

НЕЙРОФІЗИОЛОГІЧНІ ПОРУШЕННЯ У САМИЦЬ ЩУРІВ ТА ЇХ ПОТОМСТВА ЗА ІНТОКСИКАЦІЇ ХЛОРПІРИФОСОМ ДО ЗАПЛІДНЕННЯ

С. В. Грабовська
sofia_v@i.ua

Інститут біології тварин НААН,
вул. В. Стуса, 38, м. Львів, 79034, Україна

Хлорпірифос (ХПФ) є одним з найпопулярніших фосфорорганічних пестицидів. Основним механізмом його дії є незворотне інгібування ацетилхолінестерази, що призводить до нейротоксичних ефектів. Відомо, що ХПФ-інтоксикація матерів незадовго до або в період вагітності може спричинити нейрокогнітивні порушення у їх дітей.

Метою цієї роботи було дослідити вплив інтоксикації ХПФ самиць щурів до запліднення на нейроповедінкові, біохімічні та гематологічні параметри їхнього потомства. Для дослідження було використано нейроповедінкові методи (тести «Відкрите поле», «Темно-світла камера», «Екстраполяційне позбавлення»), а також біохімічні (вимірювання активностей ацетилхолінестерази, аспартат- та аланінамінотрансфераз, лужної фосфатази, вмісту загального білка, холестерину, тригліцеридів та креатиніну), гематологічні (підрахунок кількісних показників червоної, білої крові, тромбоцитів) та морфометричні методи. Самицям білих лабораторних щурів лінії Вістар одноразово за допомогою перорального зонда вводили препарат ХПФ у вигляді олійного розчину у дозах 15, 30 та 60 мг/кг.

У самиць щурів, інтоксикованих ХПФ, виявлено зниження активності ацетилхолінестерази та зростання активності лужної фосфатази, що є характерним для отруєння фосфорорганічними сполуками. Спостерігали зниження їхньої вертикальної рухової активності та кількості актів короткого грумінгу в тесті «Відкрите поле». У потомства інтоксикованих самиць було виявлено збільшення смертності у ранній постнатальний період, а поведінкові тести, проведені у віці 1,5 місяця, показали аномальну реакцію цих тварин на помірний стрес: у тесті «Темно-світла камера» вони значно більше часу проводили в освітленій частині установки. Також у плазмі крові потомства щурів дослідної групи було виявлено зниження активності лужної фосфатази.

Одержані результати свідчать про наявність впливу інтоксикації самиць щурів ХПФ перед їх вагітністю на нейрофізіологічні показники їх потомства. Механізми такого впливу потребують детальнішого вивчення та є перспективним напрямком подальших досліджень.

Ключові слова: ХЛОРПІРИФОС, ЩУРИ, ДРУГЕ ПОКОЛІННЯ, ПОВЕДІНКА, ЦНС

NEUROPHYSIOLOGICAL DISORDERS IN FEMALE RATS AND THEIR OFFSPRING AFTER CHLORPYRIFOS INTOXICATION PRIOR TO FERTILISATION

S. V. Grabovska
sofia_v@i.ua

Institute of Animal Biology NAAS,
38 V. Stus str., Lviv 79034, Ukraine

Chlorpyrifos (CPF) is one of the most popular organophosphate pesticides. The main mechanism of its action is irreversible acetylcholinesterase inhibition, which leads to a neurotoxic effect. There is evidence that CPF exposure to mothers shortly before or during pregnancy can cause behavioral abnormalities in their children.

The purpose of this work was to investigate the effects of CPF intoxication of female rats before fertilization on neurobehavioral, biochemical and hematological parameters of their offspring. To investigate the changes, behavioral techniques were used ("Open Field", "Dark/Light Box", "Extrapolation Escape" tests), as well as biochemical (assessing aspartate and alanine aminotransferase activity, alkaline phosphatase activity, content of total protein, cholesterol, triglycerides and creatinine), hematological (quantitative analysis of white, red blood cells and thrombocytes) and morphometric methods. Female rats were exposed to oil CPF solution at doses of 15, 30 and 60 mg/kg, via oro-gastric tube.

In intoxicated females decreased activity of acetylcholinesterase and increased alkaline phosphatase activity (which is characteristic of poisoning by organophosphorus compounds) were found, as well as some decrease in

vertical motor activity and number of short grooming acts in the "Open Field" test. In the offspring of intoxicated females, a sharp increase in mortality rate in the early postnatal period was observed, and behavioral tests conducted at the age of 1.5 months showed an abnormal reaction of these animals to moderate stress: they spent much more time in the illuminated compartment in the "Dark/Light Box" test. Additionally, we detected a decrease of plasma alkaline phosphatase activity in the offspring of the experimental group.

Based on the obtained results we may conclude that CPF intoxication before pregnancy altered behavioral parameters of the future offspring. The mechanisms of such influence require a more detailed study and make a promising direction for further researches.

Keywords: CHLORPYRIFOS, RATS, SECOND GENERATION, BEHAVIOUR, CENTRAL NERVOUS SYSTEM

ИНТОКСИКАЦИЯ ХЛОРПИРИФОСОМ САМОК КРЫС ДО ОПЛОДОТВОРЕНИЯ ВЫЗЫВАЕТ НЕЙРОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ НАРУШЕНИЯ У ИХ ПОТОМСТВА

С. В. Грабовская
sofia_v@i.ua

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

Хлорпирифос (ХПФ) — один из наиболее популярных фосфорорганических пестицидов. Основным механизмом его действия является необратимое ингибирование ацетилхолинэстеразы, ведущее к нейротоксическим эффектам. Есть данные, что интоксикация ХПФ матерей во время беременности или незадолго до нее способна вызывать поведенческо-когнитивные нарушения у их детей.

Целью данной работы было исследовать влияние интоксикации ХПФ самок крыс до оплодотворения на нейроповеденческие, биохимические и гематологические параметры их потомства. Для исследования вызванных изменений были использованы поведенческие методики (тесты «Открытое поле», «Темно-светлая камера», «Экстраполяционное избавление»), а также биохимические (измерение активностей аспартат- и аланинаминотрансфераз, щелочной фосфатазы, содержания общего белка, холестерина, триглицеридов и креатинина), гематологические (подсчет количественных показателей красной, белой крови и тромбоцитов) и морфометрические методы.

Самкам белых лабораторных крыс линии Вистар однократно вводили препарат ХПФ в виде масляного раствора с помощью перорального зонда в дозах 15, 30 и 60 мг/кг. У самок, интоксикованных ХПФ, наблюдалось снижение активности ацетилхолинэстеразы и рост активности щелочной фосфатазы (что характерно для отравления фосфорорганическими соединениями), а также некоторое снижение вертикальной двигательной активности и количества актов короткого груминга в тесте «Открытое поле». Среди потомства интоксикованных самок обнаружено резкое увеличение смертности в ранний постнатальный период, а поведенческие тесты, проведенные в возрасте 1,5 месяца, показали аномальную реакцию этих животных на умеренный стресс: в тесте «Темно-светлая камера» они гораздо больше времени проводили в освещенной части установки. Также у потомства исследовательской группы обнаружили снижение активности щелочной фосфатазы в плазме крови. На основе полученных результатов можно сделать выводы о наличии влияния интоксикации ХПФ до беременности на поведенческие, биохимические и гистологические параметры будущего потомства. Механизмы такого влияния требуют более детального изучения и представляют перспективное направление дальнейших исследований.

Ключевые слова: ХЛОРПИРИФОС, КРЫСЫ, ВТОРОЕ ПОКОЛЕНИЕ, ПОВЕДЕНИЕ, ЦНС

Хлорпірифос (ХПФ) є одним з найпопулярніших фосфорорганічних пестицидів, який дуже широко використовується в агропромисловому секторі багатьох країн, зокрема України. У зв'язку з цим існують значні ризики отруєнь та шкідливих впливів ХПФ на здоров'я населення, особливо дітей. Основ-

ним механізмом дії ХПФ, як і всіх фосфорорганічних сполук, є незворотне інгібування ензиму ацетилхолінестерази (АХЕ), яке призводить до порушень у роботі ЦНС.

Значне занепокоєння викликають віддалені наслідки отруєння фосфорорганічними сполуками, зокрема нейроповедінкові пору-

шення у потомства матерів, які зазнавали інтоксикації ХПФ. Результати значної кількості досліджень дозволяють прослідкувати зв'язок між отруєнням матерів ХПФ та розвитком у їхніх дітей патологій, етіологія яких на сьогодні остаточно не встановлена. У науковій літературі є повідомлення про можливий вплив ХПФ-інтоксикації на виникнення і розвиток навіть такого проблемного захворювання, як аутизм. Показовою є робота [7], автори якої піддавали впливу ХПФ самиць мишей у період вагітності, а згодом в їхнього потомства спостерігали аномалії ультразвукової вокалізації та соціальної взаємодії, відмінності при проходженні тесту «Відкрите поле», повторювану поведінку — ознаки, характерні для тваринних моделей аутизму. Що стосується людей, то моніторингові дослідження засвідчили вищу частоту проявів симптомів аутизму серед дітей, матері яких у період вагітності зазнавали контакту з ХПФ або мешкали у місцевості, де в господарській діяльності використовувалися ці чи аналогічні фосфорорганічні пестициди [10].

У дослідженні на щурах, які зазнали ранньої постнатальної (1–4 дні після народження) інтоксикації ХПФ, після досягнення ними статевозрілого віку спостерігали симптоми депресії [1]: ангедонію (зниження чи втрата здатності отримувати задоволення), погіршення пам'яті та інші поведінкові порушення. Доза хлорпірифосу (1 мг/кг в день) була підібрана так, щоб не виявляти ознак прямої нейротоксичності.

При дослідженні дітей, які зазнавали пренатальної інтоксикації ХПФ, було виявлено морфологічні зміни головного мозку [9]. Цікавим є дослідження, у якому порівняли дані магнітно-резонансної томографії 20-ти дітей у віці 5–11 років, які зазнали впливу пестицидів під час внутрішньоутробного розвитку (у дозах, які є нормальними для сільськогосподарської обробки), з даними такої ж кількості дітей, матері яких під час вагітності не зазнавали такого впливу. У дітей дослідної групи було виявлено аномальні розміри деяких мозкових зон, викликані змінами у білій речовині. Спостерігали також деяке згладження статевих відмінностей у будові нижньої тім'яної долі та верхньої бокової звивини. У правій медіальній лобній звивині виявили навіть реверсію статевих відмінностей.

За даними іншого моніторингового дослідження, ХПФ здатний викликати погіршення пам'яті [12, 13] та академічної успішності дітей [8]. Так, Rauh зі співробітниками дослідили 265 новонароджених. У плазмі пуповинної крові визначали рівень пренатальної концентрації ХПФ. Згодом, після досягнення цими дітьми 7-річного віку, рівень їхнього інтелекту вимірювали за допомогою спеціального адаптованого тесту. Було виявлено, що у дітей, які зазнали пренатального впливу ХПФ, коефіцієнт інтелекту знизився на 1,4 %, а показники оперативної пам'яті — на 2,8 %. Такі фактори, як різниця освіти батьків та обставини середовища, в якому зростали діти, було враховано.

Шкідливий вплив ХПФ під час вагітності активно досліджується як на тваринних моделях, так і в моніторингових дослідженнях на людях, однак ми не виявили у літературі даних щодо ефектів інтоксикації організму цією сполукою до настання вагітності на його майбутнє потомство. Тому метою нашого дослідження було саме вивчення впливу інтоксикації ХПФ самиць щурів до запліднення на функціональний стан нервової системи їхнього потомства.

Поведінкові методики тестування тварин дозволяють виявляти функціональні порушення у роботі ЦНС під впливом таких доз ХПФ, які не спричиняють помітних змін біохімічних показників та видимих ознак отруєння. Тому у роботі ми використали поведінкові тести «Відкрите поле», «Темно-світла камера» та «Екстраполяційне позбавлення». Також ми провели низку біохімічних та гематологічних досліджень як самих інтоксикованих самиць, так і їхнього потомства.

Матеріали і методи

Дослідження були проведені на білих лабораторних щурах лінії Вістар, яких утримували у стандартних умовах віварію з дотриманням 12-годинного режиму освітлення (темрява/світло), з необмеженим доступом до питної води та корму. Тваринам згодували стандартний комбікорм для лабораторних щурів. Усі маніпуляції з тваринами проводили відповідно до Європейської конвенції «Про за-

хист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних і наукових цілей» від 18.03.1986 р. [2], 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 № 42 від 01.11.13 засідання комісії з біоетичної експертизи Інституту біології тварин НААН).

Було сформовано 4 групи статевозрілих самиць шурів по 6 тварин у кожній: три дослідні та одну контрольну групу. Тваринам дослідних груп одноразово за допомогою стравохідного зонда було введено розчин ХПФ у соняшниковій олії (аналогічно до попереднього етапу досліджень) у таких дозах: група Д1 — 15 мг/кг маси тіла тварини, група Д2 — 30 мг/кг, група Д3 — 60 мг/кг. Тварини контрольної групи одержали аналогічний об'єм чистої олії.

Через одну годину після введення з кожної групи було відібрано по 3 тварини для забою та відбору зразків крові, органів і тканин для подальших гістологічних та біохімічних досліджень. Для гістологічного аналізу ми відбирали головний мозок, серце, легені, печінку, селезінку та нирки тварин. У зразках крові визначали активність ацетилхолінестерази, лужної фосфатази, аланін- та аспартатамінотрансферази і вміст загального білка, а також гематологічні показники (кількість лімфоцитів, моноцитів, гранулоцитів, еритроцитів, вміст гемоглобіну, гематокритне число, середній об'єм еритроцитів і тромбоцитів, кількість тромбоцитів) та стійкість еритроцитів до кислотного гемолізу.

Решту тварин (по 3 самиці у кожній групі) знову помістили у стандартні умови виварію. На 2-у та 3-ю добу після введення ХПФ їх було протестовано за допомогою поведінкових методик — тестів «Відкрите поле» і «Темно-

світла камера» відповідно. Ці методики були обрані тому, що саме за їх результатами спостерігалися найістотніші зміни на попередніх етапах роботи.

Через 10 діб після введення ХПФ до самиць для запліднення підсадили інтактних самців. Після народження потомства його підраховували (для визначення відсотку виживання до дорослого віку) і вимірювали його масу та назоанальну довжину тіла (щоб вирахувати коефіцієнти маси тіла і швидкості набору маси, що свідчать про гармонійність розвитку організму). По досягненні потомством віку 1,5 місяця було розпочато тестування його за допомогою поведінкових методик: «Відкрите поле», «Темно-світла камера» (всього було проведено по 3 тестування за кожною з цих методик) та «Екстраполяційне позбавлення» (1 тестування). Тестування проводили з інтервалами, передбаченими методикою. Схему досліді представлено на рис. 1.

Вводили препарат ХПФ фірми «Sigma-Aldrich» (США). Для введення тваринам його було розчинено у рафінованій соняшниковій олії. Дози ХПФ для кожної тварини розраховували індивідуально з урахуванням групи та маси тварини. Усі введення проводилися за допомогою перорального зонда, що мінімізує побічні стресові фактори та забезпечує потрапляння хімікату в шлунок тварин у визначеній дозі.

Для дослідження функціонального стану нервової системи піддослідних тварин використовували поведінкові тестові методики. Тест «Відкрите поле» застосовували для вивчення рівнів активності та тривожності в умовах новизни території за відсутності гострого стресу, «Темно-світла камера» та «Екстраполяційне позбавлення» — для дослідження аналогічних

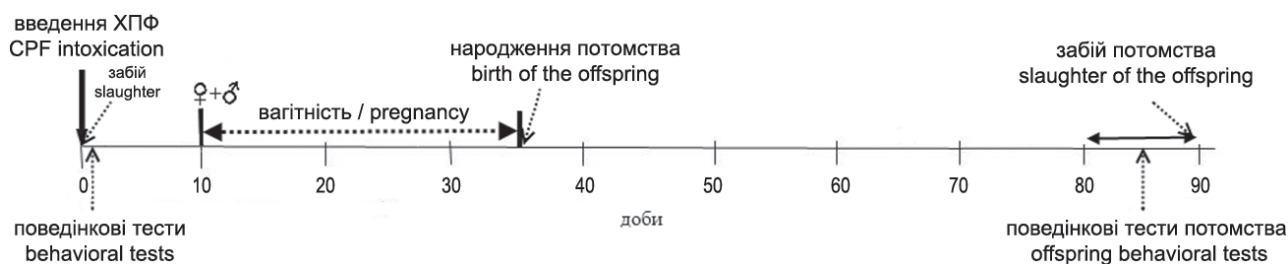


Рис. 1. Схема досліді
Fig. 1. Scheme of the experiment

показників в умовах, відповідно, помірного та сильного гострого стресу. Тестування проводили за методикою, описаною нами раніше [4].

Забій тварин (8 тварин, що досягли дорослого віку, по 4 з кожної групи) проводили методом декапітації при ефірній анестезії. Кров відбирали у пробірки з 1 % розчином гепарину в якості антикоагулянта. Плазму крові відділяли центрифугуванням при 700 g упродовж 15 хв, а еритроцити тричі відмивали за допомогою 0,150 М розчину NaCl, центрифугуючи суспензію клітин при 700 g протягом 5 хв.

Визначення активності холінерастери (ХЕ) (КФ 3.1.1.8) проводили за методом, описаним А. І. Карпищенком [6]. Активності лужної фосфатази, аспартат- та аланінамінонотрансфераз, вміст загального білка визначали за допомогою біохімічного аналізатора «Humalyzer 2000» (Німеччина).

Резистентність еритроцитів до кислотно-го гемолізу визначали за методом І. А. Терскова та І. І. Гітельсона [3]. Ступінь дисоціації оксигемоглобіну визначали спектрофотометричним методом у модифікації Ю. Г. Іванова [5].

У зразках крові, відібраних у пробірки з антикоагулянтом ЕДТА-К2, з допомогою автоматичного гематологічного аналізатора («Orphee Mythic 18», Швейцарія) проводили дослідження гематологічних показників: загальної кількості еритроцитів, лейкоцитів, лімфоцитів, моноцитів, гранулоцитів, тромбоцитів, концентрації гемоглобіну, гематокриту, тромбокрити, середнього тромбоцитарного об'єму, гетерогенності тромбоцитів за об'ємом.

Всі одержані результати було статистично оброблено за допомогою програмного забезпечення *Statistica 8.0* та *Microsoft Excel*.

Результати й обговорення

Зміни досліджуваних біохімічних показників у крові щурів дослідних груп через 1 год після введення ХПФ (рис. 2) відповідали типовій реакції на інтоксикацію аналогічними дозами ХПФ. Активність ацетилхолінерастери (АХЕ) у крові щурів, інтоксикованих ХПФ, знизилася порівняно з контролем. Так, у групі Д1 (доза 60 мг/кг ХПФ) вона становила близько 48 % від активності у контролі

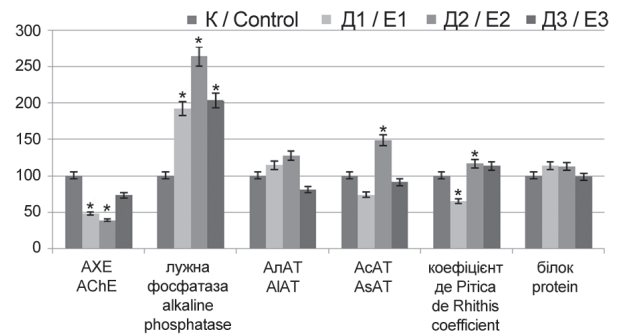


Рис. 2. Активності ацетилхолінерастери, лужної фосфатази, аланін- та аспартат амінонотрансфераз, коефіцієнт де Рітиса та вміст загального білка у плазмі крові щурів першого покоління (у % від контрольних значень)

Fig. 2. Activity of acetylcholinesterase, alkaline phosphatase, alanine and aspartate aminotransferases, de Rithis coefficient and total protein content in blood plasma of rats of the first generation (as a % of the control values)

Примітка: тут і далі * — відмінності статистично вірогідні порівняно з контролем ($P < 0,05$).

Note: here and further * — the differences are statistically significant compared to the control ($P < 0,05$).

($P < 0,05$), у Д2 — 39 % ($P < 0,05$), у групі Д3 — 73 % контрольної активності. Оскільки основним механізмом токсичності ХПФ є саме інгібування ензиматичної активності АХЕ, то з одержаних даних можна зробити висновок про токсичну дію введеного препарату, якої зазнали тварини дослідних груп.

Активності інших ензимів у плазмі крові інтоксикованих ХПФ самиць за годину після введення препарату також відрізнялися від показників контролю. Так, активність аспартатамінонотрансферази у групі Д2 (щурі, які одержали 30 мг/кг ХПФ) була на 48 % вищою ($P < 0,05$), ніж у контрольній групі. За активністю аланінамінонотрансферази істотних змін виявлено не було. Коефіцієнт Де Рітиса (відношення активностей аспартат- та аланінамінонотрансфераз) статистично вірогідно ($P < 0,05$) відрізнявся від контрольних значень у першій та другій дослідних групах. У першій групі він був на 36 % нижчим, ніж у контролі, у другій — навпаки, вищим на 43 %. Виявлені відмінності в активності АсАТ відповідають результатам, описаним у літературі, зокрема [10].

Активність лужної фосфатази у всіх трьох дослідних групах була вищою, ніж у контрольній: на 92 % ($P < 0,05$) — у групі Д1,

на 164 % — у групі Д2 та на 103 % — у групі Д3. Лужна фосфатаза здійснює дефосфорильовання багатьох типів молекул, зокрема протейнів, нуклеотидів, алкалоїдів, та присутня у більшості тканин організму. Основним місцем розташування цього ензиму в клітинах є клітинна мембрана. Збільшення рівня ЛФ може бути фі-

зіологічним або пов'язаним із захворюваннями деяких внутрішніх органів. Активність її може зростати за гострих отруєнь різного роду ксенобіотиками, що ми і спостерігали.

Вміст загального білка у плазмі крові дослідних та контрольних тварин істотно не відрізнявся та був у межах норми.

Таблиця 1

Гематологічні показники крові щурів за годину після інтоксикації ХПФ
Hematological parameters of blood of rats one hour after CPF intoxication

Показник / Parameter	Група / Group			
	Д1 / E1	Д2 / E2	Д3 / E3	К / Control
Показники білої крові / White blood parameters				
Загальна кількість лейкоцитів, $1 \times 10^9/\text{л}$ / Leucocytes, $1 \times 10^9/\text{l}$	4±0,68	10,9±0,51	9,1±0,48	5,9±0,42
Лімфоцитів, $1 \times 10^9/\text{л}$ / Lymphocytes, $1 \times 10^9/\text{l}$	н/д	7,3±1,65	6,1±0,97	4,1±2,07
Моноцитів, $1 \times 10^9/\text{л}$ / Monocytes, $1 \times 10^9/\text{l}$	н/д	1,7±0,39	1,2±0,48	0,7±0,24
Гранулоцитів, $1 \times 10^9/\text{л}$ / Granulocytes, $1 \times 10^9/\text{l}$	н/д	1,9±0,53	1,9±0,87	1,1±0,76
% лімфоцитів / % of lymphocytes	н/д	67±3	66,5±7,4	69,3±8,4
% моноцитів / % of monocytes	н/д	15,3±6,9	12,7±7,6	11,9±5,3
% гранулоцитів / % of granulocytes	н/д	17,7±6,9	20,8±11,7	18,8±10,4
Показники червоної крові / Red blood parameters				
Загальна кількість еритроцитів, $1 \times 10^{12}/\text{л}$ Total erythrocytes number, $1 \times 10^{12}/\text{l}$	5,75±0,43	9,09±0,67	7,4±0,96	7,7±0,53
Гемоглобін, г/л / Hemoglobin, g/l	136±4,23	192±3,45	158±3,87	166±2,58
Гематокрит, л/л / Haematocrit, l/l	0,283±0,07	0,417±0,04	0,337±0,06	0,358±0,01
Середній об'єм еритроцита, фл / Mean cell volume (MCV), fl	49,2±6,4	45,9±6,7	45,5±7,3	46,5±8,8
MCH, пг / pg	23,7±6,2	21,1±4,1	21,4±7,1	21,6±5,2
MCHC, г/л / g/l	481±18,4	460±12,6	469±9,2	464±13,5
RDW, %	14,1±3,9	12,8±1,8	13,9±3,1	12,2±4,1
Показники тромбоцитів / Platelet parameters				
Загальна кількість тромбоцитів, $1 \times 10^9/\text{л}$ / Platelets, $1 \times 10^9/\text{l}$	756±23,1*	517±13,8*	386±21,8	297±17,2
Середній об'єм тромбоцита, фл / Mean platelet volume (MPV), fl	5,7±0,61	5,8±0,11	6,2±0,68	6,5±0,34
PCT, %	0,431±0,06	0,3±0,03	0,239±0,07	0,193±0,06
PDW, %	14±2,1	22,8±4,1	23±3,2	25±1,2

Примітка: тут і далі відмінності статистично вірогідні порівняно з контролем: * — $P < 0,05$; ** — $P < 0,01$; *** — $P < 0,001$.

Note: here and further statistically significant differences compared to control: * — $P < 0.05$; ** — $P < 0.01$; *** — $P < 0.001$.

За гематологічними показниками (табл. 1) відмінності від контролю було виявлено тільки за кількістю тромбоцитів: в інтоксикованих тварин їхня кількість зросла, причому найбільше зростання — на 61 % ($P < 0,05$) — спостерігалося у тварин, які одержали максимальну з застосованих доз ХПФ (60 мг/кг), а найменше, на 23 % — відповідно, у групі, що отримала мінімальну дозу (15 мг/кг). У групі Д2 (30 мг/кг ХПФ) кількість тромбоцитів зросла на 43 % ($P < 0,05$) відносно контролю. За рештою гематологічних показників істотних відмінностей між контрольними та дослідними тваринами виявлено не було.

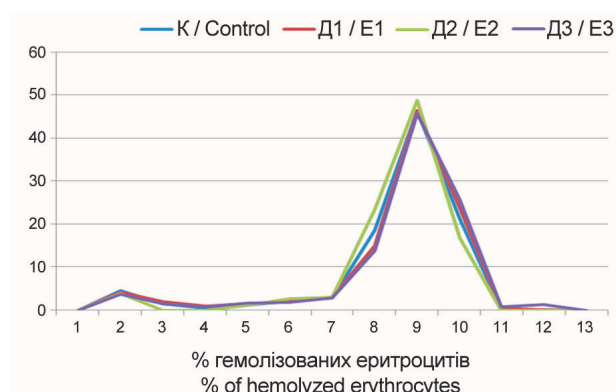
За стійкістю еритроцитів до кислотного гемолізу не було виявлено статистично вірогідних відмінностей між контрольними та дослідними тваринами (рис. 3).

Як вже було зазначено, крім дослідження окремих біохімічних і гематологічних параметрів паралельно проводили нейрофізіологічний аналіз функціонування нервової системи тварин. Отже, завдяки поведінковому тестуванню самиць 1 покоління було одержано такі результати. У тестах «Відкрите Поле» та «Темно-світла камера», проведених до введення ХПФ, істотних міжгрупових відмінностей виявлено не було, що свідчить про достатню рівномір-

ність розподілу тварин між групами за їх поведінковим фенотипом та, відповідно, про вірогідність наступних результатів досліджень.

Після введення ХПФ поведінкові параметри інтоксикованих тварин зазнали деяких змін; при цьому найістотніші відмінності спостерігалися у групі Д2 (тварини, що одержали 30 мг/кг ХПФ). Так, у тесті «Відкрите Поле», проведеному на 2-у добу після введення ХПФ, порівняно з першим тестуванням вертикальна рухова активність дещо знизилася в усіх групах; однак найбільш вираженою та статистично вірогідною ($P < 0,01$) ця різниця була у групі Д2: якщо у тесті, проведеному до введення препарату, тварини усіх груп робили в середньому 15 стійок на задніх лапах, то після введення у групі Д1 цей показник знизився до 5, а в групі Д2 — до 8, тоді як у контрольній групі він практично не змінився. Показники короткого грумінгу у другому тестуванні також дещо знизилися у всіх групах, однак найістотнішою та статистично вірогідною ($P < 0,01$) ця зміна була у групах Д1 (в середньому з 4 до 1 акту короткого грумінгу за тестування) та Д2 (з 3 актів до 0) (рис. 4). Зниження вертикальної активності можна трактувати як ознаку підвищеної тривожності, однак у поєднанні зі зниженою кількістю актів грумінгу вона може свідчити радше про загальне зниження активності дослідних тварин. За іншими показниками (зовнішня та внутрішня горизонтальна активність, довгий грумінг, кількість актів дефекації, нірковий рефлекс, кількість та тривалість завмирань) істотних відмінностей між дослідними та контрольною групами виявлено не було. Відмінності у результатах першого та другого тестувань, які спостерігалися як у дослідних, так і в контрольній групах, можуть бути пояснені як дещо зниженою новизною арени, в яку тварини потрапляли вдруге, так і стресом, якого тварини зазнавали під час введення препарату (у тому числі контрольні щури, яким вводили чисту олію).

Тест «Темно-світла камера» проводили на 3-ю добу після введення ХПФ. За його результатами, статистично вірогідних відмінностей у поведінці контрольних та дослідних тварин до та після введення ХПФ виявлено не було.



Група Group	Час максимального гемолізу, хв Maximum hemolysis time, min	Час тотального гемолізу, хв Total hemolysis time, min	% максимального гемолізу % of maximum hemolysis
Д1 / E1	8,8±0,2	11,0±0,1	48,8±1,8
Д2 / E2	9,0±0,1	10,9±0,2	48,8±3,5
Д3 / E3	8,9±0,2	11,1±0,1	45,8±2,9
К/Control	9,1±0,1	11,0±0,1	46,5±4,1

Рис 3. Усереднені криві кислотного гемолізу еритроцитів щурів через годину після введення ХПФ

Fig. 3. Averaged curves of acid hemolysis of rat erythrocytes one hour after CPF intoxication

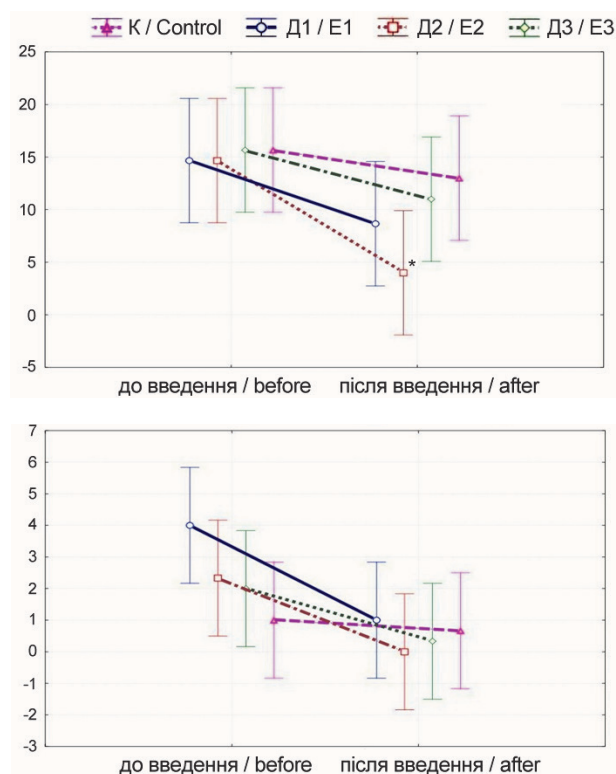


Рис. 4. Вертикальна рухова активність та короткий грумінг у тесті «Відкрите поле» до та після введення ХПФ

Fig. 4. Vertical motor activity and short grooming in the “Open field” test before and after CPF intoxication

Після парування з самцями у контрольній та Д3 групах завагітніли по 2 самиці, у решті груп — по одній. Починаючи з другої доби життя, потомство всіх самиць підраховували, вимірювали масу тіла та назоанальну довжину усіх тварин.

До дорослого віку дожило потомство лише двох груп — Д2 та контрольної; щурята з груп Д1 та Д3 загинули на першому тижні життя (табл. 2).

У Д2 смертність щурят також була вищою, ніж у контрольній: у цих групах вижили, відповідно, 44 % та 75 % потомства (табл. 2). За морфометричними показниками (індекс Кетле, швидкість набору маси) істотних відмінностей між контрольними та дослідними тваринами виявлено не було.

Таблиця 2

Загальна кількість та відсоток смертності потомства щурів від 2-ї до 30-ї доби життя
Total number and percentage of mortality in offspring of rats on postnatal days from 2 to 30

Вік, днів Age, days	Д1 E1	Д2 E2	Д3 E3	К Control
2	6	9	19	12
7	0	7	0	9
14	0	4	0	9
21	0	4	0	9
30	0	4	0	9
% смертності % of mortality	100***	55,6**	100***	25

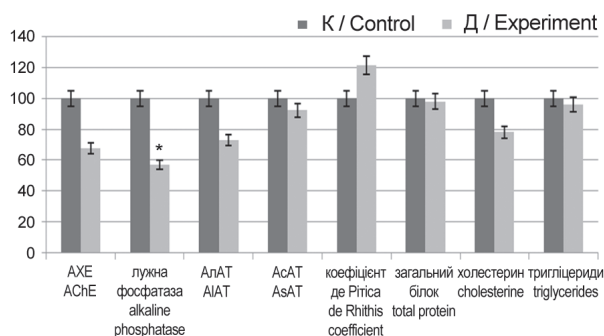


Рис. 5. Активності ацетилхолінестерази, лужної фосфатази, аланін- та аспарататамінотрансфераз, коефіцієнт де Рітиса і вміст загального білка у плазмі крові щурів другого покоління (у відсотках від контрольних значень)

Fig. 2. Activity of acetylcholinesterase, alkaline phosphatase, alanine and aspartate aminotransferases, de Rithis coefficient and total protein content in blood plasma of rats of the second generation (as a percentage of the control values)

За біохімічними показниками крові (табл. 4) (при аналізі зразків, відібраних у віці 1,5 місяця) істотні відмінності дослідної групи від контролю було виявлено лише за активністю лужної фосфатази (рис. 5): у дослідній групі вона була на 30 % нижчою ($P < 0,05$), ніж у контролі.

Активність ацетилхолінестерази у крові дослідних та контрольних тварин статистично не відрізнялася, хоча у дослідних тварин залишалася дещо зниженою. За іншими біохімічними показниками (активність аспарат- та аланінамінотрансфераз, вміст загального білка, холестерину, тригліцеридів та креатиніну) істотних відмінностей виявлено також не було.

Дослідження гематологічних показників піддослідних щурів (табл. 3) виявило у дослідній групі статистично вірогідне (при $P < 0,05$) зростання показника анізоцитозу еритроцитів (RDW), тобто неоднорідності еритроцитів за об'ємом, що, зокрема, може бути симптомом анемії. Показане вище зростання активності лужної фосфатази також може свідчити про наявність у тварин анемії. Окрім цього, у дослідній групі спостерігалось зростання середнього об'єму тромбоцита, що також сигналізує про певні відхилення у роботі системи кровотворення цих тварин. Однак за рештою гематологічних показників істотних відмінностей між контрольною та дослідною групами виявлено не було.

За стійкістю еритроцитів до кислотного гемолізу (рис. 6) було виявлено відмінності ($P < 0,05$) у часі максимального гемолізу: $(6,0 \pm 0)$ с для дослідних тварин та $(5,1 \pm 0,2)$ с для контрольних. За часом тотального гемолізу та максимальним відсотком гемолізу статистично вірогідних відмінностей виявлено не було.

Поведінкові тестування, проведені після досягнення щурятами 1,5-місячного віку, виявили низку відмінностей між контрольними та дослідними тваринами. У тесті «Відкрите поле» статистично вірогідні відмінності (рис. 7) спостерігали за зовнішньою горизонтальною активністю, довгим та коротким грумінгом. Так, кількість перетнутих за час тестування квадратів у дистальній частині арені (зовнішня горизонтальна активність) в дослідній групі була дещо нижчою, ніж у контролі ($P < 0,05$), в обох

Гематологічні показники крові другого покоління щурів
Hematological parameters of blood of the offspring of rats

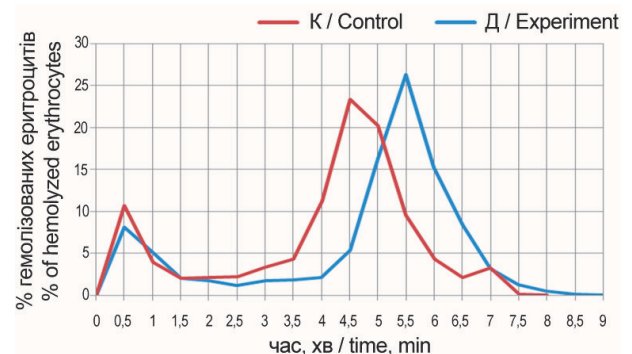
Показник / Parameter	К / Control	Д / Experiment
Показники білої крові / White blood parameters		
Загальна кількість лейкоцитів, $1 \times 10^9/\text{л}$ / Leucocytes, $1 \times 10^9/\text{l}$	4,88±1,0	9,88±2,56
Лімфоцитів, $1 \times 10^9/\text{л}$ / Lymphocytes, $1 \times 10^9/\text{l}$	3,48±0,75	6,98±1,65
Моноцитів, $1 \times 10^9/\text{л}$ / Monocytes, $1 \times 10^9/\text{l}$	0,45±0,01	1,23±0,41
Гранулоцитів, $1 \times 10^9/\text{л}$ / Granulocytes, $1 \times 10^9/\text{l}$	0,98±0,28	1,7±0,5
% лімфоцитів / % of lymphocytes	70,88±4,02	71,48±1,61
% моноцитів / % of monocytes	9,55±1,31	11,55±1,03
% гранулоцитів / % of granulocytes	19,58±3,04	16,98±1,17
Показники червоної крові / Red blood parameters		
Загальна кількість еритроцитів, $1 \times 10^{12}/\text{л}$ Total erythrocytes number, $1 \times 10^{12}/\text{l}$	6,15±0,2	6,43±0,18
Гемоглобін, г/л / Hemoglobin, g/l	138,5±6,74	142,25±5,57
Гематокрит, л/л / Haematocrit, l/l	0,32±0,02	0,33±0,01
Середній об'єм еритроцита, фл / Mean cell volume (MCV), fl	52,0±1,06	50,63±1,28
MCH, пг / pg	22,53±0,38	22,13±0,7
MCHC, г/л / g/l	433,0±1,47	437,25±2,93
RDW, %	14,55±0,36	17,03±0,32*
Показники тромбоцитів / Platelets parameters		
Загальна кількість тромбоцитів, $1 \times 10^9/\text{л}$ / Platelets, $1 \times 10^9/\text{l}$	327,5±81,35	383,5±61,23
Середній об'єм тромбоцита, фл / Mean platelet volume (MPV), fl	5,83±0,11	6,65±0,16*
PCT, %	0,19±0,05	0,26±0,04
PDW, %	14,35±0,91	15,55±1,25

тестуваннях. Кількість актів довгого грумінгу в дослідній групі тварин у першому тестуванні була статистично вірогідно ($P < 0,05$) вищою, ніж у контролі, однак у другому тесті показники обох груп практично зрівнялися.

Найістотніші відмінності у тесті «Відкрите поле» спостерігали за параметром «короткий грумінг» у першому тестуванні: у дослідній групі цей показник був статистично вірогідно ($P < 0,001$) вищим, ніж у контролі, в середньому 4–5 актів проти 1–2; однак у другому тестуванні цей показник також наблизився до контрольного рівня.

Зниження горизонтальної активності у поєднанні зі зростанням кількості актів грумінгу вважається ознаками підвищення тривожності тварин. За іншими параметрами цього тесту істотних відмінностей виявлено не було.

У тесті «Темно-світла камера» також спостерігали низку істотних відмінностей у поведінці дослідних та контрольних тварин. За тривалістю перебування у світлій частині камери з моменту поміщення щура в установку до заходу його у нірку, а також за кількістю виглядань з нірки (без виходу у світлу частину) відмінностей виявлено не було, однак кількість



Група / Group	Час максимального гемолізу, хв / Maximum hemolysis time, min	Час тотального гемолізу, хв / Total hemolysis time, min	% максимального гемолізу / % of maximum hemolysis
Дослід / Experiment	6,0±0*	7,75±0,5	26,3±2,3
Контроль / Control	5,1±0,2	6,9±0,4	29,3±4,3

Рис. 6. Усереднені еритрограми кислотного гемолізу еритроцитів щурів другого покоління та їх параметри
 Fig. 6. Averaged erythrograms of acid hemolysis of erythrocytes of the second generation rats and their parameters

та тривалість виходів з темної частини камери в освітлену істотно відрізнялася (рис. 8).

Якщо тварини контрольної групи майже не виходили з темної частини камери в освітле-

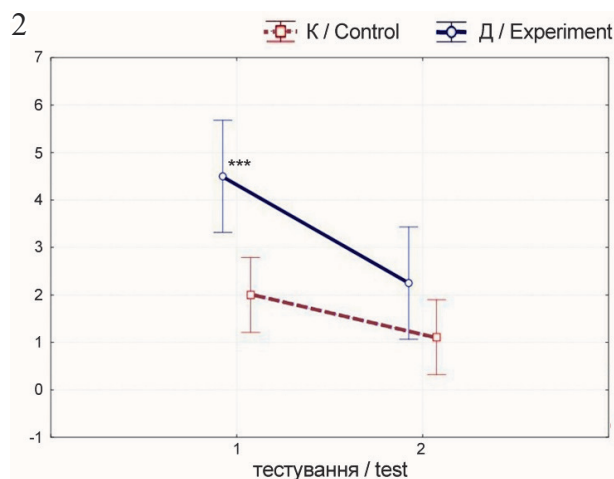
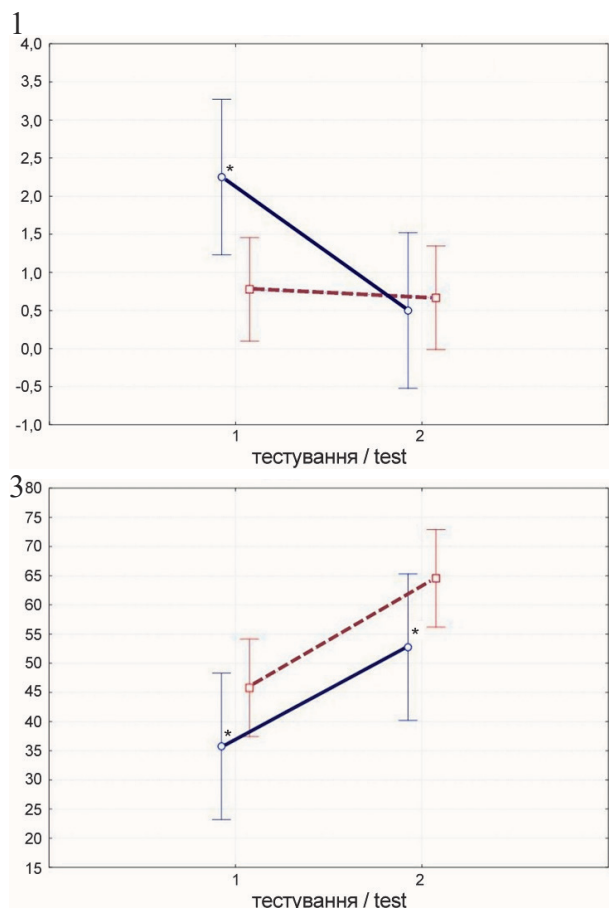


Рис. 7. Кількість актів довгого та короткого грумінгу та зовнішня горизонтальна активність у тесті «Відкрите поле» у другому поколінні щурів
 Fig. 7. Number of long and short grooming acts and external horizontal activity in the “Open Field” test in rats of the second generation

Примітка: у цій і наступній схемі відмінності статистично вірогідні порівняно з контролем: *— $P < 0,05$; ** — $P < 0,01$; *** — $P < 0,001$.

Note: in this and the next figure statistically significant differences compared to control: * — $P < 0.05$; ** — $P < 0.01$; *** — $P < 0.001$.

ну (максимум 1 вихід), то потомство інтоксикованих самок проводило в освітленій частині установки майже половину всього часу тестування. При цьому кількість та тривалість виходів у світлу частину камери в дослідній групі зростали в кожному наступному тестуванні (до 9 виходів та 120 секунд сумарного перебування

в освітленому відсіку), що було статистично вірогідно ($P < 0,01$) вище, ніж аналогічні показники інтактних контрольних тварин.

Оскільки за допомогою тесту «Темно-світла камера» досліджують поведінку гризунів в умовах помірного стресу, викликаного яскравим освітленням світлої частини камери,

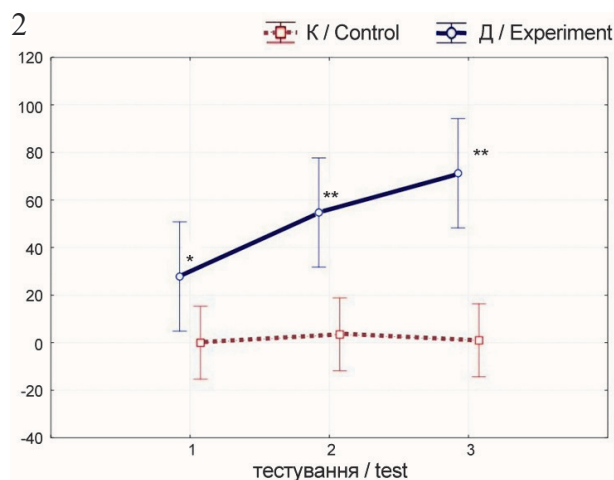
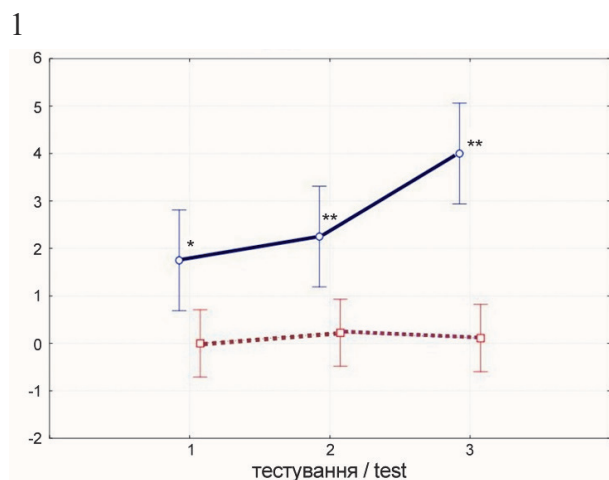


Рис 8. Кількість та сумарна тривалість виходів з темної частини камери в освітлену у тесті «Темно-світла камера» для другого покоління щурів

Fig. 8. Number and total duration of exits out of the dark compartment of the camera into the illuminated one in the “Dark/light camera” test in the second generation of rats

то на основі одержаних у тестах результатів було зроблено припущення про відмінність у дослідних та контрольних тварин реакції на стрес. Для перевірки цього припущення ми вирішили використати ще одну тестову методику, в якій тварин поміщають у стресові умови, а саме «Екстраполяційне позбавлення». Однак за даними цього тесту суттєвих відмінностей у поведінці дослідних та контрольних щурів виявлено не було.

Висновки

Одноразове введення препарату ХПФ у дозах 15, 30 та 60 мг/кг самицям щурів викликало у них зміни деяких біохімічних показників (зниження активності АХЕ, зростання активності лужної фосфатази), але не призвело до істотних змін у їхній поведінці. Однак поведінкові параметри їхнього потомства, зачатого за 10 днів після інтоксикації, суттєво відрізнялися від аналогічних показників контрольних тварин. Було виявлено ознаки підвищеної тривожності потомства дослідних тварин в низькостресогенних умовах (поміщення в незнайому територію), а також аномальна реакція на помірний стрес, викликаний яскравим світлом. У реакції на гострий стрес (поміщення у водне середовище) суттєвих відмінностей від контролю у поведінці цих тварин виявлено не було. Також у дослідній групі другого покоління було виявлено зниження активності лужної фосфатази та деякі відхилення у гематологічних показниках, що може свідчити про прояви анемії у цих тварин. Інтоксикація ХПФ самиць до зачаття призвела до суттєвих нейроповедінкових та фізіологічно-біохімічних змін у їхнього потомства.

Перспективи подальших досліджень.

Детальнішого вивчення потребують біохімічні та фізіологічні механізми впливу інтоксикації ХПФ самиць щурів на нервову систему їхнього потомства, яке безпосередньо не зазнавало впливу токсиканта (адже вважається, що фосфорорганічні пестициди не здатні до накопичення в організмі та виводяться з нього незадовго після отруєння). Окрім того, варто більш поглиблено дослідити зв'язок отруєння ХПФ матерів та ризику розвитку синдрому гіперактивності у дітей.

1. Aldridge J. E., Levin E. D., Seidler F. J., Slotkin T. A. Developmental exposure of rats to chlorpyrifos leads to behavioral alterations in adulthood, involving serotonergic mechanisms and resembling animal models of depression. *Environ. Health Perspect.*, 2005, vol. 113, no. 5, pp. 527–31.

2. European convention for the protection of vertebrate animals used for experim. and other scientific purposes. Coun. of Europe, Strasbourg, 1986.

3. Gitelson I. I., Terskov I. A. *The erythrogram as a method of clinical investigation of the blood*. Krasnoyarsk, Scientific academy of USSR, Siberia department, 1959, 246 p. (In Russian).

4. Grabovska S., Salyha Y. ADHD-like behaviour in the offspring of female rats exposed to low chlorpyrifos doses before pregnancy. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 2015, vol. 66, no. 2, pp. 121–127.

5. Ivanov G. Modification of spectrophotometric method for determining the oxygen hemoglobin dissociation curves. *Bul. Exp. Biol. and Medicine*, 1975, vol. 11, pp. 122–125. (in Russian)

6. Karpyshtshenko A. *Medical laboratory technologies and diagnostics*. A handbook. St. Petersburg, Intermedica, 1999, 656 p. (in Russian)

7. Mullen B. R., Khialeeva E., Hoffman D. B., Ghiani C. A., Carpenter E. M. Decreased Reelin Expression and Organophosphate Pesticide Exposure Alters Mouse Behavior and Brain Morphology. *ASN Neuro.*, 2012, vol. 5, no.1, e00106.

8. Rauh V., Arunajadai S., Horton M., Perera F., Hoepner L., Barr D. B., Whyatt R. Seven-year neurodevelopmental scores and prenatal exposure to chlorpyrifos, a common agricultural pesticide. *Environ Health Perspect.*, 2011, vol. 119, no. 8, pp. 1196–201.

9. Rauh V. A., Perera F. P., Horton M. K., Whyatt R. M., Bansal R., Hao X., Liu J., Barr D. B., Slotkin T. A., Peterson B. S. Brain anomalies in children exposed prenatally to a common organophosphate pesticide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 2012, vol. 109, no. 20, pp. 7871–7876.

10. Salyha Y. T., Rosalovsky V. P. Effects of chlorpyrifos intoxication on biochemical and erythrocytal parameters of rat blood. *Lviv University Bulletin: Biological series*, 2016, vol. 71, pp. 56–64. (in Ukrainian)

11. 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, vol. 120, no. 7, pp. 944–951.

12. Terry A. V. Jr, Beck W. D., Warner S., Vandenhueck L., Callahan P. M. Chronic impairments in spatial learning and memory in rats previously exposed to chlorpyrifos or diisopropylfluorophosphate. *Neurotoxicol. Teratol.*, 2012, vol. 34, no. 1, pp. 1–8.

13. Yan C., Jiao L., Zhao J., Yang H., Peng S. Repeated exposures to chlorpyrifos lead to spatial memory retrieval impairment and motor activity alteration. *Neurotoxicol. Teratol.*, 2012, vol. 34, no. 4, pp. 442–449.