атоми чи молекули, що мають на зовнішній орбіталі один або декілька неспарених електронів. Ця властивість пов'язана з високою реакційною здатністю і спорідненістю до хімічних реакцій. У 1956 р. Harman запропонував «вільнорадикальну теорію» процесу старіння [176, 567, 595]. Він припустив, що вільні радикали, які утворюються під час аеробного дихання, мають шкідливий вплив на клітинні компоненти і сполучні тканини, викликає старіння і зрештою смерть. Він спочатку припускав, що вільні радикали утворюються у реакціях за участю молекулярного Оксигену, які каталізуються окисними ензимами клітин [9, 10, 421]. У 1972 році Harman включив участь мітохондрій у фізіологічні процеси старіння. Близько 90% всього Оксигену в клітині споживається мітохондріями, особливо їх внутрішньою мембраною, де відбувається окисне фосфорилування [421]. Оксиген бере участь в окисненні органічних сполук і

виробництві енергії, необхідної для життєдіяльності клітини. Проте, лише дуже невелика частка спожитого Оксигену (від 2 до 5%) відновлюється, внаслідок чого виникає значна кількість високо реакційно здатних сполук, відомих як вільні радикали або АФО, а також АФН.

Існує багато різновидів АФО, включаючи синглетний Оксиген, Гідрогену пероксид ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) і оксигенні радикали – супероксидний аніон-радикал ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), гідропероксидний ( $\text{HO}_2^{\bullet}$ ) і гідроксильний радикал ( $\text{OH}^{\bullet}$ ), які утворюються в процесі відновлення молекулярного Оксигену. Сучасний термін АФО охоплює, як радикали Оксигену так і молекули, які у них трансформуються ( $\text{O}_3$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2$ ) (Рис 1.12) [384, 415, 515].

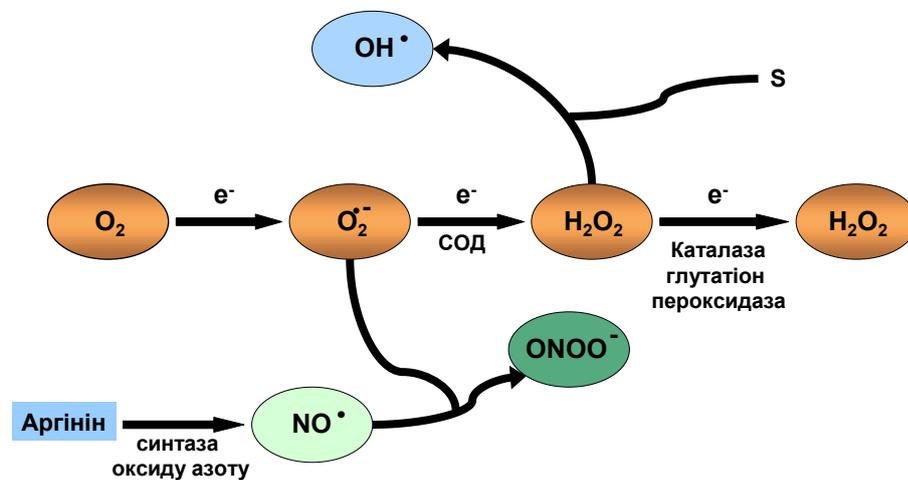


Рис 1.12 Схема утворення АФО за [222].

АФО відрізняються за своєю реакційною здатністю, зокрема, гідроксильний радикал ( $\text{OH}^{\bullet}$ ) є одним з найбільш реактивних. Саме завдяки своїй великій реакційній активності АФО хімічно взаємодіють з біомолекулами, часто призводячи тим самим до змін у нормальному функціонуванні клітини, а то і до клітинної смерті (Рис. 1.13) [44, 384, 515].

Гідроксил ( $\text{HO}^{\bullet}$ ) є найбільш руйнівним з клітинних вільних радикалів. Він є нестійким, з середньою тривалістю життя кілька мілісекунд, і тому рідко виявляється *in vivo*. Ці радикали часто атакують молекули шляхом відщеплення Гідрогену. Інтенсивні і часті атаки цього радикала можуть

викликати пошкодження ДНК, РНК, протеїнів, ліпідів і клітинних мембран ядра і мітохондрій [9, 22, 24, 199, 516, 519, 721].

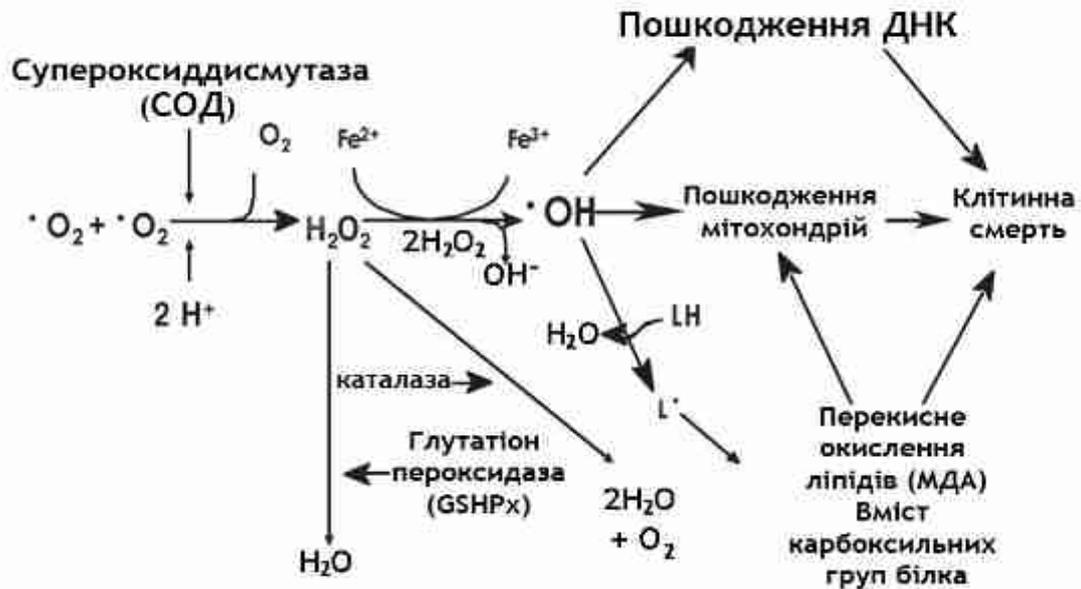


Рис. 1.13 Узагальнена схема механізму оксидативного пошкодження клітин.

Примітка. Противагою дії вільних радикалів є функціонування трьох антиоксидантних ензимів - СОД, КАТ і ГПО, але утворення гідроксильних радикалів з гідропероксидів спричиняє розвиток оксидативного пошкодження клітин через пошкодження ДНК, карбоксилювання протеїнів і активацію ПОЛ, що в кінцевому результаті призводить до клітинної смерті [390].

Утворення супероксиду ( $O_2\cdot$ ) відбувається в основному усередині мітохондрії в електрон-транспортному ланцюзі, коли деяка незначна кількість електронів відщеплюється з формуванням  $O_2\cdot$  аніону. Дослідження субмітохондріальних часток показали, що близько 1-3% всіх електронів електрон-транспортного ланцюга відщеплюються, утворюючи  $O_2\cdot$  замість перетворення Оксигену на воду. Супероксиди є відносно нестабільними, з періодом напіврозпаду порядку кількох мілісекунд. Їх зарядженість ускладнює проходження клітинних мембран, але вони можуть, наприклад відновлювати іонізоване залізо та його протеїнові комплекси і призводити до пошкодження амінокислот або втрати функції протеїну, крім того  $O_2\cdot$  задіяний у дуже багатьох фізіологічних і патофізіологічних процесах організму [5, 7, 9, 10, 35, 36, 37, 384, 722, 737].

З іншого боку, молекули Гідрогену пероксиду ( $H_2O_2$ ) не містять непарних електронів – отже, вони не належать до вільних радикалів. У фізіологічних умовах утворення  $H_2O_2$  становить  $\sim 2\%$  від загального споживання Оксигену організмом [384]. Хоча  $H_2O_2$  не є вільним радикалом, однак є дуже шкідливим, оскільки виступає в якості проміжного продукту в реакціях утворення  $HO\cdot$  - наприклад, реакції Фентона [11, 12, 199].

Гідрогену пероксид має тривалий період напіврозпаду і здатний перетнути кілька ліпідних шарів і реагувати з перехідними металами і деякими гемопротейнами. Він також може викликати хромосомні зміни, руйнування ланцюга ДНК і, за відсутності каталізаторів, окиснення сульфгідрильних сполук ( $-SH$ ) [22, 45, 47, 49, 56, 80, 515, 567].

Оксид Нітрогену є відносно поширеним вільним радикалом, відіграє роль важливого біологічного сигналу в деяких фізіологічних процесах, у тому числі у нейротрансмісії, регуляції кров'яного тиску, захисних механізмах, розслабленні гладеньких м'язів та імунній регуляції [493].  $NO$  має низьку реакційну спорідненість до більшості біомолекул, але легко реагує з іншими вільними радикалами. Оксид Нітрогену не надто активно атакує безпосередньо ДНК, але може реагувати з виробленим фагоцитами  $O_2\cdot$  з утворенням пероксинітриду. Пероксинітрид, з іншого боку, є продуктом дифузійно-контрольованої реакції  $NO$  з  $O_2\cdot$  радикалом. Пероксинітрид є недовгоживучим окислювачем і потужним індуктором загибелі клітин [717, 722]. Що стосується  $NO$ , то він може брати участь у вторинних реакціях з утворенням агентів, які можуть нітрувати ароматичні амінокислоти (наприклад, перетворюючи тирозин на ніротирозин) і основи ДНК, особливо гуанін [47].

Шкідливий вплив вільних радикалів на організм викликає ряд механізмів захисту. Ці механізми включають в себе видалення вільних радикалів каталазою (КАТ), супероксиддисмутазою (СОД), глутатіонпероксидазою (ГПО), глутатіонредуктазою (ГР), глутатіонтрансферазою (ГТ) і неензиматичними антиоксидантами. У нормальних умовах на внутрішньоклітинному рівні існує баланс між про- та антиоксидантною дією. При вільнорадикальному

пероксидному окисненні разом з АФО утворюється цілий ряд інших активних радикалів – пероксиди, епоксиди, альдегіди, кетони, спирти, диальдегіди та інші, які здатні ковалентно взаємодіяти з окремими функціональними групами протеїнів, що призводить до їх полімеризації і руйнування амінокислотних залишків, особливо тих, які містять SH, SCH<sub>3</sub>- групи цистеїну, метіоніну, NH-групи лізину, тощо. Такі явища можуть спричиняти порушення структурних і функціональних властивостей мембран шляхом зміни фосфоліпідного складу, появи у гідрофобній частині продуктів окиснення, які активують процеси іонного транспорту, зміну конформації протеїнів і ліпідного складу [12]. Також відомо, що вільні радикали можуть безпосередньо взаємодіяти з азотистими основами ДНК, утворюючи їх модифіковані похідні, зокрема, 8-азагуанін. Можлива також опосередкована дія вільних радикалів на ДНК через вторинні та кінцеві продукти ПОЛ (МДА і його похідні), які можуть зв'язуватися з ДНК та протеїнами ядерного хроматину, призводячи тим самим до помилок у процесах зчитування генетичної інформації – реплікації і транскрипції [12, 43]. АФО можуть діяти у клітині на різні субстанції, включаючи протеїни, ліпіди, ДНК, РНК. Продуктами окиснення поліненасичених жирних кислот, особливо арахідонової і докозагексаєнової кислот, на які багатий мозок, є МДА і 4-гідроксиноненал. АФО пошкоджують протеїни, окиснюючи їх ланцюги. На нуклеїнові кислоти АФО діють різними шляхами, зокрема, модифікуючи пуринові і піридинові основи [384]. Потенційний ензиматичний ресурс АФО включає в себе компоненти мітохондріального транспортного ланцюга, ксантин оксидазу, р450 цитохром-монооксигенази, ліпоксигеназу, нітрооксид (NO) синтазу і NADH оксидазу (рис. 1.14). Низькі рівні як внутрішньо- так і зовнішньоклітинних АФО є необхідною передумовою для протікання багатьох біохімічних реакцій, включаючи внутрішньоклітинні сигнальні процеси, протимікробний захист та інші [74-76, 106, 376, 377, 395, 485, 505, 506, 542, 569, 571, 572, 717, 736].

На противагу цьому, високі дози, або ж навпаки – дефіцит АФО, особливо супероксидного аніон-радикалу, спричиняють виникнення такого небезпечного

явища, яке отримало назву «оксидативний стрес» [11, 12, 14, 21-24, 48, 51, 60, 113, 175, 189, 199, 222, 236, 331, 348, 355, 384, 417, 451, 502, 516, 567, 575, 632, 694].

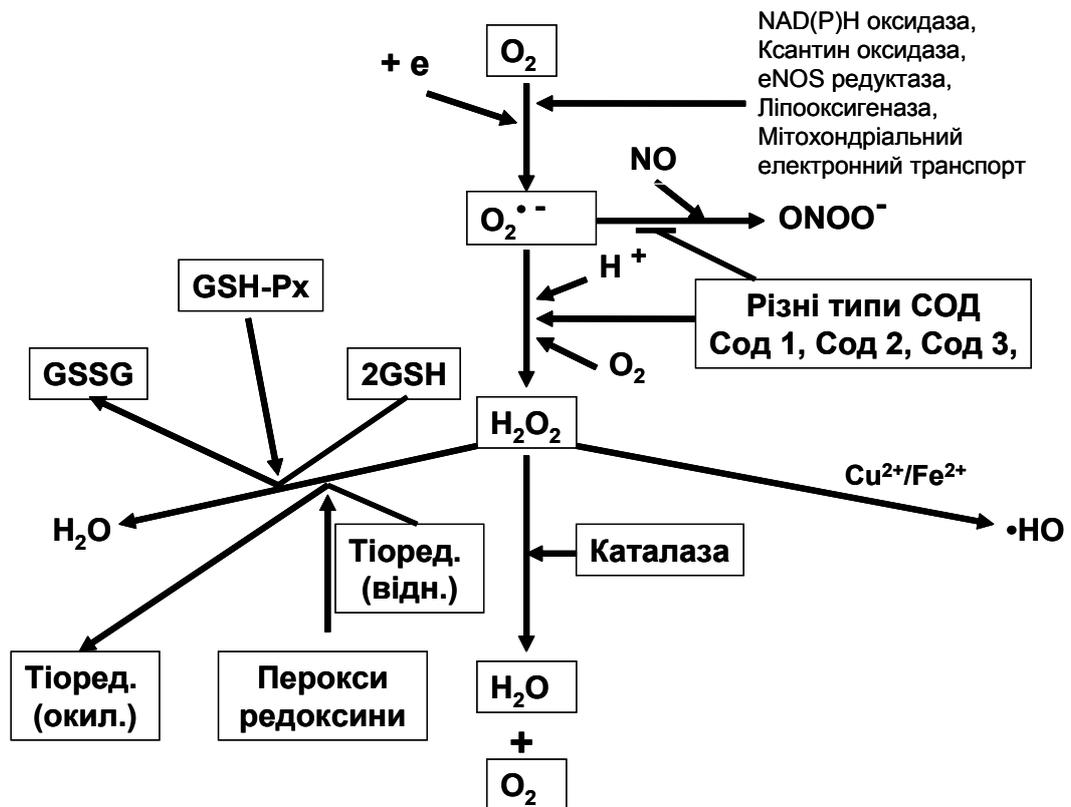


Рис. 1.14 Схема утворення і метаболізму АФО [376].

Його можна охарактеризувати, як умови, коли баланс між продукцією АФО і рівнем антиоксидантів є порушений. Таким чином, оксидативний стрес визначається як дисбаланс окиснювачів (вільних радикалів); в свою чергу, нітрозативний стрес спричиняється процесами, за яких потоки NO стають достатньо потужними, щоб призвести до нітрузування амінів, тіолів та антиоксидантів, що призводить до відносного або абсолютного переважання окислювачів, а це, у свою чергу, призводить до порушення передачі сигналів та окисно-відновної регуляції і/або молекулярних пошкоджень [417, 452]].

Оксидативний стрес, АФО і АФН часто взаємопов'язані з широким спектром патологічних процесів організму [46, 55, 73, 368, 452, 502]. У контексті нейротоксичності слід перш за все мати на увазі, що оксидативний стрес може спричинити пошкодження нейрональних мембран токсичними вільними радикалами Оксигену і продуктами ПОЛ. Це, у свою чергу, є одним з ключових

механізмів загибелі нервових клітин, поряд з такими явищами, як ексайтотоксичність (пошкоджуюча дія на нейрони підвищених концентрацій збудливих нейромедіаторів, таких, як глутамат, аспартат, та ін.); мітохондріальна дисфункція; гіперекспресія ранніх генів; дефіцит нейротрофічних факторів, що ініціюють нейроапоптоз [137, 582, 599, 748, 739, 753].

В історичному аспекті лєвова частка досліджень, присвячених ендogenousному оксидативному стресові ґрунтується на так званій мітохондріально-вільнорадикальній теорії старіння, запропонованій американським вченим Д. Харманом ще у 1972 р. [368, 421]. Згідно його теорії, утворення ендogenousних вільних радикалів, як побічних продуктів мітохондріального метаболізму призводить до прогресуючих пошкоджень у клітинах різних систем і органів, які в результаті переростають у пов'язані з віком патології, в тому числі нейродегенеративні [204, 208, 293, 307, 368, 415, 467, 471, 595]. Проте, сьогодні теорія Хармана не дає вичерпних відповідей на низку запитань, зокрема: які рівні вільних радикалів пошкоджують фенотип; чи всі радикали однаково токсичні; чи існують специфічні протеїни, ліпіди чи нуклеїнові кислоти, які є особливо вразливі до пошкоджуючої дії радикалів; яка межа присутності вільних радикалів у різних типах клітин і тканин при різних метаболічних станах? У своєму огляді [368] американські вчені Джеймс М. Флін і Сімон Мелов пишуть: «ми відчуваємо, що саме такі запитання, а також багато інших нюансів роблять цю теорію значною мірою неперевіреною. Сучасні теорії, що намагаються пояснити ключові механізми патобіології старіння, зокрема пов'язаних з віком нейродегенеративних захворювань, часто включають оксидативний стрес, як частину глобальнішої схеми патологічних процесів, а не фокусуються лише окремо на ньому».

Отже, як ми вже відзначали, Оксиген може бути потенційно небезпечним для аеробних організмів, які захищаються від нього так званою системою антиоксидантного захисту [338, 340, 355, 361, 384, 417, 437, 519]. Оксиген володіє надзвичайно потужним редокс-потенціалом, що забезпечує його відмінні

оксидативні властивості через здатність приймати електрони від відновлених субстратів. Залежно від метаболічних особливостей відрізняється потреба різних тканин і систем організму в Оксигені.

**1.4.2 Оксидативний стрес і функціонування ЦНС.** Утворення вільних радикалів пов'язане зі шкодою, заподіяною клітинним структурам, і розвитком таких патологічних станів ЦНС, як хвороба Паркінсона, інсульт, деменція, епілепсія [340, 351, 357, 361, 417, 429, 445, 486, 504, 507, 508, 591, 592, 567, 764]. ЦНС вельми чутлива до оксидативного стресу через високий рівень споживання нею Оксигену і низьку активність антиоксидантного захисту [415, 417, 502]. ЦНС має надзвичайно високий рівень метаболізму і в стані спокою поглинає близько 20% Оксигену, який вдихається організмом, хоча на її частку припадає лише 2% маси тіла [605].

Цей величезний метаболічний попит пояснюється тим, що нейрони є дуже диференційованими клітинами, і їм необхідна значна кількість АТФ для підтримки іонних градієнтів у клітинних мембранах та нейротрансмісії. Оскільки більшість АТФ у нейронах генерується за допомогою окисного метаболізму, то ці клітини є у значній мірі залежними від функції мітохондрій і надходження Оксигену [731, 732] (Рис. 1.15). Функції мітохондрій, в тому числі синтез аденозинтрифосфату (АТФ), окиснення жирних кислот, ексайтотоксичність, контроль апоптозу та некрозу, біосинтез нейротрансмітерів і регулювання гомеостазу цитозольного кальцію, впливають на збудливість нейронів. Мітохондрії є основним місцем продукції АТФ і тому вони надзвичайно вразливі до оксидативного пошкодження [186, 212, 224, 230, 241, 285, 291, 299, 340, 355, 357, 493, 502, 579, 584, 728, 731, 737, 767].

Мозок є органом, який для своєї життєдіяльності і функціонування потребує багато Оксигену. Водночас, клітини мозку, особливо нейрони потребують ефективного антиоксидантного захисту, зокрема тому, що, як вже було сказано, вони використовують приблизно у 10 раз більше Оксигену порівняно з іншими тканинами; крім того, нейрони характеризуються довгою тривалістю життя, і нарешті – у мозку дуже важливу роль відіграє оксид

Нітрогену. NO може утворювати так звані активні форми Нітрогену (АФН), наприклад такі як пероксинітрит. NO може брати участь у нітрозилуванні протеїнів, зокрема, згаданий вище пероксинітрит є високоактивною формою Нітрогену, яка може нітрувати тирозинові залишки протеїнів, змінюючи тим самим їхнє функціонування [384].

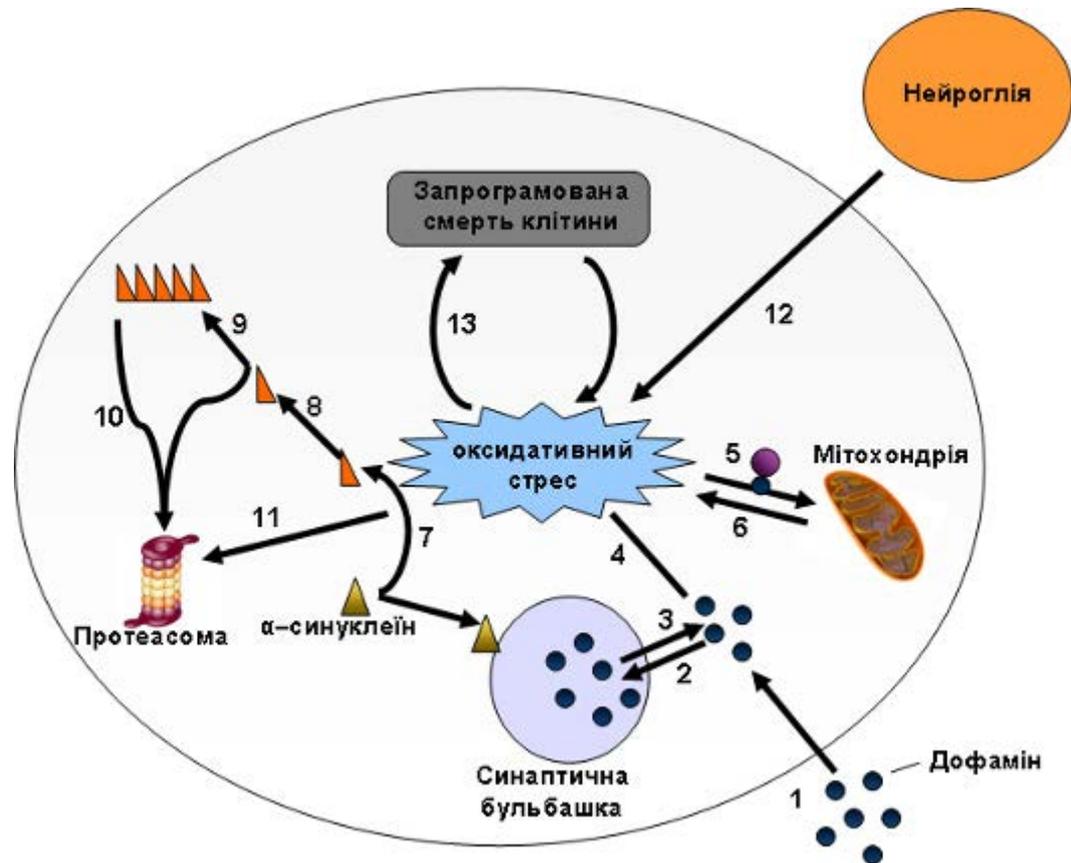


Рис. 1.15 Схематичне зображення можливих шляхів оксидативного стресу у допамінергичному нейроні.

1. Дофамін переноситься за допомогою допамінового транспортеру (DAT) у клітину нейрона; 2. перенесення дофаміну у синаптичні везикули за допомогою транспортеру VMAT2; 3. вивільнення дофаміну із синаптичних везикул за допомогою  $\alpha$ -синуклеїну; 4. окиснення дофаміну до допамін-хінону (DAQ); 5. утворення потенційних мітохондріальних інгібіторів, наприклад кон'югатів 5cysDAQ. 6. мітохондріально спричинений ОС; 7. окиснення  $\alpha$ -синуклеїну; 8. розпад  $\alpha$ -синуклеїну в протеосомах; 9. олігомеризація  $\alpha$ -синуклеїну; 10. токсична взаємодія  $\alpha$ -синуклеїну з протеосомою; 11. взаємодія продуктів ОС (таких як 4-гідроксिनоненол) з протеосомою; 12. ОС викликаний сусідніми гліальними клітинами та (13) індукція запрограмованої клітинної смерті.

Отже, завдяки своїй високій метаболічній активності і водночас зниженому потенціалу клітинної регенерації порівняно з іншими органами, мозок є особливо чутливим до пошкоджуючої дії АФО. При різних

нейродегенеративних захворюваннях, зокрема, хворобах Паркінсона, Альцгеймера і аміотропному латеральному склерозі були встановлені різні рівні пошкоджень, викликаних АФО у різних відділах головного мозку, які зазнають активної нейродегенерації [222, 236, 243, 273, 299, 351, 362, 384, 417, 445, 451, 502, 584, 664, 697, 759].

Тим не менше, аргумент про зростання оксидативного стресу ще не доводить, що саме він спричиняє нейродегенеративні процеси, які мають місце при згаданих захворюваннях.

### **1.5 Біохімічна роль металів у функціонуванні ЦНС та механізмах нейротоксичності**

В організмі міститься більше 20 мікроелементів. Більшість їх входить до складу органічних сполук (гормони, ензими та ін) і часто обумовлює їх високу хімічну та біологічну активність [1, 668]. Органічні комплекси мікроелементів беруть участь у проміжних процесах обміну речовин, впливаючи на основні функції організму: розвиток, розмноження, кровотворення та ін. Нестача або надлишок певних мікроелементів (Феруму, Кобальту, Купруму, Цинку, Мангану, Бору, Молібдену, Нікелю, Йоду, Фтору, Селену та ін) призводить до порушення обміну речовин і до виникнення ендемічних захворювань [2, 134, 141, 264, 432, 668]. Особливо важливою є роль макро- і мікроелементів у функціонуванні нервової системи [136, 271, 272, 336, 436], тому виділимо основні нейрофізіологічні процеси, в яких вони беруть участь. Отже, мікроелементи беруть участь у формуванні каталітичних центрів і стабілізації регуляторних центрів більш ніж 1000 різних ензимів нервової тканини, що забезпечує підтримку різноманітних енергетичних і пластичних процесів. [42, 398, 513]. Ряд есенціальних мікроелементів (Zn, Fe, Mn, Cu) беруть участь у процесах синтезу численних

нейромедіаторв (катехоламінів), нейропептидів [120]. Синтез всіх відомих на сьогодні нейропептидів йде за обов'язкової участі іонів Mg [41, 481, 624].

Загалом, в останні роки дуже стрімко зростає кількість наукових робіт нейрохімічного спрямування, які присвячені проблемі впливу металів на нервову систему. Неодноразово доведено, що порушення обміну елементів є важливою ланкою в патогенезі багатьох захворювань ЦНС, але, у той сам час, при різних патологічних процесах в нервовій системі мають місце порушення метаболізму хімічних елементів і металів зокрема [42, 272, 278, 305, 329, 336, 436, 451, 475, 479, 480, 532, 551, 610, 713].

Мікроелементи також залучені до антиоксидантних процесів, які впливають на функції нейронів і гліальних клітин: селен-цистеїн бере участь у формуванні активних центрів глутатіонпероксидази і тіоредоксинредуктази [8, 9, 11, 19, 510, 521, 528]. Елементи з антиоксидантними властивостями беруть участь у процесах стабілізації та захисту NMDA-рецепторів, а також аспартатних і гліцинових рецепторів від пошкодження вільними радикалами, токсичними речовинами і ліками [372, 436, 445, 451, 466, 597]. Мікроелементи (Zn, Cu, Se) стабілізують апарат нейрофіламентів і цитоскелету нейронів, що сприяє підтримці пластичного обміну в нервовій тканині [134]. Внутрішньоклітинна механічна, комунікативна і сигнальна функції мікроелементів визначаються роллю деяких іонів (Zn, Mg, Ca) в модуляції активностей тирозинкіназ (внутрішньоклітинне проведення сигналів в процесі життєдіяльності та апоптозу нейронів), а також вивільнення металів в синаптичну щілину з певним ефектом на трансинаптичну передачу нервових потанціалів [42]. Крім того мікроелементи беруть участь в організації, перетворенні та оптимізації процесів осмолярності у нервовій тканині [1].

Дані про розподіл макро- і мікроелементів у різних відділах ЦНС є дуже важливими для профілактики розладів НС та розробки нових підходів до фармакотерапії багатьох неврологічних патологій [50, 178, 191-195, 271-272, 336, 404, 436, 450, 451, 477, 555, 633, 700, 708, 720].

Розподіл хімічних елементів, зокрема металів у різних структурах ЦНС нерівномірний [136]. За вмістом більшості елементів в організмі лідирує головний мозок і особливо кора великих півкуль [1]. Вважають, що вміст металів вищий в ділянках мозку з найінтенсивнішою діяльністю [65]. Роздільне вивчення сірої і білої речовини головного мозку дозволило встановити, що в корі і підкіркових ядрах у зв'язаному з лігандами стані вибірково накопичуються Mg, Cu, Co, Ti, Mn, Mo, V, Zn [398]. Кора головного мозку, займає одне з перших місць за вмістом Купруму, є його своєрідним депо [248, 264, 272, 336]. Порівняно мало в корі міститься Si, Al, Mg [398]. Кількість елементів у різних зонах кори змінюється. Вищий вміст металів виявлено в зоні центру мовлення; в зоні зорового аналізатора; в ядерних зонах рухового аналізатора, у зоні слухового аналізатора виявлено високий вміст Ag, Ti, Cu [398]. Також асиметричним є вміст металів у різних півкулях головного мозку. У людини ліва півкуля головного мозку домінує у функціональному відношенні і містить більше Fe, Cu, Mn, ніж права [398]. Біохімічна асиметрія мозку, в тому числі асиметричний розподіл у ньому хімічних елементів ймовірно пов'язані з асиметрією функціонального призначення великих півкуль. Наразі не встановлені міжпівкульні відмінності у вмісті Co, Rb, Se, Zn, Cr, Ag, Cs [42]. Серед структур стовбура мозку найвищою концентрацією Fe, Cu, Mn, Co, Ni, Pb, Ag, Ti характеризується довгастий мозок [1]. Можливо, це пов'язано з великою біохімічною активністю стовбура мозку [398]. Гіпоталамус містить менше хімічних елементів, ніж підкіркові і стовбурові структури, а кількість елементів у передніх відділах гіпоталамуса вища, ніж у задніх [272]. При вивченні внутрішньоклітинного розподілу елементів в клітинах головного мозку встановили, що найбільша кількість металів локалізується в мітохондріях (до 30%), в ядрах (до 10%), мікросомах (до 6%) нейронів [120].

## **1.6 Біохімічна роль деяких металів у механізмах виникнення оксидативного стресу та функціонуванні системи антиоксидантного захисту.**

Детальні дослідження останніх двох десятиліть показали, що такі метали як Ферум, Купрум, Кадмій, Хром, Ртуть, Нікель, Ванадій та деякі інші мають здатність до утворення реакційноздатних радикалів, внаслідок чого виникає пошкодження ДНК, перекисне окислення ліпідів, виснаження білкових сульфгідрилів та інші порушення [267, 345]. До реактивних радикалів належить широкий спектр радикальних форм Оксигену, вуглецю, сірки, що походять від супероксидного радикалу, перекису водню та ліпідних пероксидів, а також хелати амінокислот, пептиди і протеїни в комплексі з токсичними металами. Токсичні ефекти металів включають гепатотоксичність, нейротоксичність і нефротоксичність [61, 65, 100, 112, 197, 341, 342, 382, 397, 398, 404, 436, 450, 452, 458, 477, 513, 616, 633, 699].

Метал-опосередковане утворення вільних радикалів викликає модифікації основ ДНК, посилення перекисного окислення ліпідів та зміни кальцієвого і сульфгідрильного гомеостазу. Пероксили ліпідів, які утворюються внаслідок атак вільних радикалів на залишки поліненасичених жирних кислот у фосфоліпідах, можуть далі вступати в реакцію з окисно-відновними металами, і в результаті утворюються мутагенні та канцерогенні сполуки: малондіальдегід, 4-гідроксиноненаль та інші екзоциклічні аддукти ДНК (етено- та/або пропано-аддукти).

Оксид Нітрогену (NO) бере участь у арсеніт-індукованому пошкодженні ДНК та інгібуванні вирізання піримідину. Численні дослідження підтвердили, що метал-активовані сигнальні шляхи і канцерогенна дія металів в основному пов'язані з активацією редокс-чутливих факторів транскрипції, а саме NF-карраВ, AP-1 і p53. Деякі важливі перехідні метали, такі як Цинк, Ферум, Купрум, Кобальт і Манган, беруть участь у контролі багатьох метаболічних і сигнальних

шляхів. Проте, різноманіття окисно-відновних властивостей дозволяє їм уникати контрольних механізмів, таких як гомеостаз, транспорт, компартменталізація і прив'язка до визначених тканин і клітинних складових. Порушення цих механізмів може призвести до зв'язування металів з іншими сайтами протеїнів, ніж у нормі, або до видалення інших металів з їх природних місць зв'язування [38, 71, 214, 247, 588, 590].

Кращим доказом на користь гіпотези про окисний характер метал-індукованих генотоксичних порушень є широкий спектр продуктів нуклеотидних основ, типових для атаки Оксигену на ДНК в культивованих клітинах та організмах тварин, що піддавалися впливу канцерогенних металів. Найбільш значні наслідки впливу металів на сигнальні шляхи спостерігають у шляхах кінази мітоген-активованого протеїну (MAP)/AP-1 і NF-κB [333, 450]. Ядерний транскрипційний фактор NF-κB бере участь у запальній відповіді, а AP-1 має важливе значення для росту і диференціації клітин. Порушення гену P53 вважається причиною понад половини усіх злоякісних пухлин людини.

Ряд повідомлень останніх років свідчить, що деякі метали можуть впливати на активацію або активність транскрипційних факторів NF-κB. NF-κB є індукційним і повсюдно експресованим фактором транскрипції генів, що відповідають за виживання клітин, диференціацію, ріст і запальну відповідь [720].

Активація сімейства транскрипційних факторів NF-κB та AP-1 бере участь у проліферації клітин та апоптозі. Концентрація радикалів, що утворюються всередині клітини, вірогідно, впливає на селективну активацію цих транскрипційних факторів і, отже, може допомогти пояснити спостереження, що загибель клітин або їх проліферація пов'язані з впливом металів.

Стресори (метали або  $H_2O_2$ ) викликають сигнальний каскад, який починається з активації MAP-кіназного сімейства серин/треонін кіназ, що регулюють такі процеси, як проліферація, диференціювання і апоптоз. Виявлено три основних підродини: позаклітинно регульовані кінази (ERK), c-Jun N-кінцеві кінази (JNK) і p38 кінази [13, 450]. Індукція AP-1 за допомогою

$H_2O_2$ , металів, цитокінів та інших стресорів опосередковується переважно JNK і p38 MAP-кіназними каскадами [450, 720]. Відомо, що стресові фактори можуть активувати MAP кінази і тим самим AP-1 в декількома способами. До одного з них залучені MAP-кінази, кінази регулювання апоптозного сигналу (ASK1) [13, 531].

Інший механізм включає опосередковане антиоксидантами інгібування MAP-кіназних фосфатаз, що призводить до посилення активації MAP кіназ. Який би механізм не переважав, активація MAP кіназ завжди призводить до зростання активності протеїну AP-1. Механізм активації NF- $\kappa$ B металами та АФО досі достеменно не з'ясований. Активні форми Оксигену в якості вторинних месенджерів беруть участь в активації NF- $\kappa$ B фактором некрозу пухлин (TNF) та інтерлейкіном-1 [13]. "Рішення" про смерть чи продовження життя клітини частково залежить від концентрації та тривалості експозиції окислювача і від типу клітини.

Важливість металів та інших активних форм Оксигену для активації NF- $\kappa$ B підтверджується результатами досліджень: майже всі подразники можуть бути блоковані антиоксидантами, у тому числі L-цистеїном, N-ацетилцистеїном (NAC), меркаптанами, поліфенолами зеленого чаю, вітаміном E.

Очевидно, що активація транскрипційних факторів стимулюється шляхами передачі сигналів, які активуються металами,  $H_2O_2$  та іншими клітинними окислювачами. Завдяки здатності стимулювати проліферацію клітин і позитивно чи негативно регулювати апоптоз, транскрипційні фактори можуть опосередковувати багато з документованих ефектів як фізіологічного, так і патологічного впливу металів або сполук, що утворюють активні форми Оксигену і/або створюють інші умови, сприятливі для посилення оксидації клітин.

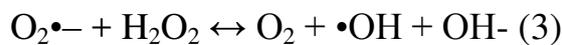
Шляхом регулювання гена фактора транскрипції та розривання шляхів передачі сигналів, активні форми Оксигену активно залучені у

підтримання узгоджених мереж експресії генів, які можуть брати участь у розвитку пухлин.

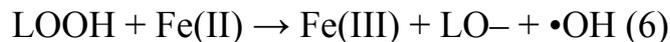
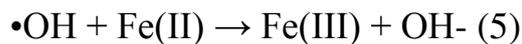
Ферум у контексті про-антиоксидантних процесів заслуговує особливої уваги [370, 431]. Численні експерименти *in vitro* підтвердили утворення гідроксильних радикалів ( $\bullet\text{OH}$ ), яке можна проілюструвати наступними реакціями:



Реакція названа реакцією Хабер-Вейсса [450, 720]:



Окрім описаних, можуть також відбуватися наступні реакції:



Fe (II)-залежний розклад Гідрогену пероксиду (реакція 2) носить назву реакції Фентона, у ній утворюється гідроксильний радикал [311, 715, 720], який, залежно від рівня дифузії, може реагувати з різними біомолекулами, зокрема ліпідами, протеїнами і ДНК. Це означає, що ізоляція Феруму від молекулярного Оксигену та середовища є одним з найважливіших факторів запобігання Ферум-опосередкованого оксидативного стресу. Зв'язування Феруму низькомолекулярними хелаторами за допомогою координаторних лігандів, таких як O, N, S, блокує здатність Феруму каталізувати окисно-відновні реакції. З іншого боку, ряд Fe-хелаторів сприяють токсичній дії, стимулюючи Fe-опосередковане утворення радикальних форм Оксигену [254, 451]. Наприклад, такі ліганди як нітрилотриацетат (NTA) і АТФ, як відомо, зв'язують Fe і здатні викликати окислення ліпідів і пошкодження ДНК. Ліганд етилендіамінтетраоцтова кислота (EDTA) також може викликати радикал-опосередковане пошкодження за реакцією Фентона [352, 720].

Утворення гідроксильного радикала може бути також результатом

взаємодії  $\text{H}_2\text{O}_2$  з іншими перехідними металами, наприклад  $\text{Cu}^+$ , [382, 622]:



Отже, *Купрум*, також може бути посередником утворення вільних радикалів і прямого окислення ліпідів, протеїнів і ДНК. Рае та ін. [617, 721] виявили, що мідний шаперон гену супероксиддисмутази необхідний для експресії активної, пов'язаної з  $\text{Cu}$  форми супероксиддисмутази *in vivo*, незважаючи на високу спорідненість СОД до  $\text{Cu}$  та високі внутрішньоклітинні концентрації СОД і  $\text{Cu}$ . До недавнього часу вважалося, що іони металу перебувають у рівновазі з металопротеїнами, однак результати названої роботи показують, що існує значний надлишок можливостей хелатування  $\text{Cu}$  в клітині, і повинні існувати численні процеси, які зв'язують *Купрум* і запобігають його вільному доступу.

Відомо, що *Кобальт*-опосередковане утворення вільних радикалів спричиняє токсичність і канцерогенність *Кобальту* [752, 770]. Нещодавно було повідомлення про ушкодження мітохондріальної ДНК і гіпоксичну реакцію, індуковані  $\text{CoCl}_2$  у нейрональних клітинах PC12 щурів [731]. У цьому дослідженні було вперше доведено, що в присутності  $\text{CoCl}_2$  відбувалося пошкодження матричної ДНК та зміни морфології клітин внаслідок надмірного утворення вільних радикалів.

Експериментальні дані показують, що окисний стрес може відігравати важливу роль в *Нікель*-індукованому канцерогенезі, однак кореляція між здатністю нікелю викликати оксидативний стрес і канцерогенністю ще не повністю вивчена. Протилежні погляди на роль оксидативного стресу в *нікель*-індукованому канцерогенезі документуються в експериментах на тваринах. У той час як введення Нікелю, а також *Кобальту*, індукувало формування пухлини, вплив *Купруму* та *Феруму* (які також спричиняють сильний оксидативний стрес) не викликало пухлин [686]. Це говорить про те, що оксидативний стрес не може бути основним у механізмах *Нікелевої* канцерогенності.

*Цинк* є редокс-інертним металом і не бере участі в окисно-відновних реакціях [65, 100, 249, 730]. Швидкодіюча антиоксидантна функція Цинку була вперше виявлена наприкінці 80-х років і включає два окремих механізми: (I) захист сульфгідрильних груп протеїнів і ензимів пвід атаки вільних радикалів або окислення, і (II) скорочення продукції  $\cdot\text{OH}$  з  $\text{H}_2\text{O}_2$  шляхом запобігання утворення вільних радикалів – іншими словами, антагонізм дії редокс-активних перехідних металів, таких як Ферум і Купрум. Дефіцит Цинку може бути пов'язаний з вищими за нормальні рівнями окисного пошкодження тканин, в тому числі посилення окиснення ліпідів, протеїну і ДНК [564, 566, 700, 711, 719, 734]. Цинк також діє як антиоксидант в центральній нервовій системі, зокрема у мозку [197, 219, 383, 569].

#### Висновки з огляду літератури та вибір напрямів досліджень

На основі проведеного аналізу даних сучасної вітчизняної і зарубіжної наукової літератури за темою дисертаційної роботи визначено проблеми і питання, які на даний час вивчені недостатньо. Це, зокрема, стосується ланок механізмів токсичності фосфорорганічних і карбаматних сполук, які не пов'язані з інгібуванням ензимів холінестеразного ряду; взаємозв'язків між токсичністю вказаних сполук і особливостями про- / антиоксидантних реакцій, явища оксидативного стресу, системи антиоксидантного захисту, а також ролі деяких металів у процесах токсичності досліджуваних сполук, методів вивчення впливу ХПФ на ріст, розвиток і функціонування нейронів в умовах культури клітин та ін.. Узагальнено інформацію щодо нейротоксичної дії хлорпірифосу і карбофурану. Вказане вище дозволило обґрунтувати актуальність досліджень і основні напрямки дисертаційної роботи.

## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ І 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 України. Частина експериментальних досліджень було проведено у Середземноморському інституті нейробіології (м. Марсель, Франція) під час стажувань та відряджень за міжнародними грантами (2003–2010 рр.).

#### 2.1 Схеми досліджень

Загальну схему досліджень дисертаційної роботи представлено на Рис. 2.1.

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.

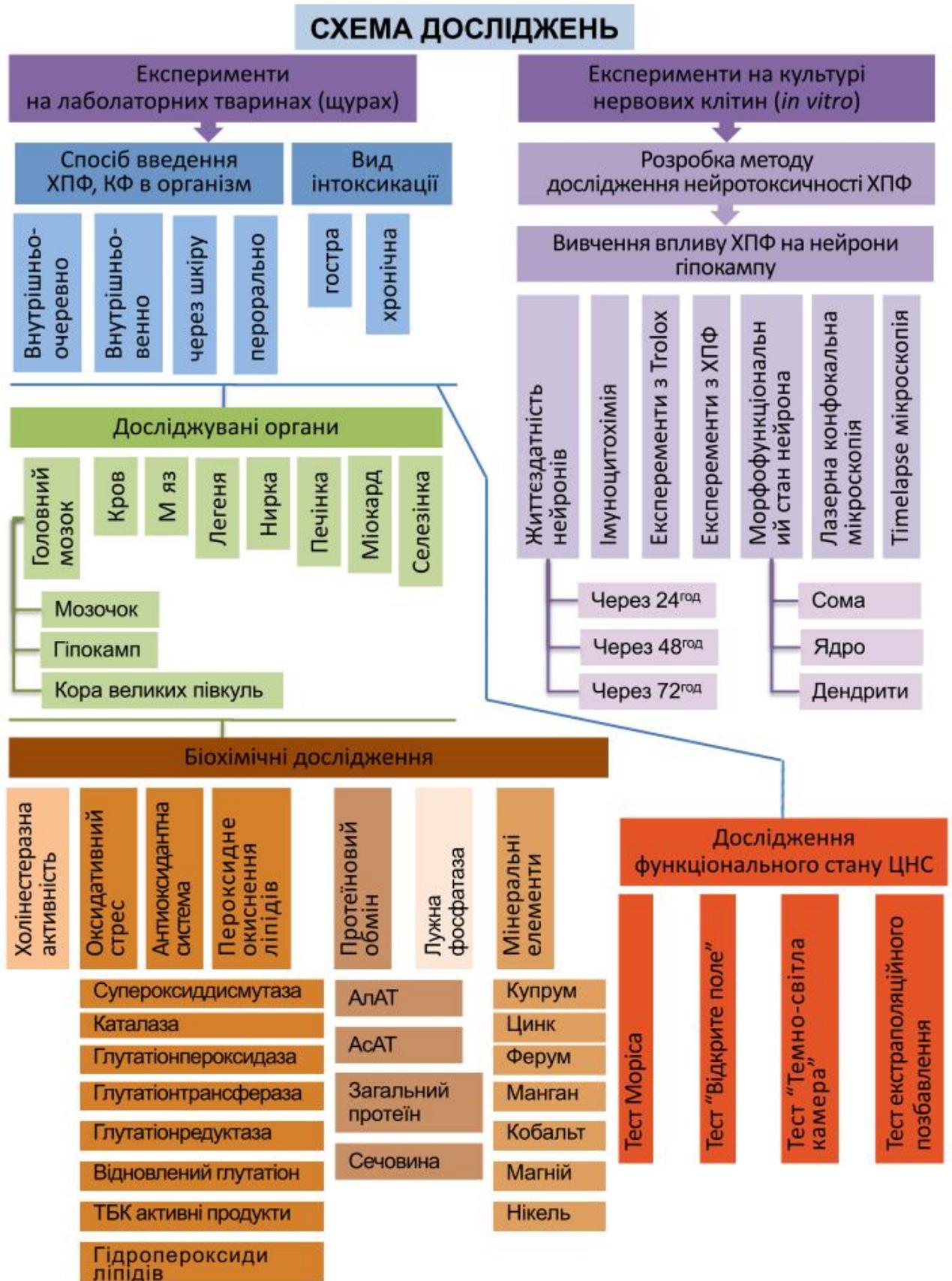


Рис. 2.1. Схема досліджень, проведених при виконанні дисертаційної роботи.

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.

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

## **2.2 Препарати карбофурану і хлорпірифосу, які використовували в дослідженнях**

У проведених експериментальних дослідженнях використовували 99,9% карбофуран (CAS № 1563-66-2) (2,3-дигідро-2,2-диметил-7-бензофураніл-метилкарбамат,  $C_{12}H_{15}NO_3$ ) компанії Supelco (США), 99,9% хлорпірифос (CAS № 2921-88-2) (О,О-діетил-О-3,5,6-трихлор-2-піридилфосфоротіоат ( $C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$ )) компанії Sigma Chemical (США). Для приготування маточного розчину ХПФ розчиняли в диметилсульфоксиді (ДМСО) у концентрації 100  $\mu$ М. Для кожного експерименту використовували свіжоприготовані розчини ХПФ необхідних концентрацій. Застосовували також комерційний інсектицидний препарат “Дурсбан” (Україна) з концентрацією ХПФ 480 г/л. У ряді

експериментів замість ДМСО, як розчинник для ХПФ використовували етиловий спирт, рафіновану соняшникову олію.

### **2.3. Загальні принципи експериментів з лабораторними тваринами**

Дослідження були проведені на 200 статевозрілих самцях білих лабораторних щурів лінії Вістар масою тіла 180–270 г, яких утримували у стандартних умовах віварію з дотриманням 12-годинного режиму освітлення темнота/світло, необмеженим доступом до питної води та корму. Годівлю тварин здійснювали стандартним повноцінним збалансованим гранульованим комбікормом для лабораторних щурів, який забезпечував фізіологічні потреби їхнього організму у вітамінах, мікроелементах, мінеральних речовинах та енергії. З метою уникнення випадкових впливів усі тварини перебували в однакових умовах, дослідження проводили, намагаючись створювати максимально ідентичні параметри (сезонність, час доби та ін.). 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., [356], 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. та «Науково-практичних рекомендацій з утримання лабораторних тварин та роботи з ними» [118]. Комісією з біоетичної експертизи Інституту біології тварин НААН (протокол № 48 від 2 квітня 2015 року) не встановлено порушень морально-етичних норм при проведенні дослідів з тваринами.

Для ряду маніпуляцій з лабораторними щурами (ін’єкції, вивчення проникнення досліджуваних препаратів крізь шкіру тварин) їх фіксували за допомогою спеціальних рестрейнерів, виготовлених з прозорого плексигласу

(Рис. 2.2). Використовували рестрейнери двох розмірів, із гнучкою системою регулювання фіксаторів, що дає змогу фіксувати тварин різного віку і розмірів.

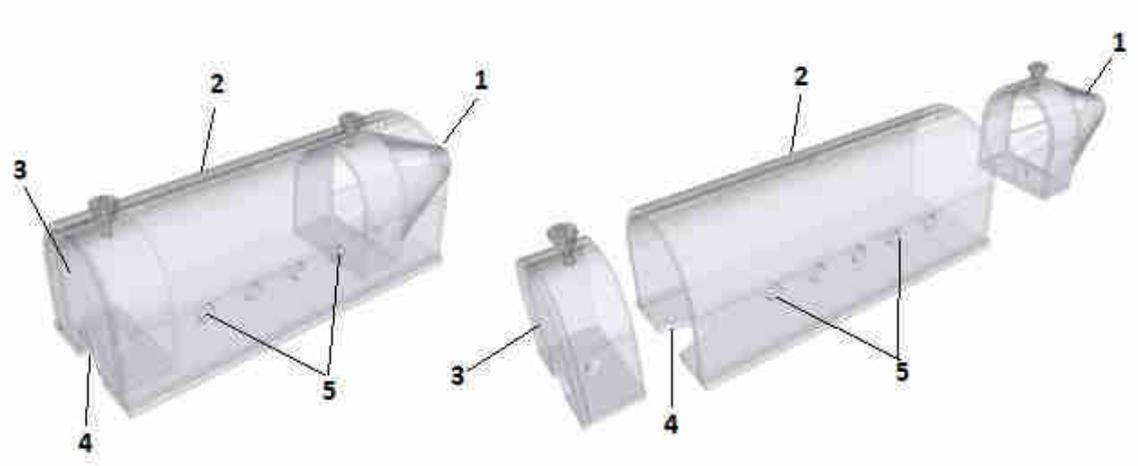


Рис. 2.2. Схематичне зображення рестрейнера для фіксації лабораторних щурів

Примітка. 1 – фіксатор, що регулюється для голови щура; 2 – камера; 3 – задня кришка, що регулюється; 4 – отвір для хвоста; 5 – вентиляційні отвори.

Залежно від мети експерименту введення піддослідним тваринам препаратів карбофурану та хлорпірифосу здійснювали різними способами, а саме: перорально (випоювання, зондування), внутрішньовенно (ін'єкції у хвостову вену), внутрішньоочеревинно, через шкіру (аплікації токсинами хвоста тварин).

Виведення тварин з експериментів здійснювали шляхом евтаназії (безболісного умертвління). Евтаназію здійснювали дислокацією шийних хребців під легким етерним наркозом, після чого тварин декапітували. Оскільки, дія етерного наркозу була незначною і короткотривалою, а також однаковою як для дослідних, так і контрольних груп тварин, то можливим виникненням артефактів нехтували. В окремих випадках евтаназію проводили діоксидом вуглецю ( $\text{CO}_2$ ), застосовуючи для цього герметичну камеру, або ексикатор [114].

## 2.4. Вибір експериментального матеріалу від лабораторних тварин

Для досліджень використовували цільну кров, сироватку крові, плазму крові, гомогенати тканин цілого головного мозку, кори великих півкуль головного мозку, гіпокампа, мозочка, печінки, нирок, легенів, серця. Частина роботи була виконана на первинній культурі нервових клітин, які отримували із зачаткового мозку ембріонів щурів, як детально описано у розділі 2.6.

У роботі використовували змішану перефіричну кров, яку отримували після декапітації тварин, а також кров, прижиттєво відібрану з хвостової вени щурів.

Для отримання плазми кров відбирали у пробірки з попередньо внесеним антикоагулянтом – 1% розчином гепарину, або ЕДТА (3 краплі на 10 мл крові). Плазму відділяли центрифугуванням при 3 000 g впродовж 15 хв. Для отримання сироватки кров відбирали у скляні пробірки без антикоагулянта. Для відділення сироватки від кров'яного згустка по внутрішній стінці пробірки проводили спицею із нержавіючої сталі або тонкою скляною паличкою. Пробірки закривали корками і поміщали у термостат при температурі 37–38 °C на 1–2 год або залишали при кімнатній температурі (20–26 °C) до повного відділення сироватки. Для швидкого отримання сироватки кров поміщали в термостат (37–38°C) на 10–15 хв. Після цього, притримуючи утворений кров'яний згусток скляною паличкою, сироватку переливали у центрифужну пробірку і центрифугували протягом 15–20 хв при 3 000 g [101-102].

Для отримання еритроцитів гепаринізовану кров центрифугували в рефрижераторній центрифусі при 3 000 g впродовж 15 хв. Плазму відбирали, а червоні кров'яні клітини тричі відмивали за допомогою 0,85% розчину NaCl, кожний раз центрифугуючи суспензію клітин при 3 000 g протягом 5 хв. Гемолізати отримували шляхом трикратного заморожування і відтаювання суспензій, приготованих додаванням до еритроцитів

бідистильованої води, з подальшим центрифугуванням при 8 000 g впродовж 15 хв на центрифугі з охолодженням.

Виділення внутрішніх органів у лабораторних тварин проводили негайно після їх евтаназії, користуючись атласом анатомії щурів [119]. Відібрані після декапітації і розтину тварин органи (мозок, печінка, серце, легені, нирки, селезінка), охолоджували у фізіологічному 0,85 % розчині, підсушували фільтрувальним папером, зважували та заморожували у рідкому азоті для подальших досліджень. Заморожений біологічний матеріал зберігали в посудинах Дьюара у рідкому азоті, або у морозильній камері при температурі -15 – -25°C.

Гомогенати готували із заморожених у рідкому азоті зразків, які розтирали у фарфоровій ступці, або за допомогою гомогенізатора MPW-324 (Польща) при 4 000 об./хв, додаючи охолоджений до 0 °C 0,05 М тріс-НСІ буфер (рН 7,5) у масовому співвідношенні тканина:буфер – 1:9. Одержані гомогенати фракціонували за допомогою центрифуги MLW-T23D (Німеччина) при 10 000 g впродовж 30 хв, використовуючи для досліджень надосадову рідину.

#### **2.4.1 Препарування кори великих півкуль, гіпокампа, мозочка.**

Одразу після декапітації тварин, за допомогою малих хірургічних ножиць і пінцета розкривали черепну коробку, з якої швидко відбирали головний мозок [583, 690]. Одержаний мозок негайно переносили у чашку Петрі з охолодженим до 4 °C мінімальним підтримуючим середовищем (MEM) наступного складу: 95,5% розчин Хенка (Gibco, США), 1% пеніцилін-стрептоміцин (Gibco, США), 2,5% HEPES буфер (Gibco, США) і 1 М Тріс-НСІ (1%, Invitrogen, США). Замість приведеного вище середовища у частині експериментів застосовували середовище-аналог наступного складу: сахароза (250 Мм), КСІ (2 Мм), СаСІ<sub>2</sub> (0,5 Мм), МгСІ<sub>2</sub> (7 Мм), NaHCO<sub>3</sub> (26 Мм), NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1,2 Мм), глюкоза (11 Мм). За допомогою спеціальних мікрохірургічних інструментів у полі зору біноккулярного мікроскопа-лупи одразу приступали до виділення досліджуваних ділянок мозку, ідентифікацію яких проводили відповідно до анатомічних атласів мозку

щурів [583, 690, 698]. Спочатку відсікали мозочок, згодом виділяли гіпокамп і кору півкуль [690]. Всі згадані вище маніпуляції проводили на льодяній бані. Для подальших біохімічних досліджень відібрані тканини одразу заморожували в рідкому азоті та зберігали у посудинах Дьюара.

## **2.5. Біохімічні показники, які визначали в дослідженнях**

Всі вимірювання під час визначення досліджуваних показників здійснювали за допомогою сертифікованого устаткування та приладів, які пройшли метрологічну перевірку.

**2.5.1 Активність холінестерази (КФ 3.1.1.8).** Визначення активності холінестерази проводили за методом описаним А. І. Карпищенком [111]. Його принцип ґрунтується на тому, що під дією холінестерази відбувається гідроліз ацетилхолінхлориду з утворенням оцтової кислоти і холіну. Оцтова кислота знижує рН розчину, що встановлюється за допомогою індикатору (зміна забарвлення від малинового до жовтого). Зміна інтенсивності забарвлення пропорційна активності ензиму. Для визначення активності холінестерази використовували наступні реактиви: 0,9 моль/л розчин ацетилхолінхлориду (1,63 г ацетилхолінхлориду (Сфера Сім, Україна) розчиняли в 10 мл дистильованої води). При використанні фармакопейного препарату вміст однієї ампули (0,2 г) розчиняли в 1,2 мл води; вероналовий буфер, рН 8,4 (1,545 г натрієвої солі вероналу (мединал) (Макрохім, Україна) розчиняли в 500 мл дистильованої води, додавали 9 мл 0,1 моль / л розчину соляної кислоти (Сфера Сім, Україна) і 150 мл 0,1 г/л розчину індикатора, вимірювали рН. Об'єм доводили дистильованою водою до 1 л); індикатор – фіолетовий синій (Макрохім, Україна) з переходом забарвлення від жовтого до червоного при рН у межах 6,8-8,4 (0,1 г сухого індикатора розтирали у ступці з 5,7 мл 0,05 моль/л

розчину натрію гідроксиду. Після розчинення об'єм доводили дистильованою водою до 25 мл. З отриманого 0,4%-ного розчину безпосередньо перед використанням готували 0,01%-ний розчин шляхом розведення його дистильованою водою в 40 разів); 0,7%-ний водний розчин прозерину (Макрохім, Україна) (0,7 г прозерину розчиняли в 100 мл дистильованої води); 0,1 моль/л розчин оцтової кислоти готували з стандарт-титру (фіксаналу), або шляхом доведення дистильованою водою 5,7 мл льодяної оцтової кислоти (категорії Х. Ч.) (Сфера Сім, Україна) до 1000 мл у мірній колбі об'ємом 1 л.

*Хід визначення.* У пробірку вносили 2,5 мл вероналового буферу, 0,1 мл дистильованої води і 0,05 мл сироватки крові, або тканинного супернатанту. Суміш прогрівали при температурі 37° С протягом 5 хв на водяній бані, потім до неї додавали 0,1 мл розчину ацетилхолінхлориду та інкубували протягом 30 хв при температурі 37° С. Після інкубації додавали 0,1 мл розчину прозерину. Одночасно готували контроль мутності, калібрувальну та холосту проби. У холосту пробу замість дослідного матеріалу вносили відповідний об'єм фізіологічного розчину. Протягом 10 хв вимірювали оптичну густина на спектрофотометрі при довжині хвилі 540 нм проти дистильованої води.

Активність холінестерази, виражену в мкмоль/с×л розраховували за формулою 2.1:

$$E_{\text{рез.}} = E_{\text{хол.}} - E_{\text{м.}} - E_{\text{досл.}} \quad (2.1),$$

де:  $E_{\text{хол.}}$  – оптична густина холостої проби;  $E_{\text{досл.}}$  – оптична густина дослідної проби;  $E_{\text{м.}}$  – оптична густина контролю мутності;  $E_{\text{рез.}}$  – результуюча оптична густина.

Розрахунок активності ХЕ проводили за формулою 2.2:

$$C = \frac{E_{\text{рез.}} \times 37,0}{E_{\text{хол.}} - E_{\text{кал.}}} \quad (2.2),$$

де:  $C$  – активність ХЕ, мкмоль /с×л; 37 – фактор перерахунку, мкмоль/с×л .

У окремих серіях експериментів для визначення холінестеразної активності користувались стандартним набором реактивів НВП Філісіт-Діагностика (Україна).

### **2.5.2 Активність супероксиддисмутази (КФ 1.15.1.1).**

Супероксиддисмутазу (СОД) активність визначали за методом описаним Є. Є. Дубініною та ін. [57], який ґрунтується на відновленні нітросинього тетразолію до нітроформаону супероксидними аніон-радикалами, що утворюються в реакції між феназинметасульфатом і відновленою формою NADH. До 0,2 мл гомогенату тканини (гемолізату еритроцитів) додавали 0,5 мл абсолютного етанолу і 0,3 мл хлороформу, інтенсивно перемішували та центрифугували протягом 30 хв при 4000 g. Далі до 0,1 мл супернатанту додавали 0,1 мл 1 мкМ розчину ЕДТА (Sigma, США), 0,1 мл 1% розчину желатину (Макрохім, Україна), 0,1 мл 1,8 мкМ розчину феназинметасульфату (Acros Organics, Бельгія; Sigma-Aldrich, США), 0,1 мл 0,4 мкМ розчину нітротетразолію синього (Acros Organics, Бельгія) і 0,1 мл 1,0 мМ розчину NADH (Acros Organics, Бельгія). Загальний об'єм суміші доводили 0,15 М фосфатним буфером (рН 7,8) до 3,0 мл та інкубували при кімнатній температурі у темному місці протягом 30 хв після чого при довжині хвилі 540 нм вимірювали величину екстинції контрольних і дослідних проб. У контрольні проби вносили ті самі компоненти, що і в дослідні, за винятком тканинного гомогенату чи компонентів крові, замість яких використовували адекватну кількість буферу.

Активність СОД розраховували за формулою (2.3):

$$X = \frac{\Delta E_c - \Delta E_d}{\Delta E_c} \times 100 \quad (2.3),$$

де: X – ступінь блокування утворення нітроформаону, %;  $\Delta E_c$  – екстинція контрольної проби, од. екст.;  $\Delta E_d$  – екстинція дослідної проби, од. екст.; 100 – коефіцієнт перерахунку значення у відсотки.

Активність СОД виражали в умовних одиницях на 1 мг протеїну тканини, або у відсотках.

**2.5.3 Активність каталази (КФ 1.11.1.6).** Каталазну активність визначали за методом описаним М. А. Королюк [83]. Принцип методу ґрунтується на властивості Гідрогену пероксиду утворювати з солями Молібдену стійкий кольоровий комплекс. Реакцію запускали додаванням до 0,1 мл гомогенату тканини (гемолізату еритроцитів) 2 мл 0,03% розчину Гідрогену пероксиду. У пробірки з контрольними зразками замість тканинного гомогенату чи гемолізату еритроцитів вносили по 0,1 мл дистильованої води. Реакцію зупиняли через 10 хв додаванням 1,0 мл 4% молібдату амонію. Інтенсивність забарвлення вимірювали при  $\lambda = 410$  нм проти контрольного зразка, в який замість Гідрогену пероксиду додавали 2,0 мл дистильованої води. Активність ензиму визначали за формулою (2.4) і виражали в нмоль  $\text{H}_2\text{O}_2$ /хв на 1 мг протеїну гомогенату тканини:

$$X = \frac{\Delta E_c - \Delta E_d}{t \times v \times 22,2 \times 10^3 \times \Pi} \quad (2.4),$$

де: E – активність каталази, ммоль/мг протеїну за хв;  $\Delta E_c$  – екстинція контрольної проби, од. екст.;  $\Delta E_d$  – екстинція дослідної проби, од. екст.;

V – об'єм внесеної проби (0,1), мл; t – час інкубації, хв;  $\Pi$  – кількість протеїну в пробі, мг/мл;  $22,2 \times 10^3$  – коефіцієнт мілімолярної екстинції Гідрогену пероксиду, ммоль<sup>-1</sup>см<sup>-1</sup>.

**2.5.4 Активність глутатіон-S-трансферази (КФ 2.5.1.18).** Визначення активності глутатіон-S-трансферази (GST) проводили за методом W.H. Nabig та W.B. Jacoby [411]. Принцип цього методу ґрунтується на реакції взаємодії відновленого глутатіону з 1-хлор-2,4-динітробензолом у присутності глутатіон-S-трансферази з утворенням кон'югату, котрий характеризується максимумом світлопоглинання при довжині хвилі 340 нм. У процесі визначення реакцію здійснювали в термостатуючій кюветі при температурі +37 °С. У кювету вносили 1,2 мл 2 мМ розчину глутатіону відновленого (Sigma-Aldrich, США) у 0,1 М калій-фосфатному буфері (рН 6,5) і 0,1 мл досліджуваного зразка. Реакцію запускали шляхом додавання 1,2 мл 1-хлор-2,4-динітробензолу. Оптичну густину продуктів реакції

вимірювали проти 0,1 М калій-фосфатного буферу при довжині хвилі 340 нм у кюветі з довжиною оптичного шляху 10 мм. За контроль служили результати вимірювання оптичної густини суміші, у яку замість дослідного зразка додавали 0,1 мл калій-фосфатного буферу (рН 7,4). Розрахунок активності GST проводили відповідно до закону Бугера-Ламберта-Бера з використанням молярного коефіцієнту світлопоглинання для утвореного продукту при довжині світлової хвилі 340 нм ( $\epsilon = 9600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Ензиматичну активність виражали в мкмоль/(хв на г протеїну), або мкмоль/(хв на г гемоглобіну).

**2.5.5 Активність глутатіонпероксидази (КФ 1.11.1.9).** Активність ГПО в гомогенатах досліджуваних тканин та у компонентах крові визначали за методом Моїна [117]. Принцип методу ґрунтується на порівняльному дослідженні ступеня окиснення відновленого глутатіону (ГВ) пероксидом третинного бутилу, який додається до інкубаційної суміші, що містить гомогенат досліджуваних тканин чи компоненти крові. Відбувається кольорова реакція, в основі розвитку якої лежить взаємодія SH-груп з 5,5-дитіобіс-2-нітробензойною кислотою, внаслідок чого утворюється забарвлений продукт – тіонітрофенільний аніон. Кількість останнього прямо пропорційна кількості SH-груп, що прореагували з 5,5-дитіобіс-2-нітробензойною кислотою. У ході визначення 1 мл гомогенату додавали до інкубаційної суміші, яка містила 2 мл фізіологічного розчину NaCl, 0,5 мл 0,25 М трис-буферу (рН 7,4), 0,1 мл 25 ммоль ЕДТА (Sigma, США), 0,3 мл 1 ммоль глутатіону відновленого (Sigma-Aldrich, США). Для інгібування каталазної активності до інкубаційного середовища додавали 0,1 мл 0,4 моль натрію азиду (Sigma-Aldrich, США). Запускали реакцію додаванням до інкубаційного середовища 0,1 мл 50 ммоль пероксиду третинного бутилу (Acros Organics, Бельгія). Через 1 хв реакцію зупиняли додаванням 1 мл 10% розчину метафосфорної кислоти (Хімлаборреактив, Україна). До 2 мл надосадової рідини, одержаної після центрифугування інкубаційної суміші, додавали 2 мл 0,25 моль трис-буферу (рН 8,9), 0,1 мл 0,04% розчину

дитіонітробензойної кислоти (Acros Organics, Бельгія; Sigma-Aldrich, США) і колориметрували при довжині хвилі 412 нм. Концентрацію ГВ, який не окиснився пероксидом третинного бутилу, визначали шляхом порівняння досліджуваної проби із стандартом. У контрольну пробу замість гомогенату тканин чи компонентів крові додавали відповідну кількість фізіологічного розчину. В розрахунках використовували формулу (2.5):

$$X = \frac{(\Delta E_{\text{к}} - \Delta E_{\text{д}}) \times C \times P}{\Delta E_{\text{с}} \times \Pi \times \text{Ч}} \quad (2.5),$$

де: X – кількість ГВ, який брав участь в глутатіон-пероксидазній реакції, нмоль/мг протеїну за хв;  $\Delta E_{\text{к}}$  – екстинція ГВ, який не прореагував з пероксидом третинного бутилу за відсутності глутатіонпероксидази, од. екст.;  $\Delta E_{\text{д}}$  – екстинція ГВ, який не прореагував з пероксидом третинного бутилу за присутності глутатіонпероксидази, од. екст.;  $\Delta E_{\text{с}}$  – екстинція ГВ стандартного розчину, од. екст.; C – концентрація ГВ стандартного розчину, нмоль;  $\Pi$  – кількість протеїну в пробі, мг; Ч – час протікання реакції, хв; P – фактор розведення.

### **2.5.6 Активність глутатіонредуктази (КФ 1.6.4.2).**

Глутатіонредуктазну (ГР) активність визначали методом, описаним у [286], принцип якого базується на каталітичній NADPH-залежній реакції відновлення окисненої форми глутатіону (GSSG), інтенсивність якої можна оцінити за швидкістю зниження екстинції, при якій розчин NADPH має максимум світлопоглинання (340 нм). Для здійснення реакції гомогенати тканин (гемолізат еритроцитів) розводили 0,1 М калій-фосфатним буфером (рН 7,4) у співвідношенні 1:9. Реакцію проводили в термостатованій кюветі при температурі 37°C. У кювету вносили 1,8 мл 0,1 М калій-фосфатного буферу (рН 7,0) з додаванням 1 мМ ЕДТА (Sigma, США), 0,1 мл 20 мМ водного розчину окисненого глутатіону (Sigma-Aldrich, США) і 100 мкл розведеного гомогенату (гемолізату еритроцитів). Через 3 хв реакцію запускали додаванням 0,1 мл 2 мМ розчину NADPH (Sigma-Aldrich, США), розчиненого в 10 мМ Тріс-НСl (Sigma-Aldrich, США) буфері, рН 7,0.

Вимірювання оптичної густини досліджуваних розчинів проводили при довжині хвилі 340 нм на спектрофотометрі СФ-26 проти дистильованої води у кюветах з довжиною оптичного шляху 10 мм. Як контроль використовували реакційну суміш, у яку замість досліджуваного зразка вносили в такому самому об'ємі 0,1 М калій-фосфатний буфер (рН 7,4). Розрахунок активності ГР здійснювали відповідно до закону Бугера-Ламберта-Бера, використовуючи молярний коефіцієнт світлопоглинання для NADPH при довжині хвилі 340 нм ( $\epsilon = 6200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Активність ензиму виражали в мкмоль NADPH /хв на 1мг протеїну.

**2.5.7 Концентрація глутатіону відновленого.** Концентрацію глутатіону відновленого (ГВ) вимірювали колориметрично [434]. В основі методу лежить кольорова реакція, яка розвивається при взаємодії SH-груп з 5,5'-дитіобіс-2-нітробензойною кислотою з утворенням забарвленого продукту – тіонітрофенільного аніону. Вміст останнього прямо пропорційний кількості SH-груп, що прореагували з 5,5'-дитіобіс-2-нітробензойною кислотою. У процесі визначення до 0,6 мл гомогенату тканин (гемолізату еритроцитів) з метою осадження протеїну додавали 0,2 мл 20% розчину сульфосаліцилової кислоти (Хімлаборреактив, Україна). Проби центрифугували впродовж 10 хв при 3000 г. Супернатант (0,1 мл) переносили в пробірки, які містили 2,55 мл 0,1 М Тріс-НС1 буферу (Sigma-Aldrich, США) з 0,01% ЕДТА (Sigma, США), рН 8,5. До отриманої суміші додавали 25 мкл розчину 5,5'-дитіобіс-2-нітробензойної кислоти (Fluka, Німеччина). Після утворення забарвлення визначали показник екстинкції на спектрофотометрі СФ-26 при  $\lambda=412$  нм в кюветі з довжиною оптичного шляху 10 мм проти дистильованої води. Розрахунок вмісту ГВ проводили за калібрувальним графіком і виражали в ммоль/г тканини.

**2.5.8 Вміст гідропероксидів ліпідів.** Вміст гідропероксидів ліпідів у плазмі крові і гомогенатах тканин визначали за методом, який ґрунтується на спектрофотометричному вимірюванні оптичної густини продуктів реакції з тіоціанатом амонію, сіллю Мора і соляною кислотою [29]. Попередньо з

досліджуваних проб екстрагували ліпіди за допомогою метанолу (відношення спирту до об'єму плазми крові або маси твердих тканин 13:1 – 16:1). Відбір тканин і приготування зразків для екстрагування здійснювали при температурі 4°C. До 0,2 мл плазми крові, яка містила 0,5 мг/мл натрію оксалату (Хімлаборреактив, Україна), або до такого ж об'єму тканинного гомогенату у буферному розчині з рН 7,4 додавали 2,8 мл етанолу та 0,05 мл 50%-го розчину ТХО (Хімлаборреактив, Україна) і струшували протягом 5-6 хв. Протеїновий осад, який при цьому утворювався, відділяли центрифугуванням протягом 10 хв при 700 g. У результаті отримували супернатант, що являв собою спиртовий екстракт ліпідів, який безпосередньо і використовували для визначення гідропероксидів ліпідів. Відбирали 1,5 мл цього супернатанту і доводили до 2,7 мл етанолом, додавали 0,02 мл концентрованої HCl (Сфера Сім, Україна) і 0,03 мл 1%-го розчину солі Мора (Сфера Сім, Україна) в 3%-му розчині HCl. Вміст струшували і через 30 с додавали 0,2 мл 20%-го розчину тіоціанату амонію (Acros Organics, Бельгія), після чого розвивалося малинове забарвлення. Вимірювання оптичної густини проводили після додавання тіоціанату амонію при  $\lambda = 480$  нм. Контрольну пробу готували аналогічно до дослідної, але замість гомогенату тканини додавали відповідну кількість дистильованої води. Вміст гідропероксидів ліпідів у біологічному матеріалі виражали в величинах оптичної густини при 480 нм на 1 г тканини, або 1 мл плазми крові.

**2.5.9 Концентрація ТБК-активних продуктів.** Концентрацію ТБК-активних продуктів, яка характеризує швидкість ПОЛ визначали за методом Е. Н. Коробейникової [81], в основі якого лежить реакція між малоновим диальдегідом (МДА) і тіобарбітуровою кислотою (ТБК), яка при високій температурі і кислому середовищі протікає з утворенням кольорового триметинового комплексу, що містить одну молекулу МДА і дві молекули ТБК. У процесі визначення до 1 мл гомогенату тканини або плазми крові додавали 4,5 мл 20% фосфорновольфрамової кислоти (Макрохім, Україна) і центрифугували протягом 15хв при 700 g. Надосадову рідину зливали, а до

осаду додавали 1,0 мл 0,8% розчину ТБК (Sigma-Aldrich, США) і витримували протягом 1 год на водяній бані при температурі 100 °С. Після цього пробірки охолоджували і центрифугували. В одержаній надосадовій рідині вимірювали оптичну густину при довжині хвилі 535 і 580 нм проти контрольної проби, яка замість плазми крові чи гомогенату тканини містила відповідну кількість бідистильованої води. Щоб виключити поглинання зафарбованих комплексів ТБК-речовинами неліпідної природи вимірювання абсорбції проводили двічі. Вміст ТБК-активних продуктів розраховували за формулою 2.6:

$$C = 0,21 + 26,5 \Delta D \quad (2.6),$$

де:  $C$  – концентрація ТБК-активних продуктів;  $\Delta D$  – показник  $D_{535} - D_{580}$  в надосадовій рідині. Концентрацію ТБК-активних продуктів виражали в нмоль МДА на 1 г тканини, або в нмоль/мл/хв у плазмі крові, використовуючи коефіцієнт молярного поглинання, який дорівнює  $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ на см}^{-1}$ .

**2.5.10 Активність амінотрансфераз – аланінамінотрансферази (К Ф 2.6.1.2) та аспартатамінотрансферази (К Ф 2.6.1.1).** Визначення активностей аланінамінотрансферази (АлАТ) і аспартатамінотрансферази (АсАТ) проводили за допомогою уніфікованого динітрофенілгідразинового методу Райтмана-Френкеля [626]. Принцип методу ґрунтується на тому, що внаслідок переамінування 2-оксоглутарової кислоти L-аланіном, яке відбувається під дією АлАТ, або L-аспарагіновою кислотою, яке відбувається під дією АсАТ на  $\alpha$ -кетоглутарову кислоту, утворюються L-глутамінова та піровиноградна кислоти. Остання вступає у лужному середовищі в реакцію з 2,4-динітрофенілгідразиним з утворенням 2,4-динітрофенілгідрозонів, що мають високий коефіцієнт молярної екстинкції, тому існує прямопропорційна залежність оптичної щільності реакційного розчину від активності ензиму.

Для визначення активностей АлАТ і АсАТ використовували стандартні набори ТОВ НВП «Філісіт-Діагностика» (Україна). У процесі визначення у пробірку вносили 0,25 мл субстратного розчину для АлАТ (або АсАТ), нагрівали при 37 °С протягом 3 хв і додавали 0,05 мл сироватки крові

чи тканинного гомогенату та інкубували на водяній бані при 37 °С протягом 60 хв. Після інкубації додавали 0,25 мл розчину 2,4-динітрофенілгідразину і витримували 20 хв при кімнатній температурі. Після цього додавали 2,5 мл 0,4 М розчину лугу, перемішували і залишали для розвитку забарвлення на 10 хв при кімнатній температурі. Оптичну густину вимірювали на спектрофотометрі при довжині хвилі 540 нм у кюветі 1 см проти контролю. Розрахунок ензиматичної активності проводили за калібрувальним графіком. При визначенні активностей АлАТ і АсАТ враховували той факт, що при зберіганні біологічних субстратів навіть протягом незначного проміжку часу при кімнатній температурі активність цих ензимів у них знижується. Тому сироватку крові і гомогенати тканин до аналізу зберігали у морозильній камері і розморожували безпосередньо перед проведенням визначень.

Також розраховували коефіцієнт де Рітіса, що представляє собою відношення співвідносних величин АсАТ до АлАТ [321]. Варто відзначити, що розрахунок коефіцієнту де Рітіса доцільно проводити тільки при значеннях АсАТ і / або АлАТ, що виходять за межі референсних значень.

**2.5.11 Активність лужної фосфатази (КФ. 3.1.3.1).** Принцип методу ґрунтується на тому, що лужна фосфатаза розщеплює фенілфосфат з утворенням фенолу. Окисне з'єднання фенолу з 4-амінофеназоном утворює червоне забарвлення, інтенсивність якого визначається фотометрично [469]. Активність ензиму пропорційна збільшенню оптичної щільності розчину.

Для визначення активності лужної фосфатази використовували стандартний набір ТОВ НВП «Філісіт–Діагностика» (Україна). У процесі визначення у пробірки (дослідну, холосту, калібрувальну і порівняльну) вносили буферно-субстратний розчин, який інкубували протягом 3 хв при температурі 37 °С, потім у дослідну пробірку вносили сироватку крові чи тканинний гомогенат, у калібрувальну – калібрувальний розчин, а у порівняльну пробу дистильовану воду та знову інкубували протягом 10 хв при 37 °С. Після інкубації у всі пробірки вносили окиснювальний розчин, а у сліпу пробу крім того вносили сироватку чи тканинний гомогенат і витримували 5 хв при кімнатній

температурі. По завершенні реакції вимірювали оптичну густину дослідної проби ( $E_{\text{досл}}$ ) проти сліпої проби та оптичну густину калібрувальної проби ( $E_{\text{каліб}}$ ) проти порівняльної проби при довжині хвилі 490 — 550 нм.

Розрахунок ензиматичної активності проводили за формулою 2.7:

$$C = \frac{E_{\text{досл}}}{E_{\text{каліб}}} \times 8300 \quad (2.7),$$

де  $C$  – активність лужної фосфатази у дослідній пробі, нмоль/(с×л); 8300 – коефіцієнт перерахунку, нмоль/(с×л).

**2.5.12 Вміст сечовини.** Вміст сечовини визначали колориметрично [758] з використанням стандартного набору виробництва НВП «Філісіт Діагностика» (Україна). Принцип методу ґрунтується на тому, що сечовина з діацетилмонооксимом у присутності тіосемікарбозиду та йонів тривалентного Феруму утворює комплекс жовто-помаранчевого кольору. Інтенсивність забарвлення пропорційна концентрації сечовини в пробі.

У процесі визначення готували дослідну, сліпу і калібрувальну проби. У пробірку з дослідною пробою вносили 0,02 мл сироватки крові чи тканинного гомогенату, у калібрувальну пробірку вносили 0,02 мл калібрувального розчину. Після цього у всі пробірки додавали по 3 мл розчину діацетилмонооксиму, а у пробірку з сліпою пробою додатково вносили 0,02 мл дистильованої води. Вміст пробірок ретельно перемішували протягом 1 хв і додавали по 1 мл реагенту хромогену та інкубували у термостаті протягом 10 хв при 37 °С. Потім пробірки швидко охолоджували у проточній холодній воді та відразу проводили вимірювання оптичної густини дослідної ( $E_{\text{досл}}$ ) і калібрувальної ( $E_{\text{каліб}}$ ) проб проти сліпої проби при довжині хвилі 470 нм у кюветі товщиною 10 мм.

Розрахунок концентрації сечовини проводили за формулою 2.8:

$$C = \frac{E_{\text{досл}}}{E_{\text{каліб}}} \times K \quad (2.8),$$

де:  $C$  – концентрація сечовини у дослідній пробі, ммоль/л;  $K$  – концентрація сечовини у калібрувальній пробі, ммоль/л.

**2.5.13 Вміст загального протеїну.** Вміст загального протеїну визначали за методом Лоурі [509]. Принцип методу ґрунтується на визначенні інтенсивності забарвлення, яке дає розчин протеїну в кольорових реакціях – біуретовій і Фоліна (ароматичні амінокислоти і цистеїн). При взаємодії протеїну з лужним розчином Купруму сульфату утворюються комплексні сполуки (біуретова реакція), які своїми тирозиновими і цистеїновими радикалами відновлюють суміш фосфатно-вольфраматної і фосфатно-молібдатної кислот з утворенням комплексної сполуки синього кольору (реактив Фоліна-Чекальтеу). Для визначення вмісту загального протеїну використовували стандартні набори реактивів НВП Філісіт-Діагностика (Україна) та Сімко ЛТД (Україна). Величину оптичної густини вимірювали при довжині хвилі 750 нм. Підрахунок кінцевого результату проводили за допомогою калібрувального графіка.

**2.5.14 Вміст альбуміну.** Визначення альбуміну проводили за допомогою реакції з бромкрезоловим зеленим [339]. Принцип методу ґрунтується на тому, що альбумін утворює у слабкокислому середовищі з індикатором бромкрезоловим зеленим в присутності детергенту забарвлену сполуку, інтенсивність забарвлення якої пропорційна концентрації альбуміну.

У процесі визначення у дослідні пробірки вносили 0,02 мл сироватки крові або відповідну кількість тканинного гомогенату, у калібрувальні пробірки вносили 0,02 мл калібрувального розчину, а у сліпу пробу вносили 0,02 мл фізіологічного розчину NaCl. Після цього в усі пробірки додавали по 2 мл робочого розчину бромкрезолового зеленого, витримували 5 хв при кімнатній температурі і проводили вимірювання оптичної густини дослідної ( $E_{\text{досл}}$ ) і калібрувальної ( $E_{\text{каліб}}$ ) проб проти холостої проби при довжині хвилі 620 нм. Розрахунок концентрації альбуміну проводили за формулою 2.9:

$$C = \frac{E_{\text{досл}}}{E_{\text{каліб}}} \times K \quad (2.9),$$

де  $C$  – концентрація альбуміну у дослідній пробі, г/л;  $K$  – концентрація альбуміну у калібрувальній пробі, г/л.

**2.5.15 Коцентрація окремих хімічних елементів у тканинах тварин.** Вміст металів у тканинах тварин визначали методом атомно-абсорбційної спектрофотометрії, принцип якого полягає у тому, що зразок розпилюється у полум'ї, де утворюється холодна атомна пара. Через атомну пару проходять промені світла певної резонансної частоти відповідного хімічного елемента, де електронами зовнішньої оболонки поглинається частина світлового потоку, подальша інтенсивність якого визначається детектором і обробляється за допомогою спеціалізованого програмного забезпечення (Selmi-AASpec). Інтенсивність поглинання пропорційне концентрації елемента у полум'ї атомізатора [187].

Для визначення вмісту металів у тканинах дослідні зразки попередньо мінералізували методом сухого озолення згідно з ГОСТом 286-87-85. Метод сухого озолення базується на повному розкладі органічних речовин при спалюванні проби в муфельній печі за умови контрольованого температурного режиму. Спочатку проводили висушування зразків. Для цього порцелянові тиглі з дослідними зразками поміщали у сушильну шафу з температурою 70–80 °С на дві години, а потім – на три години за температури 150 °С. Після цього тиглі зі зразками переносили на газовий пальник або електроплитку і доводили до максимальної потужності розігріву. Проби обвуглювали до закінчення кипіння і виділення пари, диму, не допускаючи загорання. Після цього приступали до наступного етапу мінералізації – здійснювали спалювання зразка у муфельній електропечі за температури 450 °С. Електропіч нагрівали поступово, піднімаючи температуру на 50 °С через кожні наступні 30 хвилин. Максимальна температура у муфельній печі не повинна перевищувати 450 °С. Пробу озолювали протягом 10–15 годин. Мінералізацію вважали закінченою тоді, коли зола набувала білого або блідо-рожевого забарвлення без обвуглених частинок, що вказувало про повне видалення із проби органічних речовин. Після озолення зразків проводили їх кислотну екстракцію за допомогою 3н

НСІ. У підготовлених таким чином зразках визначили необхідні хімічні елементи методом атомно-абсорбційної спектрофотометрії на приладі С-115ПК (Selmi, Україна), з використанням ацетилен-повітряної суміші. Перерахунок одержаних результатів здійснювали на «суху» і «сиру» масу досліджуваного зразка у міліграмах чи мікрограмах на 1 кг чи г тканини.

## 2.6. Дослідження на первинних культурах нервових клітин

Первинна культура – це культура, яка походить від клітин тканин та органів, відібраних безпосередньо із організму. Первинні культури зазвичай отримують трипсинізацією тканин, відібраних від здорових тварин, або їх ембріонів.

**2.6.1 Отримання первинних культур нейронів гіпокампу з ембріонів щурів.** З метою наступного культивування *in vitro* спочатку нейрони виділяли із зародкових тканин гіпокампа ембріонів 18 денного віку (E18) щурів лінії Вістар. Для цього після анестезії вагітних самок їх черевну частину позбавляли шерсті за допомогою бритви, оголену шкіру протирали 70% етанолом. Після цього за допомогою стерильних хірургічних інструментів здійснювали лапаротомію (відкривали черевну порожнину). Іншим набором стерильних щипців і ножиць видаляли роги матки і поміщали їх у стерильну пробірку з культуральним середовищем MEM (Gibco, США), після чого здійснювали евтаназію прооперованої самки шляхом декапітації. Тоді з рогів матки виймали ембріони, використовуючи маленькі ножиці і пінцет. Подальші маніпуляції з ембріонами здійснювали у полі зору біокулярного мікроскопа у невеликих стерильних чашках Петрі заповнених середовищем MEM (Gibco, США). Ембріони обезголовлювали у каудальному відділі, голови поміщали окрему чашку з середовищем MEM (Gibco, США). Головний мозок виділяли, спочатку зробивши розріз мікроножицями (або скальпелем з тонким лезом) на рівні очей, а потім за допомогою двох тонких пінцетів відділяли тканини, що його оточують. Мозок переносили в іншу чашку з

МЕМ середовищем для подальшого розтину. При потребі, цей етап повторювали 1-2 рази в окремих чашках Петрі з чистим середовищем з метою відмивання нервової тканини від крові і фрагментів сполучної тканини. Переносячи нервову тканину у пробірки чи на чашки Петрі, її безпосередньо пінцетом не захоплювали, а підіймали за допомогою мікроножиць чи загнутих щипців, використовуючи силу поверхневого натягу середовища для розтину.

Одразу приступали до виділення гіпокампу (Рис. 2.3). Для цього спочатку робили парамедіальний поздовжній розріз по всій довжині котикального зачатка (Рис. 2.3; (1)). У каудальній частині надріз робили збоку від зачатка гіпокампу. Кору мозку розкривали (Рис. 2.3; (2)) і робили розріз через поясну звивину і підстилаючу бахромку. Після цього гіпокамп акуратно відсували назад, щоб звільнити його від таламуса, розташованого під ним (Рис. 2.3 (3)). Нарешті робили надріз у нижній частині шматка, що містив гіпокамп ((Рис. 2.3 (4)), який акуратно очищали від зайвої тканини неокортексу та мозкових оболонок.

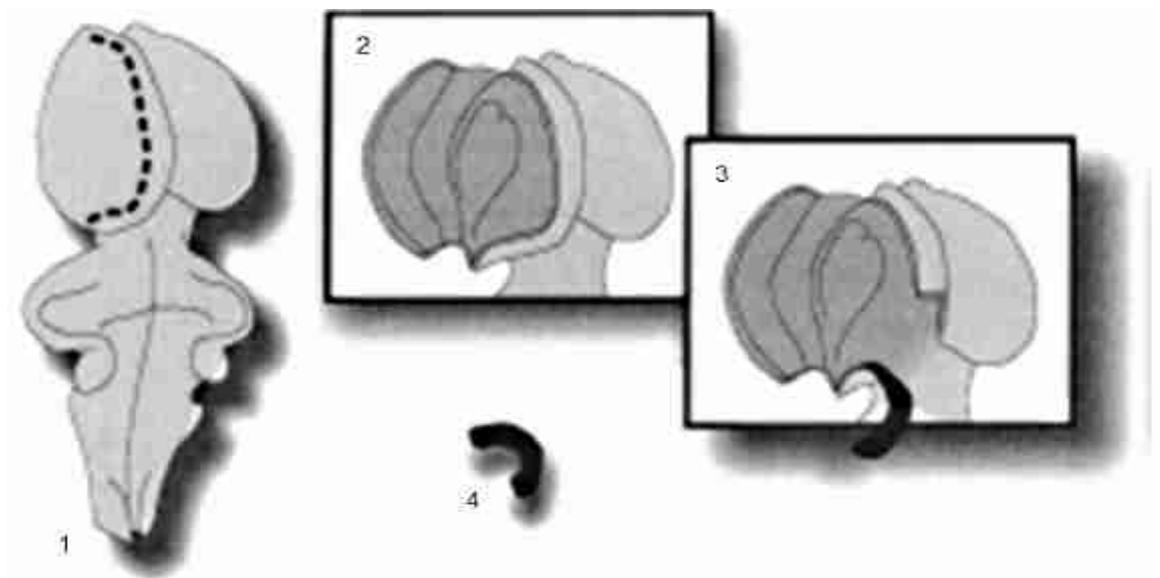


Рис. 2.3 Основні мікросірургічні етапи виділення зародкового гіпокампу з ембріона щура (E18) (за [690, 698]).

Для отримання суспензії нервових клітин гіпокампу його піддавали ензиматичній та механічній дисоціації. Оскільки ця процедура дуже суттєво впливає на життєздатність клітин і успішність їх наступного культивування

*in vitro*, то її правильному проведенню приділяли особливу увагу. Після виділення гіпокампіальної тканини із ембріонів, як було описане вище, їх переносили у пробірку Еппендорф та з метою ензиматичної дезагрегації клітин застосовували їх обробку 0,25% трипсином (Worthington, N.J., США) протягом 15 хв при 37°C. Після цього їх інкубували з 0,1% трипсином при 37°C протягом 20 хв. Зразки відмивали від трипсину, обережно змінюючи середовище 4 рази. Після цього тканину механічно дисоціювали до стану молокоподібної суспензії клітин, пропускаючи кілька разів крізь стерильні піпетки Пастера, слідкуючи, щоб не утворювалися бульки повітря. Одержана суспензія складалася з окремих нервових клітин, які використовували для культивування і експериментів *in vitro*.

**2.6.2 Культивування первинних культур нейронів гіпокампу щурів *in vitro*.** Виділені, як описано вище, нервові клітини вирощували у пластикових чашках Петрі діаметром 35 мм, або культуральних планшетах з 4 лунками діаметром 16 мм, застосовуючи CO<sub>2</sub>-інкубатор з наступними параметрами: температура – 37° С, концентрація CO<sub>2</sub>, – 5 %, відносна вологість – 80 %. Оскільки, більшість клітин ссавців за умов культури здатні рости тільки у вигляді моношару, прикріпленого до певного субстрату, нейрони висівали на поверхню покривних скелець, покритих поліетиленіміном, дотримуючись щільності 70000 клітин на см<sup>2</sup>. Більша густина клітин значно ускладнює, а то й повністю унеможлиблює проводити їх кількісний і морфологічний аналіз. Нейрони культивували в культуральному 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 [268]. На 7, 10 і 13 доби інкубування культури клітин, половину живильного середовища замінювали середовищем MEM з додаванням 2% B27 (Invitrogen, США). Повний склад і пропорції цього культурального середовища представлено у табл. 2.1.

Таблиця 2.1

Склад культурального середовища (MEM + B27) для вирощування нервових гіпокампіальних клітин *in vitro* [487].

Компонент	Компанія-виробник, каталожний номер	Стокова (маточна) концентрація	Кінцева концен-трація	Об'єм для 100 мл се-редовища
MEM	Gibco, 31095-029			77.2 мл
HEPES	Gibco, 15630-056	1 М	15 mM	1.5 мл
NU serum	BD, 355500 or 355100	1 x	15%	15 мл
Глюкоза		1 М	0.45%	2.3 мл
Na-піруват	Sigma, S8636	100 mM	1 mM	1 мл
L-глутамін	Gibco, 25030-024	100 x		1 мл
B27	Gibco, 17504-044	50 x		2 мл

**2.6.3. Трансфекція нейронів гіпокампу щурів *in vitro*.** Для трансфекції нейронів флуоресцентним білковими маркерами зеленим флуоресцентним білком (GFP) використовували метод магнетофекції – високоефективний спосіб перенесення генетичної інформації на основі доставки ДНК на металевих наночастинках під дією спрямованого магнітного поля. У віці 7-10 днів *in vitro* (DIV), змішані культури клітин гіпокампу були трансфеговані з використанням набору «Magnetofection Kit» (OZ Biosciences, Франція) та ліпофектаміну 2000 [268]. Для трансфекції культур, які вирощували у чашках діаметром 35 мм, 300  $\mu$ l середовища Opti-MEM змішували із 7  $\mu$ l ліпофектаміну 2000 (Invitrogen), 1,0  $\mu$ l реагенту Magnetofection CombiMag (OZ Bioscience, Франція) і 1-1,5 мкг рсДНК. Суміш інкубували протягом 20 хв при кімнатній температурі, а потім акуратно вносили її у чашки до культури нейронів на поверхню середовища. Чашки з культурами поміщали на спеціальні магнітні пластини (OZ Bioscience Марсель, Франція) і витримували так протягом 30-35 хв при 37°C. Процес трансфекції зупиняли шляхом заміни 90% інкубаційного розчину свіжим

культуральним середовищем (Табл. 2.1). Для трансфекції культур, які інкубували у планшетах з 4 лунками діаметром 16 мм, у кожен таку лунку вносили 60  $\mu$ l описаної вище суміші. В подальших експериментах використовували клітини через 2-5 діб після трансфекції.

Після трансфекції клітини досліджували за допомогою люмінесцентної мікроскопії. Культури з низьким рівнем трансфекції (<10 нейронів на покривне скельце) в експериментах не застосовували.

**2.6.4. Імуноцитохімічні дослідження нейронів гіпокампу щурів.** Для імуноцитохімічного аналізу нейрони спочатку фіксували 4% розчином параформальдегіду на фосфатному буфері (pH 7.1), або препаратом Antigenfix (Diapath, Martingo, Італія) протягом 20 хв при кімнатній температурі. Після того клітини пермеабілізували за допомогою 0.3% Тритону X-100 і блокували за допомогою 5% козячої сироватки крові (normal goat serum) при кімнатній температурі. Первинні антитіла додавали на 12 годин, протягом яких клітини поміщали в холодильник з температурою 4°C. Після цього клітини обробляли вторинними (флюорохром-кон'югованими) антитілами протягом 1 (в деяких експериментах – 2) год, за кімнатної температури.

У якості первинних антитіл, залежно від імуноцитохімічної реакції застосовували: моноклональні anti-GAD65 (Chemicon, США), поліклональні кролячі – rabbit anti-vGLUT1 (Synaptic Systems, Німеччина), rabbit anti-KCC2 (Euromedex, Франція), мишині anti-MAP2 (Sigma-Aldrich, США), курячі anti-MAP2 (ab5392) (Abcam, Великобританія) і мишині антиядерні нейрональні (NeuN) антитіла (Chemicon, США).

У якості вторинних антитіл, залежно від імуноцитохімічної реакції застосовували: Cy3 або Cy5 кон'юговані з козячим анти-мишиним або козячим анти-кролячим IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc. West Grove, США).

Для візуалізації ядер нейронів їх забарвлювали (протягом 5 хв) препаратом Hoeschst 33258 (Sigma-Aldrich, США), який дає синю флюоресценцію.

### **2.6.5 Конфокальна мікроскопія нейронів гіпокампу щурів.**

Конфокальну мікроскопію нервових клітин здійснювали за допомогою конфокального мікроскопа марки «Olympus Fluorview-500», застосовуючи об'єктиви 40×; 20× та 1.0 NA. Для аналізу інтенсивності флуорисценції нейронів застосовували програмне забезпечення «MetaMorph» та «ImageJ».

Спочатку створювали бінарну маску соми eGFP-флюоресцентних клітин, а потім аналізували інтенсивність KCC2 у тих ділянках клітини, які перекривалися із бінарною маскою. Для аналізу нетрансфєкованих клітин створювали бінарну маску довкола соми, яку візуалізували за допомогою антитіл MAP2. Параметри мікроскопування і вимірювання інтенсивності флюорисценції були однаковими для всіх експериментальних умов. Після аналізу даних були нормалізовані до середнього значення KCC2 в нейронах, трансфєкованих shRNA і eGFP. У кожних умовах експерименту аналізували по п'ять трансфєкованих нейронів, вибраних навмання.

### **2.6.6 Прижиттєва мікроскопія нейронів гіпокампу щурів.**

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 контролювався рівень вуглекислого газу і температура. Протягом трьох діб підряд, з використанням камери Micro-MAX CCD і програмного забезпечення MetaMorph (Roper Scientific) отримували і аналізували зображення одних і тих же 20-30 трансфєкованих нейронів за кожних окремих умов експерименту, знаходячи їх щоразу за системою координат. Одразу після процесу мікроскопування нейронів, чашки з культурами переносили у CO<sub>2</sub>-інкубатор. Нейрони з нормальним розвитком дендритів у яких спостерігався рівномірний розподілу GFP враховувалися як живі, тоді як нейрони з кластеризованим розподілом GFP або ті клітини, де GFP зникав вважалися мертвими.

## **2.7. Світлова мікроскопія тканин головного мозку та печінки щурів (гістологічні дослідження).**

Для проведення гістологічних досліджень тканин різних відділів головного мозку та печінки одразу після забою тварин відбирали фрагменти досліджуваних тканин товщиною 0,1-0,3 см. Відбір проб проводили таким чином: печінку препарували в області вісцеральної поверхні лівої медіальної долі, мозок - шляхом сагітального розрізу великих півкуль в області плаща і поздовжньої щілини великого мозку, а також поздовжнього розрізу мозочка. Матеріал фіксували в 10%- му розчині нейтрального формаліну та заливали у парафін, згідно з загальноприйнятими методами [102]. Серійні парафінові гістозрізи товщиною 7 мкм отримували за допомогою ротаційного мікротома НМ-340 Е з системою переносу зрізів та фарбували гематоксиліном та еозином. Дослідження гістологічних препаратів проводили з допомогою світлового мікроскопа Axioskop-40 фірми Carl Zeiss. Фотографування гістозрізів проводили за допомогою вмонтованої в мікроскоп відеокамери з фіксацією зображення програмним забезпеченням "Med. Cam."

## **2.8. Проведення поведінкових тестів на лабораторних тваринах**

Для дослідження впливу ХПФ та карбофурану на функціональний стан ЦНС щурів проводили їх тестування за наступними поведінковими методиками: «Водний лабіринт Морріса», «Відкрите поле», «Екстраполяційне позбавлення» та «Темно-світла камера» [17, 102, 260, 552]. З метою уникнення артефактів за дві години до тестування тварин поміщали у тихе, слабоосвітлюване місце. У цей період не проводили перегрупування тварин, не годували їх і не здійснювали жодних інших маніпуляцій. Такі процедури, як маркування, переміщення з однієї клітки в іншу, формування

груп (перегрупування) і т.д., проводили з тваринами не менш як за 24 год до тестування. Усі тестування проводили в один і той самий час доби, за однакових умов освітлення і температури, за відсутності сторонніх запахів і шуму [758].

**2.8.1 Водний лабіринт Морріса.** Функціональний стан нервової системи тварин, зокрема їх пам'яті та здатності навчатися досліджували за допомогою водного тесту, запровадженого у наукову практику шотландським вченим Р. Моррісом за методикою, описаною у [314, 552]. Принцип методу полягає в тому, що піддослідну тварину випускають у басейн із замутною водою. Із басейну нема виходу, але в нього встановлюють у певному місці невидиму для тварини підводну платформу, яка служить для неї місцем відпочинку. Знайшовши цю платформу, тварина може вибратись із води. Тварину, яка знайшла платформу, виймають з басейну, а через деякий час знову випускають плавати, але вже з іншої стартової позиції. Поступово час, який проходить від старту тварини до знаходження платформи, скорочується, а шлях спрощується, що свідчить про формування у тварини уявлення про просторове розміщення платформи на основі зовнішніх орієнтирів. За допомогою тесту Морріса можна оцінити динаміку формування твариною просторового навичку, стратегію поведінки тварини в ході досліду, встановити відмінності у поведінці тварин [102, 314].

Для проведення водного тесту Морріса використовували басейн діаметром 1,6м та глибиною 40см з переносною плексигласовою платформою-острівком, встановленою на 1см нижче рівня води (рис. 2.4). Під час проведення експериментів воду у басейні робили непрозорою за допомогою сухого молока (для неможливості візуального знаходження платформи), температуру води підтримували на рівні 20-28 градусів Цельсія. Навколо басейну на штативах рівновіддалено були розміщені 4 різні геометричні картонні фігури для полегшення просторової орієнтації тварин (рис. 2.4 (3)). Процедуру тестування тварин фіксували відеокамерою для подальшого аналізу і статистичної обробки. Кожній тварині надавали по 2

послідовні спроби, з інтервалом 10-15 хв для знаходження невидимої у замутненій воді платформи. Фіксували час, витрачений твариною в процесі досягнення цієї мети. У випадку, якщо тварина не знаходила платформи протягом 3 хв тестування зупиняли і спробу враховували як невдалу.

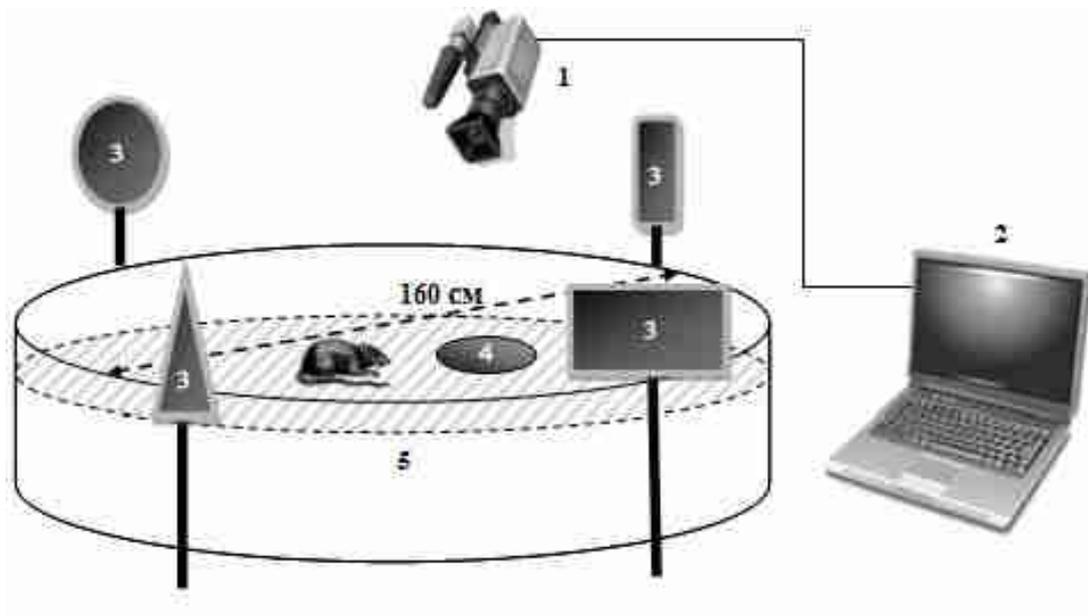


Рис. 2.4. Експериментальна установка для проведення водного тесту Морріса

Примітка. 1-2 – цифрова відеофіксуюча камера сполучена з комп'ютером; 3 – орієнтири для тварин у вигляді різних геометричних фігур; 4 – платформа-острівець, занурена на 1-2 см нижче рівня води; 5 – басейн, заповнений теплою і непрозорою водою.

**2.8.2 Тест «Відкрите поле»** Метод “відкритого поля” використовується для вимірювання дослідницької поведінки, рухової активності та емоційності тварин [17]. Принцип методу полягає в кількісному вимірюванні різних компонентів поведінки тварини, котру поміщають у новий для неї відкритий простір, вийти з якого не дозволяють бокові стінки.

У роботі використовували експериментальну установку квадратної форми, виготовлену з плексигласу (рис. 2.5). Вона мала розміри 80x80см, висота бокових стінок становила 40 см. Дно установки було розділене на 16 однакових за площею квадратів – 12 зовнішніх та 4 внутрішні, на точках перетину яких були зроблені скрізьні отвори діаметром 1 см. Тестування кожної тварини проводили протягом 3-5 хв під час цього реєстрували наступні параметри:

горизонтальну рухову активність (кількість перетнутих твариною зовнішніх і внутрішніх квадратів), вертикальну рухову активність (кількість стійок на задніх кінцівках), дослідження отворів, кількість актів дефекації та грумінгу.

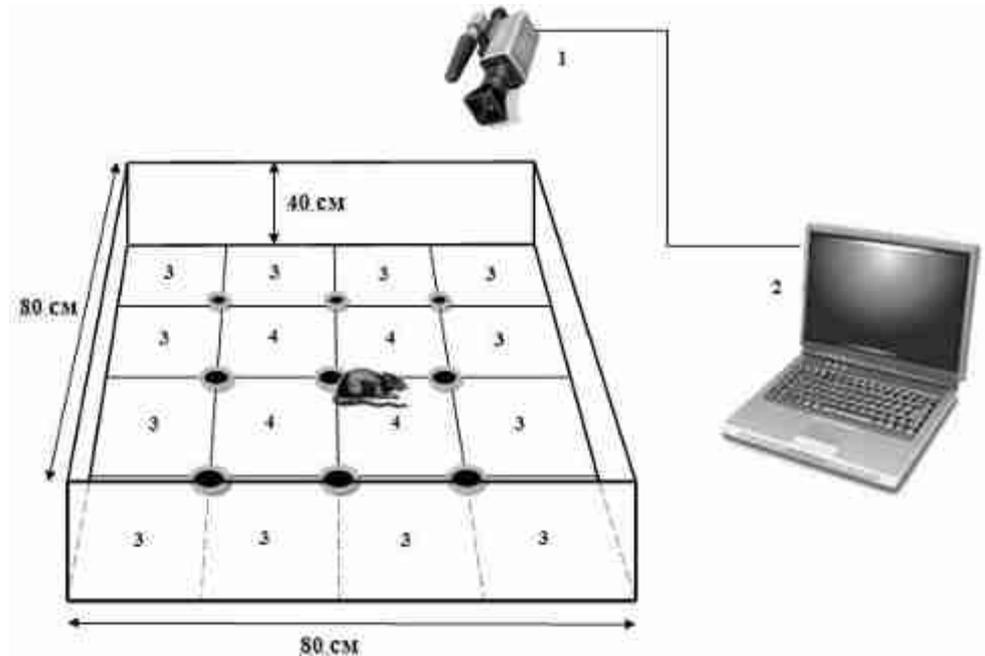


Рис. 2.5. Експериментальна установка «Відкрите поле»

Примітка. 1-2 – цифрова відеофіксуюча камера сполучена з комп'ютером; 3 – зовнішні квадрати; 4 – внутрішні квадрати).

*Горизонтальна рухова активність* тварин у “відкритому полі” включає їхнє переміщення за різними траєкторіями, навіть такі, як кружляння навколо однієї точки. Основним критерієм для ідентифікації даної форми поведінки є участь у переміщенні тварини всіх чотирьох лап. Дно арени розкреслене на квадрати однакової площі, тому за одиницю переміщення при візуальній реєстрації поведінки приймали один перетнутий квадрат. Якщо тварина знаходилась у межах одного квадрата (всіма чотирма лапами), а потім перейшла у суміжний з ним (задні лапи перетнули лінію, що їх розділяє), то вважали, що тварина перетнула один квадрат. Окремо реєстрували горизонтальну рухову активність на периферії і в центрі “відкритого поля”. Обрахунок результатів проводили, як за загальною горизонтальною руховою активністю, так і за руховою активністю у різних зонах “відкритого поля”.

*Вертикальна рухова активність* тварин у “відкритому полі” виражається двома видами стійок тварин: задні лапи щура залишаються на підлозі установки, а передні впираються у стінку поля (С), чи залишаються в повітрі (П). Обрахунок результатів проводили як за загальною вертикальною руховою активністю, так і роздільно (окремо С і П).

*Дослідження отворів* (які знаходяться в полі арени) представляє собою обнюхування країв отворів, яке ще називають «рефлексом нірки».

*Рівень дефекації* вважається індексом «емоційності» тварини. Однак, слід врахувати, що вид корму, ступінь наповнення кишечника, а також інші чинники, особливо при токсикологічному експерименті можуть суттєво впливати на активність шлунково-кишкового тракту тварини. Тому для мінімізації артефактів підраховували не кількість болюсів, а лише кількість актів дефекації тварин протягом періоду тестування.

*Грумінг* тварин при тестуванні у «відкритому полі» розділяли на дві категорії: короткий і довгий. Короткий грумінг характеризувався 1-2 швидкими круговими рухами лап навколо носа і невеликої ділянки біля нього, а довгий – вмиванням ділянки очей, закликанням лап за вуха і переходом на вмивання всієї голови, лап, боків, тулуба, аногенітальної ділянки, хвоста. Okремо фіксували кількість актів короткого і довгого грумінгу за тестовий період.

Після тестування кожної тварини установку ретельно протирали спочатку вологою губкою, а потім сухою ганчіркою, щоб уникнути впливу запахів протестованих щурів на наступних тварин.

**2.8.3 Тест «Екстраполяційне позбавлення»** Тест «Екстраполяційне позбавлення» призначений для вивчення когнітивних функцій гризунів в умовах гострого стресу і дозволяє оцінити: індивідуальні різновиди когнітивного стилю вирішення задачі (пошуку шляху позбавлення стресової ситуації), становлення когнітивних функцій в онтогенезі, вплив фармакологічних речовин на порушення когнітивних функцій і т.д. [101-102]. У роботі використовували пристрій «Екстраполяційне позбавлення»

(рис. 2.6), який представляє собою внутрішній циліндр виготовлений з прозорого акрилового пластику та зовнішню посудину з білого поліпропілену, для заповнення водою.



Рис. 2.6. Експериментальна установка «Екстраполяційне позбавлення»

Примітка. 1 – зовнішня циліндрична посудина, заповнена водою; 2 – внутрішній прозорий циліндр, у який поміщають піддослідну тварину.

Спеціальне металеве кріплення утримує циліндр в центрі ємності. У ході проведення даного тесту спостерігали за здатністю тварини, попередньо поміщеної у внутрішній циліндр знайти вихід із нього шляхом пірнання. Для проведення тестування пристрій наповнювали водою температурою 20-25°C так, щоб внутрішній циліндр був занурений на 2,5 см. Після цього щура необхідно акуратно помістити у воду, опустивши його в середину прозорого циліндру хвостом вниз. Реєстрацію поведінки щура у тесті проводили, як в процесі реального експерименту, так і за його відеозаписом фіксуючи наступні параметри (форми поведінки): латентний період початку аверсійних реакцій після посадки у пристрій, кількість стрибків за тестовий період, латентний період пірнання. Час тестування: до моменту пірнання (не більше 2 хвилин).

**2.8.4 Тест «Темно-світла камера»** Тест «Темно-світла камера» призначений для вивчення його використовують у дослідженні впливу різноманітних факторів на функціональний стан нервової системи тварин, зокрема на рівень тривожності та активності дослідницької поведінки [260].

«Темно-світла камера», яку використовували в роботі (рис. 2.7) складалася з двох однакових за розмірами кубічних частин – забарвленої у чорний колір комірки з кришкою і білої без кришки, яку додатково освітлювали лампою денного світла.

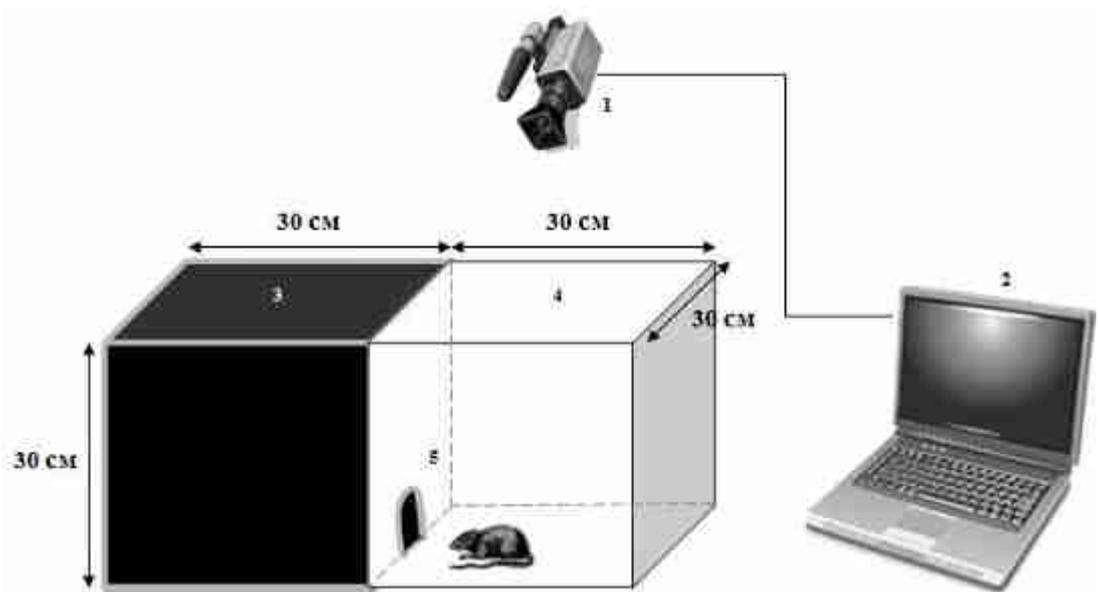


Рис. 2.7. Експериментальна установка «Темно-світла камера»

Примітка. 1-2 – цифрова відеофіксуюча камера сполучена з комп'ютером; 3 – темна частина камери; 4 – світла частина камери; 5 – отвір-нірка.

Комірки були сполучені невеликим отвором-ніркою. У процесі тестування тварину спочатку поміщали в освітлену білу частину і фіксували час, через який вона переходила у темну, а також кількість виглядувань з нірки та (за наявності) кількість і тривалість виходів з неї. Тривалість спроби для кожної тварини становила 3 хв.

## 2.9. Статистична обробка результатів і кореляційний аналіз

Статистичну обробку отриманих результатів проводили за допомогою пакету програм OriginPro 7.5 (Microcal, США) за стандартним критерієм t-тесту Ст'юдента. 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 ( $M \pm m$ ). Значення при  $p < 0,05$  вважали достовірними.

Аналітичну обробку мікрофотографій нервових клітин здійснювали за допомогою програм ImageJ [216] (Національний інститут здоров'я, США), MetaMorph Imaging System (Universal Imaging, США), NeuronJ (Швейцарський Федеральний Інститут технології (EPFL), Швейцарія і Biomedical Imaging Group, Нідерланди) [538, 539].

При проведенні кореляційного аналізу застосований метод параметричної кореляції з визначенням лінійного коефіцієнта кореляції Пірсона ( $r$ ) [180]. Від'ємне значення коефіцієнта вказує на зворотній (негативний, від'ємний) зв'язок між досліджуваними явищами, додатне – на прямопропорційний (прямий, позитивний) зв'язок, а нульове значення – на його відсутність [104-105, 180]. За силою зв'язку кореляційну залежність вважали тісною (сильною) при  $|r|=0,70 - 0,99$ , середньою – при  $|r|=0,30 - 0,69$ , слабкою – при  $|r|=0,01 - 0,29$ .

## **РОЗДІЛ 3**

### **РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ**

#### **3.1 Вплив гострої інтоксикації ХПФ у дозі 30 мг/кг на фізіолого-біохімічні показники щурів через 1, 3, 6, 10 діб після введення препарату**

З метою з'ясування впливу ХПФ на основні біохімічні показники крові та різних органів були проведені дослідження на щурах, яким одноразово внутрішньочеревинно вводили вищезазначений токсикант у дозі 30 мг/кг. З метою прослідкувати зміни основних біохімічних параметрів крові і тканин щурів матеріал для досліджень відбирали через 1, 3, 6, 10 діб після введення препарату. У ці ж часові періоди проводили оцінку функціонування ЦНС тварин за допомогою поведінкового тестування.

**3.1.1 Вплив гострої інтоксикації ХПФ у дозі 30 мг/кг на біохімічні показники крові щурів через 1, 3, 6, 10 діб після введення препарату.** Оскільки загальноприйнятим індикаторним показником ступеня інтоксикації ФОС і, зокрема ХПФ, є ензиматична активність ХЕ [581], було проведено визначення активності цього ензиму у сироватці крові на кожному з етапів експерименту. Слід зазначити, що у сироватці крові присутня так звана бутирилхолінестераза (БХЕ) або псевдохолінестераза – форма ензиму, що виробляється гепатоцитами і бере участь у руйнуванні не тільки холіну, але й холіноподібних сполук. Отруєння ФОС призводить до фосфорилування ХЕ, тобто утворюється так звана фосфорилізована ХЕ (ХЕ + залишок ФОС, що містить фосфор у вигляді залишку фосфорної кислоти), яка втрачає здатність гідролізувати АХ і відновлює свою активність дуже повільно. Як видно з даних представлених у таблиці 3.1, статистично вірогідне зниження активності БХЕ у сироватці крові тварин дослідної групи порівняно з

контрольними групами інтактних тварин було зафіксоване на першу і третю доби дослідження, а саме – на 80,9 ( $p<0,001$ ) і 42,8 % ( $p<0,05$ ) відповідно. Отже, 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.

Таблиця 3.1

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

Група тварин	Період досліджень (діб після введення ХПФ)			
	1	3	6	10
К	38,03 $\pm$ 3,17	40,64 $\pm$ 3,69	39,25 $\pm$ 2,06	35,1 $\pm$ 4,05
Д	21,09 $\pm$ 2,89***	28,57 $\pm$ 3,11*	34,56 $\pm$ 4,84	26,40 $\pm$ 3,4

Примітка: у цій та наступних таблицях: \*, \*\*, \*\*\* - вірогідність відмінностей між показниками контрольних і дослідних груп тварин (\* -  $p<0,05$ ; \*\* -  $p<0,01$ ; \*\*\* -  $p<0,001$ ).

Важливим біохімічним тестом для оцінки метаболічного стану є дослідження активностей амінотрансфераз – ензимів, які каталізують реакції переамінування. Результати досліджень (табл. 3.2) 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 контрольних зразків, відповідно – на 20 ( $P<0,001$ ), 28 ( $P<0,01$ ) і на 19 % ( $P<0,05$ ). Що стосується 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 вже практично на одному рівні з показниками контрольної групи.

За умов зростання амінотрансферазних активностей рекомендується розраховувати коефіцієнт де Рітіса (De Ritis ratio), тобто відношення абсолютних значень АсАт до АлАт [526]. Як видно з даних, які представлені у табл. 3.2, зміни коефіцієнту де Рітіса були незначними і не виходили за межі норми, хоча можна відзначити, що у першій частині експерименту – на 1-шу – 3-тю доби цей показник незначно зростав, а починаючи із 6-ї доби спостерігалась протилежна тенденція, зокрема, на 10 добу після інтоксикації ХПФ спостерігали зниження цього коефіцієнту до 1,49 у тварин дослідної групи порівняно до контролю, що було його мінімальним значенням протягом всього дослідного періоду.

Таблиця 3.2

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

Період досліджень (діб після введення ХПФ)	Групи тварин	Досліджувані показники		
		АлАт, (мкмоль/год×мл)	АсАт, (мкмоль/год×мл)	Коефіцієнт де Рітіса
1 доба	К	0,64±0,03	1,07±0,03	1,67
	Д	0,75±0,04*	1,28±0,02***	1,71
3 доби	К	0,70±0,10	1,20±0,09	1,71
	Д	0,87±0,06	1,54±0,07**	1,77
6 діб	К	0,74±0,02	1,27±0,03	1,71
	Д	0,91±0,04**	1,51±0,08*	1,66
10 діб	К	0,66±0,07	1,10±0,07	1,64
	Д	0,77±0,03	1,15±0,10	1,49

Лужна фосфатаза (ЛФ) – ензим, який здійснює дефосфорилювання багатьох типів молекул, зокрема, нуклеотидів, протеїнів, алкалоїдів та ін. Цей

ензим присутній практично у всіх тканинах організму, а основним місцем його знаходження в клітинах є мембрана. Відомо, що при гострих отруєннях різної етіології у крові часто відбувається зростання активності ЛФ. У результаті проведених досліджень було встановлено, що активність ЛФ у плазмі крові (табл. 3.3) щурів суттєво зростала у тварин 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 – відповідно на 35,6 ( $P < 0,001$ ) та 33,2 % ( $P < 0,05$ ), порівняно з тваринами контрольної групи. Це вказує на можливі біохімічні порушення в органах і тканинах щурів дослідної групи.

Таблиця 3.3

Активність лужної фосфатази (Од/л) в плазмі крові щурів через 1, 3, 6, і 10 діб після введення ХПФ у дозі 30 мг/кг, ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )

Групи тварин	Період досліджень (діб після введення ХПФ)			
	1	3	6	10
К	424,33±34,48	303,74±19,19	390,11±24,10	554,13±54,18
Д	597,07±52,80*	304,57±17,87	251,26±12,77***	370,40±50,47*

Проведені нами дослідження показали, що вміст загального протеїну у плазмі крові тварин експериментальної групи вірогідно знижувався на 3-тю та 6-ту доби після застосування ХПФ, відповідно на 16,1% ( $P < 0,05$ ) та 11,5 % ( $P < 0,01$ ) (табл. 3.4). Аналіз даних з вмісту сечовини в сироватці крові експериментальних тварин свідчить, що її рівень у інтоксикованих ХПФ тварин, практично не відрізняється від рівня у інтактних тварин (табл. 3.4), тобто рівень катаболізму амінокислот у тварин дослідних груп однаковий з таким у інтактних. Вміст альбуміну був вірогідно нижчим у тварин дослідної групи на 3 добу на 17,5 % ( $P < 0,01$ ) після введення пестициду ХПФ порівняно до контролю.

Таблиця 3.4

Показники протеїнового обміну у плазмі крові щурів через 1, 3, 6, і 10 діб після введення ХПФ у дозі 30 мг/кг, ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )

Період досліджень (діб після введення ХПФ)	Групи тварин	Досліджувані показники		
		Загальний протеїн, (г/л)	Альбумін, (г/л)	Сечовина, (ммоль/л)
1	К	79,40±3,91	56,70±2,23	4,24±0,77
	Д	77,46±1,82	62,13±2,66	5,76±0,65
3	К	71,47±3,45	44,23±2,01	4,21±0,35
	Д	60,00±3,03*	36,50±0,67**	4,63±0,14
6	К	73,21±2,14	46,39±1,73	6,56±0,67
	Д	64,83±1,88**	46,00±1,59	6,80±0,25
10	К	75,00±1,10	46,70±2,70	4,46±0,97
	Д	72,46±4,20	51,73±1,24	5,80±0,15

Гематологічні показники є важливою інтегральною характеристикою фізіологічного і клінічного стану організму, оскільки, як відомо кров є ключовою гомеостатичною системою. Вивчення гематологічних показників показало (табл. 3.5), що введення тваринам ХПФ приводило до зниження концентрації гемоглобіну на 1-шу добу на 8 % ( $p < 0,05$ ) без зміни кількості еритроцитів. Вірогідно знижена концентрація гемоглобіну утримувалась на 3-тю та 6-ту доби після введення ХПФ, відповідно на 17,9 ( $P < 0,01$ ) і 21 % ( $P < 0,01$ ). Концентрація гемоглобіну не зростала навіть на 10-ту добу після застосування вищевказаного пестициду і була вірогідно нижчою порівняно до тварин контрольної групи на 18,1 % ( $P < 0,01$ ). Загальна кількість еритроцитів при цьому не змінювалась.

Таблиця 3.5

Загальна кількість еритроцитів та концентрація гемоглобіну у крові щурів через 1, 3, 6, і 10 діб після введення ХПФ у дозі 30 мг/кг, ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )

Період досліджень (діб після введення ХПФ)	Групи тварин	Досліджувані показники	
		Загальна кількість еритроцитів, (Т/л)	Концентрація гемоглобіну, (г/л)
1	К	$3,28 \pm 0,21$	$141,00 \pm 3,34$
	Д	$3,71 \pm 0,16$	$129,80 \pm 4,00^*$
3	К	$3,52 \pm 0,27$	$146,50 \pm 4,12$
	Д	$3,33 \pm 0,13$	$120,80 \pm 6,45^{**}$
6	К	$3,49 \pm 0,19$	$148,00 \pm 5,87$
	Д	$3,41 \pm 0,32$	$117,05 \pm 6,00^{**}$
10	К	$3,40 \pm 0,22$	$138,19 \pm 5,36$
	Д	$3,35 \pm 0,24$	$113,13 \pm 6,34^{**}$

**3.1.2 Вплив гострої інтоксикації ХПФ у дозі 30 мг/кг на ключові показники АОС крові щурів через 1, 3, 6, 10 діб після введення препарату.** Ключова роль у захисті клітини від оксидативного стресу належить системі глутатіону. Проведені нами дослідження дозволили прослідкувати основну динаміку змін показників глутатіонової ланки антиоксидантної системи у крові через 1, 3, 6 та 10 діб після введення дослідним тваринам ХПФ. Як видно з представлених на табл. 3.6 даних, за дії ХПФ спостерігається значне (майже втричі) зниження вмісту глутатіону відновленого (ГВ) в гемолізатах еритроцитів щурів дослідної групи вже на першу добу експерименту ( $P < 0,001$ ). На 3-тю – 10-ту доби дослідного періоду вміст цього трипептиду у еритроцитах тварин, яким вводили вказаний токсикант надалі залишався на низькому рівні і був у 2,3 раза

нижчим ( $P < 0,05$ ) від контрольного значення. На 6-ту та 10-ту доби вміст цього трипептиду незначно зростав, але все ж залишався вірогідно приблизно вдвічі нижчим порівняно з контрольними значеннями. Поступове падіння вмісту ГВ в еритроцитах свідчить, очевидно, про його інтенсивне споживання у реакціях детоксикації. Зниження вмісту відновленого глутатіону у гемолізатах еритроцитів тварин дослідної групи може впливати на дестабілізацію ензимів, які беруть участь у підтриманні його фізіологічного рівня. Зниження вмісту ГВ у еритроцитах крові на, встановлене у ході наших 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 [217, 474, 514, 601].

Таблиця 3.6

Вміст глутатіону відновленого (ммоль/л) в гемолізатах еритроцитів щурів через 1, 3, 6, і 10 діб після введення ХПФ у дозі 30 мг/кг, ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )

Групи тварин	Період досліджень (діб після введення ХПФ)			
	1	3	6	10
К	$0,17 \pm 0,005$	$0,16 \pm 0,02$	$0,18 \pm 0,01$	$0,16 \pm 0,01$
Д	$0,06 \pm 0,004^{***}$	$0,07 \pm 0,006^*$	$0,10 \pm 0,03^*$	$0,07 \pm 0,004^{***}$

Глутатіонредуктаза (ГР) відновлює дисульфідний зв'язок окисненого глутатіону (GSSG) до його сульфгідрильної форми (ГВ). Результати наших досліджень свідчать, що поряд із зниженням концентрації ГВ, за умов гострої інтоксикації ХПФ, спостерігаються зміни у активності ГР (табл. 3.7). Зокрема, аналіз динаміки змін цього ензиму за умов токсичного ураження організму тварин, викликаного досліджуваним препаратом показує, що активність ГР вірогідно знижувалась на 1-шу добу після застосування досліджуваного токсиканта майже у 2,5 рази ( $P < 0,001$ ), а також на 3-тю та 10-

ту доби після введення ХПФ відповідно на 31% ( $P<0,01$ ) та 32 % ( $P<0,01$ ) порівняно до тварин контрольної групи.

Таблиця 3.7

Активність ГП і ГР і ГТ у гемолізатах еритроцитів крові щурів через 1, 3, 6, і 10 діб після введення ХПФ у дозі 30 мг/кг, ( $M\pm m$ ,  $n=5$ )

Період досліджень (діб після введення ХПФ)	Групи тварин	Досліджувані показники		
		ГПО (нмоль/хв·мг протеїну)	ГР (мкмольNADPH/хв·мг протеїну)	ГТ (мкмоль/хв·мг протеїну)
1	К	67,80 ±1,93	0,72 ±0,03	0,45 ± 0,07
	Д	54,51±2,02**	0,28 ±0,03***	0,54±0,02**
3	К	69,34±3,27	0,68 ±0,02	0,43±0,02
	Д	53,78±2,73*	0,47±0,03**	0,55 ± 0,02**
6	К	70,01±2,15	0,74±0,04	0,44±0,03
	Д	84,51±2,05**	0,69±0,02	0,23 ± 0,03***
10	К	65,12±2,88	0,71±0,03	0,45±0,09
	Д	64,82±4,11	0,48 ± 0,04**	0,46 ±0,03

Однією з причин зниження глутатіонредуктазної 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 окисленої форми нуклеотиду (NADP). NADPH + H<sup>+</sup> утворюється у гексозомонофосфатному шунті (пентозному циклі) і надає H<sup>+</sup> для регенерації ГВ із глутатіондисульфідів (GSSG) за допомогою ГР. Нормальне функціонування у клітині NADPH-залежної ГР є дуже важливим для запобігання окисного ушкодження мітохондрій, які неспроможні синтезувати ГВ *de novo* і тому залежать від інтенсивності відновлення глутатіонредуктазою окисненого глутатіону та його надходження з цитозолу через зовнішню мітохондріальну мембрану. Тобто,

зниження активності еритроцитарної ГР може бути зумовлене як дією АФО, так і частковим виснаженням реакцій пентозофосфатного шляху утилізації глюкози в еритроцитах, зокрема зниженням інтенсивності глюкозо-6-фосфатдегідрогеназної реакції.

Не менш важливим ензимом глутатіонової системи є ГПО, що є гомотетрамерним селенопротеїном, який каталізує відновлення  $H_2O_2$ , або органічних гідропероксидів і внаслідок цього захищає клітини від дії реактивних форм Оксигену [89, 109]. Результати досліджень показали (табл. 3.7), що активність ГПО в гемолізатах еритроцитів щурів після введення досліджуваного токсиканта на 1-шу добу експерименту була вірогідно нижчою у тварин дослідної групи у порівнянні з тваринами контрольної групи на 19,6 % ( $P < 0,01$ ). На 3-тю добу активність цього ензиму була меншою від контрольних значень на 22,5 % ( $P < 0,05$ ). Проте, отримані результати показали, що вже починаючи з 6-ї 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.

Не виключено, що поступове зниження активності ГПО в еритроцитах у проміжку з 1 по 3-тю добу експериментального періоду зумовлене вичерпанням доступного пулу ГВ та накопиченням продуктів ліпопероксидації. Таке припущення підтверджується даними, згідно з якими глутатіонредуктазна активність є зниженою на 1-шу та 3-тю доби після дії ХПФ. Це узгоджується з думкою про те, що тривала активація ГПО можлива лише за умови підтримання достатньо високого рівня внутрішньоклітинного ГВ, який виконує роль не лише субстрату реакцій, але й фактора, необхідного для постійного відновлення розміщених у каталітичному центрі ензиму селенольних груп, що окислюються у процесі глутатіонпероксидазної реакції [88-90].

Принципово важливим є наявність в еритроцитах глутатіонтрансферази – ензиму, який належить до мікросомального комплексу P450, і відіграє важливу роль як в детоксикаційних процесах, так і в забезпеченні нормального

функціонування нервової системи. Функціонування ГТ забезпечує можливість детоксикації екзогенних гідрофільних сполук вже на перших етапах їх проникнення в організм, тому визначення активностей цього ензиму за умов інтоксикації тварин ХПФ має важливе інформативне значення [448, 673]. Як показали результати досліджень (табл. 3.7) на початкових етапах дослідного періоду спостерігалось достовірне 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 противагу цій напруженості змін, на 6-ту добу у тварин дослідної групи, навпаки, мало місце вірогідне суттєве зниження глутатіонтрансферазної активності у 1,91 раза ( $P < 0,001$ ). Припускаємо, що таку зміну можна пояснити збільшенням токсичного навантаження на організм, при якому індукується цитохром Р 450 и ГТ. Це, в свою чергу, супроводжується зниженням рівня у клітинах крові вмісту ГВ, який інтенсивно використовується в якості агента кон'югації.

СОД є одним з найважливіших ензимів антиоксидантної системи організму. Цей ензим здійснює реакцію дисмутації супероксидних аніон-радикалів і перетворює їх на молекули Гідрогену пероксиду, які є менш реакційно здатними [127, 218, 373, 374, 376]. Отримані дані (табл. 3.8) свідчать про зниження активності СОД у гемолізатах еритроцитів тварин дослідної групи протягом всього періоду експерименту порівняно до контролю.

Слід, однак відзначити, що найвагомніше – приблизно на 50 % ( $P < 0,001$ ) зниження активності СОД спостерігалось через 3, 6 і 10 діб після введення тваринам токсину. 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.

Каталаза – це ензим, який каталізує реакцію в ході якої відбувається знешкодження Гідрогену пероксиду, що утворюється в результаті реакції

дисмутації супероксидного радикалу і її активність мала б пропорційно змінюватись до активності СОД [180, 427, 754].

Таблиця 3.8

Активність СОД та каталази в еритроцитах крові щурів через 1, 3, 6, і 10 діб після введення ХПФ у дозі 30 мг/кг, ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )

Період досліджень (діб після введення ХПФ)	Групи тварин	Досліджувані показники	
		СОД, (ум.од./ мг протеїну)	КАТ, (мкмоль/хв·мг протеїну)
1	К	$54,78 \pm 2,77$	$0,28 \pm 0,04$
	Д	$50,11 \pm 4,54$	$0,30 \pm 0,02$
3	К	$64,46 \pm 3,12$	$0,30 \pm 0,01$
	Д	$39,93 \pm 0,93^{***}$	$0,31 \pm 0,03$
6	К	$50,14 \pm 1,68$	$0,30 \pm 0,07$
	Д	$26,83 \pm 2,70^{***}$	$0,29 \pm 0,009$
10	К	$50,87 \pm 2,57$	$0,35 \pm 0,01$
	Д	$25,51 \pm 0,91^{***}$	$0,41 \pm 0,02^*$

Проте, як показали наші дослідження активність КАТ у контрольній та дослідній групах була практично на одному рівні протягом всього періоду досліджень, за винятком 10-ї доби після застосування ХПФ, коли активність цього ензиму вірогідно зростала у гемолізатах еритроцитів на 17 % ( $P < 0,05$ ) порівняно до гемолізатів контрольної групи інтактних тварин.

Дослідженнями встановлено (табл. 3.9), що за дії ХПФ вірогідно зростав вміст ТБК- активних продуктів у плазмі крові тварин дослідної групи на 1-шу, 3-тю, 6-ту та 10-ту доби після застосування цього ксенобіотика, відповідно – на 14 % ( $P < 0,05$ ), 171 % ( $P < 0,001$ ), 69% ( $P < 0,001$ ) і 62 % ( $P < 0,001$ ).

Найсуттєвіше зростання цього показника – більше ніж у 2,5 рази спостерігали на 3-тю добу після застосування ХПФ. Вираженість вказаних процесів є 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.

Таблиця 3.9

Вміст ТБК-активних продуктів та гідропероксидів ліпідів у плазмі крові щурів через 1, 3, 6, і 10 діб після введення ХПФ у дозі 30 мг/кг, ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )

Період досліджень (діб після введення ХПФ)	Групи тварин	Досліджувані показники	
		ТБК-активні продукти, (нмоль/мл)	ГПЛ, ( $\Delta D^{480}$ /мл)
1	К	$4,71 \pm 0,13$	$0,33 \pm 0,04$
	Д	$5,36 \pm 0,28 *$	$0,64 \pm 0,05^{***}$
3	К	$3,23 \pm 0,21$	$0,43 \pm 0,01$
	Д	$8,77 \pm 0,30^{***}$	$0,85 \pm 0,03^{***}$
6	К	$4,82 \pm 0,67$	$0,39 \pm 0,07$
	Д	$8,17 \pm 0,42^{***}$	$0,42 \pm 0,008$
10	К	$4,21 \pm 0,21$	$0,37 \pm 0,02$
	Д	$6,83 \pm 0,12^{***}$	$0,39 \pm 0,03$

При дослідженні вмісту ГПЛ ми спостерігали вірогідне їх зростання на 1-шу та 3-тю доби після введення ХПФ відповідно на 93,9 ( $P < 0,05$ ) та 97,6 % ( $P < 0,001$ ), порівняно до плазми крові інтактних тварин контрольної групи.

Підсумовуючи результати цього етапу роботи, які описані вище можна констатувати, що введення дослідним тваринам ХПФ призводило до активації процесів перекисного окислення 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 досліджень.

**3.1.3 Вплив гострої інтоксикації ХПФ у дозі 30 мг/кг на показники АОС мозку, печінки і селезінки щурів через 1, 3, 6, 10 діб після введення препарату.** Отруєння фосфорорганічними пестицидами викликають суттєві зміни стану системи глутатіону в тканинах отруєних тварин та залежить від дози токсиканта, його розподілу в організмі та накопиченням у тканинах. Як показали результати наших досліджень гостра інтоксикація ХПФ впливає на стан системи глутатіону в тканинах отруєних щурів.

ГВ може або сам по собі служити пасткою для супероксид і гідроксил-радикалу, або функціонувати в якості субстрата-донора для ензимів, що забезпечують детоксикацію АФО [258]. Як показали результати досліджень тканин мозку на 1-шу добу після введення ХПФ (табл. 3.10) вміст глутатіону відновленого був вірогідно вищим у тварин дослідної групи більше ніж у 3 рази ( $P < 0,001$ ) порівняно до контрольної групи.

На 3-тю добу вірогідних відмінностей між вмістом ГВ між контрольними і дослідними зразками виявлено не було. А на 6-ту добу після введення тваринам ХПФ вміст досліджуваного трипептиду у тканинах мозку дослідної групи вірогідно знижувався порівняно до аналогічних тканин інтактних тварин на 62,5 % ( $P < 0,001$ ).

Активність ГПО та ГТ у мозку вірогідно зростала на 1-шу добу після введення ХПФ, відповідно на 41 % ( $P < 0,05$ ) і в 3,4 рази ( $P < 0,001$ ), порівняно з контролем. У подальші періоди досліджень, а саме на 3-тю та 10-ту доби після введення токсиканта, активність ГПО навпаки – вірогідно знижувалась у щурів дослідної групи – відповідно на 27 % ( $P < 0,05$ ) і 36 % ( $P < 0,05$ ), порівняно до мозкових тканин інтактних тварин.

Активність ГТ, навпаки, протягом всього періоду досліджень була вірогідно вищою у тварин дослідної групи порівняно до контролю: на 1-шу добу експерименту – в 3,4 рази ( $P < 0,001$ ), на 3-тю добу – на 86 % ( $P < 0,001$ ) та на 107 % ( $P < 0,001$ ) на 6-ту добу після введення тваринам ХПФ.

Таблиця 3.10

Вміст ГВ і активність глутатіонзалежних ензимів у тканинах мозку щурів через 1, 3, 6, і 10 діб після введення ХПФ у дозі 30 мг/кг, ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )

Період досліджень (діб після введення ХПФ)	Групи тварин	Досліджувані показники			
		ГВ, (ммоль/г тканини)	ГПО, (нмоль/хв·мг протеїну)	ГР, (мкмоль NADPH/хв·мг протеїну)	ГТ, (мкмоль/хв·мг протеїну)
1	К	0,08±0,004	20,00±1,65	2,12 ± 0,28	0,24± 0,05
	Д	0,29±0,003***	28,23±1,91*	2,35± 0,46	0,83±0,01***
3	К	0,06±0,002	19,34±1,03	2,63± 0,61	0,30± 0,03
	Д	0,07±0,005	15,18±0,97*	2,58± 0,57	0,56±0,02***
6	К	0,08±0,005	20,34±1,45	2,33± 0,51	0,29± 0,02
	Д	0,05 ±0,004***	21,68 ±2,13	2,87± 0,38	0,60±0,02***
10	К	0,08±0,005	24,72±2,11	2,67± 0,39	0,34± 0,04
	Д	0,08±0,003	18,22 ±1,72*	1,29± 0,36***	0,37± 0,06

Активність ГР практично не зазнавала змін у перші 6 днів після використання ХПФ, але на 10-ту добу вона вірогідно знизилась у 2 рази ( $P<0,001$ ) у тварин дослідної групи порівняно до контролю.

Також в ході виконання даного етапу роботи досліджували показники глутатіонової системи гомогенатів тканин печінки. Цей орган важливий з одного боку у дезінтоксикаційних процесах, а з другого – в обміні глутатіону, оскільки основним органом синтезу ГВ у ссавців є саме печінка, яка забезпечує біля 90 % всього циркулюючого глутатіону при фізіологічних умовах. Як видно з табл. 3.11 вміст ГВ у даному експерименті знижувався у тканинах печінки щурів дослідної групи на 20 % ( $P<0,05$ ) на 1-шу добу після введення ХПФ, та на 36 % ( $P<0,001$ ) на 3-тю добу після введення ХПФ, порівняно з контролем. На 6-ту добу вміст ГВ у гомогенатах тканин печінки дослідної групи знизився у 2 рази ( $P<0,001$ ) порівняно з контрольною групою тварин.

Таблиця 3.11

Вміст ГВ і активність глутатіонзалежних ензимів у тканинах печінки щурів через 1, 3, 6, і 10 діб після введення ХПФ у дозі 30 мг/кг, ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )

Період досліджень (діб після введення ХПФ)	Групи тварин	Досліджувані показники			
		ГВ, (ммоль/ г тканини)	ГПО, (нмоль/хв·мг протеїну)	ГР, (мкмоль NADPH/хв·мг протеїну)	ГТ, (мкмоль/хв·мг протеїну)
1	К	0,45±0,03	30,21±1,37	2,28± 0,22	0,64± 0,02
	Д	0,36±0,02*	35,96±2,00*	0,62±0,12***	1,36±0,04***
3	К	0,59± 0,03	48,23 ± 2,07	2,01± 0,34	0,71± 0,03
	Д	0,38±0,02***	40,15±2,92*	0,77±0,09**	1,67±0,05***
6	К	0,71±0,03	44,72 ± 4,37	2,54± 0,26	0,82± 0,05
	Д	0,35±0,05***	42,62±3,76	0,96± 0,21***	0,30±0,04***
10	К	0,47±0,04	36,43±2,37	1,97 ±0,14	0,72± 0,02
	Д	0,41± 0,03	39,95±2,78	1,12± 0,32*	0,48±0,06**

У активності ГПО – ключового ензиму АОС, спостерігалися менш виражені зміни. Якщо через 1 добу після застосування ХПФ активність цього ензиму у тканинах печінки була вищою у тварин дослідної групи порівняно до контролю на 19 % ( $P < 0,05$ ), то вже на 3-тю добу активність ГПО вірогідно знижувалась на 34 % ( $P < 0,05$ ) у групі тварин, які отримували ХПФ порівняно до контролю. Подальші зміни між групами були незначними.

При аналізі у тканинах печінки активностей ГР спостерігали досить суттєві відмінності між групами. Зокрема, активність ГР у тканинах печінки була вірогідно нижчою у інтоксикованих тварин. Причому зниження активностей ГР мало місце у тканинах печінки протягом всього періоду досліджень, і становило – більше ніж у 4,5 раза ( $P < 0,001$ ) на 1-шу добу, 2,6 раза ( $P < 0,01$ ) на 3-тю та 6-ту доби дослідження ( $P < 0,001$ ), тобто після введення тваринам ХПФ. На 10 добу після введення ХПФ активність досліджуваного

ензиму у печінці інтоксикованих щурів була вірогідно нижчою порівняно до контролю на 28,6 43,2 % ( $P<0,05$ ).

ГТ-активність гомогенатів тканин печінки зростала у перші доби після введення токсиканту, зокрема, на 1-шу добу – у 2,1 ( $P<0,001$ ) та у 2,3 раза ( $P<0,001$ ) на 3-тю добу, порівняно з тканинами печінки контрольної групи. У подальшому, тобто на 6-ту та 10-ту доби активність цього ензиму вірогідно знижувалась, відповідно у 2,7 раза ( $P<0,001$ ) та на 33,4 % ( $P<0,01$ ).

Аналогічні дослідження були здійснені також на тканинах селезінки – органі лімфоїдного кровотворення та імунного захисту. Дані, які були отримані стосовно глутатіонової ланки АОС у тканинах селезінки представлені у табл. 3.12.

Таблиця 3.12

Вміст ГВ і активність глутатіонзалежних ензимів у тканинах селезінки щурів через 1, 3, 6, і 10 діб після введення ХПФ у дозі 30 мг/кг, ( $M\pm m$ ,  $n=5$ )

Період досліджень (діб після введення ХПФ)	Групи тварин	Досліджувані показники			
		ГВ, (ммоль/г тканини)	ГПО, (нмоль/хв·мг протеїну)	ГР, (мкмоль NADPH/хв·мг протеїну)	ГТ, (мкмоль/хв·мг протеїну)
1	К	0,09±0,003	25,27±1,38	4,87 ± 0,42	0,46± 0,04
	Д	0,07±0,002***	13,20±1,30***	3,15±0,37**	0,87±0,03***
3	К	0,08±0,005	27,00±2,03	3,82± 0,57	0,62± 0,05
	Д	0,06±0,002**	14,78±1,04***	3,52± 0,40	0,40±0,02***
6	К	0,07±0,003	20,34±2,45	4,00± 0,43	0,62± 0,04
	Д	0,05±0,004***	14,56 ±1,67*	3,87± 0,55	0,27±0,02***
10	К	0,07±0,004	21,19±1,02	3,45± 0,51	0,54± 0,02
	Д	0,07±0,002	19,32 ±1,79	3,29± 0,35	0,35±0,03***

Встановлено, що вміст ГВ у тканинах селезінки вірогідно знижувався майже у всі періоди досліджень, а саме: на 1-шу добу – на 22,3 % ( $P<0,001$ ), на 3-тю – на 25 % ( $P<0,01$ ), на 6-ту – на 28,6 % ( $P<0,001$ ) доби порівняно до

контролю. Активність ГПО протягом експерименту у селезінці змінювалась наступним чином: знижувалась на 1-шу добу на 92 % ( $P < 0,001$ ), на 3-тю – на 83 % ( $P < 0,001$ ) та на 40 % ( $P < 0,05$ ) на 6-ту добу після введення ХПФ. Активність ГР була вірогідно нижчою лише на 1-шу ( $P < 0,01$ ) добу після інтоксикації. У наступні періоди досліджень суттєвих змін не спостерігали. Активність ГТ у тканинах селезінки, подібно як і у тканинах печінки, зростала на 1-шу ( $P < 0,001$ ) та 3-тю ( $P < 0,001$ ) доби і, навпаки, знижувалась на 6-ту ( $P < 0,001$ ) та 10-ту ( $P < 0,001$ ) доби після дії ХПФ порівняно до контрольної групи тварин.

Отже, наведені у цьому розділі дисертаційної роботи результати свідчать про те, що гостре отруєння щурів ХПФ, яке було викликане одноразовим введенням цієї сполуки у дозі 30 мг/кг маси тіла, призводить до тканинно-залежної і часозалежної активації процесів ПОЛ, що супроводжується нагромадженням продуктів ліпопероксидації та АФО. Останні можуть спричиняти деструкційні явища у мембранах різних клітин, зокрема еритроцитів і гепатоцитів і тим самим підсилювати ендогенну інтоксикацію організму.

**3.1.4 Вплив гострої інтоксикації ХПФ у дозі 30 мг/кг на на вміст металів у тканинах різних органів щурів через 1, 3, 6, 10 діб після введення препарату.** Загальновідомо, що мінеральні елементи входять до складу всіх клітин і тканин організму і є їх необхідною складовою частиною. Макро- і мікроелементи володіють високою біологічною активністю і беруть участь в процесах аеробного гліколізу, циклу трикарбонових кислот, окисного фосфорилування і його регуляції, тобто в комплексі біохімічних реакцій, які визначають енергетичний метаболізм. Більшість мікроелементів входить до складу органічних сполук (гормони, ензими та ін) і часто обумовлює їх високу хімічну та біологічну активність. Неодноразово доведено, що порушення обміну елементів є важливою ланкою в патогенезі багатьох захворювань ЦНС, але, у той сам час, при різних патологічних процесах в нервовій системі мають місце порушення метаболізму хімічних елементів і

металів зокрема [41-42]. 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.

*Вплив гострої інтоксикації ХПФ у дозі 30 мг/кг на вміст металів у тканинах мозку.* Купрум виконує надзвичайно важливі функції для більшості живих організмів [226, 450, 720]. Володіючи високим окисно-відновним потенціалом, він служить кофактором протеїнів у різних біологічних реакціях, таких як дихання, формування сполучної тканини, обмін Феруму, знешкодження вільних радикалів та неврологічні функції. Купрум анологічно до Феруму також виступає посередником утворення вільних радикалів, а також окиснення ліпідів, протеїнів і ДНК. Баланс між внутрішньоклітинним і позаклітинним вмістом Купруму підтримується за допомогою систем клітинного транспорту, які регулюють її поглинання, експорт та внутрішньоклітинну компартменталізацію. Результати нашої роботи свідчать про зниження вмісту Купруму у більшості тканин упродовж експериментального періоду, 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 [226, 255, 264, 319, 617, 622, 659].

У роботі встановлено, що за інтоксикації щурів ХПФ вміст Купруму у тканинах органів тварин переважно спадав. Зокрема, у тканинах мозку спостерігали тенденцію до зниження вмісту Купруму (табл. 3.13) на всіх етапах експерименту у тварин дослідної групи. Але статистично вірогідна різниця – 34,2 % ( $P < 0,05$ ) була встановлена лише на першу добу після введення щурам ХПФ.

Таблиця 3.13

Вміст Купруму в тканинах головного мозку щурів через 1, 3, 6, і 10 діб після введення ХПФ у дозі 30 мг/кг, ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )

Час після введення ХПФ	Групи тварин		Зміни між інтактною і дослідною групами
	Інтактна (контроль)	Дослідна	
доба	мг/кг сухої ваги		%
1	2,95 ± 0,14	1,94 ± 0,28*	↓ 34,2
3	3,01 ± 0,16	2,81 ± 0,13	↓ 6,6
6	3,02 ± 0,12	2,85 ± 0,28	↓ 8,9
10	3,01 ± 0,17	2,94 ± 0,16	↓ 2,3

Манган є одним із найважливіших мікроелементів, що забезпечує нормальне функціонування організму тварин. Важливо, що цей елемент виконує серед інших антиоксидантну функцію. Головним чином, це стосується двовалентного Мангану, який міститься у головному мозку та інших тканинах як частина ключового ензиму АОС – СОД. У свою чергу, трьохвалентний марганець може мати прооксидантні властивості.

Як видно з результатів дослідження, представлених у табл. 3.14, зміни у вмісті Мангану у мозку мали протилежну тенденцію порівняно до концентрації Купруму. Гостра інтоксикація щурів ХПФ призводила до статистично вірогідного зростання вмісту Мангану у тканинах мозку щурів дослідної групи через 10 діб після введення ксенобіотика. У інші часові періоди експериментального періоду вірогідних відмінностей між тканинами мозку контрольної і дослідних груп не спостерігали. Отже, концентрація Мангану мала тенденцію до зростання протягом усього досліду, а вірогідне зростання його вмісту на 51,7 % ( $p \leq 0,05$ ), порівняно з контролем встановлено на 10-ту добу після введення щурам ксенобіотика.

Таблиця 3.14

Вміст Мангану в тканинах головного мозку щурів через 1, 3, 6, і 10 діб після введення ХПФ у дозі 30 мг/кг, ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )

Час після введення ХПФ	Групи тварин		Зміни між інтактною і дослідною групами
	Інтактна (контроль)	Дослідна	
доба	мг/кг сухої ваги		%
1	6,00 ± 0,41	6,03 ± 0,45	↑ 0,5
3	5,91 ± 0,62	5,93 ± 0,30	↑ 0,3
6	5,99 ± 0,59	7,06 ± 0,72	↑ 17,9
10	5,92 ± 0,60	8,98 ± 0,83*	↑ 51,7

Компонентом понад 70 ензимів, які функціонують у багатьох ланках клітинного метаболізму, включаючи метаболізм протеїнів, ліпідів і вуглеводів виступає Цинк. Відомо також, що цей метал бере участь у клітинній передачі сигналу і навіть функціонує як модулятор синаптичної нейротрансмісії у Zn-вмісних нейронах переднього мозку, бере участь у фосфорилуванні і дефосфорилуванні протеїнів, а також активності факторів транскрипції. На відміну від інших мікроелементів, Цинк не накопичується з утворенням постійних депо. У зв'язку з цим, дані про вміст цього елемента у різних тканинах організму, головного мозку зокрема, представляють великий інтерес.

При дослідженні концентрації Цинку (табл. 3.15) у тканинах мозку щурів на тлі гострої інтоксикації їх ХПФ в дозі 30 мг/кг маси тіла, на 1-шу, 3-тю і 6-ту доби експериментального періоду змін у вмісті цього металу між тканинами дослідних і контрольних тварин не спостерігали. У свою чергу, було встановлено вірогідне зростання вмісту цього елемента на десяту добу експерименту, яке становило 55,9 % ( $p \leq 0,001$ ).

Таблиця 3.15

Вміст Цинку в тканинах головного мозку щурів через 1, 3, 6, і 10 діб після введення ХПФ у дозі 30 мг/кг, ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )

Час після введення ХПФ	Групи тварин		Зміни між інтактною і дослідною групами
	Інтактна (контроль)	Дослідна	
доба	мг/кг сухої ваги		%
1	10,36 ± 0,41	9,41 ± 0,97	↓ 9,2
3	10,28 ± 0,92	9,89 ± 0,21	↓ 3,8
6	10,04 ± 0,81	10,35 ± 0,46	↑ 3,1
10	9,55 ± 0,51	14,89 ± 0,87***	↑ 55,9

Інтоксикація щурів ХПФ впливала подібним чином і на рівень Феруму у досліджуваних тканинах протягом експерименту (табл. 3.16). Зокрема, відмічено вірогідне збільшення вмісту досліджуваного металу на 21,5 %, порівняно з контрольною групою на 6-ту добу експерименту. На десяту добу різниця також була вірогідною ( $p \leq 0,01$ ) і склала 20,9 % зростання вмісту Феруму в дослідних тканинах. Останнім часом у науковій літературі з'являється все більше свідчень про те, що порушення метаболізму Феруму в головному мозку можуть відігравати значну роль у патогенезі низки нейродегенеративних захворювань [381, 394, 638-641, 669]. Проте, на сьогодні остаточно невідомо, чи саме безпосереднє накопичення у мозку Феруму спричиняє прогресування патологічного стану, чи навпаки, це зростання відбувається вже після загибелі нейронів і є його наслідком. Ймовірно, що зростання вмісту цього металу у нервових тканинах може бути взаємозв'язаним із посиленням утворенням вільних радикалів, виникненням оксидативного стресу і загибеллю нейронів.

Таблиця 3.16

Вміст Феруму в тканинах головного мозку щурів через 1, 3, 6, і 10 діб після введення ХПФ у дозі 30 мг/кг, ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )

Час після введення ХПФ	Групи тварин		Зміни між інтактною і дослідною групами
	Інтактна (контроль)	Дослідна	
доба	мг/кг сухої ваги		%
1	350,2 ± 21,1	335,2 ± 30,5	↓ 4,3
3	355,9 ± 25,4	356,4 ± 29,1	↑ 0,1
6	345,0 ± 21,2	419,2 ± 26,1*	↑ 21,5
10	353,3 ± 31,2	427,3 ± 23,3*	↑ 20,9

На відміну від Купруму, Цинку, Мангану і Феруму, дослідження вмісту Магнію, Кобальту і Нікелю у тканинах головного мозку протягом всіх досліджуваних періодів не показали вірогідних відмінностей між контрольною і дослідними групами. Вміст Магнію знаходився у межах 1149,9 ± 87,3 – 1229,5 ± 65,4; Кобальту – 2,33 ± 0,12 – 2,52 ± 0,20; Нікелю – 0,045 ± 0,004 – 0,057 ± 0,004 мг/кг сухої ваги.

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).

*Вплив інтоксикації ХПФ у дозі 30 мг/кг на вміст металів у тканинах нирки.* Оскільки нирки шляхом фільтрації крові здійснюють виведення з

організму метаболічних продуктів, а також беруть участь у процесах регуляції водно-солевого балансу, дослідження вмісту у їх тканинах різних макро- і мікроелементів представляє особливий інтерес, як за нормальних умов, так і за порушень, викликаних, в тому числі, дією ксенобіотиків. Саме завдяки ниркам ввiдбувається екскреція з організму мінеральних елементів і підтримка їхнього гомеостазу.

Баланс між корисною дією Купруму і токсичністю досягається як на клітинному рівні, так і на рівнях тканин та органів. Як видно з результатів досліджень, представлених у табл. 3.17, інтоксикація щурів призводила до зниження концентрації Купруму у тканинах нирки щурів. Зокрема, вміст Купруму у тканинах цього органу у щурів дослідної групи мав негативну тенденцію на всіх етапах експериментального періоду. Вірогідні різниці ( $p < 0,05$  –  $p < 0,001$ ) встановлено на 6-ту та 10-ту доби досліді, що становило відповідно 31,5 та 55,1 %, порівняно до контрольної групи.

Таблиця 3.17

Вміст Купруму в тканинах нирки щурів через 1, 3, 6, і 10 діб після введення ХПФ у дозі 30 мг/кг, ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )

Час після введення ХПФ	Групи тварин		Зміни між інтактною і дослідною групами
	Інтактна (контроль)	Дослідна	
доба	мг/кг сухої ваги		%
1	4,81±0,44	4,19±0,31	↓ 12,9
3	4,72±0,17	4,23±0,43	↓ 10,4
6	4,76±0,39	3,26 ±0,26*	↓ 31,5
10	4,90±0,44	2,20 ±0,21***	↓ 55,1

Зниження концентрації Купруму у тканинах організму часто є характерною ознакою стресових станів, неврологічних розладів, токсикозів

та ін. Крім того, воно також може свідчити про наявність порушень про-/антиоксидантної рівноваги. Купрум, зокрема, важливий елемент для функціонування системи антиоксидантного захисту, оскільки разом з Цинком входить в структуру ключового ензиму АОС – СОД, а також до складу антиоксидантного протеїну плазми крові – церулоплазмину.

При дослідженні концентрації Мангану (табл. 3.18) у тканинах нирки щурів на тлі інтоксикації ХПФ, на противагу напрямленості змін концентрації Купруму, навпаки – встановлено вірогідне зростання вмісту досліджуваного мікроелементу протягом усього експериментального періоду. Інтенсивність зростання вмісту Мангану прогресувала із часовими проміжками досліді і виражалася наступними відсотковими величинами: на першу добу – на 31,3 % ( $p \leq 0,05$ ), на третю – на 41,5 % ( $p \leq 0,05$ ), на шосту – на 80,3 % ( $p \leq 0,01$ ), а на десяту добу – на 94,8 % ( $p \leq 0,01$ ).

Таблиця 3.18

Вміст Мангану в тканинах нирки щурів через 1, 3, 6, і 10 діб після введення ХПФ у дозі 30 мг/кг, ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )

Час після введення ХПФ	Групи тварин		Зміни між інтактною і дослідною групами
	Інтактна (контроль)	Дослідна	
доба	мг/кг сухої ваги		%
1	5,94±0,36	7,80 ±0,72*	↑ 31,3
3	6,24±0,62	8,83±0,85 *	↑ 41,5
6	6,34±0,56	11,43±1,10**	↑ 80,3
10	6,95±0,68	13,54±1,13**	↑94,8

Встановлено також аналогічне зростання концентрації Цинку в тканинах нирки щурів дослідної групи, порівняно до контрольної. При цьому, за хлорпірифосної інтоксикації щурів рівень Цинку вагомніше підвищувався у

другій половині (6-та – 10-та доби) експерименту, відповідно на 35,3 – 37,9 % ( $p \leq 0,05$ ), порівняно до контролю (табл. 3.19).

Таблиця 3.19

Вміст Цинку в тканинах нирки щурів через 1, 3, 6, і 10 діб після введення ХПФ у дозі 30 мг/кг, ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )

Час після введення ХПФ	Групи тварин		Зміни між інтактною і дослідною групами
	Інтактна (контроль)	Дослідна	
доба	мг/кг сухої ваги		%
1	11,23±0,91	13,60±1,00	↑ 21,1
3	11,02±1,13	13,77±0,35	↑ 24,9
6	10,10±0,95	13,93±1,14*	↑ 37,9
10	10,22±1,01	13,83±0,69*	↑ 35,3

Варто відзначити, що напрямленість змін концентрації Цинку була протилежною змінам Купруму і Мангану. Цей факт, очевидно, не дозволяє говорити про пов'язаність змін вмісту перерахованих металів у випадку даного експерименту із можливими коливаннями активності езиму СОД.

Хоча Ферум у його біологічному аспекті перш за все відомий, як метал, що входить до складу гемоглобіну (70 %) та міоглобіну (5-10 %) він також прямо і опосередковано задіяний у багатьох метаболічних процесах, в тому числі тих, які мають місце при отруєннях ФОС. Здатність Феруму легко приєднувати і віддавати електрони дозволяє йому брати участь у багатьох окисно-відновних реакціях.

При надлишку Феруму в організмі, він виводиться з нього головним чином за допомогою нирок. Проведені дослідження показали (табл. 3.20), що гостра інтоксикація щурів ХПФ у дозі 30 мг/кг маси тіла відчутно впливала на концентрацію Феруму у тканинах нирки, призводячи до значного зростання вмісту цього металу.

Таблиця 3.20

Вміст Феруму в тканинах нирки щурів через 1, 3, 6, і 10 діб після введення ХПФ у дозі 30 мг/кг, ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )

Час після введення ХПФ	Групи тварин		Зміни між інтактною і дослідною групами
	Інтактна (контроль)	Дослідна	
доба	мг/кг сухої ваги		%
1	405,4±33,1	467,6 ±13,4	↑ 15,3
3	409,6±36,0	524,1± 13,8*	↑ 27,9
6	411,2±27,3	847,4± 27,1***	↑ 106,1
10	512,6±28,0	1191,8±118,0***	↑ 132,5

На третю добу концентрація Феруму у нирках щурів зросла на 27,9 % ( $p \leq 0,05$ ). У другій половині досліду різниця між вмістом Феруму у контрольній і дослідній групах збільшилась ще відчутніше. Так на шосту добу відзначено зростання показника на 106,1 ( $p \leq 0,001$ ), а на десяту – на 132,5 % ( $p \leq 0,001$ ).

У табл. 3.21 представлені зміни концентрації Магнію у танинах нирки.

Таблиця 3.21

Вміст Мангнію в тканинах нирки щурів через 1, 3, 6, і 10 діб після введення ХПФ у дозі 30 мг/кг, ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )

Час після введення ХПФ	Групи тварин		Зміни між інтактною і дослідною групами
	Інтактна (контроль)	Дослідна	
доба	мг/кг сухої ваги		%
1	693,4±70,1	1095,3±102,3*	↑57,9
3	700,1±64,3	1112,1±78,9**	↑ 58,8
6	676,5±67,4	1229,7±108,5**	↑ 81,7
10	688,6±64,0	1279,3±96,2***	↑ 85,8

Встановлено, що інтоксикація щурів ХПФ у даному експерименті призводила до вірогідного підвищення концентрації Магнію на першу добу – на 57,9 % ( $p \leq 0,05$ ), на третю – на 58,8 % ( $p \leq 0,01$ ). У другій половині досліджування спостерігали ще відчутніше зростання концентрації цього металу у тканинах нирки дослідних тварин, порівняно до контролю, а саме, на шосту добу – на 81,7 % ( $p \leq 0,01$ ), та на десяту – на 85,8 % ( $p \leq 0,001$ ).

Також умови даного експерименту призводили до суттєвого зростання у тканинах нирок дослідних щурів концентрації Нікелю протягом всього періоду, і знову – з більшою вираженістю у другій частині експерименту (таб 3.22).

Таблиця 3.22

Вміст Нікелю в тканинах нирки щурів через 1, 3, 6, і 10 діб після введення ХПФ у дозі 30 мг/кг, ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )

Час після введення ХПФ	Групи тварин		Зміни між інтактною і дослідною групами
	Інтактна (контроль)	Дослідна	
доба	мг/кг сухої ваги		%
1	0,32±0,02	0,46±0,04*	↑ 44,9
3	0,33±0,02	0,51±0,04**	↑ 56,1
6	0,36±0,04	0,62±0,06**	↑ 73,3
10	0,37±0,04	0,66±0,03***	↑ 80,1

При дослідженні концентрації Кобальту у тканинах нирок щурів вірогідних змін досліджуваного елемента між контрольною і дослідними групами не виявлено. Рівень цього металу перебував у діапазоні значень від  $0,86 \pm 0,04$  до  $0,96 \pm 0,06$  мг/кг сухої ваги.

Проведений кореляційний аналіз змін концентрації мінеральних елементів у тканинах нирок дослідних тварин за дії ХПФ у дозі 30 мг/кг показав високий позитивний корелятивний зв'язок між такими мінеральними елементами як Манган і Ферум (0,998), Манган і Магній (0,983), Магній і Ферум (0,970), Магній і Цинк (0,923), Купрум і Нікель (0,913). Високий

позитивний кореляційний зв'язок у тканинах нирок був відмічений між такими елементами як Цинк і Манган (0,839), Цинк і Ферум (0,803). Що стосується негативного кореляційного зв'язку змін концентрації мінеральних елементів у нирках щурів за дії ХПФ, то дуже високий негативний кореляційний зв'язок виявлено між такими елементами як Нікель і Магній (-0,992), Ферум і Купрум (-0,991), Нікель і Цинк (-0,947) та Магній і Купрум (-0,931), Цинк і Купрум (-0,719).

*Вплив інтоксикації ХПФ у дозі 30 мг/кг на вміст металів у тканинах печінки.* Печінка водночас є важливим органом як для процесів мінерального обміну організму, так і для детоксикації багатьох екзогенних і ендогенних речовин. Цей орган служить депо для багатьох мікро- і макроелементів, бере безпосередню участь у засвоєнні Купруму і Феруму. Загалом, печінка є надзвичайно активною у метаболічному аспекті, її клітини містять тисячі ензимів, які каталізують протікання катаболічних і анаболічних реакцій. Враховуючи сказане вище, дослідження вмісту різних хімічних елементів у тканинах печінки щурів інтоксикованих ХПФ становить істотний інтерес.

Інтоксикація щурів ХПФ знижувала вміст Купруму (табл. 3.23) в печінці щурів протягом експерименту.

Таблиця 3.23

Вміст Купруму в тканинах печінки щурів через 1, 3, 6, і 10 діб після введення ХПФ у дозі 30 мг/кг, ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )

Час після введення ХПФ	Групи тварин		Зміни між інтактною і дослідною групами
	Інтактна (контроль)	Дослідна	
доба	мг/кг сухої ваги		%
1	3,02± 0,20	2,99± 0,24	↓ 1,03
3	2,90 ± 0,13	2,54±0,18	↓ 12,4
6	2,91±0,17	1,93± 0,20**	↓ 33,7
10	2,71±0, 14	1,94± 0,11**	↓ 28,4

Найбільш суттєве ( $p < 0,01$ ) зниження вмісту Купруму у тканинах печінки встановлено у дослідній групі, порівняно до контрольної, на 6-ту та 10-ту добу досліджу, а саме на 33,7 та 28,4 %. Треба зазначити, що протягом експерименту вміст Купруму у печінці тварин контрольної групи дещо зменшувався, тоді як в міокарді залишався на однаковому рівні.

При дослідженні концентрації Мангану (табл. 3.24) у тканинах печінки щурів за гострої дії ХПФ, виявлено зростання його рівня практично на всіх етапах експерименту.

Таблиця 3.24

Вміст Мангану в тканинах печінки щурів через 1, 3, 6, і 10 діб після введення ХПФ у дозі 30 мг/кг, ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )

Час після введення ХПФ	Групи тварин		Зміни між інтактною і дослідною групами
	Інтактна (контроль)	Дослідна	
доба	мг/кг сухої ваги		%
1	6,12 ± 0,53	6,65 ± 0,33*	↑ 8,7
3	5,92 ± 0,43	6,60 ± 0,22	↑ 11,5
6	5,77 ± 0,45	7,91 ± 0,69*	↑ 37,1
10	5,72 ± 0,46	8,57 ± 0,63**	↑ 49,9

Зокрема, концентрація Мангану вже на першу добу експерименту вірогідно зростала на 8,7 % ( $p < 0,05$ ), на шосту добу – на 37,1 % ( $p < 0,05$ ), а найбільше його зростання у щурів дослідної групи встановлено на десятю добу – 49,9 % ( $p < 0,01$ ). Зростання вмісту Мангану у тканинах печінки може свідчити про можливість активації синтезу протеїнових складових металопротеїнів, які зв'язують іони цього металу. Ще одним поясненням збільшення концентрації Мангану в цьому та інших органах щурів може бути експресія Mn- вмісної СОД, що, у свою чергу, можна розцінювати як захист організму від дії оксидативного стресу. Очевидно, у цьому ж контексті можна розглядати аналогічну

напрямлєність змін у тканинах печінки вмісту Цинку, який такж фходить до активного центру згаданого антиоксидантного ензиму. Проте, варто звернути увагу, ще це не узгоджується із виявлєними нами в цьому експерименті змінами Купруму, які були протилєжними, тобто концентрація його зменшувалася.

Отже, на тлі гострої інтоксикації щурів дослідної групи хлорпірифосом виявлено тенденцію до зростання концентрації Цинку (табл. 3.25) у печінці протягом всього експерименту. Статистично вірогідне збільшення було виявлено лише на десяту добу дослідного періоду і становило 16,6 % ( $p < 0,05$ ), порівняно з тканинами контрольної групи. Заслуговує уваги той факт, що встановлені зміни у вмісті Цинку в тканинах печінки були аналогічними до змін у вмісті цього металу у тканинах нирки, що описано вище.

Таблиця 3.25

Вміст Цинку в тканинах печінки щурів через 1, 3, 6, і 10 діб після введення ХПФ у дозі 30 мг/кг, ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )

Час після введення ХПФ	Групи тварин		Зміни між інтактною і дослідною групами
	Інтактна (контроль)	Дослідна	
доба	мг/кг сухої ваги		%
1	10,01 ± 0,91	10,31 ± 0,84	↑ 3,0
3	11,58 ± 1,01	12,76 ± 0,83	↑ 10,2
6	11,83 ± 1,02	13,52 ± 0,29	↑ 14,3
10	12,12 ± 0,81	14,13 ± 1,20*	↑ 16,6

Печінка вважається одим з депонуючих Ферум органів. Проведенні дослідження впливу інтоксикації щурів ХПФ на рівень Феруму (табл. 3.26) у печінці досліджуваних тварин показали зниження рівня цього елемєнту у дослідній групі тварин порівняно до контрольної на третю добу на 34,1 % ( $p \leq 0,01$ ), але на 10-ту добу експериментального періоду – навпаки, спостерігали вірогідне зростання цього показника, яке становило 35 % ( $p \leq 0,05$ ).

Таблиця 3.26

Вміст Феруму в тканинах печінки щурів через 1, 3, 6, і 10 діб після введення ХПФ у дозі 30 мг/кг, ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )

Час після введення ХПФ	Групи тварин		Зміни між інтактною і дослідною групами
	Інтактна (контроль)	Дослідна	
доба	мг/кг сухої ваги		%
1	501,1± 33,9	440,5± 35,5	↓ 12,1
3	520,0± 36,7	342,6± 32,6**	↓ 34,1
6	549,6± 53,5	501,7± 39,4	↓ 8,7
10	551,6±42,5	744,7± 71,6*	↑ 35,0

Вплив іонів Феруму пов'язують з його активним впливом на процеси ПОЛ. При підвищенні концентрації цього елемента в різних тканинах активуються процеси ліпопероксидації.

При дослідженні концентрації Нікелю (табл. 3.27) у тканинах печінки, на відміну від тканин нирок щурів за дії ХПФ, виявлено вірогідне зростання вмісту цього елемента майже на всіх етапах дослідного періоду.

Таблиця 3.27

Вміст Нікелю в тканинах печінки щурів через 1, 3, 6, і 10 діб після введення ХПФ у дозі 30 мг/кг, ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )

Час після введення ХПФ	Групи тварин		Зміни між інтактною і дослідною групами
	Інтактна (контроль)	Дослідна	
доба	мг/кг сухої ваги		%
1	0,334± 0,029	0,425± 0,015*	↑ 27,3
3	0,356± 0,033	0,420± 0,026	↑ 17,9
6	0,389± 0,034	0,490± 0,026*	↑ 25,9
10	0,376± 0,031	0,520± 0,048*	↑ 38,3

Зокрема, концентрація Нікелю вже на першу добу експерименту вірогідно зростала на 27,3 % ( $p < 0,05$ ), на шосту добу – на 25,9 % ( $p < 0,05$ ), а найбільше його зростання у щурів дослідної групи встановлено на десяту добу – 38,3 % ( $p < 0,01$ ). Разом з тим, на третю добу вірогідної різниці при встановлено не було.

Проведені дослідження вмісту Магнію у тканинах печінки за умов гострої інтоксикації щурів ХПФ у дозі 30 мг/кг маси тіла не показали наявності вірогідних міжгрупових змін у вмісті цього елемента протягом періоду експерименту. Концентрація Магнію у тканинах печінки щурів перебувала у наступному діапазоні значень  $467,26 \pm 11,6$  –  $495,31 \pm 28,8$  мг/кг сухої ваги. Також у даному досліді не встановлено впливу гострої інтоксикації щурів ХПФ на рівень Кобальту в печінці дослідної групи, порівняно до контрольної на всіх етапах експерименту. Концентрація цього мікроелементу коливалася в межах від  $0,68 \pm 0,07$  до  $0,82 \pm 0,08$  мг/кг сухої ваги.

Кореляційний аналіз змін величини концентрацій досліджуваних елементів у печінці щурів за введення ХПФ показав високий позитивний кореляційний зв'язок між Манганом і Цинком (0,899), Ферумом і Манганом (0,831). Слабкий позитивний корелятивний зв'язок був відмічений між Ферумом і Цинком (0,573), Нікелем і Купрумом (0,511), дуже слабка кореляція була відмічена між такими елементами як Кобальт і Манган (0,366). Також при кореляційному аналізі було зафіксовано і негативні зв'язки змін кількості мінеральних елементів у печінці щурів. Зокрема, дуже висока негативна кореляція була між такими елементами як Нікель і Ферум (-0,991), Цинк і Купрум (-0,913), а висока кореляція між такими елементами як Нікель і Манган (-0,887), Купрум і Манган (-0,859). Негативний середній зв'язок був між Кобальтом і Купрумом (-0,556), а слабкий зв'язок між Ферумом і Купрумом (-0,433).

*Вплив інтоксикації ХПФ у дозі 30 мг/кг на вміст металів у тканинах міокарда.* Провівши аналіз вмісту досліджуваних хімічних елементів у тканинах міокарда, було виявлено, що вміст Купруму (табл. 3.28) у

серцевому м'язі вірогідно спадав ( $p < 0,05$ ) лише на 10-ту добу після введення токсиканта, хоча зміна була незначною і становила 14,7 % порівняно з контролем. В інші періоди експерименту міжгрупових відмінностей у концентрації Купруму в тканинах міокарда встановлено не було.

Таблиця 3.28

Вміст Купруму в тканинах міокарда щурів через 1, 3, 6, і 10 діб після введення ХПФ у дозі 30 мг/кг, ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )

Час після введення ХПФ	Групи тварин		Зміни між інтактною і дослідною групами
	Інтактна (контроль)	Дослідна	
доба	мг/кг сухої ваги		%
1	7,72±0,54	7,55±0,18	↓ 2,2
3	7,57± 0,33	7,30±0,16	↓ 3,6
6	7,62±0,54	7,36±0,20	↓ 3,4
10	8,10±0,37	7,05±0,38*	↓ 14,7

При дослідженні концентрації Мангану (табл. 3.29) у тканинах міокарду щурів встановлено вірогідне суттєве зростання вмісту досліджуваного мікроелементу протягом всього експериментального періоду.

Таблиця 3.29

Вміст Мангану в тканинах міокарда щурів через 1, 3, 6, і 10 діб після введення ХПФ у дозі 30 мг/кг, ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )

Час після введення ХПФ	Групи тварин		Зміни між інтактною і дослідною групами
	Інтактна (контроль)	Дослідна	
доба	мг/кг сухої ваги		%
1	6,47±0,47	11,32±0,20***	↑ 75,1
3	6,00±0,45	11,37±0,06***	↑ 89,5
6	5,92±0,49	11,17±0,07***	↑ 88,8
10	5,75±0,53	10,91±0,05***	↑ 89,9

Виявлено, що концентрація Мангану суттєво зростала вже на першу добу експерименту – на 75,1 % ( $p \leq 0,001$ ), на третю добу – на 89,5 % ( $p \leq 0,001$ ), на шосту добу – на 88,8 % ( $p \leq 0,001$ ) і на десяту добу на 89,9 % ( $p \leq 0,001$ ). Пояснити описані вище зміни концентрації Мангану у тканинах міокарда важко, хоча, очевидно, важливим є той факт, що поряд із нирками і печінкою серце характеризується одним з найбільш багатим органом за вмістом цього елемента.

Дослідження показали (табл. 3.30), що на відміну від Мангану, але аналогічно до Купруму, гостра інтоксикація щурів ХПФ призводила до зниження концентрації Цинку у тканинах міокарду щурів дослідних груп, порівняно з контролем.

Таблиця 3. 30

Вміст Цинку в тканинах міокарда щурів через 1, 3, 6, і 10 діб після введення ХПФ у дозі 30 мг/кг, ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )

Час після введення ХПФ	Групи тварин		Зміни між інтактною і дослідною групами
	Інтактна (контроль)	Дослідна	
доба	мг/кг сухої ваги		%
1	22,21 ±1,03	16,93±1,02*	↓ 23,8
3	24,42 ±1,02	16,04±1,25***	↓ 34,3
6	25,04 ±1,41	20,23±1,01*	↓ 19,2
10	25,21 ±1,38	22,24±1,23	↓ 11,8

Майже на всіх етапах експерименту а саме на першу, третю і шосту добу встановлено встановлено вірогідне зниження досліджуваного мікроелементу ( $p \leq 0,05 - 0,001$ ) відповідно на 23,8 %, 34,3 % та 19,2 %. На десяту добу вірогідних різниць у тварин дослідної групи порівняно до контрольної встановлено не було. Однозначно пояснювати зміни вмісту Цинку в тканинах міокарда, зрештою, як і в інших органах є проблематично,

хоча б з огляду на те, що даний хімічний елемент необхідний для майже 2000 різноманітних протеїнів різного функціонального призначення. Водночас відомо, що значна частина Цинку в організмі зосереджена саме у м'язовій тканині, в тому числі і в міокарді. Зміни, які були встановлені нами можуть бути пов'язані із явищем оксидативного стресу, який викликається токсичною дією досліджуваного ксенобіотика і, відповідно, із функціонуванням при цьому системи антиоксидантного захисту.

Вище, вже було наголошено на важливість у багатьох метаболічних процесах, в тому числі – детоксикаційних іонного гомеостазу Феруму. Результати проведених досліджень із вивчення змін вмісту цього металу, які представлені у табл. 3.31, свідчать, що гостра інтоксикація щурів ХПФ у дозі 30 мг/кг маси тіла майже не впливала на його концентрацію у міокарді щурів. Лише на десяту добу концентрація досліджуваного мікроелементу зростала на 25,9 % ( $p \leq 0,05$ ) у тканинах серцевого м'яза дослідних тварин, порівняно до контролю.

Таблиця 3.31

Вміст Феруму в тканинах міокарда щурів через 1, 3, 6, і 10 діб після введення ХПФ у дозі 30 мг/кг, ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )

Час після введення ХПФ	Групи тварин		Зміни між інтактною і дослідною групами
	Інтактна (контроль)	Дослідна	
доба	мг/кг сухої ваги		%
1	755,5±48,8	771,5±54,6	↑ 2,1
3	760,3±54,7	770,3±33,3	↑ 1,3
6	773,4±40,2	851,2±40,3	↑ 10,1
10	758,2±67,7	954,9±75,4*	↑ 25,9

У даному експерименті за інтоксикації щурів дослідної групи ХПФ в дозі 30 мг/кг маси тіла у тканинах міокарду не виявлено вірогідних міжгрупових різниць у концентраціях Магнію та Кобальту(таб. 3.32 - 3.33).

Таблиця 3.32

Вміст Магнію в тканинах міокарда щурів через 1, 3, 6, і 10 діб після введення ХПФ у дозі 30 мг/кг, ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )

Час після введення ХПФ	Групи тварин		Зміни між інтактною і дослідною групами
	Інтактна (контроль)	Дослідна	
доба	мг/кг сухої ваги		%
1	2155,6±200,0	2200,1±197,2	↑2,1
3	2173,4±123,6	2324,3±212,1	↑ 6,9
6	2211,3±75,1	2627,9±210,8	↑ 18,8
10	2142,8±209,2	2463,9±136,9	↑ 14,9

Таблиця 3.33

Вміст Кобальту в тканинах міокарда щурів через 1, 3, 6, і 10 діб після введення ХПФ у дозі 30 мг/кг, ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )

Час після введення ХПФ	Групи тварин		Зміни між інтактною і дослідною групами
	Інтактна (контроль)	Дослідна	
доба	мг/кг сухої ваги		%
1	1,40 ±0,23	1,38 ±0,22	↓ 1,4
3	1,36 ±0,21	1,32 ±0,14	↓ 2,9
6	1,38 ±0,28	1,26 ±0,21	↓ 8,7
10	1,32 ±0,28	1,20 ±0,14	↓ 9,1

Проте, на відміну від двох елементів, описаних вище, при дослідженні концентрації Нікелю (табл. 3.34) у тканинах міокарду щурів за дії ХПФ, виявлено зниження його рівня протягом всього експерименту, порівняно з контролем.

Таблиця 3.34

Вміст Нікелю в тканинах міокарда щурів через 1, 3, 6, і 10 діб після введення ХПФ у дозі 30 мг/кг, ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )

Час після введення ХПФ	Групи тварин		Зміни між інтактною і дослідною групами
	Інтактна (контроль)	Дослідна	
доба	мг/кг сухої ваги		%
1	1,12±0,11	0,715±0,07*	↓ 36,6
3	1,31±0,17	0,752±0,03*	↓ 57,2
6	1,25±0,13	0,777±0,05**	↓ 38,4
10	1,49±0,15	0,747±0,08**	↓ 49,9

Зокрема, концентрація Нікелю вже на першу добу експерименту вірогідно знижувалася на 36,6% ( $p < 0,05$ ), на шосту добу – на 38,4% ( $p < 0,01$ ), на десяту добу – на 49,9% ( $p < 0,01$ ), а найбільше його зниження у щурів дослідної групи встановлено на третю добу – 57,2% ( $p < 0,01$ ), порівняно до тканин міокарду інтактних тварин.

Проведений кореляційний аналіз змін концентрацій мінеральних елементів у міокарді тварин за додавання ХПФ, у дозі 30 мг/кг маси тіла тварини, показав, що дуже сильний позитивний зв'язок був зафіксований між Нікелем і Купрумрм (0,945). Сильний зв'язок спостерігали між змінами у концентрації таких елементів як Ферум і Цинк (0,828), тоді як значна по силі зв'язку позитивна кореляція зафіксована між Манганом і Купрумом (0,618). Помірна позитивна кореляція була між Нікелем і Манганом (0,410) та Цинком і Манганом (0,392).

**3.1.5 Вплив гострої інтоксикації ХПФ у дозі 30 мг/кг на поведінкові параметри щурів.** Дана частина роботи стосувалася вивчення поведінки та емоційного стану інтоксикованих ХПФ щурів за допомогою тесту “Відкрите поле” через різні періоди після його введення тваринам. Вивчали динаміку змін параметрів поведінки піддослідних тварин через 1, 3, і 5 діб після надходження досліджуваного ксенобіотика в їхній організм.

Оцінити стан функціонування нервової системи організму можна за допомогою етологічних досліджень у яких використовують різноманітні методи тестування поведінки тварин [17, 554, 630]. Серед їх різномаїття тест “Відкрите поле” є одним з найпопулярніших і дозволяє значною мірою оцінити вплив токсичних чинників на організм. Метою цього етапу роботи було дослідити як змінюється емоційний стан та рухливість щурів через різні проміжки часу після їх гострої інтоксикації ХПФ у дозі 30 мг/кг. Даний тест дає можливість вивчати поведінку щурів у стресогенних умовах, оцінюючи вираженість і динаміку окремих поведінкових елементів, рівень емоційно-поведінкової реактивності, стратегію дослідницької та захисної поведінки тварини, параметри звикання, здатність до запам’ятовування орієнтувальних стимулів, симптоми неврологічного дефіциту, локомоторну стереотипію та ін. Дія на організм токсичних чинників часто призводить до змін вище перерахованих параметрів, що може свідчити про їх вплив на нервову систему організму. Так про низький рівень тривоги у піддослідних щурів може свідчити їх висока горизонтальна і вертикальна активність, інтенсивне дослідження отворів у днищі тестової камери (нірок), нечасті завмирання. Навпаки, низька рухова активність, велика кількість завмирань і зростання їх тривалості, уникання тваринами центральних квадратів свідчить про високий рівень тривожності у тварин. Провівши аналіз результатів тестування досліджуваних тварин у “Відкритому полі” найперше можна говорити про їх емоційний стан. Як видно з табл. 3.35 найбільш виражена різниця у параметрах поведінки піддослідних щурів спостерігалась через добу після введення їм ХПФ.

Причому, горизонтальна рухова активність (ГРА), визначена за кількістю перетнутих тваринами протягом тестування периферичних квадратів була більш ніж у два рази вірогідно нижчою у дослідній групі порівняно до контролю. Аналогічну ситуацію спостерігали із показником загальної ГРА, який вираховується як сума ГРА у периферичних та

Таблиця 3.35

Параметри поведінки щурів інтоксикованих ХПФ у дозі 30 мг/кг у тесті “Відкрите поле” (n=3-15)

Група тварин	Горизонтальна рухова активність (к-сть перетнутих квадратів)			Вертикальна рухова активність			К-сть завмирань	Дослідження отворів	Грумінг		К-сть дефекацій	К-сть уринацій
	ГРА периф.	ГРА центр.	ГРА загальна	ВРА (передні лапи впираються в стінку)	ВРА (передні лапи в повітрі)	ВРА загальна			Короткий (1-2 рухи)	Довгий (більше)		
Проведення тестування за 3 доби перед початком експерименту (до введення ХПФ)												
К, Д n=15	24,66±6,6	4,4±2,6	29±8,1	7±3,04	2,7±2,9	9,7±3,7	2,5±1	3,06±1,7	1,1±0,2	2,2±0,3	2,7±0,4	0,1±0,1
Проведення тестування через 1 добу експерименту												
К n=3	24±3	2,66±1,5	26,7±3,8	5±3,6	2,3±2,3	7,3±5,8	1,3±0,6	1,6±0,6	0,7±0,3	2,3±1,5	0,6±0,6	0,3±0,3
Д n=12	8,6±3,6***	2,08±0,9	10,6±4,03**	3,2±1,4	1±1,3	4,2±2,2	5,5±2,4	2±1,5	0,9±0,4	1,6±0,4	0,8±0,3	0±0
Проведення тестування через 3 доби експерименту												
К n=3	20,3±4,1	2,66±0,6	23±4,4	2±1	1±0	3±1	2,6±0,5	0,3±0,5	1,7±0,9	1,3±0,9	1,3±0,9	0,3±0,3
Д n=9	12,1±4,8	2,9±1,6	15±5,8	4,5±2,3	2±2,1	13,6±7,4	1,7±0,6	1±1	1,2±0,4	0,9±0,3	1,1±0,3	0,4±0,2
Проведення тестування через 5 діб експерименту												
К n=3	21,3±5,6	5±2,6	26,3±7,5	4,7±2,3	7±7,5	11,6±9,5	2,6±0,5	3,3±0,6	1,0±0,6	1,7±1,2	1,0±1,0	0±0
Д n=6	25,6±6,8	3,6±1,36	29,3±7,4	6,5±3,8	7,1±4,3	13,6±7,4	2,6±1,03	1,6±2,1	0,8±0,3	1,2±0,5	0±0	0,3±0,2

центральных квадратах установки “Відкрите поле”. Водночас вірогідних змін у ГРА в зоні центральних квадратів зафіксовано не було.

Вертикальна рухова активність (ВРА), яку оцінювали за кількістю стійок тварин коли вони опиралися при цьому на бокові стінки, а також коли їх передні кінцівки знаходились у повітрі (без упирання на стінку) також мала чітко виражену тенденцію до зменшення через добу після початку експерименту. Такі зміни свідчать про високий рівень тривожності тварин на другут добу після інтоксикації ХПФ. Підтверджує такий висновок і факт збільшення кількості завмирань цих тварин у той же період.

Проаналізувавши вище описані поведінкові параметри через 3 і 5 діб після введення дослідним тваринам ксенобіотика, стало очевидно, що функціонування нервової системи тварин поступово наблизилось до того стану, який спостерігали на початок дослідю. З цього випливає, за період 5 діб в організмі дослідних груп тварин пройшли детоксикаційні процеси з нормалізацією їх нейрофізіологічних функцій. Варто відзначити, що такий параметр, як кількість досліджень тваринами отворів у дні тестової камери практично не змінювався у всіх групах тварин і, таким чином виявився неінформативним.

Отже, статистично достовірні відмінності у поведінці дослідних щурів від контролю у даному експерименті було встановлено лише через добу після введення ХПФ: у цих тварин різко знизилася периферична горизонтальна рухова активність. За іншими показниками у цьому тестуванні достовірних змін виявлено не було, а також не спостерігали відмінностей у тестуваннях протягом наступних часових періодів експерименту (через 3 та 5 діб після введення токсиканта). Це може свідчити про адаптацію організму тварин та роботу захисних та відновлювальних механізмів.

Водний тест (лабіринт) Морріса дає змогу проводити ефективно дослідження просторової пам'яті, орієнтування та здатності до навчання лабораторних гризунів. Одним з показників, які фіксували за допомогою даного тесту, був стан короткочасної пам'яті дослідних тварин. Визначали

його за різницею часу, затраченого на знаходження твариною острівка-платформи у першій та другій спробах. Однак у тварин, які зазнавали впливу ХПФ у даному експерименті погіршення короткочасної пам'яті виявлено не було, оскільки між різницями тривалості виконання тесту у першій і другій спробах тваринами контрольної і дослідної груп через 4 та 6 діб після введення токсиканту не зафіксовано. Іншим важливим показником, що досліджувався за допомогою тесту Морріса, був стан довготривалої просторової пам'яті. За нормального функціонування механізмів просторової пам'яті та орієнтації час, необхідний для знаходження платформи, з кожним наступним поміщенням тварини у басейн скорочується, що свідчить про навчання та запам'ятовування місця знаходження платформи за розташуванням орієнтирів. При порушеннях механізмів пам'яті (наприклад, за впливу хімічних речовин на гіпокамп чи ураженні його внаслідок травми або хвороби) просторова пам'ять порушується, і час, потрібний на знаходження платформи, не зменшується з наступними повторами тестування, чи навіть навпаки – збільшується в міру прогресування ураження пам'яті, а поведінка тварини, їх траєкторія у басейні стає хаотичнішою. За загальним часом, затраченим тваринами для знаходження платформи у різних спробах статистично достовірних відмінностей між групами також виявлено не було. При порушеннях функціонування просторової пам'яті часто трапляється, що тварина взагалі не може знайти платформу за 3 хвилини. Тому ми взяли до уваги такий параметр, як відсоток вдалих спроб – відносна частка тварин у кожній групі, які змогли відшукати платформу за відведений час. За цим показником істотне порушення було виявлене у дослідній групі тварин через 1 добу після початку експерименту, де спостерігали статистично вірогідне зниження відсотку вдалих спроб ( табл 3.36).

Отже, було встановлено, що ХПФ чинить негативний вплив на механізми просторової орієнтації та спричиняє порушення довготривалої пам'яті у щурів, які одержували ХПФ у дозі 30 мг/кг. Найвагоміші зміни у

поведінкових параметрах дослідних щурів мали місце через одну добу після введення ХПФ.

Таблиця. 3.36

Частка вдалих спроб (знаходження твариною платформи протягом трьох хвилин тестування) у тесті Морріса.

Спроба Група тварин	Частка тварин, що успішно виконали тест, %							
	До введення ХПФ		Через 1 добу		Через 4 доби		Через 6 діб	
	1	2	1	2	1	2	1	2
Контроль	80	90	100	80	80	100	80	100
Дослід	80	100	50*	40*	60	80	80	70

Примітка. Вказано доби від початку введення ХПФ. \* - статистично вірогідно порівняно з контролем з  $P < 0,05$ .

### Висновки

Наведені у цьому розділі результати свідчать про те, що гостра інтоксикація щурів ХПФ, яка була викликана одноразовим введенням цієї сполуки у дозі 30 мг/кг маси тіла, впродовж наступних 10 діб після введення токсину в організм призводить до тканинно-залежної і часозалежної активації процесів ПОЛ, що супроводжується нагромадженням продуктів ліпопероксидації та АФО. Останні можуть спричиняти деструкційні явища у мембранах різних клітин, зокрема еритроцитів і гепатоцитів і тим самим підсилювати ендogenous інтоксикацію організму. Встановлено:

1. зниження активності БХЕ у сироватці крові дослідних тварин порівняно з контролем 1-шу (на 80,9% ( $p < 0,001$ )) і 3-тю (на 42,8% ( $p < 0,05$ )) доби дослідження, а починаючи з 6-ї доби після початку експерименту зростання до рівня показників контрольної групи;

2. зростання активності АсАт на 1-шу, 3-тю та 6-ту доби експериментального періоду, порівняно до контрольних зразків, відповідно –

на 20% ( $P<0,001$ ), 28,3% ( $P<0,01$ ) і на 19% ( $P<0,05$ ). Зростання активності АлАт на 1-шу та 6-ту доби після введення ХПФ, відповідно на 17,2% ( $P<0,05$ ) та 23% ( $P<0,01$ ) порівняно до плазми крові інтактних щурів. Повернення показників активності АлАт та АсАт інтоксикованих тварин до рівня показників контрольної групи на 10 добу експерименту;

3. зростання активності ЛФ (на 40,7% ( $P<0,05$ )) у плазмі крові щурів дослідної групи на 1-шу добу після введення ХПФ, порівняно до контролю та зниження цього показника на 6-ту та 10-ту доби, відповідно на 35,6% ( $P<0,001$ ) та 33,2% ( $P<0,05$ );

4. зниження вмісту загального протеїну у плазмі крові тварин на 3-тю та 6-ту доби після застосування ХПФ, відповідно на 16,1% ( $P<0,05$ ) та 11,5% ( $P<0,01$ ) і вірогідне зростання вмісту альбуміну у тварин дослідної групи на 3 добу ( $P<0,01$ ) порівняно до контролю;

5. зниження концентрації гемоглобіну на 1-шу добу на 8% ( $p<0,05$ ), на 3-тю (17,9 ( $P<0,01$ )), 6-ту (21 % ( $P<0,01$ )) та 10-ту 1-шу добу 18,1 % ( $P<0,01$ ) доби після введення ХПФ, без зміни кількості еритроцитів;

6. зниження вмісту ГВ в гемолізатах еритроцитів щурів дослідної групи у всі періоди дослідження ( $P<0,001$ ): на 1-шу добу – втричі, на 3-тю добу вміст ГВ становив 41,2 % ( $P<0,05$ ) від контрольного значення;

7. зниження активності ГР на 1-шу добу після застосування ХПФ в гемолізатах еритроцитів у 2,5 раза ( $P<0,001$ ), а також на 3-тю та 10-ту доби відповідно на 31% ( $P<0,01$ ) та 33% ( $P<0,01$ ) порівняно до контролю;

8. зниження активності ГПО в гемолізатах еритроцитів на 1-шу добу у порівнянні з гемолізатами контрольної групи на 24% ( $P<0,01$ ), на 3-тю на 29% ( $P<0,05$ ), але зростання показника починаючи з 6-ї доби експерименту з переважанням контрольного значення на 21% ( $P<0,01$ );

9. зростання активності ГТ на 1-шу добу (20% ( $P<0,01$ )), на 3-тю (28% ( $P<0,01$ )), порівняно до гемолізатів еритроцитів інтактних тварин, але зниження на 53% ( $P<0,001$ ) на 6-ту добу експерименту;

10. зниження активності СОД у гемолізатах еритроцитів тварин дослідної групи протягом всього періоду експерименту порівняно до контролю, але найвагомніше – приблизно на 50% ( $P < 0,001$ ) – через 3, 6 і 10 діб після введення тваринам ХПФ;

11. зростання вмісту ТБК- активних продуктів у плазмі крові тварин дослідної групи на 1-шу, 3-тю, 6-ту та 10-ту доби після застосування цього ксенобіотика, відповідно – на 14% ( $P < 0,05$ ), 171% ( $P < 0,001$ ), 69% ( $P < 0,01$ ) і 62% ( $P < 0,001$ );

12. зростання вмісту ГПЛ на 1-шу та 3-тю доби після введення ХПФ відповідно на 93,9% ( $P < 0,05$ ) та 97,6% ( $P < 0,001$ ) порівняно до плазми крові інтактних тварин;

13. зростання вмісту ГВ у тканинах мозку тварин дослідної групи на 67,5% ( $P < 0,001$ ) порівняно до контрольної групи на 1-шу добу, але зменшення на 6-ту добу після введення тваринам ХПФ на 66% ( $P < 0,001$ ); зростання активності ГПО та ГТ на 1-шу добу після введення ХПФ, відповідно на 41% ( $P < 0,05$ ) і 245% ( $P < 0,001$ ), але зниження в подальші періоди досліджень, а саме на 3-тю та 10-ту доби відповідно на 27% ( $P < 0,05$ ) і 36% ( $P < 0,05$ ); зростання активності ГТ на 1-шу добу – на 245% ( $P < 0,001$ ), на 3-тю – на 86% ( $P < 0,001$ ) та на 6-ту добу досліджу на 107% ( $P < 0,001$ ); зниження активності ГР на 10-ту добу у мозку тварин дослідної групи порівняно до контролю на 106% ( $P < 0,001$ );

14. зниження вмісту ГВ щурів у тканинах печінки дослідної групи на 20 % ( $P < 0,05$ ) на 1-шу добу після введення ХПФ, та на 36% ( $P < 0,001$ ) на 3-тю добу і у 2 рази на 6 добу після введення ХПФ, порівняно з контролем; зростання на 1-шу добу активності ГПО на 19% ( $P < 0,05$ ), але зниження на 3 добу на 34% ( $P < 0,05$ ); зниження активностей ГР протягом всього періоду досліджень – 355% ( $P < 0,001$ ) на 1-шу добу, 161% ( $P < 0,01$ ) на 3-тю, 165% ( $P < 0,001$ ) на 6-ту добу досліджу та 76% ( $P < 0,05$ ) на 10 добу експериментального періоду;

15. встановлені тканинно-залежні та залежні від періоду досліджень закономірності вмісту у досліджуваних органах Купруму, Мангану, Цинку,

Феруму, Магнію, Кобальту і Нікелю, а також їх кореляційні зв'язки між собою, залежно від тканини, а також кореляції між вмістом перерахованих елементів і показниками антиоксидантної системи організму;

16. встановлені відмінності у поведінці дослідних щурів від контролю через добу після введення ХПФ: у цих тварин різко знизилася периферична горизонтальна рухова активність; встановлено, що ХПФ чинить негативний вплив на механізми просторової орієнтації та спричиняє порушення довготривалої пам'яті у щурів, які одержували ХПФ у дозі 30 мг/кг.

Результати даного підрозділу опубліковані у роботах [146, 147, 152, 153, 160, 161, 163, 169, 171, 173, 646, 649].

### **3.2 Вплив гострої інтоксикації 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**

**3.2.1 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.** Дослідження були проведені на 30 статевозрілих самцях білих лабораторних щурів лінії Вістар масою тіла 200–220 г, яких утримували у стандартних умовах віварію з дотриманням 12-годинного режиму освітлення темнота/світло, необмеженим доступом до питної води та корму. Було сформовано три групи тварин (контрольну (К) і дві дослідні (Д1 і Д2) по 5 щурів у кожній. Тваринам дослідних груп одноразово внутрішньоочеревинно вводили ХПФ з розрахунку 15 (група Д1) і 30 мг/кг (група Д2) живої ваги. Інтактним тваринам контрольної групи замість препарату вводили аналогічний об'єм фізіологічного розчину. Через 24 год. всіх тварин декапітували під етерним

наркозом. Одразу виділяли головний мозок з якого препарували кору великих півкуль, мозочок і гіпокамп.

СОД є ключовим ензимом антиоксидантної системи, що каталізує зворотну реакцію дисмутації супероксид-аніон радикалу до менш токсичного Гідроген пероксиду. Як видно з табл. 3.37 активність СОД була вірогідно нижчою у півкулях головного мозку тварин першої та другої дослідних груп відповідно на 27,2% ( $P < 0,05$ ) та 31,4% ( $P < 0,05$ ) порівняно до тканин контрольних тварин. Що стосується гіпокампу та мозочку, то у цих відділах головного мозку спостерігалась лише тенденція до зниження цього показника.

Таблиця 3.37

Активність СОД (ум.од./мг протеїну) у різних відділах головного мозку щурів за гострої інтоксикації ХПФ (15 і 30 мг/кг), ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )

Групи тварин	Відділи головного мозку		
	Гіпокамп	Мозочок	Кора великих півкуль
К	5,3±0,29	2,32±0,06	8,44±0,45
Д1	4,82±0,12	2±0,08	6,15±0,16*
Д2	4,55±0,09	1,64±0,04	5,79±0,11*

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 концентрації синглетного Оксигену, Гідроген пероксиду, гідроксильних радикалів, гідропероксидів. Можливо, ХПФ викликає певні конформаційні зміни молекули СОД, внаслідок чого, вона втрачає свою функціональність. Не виключено також, що зниження активності СОД може бути наслідком порушення експресії гену цього ензиму за умов оксидативного стресу.

У ході метаболізму в мозку утворюється значна кількість Гідроген пероксиду, і виникає потреба у його знешкодженні каталазою – ензимом, що каталізує реакцію розщеплення останнього до води й молекулярного кисню і таким чином, разом із СОД розриває ланцюг пероксидації ще на початковій його стадії [384]. У табл. 3.38 зображені зміни активності КАТ 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 тварин другої дослідної групи відповідно на 19,5 і 49,7 % ( $P < 0,05$ ) порівняно до тварин контрольної групи

Таблиця 3.38

Активність КАТ (мкмоль/ хв/ мг протеїну) у різних відділах головного мозку щурів за гострої інтоксикації ХПФ (15 і 30 мг/кг), ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )

Групи тварин	Відділи головного мозку		
	Гіпокамп	Мозочок	Кора великих півкуль
К	6,45±0,39	6,32±0,17	7,54±0,25
Д1	5,02±0,21*	6±0,13	7,06±0,16
Д2	4,35±0,1*	5,09±0,09*	3,79±0,11*

Різнострамовані зміни активностей СОД і КАТ, які ми спостерігали, свідчать про розбалансованість процесів утворення та утилізації АФО у мозку щурів інтоксикованих ХПФ.

Така ситуація у співвідношенні активностей двох згаданих вище ензимів посилюється ще й загальновідомим фактом, що тканини головного мозку характеризуються відносно низькою каталазою активністю [514]. У свою чергу, зменшення активності КАТ свідчить про зниження інтенсивності реакції, що запобігає накопиченню Гідроген пероксиду, який утворюється при дисмутації супероксидного аніону і при аеробному окисненні відновлених флавопротеїнів.

Глутатіонова система, як відомо бере безпосередню участь у низці біохімічних механізмів детоксикації ліпофільних і гідрофільних ксенобіотиків [514]. Отримані нами експериментальні дані (табл. 3.39)

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 активності ГПО у гомогенатах досліджуваних ділянок мозку першої дослідної групи – то вона вірогідно зменшувалася лише у корі великих півкуль, а саме – на 21,9 % ( $P < 0,05$ ).

Таблиця 3.39

Активність ГПО (нмоль ГВ /хв на 1 мг протеїну) у різних відділах головного мозку щурів за гострої інтоксикації ХПФ (15 і 30 мг/кг), ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )

Групи тварин	Відділи головного мозку		
	Гіпокамп	Мозочок	Кора великих півкуль
К	11,63±0,4	41,29±1,44	26,59±1,15
Д1	11,27±1,26	37,17±1,56	20,76±0,81*
Д2	6,98±0,15*	33,28±1,35*	19,37±1,16*

Не виключено, що зниження активності ГПО за токсичної дії ХПФ зумовлене вичерпанням пулу глутатіону відновленого та накопиченням продуктів ліпопероксидації. Це припущення підтверджується даними, представленими у табл. 3.40, згідно з якими активність ГР – ензиму, відповідального за поповнення внутрішньоклітинного пулу ГВ також знижувалася у гомогенатах тканин гіпокампу і кори великих півкуль головного мозку щурів дослідних груп.

Таблиця 3.40

Активність ГР (мкмоль NADPH/хв на 1 мг протеїну) у різних відділах головного мозку щурів за гострої інтоксикації ХПФ (15 і 30 мг/кг), ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )

Групи тварин	Відділи головного мозку		
	Гіпокамп	Мозочок	Кора великих півкуль
К	0,24±0,03	0,28±0,01	0,34±0,01
Д1	0,26±0,01	0,25±0,05	0,26±0,02*
Д2	0,18±0,01*	0,27±0,01	0,21±0,02*

Як відомо, зміна рівня ГВ є чутливим маркером оксидативного стресу. З результатів досліджень (табл. 3.41) видно, що вміст ГВ є нижчим 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.

Таблиця 3.41

Вміст ГВ (ммоль ГВ /г тканини) у різних відділах головного мозку щурів за гострої інтоксикації ХПФ (15 і 30 мг/кг), ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )

Групи тварин	Відділи головного мозку		
	Гіпокамп	Мозочок	Кора великих півкуль
К	0,158±0,009	0,178±0,009	0,188±0,003
Д1	0,12±0,002*	0,17±0,002	0,142±0,001*
Д2	0,1±0,004*	0,171±0,001	0,08±0,003*

Це можна пояснити дією ХПФ, оскільки рівень ГВ та швидкість його обміну можуть бути порушені внаслідок дії хімічних агентів та метаболічних інтермедіатів [514].

Також можна припустити, що дія ХПФ пригнічує *de novo* синтез ГВ. Але в основному зниження вмісту ГВ відбувається за рахунок невідомої втрати ГВ при утворенні його кон'югатів з ХПФ в глутатіонтрансферазній реакції. Частково зниження ГВ можна пояснити вірогідно нижчим рівнем ГР у цих відділах мозку, адже відомо, що високий вміст ГВ забезпечується регенерацією окисненого глутатіону під дією ГР. Активність цього ензиму може пригнічуватись в разі накопичення NADP, бо як відомо, ГР є NADPH-залежним ензимом. Зниження активності ГР спричинене дією вільних радикалів, може сприяти активації мітохондріального шляху апоптозу. Як видно з результатів найвідчутніших змін активність ГР зазнавала у тканинах кори великих півкуль – знижувалася в обох дослідних групах на 23,6 % ( $P < 0,05$ ) і 38,2% ( $P < 0,05$ ), відповідно. У тканинах мозочку змін активності цього ензиму ми не встановили, проте було виявлено вірогідне її зниження на 15% у гіпокампі щурів другої дослідної групи.

**3.2.2 Вплив гострої інтоксикації ХПФ у дозі 15 мг/кг на вміст металів у тканинах різних органів щурів.** Результати досліджень показали, що гостра інтоксикація ХПФ, шляхом його одноразового введення у дозі 15 мг/кг маси тіла дослідних тварин, по різному впливає на рівень окремих металів у досліджуваних тканинах протягом експерименту. Зокрема, при дослідженні тканин нирки щурів (табл. 3.42) встановлено зростання у них концентрації Купруму на 17,7% у тварин дослідної групи. При цьому спостерігалось вірогідне зниження концентрації Феруму на 37,7 % ( $p \leq 0,01$ ) і Кобальту на 8,8% при одноразовому введенні ХПФу в дозі 15 мг/кг маси тіла. Разом з тим, на тлі інтоксикації ХПФ, відмічено зростання концентрації Марганцю на 54,7 % ( $p \leq 0,001$ ), Цинку на 32,8 % ( $p \leq 0,05$ ), Магнію на 51,08 % ( $p \leq 0,01$ ) та Нікелю на 57,14 % ( $p \leq 0,01$ ).

Таблиця 3.42

Вміст металів у тканинах нирки щурів через 1 добу після введення ХПФ у дозі 15 мг/кг, ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )

Хімічний елемент	Групи тварин		Зміни між інтактною і дослідною групами
	Інтактна (контроль)	Дослідна	
	мг/кг сухої ваги		%
Cu	3,17 ± 0,29	3,73 ± 0,31	↑17,7
Mn	4,04 ± 0,32	6,25 ± 0,26***	↑54,7
Zn	9,53 ± 0,68	12,66 ± 1,04*	↑32,8
Fe	549,81 ± 50,1	342,72 ± 29,1**	↓37,7
Mg	786,91 ± 60,2	1188,92 ± 98,3**	↑51,1
Co	0,91 ± 0,07	0,83 ± 0,06	↓8,8
Ni	0,42 ± 0,03	0,66 ± 0,061**	↑57,1

Загалом, гостра інтоксикація щурів ХПФ, шляхом його одноразового введення у дозі 15 мг/кг маси тіла призводила до збільшення концентрації металів у тканинах нирки в ряду: Купрум < Цинк < Магній < Марганець < Нікель.

Згідно результатів досліджень (табл. 3.43) інтоксикація ХПФ, у дозі 15 мг/кг маси тіла також впливала на концентрацію досліджуваних металів у печінці щурів дослідної групи.

Таблиця 3.43

Вміст металів у тканинах печінки щурів через 1 добу після введення ХПФ у дозі 15 мг/кг, ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )

Хімічний елемент	Групи тварин		Зміни між інтактною і дослідною групами
	Інтактна (контроль)	Дослідна	
	мг/кг сухої ваги		%
Cu	3,00 ± 0,21	2,27 ± 0,19*	↓24,3
Mn	6,88 ± 0,31	7,45 ± 0,34	↑8,3
Zn	10,18 ± 0,88	10,76 ± 0,48	↑5,7
Fe	524,97 ± 46,42	630,58 ± 51,07	↑20,1
Mg	523,29 ± 28,98	762,67 ± 52,93**	↑45,7
Ni	0,27 ± 0,02	0,35 ± 0,03*	↑29,6

При цьому, зміни у концентрації елементів у печінці були менш виражені порівняно до їх концентрації у нирках тварин. Зокрема, концентрація Купруму вірогідно знижувалася на 24,3 % ( $p \leq 0,05$ ) у тварин дослідної групи, яким проводили інтоксикацію ХПФ. Крім того, також встановлено зниження концентрації Кобальту на 5,5 %. На відміну від Кобальту і Купруму, встановлено підвищення концентрації Магнію на 45,7 % ( $p \leq 0,01$ ) та Нікелю на 29,6 % ( $p \leq 0,05$ ). Поряд з цим відмічено зростання концентрації Марганцю, Цинку та Феруму на 5-20% при одноразовому введенні ХПФ щурам дослідної групи. Зростання концентрації досліджуваних металів у тварин дослідної групи, якій вводили ХПФ виявлено у ряду: Цинк < Марганець < Ферум < Нікель < Магній.

Дослідженнями встановлено (табл. 3.44), що за дії ХПФ у дозі 15 мг/кг маси тіла, концентрація всіх досліджуваних металів знижувалася у міокарді тварин дослідної групи порівняно до контрольної.

Таблиця 3.44

Вміст металів у тканинах міокарду щурів через 1 добу після введення ХПФ у дозі 15 мг/кг, ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )

Хімічний елемент	Групи тварин		Зміни між інтактною і дослідною групами
	Інтактна (контроль)	Дослідна	
	мг/кг сухої ваги		%
Cu	6,04 ± 0,51	5,77 ± 0,49	↓4,5
Mn	6,78 ± 0,59	5,98 ± 0,42	↓11,8
Zn	24,45 ± 1,98	17,11 ± 1,01*	↓30,0
Fe	704,12 ± 60,32	570,37 ± 51,5	↓18,9
Mg	2928,54 ± 139,95	1928,8 ± 189,01**	↓34,1
Co	1,56 ± 0,13	1,46 ± 0,12	↓6,4
Ni	1,38 ± 0,09	1,28 ± 0,1	↓7,2

Інтоксикація ХПФ знижувала концентрацію Цинку на 30,0 % ( $p \leq 0,05$ ) та Магнію на 34,1 % ( $p \leq 0,01$ ). Встановлено тенденцію до зниження концентрації Купруму Кобальту, Нікелю, Марганцю та Феруму. На тлі ХПФ-інтоксикації зниження концентрації досліджуваних металів виявлено в ряду: Магній > Цинк > Ферум > Марганець > Нікель > Кобальт > Купрум.

При дослідженні концентрації металів у мозку щурів (табл. 3.45) на тлі одноразової інтоксикації їх ХПФ в дозі 15 мг/кг маси тіла встановлено зростання вмісту Цинку на 27,1 % ( $p \leq 0,05$ ) та вмісту Нікелю на 38,1 % ( $p \leq 0,05$ ).

Таблиця 3.45

Вміст металів у тканинах головного мозку щурів через 1 добу після введення ХПФ у дозі 15 мг/кг, ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )

Хімічний елемент	Групи тварин		Зміни між інтактною і дослідною групами
	Інтактна (контроль)	Дослідна	
	мг/кг сухої ваги		%
Cu	2,56 ± 0,19	2,65 ± 0,21	↑3,5
Mn	5,84 ± 0,39	6,35 ± 0,42	↑8,7
Zn	9,27 ± 0,68	11,78 ± 0,89*	↑27,1
Fe	293,24 ± 19,76	281,73 ± 20,03	↓3,9
Mg	1121,29 ± 89,31	1036,81 ± 86,12	↓7,6
Co	2,43 ± 0,19	2,11 ± 0,16	↓13,2
Ni	0,042 ± 0,004	0,058 ± 0,005*	↑38,1

Проведені дослідження показали, що найбільш вагомі зміни досліджуваних металів на тлі одноразової інтоксикації щурів ХПФ виявлено у їх легенях (табл. 3.46) та скелетних м'язах (табл. 3.47). Зокрема, інтоксикація щурів дослідної групи ХПФ призвела до значного зростання концентрації – Купруму на 85,1 % ( $p \leq 0,001$ ).

Разом з тим, одноразове введення тваринам ХПФ призводило до одночасного вірогідного зниження концентрації Нікелю на 20,9 % ( $p \leq 0,05$ ), Кобальту на 25,2 % та, меншою мірою, Магнію – на 8,9 %. Слід зауважити, що концентрація Магнію знижувалася подібним чином у мозку, суттєвіше зниження його вмісту спостерігали у скелетних м'язах та міокарді, тоді як у нирках і печінці вміст Магнію суттєво зростав у тварин дослідної групи, порівняно до контролю.

Таблиця 3.46

Вміст металів у тканинах легені щурів через 1 добу після введення ХПФ у дозі 15 мг/кг, ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )

Хімічний елемент	Групи тварин		Зміни між інтактною і дослідною групами
	Інтактна (контроль)	Дослідна	
	мг/кг сухої ваги		%
Cu	1,41 ± 0,11	2,61 ± 0,19***	↑85,1
Mn	2,23 ± 0,18	2,97 ± 0,26*	↑33,2
Zn	13,65 ± 1,22	14,12 ± 1,06	↑3,4
Fe	394,18 ± 28,16	411,87 ± 36,16	↑4,5
Mg	1524,84 ± 134,51	1388,80 ± 112,02	↓8,9
Co	1,19 ± 0,09	0,89 ± 0,07*	↓25,2
Ni	0,67 ± 0,05	0,53 ± 0,04*	↓20,9

Результати досліджень показали, що інтоксикація ХПФ, шляхом його одноразового введення у дозі 15 мг/кг маси тіла дослідних тварин, впливає також на рівень окремих металів у м'язовій тканині щурів протягом експерименту (табл. 3.47). Зокрема, найбільші зміни встановлені при дослідженні Купруму, концентрація якого зростала на 167,3 % ( $p \leq 0,001$ ) та Марганцю, вміст якого навпаки знижувався на 49,4 % ( $p \leq 0,001$ ). Поряд з цим, знижувалася концентрація Магнію на 26,8 % ( $p \leq 0,05$ ) та Цинку на 25,6 % ( $p \leq 0,01$ ). Вірогідних різниць у концентрації інших досліджуваних металів встановлено не було. Найбільш істотне зростання концентрації Купруму виявлено у м'язовій тканині та легені, тоді як в інших досліджуваних тканинах вміст Купруму вірогідно не змінювався, або навпаки, зменшувався, що може свідчити про вплив інтоксикації ХПФ на концентрацію Купруму у тканинах легені і скелетного м'яза щурів.

Таблиця 3.47

Вміст металів у тканинах м'яза щурів через 1 добу після введення ХПФ у дозі 15 мг/кг, ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )

Хімічний елемент	Групи тварин		Зміни між інтактною і дослідною групами
	Інтактна (контроль)	Дослідна	
	мг/кг сухої ваги		%
Cu	1,10 ± 0,09	2,94 ± 0,22***	↑167,3
Mn	2,63 ± 0,19	1,33 ± 0,11***	↓49,4
Zn	12,18 ± 0,61	9,06 ± 0,67**	↓25,6
Fe	186,03 ± 13,71	190,21 ± 8,73	↑2,2
Mg	2416,48 ± 198,13	1769,22 ± 136,15*	↓26,8
Co	1,21 ± 0,09	1,09 ± 0,08	↑9,9
Ni	0,61 ± 0,05	0,57 ± 0,04	↓6,5

### Висновки

Наведені у цьому розділі результати свідчать про те, що інтоксикація щурів ХПФ у дозах 15 і 30 мг/кг викликає зміни ключових ензиматичних параметрів АОС у тканинах головного мозку. Встановлено:

1. через 24 год після одноразового внутрішньоочеревинного введення тваринам ХПФ в дозах 15 і 30 мг/кг спостерігали зміни активностей СОД, КАТ, ГПО, ГР та вмісту ГВ в досліджуваних відділах головного мозку. Виявлено, що різні відділи головного мозку відрізняються за активністю антирадикального захисту. Найвищу інтенсивність антиоксидантних процесів спостерігали у великих півкулях головного мозку, найнижчу – в мозочку;

2. активність СОД у півкулях головного мозку тварин першої та другої дослідних груп знижувалася відповідно на 27,2% ( $P < 0,05$ ) та 31,4% ( $P < 0,05$ ) порівняно до контролю;

3. активність КАТ у гіпокампі тварин першої та другої дослідних груп знижувалася відповідно на 22,6% і 32,6% ( $P < 0,05$ ). У мозочку і корі великих півкуль головного мозку тварин другої дослідної групи

активність КАТ знижувалась відповідно на 19,5% і 49,7% ( $P < 0,05$ ) порівняно до контролю;

4. активність ГПО знижувалася 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 порівняно до контролю;

5. вміст ГВ знижувався у тварин першої та другої дослідних груп у гіпокампі (відповідно на 24,06% ( $P < 0,05$ ) та 36,71% ( $P < 0,05$ ) та півкулях головного мозку (відповідно на 24,47% ( $P < 0,05$ ) та 57,45% ( $P < 0,05$ )) порівняно до контролю;

6. виявлені тканинно-залежні зміни вмісту у досліджуваних органах Купруму, Мангану, Цинку, Феруму, Магнію, Кобальту і Нікелю. Найбільш вагомі зміни досліджуваних металів на тлі одноразової інтоксикації щурів ХПФ у дозі 15 мг/кг мали місце в тканинах легені та скелетного м'яза.

Результати даного підрозділу опубліковані у роботах [143, 151, 168].

### **3.3 Вплив хронічної інтоксикації ХПФ у дозі 15 мг/кг на стан показників АОС та вміст металів у окремих відділах головного мозку щурів**

Завданням даного етапу роботи було дослідити вплив хронічної інтоксикації ХПФ на біохімічні показники, які характеризують антиоксидантний статус у різних відділах головного мозку, а також прослідкувати можливі зміни концентрації металів. Для цього було сформовано дві групи щурів по 5 тварин у кожній. Тварини дослідної групи щоранку протягом 30 днів перорально отримували ХПФ у дозі 15 мг/кг маси тіла.

**3.3.1 Вплив хронічної інтоксикації ХПФ у дозі 15 мг/кг на показники АОС у різних відділах головного мозку щурів.** З метою з'ясування стану АОС у різних відділах головного мозку за умов хронічної інтоксикації щурів

ХПФ вивчали зміни активностей КАТ, ГП, СОД, а також вмісту ТБК-активних комплексів у тканинах великих півкуль, мозочка та гіпокампу.

З отриманих результатів, які представлено у таблиці 3.48 видно, що у всіх досліджуваних відділах головного мозку щурів хронічна інтоксикація ХПФ призводить до зниження активностей СОД і ГП та одночасне зростання концентрації ТБК-активних продуктів.

Таблиця 3.48

Ензиматичні та неензиматичні показники АОС у різних відділах головного мозку щурів за хронічного впливу ХПФ у дозі 15 мг/кг ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )

Активність супероксиддисмутази (СОД) (ум. од./мг протеїну)		
Відділи головного мозку	К	Д
Півкулі	1,75±0,17	1,22±0,13*
Мозочок	1,18±0,26	0,413±0,15*
Гіпокамп	3,77±0,38	1,61±0,24**
Активність глутатіонпероксидази (ГПО) ( мкМоль/ хв.•на 1 г протеїну)		
Півкулі	399,34±25,13	187,68±28,36**
Мозочок	337,07±34,28	185,38±26,11**
Гіпокамп	182,49±15,69	109,16±14,15**
Активність каталази (КАТ) (мкМоль Н <sub>2</sub> О <sub>2</sub> /хв.•мг протеїну)		
Півкулі	4,23 ± 0,8	4,45 ± 0,5
Мозочок	3,14 ± 0,6	2,72 ± 0,3
Гіпокамп	3.45 ± 0,5	4,61 ± 1,1
Вміст ТБК-активних продуктів (нмоль/г тканини)		
Півкулі	74,55±4,31	96,91±6,58*
Мозочок	27,22±2,73	38,68±3,21*
Гіпокамп	96,16±10,16	149,04±11,55**

Водночас, достовірних відмінностей у активності КАТ зареєстровано не було, не беручи до уваги тенденцію до її незначного зростання у гіпокампі. У півкулях головного мозку дослідної групи спостерігали достовірне зниження супероксидисмутазної активності на 43,4 % ( $p < 0,05$ ) порівняно до контролю. Схожі зміни спостерігали у мозочку де зниження ензиматичної активності супероксидисмутази було найсуттєвішим і складало 185,7 % ( $p < 0,05$ ) відносно контролю. Зниження супероксидисмутазної активності у гіпокампі становило 134,1 % ( $p < 0,01$ ) відносно контрольних значень.

Спостерігали зниження глутатіонпероксидазної активності у півкулях головного мозку на 112,7 % ( $p < 0,01$ ), мозочку на 81,8 % ( $p < 0,01$ ), гіпокампі на 67,1 % ( $p < 0,01$ ) порівняно з контролем. Вміст ТБК-активних продуктів зростав у півкулях на 29,9 % ( $p < 0,05$ ), мозочку 42,1 % ( $p < 0,05$ ) та гіпокампі 54,9 ( $p < 0,01$ ) порівняно з контрольними показниками. Загалом, при хронічній інтоксикації ХПФ показники АОС досліджуваних ділянок головного мозку можна розташувати у такому порядку спадання чутливості: гіпокамп, мозочок і кора великих півкуль.

**3.3.2 Вплив хронічної інтоксикації ХПФ у дозі 15 мг/кг на вміст деяких металів у тканинах різних органів щурів.** Відомо, що розподіл хімічних елементів, зокрема металів у різних структурах ЦНС нерівномірний [136]. Деякі автори вважають, що вміст металів вищий в ділянках мозку з найінтенсивнішою діяльністю, хоча ці твердження є суперечливими [65]. У цій частині роботи було проведено дослідження вмісту Купруму, Цинку, Мангану, Кобальту і Феруму у різних відділах головного мозку щурів (гіпокампі, корі великих півкуль і мозочку) за хронічної дією хлорпірифосу. Встановлено, що умови експерименту призводили у більшості випадків до змін у концентрації перерахованих металів у різних відділах головного мозку піддослідних щурів, що видно з даних представлених у таблицях 3.49 – 3.52.

При дослідженні концентрації Цинку (таб. 3.59) у трьох відділах головного мозку щурів на тлі хронічної інтоксикації їх ХПФ, встановлено вірогідне зростання вмісту Цинку у мозочку на 35,9 % ( $p \leq 0,05$ ), тоді як у гіпокампі

концентрація Цинку зростала на 17 %, ( $p \leq 0,5$ ), порівняно до тканин інтактних тварин. Разом з тим, у корі півкуль головного мозку концентрація Цинку, навпаки мала тенденцію до зниження, хоча вірогідних змін встановлено не було.

Таблиця 3.49

Концентрація Цинку у різних відділах головного мозку щурів за хронічного впливу ХПФ у дозі 15 мг/кг ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )

Відділи головного мозку	Групи тварин		Зміни між інтактною і дослідною групами
	Інтактна (контроль)	Дослідна	
	мг/кг сухої ваги		%
кора головного мозку	17,27 $\pm$ 1,88	13,40 $\pm$ 1,21	↓22,4
гіпокамп	30,87 $\pm$ 2,31	36,33 $\pm$ 1,78*	↑17,0
мозочок	12,72 $\pm$ 0,60	17,29 $\pm$ 1,45*	↑35,9

Як видно з результатів досліджень (табл. 3.50) хронічна інтоксикація щурів ХПФ впливала на вміст Феруму у тканинах всіх досліджуваних

Таблиця 3.50

Концентрація Феруму у різних відділах головного мозку щурів за хронічного впливу ХПФ у дозі 15 мг/кг ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )

Відділи головного мозку	Групи тварин		Зміни між інтактною і дослідною групами
	Інтактна (контроль)	Дослідна	
	мг/кг сухої ваги		%
кора головного мозку	656,2 $\pm$ 2,8	533,7 $\pm$ 3,5***	↓18,6
гіпокамп	788,8 $\pm$ 3,5	681,59 $\pm$ 4,6***	↓13,6
мозочок	782,8 $\pm$ 3,9	692,59 $\pm$ 5,6***	↓11,5

відділів головного мозку тварин дослідної групи. Зокрема, мало місце зниження вмісту цього металу у гіпокампі на 13,6 % ( $p \leq 0,001$ ), в мозочку – на 11,5 % ( $p \leq 0,001$ ), а в корі великих півкуль – на 18,6 % ( $p \leq 0,001$ ).

Встановлено, що хронічна інтоксикація щурів ХПФ по різному впливає на вміст Купруму у досліджуваних відділах головного мозку щурів (табл. 3.51).

Таблиця 3.51

Концентрація Купруму у різних відділах головного мозку щурів за хронічного впливу ХПФ у дозі 15 мг/кг ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )

Відділи головного мозку	Групи тварин		Зміни між інтактною і дослідною групами
	Інтактна (контроль)	Дослідна	
	мг/кг сухої ваги		%
кора головного мозку	2,04±0,15	1,24±0,10**	↓39
гіпокамп	3,86±0,23	5,31±0,49*	↑37,5
мозочок	1,79±0,16	1,99±0,15	↑11,1

Спостерігали зниження вмісту Купруму у корі головного мозку на 39% ( $p \leq 0,01$ ), але водночас, підвищення концентрації цього елемента у гіпокампі на 37,5 % ( $p \leq 0,05$ ). У мозочку змін у концентрації Купруму виявлено не було. У корі півкуль головного мозку і мозочку не було виявлено змін у концентрації Кобальту (табл. 3.52).

Таблиця 3.52

Концентрація Кобальту у різних відділах головного мозку щурів за хронічного впливу ХПФ у дозі 15 мг/кг ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )

Відділи головного мозку	Групи тварин		Зміни між інтактною і дослідною групами
	Інтактна (контроль)	Дослідна	
	мг/кг		%
кора головного мозку	2,26±0,11	2,09±0,18	↓7,5
гіпокамп	1,10±0,09	1,45±0,1*	↑31,8
мозочок	2,04±0,19	1,57±0,13	↓23

Проте, водночас було встановлено, що хронічна інтоксикація піддослідних тварин ХПФ у даному експерименті призводила до зростання цього показника на 31,8 % у тканинах гіпокампу.

## Висновки

1. Пероральне щоденне введення щурам ХПФ дозі 15мг/кг маси тіла протягом одного місяця призводить 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.

2. Встановлені тканинно-залежні особливості вмісту у досліджуваних відділах головного мозку щурів, які зазнавали хронічної інтоксикації ХПФ у дозі 15мг/кг маси тіла протягом одного місяця Купруму, Цинку, Марганцю, Кобальту і Феруму.

Результати даного підрозділу опубліковані у роботах [146, 151, 155, 159, 653].

### **3.4 Вплив хронічної дермальної інтоксикації ХПФ на фізіолого-біохімічні показники щурів**

Дермальний шлях надходження ХПФ до організму залишається одним з найменш вивчених, перш за все через методологічні складнощі. З метою вивчення хронічного (протягом одного місяця) дермального впливу ХПФ на ЦНС та інші фізіолого-біохімічні показники організму. Було сформовано три групи тварин (контрольну (К) і дві дослідні (Д1 і Д2) по 10 щурів у кожній. Протягом місяця тваринам дослідних груп щоденно в один і той самий час дермально аплікували ХПФ, занурюючи їхній хвіст у розчин цієї речовини відповідної концентрації на 3 хв. У якості вихідного розчину ХПФ застосовували препарат “Дурсбан” (Україна) з концентрацією діючої речовини 480 г/л. Для експериментів препарат розводили у 50 (група Д1) і 5

разів (група Д2). У контрольній групі з інтактними тваринами проводили ті самі маніпуляції, що й у дослідній, але замість ХПФ використовували фізіологічний розчин.

### 3.4.1 Хронічний дермальний вплив ХПФ на показники АОС у тканинах різних органів щурів.

**3.4.1.1 Вплив хронічної інтоксикації ХПФ на глутатіонову систему та вміст продуктів ПОЛ у різних органах щурів.** Як відомо, 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. 3.53) хронічне отруєння щурів ХПФ 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 відповідних тканин щурів контрольної групи.

Таблиця. 3.53

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	82,7±3,53	71,1±2,82*	78,62±3,19
Селезінка	14,43±1,61	13,09±1,62	15,42±2,35
Міокард	40,8±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. Проте, 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 виявлено не було. Треба мати на увазі, що динаміка багатьох патологічних процесів в організмі значною мірою залежить від активності ГПО. Її суттєве зниження у печінці, наприклад, може свідчити про порушення захисту її клітин від ксенобіотиків, зокрема ХПФ. Аналогічно це стосується і нирки.

Основна біологічна роль ензиму ГР полягає у підтриманні необхідної внутрішньоклітинної концентрації ГВ – важливого компоненту неензиматичної ланки АОС, шляхом забезпечення його синтезу. Як видно з даних представлених у таблиці 3.54, ГР- активність була вірогідно нижчою у тканинах нирки обидвох дослідних груп – відповідно на 24,4 та 48,7 % ( $P < 0,05$ ), порівняно до контролю. Спостерігали зниження цього показника і у тканинах печінки обидвох дослідних груп, але статистично вірогідно цей показник змінювався лише у тварин другої дослідної групи, а саме – спадав на 36,2 % ( $P < 0,05$ ).

Таблиця 3.54

Активність ГР (мкмоль NADPH/хв·мг протеїну) у тканинах різних органів щурів за хронічної дермальної дії ХПФ ( $M \pm m$ ,  $n=10$ )

Досліджувані органи	Групи тварин		
	К	Д1	Д2
Нирки	0,61±0,02	0,49±0,03*	0,41±0,05*
Легені	0,48±0,07	0,42±0,03	0,38±0,05
Селезінка	0,32±0,01	0,34±0,01	0,31±0,02
Міокард	0,6±0,04	0,65±0,07	0,6±0,06
Печінка	0,94±0,07	0,81±0,06	0,69±0,05*
Мозок	0,32±0,01	0,29±0,01	0,3±0,01

У тканинах селезінки, міокарда і мозку ГР- активність тварин обох дослідних груп практично не відрізнялась від контролю. Тенденцію до

незначного зниження ГР- активності спостерігали у тканинах легень обох дослідних груп відносно контролю.

Зниження активності таких ензимів, як ГПО і ГР, очевидно свідчать про наявність дисбалансу в про-антиоксидантній системі тварин, які зазнавали хронічного дермального отруєння ХПФ у різних дозах.

Що стосується вмісту ГВ, то як видно з Табл. 3.55 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 групи тварин. На противагу цьому – у досліджених гомогенатах тканин нирки, легені, селезінки, міокарда і мозку усіх груп тварин, змін у вмісті ГВ виявлено не було.

Таблиця 3.55

Вміст ГВ (ммоль/ г тканини) у тканинах різних органів щурів за хронічної дермальної дії ХПФ ( $M \pm m$ ,  $n=10$ )

Досліджувані органи	Групи тварин		
	К	Д1	Д2
Нирка	0,15±0,04	0,15±0,005	0,14±0,005
Легеня	0,05±0,01	0,04±0,002	0,04±0,005
Селезінка	0,08±0,004	0,07±0,01	0,06±0,007*
Міокард	0,09±0,004	0,08±0,003	0,09±0,002
Печінка	0,30±0,005	0,21±0,006*	0,19±0,007*
Мозок	0,09±0,002	0,07±0,004	0,07±0,002

Слід зазначити, що ГВ захищає внутрішньоклітинні альбуміни від ендогенних активних форм Оксигену (АФО), крім того, він підсилює інактивацію гідропериксидів та інших токсичних продуктів окиснення [67]. Враховуючи безпосередню участь глутатіону у багатьох процесах життєдіяльності клітини, в тому числі таких, як диференціація, проліферація та апоптоз, порушення його гомеостазу може свідчити, зокрема, про розвиток ряду патологічних явищ. Глутатіон, з одного боку – самостійно, а з другого – опосередковано – в ролі субстрату ГВ-залежних ензимів

(глутатіонтрансферази, глутатіонпероксидази і глутатіонредуктази) модулює клітинну відповідь на дію АФО, займаючи таким чином центральне місце у функціонуванні глутатіонової ланки АОС.

Важливо зазначити, що ТБК-активні продукти є одним з основних індикаторів інтенсивності протікання процесів ПОЛ, які відомі, як одні із універсальних механізмів пошкодження клітин на рівні біологічних мембран. Зокрема, порушення цілісності клітинних мембран призводить до активації фосфоліпаз і оксигеназ, які стимулюють утворення вільних радикалів, провокуючи порушення у системі ПОЛ та впливають на характер перебігу мембрано-деструктивних процесів у клітинах [58-59]. Гідропероксида ліпідів – первинні продукти ПОЛ є нестійкі і швидко руйнуються з утворенням альдегідів (МДА), спиртів, кетонів і епоксидів – вторинних продуктів ПОЛ. Аналізуючи отримані нами дані видно, що вміст ТБК-активних продуктів (табл. 3.56) був вірогідно вищим у тканинах нирки, міокарда та мозку тварин другої дослідної групи – відповідно на 31,7 %, 53,1 %, 84,4 % ( $P < 0,05$ ).

Таблиця 3.56

Вміст ТБК- активних продуктів (нмоль/г тканини) у тканинах різних органів щурів за хронічної дермальної дії ХПФ ( $M \pm m$ ,  $n=10$ ).

Досліджувані органи	Групи тварин		
	К	Д1	Д2
Нирка	4,76±0,57	5,69±0,39	6,27±0,28*
Легеня	2,52±0,41	2,5±0,32	3,1±0,38
Селезінка	8,69±0,26	8,17±0,26	8,61±0,19
Міокард	5,44±0,61	5,42±0,58	8,33±0,53*
Печінка	4,74±0,37	5,13±0,62	5,15±0,59
Мозок	2,7±0,29	3,84±0,82	4,98±0,22*

Як і вміст ТБК-активних продуктів, вміст гідропероксидів ліпідів характеризує ступінь впливу різних чинників на організм, в тому числі токсичних і, таким чином, є важливим показником ліпопероксидативних процесів.

Як показали результати наших досліджень цього параметру (табл. 3.57), 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 % ( $P < 0,05$ ), у порівнянні з контролем. Також слід зазначити зростання вмісту даного показника у тканинах нирок тварин першої дослідної групи.

Таблиця 3.57

Вміст гідропероксидів ліпідів ( $\Delta D^{480}/\text{мл}$ ) у тканинах різних органів щурів за хронічної дермальної дії ХПФ ( $M \pm m, n=10$ ).

Досліджувані органи	Групи тварин		
	К	Д1	Д2
Нирка	0,10±0,03	0,20±0,03*	0,14±0,02
Легеня	0,14±0,02	0,14±0,01	0,12±0,02
Селезінка	0,38±0,04	0,38±0,03	0,39±0,02
Міокард	0,68±0,07	1,10±0,06	1,09±0,15
Печінка	0,94±0,11	1,52±0,19*	1,68±0,19*
Мозок	0,83±0,09	1,65±0,14*	1,59±0,23*

**3.4.1.2 Вплив хронічної інтоксикації ХПФ на ензиматичні показники АОС у різних органах щурів.** Встановлено, що за хронічної дермальної дії ХПФ на організм щурів у переважній більшості їх тканин знижується активність системи антиоксидантного захисту, що виражається, зокрема, у зменшенні активності СОД (табл. 3.58). Так активність СОД після одномісячної дермальної інтоксикації досліджуваних тварин ХПФ була достовірно 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 тканин щурів контрольної групи. У тканинах селезінки спостерігалась лише тенденція до зниження супероксиддисмутазної активності у тварин обох дослідних груп тварин.

Таблиця 3.58

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

Досліджуваний орган	Група тварин		
	К	Д1	Д2
Нирки	5,30±0,17	4,91±0,24	3,35±0,23*
Легені	11,47±0,84	12,8±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*	4,8±0,74*
Мозок	10,76±1,32	7,42±0,67*	7,06±1,02*

Аналізуючи результати досліджень активності СОД у тканинах нирки та легені, видно, що у цих органах даний показник був вірогідно нижчим у тварин другої дослідної групи, які отримували вищу дозу пестициду. У тварин першої дослідної групи у тканинах нирки спостерігали лише тенденцію до зниження ензиматичної активності СОД. Слід зазначити, що найбільш суттєві відмінності у значеннях досліджуваного ензиматичного показника ми спостерігали у тканинах печінки та мозку. Це видається цілком закономірним, зважаючи, що печінка є основним органом у якому проходять процеси детоксикації багатьох ксенобіотиків різної природи (в тому числі ФОС), проявляє більшу потребу у ензимах АОС, зокрема у СОД. Стосовно мозку, важливо наголосити, що нервова тканина, загалом, є дуже чутливою до пошкоджуючого впливу вільних радикалів. Це можна пояснити надзвичайно високою інтенсивністю обмінних процесів у тканинах мозку, відсутністю в них надлишкових запасів енергії, високим вмістом субстратів ПОЛ (поліненасичених жирних кислот) і каталізаторів реакцій ліпідного переокиснення (в основному, іонів Феруму і Купруму). Якщо при цьому ще матиме місце зниження активності антиоксидантних ензимів, які у нервовій тканині і за звичайних умов не є на високому рівні, то це може мати

негативні наслідки для нормального функціонування нервової системи організму. Інгібування активності СОД під впливом ХПФ можна пояснити надмірним збільшенням у клітинах вільних радикалів (синглетного Оксигену, перекису Гідрогену, гідроксильних радикалів). Вплив даного ксенобіотики ймовірно приводить до пригнічення процесів транскрипції та трансляції в клітинах даних тканин, що може бути однією з причин пригнічення активності даного ензиму. АФО здатні через механізми вільнорадикального окислення пошкодують діяти на протеїни, нуклеїнові кислоти і ліпіди. У свою чергу, ПОЛ можна розглядати, як один з основних механізмів пошкодження клітин, зокрема їхніх мембран. Внаслідок інтенсифікації процесів ПОЛ можуть відбуватися фізико-хімічні властивості мембран, перерозподіл у них ліпідів і пригнічення активності ензимів. Ще однією з причин зниження активності СОД ми припускаємо, може бути зниження вмісту відновленого глутатіону, який як відомо, має регулюючий вплив на активність цього ензиму.

Як видно з результатів (табл. 3.59), за винятком гомогенатів тканин селезінки і міокарда, у всіх інших досліджуваних тканинах щурів інтоксикованих ХПФ, активність КАТ по була нижчою, ніж у тканинах тварин контрольної групи.

Спостерігали зниження активності КАТ у тканинах мозку щурів двох дослідних груп відповідно на 51,3 та 69 % ( $P < 0,05$ ) у порівнянні до контролю. 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 Оксигену, 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 каталази у тканинах нирок та печінки у 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 ( $M \pm m$ ,  $n=10$ ).

Досліджувані органи	Групи тварин		
	К	Д1	Д2
Нирка	11,89 ±0,88	10,7±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	10,0±0,32	8,74±0,21*
Мозок	6,60±0,39	4,36±0,57*	3,93±0,48*

Що стосується інших органів, зокрема, селезінки та міокарда, то в даному випадку спостерігали протилежне явище, а саме – зростання активності КАТ тварин другої дослідної групи порівняно до контролю. Можна припустити, що таке підвищення є результатом компенсаторно-захисних механізмів у відповідь на інтенсифікацію вільнорадикальних процесів.

**3.4.1.3 Вплив хронічної дермальної інтоксикації ХПФ на ензиматичні показники АОС у еритроцитах крові щурів.** Метою даної частини роботи було провести порівняльний аналіз ключових показників АОС у клітинах крові щурів, інтоксикованих ХПФ шляхом його хронічного проникнення в організм через шкіру. Свідченням активації ПОЛ у еритроцитах за дії ХПФ є значне підвищення вмісту проміжних та кінцевих продуктів цього процесу. З метою оцінювання інтенсивності процесів ПОЛ найчастіше проводять кількісне визначення малонового діальдегіду (МДА).

Результати проведених досліджень вказують на зростання вмісту ТБК-активних продуктів у гемолізатах еритроцитів щурів першої та другої дослідних груп відповідно на 58% ( $p < 0,001$ ) і 39 %, ( $p < 0,01$ ) у порівнянні з контрольною групою тварин (рис. 3.1). Що стосується вмісту

гідропероксидів ліпідів, то вірогідне зростання цього показника спостерігали у тварин першої дослідної групи на 29 % у порвнянні до контролю. у тварин другої дослідної групи вміст гідропероксидів ліпідів був на 17% вищим стосовно тварин, що не були інтоксиковані ХПФ, але ці зміни не були вірогідними статистично.

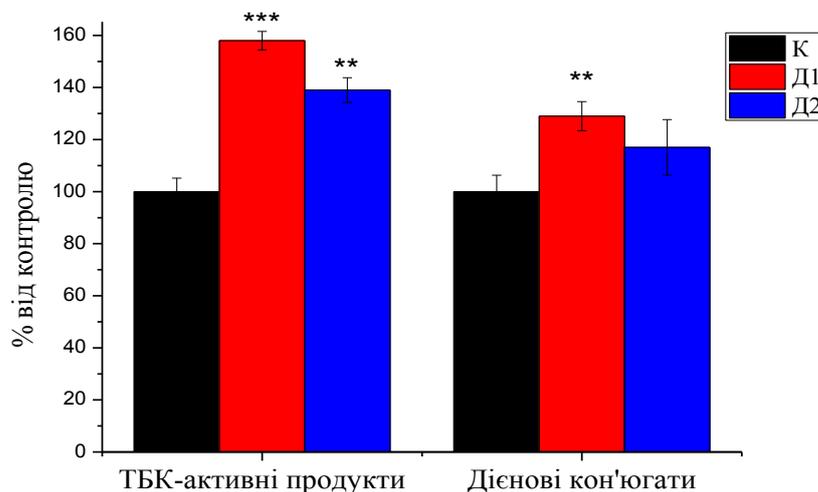


Рис. 3.1. Вплив хронічної дермальної інтоксикації ХПФ на вміст продуктів ПОЛ в еритроцитах щурів, ( $M \pm m$ ,  $n=10$ ).

На рис.3.2. представлені дані стосовно активностей ключових ензимів антиоксидантного захисту.

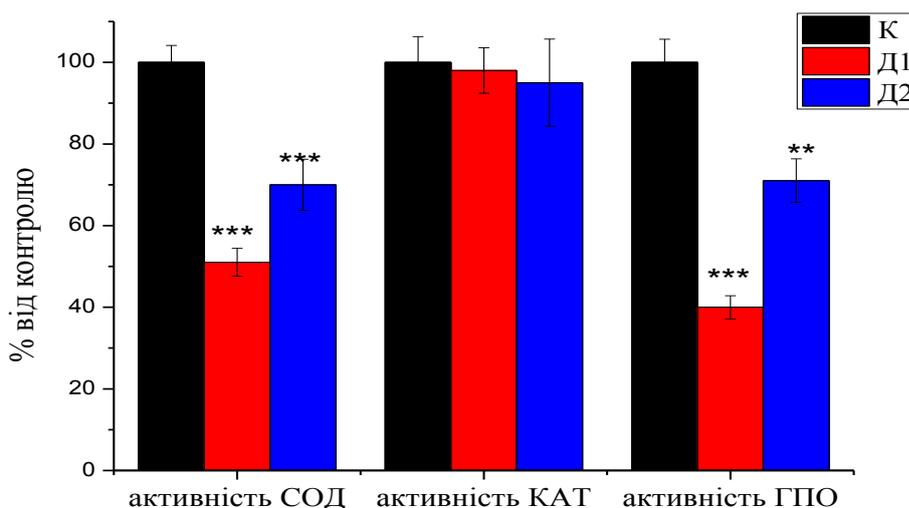


Рис. 3.2. Вплив хронічної дермальної інтоксикації ХПФ на активність ензимів АОС в еритроцитах щурів, ( $M \pm m$ ,  $n=10$ )

Одержані дані активності СОД свідчать, що посилення вільнорадикальних процесів супроводжується вірогідним зниженням активності цього ензиму в еритроцитах крові щурів першої дослідної групи на 49% ( $p < 0,001$ ), у тварин другої дослідної групи на 30% ( $p < 0,001$ ) порівняно з тваринами контрольної групи.

Подібні зміни спостерігали при визначенні активності ГПО – ензиму, який також є одним з основних показників антиоксидантного статусу організму і виконує функцію інактивації пероксиду Гідрогену і пероксидних радикалів, захищаючи тим самим клітинні мембрани від дестабілізації. Активність цього ензиму була вірогідно нищою у тварин першої та другої дослідних груп відповідно на 60% ( $p < 0,001$ ) та 31% ( $p < 0,01$ ) стосовно контролю. У той же час, каталаза, що розщеплює пероксид Гідрогену, у наших дослідженнях достовірних змін активності не зазнавала.

### **3.4.2 Дослідження хронічного дермального впливу ХПФ на гістологічні параметри у тканинах печінки і різних відділів мозку щурів.**

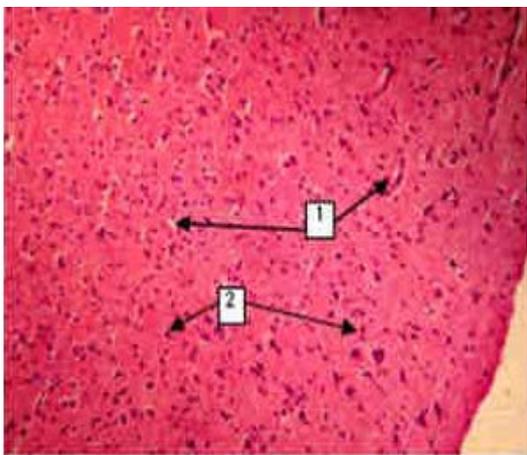
Дана частина роботи була присвячена дослідженням гістології мозку та печінки щурів за хронічного впливу на них низьких доз ХПФ. Відомо, що ХПФ може негативно впливати на проліферацію і диференціацію нервових клітин, формування синапсів, згубно діє на імунну, репродуктивну та інші системи організму. Іншими нашими дослідженнями, як на експериментальних тваринах, так і на культурі нервових клітин підтверджено нейротоксичну дію ХПФ і те, що отруєння ним спричиняє біохімічні зміни у клітинах різних відділів головного мозку, а на рівні організму спостерігаються порушення функціонування центральної нервової системи. Також було встановлено, що ХПФ при додаванні його у культуральне середовище нейрональних клітин за умов *in vitro*, призводив до негативних незворотних змін у морфології нейронів.

У зв'язку з цим, виник закономірний інтерес до з'ясування можливого впливу ХПФ на гістологічні і цитологічні показники окремих органів тварин, які зазнали дії цього токсиканта. Тому метою даної частини роботи було вивчити гістологічні параметри головного мозку і печінки у щурів,

інтоксикованих ХПФ шляхом його хронічного проникнення в організм через шкіру у низьких дозах. Вибір для дослідження головного мозку логічно впливає із сказаного вище. Печінка, в свою чергу, є органом, що виконує захисні, знешкоджувальні, ензиматичні і видільні функції, спрямовані на підтримання гомеостазу в організмі та бере участь у протеїновому, вуглеводному, жировому і мінеральному обмінах, тому стан її морфологічний стан при різноманітних токсичних ураженнях завжди представляє особливий інтерес.

Вивчення гістозрізів великих півкуль головного мозку (*hemispheriae cerebri*) дослідних і контрольних тварин показало, що їхня гістологічна структура в процесі експерименту суттєвих змін не зазнала. Аналіз гістологічних препаратів обидвох груп (рис. 3.3) дозволяє говорити, що цитоархітектоніка півкуль збережена і відповідає її шестишаровій будові, тобто складається з молекулярного, зовнішнього зернистого, пірамідного, внутрішнього зернистого, гангліонарного та шару поліморфних клітин.

А



Б

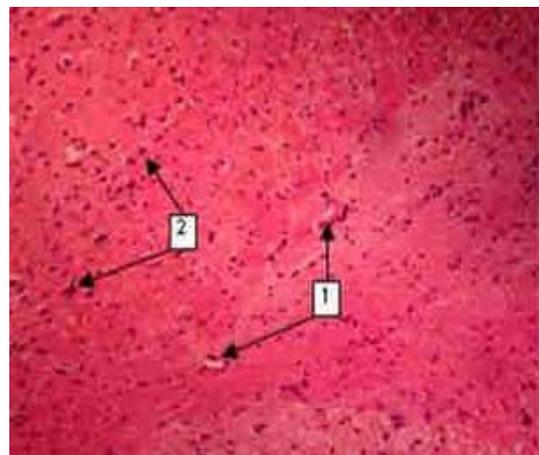


Рис 3.3. Мікроструктура півкуль головного мозку за умов хронічної дермальної інтоксикації ХПФ.

Примітка. А – контроль, Б – дослід; Забарвлення – гематоксилін-еозин, Х100, 1 – кровоносні судини; 2 – нейрони

У нейроглії чітко проглядаються нервові волокна, нейрони та кровоносні судини. Слід звернути увагу на те, що у гістопрепаратах дослідних тварин спостерігається незначне збільшення діаметру капілярів та

венозних судин, у проясвіті наявні залишки еритроцитів. Стосовно нейронів, то вони як у дослідних, так і контрольних зразках залишалися без видимих патологій, їх ядра розміщені центрально, цитоплазма однорідна.

Результати гістоморфологічних досліджень мозочка (*cerebellum*) також показали, що дослідні зразки суттєво не відрізнялися від контрольних (рис. 3.4). На зображеннях гістопрепаратів мозочка обидвох груп добре видно тришарову будову її кори, а саме – молекулярний, гангліонарний та зернистий шари. У гангліонарному шарі спостерігаються поодинокі грушоподібні клітини, дендрити яких простягаються до молекулярного шару. У зернистому шарі зустрічаються нейрони різних розмірів з чітко видимими ядрами. Кровоносні судини звужені, заповнені еритроцитами.

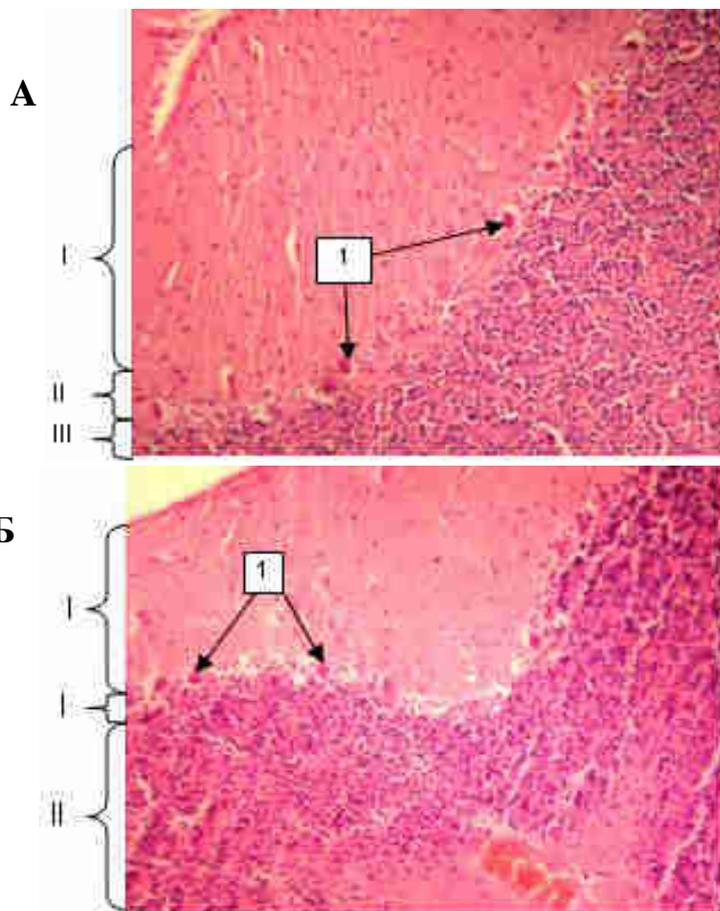


Рис 3.4 Мікроструктура мозочка за умов хронічної дермальної інтоксикації ХПФ.

Примітка. А – контроль, Б – дослід; Забарвлення – гематоксилін-еозин, Х200, I – зернистий шар; II – гангліонарний шар; III – молекулярний шар. 1 – грушоподібні нейрони.

Зауважимо, що у деяких препаратах дослідної групи ми спостерігали, що у молекулярному шарі кори мозочка окремі нервові волокна були атрофовані.

Дослідження гістоморфологічних параметрів печінки (hepar) (рис. 3.5) показали, що у препаратах обидвох груп структура органа збережена, чітко видно гепатоцити, центральну вену, триади (артерія, вена, жовчний протік).

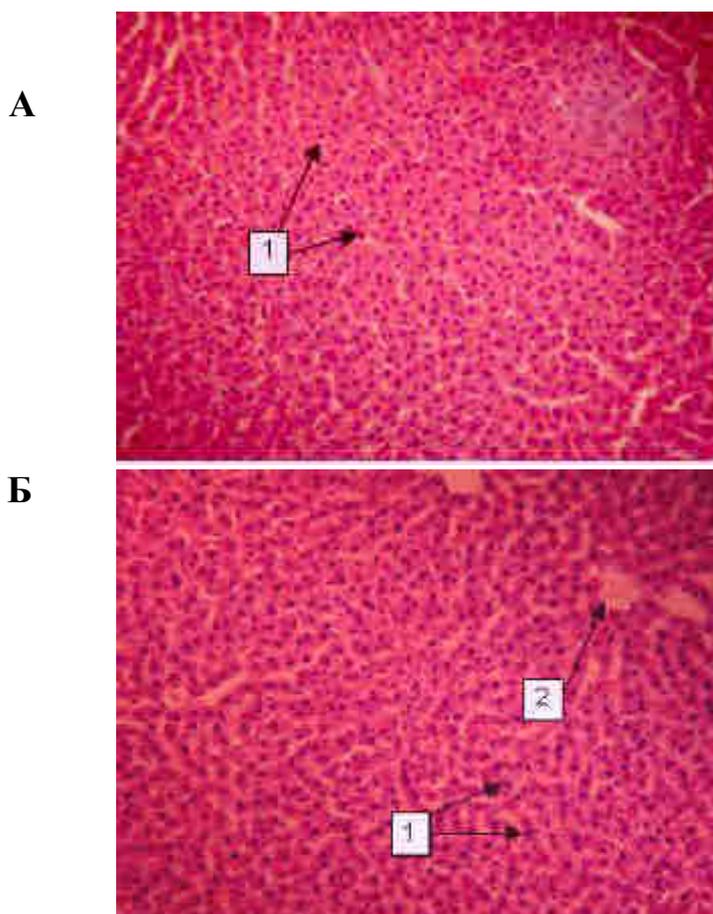


Рис. 3.5. Мікроструктура печінки за умов хронічної дермальної інтоксикації ХПФ.

Примітка. А – контроль, Б – дослід. Зabarвлення – гематоксилін-еозин, Х200, 1 – гепатоцити; 2 – центральна вена.

Окрім того, у печінці за допомогою ензиматичних систем гепатоцитів, відбувається повна або часткова втрата токсичних властивостей речовин, в тому числі фосфорноорганічних сполук антихолінестеразної дії, до яких належить і ХПФ. Морфофункціональний стан так званої тканинної мікроділянки печінки, суб'єктами якої, як і в інших структурах є кровоносні

та лімфатичні мікросудини, пухка сполучна тканина (інтерстицій) і клітини паренхіми відображає не лише функціональну напруженість самого органу, а може також свідчити про реакцію організму в цілому. Але, водночас, при цьому відомо, що за допомогою гістологічних досліджень впливу дії фосфорорганічних сполук не виявляли характерних змін тканин печінки.

**3.4.3 Дослідження хронічного дермального впливу ХПФ на поведінку щурів.** Дослідження поведінки тварин під впливом тих чи інших токсичних факторів є надзвичайно важливим, адже певні її зміни можуть бути ранньою ознакою того, що організм зазнав шкідливої дії окремого токсину або їх суміші.

У зв'язку з цим, метою даної частини роботи було встановити можливі порушення когнітивних функцій у щурів, інтоксикованих ХПФ шляхом його хронічного проникнення в організм через шкіру у низьких дозах. Для цього інтактних і дослідних тварин піддавали аналітичному тестуванню в установках «екстраполяційне позбавлення», «темно-світла камера» і «відкрите поле» на початку експериментального періоду (до інтоксикації ХПФ), а також через 7, 14 і 30 діб дослідного періоду.

Тест «Екстраполяційне позбавлення» використовується для дослідження когнітивних здібностей піддослідних тварин (як правило, щурів, рідше мишей), а саме їхньої здатності знаходити вихід з ситуації гострого стресу та запам'ятовувати цей вихід після того, як його було знайдено. Для цього слугують показники часу пірнання та частки вдалих спроб: що краще працюють когнітивні механізми тварини, то швидше вона знайде вихід, підпірнувши під край циліндра, і, відповідно, тим більша частка спроб буде вдалою (завершиться пірнанням). При порушеннях роботи ЦНС, викликаних різноманітними чинниками (зокрема, впливом нейротоксичних хімікатів, таких як ХПФ), щурі виявляють труднощі з вирішенням екстраполяційної задачі: на знаходження виходу вони витрачають більше часу, або й узагалі не знаходять його. Також з допомогою даного тесту можна оцінювати рівень

рухової активності тварин: що більше тварина здійснює стрибків усередині циліндра, тим вищою вважається її активність.

За результатами проведених тестувань виявлено ряд істотних відмінностей між тваринами, що були піддані інтердермальному впливові ХПФ, та інтактними щурами контрольної групи (табл.3.60). Ці відмінності яскравіше проявлялися у дослідній групі 1, на яку діяли концентрованішим розчином токсиканта – отже, були дозозалежними.

Таблиця.3.60

Виконання тваринами тесту екстраполяційного позбавлення за умов впливу на них різних доз ХПФ протягом 30 діб при його дермальному введенні (для всіх груп: n=5, P < 0,05).

Доба тестування	Група тварин	К-сть стрибків	Час до пірнання, сек	К-сть вдалих спроб, %
1	к	6.00±1.30	46.00±5.74	100
1	д1	3.8±0.86	61.60±16.01	80
1	д2	5.00±1.38	74.40±12.26	80
7	к	4.20±2.03	34.00±8.49	100
7	д1	2.60±1.69	95.80±15.51**	40**
7	д2	5.80±2.44	78.80±17,12*	60*
14	к	9.80±4.08	51.40±18.47	100
14	д1	0.40±0.24**	82.6±22.90	40**
14	д2	1.80±1.56*	46.80±18.45	80
30	к	6.60±4.85	16.20±2.85	100
30	д1	0.40±0.24*	77.80±25.84**	40**
30	д2	2.80±2.80	49.80±18.28*	80

Окрім того, вони виявляли часову динаміку: якщо у першому тестуванні, проведеному на початку періоду введення ХПФ, відмінностей між контрольною та дослідними групами виявлено практично не було, то з часом вони проявлялися яскравіше і ставали статистично достовірними.

Найбільш істотні відмінності між групами було виявлено за часткою вдалих спроб. У першому тестуванні, яке здійснювали перед початком інтоксикації тварин за допомогою ХПФ (1-ша доба експерименту) в обох дослідних групах вона становила 80%. У другому тестуванні (7-ма доба експерименту) успішність обох груп знизилася: до 60% у дослідній групі 2 (за  $p < 0.05$ ) та до 40% у дослідній групі 1 (за  $p < 0.01$ ). У третьому (14-та доба експерименту) та четвертому (30-та доба експерименту) тестуваннях результати групи 2 дещо покращилися (знову повернувшись до значення 80%), однак у першій групі вони залишилися на рівні 40%, що статистично достовірно нижче на контроль ( $p < 0.01$ ). При цьому у контрольній групі частка вдалих спроб у всіх тестуваннях становила 100%. Цікаво, що зменшення кількості тварин, здатних успішно пройти тест спостерігалось у обидвох дослідних групах на 7-му добу дослідження, а після того не змінювалося до завершення експерименту. Хоча відомо, що фосфорорганічні сполуки, в тому числі і ХПФ при хронічному впливі на організм можуть викликати ефект функціональної кумуляції. Те що ми такого ефекту на прикладі когнітивної поведінки дослідних щурів не спостерігали можна пояснити з одного боку, низькими дозами надходження в організм токсину внаслідок короткої експозиції при його дермальному введенні (3 хвилини на добу), а з другого тим, що інактивація більшості фосфорорганічних сполук в організмі проходить шляхом гідролізу або хімічної взаємодії з білками протягом доби.

Час, затрачений тваринами на знаходження виходу зі стресової ситуації, тобто час до підпірнання під край циліндра, у дослідних групах також відрізнявся від контрольних значень: інтоксиковані ХПФом тварини потребували більше часу, при цьому різниця також була дозозалежною та виявляла часову динаміку. Найбільш істотні відмінності спостерігалися у другому та четвертому тестуваннях, хоча загальна тенденція до зростання затраченого часу прослідковувалася в усіх періодах тестування. Так, у другому тестуванні щурам дослідної групи 1 знадобилося для виконання

завдання у середньому 95 секунд (статистично достовірна різниця за  $p < 0.01$ ), дослідної групи 2 – 78 секунд ( $p < 0.05$ ), у той час як контрольні щурі на пошук виходу затратили в середньому лише 34 секунди. Аналогічна ситуація спостерігалася і під час четвертого тестування: 78 секунд у першій дослідній групі ( $p < 0.01$ ) та 50 секунд у другій ( $p < 0.05$ ), при 16 секундах у контрольній групі. Загалом, як можна прослідкувати за отриманими даними, навчання тварин відбувалося у всіх групах, однак у контрольній групі воно було ефективнішим – час, затрачений на пошук виходу з циліндра, знижувався з кожним наступним тестуванням, демонструючи нормальну роботу механізмів довготривалої пам'яті інтактних тварин. В обох дослідних групах у другому тестуванні затрачений час, навпаки, зростає, що свідчить про накопичення дії токсиканта, яка ще не так яскраво проявилася у першому тестуванні. У подальших тестуваннях, а саме – на 14 і 30 доби експериментального періоду, час до пірнання у дослідних групах також дещо знижувався, тобто навчання все ж відбувалося. Однак, показники обох дослідних груп залишалися відмінними від контролю, тобто когнітивні функції інтоксикованих тварин зазнали порушення. Додаючи до цього згаданий вже параметр частки успішних спроб, можна прослідкувати чітку, статистично достовірну тенденцію до погіршення когнітивних функцій у тварин, які були інтоксиковані ХПФ шляхом проникнення його крізь шкіру. При цьому, за дії концентрованішого розчину порушення були значно більш вираженими, але й розбавлений у 50 разів токсикант викликав помітні та достовірні порушення.

За кількістю стрибків усередині циліндра статистично достовірна різниця обох дослідних груп від контролю спостерігалася у 3 тестуванні: до 1 стрибка у дослідній групі 1 ( $p < 0.01$ ) та до 2 у групі 2 ( $p < 0.05$ ), при цьому контрольні тварини у середньому здійснювали 9-10 стрибків. У 4 тестуванні різниця залишалася достовірною лише для першої дослідної групи ( $p < 0.05$ ), хоча значення другої групи також залишалися нижчими за контрольні. В інших тестах спостерігалася аналогічна тенденція (яка, однак, не сягала рівня

статистичної достовірності). У сумі з підвищенням часу, проведеного у циліндрі, та зниженням частки вдалих спроб, це свідчить про певну рухову загальмованість тварин, інтоксикованих ХПФом.

За допомогою проведених експериментів також було встановлено, що до завершення дослідного періоду порівняно з його початком відбулося зменшення кількості тварин, які зуміли за відведені для цього 120 секунд успішно здійснити реакцію екстраполяційного позбавлення шляхом пірнання на 50 % у групі Д1 і 20 % у групі Д2 відповідно (Рис. 3.6).

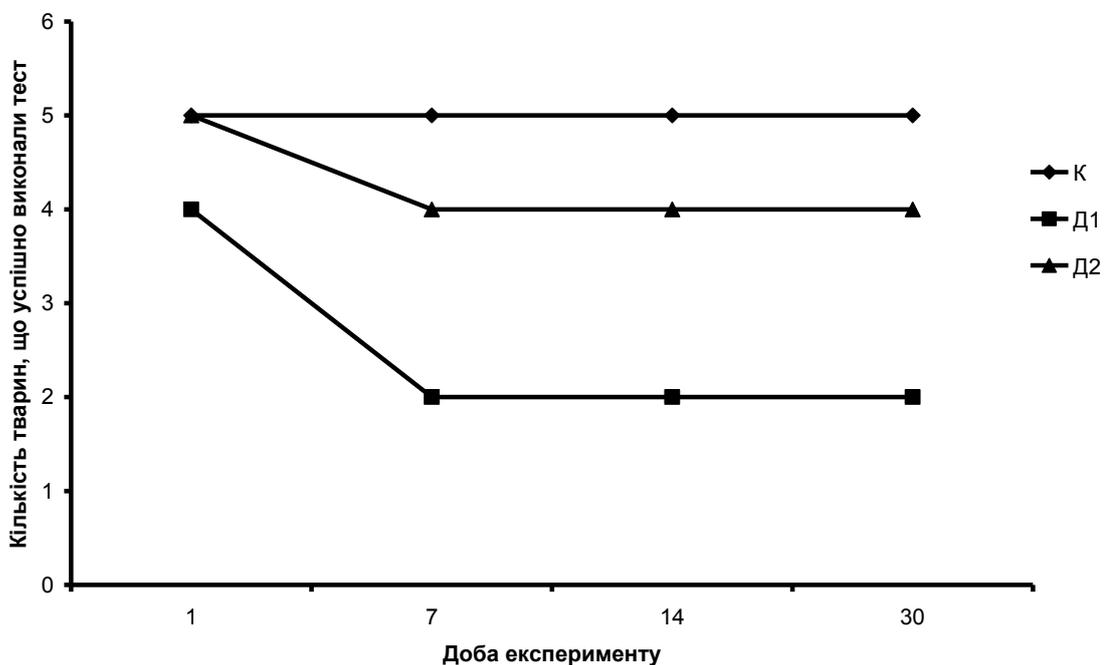


Рис. 3.6. Успішність виконання щурами тесту екстраполяційного позбавлення за умов впливу на них різних доз ХПФ протягом 30 днів при його дермальному введенні (для всіх груп:  $n=5$ ,  $P < 0,05$ ).

Тест «Темно-світла камера» дозволяє оцінювати рівень тривожності гризунів: що більша кількість виглядувань та виходів у світлу частину і сумарний час, проведений у ній, то нижчим вважається рівень тривожності досліджуваної тварини. І, навпаки, за дії анксиогенних факторів значення цих показників падає, і гризуни проводять більше часу у закритому темному відсіку, рідше виглядаючи та виходячи з нього.

За результатами чотирьох проведених тестувань істотних відмінностей між групами виявлено не було (табл.3.61). Це свідчить про те, що інтердермальне введення ХПФ не викликало істотних змін рівня тривожності як у сторону її зростання, так і в бік зниження.

Таблиця 3.61

Результати тесту «Темно-світла камера» за умов впливу на тварин ХПФ протягом 30 діб при його дермальному введенні (для всіх груп:  $n=5$ ,  $P < 0,05$ )

Доба тестування	Група тварин	К-сть переходів між частинами камери	К-сть виглядувань з нірки	Час, проведений твариною у світлій частині камери, с
1	к	2.40±0.40	6.20±1.39	34.80±4.93
	д1	1.60±0.24	5.00±1.22	49.40±7.40
	д2	1.80±0.49	5.40±1.29	48.20±3.22
7	к	2.00±0.45	5.00±0.89	24.2±5.89
	д1	2.40±0.60	6.60±1.12	25.80±4.27
	д2	1.60±0.40	5.80±1.11	18.00±5.03
14	к	3.60±0.87	6.60±0.92	35.80±5.59
	д1	1.80±0.58	6.60±1.44	35.80±11.67
	д2	2.00±0.45	7.80±1.74	20.80±7.28
30	к	2.60±1.17	4.60±0.60	15.40±3.57
	д1	1.60±0.40	4.80±0.80	29.80±7.75
	д2	1.80±0.49	6.00±1.26	20.40±2.11

У тесті «Відкрите поле» було виявлено ряд відмінностей у поведінці щурів, які були піддані трансдермальному впливові ХПФ, та контрольних інтактних тварин (табл. 3.62). Так, горизонтальна рухова активність у першому тестуванні (тобто на початку введення хімікату) у обох дослідних груп була вірогідно ( $p < 0,01$ ) нижчою за аналогічний показник контрольної групи. При цьому, значніші відмінності спостерігалися у дослідній групі 1. У подальшому (у другій та третій серії тестів) дана тенденція зберігалася, однак

ставала менш вірогідною. У четвертому тестуванні горизонтальна рухова активність тварин другої дослідної групи зросла і стала вищою за контрольну, однак ця тенденція не мала статистичної вірогідності. Виділяючи окремо периферичну та центральну горизонтальну активність, можна зазначити, що аналогічна закономірність спостерігалася і за цими показниками. Так, статистично достовірно найнижча периферична горизонтальна активність у перший день тестування спостерігалася у дослідній групі 1; у дослідній групі 2 вона була дещо вищою, однак все ж значно нижчою за контрольні показники. У подальших тестуваннях ця відмінність згладжувалася, а у дослідній групі 2 у четвертій серії тестів периферична рухова активність була вищою, ніж у контрольній групі, у той час як показники першої дослідної групи залишалися дещо нижчими. За показниками центральної горизонтальної активності виявлялася аналогічна тенденція: статистично достовірне зниження у першій дослідній групі у першому тестуванні та поступове зрівняння з контрольними показниками у четвертій серії тестів.

За вертикальною активністю відмінності також спостерігалися, однак були менш вираженими. Так, кількість стійок з опиранням на стінку (пристінкова вертикальна активність) у першій дослідній групі також була вірогідно ( $p < 0,05$ ) нижчою за контрольні показники у перший день тестування, а в подальшому ця різниця нівелювалася. За вільною вертикальною активністю (кількість стійок без опори, коли передні кінцівки тварини залишаються у повітрі) не було виявлено статистично вірогідних відмінностей, хоча загальна тенденція зберігалася і за цим показником. Відповідно, загальна вертикальна активність (як сума цих двох параметрів) у перший день тестування була найвищою в контролі, а найнижчою (щоправда, не досягаючи статистичної достовірності) – у першій дослідній групі. У наступних тестуваннях показники дослідних та контрольних тварин зрівнювалися.

Таблиця.3.62

Результати тесту «Відкрите поле» за умов дермального впливу на тварин ХПФ протягом 30 діб (n=5, P < 0,05)

Група тварин	Горизонтальна рухова активність			Вертикальна рухова активність			К-сть завмирань	Дослідження отворів	Грумінг		К-сть дефекацій	К-сть уринацій
	ГРА периф.	ГРА центр.	ГРА загальна	ВРА (передні лапи впираються в стінку)	ВРА (передні лапи в повітрі)	ВРА загальна			Короткий (1-2 рухи)	Довгий (більше)		
Проведення тестування на 1-шу добу експерименту												
К	38,8±4,65	8,2±1,09	47±4,47	16±1,22	10,4±5,59	28,4±7,43	3±1,22	0,6±0,54	0,8±0,83	1±0,70	2±2,54	1,4±1,14
Д1	18,6±2,7**	2,4±2,07**	21±3,08**	11,4±2,07*	3±1,87	14,4±3,64	4,2±1,64	0,2±0,44	2±1,58	1,2±0,83	3±0,70	1,6±0,89
Д2	26,6±2,79	5,4±2,96	32±5,47	12,2±0,83*	5,2±1,92	17,4±2,60	1,6±1,81	0,6±0,54	2,4±1,67	1±1,22	1,2±1,30	0,6±0,54
Проведення тестування на 7-му добу експерименту												
К	45,6±6,46	7±5,24	52,6±10,01	13,2±3,11	5,8±2,48	19±3,80	1,4±1,51	2,6±1,81	1,6±1,34	3,4±1,51	1±2,23	0,4±0,54
Д1	38±4,06	6,2±2,58	44,2±3,42	18±4,69	10,8±5,49	28,8±7,12	1,6±2,50	2±1,58	2,8±2,48	2±1,58	0	1±0,70
Д2	39,4±4,72	6,2±4,63	45,6±8,56	15,2±4,26	9±6,04	24,2±8,46	1±1,22	2±1,41	2,2±1,30	3,2±1,30	0,8±1,78	1±1
Проведення тестування на 14-ту добу експерименту												
К	40,2±3,8	6,8±1,92	47±3,87	12±2,12	10,6±7,43	22,6±7,66	2±2,34	3,8±4,08	0,4±0,89	2,2±1,09	0	0,4±0,54
Д1	30,6±11,01	6,6±4,21	37,2±14,82	11,4±10,64	7,6±4,09	19±14,10	3,6±2,07	1,6±3,04	3,2±1,30	2,2±1,92	0,4±0,89	0,4±0,54
Д2	34,2±7,6	5,4±1,67	39,6±7,05	12,2±1,92	5,6±2,88	17,8±4,60	2,6±2,88	2±1	3,8±2,94	2,8±1,30	1±2,23	0,6±0,89
Проведення тестування на 21-шу добу експерименту												
К	33,2±13,33	4,6±2,70	37,8±15,53	6,4±3,20	5,8±3,42	12,2±6,49	2,2±1,30	2±2	0,8±0,83	1,6±1,14	1,2±1,78	1,4±1,34
Д1	29,2±10,70	6±2,34	34,8±12,83	12,2±9,83	8,6±3,91	20,8±12,91	2,2±1,92	2,6±1,94	1,6±1,34	1,4±1,67	0,4±0,54	0,4±0,89
Д2	41,8±10,56	7,4±1,94	49,2±10,35	9,6±6,38	6,6±4,03	16,2±9,49	1,6±2,50	2,4±1,67	1,6±1,51	2±0,70	1,2±1,78	1,2±1,78

За кількістю завмирань вірогідних відмінностей між контрольними та дослідними тваринами виявлено не було. Кількість актів обнюхування отворів (нірковий рефлекс) у дослідних групах була дещо нижчою за контрольні показники (крім четвертого тестування), однак ця тенденція не була статистично достовірною. Кількість актів короткого грумінгу (2-3 рухи лапками навколо мордочки) у дослідних групах була вищою, ніж у контролі (на третій день тестування ця різниця виявилася статистично достовірною за  $p < 0,05$ ). Аналогічно до показників рухової активності, у четвертій серії тестів значення цього параметра наближалися до контрольних. За показниками довгого грумінгу (триваліше вмивання мордочки та тіла) достовірних відмінностей спостережено не було. Кількість актів дефекації та уринації у контрольних та дослідних групах також достовірно не відрізнялися як на початку тестування, так і в подальших серіях тестів. Як відомо, зниження рухової активності та підвищення кількості актів грумінгу (а також активізація уринації та дефекації, якої ми, однак, у даному досліді не спостерігали) свідчать про вищий рівень тривожності досліджуваних тварин.

### **Висновки**

Отримані результати у цьому розділі, загалом, підтверджують вплив ХПФ на організм шляхом індукування оксидативного стресу. Виявлені зміни досліджуваних показників свідчать про активну участь глутатіонової системи у процесах детоксикації організму при хронічному отруєнні ХПФ і одночасну активацію процесів ПОЛ. Хронічна дермальна інтоксикація щурів ХПФ протягом одного місяця мала інгібуючий вплив на АОС організму, що виражалось у змінах активностей її ключових ензимів – супероксиддисмутази і каталази. Зокрема, вставлено:

1. зниження активності ГП при хронічній ХПФ інтоксикації, яке найвідчутніше спостерігалось у тканинах печінки і нирок. Аналогічний, але менш виражений вплив інтоксикація досліджуваною ФОС проявляла на активність ГР. Вірогідне зниження вмісту відновленого глутатіону спостерігали лише у гомогенатах тканин печінки дослідних груп тварин. Стосовно продуктів ПОЛ – результати свідчать про їх вірогідне зростання у тканинах печінки, мозку, нирок та міокарда інтоксикованих ХПФ щурів;

2. зниження активності СОД у тканинах нирок, легень, міокарда, печінки і головного мозку обидвох дослідних груп, порівняно з контролем. Активність КАТ за таких самих експериментальних умов вірогідно зменшувалася у тканинах нирок, печінки і головного мозку і незначно зростала у селезінці і міокарді.

3. зниження активностей СОД і ГПО, зростання вмісту малонового диальдегіду гідропероксидів ліпідів у гемолізатах еритроцитів щурів;

4. гістоморфологічні дослідження тканин великих півкуль головного мозку, мозочка та печінки щурів під впливом низьких доз ХПФ при його хронічному надходженні в організм через шкіру, свідчать про відсутність суттєвих патологічних змін та пошкоджень;

5. хронічна дермальна інтоксикація щурів ХПФ протягом одного місяця спричиняла зростання рівня тривожності у тварин дослідних груп (порівняно з контролем) одразу після початку введення ХПФ. Зникнення істотних відмінностей між групами у подальших тестуваннях свідчить про адаптаційні процеси, якими організм гризунів відповідає на введення токсиканта. Вочевидь, захисні та адаптаційні механізми починають діяти з деякою затримкою, тому нейротоксична дія, що проявилася зростанням симптомів тривожності у першому тестуванні, з часом нівелювалася, внаслідок чого нормалізувалася й поведінка піддослідних тварин.

Результати даного підрозділу опубліковані у роботах [142, 144, 145, 156, 157, 165, 166, 170, 174, 400, 701, 702].

### **3.5 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**

У цій частині роботи ми поставили за мету прослідкувати біохімічні зміни у крові та тканинах різних органів щурів за гострої інтоксикації ХПФ впродовж першої години після введення їм ХПФ у дозі 50 мг/кг. Для цього

відбір дослідного матеріалу проводили через 15, 30, 45 та 60 хв. після введення в організм ХПФ.

Оскільки загальноприйнятим індикаторним показником ступеня інтоксикації ФОС і, зокрема ХПФ, є ензиматична активність ХЕ, було проведено визначення активності цього ензиму у сироватці крові на кожному з етапів експерименту. Як видно з табл. 3.63, у всіх 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 хвилин після отруєння мало місце різке, зниження активності БХЕ, яке мало практично лінійний характер. Проте вже через годину після початку експерименту активність досліджуваного ензиму вийшла із своїх мінімальних значень, які ми спостерігали на 45 хв, і зросла майже до рівня групи дослідженої на 15 хв. Тим не менше, навіть при такому зростанні у порівнянні з групами, дослідженими через 30 і 45 хв., активність холінестерази через 60 хв все ж залишалася більше ніж вдвічі нижчою, порівняно з групою інтактних тварин.

Таблиця 3.63

Активність БХЕ у сироватці крові щурів після введення їм ХПФ у дозі 50 мг/кг, ( $M \pm m$ ,  $n=5$ ).

Групи тварин	Період досліджень (хв. після введення ХПФ)			
	15	30	45	60
К	34,75±2,34	32,54±3,29	31,9±3,97	35,11±3,97
Д	19,1±3,53**	11,02±4,12***	6,1±2,18***	15,75±3,13**

У результаті проведених досліджень було встановлено, що активність лужної фосфатази у плазмі крові (табл. 3.64) щурів зростала приблизно у два

рази ( $P < 0,001$ ) у тварин дослідної групи порівняно до контролю через 15, 30 і 45 хв. після введення ХПФ.

Таблиця 3.64

Активність лужної фосфатази (Од/л) в плазмі крові щурів після введення їм ХПФ у дозі 50 мг/кг, ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )

Групи тварин	Період досліджень (хв. після введення ХПФ)			
	15	30	45	60
К	282,3±21,1	290,6±27,3	323,1±18,2	298,6±31,5
Д	487,2±30,1***	456,3±35,4*	471,2±26,5*	302,7±28,7

**3.5.1 Вплив гострої інтоксикації ХПФ у дозі 50 мг/кг на стан показників АОС у різних органах щурів.** При надмірному утворенні активних форм Оксигену активується робота антиоксидантної системи, яка направлена на попередження небажаних наслідків оксидативного стресу. Однією з найважливіших ланок антиоксидантної системи є ГР/ГПО система, яка використовує у якості субстрату глутатіон. Як показали результати наших досліджень (табл. 3.65), активність вищезгаданих ензимів у тканинах печінки на 15 хв після введення ХПФ змінювалась неоднаково. Зокрема, активність ГПО зростала більше як у 2 рази ( $P < 0,05$ ), в цей час активність ГР знижувалась на 90,7% ( $P < 0,05$ ) порівняно до контролю. На цьому фоні спостерігали вірогідне зниження ГВ на 43,3% ( $P < 0,05$ ) та ГТ активності на 34,4% ( $P < 0,05$ ) стосовно тварин контрольної групи. На 30-ту хв після ін'єкції ХПФ вміст ГВ залишався вірогідно нижчим на 38,5% ( $P < 0,001$ ), активність ГТ зростала майже у 2 рази ( $P < 0,05$ ).

Активність ГПО була вищою у тварин дослідної групи на 30 та 45-ту хв відповідно на 42,8 % ( $P < 0,05$ ) і 24 % ( $P < 0,05$ ) порівняно до контролю, але ці різниці не були такими великими як на 15-ту хв після використання ХПФ, коли активність ГПО зростала більше ніж удвічі ( $P < 0,05$ ).

Таблиця 3.65

Активність глутатіонзалежних ензимів у тканинах печінки щурів щурів після введення їм ХПФ у дозі 50 мг/кг, ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )

Період досліджень (хв. після введення ХПФ)	Групи тварин	Досліджувані показники			
		ГВ, (ммоль/л)	ГПО, (нмоль/хв·мг протеїну)	ГР (мкмоль NADPH/хв·мг протеїну)	ГТ, (мкмоль/хв·мг протеїну)
15	К	0,37±0,03	8,77±1,14	6,39± 0,91	0,32± 0,07
	Д	0,21±0,05*	20,11±2,09*	3,35± 0,75*	0,21±0,04*
30	К	0,39±0,03	8,56 ± 1,05	5,81± 0,54	0,35± 0,02
	Д	0,23±0,01***	12,23 ± 0,94*	5,56± 0,69	0,60± 0,05*
45	К	0,31±0,09	9,12 ± 0,57	5,24± 0,78	0,43± 0,07
	Д	0,30±0,13	11,31 ± 0,64*	4,95± 1,02	0,69± 0,06*
60	К	0,34±0,10	9,33±1,17	6,16 ±1,02	0,42± 0,04
	Д	0,29±0,06	9,51±0,78	5,82± 0,93	0,53± 0,05*

Слід зазначити вірогідне зростання активності ГТ на 45- та 60-ту хв після введення ХПФ відповідно на 60,5 % ( $P<0,05$ ) і 26,2 % ( $P<0,05$ ) порівняно до контролю. На 60-ту хв експерименту показники активності ГПО, ГР та ГВ була на одному рівні з цими ж показниками у контрольній групі.

Активність СОД (табл. 3.66) не зазнавала суттєвих змін протягом періоду досліджень. Хоча слід відзначити зниження цього показника на 45-ту та 60-ту хв експерименту на 84,8 % ( $P<0,001$ ) та 10,7 % ( $P<0,05$ ) відповідно. Активність КАТ була вищою у всі періоди досліджень, а саме на 15-ту хв – у 2,93 раза ( $P<0,001$ ), 30-ту хв – у 1,52 раза ( $P<0,05$ ), 45-ту хв – у 1,59 раза ( $P<0,01$ ) та 60-ту хв – у 2,25 раза ( $P<0,001$ ) порівняно до контролю.

Таблиця 3.66

Активність СОД і КАТ у тканинах печінки щурів після введення їм ХПФ у дозі 50 мг/кг, ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )

Період досліджень (хв. після введення ХПФ)	Групи тварин	Досліджувані показники	
		СОД, (ум.од./ мг протеїну)	КАТ, (мкмоль/хв·мг протеїну)
15	К	38,51 ± 2,63	3,64 ± 0,91
	Д	38,63 ± 1,25	10,67 ± 1,25***
30	К	35,32 ± 1,74	4,52 ± 0,75
	Д	29,60 ± 2,28	6,86 ± 0,46 *
45	К	34,33 ± 1,24	4,57 ± 0,49
	Д	18,57 ± 0,76***	7,30 ± 0,56**
60	К	35,05 ± 0,68	3,73 ± 0,22
	Д	31,29 ± 1,49*	8,40 ± 1,07***

Утворені під час первинного окиснення гідропероксиди жирних кислот це нестабільні сполуки, які зазнають вторинного окиснення з утворенням продуктів полімеризації або низькомолекулярних альдегідів та кетонів. Як показали результати (табл. 3.67) вміст ТБК-активних продуктів та ГПЛ на 15-ту хв після застосування ХПФ зростали відповідно на 34,9% ( $P < 0,01$ ) та 96,3 % ( $P < 0,001$ ) порівняно з тваринами контрольної групи. На 30-ту хв ці показники були на рівні з показниками тварин контрольної групи. А вже на 45-ту хв після введення ХПФ вони знову зростали відповідно на 53,8 % ( $P < 0,001$ ) та 81,4 % ( $P < 0,001$ ) порівняно до тварин контрольної групи.

Таблиця 3.67

Вміст ТБК-активних продуктів та гідропероксидів ліпідів у тканинах печінки щурів після введення їм ХПФ у дозі 50 мг/кг, ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )

Період досліджень (хв. після введення ХПФ)	Група тварин	Досліджуваний показник	
		ТБК-активні продукти, нМоль/мл	ГПЛ, $\Delta D^{480}/\text{мл}$
15	К	$4,58 \pm 0,37$	$0,83 \pm 0,04$
	Д	$6,18 \pm 0,26^{**}$	$1,63 \pm 0,09^{***}$
30	К	$5,62 \pm 0,41$	$0,72 \pm 0,10$
	Д	$5,16 \pm 0,46$	$0,84 \pm 0,14$
45	К	$5,31 \pm 0,48$	$0,86 \pm 0,05$
	Д	$8,17 \pm 0,33^{***}$	$1,56 \pm 0,03^{***}$
60	К	$5,11 \pm 0,25$	$0,88 \pm 0,03$
	Д	$4,43 \pm 0,71$	$0,91 \pm 0,09$

ГВ є основним фактором підтримання внутрішньоклітинного редокс-гомеостазу. Як видно з табл. 3.68 вміст цього трипептиду у тканинах селезінки не зазнавав змін протягом усього періоду досліджень.

Активність ГПО знижувалась на 15-ту хв після введення ХПФ майже у 3 рази ( $P < 0,001$ ) порівняно до контролю. Активність ГР, навпаки, зростала на 15-ту, 30-ту, 45-ту та 60-ту хв після введення ХПФ відповідно у 4,9 ( $P < 0,05$ ); 1,5 ( $P < 0,05$ ); 4,4 ( $P < 0,001$ ) та 1,4 ( $P < 0,05$ ) рази порівняно до тварин контрольної групи. Активність ГТ була вищою на 15-ту хв після введення ХПФ на 94,6 % ( $P < 0,001$ ) порівняно до контролю.

Таблиця 3.68

Активність глутатіонзалежних ензимів у тканинах селезінки щурів після введення їм ХПФ у дозі 50 мг/кг, ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )

Період досліджень (хв. після введення ХПФ)	Групи тварин	Досліджувані показники			
		ГВ, (ммоль/л)	ГПО, (нмоль/хв·мг протеїну)	ГР, (мкмоль NADPH/хв·мг протеїну)	ГТ, (мкмоль/х мг протеїну)
15	К	0,038±0,024	3,81±0,18	0,48 ± 0,02	0,37 ± 0,02
	Д	0,044±0,025	1,40±0,04***	2,36± 0,80*	0,72±0,05***
30	К	0,035±0,006	3,06 ±0,21	0,62± 0,05	0,33± 0,02
	Д	0,022±0,004	2,48±0,19	0,98± 0,13*	0,40± 0,11
45	К	0,034±0,003	3,25±0,15	0,66± 0,07	0,36± 0,09
	Д	0,035±0,011	3,37±0,28	2,95±0,17***	0,31± 0,04
60	К	0,037±0,009	2,87±0,13	0,65± 0,05	0,40± 0,05
	Д	0,039±0,028	2,12±0,32	0,91± 0,08*	0,41± 0,07

Активність СОД (табл.3.69) у тканинах селезінки знижувалась на 30-ту хв на 27,5 % ( $P<0,01$ ), 45-ту хв – у 3 рази ( $P<0,001$ ) та 60-ту хв – у 2,5 рази ( $P<0,001$ ) порівняно до тварин контрольної групи. Активність КАТ у селезінці не зазнавала змін.

Таблиця 3.69

Активність СОД і КАТ у тканинах селезінки щурів після введення їм ХПФ у дозі 50 мг/кг, ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )

Період досліджень (хв. після введення ХПФ)	Групи тварин	Досліджувані показники	
		СОД, (ум.од./ мг протеїну)	КАТ, (мкмоль/хв·мг протеїну)
15	К	12,40 ± 0,96	1,43 ± 0,23
	Д	13,00 ± 1,05	1,34 ± 0,34

## Продовження таблиці 3.69

30	К	$10,34 \pm 0,75$	$1,43 \pm 0,16$
	Д	$7,50 \pm 0,53^{**}$	$1,49 \pm 0,33$
45	К	$11,36 \pm 0,44$	$1,54 \pm 0,28$
	Д	$3,70 \pm 0,76^{***}$	$1,76 \pm 0,32$
60	К	$10,05 \pm 0,72$	$1,50 \pm 0,17$
	Д	$3,93 \pm 0,90^{***}$	$1,32 \pm 0,21$

Дослідження вмісту ТБК-активних продуктів та гідропероксидів ліпідів наведено у таблиці 3.70. Інтоксикація ХПФ приводила до зростання ТБК-активних продуктів на 60-ту хв експерименту – у 1,58 раза ( $P < 0,001$ ) та вмісту ГПЛ на 45-ту хв після введення ХПФ – у 1,77 раза ( $P < 0,001$ ) порівняно до контролю.

Таблиця 3.70

Вміст ТБК-активних продуктів та гідропероксидів ліпідів у тканинах селезінки щурів після введення їм ХПФ у дозі 50 мг/кг, ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )

Період досліджень (хв. після введення ХПФ)	Групи тварин	Досліджувані показники	
		ТБК-активні продукти, нМоль/мл	ГПЛ, $\Delta D^{480}$ /мл
15	К	$0,70 \pm 0,06$	$0,51 \pm 0,03$
	Д	$0,89 \pm 0,17$	$0,48 \pm 0,03$
30	К	$0,62 \pm 0,03$	$0,61 \pm 0,12$
	Д	$0,67 \pm 0,19$	$0,58 \pm 0,05$
45	К	$0,75 \pm 0,48$	$0,58 \pm 0,07$
	Д	$0,76 \pm 0,10$	$1,61 \pm 0,10^{***}$
60	К	$0,74 \pm 0,27$	$0,62 \pm 0,13$
	Д	$1,91 \pm 0,11^{***}$	$0,60 \pm 0,05$

Активність глутатіонзалежних ензимів у тканинах нирки представлена на таблиці 3.71. Слід звернути увагу на вірогідне зростання активності ГР – ензиму, який каталізує відновлення окисленого глутатіону внутрішньомітохондріальним NADPH і таким чином підтримує високі співвідношення відновленого та окисленого глутатіону.

Таблиця 3.71

Активність глутатіонзалежних ензимів у тканинах нирок щурів після введення їм ХПФ у дозі 50 мг/кг, ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )

Період досліджень (хв. після введення ХПФ)	Групи тварин	Досліджувані показники			
		ГВ, (ммоль/л)	ГПО, (нмоль/хв·мг протеїну)	ГР, (мкмоль NADPH/хв·мг протеїну)	ГТ, (мкмоль/хв·мг протеїну)
15	К	0,17±0,002	14,39±0,26	7,05 ± 0,49	0,25 ± 0,12
	Д	0,18±0,005	68,10±2,47***	12,47±0,82***	0,22±0,08
30	К	0,18±0,004	15,24 ± 0,89	8,18±0,16	0,23±0,04
	Д	0,19±0,008	73,28±1,49***	14,48± 0,39***	0,23±0,03
45	К	0,17±0,004	13,15±0,09	7,56±0,06	0,27±0,09
	Д	0,17±0,002	21,17±0,84***	10,39±0,57***	0,31±0,12
60	К	0,18±0,006	13,47±0,43	8,66±0,05	0,24±0,03
	Д	0,12±0,003***	12,10±0,59	13,22±0,18***	0,25±0,11

Як вказують результати досліджень, гостра інтоксикація організму щурів ХПФ у дозі 50 мг/кг, призводила до зростання активності ГР у тканинах нирок у всі досліджувані періоди, а саме: на 15-ту, 30-ту, 45-ту та 60-ту хв після введення ХПФ, відповідно на 76,8 %, 77 %, 60,9 % та 52,6 % ( $P<0,001$ ), порівняно до зразків аналогічних тканин щурів контрольної групи. Виявлено, що активність ГПО також зазнавала подібних змін, а саме: зростала на 15-ту хв – у 4,7 раза ( $P<0,001$ ), 30-ту хв. – у 4,8 раза ( $P<0,001$ ) та 45-ту хв. – у 1,61 раза ( $P<0,001$ ),

порівняно до тканин контрольної групи. Що стосується активності ГТ, то цей показник не зазнавав змін у ході експерименту.

Встановлено, що вміст ГВ у тканинах нирок дослідних тварин протягом перших 45 хвилин дослідження суттєво не відрізнявся від показників контрольної групи. На 60-ту хв вміст ГВ вірогідно знижувався на 33,4% ( $P < 0,01$ ) порівняно до контрольної групи тварин.

Встановлено, що активність СОД у тканинах нирок дослідної групи тварин (табл. 3.72) була вірогідно вищою на всіх етапах досліджень: на 15-ту, 30-ту 45-ту та 60-ту хв після введення ХПФ відповідно на 19% ( $P < 0,01$ ), 22,8% ( $P < 0,001$ ), 43,45% ( $P < 0,001$ ) та 51,5% ( $P < 0,001$ ) порівняно до контролю.

Таблиця 3.72

Активність СОД і КАТ у тканинах нирок щурів після введення їм ХПФ у дозі 50 мг/кг, ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )

Період досліджень (хв. після введення ХПФ)	Група тварин	Досліджуваний показник	
		СОД, (ум.од./ мг протеїну)	КАТ, (мкмоль/хв·мг протеїну)
15	К	21,98 ± 1,06	0,16 ± 0,001
	Д	26,17 ± 0,75**	0,15 ± 0,003**
30	К	23,74 ± 0,55	0,16 ± 0,007
	Д	29,17 ± 0,64***	0,17 ± 0,002
45	К	24,36 ± 0,68	0,17 ± 0,006
	Д	34,95 ± 1,16***	0,16 ± 0,003
60	К	22,34 ± 0,56	0,17 ± 0,005
	Д	33,85 ± 1,17***	0,17 ± 0,002

Каталазна активність у тканинах нирок знижувалась на 15-ту хв на 7 % ( $P < 0,01$ ) після введення ХПФ порівняно до контролю. В інші періоди досліджень цей показник не зазнавав змін.

Для оцінки інтенсивності ПОЛ найбільш часто використовують кількісне визначення ТБК-активних продуктів. Як показано на табл. 3.73, вміст ТБК-активних продуктів зростав у тканинах нирок тварин дослідної групи на 15-ту хв на 73,9% ( $P < 0,001$ ) за дії ХПФ порівняно до контрольної групи щурів. Також на 15-ту хв вірогідно зростав вміст гідропероксидів ліпідів – 2,1 рази ( $P < 0,001$ ). У подальші періоди досліджень суттєвих змін цих показників не спостерігали.

Таблиця 3.73

Вміст ТБК-активних продуктів та гідропероксидів ліпідів у тканинах нирок щурів після введення їм ХПФ у дозі 50 мг/кг, ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )

Період досліджень (хв. після введення ХПФ)	Група тварин	Досліджуваний показник	
		ТБК-активні продукти, нМоль/мл	ГПЛ, $\Delta D^{480}$ /мл
15	К	$2,11 \pm 0,10$	$0,91 \pm 0,07$
	Д	$3,67 \pm 0,24$ ***	$1,93 \pm 0,04$ ***
30	К	$2,32 \pm 0,06$	$1,02 \pm 0,06$
	Д	$2,71 \pm 0,11$	$1,10 \pm 0,35$
45	К	$2,35 \pm 0,08$	$1,05 \pm 0,08$
	Д	$2,86 \pm 0,18$	$1,14 \pm 0,07$
60	К	$2,24 \pm 0,07$	$0,94 \pm 0,03$
	Д	$2,13 \pm 0,09$	$0,96 \pm 0,10$

Важливу роль у формуванні резистентності організму до різноманітних шкідливих чинників відіграє система глутатіону. Згідно з даними, представленими табл. 3.74, у тварин, що отримували ХПФ

спостерігалася стимуляція ГВ-залежної антиоксидантної системи в перші хвилини після введення тваринам ХПФ. Це проявлялося не лише в підвищенні порівняно з контролем вмісту ГПО та посиленні глутатіонредуктазної активності, але й у збільшенні ГТ активності у тканинах міокарду, яке мало місце через 15 та 30 хв після введення тваринам ХПФ.

Слід зазначити, що активність ГПО у тканинах міокарду інтоксикованих щурів була вищою протягом усього періоду досліджень, а саме на 15 хв – у 2,76 раза ( $P<0,001$ ), на 30 хв – у 2,29 раза ( $P<0,001$ ), на 45 хв – у 1,98 раза ( $P<0,001$ ) та на 60 хв – у 1,79 раза ( $P<0,01$ ), порівняно до щурів контрольної групи.

Таблиця 3.74

Активність глутатіонзалежних ензимів у тканинах міокарду щурів за дії ХПФ ( $M\pm m$ ,  $n=10$ )

Період досліджень (хв. після введення ХПФ)	Групи тварин	Досліджувані показники			
		ГВ, ммоль/л	ГПО, нМоль/хв·мг протеїну	ГР, мкМольNADPH/хв·мг протеїну	ГТ, мкМоль/хв·мг протеїну
15	К	0,36±0,03	4,45±0,09	2,29 ± 0,12	0,34 ± 0,03
	Д	0,25±0,02**	11,90±0,56***	8,02±0,45***	1,15±0,12***
30	К	0,37±0,01	4,27 ±0,05	2,67± 0,09	0,42± 0,07
	Д	0,28±0,03*	9,80±0,26***	6,81±0,54***	0,88±0,05***
45	К	0,40±0,11	5,06±0,07	3,08± 0,34	0,38± 0,06
	Д	0,39±0,02	10,06±0,11***	3,79± 0,18	0,41± 0,14
60	К	0,39±0,05	4,57±0,08	2,68± 0,08	0,40± 0,11
	Д	0,22±0,03**	8,19±0,10**	1,85±0,11***	0,36± 0,05

Активність ГР змінювалась наступним чином: на 15-ту та 30-ту хв зростала у 3,58 ( $P<0,001$ ) та у 2,55 раза ( $P<0,001$ ) відповідно. На 45-ту хв

після введення ХПФ змін між контрольною та дослідною групами не спостерігали. На 60-ту хв активність ГР у тканинах міокарду знижувалась на 31 % ( $P < 0,001$ ) порівняно з контролем. Активність ГТ у міокарді зростала на 15-ту та 30-ту хв після введення ХПФ у 3,38 ( $P < 0,001$ ) та 2,09 ( $P < 0,001$ ) рази порівняно до щурів контрольної групи.

Вміст ГВ у тканинах міокарду знижувався на 15-ту та 30-ту хв після введення ХПФ на 30,6 % ( $P < 0,01$ ) та 27,4 % ( $P < 0,05$ ) відповідно, порівняно до контролю. Також спостерігали зниження рівня цього трипептиду на 60-ту хв дії ХПФ на 44 % ( $P < 0,001$ ) порівняно з контролем. Можна припустити, що зниження вмісту ГВ у тканинах свідчить про посилене споживання ГВ у реакціях детоксикації.

СОД є ключовим ензимом антирадикального захисту. Як показали результати досліджень (табл. 3.75), активність СОД зростала на 15-ту хв після введення тваринам ХПФ на 59,6 % ( $P < 0,001$ ). Причому активність КАТ не зазнавала змін.

Таблиця 3.75

Активність СОД і КАТ у тканинах міокарду після введення їм ХПФ у дозі 50 мг/кг, ( $M \pm m$ ,  $n=5$ ).

Період досліджень (хв. після введення ХПФ)	Групи тварин	Досліджувані показники	
		СОД, (ум.од./ мг протеїну)	КАТ, (мкмоль/хв·мг протеїну)
15	К	11,68 ± 0,34	3,37 ± 0,35
	Д	18,65 ± 0,51***	3,42 ± 0,31
30	К	13,45 ± 0,43	3,19 ± 0,23
	Д	15,17 ± 0,78	3,42 ± 0,29
45	К	15,39 ± 0,89	3,52 ± 0,09
	Д	17,63 ± 1,02	3,40 ± 0,73
60	К	14,38 ± 0,76	3,42 ± 0,56
	Д	16,21 ± 1,11	3,40 ± 0,35

Гідропероксиди ліпідів – це нестійкі речовини, які легко піддаються подальшим перетворенням з утворенням цілого ряду більш стійких вторинних продуктів окиснення: альдегідів, кетонів, ряду низькомолекулярних кислот (мурашиної, оцтової, масляної). Ці речовини є токсичними для клітини та призводять, наприклад, до порушення функціонування мембран та клітинного метаболізму в цілому.

Як видно з результатів досліджень, які представлені у таблиці 3.76, вміст ТБК-активних продуктів у тканинах міокарду дослідних щурів зростав на 15-ту та 45-ту хв після введення тваринам токсиканта, відповідно на 43,5 % ( $P < 0,001$ ) та 122,5 % ( $P < 0,001$ ), порівняно до контролю. У той же час, вміст ГПЛ вірогідно зростав у тканинах міокарду лише на 45-ту хв, і це збільшення становило 62,8 % ( $P < 0,01$ ), порівняно до контролю.

Таблиця 3.76

Вміст ТБК-активних продуктів та гідропероксидів ліпідів у тканинах міокарду щурів після введення їм ХПФ у дозі 50 мг/кг, ( $M \pm m$ ,  $n=5$ ).

Період досліджень (хв. після введення ХПФ)	Групи тварин	Досліджувані показники	
		ТБК-активні продукти, нМоль/мл	ГПЛ, $\Delta D^{480}$ /мл
15	К	1,63 $\pm$ 0,08	0,44 $\pm$ 0,09
	Д	2,34 $\pm$ 0,15***	0,46 $\pm$ 0,10
30	К	1,38 $\pm$ 0,26	0,39 $\pm$ 0,15
	Д	1,71 $\pm$ 0,21	0,31 $\pm$ 0,08
45	К	1,55 $\pm$ 0,07	0,35 $\pm$ 0,04
	Д	3,45 $\pm$ 0,24***	0,57 $\pm$ 0,05**
60	К	1,54 $\pm$ 0,13	0,37 $\pm$ 0,05
	Д	1,71 $\pm$ 0,36	0,33 $\pm$ 0,07

Активність ГР у тканинах скелетного м'язу (табл. 3.77) у тварин дослідної групи, якій вводили ХПФ була вірогідно нижчою на 30-ту, 45-ту та

60-ту хв, відповідно – у 1,83 ( $P<0,05$ ), 2,58 ( $P<0,001$ ) та 1,71 ( $P<0,001$ ) рази порівняно до контрольної групи тварин.

Як відомо – ГТ бере участь у знешкодженні великої кількості органічних сполук майже всіх класів, до яких належать і досліджувані нами інсектициди.

Було виявлено, що активність ГТ у тканинах скелетного м'яза інтоксикованих щурів була нижчою у всі періоди експерименту, а саме: на 15-ту хв – на 56,0 % ( $P<0,05$ ), 45-ту хв – на 43,2 % ( $P<0,01$ ), та 60-ту хв. – на 38,9 % ( $P<0,01$ ), порівняно до контрольної групи тварин. Вміст ГВ у тканинах скелетного м'язу вірогідно зростав на 30-ту хв на 73,3 % ( $P<0,01$ ). На 60-ту хв вміст цього три пептиду вірогідно знижувався на 41,4 % ( $P<0,01$ ) порівняно до тварин контрольної групи. В той же час вміст ГВ зростав на 30 хв експерименту на 73,3 % ( $P<0,01$ ), але на 60 хв цей показник змінював своє значення у протилежному напрямку – спадав на 41,37 % ( $P<0,01$ ).

Таблиця 3.77

Активність глутатіонзалежних ензимів у тканинах скелетного м'язу щурів після введення їм ХПФ у дозі 50 мг/кг, ( $M\pm m$ ,  $n=5$ ).

Період досліджень (хв. після введення ХПФ)	Групи тварин	Досліджувані показники			
		ГВ, ммоль/л	ГПО, нМоль/хв·мг протеїну	ГР, мкМольNAD РН/хв·мг протеїну	ГТ, мкМоль/хв·мг протеїну
15	К	0,26±0,17	0,24±0,09	3,77 ± 0,58	0,16 ± 0,04
	Д	0,24±0,05	0,22±0,07	3,48± 0,037	0,07± 0,01*
30	К	0,30±0,08	0,25 ±0,05	3,17± 0,16	0,18± 0,06
	Д	0,52±0,06*	0,23±0,06	1,73± 0,46*	0,15± 0,13
45	К	0,28±0,05	0,25±0,06	3,44± 0,27	0,16± 0,01
	Д	0,37±0,06	0,22±0,03	1,33± 0,14***	0,09± 0,02**
60	К	0,29±0,04	0,25±0,10	2,98± 0,22	0,18± 0,02
	Д	0,17±0,03*	0,24±0,03	1,74± 0,07***	0,11± 0,01**

Як показали результати (табл. 3.78) активність СОД зростала на 15-ту хв дії ХПФ – на 59,6 % ( $P < 0,001$ ) порівняно до контролю. Слід відмітити, що підвищена активність СОД зберігалась у тварин дослідної групи і на 30-, 45-, 60-ту хвилини після застосування фосфорорганічного пестициду ХПФ, але ці дані не були вірогідними. Водночас змін у активності каталази протягом всього періоду досліджень не спостерігали.

Таблиця 3.78

Активність СОД і КАТ у тканинах скелетного м'яза щурів після введення їм ХПФ у дозі 50 мг/кг, ( $M \pm m$ ,  $n=5$ ).

Період досліджень (хв. після введення ХПФ)	Групи тварин	Ензиматична активність	
		СОД, (ум.од./ мг протеїну)	КАТ, (мкмоль/хв·мг протеїну)
15	К	11,68 ± 0,34	3,37 ± 0,35
	Д	18,65 ± 0,51***	3,42 ± 0,31
30	К	13,45 ± 0,43	3,19 ± 0,23
	Д	15,17 ± 0,78	3,42 ± 0,29
45	К	15,39 ± 0,89	3,52 ± 0,09
	Д	17,63 ± 1,02	3,40 ± 0,73
60	К	14,38 ± 0,76	3,42 ± 0,56
	Д	16,21 ± 2,11	3,40 ± 0,35

Дослідження показали (табл. 3.79), що вміст ТБК-активних продуктів у тканинах скелетного м'яза інтоксикованих тварин дослідних груп вірогідно зростав на 45-ту та 60-ту хв після введення ХПФ, відповідно у 2,06 ( $P < 0,05$ ) та 1,59 ( $P < 0,05$ ) раза порівняно до тварин контрольної групи.

Що стосується вмісту гідропероксидів ліпідів, то суттєвих змін між тканинами контрольної і дослідної груп виявлено не було.

Таблиця 3.79

Вміст ТБК-активних продуктів та ГПЛ у тканинах скелетного м'яза щурів після введення їм ХПФ у дозі 50 мг/кг, ( $M \pm m$ ,  $n=5$ ).

Період досліджень (хв. після введення ХПФ)	Групи тварин	Досліджувані показники	
		ТБК-активні продукти, нМоль/мл	ГПЛ, $\Delta D^{480}$ /мл
15	К	$1,25 \pm 0,44$	$0,42 \pm 0,16$
	Д	$1,58 \pm 0,32$	$0,47 \pm 0,11$
30	К	$1,76 \pm 0,58$	$0,36 \pm 0,09$
	Д	$2,00 \pm 0,47$	$0,31 \pm 0,08$
45	К	$1,57 \pm 0,16$	$0,37 \pm 0,11$
	Д	$3,24 \pm 0,67^*$	$0,49 \pm 0,23$
60	К	$1,92 \pm 0,32$	$0,34 \pm 0,18$
	Д	$3,06 \pm 0,41^*$	$0,28 \pm 0,10$

Глутатіонова ланка антиоксидантної системи, яка діє головним чином за допомогою таких ензимів, як ГПО, ГР та ГТ перешкоджає накопиченню токсичних продуктів ПОЛ, відіграє важливу роль у детоксикації, деградації та виведенні з організму токсичних субстанцій.

Згідно з одержаними даними, які представлені у табл. 3.80, на 15 та 45-ту хв після введення щурам ХПФ, активність ГПО у тканинах легені дослідних тварин знижувалася: відповідно на 30,2 % ( $P < 0,001$ ) та 156 % ( $P < 0,001$ ) порівняно до контролю.

Активність ГР та ГТ навпаки зростала – на 30-ту хв досліді – у 2,26 ( $P < 0,001$ ) та 1,85 раза ( $P < 0,01$ ) порівняно з контролем.

Таблиця 3.80

Активність глутатіонзалежних ензимів у тканинах легені щурів після введення їм ХПФ у дозі 50 мг/кг, ( $M \pm m$ ,  $n=5$ ).

Період досліджень (хв. після введення ХПФ)	Група тварин	Досліджувані показники			
		ГВ, ммоль/л	ГПО, нМоль/хв·мг протеїну	ГР, мкМольNADP Н/хв·мг протеїну	ГТ, мкМоль/хв·мг протеїну
15	К	0,76±0,75	5,28±0,20	0,56 ± 0,23	0,33 ± 0,13
	Д	0,46±0,16	3,69±0,16***	0,41± 0,18	0,34± 0,09
30	К	0,75±0,38	5,21 ±0,62	0,68± 0,05	0,28± 0,05
	Д	0,59±0,32	4,74±0,53	1,54± 0,11***	0,52± 0,06**
45	К	0,75±0,45	4,88±0,04	0,66± 0,07	0,30± 0,08
	Д	0,67±0,08	1,90±0,29***	0,74± 0,44	0,21± 0,05
60	К	0,77±0,59	4,66±0,52	0,52± 0,05	0,35± 0,02
	Д	0,79±0,10	3,81±0,55	0,30± 0,08*	0,23± 0,03

Активність СОД (табл. 3.81) у тканинах легені зростала на 15-ту та 30-ту хв – відповідно у 4,03 ( $P<0,001$ ) та 3,06 рази ( $P<0,001$ ) порівняно з контролем. На 60-ту хв, навпаки, спостерігали зниження цього показника у 2,36 рази ( $P<0,001$ ).

Таблиця 3.81

Активність СОД і КАТ у тканинах легені щурів після введення їм ХПФ у дозі 50 мг/кг, ( $M \pm m$ ,  $n=5$ ).

Період досліджень (хв. після введення ХПФ)	Групи тварин	Досліджувані показники	
		СОД, (ум.од./ мг протеїну)	КАТ, (мкМоль/хв·мг протеїну)
15	К	1,12 ± 0,07	9,64 ± 0,77
	Д	4,52 ± 0,64***	9,95 ± 1,11
30	К	2,59 ± 0,48	8,67 ± 0,77
	Д	7,93 ± 0,87***	9,05 ± 0,82

Продовження таблиці 3.81

45	К	$2,67 \pm 0,27$	$9,12 \pm 0,56$
	Д	$3,08 \pm 0,48$	$10,25 \pm 1,33$
60	К	$2,81 \pm 0,34$	$8,41 \pm 0,74$
	Д	$1,19 \pm 0,18^{***}$	$9,36 \pm 1,03$

Результати досліджень показали (табл. 3.82) зростання вмісту ГПЛ на 30-ту та 45-ту хв експерименту на 90 % ( $P < 0,001$ ) та 105 % ( $P < 0,001$ ), порівняно до контролю. Вміст у тканинах легень щурів ТБК-активних продуктів не зазнавав достовірних змін.

Таблиця 3.82

Вміст ТБК-активних продуктів та гідропероксидів ліпідів у тканинах легені щурів після введення їм ХПФ у дозі 50 мг/кг, ( $M \pm m$ ,  $n=5$ ).

Період досліджень (хв. після введення ХПФ)	Групи тварин	Досліджувані показники	
		ТБК-активні продукти, нМоль/мл	ГПЛ, $\Delta D^{480}$ /мл
15	К	$0,50 \pm 0,17$	$0,35 \pm 0,03$
	Д	$0,54 \pm 0,10$	$0,44 \pm 0,09$
30	К	$0,52 \pm 0,21$	$0,30 \pm 0,04$
	Д	$0,47 \pm 0,05$	$0,57 \pm 0,05^{***}$
45	К	$0,58 \pm 0,08$	$0,39 \pm 0,07$
	Д	$0,61 \pm 0,06$	$0,80 \pm 0,04^{***}$
60	К	$0,53 \pm 0,12$	$0,40 \pm 0,05$
	Д	$0,62 \pm 0,07$	$0,48 \pm 0,11$

Встановлено зміни активностей енізимів антиоксидантного захисту впродовж першої години після інтоксикації ХПФ у різних відділах головного мозку щурів. Зокрема, у півкулях головного мозку (табл. 3.83) активність ГПО та ГР знижувалась на 60 хв після введення ХПФ у тварин дослідної групи, відповідно на 31,9 % ( $P < 0,001$ ) і на 48,2 % ( $P < 0,01$ ) порівняно до

контролю. Активність ГТ зростала на 15-ту хв на 82,9% ( $P<0,05$ ) та 30-ту хв на 67,3% ( $P<0,001$ ) експерименту. Вміст ГВ у корі великих півкуль на всіх етапах досліджень не змінювався.

Таблиця 3.83

Активність глутатіонзалежних ензимів у півкулях головного мозку щурів після введення їм ХПФ у дозі 50 мг/кг, ( $M\pm m$ ,  $n=5$ ).

Період досліджень (хв після введення ХПФ)	Групи тварин	Досліджувані показники			
		ГВ, ммоль/л	ГПО, нМоль/хв·мг протеїну	ГР, мкМольNADPH/хв·мг протеїну	ГТ, мкМоль/хв·мг протеїну
15	К	0,091±0,001	17,89±1,58	2,00 ± 0,17	0,41±0,11
	Д	0,090±0,002	20,97±1,35	2,10± 0,22	0,75±0,08*
30	К	0,094±0,003	18,29±1,24	2,21± 0,19	0,52±0,02
	Д	0,091±0,002	15,89±1,88	2,16± 0,06	0,87±0,06***
45	К	0,090±0,001	20,14±2,05	2,25± 0,31	0,46±0,03
	Д	0,091±0,004	22,34 ±1,73	2,34± 0,12	0,52± 0,05
60	К	0,091±0,003	20,71±1,41	2,82± 0,34	0,50± 0,04
	Д	0,092±0,001	14,09±0,55***	1,46± 0,17**	0,47± 0,03

Результати проведених досліджень показали, що активність СОД у тканинах кори великих півкуль головного мозку знижувалась у тварин дослідної групи на 31,4 % ( $P<0,001$ ) на 15 хв та на 36 % ( $P<0,05$ ) на 30 хв досліду (табл 3.84). На 60 хв спостерігали менш виражене зниження активності СОД, а саме – на 11,2 % ( $P<0,05$ ), порівняно до контрольних значень. Водночас, встановлено, що активність КАТ у тканинах кори великих півкуль головного мозку інтоксикованих ХПФ тварин знижувалась на 15 хв –

на 27 % ( $P < 0,05$ ) та на 60 хв – на 37,9 % ( $P < 0,01$ ), порівняно до тканин контрольної групи.

Однією з причин інгібування активності СОД може бути надмірне збільшення у клітинах концентрації синглетного Оксигену, Гідроген пероксиду, гідроксильних радикалів, гідропероксидів ліпідів. Тобто пригнічення активності даного ензиму сигналізує про інтенсифікацію утворення у тканинах головного мозку інтоксикованих за допомогою ХПФ щурів вільних радикалів, одночасного зниження рівня антиоксидантного захисту і, відтак – виникнення явища оксидативного стресу. У свою чергу, зменшення активності каталази свідчить про зниження реакції, що запобігає накопиченню Гідроген пероксиду, який утворюється під час дисмутації супероксидного аніона і за аеробного окиснення відновлених флавопротеїнів.

Таблиця 3.84

Активність СОД і КАТ у півкулях головного мозку щурів після введення їм ХПФ у дозі 50 мг/кг, ( $M \pm m$ ,  $n=5$ ).

Період досліджень (хв. після введення ХПФ)	Групи тварин	Ензиматична активність	
		СОД, (ум.од./ мг протеїну)	КАТ, (мкмоль/хв·мг протеїну)
15	К	7,40 ± 0,53	10,89 ± 0,72
	Д	5,08 ± 0,09 ***	7,95 ± 0,93*
30	К	8,12 ± 0,93	8,94 ± 0,87
	Д	5,21 ± 0,20*	8,64 ± 0,71
45	К	7,43 ± 0,87	10,53 ± 0,87
	Д	4,93 ± 0,87	9,88 ± 1,07
60	К	6,03 ± 0,21	10,47 ± 1,02
	Д	5,36 ± 0,15*	6,51 ± 0,29**

Як видно з результатів досліджень представлених у табл. 3.85, вміст ГПЛ та ТБК-активних продуктів на початкових етапах досліджень (15, 30-та

хв) у тканинах кори великих півкуль головного мозку тварин дослідної групи був майже на одному рівні з показниками контрольної групи. Але на 45-ту хв експерименту у зразках цих тканин дослідної групи вміст ГПЛ зростав на 79,3 % ( $P < 0,05$ ) порівняно до контролю. На 60-ту хв мало місце зростання цього показника на 77,8 % ( $P < 0,001$ ) а також одночасне зростання вмісту ТБК-активних продуктів на 86,3 % ( $P < 0,001$ ), порівняно з контролем.

Таблиця 3.85

Вміст ТБК-активних продуктів та гідропероксидів ліпідів у півкулях головного мозку щурів після введення їм ХПФ у дозі 50 мг/кг, ( $M \pm m$ ,  $n=5$ ).

Період досліджень (хв. після введення ХПФ)	Група тварин	Досліджуваний показник	
		ТБК-активні продукти, нМоль/мл	ГПЛ, $\Delta D^{480}$ /мл
15	К	$1,71 \pm 0,19$	$0,24 \pm 0,01$
	Д	$1,95 \pm 0,18$	$0,21 \pm 0,03$
30	К	$1,71 \pm 0,21$	$0,30 \pm 0,02$
	Д	$1,68 \pm 0,10$	$0,31 \pm 0,03$
45	К	$1,91 \pm 0,57$	$0,29 \pm 0,06$
	Д	$2,05 \pm 0,16$	$0,52 \pm 0,06^*$
60	К	$2,19 \pm 0,23$	$0,36 \pm 0,03$
	Д	$4,08 \pm 0,40^{***}$	$0,64 \pm 0,02^{***}$

Глутатионова система, як відомо, бере безпосередню участь у низці біохімічних механізмів детоксикації ліпофільних і гідрофільних ксенобіотиків. Дослідження показників глутатионової ланки антиоксидантної системи показали (табл. 3.86), що через 15 хв після введення дослідним тваринам ХПФ у тканинах мозочка дослідної групи відбувалося зростання вмісту ГВ на 100% ( $P < 0,001$ ), порівняно з контролем. Варто відзначити, що на 30-ту та 45-ту хв змін вмісту ГВ у тканинах мозочка, порівняно до

контролю не спостерігали, а на 60-ту хв вміст цього трипептиду навпаки знижувався на 33,3% ( $P < 0,001$ ).

Таблиця 3.86

Активність глутатіонзалежних ензимів у тканинах мозочка щурів після введення їм ХПФ у дозі 50 мг/кг, ( $M \pm m$ ,  $n=5$ ).

Період досліджень (хв. після введення ХПФ)	Групи тварин	Досліджувані показники			
		ГВ, ммоль/л	ГПО, нМоль/хв·мг протеїну	ГР, мкМоль/НА ДРН/хв·мг протеїну	ГТ, мкМоль/хв·мг протеїну
15	К	0,06±0,001	0,37±0,03	1,85 ± 0,22	0,33±0,05
	Д	0,12±0,001***	1,22±0,14***	1,72± 0,13	0,68±0,03***
30	К	0,07±0,003	0,45 ± 0,13	1,71± 0,09	0,41±0,04
	Д	0,07±0,001	0,81±0,07*	1,96± 0,18	0,37±0,18
45	К	0,06±0,003	0,50±0,09	1,88± 0,15	0,29±0,07
	Д	0,07±0,009	0,79±0,06*	2,00± 0,08	0,32±0,03
60	К	0,06±0,002	0,49±0,04	1,84± 0,17	0,30± 0,02
	Д	0,04±0,001***	0,80±0,08**	1,26± 0,13*	0,35± 0,04

Активність ГПО зростала більше ніж у 3 рази ( $P < 0,001$ ) на 15 хв після ін'єкції ХПФ. Ця тенденція спостерігалась протягом усього періоду дослідження, хоча надалі різниці між контрольною та дослідною групами були менш вагомими. Зокрема, активність ГПО зростала на 30-ту, 45-ту та 60-ту хв після застосування ХПФ, відповідно на 80 % ( $P < 0,05$ ), 58 % ( $P < 0,05$ ) та 63 % ( $P < 0,01$ ) порівняно до контролю.

Активність ГТ зростала у 2 рази ( $P < 0,001$ ) на 15 хв дослідження. Що стосується активності ГР – суттєвих змін протягом перших 45 хвилин не

спостерігали, але на 60-ту хв активність цього ензиму знижувалась на 31,6% ( $P < 0,05$ ).

Активність СОД у мозочку (табл.3.87) знижувалась на 45-ту хв після застосування ХПФ на 54,4 % ( $P < 0,01$ ) порівняно з контрольними показниками. У свою чергу, активність КАТ знижувалась на 15-ту, 30-ту та 45-ту хв після введення ХПФ відповідно на 32,7 % ( $P < 0,05$ ), 57,2 % ( $P < 0,01$ ) та 56,8 % ( $P < 0,01$ ), порівняно до контролю. На 60-ту хв показники активності КАТ у тварин контрольної та дослідної груп майже не відрізнялися.

Таблиця 3.87

Активність СОД і КАТ у мозочку щурів після введення їм ХПФ у дозі 50 мг/кг, ( $M \pm m$ ,  $n=5$ ).

Період досліджень (хв. після введення ХПФ)	Група тварин	Ензиматична активність	
		СОД, ум.од./ мг протеїну	Каталаза, мкМоль/хв·мг протеїну
15	К	13,59 ± 1,83	4,19 ± 0,43
	Д	18,18 ± 2,09	2,82 ± 0,31*
30	К	15,12 ± 0,73	5,04 ± 0,89
	Д	14,01 ± 0,86	2,16 ± 0,16**
45	К	13,59 ± 1,83	4,05 ± 0,67
	Д	6,21 ± 0,58**	1,75 ± 0,28**
60	К	12,23 ± 1,48	4,42 ± 0,77
	Д	13,63 ± 1,02	3,99 ± 0,39

Для оцінки інтенсивності ПОЛ часто використовують кількісне визначення ТБК-активних продуктів. Його підвищення є методом раннього виявлення метаболічних порушень в організмі.

Було встановлено (табл. 3.88), що вміст ТБК-активних продуктів у тканинах мозочка дослідних тварин на 15 хвилину після введення щурам

ХПФ зростав у 3 рази ( $P < 0,01$ ), порівняно до аналогічних тканин контрольної групи. Водночас виявлено вірогідне підвищення вмісту ГПЛ у тканинах мозочка на 15-ту та 30-ту хв експерименту відповідно – у 3 та 2 ( $P < 0,001$ ) рази, порівняно з контролем.

Таблиця 3.88

Вміст ТБК-активних продуктів та гідропероксидів ліпідів у мозочку щурів після введення їм ХПФ у дозі 50 мг/кг, ( $M \pm m$ ,  $n=5$ ).

Період досліджень (хв. після введення ХПФ)	Групи тварин	Досліджувані показники	
		ТБК-активні продукти, нМоль/мл	ГПЛ, $\Delta D^{480}$ /мл
15	К	$0,86 \pm 0,20$	$0,23 \pm 0,02$
	Д	$2,83 \pm 0,63^{**}$	$0,87 \pm 0,05^{***}$
30	К	$0,77 \pm 0,43$	$0,30 \pm 0,02$
	Д	$0,63 \pm 0,14$	$0,61 \pm 0,02^{***}$
45	К	$0,86 \pm 0,55$	$0,40 \pm 0,11$
	Д	$0,82 \pm 0,40$	$0,38 \pm 0,02$
60	К	$0,72 \pm 0,28$	$0,36 \pm 0,08$
	Д	$0,70 \pm 0,17$	$0,44 \pm 0,03$

Результати досліджень (табл. 3.89) показали, що вміст ГВ у тканинах гіпокампу на початку експерименту, тобто на 15-ту хв зростав у щурів дослідної групи на 60 % ( $P < 0,001$ ) порівняно з контролем, а на 45-ту хв після застосування ХПФ – на 83,3 % ( $P < 0,001$ ). Але вже на 60-ту хв спостерігали зниження вмісту цього показника у 2 рази ( $P < 0,001$ ).

Зміни активності ГПО носили аналогічний характер до змін ГВ. Зокрема, активність ГПО у тканинах гіпокампу вірогідно зростала на 15-ту та 45-ту хв експерименту у 1,95 ( $P < 0,05$ ) та 2,6 рази ( $P < 0,001$ ), відповідно. Активність ГР у тканинах тварин дослідної групи зростала на 15-ту та 30-ту хв після введення

ХПФ, відповідно на 55,5 % ( $P<0,001$ ) та на 47,2 % ( $P<0,01$ ), порівняно до контрольної групи тварин. На 60-ту хв – навпаки, активність цього ензиму вірогідно знижувалась на 34,15% ( $P<0,05$ ) стосовно тварин контрольної групи.

Таблиця 3.89

Активність глутатіонзалежних ензимів у гіпокампі щурів після введення їм ХПФ у дозі 50 мг/кг, ( $M\pm m$ ,  $n=5$ ).

Період досліджень (хв. після введення ХПФ)	Група тварин	Досліджуваний показник			
		ГВ, ммоль/л	ГПО, нМоль/хв·мг протеїну	ГР, мкМольNADPH/хв·мг протеїну	ГТ, мкМоль/хв·мг протеїну
15	К	0,05±0,003	1,73±0,13	1,53 ± 0,07	0,32± 0,01
	Д	0,08±0,001***	3,38±0,67*	2,38±0,14***	1,04±0,07***
30	К	0,06±0,004	1,53±0,64	1,61± 0,17	0,40± 0,09
	Д	0,07±0,003	1,24±0,45	2,37± 0,11**	0,95± 0,16*
45	К	0,06±0,001	2,74±0,43	1,75± 0,18	0,40± 0,06
	Д	0,11±0,006***	7,15±1,03***	2,04± 0,93	0,52± 0,05
60	К	0,06±0,003	2,64±0,53	2,02± 0,21	0,47± 0,05
	Д	0,03±0,001***	2,51±0,87	1,33± 0,15*	0,25±0,03**

Встановлено, що активність ГТ у тканинах гіпокампу змінювалась наступним чином: зростала – у 3,25 раза ( $P<0,001$ ) на 15-ту та – у 2,37 раза ( $P<0,01$ ) на 30-ту хв після введення ХПФ та вірогідно знижувалась на 46,9% ( $P<0,01$ ) на 60-ту хв експерименту.

Активність СОД у гіпокампі (табл. 3.90) тварин дослідної групи зростала на 55,7% ( $P<0,05$ ) на 15-ту хв після введення ХПФ, порівняно до аналогічного показника контрольної групи. Це зниження спостерігалось на фоні зростання каталазної активності у тварин дослідної групи більше ніж у 2 раза ( $P<0,05$ ). У подальші періоди досліду змін цих показників виявлено не було.