



УДК 577.15:612.017:632.95

ПОКАЗНИКИ АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ У ГОЛОВНОМУ МОЗКУ ЩУРІВ, ІНТОКСИКОВАНИХ ХЛОРПІРИФОСОМ

Ю. Т. Салига

*Інститут біології тварин НААН України, вул. В. Стуса, 38, Львів 79034, Україна
e-mail: yursalyha@yahoo.com*

Одними з найпоширеніших пестицидів у світі є препарати на основі хлорпірифосу – фосфорорганічної сполуки, що інгібує ензим ацетилхолінестеразу. Нейротоксичність хлорпірифосу не обмежується тільки антихолінестеразною дією, а може реалізовуватись і за допомогою інших механізмів, у тому числі через порушення прооксидантно-антиоксидантного балансу. Метою роботи було провести порівняльний аналіз ключових показників системи антиоксидантного захисту в різних відділах головного мозку щурів, інтоксикованих хлорпірифосом.

Експерименти проводили на дорослих щурах-самцях лінії Вістар масою від 200 до 220 г. Тваринам дослідних груп одноразово внутрішньоочеревинно вводили хлорпірифос із розрахунку 15 і 30 мг/кг. Через 24 год тварин декапітували під етерним наркозом, після чого одразу виділяли головний мозок та ізолювали з нього гіпокамп, мозочок і кору великих півкуль. У виділених відділах головного мозку визначали активності супероксиддисмутази, каталази, глутатіонпероксидази, глутатіонредуктази, а також вміст відновленого глутатіону.

Встановлено, що інтоксикація щурів хлорпірифосом викликає пригнічення ключових ензиматичних параметрів антиоксидантної системи у тканинах головного мозку. Виявлено, що різні відділи головного мозку відрізняються за рівнем антирадикального захисту. Найвищу інтенсивність антиоксидантних процесів спостерігали у корі великих півкуль головного мозку, найнижчу – у мозочку.

Ключові слова: хлорпірифос, мозок, супероксиддисмутаза, каталаза, глутатіонпероксидаза, глутатіонредуктаза, глутатіон відновлений.

ВСТУП

Хлорпірифос (О,О-диетил-О-3,5,6-трихлор-2-піридилфосфоротіоат, $C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$) належить до класу фосфорорганічних сполук (ФОС). Найбільше застосування він знайшов у ролі діючої речовини багатьох контактних інсектицидів широкого спектра дії [2]. Значний інтерес до вивчення хлорпірифосу (ХПФ) викликаний двома основними причинами. Перша з них зумовлена небезпекою, яку він може становити для здоров'я людини як один із найстійкіших і найтоксичніших ФОС. Зазначимо, що протягом останнього десятиліття вчені у багатьох країнах забили

на сполох: ХПФ і комерційні препарати на його основі викликають значно більше ризиків, ніж вважалося раніше [13, 15, 25, 27]. Зокрема, встановлено, що дія ХПФ на плід у материнській утробі та новонароджених мишенят спричиняє довготривале, практично незворотне порушення Т-лімфоцитарної відповіді [23]. Дослідження впливу мікродоз ХПФ, які вводили вагітним і годуючим самкам мишей, на здоров'я їхнього потомства виявило, що токсикант спричиняє довготермінову затримку когнітивного розвитку мишенят і підвищення їх тривожності [8]. Пренатальний вплив хлорпірифосу може викликати в організмі мишей порушення, аналогічні до тих, які спостерігаються при аутизмі [22]. Простежується ймовірність наявності зв'язку споживання мікродоз пестицидів у пре- та постнатальному періоді розвитку зі зростанням ризику виникнення аутизму у дітей [30]. На підставі статистичного дослідження впливу мікродоз пестицидів на розвиток хвороби Паркінсона [9] автори припускають, що на розвиток даної патології може впливати проникнення в організм мікродоз фосфорорганічних пестицидів, зокрема ХПФ, унаслідок обробки ними сільськогосподарських угідь і боротьби зі шкідниками у міських умовах.

Друга причина зацікавленості ХПФ лежить у фундаментальній науковій площині. Механізми дії цієї сполуки до кінця не розкриті, а твердження про те, що ХПФ чинить свій вплив шляхом інгібування холінестеразної активності, є далеко недостатнім, щоб за його допомогою можна було описати всі відомі на сьогодні ефекти, які можуть виникати за дії обговорюваного ксенобіотика. Зокрема, виявлено, що ХПФ впливає також на перебіг серотонінергічних процесів у центральній нервовій системі (ЦНС) [12]. Останні, як відомо, задіяні в реалізації складних інтегративних психічних функцій організму, у регуляції діяльності гладкої мускулатури та, відповідно, функцій серцево-судинної, травної й дихальної систем. Також існують повідомлення про те, що ХПФ може пошкоджувати MAP-2 (так званий протеїн, асоційований з мікротрубочками), що відіграє важливу роль у процесах нейрогенезу [10, 17].

Дедалі більшу увагу останнім часом у контексті механізмів токсичності ФОС і ХПФ зокрема приділяють дослідженням впливу цих сполук на антиоксидантний статус організму [21, 27, 29, 31]. Особливо тісно цей взаємозв'язок простежується стосовно мозку, який є особливо чутливим до окисного пошкодження, одною з причин чого є високе споживання ним кисню. Він метаболізується на внутрішній мембрані мітохондрій у серії АТФ-синтезуючих енергетичних реакцій. Водночас відбувається утворення активних форм Оксигену (АФО) і активних форм Нітрогену (АФН), які характеризуються високою реакційною здатністю [4]. Якщо рівновага між продукуванням АФО і АФН та системою антиоксидантного захисту порушується, то має місце явище оксидативного стресу, який є одним із факторів, що призводять до багатьох небезпечних патологій, у тому числі нейродегенеративних, зокрема таких, як аміотрофічний латеральний склероз, хвороби Паркінсона, Хантінгтона, Альцгеймера, пріонні захворювання, синдром Дауна, атаксія, розсіяний склероз, хвороба Крейцфельдта-Якоба, шизофренія та пізня дискінезія [14, 19]. За недостатньої потужності антиоксидантної системи організму надлишок АФО спричиняє різноманітні оксидативні пошкодження на клітинному та субклітинному рівнях. Зокрема, це можуть бути порушення функціонування мітохондрій – так звані мітохондріальні дисфункції, помилки білкового синтезу, зміни нейронального кальцієвого гомеостазу і механізмів синаптичної передачі. Окрім того, має місце нагромадження продуктів пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ), що негативно впливає на різноманітні ланки гомеостазу і також є однією з причин багатьох захворювань [1, 18, 28, 29, 31].

Отже, крім того, що вільнорадикальне окиснення є універсальним патофізіологічним явищем при багатьох патологічних станах, воно також є суттєвою складовою механізмів реакції організму на токсичну дію різноманітних ксенобіотиків, у тому числі ФОС і ХПФ зокрема. У зв'язку з цим виникає нагальна потреба пошуку високоефективних засобів антиоксидантної нейропротекції при нейродегенеративних станах і патологіях.

Супероксиддисмутаза (СОД), каталаза, глутатіонпероксидаза (ГПО), глутатіонредуктаза (ГР) – ключові антиоксидантні ензими, що забезпечують детоксикацію високореактивного Оксигену поряд з іншими низькомолекулярними знешкоджувачами, такими як відновлений глутатіон (GSH) [34]. Метою роботи було провести порівняльний аналіз вищезгаданих показників системи антиоксидантного захисту в різних відділах головного мозку щурів, інтоксикованих ХПФ.

Вибір для дослідження саме кори великих півкуль головного мозку, гіпокампа і мозочка перш за все був зумовлений тим, що саме перелічені відділи мозку є найвразливішими мішенями токсичної дії ФОС, і порушення їх функціонування призводить до небезпечних патологій. Крім того, загальновідомо, що у корі великих півкуль і гіпокампі переважають збуджуючі нейрони пірамідного типу й інтернейрони, а в мозочку більшість нервових клітин є інгібуючими. У свою чергу, є повідомлення про різну чутливість перелічених типів клітин і ділянок мозку до оксидативних процесів і, водночас, відмінності у потенціалі їх АОС [35].

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

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. Тваринам згодовували стандартний комбікорм для лабораторних щурів. Усі маніпуляції з тваринами проводили відповідно до Європейської конвенції “Про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних і наукових цілей” від 18.03.1986 р., Директиви ЄС №609 від 24.11.1986 р. і “Загальних етичних принципів експериментів на тваринах”, ухвалених Першим Національним конгресом з біоетики у Києві 2001 р. (протокол № 40 від 15.07.13 засідання комісії з біоетичної експертизи Інституту біології тварин НААН). Було сформовано три групи тварин (контрольну (К) і дві дослідні (Д1 і Д2) по 10 щурів у кожній. Тваринам дослідних груп одноразово внутрішньоочеревинно вводили хлорпірифос із 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 проводили евтаназію тварин 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 для контрольних груп тварин, то можливим виникненням артефактів нехтували. Одразу після декапітації, за допомогою малих хірургічних ножиць і пінцета розкривали черепну коробку, з якої швидко відбирали головний мозок, як описано у [32]. Одержаний мозок негайно переносили у чашку Петрі з охолодженням до 4°C препарувальним середовищем (MEM) такого складу: 95,5% розчин Хенка (Gibco), 1% пеніцилін-стрептоміцин (Gibco), 2,5% HEPES буфер (Gibco) і 1 М Трис-НCl (1%, Invitrogen, USA) [26]. Відразу розпочинали виділення досліджуваних ділянок мозку, ідентифікацію яких проводили згідно з анатомічними атласами

мозку щурів [24, 33] і як описано у [24, 32]. Спочатку відсікали мозочок, згодом виділяли гіпокамп і кору півкуль, як детально й ілюстративно описано у [32]. Усі згадані вище маніпуляції проводили на льодяній бані. Для подальших біохімічних досліджень відібрані тканини заморожували і зберігали в рідкому азоті.

Супероксиддисмутазу (СОД) (КФ 1.1.15.1.) активність визначали за методом Є.Є. Дубініної та ін. [3], який ґрунтується на відновленні супероксидним аніоном, що утворюється у реакції між феназинметасульфатом і NADPH, нітросинього тетразолію до нітроформазону. Активність СОД виражали в умовних одиницях на 1 мг протеїну тканини.

Каталазу (КФ 1.11.1.6) активність визначали за методом М.А. Королюк [5]. Реакцію запускали додаванням 2 мл Гідрогену пероксиду до 0,1 мл гомогенату тканини. Активність ензиму виражали в нмоль $\text{H}_2\text{O}_2/\text{хв}$ на 1 мг протеїну гомогенату тканини, використовуючи коефіцієнт молярного поглинання, який дорівнює $22,2 \times 10^3 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$.

Глутатіонпероксидазу (ГПО) (КФ 1.11.1.9) активність визначали за швидкістю окислення GSH до і після інкубації з гідропероксидом третинного бутилу. В основі розвитку кольорової реакції лежить взаємодія SH-груп з 5,5-дитіобіс-2-нітробензойною кислотою (ДТНБК), унаслідок чого утворюється забарвлений продукт – тіонітрофенільний аніон [6]. Кількість останнього прямо пропорційна кількості SH-груп, що прореагували з ДТНБК. Активність ензиму виражали в нмоль GSH/хв на 1 мг протеїну.

Глутатіонредуктазу (ГР) (КФ 1.6.4.2) активність визначали методом, описаним у [11]. Принцип методу базується на каталітичній NADPH-залежній реакції відновлення окисненої форми глутатіону, інтенсивність якої можна оцінити за швидкістю зниження екстинкції, за якої розчин NADPH має максимум світлопоглинання (340 нм). Розрахунок активності ГР здійснювали, використовуючи молярний коефіцієнт світлопоглинання для NADPH при довжині хвилі 340 нм ($\epsilon = 6200 \text{ М}^{-1} \text{ см}^{-1}$). Активність ензиму виражали в мкмоль NADPH/хв на 1 мг протеїну.

Концентрацію відновленого глутатіону (GSH) вимірювали до і після реакції колориметрично за методикою, описаною у [16]. В основі розвитку кольорової реакції лежить взаємодія SH-груп з ДТНБК. Розрахунок вмісту GSH проводили за калібрувальним графіком і виражали в ммоль/г тканини.

Концентрацію білка визначали за методом Лоурі [20].

Усі реактиви, які використовували у роботі, отримали від фірм Sigma-Aldrich та Fluka (США).

Експериментальні дані обробляли методами варіаційної статистики з використанням програми OriginPro 8. Для визначення вірогідних відмінностей між середніми значеннями двох вибірок використовували *t*-критерій Стьюдента для незалежних груп даних. У всіх випадках достовірними вважали відмінності між групами за умови значення ймовірності *P*, менше 5% ($P < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ І ЇХНЕ ОБГОВОРЕННЯ

СОД є ключовим ензимом антиоксидантної системи, що каталізує зворотну реакцію дисмутації супероксид-аніон радикалу до менш токсичного Гідроген пероксиду. Як видно на рис. 1, активність СОД була вірогідно нижчою у півкулях головного мозку тварин першої та другої дослідних груп у середньому відповідно на 27,2% ($P < 0,05$) та 31,4% ($P < 0,05$), порівняно з тканинами контрольних тварин.

Що стосується гіпокампу та мозочку, то в цих відділах головного мозку спостерігалась лише тенденція до зниження цього показника. Таким чином, отримані результати показують суттєві відмінності СОД активності у різних відділах мозку – найвищу в корі великих півкуль і найнижчу в 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, хлорпірифос викликає певні конформаційні зміни молекули СОД, внаслідок чого вона втрачає свою функціональність. Не виключено також, що зниження активності СОД може бути наслідком порушення експресії гена цього ензиму за умов оксидативного стресу.

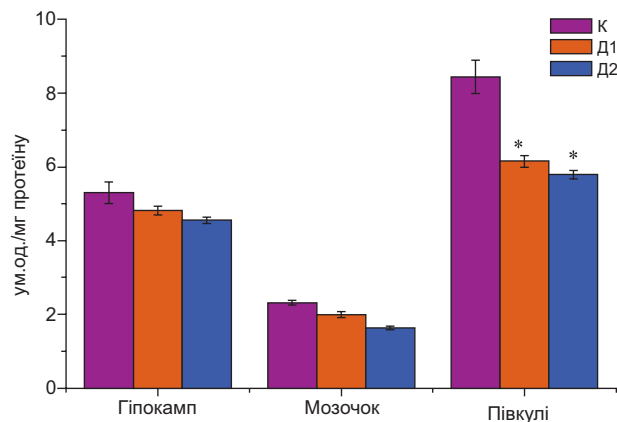


Рис. 1. Активність супероксиддисмутаз (СОД) у різних відділах мозку щурів у контролі та за дії хлорпірифосу * $P < 0,05$

Fig. 1. Superoxidedismutase (SOD) activity in different regions of rat brain in control conditions and under the action of chlorpyrifos * $P < 0.05$

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 [14]. На рис. 2 зображені зміни активності каталази за дії різних доз ХПФ. Необхідно відзначити вірогідне зниження активності цього ензиму в гіпокампі тварин першої та другої дослідних груп у середньому 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 з тваринами контрольної групи. Різностямовані зміни активностей СОД і каталази, які ми спостерігали, свідчать про розбалансованість процесів утворення й 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 [21]. 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.

Глутатіонова система, як відомо, бере безпосередню участь у низці біохімічних механізмів детоксикації ліпофільних і гідрофільних ксенобіотиків [21]. Отримані нами експериментальні дані показують (рис. 3) вірогідне зниження активності ГПО в середньому на 38,2% у гіпокампі, на 19,4% ($P < 0,05$) у мозочку і на 27,8% ($P < 0,05$) у корі півкуль головного мозку щурів другої дослідної групи, тобто за дії вищої дози ХПФ. Що стосується ГПО активності у гомогенатах досліджуваних ділянок мозку першої дослідної групи – то вона вірогідно зменшувалася в середньому на 21,9% ($P < 0,05$) лише у корі півкуль. Не виключено, що зниження ГПО активності після дії ХПФ зумовлене вичерпанням пулу GSH та накопиченням продуктів ліпопероксидації. Це припущення підтверджується даними, представленими далі (рис. 5), згідно з якими активність ГР – ензиму, відповідального за поповнення внутрішньоклітинного пулу GSH, також є нижчим у гомогенатах тканин мозку дослідних груп.

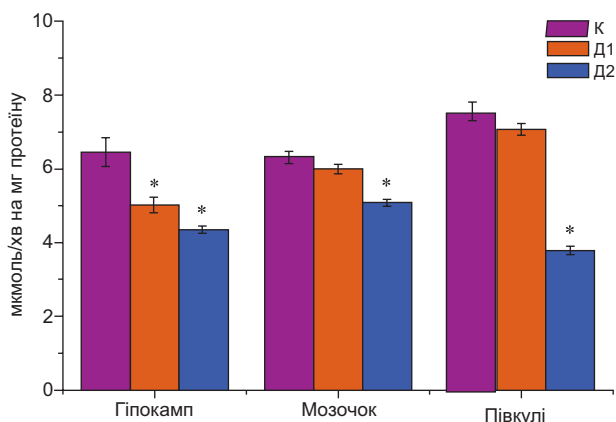


Рис. 2. Активність каталази у різних відділах мозку щурів у контролі та за дії хлорпірифосу * $P < 0,05$

Fig. 2. Catalase activity in different regions of rat brain in control conditions and under the action of chlorpyrifos * $P < 0.05$

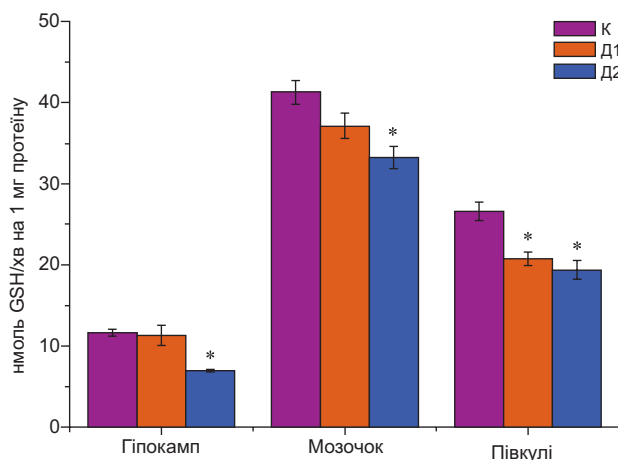


Рис. 3. Активність глутатіонпероксидази (ГПО) у різних відділах мозку щурів у контролі та за дії хлорпірифосу * $P < 0,05$

Fig. 3. Glutathione peroxidase (GPO) activity in different regions of rats brain in control conditions and under the action of chlorpyrifos * $P < 0.05$

Як відомо, зміна рівня GSH є чутливим маркером оксидативного стресу. З результатів наших досліджень (рис. 4) видно, що вміст GSH є вірогідно нижчим у тварин першої та другої дослідних груп у гіпокампі (відповідно в середньому на 24,06% ($P < 0,05$) та 36,71% ($P < 0,05$) та півкулях головного мозку (відповідно в середньому на 24,47% ($P < 0,05$) та 57,45% ($P < 0,05$)) порівняно з контролем. Це можна пояснити дією ХПФ, оскільки рівень GSH і швидкість його обміну можуть бути порушені внаслідок дії хімічних агентів і метаболічних інтермедіатів [21]. Також можна припустити, що дія ХПФ пригнічує синтез *de novo* GSH. Але в основному зниження вмісту GSH відбувається за рахунок невідновної втрати GSH при утворенні його кон'югатів з ХПФ у глутатіонтрансферазній реакції. Частково зниження GSH можна пояснити вірогідно нижчим рівнем ГР (рис. 5) у цих відділах мозку, адже відомо, що високий вміст GSH забезпечується регенерацією окисненого глутатіону під дією ензиму ГР. Активність цього ензиму може пригнічуватись у разі накопичення NADP, бо, як відомо, ГР є NADPH-залежним ферментом. Зниження активності ГР спричинене дією вільних радикалів, може сприяти активації мітохондріального шляху апоптозу. Як видно з результатів, найвідчутніших змін глутатіонредуктазна активність зазнавала у гомогенатах кори великих півкуль – знижувалася в обох дослідних групах у середньому на 23,6% ($P < 0,05$) і 38,2% ($P < 0,05$) відповідно. У мозочку змін активності цього ензиму ми не встановили, проте було виявлено вірогідне її зниження в середньому на 15% у гомогенатах гіпокампу щурів другої дослідної групи.

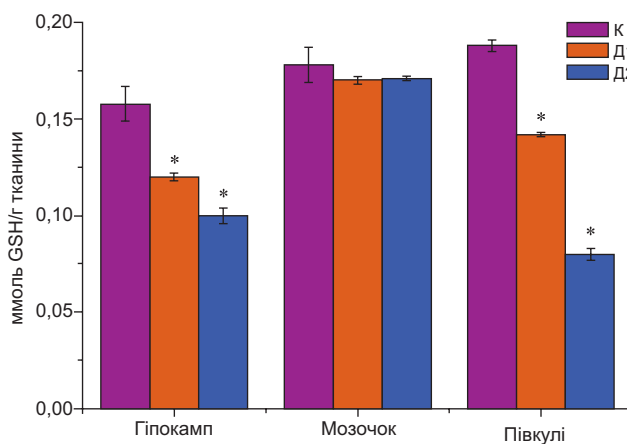


Рис. 4. Вміст відновленого глутатіону (GSH) у різних відділах мозку щурів у контролі та за дії хлорпірифосу * $P < 0,05$

Fig. 4. Glutathione (GSH) content in different regions of rat brain in control conditions and under the action of chlorpyrifos * $P < 0.05$

Обговорюючи отримані результати, зазначимо, що зміни параметрів антиоксидантної системи за дії ХПФ можуть бути пов'язані з цілою низкою біохімічних процесів, включаючи внутрішньоклітинні сигнальні явища, вплив на компоненти мітохондріального транспортного ланцюга, протеїни, ліпіди, ДНК, РНК. Усі ці та інші варіанти потребують значно глибших досліджень. В останні роки іде, зокрема, перегляд мітохондріальної теорії Д. Хармана про вільнорадикальний вплив на процеси організму [7]. Згідно з цією теорією, утворення ендогенних вільних радикалів

як продуктів мітохондріального метаболізму призводить до прогресуючих пошкоджень у клітинах різних систем і органів, які в результаті переростають у патології, в тому числі нейродегенеративні. Завдяки своїй високій метаболічній активності й водночас зниженій потужності клітинної регенерації порівняно з іншими органами, мозок є особливо чутливим до пошкоджуючої дії АФО. При різних нейродегенеративних захворюваннях (а етіологію останніх пов'язують усе частіше і з впливом фосфорорганічних сполук, у тому числі й ХПФ) встановлюють різні рівні пошкоджень, викликаних АФО у різних відділах головного мозку, які зазнають селективної нейродегенерації. Для прикладу, маркери ліпідної пероксидації, включаючи малоновий діальдегід, були виявлені у корі великих півкуль і гіпокампі людей із хворобою Альцгеймера, у чорній субстанції хворих на паркінсонізм і у спинномозковій рідині пацієнтів, які страждали на АЛС [7]. Тим не менше, аргумент про зростання оксидативного стресу все ж не доводить, що саме він спричиняє нейродегенеративні процеси, які мають місце при згаданих захворюваннях. У клітини розвинулися кілька захисних і відновлювальних механізмів від шкідливих впливів оксидативного стресу, який, як показано, може викликатися і дією хлорпірифосу. Серед цих механізмів важливим є в тому числі дослідження ензиматичного антиоксидантного захисту.

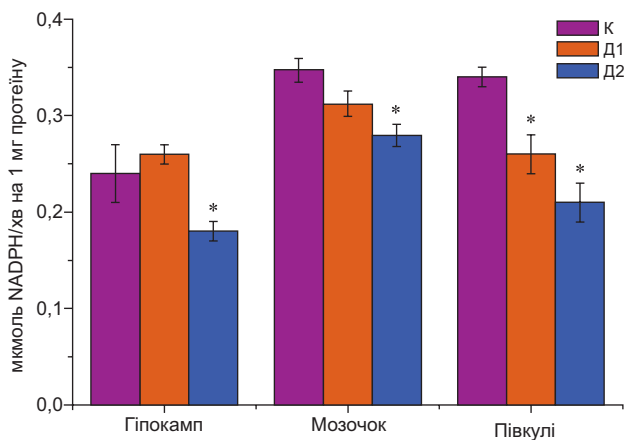


Рис. 5. Активність глутатіонредуктази (ГР) у різних відділах мозку щурів у контролі та за дії хлорпірифосу * $P < 0,05$

Fig. 5. Glutathione reductase activity in different regions of rat brain in control conditions and under the action of chlorpyrifos * $P < 0.05$

Аналізуючи відмінності антиоксидантних показників у різних відділах головного мозку тварин під впливом ХПФ, очевидно, відштовхуватися треба, в першу чергу, від морфофункціональних характеристик досліджуваних частин мозку, а також від особливостей організації та роботи у них нейрональних мереж. Слід наголосити, що у корі великих півкуль і гіпокампі переважають збуджуючі нейрони, які як нейротрансмітер вивільняють глутамат. На противагу цьому, в мозочку домінують роль відіграють два типи нервових клітин, а саме: клітини Пуркінє і гранулярні, або зернисті клітини. Клітини Пуркінє як гальмівний нейромедіатор вивільняють ГАМК. Важливо, що саме ГАМК-ергічні нейрони є особливо чутливі до оксидативного стресу. За останніми даними [35], існує припущення, що активні форми Оксигену сприяють, наприклад, сенсibilізації невропатій, призводячи до зменшення

кількості ГАМК-ергічних нейронів, а також перешкоджаючи функціонуванню самої ГАМК. Сказане вище також може бути одним із пояснень відмінностей у параметрах системи антиоксидантного захисту кори великих півкуль, гіпокампа і мозочка, які ми спостерігали.

ВИСНОВКИ

На основі виявлених змін досліджуваних показників отримані результати свідчать про те, що інтоксикація щурів хлорпірифосом викликає зміни ключових ензиматичних параметрів антиоксидантної системи у тканинах головного мозку. Через 24 год після одноразового внутрішньоочеревинного введення тваринам хлорпірифосу в дозах 15 і 30 мг/кг спостерігали пригнічення активностей супероксиддисмутази, каталази, глутатіонпероксидази, глутатіонредуктази та відновленого глутатіону в досліджуваних відділах мозку. Виявлено, що різні відділи головного мозку відрізняються за активністю антирадикального захисту. Найвищу інтенсивність антиоксидантних процесів спостерігали у великих півклях головного мозку, найнижчу – в мозочку.

1. *Афанасьев С.В., Лихолат О.А.* Регіональні особливості вільнорадикального окиснення ліпідів та антиоксидантної системи у хворих на хронічний панкреатит. **Медична хімія**, 2005; 7 (1): 47–50.
2. *Влізло В.В., Салига Ю.Т.* Проблеми біологічної безпеки застосування пестицидів в Україні. **Вісник аграрної науки**, 2011; 1: 24–27.
3. *Дубинина Е.Е., Сальникова Л.Я., Ефимова Л.Ф.* Активність и изоферментный спектр СОД эритроцитов. **Лаб. дело**, 1983; 10: 30–33.
4. *Коробов В.М.* Роль оксиду азота в регуляції транспорту газів. **Укр. біохім. журнал**, 2001; 73(4): 13–18.
5. *Королюк М.А. Иванова Л. И., Майорова Н.О., Токарев В.Е.* Метод определения активности каталазы. **Лаб. дело**, 1988; 1: 16–18.
6. *Моин В.М.* Простой и специфический метод определения активности глутатионпероксидазы в эритроцитах. **Лаб. дело**, 1986; 12: 724–727.
7. *Andersen J.K.* Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? **Nat. Rev. Neurosc**, 2004; 10: 18–25.
8. *Braquenier J.B., Quertemont E., Tirelli E., Plumier J.C.* Anxiety in adult female mice following perinatal exposure to chlorpyrifos. **Neurotoxicol Teratol**, 2010; 32(2): 234–239.
9. *Brown T.P., Rumsby P.C., Capleton A.C. et al.* Pesticides and Parkinson's Disease – Is There a Link? **Environ Health Perspect**, 2006; 114(2): 156–164.
10. *Cardona D., Lopez-Granero C., Canadas F. et al.* Dose-dependent regional brain acetylcholinesterase and acylpeptide hydrolase inhibition without cell death after chlorpyrifos administration. **J. Toxicol. Sci**, 2013; 38(2): 193–203.
11. *Carlberg I., Mannervik B.* Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. **J. Biol. Chem**, 1975; 250: 5475–5480.
12. *Chen W.Q., Yuan L., Xue R. et al.* Repeated exposure to chlorpyrifos alters the performance of adolescent male rats in animal models of depression and anxiety. **Neurotoxicology**, 2011; 32(4): 355–361.
13. *Flaskos J.* The developmental neurotoxicity of organophosphorus insecticides: A direct role for the oxon metabolites. **Toxicol. Lett**, 2012; 209(1): 86–93.
14. *Gandhi S., A. Y. Abramov.* Mechanism of Oxidative Stress in Neurodegeneration. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2012; 11 p.

15. Gupta R. C., Malik J. K., Milatovic D. Organophosphate and carbamate pesticides. **Reproductive and Developmental Toxicology**, 2011: 471–486.
16. Hissin P.J., Hilf R.A. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. **Analyt. Biochem**, 1976; 74: 214–226.
17. Ki Y.W., Park J.H., Lee J.E. et al. JNK and p38 MAPK regulate oxidative stress and the inflammatory response in chlorpyrifos-induced apoptosis. **Toxicol. Lett**, 2013; 26; 218(3): 235–245.
18. Kinouchi H., Kamii H., Mikawa S. et al. Role of superoxide dismutase in ischemic brain injury: a study using SOD-1 transgenic mice. **Cell Mol. Neurobiol**, 1998; 18(6): 609–620.
19. Kovacic P., Somanathan R. Redox processes in neurodegenerative disease involving reactive Oxygen species. **Current Neuropharmacology**, 2012; 1: 289–302.
20. Lowry O.H. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Biol. Chem**, 1951; 193(1): 265–275.
21. Lukaszewicz-Hussain A. Subchronic intoxication with chlorfenvinphos, an organophosphate insecticide, affects rat brain antioxidative enzymes and glutathione level. **Food and Chem. Tox**, 2008; 46(1): 82–86.
22. Mullen B.R., Khialeeva E., Hoffman D.B. et al. Decreased Reelin Expression and Organophosphate Pesticide Exposure Alters Mouse Behavior and Brain Morphology. **ASN Neuro**, 2013; 8.
23. Nakamura R., Kimura Y., Matsuoka H. et al. Effects of transplacental and trans-breast milk exposure to the organophosphate compound chlorpyrifos on the developing immune system of mice. **Kokuritsu Iyakuhiin Shokuhin Eisei Kenkyusho Hokoku**, 2011; (129): 105–10.
24. Palkovits M., Brownstem M.J. **Maps and guide to microdissection of the rat brain**. New York: Elsevier Academic Press, 1988; 223.
25. Rauh V., Arunajadai S., Horton M. et al. Seven-year neurodevelopmental scores and prenatal exposure to chlorpyrifos, a common agricultural pesticide. **Environ. Health Perspect**, 2011; 119(8): 1196–1201.
26. Ryan M.M., Morris G.P., Mockett B.G. et al. Time-dependent changes in gene expression induced by secreted amyloid precursor protein-alpha in the rat hippocampus. **BMC Genomics**, 2013; 14(1): 376.
27. Salyha Y. Biological effects assessment of chlorpyrifos and some aspects of its neurotoxicity. **Visnyk of Lviv University. Biology Series**, 2010; 54: 3–14.
28. Sandhu M. A., Saeed A. A., Khilji M. S. et al. Genotoxicity evaluation of chlorpyrifos: a gender related approach in regular toxicity testing. **J. Toxicol. Sci**, 2013; 38 (2): 237–244.
29. Saulsbury M. D., Heyliger S. O., Wang K. et al. Chlorpyrifos induces oxidative stress in oligodendrocyte progenitor cells. **Toxicology**, 2009; 259(1): 1–9.
30. Shelton J.F., Hertz-Picciotto I., Pessah I.N. Tipping the Balance of Autism Risk: Potential Mechanisms Linking Pesticides and Autism. **Environ. Health Perspect**, 2012; 120(7): 944–951.
31. Slotkin T.A., Seidler F. J. Oxidative and excitatory mechanisms of developmental neurotoxicity: transcriptional profiles for chlorpyrifos, diazinon, dieldrin, and divalent nickel in PC12 cells. **Environ. Health Perspect**, 2009; 117(4): 587–96.
32. Spijker S. Dissection of rodent brain regions. **Neuroproteomics**, 57; 2011: 13–26.
33. Swanson L.W. **Brain maps: structure of the rat brain**. 3rd revised edition. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2004: 215.
34. Yonar M.E., Yonar S.M., Ural M.S. et al. Protective role of propolis in chlorpyrifos-induced changes in the haematological parameters and the oxidative/antioxidative status of *Cyprinus carpio carpio*. **Food and Chem. Tox**, 2012; 50: 2703–2708.
35. Yowtak J., Wang J., Young K.H. et al. **Effect of antioxidant treatment on spinal GABA neurons in a neuropathic pain model in the mouse**. PAIN; 2013; DOI: 10.1016/j.pain.2013.07.024.

ANTIOXIDANT SYSTEM INDICES IN BRAIN OF RATS INTOXICATED BY CHLORPYRIFOS

Y. T. Salyha

Institute of Animal Biology, UAAS of Ukraine, 38, V. Stus St., Lviv 79034, Ukraine

e-mail: yursalyha@yahoo.com

Chlorpyrifos is one of the most common pesticides around the world. This organo-phosphorus compound inhibits of acetylcholinesterase activity. A toxicity of chlorpyrifos is not limited to inhibition of cholinesterase activity, but may act through other mechanisms, including breaking antioxidant-prooxidant balance. The goal of the study was to conduct a comparative analysis of key indicators of the antioxidant defense system in different brain regions of rats intoxicated with chlorpyrifos.

Wistar male rats were injected intraperitoneally once with chlorpyrifos in 15 and 30 mg/kg. After 24 hours, the animals were decapitated under ether anesthesia, after which the brain was removed immediately, and hippocampus, cerebellum and cerebral cortex were isolated. In selected areas of the brain activity of superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase and glutathione content were determined. It was found that intoxication of rats by chlorpyrifos caused a decreasing of key enzymatic parameters of antioxidant system in brain tissue. Different parts of brain characterised by different antiradical defense activity. The highest intensity of antioxidant processes was observed in the cerebral hemispheres of rat brain, while the lowest – in the cerebellum.

Keywords: chlorpyrifos, brain, superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase, glutathione reduced.

ПОКАЗАТЕЛИ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ КРЫС, ИНТОКСИЦИРОВАННЫХ ХЛОРПИРИФОСОМ

Ю. Т. Салыга

Институт биологии животных НААН Украины, ул. В. Стуса, 38, Львов 79034, Украина

e-mail: yursalyha@yahoo.com

Одними из самых распространенных пестицидов в мире являются препараты на основе хлорпирифоса. Это фосфорорганическое соединение, которое ингибирует активность ацетилхолинэстеразы. Токсичность хлорпирифоса не ограничивается только ингибированием холинэстеразы, но может также действовать с помощью других механизмов, в том числе путем нарушения прооксидантно-антиоксидантного баланса. Целью работы было провести сравнительный анализ ключевых показателей системы антиоксидантной защиты в различных отделах головного мозга крыс, интоксигированных хлорпирифосом.

Эксперименты проводились на крысах-самцах линии Вистар. Животным опытных групп однократно внутрибрюшинно вводили хлорпирифос из расчета 15 и 30 мг/кг. Через 24 ч животных декапитировали под эфирным наркозом, после чего сразу выделяли мозг и изолировали из него гиппокамп, мозжечек и кору больших полушарий. В выделенных отделах головного мозга определяли активности

супероксиддисмутазы, каталазы, глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы, а также содержание восстановленного глутатиона. Установлено, что интоксикация крыс хлорпирифосом вызывает угнетение ключевых ферментативных параметров антиоксидантной системы в тканях головного мозга. Обнаружено, что различные отделы головного мозга отличаются по активности антирадикальной защиты. Наивысшую интенсивность антиоксидантных процессов наблюдали в больших полушариях головного мозга, самую низкую – в мозжечке.

Ключевые слова: хлорпирифос, мозг, супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза, глутатион восстановленный.

Одержано: 12.07.2013