

ЕКСТРАПОЛЯЦІЙНА ПОВЕДІНКА ЩУРІВ ЗА ХРОНІЧНОГО ВПЛИВУ НА НИХ НИЗЬКИХ ДОЗ ХЛОРПІРИФОСУ

Ю. Т. Салига, Н. І. Талоха, О. М. Стефанишин

Інститут біології тварин НААН

У статті представлено результати дослідження впливу поширеного у використанні в агропромисловому секторі України фосфорорганічного інсектициду — хлорпірифосу (Дурсбану) при його надходженні в організм щурів через шкіру на їх поведінку в тесті екстраполяційного позбавлення. Встановлено, що за умов хронічної дії протягом одного місяця хлорпірифос викликав статистично достовірні негативні зміни у когнітивних функціях піддослідних лабораторних тварин. Одержані результати вказують на токсичну дію хлорпірифосу на центральну нервову систему навіть за низьких доз його надходження до організму, беручи до уваги той факт, що зміни у поведінці тварин можуть бути однією з перших ознак інтоксикацій.

Ключові слова: ХЛОРПІРИФОС, НЕЙРОТОКСИЧНІСТЬ, ЩУРИ ЛАБОРАТОРНІ, ТЕСТ ЕКСТРАПОЛЯЦІЙНОГО ПОЗБАВЛЕННЯ, КОГНІТИВНІ ФУНКЦІЇ, ЦЕНТРАЛЬНА НЕРВОВА СИСТЕМА

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 токсикології успішно застосовують цілий ряд різноманітних поведінкових тестів з метою з'ясування впливу токсикантів на центральну і периферичну нервову систему тварин і людини. Зміна певних форм поведінки лабораторних тварин при таких тестуваннях може свідчити про можливі порушення вищих регуляторних функцій організму. На основі аналізу результатів поведінкових тестів також можна зробити висновок про рівень тропності чинників токсичного ураження до певних систем чи органів, що є дуже важливим у токсикологічних дослідженнях [1–3].

Фосфорорганічні сполуки, зокрема хлорпірифос (*O,O*-Диетил-*O*-3,5,6-трихлор-2-піридилфосфоротіоат, $C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$) входять до складу великої кількості пестицидів, засобів побутової хімії, використовуються у промисловості. Останніми роками завдяки дослідженням науковців з багатьох країн світу було суттєво загострено увагу на вкрай небезпечних токсичних особливостях цієї речовини, яка може порушувати нормальне функціонування ключових органів та систем тварин і людини. Відомо, що хлорпірифос, який є інгібітором ацетилхолінестерази, може негативно діяти на проліферацію і диференціацію нервових клітин, формування синапсів, згубно впливає на імунну, репродуктивну та інші системи організму. Нашими попередніми дослідженнями як на експериментальних тваринах, так і на культурі нервових клітин [4–5] підтверджено нейротоксичну дію хлорпірифосу та те, що отруєння ним спричиняє біохімічні зміни у клітинах різних відділів головного мозку, а на рівні організму спостерігаються порушення функціонування центральної нервової системи. Недостатньо вивченими залишаються питання відмінностей токсичної дії даної фосфорорганічної сполуки за різних шляхів її надходження в організм і тривалості впливу.

У зв'язку з цим, метою роботи було встановити можливі порушення когнітивних функцій у щурів, інтоксикованих хлорпірифосом, шляхом його хронічного проникнення в організм через шкіру у низьких дозах.

Матеріали і методи

Дослідження проводили на білих лабораторних щурах лінії Вістар масою тіла 250–300 г, яких утримували у стандартних умовах віварію на збалансованому раціоні з необмеженим доступом до питної води. Експерименти проводили відповідно до Європейської конвенції «Про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних і наукових цілей» (Страсбург, 1986 р.). Було сформовано три групи (одну контрольну (К) і дві дослідні (Д1, Д2)) тварин по 5 щурів у кожній. Протягом місяця тваринам груп Д1 і Д2 щоденно в один і той самий час дермально аплікували хлорпірифос шляхом занурення їхнього хвоста у розчин цієї речовини відповідної концентрації на 3 хв. На час цієї процедури досліджуваних тварин поміщали у спеціальні плексигласові фіксатори, що дозволяло знерухомлювати їх та зручно маніпулювати. У якості вихідного розчину хлорпірифосу застосовували комерційний інсектицидний препарат «Дурсбан» (Україна) з концентрацією діючої речовини 480 г/л. Для експериментів препарат розводили у 5 (Д1) і 50 (Д2) разів. У контрольній групі замість хлорпірифосу використовували фізіологічний розчин.

Для вивчення когнітивної поведінки щурів застосовували тест екстраполяційного позбавлення [1, 6]. Пристрій для цього тесту представляє собою циліндр виготовлений з прозорого акрилового пластику або скла, який встановлюють у посудину циліндричної форми більшого діаметру і висоти для заповнення її водою (рис. 1). Спеціальне металеве кріплення утримує циліндр в центрі цієї ємності. У ході проведення тесту спостерігали за здатністю тварини, попередньо поміщеної у внутрішній циліндр знайти вихід із нього шляхом пірнання. Для проведення тестування установку наповнювали водою температурою 20–25 °С так, щоб внутрішній циліндр був занурений у воду на 2,5 см. У процесі тестування тварин контрольної і дослідних груп, яке проводили перед початком експерименту, а також на 7, 14 і 30-ту добу реєстрували кількість стрибків щурів у пристрої та час, який вони затратили для успішного звільнення із циліндра установки шляхом пірнання. Час тестування кожної тварини був обмежений двома хвилинами.

Одержані результати обробляли статистично з використанням *t*-критерію Стьюдента. Достовірними вважалися результати при $p < 0,05$.

Результати й обговорення

У сучасних токсикологічних та фізіологічних дослідженнях багатьох науковців все більшої популярності набирає поведінковий тест екстраполяційного позбавлення, розроблений російськими вченими [6]. Він дає можливість оцінити на експериментальних тваринах їх здатність розв'язувати раніше невідомі завдання у критичних ситуаціях. Тестування проводиться без попереднього навчання тварин і тому його результати можуть характеризувати рівень їх когнітивних функцій і адаптивно-приспосувальних реакцій. За допомогою цього тесту вдається спостерігати індивідуальні різновиди когнітивного стилю вирішення завдання (пошуку шляху позбавлення від стресової ситуації), становлення когнітивних функцій в процесі онтогенезу, вплив токсичних та фармакологічних речовин і препаратів на порушення нервових функцій і т.д. Беручи до уваги сказане вище, ми обрали саме тест екстраполяційного позбавлення для дослідження можливого впливу низьких доз хлорпірифосу при його дермальному надходженні в організм на функціонування центральної нервової системи.

Слід наголосити, що інтерес до вивчення дермального шляху проникнення досліджуваного токсиканту підсилюється тим фактом, що фосфорорганічні сполуки добре розчинні в жирах і ліпоїдах і тому добре проникають крізь шкіру. Відомо, що

таке проникнення речовин цієї групи візуальних ознак на шкірі не залишає, оскільки подразнення дермальних покривів не спричиняються. Це цілком підтверджено нашим дослідженням стосовно хлорпірифосу — жодних видимих ознак впливу щоденних аплікацій цього препарату протягом місяця на шкіру хвоста щурів не спостерігалось.

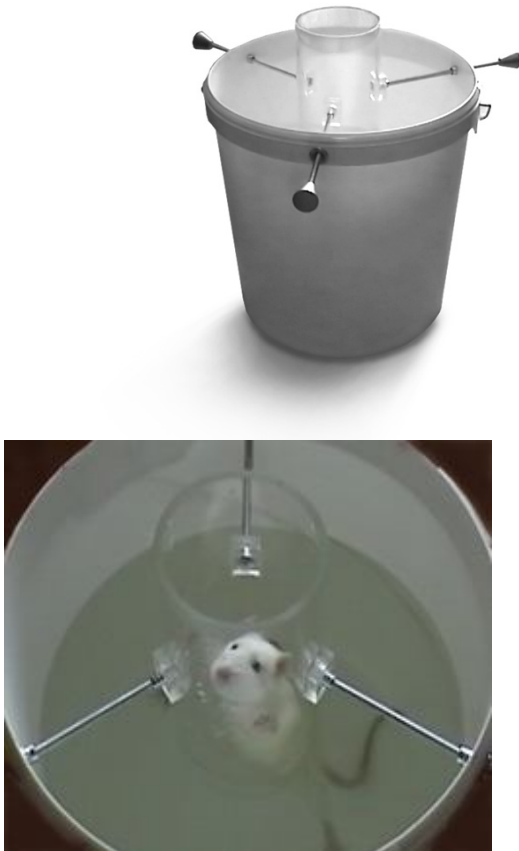


Рис. 1. Пристрій для проведення тесту екстраполяційного позбавлення

Що стосується безпосередньо когнітивних результатів тестування, то внаслідок проведених експериментів до завершення дослідного періоду було виявлено порівняно з його початком 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. 2).

Також до 30 доби було встановлено достовірне зменшення кількості стрибків тварин у циліндрі під час тесту у групах Д1 і Д2 на 90 % і 30 %, відповідно, порівняно з початком експерименту, що свідчить про зниження їх рухової активності під впливом хлорпірифосу. У щурів контрольної групи змін цього показника не було, їх рухова активність залишалася високою протягом всього дослідного періоду. Водночас, проаналізувавши тривалість латентного періоду до моменту пірнання, яке приводило до успішного виконання твариною екстраполяційного завдання, у всіх досліджуваних групах достовірних різниць встановити не вдалося через високу варіабельність даних. Але при цьому спостерігалася чітка тенденція до збільшення тривалості латентного періоду у групі Д1. Цікаво, що зменшення кількості тварин,

здатних успішно пройти тест спостерігалось у двох дослідних групах на 7-му добу дослідження, а після того не змінювалось до завершення експерименту. Хоча відомо, що фосфорорганічні сполуки, в тому числі і хлорпірифос, 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 хв на добу), а з іншого тим, що інактивація більшості фосфорорганічних сполук в організмі проходить шляхом гідролізу або хімічної взаємодії з білками протягом доби.

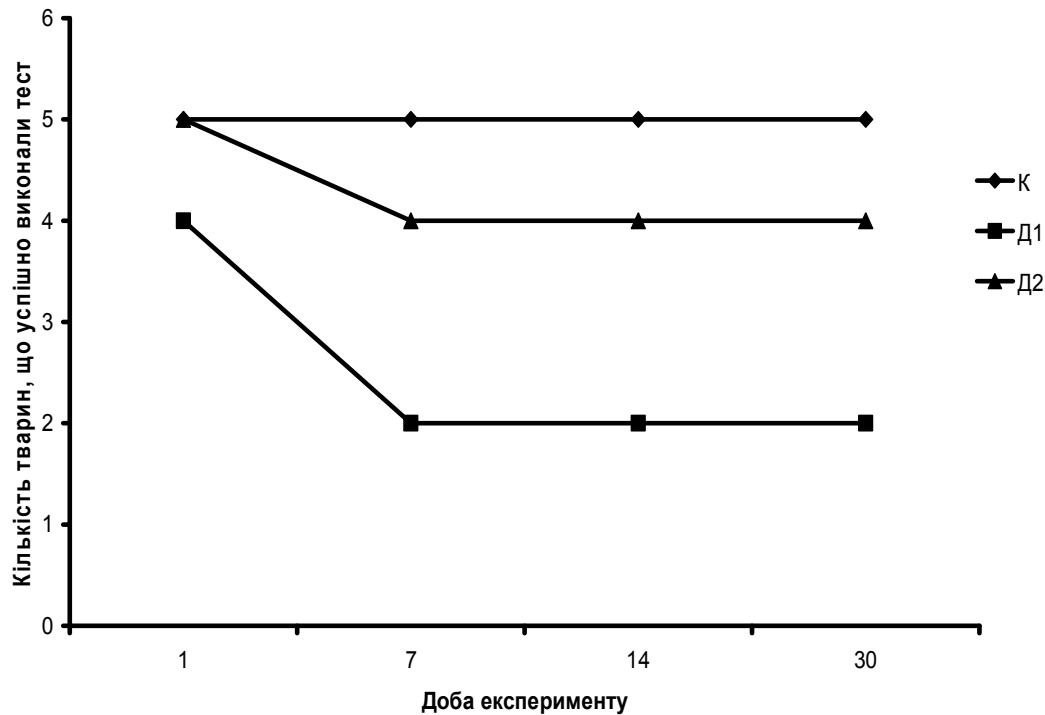


Рис. 2. Виконання тваринами тесту екстраполяційного позбавлення за умов впливу на них різних доз хлорпірифосу протягом 30 днів при його дермальному введенні (для всіх груп: $n=5$, $p < 0,05$).

Висновки

Отже, отримані нами дані підтверджують токсичний вплив хлорпірифосу на центральну нервову систему тварин навіть за дуже низьких доз надходження цієї сполуки до організму. Щоденний вплив на організм щурів хлорпірифосу протягом одного місяця за умов його проникнення через шкіру призводить до достовірного порушення їх когнітивних функцій. Одержані результати мають доповнити наукове обґрунтування повної і найшвидшої заборони в Україні препаратів на основі хлорпірифосу.

Перспективи подальших досліджень. Враховуючи той факт, що холінергічна іннервація у центральній нервовій системі ссавців відіграє одну з найважливіших ролей у здійсненні різних форм поведінки, зокрема когнітивних [7], а хлорпірифос є сильним інгібітором ацетилхолінестерази, перспективними видаються подальші глибші дослідження впливу цього токсиканту як на фізіологічні, так і біохімічні

показники організму. Також майбутні зусилля мають бути спрямовані на розробку способів детоксикації організму, ураженого хлорпірифосом.

Y. T. Salyha, N. I. Talokha, O. M. Stefanyshyn

EXTRAPOLATION BEHAVIOR OF RATS UNDER THE CHRONIC EXPOSURE TO LOW DOSES OF CHLORPYRIFOS

S u m m a r y

The paper presents results of research concerning the influence of dermal application of the widespread in agriculture of Ukraine organophosphorus insecticide — chlorpyrifos (Dursban) on their behavior with the help of extrapolation escape task. We found that under the chronic conditions within one month chlorpyrifos caused statistically significant negative changes in cognitive functions of experimental laboratory animals. The obtained results indicate toxic effects of the chlorpyrifos on the central nervous system even at low doses taking into account the fact that changes in the behavior of animals may be one of the first signs of poisoning.

Ю. Т. Салыга, Н. И. Талоха, О. М. Стефанышин

ЭКСТРАПОЛЯЦИОННОЕ ПОВЕДЕНИЕ КРЫС ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ВЛИЯНИИ НА НИХ НИЗКИХ ДОЗ ХЛОРПИРИФОСА

А н н о т а ц и я

В статье представлены результаты исследования влияния распространенного в использовании в агропромышленном секторе Украины фосфорорганического инсектицида — хлорпирифоса (Дурсбана) при его поступлении в организм крыс через кожу на их поведение в тесте экстраполяционного избавления. Установлено, что в условиях хронического действия в течение одного месяца хлорпирифос вызвал статистически достоверные отрицательные изменения в когнитивных функциях подопытных лабораторных животных. Полученные результаты указывают на токсическое действие хлорпирифоса на ЦНС даже при низких дозах его поступления в организм, принимая во внимание тот факт, что изменения в поведении животных могут быть одним из первых признаков интоксикации.

1. *Бондаренко Н. А.* Избирательное влияние нейролептиков на дофаминзависимое нарушение поведения крыс в тесте экстраполяционного избавления / Н. А. Бондаренко, И. И. Мирошниченко, В. С. Кудрин и др. // Бюлл. эксперим. биол. и медицины. — 1990. — № 11. — С. 506–508.
2. *Deacon R. M. J.* Appetitive position discrimination in the T-maze / R. M. J. Deacon // Nat. Protocols. — 2006. — V. 1. — P. 13–15.
3. *Whishaw I. Q.* Of mice and mazes: Similarities between mice and rats on dry land but not water mazes / I. Q. Whishaw, J.-A. Tomie // Physiol. Behav. — 1997. — V. 60. — P. 1191–1197.
4. *Салига Ю. Т.* Дослідження нейротоксичності хлорпірифосу у щурів за допомогою водного тесту Морріса та в умовах культури клітин гіпокампа / Ю. Т. Салига, Слипанюк О. В. // Фізіологічний журнал. — 2010. — Т. 56, № 2. — С.49–50.
5. *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. — Т.12, № 2 (44), Ч. 2. — С.260–263. — [Серія «Біологічні науки»].

6. Extrapolation Escape Task (OpenScience, Moscow, Russia). — <http://www.openscience.ru/>.
7. Dubrovskaya N. M. Role of the striatal cholinergic system in the regulation of learned manipulation in rats / N. M. Dubrovskaya, I. A. Zhuravin // Integrative Physiol. Behav. Sci. — 1995. — V. 30, N. 2. — P. 127–137.

Рецензент: старший науковий співробітник лабораторії живлення птиці, кандидат сільськогосподарських наук Сірко Я. М.

УДК 577.3 + 615.9

СТАН СИСТЕМИ ПРООКСИДАНТИ-АНТИОКСИДАНТИ В НИРКАХ ЩУРІВ, ЯКИМ ВВОДИЛИ АФЛАТОКСИН В1

Р. О. Федяков¹, Г. Л. Антоняк^{1,2}, О. М. Стефанишин¹

¹Інститут біології тварин НААН

²Львівський національний університет імені Івана Франка,

Досліджували стан системи прооксиданти-антиоксиданти в гомогенатах клітин нирки щурів, яким вводили афлатоксин В1. Установлено, що впродовж 21-добового періоду після введення токсину в гомогенатах клітин відбувається нагромадження продуктів пероксидного окиснення ліпідів і змінюється активність ферментів антиоксидантної системи (супероксиддисмутаза, каталаза, глутатіонпероксидаза, глутатіонредуктаза). На 1-шу добу досліджень супероксиддисмутазна і каталазна активність зростає, а глутатіонпероксидазна та глутатіонредуктазна — зменшується. Наприкінці експерименту відбувається пригнічення всіх досліджуваних ферментів-антиоксидантів у зазначених клітинах. Отримані дані свідчать про роль оксидативного стресу в механізмах токсичного впливу афлатоксину В1 на клітини нирок.

Ключові слова: МІКОТОКСИНИ, АФЛАТОКСИН В1, ПЕРОКСИДНЕ ОКИСНЕННЯ ЛІПІДІВ, АНТИОКСИДАНТНА СИСТЕМА, НИРКИ

Афлатоксини — це група мікотоксинів, які синтезуються як вторинні метаболіти грибів роду *Aspergillus*. Ці сполуки часто виявляють у кормах тварин, а іноді — у продуктах харчування людини [1, 2]. За умов тривалого надходження в організм афлатоксини зумовлюють сповільнення росту, пригнічення діяльності імунної системи, порушення функцій печінки та нирок, а у високих концентраціях можуть спричиняти загибель сільськогосподарських тварин і птиці [3]. Головним із групи афлатоксинів є афлатоксин В1 (AFB1), який належить до найнебезпечніших природних отрут [4].

Афлатоксини метаболізуються у печінці за участю мікосомальних ферментів із утворенням продуктів різного рівня токсичності, які можуть надходити в кров і виводитись із організму через видільну систему [5]. Неметаболізовані афлатоксини, в тому числі, AFB1 також виявляють у крові. Тому нирки є органом, який зазнає безпосереднього впливу афлатоксинів та їхніх метаболітів. Однак механізми впливу цих токсичних сполук на метаболізм у клітинах нирок з'ясовані недостатньо.

Як відомо, в механізмах дії різноманітних токсикантів важливу роль відіграє здатність стимулювати утворення активних форм Оксигену (АФО) та процеси пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ), спричиняючи розвиток оксидативного стресу [6]. За умов зниження активності ферментів антиоксидантної системи надмірне утворення АФО і продуктів ПОЛ призводить до пошкодження біологічних молекул, плазматичних мембран та інших клітинних компонентів, і, як наслідок — порушення метаболізму та функцій клітини [6]. Тому метою роботи було дослідити вплив AFB1 на прооксидантно-