

УДК 577.15:612.017:632.95:611.81

Салига Ю.Т.,[©] кандидат біологічних наук (inenbiol@mail.lviv.ua)

Інститут біології тварин НААН України, м. Львів

ВПЛИВ ХЛОРПІРИФОСУ НА ДЕЯКІ ПОКАЗНИКИ АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ У РІЗНИХ ВІДДІЛАХ ГОЛОВНОГО МОЗКУ ЩУРІВ

У статті представлено дані за результатами досліджень впливу щоденного введення щурам хлорпірифосу *per os* протягом одного місяця у дозі 15 мг/кг маси тіла на активність супероксиддисмутази, глутатіонпероксидази, каталази та вміст малонового діальдегіду у тканинах великих півкуль, мозочка та гіпокампу.

Ключові слова: хлорпірифос, центральна нервова система (ЦНС), нейротоксичність, система антиоксидантного захисту, супероксиддисмутаза, глутатіонпероксидаза, каталаза, малоновий діальдегід, мозок.

Вступ. Хлорпірифос ($C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$, О-(3,5,6-трихлорпіридил-2)-О,О-диетилтіофосфат, О,О-диетил-О-3,5,6-трихлор-2-піридилфосфорогіоат) широко застосовується у світі як самостійний інсектицид, а також входить до складу багатьох інших агрохімічних препаратів. Хлорпірифос (ХП) належить до класу фосфорорганічних сполук, котрі, як відомо, характеризуються високою біологічною активністю, а багато які з них є сильними отрутами. Вважається, що патогенетичний механізм токсичної дії ХП полягає в основному у пригніченні ним активності ацетилхолінестерази (АХЕ) – ферменту, що гідролізує ацетилхолін і є ключовим у процесі синаптичної передачі нервових імпульсів [5]. Необхідно наголосити, що в останні роки з'явився цілий ряд наукових повідомлень про можливі інші механізми дії ХП, які не пов'язані з інгібуванням АХЕ [6]. Зокрема, встановлено, що отруєння організму ХП може індукувати оксидативний стрес, в тому числі і у клітинах мозку [4-6].

Виходячи із вищесказаного, метою нашої роботи було провести порівняльний аналіз ключових ензиматичних показників системи антиоксидантного захисту у тканинах окремих відділів головного мозку щурів інтоксикованих ХП.

Матеріал і методи. Дослідження проводили на молодих білих лабораторних щурах-самцях лінії Вістар масою тіла 120-180 г, які утримувалися у стандартних умовах інститутського віварію. Протягом усього експерименту щурів утримували на збалансованому раціоні, що містив усі необхідні компоненти, питну воду тварини отримували без обмежень із скляних поїлок об'ємом 0,2 літра. Усі маніпуляції з тваринами проводили відповідно до Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних і наукових цілей (Страсбург, 1986 р.).

Було сформовано дві групи щурів по 15 тварин у кожній. Тварини дослідної групи щоранку протягом 30 днів перорально отримували ХП у дозі 15 мг/кг маси тіла. ХП застосовували у вигляді розчину у 20% етанолі об'ємом

від 150 до 300 мкл залежно від маси тварини, яку визначали їх щоденним зважуванням, що дозволило чітко дотримуватися досліджуваної дози препарату протягом усього експерименту. Тварини контрольної групи отримували аналогічний об'єм 20% етанолу без ХП. Теоретично можливий вплив етанолу на аналізовані біохімічні показники був однаковим як на дослідну, так і на контрольну групу тварин, а крім того через дуже незначну його добову дозу до уваги не брався.

Після завершення експерименту тварин декапітували під ефірним наркозом, після чого одразу виділяли головний мозок та ізолювали з нього гіпокамп, мозочок та кору великих півкуль і для наступного біохімічного аналізу заморожували їх рідким азотом. Активність супероксиддисмутази (СОД, 1.15.1.1) визначали за методом Дубініної Є.Є. і ін. [1], який ґрунтується на відновленні супероксидними аніонами, що утворюються між феназинметасульфатом і NADPH, нітросинього тетразолію до нітроформазону. Вимірювання інтенсивності поглинання світла продуктом відновлення проводили на спектрофотометрі при довжині хвилі 410 нм. Визначення каталазної (КАТ, 1.11.1.6) активності проводили за ступенем розкладу цим ферментом пероксиду водню і його здатністю утворювати з солями молібдату кольоровий комплекс з максимальним поглинанням світла при довжині хвилі 410 нм [2]. Активність глутатіонпероксидази (ГП, 1.11.1.9) визначали за швидкістю окиснення глутатіону при наявності гідроперекису третинного бутилу. Концентрацію відновленого глутатіону вимірювали до і після реакції колориметрично. В основі розвитку кольорової реакції лежить взаємодія SH-груп з 5,5'-дитіобіс-2-нітробензойною кислотою (ДТНБК) з утворенням забарвленого продукту – тіонітрофенільного аніону. Вміст останнього прямо пропорційний кількості SH-груп, що прореагували з ДТНБК. Визначення вмісту малонового діальдегіду (МДА) проводили за методом Коробейнікова Е.М. [3], в основі якого лежить реакція між МДА і тіобарбітуровою кислотою (ТБК), яка при високій температурі і кислому середовищі протікає з утворенням триметинового комплексу, що містить одну молекулу МДА і дві молекули ТБК. Концентрацію білка визначали за методом Лоурі [Lowry et al., 1951].

У роботі використовували всі реактиви корпорації Sigma-Aldrich (США).

Одержані результати обробляли статистично за допомогою комп'ютерної програми OriginPro 8 з використанням *t*-критерію Стьюдента. Вірогідно різними вважалися результати при $P < 0,05$.

Результати дослідження.

Патологічні зміни в організмі, які викликають локальні або загальні порушення метаболічних процесів, в основному супроводжуються посиленням вільнорадикальних процесів у клітинах. Наприклад, при запальних процесах ушкоджені тканини знаходяться в стані оксидативного стресу, пов'язаного з генерацією великої кількості $O_2^{\cdot-}$ і NO^{\cdot} фагоцитуючими лейкоцитами, відмічено, що супероксид відіграє важливу роль у патофізіології мозку [4]. Активні форми кисню, завдяки високій реакційноздатності, беруть участь у ряді метаболічних процесів організму, в тому числі адаптивних процесах в екстремальних умовах та при різноманітних інтоксикаціях.

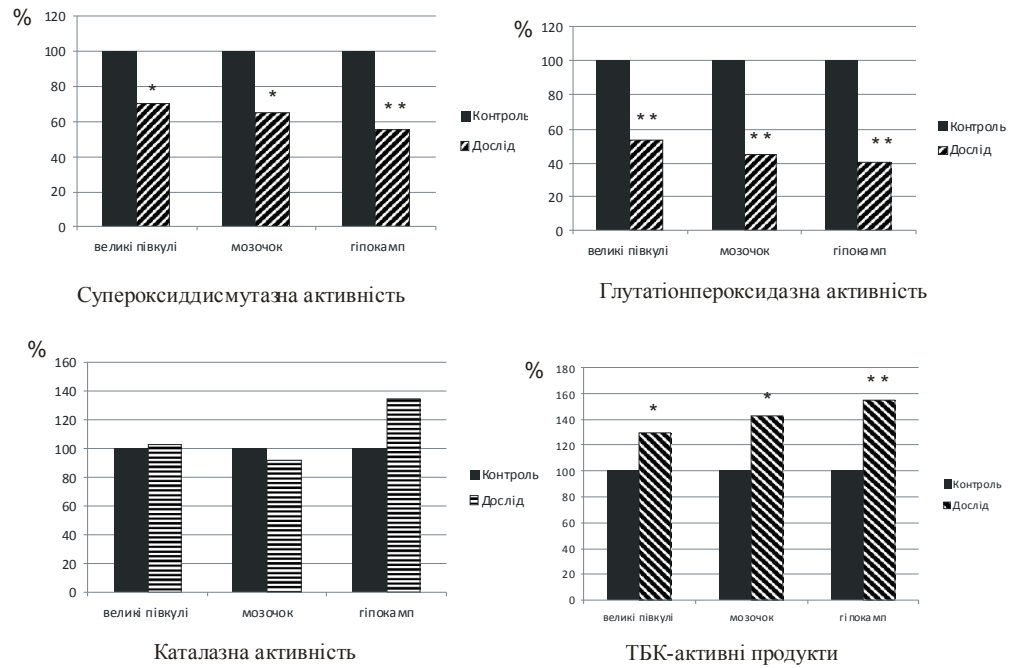


Рис. 1. Показники антиоксидантної системи у тканинах різних відділів головного мозку щурів, яких піддавали інтоксикації хлорпірифосом протягом 30 діб.

Антиоксидантна система при цьому, з одного боку, здійснює захист від переокисного пошкодження клітинних структур, а з другого – входить у систему регулювання інтенсивності вільнорадикальних перетворень, основна регулююча роль при цьому належить антиоксидантним ферментам, в першу чергу таким як КАТ, ГП і СОД. Важливим є також дослідження показників системи антиоксидантного захисту у різних відділах головного мозку під впливом різних нейротоксичних чинників. Тому нами було проведено дослід з вивченням змін активностей КАТ, ГП, СОД, а також вмісту ТБК-активних комплексів у тканинах великих півкуль, мозочка та гіпокампу щурів, яких протягом одного місяця піддавали ХП-інтоксикації.

З отриманих результатів, які графічно представлено на рисунку 1, видно, що у всіх досліджуваних відділах головного мозку щурів ХП викликав статистично достовірне зниження активностей супероксиддисмутази і глутатіонпероксидази та одночасне зростання концентрації ТБК-активних продуктів. Водночас, достовірних відмінностей у ферментативній активності каталази нами зареєстровано не було, не беручи до уваги тенденцію до її незначного зростання у гіпокампі. Найпомітніші зміни – зменшення від 45% у корі великих півкуль і на 60% у гіпокампі порівняно з контролем, було виявлено в активності ГП. Загалом, за впливом ХП на показники системи антиоксидантного захисту досліджуваних ділянок головного мозку їх можна розташувати у такому вигляді в порядку спадання чутливості: гіпокамп, мозочок і кора великих півкуль.

Одержані нами результати підтверджують деякі інші дослідження про індукування хлорпірифосом оксидативного стресу. Зважаючи на те, що вільні радикали можуть викликати порушення функціонування тканин ЦНС через різні механізми, зокрема ексцитотоксичність, метаболічну дисфункцію і зміну внутрішньоклітинного гомеостазу кальцію, що оксидативний стрес може бути одним із факторів, що призводять до ряду нейродегенеративних розладів, включаючи аміотропний латеральний склероз і хворобу Паркінсона, що є дані саме про ключову роль хронічного оксидативного стресу у виникненні аміотропного латерального склерозу, так як ця хвороба безпосередньо пов'язана з функціонуванням ферменту супероксиддисмутази, можна впевнено стверджувати про необхідність глибших досліджень впливу ХП на антиоксидантний статус організму.

Висновки.

1. Пероральне щоденне введення щурам хлорпірифосу у дозі 15 мг/кг маси тіла протягом одного місяця призводить до достовірного зниження активностей супероксиддисмутази і глутатіонпероксидази, зростання вмісту малонового діальдегіду у тканинах великих півкуль, мозочка і гіпокампу.

2. Підтверджено індукування хлорпірифосом оксидативного стресу у тканинах головного мозку щурів.

Література

1. Дубинина Е.Е., Сальникова Л.Я., Ефимова Л.Ф. Активность и изоферментный спектр СОД эритроцитов // Лаб. дело. 1983. №10.-С. 30-33.
2. М.А.Королюк, Л.И.Иванова, И.Г.Майорова, В.Е.Токарев Метод определения активности каталазы // Лаб. дело. 1988. №1.-С. 16-18.
3. Коробейникова Э.Н. Модификация определения ПОЛ в реакции с ТБК // Лаб. дело. – 1989. – № 7. – С. 8-10.
4. Kinouchi H., Kamii H., Mikawa S., Epstein CJ., Yoshimoto T., Chan PH. Role of superoxide dismutase in ischemic brain injury: a study using SOD-1 transgenic mice // Cell Mol. Neurobiol.- 1998.- 18, № 6.- P. 609-620.
5. Slotkin T.A., Seidler F.J. Comparative developmental neurotoxicity of organophosphates in vivo: Transcriptional responses of pathways for brain cell development, cell signaling, cytotoxicity and neurotransmitter systems // Brain Research Bulletin. 2007. Vol. 72 P. 232–274.
6. 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). P. 587-96.

Summary

The data concerning effect of daily chlorpyrifos intake by rats during one month at the dose 15 mg/kg on indexes of superoxidisedismutase, glutathionperoxidase and catalase at the tissues of hippocampus, cerebellum and cerebral cortex are given in the article.

Стаття надійшла до редакції 13.04.2010