УДК 577.15:612.176:632.95

Ю. Т. Салига, Н. І. Талоха, О. М. Стефанишин, З. І. Сав'як, Г. Р. Будзан
ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ ТВАРИН НААН, ЛЬВІВ

ДЕЯКІ ПОКАЗНИКИ АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ В ЕРИТРОЦИТАХ ЩУРІВ ЗА УМОВ ХРОНІЧНОГО ВПЛИВУ ХЛОРПІРИФОСУ

Проведено дослідження впливу хлорпірифосу при його надходженні в організм щурів через шкіру на основні показники системи антиоксидантного захисту в еритроцитах. Встановлено, що за умов хронічної дії протягом одного місяця хлорпірифос викликає дозозалежні зміни цих показників у еритроцитах щурів, зокрема зростання продуктів перекисного окиснення ліпідів та зниження активності супероксиддисмутази та глутатіонпероксидази.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: **хлорпірифос, перекисне окиснення ліпідів, супероксиддисмутаза, каталаза, глутатіонпероксидаза, дієнові кон'югати, малоновий діальдегід.**

ВСТУП. Фосфорорганічні сполуки, зокрема ті, що входять до складу багатьох пестицидів, деяких засобів побутової хімії, використовуються у промисловості, при потраплянні в організм навіть у незначних концентраціях можуть бути дуже небезпечними для здоров'я людини. Однією з найтоксичніших фосфорорганічних речовин, яку широко застосовують в Україні, є хлорпірифос (*О,О-Діетил-О-3,5,6-трихлор-2-піридилфосфоротіоат,* $C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$). Він інгібітор ацетилхолінестерази, яка відіграє важливу роль у передачі нервового імпульсу. Встановлено, що хлорпірифос може негативно діяти на проліферацію, диференціацію нервових клітин, формування синапсів. Крім нейротоксичної дії, доведено також його шкідливий вплив на імунну та репродуктивну системи організму. Поряд із цим, останнім часом у науковій літературі з'явилось багато повідомлень про те, що отруєння організму хлорпірифосом може індукувати оксидативний стрес, який може бути одним із молекулярних механізмів токсичності [6–8]. Оксидативний стрес також вважають одним із важливих факторів нейродегенеративних захворювань, зокрема синдромів Паркінсона та Альцгеймера, бокового аміотрофічного склерозу, епілепсії, розсіяного склерозу.

Наші попередні дослідження [4, 5] підтвердили нейротоксичну дію хлорпірифосу і те, що отруєння ним спричиняє оксидативний стрес у клітинах різних відділів головного мозку щурів. Такі результати спонукають до ширшого вивчення впливу даного токсиканта на показники системи антиоксидантного захисту різних тканин організму, в тому числі крові. Маловивченими залишаються питання щодо відмінностей токсичної дії хлорпірифосу за різних шляхів його надходження в організм і тривалості впливу. У зв'язку з цим, метою даної роботи було провести порівняльний аналіз ключових показників системи антиоксидантного захисту в еритроцитах щурів, інтоксикованих хлорпірифосом шляхом його хронічного проникнення в організм через шкіру.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Дослідження проводили на білих лабораторних щурах лінії Вістар масою 120–180 г, яких утримували в умовах віварію на збалансованому раціоні з необмеженим доступом до питної води. Експерименти виконували відповідно до Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986). Було сформовано три групи (одну контрольну (К) і дві дослідні (Д)) тварин по 5 щурів у кожній. Протягом місяця тварин груп Д1 і Д2 щоденно піддавали дії хлорпірифосу шляхом занурення хвоста у розчин цієї речовини відповідної концентрації протягом 3 хв. У контрольній групі замість хлорпірифосу використовували дистильовану воду. Вихідним розчином хлорпірифосу слугував комерційний препарат "Дурс-

© Ю. Т. Салига, Н. І. Талоха, О. М. Стефанишин, З. І. Сав'як, Г. Р. Будзан, 2011.

бан" з концентрацією діючої речовини 480 г/л. Для експериментів препарат розводили у 5 (Д1) і 50 (Д2) разів.

Кров, отриману після декапітації тварин, збирали у пробірки з гепарином, відділяли плазму, а еритроцити тричі промивали 0,9 % NaCl, центрифугуючи суспензію клітин при 3000 g впродовж 10 хв. У гемолізатах, одержаних шляхом трикратного заморожування–розморожування водних суспензій еритроцитів, визначали активність каталази (КАТ), супероксиддисмутази (СОД), глутатіонпероксидази (ГП), а також вміст малонового діальдегіду (МДА) і дієнових кон'югатів.

Активність супероксиддисмутази (1.15.1.1) визначали за методом Є. Є. Дубініної та ін. [1], який ґрунтується на відновленні супероксидними аніонами нітросинього тетразолію до нітроформазону. Вимірювання інтенсивності поглинання світла продуктом відновлення проводили на спектрофотометрі при довжині хвилі 410 нм. Активність каталази (1.11.1.6) визначали за ступенем розкладу цим ферментом пероксиду водню і його здатністю утворювати із солями молібдату кольоровий комплекс з максимальним поглинанням світла при довжині хвилі 410 нм [3], активність глутатіонпероксидази (1.11.1.9) – за швидкістю окиснення глутатіону при наявності гідроперекису третинного бутилу, вміст малонового діальдегіду – за методом Е. М. Коробейникової [2], в основі якого лежить реакція між МДА і тіобарбітуровою кислотою (ТБК), яка при високій температурі й кислому середовищі перебігає з утворенням триметинового комплексу, що містить одну молекулу МДА і дві молекули ТБК. Концентрацію білка визначали за методом Лоурі.

Одержані результати обробляли статистично за допомогою комп'ютерної програми "OriginPro 8" з використанням t-критерію Стьюдента. Достовірними вважали результати при $p<0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. За нормального функціонування організму в тканинах підтримується динамічна рівновага між про- та антиоксидантною системами. Стабільний рівень активних форм кисню (АФК) забезпечується системою антиоксидантного захисту. Порушення метаболічної рівноваги в бік збільшення генерації АФК і зменшення активності ферментів цієї системи за дії токсичних чинників, зокрема інтоксикації організму хлорпірифосом, призводять до розвитку оксидативного стресу, що проявляється значною стимуляцією процесів пероксидації біомолекул та інгібуванням активності ферментів антиоксидантного захисту. Про активацію перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) в еритроцитах за дії хлорпірифосу свідчить значне підвищення вмісту проміжних та кінцевих продуктів ПОЛ. З метою оцінювання інтенсивності процесів ПОЛ найчастіше проводять кількісне визначення малонового діальдегіду. Результати проведених нами досліджень вказують на достовірне ($p<0,05$) зростання вмісту МДА та гідроперекисів ліпідів у гемолізатах еритроцитів щурів груп Д1 та Д2 (58 і 34 % відповідно) порівняно з контролем (рис. 1). Збільшення вмісту дієнових кон'югатів було менш вираженим і становило, відповідно, 25 і 17 % ($p<0,05$).

Асоціація металів змінної валентності з молекулами білків індукує каталізовану металом окисну модифікацію в тій частині поліпептиду, яка бере участь у його зв'язуванні. За таким механізмом здійснюється окисна модифікація низки ферментів, зокрема каталази, СОД, ацетилхолінестерази тощо, що містять в активному центрі іони металів змінної валентності. Існують припущення, що фосфорорганічні сполуки беруть участь у вищевказаному процесі, що може бути одним із важливих біохімічних механізмів ураження клітин за дії цих речовин.

Підвищення вмісту проміжних та кінцевих продуктів пероксидації біомолекул у тканинах тварин за дії хлорпірифосу безпосередньо свідчить про генерацію активних форм кисню під час розвитку оксидативного стресу і порушень ферментативної ланки у системі антиоксидантного захисту, зменшуючи її стійкість та буферну ємність. У механізмі регуляції вільнорадикальних та пероксидних процесів ключову роль відіграють такі ферменти, як СОД, КАТ і ГП. Найважливішим елементом системи антиоксидантного захисту організму є саме СОД – фермент, який складається з двох субодиниць із загальною молекулярною масою 32 кДа. СОД здійснює реакцію дисмутації супероксидних аніон-радикалів та перетворює їх на менш реакційноздатні молекули – H_2O_2. Тому відмінності в активності цього ферменту характеризують глибину тканинного ураження та порушення метаболізму, зумовлених оксидативним стресом. Одержані нами дані щодо активності СОД свідчать (рис. 2) про те, що посилення вільнорадикальних процесів супроводжується вірогідним зниженням активності ферменту в еритроцитах (на 48 % у тварин групи Д1 і на 30 % у щурів групи Д2). Аналогічні зміни ми спостерігали стосовно ГП еритроцитів – ферменту, який також є одним з основних показників антиоксидантного ста-

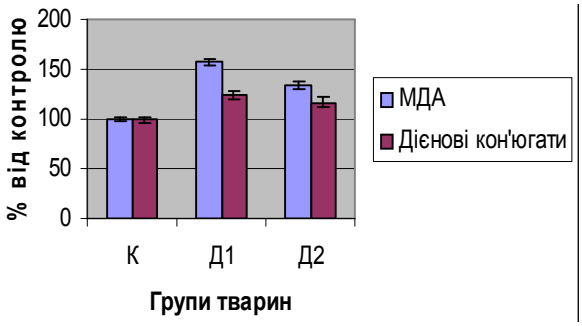

Рис. 1. Вплив різних доз хлорпірифосу на вміст продуктів ПОЛ в еритроцитах щурів.

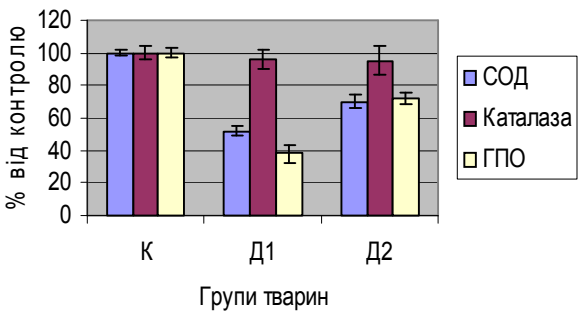

Рис. 2. Вплив різних доз хлорпірифосу на активність ферментів антиоксидантної системи в еритроцитах щурів.

тусу організму і виконує функцію інактивації перекису водню та пероксидних радикалів, захищаючи тим самим клітинні мембрани від дестабілізації (рис. 2). Разом із тим, активність каталази, що розщеплює пероксид водню, у наших дослідженнях не зазнавала достовірних змін (рис. 2).

ВИСНОВКИ. 1. Щоденний вплив на організм щурів хлорпірифосу протягом одного місяця за умов його проникнення через шкіру призводить до достовірного зниження активності супероксиддисмутази і глутатіонпероксидази, зростання вмісту малонового діальдегіду і гідроперекисів ліпідів у гемолізатах еритроцитів щурів.

2. Одержані результати загалом підтверджують індукування хлорпірифосом оксидативного стресу, під яким мається на увазі стан гомеостазу, при котрому збільшується кількість вільнорадикальних молекул і їх продуктів. З огляду на це, необхідні глибші дослідження впливу хлорпірифосу на антиоксидантний статус організму.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Дубинина Е. Е. Активность и изоферментный спектр СОД эритроцитов / Е. Е. Дубинина, Л. Я. Сальникова, Л. Ф. Ефимова // Лаб. дело. – 1983. – № 10. – С. 30–33.

2. Коробейникова Э. Н. Модификация определения ПОЛ в реакции с ТБК / Э. Н. Коробейникова // Лаб. дело. – 1989. – № 7. – С. 8–10.

3. Королюк М. А. Метод определения активности каталазы / М. А. Королюк // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С. 16–18.

4. Салига Ю. Т. Вплив хлорпірифосу на деякі показники антиоксидантної системи у різних відділах головного мозку щурів / Ю. Т. Салига // Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнології імені С. З. Гжицького. – 2010. –– **12**, № 2 (44), частина 2. – С. 260–263 (Серія "Біологічні науки").

5. Салига Ю. Т. Дослідження нейротоксичності хлорпірифосу у щурів за допомогою водного тесту Морріса та в умовах культури клітин гіпокампа / Ю. Т. Салига, О. В. Слипанюк // Фізіол. журн. – 2010. – **56**, № 2. – С. 49–50.

6. Cellular mechanisms for developmental toxicity of chlorpyrifos: targeting the adenylyl cyclase signaling cascade / X. Song, F. J. Seidler, J. L. Saleh [et al.] // Toxicol. Appl. Pharmacol. – 1997. – **145**. – P. 158–174.

7. Role of superoxide dismutase in ischemic brain injury: a study using SOD-1 transgensc mice / H. Kinouchi, H. Kamii, S. Mikawa [et al.] // Cell Mol. Neurobiol. – 1998. – **18**, № 6. – P. 609–620.

8. Slotkin T. A. Oxidative and excitatory mechanisms of developmental neurotoxicity: transcriptional profiles for chlorpyrifos, diazinon, dieldrin, and divalent nickel in PC12 cells / T. A. Slotkin, F. J. Seidler // Environ. Health Perspect. – 2009. – **117**(4). – P. 587–396.

Ю. Т. Салыга, Н. И. Талоха, О. Н. Стефанышин, З. И. Савьяк, Г. Р. Будзан
ІНСТИТУТ БИОЛОГИИ ЖИВОТНЫХ НААН, ЛЬВОВ

НЕКОТОРЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ В ЭРИТРОЦИТАХ КРЫС В УСЛОВИЯХ ХРОНИЧЕСКОГО ВЛИЯНИЯ ХЛОРПИРИФОСА

Резюме

Проведено исследование влияния хлорпирифоса при его поступлении в организм крыс через кожу на основные показатели системы антиоксидантной защиты в эритроцитах. Установлено, что в условиях хронического действия в течение одного месяца хлорпирифос вызывает дозозависимые изменения этих показателей в эритроцитах крыс, в частности рост продуктов перекисного окисления липидов и снижение активности супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: **хлорпирифос, перекисное окисление липидов, супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза, малоновый диальдегид**.

Yu. T. Salyha, N. I. Talokha, O. M. Stefanyshyn, Z. I. Savyak, H. R. Budzan
INSTITUTE OF ANIMAL BIOLOGY OF NAAS, LVIV

SOME PARAMETERS OF ANTIOXIDANT SYSTEM IN ERYTHROCYTES OF RATS UNDER THE CHRONIC INFLUENCE OF CHLORPYRIFOS

Summary

The influence of dermal application of chlorpyrifos on the key parameters of antioxidant system in erythrocytes of rats was studied. We found that daily chlorpyrifos intake by rats during one month causes dose-related changes in these parameters in erythrocytes of rats, in particular the growth of products of lipid peroxidation (LPO) and decrease in activity of superoxide dismutase and glutathione peroxidase.

KEY WORDS: **Chlorpyrifos, lipid peroxidation, superoxidedismutase, catalase, glutathione peroxidase, malonic dialdehid.**

Отримано 10.10.11

Адреса для листування: *Ю. Т. Салига, Інститут біології тварин НААН, вул. Стуса, 38, Львів, 79034, Україна.*