

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ ТВАРИН

РОСАЛОВСЬКИЙ ВОЛОДИМИР ПЕТРОВИЧ

УДК 628.16.094+543.393

**ПОРУШЕННЯ ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОЇ
РІВНОВАГИ І ФУНКЦІОНАЛЬНОГО СТАНУ КРОВІ ЩУРІВ ЗА
ІНТОКСИКАЦІЇ ХЛОРПРИФОСОМ ТА ЇХ КОРИГУВАННЯ
КОМПЛЕКСОМ ВІТАМІНІВ А ТА Е**

03.00.04 – біохімія

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Львів – 2018

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Інституті біології тварин НААН.

Науковий керівник – доктор біологічних наук,
старший науковий співробітник
Салига Юрій Тарасович,
Інститут біології тварин НААН,
завідувач лабораторії обміну речовин

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор
Столяр Оксана Борисівна, Тернопільський
національний педагогічний університет імені
Володимира Гнатюка, професор кафедри хімії
та методики її навчання;

доктор біологічних наук, професор
Єлісєєва Ольга Петрівна, Львівський
національний медичний університет імені
Данила Галицького, професор кафедри
гістології, цитології та ембріології

Захист відбудеться «3» липня 2018 р. о 12⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої
вченої ради Д 35.368.01 в Інституті біології тварин НААН за адресою:
79034, м. Львів, вул. В. Стуса, 38.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту біології тварин НААН
за адресою: 79034, м. Львів, вул. В. Стуса, 38.

Автореферат розісланий «___» _____ 2018 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради

О. І. Віщур

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Фосфорганічні сполуки (ФОС) – численний клас хімічних речовин, представлений естерами, амідами, тіоловими похідними фосфорної, фосфонової, фосфінової чи тіофосфорної кислот, що їх застосовують у сільському господарстві (інсектициди), промисловості, ветеринарії, побуті, тощо (Costa L., 2006; Харченко О. А., 2013; Boussabbeh M., 2015; Muhammad G., 2017). ФОС можуть спричинювати істотні ризики для організмів, які не є безпосередніми мішенями їх дії, зокрема для людини. Дослідження останніх 5–10 років демонструють, що вплив гострих і хронічних інтоксикацій цих речовин недооцінюється та потребує поглибленого дослідження (Slotkin T. A., 2009; Khokhar J. Y., 2012).

Загальновідомим основним механізмом токсичної дії ФОС є інгібування ними ензимів холінестеразного ряду з відповідними фізіолого-біохімічними наслідками (Lessenger J. E., 2000; El-Demerdash F. M., 2011; Coban F. K., 2014; Ma J., 2014). Водночас в останні роки значно зросла кількість наукових публікацій, які розширюють уявлення про діапазон ефектів на метаболічні процеси, молекулярні структури та фізіологічні функції ФОС і свідчать про наявність інших механізмів їх токсичності (Ojo O., 2014; Salyha Y., 2015; Natta M. R., 2016). Зокрема, чутливою до дії ФОС є система антиоксидантного захисту. Як відомо, ФОС здатні ініціювати оксидативний стрес, що і є одним із проявів їх токсичності в організмі (Schweikert K., 2012, De Felice A., 2016; Zhang Z., 2017).

Кров як тканина, постійно перебуває у тісній взаємодії з переважною більшістю структур організму. Тому дослідження її біохімічних і фізіологічних параметрів за дії різноманітних ксенобіотиків, зокрема ФОС, оцінка кількісного складу її компонентів, ефективності функціонування ензиматичних систем і стабільності окремих формених елементів має важливе інформативне та діагностичне значення (Goel A., 2006; Savithri Y., 2010; Sosnowska B., 2015).

У цьому контексті дослідження впливу хлорпірифосу (ХПФ) – одного з найпоширеніших у застосуванні представників ФОС на систему крові є цілком обґрунтованим і доцільним, оскільки сьогодні бракує робіт такого спрямування, а їх результати часто є неповними або суперечливими (Ambali S., 2010; Uzun F. G., 2013).

З огляду на нейротоксичність ФОС, терапія інтоксикацій такої природи передусім передбачає застосування заходів для нейтралізації наслідків указаних порушень. Натомість у літературі менше акцентується на пошуку способів і засобів підвищення неспецифічної резистентності організму до або після отруєння ФОС, які не спричиняють негативних ефектів при тривалому лікувально-профілактичному введенні. Зокрема, це стосується комплексних препаратів, що проявляють антиоксидантну дію. Прикладом таких препаратів можуть бути вітаміни А та Е. Дослідження їх впливу на компоненти крові, кисеньтранспортні властивості гемоглобіну має важливе значення в контексті пошуку методів корекції наслідків оксидативних порушень, які виникають за хронічних і гострих отруєнь ФОС. (Dash R. K., 2010; Eroglu S., 2013; Ma P., 2013; Spodniewska A., 2015; Hassani S. I., 2015). Саме тому актуальним є вивчення реакцій системи крові: змін резистентності еритроцитарних мембран до гемолізу, дослідження антиоксидантного статусу

еритроцитів, спорідненості гемоглобіну (Hb) до O₂ за дії ФОС-індукованого оксидативного стресу.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконана у межах науково-дослідних робіт Інституту біології тварин НААН у 2012–2017 рр. за темами: 31.14.04.02 «Вивчити фізіолого-біохімічні особливості метаболізму у тварин під дією окремих трофічних і біогеохімічних факторів і розробити методи їх коригування» (№ ДР 0111U006136), 35.00.02.02 «Вивчити фізіолого-біохімічні механізми токсичної дії фосфорорганічних сполук на організм тварин» (№ ДР 0116U001411), у яких дисертант був виконавцем і досліджував біохімічні та гематологічні параметри організму щурів за інтоксикації ХПФ та за дії коригувальних чинників.

Мета і завдання дослідження. Мета дисертаційної роботи полягала у з'ясуванні стану крові щурів і антиоксидантної системи (АОС) залежно від дози хлорпірифосу та обґрунтуванні способів коригування гематотоксичних ефектів цієї сполуки комплексом вітамінів А та Е.

Для досягнення мети в дисертаційній роботі поставлено такі завдання:

- визначити інтенсивність пероксидного окиснення ліпідів і активність антиоксидантних ензимів крові щурів за інтоксикації різними дозами хлорпірифосу;
- дослідити гематологічні показники щурів за інтоксикації різними дозами хлорпірифосу;
- оцінити параметри осмотичної резистентності еритроцитів за інтоксикації щурів різними дозами хлорпірифосу та стан кисеньтранспортної функції гемоглобіну;
- з'ясувати ефективність застосування комплексу вітамінів А та Е як коригувального фактора токсичного впливу хлорпірифосу на функціональний стан еритроцитів, кисеньтранспортні властивості Hb та систему антиоксидантного захисту крові щурів;

Об'єкт дослідження – біохімічні та гематологічні процеси у щурів за умов інтоксикації різними дозами ХПФ та їх коригування за допомогою комплексу вітамінів А і Е.

Предмет дослідження – процеси пероксидного окиснення ліпідів, активність ензимів системи антиоксидантного захисту, осмотична резистентність і стан кисеньтранспортної функції еритроцитів у щурів за дії хлорпірифосу і за коригування викликаних ним порушень із застосуванням комплексу вітамінів А та Е.

Методи дослідження: біохімічні (визначення ензиматичної активності, вмісту субстратів і продуктів окиснювально-відновних реакцій); гематологічні (дослідження осмотичної резистентності еритроцитів, кисневої ємності гемоглобіну); статистичні.

Наукова новизна одержаних результатів. Отримані результати доповнюють знання про механізми токсичної дії ХПФ, ролі у цих процесах прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу і гематологічного профілю крові. Уперше на основі комплексних досліджень визначено параметри прооксидантно-антиоксидантного балансу компонентів крові щурів за умов їх гострої інтоксикації різними дозами ХПФ. Продемонстровано, що механізми токсичності ХПФ не обмежуються лише

його антихолінестеразною дією, а зв'язані з порушенням окиснювально-відновного гомеостазу, зокрема, з індукцією оксидативного стресу і спорідненістю гемоглобіну до кисню. Показано можливість застосування як коригувального засобу комплексу вітамінів А та Е, який послаблює розвиток прооксидантних процесів у крові щурів за інтоксикації ХПФ. Уперше продемонстровано, що за дії вказаного вітамінного комплексу спостерігається формування стану помірної прооксидації, що забезпечує вищу здатність ензимів антиоксидантної системи еритроцита метаболізувати надлишок продуктів вільнорадикального окиснення, утворених під впливом введення щурам ХПФ.

Практичне значення одержаних результатів. На основі отриманих експериментальних результатів обґрунтовано спосіб послаблення сили оксидативного стресу, який виникає при інтоксикації ХПФ та коригування гематотоксичних ефектів комплексом вітамінів А та Е у крові щурів, інтоксикованих цією фосфорорганічною сполукою. З'ясовано, що окремі біохімічні показники пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ), антиоксидантної системи (АОС) крові, а також фізико-хімічні параметри еритроцитів (резистентність до кислотного гемолізу, вміст лігандних форм гемоглобіну та його спорідненість до кисню) можуть бути використані як додаткові діагностичні ознаки хлорпірифосної інтоксикації. Отримані результати обґрунтовують спосіб коригування фізіолого-біохімічних порушень, які виникають за інтоксикації цією сполукою. Результати дисертаційного дослідження впроваджені у навчальний процес при викладанні спецкурсів «Метаболізм ксенобіотиків», «Біохімія крові» на кафедрі біохімії Львівського національного університету імені Івана Франка.

Особистий внесок здобувача. Автором розроблено схему і методологію досліджень, виконано весь запланований обсяг експериментальних робіт, опрацьовано дані наукової літератури за темою дисертації, проведено статистичну обробку одержаних результатів та їх аналіз, сформульовано основні висновки роботи, підготовлено до друку наукові публікації за темою дисертації. В опублікованих у співавторстві наукових працях задекларовано частку автора. Обговорення результатів досліджень, формулювання висновків здійснено разом із науковим керівником.

Апробація результатів дисертації. Результати досліджень, викладені у дисертації, оприлюднені на засіданнях вченої ради Інституту біології тварин НААН (2012-2017 рр.), на міжнародних науково-практичних конференціях: VII Міжнародній конференції молодих учених (Харків, 20-23 листопада, 2012), 49-му Конгресі європейських токсикологічних товариств «Eurotox 2013» (Interlaken Switzerland, 1-4 September, 2013), IV Всеукраїнському з'їзді екологів з міжнародною участю (Вінниця, 25-28 вересня, 2013), VI Міжнародній конференції молодих учених «Біорізноманіття, Екологія, Адаптація, Еволюція.» (Одеса, 13-17 травня, 2013), XI Українському біохімічному конгресі (Київ, 6-10 жовтня, 2014), X Міжнародній науковій конференції студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології» (Львів, 8-11 квітня, 2014), XIX з'їзді Українського фізіологічного товариства ім. П. Г. Костюка з міжнародною участю (Львів, 24-26 травня, 2015), Міжнародній науково-практичній конференції «Актуальні проблеми сучасної біології, тваринництва та ветеринарної медицини» (Львів, 29-30

жовтня 2016), VII Міжнародному конгресі Українського товариства нейронаук (Київ, 7-11 червня, 2017).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 18 друкованих праць: 9 статей, з них 7 – у фахових наукових виданнях (4 одноосібні), 4 статті опубліковано у наукових періодичних виданнях, включених до міжнародних наукометричних баз даних, 9 тез доповідей матеріалів наукових конференцій.

Структура та обсяг роботи. Дисертаційна робота сформована зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, результатів досліджень та їх обговорення, висновків і списку використаної літератури, який налічує 290 найменувань, з них 203 латиницею, та додатка. Робота викладена на 161 сторінці комп'ютерного набору, з яких 116 займає основна частина. Дисертація проілюстрована 16 рисунками, містить 25 таблиць, які займають 18 сторінок.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Огляд літератури. В огляді літератури висвітлено сучасні уявлення про виникнення порушень прооксидантно-антиоксидантної рівноваги та змін гематологічного характеру за умов хлорпірифос-індукованого оксидативного стресу. Значну увагу приділено коригуванню наслідків оксидативних порушень, спричинених хлорпірифосом.

Матеріали й методи дослідження. Дослідження виконано в лабораторії обміну речовин імені С. З. Гжицького Інституту біології тварин НААН впродовж 2012–2017 рр. Експериментальна частина проведена на 120 самцях білих лабораторних щурів лінії Вістар масою тіла 180–250 г.

У фаховій літературі діапазон напівлетальних доз ХПФ для щурів зазначається в межах 95–270 мг/кг, тому його дозування для досліджень здійснювали на основі літературних даних і результатів власних досліджень (Салига Ю. Т., 2013; Росаловський В. П., 2013; Aly N., 2010; Ambali S. F., 2011). У роботі використано хлорпірифос виробництва Sigma-Aldrich, (США). Як антиоксидантний комплекс застосовувався розчин, що містив вітамін А дозою 100 000 МО та вітамін Е дозою 0,1 г/кг. Обраний розчин вітамінів вводили щурам за допомогою шлунокового зонда.

Під час виконання дисертаційної роботи проведено чотири серії досліджень, що відрізнялися між собою дозою ХПФ і тривалістю його дії на організм піддослідних тварин. Загальну схему досліджень представлено на рис. 1.

Серія досліджень 1. На цьому етапі досліджували вплив ХПФ на фізіолого-біохімічні показники крові щурів за інтоксикації тривалістю 1 год. Тваринам дослідних груп за допомогою зонду одноразово вводили олійний розчин ХПФ дозою 50 мг/кг. Тваринам контрольних груп вводили аналогічний об'єм чистої соняшникової олії. Декапітацію щурів і забір крові проводили через 15, 30, 45, 60 хв після введення в їх організм ксенобіотика.

Серія досліджень 2. На цьому етапі одноразово вводили щурам розчин ХПФ дозою 30 мг/кг. Тваринам контрольних груп замість препарату вводили аналогічний об'єм соняшникової олії. Тварин виводили з експерименту на 1-шу, 3-тю, 6-ту й 10-ту доби дослідження. Для досліджень відбирали кров, яку застосовували для

визначення резистентності еритроцитарних мембран до кислотного гемолізу та приготування гемолізатів для біохімічних досліджень.

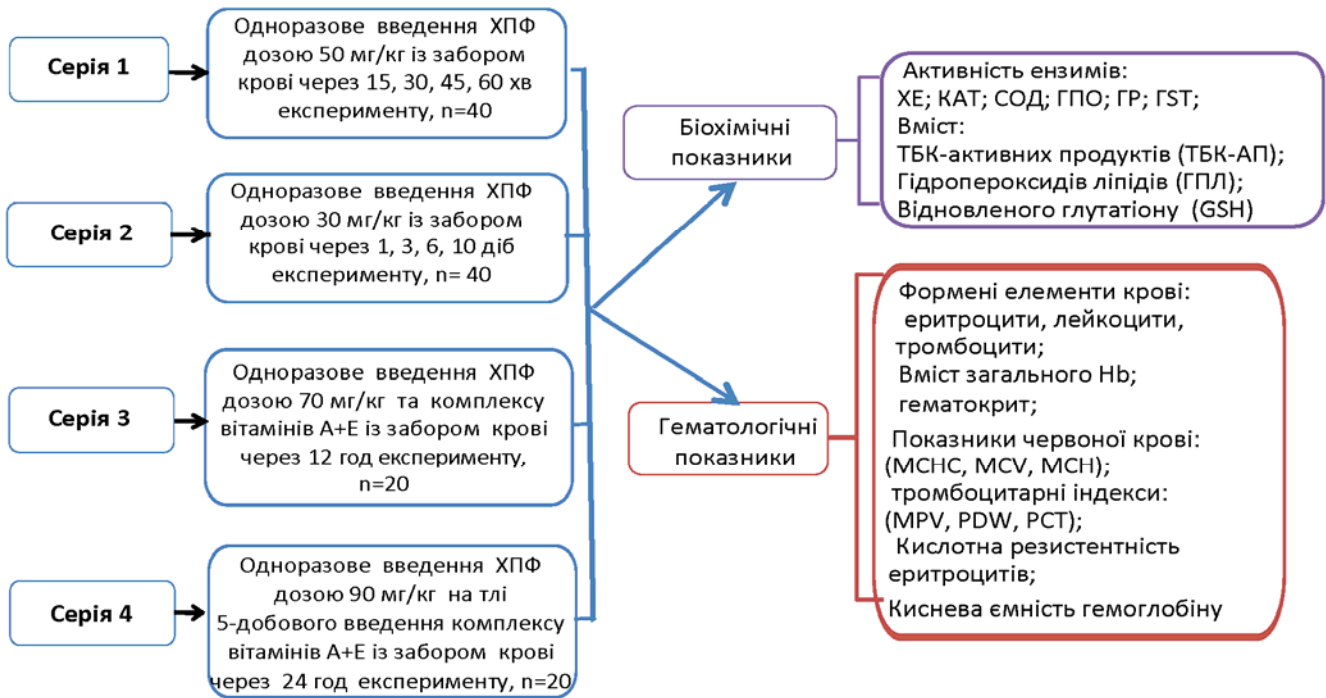


Рис. 1. Загальна схема досліджень дисертаційної роботи.

Серія досліджень 3. У цій серії досліджували вплив вітамінів А та Е на розвиток гострої інтоксикації ХПФ за фізіолого-біохімічними показниками крові щурів. Для цього сформували чотири групи тварин: одну контрольну (К1) і три дослідні (Д1, Д2, Д3). Усі тварини за допомогою зонда внутрішньошлунково отримували відповідно: група Д1 – олійний розчин ХПФ дозою 70 мг/кг, група Д2 – вітамін А у вигляді ретинолу пальмітату 100 000 МО + вітамін Е у вигляді α -токоферолу ацетату, 0,1 г/кг, група Д3 – розчин ХПФ (70 мг/кг) + вітамін А у вигляді ретинолу пальмітату 100 000 МО та вітамін Е у вигляді α -токоферолу ацетату 0,1 г/кг. Контрольній групі вводили відповідний об'єм чистої соняшникової олії. Декапітацію щурів і забір крові у тварин проводили через 12 год після введення в їх організм ХПФ.

Серія досліджень 4. На цьому етапі роботи проводили дослідження гострої інтоксикації ХПФ дозою 90 мг/кг на фізіолого-біохімічні показники крові щурів на тлі введення комплексу вітамінів А та Е впродовж 5 діб до введення ХПФ. З щурів-самців сформували 4 групи (К, Д1, Д2, Д3) по 5 тварин у кожній. Щурі групи Д1 одноразово отримували олійний розчин ХПФ дозою 90 мг/кг, Д2 – комплекс вітамінів А у вигляді ретинолу пальмітату 100 000 МО та вітаміну Е у вигляді α -токоферолу ацетату 0,1 г/кг упродовж 5 діб до початку експерименту, щурам групи Д3 аналогічно, як групі Д2 вводили вітамінний комплекс разом із олійним розчином ХПФ дозою 90 мг/кг. Тварини контрольної групи (К) отримували чисту соняшкову олію. Декапітацію і забір зразків крові тварин усіх груп проводили через 24 год після початку експерименту.

Усі експерименти з тваринами проводили, дотримуючись Європейської конвенції «Про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних і наукових цілей» від 18.03.1986 р. (Страсбург, Франція),

Директиви ЄС № 609 від 24.11.1986 р. і «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим Національним конгресом з біоетики в Києві 2001 р., та «Науково-практичних рекомендацій з утримання лабораторних тварин та роботи з ними» (Кожем'якін Ю. М., 2002). Комісією з біоетичної експертизи Інституту біології тварин НААН (протокол № 64 від 3 жовтня 2017 року) не виявлено порушень морально-етичних норм під час проведення дослідів із тваринами.

Для досліджень використовували цільну кров, еритроцити, сироватку та плазму крові, які отримували загальноприйнятими методами.

Дослідження гематологічних параметрів проводили за допомогою автоматичного гематологічного аналізатора (Orphee Mythic 18 (Швейцарія). Підготовку зразків крові здійснювали їх додаванням у пробірки Terumo Europe N.V. (Бельгія), які містили антикоагулянт ЕДТА-К2.

У експериментальних зразках визначали: активність холінестерази (ХЕ) за методом описаним А. І. Карпищенком (2002); каталази (КАТ, КФ 1.11.1.6) за методом, описаним М. А. Корольок (1988); супероксиддисмутази (СОД, КФ 1.15.1.1.) за методом, описаним Є. Є. Дубініною зі співавт. (1983); глутатіонпероксидази (ГПО, КФ 1.11.1.9) за методом, описаним В. М. Моїним (1986); глутатіонредуктази (ГР, КФ 1.6.4.2) за методом I. Carlberg et al. (1975); глутатіон-S-трансферази (GST, КФ 2.5.1.18) за методом W. H. Habig (1974). Вміст глутатіону відновленого (GSH) вимірювали методом P. J. Hissin et al. (1976); гідропероксидів ліпідів (ГПЛ) за методом В. Б. Гаврилова зі співавт. (1983), вміст ТБК-активних продуктів (ТБК-АП) за методом, описаним Є. Н. Коробейниковою зі співавт. (1989). Резистентність еритроцитів до кислотного гемолітика досліджували за методом А. І. Терскова і М. І. Гітельзона (1959). Вміст лігандних форм гемоглобіну (Hb) визначали методом, описаним О. І. Білим зі співавт. (1998). Дослідження спорідненості Hb до O₂ проводили спектрофотометричним методом у модифікації Ю. Г. Іванова (1975) за допомогою побудови кривих оксигенації.

Отримані результати статистично опрацьовували за допомогою комп'ютерного пакета програм OriginPro 8.5 (Microcal, США) з використанням t-критерію Стьюдента та однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA). Вірогідно різними вважали результати при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Прооксидантно-антиоксидантна рівновага та функціональний стан крові щурів за дії ХПФ дозою 50 мг/кг. У гемолізатах еритроцитів щурів найбільш вагомими зміни більшості досліджуваних параметрів відбувались упродовж 15–30 хв після отруєння ХПФ (рис. 2). Відомо, що ХПФ здатен спричиняти зсув прооксидантно-антиоксидантного балансу в бік утворення прооксидантів, що призводить до виникнення оксидативного стресу в клітинах організму, навіть за відсутності змін активності індикаторного ензиму – ХЕ (Padilla S., 1996).

Визначено зростання вмісту ТБК-АП у гемолізатах еритроцитів щурів у групах Д2 і Д3 на 80 та 139 % та збільшення вмісту ГПЛ у групі Д4 на 45 %, порівняно з контролем. За введення ХПФ дозою 50 мг/кг зафіксовано зростання інтенсивності процесів ліпопероксидації, про що свідчить збільшення вмісту ТБК-АП на тлі поступового зниження вмісту іншого антиоксидантного компонента еритроцитів – GSH, порівняно з початковим вмістом цього тіолу. Зміни перелічених показників

були найбільш виражені при короткотривалій (упродовж 1 год) інтоксикації ХПФ. Зафіксовано зниження вмісту GSH у групі Д4 на 47 % на тлі зростання вмісту ТБК-АП у групах Д2, Д3, Д4 – на 128, 176 та 67 % відповідно, порівняно з показниками групи Д1. Крім того, виявлено зниження активності ГПО на 67 % у групі Д2 відповідно, на тлі зростання активності КАТ у групі Д4 на 9 % порівняно з контролем.

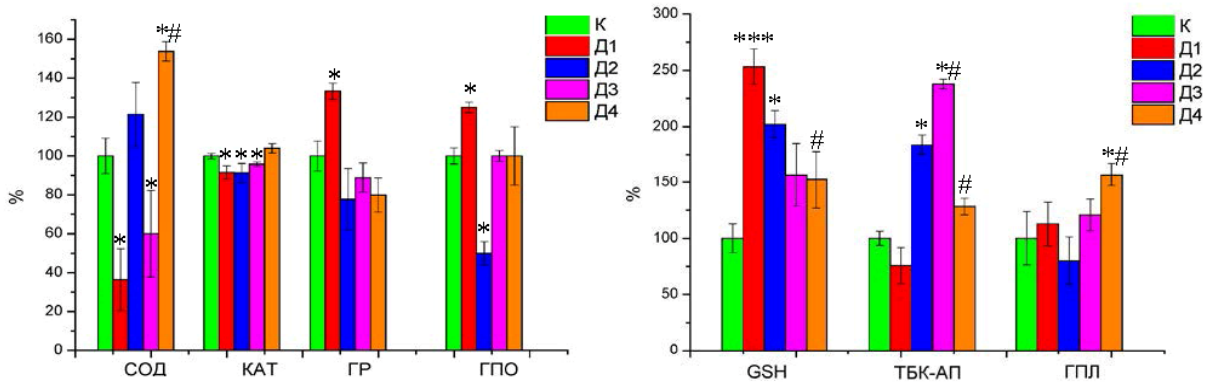


Рис. 2. Прооксидантно-антиоксидантні параметри еритроцитів щурів через 15 (Д1), 30 (Д2), 45 (Д3), 60 (Д4) хв після введення ХПФ дозою 50 мг/кг ($m \pm M$, $n=5$).

Примітка. На цій і наступних діаграмах: # – різниця достовірна за результатами однофакторного ANOVA-аналізу порівняно з групою Д1. На цій і наступних діаграмах різниця достовірна порівняно з контрольною групою: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$.

Зафіксовано збільшення кількості еритроцитів на 9 %, вмісту загального гемоглобіну на 11 % та показника гематокриту на 6 % ($p < 0,05$) у групі Д1 порівняно з контролем. Показано зростання максимального відсотка зруйнованих еритроцитів у групі Д1 до 53 %, натомість у групі Д3, виявлено зниження цього показника до 34 % ($p < 0,05$), порівняно з контролем без зміни часу гемолізу (рис. 3 А). У групі Д1 знизилась спорідненість гемоглобіну до O_2 (рис. 3 Б), про що свідчить збільшення значення коефієнта Гілла.

Спостерігали різноспрямований характер відповіді АОС на спричинене окисне пошкодження: мобілізацію (активність через 15 хв) та ознаки виснаження (деадаптація), які були найбільш виражені на 45 і 60-й хвилині. Водночас зафіксували зростання відсотка гемолізу еритроцитів (найвищий через 15 хв) на тлі зниження спорідненості гемоглобіну до O_2 . (рис. 3 А), що підтверджує зазначений характер адаптивної відповіді.

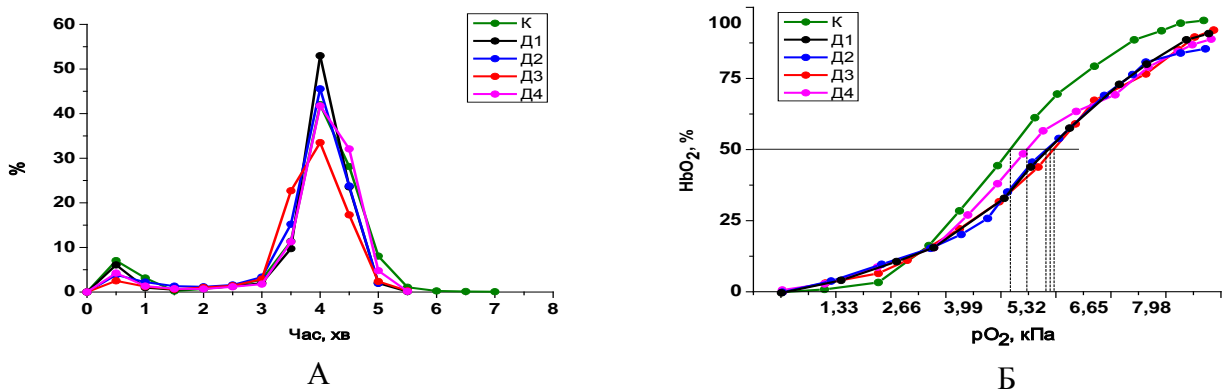


Рис. 3. Типові еритрограми (А) та криві насичення гемоглобіну крові щурів киснем через 15 (Д1), 30 (Д2), 45 (Д3), 60 (Д4) хв (Б) після введення ХПФ дозою 50 мг/кг ($M \pm m$, $n=5$).

Прооксидантно-антиоксидантна рівновага та функціональний стан крові щурів за дії ХПФ дозою 30 мг/кг. Показано зростання вмісту ТБК-АП у групах Д2, Д3, Д4 на , 21, 51, 42% відповідно на тлі зростання у вказаних групах активності ГР на 67, 149, 120 % порівняно з показниками групи Д1 (рис. 4).

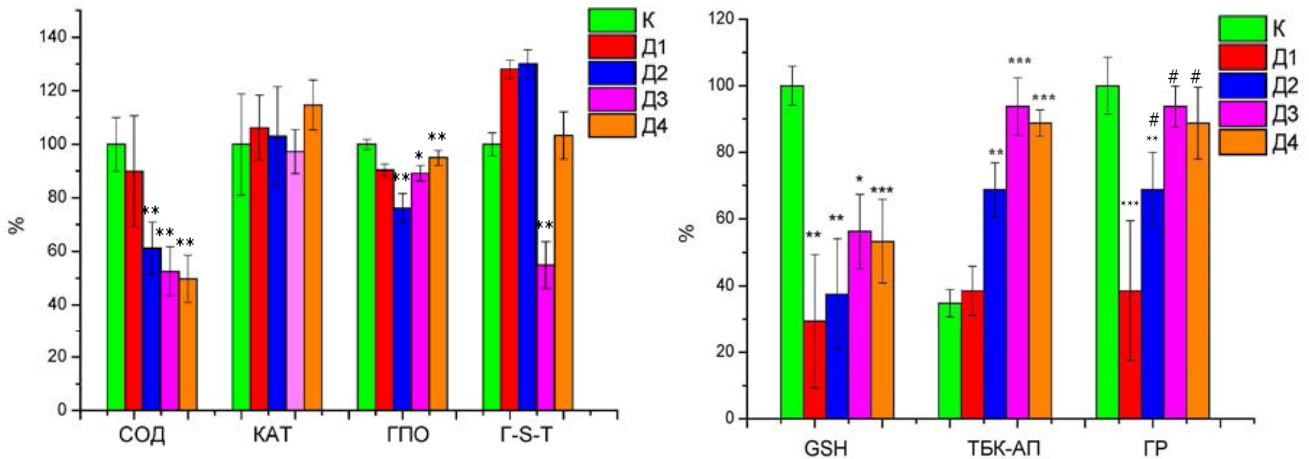


Рис. 4 Прооксидантно-антиоксидантні параметри еритроцитів щурів через 1 (Д1), 3 (Д2), 6 (Д3), 10 (Д4) діб після введення ХПФ дозою 30 мг/кг ($M \pm m$, $n=5$).

За гострого отруєння щурів ХПФ дозою 30 мг/кг у різні досліджувані періоди спостерігали зміну біохімічних і гематологічних показників еритроцитів крові щурів, зокрема, зниження активності СОД на 38, 47 і 50 % у групах Д2, Д3, Д4 відповідно, порівняно з контролем. Виявлено зростання вмісту ТБК-АП на 3, 6 й 10-ту доби на 39, 157 і 125 % відповідно. Зафіксовано зниження вмісту GSH на 67, 56, 43 і 48 % у групі Д1, Д2, Д3, Д4 відповідно, порівняно з контролем.

Дослідження резистентності мембран еритроцитів до гемолізу (рис. 5 А) показало скорочення часу максимального гемолізу на 1-шу добу після введення тваринам ХПФ дозою 30 мг/кг на 24 % ($p < 0,05$) – з 4,1 до 3,1 хв.

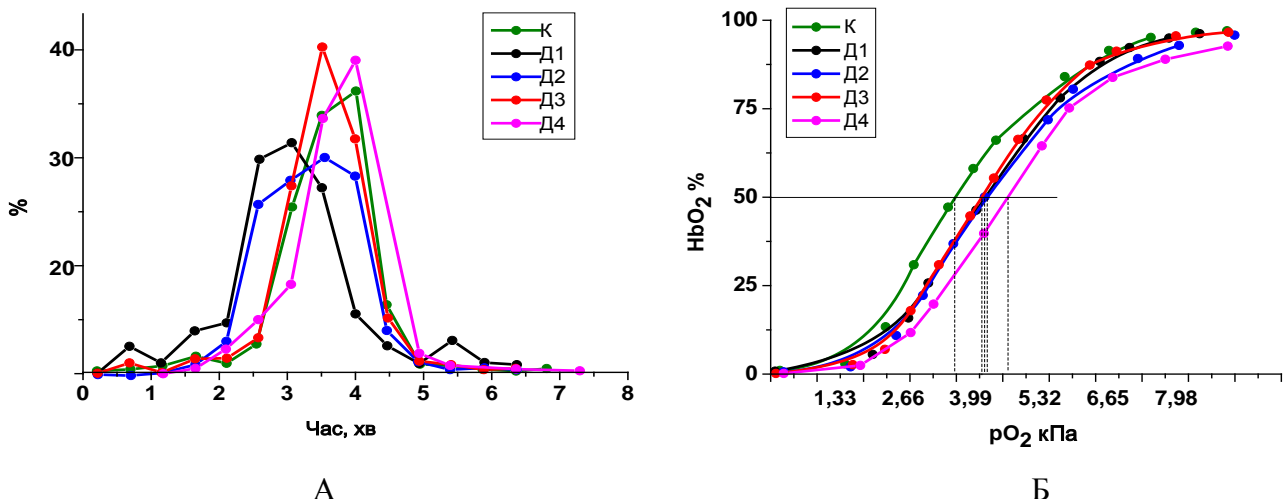


Рис. 5. Типові еритрограми (А) та криві насичення гемоглобіну крові щурів киснем через 1 (Д1), 3 (Д2), 6 (Д3), 10 (Д4) діб (Б) після введення ХПФ дозою 30 мг/кг ($M \pm m$, $n=5$).

Окрім цього, скорочувався час тотального гемолізу еритроцитів у групах Д2 і Д3 на 14 та 5 % ($p < 0,05$) відповідно порівняно з контролем. Виявлено зростання

показника коефіцієнта Гілла у групах Д1, Д2, Д4 на 18, 20 і 30 % ($p < 0,05$) відповідно (рис. 5 Б).

Таким чином, введення щурам ХПФ дозою 30 мг/кг призводило до порушення прооксидантно-антиоксидантного балансу еритроцитів їх крові та супроводжувалось змінами показників тотального і максимального гемолізу й параметрів кисневої ємності гемоглобіну.

Прооксидантно-антиоксидантна рівновага та функціональний стан крові щурів за дії ХПФ дозою 70 мг/кг і комплексу вітамінів А та Е. Через 12 год після інтоксикації ХПФ (група Д1) виявлено істотне зростання вмісту ТБК-АП – на 39 %, ГПЛ – на 32 %, активності КАТ – на 34 % на тлі зниження активності ГПО та ГР на 70 і 27 % відповідно порівняно з контролем (рис. 6) Рівень GSH за цих умов знижувався на 15 %. Введення лише комплексу вітамінів А та Е (група Д2) спричинило інший характер змін у системі про/антиоксиданти. Зокрема, активність СОД та ГР знижувалась на 66 і 47 % відповідно, на тлі помірної активності КАТ. Однак така модуляція ензиматичної активності зумовлювала посилену утилізацію ТБК-АП, про що свідчить зниження їх вмісту на 51 і 32 % порівняно з групою Д1 та контролем відповідно. За сумісного введення ХПФ та комплексу вітамінів (група Д3) вміст ГПЛ був нижчим на 16 % порівняно з групою Д1 та незначно вищим порівняно з контролем. Аналогічний характер змін констатовано щодо ТБК-АП, вміст яких зменшувався на 39 і 15 % порівняно з групою Д1 і контролем. Такі зміни можуть свідчити про виникнення помірної прооксидантної активації з вираженим антиоксидантним ефектом, судячи з посилення утилізації ТБК-АП та зростання вмісту GSH на 9 % порівняно з його контрольним рівнем.

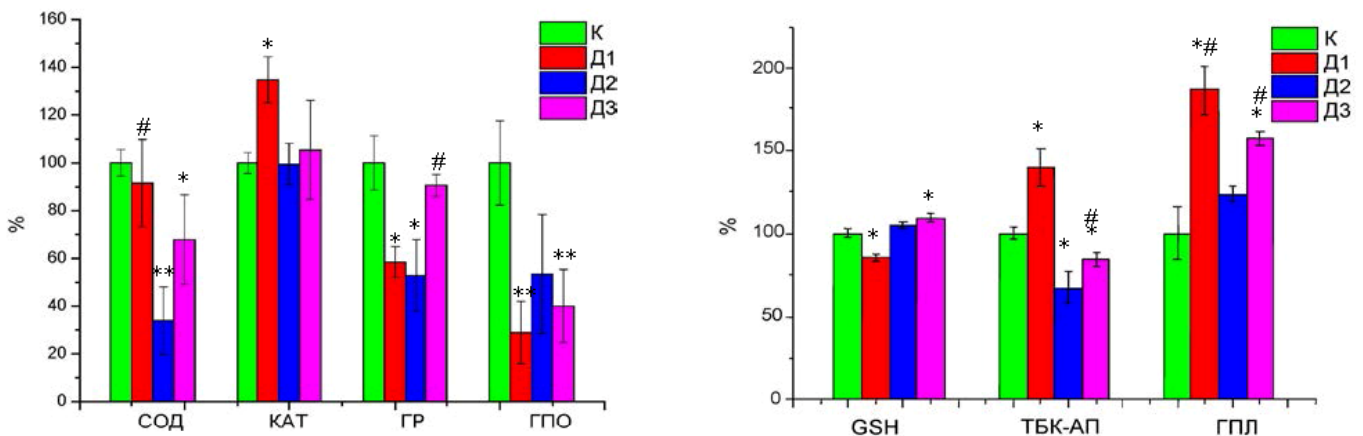


Рис. 6. Прооксидантно-антиоксидантні параметри еритроцитів щурів за введення ХПФ дозою 70 мг/кг та дії комплексу вітамінів А та Е ($M \pm m$, $n=5$).

Примітка: К – контрольна група щурів, яким вводили чисту соняшникову олію за 12 год до забору зразків; Д1 – група щурів, яким вводили ХПФ дозою 70 мг/кг за 12 год до забору зразків; Д2 – група щурів, яким вводили вітамін А 100 000 МО та вітамін Е (0,1 г/кг) за 12 год до забору зразків; Д3 – група щурів, яким вводили ХПФ дозою 70 мг/кг разом із вітамінами А 100 000 МО та Е (0,1 г/кг) за 12 год до забору зразків.

У щурів групи Д1 виявлено зниження загальної кількості еритроцитів та вмісту загального гемоглобіну на 13 та 7,9 % порівняно з контролем. Зафіксовано збільшення відсотка максимального гемолізу еритроцитів до 33 % у групі Д1, до 39 % у групі Д2, та до 33 % ($p < 0,05$) в групі Д3 порівняно з контрольними

значеннями (рис. 7 А). У групах Д1 та Д3 показано зростання показника P_{75} на 12 % та 19 % відповідно. У групі Д3 спостерігали збільшення показника P_{90} до 37 % порівняно з контролем.

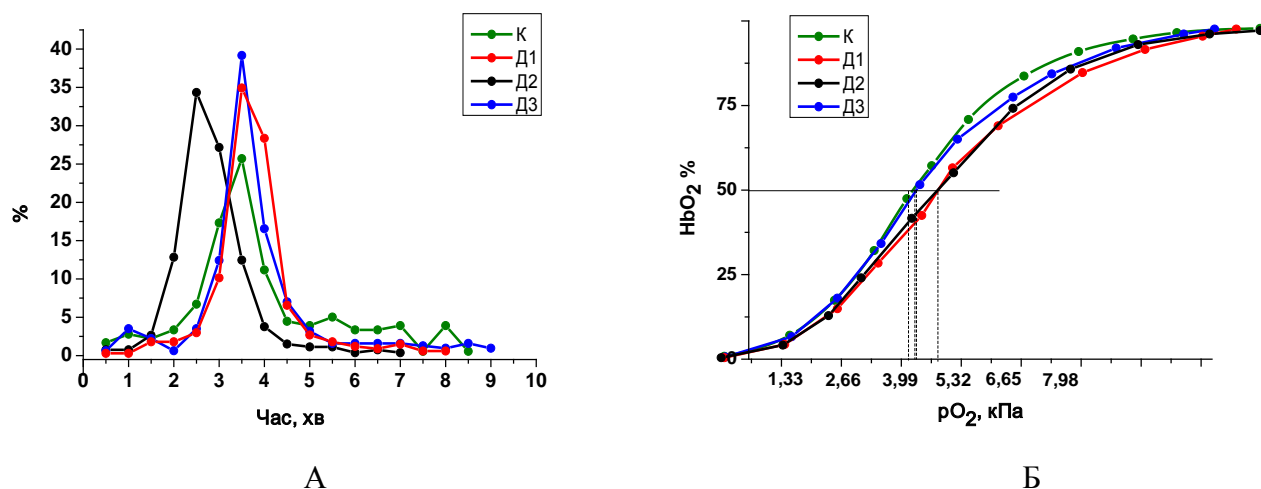


Рис. 7. Типові еритрограми (А) та криві насичення гемоглобіну крові щурів киснем (Б) за дії ХПФ дозою 70 мг/кг та комплексу вітамінів А та Е ($M \pm m$, $n=5$).

Виявлені зміни свідчать про зниження спорідненості гемоглобіну крові щурів як за безпосередньої дії ХПФ, так і за введення ХПФ разом із комплексом вітамінів А та Е. За спільної дії цих чинників відбувається часткова нейтралізація ефекту ХПФ на рівні мембранних структур, функції гемоглобіну та системи глутатіону еритроцитів.

Прооксидантно-антиоксидантна рівновага і функціональний стан крові щурів за попереднього введення комплексу вітамінів А та Е за 5 діб до інтоксикації ХПФ дозою 90 мг/кг. Збільшення дози ХПФ (90 мг/кг) і тривалості його дії (24 год) показало такі зміни в системі ПОЛ/АОС: за дії ХПФ (група Д1) спостерігали зростання активності СОД – на 44 %, КАТ – на 43 % та тлі зниження ГПО та Г-S-T на 55 і 27 % відповідно порівняно з контролем (рис. 8). Незважаючи на зростання активності СОД і КАТ, зростав вміст ТБК-АП і ГПЛ у 2,6 раза та на 81 % відповідно. Водночас виявлено на 27 % нижчий вміст GSH і порівняно з контролем, що може свідчити про недостатню елімінацію продуктів окисного пошкодження, зокрема ПОЛ. У свою чергу комплекс вітамінів А та Е (група Д2) зумовлював посилену елімінацію продуктів ГПЛ, що виявлялось у зниженні їх вмісту (на 56 %) за умов зниження активності КАТ – на 30 %, та співмірній із контролем активності ГПО порівняно з показниками групи Д1. Встановлені зміни можуть свідчити про нижчий ступінь окисного пошкодження клітинних компонентів еритроцитів у результаті вільнорадикальних процесів. Зокрема, у еритроцитах щурів групи Д2 спостерігався співмірний із контролем рівень GSH на тлі зростання активності ГПО на 103 % порівняно з групою Д1. Характер відповіді АОС еритроцитів щурів на введення ХПФ дозою 90 мг/кг (група Д3) на тлі попереднього введення комплексу вітамінів А та Е за 5 діб інтоксикації ХПФ відрізнявся від відповіді антиоксидантної системи еритроцитів за дії комплексу вітамінів у групі Д2. Незважаючи на те, що вміст ТБК-АП збільшувався (на 41 %),

рівень ГПЛ був на 23 % нижчим порівняно з показниками групи Д1. Активність усіх досліджуваних ензимів була менше виражена і наближалася до контрольних значень на тлі зниження активності СОД. Рівень GSH у групі Д3 знижувався на 34 % на тлі збільшення активності Г-S-T на 30 % порівняно з показниками Д2. Характер змін у цій серії досліджень свідчить про кращу компенсацію окисного пошкодження порівняно з групою Д2. Введення вітамінного комплексу забезпечувало більш ефективну відповідь АОС на інтоксикацію ХПФ.

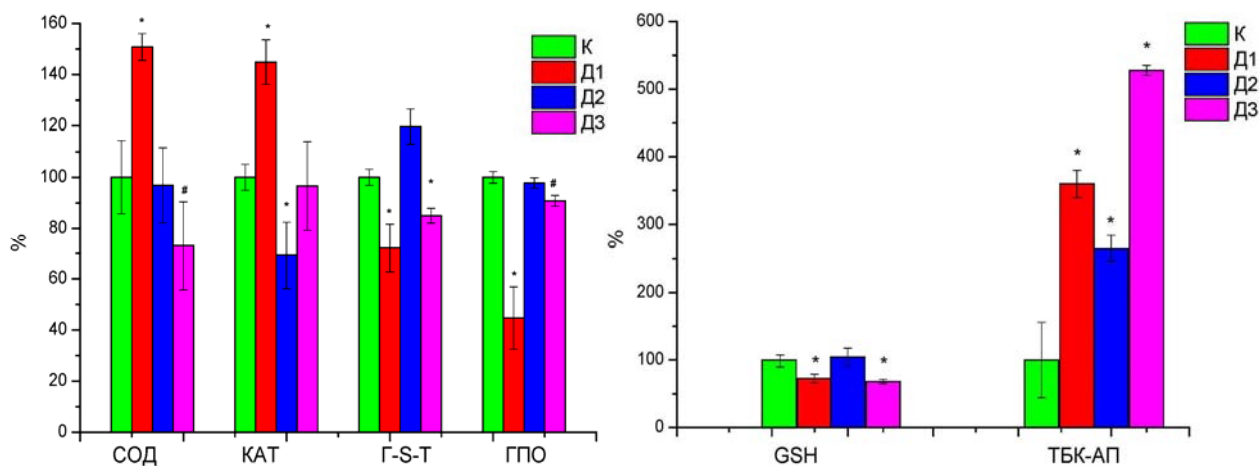
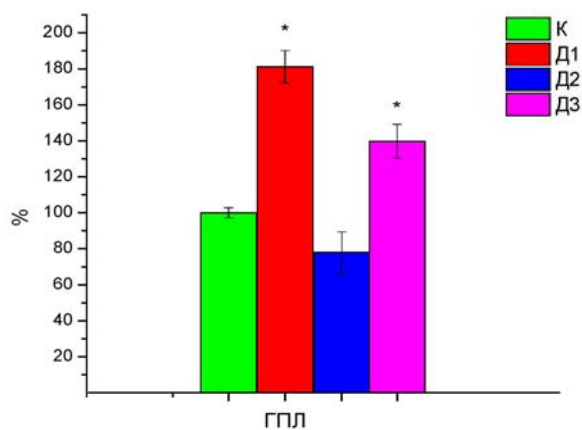


Рис. 8. Прооксидантно-антиоксидантні параметри еритроцитів щурів за дії ХПФ дозою 90 мг/кг та комплексу вітамінів А та Е впродовж 5 діб (M±m, n=5).



Зафіксовано зростання загальної кількості еритроцитів у групі Д1 на 13 % ($p < 0,05$) та вмісту загального гемоглобіну на 6,3 % ($p < 0,05$) порівняно з контролем. Виявлено зростання кількості гемолізованих еритроцитів у групі Д1 на 17 % ($p < 0,05$) і зниження цього показника на 16,1 % у групі Д2 порівняно з показниками тварин контрольної групи (рис. 9 А).

Виявлено зростання значень показника P_{75} у групах Д1 та Д3 на 85 і 76 % ($p < 0,05$) відповідно (рис. 9 Б). Водночас у цих групах зростали значення показника P_{90} (у групі Д1 та Д3), на 42 і 44 % ($p < 0,05$) відповідно, порівняно з контролем.

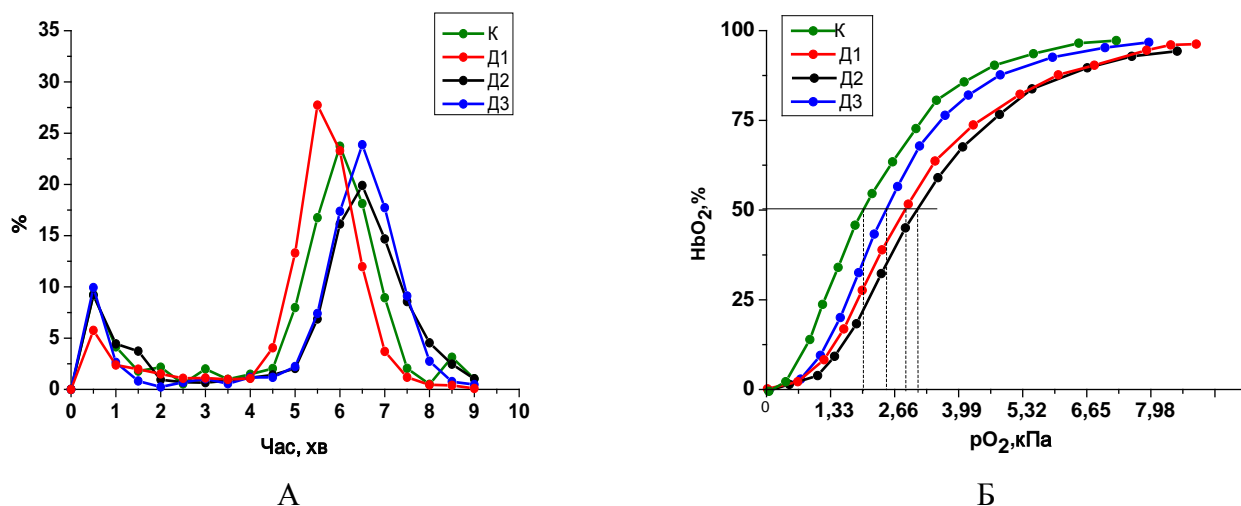


Рис. 9. Типові еритрограми (А) та криві насичення гемоглобіну крові щурів киснем (Б) за дії ХПФ дозою 90 мг/кг і введення комплексу вітамінів А та Е впродовж 5 діб ($M \pm m$, $n=5$).

Таким чином, за дії ХПФ дозою 90 мг/кг на тлі попереднього введення комплексу вітамінів А та Е відбувалася нормалізація окремих досліджуваних показників АОС, проте коригувальний ефект обраної дози, кратності та введених вітамінів був менше виражений порівняно з введенням вітамінів, використаним у попередній серії досліджень. Натомість, продемонстровано, що за обраної схеми досліджень застосовані вітаміни А та Е забезпечують ефективніше підтримання стабільності еритроцитарних мембран порівняно з одноразовим введенням цих сполук безпосередньо після інтоксикації.

Загалом, дисертаційні дослідження показали, що за обраних експериментальних схем інтоксикація щурів ХПФ призводила до різноспрямованого характеру змін основних показників у системі прооксиданти/антиоксиданти еритроцитів. Водночас отруєння ХПФ супроводжувалося зниженням резистентності еритроцитів до гемолізу та зниження спорідненості гемоглобіну до O₂. За умов коригування відзначених порушень вітамінами А та Е відбувалася нормалізація окремих показників системи антиоксидантного захисту та резистентності мембран еритроцитів до кислотного гемолізу. Узагальнена гіпотетична схема моделі гематотоксичної дії ХПФ представлена на рис. 10.

Зображена схема демонструє, що ХПФ здатний впливати на прооксидантно-антиоксидантну рівновагу в клітинах еритроцитів. Підтвердженням цього може бути різноспрямований характер змін окремих показників АОС за різної дози ХПФ. Водночас збільшення вмісту ТБК-АП на тлі зниження вмісту GSH свідчить про інтенсифікацію процесів ПОЛ у еритроцитах за дії цієї сполуки. Зниження стійкості еритроцитів до гемолізу є наслідком порушення цілісності їх клітинних мембран, унаслідок чого посилюється їх руйнування.

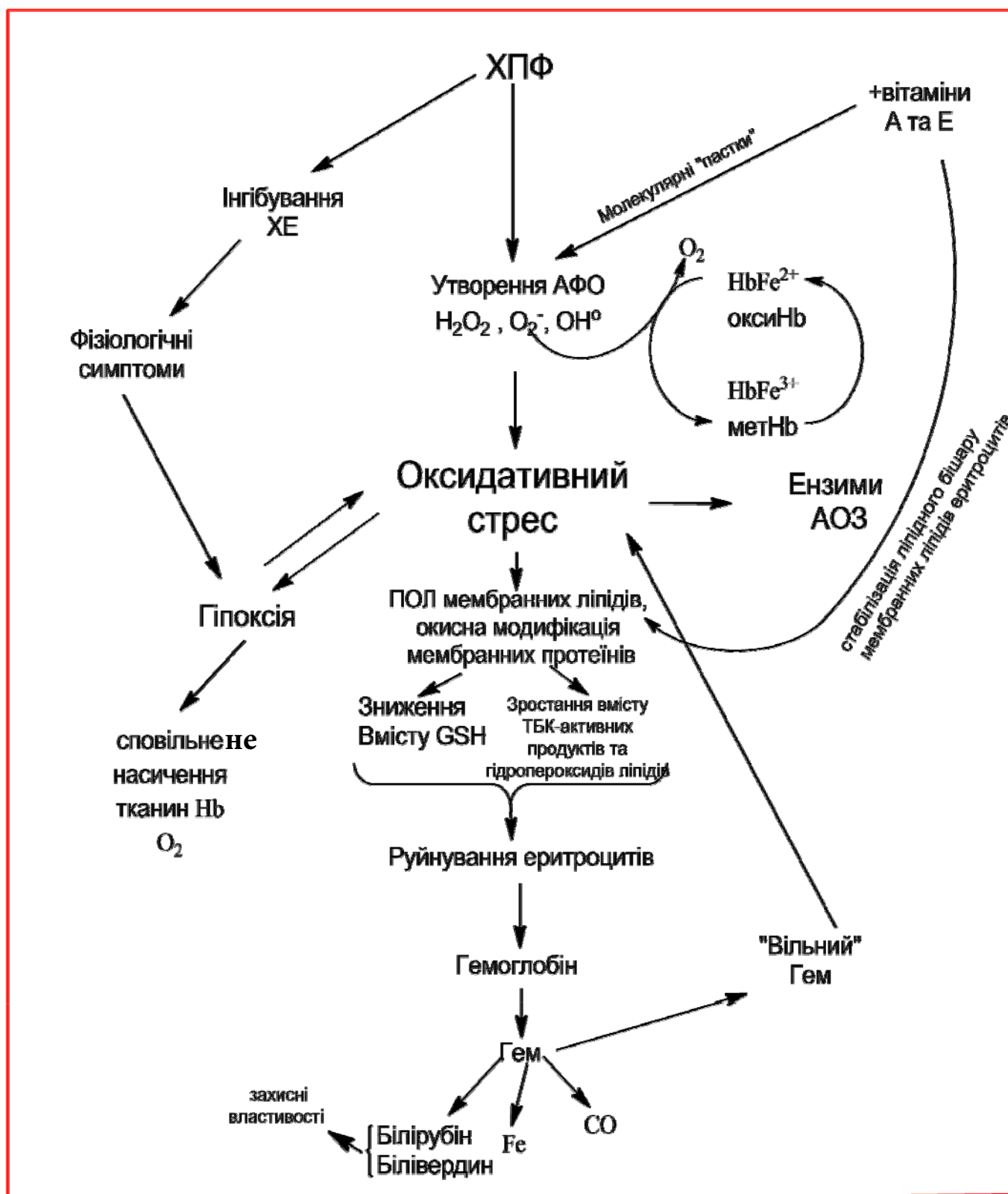


Рис. 10. Узагальнена гіпотетична схема моделі гематотоксичної дії ХПФ.

Зменшення кількості еритроцитів спричиняє зниження вмісту гемоглобіну та опосередковано впливає на процеси його автоокиснення, що призводить до порушення газотранспортних властивостей цього гемопротейну. Своєю чергою вітаміни А та Е забезпечували утилізацію надмірної кількості АФО та опосередковано підтримували нормальну інтенсивність процесів ПОЛ.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі отримано нові експериментальні дані про окремі біохімічні й гематологічні порушення прооксидантно-антиоксидантного балансу, зниження стійкості мембран еритроцитів до кислотного гемолізу, зниження кисневої ємності гемоглобіну та зміни кількості формених елементів крові у щурів за умов їх гострої інтоксикації різними дозами хлорпірифосу. Експериментально обґрунтовано застосування комплексу вітамінів А та Е з метою корекції порушень прооксидантно-антиоксидантної рівноваги еритроцитів крові, зниження інтенсивності прооксидантних процесів, які виникають у крові щурів за інтоксикації хлорпірифосом. Вперше показано, що короткотривале застосування комплексу вітамінів А та Е як за самостійної дії, так і в поєднанні з інтоксикацією хлорпірифосом зумовило стабілізацію структури і функцій еритроцитів.

1. Токсична дія хлорпірифосу за його введення щурам дозами 30 мг/кг (1, 3, 6, 10-та доба), 50 мг/кг (15, 30, 45, 60 хв), 70 мг/кг (12 год) та 90 мг/кг (24 год), тобто, за усіх обраних моделей інтоксикацій була підтверджена вірогідним зниженням холінестеразної активності у крові щурів.
2. За гострого отруєння щурів хлорпірифосом дозами 30 мг/кг (1, 3, 6, 10-та доба), 50 мг/кг (15, 30, 45, 60 хв), 70 мг/кг (12 год) і 90 мг/кг (24 год) виникав дисбаланс активності ензимів антиоксидантної системи еритроцитів, що характеризувались зниженням активності супероксиддисмутази, глутатіонпероксидази, глутатіонредуктази на тлі зростання активності глутатіон-S-трансферази за дії хлорпірифосу дозою 30 мг/кг; зниження активності супероксиддисмутази та глутатіонредуктази з одночасним зростанням активності глутатіонпероксидази за дії хлорпірифосу дозою 50 мг/кг; зростанням активності каталази на тлі зниження активності глутатіонредуктази та глутатіонпероксидази за дії хлорпірифосу дозою 70 мг/кг; зниженням активності супероксиддисмутази і каталази на тлі зростання глутатіонпероксидази та глутатіон-S-трансферази за дії хлорпірифосу дозою 90 мг/кг.
3. Інтоксикація щурів хлорпірифосом дозами 30 мг/кг (1, 3, 6, 10-та доба), 50 мг/кг (15, 30, 45, 60-та хв), 70 мг/кг (12 год), 90 мг/кг (24 год) супроводжувалась зниженням вмісту глутатіону відновленого у еритроцитах щурів. Натомість, за цих умов встановлено зростання у еритроцитах вмісту кінцевих продуктів пероксидного окислення ліпідів – ТБК-активних продуктів.
4. Параметри кислотних еритрограм, зокрема час максимального та тотального гемолізу, відсоток гемолізованих еритроцитів за дії хлорпірифосу дозами 30 мг/кг (1, 3, 6, 10-та доба), 70 мг/кг (12 год) та 90 мг/кг (24 год) після інтоксикації щурів цією сполукою, свідчать про зниження стабільності мембран еритроцитів.
5. Інтоксикація щурів хлорпірифосом дозами 30 мг/кг (1, 3, 6, 10-та доба), 50 мг/кг (15, 30, 45, 60 хв), 70 мг/кг (12 год) і 90 мг/кг (24 год) призводила до зниження спорідненості гемоглобіну до кисню. Найсуттєвіший вплив інтоксикації на параметри оксигенації гемоглобіну було зафіксовано за дії хлорпірифосу дозою 30 мг/кг.
6. Інтоксикація щурів хлорпірифосом дозою 90 мг/кг на тлі 5 добового введення комплексу вітамінів А та Е супроводжувалась зниженням у еритроцитах каталазної (на 33 %) та супероксиддисмутазної (на 51 %) активності за одночасного зростання

активності глутатіон-S-трансферази та глутіонпероксидази на 17 % та 103 % відповідно, порівняно з еритроцитами інтоксикованих щурів без попереднього введення їм вітамінного комплексу.

7. Введення щурам комплексу вітамінів А та Е безпосередньо після інтоксикації щурів хлорпірифосом дозою 70 мг/кг (12 год) призводило до зниження інтенсивності прооксидантних процесів, інтенсифікації системи антиоксидантного захисту, що виражалось у зростанні активності глутатіонредуктази на 54 %, зниження вмісту гідропероксидів ліпідів на 16 % та ТБК-активних продуктів на 39 %, порівняно з еритроцитами інтоксикованих хлорпірифосом щурів. Застосування комплексу вітамінів А та Е безпосередньо після інтоксикації щурів хлорпірифосом проявляло кращий коригувальний ефект на досліджувані параметри антиоксидантної системи еритроцитів порівняно з попереднім 5-ти добовим введенням цього комплексу.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Салига Ю. Т., **Росаловський В.П.** До вивчення деяких параметрів системи антиоксидантного захисту та перекисного окиснення ліпідів у крові щурів за токсичної дії хлорпірифосу. Український морфологічний альманах. 2012. Т. 10. № 3. С. 94–95. *(Здобувач здійснив забір крові та провів дослідження показників антиоксидантної системи крові щурів).*
2. Салига Ю., **Росаловський В.**, Федяков Р. Глутатіонова система еритроцитів щурів, інтоксикованих хлорпірифосом. Вісник Львівського університету. Серія біологічна. 2012. Т. 60. С. 99–104. *(Здобувач здійснив забір крові, підготовку зразків та визначення показників системи глутатіону).*
3. **Rosalovsky V. P.**, Grabovska S. V., Salyha Yu. T. Biochemical and haematological changes in peripheral blood of rats exposed to chlorpyrifos: protective effect of vitamins A and E combination. Біологічні Студії / Studia Biologica. 2015. V. 9. № 3. P. 57–68. *(Здобувач здійснив дослідження показників антиоксидантної системи еритроцитів та параметрів гематологічного профілю щурів).*
4. **Rosalovsky V. P.** Hematological indices of rats during the first hour after chlorpyrifos exposure. Biological Bulletin of V. Chmeln. Melitopol State Ped. Univ. 2015. № 1. P. 123–132.
5. **Rosalovsky V. P.**, Grabovska S. V., Salyha Yu. T. (Changes in glutathione system and lipid peroxidation in rat blood during the first hour after chlorpyrifos exposure. Ukr. Biochem. J. 2015. V. 87. № 5. P. 124–132. *(Здобувач провів визначення продуктів перексидного окиснення ліпідів, активності ензимів антиоксидантної системи, взяв участь у аналізі даних).*
6. **Росаловський В. П.** Вплив хлорпірифосу на деякі фізіолого-біохімічні і функціональні характеристики гемоглобіну крові щурів. Scientific Journal Science Rise. 2015. Т. 5 (1). № 10. С. 16–20.
7. Салига Ю. Т., **Росаловський В. П.** (Вплив хлорпірифосної інтоксикації на біохімічні та еритроцитарні параметри крові щурів. Вісник Львівського університету. Серія біологічна. 2016. № 71. С. 56–64. *(Здобувач провів забір крові та дослідження осмотичної резистентності еритроцитів).*

8. **Росаловський В. П.** Кисень-транспортна функція гемоглобіну щурів за гострої і хронічної інтоксикації хлорпірифосом у різних дозах. Біологічні Студії / *Studia Biologica*. 2017. Т. 11. № 1. С. 51–58.
9. **Росаловський В. П.** Вплив 5-добового введення вітамінів А та Е на стан антиоксидантної системи еритроцита та гематологічні показники крові щурів, інтоксикованих хлорпірифосом. Біологія тварин. 2017. Т. 19. № 2. С. 106–114.
10. **Росаловський В. П.** Дослідження дії ХПФ на деякі гематологічні показники крові щурів. «Біологія від молекули до біосфери» Матеріали VII Міжнародної конференції молодих учених 2012 (20-23 листопада, м. Харків, Україна) С. 59.
11. **Rosalovsky V., Salyha Y.** New biochemical and physiological aspects of chlorpyrifos neurotoxicity (49th Congress of the European Societies of Toxicology, EUROTOX 2013 (1-4 Sep. 2013, Interlaken, Switzerland) *Toxicology Letters* 2013 P. S 200. *(Здобувач брав участь у виконанні експериментальної частини дослідження та представляв матеріали на конференції у вигляді стендової доповіді).*
12. Салига Ю. Т., **Росаловський В. П.**, Грабовська С. В. Нейротоксичність фосфорорганічних пестицидів екологічні і медико-біологічні аспекти IV. Всеукраїнський з'їзд екологів з міжнародною участю. (25-28 вересня 2013, Вінниця, Україна). С. 413–415 *(Здобувач здійснив дослідження активності ензимів антиоксидантної системи та вміст продуктів пероксидного окиснення ліпідів)*
13. **Росаловський В. П.**, Грабовська С.В., Федяков Р.О., Салига Ю.Т. Механізм нейротоксичності фосфорорганічних сполук: роль оксидативного стресу. Матеріали VI міжнародної конференції молодих учених «Біорізноманіття. Екологія. Адаптація. Еволюція.» (13-17 травня 2013, Одеса, Україна) С. 189. *(Здобувач виконав дослідження ензиматичних та неензиматичних складових системи антиоксидантного захисту).*
14. **Росаловський В. П.**, Салига Ю. Т. Стан системи антиоксидантного захисту та пероксидного окиснення ліпідів в крові та головному мозку щурів за інтоксикації хлорпірифосом. XI Український біохімічний конгрес (6-10 жовтня 2014 р., м. Київ, Україна) *Ukr. Biochem. J.* Т. 86. № 5. (Suppl. 1) С. 49–50. *(Здобувач виконав дослідження ензиматичної активності та стану пероксидного окиснення ліпідів у тканинах щурів).*
15. **Росаловський В.** Деякі показники периферичної крові щурів за хронічного впливу хлорпірифосу. X міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології» (8–11 квітня 2014 р. м. Львів, Україна) С. 40–41.
16. Салига Ю. Т., **Росаловський В. П.**, Грабовська С. В. Багатовекторність нейротоксичної дії хлорпірифосу. XIX з'їзд Українського фізіологічного товариства ім. П. Г. Костюка з міжнародною участю, присвячений 90-річчю від дня народження академіка П. Г. Костюка. Фізіологічний журнал. 2014, Т. 6. № 3. (Додаток) С. 49–50. *(Здобувач провів експериментальну частину дослідження та взяв участь у написанні тез).*
17. **Росаловський В. П.**, Салига Ю. Т. Киснева ємність гемоглобіну щурів за отруєння хлорпірифосом. «Актуальні проблеми сучасної біології, тваринництва та ветеринарної медицини». Біологія тварин, 2016. Т. 18. № 3. С. 180. *(Здобувач виконав дослідження кисневої ємності гемоглобіну, та здійснив статичну обробку даних, представив матеріали на конференції у вигляді усної доповіді).*

18. Salyha Y., Rosalovskyi V., Grabovska S. Organophosphate compounds: «old» neurotoxicants and new questions. VII Congress of the Ukrainian Society for Neuroscience, (June 7-11, 2017. Kyiv, Ukraine.) С. 51-52. *(Здобувач брав участь в аналізі та узагальненні результатів дослідження).*

АНОТАЦІЇ

Росаловський В. П. Порушення прооксидантно-антиоксидантної рівноваги і функціонального стану крові щурів за інтоксикації хлорпірифосом та їх коригування комплексом вітамінів А та Е. - Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія. – Інститут біології тварин НААН, Львів, 2018.

Дисертація присвячена дослідженню впливу хлорпірифосу на прооксидантно-антиоксидантний статус, фізико-хімічні та функціональні властивості компонентів крові білих лабораторних щурів лінії Вістар за умов гострої інтоксикації хлорпірифосом. На підставі аналізу отриманих результатів показано, що механізми токсичності хлорпірифосу не обмежуються лише його антихолінестеразною дією, а й пов'язані з порушенням окиснювально-відновного гомеостазу, зокрема, індукцією оксидативного стресу та змінами морфофункціональних характеристик клітин крові. Показано, що за обраних доз та тривалості введення хлорпірифос викликав зміни активності ензимів системи антиоксидантного захисту та показників осмотичної резистентності еритроцитів.

На основі отриманих експериментальних результатів обґрунтовано спосіб зниження спричиненої хлорпірифосом прооксидантної дії на еритроцити щурів та коригування гематотоксичних ефектів комплексом вітамінів А та Е в крові щурів, інтоксикованих цією сполукою. Виявлено, що окремі біохімічні показники пероксидного окиснення ліпідів, ензиматичних та неензиматичних компонентів системи антиоксидантного захисту крові, а також фізико-хімічні параметри еритроцитів (їх резистентність до кислотного гемолізу і спорідненість гемоглобіну з киснем) можуть бути використані як додаткові діагностичні ознаки хлорпірифосної інтоксикації.

Ключові слова: щурі, хлорпірифос, інтоксикація, кров, еритроцити, оксидативний стрес, антиоксидантна система, вітамін А, вітамін Е.

Росаловский В. П. Нарушение прооксидантно-антиоксидантного равновесия и функционального состояния крови крыс при интоксикации хлорпирифосом и их корректировка комплексом витаминов А и Е. - Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.04 – биохимия. – Институт биологии животных НААН, Львов, 2018.

Диссертация посвящена исследованию влияния хлорпирифоса на прооксидантно-антиоксидантный статус, физико-химические и функциональные свойства компонентов периферической крови белых лабораторных крыс линии Вистар при их острой интоксикации различными дозами хлорпирифоса. На основании анализа полученных результатов показано, что механизмы токсичности хлорпирифоса не ограничиваются только его антихолинэстеразным действием, также связаны с нарушением окислительно-восстановительного гомеостазу, в

частности, индукцией оксидативного стресса и изменениями морфофункциональных характеристик клеток крови. Показано, что при избранных дозах и длительности введения хлорпирифос вызвал изменения активности ферментов системы антиоксидантной защиты и показателей осмотической резистентности эритроцитов.

На основании полученных экспериментальных результатов обоснованно способ снижения вызванного хлорпирифосом прооксидантного воздействия на эритроциты крыс и корректировки гематотоксических эффектов комплексом витаминов А и Е в крови крыс интоксцированных этим соединением. Установлено, что отдельные биохимические показатели процессов перекисного окисления липидов, энзиматических и неэнзиматических компонентов системы антиоксидантной защиты крови, а также физико-химические параметры эритроцитов (их резистентность к кислотному гемолизу, сродство гемоглобина к кислороду) могут быть использованы как дополнительные диагностические признаки хлорпирифосной интоксикации.

Ключевые слова: крысы, хлорпирифос, интоксикация, периферическая кровь, эритроциты, оксидативный стресс, антиоксидантная система, витамин А, витамин Е.

Rosalovsky V. P. Disorders of prooxidant-antioxidant balance and functional state of rat blood under conditions of chlorpyrifos intoxication, and their treatment with vitamins A and E complex. - Manuscript.

Thesis for awarding PhD degree in specialty 03.00.04 – biochemistry – Institute of animal biology NAAS Ukraine, Lviv, 2018.

The use of various organophosphorus compounds (OPs) is increasing every year in agriculture, industry and household in Ukraine and worldwide. Due to the popularity of OPs, their both direct and indirect effects constitute a significant threat to humans and animals.

This study is dedicated to the effects, which acute exposure to different doses of chlorpyrifos (CPF) causes on the prooxidant-antioxidant status and on physico-chemical and functional properties of the rat peripheral blood components. The results show that mechanisms of CPF toxicity are not limited only to its anticholinesterase effect, but are also related to disturbance of the RedOx homeostasis, in particular, by oxidative stress induction and changes in morpho-functional characteristics of the blood cells. We also demonstrate the possibility to use the A and E vitamins complex as an antioxidant factor for correction of hematotoxic effects, and for prevention and mitigation of the prooxidant processes development in the rat blood after CPF exposure.

Studies were performed on 120 male white Wistar rats. 4 series of experiments were carried out.

The changes in individual biochemical and haematological parameters, caused by CPF exposure, indicate compensatory mechanisms of rat erythrocytes, which activation and direction is associated with the intensity and duration of oxidative stress have been observed.

It has been shown that, acute CPF exposure at doses of 30, 50, 70 and 90 mg/kg was accompanied in rats by a significant decrease in cholinesterase activity in blood plasma. It was found that acute intoxication with 30, 50, 70, and 90 mg/kg CPF significantly

influenced physical and chemical properties of rat erythrocyte membranes, manifested by the main parameters of erythrograms - particularly, by differences in the time of their total and maximal hemolysis. The observed changes are connected both with decreased osmotic resistance of erythrocyte membranes and with changes in the erythropoiesis intensity which makes up the etiological cause of the anemia development in the long term after intoxication. Since anemia is related to physical and chemical properties and functions of hemoglobin, the study of Hb affinity to O₂ constituted an important element of our work. We ascertain that 30, 70, and 90 mg/kg CPF exposure led to a decrease in hemoglobin affinity to O₂ in the erythrocytes, which was confirmed by the P₅₀, P₇₅, P₉₀ indices in the respective groups of animals. The obtained results allow to link the decreased hemoglobin affinity to O₂ with the intensification of the hypoxic effect of CPF exposure.

For correction of the pro/antioxidant imbalance, detected in erythrocyte we used A and E vitamin complex, containing these vitamins at doses 100 000 IU and 100 mg/kg, respectively. In different studies, the vitamin complex was administered at a single dose 12 hours after CPF intoxication or 5 days before poisoning.

Treatment with a complex of vitamins A and E, at a background of intoxication with 70 mg/kg CPF, increased the hemolysis resistance of erythrocyte membranes. At acute intoxication with 90 mg/kg CPF, after 5 days of daily introduction of vitamin complexes, we detected no corrective effects on the parameters of the erythrocytes antioxidant system. However, we found such corrective effect of the A and E vitamin complex on the maximum percentage of hemolysed erythrocytes after CPF intoxication.

Based on the obtained experimental results we substantiated a method for reducing chlorpyrifos-induced prooxidant activity and correcting hematotoxic effects (studied in peripheral blood of CPF-intoxicated rats) with a complex of vitamins A and E. Moreover, it has been established that individual biochemical parameters of the LPO processes, blood antioxidant system, and certain physicochemical parameters of red blood cells (resistance to acid hemolysis, content of ligand forms of hemoglobin and its affinity to oxygen) can be used as additional diagnostic features of CPF intoxication.

Key words: rats, chlorpyrifos, intoxication, peripheral blood, red blood cells, oxidative stress, antioxidant system, vitamin A, vitamin E.

ДЛЯ ПОДАТОК

Підписано до друку 17.05. 2018 р.
Гарнітура «Times New Roman»
Формат 60x84/16. Папір офсетний.
Умов.друк. арк. 0,9. Наклад 100 прим.
ТзОВ «Смарт Систем ЛТД»
79018, м. Львів, вул. О. Степанівни 45, корп. 3
тел./факс: (032) 2368236

