

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ ТВАРИН

Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису

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

Дисертація на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень.
Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на
відповідне джерело _____ В. П. Росаловський

Науковий керівник:

САЛИГА Юрій Тарасович

доктор біологічних наук,

старший науковий співробітник

Львів – 2018

АНОТАЦІЯ

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 (доктора філософії) за спеціальністю 03.00.04 – біохімія – Інститут біології тварин НААН України, Львів, 2018.

Щороку в Україні та світі у сільському господарстві, промисловості та побуті зростають масштаби застосування різноманітних сполук, у тому числі фосфорорганічних (ФОС). У зв'язку з масовістю застосування ФОС, прямі та опосередковані наслідки їх впливу становлять значну загрозу для людини і тварин.

Дисертацію присвячено дослідженню впливу хлорпірифосу (ХПФ) на прооксидантно-антиоксидантний статус, фізико-хімічні та функціональні властивості компонентів крові щурів за умов їх гострої інтоксикації різними дозами хлорпірифосу. На підставі отриманих результатів показано, що механізми токсичності хлорпірифосу не обмежуються лише його антихолінестеразною дією, але й пов'язані з порушенням окисно-відновного гомеостазу, зокрема індукцією оксидативного стресу й змінами морфо-функціональних характеристик клітин крові. Показано можливість застосування комплексу вітамінів А та Е як антиоксидантного чинника з метою коригувального впливу гематотоксичних ефектів, запобіганню і пом'якшенню розвитку прооксидантних процесів, які виникають у крові щурів за їх інтоксикації хлорпірифосом.

Дисертаційні дослідження були виконані на 120 самцях білих лабораторних щурів лінії Вістар. У ході роботи було проведено 4 серії експериментів.

Характер змін окремих біохімічних та гематологічних показників за дії ХПФ свідчить про наявність в еритроцитах щурів компенсаторних механізмів, активізація та спрямованість яких пов'язана з інтенсивністю та тривалістю оксидативного стресу.

У роботі показано, що гостре отруєння щурів хлорпірифосом у дозах 30, 50, 70 та 90 мг/кг супроводжується вірогідним зниженням холінестеразної активності у плазмі крові щурів. Встановлено, що гостра інтоксикація щурів ХПФ дозою 30 мг/кг призводить до: зниження у крові активності СОД на 3-тю, 6-ту та 10-ту добу на 37,8 %, 47,4 %, 50,3 % ($p < 0,01$) відповідно; зростання вмісту ТБК-активних продуктів в 1,25 раза, 1,57 раза та на 49 % ($p < 0,01$) відповідно; зниження вмісту GSH на 65,4 %, 41,2 %, 56,2 %, 53,3 % ($p < 0,01$) відповідно. Наслідком гострої інтоксикації щурів ХПФ дозою 50 мг/кг є: зниження активності СОД на 63,6 % через 15 хвилин після введення препарату; зростання вмісту ТБК-активних продуктів через 30 та 45 хвилин на 80 % та на 139 % відповідно; зростання вмісту GSH через 15 хв на 17,6 % та зниження через 30 хв на 44 % ($p < 0,05$). Встановлено, що гостра інтоксикація щурів ХПФ дозою 70 мг/кг спричиняє: зниження вмісту GSH на 15 % ($p < 0,01$); зростання вмісту ТБК-активних продуктів на 70,9 % ($p < 0,05$), а вмісту ГПЛ – на 80 % ($p < 0,05$). Виявлено, що гостра інтоксикація щурів ХПФ у дозах 30, 50, 70, 90 мг/кг суттєво впливає на фізико-хімічні властивості мембран еритроцитів, про що свідчать основні параметри еритрограм, зокрема відмінності часу їх тотального й максимального гемолізу. Встановлені зміни пов'язані як зі зниженням осмотичної резистентності еритроцитарних мембран, так і зі зміною напруженості еритропоезу, що є етіологічною причиною розвитку анемій у віддалені терміни після інтоксикації. Оскільки з розвитком анемій пов'язані фізико-хімічні властивості і функції гемоглобіну, важливим елементом роботи були дослідження спорідненості гемоглобіну до O_2 . Їхні результати свідчать, що за дії ХПФ у дозах 30, 70, та 90 мг/кг відбувається зниження спорідненості гемоглобіну еритроцитів до O_2 , що підтверджується показниками коефіцієнта

Гілла та значеннями P_{75} , P_{90} відповідних груп тварин. Отримані результати дозволяють пов'язати зниження спорідненості гемоглобіну до O_2 з посиленням гіпоксичного ефекту в організмі щурів за дії ХПФ.

Для коригування виявленого прооксидантно-антиоксидантного дисбалансу плазми крові та гемолізатів еритроцитів було використано комплекс вітамінів А та Е, що містив зазначені речовини у дозах 55 мг та 100 мг відповідно. Залежно від серії досліджень, введення вітамінного комплексу здійснювали як одноразово після інтоксикації ХПФ, так і впродовж 5 діб до отруєння цією сполукою.

Одноразове введення щурам обраного вітамінного комплексу на тлі гострого отруєння ХПФ дозою 70 мг/кг спричиняло уповільнення зростання в еритроцитах вмісту гідропероксидів ліпідів із 80 % за інтоксикації хлорпірифосом до 49 % ($p < 0,05$) за одночасної дії ХПФ і вітамінів порівняно з контрольними значеннями. За цих умов виявлено нормалізацію вмісту відновленого глутатіону до контрольних значень, що є підтвердженням стабілізації прооксидантно-антиоксидантної рівноваги в еритроцитах. Введення комплексу вітамінів А та Е на тлі хлорпірифосної інтоксикації дозою 70 мг/кг призводить до зростання резистентності мембран еритроцитів до гемолізу. За гострої інтоксикації щурів хлорпірифосом дозою 90 мг/кг, здійсненої після попереднього щодобового введення щурам протягом 5 діб комплексу вітамінів А та Е, коригувального впливу на показники антиоксидантної системи еритроцитів не виявлено, проте встановлено коригувальний вплив вітамінного комплексу вітамінів А та Е на максимальний відсоток гемолізованих еритроцитів за інтоксикації хлорпірифосом.

На основі отриманих експериментальних результатів обґрунтовано спосіб зниження хлорпірифос-індукованої прооксидантної дії та коригування гематотоксичних ефектів комплексом вітамінів А та Е у крові щурів, інтоксикованих цією сполукою. Встановлено, що окремі біохімічні показники процесів ПОЛ, АОС крові, а також фізико-хімічні параметри

еритроцитів (резистентність до кислотного гемолізу, вміст лігандних форм гемоглобіну і його спорідненість до кисню) можуть бути використані як додаткові діагностичні ознаки хлорпірифосної інтоксикації.

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

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. Р. 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 B. Chmeln. Melitopol State Ped. Univ. 2015. № 1. Р. 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. Р. 124–132. *(Здобувач провів*

визначення продуктів пероксидного 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 (Sep. 1–4, 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 фос-форорганічних 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 нейро-токсичної 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., **Rosalovsky 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).*

SUMMARY

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

Every year, the use of various organophosphorus compounds (OPs) is increasing 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 obtained 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 conducted. Observed 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. It has been shown that in rats acute CPF exposure at doses of 30, 50, 70 and 90 mg/kg was accompanied by a significant decrease in cholinesterase activity in blood plasma. We found that acute intoxication with 30 mg/kg CPF led to a decrease in the SOD activity in blood at 3rd, 6th and 10th day: by 37.8 %, 47.4 %, 50.3 %

($p < 0.01$), respectively; increase in TBARS- content by 1.25 times, 1.57 times and by 49 % ($p < 0.01$), respectively; decrease in GSH content by 65.4 %, 41.2 %, 56.2 %, 53.3 % ($p < 0.01$), respectively. Acute intoxication with 50 mg/kg CPF caused: a decrease (by 63.6 %) of SOD activity at 15 minutes after the exposure; an increase in the content of TBARS by 30 %, 45 %, 80 % and 139 %, respectively; GSH content increased by 17.6 % after 15 minutes, and decreased by 44 % after 30 minutes ($p < 0.05$). It was shown that acute intoxication of rats with 70 mg/kg CPF causes: a decrease in GSH content by 15 % ($p < 0.01$); an increase in the TBARS by 70.9 % ($p < 0.05$), and by 80 % in LHP ($p < 0.05$). 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 hemoglobin affinity to O_2 constituted an important element of our work. We found that 30, 70, and 90 mg/kg CPF exposure led to a decrease in hemoglobin affinity to O_2 in the erythrocytes, which was confirmed by the Hill, equation, P_{75} , and P_{90} indices in the respective groups of animals. The obtained results allow to link the decreased hemoglobin affinity to O_2 with the intensification of the hypoxic effect of CPF exposure.

For correction of the pro/antioxidant imbalance, detected in the blood plasma and erythrocyte hemolysates, 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 after CPF intoxication or 5 days before poisoning.

A single treatment with the vitamin complexes after acute CPF poisoning in a dose of 70 mg/kg lowered the increase of lipids hydroperoxide content in

erythrocytes after intoxication: from 80 % without treatment, up to 49 % ($p < 0.05$) while simultaneously acting with vitamins, both compared to control values. Under these conditions the content of reduced glutathione approached to the control values, thus confirming stabilization of the prooxidant-antioxidant balance in erythrocytes. 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, blood, red blood cells, hemoglobin, oxidative stress, antioxidant system, vitamin A, vitamin E.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ І ТЕРМІНІВ.....	14
ВСТУП.....	15
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	21
1.1. Загальна фізіолого-біохімічна і токсикологічна характеристика хлорпірифосу.....	21
1.2. Перебіг прооксидантно-антиоксидантних процесів у організмі тварин за дії хлорпірифосу.....	26
1.3. Вплив хлорпірифосу на гематологічні показники тварин.....	34
1.4. Способи корекції оксидативного стресу у тварин.....	39
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	45
2.1. Схема дисертаційних досліджень.....	45
2.2. Загальні принципи експериментів з лабораторними тваринами.....	47
2.3. Відбір експериментального матеріалу від лабораторних тварин.....	48
2.4. Біохімічні параметри, які досліджували у роботі.....	49
2.4.1. Активність холінестерази (КФ 3.1.1.8).....	49
2.4.2. Активність каталази (КФ 1.11.1.6).....	50
2.4.3. Активність супероксиддисмутази (КФ 1.15.1.1.).....	50
2.4.4. Активність глутатіонпероксидази (КФ 1.11.1.9).....	51
2.4.5. Активність глутатіонредуктази (КФ 1.6.4.2).....	52
2.4.6. Активність глутатіон-S-трансферази (КФ 2.5.1.18).....	52
2.4.7. Вміст глутатіону відновленого.....	53
2.4.8. Вміст гідропероксидів ліпідів.....	53
2.4.9. Вміст ТБК-активних продуктів.....	54
2.4.10. Вміст загального протеїну.....	54
2.5. Гематологічні параметри, які досліджували у роботі.....	55
2.5.1. Резистентність еритроцитів до кислотного гемолізу.....	55
2.5.2. Вміст лігандних форм гемоглобіну.....	56
2.5.3. Спорідненість гемоглобіну до O ₂	56

	12
2.6. Статистична обробка результатів.....	57
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	58
3.1. Біохімічні та гематологічні показники крові щурів за гострої інтоксикації ХПФ дозою 50 мг/кг.....	58
3.1.1. Холінестеразна активність в крові щурів за гострої інтоксикації ХПФ дозою 50 мг/кг.....	59
3.1.2. Прооксидантно-антиоксидантні параметри еритроцитів щурів за гострої інтоксикації ХПФ дозою 50 мг/кг впродовж 1 год.....	60
3.1.3. Гематологічні показники крові щурів за гострої інтоксикації ХПФ дозою 50 мг/кг впродовж 1 год.....	64
3.2. Біохімічні та гематологічні показники крові щурів за гострої інтоксикації ХПФ дозою 30 мг/кг.....	72
3.2.1. Холінестеразна активність у крові щурів за гострої інтоксикації ХПФ дозою 30 мг/кг.....	72
3.2.2. Прооксидантно-антиоксидантні параметри еритроцитів щурів за гострої інтоксикації ХПФ дозою 30 мг/кг.....	73
3.2.3. Гематологічні показники щурів за гострої інтоксикації ХПФ дозою 30 мг/кг.....	79
3.3. Біохімічні та гематологічні показники крові щурів за гострої інтоксикації ХПФ дозою 70 мг/кг та дії вітамінів А та Е впродовж 12 год.....	85
3.3.1. Холінестеразна активність крові щурів за гострої інтоксикації ХПФ дозою 70 мг/кг та дії вітамінів А та Е впродовж 12 год.....	85
3.3.2. Прооксидантно-антиоксидантні параметри еритроцитів щурів за гострої інтоксикації ХПФ дозою 70 мг/кг та дії вітамінів А та Е впродовж 12 год.....	86
3.3.3. Гематологічні показники крові щурів за гострої інтоксикації ХПФ дозою 70 мг/кг та дії вітамінів А та Е впродовж 12 год.....	90

3.4. Біохімічні та гематологічні показники крові щурів за гострої інтоксикації ХПФ дозою 90 мг/кг за введення комплексу вітамінів А та Е..	96
3.4.1. Холінестеразна активність крові щурів за гострої інтоксикації ХПФ дозою 90 мг/кг за введення комплексу вітамінів А та Е впродовж 5 діб.....	96
3.4.2. Прооксидантно-антиоксидантні параметри еритроцитів щурів за гострої інтоксикації ХПФ дозою 90 мг/кг за введення комплексу вітамінів А та Е впродовж 5 діб.....	97
3.4.3. Гематологічні показники крові щурів за гострої інтоксикації ХПФ дозою 90 мг/кг за введення комплексу вітамінів А та Е впродовж 5 діб...	100
РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ...	108
ВИСНОВКИ.....	130
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	132
ДОДАТОК.....	162

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ І ТЕРМІНІВ

АОС	—	антиоксидантна система
АФО	—	активні форми Оксигену
АФН	—	активні форми Нітрогену
АХЕ	—	ацетилхолінестераза
ГПЛ	—	гідроперокси́ди ліпідів
ГПО	—	глутатіонпероксидаза
ГР	—	глутатіонредуктаза
ГТ	—	глутатіонтрансфераза
Г-S-T	—	глутатіон-S-трансфераза
КАТ	—	каталаза
ЛД ₅₀	—	напівлетальна доза
МДА	—	малоновий диальдегід
МПО	—	мієлопероксидаза
НАДФ	—	нікотинамідаденіндинуклеотид фосфат
НАДФН	—	нікотинамідаденіндинуклеотид фосфат відновлений
O ^{•-}	—	супероксидний аніон-радикал
ПОЛ	—	перекисне окиснення ліпідів
СОД	—	супероксиддисмутаза
ТБК-АП	—	тіобарбітурова кислота
ФОС	—	фосфорорганічні сполуки
ХЕ	—	холінестераза
ХПФ	—	хлорпірифос
GSH	—	глутатіон відновлений
GSSG	—	глутатіон окиснений
Hb	—	гемоглобін
MetHb	—	метгемоглобін

ВСТУП

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 [84, 108, 120, 205]. ФОС можуть спричинювати істотні ризики для організмів, які не є безпосередніми мішенями їхньої дії, зокрема для людини. Дослідження останніх 5–10 років демонструють, що вплив гострих і хронічних інтоксикацій цих речовин недооцінюється та потребує поглибленого дослідження [117, 119, 259].

Загальновідомим основним механізмом токсичної дії ФОС є інгібування ними ензимів холінестеразного ряду з відповідними фізіолого-біохімічними наслідками [125, 133, 179, 191, 225]. 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 [151, 160, 206, 213]. 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 [123, 252, 180, 189, 194, 289].

Кров як тканина постійно перебуває у тісній взаємодії з 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 [150, 163, 170, 249, 263].

У цьому контексті дослідження впливу хлорпірифосу (ХПФ) – одного з найпоширеніших у застосуванні представників ФОС – на систему крові є цілком обґрунтованим і доцільним, оскільки сьогодні є мало робіт такого спрямування, а їхні результати часто неповні або суперечливі [96, 97, 275].

З огляду на нейротоксичність ФОС, терапія інтоксикацій такої природи перш за все 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, які проявляють антиоксидантну дію. Прикладом таких препаратів можуть бути вітаміни А та Е. Дослідження їхнього 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 [122, 137, 155, 184, 192, 264]. Саме тому актуальним є вивчення реакцій системи крові: змін резистентності еритроцитарних мембран до гемолізу, дослідження антиоксидантного статусу еритроцитів, спорідненості гемоглобіну (Hb) до O_2 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 і 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 Нб 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. Вперше на основі комплексних досліджень визначено параметри прооксидантно-антиоксидантного балансу компонентів крові щурів за умов їх гострої інтоксикації різними дозами ХПФ. Продemonстровано, що механізми токсичності ХПФ не обмежуються лише його антихолінестеразною дією, а пов'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, який 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, підготовано 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, September 1–4, 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 періодичних наукових виданнях, які входять 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, 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.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Загальна фізіолого-біохімічна і токсикологічна характеристика хлорпірифосу

Фосфорорганічні сполуки (ФОС) – це загальна назва органічних похідних фосфору. ФОС – це естери, амідни, тіолові похідні фосфорної, фосфоновної, фосфіновної чи тіофосфорної кислот із двома ціано-, тіоціно- чи фенольними групами [14, 60, 103]. Загальна формула ФОС зображена на рис. 1.1. У молекулі ФОС радикали R_1 і R_2 – це однакові, або різні алкільні чи арильні групи, що можуть зв'язуватись через Оксиген чи Сульфур. X група може бути представником широкого спектру аліфатичних, ароматичних чи гетероциклічних груп, приєднаних через лабільну групу (зазвичай $-P-$, чи $-S-$) [103].

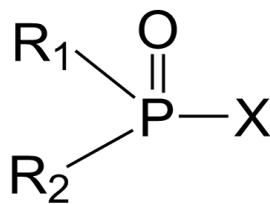


Рис. 1.1. Загальна формула ФОС

ФОС є класом одних із найбільш поширених інсектицидних препаратів у світі [42, 77, 85, 152, 174, 260]. Їх також застосовують як фунгіциди, нематоциди, акарициди, гербіциди, дефоліанти, розчинники, інгібітори горіння, пластифікатори при виробництві негорючих пластмас, лікарські препарати та бойові отруйні речовини.

Першою відомою ФОС був тетраетилпірофосфат, синтезований 1854 р. Філіпом де Клермонтом [103]. Він виявився ефективним інсектицидним препаратом, володів високою токсичністю, проте швидко втрачав активність внаслідок розпаду за дії факторів навколишнього середовища [103].

Поряд з інтенсивним використанням фосфорорганічних пестицидів в агропромисловому секторі, варто наголосити на широкому застосуванні ФОС пересічними споживачами як побутових інсектицидів для знищення мурах, тарганів та інших комах в оселях, на присадибних ділянках, спортивних і паркових трав'яних газонах, а також з метою захисту домашніх тварин від різних паразитів (кліщів, бліх тощо). Відносно низька водорозчинність багатьох ФОС, їхня здатність накопичуватись у ґрунтах і стічних водах, а також порівняно низькі швидкості природного розщеплення призводять до того, що вони можуть потрапляти у людський організм при використанні у побуті, під час сільськогосподарських робіт чи споживанні забрудненої ними води та харчових продуктів [18, 20, 121, 230, 269].

Основний механізм токсичної дії ФОС полягає в інгібуванні ензимів класу естераз, насамперед ацетилхолінестерази (АХЕ). Зокрема, інгібування АХЕ полягає в фосфорилуванні активного центру ензиму, у результаті чого втрачається його специфічна біологічна активність. Унаслідок інгібування активності АХЕ накопичується медіатор нервової системи – ацетилхолін, що призводить до порушення передачі нервового збудження через гангліонарні синапси. Тому рівень ацетилхоліну чи холінестеразна активність є основним показником ступеня інтоксикації організму ФОС [6, 31, 81, 201, 217, 258, 262].

Відомо також, що ФОС можуть інгібувати активність ензимів, які не належать до класу естераз, зокрема ліпазу підшлункової залози, протеаз (трипсин, хімотрипсин) [86, 106]. Показано, що ФОС здатні проявляти опосередковану дію на клітини крові та ендотеліоцити [14, 81, 232]. За наявності у складі молекули ФОС паранітрофенільної групи (метилнітрофос, метафос, тіофос) у крові може відбуватися зниження вмісту гемоглобіну,

перерозподіл між його лігандними формами (зростання вмісту метгемоглобіну), поява тілець Хейнца [43,45, 50].

Хлорпірифос 0-(3,5,6-трихлорпіридил-2)-0,0-диетилтіофосфат – це ФОС, що є тіоною похідною тіофосфорної кислоти (рис. 1.2.).

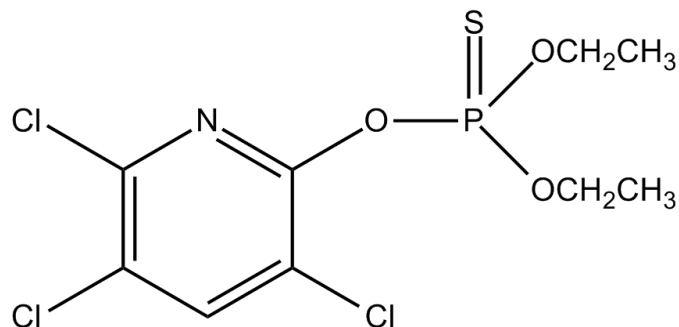


Рис. 1. 2. Структурна формула хлорпірифосу

ХПФ є діючою речовиною багатьох інсектицидних, нематоцидних, акарицидних препаратів. Він розроблений та зареєстрований компанією «DOW Chemical» у 1965 році як інсектицид для контролю чисельності личинок комарів. Проте виявлена ефективність цієї сполуки зумовила розширення спектру її застосування. Препарати на основі ХПФ використовуються як контактні інсектициди для боротьби з широким спектром шкідників сільськогосподарських, технічних культур та синантропними комахами. ХПФ-вмісні інсектициди використовуються для обробітку зернових, бавовняних, олійних, овочевих культур, садових дерев та захисту від шкідників газонів і декоративних рослин [118, 129, 135]. ХПФ дозволений для санітарної і побутової дезінсекції приміщень, контейнерів, захисту свійської птиці, овець та собак від ектопаразитів [90, 181, 214].

У чистому вигляді ХПФ – це біла кристалічна речовина із характерним меркаптановим (тіоловим) запахом. При кімнатній температурі кристалічний ХПФ стійкий, проте швидко руйнується у водних розчинах. За 25 °С ХПФ майже нерозчинний у воді (2 мг/л), проте добре розчинний у бензолі (7900 г/кг), ацетоні (6500 г/кг), хлороформі (6300 г/кг), ксилолі (4000 г/кг),

етанолі (630 г/кг). ХПФ стабільний у нейтральному та кислому середовищі, проте за зростання рН до лужних значень швидко гідролізується [103, 152]. Період розпаду ХПФ залежно від типу ґрунту, клімату та інших умов може тривати від 2 тижнів до 1 року [171]. Переважно ХПФ зазнає деградації в ґрунті за дії УФ-випромінювання, хімічного гідролізу та мікробіологічної трансформації впродовж 60–120 діб. При надходженні у водне середовище період піврозпаду ХПФ за 25 °С становить близько 35–78 діб. ГДК ХПФ у ґрунті – 0,2 мг/кг, воді – 0,002 мг/дм³, в атмосферному повітрі – 0,0002 мг/м³. Натомість, у рослинній продукції максимально допустимий рівень ХПФ встановлений в межах 0,4–0,005 мг/кг [171, 176].

Добре вивченим механізмом дії ХПФ є інгібування активності АХЕ унаслідок фосфорилювання залишку гідроксилу серину в складі активного центру ХЕ. При цьому відбувається інгібування активності ензиму та накопичення у синаптичній щілині нервово-м'язових, нейро-нейрональних, нейрон-секреторних чи інших синапсів молекул медіатора синаптичної передачі – ацетилхоліну, що призводить до порушень передачі нервового імпульсу між нейрональними та м'язовими клітинами або безпосередньо між нейронами. На рівні організму це спричиняє появу тремору м'язів, який переходить у параліч. Варто зазначити, що взаємодія між ХПФ і активним центром АХЕ відбувається за типом конкурентного інгібування і призводить до незворотної втрати активності ензиму. Відновлення активності АХЕ можливе лише за синтезу ензиму *de novo*. У токсикологічному аспекті, для прояву дії ХПФ на організм важливе значення мають групи атома хлору цієї сполуки, які забезпечують високу розчинність ХПФ у ліпідах та збільшують час його напіврозпаду в організмі. Завдяки особливостям хімічної будови ХПФ впливає на поступове та тривале зниження активності АХЕ порівняно з іншими інсектицидами фосфорорганічної природи [47, 209].

За інгаляційного, дермального, а особливо перорального надходження ХПФ в організм він швидко потрапляє у кров і транспортується до органів і тканин, порушує функціонування центральної нервової, серцево-судинної

та дихальної систем, що обумовлено інгібуванням АХЕ, ініціюванням оксидативного стресу та ендокринними порушеннями [105, 132, 175, 204, 277].

Оскільки період напіврозпаду ХПФ в організмі становить менше 3 діб, для нього не є характерним накопичення в організмі, проте протягом деякого часу ХПФ може зберігатись у крові (до 24 год.) та жировій тканині (до 60 год.) [139]. Метаболізм ХПФ в організмі включає анаеробну і аеробну стадії. Зокрема, в детоксикації цієї сполуки беруть участь ензими родини цитохрому Р 450, зокрема СYP2B6 [117, 172]. У печінці ХПФ під дією ензиму СYP2B6 метаболізується до ХПФ-оксону (рис. 1.3) внаслідок заміщення сульфогрупи оксигрупою.

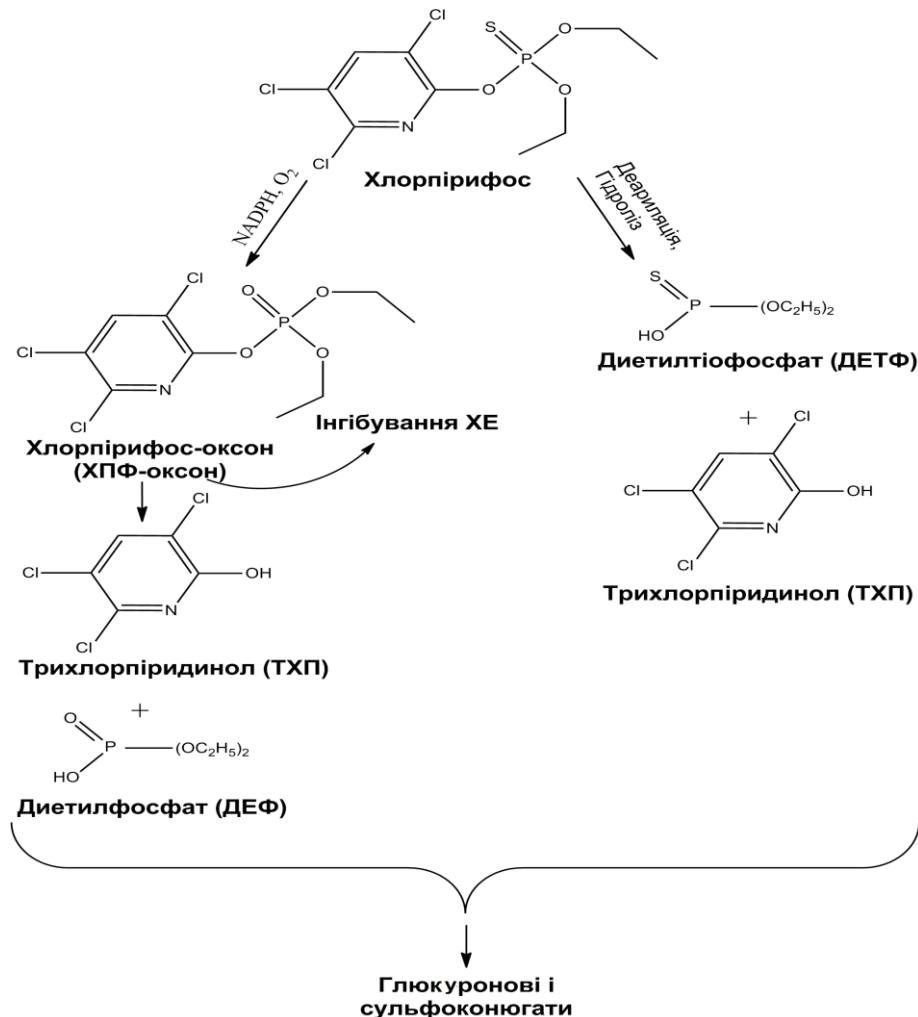


Рис. 1.3. Метаболізм ХПФ за даними Eaton et al. [131]

ХПФ-оксону належить основна роль в інгібуванні АХЕ [139, 140, 172]. На другому етапі метаболізму відбувається гідроліз ХПФ і ХПФ-оксону до іншого інтермедіата – 3,5,6-трихлор-2-піридінолу (ТХП) [172]. Оскільки

ХПФ-оксон володіє кращою розчинністю в воді, ніж ХПФ, його гідроліз до ТХП відбувається швидше. На наступному етапі метаболізму ТХП утворює кон'югати з гліцином та глюкуроною кислотою, що виводяться з організму з сечею. Незважаючи, на те, що ХПФ та ХПФ-оксон в основному метаболізується до ТХП під дією α -естерази (арилестерази та арилдиалкілфосфатази), він може трансформуватись до диетилтіофосфату (ДЕТФ) і диетилфосфату (ДЕФ), які не мають інгібуючих властивостей щодо АХЕ. Елімінація цих метаболітів з організму, як і ТХП, відбувається разом з сечею (бл. 84%) та калом (бл. 5%) протягом 72 год. з моменту отруєння. Проте навіть після виведення метаболітів ХПФ з організму впродовж тривалого часу зберігаються ефекти нейрональних, оксидативних та гуморальних порушень [139, 229, 239, 241, 242, 248].

1.2. Перебіг прооксидантно-антиоксидантних процесів у організмі тварин за дії хлорпірифосу

В останні роки у наукових дослідженнях усе більше уваги приділено оксидативному стресу як можливому механізму дії різних пестицидів. Зокрема, це обумовлено з'ясуванням ролі цього явища в етіології нейродегенеративних, ракових, серцево-судинних, імунних, дихальних патологій. Оксидативний стрес – це явище порушення прооксидантно-антиоксидантної рівноваги в бік утворення прооксидантів, що супроводжується змінами вмісту ТБК-активних продуктів, гідропероксидів ліпідів, активностей антиоксидантних ензимів [1, 2, 3, 8, 104, 112, 113, 107]. Його виникнення розглядають як один із наслідків дії ксенобіотиків різноманітної природи, іонізуючого випромінювання, токсичних сполук, зокрема ФОС [89, 92]. Поза сумнівом, ХПФ є індуктором оксидативного стресу, у науковій літературі останніх років це має численні підтвердження, які базуються на основі досліджень за умов *in vitro* та *in vivo*, проведених на

багатьох видах тварин і за різних доз та способів введення цієї сполуки [94, 106, 195, 173, 219, 287].

Одним із таких підтверджень є робота Smida A. та співавторів [261], які виявили, що при введенні щурам ХПФ дозою 10 мг/кг впродовж 30 діб у селезінці та тимусі відбувалось зростання продуктів ПОЛ, про що свідчило збільшення вмісту ТБК-активних продуктів, зниження активностей СОД, КАТ та ГПО. Автори пов'язують зниження активностей цих ензимів з інгібуючим впливом на них продуктів ПОЛ. Водночас, в роботі Saoudi M. [244] показано, що в щурів лінії Вістар за 2-тижневого введення тваринам ХПФ дозою 63 мг/кг спостерігали зростання вмісту ГПЛ та ТБК-активних продуктів у гомогенатах печінки, нирок та мозку. Натомість було зафіксовано зниження активностей окремих ензимів системи антиоксидантного захисту – СОД, КАТ і ГПО. У дослідженні цього ж автора [245], проведеному з використанням самок щурів лінії Вістар в період лактації, показано, що за перорального введення тваринам ХПФ у дозах 1 та 1,35 мг/кг у плазмі крові відбувалось зростання вмісту ТБК-активних продуктів та зниження активностей Г-S-T і СОД. Mansour S. A. у дослідженнях на самцях та самках щурів лінії Вістар показав, що при пероральному введенні тваринам ХПФ дозою 6,75 мг/кг впродовж 28 діб в еритроцитах тварин спостерігалось зростання вмісту ТБК-активних продуктів і зниження активностей СОД, КАТ і Г-S-T. Автор роботи припускає, що вірогідною причиною зниження активності СОД при отруєнні ХПФ могло бути використання клітинного пулу цього ензиму в процесах трансформації O_2^- до H_2O . Відомо, що зростання утворення ПОЛ виступає як один з універсальних молекулярних механізмів токсичності, індукованої хлорорганічними, карбаматними та фосфорорганічними пестицидами [101, 134, 205, 270]. Оскільки в біологічних системах інтенсивність ПОЛ використовується як показник сили оксидативного стресу, то Mansour S. A. та співавтори [195]. припускають, що зростання вмісту ТБК-активних продуктів може свідчити про інтенсифікацію процесів вільнорадикального

окиснення ліпідів у мембранах еритроцитів. Оскільки Г-S-T здійснює детоксикаційну функцію, зокрема через каталіз процесів кон'югації електрофільних субстратів з тіоловими групами GSH, зниження його активності в плазмі крові самців та самок щурів могло виступати індикатором послаблення процесів детоксикації ХПФ та його метаболітів у тварин. В іншій роботі цього ж автора [196] показано, що при введенні щурам лінії Вістар розчину ХПФ у дозах 6,75 мг/кг впродовж 28 діб у тканинах печінки та нирок відбувалося зростання вмісту ТБК-активних продуктів та зниження активностей СОД та Г-S-T.

Ма Р. та співавтори [192] встановили, що при пероральному введенні мишам розчину ХПФ у дозах 3, 6, 12 мг/кг впродовж 7 днів у тканинах мозку, нирок та печінки тварин спостерігалися зміни активності окремих ензимів та гістологічні порушення. Зокрема, за дії ХПФ у дозах 6 та 12 мг/кг у нирках та печінці автори фіксували зниження вмісту GSH, на фоні зростання у цих тканинах вмісту ТБК-активних продуктів [267]. Зниження рівня GSH могло бути спричинене його участю в процесах детоксикації. Використання GSH як відновника в процесах детоксикації може спричиняти зниження його вмісту в нирках, печінці. Зростання вмісту ТБК-активних продуктів могло бути зумовлене посиленням процесів ПОЛ, які порушували клітинний гомеостаз окисною модифікацією поліненасичених жирних кислот клітинних мембран клітин нирок і печінки. Оскільки основним продуктом їх окиснення є МДА, то, ймовірно, завдяки зростанню вмісту цієї сполуки міг зростати вміст ТБК-активних продуктів.

Abolaji A. O. та співавтори [87] показали, що після введення щурам лінії Вістар ХПФ дозою 5 мг/ кг впродовж 35 днів відбувалось зростання рівня ТБК-активних продуктів у тканинах мозку, яєчників та матки самок. Проте автори встановили зростання у зазначених тканинах активностей КАТ, СОД, ГПО та вмісту GSH. Водночас при введенні самкам щурів ХПФ дозою 10 мг/кг впродовж 7 днів у нирках, печінці та селезінці тварин відбувалось зниження активностей СОД, Г-S-T та вмісту GSH. Зниження активності

каталази зафіксували лише у нирках та селезінці щурів. У тканинах нирок та селезінки було зафіксовано зростання вмісту ТБК-активних продуктів, вмісту гідроген пероксиду та активності мієлопероксидази (МПО). Зазначений ензим є компонентом лізосом нейтрофілів, тому зростання його активності автори розглядають як специфічну реакцію на запальний процес в артеріях. Збільшення активності МПО може бути наслідком зростання вмісту гідроген пероксиду, який виступає субстратом для ензиму при утворенні гіпохлорид-аніону – сильного окисника із неспецифічними бактерицидними властивостями.

Підтвердженням участі ХПФ у виникненні оксидативного стресу в еритроцитах може бути також дослідження Demir F. та співавторів [126], які встановили, що введення щурам лінії Вістар ХПФ дозою 5,4 мг/кг протягом 4-х тижнів призводило до зростання в еритроцитах інтоксикованих тварин вмісту ТБК-активних продуктів та зниження активностей СОД, КАТ та ГПО.

Aly N. та співавтори [93] при пероральному введенні мишам *Mus musculus* ХПФ дозою, що становила 1/10 LD₅₀, через 24 год у печінці тварин показали зростання вмісту ТБК-активних продуктів та активностей, СОД, КАТ, Г-S-T, без змін активності ГПО. Натомість у печінці зменшувався вміст GSH та знижувалась активність глюкозо-6-фосфат дегідрогенази (Г6ФД).

У роботі Verma R. [279] встановлено, що за внутрішньом'язового введення щурам ХПФ дозою 100 мг/кг впродовж 3 діб у тканинах печінки, нирок, селезінки і мозку зростає вмісту ТБК-активних продуктів, окисленого глутатіону (GSSG), збільшення співвідношення GSH/GSSG на тлі зниження активностей СОД, КАТ, Г6ФД та вмісту GSH. Зниження активностей СОД, КАТ і Г6ФД може бути пов'язане із пошкодженням клітинних макромолекул та утворенням ковалентних зв'язків між молекулами ензимів і деякими високоактивними продуктами ПОЛ.

У дослідженні Mosbah R. [204] було показано, що пероральне введення щурам ХПФ дозою 20 мг/кг впродовж 4 тижнів призводило до зростання

вмісту ТБК-активних продуктів, яке супроводжувалось зниженням вмісту GSH та зменшенням активностей СОД, КАТ, Г-S-T і ГПО у плазмі та сім'яниках щурів. Аналогічні результати були отримані Nishi K. [208] в експерименті, проведеному на самках щурів лінії Вістар. При пероральному введенні їм ХПФ у дозах 1 та 2,5 мг/кг протягом 8 тижнів у еритроцитах тварин обох груп зростав вміст ТБК-активних продуктів, відбувались гістологічні зміни у тканинах репродуктивної системи. Подібну картину спостерігали Umosen A. та співавтори [273], які виявили у сім'яниках та гіпофізі зростання вмісту ТБК-активних продуктів та зменшення активностей СОД і КАТ при пероральному введенні щурам ХПФ дозою 8,5 мг/кг впродовж 28 діб.

Ojha A. та співавтори [212] при пероральному введенні щурам ХПФ дозою 38,8 мг/кг через 24 та 48 год у органах тварин зафіксували порушення окисно-відновного балансу. Зокрема, у печінці, мозку та селезінці тварин було виявлено зниження вмісту GSH, що супроводжувалось зростанням вмісту його окисненої форми (GSSG) та зниженням співвідношення GSH/GSSG порівняно з контрольними значеннями. Ці вчені зафіксували зростання активностей Г6ФД та ГР в усіх досліджуваних органах щурів.

Singh V. та співавтори [257] показали, що при пероральному введенні олійного розчину ХПФ дозою 89,4 мг/кг щурам лінії Вістар протягом 15 діб відбувались зміни ліпідного профілю та антиоксидантного статусу кори головного мозку тварин. Зокрема, було виявлено інгібування активностей Г-S-T, ГПО, ГР на тлі зростання активностей СОД, КАТ та вмісту гідроперекисів ліпідів. Оскільки в численних дослідженнях було показано, що за сублетальних інтоксикацій ХПФ відбувається зниження вмісту GSH та зростання його окисненої форми GSSG, то зниження активності Г-S-T та ГР розглядається як наслідок зменшення вмісту цього трипептиду в корі головного мозку. У світлі того, що ХПФ здатен спричиняти порушення цілісності ДНК, автори пов'язують зменшення активності ГПО з виникненням порушень на рівні трансляції цього ензиму. Зростання

активностей СОД та КАТ автори розглядають як компенсаторну реакцію на зростання кінцевого продукту ліпопероксидації – МДА.

У дослідженнях Asker C. I. та співавторів [88] встановлено, що при одноразовому введенні щурам лінії Вістар ХПФ дозою 50 мг/кг на 8-му добу експерименту зростає вміст ТБК-активних продуктів та карбонільних груп білків. Водночас спостерігали зниження вмісту GSH, тіолових груп, зменшення активностей СОД, КАТ та ГПО. Dimov D. співавтори [127] у дослідженні на мишах показали, що при пероральному введенні їм ХПФ дозою 63 мг/кг протягом 24 год відбувались апоптичні ефекти у сітківці тварин та зміни показників АОС. Зокрема, у гомогенатах сітківки спостерігали зростання вмісту ТБК-активних продуктів на тлі зниження активностей СОД, КАТ та ГПО. У роботі Tuzmen N. [270] показано, що за перорального введення щурам лінії Вістар ХПФ дозою 1 та 15 мг/кг впродовж 16 тижнів у печінці тварин зростає вміст ТБК-активних продуктів, збільшувалася активність СОД, КАТ, що не супроводжувалось змінами активності ГПО.

У дослідженні *in vitro* Saxena R. та співавтори [250] виявили, що при інкубації еритроцитів щурів у середовищі, яке містило 0,01% розчин ХПФ, впродовж 3 год за 37 °C у них спостерігалось зростання вмісту гідропероксидів ліпідів, зменшення активності Г-S-T та зниження активностей СОД та КАТ.

У роботі Dominah G. A. [128], проведений в умовах *in vitro* на культурі клітин смугастого тіла мозку мишей, через 48 год після інкубації клітин з ХПФ у дозах 75 та 100 мкмоль у тварин встановлено зниження активності СОД і вмісту GSH на тлі зростання вмісту ТБК-активних продуктів. Saulsbury M. D. та співавтори [243] у дослідженнях на клітинах нейроглії показали, що за інкубування клітин лінії CG-4 із ХПФ у дозах 60 мкмоль впродовж 1, 2 та 4 год не спостерігається вірогідних змін активності СОД, проте автори встановили вірогідне утворення супероксиданіону, що є одним із найбільш реакційноздатних вільних радикалів.

Deeba F. та співавтори [124] показали, що за інкубації еритроцитів людини у середовищі, яке містило ХПФ у концентраціях від 0,01 до 0,2 %, впродовж 1 та 3 год відбувалося зростання вмісту ТБК-активних продуктів, що супроводжувалося зниженням активностей СОД і КАТ. Водночас розлади у функціонуванні АОС супроводжувались зниженням осмотичної резистентності еритроцитів. Автори прийшли до висновку, що зниження активності КАТ пов'язане зі зниженням активності СОД.

У дослідженні Chiarella G. та ін. [116] виявлено, що при інкубації клітин хоріокарциноми лінії JEG-3 у середовищі з ХПФ у концентраціях 5, 50 та 100 мкмоль впродовж 24 год відбувались зростання активності КАТ та зниження вмісту GHS. Також виявлено зростання вмісту мРНК, ензимів ГР та гемоксигенази-1, що розглядалось авторами як доказ існування на субклітинному рівні механізму пом'якшення ХПФ-ініційованого оксидативного стресу клітинами лінії JEG-3 через активацію шляху Nrf 2/ARE.

Singh M. та співавтори [256] встановили, що при інкубації еритроцитів щурів *in vitro* з ХПФ у концентрації 200 мкг/мл у них зростали активності Г-S-T та ГР, знижувався вміст GSH і зменшувалась активність Г6ФД.

Відомі дані про ХПФ-ініційований оксидативний стрес в організмах різних видів тварин. Зокрема, Ozkan F. та співавтори [216] показали, що за дії на риб *Oreochromis niloticus* ХПФ у дозах 12 мкг/л та 24 мкг/л впродовж 96 год у тканинах їхнього мозку зростав вміст ТБК-активних продуктів. Зростання вмісту ТБК-активних продуктів автори пов'язують з інтенсифікацією процесів ПОЛ. Також автори зазначають про підвищення вмісту ГПО у тканинах мозку та нирок, зростання активності КАТ у печінці та зниження у мозку. У тканинах мозку було виявлено зростання активності СОД, натомість у печінці активність цього ензиму знижувалась.

У експериментах на рибах *Danio rerio* Jin Y. та співавтори [165] показали, що при обробці заплідненої ікри риб ХПФ у дозах 10, 30, 100 та 300 мкг/л протягом 96 год відбувались зміни вмісту різних видів РНК та

активностей окремих ензимів АОС. У потомства (личинок риб) зафіксували зростання вмісту ТБК-активних продуктів, активностей СОД, КАТ з одночасним зниженням активностей ГПО, Г-S-T та вмісту GSH. У дослідженні на *Danio rerio*, Rodriguez-Fuentes G. та співавтори [233] встановили, що при обробці заплідненої ікри ХПФ у дозах 200 та 400 мкг/л впродовж 72 год у зародків риб відбувалось зростання вмісту GSH за дії дози ХПФ 200 мкг/л та зниження за дії дози 400 мкг/л. Водночас змін активності КАТ виявлено не було. Zhang Z. та співавтори [289] за дії на *Cyprinus carpio* L. ХПФ дозою 14,5 мкг/л протягом 30 діб у нирках риб зафіксували зростання вмісту ТБК-активних продуктів, тоді як активності СОД та ГПО знижувалась. У дослідженні, здійсненому Oruc E. [215] на рибах *Oreochromis niloticus*, при введенні їм сублетальних доз ХПФ впродовж 30 діб у гонадах риб зафіксували зниження рівня естрадіолу, тестостерону та кортизолу разом зі зменшенням активності Г-S-T на тлі зростання активності СОД. Слід наголосити, що зростання активності СОД не супроводжувалось змінами активностей КАТ та ГПО. Attademo A. та співавтори [102] виявили в організмі жаб *Lysapsus limellium* зниження активності КАТ та Г-S-T у тканинах шлунку та печінки через 168 год після надходження ХПФ.

Відомі дані про вплив ХПФ на водних безхребетних. Зокрема, Kim R. O. та співавтори [173] показали, що за дії на коловерток *Brachionus koreanus* ХПФ у дозах 10, 100 та 500 мкг/л впродовж 24 год в останніх відбувається зниження вмісту GSH і зростання активностей ГПО, ГР та Г-S-T.

Khalil A. [171] у роботі, проведеної на прісноводних молюсках *Lanistes carinatus*, показав, що через 7, 14, 21, та 28 діб після введення ХПФ у дозах 0,09 та 0,29 мкг/л у гепатопанкреатичній залозі (аналог печінки ссавців) слимаків спостерігали зміни показників АОС – активностей КАТ, ГПО, Г-S-T практично лінійно зростала із 7 по 28 добу досліджень. Натомість щодо вмісту ТБК-активних продуктів спостерігали обернену залежність до тривалості експозиції. У дослідженні Cacciatore L. C. [109] задокументовано, що за дії ХПФ на прісноводних молюсків *Planorbarius corneus* дозою

7,5 мкг/л впродовж 48 год у гепатопанкреатичній залозі останніх зростав рівень ТБК-активних продуктів, знижувалися активності СОД та КАТ.

У роботі Narra M. R. [206], проведений на тканинах м'язів крабів *Barytelphusa guerini*, було показано, що ХПФ дозою 0,07 мг/л впродовж 8 діб призводив до зниження активності СОД, вмісту ТБК-активних продуктів на тлі зростання активності КАТ та вмісту GST. Vioque-Fernandez A. та співавтори [280] встановили, що за впливу ХПФ на раків *Procambarus clarkii* впродовж 7 діб із відбором тканин на 2-гу та 7-му добу в травній залозі раків відбувались зміни активностей ензимів АОС. Зокрема, за дії ХПФ дозою 12 мкг/л на 2-гу добу активність КАТ знижувалась, а за впливу ХПФ дозою 24 мкг/л на 7-му добу — зростала. Виявлено зростання активності Г-S-T та зниження вмісту GSSG на 2 добу дослідження. Натомість змін вмісту ТБК-активних продуктів, GSH, активності ГПО виявлено не було. У дослідженні Wu H. та співавторів [283] у комах *Oxya chinensis* при контактному надходженні в організм ХПФ у дозах 0,08; 0,12; 0,16 та 0,28 мкг/л повітря через 24 год виявлено зростання вмісту ТБК-активних продуктів і активностей СОД, КАТ при зниженні активностей Г-S-T, ГР, ГПО і зменшенні вмісту GSH.

Отже, виявлені численними авторами зміни в системі антиоксидантного захисту різноманітних організмів за дії ХПФ є переконливим підтвердженням участі ХПФ-ініційованого оксидативного стресу в біохімічних механізмах токсичності цієї фосфорорганічної сполуки.

1.3. Вплив хлорпірифосу на гематологічні показники тварин

Аналіз кількісного та якісного складу крові має важливе значення у дослідженні впливу ксенобіотиків на організм для первинної діагностики різноманітних паталогічних станів, ступеня їх важкості та поширення. Передусім це обумовлено функцією крові в організмі. Оскільки кров

перебуває у безпосередньому контакті з тканинами та забезпечує їхній гомеостаз, гематологічні параметри є універсальним клініко-діагностичним показником фізіологічного стану організму як у нормі, так і за дії екзогенних факторів (ксенобіотиків). З одного боку, зміни кількісного та якісного складу крові можна розглядати як індикатор виникнення порушень в органах та тканинах. Зміни гематологічних показників залежать від важкості і ступеня інтоксикації. При легких ступенях отруєнь ФОС змін гематологічних показників здебільшого не виявляють, натомість за інтоксикації середнього ступеня спостерігається збільшення кількості еритроцитів, зростання ШОЕ тощо. Кров виконує важливу функцію в розподілі, накопиченні, знешкодженні, та елімінації ксенобіотиків та їхніх метаболітів. Водночас зміни кількісного і якісного складу компонентів крові можуть не корелювати зі ступенем інгібування активності АХЕ. Зміну складу крові можна розглядати як прояв загальнотоксичної дії ФОС, який може відрізнятися залежно від хімічної будови ксенобіотика [7, 14, 29, 50, 86, 249].

У випадках інтоксикацій людей метилмеркаптофосом спостерігали морфологічні зміни профілю крові. В описаних випадках відмічається розвиток лейкоцитозу з нерізким нейтрофіліозом та зсувом лейкоцитарної формули вліво еозинопенією, лімфопенією і зростанням вмісту гемоглобіну. В експериментах на лабораторних щурах зафіксували зростання кількості еритроцитів, ретикулоцитів та вмісту гемоглобіну. [43] При введенні дозою 0,5 LD₅₀ таких речовин, як дихлофос та гетерофос, спостерігалось зростання кількості еритроцитів, ретикулоцитів, вмісту гемоглобіну [50]. Водночас за хронічного введення ФОС спостерігали зростання вмісту ретикулоцитів, що може бути пов'язано з реакцією органів кровотворення на надходження ФОС.

У літературі є інформація, яка стосується впливу ФОС на показники білої крові [14, 29, 81, 149, 168]. Спостерігались явища нейтрофіліозу, лейкоцитозу, лімфоцитопенії, еозинопенії. Водночас за хронічного введення дихлофосу та гетерофосу у малих дозах спостерігались вищеописані зміни

складу формених елементів, проте вони були слабше виражені і мали фазовий характер. Авторами встановлено, що вплив на систему крові у різних пестицидів проявляється по-різному та залежить від хімічної структури тієї чи іншої сполуки [43, 81, 86, 91, 95]. Так, у токсичних дозах ефіри тіофосфорної кислоти, що містять у своєму складі фенольний та триазольний радикали, здатні стимулювати процеси еритропоезу, водночас ациклічна сполука – дихлорвинілфосфат – спричиняє інгібування еритроцитопоезу, гранулоцитопоезу та тромбоцитопоезу [43, 86]. Похідні тіофосфорної кислоти з піримідинової та фосфорної кислоти з гептадієновою групами зумовлюють активацію лімфоцитопоезу у селезінці. Варто наголосити, що емульсія тіонних та тіолових ізомерів диметиллових ефірів тіофосфорної кислоти володіє гемолітичною дією, що спричиняє розвиток в організмі неефективного еритропоезу. У літературі є інформація, що диталімфос спричиняє гіпоплазію кісткового мозку та розвиток екстрамедулярного гемопоєзу у селезінці. Дослідження різних авторів вказують на те, що анемічний ефект ФОС може бути пов'язаний із посиленням руйнування еритроцитів, підтвердженням чого може бути ретикулоцитоз, сидероцитоз, поліхроматофілія та зростання вмісту гемосидерину в селезінці [86].

Однак не виявлено прямої залежності між показникам системи крові та ступенем інгібування ХЕ і токсичністю ФОС. [84, 150, 217]. Важливим фактором, що впливає на ступінь токсичності ФОС, є спосіб надходження в організм. Так, за інгаляційного надходження ФОС спостерігається суттєвіший вплив на систему кровотворення порівняно із пероральною інтоксикацією аналогічною дозою.

Є дані про те, що за гострої інтоксикації хлорофосом та октаметилом спостерігається зростання вмісту адреналіну в крові та зниження його концентрації в наднирниках. Одночасно із вищезазначеними процесами відбувається зростання вмісту норадреналіну в наднирниках та вмісту серотоніну в крові і тканинах головного мозку. Зростання вмісту серотоніну

в крові та зниження його запасів у ентерохромафінних клітинах спостерігається як за хронічного введення доз, що не спричиняють інгібування ХЕ, так і при гострих інтоксикаціях ФОС. За дії низьких доз ізофосу та хлорофосу відбувається порушення фагоцитарної активності нейтрофілів, зниження їх фагоцитарної функції та зменшення фосфатазної активності лейкоцитів, що може бути ознакою імунологічної реактивності організму. Водночас за умов сильної інтоксикації хлорофосом, карбофосом фосфамідом відмічається порушення видільної функції, системи згортання крові, порушення регіонарного кровообігу із розвитком холестазу та білкової дистрофії [43, 130].

В описаних у літературі випадках отруєнь ХПФ різних видів організмів, зокрема птахів, гризунів, риб спостерігається широкий діапазон змін гематологічних показників. Зокрема, у роботі Begum S. A. показано, що при 12-тижневому введенні курям ХПФ дозою 0,36 мг/кг у їх крові відбувалося зростання загальної кількості еритроцитів, лейкоцитів та вмісту гемоглобіну [106].

У дослідженні Ahmad M. Z. [90] встановлено, що при пероральному введенні курчатам бройлерам олійного розчину ХПФ у дозах 5, 10, 20 мг/кг впродовж 14 діб відбувалося зниження вмісту загальної кількості еритроцитів, лейкоцитів, вмісту гемоглобіну і показника гематокриту.

За даними Elsharkawy E. E. та співавторів [135], при хронічному введенні самцям щурів лінії Спрег-Доулі ХПФ дозою 30 мг/кг впродовж 90 діб у їхній крові відбувалося зниження вмісту гемоглобіну, гематокриту, загальної кількості тромбоцитів, показника гетерогенності тромбоцитів, тромбокрити. У дослідженні Ezzi L. та співавторів [141] показано, що при пероральному введенні щурам лінії Вістар олійного розчину ХПФ у дозах 3,1 та 6,2 мг/кг протягом 4 тижнів спостерігається зростання кількості формених елементів крові, зокрема тромбоцитів, лейкоцитів та співвідношення поліхроматичних/нормохроматичних еритроцитів. Зростання останнього автори пов'язують із можливим стимулювальним ефектом ХПФ

на процеси кровотворення у кістковому мозку. Натомість у дослідженнях, проведених Uzun F. G. та співавторами [275] на щурах лінії Вістар, показано, що пероральне введення ХПФ дозою 5,4 кг/кг впродовж 4 тижнів не призводило до статистично значущих змін загальної кількості еритроцитів, загального вмісту гемоглобіну, гематокриту, середнього об'єму еритроцита, середнього корпускулярного вмісту гемоглобіну. Проте було виявлено зростання загальної кількості лейкоцитів та тромбоцитів. У дослідженнях Asker C. I. та співавторів [88] встановлено, що при одноразовому введенні щурам лінії Вістар ХПФ дозою 50 мг/кг на 8-му добу експерименту відбувалося зниження вмісту гемоглобіну та показника гематокриту, загальної кількості лейкоцитів, лімфоцитів, моноцитів та нейтрофілів.

Uchendu C. та співавторами [271] показано, що при щоденному пероральному введенні мишам ХПФ дозою 21,3 мг/кг впродовж 10 тижнів у крові тварин відбувалося зростання загальної кількості еритроцитів, вмісту гемоглобіну, водночас спостерігали зниження вмісту лейкоцитів.

В іншій роботі цього ж автора [272], виконаній на щурах лінії Вістар, встановлено, що при пероральному введенні ХПФ дозою 10,6 мг/кг впродовж 17 тижнів загальна кількість еритроцитів, лейкоцитів, тромбоцитів у крові тварин знижувалася. Водночас за дії ХПФ дозою 85 мг/кг на тлі (17 тижнів) хронічної інтоксикації, через 48 год зафіксовано зниження осмотичної резистентності еритроцитів.

Відомо про вплив ХПФ на гематологічні параметри риб. Зокрема, у дослідженні Ismail M. та співавторів [161] було показано, що при одноразовому введенні риbam *Labeo rohita* ХПФ у дозах, які становили 1/6, 1/4, 1/2, від LC_{50} , через 96 год відбувалося зростання загальної кількості еритроцитів, вмісту гемоглобіну та показника гематокриту на тлі зростання загальної кількості лейкоцитів.

У роботі Ural M. S. [274] показано зниження загальної кількості еритроцитів, вмісту гемоглобіну, показника гематокриту на тлі зростання

вмісту лейкоцитів при пероральному введенні риbam *Cyprinus carpio carpio* ХПФ дозою 40 мг/кг впродовж 14 днів.

Однак, незважаючи на виявлені у літературі свідчення різних авторів про гематологічні зміни з боку системи крові за дії ХПФ, з'ясування особливостей етіології та патогенезу при отруєннях ХПФ різного ступеня важкості є актуальним як показник загально-клінічного стану організму. З іншого боку, залишаються нез'ясованими аспекти впливу дестабілізаційних факторів ХПФ-індукованого оксидативного стресу на кількісний та якісний склад формених елементів крові, зокрема еритроцитів, резистентність їхніх мембран до гемолітиків та участь основного білка еритроцитів – гемоглобіну в оптимальному постачанні кисню до органів і тканин.

1.4. Способи корекції оксидативного стресу у тварин за допомогою сполук з антиоксидантними властивостями

Утворення АФО у організмі відбувається за нормальних умов [36, 78, 80], проте за дії ксенобіотиків та екстремальних умов у біологічних системах може посилюватись інтенсивність цих процесів [82, 88]. Оскільки ХПФ, як і багато ксенобіотиків, є ліпофільною сполукою, він здатен взаємодіяти з ліпідами біологічних мембран [275]. Виникнення цієї взаємодії супроводжується утворенням різноманітних молекул та атомів із неспареними електронами, що можуть модифікувати клітинні структури, інактивувати мембраннозв'язані ензими, спричиняти накопичення стійких хімічно інертних метаболітів, здійснювати імуносупресорну функцію [162, 168].

У дослідженні Aly N. та співавторів [93] для зниження рівня оксидативного стресу у печінці мишей застосовували вітамін С, який вводили перорально дозою 200 мг/кг за 30 хв до введення ХПФ та через 30 хв після його введення. Через 24 год у печінці мишей було виявлено зниження вмісту ТБК-активних продуктів за обох типів введення. При введенні

вітаміну С до отруєння ХПФ було виявлено зростання вмісту GSH, що супроводжувалось збільшенням активності КАТ, СОД, ГПО, Г-S-T та Г6ФД практично до контрольних значень.

У роботі Verma R. та співавторів [280] для корекції оксидативного стресу застосовували комплекс вітамінів А (2 мкг/кг), Е (20 мкг/кг) та С (120 мкг/кг), який вводили перорально впродовж 30 діб після введення ХПФ. За дії вітамінів у тканинах печінки, нирок, селезінки та мозку було виявлено, зменшенн вмісту ТБК-активних продуктів, зниження співвідношення GSH/GSSG та повернення активностей СОД, КАТ, Г6ФД практично до контрольних значень.

У роботі Ma P. та співавторів [192], проведений на мишах, було показано, що пероральне введення тваринам вітаміну Е дозою 100 мг/кг спричиняло зростання вмісту GSH на тлі зниження загальної кількості прооксидантів та вмісту ТБК-активних продуктів у тканинах мозку, нирок та печінки мишей.

Ojha A. та співавтори [212] виявили, що при пероральному введенні щурам комплексу вітамінів А (2,0 мг/кг), Е (20,0 мг/кг) та С (120 мг/кг) впродовж 15 діб до введення ХПФ було виявлено зростання вмісту відновленого глутатіону, збільшення співвідношення GSH/GSSG та зниження активностей Г6ФД і ГР у печінці, мозку та селезінці щурів.

У дослідженні, проведеному на рибах *Danio rerio*, Rodriguez-Fuentes G. та співавтори [233] встановили, що при обробці заплідненої ікри вітаміном С у дозах 200 та 400 мкг/л впродовж 72 год у зародків риб спостерігали тенденцію до зростання активності КАТ та вмісту вмісту GSH порівняно з контрольними тваринами. Зростання активності КАТ в ікрі риб автори розглядають як негативне явище, оскільки в дослідженнях *in vitro* було показано, що аскорбат може виступати як прооксидант та спричиняти утворення гідроген пероксиду [99].

У дослідженні в умовах *in vitro* Saxena R. та співавтори [250] виявили, що при інкубації еритроцитів щурів в середовищі, яке містило 0,01% розчин

вітаміну Е, впродовж 3 год при 37 °С у еритроцитах щурів спостерігали зменшення вмісту гідроперекисів ліпідів, водночас зафіксували зростання активностей СОД, КАТ та Г-S-T практично до контрольних значень.

Yu F. співавтори [287] у дослідженні на мишах показали, що при пероральному введенні тваринам вітамінів С (дозою 250 мг/кг) та Е (дозою 150 мг/кг) протягом 6 діб до введення розчину ХПФ у сітківці тварин зафіксували послаблення апоптичних ефектів та повернення до норми показників системи антиоксидантного захисту. Зокрема, автори повідомили про зменшення вмісту ТБК-активних продуктів на тлі повернення до контрольних значень активностей СОД, КАТ та ГПО у гомогенатах сітківки мишей.

У дослідженнях Acker C. I. та співавторів [88] встановлено, що при одноразовому введенні щурам лінії Вістар дифенілдиселеніду $(\text{PhSe})_2$ дозою 5 мг/кг впродовж 7 діб до та після введення ХПФ виявлено протекторний вплив лише $(\text{PhSe})_2$, введеного після інтоксикації ХПФ. Було виявлено нормалізацію вмісту карбоксильних груп білків, ТБК-активних продуктів та зниження активностей КАТ. Водночас спостерігали зростання активностей ГПО, Г-S-T та СОД.

У дослідженнях Kaur R. та співавторів [169] з метою пом'якшення оксидативних порушень крові у буйволів *Bubalus bubalis* використовували Натрію селеніт $(\text{Na}_2\text{SeO}_3)$ дозою 0,05 мг/кг, який випоювали тваринам впродовж 20 тижнів. З'ясувалось, що використана доза натрію селеніту сприяла нормалізації вмісту гідроперекисів ліпідів, GSH та зниженню активності КАТ, СОД, Г-S-T, ГР та Г6ФД практично до контрольних значень, що свідчить про коригувальний вплив зазначеної сполуки.

Mansour S. A. [195] у дослідженнях на щурах показав, що при випоюванні тваринам сульфату цинк $(\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O})$ дозою 227 мг/кг впродовж 28 діб в еритроцитах щурів спостерігали зниження вмісту ТБК-активних продуктів, активностей СОД, Г-S-T та КАТ. Водночас показано, що за аналогічних умов експерименту та доз сульфату цинку у печінці та нирках

щурів встановлено вірогідне зниження рівня ТБК-активних продуктів та активностей СОД та Г-S-T до контрольних показників.

Umosen A. та співавтори [273] виявили, що при пероральному введенні щурам мелатоніну дозою 0,5 мг/кг за 10 хв до введення ХПФ впродовж 28 діб у сім'яниках та гіпофізі щурів спостерігали зниження рівня ТБК-активних продуктів та активності СОД і КАТ практично до контрольних значень.

У роботі Ghayomi F. [149] для корекції оксидативних порушень у Т-лімфоцитах людини, спричинених їх інкубацією з ХПФ в умовах *in vitro*, використовували мелатонін, коензим Q₁₀ та вінпоцетин. Ці речовини додавали в інкубаційне середовище у дозах: 720 (мелатонін), 145 (коензим Q₁₀) і 60 мкмоль (вінпоцетин) та інкубували впродовж 72 год за 37 °С. Всі застосовані речовини спричинили зниження вмісту ГПЛ, збільшення показника загальної антиоксидантної активності, зниження активності МПО та зростання вмісту тіолових груп.

Для корекції оксидативних порушень в еритроцитах щурів у дослідях Demir F. та співавтори [126] застосовували біофлавоноїди – катехін і кверцетин, які вводили перорально дозою 20 мг/кг впродовж 4 тижнів. Обрані дози речовин спричиняли зниження в еритроцитах вмісту ТБК-активних продуктів на тлі зростання активностей СОД, КАТ та ГПО порівняно з показниками тварин, які отримували лише розчин ХПФ.

Дослідження Singh V. та співавторів [257] показали, що при пероральному введенні щурам лінії Вістар розчину 4-аліл-2-метоксифенолу (C₁₀H₁₂O₂) дозою 250 мг/кг протягом 15 діб відбувалось повернення до контрольних значень ліпідного профілю та антиоксидантних показників кори головного мозку тварин, зокрема зменшення вмісту ТБК-активних продуктів та зниження активностей Г-S-T, ГПО, ГР, КАТ.

У дослідженні Mosbah R. та співавторів [204] було показано, що пероральне введення щурам олії кмину чорного *Nigella sativa* дозою 1 мл/кг впродовж 4 тижнів призводило до зниження вмісту ТБК-активних продуктів

на тлі зростання вмісту GSH та активностей ГПО, КАТ, СОД та Г-S-T у плазмі та сім'яниках щурів.

Smida A. та співавтори [261] виявили, що при введенні щурам водного екстракту кактусу *Opuntia ficus indica* дозою 100 мг/кг впродовж 30 діб у селезінці та тимусі відбувалось зниження продукції ПОЛ, про що свідчило збільшення вмісту ТБК-активних продуктів, водночас у селезінці й тимусі спостерігали зростання активностей СОД, КАТ та ГПО до показників контрольної групи.

На сучасному етапі досліджень численними авторами показано доцільність та ефективність застосування сполук із прооксидантними властивостями для корекції порушень окисно-відновного балансу, спричиненого отруєннями ХПФ. Зокрема, встановлено позитивну динаміку змін показників системи АОЗ при введенні біофлавоноїдів, солей неорганічних речовин, вітамінних препаратів.

Висновки з огляду літератури та вибір напрямів досліджень

На основі проведеного аналізу даних сучасної вітчизняної та іноземної наукової літератури за темою дисертаційної роботи визначено проблеми і питання, які на цей час вивчені недостатньо. Зокрема, це стосується показників антиоксидантного статусу основних формених елементів крові – еритроцитів, їх резистентності до кислотного гемолізу за умов гострих та хронічних отруєнь ХПФ і стану кисень-транспортних властивостей гемоглобіну. Варто зазначити, що пошук сполук та вибір доз, які дозволяють підвищити неспецифічну резистентність організму до отруєнь ФОС та не спричиняють негативних ефектів при тривалому лікувально-профілактичному введенні, є актуальним для мінімізації негативних довготривалих наслідків отруєнь. Важливими є дослідження активності ензимів антиоксидантного захисту еритроцитів, підтримання стабільності

їхніх мембран та пов'язане з цим постачання киснем, органів та тканин і функціональні особливості кисневотранспортної функції гемоглобіну за умов ХПФ-індукованого оксидативного стресу. Отже, проведення комплексних біохімічних досліджень щодо токсичної дії ФОС є актуальною проблемою, що вимагає різностороннього вивчення її біохімічних та гематологічних аспектів.

Літературний аналіз дав можливість обґрунтувати актуальність дисертаційної роботи і визначити її основні напрямки досліджень.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Дисертаційна робота виконувалась протягом 2012–2017 років у лабораторії обміну речовин ім. С. Ѓжицького Інституту біології тварин НААН України.

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 та результатів власних досліджень [56, 64, 93, 98,] У роботі був використаний препарат ХПФ виробництва Sigma-Aldrich (США). Препарат розчиняли в соняшниковій олії і за допомогою шлункового зонда вводили щурам. Як антиоксидантний комплекс застосовували розчин, що містив вітамін А дозою 100 000 МО та вітамін Е дозою 0,1 г/кг. Обраний розчин вітамінів вводили щурам за допомогою шлункового зонда. Під час виконання дисертаційної роботи було проведено чотири серії досліджень, які відрізнялись між собою дозою ХПФ і тривалістю його дії на організм піддослідних тварин.

2.1. Схема дисертаційних досліджень

Загальну схему досліджень дисертаційної роботи представлено на рис. 2.1.

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. Виведення щурів з експерименту [76] і забір крові проводили через 15, 30, 45, 60 хв після введення в їхній організм ксенобіотика.

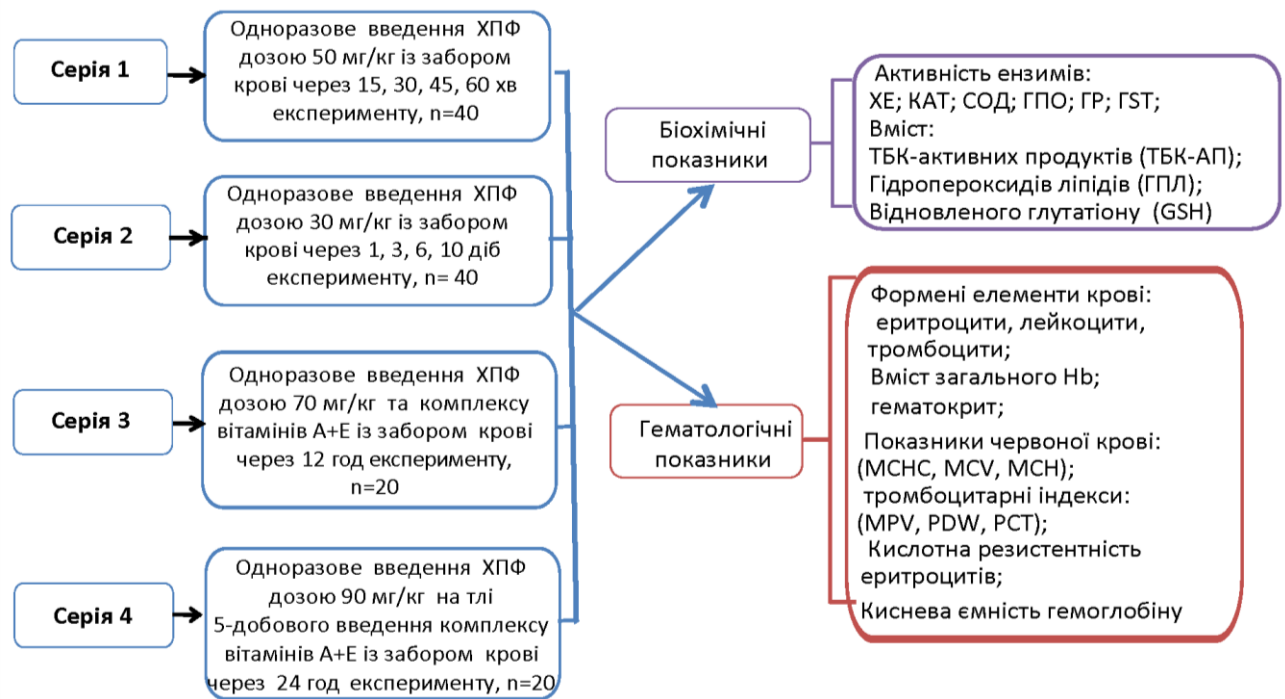


Рис. 2.1. Загальна схема досліджень дисертаційної роботи

Серія досліджень 2. На цьому етапі щурам одноразово вводили 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.

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. Щури 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 з 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.

2.2. Загальні принципи експериментів з лабораторними тваринами

Дослідження були проведені на 120 статевозрілих самцях білих лабораторних щурів лінії Вістар масою тіла 180–250 г, яких утримували у стандартних умовах віварію Інституту біології тварин НААН України з дотриманням 12-годинного режиму освітлення темрява/світло, необмеженим доступом до питної води та корму (стандартний збалансований гранульований комбікорм для лабораторних щурів).

Усі експерименти з тваринами проводили, дотримуючись Європейської конвенції “Про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних і наукових цілей” від 18.03.1986 р., [138], 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» [34]. Комісією з біоетичної експертизи Інституту біології тварин НААН (протокол № 64 від 3 жовтня 2017 року) не встановлено порушень морально-етичних норм при проведенні дослідів з тваринами.

2.3. Відбір експериментального матеріалу від лабораторних тварин

Для досліджень використовували цільну кров, яку отримували після декапітації тварин сироватку та плазму крові.

Для отримання плазми кров відбирали у пробірки з попередньо внесеним антикоагулянтом – 1 % розчином гепарину або ЕДТА-К2. Плазму відділяли центрифугуванням при 1000 g впродовж 15 хв. Для отримання сироватки кров відбирали у скляні пробірки без антикоагулянта. Сироватку відділяли від кров'яного згустка, центрифугували протягом 15–20 хв при 1000 g [12, 13, 75].

Для отримання еритроцитів гепаринізовану кров центрифугували в рефрижераторній центрифугі при 1000 g впродовж 15 хв. Плазму відбирали, а червоні кров'яні клітини тричі відмивали за допомогою 0,150 мМ розчину NaCl, кожний раз центрифугуючи суспензію клітин за 1000 g протягом 5 хв. Гемолізати отримували трикратним заморожуванням і відтаюванням суспензій, приготованих додаванням до еритроцитів бідистильованої води, з подальшим центрифугуванням за 7150 g впродовж 15 хв на центрифугі з охолодженням.

Для визначення гематологічних параметрів на автоматичному гематологічному аналізаторі (Orphèe Mythic 18, Швейцарія) зразки крові вносили у пробірки (Terumo Europe N.V., Бельгія), які містили антикоагулянт ЕДТА-К2. Не пізніше, ніж через 2 год після взяття кров аналізували на автоматичному гематологічному аналізаторі.

2.4. Біохімічні параметри, які досліджували у роботі

Усі вимірювання під час визначення досліджуваних показників здійснювали за допомогою сертифікованого устаткування та приладів, які пройшли метрологічну перевірку.

2.4.1. Активність холінестерази (КФ 3.1.1.8) визначали за методом, описаним А. І. Карпищенком [33]. Його принцип ґрунтується на тому, що під дією холінестерази відбувається гідроліз ацетилхолінхлориду з утворенням оцтової кислоти і холіну, що супроводжується утворенням забарвленого комплексу.

Хід визначення. У пробірку вносили 2,5 мл вероналового буферу, 0,1 мл дистильованої води і 0,05 мл сироватки крові. Суміш прогрівали при температурі 37 °С протягом 5 хв на водяній бані, додавали 0,1 мл розчину ацетилхолінхлориду та інкубували протягом 30 хв при температурі 37 °С. Після інкубації додавали 0,1 мл розчину прозерину. Одночасно готували контроль мутності, калібрувальну та холосту проби. У холосту пробу замість дослідного матеріалу вносили відповідний об'єм фізіологічного розчину. Протягом 10 хв вимірювали оптичну густину на спектрофотометрі при довжині хвилі 540 нм проти дистильованої води.

Активність холінестерази, виражену в мкмоль/с×л, розраховували за формулою 2.1:

$$E_{\text{рез.}} = E_{\text{хол.}} - E_{\text{м.}} - E_{\text{досл.}} \cdot \text{мкмоль} \cdot \text{с}^{-1} \cdot \text{л}^{-1} \quad (2.1),$$

де: $E_{\text{хол.}}$ – оптична густина холостої проби; $E_{\text{досл.}}$ – оптична густина дослідної проби; $E_{\text{м.}}$ – оптична густина контролю мутності; $E_{\text{рез.}}$ – результуюча оптична густина.

Розрахунок активності ХЕ проводили за формулою 2.2:

$$C = \frac{E_{\text{рез.}} \times 37,0}{E_{\text{хол.}} - E_{\text{кал.}}} \quad (2.2),$$

де: C – активність ХЕ, мкмоль /с×л; 37 – фактор перерахунку, мкмоль/с×л .

2.4.2. Активність каталази (КФ 1.11.1.6) визначали за методом, описаним М. А. Корольок [38], принцип якого ґрунтується на властивості Гідрогену пероксиду утворювати з солями Молібдену стійкий кольоровий комплекс. Реакцію запускали додаванням до 0,1 мл гемолізату еритроцитів 2 мл 0,03 % розчину H_2O_2 . Реакцію зупиняли через 10 хв додаванням 1,0 мл 4 % молибдату амонію. Інтенсивність забарвлення вимірювали при $\lambda = 410$ нм проти контрольного зразка, в який замість H_2O_2 додавали 2,0 мл дистильованої води. Активність ензиму визначали за формулою (2.3) і виражали в нмоль H_2O_2 /хв на 1 мг протеїну гомогенату тканини:

$$X = \frac{\Delta E_c - \Delta E_d}{t \times V \times 22,2 \times 10^3 \times \Pi} \quad (2.3),$$

де: E – активність каталази, ммоль/мг протеїну за хв; ΔE_c – екстинція контрольної проби, од. екст.; ΔE_d – екстинція дослідної проби, од. екст.; V – об'єм внесеної проби (0,1), мл; t – час інкубації, хв; Π – кількість протеїну в пробі, мг/мл; $22,2 \times 10^3$ – коефіцієнт мілімолярної екстинції H_2O_2 , ммоль $^{-1}\text{cm}^{-1}$.

2.4.3. Активність супероксиддисмутази (КФ 1.15.1.1.) визначали за методом, описаним Є. Є. Дубініною зі співавторами [24], який ґрунтується на відновленні нітросинього тетразолію до нітроформазону супероксидними аніон-радикалами, що утворюються в реакції між феназинметасульфатом і відновленою формою NADH. До 0,2 мл гемолізату еритроцитів додавали 0,5 мл абсолютного етанолу і 0,3 мл хлороформу, інтенсивно перемішували та центрифугували протягом 30 хв при 4000 g. Далі до 0,1 мл супернатанту додавали 0,1 мл 1 мкМ розчину ЕДТА (Sigma, США), 0,1 мл 1% розчину желатину (Макрохім, Україна), 0,1 мл 1,8 мкМ розчину феназинметасульфату (Sigma-Aldrich, США), 0,1 мл 0,4 мкМ розчину нітротетразолію синього (Acros Organics, Бельгія) і 0,1 мл 1,0 мМ розчину NADH (Acros Organics, Бельгія). Загальний об'єм суміші доводили 0,15 М фосфатним буфером (pH 7,8) до 3,0 мл та інкубували при кімнатній температурі у темному місці протягом 30 хв, після чого при довжині хвилі 540 нм вимірювали величину екстинції контрольних і дослідних проб. У контрольні проби вносили ті самі реагенти, що і в дослідні,

але замість компонентів крові яких використовували адекватну кількість буферу. Активність СОД розраховували за формулою (2.4):

$$X = \frac{\Delta E_c - \Delta E_d}{\Delta E_c} \times 100 \quad (2.4),$$

де: X – ступінь блокування утворення нітроформазану %; ΔE_c – екстинція контрольної проби, од. екст.; ΔE_d – екстинція дослідної проби, од. екст.; 100 – коефіцієнт перерахунку значення у відсотки. Активність СОД виражали в умовних одиницях на 1 мг протеїну.

2.4.4. Активність глутатіонпероксидази (КФ 1.11.1.9) визначали за методом, описаним В. М. Моїном [49]. Принцип методу ґрунтується на порівняльному дослідженні ступеня окиснення відновленого глутатіону (ГВ) пероксидом третинного бутилу, який додається до інкубаційної суміші. Відбувається кольорова реакція, в основі розвитку якої лежить взаємодія SH-груп з 5,5–дитіобіс–2–нітробензойною кислотою, внаслідок чого утворюється забарвлений продукт – тіонітрофенільний аніон. У ході визначення 1 мл гемолізату додавали до інкубаційної суміші, яка містила 2 мл фізіологічного розчину, 0,5 мл 0,25 М трис–буферу (pH 7,4), 0,1 мл 25 ммоль EDTA (Sigma, США), 0,3 мл 1 ммоль глутатіону відновленого (Sigma-Aldrich, США). Запускали реакцію додаванням до інкубаційного середовища 0,1 мл 50 ммоль пероксиду третинного бутилу (Acros Organics, Бельгія). Через 1 хв реакцію зупиняли додаванням 1 мл 10 % розчину метафосфornoї кислоти (Хімлаборреактив, Україна). До 2 мл надосадової рідини, одержаної після центрифугування інкубаційної суміші, додавали 2 мл 0,25 моль трис–буферу (pH 8,9), 0,1 мл 0,04 % розчину дитіонітробензойної кислоти (Sigma-Aldrich, США) і колориметрували при довжині хвилі 412 нм. Концентрацію ГВ, який не окиснився пероксидом третинного бутилу, визначали порівнянням досліджуваної проби зі стандартом. У контрольну пробу замість компонентів крові додавали відповідну кількість фізіологічного розчину. У розрахунках використовували формулу (2.5):

$$X = \frac{(\Delta E_k - \Delta E_d) \times C \times P}{\Delta E_c \times \Pi \times Ч} \quad (2.5),$$

де: X – кількість ГВ, який брав участь в глутатіон-пероксидазній реакції, нмоль/мг протеїну за хв; ΔE_k – екстинція ГВ, який не прореагував з пероксидом третинного бутилу за відсутності глутатіонпероксидази, од. екст.; ΔE_d – екстинція ГВ, який не прореагував з пероксидом третинного бутилу за присутності глутатіонпероксидази, од. екст.; ΔE_c – екстинція GSH стандартного розчину, од. екст.; C – концентрація ГВ стандартного розчину, нмоль; Π – кількість протеїну в пробі, мг; τ – час протікання реакції, хв; P – фактор розведення.

2.4.5. Активність глутатіонредуктази (КФ 1.6.4.2) визначали методом, описаним I. Carlberg [110], принцип якого базується на каталітичній NADPH-залежній реакції відновлення окисненої форми глутатіону (GSSG), інтенсивність якої можна оцінити за швидкістю зниження екстинкції при 340 нм. Реакцію проводили в термостатованій кюветі за температури 37 °C. У кювету вносили 1,8 мл 0,1 М калій-фосфатного буферу (pH 7,0) з додаванням 1 мМ ЕДТА (Sigma, США), 0,1 мл 20 мМ водного розчину окисненого глутатіону (Sigma-Aldrich, США) і 100 мкл розведеного гемолізату еритроцитів. Через 3 хв реакцію запускали додаванням 0,1 мл 2 мМ розчину NADPH (Sigma-Aldrich, США), розчиненого в 10 мМ Трис-HCl (Sigma-Aldrich, США) буфері, pH 7,0. Як контроль використовували суміш, у яку вносили в такому самому об'ємі 0,1 М калій-фосфатний буфер (pH 7,4). Розрахунок активності ГР здійснювали, використовуючи молярний коефіцієнт світлопоглинання для NADPH при довжині хвилі 340 нм ($\epsilon = 6200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Активність ензиму виражали в мкмоль NADPH /хв на 1 мг протеїну.

2.4.6. Активність глутатіон-S-трансферази (КФ 2.5.1.18) визначали за методом, описаним W. H. Habig [153]. Принцип цього методу ґрунтується на реакції взаємодії відновленого глутатіону з 1-хлор-2,4-динітробензолом у присутності глутатіон-S-трансферази з утворенням кон'югату, котрий характеризується максимумом світлопоглинання при довжині хвилі 340 нм. У процесі визначення реакцію здійснювали в термостатуючій кюветі при температурі +37 °C. У кювету вносили 1,2 мл 2 мМ розчину глутатіону

відновленого (Sigma-Aldrich, США) у 0,1 М калій-фосфатному буфері (pH 6,5) і 0,1 мл досліджуваного зразка. Реакцію запускали додаванням 1,2 мл 1-хлор-2,4-динітробензолу. Оптичну густину продуктів реакції вимірювали проти 0,1 М калій-фосфатного буферу при довжині хвилі 340 нм у кюветі з довжиною оптичного шляху 10 мм. За контроль слугували результати вимірювання оптичної густини суміші, у яку замість дослідного зразка додавали 0,1 мл калій-фосфатного буферу (pH 7,4). Розрахунок активності Г-S-T проводили при довжині світлової хвилі 340 нм ($\epsilon = 9600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Ензиматичну активність виражали в мкмоль/(хв на г протеїну), або мкмоль/(хв на г гемоглобіну).

2.4.7. Вміст глутатіону відновленого вимірювали колориметрично методом, описаним Р. J. Hissin [159]. В основі методу лежить кольорова реакція, яка розвивається при взаємодії SH-груп з 5,5'-дитіобіс-2-нітробензойною кислотою з утворенням забарвленого продукту – тіонітрофенільного аніону. У процесі визначення до 0,6 мл гемолізату еритроцитів з метою осадження протеїну додавали 0,2 мл 20% розчину сульфосаліцилової кислоти (Хімлаборреактив, Україна). Проби центрифугували впродовж 10 хв за 1000 g. Супернатант (0,1 мл) переносили у пробірки, які містили 2,55 мл 0,1 М Тріс-НС1 буферу (Sigma-Aldrich, США) з 0,01% ЕДТА (Sigma, США), pH 8,5. До отриманої суміші додавали 25 мкл розчину 5,5'-дитіобіс-2-нітробензойної кислоти (Fluka, Німеччина). Після утворення забарвлення визначали показник екстинкції на спектрофотометрі СФ-26 при $\lambda=412$ нм в кюветі з довжиною оптичного шляху 10 мм проти дистильованої води. Розрахунок вмісту GSH проводили за калібрувальним графіком і виражали в ммоль/г тканини.

2.4.8. Вміст гідропероксидів ліпідів визначали за методом, описаним В. Б. Гавриловим [15], який ґрунтується на спектрофотометричному вимірюванні оптичної густини продуктів реакції з тіоціанатом амонію, сіллю Мора і соляною кислотою. До 0,2 мл плазми крові, яка містила 0,5 мг/мл натрію оксалату (Хімлаборреактив, Україна), додавали 2,8 мл етанолу та

0,05 мл 50 %-го розчину ТХО (Хімлаборреактив, Україна) і струшували протягом 5–6 хв. Протеїновий осад, який при цьому утворювався, відділяли центрифугуванням протягом 10 хв при 1000 g. Відбирали 1,5 мл супернатанту і доводили до 2,7 мл етанолом, додавали 0,02 мл концентрованої HCl (Сфера Сім, Україна) і 0,03 мл 1 %-го розчину солі Мора (Сфера Сім, Україна) в 3 %-му розчині HCl. Вміст струшували і через 30 с додавали 0,2 мл 20 %-го розчину тіоціанату амонію (Acros Organics, Бельгія), після чого утворювався забарвлений комплекс. Вимірювання оптичної густини проводили при $\lambda = 480$ нм. Вміст гідропероксидів ліпідів виражали у величинах оптичної густини при 480 нм на 1 мл плазми крові.

2.4.9. Вміст ТБК-активних продуктів визначали за методом, описаним Е. Н. Коробейниковою [37], в основі якого лежить реакція між малоновим диальдегідом (МДА) і тіобарбітуровою кислотою (ТБК), яка при високій температурі і кислому середовищі проходить з утворенням кольорового триметинового комплексу. У процесі визначення до 1 мл плазми крові додавали 4,5 мл 20 % фосфорновольфрамової кислоти (Макрохім, Україна) і центрифугували протягом 15 хв при 1000 g. До осаду додавали 1,0 мл 0,8 % розчину ТБК (Sigma-Aldrich, США) і витримували протягом 1 год на водяній бані за температури 100 °С. В одержаній надосадовій рідині вимірювали оптичну густину при довжині хвилі 535 і 580 нм проти контрольної проби, яка замість плазми крові містила відповідну кількість дистильованої води. Вміст ТБК-активних продуктів розраховували за формулою 2.6:

$$C = 0,21 + 26,5 \Delta D \quad (2.6),$$

де: C – концентрація ТБК-активних продуктів; ΔD – показник $D_{535} - D_{580}$ в надосадовій рідині. Концентрацію ТБК-активних продуктів виражали в нмоль/мл/хв у плазмі крові, використовуючи коефіцієнт молярного поглинання, який дорівнює $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ на cm^{-1} .

2.4.10. Вміст загального протеїну у біологічному матеріалі визначали за методом, описаним О. Н. Lowry [182]. Принцип методу полягає у здатності Cu^{2+} утворювати в лужному середовищі комплекс з пептидними

зв'язками, відновлюючись до Cu^+ . Одновалентні йони міді реагують з реактивом Фоліна, утворюючи забарвлений комплекс з максимумом поглинання при 750 нм. Оскільки збільшення адсорбції при 750 нм прямо пропорційне концентрації протеїну в пробі, то вміст загального протеїну визначали на основі калібрувального графіка.

2.5. Гематологічні параметри, які досліджували у роботі

Дослідження основних гематологічних показників крові здійснювали на автоматичному гематологічному аналізаторі Orphee Mythic 18 (Швейцарія). За його допомогою здійснювали: підрахунок кількості еритроцитів, лейкоцитів, лімфоцитів, моноцитів, гранулоцитів, тромбоцитів та розрахунок вмісту гемоглобіну гематокриту, тромбокриту, середнього тромбоцитарного об'єму і показника гетерогенності тромбоцитів за об'ємом.

2.5.1. Резистентність еритроцитів до кислотного гемолізу
досліджували за методом, описаним А. І. Терсковим та І. І. Гітельзоном [17], шляхом побудови кривих гемолізу еритроцитів. Метод базується на використанні прямої залежності між часом гемолізу еритроцитів та дією гемолітика, що використовується для їх гемолізу.

Аналіз гемолітичних еритрограм проводили за такими параметрами, як: час максимального гемолізу (хв); відсоток гемолізованих еритроцитів у момент максимального гемолізу (% max); тривалість тотального гемолізу (хв).

Відмиті еритроцити розводили 0,150 Ммоль NaCl у співвідношенні 1:1000. Отриману суспензію розводили для досягнення нею екстинції в межах 0,700–750 при довжині хвилі 630 нм. Дослідження здійснювали у термостатованій кюветі для підтримання сталої температури зразків, оскільки кінетика гемолізу залежить від температури розчину, в якому відбувається, важливим є дотримання температурного режиму. Оптимальною для дослідження вважається температура +24 °C. У кювету вносили 2 мл

суспензії еритроцитів і додавали аналогічний об'єм гемолізуючого розчину 0,004 Н HCl, приготованого в 0,150 Ммоль розчині NaCl. З моменту додавання гемолітика через кожні 30 с фіксували зміни екстинції при довжині хвилі 630 нм. Моніторинг проводили до моменту повного припинення змін значень екстинції. У контрольну кювету поміщали 2 мл H₂O і додавали 2 мл 0,004 Н розчину HCl, приготованого на 0,150 мМ NaCl. Процентний розподіл еритроцитів за резистентністю зображали у вигляді еритрограми – кривої залежності між процентом гемолізованих еритроцитів і часом гемолізу.

2.5.2. Вмісту лігандних форм гемоглобіну визначали за методом, описаним О. І. Білим [5]. Для визначення вмісту п'яти лігандних форм гемоглобіну (RHb – дезокси-, HbO₂ – окси-, HbCO–карбокси, SHb–сульф і MetHb – метгемоглобіну) використовували гемолізати свіжовзятої цільної крові. Гемоліз проводили 3 мМ K⁺, Na⁺-фосфатним буфером, рН 7,36. Оптичну густину гемолізатів визначали на спектрофотометрі Specord M-40 (Німеччина) за довжини хвилі 554,8; 577,4; 569,5; 620,3 і 500,0 нм.

2.5.3. Спорідненість гемоглобіну до O₂ досліджували спектрофотометричним методом у модифікації Ю. Г. Іванова шляхом побудови кривих оксигенації [30].

Відомо, що спектри поглинання оксигенованого/деоксигенованого гемоглобіну в діапазоні 400–800 нм істотно відрізняються. На врахуванні цієї різниці засновано метод спектрофотометричного аналізу сумішей окси- і деоксигемоглобіну. Визначення проводили у тонометричній кюветі за постійної температури в термостаті. Оптичну густину розчину визначали при 558 нм на спектрофотометрі СФ-26. У кювету запускали певні порції повітря. Після кожного запуску повітря кювету тонометрували через 10 хв. Останні виміри проводили після витримування розчину при атмосферному тиску. Так проведено 6–7 вимірів, на основі яких побудовано киснево-дисоціаційні криві гемоглобіну. Насичення гемоглобіну киснем обчислювали за формулою 2.7:

$$\% \text{HbO}_2 = \frac{D_{\text{Hb}} - D_x}{D_{\text{Hb}} - D_{\text{HbO}_2}} \quad (2.7)$$

де: D_{Hb} – оптична густина деоксигемоглобіну; D_{HbO_2} – оптична густина оксигемоглобіну; D_x – оптична густина розчину гемоглобіну при даному парціальному тиску.

При побудові кривих дисоціації оксигемоглобіну на осі абсцис відкладаються значення парціальний тиск кисню або його десяткові логарифми, а на осі ординат – насичення гемоглобіну киснем, виражене у відсотках.

Для аналізу використовували розчин гемолізату в 0,02 М тріс-НСІ буфері, рН 7,2, що містить 1 мм ЕДТА. Відцентрифуговані і тричі промиті 0.150 М-ним розчином NaCl еритроцити гемолізували дистильованою водою. Гемолізат центрифугували при 7150g і фільтрували для відокремлення строми й одержання оптично прозорого розчину. Процедуру проводили за температури 2–4 °С.

Криві насичення гемоглобіну киснем визначались за оптимальної температури (+37 °С для підтримання стабільної концентрації гемоглобіну при вимірах 20 °С).

2.6. Статистична обробка результатів

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

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

Як було описано в загальній схемі досліджень, представлений у розділі 2 «Матеріали і методи», у дисертаційній роботі вивчали вплив ХПФ на щурів у дозах 30, 50, 70, 90 мг/кг. Вибір цих доз для досліджень ґрунтувався на глибокому аналізі літературних джерел та даних попередніх досліджень лабораторії обміну речовин Інституту біології тварин НААН України [60, 151, 238, 241]. Вплив на організм щурів ХПФ в обраних для досліджень дозах був описаний зокрема Е. Е. Elsharkawy [135], який показав, що за хронічної інтоксикації щурів ХПФ дозою 30 мг/кг було зафіксовано порушення прооксидантно-антиоксидантної рівноваги у тканинах щурів. Натомість в іншій роботі С. І. Aker [88] вказує на те, що одноразова інтоксикація щурів ХПФ дозою 50 мг/кг спричиняє виникнення гіперглікемії. Водночас V. Singh [257] стверджує, що щоденне введення ХПФ дозою 89,4 мг/кг впродовж 15 діб спричиняло зміну ліпідного профілю та інтенсифікації процесів ПОЛ у корі головного мозку щурів. Таким чином, враховуючи вищевказані дані, ми розробили схему досліджень дисертаційної роботи з використанням вказаних доз та тривалості дії на організм щурів ХПФ.

3.1. Біохімічні та гематологічні та показники крові щурів за гострої інтоксикації ХПФ дозою 50 мг/кг

У численних роботах, наведених у розділі 1 «Огляд літератури», показано, що ХПФ може впливати на перебіг прооксидантно-антиоксидантних процесів, активність ензимів системи антиоксидантного захисту, процесів ліпопероксидації, ендокринної регуляції. Проте в літературі недостатньо інформації щодо досліджень фізико-хімічних властивостей мембран еритроцитів,

антиоксидантного статусу їх гемолізатів та спорідненості гемоглобіну до кисню за ХПФ-індукованого стресу. Зважаючи на те, що інтенсивність та напрямленість прооксидантно-антиоксидантних процесів може відрізнятися на різних етапах інтоксикації ХПФ, було проведено дослідження динаміки цих процесів. З цією метою через 15, 30, 45 та 60 хв після одноразового введення щурам ХПФ дозою 50 мг/кг було здійснено відбір матеріалу для досліджень.

3.1.1. Холінестеразна активність в крові щурів за гострої інтоксикації ХПФ дозою 50 мг/кг. Враховуючи той факт, що максимум інгібування ХЕ спостерігається на ранніх стадіях після інтоксикації, було проведено визначення активності цього ензиму у сироватці крові за умов інтоксикації ХПФ впродовж 1 год. У результаті досліджень у сироватці крові експериментальних тварин спостерігали зниження холінестеразної активності на 42,5 % ($p < 0,001$) (Д1), 65,5 % ($p < 0,001$) (Д2), 81,1 % ($p < 0,001$) (Д3), 54,6 % ($p < 0,001$) (Д4) порівняно з контрольними групами тварин (рис. 3.1).

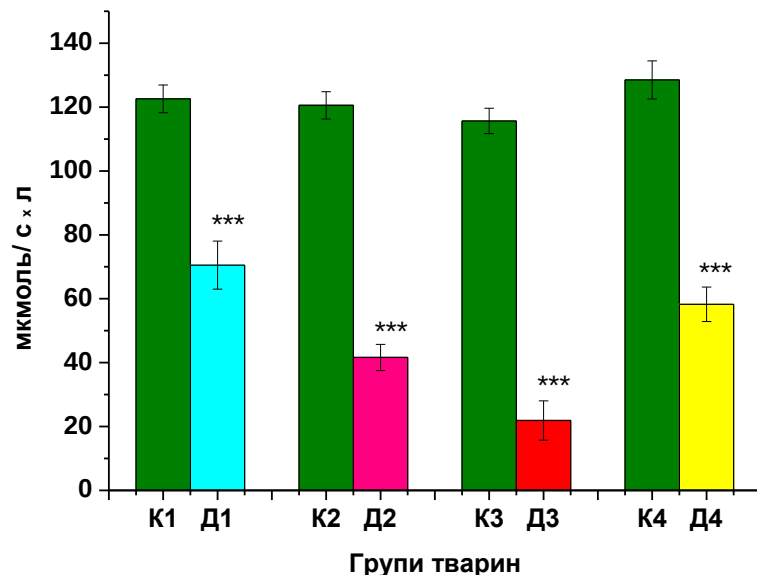


Рис. 3.1. Холінестеразна активність у сироватці крові щурів через 15 (Д1), 30 (Д2), 45 (Д3), 60 (Д4) хв після інтоксикації ХПФ дозою 50 мг/кг ($M \pm m$, $n=5$).

Протягом перших 45 хв було виявлене швидке і практично лінійне зниження ХЕ-активності. Виявлене зниження активності цього ензиму в сироватці крові щурів слугує підтвердженням наявності ознак інтоксикації у крові щурів за дії ХПФ.

3.1.2. Прооксидантно-антиоксидантні параметри еритроцитів щурів за гострої інтоксикації ХПФ дозою 50 мг/кг впродовж 1 год.

З літератури відомо, що ХПФ індукує утворення активних форм Оксигену, здатних впливати на ензиматичні і неензиматичні компоненти системи антиоксидантного захисту [19, 284, 210, 290], тому було проведено визначення каталазної та супероксиддисмутазної активності у гемолізатах еритроцитів щурів через 15, 30, 45, 60 хв після введення тваринам цієї сполуки дозою 50 мг/кг (табл. 3.1).

Таблиця 3.1

Активність КАТ та СОД у гемолізатах еритроцитів щурів впродовж 1 год після інтоксикації ХПФ дозою 50 мг/кг ($M \pm m$, $n=5$)

Час, хв	Група тварин	Досліджуваний показник	
		КАТ	СОД
		ммоль H_2O_2 /хв•мг прот.	ум. од./мг прот.
15	К1	11,52±0,16	0,11±0,01
	Д1	10,54±0,36*	0,04±0,02*
30	К2	10,93±0,13	0,14±0,03
	Д2	9,99±0,48*	0,17±0,04
45	К3	11,40±0,20	0,10±0,01
	Д3	10,92±0,11*	0,06±0,02
60	К4	11,12±0,12	0,13±0,01
	Д4	11,56±0,27	0,20±0,01*

Примітка: у цій та наступних таблицях * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ різниця вірогідна порівняно із контрольною групою.

У результаті проведених досліджень було виявлено вірогідне зниження супероксиддисмутазної активності у групі Д1 на 63,6 % ($p < 0,05$) та вірогідне зростання у групі Д4 на 53,8 % ($p < 0,05$) порівняно із контрольними показниками відповідних груп. Інгібування супероксиддисмутазної активності за дії ХПФ могло бути зумовлене надмірним збільшенням у клітинах еритроцитів щурів вмісту вільних радикалів (синглетного Оксигену, пероксиду гідрогену, гідроксильних радикалів тощо), які можуть змінювати фізичні та хімічні властивості цього ензиму.

КАТ здійснює реакцію каталізу пероксиду гідрогену, що утворюється в результаті реакції дисмутації супероксидного радикала. Активність цього ензиму проявляється майже у всіх клітинах і органах. Як видно з результатів наших досліджень (табл. 3.1), у крові щурів, інтоксикованих ХПФ дозою 50 мг/кг, каталазна активність була нижчою, ніж у тварин контрольної групи. На 15, 30, 45 хв досліду (групи Д1, Д2, Д3 відповідно), активність каталази вірогідно знижувалася порівняно з контролем і досягала найнижчих значень через 30 хв після введення щурам ХПФ (група Д2). Важливим аспектом досліджень було з'ясувати характер перебігу процесів глутатіонової системи та процесів вільнорадикального окиснення в гемолізатах еритроцитів крові щурів впродовж 1 год після інтоксикації ХПФ.

Як показано у табл. 3.2, через 15 хв, після інтоксикації ХПФ (група Д1) вміст відновленого глутатіону зростав на 17,6 % ($p < 0,05$) порівняно з контролем. У наступному часовому інтервалі, через 30 хв після введення хлорпірифосу, у групі Д2 спостерігали зворотне явище: вміст відновленого глутатіону знижувався на 44 % ($p < 0,05$) порівняно з показниками відповідних контрольних груп.

Таблиця 3.2

Вміст відновленого глутатіону (GSH), активність глутатіонпероксидази (ГПО) та глутатіонредуктази (ГР) в гемолізатах еритроцитів щурів протягом 1 год після впливу ХПФ ($M \pm m$, $n=5$)

Час, хв	Група тварин	Досліджуваний показник		
		ГПО	GSH	ГР
		мкмоль GSH/мг протеїну•хв	мкмоль GSH/мг протеїну	мкм NADPH/хв•мг білка
15	К1	0,12±0,005	16,10±2,06	0,09±0,007
	Д1	0,15±0,004*	40,79±6,45*	0,12±0,005*
30	К2	0,10±0,005	13,10±2,06	0,09±0,01
	Д2	0,05±0,003*	26,48±3,27*	0,07±0,011
45	К3	0,11±0,01	17,10±2,06	0,09±0,013
	Д3	0,11±0,003	26,84±7,53	0,08±0,006
60	К4	0,12±0,007	14,10±2,06	0,10±0,009
	Д4	0,12±0,018	21,47±5,50	0,08±0,007

Найсуттєвіше зростання глутатіонпероксидазної активності (табл. 3.2) в гемолізатах еритроцитів щурів протягом 1 год після введення ХПФ спостерігали через 15 хв після введення в групі Д1. У зазначеній групі тварин зростання активності ГПО перевищило контрольні значення в 2,5 рази ($p<0,05$). Також ми зафіксували збільшення активності цього ензиму у 2 рази ($p<0,05$) порівняно з контрольною групою через 30 хвилин після введення ХПФ (група Д2). Вірогідне збільшення активності ГПО у групі Д2, очевидно, призводило не тільки до розщеплення пероксиду гідрогену, але також запобігало накопиченню гідроксигруп (OH^-) [26]. Зважаючи на важливість у регуляції прооксидантно-антиоксидантного балансу ГР, яка забезпечує відновлення окисненого глутатіону за участю донорів протонів і електронів

НАДФН або НАДН, було проведено визначення активності цього ензиму. Глутатіонредуктазна активність (табл. 3.2) зростала на 26,8 % ($p<0,05$) у групі Д1 на початковому етапі інтоксикації порівняно з контролем лише у ХПФ.

Для оцінки інтенсивності вільнорадикальних процесів також було проведено дослідження вмісту, первинних та вторинних продуктів пероксидного окиснення ліпідів – відповідно, гідропероксидів та ТБК-активних продуктів. Встановлено, що вміст гідропероксидів ліпідів зростав на 45 % ($p<0,05$) у зразках крові групи Д4 через год після введення ХПФ порівняно з показниками інтактних тварин. (табл. 3.3).

Таблиця. 3.3

Вміст ТБК-активних продуктів та гідропероксидів ліпідів в гемолізатах еритроцитів щурів протягом 1 год після впливу ХПФ ($M\pm m$, $n=5$)

Час, хв	Група тварин	Досліджуваний показник	
		ТБК-активні продукти	ГПЛ
		у.о./мл	мкмоль/мл
15	К1	0,33±0,02	0,55±0,13
	Д1	0,25±0,04	0,62±0,12
30	К2	0,31±0,03	0,65±0,09
	Д2	0,57±0,05*	0,52±0,11
45	К3	0,29±0,05	0,53±0,11
	Д3	0,69±0,03*	0,64±0,09
60	К4	0,32±0,04	0,63±0,09
	Д4	0,41±0,03	0,99±0,10*

Своєю чергою, вміст ТБК-активних продуктів (табл. 3.3) був значно вищим у гемолізатах еритроцитів щурів, інтоксикованих ХПФ через 30 (група Д2) і 45 хв (група Д3) на 80 %, ($p<0,05$) і 1,39 раза ($p<0,05$) відповідно.

Отже, підсумовуючи динаміку як ензиматичних, так і не ензиматичних параметрів глутатіонової системи у гемолізатах еритроцитів щурів у різні проміжки часу після інтоксикації ХПФ, можна стверджувати, що найбільш вагомі відхилення більшості досліджуваних параметрів відбувались в перші 15–30 хв після отруєння.

3.1.3. Гематологічні показники крові щурів за гострої інтоксикації ХПФ дозою 50 мг/кг впродовж 1 год. Аналізуючи гематологічні параметри крові щурів протягом першої години після інтоксикації ХПФ, ми виявили суттєві відмінності у кількості формених елементів крові та резистентності еритроцитів до кислотного гемолізу. У табл 3.4 наведено вплив ХПФ на компонентний склад крові.

Зокрема було виявлено збільшення кількості еритроцитів майже на 9 % ($p < 0,05$) порівняно з контрольною групою у групі Д1 через 15 хв після інтоксикації. Водночас у групі Д1 зафіксували збільшення вмісту гемоглобіну на 11 % ($p < 0,05$), показника гематокриту – на 6,3 % ($p < 0,05$) порівняно з контролем.

Таблиця 3.4

Гематологічні показники крові щурів за інтоксикації ХПФ дозою 50 мг/кг впродовж 1 год ($M \pm m$, $n=5$)

Показник	Група тварин							
	К1	Д1	К2	Д2	К3	Д3	К4	Д4
Еритроцити, $1 \cdot 10^{12}/\text{л}$	$7,5 \pm 0,20$	$8,1 \pm 0,30^*$	$7,2 \pm 1,1$	$7,1 \pm 0,3$	$7,3 \pm 1,9$	$6,3 \pm 0,1$	$7,9 \pm 2,7$	$5,9 \pm 0,8$
Загальний гемоглобін, г/л	$138,5 \pm 3,5$	$154,1 \pm 4,9^*$	$137,5 \pm 3,3$	$129,2 \pm 4,1$	$140,1 \pm 4,4$	$130,5 \pm 3,4$	$136,3 \pm 2,6$	$135,3 \pm 1,7$
Гематокрит, %	$41,5 \pm 1,0$	$44,1 \pm 0,9^*$	$43,2 \pm 1,3$	$42,3 \pm 1,7$	$40,3 \pm 2,1$	$39,7 \pm 2,0$	$41,9 \pm 1,8$	$38,5 \pm 1,5$
MCV, фл	$55,5 \pm 3,6$	$54,2 \pm 2,6$	$53,1 \pm 4,9$	$59,5 \pm 3,5$	$54,0 \pm 4,3$	$63,5 \pm 5,2$	$56,3 \pm 3,1$	$65,5 \pm 4,9$
Лейкоцити, $1 \cdot 10^9/\text{л}$	$12,7 \pm 0,8$	$16,4 \pm 1,5^*$	$13,5 \pm 0,9$	$12,1 \pm 1,6$	$12,1 \pm 1,4$	$9,5 \pm 0,6^*$	$11,3 \pm 1,2$	$8,0 \pm 0,9^*$
Тромбоцити., $1 \cdot 10^9/\text{л}$	$572,3 \pm 32,9$	$448,9 \pm 28,5^*$	$544,5 \pm 41,1$	$401,8 \pm 40,3^*$	$597,2 \pm 58,5$	$278,7 \pm 31,5^*$	$521,9 \pm 46,7$	$229,5 \pm 35,1^*$
MPV, фл	$6,7 \pm 0,1$	$6,6 \pm 0,1$	$6,9 \pm 0,3$	$6,8 \pm 0,2$	$6,7 \pm 0,2$	$6,9 \pm 0,2$	$6,6 \pm 0,2$	$6,5 \pm 0,1$
PDW, %	$25,4 \pm 4,1$	$19,4 \pm 3,8$	$22,2 \pm 5,8$	$21,6 \pm 3,4$	$24,5 \pm 3,1$	$15,4 \pm 5,5$	$23,5 \pm 4,8$	$20,6 \pm 2,3$

Після введення ХПФ спостерігали зміни загальної кількості лейкоцитів. Так, у крові групи Д1 після інтоксикації спостерігали значне збільшення на 29,1 % ($p < 0,05$) кількості лейкоцитів порівняно з групою інтактних тварин (табл. 3.4). Натомість в інших досліджуваних часових періодах спостерігали зниження кількості лейкоцитів. Так, у групі Д2 зменшення кількості цього класу клітин становило 10,3 %, тоді як у групах Д3 і Д4 – 21,9 % ($p < 0,05$) і 28,9 % ($p < 0,05$) відповідно порівняно з контрольними значеннями. Аналіз результатів показав, що за інтоксикації ХПФ дозою 50 мг/кг відбувається зниження кількості тромбоцитів у щурів всіх експериментальних груп порівняно з відповідними групами інтактних тварин. У всіх досліджених часових періодах кількість тромбоцитів зменшувалась: на 21,6 % ($p < 0,05$) у групі Д1, на 26,2 % ($p < 0,05$) у групі Д2, на 53,3 % ($p < 0,05$) у групі Д3 і на 56,0 % ($p < 0,05$) у групі Д4 порівняно із відповідними показниками контрольних тварин. Натомість змін показника розподілу тромбоцитів і середнього об'єму тромбоцитів виявлено не було.

Ймовірно, що в основі зниження вмісту тромбоцитів за дії ХПФ на всіх етапах інтоксикації лежить процес гіперкоагуляції, яке є характерним при отруєннях ФОС на фоні порушення обміну ацетилхоліну, викликаного інгібуванням холінестерази цими сполуками. [81, 86].

Одним із факторів, що забезпечує підтримку гомеостазу в організмі та визначає стійкість еритроцитів до гемолізу, є функціональний стан їхніх мембран. На їхню стійкість до гемолітика впливає, зокрема, час, необхідний гемолітику на подолання мембранного бар'єру, та час, впродовж якого зберігається її (мембрани) цілісність в умовах зростання внутрішньоклітинного (осмотичного) тиску. У кислому середовищі лізис еритроцитів охоплює такі основні етапи: проникнення йонів гідрогену, протонування гемоглобіну та руйнування еритроцитів з поступовою агрегацією їх мембранних протеїнів [28, 73, 74].

Під впливом ксенобіотиків можуть виникати порушення цілісності мембран еритроцитів, зміни поверхневих властивостей ліпідного бішару

і конформації білків мембрани, що спричиняє порушення здатності еритроцитів зв'язувати різні сполуки [25, 86, 142]. Отримані нами кислотні еритрограми (рис. 3.2, табл. 3.5) показують негативний вплив ХПФ на стійкість еритроцитарних мембран до гемолітика і, як наслідок, скорочення тривалості циркуляції еритроцитів у кров'яному руслі.

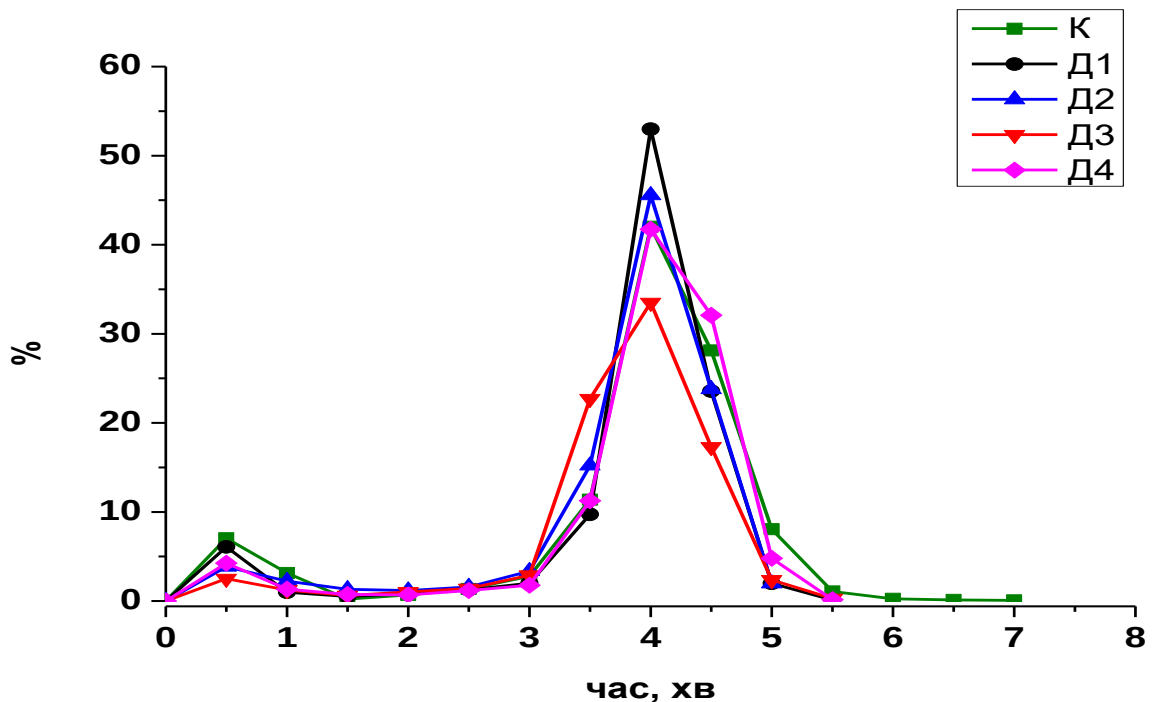


Рис. 3.2 Типові еритрограми крові щурів через 15 (Д1), 30 (Д2), 45 (Д3), 60 (Д4) хв після інтоксикації ХПФ дозою 50 мг/кг ($M \pm m$, $n=5$).

У групі Д1 після інтоксикації ХПФ спостерігали зниження стійкості основного пулу еритроцитів до кислотного гемолітика, що супроводжувалось зростанням на 53 % ($p < 0,05$) відсотка максимального гемолізу цих клітин порівняно з контролем. Водночас групі Д3 (через 45 хв) після введення ХПФ спостерігали зниження відсотка максимуму гемолізу еритроцитів до 34 % ($p < 0,05$). Проте збільшення площі під кривою гемолізу у правій і лівій інфлексії вказує на наявність еритроцитів фракції з підвищеною стійкістю до кислотного гемолізу. Через 60 хв після впливу ХПФ в групі Д4 кількість зруйнованих еритроцитів наближалась до контрольних значень. Поява у крові щурів еритроцитів із вищою стійкістю до дії кислотного гемолізу

може бути обумовлена заміщенням пулу зруйнованих еритроцитів клітинами з більшою стійкістю до гемолізу.

Таблиця 3.5

Параметри еритрограм крові щурів, через 15 (Д1), 30 (Д2), 45 (Д3), 60 хв (Д4) після інтоксикації ХПФ дозою 50 мг/кг ($M \pm m$, $n=5$)

Група тварин	Показник гемолізу		
	Час максимального гемолізу, хв	Час тотального гемолізу, хв	Максимум гемолізу, %
К	4,1 $\pm$ 0,30	6,9 $\pm$ 0,81	42,02 $\pm$ 3,36
Д1	4,1 $\pm$ 0,28	5,3 $\pm$ 0,65	52,97 $\pm$ 3,05*
Д2	4,2 $\pm$ 0,35	5,5 $\pm$ 0,54	45,54 $\pm$ 4,97
Д3	4,1 $\pm$ 0,37	5,6 $\pm$ 0,47	33,50 $\pm$ 2,41*
Д4	4,1 $\pm$ 0,25	5,6 $\pm$ 0, 52	41,73 $\pm$ 3,99

З огляду на важливість встановлення ступеня забезпечення Оксигеном органів і тканин на ранніх етапах за інтоксикації ХПФ дозою 50 мг/кг, були проведені порівняльні дослідження кінетики насичення киснем гемоглобіну щурів методом побудови кривих оксигенації. Аналіз результатів показав, що через 1 год після введення ХПФ в організм у всіх дослідних групах спорідненість гемоглобіну до кисню знижується, про що свідчать значення показників коефіцієнта Гілла та значень, P_{75} , та P_{90} відповідних груп (рис. 3.3, табл 3.6).

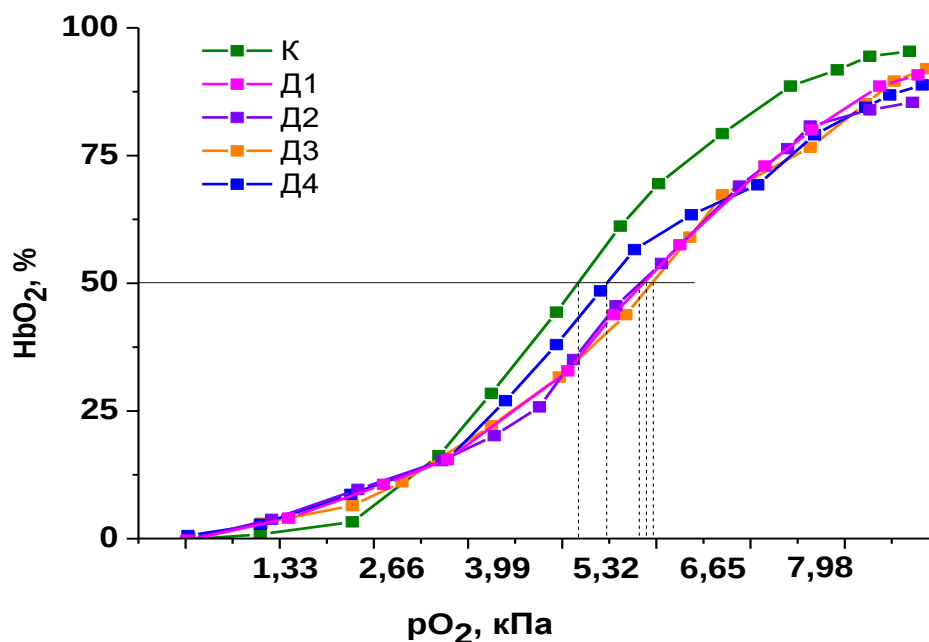


Рис. 3.3. Типові криві насичення киснем гемоглобіну крові щурів через 15 (Д1), 30 (Д2), 45 (Д3), 60 хв (Д4) після введення ХПФ дозою 50 мг/кг ($M \pm m$, $n=5$).

Таблиця 3.6

Динаміка насичення киснем гемоглобіну крові щурів через 15 (Д1), 30 (Д2), 45 (Д3), 60 хв (Д4) після введення ХПФ дозою 50 мг/кг ($M \pm m$, $n=5$)

Група тварин	Показник насичення гемоглобіну киснем, pO ₂ кПа		
	50%	75%	90%
К	4,6±0,24	6,01±0,72	7,47±0,38
Д1	5,25±0,23*	6,37±0,51	8,0±0,65
Д2	4,28±0,36	5,1±0,53	7,54±0,82
Д3	5,06±0,32	6,53±0,84	7,52±0,97
Д4	4,14±0,55	6,12±0,53	7,78±0,74

Виявлено, що значення насичення киснем гемоглобіну еритроцитів тварин, інтоксикованих ХПФ, відрізнялись впродовж експерименту, на що вказує коефіцієнт Гілла, однак вірогідне зростання цього параметра у 1,14 раза ($p < 0,05$) порівняно з контролем спостерігали лише у групі Д1. Натомість показники P_{75} і P_{90} всіх дослідних груп мали лише статистично невірогідні відмінності.

Іншим істотним фактором порушення спорідненості гемоглобіну до кисню може бути зміна співвідношення лігандних форм гемоглобіну. Зокрема, зростання вмісту в еритроцитах лужностійкого гемоглобіну, утворення нітрозотіолів, продуктів окиснення гемоглобіну та зростання вмісту MetHb може спричиняти зміну спорідненості гемоглобіну до O_2 . У проведених експериментах встановлено статистично вірогідну зміну співвідношення лігандних форм гемоглобіну (табл. 3.7). Так, через 15 хв після введення тваринам ХПФ вміст MetHb зростає в 1,6 раза ($p < 0,05$) порівняно з контролем, а вміст HbCO через 30 хв – в 1,76 раза ($p < 0,05$) відповідно. Вірогідних змін інших лігандних форм гемоглобіну на всіх досліджуваних етапах хлорпірифосної інтоксикації щурів виявлено не було.

Таблиця 3.7

Співвідношення лігандних форм гемоглобіну у крові щурів впродовж 1 години після інтоксикації хлорпірифосом ($M \pm m$, $n=5$)

Група тварин	Лігандні форми гемоглобіну, %				
	RHb	HbO ₂	HbCO	SHb	MetHb
К	0,10 $\pm$ 0,06	94,17 $\pm$ 1,73	2,47 $\pm$ 0,72	1,35 $\pm$ 0,54	1,91 $\pm$ 0,30
Д1	0,22 $\pm$ 0,012	93,78 $\pm$ 1,57	1,09 $\pm$ 0,69	1,73 $\pm$ 0,71	3,18 $\pm$ 0,42*
Д2	0,08 $\pm$ 0,04	90,14 $\pm$ 1,42	4,37 $\pm$ 0,83*	3,93 $\pm$ 1,05	1,48 $\pm$ 0,69
Д3	0,11 $\pm$ 0,05	91,11 $\pm$ 1,46	3,69 $\pm$ 0,62	3,86 $\pm$ 0,76	1,23 $\pm$ 0,74
Д4	0,15 $\pm$ 0,07	92,66 $\pm$ 1,31	3,89 $\pm$ 0,93	2,24 $\pm$ 0,78	1,02 $\pm$ 0,81

Висновки:

Було встановлено різноспрямований характер відповіді АОС на спричинене окисне пошкодження: мобілізацію (активність через 15 хв) та ознаки виснаження (дезадаптація), які були найбільш виражені на 45 і 60 хв. Водночас зафіксували зростання відсотка гемолізу еритроцитів (найвищий через 15 хв) на тлі зниження спорідненості гемоглобіну до O_2 , що підтверджує зазначений характер адаптивної відповіді. В результаті досліджень встановлено:

1. Зниження холінестеразної активності на 42,5 %, 65,5 %, 81,1 %, 54,6 % ($p < 0,05$) у групах Д1, Д2, Д3 та Д4 відповідно порівняно з контролем.

2. Зниження каталазної активності у гемолізатах крові щурів у групах Д1, Д2, Д3 на 15, 30, 45 хв відповідно. Зростання вмісту відновленого глутатіону, у групі Д1 на 17,6 % ($p < 0,05$), у Д2 – на 44 % ($p < 0,05$) порівняно з показниками відповідних контрольних груп. Зростання вмісту гідропероксидів ліпідів на 45 %, ($p < 0,05$) у крові групи Д4 порівняно з показниками інтактних тварин. Зростання вмісту ТБК-активних продуктів у гемолізатах еритроцитів щурів у групі Д2 на 80 % ($p < 0,05$) і 1,39 раза ($p < 0,05$) у групі Д3.

3. Збільшення кількості еритроцитів на 9 % ($p < 0,05$), вмісту загального гемоглобіну на 11 % ($p < 0,05$) та показника гематокриту – на 6,3 % ($p < 0,05$) в групі Д1 порівняно з контрольною групою.

4. Зростання максимального відсотка зруйнованих еритроцитів у групі Д1 до 53 % ($p < 0,05$), натомість у Д3 – зниження цього показника до 34 % ($p < 0,05$) порівняно з контрольними показниками. У групі Д4 кількість, зруйнованих еритроцитів наближалась до контрольних значень.

5. Зниження у групі Д1 спорідненості гемоглобіну до кисню, про що свідчать значення коефіцієнта Гілла вказаної групи. Натомість вірогідних змін показників P_{75} та P_{90} не було встановлено.

Матеріали цього розділу опубліковані у роботах [54, 58, 63, 234, 236].

3.2. Біохімічні та гематологічні показники крові щурів за гострої інтоксикації ХПФ дозою 30 мг/кг

3.2.1. Холінестеразна активність у крові щурів за гострої інтоксикації ХПФ дозою 30 мг/кг. Відомо, що в результаті взаємодії ХПФ з молекулою ХЕ утворюється стійкий комплекс між ензимом і залишком фосфорної кислоти, що супроводжується втратою ензимом здатності розщеплювати ацетилхолін. Зважаючи на те, що зниження активності ХЕ є основним індикаторним показником, який обов'язково досліджується при діагностиці отруєнь ФОС загалом, зокрема ХПФ, було проведено визначення активності цього ензиму у плазмі крові щурів через 1, 3, 6, і 10 діб після перорального введення дослідним тваринам цього ксенобіотика. Результати цих досліджень представлені на рис. 3.4.

Встановлено статистично вірогідне зниження холінестеразної активності у плазмі крові щурів за дії ХПФ у всіх досліджуваних групах. У групі Д1, тобто через 24 години після введення тваринам ХПФ спостерігали найістотніше зниження холінестеразної активності, а саме – на 56,8 % ($p < 0,001$) порівняно до активності цього ензиму у плазмі крові інтактних тварин, які слугували контролем.

У групі Д2, тобто через 3 доби після інтоксикації щурів ХПФ також спостерігали суттєве статистично вірогідне зниження активності ХЕ, яке становило 42,8 % ($p < 0,01$) щодо показників контрольних тварин. У групі Д3 активність ХЕ знижувалась на 19,4 % ($p < 0,05$) порівняно з показниками інтактних тварин, а в групі Д4 – на 30 % ($p < 0,01$). Встановлені у різні часові проміжки після уведення дослідним тваринам ХПФ зміни холінестеразної активності у плазмі їх кровів насамперед дозволяють стверджувати про наявність загальнотоксичної дії ХПФ на організм дослідних щурів протягом всього дослідного періоду. З іншого боку, характер цих змін свідчить про поступовий спад антихолінестеразного впливу ХПФ упродовж періоду експерименту.

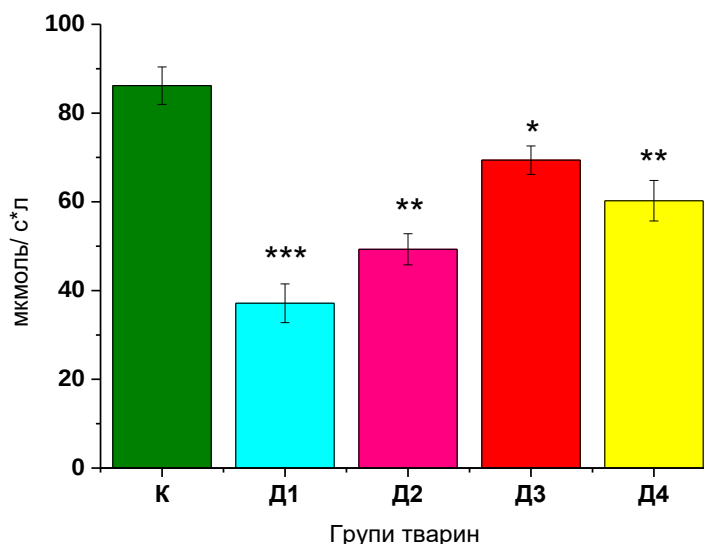


Рис. 3.4 Холінестеразна активність у плазмі крові щурів та через 1 (Д1), 3 (Д2), 6 (Д3), 10 діб (Д4) після інтоксикації ХПФ дозою 30 мг/кг ($M \pm m$, $n=5$).

Примітка у цьому та наступних графіках : * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ різниця вірогідне порівняно із контрольною групою.

3.2.2. Прооксидантно-антиоксидантні параметри еритроцитів щурів за гострої інтоксикації ХПФ дозою 30 мг/кг. Окрім інгібування активності холінестерази, ХПФ здатен спричиняти зсув прооксидантно-антиоксидантного балансу у бік утворення прооксидантів, що призводить до виникнення оксидативного стресу в клітинах організму навіть за відсутності змін активності цього індикаторного ензиму. Враховуючи важливу детоксикаційну роль відновленого глутатіону та глутатіон-залежних ензимів у нейтралізації АФО, було проведено дослідження активності ГР, ГПО, СОД, КАТ та вмісту відновленого глутатіону і ТБК-активних продуктів за умов гострого отруєння ХПФ дозою 30 мг/кг.

Відомо, що СОД є одним з найважливіших ензимів антиоксидантної системи захисту організму. Цей ензим здійснює реакцію дисмутації супероксидних аніон-радикалів і трансформує їх на молекули гідроген пероксиду, які є менш реакційноздатними. Отримані нами дані свідчать про зниження активності СОД у гемолізатах еритроцитів тварин дослідної групи

протягом усього періоду експерименту порівняно зі значеннями контролю (табл. 3.8).

Таблиця 3.8

Активність СОД, КАТ та вміст ТБК-активних продуктів у гемолізатах еритроцитів крові щурів на 1 (Д1), 3 (Д2), 6 (Д3), 10 доби (Д4) після введення ХПФ дозою 30 мг/ кг ($M \pm m$, $n=5$)

Доба	Група тварин	Досліджуваний показник		
		СОД	КАТ	ТБК-активні продукти
		у.о./ мг протеїну	ммоль H_2O_2 / хв•мг прот	нмоль/мл
1	К1	51,83±5,19	6,82±1,67	4,86±0,2
	Д1	46,65±9,65	7,25±0,88	5,41±0,40
3	К2	61,04±5,96	7,24±0,41	3,62±0,32
	Д2	37,37±3,63**	7,47±1,39	8,18±0,67***
6	К3	47,36±3,18	7,24±2,91	4,91±0,85
	Д3	24,88±5,31**	7,05±0,58	7,71±0,67*
10	К4	48,11±4,69	8,32±0,39	4,42±0,36
	Д4	23,91±2,11**	9,55±0,89	6,59±0,26**

Однак варто зауважити, що зниження активності СОД у гемолізатах еритроцитів через 1, 3, 6 і 10 діб після введення тваринам ксенобіотика відбувалося нерівномірно. Так, у групі Д2 спостерігали зниження активності СОД на 38,7 % ($p < 0,01$). Натомість, активність СОД у групі Д3 знижувалась на 47,4 % ($p < 0,01$) порівняно з відповідними значеннями інтактних тварин. Найвідчутніше зниження активності СОД, а саме на 50,3 % ($p < 0,01$) порівняно з контрольними значеннями, спостерігали на 10 добу експерименту (Д4).

Важливим ензимом, який бере участь у захисті клітин від перексидного пошкодження, є каталаза (КАТ), яка має здатність розкладати гідроген пероксид до води і молекулярного Оксигену [19, 115]. Проте у наших дослідженнях вірогідних змін активності КАТ у гемолізатах еритроцитів через 1, 3, 6 і 10 діб після хлорпірифосної інтоксикації виявлено не було. Можна відзначити лише тенденцію до незначного зростання активності цього ензиму у всі дослідні періоди порівняно з контролем (табл. 3.8).

Варто наголосити, що в усіх групах тварин, яким вводили ХПФ, спостерігали зростання вмісту ТБК-активних продуктів у гемолізатах еритроцитів, проте статистично вірогідним це зростання було лише на 3-тю, 6-ту і 10-ту добу. Так, вміст ТБК-активних продуктів у гемолізатах еритроцитів щурів зростав у 1,25 ($p < 0,001$), 1,57 рази ($p < 0,05$) через 3 та 6 діб на 49 % ($p < 0,01$) на 10 добу відповідно (табл. 3.8).

Глутатіоновий метаболізм є одним з найважливіших антиоксидантних захисних механізмів. Проведені дослідження дали змогу простежити основну динаміку змін показників глутатіонової ланки антиоксидантної системи в гемолізатах еритроцитів щурів через 1, 3, 6 і 10 діб після введення тваринам ХПФ дозою 30 мг/кг. Дані, представлені у табл. 3.2, свідчать, що за дії ХПФ спостерігається зниження на 65,4 % ($p < 0,001$) вмісту відновленого глутатіону в гемолізатах еритроцитів щурів дослідної групи вже на першу добу експерименту. На 3-тю добу дослідного періоду (Д2) вміст цього трипептиду в гемолізатах еритроцитів щурів, яким вводили вказаний токсикант, залишався і далі на низькому рівні і становив 41,2 % ($p < 0,05$) від контрольного значення. Вірогідною причиною виявленого зниження вмісту відновленого глутатіону у гемолізатах еритроцитів щурів може бути кон'югація цього тіолу з продуктами метаболізму ХПФ та використанням його клітинних запасів у процесах біохімічних перетворень АФО, які виникають за умов токсичної дії ХПФ на біологічні системи.

**Вміст відновленого глутатіону та активність глутатіонредуктази
в гемолізатах еритроцитів щурів на 1 (Д1), 3 (Д2), 6 (Д3), 10 добу (Д4)
після введення ХПФ дозою 30 мг/кг ($M \pm m$, $n=5$)**

Доба	Група тварин	Досліджуваний показник	
		GSH	ГР
		мкмоль/ 1г Нб	мкмоль NADPH/ хв•1г Нб
1	К1	0,17±0,01	72,94±6,25
	Д1	0,05±0,01***	28,11±5,88***
3	К2	0,16±0,03	68,68±5,26
	Д2	0,06±0,01*	47,19±5,31**
6	К3	0,16±0,007	74,89±8,59
	Д3	0,09±0,01*	70,21±4,30
10	К4	0,15±0,01	69,84±6,62
	Д4	0,08±0,01***	62,01±6,99

Результати цих досліджень свідчать, що поряд зі зниженням концентрації GSH за умов інтоксикації хлорпірифосом спостерігаються зміни активності ГР – ензиму, який підтримує високу внутрішньоклітинну концентрацію відновленої форми глутатіону (табл. 3.9). Так, через 1 добу після інтоксикації ХПФ у гемолізатах еритроцитів спостерігали найсуттєвіше (на 61,4 %, $p<0,001$) зниження активності ГР порівняно із контрольними показниками. Схожі зміни спостерігали на 3-тю добу після інтоксикації ХПФ. У групі Д2 зниження становило 31,2 % ($p<0,01$) порівняно з контролем.

Іншим важливим показником системи антиоксидантного захисту є активність глутатіонпероксидази. Цей ензим є гомотетрамерним селенопротеїном, який каталізує відновлення H_2O_2 або органічних гідропероксидів і таким чином захищає клітини від дії АФО. Результати

проведених нами досліджень засвідчили, що за інтоксикації ХПФ, крім зміни вмісту GSH та активності ГР у гемолізатах еритроцитів, відбувається зміна активностей інших ензимів глутатіонового ряду. Зокрема встановлено (табл. 3.3), що активність ГПО зазнавала вірогідних змін на 1-шу та 3-тю добу після введення ХПФ – спадала на 24,8 % ($p<0,05$) та 10,7 % ($p<0,01$) відповідно порівняно з показниками контрольних тварин.

Таблиця. 3.10

**Активність глутатіонпероксидази в гемолізатах еритроцитів
щурів на 1 (Д1), 3 (Д2), 6 (Д3), 10 добу (Д4) після введення ХПФ
дозою 30 мг/кг ($M\pm m$, $n=5$)**

Доба	Група тварин	Досліджуваний показник	
		ГПО	Г-S-T
		мкмоль GSH/мг протеїну•хв	у.о./ мг прот.
1	К1	74,32±1,40	43,15±1,85
	Д1	67,14±1,54**	55,26±1,91**
3	К2	73,42±4,37	42,25±2,14
	Д2	55,92±3,09*	55,23±2,92**
6	К3	75,17±1,21	44,49±2,37
	Д3	67,08±1,92**	24,41±2,13***
10	К4	71,52±3,53	45,20±1,73
	Д4	67,92±4,82	46,68±4,12

Як показали результати експериментів (табл. 3.10), на початкових етапах дослідного періоду спостерігається вірогідне зростання активності Г-S-T в гемолізатах еритроцитів, а саме на 28 % ($p<0,001$) на 1-шу добу досліджень (Д1) та на 30,7 % ($p<0,01$) – на 3-тю (Д3) порівняно з аналогічним показником інтактних тварин. Проте на 6-ту добу експерименту (група Д3) у гемолізатах еритроцитів спостерігали зміну протилежного напрямку –

зниження ензиматичної активності Г-S-T у тварин дослідної групи на 53 % ($p < 0,001$) порівняно з контрольними значеннями.

У результаті досліджень цього етапу дисертаційної роботи було отримано дані стосовно динаміки змін основних параметрів глутатіонової системи в гемолізатах еритроцитів протягом перших десяти діб постінтоксикаційного періоду щурів, отруєних ХПФ. Результати експериментів свідчать про активну участь глутатіонової системи у процесах детоксикації організму за дії ХПФ. Також було виявлено дефіцит ресурсів глутатіонової системи антиоксидантного захисту внаслідок її виснаження протягом 10 діб після інтоксикації організму ХПФ, про що зокрема свідчить зниження вмісту відновленого глутатіону, активності ГР та ГПО.

ХПФ, введений тваринам дозою 30 мг/кг, призводив до активації процесів пероксидного окиснення ліпідів, що, зокрема, проявлялось у зростанні вмісту ТБК-активних продуктів у дослідних тварин. Водночас спостерігалось зниження активності СОД у гемолізатах еритроцитів тварин дослідних груп Д2, Д3, Д4 протягом всього періоду досліджень. Вираженість вказаних процесів була найсуттєвішою у період з 3-ої до 6-ої доби експерименту, що, можливо, свідчить про дефіцит ресурсів системи антиоксидантного захисту організму внаслідок їх виснаження протягом перших годин після введення шурам ХПФ.

3.2.3. Гематолологічні показники крові щурів за гострої інтоксикації ХПФ дозою 30 мг/кг. За умов фізіологічної норми у крові живого організму підтримується баланс формених елементів. У цьому плані особлива роль належить червоним клітинам крові – еритроцитам, за участю яких здійснюється постачання киснем органів і тканин. Еритроцити крові організмів різних типів мають різну тривалість циркуляції у кров'яному руслі. Отже, для нормального функціонування організму важливе значення має підтримання динамічної рівноваги між різними віковими популяціями

еритроцитів у руслі крові: співвідношення між молодими еритроцитами, які щойно потрапили у кров'яне русло, тими, що мають середній вік і тими, які уже перейшли на етап руйнування. Підтримка цієї рівноваги, залежно від стабільності еритроцитарних мембран, є у прямій залежності не лише від віку еритроцита, але й від оточення, утвореного ендogenousними метаболітами, а також речовинами екзогенного походження. Останні, потрапляючи в еритроцити, можуть взаємодіяти з компонентами їхніх мембран, спричиняючи процеси модифікації. Зокрема, суть модифікацій може полягати у посиленні процесів пероксидного окиснення ліпідів мембран, що призводить до зміни їх жирнокислотного складу, ушкодження протеїнових структур мембран. Проте далеко не усі перераховані зміни призводять до порушення проникності мембран, і як наслідок – до скорочення періоду циркуляції цих клітин у кров'яному руслі [27, 273].

В результаті наших досліджень встановлено, що за дії ХПФ дозою 30 мг/кг у крові щурів було виявлено зниження кількості еритроцитів на 15,6 % у групі Д1 ($p < 0,05$) і на 14 % у групі Д3 ($p < 0,05$) порівняно з контрольними значеннями (табл. 3.11). Водночас було зафіксовано зниження кількості еритроцитів у крові щурів групи Д2 на 12,2 % ($p < 0,05$) та Д4 на 18,5 % ($p < 0,05$) порівняно з показниками контрольних тварин. Водночас не встановлено статистично вірогідних відмінностей у показнику гематокриту та середнього вмісту гемоглобіну в еритроциті у жодній із досліджуваних груп.

Отримані результати дають підстави стверджувати, що отруєння тварин ХПФ за обраних умов експерименту призводить до виникненням анемічних станів, які проявляються у зниженні кількості еритроцитів у крові. В основі цього явища може бути скорочення тривалості життя еритроцитів, що пов'язано з порушенням стабільності їхніх мембран.

Таблиця 3.11

Гематологічні показники червоної крові через 1(Д1), 3(Д2), 6 (Д3), 10 діб (Д4) після інтоксикації ХПФ дозою 30 мг/кг ($M \pm m$, $n=5$)

Група тварин	Показники			
	Еритроцити, $1 \cdot 10^{12}/л$	Загальний Нб, г/л	Гематокрит, %	Середній вміст Нб в еритроциті, пг
К	$6,28 \pm 0,27$	$138,19 \pm 4,70$	$41 \pm 2,07$	$22,1 \pm 0,23$
Д1	$5,30 \pm 0,32^*$	$129,85 \pm 11,05$	$44 \pm 2,30$	$24,5 \pm 0,74$
Д2	$6,31 \pm 0,39$	$121,9 \pm 5,10^*$	$41 \pm 1,80$	$19,3 \pm 0,57$
Д3	$5,40 \pm 0,21^*$	$139,05 \pm 5,63$	$41 \pm 0,90$	$25,3 \pm 0,8$
Д4	$6,25 \pm 0,35$	$113,1 \pm 5,21^*$	$39 \pm 0,11$	$18,2 \pm 0,61$

Водночас іншою причиною зниження кількості цього класу клітин може бути гальмування дозрівання попередників еритроцитів і вивільнення їх у кров'яне русло. Крім того, у кровотік можуть потрапляти незрілі клітини. Таким чином, в руслі крові з'являються клітини різних вікових категорій, що проявляють неоднакову стійкість до кислотного гемолізу. Такі твердження, підкріплюються отриманими нами результатами гемолізу кислотних еритрограм груп Д1 і Д2. Максимальний гемоліз еритроцитів відбувається в інтервалі від 2 до 4 хв.

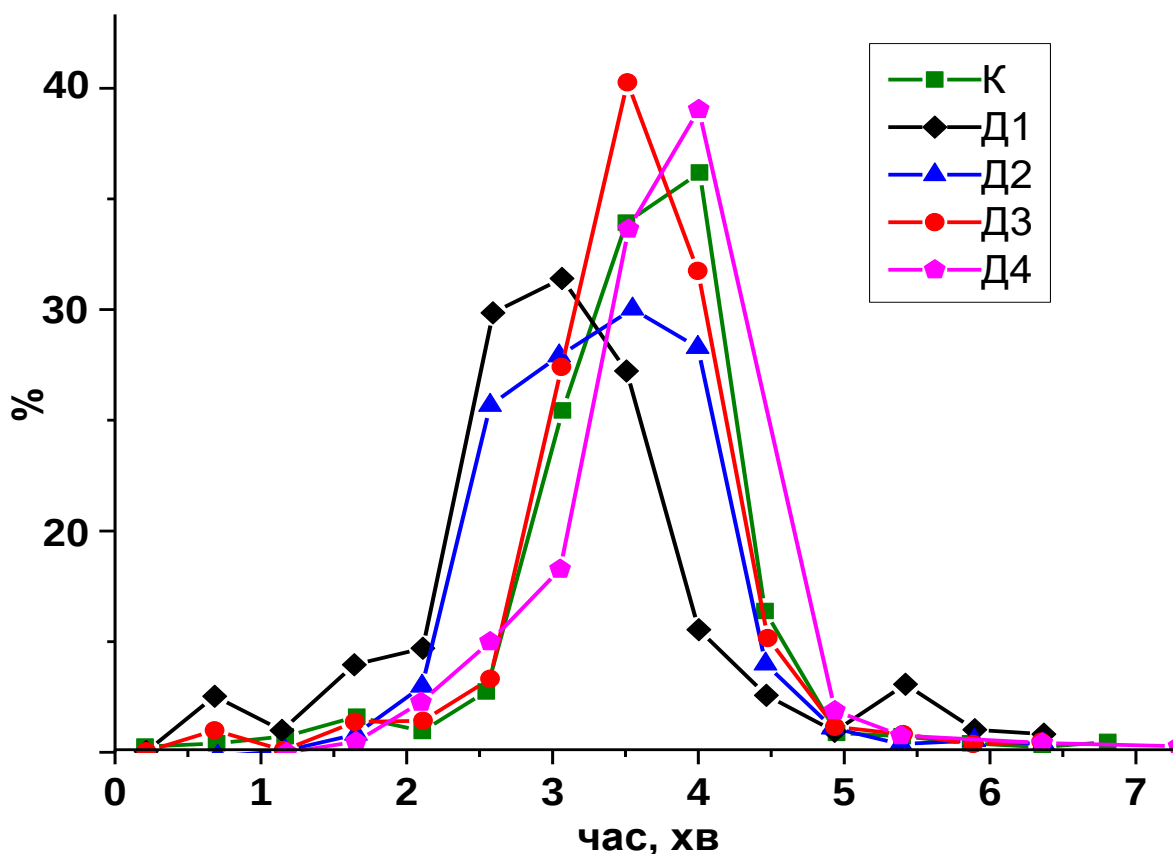


Рис. 3.5. Типові еритрограми крові щурів через 1 (Д1), 3 (Д2), 6 (Д3), 10 діб (Д4) після інтоксикації ХПФ дозою 30 мг/кг ($M \pm m$, $n=5$).

Водночас у кривих гемолізу еритроцитів груп Д1 та Д2 немає чітко вираженого максимуму, що свідчить про неоднорідність клітин у суспензії (рис. 3.4, табл. 3.12). Так, вже на 1-шу добу за після введення тваринам ХПФ час максимального гемолізу еритроцитів скорочується на 24,3 % ($p < 0,05$) – з 4,1 до 3,1 хв, що супроводжувалось зсувом піку еритрограми вліво порівняно з показниками еритрограм контрольних тварин. Окрім того, виявлено скорочення часу тотального гемолізу еритроцитів у групах Д2 та Д3 на 14,7 % ($p < 0,05$) і 5,8 % ($p < 0,05$) відповідно порівняно із показниками контрольної групи. Водночас статистично значущих змін відсотка максимального гемолізу еритроцитів виявлено не було.

**Параметри еритрограм крові щурів через 1 (Д1), 3 (Д2), 6 (Д3), 10 діб (Д4)
після інтоксикації ХПФ дозою 30 мг/кг ($M \pm m$, $n=5$)**

Група тварин	Показники гемолізу		
	Час максимального гемолізу, хв	Час тотального гемолізу, хв	Максимум гемолізу, %
К	4,1 $\pm$ 0,31	6,8 $\pm$ 0,28	36,7 $\pm$ 2,11
Д1	3,1 $\pm$ 0,27*	6,3 $\pm$ 0,40	33,8 $\pm$ 1,64
Д2	4,2 $\pm$ 0,36	5,8 $\pm$ 0,22*	29,4 $\pm$ 2,93
Д3	4,2 $\pm$ 0,33	6,4 $\pm$ 0,28*	40,1 $\pm$ 1,52
Д4	4,2 $\pm$ 0,58	7,3 $\pm$ 0,56	38,6 $\pm$ 0,78

Оскільки результати наших досліджень свідчать про зміну кількості еритроцитів у крові та зниження вмісту загального гемоглобіну за отруєння ХПФ дозою 30 мг/кг, було встановлено ступінь спорідненості гемоглобіну до O₂ методом побудови кривих насичення гемоглобіну O₂. Враховуючи те, що форма кривої за інтоксикації ФОС залишається незмінною, принциповим показником є аналіз зсуву кривих оксигенації гемоглобіну. За дії ХПФ впродовж 10 діб нами було встановлено зміни спорідненості гемоглобіну до O₂ (рис. 3.5, табл. 3.13).

Так, вже через 1 добу (група Д1) після введення дослідним тваринам ХПФ спостерігали зростання коефіцієнта Гілла на 18,9 % ($p<0,05$) порівняно із контрольними показниками (рис 3.6, табл. 3.13). Аналогічні зміни були виявлені у групах Д2 і Д4, де це зниження склало 20,4 % ($p<0,05$) та 30,4 % ($p<0,05$) порівняно з контролем. Водночас зафіксували зростання показника P₇₅ на 12,5 % ($p<0,05$) у групі Д2 та 16 % – у Д4 ($p<0,05$) порівняно із контрольними показниками. Варто зазначити, що показник P₉₀ зазнавав вірогідних змін лише у групі Д4 – тут зростання склало 26,6 % ($p<0,05$).

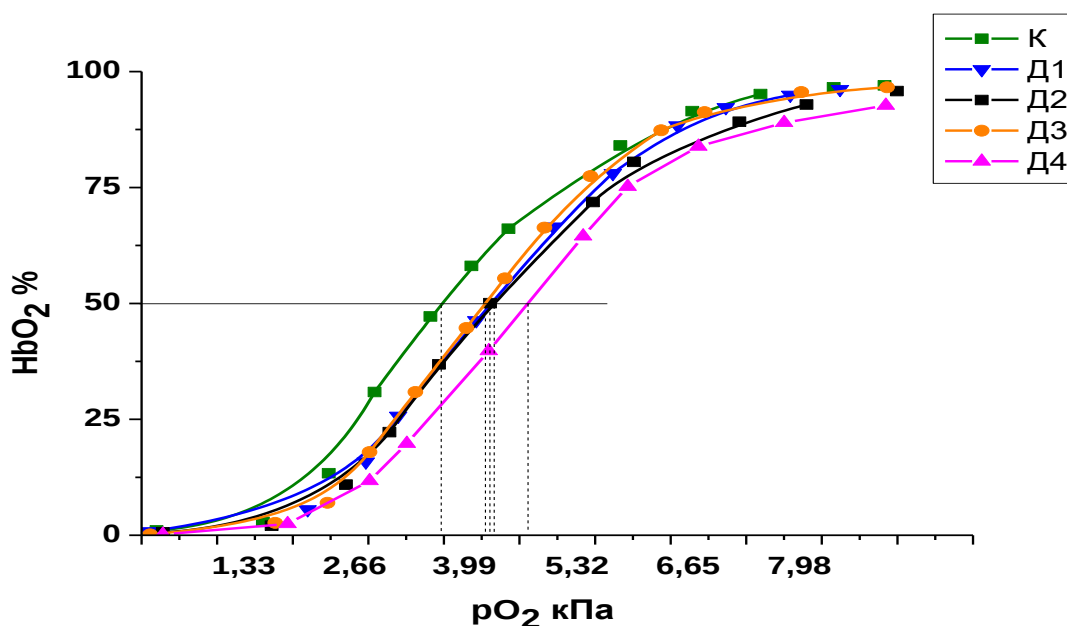


Рис. 3.6. Типові криві насичення киснем гемоглобіну крові щурів через 1 (Д1), 3 (Д2), 6 (Д3), 10 діб (Д4) після інтоксикації ХПФ дозою 30 мг/кг ($M \pm m$, $n=5$).

Таблиця 3.13

Динаміка насичення киснем гемоглобіну крові щурів через 1 (Д1), 3 (Д2), 6 (Д3), 10 діб (Д4) після введення ХПФ дозою 30 мг/кг ($M \pm m$, $n=5$)

Група тварин	Показники насичення гемоглобіну, pO_2 кПа		
	50%	75%	90%
К	$3,91 \pm 0,25$	$5,6 \pm 0,21$	$7,1 \pm 0,29$
Д1	$4,65 \pm 0,19^*$	$6,0 \pm 0,23$	$7,5 \pm 0,28$
Д2	$4,71 \pm 0,23^*$	$6,3 \pm 0,19^*$	$7,9 \pm 0,36$
Д3	$4,52 \pm 0,28$	$5,9 \pm 0,22$	$7,4 \pm 0,22$
Д4	$5,1 \pm 0,33^*$	$6,5 \pm 0,28^*$	$8,99 \pm 0,39^{**}$

Ксенобіотики можуть прямо або опосередковано впливати на спорідненість гемоглобіну до кисню. Відомо, що зниження спорідненості НЬ до O_2 може бути пов'язане зі зростанням чутливості цього гемопротеїну до 2-3 дифосфогліцерату – сполуки, яка забезпечує регуляцію віддачі O_2 тканинам [79].

Зокрема, може відбуватись модифікація карбонільних груп амінокислотних залишків поліпептидних ланцюгів, що призводить до зміни стабільності просторової організації гемоглобіну і порушення процесу зв'язування з O_2 .

Висновки

Показано, що введення щурам ХПФ дозою 30 мг/кг у різні дослідні періоди призводило до порушення прооксидантно-антиоксидантного балансу еритроцитів, кількісного вмісту компонентів крові та супроводжувалось змінами показників тотального і максимального гемолізу й параметрів кисневої ємності гемоглобіну. Зокрема за дії вказаної дози ХПФ виявлено:

1. Зниження холінестеразної активності в крові щурів у групі Д1 на 56,8 % ($p<0,05$), у групі Д2 на 42,8 % ($p<0,05$), у групі Д3 – на 19,4 % ($p<0,05$) та групі Д4 – на 30 % ($p<0,05$).

2. Зниження супероксидисмутазної активності у групах Д2 на 38,7 % ($p<0,01$), у Д3 – на 47,4 % ($p<0,01$) та в Д4 – на 50,3 % ($p<0,01$) порівняно з контролем. Зростання вмісту ТБК-активних продуктів в 1,25 раза ($p<0,001$) на 3-тю, в 1,57 раза ($p<0,05$) на 6-ту і на 49 % ($p<0,01$) на 10-ту добу експерименту. Найістотніше зниження вмісту відновленого глутатіону (на 41,2 % порівняно до контролю) було у групі Д1.

3. Скорочення часу максимального гемолізу еритроцитів на 24,3 % ($p<0,05$) на 1-шу добу за введення тваринам ХПФ і зменшення часу тотального гемолізу еритроцитів у групах Д2 на 14,7 % ($p<0,05$) і в Д3 на 5,8 % ($p<0,05$) відповідно порівняно із показниками контрольної групи.

4. Зростання коефіцієнта Гілла у групах Д1 на 18,9 % ($p<0,05$), у Д2 – на 20,4 % ($p<0,05$), в Д4 – на 30,4 % ($p<0,05$). Встановлено зростання значень показника P_{75} на 12,5 % ($p<0,05$) у групі Д2 та на 16 % у Д4 ($p<0,05$). зростання показника P_{90} на 26,6 % ($p<0,05$) лише у групі Д4 порівняно з контролем.

Матеріали цього розділу опубліковані в роботах [56, 61, 65, 67, 68, 237].

3.3. Біохімічні та гематологічні показники крові щурів за гострої інтоксикації ХПФ дозою 70 мг/кг та дії комплексу вітамінів А та Е впродовж 12 год

3.3.1. Холієстеразна активність крові щурів за гострої інтоксикації ХПФ дозою 70 мг/кг та дії комплексу вітамінів А та Е впродовж 12 год. Основним інтегральним маркером інтоксикації ФОС є зниження активності холієстерази. Механізм інгібування цього ензиму передбачає утворення стійкого до розщеплення ензим-субстратного комплексу внаслідок фосфорилювання ХЕ. У результаті цього процесу холієстераза втрачає свою ензиматичну активність, що супроводжується порушенням здатності гідролізувати ацетилхолін. Зважаючи на маркерні особливості цього ензиму, особливо на ранніх етапах інтоксикації ФОС, було проведено визначення його активності через 12 год після інтоксикації ХПФ дозою 70 мг/кг (рис. 3.9).

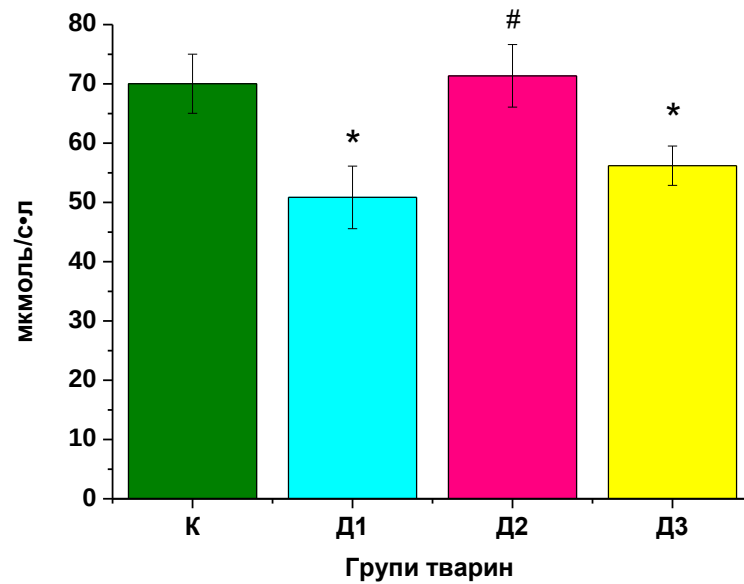


Рис. 3.9. Холінестеразна активність у плазмі крові щурів через 12 год після введення ХПФ дозою 70 мг/кг та комплексу вітамінів А та Е ($M \pm m$, $n=5$).

Примітка: # – $p < 0,05$ різниця вірогідна порівняно із групою Д1.

Отримані результати свідчать про те, що інтоксикація ХПФ викликає зменшення холінестеразної активності на 24,5 % ($p < 0,05$) у плазмі крові щурів групи Д1 порівняно із контрольними значеннями. Натомість у плазмі крові тварин групи Д3 активність ХЕ знизилася на 14 % ($p < 0,05$) порівняно з показниками інтактних тварин.

3.3.2. Прооксидантно-антиоксидантні параметри еритроцитів щурів за гострої інтоксикації ХПФ дозою 70 мг/кг та дії комплексу вітамінів А та Е впродовж 12 год. Виявили значне зростання каталазної активності на 34 % ($p < 0,05$) у гемолізатах еритроцитів групи Д1 порівняно з контролем (табл. 3.15). Окрім того, в гемолізатах еритроцитів груп Д2 і Д3 зафіксували зниження супероксиддисмутазної активності на 66 % ($p < 0,05$) і 32 % ($p < 0,05$) відповідно порівняно з контрольними показниками. Аналогічний характер змін зазначених показників був описаний у дослідженні R. Kaug зі співавт. [169], які при вполюванні *Bubalus bubalis*

ХПФ в дозі 0,05 г/кг впродовж 20 тижнів зафіксували у крові тварин статистично значуще зростання активностей КАТ.

Таблиця. 3.15

Активність КАТ та СОД в гемолізатах еритроцитів щурів через 12 год після введення ХПФ дозою 70 мг/кг та комплексу вітамінів А та Е ($M \pm m$, $n=5$)

Група тварин	Досліджуваний показник	
	КАТ	СОД
	ммоль H_2O_2 / хв • мг білка	у.о./ мг протеїну
К1	1,84±0,08	3,3±0,17
Д1	2,48±0,24*	3,02±0,55
Д2	1,83±0,16	1,12±0,27*
Д3	1,94±0,11	2,24±0,42*

Примітка: у цій і наступних таблицях: К – контрольна група щурів; Д1 – група щурів, які отримували ХПФ дозою 70 мг/кг; Д2 – група щурів, які отримували вітамін А (0,05 г/кг) та вітамін Е (0,1 г/кг); Д3 – група щурів, що отримували ХПФ дозою 70 мг/кг разом з вітамінами А (0,05 г/кг) та (0,1 г/кг).

Визначення вмісту відновленого глутатіону, глутатіонпероксидазної і глутатіонредуктазної активностей через 12 год після введення ХПФ показало наявність змін цих показників (табл. 3.16) у гемолізатах еритроцитів щурів. Зокрема встановлено, що вміст GSH у групі Д1, щурі якої отримували розчин ХПФ, знижувався на 15 % ($p<0,01$). Натомість у групі Д3, тваринам якої вводили ХПФ разом із комплексом вітамінів А та Е, відбулось зростання цього показника на 9 % ($p<0,05$) порівняно з контрольним значеннями.

**Вміст відновленого глутатіону (GSH) активність ГПО та ГР
в гемолізатах еритроцитів щурів через 12 год після введення ХПФ
дозою 70 мг/кг та комплексу вітамінів А та Е (M±m, n=5)**

Група тварин	Досліджуваний показник		
	GSH	ГР	ГПО
	мкмоль GSH/мг протеїну	мкмоль NADPH/хв•мг протеїну	мкмоль GSH/мг протеїну•хв
К1	27,2±0,2	0,53±0,06	0,45±0,08
Д1	23,3±0,5**	0,31±0,02*	0,13±0,03**
Д2	28,5±0,5	0,28±0,07*	0,24±0,06
Д3	29,7±0,7*#	0,48±0,02#	0,18±0,06*

Крім того, було виявлено окремі міжгрупові відмінності, зокрема між вмістом відновленого глутатіону за інтоксикації щурів ХПФ (група Д1) і за поєднаної дії ХПФ із вітамінами А та Е (група Д3). Так, у гемолізатах еритроцитів щурів групи Д3 спостерігали зростання вмісту GSH на 27,4 % ($p<0,05$) порівняно із показниками тварин групи Д1.

Встановлено зниження глутатіонпероксидазної активності у гемолізатах еритроцитів крові щурів як за інтоксикації ХПФ, так і за дії ХПФ і комплексу вітамінів. Зокрема, активність ГПО знижувалась на 70 % ($p<0,05$) у групі Д1 та на 60 % ($p<0,05$) у групі Д3 порівняно з контролем. Виявлено зниження глутатіонредуктазної активності, зокрема, активність ензиму знижувалась у групі Д1 через 12 год після введення ХПФ на 40 % ($p<0,05$) і за дії вітамінів А та Е у групі Д2 – на 46 % ($p<0,05$) порівняно з контрольними значеннями. Варто зазначити, що виявлені міжгрупові відмінності між активністю

глутатіонредуктази за різних експериментальних умов. Так, у групі Д3 спостерігали зростання активності цього ензиму на 33 % ($p<0,05$) порівняно з показниками групи Д1.

Враховуючи, те, що у клітинах за різних патологічних станів може фіксуватись зростання вмісту АФО, які призводять до інтенсифікації процесів, що спричиняють підвищення вмісту як первинних (гідроперексидів ліпідів), так вторинних продуктів (ТБК-активні продукти), було проведено дослідження вмісту цих сполук в гемолізатах еритроцитів крові щурів. Результати дослідження показали (табл. 3.17), що вміст ТБК-активних продуктів у групі Д1 вірогідно зростає на 70,9 % ($p<0,05$), але знижувався на 17,9 % ($p<0,05$) у групі Д3 порівняно з контрольними показниками.

Таблиця. 3.17

**Вміст ТБК-активних продуктів та ГПЛ в гемолізатах
еритроцитів крові щурів за дії ХПФ у дозі 70 мг/кг
та дії комплексу вітамінів А (0,05 г/кг) і Е (0,1 г/кг) ($M\pm m$, $n=5$)**

Група тварин	Досліджуваний показник	
	ТБК-активні продукти	ГПЛ
	у.о./мл	мкмоль/мл
К1	$0,89\pm 0,03$	$0,51\pm 0,08$
Д1	$1,24\pm 0,14^*$	$0,95\pm 0,14^*$
Д2	$0,60\pm 0,06^*$	$0,63\pm 0,03$
Д3	$0,75\pm 0,03^*$	$0,8\pm 0,03^*$

Отримані нами результати свідчать про обґрунтованість застосування з метою відновлення прооксидантно-антиоксидантної рівноваги комплексу вітамінів А та Е у дозах 0,05 г/кг та 0,1 г/кг відповідно при гострій інтоксикації ХПФ. Проте за обраних умов експерименту не спостерігали повної нормалізації усіх досліджуваних показників до контрольного рівня.

3.3.3. Гематологічні показники крові щурів за гострої інтоксикації ХПФ дозою 70 мг/кг та комплексу вітамінів А та Е впродовж 12 год.

Результати досліджень гематологічних параметрів крові щурів представлені у табл 3.18.

Таблиця 3.18

Гематологічні показники крові щурів через 12 год після введення ХПФ дозою 70 мг/кг та комплексу вітамінів А та Е ($M \pm m$, $n=5$)

Показники	Група тварин			
	К	Д1	Д2	Д3
Еритроцити, $10^{12}/л$	$8,18 \pm 0,27$	$7,08 \pm 0,32^*$	$7,58 \pm 0,25$	$7,25 \pm 0,31$
Загальний гемоглобін, г/л	$153,8 \pm 3,37$	$141,5 \pm 4,05^*$	$149,3 \pm 5,32$	$142,8 \pm 5,8$
Гематокрит, л/л	$0,44 \pm 0,03$	$0,39 \pm 0,04$	$0,4 \pm 0,03$	$0,39 \pm 0,13$
MCV, фл	$54,54 \pm 1,66$	$55,07 \pm 2,65$	$53,36 \pm 2,18$	$56,08 \pm 2,48$
Лейкоцити, $10^9/л$	$11,06 \pm 2,2$	$7,7 \pm 1,16$	$5,42 \pm 2,02$	$5,56 \pm 1,01$
Лімфоцити, $10^9/л$	$8,06 \pm 1,41$	$5,92 \pm 2,43$	$5,38 \pm 2,53$	$8,48 \pm 2,08$
Гранулоцити, $10^9/л$	$1,12 \pm 0,7$	$0,62 \pm 0,29$	$0,2 \pm 0,07$	$0,44 \pm 0,21$
Моноцити, $10^9/л$	$1,9 \pm 0,25$	$1,15 \pm 0,56$	$0,92 \pm 0,44$	$1,44 \pm 0,32$
Тромбоцити, $10^9/л$	$425,8 \pm 23,7$	$314,2 \pm 37,6^*$	$307,8 \pm 45,5$	$468,8 \pm 29,5^{\#}$
MPV, фл	$6,6 \pm 0,33$	$7,5 \pm 0,85$	$7,4 \pm 1,02$	$7,3 \pm 0,99$
PDW, %	$20,02 \pm 3,47$	$17,72 \pm 4,4$	$22,98 \pm 8,27$	$16,22 \pm 3,36$

Примітка: у цій і наступних таблицях: 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

За дії ХПФ у групі щурів Д1 спостерігали зниження кількості еритроцитів на 13,4 % та вмісту загального гемоглобіну на 7,9 % порівняно з контролем.

Уже через 12 год після введення тваринам ХПФ виявлено зниження на 26,2 % ($p < 0,05$) кількості тромбоцитів крові щурів групи Д1 щодо контрольних значень. Водночас зафіксували міжгрупові відмінності між вмістом тромбоцитів у крові тварин групи Д3 та Д1. Так, у крові тварин групи Д3 встановлено зростання на 9,1 % ($p < 0,05$) кількості тромбоцитів щодо відповідних показників групи Д1. Крім того, за введення ХПФ у групі Д1 було виявлено зниження кількості еритроцитів на 14 % ($p < 0,05$) і вміст гемоглобіну на 8 %, ($p < 0,05$) порівняно з відповідними показниками контрольних тварин.

Водночас не було виявлено вірогідних змін у загальній кількості лейкоцитів, лімфоцитів, гранулоцитів, моноцитів у групах Д1, Д2, Д3 порівняно з контролем. Також не встановлено суттєвих міжгрупових відмінностей між групами Д1 і Д3 стосовно параметрів вказаних клітин. Незначні зміни кількості еритроцитів крові щурів можуть бути пов'язані зі змінами фізичних і хімічних властивостей мембран цих клітин і тривалості їх життя за інтоксикації ХПФ.

Оцінку стабільності мембран еритроцитів окремо за дії ХПФ, вітамінного комплексу та поєднання вітамінного комплексу із ХПФ (рис. 3.9, табл. 3.19) проводили методом побудови кислотних еритрограм. Обраний метод дозволяє оцінити стан гідрофобних і протейнових компонентів мембран еритроцитів і утворення морфологічно однорідних груп еритроцитів залежно від віку. Найбільш стійкі до гемолізу є молоді еритроцити, розташовані в правій інфлексії еритрограм. Натомість унаслідок старіння еритроцитів відбувається поступове зниженням їх стійкості до гемолізу, що супроводжується зміщенням кривої гемолізу вліво.

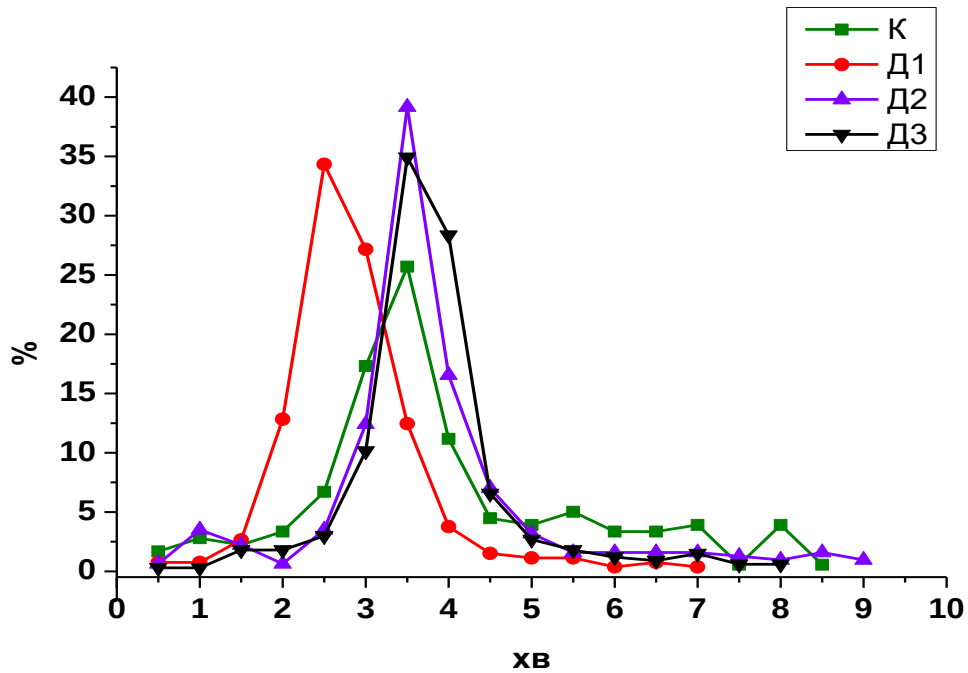


Рис. 3.9. Типові еритрограми крові щурів через 12 год після введення ХПФ дозою 70 мг/кг та комплексу вітамінів А та Е ($M \pm m$, $n=5$)

Примітка: на цій діаграмі 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.

Таблиця. 3.19

Параметри еритрограм крові щурів через 12 год після введення ХПФ дозою 70 мг/кг і комплексу вітамінів А та Е ($M \pm m$, $n=5$)

Група тварин	Показники гемолізу		
	Час максимального гемолізу, хв	Час тотального гемолізу, хв	Максимум гемолізу, %
К	3,3 $\pm$ 0,28	8,5 $\pm$ 0,28	26,7 $\pm$ 2,11
Д1	2,7 $\pm$ 0,27	7,0 $\pm$ 0,70	33,8 $\pm$ 1,64*
Д2	2,87 $\pm$ 0,25	9,2 $\pm$ 0,22	39,0 $\pm$ 2,93*
Д3	3,25 $\pm$ 0,26	7,7 $\pm$ 0,29	33,0 $\pm$ 1,51*

Аналіз отриманих результатів свідчить про зміни резистентності еритроцитів за дії ХПФ та комплексу вітамінів А та Е (табл 3.20).

Встановлено значне збільшення відсотка максимального гемолізу у всіх експериментальних груп щурів. Вказаний показник значно зростав до 33,8 % ($p<0,05$) в групі Д1, до 39 % ($p<0,05$) в групі Д2, і до 33 % ($p<0,05$) – в Д3 порівняно з контрольними значеннями. Водночас ми не виявили статистично вірогідних міжгрупових відмінностей між показниками груп Д1 і Д3.

За введення ХПФ дозою 70 мг/кг через 12 год не виявлено статистично вірогідних змін показника спорідненості гемоглобіну до O_2 , про що свідчить коефіцієнт Гілла у групі Д2 та Д1 (рис. 3.10, табл. 3.21). Своєю чергою, встановлено зниження спорідненості гемоглобіну до O_2 у групі Д3. Натомість за значень показників 75 % (P_{75}) і 90 % (P_{90}) спостерігали незначне зміщення кривих оксигенації гемоглобіну вправо. У групі Д1 відзначали зниження спорідненості гемоглобіну до кисню на 12,4 % за показником P_{75} та на 9,6 % за P_{90} щодо контрольних значень.

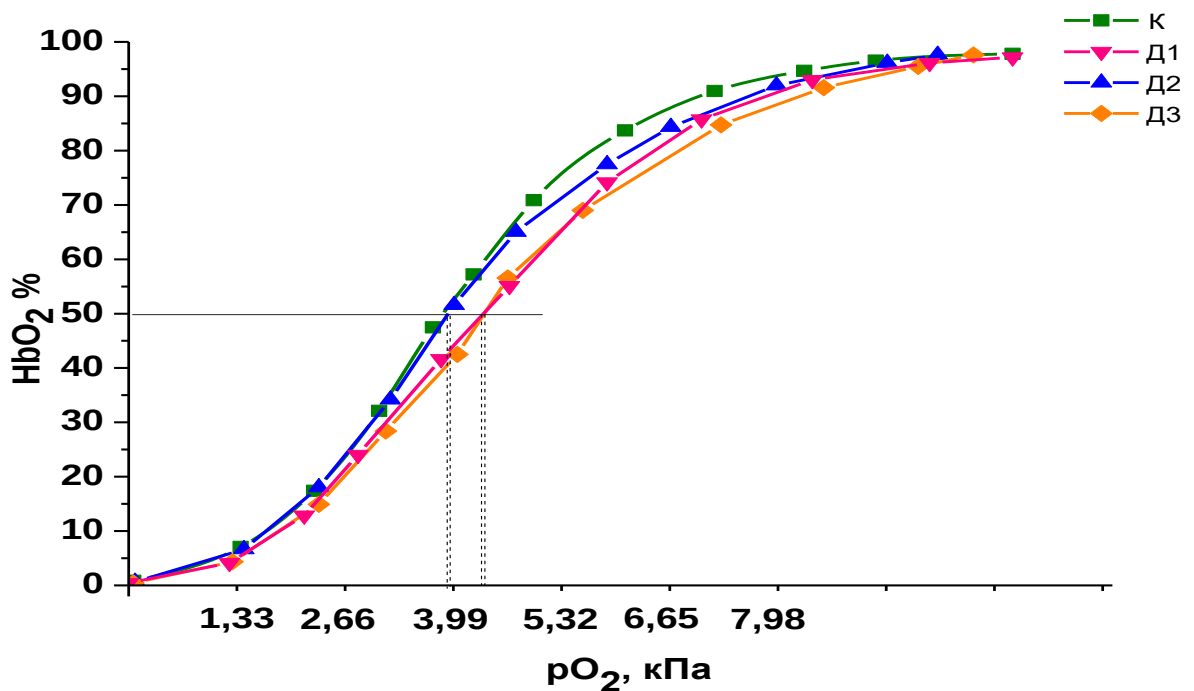


Рис 3.10. Типові криві насичення гемоглобіну киснем крові щурів за дії ХПФ (Д1), вітамінів (Д2) та сумісної дії ХПФ і вітамінів (Д3) ($M \pm m$, $n=5$)

Таблиця 3.21

Динаміка насичення гемоглобіну крові щурів киснем через 12 год після введення ХПФ у поєднанні із вітамінним комплексом ($M \pm m$, $n=5$)

Група тварин	Показники насичення гемоглобіну		
	pO ₂ кПа		
	50%	75%	90%
К	3,5±0,22	4,7±0,31	6,4±0,32
Д1	3,98±0,26	5,6±0,22*	7,5±0,25*
Д2	3,98±0,41	5,2±0,19	7,0±0,41
Д3	4,48±0,24*	6,0±0,42*	7,7±0,31*

Аналогічні зміни виявили у групі Д3, яка отримувала ХПФ разом із комплексом вітамінів. У цій групі зниження спорідненості гемоглобіну до кисню склало 19,2 % для значень парціального тиску у P₇₅ і 37,7 % для P₉₀.

Висновки

У результаті аналізу впливу гострої інтоксикації ХПФ дозою 70 мг/кг та дії комплексу вітамінів А 100 000 МО та Е (0,1 г/кг) впродовж 12 год встановлено коригувальний вплив обраних доз вітамінних препаратів на окремі біохімічні та гематологічні показники щурів. 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. За обраних доз та тривалості експерименту виявлено:

1. Зменшення холінестеразної активності у крові щурів групи Д1 на 24,5 % ($p<0,05$) та Д3 на 14 % ($p<0,05$) порівняно з показниками інтактних тварин.

2. Зниження супероксиддисмутазної активності на 66 % ($p<0,05$) і 32 % ($p<0,05$) в гемолізатах еритроцитів груп Д2 і Д3 відповідно порівняно з контрольними показниками. Зниження на 15 % ($p<0,01$) вмісту GSH у групі Д1, зростання цього показника на 9 % ($p<0,05$) у крові тварин групи Д3 порівняно з контрольним значеннями. Зниження ензиматичної активності ГПО на 70 % ($p<0,05$) у групі Д1 та на 60 % ($p<0,05$) у групі Д3 порівняно з контрольними значеннями. Зменшення глутатіонредуктазної активності у групі Д1 на 40 % ($p<0,05$) та на 46 % ($p<0,05$) у групі Д2 та порівняно з контрольними значеннями. Зростання вміст ТБК-активних продуктів у групі Д1 на 70,9 % ($p<0,05$) та зниження у Д3 на 17,9 % ($p<0,05$) порівняно з контролем. Зростання вмісту ГПЛ в групі Д1 на 80 % ($p<0,05$), водночас у групі Д3 – на 49 % відповідно порівняно із показниками контрольних тварин, оскільки одним із проявів оксидативного стресу, спричиненого пестицидами, є посилення процесів ПОЛ та генерація первинних продуктів ліпопероксидації – гідропероксидів ліпідів. Тому, ймовірно, зростання їх вмісту свідчить про інтенсифікацію оксидативного стресу в клітинах.

3. Зниження у щурів групи Д1 загальної кількості еритроцитів на 13,4 % та вмісту загального гемоглобіну на 7,9 % порівняно з контролем.

4. Збільшення відсотка максимального гемолізу еритроцитів до 33,8 % ($p<0,05$) у групі Д1, до 39 % ($p<0,05$) – в групі Д2 та до 33 % ($p<0,05$) – в групі Д3 порівняно з контрольними значеннями.

5. Зростання показника показника P_{75} на 12,4 % у групі Д1 та на 19,2 % у групі Д3 порівняно з контрольними значеннями. Окрім того, встановлено збільшення показника P_{90} групи Д3 до 37,7 % порівняно з контролем. Виявлені зміни свідчать про зменшення спорідненості гемоглобіну крові щурів як за безпосередньої дії ХПФ, так і ХПФ разом із комплексом вітамінів А та Е.

Матеріали цього розділу опубліковані у роботах [57, 62, 70, 235].

3.4. Біохімічні та гематологічні показники крові щурів за дії ХПФ дозою 90 мг/кг і за введення комплексу вітамінів А та Е впродовж 5 діб

3.4.1. Холієстеразна активність крові щурів за гострої інтоксикації ХПФ дозою 90 мг/кг за введення комплексу вітамінів А та Е впродовж 5 діб. Важливим діагностичним показником при отруєннях ФОС є зниження активності ХЕ, оскільки інгібування зазначеного ензиму є первинним елементом їх механізму дії на організм. При зниженні активності цього ензиму на 40 % виникають перші фізіологічні прояви інтоксикації, при зниженні його активності практично до нуля необхідна невідкладна фармакологічна корекція реактиваторами активності ХЕ. Тому, зважаючи на діагностичне значення ХЕ, провели визначення активності цього ензиму (рис. 3.11).

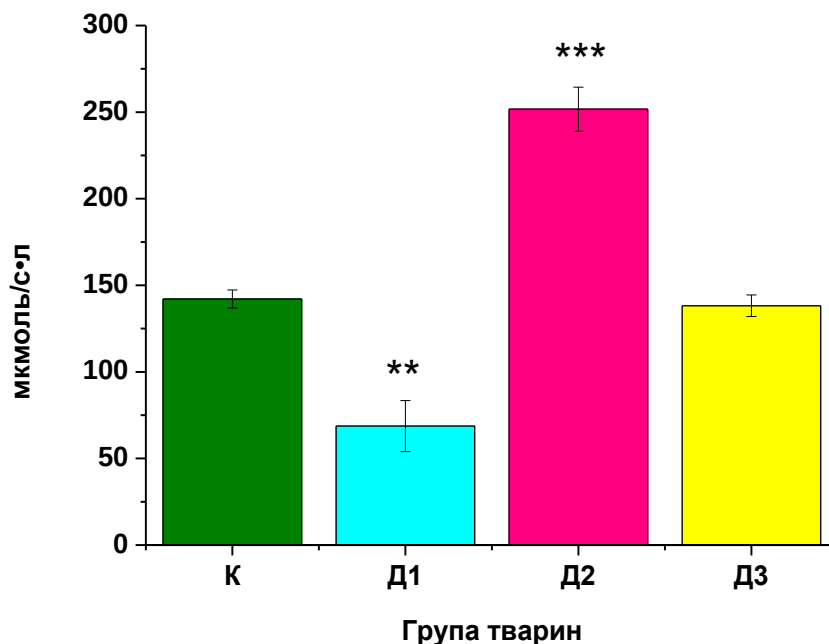


Рис. 3.11. Холієстеразна активність у плазмі крові щурів за дії ХПФ дозою 90 мг/кг (Д1), комплексу вітамінів А та Е (Д2), ХПФ і комплексу вітамінів А та Е (Д3) ($M \pm m$, $n=5$).

В результаті встановлено зниження активності ХЕ на 51,6 % ($p < 0,01$) у групі Д1, за дії комплексу вітамінів виявлено зростання активності цього ензиму на 76,6 % ($p < 0,001$), водночас за дії ХПФ дозою 90 мг/кг зафіксували незначний спад активності ХЕ порівняно з показниками контрольної групи.

3.4.2. Прооксидантно-антиоксидантні параметри еритроцитів щурів за гострої інтоксикації ХПФ дозою 90 мг/кг і за введення комплексу вітамінів А та Е впродовж 5 діб. Оскільки першою ензиматичною ланкою утилізації АФО виступають каталаза та супероксиддисмутаза, було проведено визначення їхньої ензиматичної активності в гемолізатах еритроцитів крові щурів (табл. 3.22).

Таблиця. 3.22

Активність каталази (КАТ) та супероксиддисмутази (СОД) в гемолізатах еритроцитів щурів за дії ХПФ дозою 90 мг/кг і за введення комплексу вітамінів А та Е впродовж 5 діб. ($M \pm m$, $n=5$)

Група тварин	Досліджуваний показники	
	КАТ	СОД
	ммоль H_2O_2 / хв • мг білка	у.о./ мг протеїну
К1	2,96 $\pm$ 0,15	0,63 $\pm$ 0,09
Д1	4,29 $\pm$ 0,37*	0,95 $\pm$ 0,05*
Д2	2,05 $\pm$ 0,27*	0,61 $\pm$ 0,09
Д3	2,86 $\pm$ 0,41	0,46 $\pm$ 0,08

Примітка: у цій та наступних таблицях: К – контрольна група щурів, яким вводили чисту соняшникову олію за 24 год до відбору зразків; Д1 – група щурів, яким вводили ХПФ дозою 90 мг/кг за 24 год до відбору зразків; Д2 – група щурів, яким вводили комплекс вітамінів А 100 000 МО та Е (0,1 г/кг) і відбирали зразки через 24 год після попереднього 5-добового введення вітамінів; Д3 – група щурів, яким вводили ХПФ дозою 90 мг/кг та відбирали зразки для аналізу через 24 год після попереднього 5-добового введення тваринам комплексу вітамінів А 100 000 МО та Е (0,1 г/кг).

Встановлено, що каталазна активність знижувалась у групі Д2 на 30,7 % ($p<0,05$) порівняно із показниками контрольної групи. Водночас було виявлено зростання активності КАТ у групі Д1 – на 44,9 % ($p<0,05$) порівняно з показниками інтактних тварин. Варто зазначити, що статистично вірогідні відмінності активності СОД були встановлено лише в щурів групи Д1, які отримували розчин ХПФ дозою 90 мг/кг. У гемолізатах еритроцитів цієї групи відбувалося зниження супероксидисмутази активності на 43,6 % ($p<0,05$) порівняно з контрольними значеннями.

Відомо, що глутатіон виконує функцію одного із основних ендogenous антиоксидантів, здатних синтезуватись клітинами [41]. Аналіз вмісту відновленої форми цього трипептиду в гемолізатах еритроцитів щурів показав зниження його вмісту у групі Д1, яка перорально отримувала розчин ХПФ, і в групі Д3, яка зазнавала сумісного впливу комплексу вітамінів та розчину ХПФ (табл. 3.23).

Таблиця. 3.23

Вміст глутатіону відновленого (GSH), активність глутатіонпероксидази (ГПО) та глутатіон-S-трансферази (Г-S-T) у гемолізатах еритроцитів щурів за дії ХПФ дозою 90 мг/кг і за введення комплексу вітамінів А та Е впродовж 5 діб ($M\pm m$, $n=5$)

Група тварин	Досліджуваний показник		
	GSH	ГПО	Г-S-T
	мкмоль GSH/мг протеїну	мкмоль / хв мг Hb	у.о./ мг протеїну
К1	0,22±0,02	469,9±10,7	62,63±2,12
Д1	0,16±0,01*	209,7±12,20*	45,12±4,28*
Д2	0,23±0,03	459,3±9,50	75,02±5,14
Д3	0,15±0,005*	426,7±9,13	53,2±1,57*

У гемолізатах еритроцитів щурів зазначених груп зафіксовано зниження вмісту GSH на 27,2 % ($p<0,05$) і 31,8 % ($p<0,05$) відповідно порівняно з показниками інтактних тварин. Аналогічне зниження вмісту GSH було описане у дослідженні R. Kaug зі співавторами [169]. За введення щурам ХПФ дозою 90 мг/кг виявлено інгібування глутатіонпероксидазної активності у групі Д1 (табл. 3.23). У цієї групи щурів було встановлено зниження активності ГПО на 55,3 % ($p<0,05$) порівняно з показниками контрольних тварин.

За умов цього експерименту також спостерігали зростання вмісту первинних та вторинних продуктів ліпопероксидації (табл. 3.24). Зокрема, у групах Д1 та Д3 встановлено зростання вмісту гідропероксидів ліпідів на 81,3 % та 39,7 % ($p<0,05$) відповідно порівняно з контрольними значеннями. Показано, що вміст ТБК-активних продуктів зростає у всіх дослідних групах. Так, у групі Д1 їх вміст збільшувався у 2,6 раза, у Д2 – в 1,6 раза, Д3 – у 4,3 раза порівняно із контрольними значеннями.

Таблиця 3.24

Вміст гідропероксидів ліпідів (ГПЛ) та ТБК-активних продуктів в гемолізатах еритроцитів щурів за дії ХПФ дозою 90 мг/кг і за введення комплексу вітамінів А та Е впродовж 5 діб ($M\pm m$, $n=5$)

Група тварин	Досліджуваний показник	
	ГПЛ	ТБК-активні продукти
	ммоль/мл	у.о./ мг прот.
К1	4,63 $\pm$ 0,13	1,298 $\pm$ 0,72
Д1	8,39 $\pm$ 0,75*	4,67 $\pm$ 0,93*
Д2	3,61 $\pm$ 0,47	3,44 $\pm$ 0,65*
Д3	6,47 $\pm$ 0,61*	6,85 $\pm$ 0,51*

У гемолізатах еритроцитів щурів групи Д1, які перорально отримували ХПФ дозою 90 мг/кг, було зафіксовано зниження активності Г-S-T на 27,9 % ($p < 0,05$) порівняно з показниками контрольних щурів. Натомість за введення щурам комплексу вітамінів А та Е у дозах, відповідно, 0,05 г/кг та 0,1 г/кг у гемолізатах еритроцитів групи Д2 встановлено зростання активності цього ензиму на 19,7 % порівняно зі значеннями контрольних тварин. За 5-добового введення вітамінів А та Е у гемолізатах групи Д3 зафіксували на 15,9 % ($p < 0,05$) нижчу активність Г-S-T, ніж у контролі. Слабше виражене, ніж у групі Д1, інгібування активності Г-S-T у групі Д3 може бути пов'язане з коригувальним ефектом обраних доз вказаних антиоксидантних агентів та кратністю їх введення.

3.4.3. Гематологічні показники крові щурів за гострої інтоксикації ХПФ дозою 90 мг/кг за попереднього щодобового введення комплексу вітамінів А та Е впродовж 5 діб.

За умов інтоксикації ХПФ дозою 90 мг/кг на тлі 5-добового введення комплексу вітамінів А та Е було проведено дослідження основних гематологічних показників крові (табл. 3.25). За введення ХПФ у крові групи Д1 виявлено зниження вмісту еритроцитів на 13,9 % ($p < 0,05$) порівняно з контролем. Водночас у групі Д1 було встановлено зниження вмісту загального гемоглобіну на 6,3 % ($p < 0,05$).

У групі Д1 спостерігали зниження загальної кількості лейкоцитів на 17,2 % ($p < 0,05$). Варто зауважити, що в цій групі виявлено перерозподіл субпопуляції лейкоцитів, а саме зростання вмісту гранулоцитів на 63,7 % ($p < 0,05$). Кількість тромбоцитів у групі Д1 знижувалась на 34 % та зростала у групі Д3 на 58,3 % ($p < 0,05$) порівняно з контрольними значеннями. Ці дані узгоджуються з результатами наших попередніх досліджень (р 3.3).

Враховуючи зниження вмісту еритроцитів у крові за дії ХПФ, важливо було вивчити причини цього явища, оскільки зниження кількості цього класу клітин може бути пов'язане зі скороченням тривалості їх життя у крові.

**Гематологічні показники крові щурів за дії ХПФ дозою 90 мг/кг
і за введення комплексу вітамінів А та Е впродовж 5 діб
($M \pm m$, $n=5$)**

Показники	Група тварин			
	К	Д1	Д2	Д3
Еритроцити, $10^{12}/л$	$7,2 \pm 0,31$	$6,2 \pm 0,25^*$	$8,14 \pm 0,38$	$7,0 \pm 1,1$
Загальний Нб, г/л	$158,3 \pm 3,05$	$144,33 \pm 4,2^*$	$157,33 \pm 2,4$	$146,6 \pm 3,72$
Гематокрит, л/л	$0,3 \pm 0,012$	$0,35 \pm 0,04$	$0,33 \pm 0,035$	$0,39 \pm 0,021$
MCV, фл	$46,8 \pm 1,65$	$48,67 \pm 1,71$	$46,7 \pm 1,46$	$47,60 \pm 1,68$
Лейкоцити, $10^9/л$	$13,3 \pm 0,61$	$15,6 \pm 0,75^*$	$12,47 \pm 0,93$	$13,03 \pm 1,47$
Лімфоцити, $10^9/л$	$9,4 \pm 1,04$	$6,13 \pm 0,89$	$6,85 \pm 2,8$	$8,23 \pm 0,73$
Гранулоцити, $10^9/л$	$2,4 \pm 0,30$	$3,93 \pm 0,15^*$	$1,67 \pm 0,76$	$2,27 \pm 0,24$
Моноцити, $10^9/л$	$2,4 \pm 0,34$	$2,23 \pm 0,15$	$1,33 \pm 0,56$	$2,47 \pm 0,21$
Тромбоцити, $10^9/л$	$241,7 \pm 16,4$	$159,33 \pm 1,57^*$	$382,67 \pm 16,2^{***}$	$339,1 \pm 24,6$
MPV, фл	$6,8 \pm 0,90$	$6,70 \pm 0,30$	$7,10 \pm 0,36$	$6,57 \pm 0,37$
PDW, %	$26,1 \pm 3,9$	$16,63 \pm 4,1$	$28,63 \pm 3,5$	$22,90 \pm 8,99$

Примітка: у цій і наступних таблицях: К – контрольна група щурів; Д1 – група щурів, які отримували ХПФ дозою 90 мг/кг; Д2 – група щурів, які отримували комплекс вітамінів А (0,05 г/кг) та Е (0,1 г/кг) впродовж 5 діб до введення ХПФ; Д3 – група щурів, які отримували ХПФ дозою 90 мг/кг після 5-добового введення тваринам комплексу вітамінів А (0,05 г/кг) та Е (0,1 г/кг).

У результаті досліджень швидкості гемолізу еритроцитів крові щурів отримано еритрограми, які демонструють динаміку змін фізико-хімічних характеристик мембран цих формених елементів крові за умов гострої інтоксикації ФОС. Виявлено зміни резистентності еритроцитів до кислотного гемолітика (рис. 3.12, табл. 3.26).

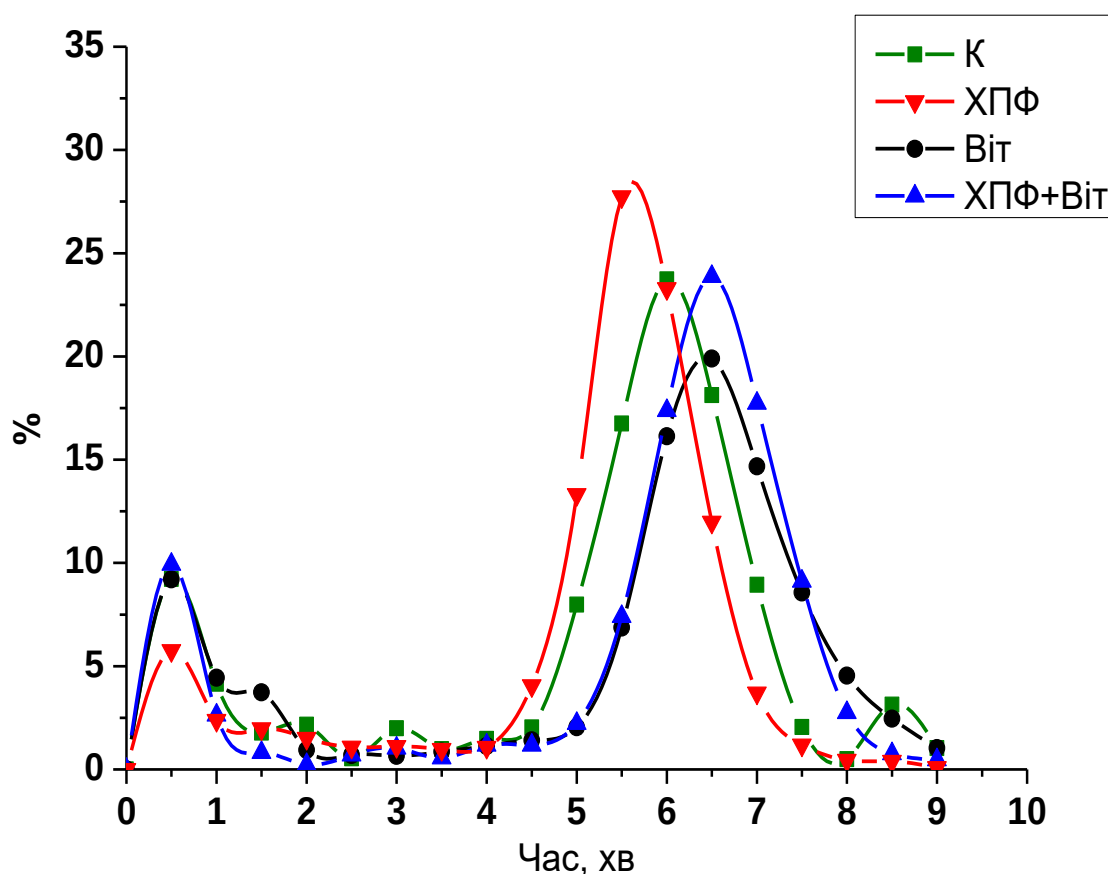


Рис. 3.12. Типові еритрограми крові щурів за дії ХПФ дозою 90 мг/кг і за введення комплексу вітамінів А та Е впродовж 5 діб ($M \pm m$, $n=5$).

Так, у тварин групи Д1, які отримували ХПФ дозою 90 мг/кг, встановлено зсув піку максимального гемолізу вліво. У групі Д1 спостерігали зростання кількості гемолізованих еритроцитів на 17,6 % ($p < 0,05$) та

зниження цього показника на 16,1 % у групі Д2 порівняно з показниками контрольних тварин.

Таблиця. 3.26

**Параметри еритрограм крові щурів за дії ХПФ дозою 90 мг/кг
і за введення комплексу вітамінів А та Е впродовж 5 діб ($M \pm m$, $n=5$)**

Група тварин	Показники гемолізу		
	Час максимального гемолізу, хв	Час тотального гемолізу, хв	Максимум гемолізу, %
К	6,2±0,12	9,12±0,133	23,73±1,13
Д1	5,7±0,14*	9,14±0,106	27,91±1,31*
Д2	6,8±0,31	9,25±0,80	19,89±1,10*
Д3	6,8±0,25	9,27±0,124	23,87±1,43

При отруєнні тварин ХПФ у групі Д1 спостерігали зсув кривих оксигенації гемоглобіну вправо, що свідчить про зниження спорідненості гемоглобіну до кисню (рис. 3.13, табл. 3.27). Зафіксований зсув супроводжувався зростанням показника насиченості гемоглобіну киснем P_{75} у групах Д1 та Д3 на 85 % ($p<0,05$) та 76,2 % ($p<0,05$) відповідно (рис. 3.13, табл. 3.28). За значень P_{90} відзначали аналогічний характер змін, проте зростання становило 42,7 % ($p<0,05$) та 44,2 % ($p<0,05$) у групах Д1 та Д3 відповідно порівняно з показниками контрольних тварин.

З одного боку, ймовірною причиною змін показника P_{75} та P_{90} є зростання вмісту CO_2 у плазмі – один із загальновідомих фізіологічних факторів зниження спорідненості гемоглобіну до кисню. Імовірно, що свій вклад у зниження спорідненості гемоглобіну до кисню вносить

2-3 дифосфогліцерат, що може взаємодіяти з гемоглобіном, забезпечуючи цим полегшену віддачу O_2 тканинам.

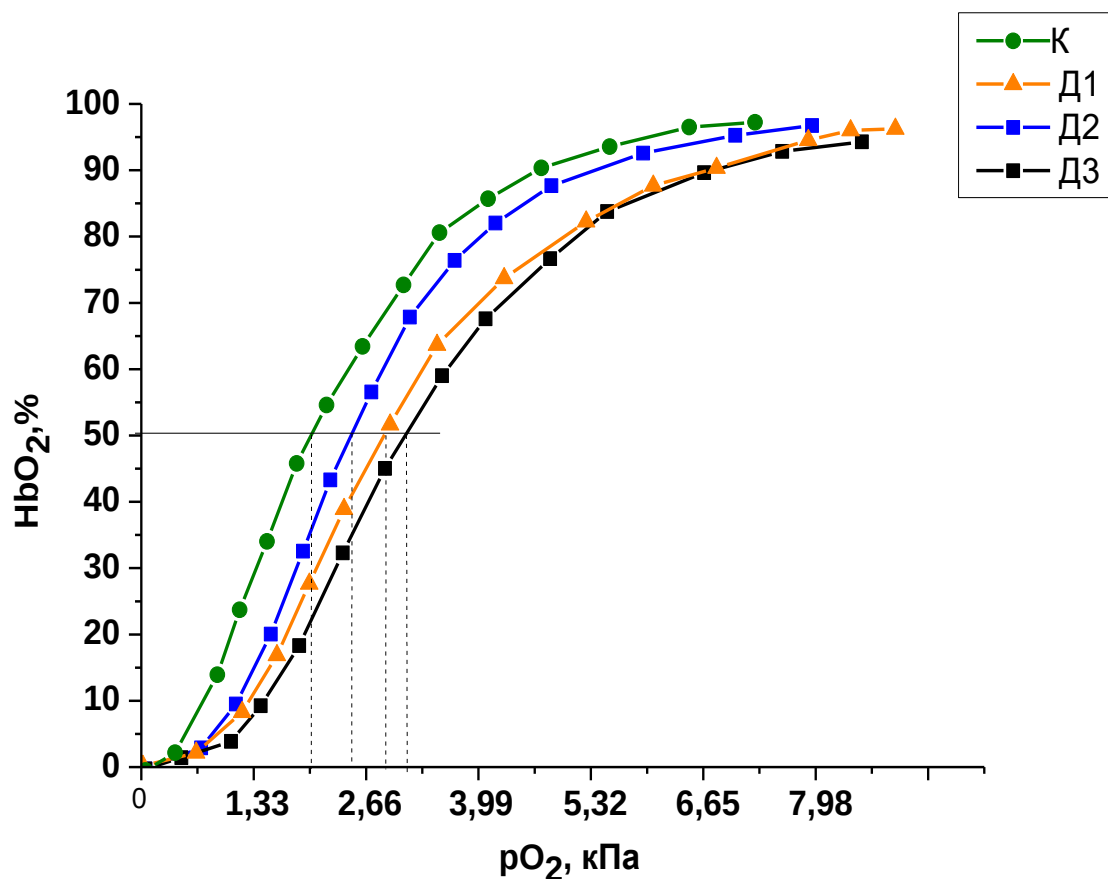


Рис. 3.13. Типові криві насичення киснем гемоглобіну крові щурів за дії ХПФ дозою 90 мг/кг і введення комплексу вітамінів А та Е впродовж 5 діб ($M \pm m$, $n=5$).

З іншого боку, ймовірно, що внаслідок дії ХПФ відбувається перерозподіл лігандних форм гемоглобіну та утворення відповідних аддуктів, які роблять свій внесок у його спорідненість до кисню. Різні лігандні форми гемоглобіну можуть переходити одна в одну, що обумовлено особливостями атома Fe^{2+} у структурі гему гемоглобіну. При взаємодії з лігандами гем гемоглобіну може утворювати комплексні сполуки, які не змінюватимуть своєї валентності.

З літератури [26, 27] відомо, що при заміні одного ліганду іншим в молекулі гемоглобіну відбувається перебудова гем-лігандних взаємодій, що супроводжується структурними перебудовами і, як наслідок, зміною функцій гемоглобіну.

Таблиця. 3.27

Динаміка насичення гемоглобіну крові щурів киснем за дії ХПФ дозою 90 мг/кг і за введення комплексу вітамінів А та Е впродовж 5 діб (M±m, n=5)

Група тварин	Показники насичення гемоглобіну		
	pO ₂ кПа		
	50%	75%	90%
К	1,99±0,26	2,27±0,67	4,68±0,43
Д1	2,73±0,35	4,37±0,23*	6,68±0,35*
Д2	2,50±0,57	2,74±0,31	5,32±0,31
Д3	2,86±0,71	4,2±0,48*	6,75±0,24*

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 менш 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.

Висновки

За гострої інтоксикації щурів ХПФ дозою 90 мг/кг на тлі 5-добового введення комплексу вітамінів А та Е у дозах 100 000 МО та 0,1 г/кг відповідно було зафіксовано:

1. Зниження холінестеразної активності у групі Д1 на 51,6 % ($p < 0,01$), водночас у групі Д3 цей показник наближався до контрольних значень.

2. Зниження каталазної активності у групі Д2 на 30,7 % ($p < 0,05$) порівняно з показниками контрольної групи. Зниження супероксиддисмутазної активності на 43,6 % ($p < 0,05$) порівняно з контрольними значеннями. Зниження вмісту відновленого глутатіону на 27,2 % ($p < 0,05$) та 31,8 % ($p < 0,05$) у гемолізатах еритроцитів щурів груп Д1 і Д3 відповідно порівняно з показниками інтактних щурів. Інгібування глутатіонпероксидазної активності у групі Д1 на 55,3 % ($p < 0,05$) порівняно з показниками контрольних тварин. Зростання вмісту гідропероксидів ліпідів на 81,3 % ($p < 0,05$) та 39,7 % ($p < 0,05$) у групах Д1 та Д3 відповідно порівняно з контрольними значеннями. Зростання вмісту ТБК-активних продуктів у групі Д1 у 2,6 раза, у Д2 – в 1,6 раза, у Д3 – у 4,3 раза порівняно з контрольними значеннями.

3. Зниження вмісту еритроцитів в групі Д1 на 13,9 % ($p < 0,05$) та вмісту загального гемоглобіну на 6,3 % ($p < 0,05$) порівняно з контролем.

4. Зростання групи Д1 кількості гемолізованих еритроцитів на 17,6 % ($p < 0,05$) та зниження цього показника на 16,1 % у групі Д2 порівняно із показниками контрольних тварин.

5. Зростання значень показника P_{75} у групах Д1 та Д3 на 85 % ($p < 0,05$) та 76,2 % ($p < 0,05$) відповідно. Зростання значень P_{90} у групі Д1 та Д3

становило 42,7 % ($p < 0,05$) та 44,2 % ($p < 0,05$) відповідно порівняно із показниками контрольних тварин.

Матеріали цього розділу опубліковані у роботах [55, 59, 240].

РОЗДІЛ 4

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

Отруєння ФОС залишаються важливою причиною виникнення широкого спектру метаболічних порушень. Щороку у світі реєструють тисячі випадків отруєння ФОС різного ступеня важкості [11, 52, 164, 167, 177, 198, 218, 220]. Добре відомим механізмом дії на організм ФОС загалом та ХПФ зокрема є інгібування ними активності ХЕ. Протягом десятиліть зазначений механізм вважався ключовим і практично єдиним. Проте в останні роки з'явилося багато робіт, які доводять існування інших механізмів дії цієї сполуки на системи, тканини та клітини організму [66, 69, 226 228, 246, 247, 254, 282]. Одним із таких може бути виникнення оксидативного стресу за інтоксикації ХПФ [148, 190, 281]. Відомо, що розвиток оксидативного стресу може призводити до порушень прооксидантно-антиоксидантної рівноваги в організмі та супроводжуватись розладами у функціонуванні серцево-судинної, дихальної, нервової та інших систем організму.

Виникнення оксидативного стресу розглядається як один з універсальних механізмів появи метаболічних порушень при захворюваннях і патологіях різної етіології, зокрема онкологічних, нейродегенеративних, серцево-судинних захворюваннях та патологічних порушеннях: гемолітичних анеміях, гіпертонії, легеневій гіпертензії [9, 10, 16, 111, 143, 199, 253, 265, 286]. Для нормалізації прооксидантно-антиоксидантної рівноваги у клітині задіяні як ензиматичні компоненти антиоксидантної системи, так і сполуки із вираженими антиоксидантними властивостями, які запобігають окисленню клітинних компонентів утвореними АФО [114, 136, 142, 251, 266, 276, 285]. Водночас оксидативний стрес може бути одним з факторів, які призводять до низки захворювань, зокрема нейродегенеративних, включно із аміотрофічним латеральним

склерозом, хворобою Паркінсона, Альцгеймера, патологій репродуктивної дихальної і кровоносної систем [145, 147, 154, 158, 193].

Пошук шляхів мінімізації та профілактики різного типу захворювань є надзвичайно важливим для сучасної експериментальної медицини і біології. З огляду на це, метою нашої роботи було дослідити динаміку змін деяких індикаторних показників системи антиоксидантного захисту еритроцитів та перекисного окиснення ліпідів, стійкість еритроцитів до кислотного гемолізу, кисневу ємність гемоглобіну крові щурів за інтоксикації ХПФ та здійснити корекцію виявлених порушень за допомогою вітамінів А та Е.

Було проведено дослідження показників антиоксидантного стану еритроцитів щурів через 1, 3, 6, 10 діб після введення хлорпірифосу дозою 30 мг/кг; через 15, 30, 45, 60 хв після отруєння ХПФ дозою 50 мг/кг; через 12 та 24 год після інтоксикації ХПФ дозою 70 та 90 мг/кг відповідно, за різної кратності і тривалості введення комплексу вітамінів А та Е.

Зважаючи на те, що загальноприйнятим маркерним показником для інтоксикації ФОС є визначення активності ХЕ, було проведено визначення активності цього ензиму в плазмі крові щурів. У результаті власних досліджень встановлено вірогідне зниження активності цього ензиму щодо контрольних значень за одноразового перорального введення щурам ХПФ у дозах 30, 50, 70 та 90 мг/кг. Таким чином, отримані дані підтверджують, що в обраних для досліджень дозах ХПФ проявляє токсичну дію на організм через блокування функції ХЕ. Інгібування цього ензиму спричиняє накопичення ацетилхоліну в синапсах, що призводить до реполяризації постсинаптичної мембрани і інактивації холінорецепторів.

На рівні організму інактивація холінестераз супроводжується низкою фізіологічних проявів (спазмами гладенької мускулатури, посиленою секрецією залоз ШКТ, паралічем периферичних м'язів, ураженням ЦНС), при яких спостерігаються ушкодження біологічних структур на клітинному та субклітинному рівні внаслідок порушення прооксидантно-антиоксидантного балансу.

В літературі є численні згадки про те, що ХПФ здатен проявляти неспецифічний вплив на функціонування антиоксидантної системи тканин різних організмів [200, 202, 207, 215, 222.]. Проте цей прояв виступає на перший план при отруєннях низькими дозами та інтоксикаціях хронічного характеру.

Відомо, що порушення компонентного складу крові, її реологічних характеристик можуть спричиняти дисфункцію у роботі органів та призводити до виникнення в них патологічних змін. Водночас виникнення порушень у нормальному функціонуванні органів може спричиняти зміни у співвідношенні формених елементів та спричиняти появу специфічних маркерів патологічних змін. Передусім це стосується еритроцитів, оскільки зазначений клас клітин є найчисельнішим серед формених елементів (на еритроцити припадає понад 90 % формених елементів крові) та постійно зазнає впливу нормоксичних і гіпоксичних станів, що може призводити до біохімічних, фізіологічних і структурних змін у клітинах еритроцитів. У процесі циркуляції в кров'яному руслі еритроцити постійно зазнають впливу як ендогенних, так і екзогенних активних форм Оксигену, які що можуть порушувати їх нормальне функціонування.

Для мінімізації впливу АФО в еритроцитах функціонує антиоксидантна система, яка складається з неензиматичних низькомолекулярних антиоксидантів (аскорбінова кислота, глутатіон) і з ензиматичних антиоксидантів (каталаза, супероксиддисмутаза, глутатіонпероксидаза тощо). За умов фізіологічної норми АФО можуть вивільнятися нейтрофілами та макрофагами в плазму крові, проте зазвичай вони нейтралізуються, перш ніж зможуть взаємодіяти з еритроцитами[1, 72, 146, 149].

Оскільки в організмі немає специфічних ензимів для знешкодження гідроксильних радикалів, синглетного кисню, пероксинітриту, то у процесах їх деактивації задіяна СОД, що здійснює утилізацію супероксиданіон-радикала ($O_2^{\bullet-}$), попередника зазначених сполук. Зазначений ензим задіяний на початковому етапі детоксикації АФО і забезпечує переривання

послідовних реакцій вільнорадикального окиснення у тканинах. СОД запобігає окисному пошкодженню макромолекул супероксиданіон-радикалом ще на стадії ініціації. $O_2^{\bullet-}$ здатен окислювати білкові молекули, які містять Fe-S-кластери. Внаслідок цього окиснення відбувається інактивація білкових молекул і вивільнення Fe (III), що може піддаватись відновленню до Fe (II) і надалі приймати участь у реакції Фентона з подальшим утворенням гідроксильних радикалів [32, 232].

У результаті дисертаційних досліджень встановлено зниження активності СОД у щурів, які отримували ХПФ у через 30 мг/кг через 3, 6, 10 діб експериментального періоду. Аналогічний характер змін спостерігали при дослідженні цього показника за дії ХПФ дозою 50 мг/кг та за дії ХПФ дозою 70 мг/кг разом із комплексом вітамінів А та Е. Отримані нами результати зниження активності СОД в еритроцитах при інкубації впродовж 60 хв та 180 хв узгоджуються з дією на ці клітини іншого фосфорорганічного інсектициду – фозалону [103]. Натомість Smida A. описує зниження активності цього ензиму при тривалій (впродовж 30 діб) інтоксикації ХПФ [261]. Іншим фактором зниження активності СОД може виступати інтенсивність та тривалість самого оксидативного стресу [227, 255, 267, 288]. У дослідженні J. Ma автор пов'язує зниження активності СОД із накопиченням у клітині супероксиданіон-радикала ($O_2^{\bullet-}$) і його участю у модифікації цистеїнових залишків молекули цього ензиму [191].

Варто зазначити, що на активність СОД впливає інтенсивність синтезу та посилення деградації молекули цього ензиму. В процесах інактивації та деградації СОД можуть брати участь гідроксильні радикали та гідроген пероксид. Останній може відновлювати Cu^{2+} до Cu^+ , який внаслідок взаємодії з новою молекулою гідроген пероксиду утворює $Cu^{2+} OH^{\bullet}$ -радикал. Цей зв'язаний радикал $OH^{\bullet}$ спричиняє окисну модифікацію бокових радикалів амінокислотних залишків у активному центрі ензиму, призводить до його інактивації [21, 51, 144]. Іншою причиною зниження супероксиддисмутазної активності може бути зниження пулу ензиму внаслідок його посиленого

використання для утилізації утвореного O_2^- . Ймовірною причиною зниження активності СОД може бути модифікація цього ензиму продуктами ПОЛ, які спричиняють його пришвидшену деградацію [35].

Іншим ензимом, який першим здійснює розщеплення надлишку гідроген пероксиду або окислює у присутності пероксидів низку токсичних сполук в пероксидазній реакції, є каталаза.

Ми встановили, що інтоксикація щурів ХПФ дозою 50 мг/кг, призводила до зниження активності КАТ у гемолізатах еритроцитів через 15 (Д1), 30 (Д2), 45 хв (Д3) після введення цієї сполуки. Зафіксовані за інтоксикації ХПФ дозою 50 мг/кг у групі Д1 одночасні зміни як КАТ, так і СОД, можливо, пов'язані з тим, що на ранньому етапі інтоксикації супероксид аніон інгібує активність КАТ, а гідроген пероксид – активність СОД [23 124, 178]. Для СОД і КАТ властиве так зване явище перехресної регуляції активності. Вірогідне зростання активності СОД ($p < 0,05$) і тенденція до збільшення активності КАТ у групі Д4 можуть бути пов'язані з нормалізацією прооксидантно-антиоксидантної рівноваги та активізацією утилізаційних процесів АФО через 60 хв після введення тваринам ХПФ.

За отруєння щурів ХПФ дозою 70 мг/кг в еритроцитах крові групі Д1 спостерігали зростання активності цього ензиму через 12 год після інтоксикації. Аналогічні зміни цього показника були виявлені за інтоксикації ХПФ дозою 90 мг/кг через 24 год. Ймовірно, що причиною зростання активності КАТ може виступати накопичення субстрату для нього за дії на організм щурів ХПФ. Водночас зростання активності вказаного ензиму може вказувати на інтенсифікацію процесів оксидативного стресу. Натомість при введенні тваринам ХПФ дозою 30 мг/кг у досліджуваних зразках ми не спостерігали вірогідних змін активності цього ензиму впродовж всього дослідного періоду.

За умови корекції прооксидантно-антиоксидантних порушень введенням комплексу вітамінів А і Е безпосередньо після інтоксикації ХПФ дозою 70 мг/кг і за щодобового введення комплексу вітамінів впродовж 5 діб

отруєння ХПФ дозою 90 мг/кг спостерігали тенденцію до повернення активності КАТ практично до контрольного рівня. Аналогічну нормалізацію активності цього ензиму в еритроцитах за дії вітаміну Е описано у роботі Saxena R. та співавторів [250]. Водночас відсутність таких змін на пізніших етапах інтоксикації ХПФ, а саме, на 1, 3, 6, 10 доби, можна розглядати як адаптаційну відповідь організму з боку антиоксидантної системи захисту еритроцитів.

До основних метаболічних реакцій, які відбуваються у клітині, належать процеси перекисного окиснення ліпідів. За нормальних фізіологічних умов інтенсивність процесів вільнорадикального окиснення підтримується на певному сталому рівні, тому їх можна використовувати як неспецифічний показник патогенезу багатьох захворювань і патологічних станів. Варто зазначити, що зміна показників ПОЛ передуює клінічним проявам ушкоджень біологічних структур. У процесі ПОЛ утворюються реакційноздатні АФО, які спричиняють ушкодження мембранних ліпідів і, як наслідок, утворення первинних та вторинних продуктів гідропероксидів ліпідів та ТБК-активних продуктів відповідно.

У результаті досліджень встановлено, що при інтоксикації щурів ХПФ дозою 30 мг/кг відбувалося зростання вмісту ТБК-активних продуктів у групах Д2, Д3 та Д4 тобто через 3, 6, 10 діб після введення ХПФ. Аналогічні зміни спостерігали при введенні піддослідним тваринам ХПФ дозою 50 мг/кг у групі Д3. Натомість у групі Д2 спостерігалось зниження вмісту ТБК-активних продуктів, яке, ймовірно, спричинене активацією процесів антиоксидантного захисту, про що опосередковано свідчать ензиматичні показники глутатіонової системи в даний дослідний період. Своєю чергою, при інтоксикації щурів ХПФ дозою 70 мг/кг спостерігали аналогічний характер змін ГПЛ. Встановлено, що при отруєнні ХПФ дозою 70 мг/кг відбувалося зростання ТБК-активних продуктів у досліджуваних зразках груп Д1, Д3. За інтоксикації ХПФ дозою 90 мг/кг у групі Д1 спостерігали аналогічний характер змін. Підтвердженням участі ХПФ в інтенсифікації

процесів ПОЛ у крові можуть виступати літературні дані, зокрема дослідження S. A. Mansour, який показав зростання вмісту ТБК-активних продуктів в еритроцитах крові щурів за інтоксикації ХПФ [195]. Водночас у дослідженнях в умовах *in vitro* F. Deeba підтвердив зростання вмісту ТБК-активних продуктів за інкубації еритроцитів з розчином ХПФ [123].

Іншим підтвердження інтенсифікації процесів ПОЛ за умов інтоксикації ХПФ може бути робота F. Ghayomi [149], який засвідчив зростання вмісту гідроперекисів ліпідів у лімфоцитах людини при інкубації Т-лімфоцитів із ХПФ.

Важливим елементом антиоксидантної системи, залученим в антирадикальний і антипероксидний захист еритроцитів, є глутатіонова ланка антиоксидантної системи. Злагоджена робота всіх її компонентів (GSH, ГПО, Г-S-T, ГР) сприяє нормалізації вмісту пероксидів і збереженню антиоксидантного гомеостазу [4, 22, 48, 156, 166, 185, 203]. Глутатіоновій системі, що охоплює глутатіон і глутатіонзалежні ензими, належить одна з провідних ролей в утилізації АФО та підтриманні окисно-відновного потенціалу. Це зумовлено синергізмом роботи глутатіонзалежних ензимів, їх участю в регенерації низки низькомолекулярних антиоксидантів і здатністю відновленого глутатіону при прямій взаємодії нейтралізувати активні кисневі інтермедіати.

Реакції окиснення призводять до утворення великих кількостей продуктів ПОЛ, зокрема гідропероксидів ліпідів, що є одним з основних продуктів ПОЛ. Гідропероксиди ліпідів – це нестійкі сполуки, тому вони легко метаболізуються в найбільш стабільні продукти вторинного окиснення – альдегіди, кетони, органічні кислоти (мурашина, оцтова, бутанова). Достатній рівень глутатіону в еритроцитах має вирішальне значення для мінімізації шкідливих ефектів АФО та автоокиснення гемоглобіну в цитоплазмі [223].

За перорального введення ХПФ дозою 30 мг/кг прослідковується зниження вмісту глутатіону відновленого в еритроцитах усіх груп

інтоксикованих щурів, що може бути підтвердженням зростання рівня АФО. Своєю чергою, при введенні дослідним щурам ХПФ дозою 50 мг/кг у досліджуваних зразках відбувалось спочатку зростання вмісту глутатіону відновленого у групі Д1 та різке зниження у групі Д2. Аналогічне зниження зафіксували при введенні ХПФ дозою 70 мг/кг у групі Д2 та незначне зростання у Д3 за його комбінованого введення із вітамінним комплексом. За дії ХПФ дозою 90 мг/кг спостерігали аналогічний характер змін у групі Д1. З одного боку, зниження вмісту відновленого глутатіону може бути наслідком дії АФО. Адже з літератури відомо, що в цитозолі мішенями окисної модифікації для АФО служать структурні компоненти клітини, зокрема мембранні ліпіди та білки. У захисті від їхньої окисної модифікації задіяний цистеїн та відновлений глутатіон. Обидві сполуки містять SH-групи, що значно легше піддаються окисленню, ніж аналогічні групи білкових молекул. Завдяки цій властивості глутатіон забезпечує захист мембранних білків від ушкоджень внаслідок окисної модифікації. Крім того, добре відомо, що глутатіон бере участь в детоксикації ксенобіотиків [39, 166, 183, 186, 187, 188]. З іншого боку, у фізіологічних концентраціях відновлений глутіон проявляє антиоксидантний ефект. Він, крім неензиматичної інактивації утворення гідропероксидів ліпідів ензиматичним шляхом, інактивує гідроген пероксид, інгібує утворення АФО та одночасно окислює тіольні групи глутатіону до дисульфідів. Зростання вмісту відновленого глутатіону після інтоксикації організму може бути пов'язане з його вивільненням для нейтралізації наслідків оксидативних порушень, а зростання при введенні із комплексу вітамінів – з антиоксидантними властивостями самих вітамінів [14].

Ензиматичним показником, що забезпечує підтримку редокс-статусу внутрішньоклітинного середовища та є глутіонзалежним показником АОС організму, є глутатіонредуктаза [110]. Зазначений ензим каталізує забезпечує відновлення окисненого глутатіону у відновлений, чим забезпечується функціонування глутатіонової ланки захисту організму. Як показали

результати дисертаційних досліджень, активність ГР була знижена у групах Д1 та Д2, які отримували ХПФ дозою 30 мг/кг. Аналогічний характер змін зафіксували в групі Д1, тварини якої отримували ХПФ дозою 70 мг/кг. Зниження активності ГР може бути обумовлене тим, що при оксидативному стресі відновлений глутатіон окиснюється в окиснену форму, яка накопичується всередині клітини та може активно виводитись із неї специфічною транспортною АТФ-азою, або активно взаємодіє із SH-групами клітинних білків з утворенням змішаних дисульфідених комплексів. У першому та другому випадку глутатіон стає менш доступним для ГР, що, вочевидь, і спричиняє зниження активності цього ензиму [278]. Водночас при введенні щурам ХПФ дозою 50 мг/кг спостерігали зростання активності цього ензиму, що паралельно супроводжувалось зростанням вмісту відновленого глутатіону у групі Д1. Зростання активності ГР може бути пов'язане з тим, що цей ензим має високу специфічність до своїх субстратів, тому накопичення окисненого глутатіону призводить до його активного відновлення. З іншого боку, за нормальних умов відновлення окисненого глутатіону переважає над процесами його синтезу. За даними [110], зростання активності цього ензиму може бути зумовлене розвитком патологічного стану, що супроводжується зниженням утвореного у пентозофосфатному циклі коферменту НАДФН⁺, задіяного у відновних процесах.

Одним з ключових ензимів АОС, який, як і каталаза, каталізує реакції відновлення гідроген пероксиду до води, а також відновлення органічних гідропероксидів (ROOH) до гідроксипохідних, є ГПО [40, 46, 60]. Проте ключова відмінність цього ензиму від каталази полягає в тому, що вона більш чутлива до низьких концентрацій H₂O₂. При дослідженні активності ГПО встановлено поступове зниження глутатіонпероксидазної активності крові у період з 1-ї до 3-ї доби експерименту. Таке зниження, можливо, зумовлене вичерпанням доступного пулу GSH та накопиченням продуктів ліпопероксидації. Такий самий характер змін активності цього ензиму

спостерігали через 12 год після введення щурам ХПФ. На противагу цьому, за інтоксикації щурів дозою 50 мг/кг спостерігали зростання активності ГПО через 15 та 30 хв у групах Д1 та Д2 відповідно, що може свідчити про активацію процесів оксидативного стресу у перші хвилини після введення токсиканту. Натомість за п'ятидобового введення тваринам вітамінів А та Е, спостерігається відновлення активності цього ензиму практично до контрольних значень. Ймовірною причиною нормалізації цих процесів може виступати зниження рівня гідроген пероксиду, який виступає субстратом для цього ензиму [197, 200].

Було встановлено, що ХПФ дозою 90 мг/кг спричиняє зменшення активності Г-S-T, ГПО та вмісту GSH у гемолізатах еритроцитів щурів. Виявлено що інтоксикація ХПФ дозою 70 мг/кг за введення вітамінів А дозою 100 000 МО та Е дозою 0,1 г/кг здійснює протективний вплив вітамінів на кількість еритроцитів, вміст гемоглобіну, зростання показників резистентності еритроцитів, зниження активності КАТ, інгібування збільшення вмісту ТБК-активних продуктів, зростання активності Г-S-T та ГПО та вмісту GSH практично до контрольних значень.

Досліджувані дози комплексу вітамінів А і Е здійснювали протективний вплив на окремі ензиматичні і неензиматичні показники АОС крові щурів. Ми виявили активацію процесів ПОЛ за дії ХПФ та зниження їх інтенсивності за дії вітамінів А і Е. Отримані нами результати корелюють із даними літератури [44]. Водночас зафіксовано збільшення активності КАТ та зниження активності СОД, ГПО, ГР і вмісту GSH у гемолізатах еритроцитів. Варто зазначити, що коригування окисного стресу вітамінним комплексом викликала позитивні зміни біохімічних параметрів еритроцитів щурів.

Один із способів корекції шляхів патогенезу оксидативного стресу полягає в застосуванні антиоксидантів. Доцільність застосування вітамінних сполук для корекції наслідків оксидативного стресу, зокрема при інтоксикаціях ФОС підтверджена роботами низки авторів [91, 93, 96, 114,136].

Слід зазначити, що серед всіх тканин і структур організму еритроцити відіграють важливу роль як утилізатори вільних радикалів і безперервно зазнають дії АФО в великому колі кровообігу і автоокисленню гемоглобіну в цитоплазмі [32, 223]. Плазматичні мембрани еритроцитів є чутливими до пошкоджень, що виникають внаслідок оксидативного стресу через високий вміст ненасичених жирних кислот, які забезпечують їх еластичність [95, 98, 100, 272].

Кров є одним із найбільш лабільних індикаторних показників при інтоксикації сполуками різноманітної природи. Зміни її функціональних показників і компонентного складу можуть віддзеркалювати розвиток патологічних процесів в органах та тканинах, водночас функціональні порушення та зміна компонентного складу крові можуть порушувати функціонування органів і тканин. Тому за умов інтоксикації ФОС, крім вивчення специфічних показників інтоксикації, важливе значення має дослідження кількості формених елементів крові, резистентності еритроцитів до гемолізу, кисневотранспортної функції гемоглобіну [55].

Оскільки склад і співвідношення формених елементів крові може виступати інтегральним показником клінічного стану організму, інформативним є аналіз її параметрів за умов інтоксикації організму різними ксенобіотиками. Зокрема, наслідком хімічної травми можуть виступати зміни функціональних характеристик крові. Ці зміни спрямовані на підтримку гомеостазу системи крові і мають адаптаційний характер. Кількісні та якісні зміни компонентного складу крові зазвичай мають неспецифічний характер, але відображають перебіг системних процесів в організмі. [42, 79].

Виявлене нами зменшення кількості еритроцитів, вмісту гемоглобіну, показника гематокриту за інтоксикації ХПФ у доза 30, 70 та 90 мг/кг може бути зумовлене виникненням анемічних ефектів та посиленням руйнування еритроцитів за дії цієї сполуки. Ймовірно, що ХПФ ініціює каскад реакцій, що призводить до утворення АФО. Можна припустити, що утворені проміжні продукти модифікують компоненти мембран еритроцитів,

внаслідок чого зменшується лабільність останніх і в них порушується йонний транспорт, що приводить до руйнування клітин [17, 45, 69]. Отримані результати підтверджуються даними літератури, які стосуються впливу на структуру мембран клітин інших представників ФОС метафосу та перфторану [49].

Форменні елементи крові перебувають у тісних міжклітинних взаємодіях з органами і тканинами, тому при інтоксикації ХПФ можуть спостерігатись зміни кількісного складу компонентів крові та порушення їх функції. У контексті дослідження впливу ХПФ на показники системи перефіричної крові спостерігали зниження кількості еритроцитів, вмісту загального гемоглобіну та гематокриту. Аналогічні зміни за дії ХПФ були описані М. R. Narra у дослідженні гематологічних показників риб *Clarias batrachus*. Автор зафіксував зниження загальної кількості еритроцитів та загального вмісту гемоглобіну. Водночас автори фіксували зростання загальної кількості лейкоцитів [206]. Ймовірно, що зміни вищеописаних показників пов'язані передусім із порушенням цілісності еритроцитарної мембрани, зниженням кількості еритроцитів внаслідок інтенсифікації пошкоджень мембрани еритроцитів продуктами ПОЛ.

Виявлені порушення у стабільності еритроцитарних мембран щурів за дії ХПФ можуть призводити до видозмін у структурі їхнього білкового компонента – гемоглобіну. Як відомо, йому належить чільне місце в складній системі регуляції газообміну в організмі [122, 223]. Водночас гемоглобін може взаємодіяти з різноманітними хімічними сполуками CO, NO, H₂S тощо, утворюючи відповідні лігандні форми: карбокси-, нітритро-, сульфгемоглобін. Гемоглобін може вступати в окисно-відновні реакції завдяки залізу гема ($\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+}$), утворюючи метгемоглобін. Кожна з перерахованих лігандних форм гемоглобіну впливає на спорідненість до кисню. Крім того, хімічні сполуки, які потрапляють в організм тварини чи людини, здатні взаємодіяти з білковим компонентом гемоглобіну (наприклад, нітритро-гемоглобін),

наслідком чого є зміни конформації білкової молекули та порушення її функції [27, 122].

Як свідчать дані літератури, за отруєння ФОС можлива ехіноцитозна трансформація еритроцитів, що призводить до порушення структури і кількісного складу цитоскелетних білків їхніх мембран. Внаслідок цих перебудов змінюється заряд мембран еритроцитів, що спричиняє агрегацію цих клітин. Агрегація ехіноцитів є додатковим фактором порушення кровотворення за інтоксикації ФОС. Агрегати ехіноцитів спричиняють зменшення пропускної здатності дрібних судин (капілярів, венул та артеріол), внаслідок чого виникає порушення кровообігу їхніх дистантних ділянок кров'яного русла та централізація кровообігу [96, 135, 150].

За використання для нормалізації прооксидантно-антиоксидантної рівноваги веритроцитах комплексу вітамінів А та Е одразу після інтоксикації ХПФ дозою 70 мг/кг і за попереднього щоденного введення впродовж 5 діб комплексу вітамінів А та Е за інтоксикації ХПФ дозою 90 мг/кг було зафіксовано нормалізацію кількості еритроцитів практично до контрольного рівня. Схоже зростання резистентності мембран еритроцитів щурів до оксидативного стресу за дії вітаміну Е та вітаміну С було описане в роботах S. F. Ambali [99, 100, 114].

Молекулярні порушення структури клітинних мембран еритроцитів спричиняють втрату їх функціональної компетентності, порушення клітинного метаболізму та призводять до загибелі клітин. Пошкодження мембран значною мірою визначає клічні та фізіологічні прояви інтоксикацій ксенобіотиками, зокрема виникнення гіпоксичних явищ при отруєннях ФОС.

АФО у кров'яному руслі взаємодіють із мембранами цих клітин, що призводить до інтенсифікації пероксидного окиснення ліпідів, яке стимулює автоокиснення оксигемоглобіну і утворення метгемоглобіну – гемоглобіну, який не здатен зв'язувати кисень. Поряд з утворенням метгемоглобіну, спостерігається підвищення рівня АФО та інших інтермедіаторів радикальної природи, які викликають гемоліз еритроцитів. Іншою причиною порушення

цілісності еритроцита може бути ушкодження білків цитоскелету еритроцита. Наслідком цього процесу є зростання ригідності його мембрани, що узгоджується з даними досліджень [137, 142, 146].

Варто зазначити, що інший аспект впливу оксидативного стресу полягає у пригніченні Са-АТФази [238], яка задіяна в регуляції вмісту внутрішньоклітинного кальцію. Це призводить до зменшення об'єму еритроцита внаслідок порушення роботи калій-кальцієвої помпи та зростання ригідності еритроцитарної мембрани, що ускладнює мікроциркуляцію еритроцитів і процеси газообміну із тканинами. Зниження рівня гемоглобіну, ймовірно, пов'язане з порушенням синтезу глобіну за рахунок модифікації продуктами метаболізму ХПФ компонентів білоксинтезуючого апарату або з інгібуванням біосинтезу порфіринів печінкою щурів.

Для переміщення еритроцитів по капілярах необхідна деформація його дископодібної клітинної мембрани. У публікаціях [50, 95, 263] було показано, що при оксидативному стресі відбувається окисне пошкодження компонента цитоскелету еритроцита – білка смуги 3. Цей протеїн задіяний у процесі транспорту кисню із легень до тканин і зворотного транспорту вуглекислого газу в легені. Окисне пошкодження білків смуги 3 призводить до пришвидшеного старіння еритроцитів, появу на поверхні клітини специфічних антигенів, які слугують маркерами для імуннокомпетентних клітин.

Зростання вмісту гранулоцитів в крові є характерним для хронічної та гострої інтоксикації ФОС [86]. Зростання вмісту цього класу клітин спостерігається при розвитку запальних та інфекційних процесів.

За даними [43, 81, 105], при гострому та хронічному отруєнні ФОС відбувається формування віддалених функціональних ефектів серцево-судинної системи, зокрема порушення епітелій-залежної релаксації судин, провідності нервових імпульсів між нервовими і м'язовими волокнами, зміна кінетичних параметрів агрегації тромбоцитів, що може виступати одним із додаткових елементів негативного впливу ФОС на реологічні параметри крові.

За даними [50, 126], для гострих отруєнь ФОС є характерним порушення системи згортання крові. Зокрема, за гострого отруєння ФОС може виникати синдром ДВЗ (дисеміноване внутрішньосудинне згортання, тромбоеморагічний синдром), за якого у відбувається порушення згортання крові внаслідок масового вивільнення з тканин тромбопластичних речовин. Розгорнута клінічна картина цього синдрому спостерігається на пізніх етапах отруєння, що характеризується виникненням гіпокоагуляції і фібринолізу. Особливістю патогенезу синдрому ДВЗ є значний викид катехоламінів за гострого отруєння в результаті парасимпатичної стимуляції кори наднирників, яку спричиняє порушення обміну ацетилхоліну, викликаного отруєнням ФОС [71].

При дослідженні впливу гострої інтоксикації на клітини крові спостерігали на зниження кількості еритроцитів за дії ХПФ у дозах 30, 70, та 90 мг/кг. Натомість за дії ХПФ дозою 50 мг/кг у групі Д1 спостерігали зростання кількості цих клітин у крові, що можна розглядати як компенсаторну реакцію на посилене руйнування еритроцитів за дії ксенобіотика на ранньому етапі отруєння.

Дія факторів екзогенного та ендогенного походження може позначатись на кисневотранспортній функції гемоглобіну, зокрема це стосується токсичних хімічних речовин, фізичних чинників, факторів довкілля. Зазначені фактори можуть спричинити порушення процесів приєднання та вивільнення O_2 гемоглобіном. Модифікація гемоглобіну може забезпечуватись прямо або опосередковано. Прямий вплив на функціональні властивості гемоглобіну здійснюється лігандами (CO , NO , йонами органічних і неорганічних сполук), які при взаємодії з молекулою гемоглобіну спричиняють її конформаційні перебудови. Натомість опосередковану модифікацію гемоглобіну здатні забезпечувати хімічні речовини, які шляхом утворення специфічних метаболітів або умов середовища впливають на характер взаємодії цього білка з лігандами. За дії ХПФ впродовж 10 діб встановлено зміни спорідненості гемоглобіну до O_2 .

При гострій інтоксикації щурів ХПФ дозою 50 мг/кг спостерігалось зростання вмісту еритроцитів та гемоглобіну через 15 хв після інтоксикації. Можна припустити, що це адаптивна реакція на гіпоксію, яка призвела до посилення синтезу еритропоєтину та вивільненням із депо субпопуляції молодих еритроцитів – ретикулоцитів.

Зменшення відсотка гемолізованих еритроцитів за дії комплексу вітамінів А та Е, ймовірно, пов'язано зі стабілізуючою дією комплексу вітамінів на мембрани еритроцитів. Відомо, що вітаміни, зокрема А та Е, мають яскраво виражені антиоксидантні властивості, завдяки чому запобігають процесам ПОЛ, зменшують інтенсивність вільнорадикального пошкодження компонентів еритроцитарних мембран та сприяють збереженню їхньої структурно-функціональної організації [95, 96, 276]. Зокрема, α -токоферол бере участь регуляції процесів ПОЛ у біологічних мембранах. В основі цієї регуляції є нормалізація вмісту АФО вітаміном Е. В подальшому утворені гідропероксиди розкладаються однією з ізоформ ГПО, яка запобігає цим включенню цих сполук у цикл окисно-відновних реакцій.

У результаті проведення досліджень резистентності еритроцитів до кислотного гемолізу виявлено, що за гострої інтоксикації ХПФ спостерігали зростання частки гемолізованих еритроцитів без вірогідних змін часу максимального та тотального гемолізів за дози 50 та 70 мг/кг. За дії ХПФ дозою 30 мг/кг спостерігали зсув основи кривої у лівій інфлексії без зміни часу максимуму гемолізу. Крім того, за дії ХПФ дозою 90 мг/кг було зафіксовано зростання проценту максимального гемолізу та скорочення часу максимального гемолізу еритроцитів. За дії комплексу вітамінів зафіксували тенденцію до наближення цих показників до контрольних значень, що може розглядатись як елемент коригувальної дії вітамінів на молекулярному рівні організації клітини. Відомо, що дія вітаміну Е здебільшого проявляється на мітохондріальному рівні, оскільки в цих органелах інтенсивно функціонує електрон-транспортний ланцюг та відбуваються процеси клітинного дихання,

які супроводжуються окисненням вуглеводів, протеїнів, амінокислот. Внаслідок дії ендогенних або новосинтезованих АФО можуть виникати порушення у функціонуванні цих органел у клітині. Вітамін виконує роль «молекулярної пастки» для вільних радикалів. Він задіяний у захисті жирнокислотних залишків мембранних фосфоліпідів від пероксидного окиснення, що призводить до руйнування клітин. Водночас токоферол захищає вітамін А від передчасного окиснення та підсилює його антиоксидантні властивості [44, 136, 155].

На тлі зростання кількості еритроцитів впродовж 1 год за дії ХПФ спостерігали чітке зниження кількості тромбоцитів за введення ХПФ дозою 50 мг/кг. Аналогічний характер змін відзначали при введенні ХПФ дозою 70 мг/кг та 90 мг/кг. Однією із причин може бути неспецифічна реакція крові на введення в організм ХПФ. Іншою ймовірною причиною зниження кількості тромбоцитів і тромбоцитарних індексів на ранніх етапах інтоксикації є утворення на поверхні тромбоцитів комплексів антиген-антитіло або зниження проникності мембрани тромбоцитів, спричиненої оксидативним стресом [135]. Варто зазначити, що за умов корекції наслідків інтоксикації щурів комплексом вітамінів А та Е спостерігали нормалізацію кількості тромбоцитів у крові дослідних щурів.

Збільшення кількості лейкоцитів в групі Д1 за введення щурам ХПФ дозою 50 мг/кг впродовж 1 год може бути пов'язано з їх вивільненням з лімфоїдно-мієлоїдного комплексу в кров для нейтралізації ХПФ-індукованих клітинних ушкоджень. Поступове зниження кількості цих клітин у групах Д2, Д3 і Д4 може бути пов'язане з послабленням окислювального пошкодження, спричиненого стресом, і завершенням утилізаційних процесів в клітинах крові. Зафіксований характер змін параметрів білої крові був описаний з дослідженнях [149]. Варто зазначити, що Elsharkawy та співавтори [135] вважають, що за дії ФОС зміни кількості лейкоцитів можуть бути залежними від важкості отруєння і виступати як додатковий індикатор ступеня отруєння ФОС.

Ступінь насичення киснем органів і тканин пов'язаний як з тривалістю життя еритроцитів, так і зі спорідненістю гемоглобіну до кисню. Тому важливими були дослідження ступеня насичення гемоглобіну киснем за різних значень парціального тиску кисню методом побудови кривих оксигенації гемоглобіну.

Наявний у еритроцитах гемоглобін тісно інтегрований у метаболічні процеси еритроцита. Основною роллю цього гемопротеїну є забезпечення кисневотранспортної функції. Проте спорідненість гемоглобіну до O_2 може зазнавати модифікацій внаслідок дії ксенобіотиків чи клітинних метаболітів. При гострому отруєнні ХПФ дозою 30 мг/кг спостерігали зміщення кривих насичення гемоглобіну киснем вправо за різних значень парціального тиску, проте найсуттєвіший зсув вправо спостерігали у групі Д4 на останню добу спостережень. При застосуванні ХПФ дозою 50 мг/кг відзначали аналогічний характер змін, проте вірогідні зміни коефіцієнта Гілла без змін значень P_{75} , та P_{90} . При застосуванні ХПФ дозою 70 мг/кг спостерігали зниження спорідненості гемоглобіну до кисню лише за значень P_{75} , та P_{90} у групах Д2 та Д4. За введення ХПФ дозою 90мг/кг спостерігали зниження показника P_{75} у групі Д3 порівняно з групою Д1. У процесі оксигенації гемоглобіну підтримується баланс між розслабленим і напруженим станами молекули гемопротеїну, які відмінні за ступенем спорідненості до кисню. На забезпечення цієї рівноваги впливають як природа ліганда, котрий зв'язується із гемоглобіном, так і відповідні метаболіти. Здійснення дихальної функції крові полягає у перенесенні гемоглобіном клітин необхідного для організму об'єму молекулярного кисню. Для забезпечення нормального рівня оксигенації тканин тиск O_2 в судинах має бути достатнім для вивільнення O_2 та його дифузії в тканини. При зниженні тиску pO_2 в судинах до певного рівня можуть виникати гіпоксичні явища.

Завдяки специфічним реакціям гліколізу, які відбуваються в еритроцитах, синтезується 2,3-дифосфогліцерат, який є важливим чинником, що впливає на спорідненість гемоглобіну до кисню (особливо при

зниженні pO_2 у крові, зокрема при гіпоксії). Вміст 2-3-дифосфогліцерату зростає в еритроцитах у відповідь на дефіцит кисню [26, 27, 122]. Інша важлива функція Оксигену пов'язана з електронакцепторною реакцією у дихальному ланцюгу мітохондрій, в якій задіяна цитохромоксидаза. За нормальних фізіологічних умов цитохромоксидаза поступово окислює 4 молекули цитохрому-С і за рахунок 4-х електронів відновлює O_2 до H_2O . У процесі відновлення O_2 4 протони H^+ захоплюються з мітохондріального матриксу і використовуються для утворення двох молекул H_2O , а 4 утворені протони H^+ переміщуються через мембрану. Завдяки цій реакції забезпечується підтримка електрохімічного градієнта, що є необхідним елементом для окисного фосфорилування, регуляції активності дихального ланцюга і синтезу енергії клітинами еукаріотів [7, 278]. За виникнення гіпоксичного стану вказаний перебіг реакцій порушується. У випадку порушення енергетичних процесів, пов'язаних із неповним відновленням Оксигену, можуть утворюватися високореактивні АФО або їхні попередники. Утворені сполуки можуть модифікувати мембранну структуру еритроцита, порушуючи їхню структурну організацію та функціональний стан.

У проведених серіях досліджень кисень-транспортної функції гемоглобіну спостерігається схожий характер змін, а саме зміщення кривих оксигенації вправо за дії ХПФ. При цьому найбільш чіткий характер змін спорідненості гемоглобіну до кисню спостерігається при хронічній інтоксикації, тоді як при зменшенні тривалості експозиції зміни стають менш чіткими.

Проведені нами дослідження показали, що за обраних схем досліджень хлорпірифосна інтоксикація може мати різнонаправлений характер змін показників антиоксидантної системи еритроцитів. Водночас отруєння ХПФ супроводжується зниженням резистентності еритроцитів до гемолізу і зменшенням спорідненості гемоглобіну еритроців щурів до кисню. За умов корекції вітамінами А та Е відбувалась нормалізація окремих показників

системи антиоксидантного захисту та вмісту окремих формених елементів циркулюючої крові і резистентності мембран еритроцитів до кислотного гемолізу.

Узагальнена гіпотетична схема моделі гематотоксичної дії ХПФ представлена на рис. 4.1. Аналіз результатів досліджень показав, що введення щурам обраних доз ХПФ супроводжується зниженням активності ХЕ, що підтверджує виникнення інтоксикації цієї сполукою у тварин.

Встановлено, що виникнення прооксидантно-антиоксидантних порушень в еритроцитах щурів супроводжувалось зниженням вмісту глутатіону відновленого та зростанням інтенсивності процесів ПОЛ підтвердженням чого може виступати зростання вмісту ТБК-активних продуктів та гідропероксидів ліпідів. Натомість виявлений у різних серіях досліджень та за дії різних доз ХПФ різнонапрямлений характер змін активностей ензимів системи антиоксидантного захисту еритроцитів ймовірно зумовлений силою та інтенсивністю оксидативного стресу. Показано, що за дії комплексу вітамів А та Е відбувається нормалізація до контрольного рівня активностей окремих ензимів системи антиоксидантного захисту еритроцитів.

Водночас дослідження кількості формених елементів показали, що інтоксикація ХПФ супроводжувалась змінами компонентного складу крові. Зокрема, інтоксикація ХПФ дозою 30 мг/кг супроводжувалась зниженням кількості еритроцитів на 1 добу експерименту; інтоксикація ХПФ дозою 50 мг/кг спричиняла зростання кількості еритроцитів, лейкоцитів, гранулоцитів з подальшою нормалізацією цих показників до контрольного рівня через 30, 45, 60 хв після інтоксикації.

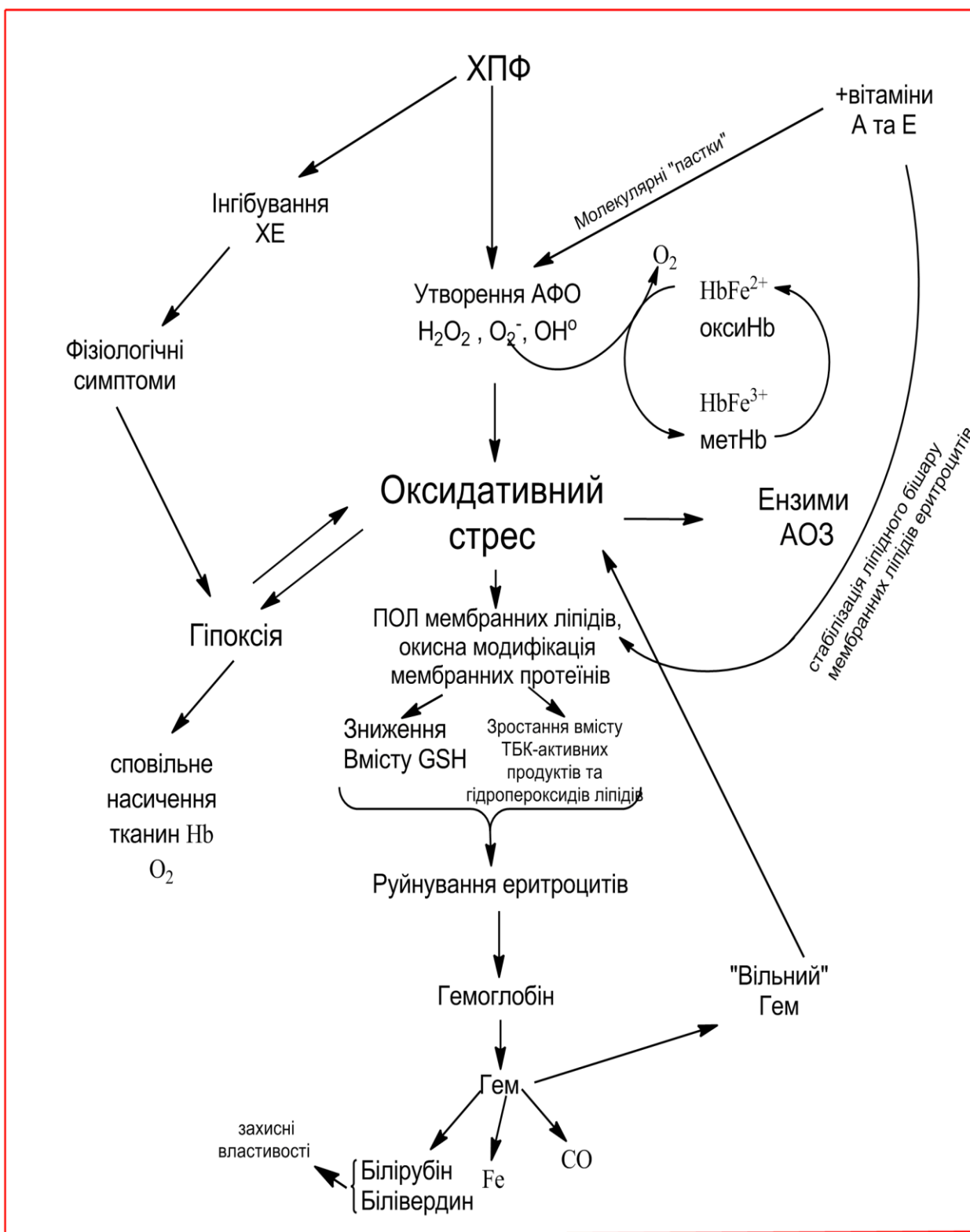


Рис. 4.1. Узагальнена гіпотетична схема моделі гематотоксичної дії ХПФ

Введення комплексу вітамінів А та Е після інтоксикації ХПФ дозою 70 мг/кг спричинило нормалізацію кількості еритроцитів до рівня контрольних значень. Аналогічний характер змін було виявлено і за

щоденного введення ХПФ впродовж 5 діб. За дії ХПФ виявлено зменшення резистентності еритроцитів щурів до кислотного гемолізу та зміни показників насичення гемоглобіну O_2 , що може бути підтвердженням цитотоксичних ефектів цієї сполуки на еритроцити. Отримані результати застосування комплексу вітамінів А та Е показують, що обрані дози і кратність введення вітамінних препаратів спричинять нормалізуючий ефект на окремі гематологічні та біохімічні показники крові щурів.

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 у крові 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 самотійної 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 характеризувалось зниженням активності супероксиддисмутази, глутатіонпероксидази, глутатіонредуктази на тлі зростання активності глутатіон-S-трансферази за дії хлорпірифосу дозою 30 мг/кг; зниженням 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. Інтотоксикація 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 окиснення 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. Інтотоксикація 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. Інтотоксикація щурів хлорпірифосом дозою 90 мг/кг на тлі 5-добового введення комплексу вітамінів А та Е супроводжувалась зниженням в еритроцитах каталазної (на 33 %) та супероксидисмутазної (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 %, зниженні 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-добовим введенням цього комплексу.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Антоняк Г. Л., Білецька Л. П. Вплив альфа-токоферолу на процеси пероксидного окиснення ліпідів та стан антиоксидантної системи в лейкоцитах тварин за умов введення хлориду кадмію. Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. 2010. Т. 3, № 51. С. 21–24.
2. Барабой В. А., Суткова Д. А. Окислительно-антиоксидантный гомеостаз в норме и патологии. К. Наукова думка, 1997. 420 с.
3. Барабой В.А. Биоантиоксиданты. К., Книга плюс, 2006. 462 с.
4. Бєлінчев І. Ф., Левицький Е. Л., Гонський Ю. І. Антиоксидантна система захисту організму. Сучасні проблеми токсикології. 2002. №3, С. 5–17.
5. Білий О. І., Дудок К. П., Лук'янець В. М. Визначення вмісту гемоглобіну та його лігандних форм у цільній крові за методом абсорбційної спектроскопії. Львів: Вид-во ЛДУ, 1998. 12 с.
6. Бресткин А. П., Кузнецова А. П. . Холинэстеразы наземных животных и гидробионтов. Владивосток: Высшая школа, 1997. 15 с.
7. Васильева Е. М. Биохимические особенности эритроцита. Влияние патологии. Биомед. химия, 2005. Т. 51, № 2, С. 118–126.
8. Владимиров Ю. А., Азизова О. А., Деев А. И. Свободные радикалы в живых системах. Итоги науки и техники. Москва.: Медицина 1991. Т.1. С. 91–95.
9. Владимиров Ю. А. Свободные радикалы в биологических системах. Соросовский обзорный журнал, 2000. Т. 6, № 12. С. 13–19.
10. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М.: 1972. 252 с.
11. Влізло В. В., Салига Ю. Т. Проблеми біологічної безпеки застосування пестицидів в Україні. Вісн. аграрної науки, 2011. № 1, С. 24–27.
12. Влізло В. В., Федорук Р. С., Ратич І. Б., Віщур О. І., Шаран М. М., Вудмаска І. В., Федорович, Є. І. Лабораторні методи досліджень у біології, тваринництві та ветеринарній медицині: довідник. Львів: Сполом. 2012. 764 с.

13. Влізло В. В., Максимович І. А., Галяс В. Л., Леньо М. І. Лабораторна діагностика у ветеринарній медицині: довідник. Львів. 2008. 92 с.
14. Войтенко Н. Г. Гемостаз и эстеразная активность крови крыс при интоксикации фосфорорганическими отравляющими веществами: автореф. дис. на соиск. учен. степени канд. биол. наук. Пушино. 2010. 23 с.
15. Гаврилов В. Б., Мишкорудная М. И. Спектрофотометрическое определение содержания гидроперекисей липидов в плазме крови. Лаб. дело, 1983. Т. 3. С. 33–36.
16. Гаврилюк С. О., Чекман І. С., Гончакова Н. О. Роль оксидативного стресу в патогенезі атеросклерозу та ішемічної хвороби серця. Укр. біохім. журн., 2005. Т. 77, № 6. С. 16–23.
17. Гительзон И. И., Терсков И. А. Эритрограммы как метод клинического исследования крови. Красноярск: Издательство Сибирского отделения Академии наук СССР. 1959. С. 247
18. Грабовська С. В., Салига Ю. Т. Вплив хронічної інтоксикації низькими дозами хлорпірифосу на поведінку самиць щурів. Фізіологічний журнал, 2015. Т. 61, № 2. С. 94–101.
19. Данилович Ю. В. Взаимосвязь образования NO та H₂O₂ и их роль в регуляции ионного гомеостаза клеток. Укр. біохім. журн., 2001. Т. 73, № 3. С. 5–18.
20. Дзюбенко Н. В., Кузнєцова Г. М., Линчак О. В., Рибальченко В. К. Токсикологічні дослідження пестицидів в Україні: необхідність уніфікації з міжнародними нормами. Збірник наукових праць II Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю «Екологічні проблеми природокористування та охорона навколишнього середовища» 2015. С. 60–61.
21. Дубинина Е. Е. Биологическая роль супероксидного анион-радикала и СОД в тканях организма. Успехи современ. Биологии, 1989. Т. 108, № 1 (4). С. 71–81.

22. Дубинина Е. Е. Антиоксидантная система плазмы крови. Укр. биохим. журн., 1992. Т. 64, № 2. С. 3–15.
23. Дубинина Е. Е. Некоторые особенности функционирования ферментативной антиоксидантной защиты плазмы человека. Биохимия, 1993. Т. 58, № 2. С. 268–273.
24. Дубинина Е. Е. Сальникова Л. Я., Ефимова Л. Ф. Активность и изоферментный спектр СОД эритроцитов. Лаб. дело, 1983. № 10, С. 30–33.
25. Дубініна О. Ю. Окислювальний стрес і окислювальна модифікація білків. Медична хімія, 2001. Т. 3. № 2, С. 5–12.
26. Дудок К. П., Федорович А. М., Дудок Т. Г., Речицький О. Н. Сресько В. А., Шкаволяк А. В., Сибірна Н. О. Вплив спірокарбону та похідних піролопіримідиндіонів на фізико-хімічні характеристики лігандних форм гемоглобіну *in vitro*. Біологічні студії/Studia biologica, 2009. Т. 3, № 2. С. 23–34.
27. Дудок К., Канюка О., Федорович А., Бурда В. NO-залежна зміна співвідношення лігандних форм гемоглобіну у периферичній крові людей. Вісник Львівського університету. Серія біологічна. 2016. Випуск 73. С. 130–136.
28. Дудок К., Старикович Л., Речицький О., Шкаволяк А., Сибірна Н. Роль похідних піролопіримідиндіонів у регуляції фізико-хімічних характеристик гемоглобіну й активності окремих ферментів антиоксидантного захисту крові людей *in vitro*. Вісник Львівського університету. Серія біологічна, 2012. Т. 60. С. 126–136.
29. Запорожец Т. С., Иванушко Л. А., Гажа А. К, Михеев Е. В., Ковалев Н. Н. Влияние фосфорорганических соединений на факторы врожденного иммунитета мышей. Биомедицина, 2013. № 1. С. 36–47.
30. Иванов Ю. Г. Модификация спектрофотометрического метода определения кислородно- диссоциационных кривых гемоглобина. Бюл. эксп. биол. и медицины. 1975. № 11. С. 122–125.
31. Каган Ю. С., Кокшарева Н. В., Жминько П. Г. Блокаторы холинэстеразы. М.: Медицина. 2002. С. 176–227.

32. Калиман П. А., Баранник Т. В. Метаболизм гема и оксидативный стресс. *Укр.биохим.журн* 2001. Т. 23, № 1. С. 5–15.
33. Карпищенко А. И. Медицинские лабораторные технологии. С.-П.: Интермедика. 2002. № 1. С. 45–46.
34. Кожем'якін Ю. М., Хромов О. С., Філоненко М. А. Науково-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними. К.: Авіцена, 2002. 156 с.
35. Колесова О. Е., Маркин А. А., Федорова Т. Н. Перекисное окисление липидов и методы определения продуктов липопероксидации в биологических средах. *Лаб. дело*, 1984. № 9. С. 540–546.
36. Колісник М., Колісник Г., Нідзюлка Є., Влізло В. Активні форми кисню та їх роль у метаболізмі клітин. *Біологія тварин*, 2009. Т. 11, № (1–2). С. 59–70.
37. Коробейникова Э. Н. Модификация определения продуктов перекисного окисления липидов в реакции с тиобарбитуровой кислотой. *Лаб. дело*, 1989. № 7. С. 89.
38. Королюк М. А., Иванова Л. И., Майорова, И. Г., Токарев, В. Е. Метод определения активности каталазы. *Лабораторное дело*, 1988. № 1. С. 16–19.
39. Косовер Н., Косовер Э. Глутатион-дисульфидная система. Свободные радикалы в биологии. М.: Мир, 1979. № 2. С. 65–95.
40. Кулинский В. И., Колесниченко Л. С. Структура, свойства, биологическая роль и регуляция глутатионпероксидазы. *Успехи совр. Биол.*, 1993. Т. 113, № 1. С. 107–121.
41. Кулинский В. И., Колесниченко Л. С. Биологическая роль глутатиона. *Успехи соврем. биологии*, 1990. Т. 110, № 1. С. 45–47.
42. Кундиев Ю. И., Трахтенберг И. М. Химическая безопасность в Украине. К.: Авиценна. 2007. 71 с.
43. Курляндский Б., Филлов В. Общая токсикология. М: Медицина. 2002. 608 с.

44. Краснокутский С.В. Шапоренко С.В. Витамин Е в профилактике и лечении состояний, связанных с активацией перекисного окисления липидов. *Кровообращение и гемостаз*. 2010. V. 1(2)., С .110-114.
45. Куценко С. А. Основы токсикологии / [Электронный ресурс] — Санкт-Петербург. 2002. 395 с.
46. Марудян Х. К., Утко Н. А., Мозжухина Т. Г. Каталаза и глутатионпероксидаза: качественно различная корреляция со скоростью потребления кислорода. *Укр. биох. журн*, 2004 Т. 76. № 3, С. 36–41.
47. Методологические указания по гигиенической оценке новых пестицидов. К.: 1988. 206 с.
48. Мецишин І. Ф., Григор'єва Н. П. Глутатионові система організму за норми та патології. *Укр. біохім. журн*, 2002. Т. 74, № 4а (д. 1). С.103–106.
49. Моин В. М. Простой и специфический метод определения активности глутатионпероксидазы в эритроцитах. *Лабораторное дело*, 1984. № 12. С. 724–727.
50. Нагиев Э. Р., Газимагомедова М. М. Структурно-функциональное состояние мембран эритроцитов при остром отравлении метафосом и введении перфторана. *Биомедицинская химия*. 2003. Т. 49, № 2. С. 138–144.
51. Поберезкина Н. Б., Осинская Л. Ф. Биологическая роль супероксид дисмутаза. *Укр. біохім. журн.*, 1989. Т. 61, № 2. С. 14–27.
52. Проданчук М. Г., Жминько П. Г, Недопитанська Н. М. Основні проблеми токсикології пестицидів і агрохімікатів та їх регламентації в об'єктах навколишнього середовища. *Журн. АМН. України*, 2005. Т. 11, № 4. С. 753–774.
53. Ребров В. Г. Громова О. А. Витамины и микроэлементы. М.: Алев. 2003. 648 с.
54. 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.
55. 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.

56. Росаловський В. П., Грабовська С. В., Федяков Р. О., Салига Ю. Т. Механізм нейротоксичності фосфорорганічних сполук: роль оксидативного стресу. Біорізноманіття. Екологія. Адаптація. Еволюція: VI міжнар. конф. мол. вч. присв. 150-річчю В. І. Липського, 13-17 травня 2013 р.: Матеріали конф. Одеса, С. 189.

57. 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.

58. Росаловський В. П., Салига Ю. Т. Стан системи антиоксидантного захисту та пероксидного окиснення ліпідів у крові та головному мозку щурів за інтоксикації хлорпірифосом. Український біохімічний журнал, 2014. Т. 86, № 5. С. 199–200.

59. Росаловський В. П. Кисень-транспортна функція гемоглобіну щурів за гострої і хронічної інтоксикації хлорпірифосом у різних у дозах. Біологічні Студії/ Studia Biologica. 2017. Т. 11. №1. С. 51-58.

60. Салига Ю. Т. Вплив хлорпірифосу на глутатіонову систему та вміст продуктів пероксидного окиснення ліпідів у різних органах щурів. Біологія тварин, 2013. Т. 15, № 2. С. 122–130.

61. Салига Ю., Росаловський В., Федяков Р. (2012). Глутатіонова система еритроцитів щурів, інтоксикованих хлорпірифосом. *Вісник Львівського університету. Серія біологічна*. 60. 99–104.

62. 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.

63. Салига Ю. Т., Росаловський В. П., Грабовська С. В. Механізми токсичного впливу хлорпірифосу на центральну нервову систему щурів. Матеріали II конгресу українського товариства нейронаук. Київ, Україна. 2014. С. 106.

64. Салига Ю. Т. Показники антиоксидантної системи у головному мозку щурів, інтоксикованих хлорпірифосом. Біологічні студії/Studia biologica 2013. Т. 7. № 3. С. 85-96.

65. 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.

66. Салига Ю. Т., Росаловський В. П., Грабовська С. В. Багатовекторність нейротоксичної дії хлорпірифосу. Фізіологічний журнал, 2014. Т. 60, № 3. С. 49–50.

67. Салига Ю.Т. Росаловський В. П. Фізіолого-біохімічні особливості нейротоксичної дії антихолінестеразних сполук хлорпірифосу і карбофурану. Ю. Т. Салига, Психофізіологічні та вісцеральні функції в нормі і патології: 2012. VI міжнар. наук. конф., 9-11 жовтня 2012 р.: тези доп. Київ. С. 190.

68. Салига Ю. Т. Федяков Р. О., Росаловський В. П., Грабовська С. В. Біологічна безпека застосування фосфорорганічних пестицидів в Україні: чи всі ризики враховані? Стратегія збалансованого розвитку агроєкосистем України: міжнар. наук.-практ. конф., 28 березня 2013 р.: Київ, Матеріали доп. Київ. 2013. С. 140–141.

69. Салига Н. О. Активність глутатіонової системи антиоксидантного захисту в щурів за дії L-глутамінової кислоти. Український біохімічний журнал, 2013. Т. 85, № 4. С. 40–47.

70. Салига Ю. Т., Росаловський В. П., Грабовська С. В. Нейротоксичність фосфорорганічних пестицидів: екологічні та медико-біологічні аспекти. Збірник наукових статей IV-го Всеукраїнського з'їзду екологів з міжнародною участю «Екологія-2013». Вінниця. С. 413–415.

71. Серединська Н. М. Токсикодинаміка антихолінестеразних речовин та роль холінергічної системи в опосередкованій кардіотоксичній дії ФОС. Современные проблемы токсикологии. 2010. Т. 2, № 3. С. 5–13.

72. Сибірна Н. О., Люта М. Я., Климишин Н. І. Молекулярні механізми депонування оксиду азоту в еритроцитах. Біологічні студії / *Studia Biologica* 2010. Т. 4, № 1. С. 143–160.

73. Сибірна Н. О., Маєвська О. М., Барська М. Л. Дослідження окремих біохімічних показників за умов оксидативного стресу. Львів: Видавничий центр ЛНУ ім. І. Франка. 2006. 60 с.

74. Сибірна Н., Барська М., Грищук І. Морфофункціональна характеристика імунотропних клітин за умов цукрового діабету І типу. Вісн. Львів.ун-ту, 2004. № 35. С. 77–83.

75. Сибірна, Н. О. Великий, М. М. Цитологічні та фізико-хімічні методи дослідження крові: Методичний посібник. Львів: Ред.-вид. відділ. Львів. ун-ту. 1997. 69 с.

76. Сидоров П. И. Методические рекомендации по выведению лабораторных животных из эксперимента. К. 1986. 24 с.

77. Список пестицидів та агрохімікатів, дозволених до використання в Україні: Витяг з «Переліку пестицидів та агрохімікатів, дозволених до використання в Україні». Карантин і захист рослин. 2007. № 2–3, С. 15–111.

78. Столяр О. Б., Грубіянко В. В., Зінківська Н. Г. Інтегральний показник антиоксидантно-прооксидантного стану організму як інструмент біомолекулярного моніторингу. Медична хімія. 2004. Т. 6, № 3. С. 66–68.

79. Столяр О. Б., О. І. Петренко, Коробов В. М. Молекулярні основи кисневої дисоціації оксигемоглобіну при дії рентгенівського опромінення у дозі 600 р. Вестник Львовского университета. 1975. С. 64-75.

80. Тимочко М. Ф., Єлісєєва О. П., Кобилінська Л. І., Тимочко І. Ф. Метаболічні аспекти формування кисневого гомеостазу в екстремальних станах. Львів. 1998. 142 с.

81. Ткачишин В. С. Інтоксикація фосфорорганічними сполуками. Острые и неотложные состояния в практике врача. 2007. № 5. С. 46–49.

82. Тимочко М. Ф. [и др.] Особенности кислородного баланса в экстремальных условиях. Нур. Мед. 1996. Т. 4, № 3., С. 8–12.

83. Хайбуллина З. Р., Вахидова Н. Т. Состояние периферической крови при острой гипоксии в эксперименте Медицина: вызовы сегодняшнего дня: Материалы междунар. заоч. науч. конф. Челябинск: Два комсомольца. 2012. С. 24–29.
84. Харченко О. А., Балан Г. М., Бабич В. А., Мымренко Т. В. Острые отравления пестицидами у работников сельского хозяйства Украины. Матер. междунар. конф. [“Гигиена, организация здравоохранения и профпатология”], (Новокузнецк, 23–24 мая 2012 г). Новокузнецк. С. 182–184.
85. Харченко О.А., Балан Г. М., Бубало Н. Н. Острые отравления фосфорорганическими соединениями: основные клинические синдромы и механизмы их формирования (Обзор литературы и данных собственных исследования). Сучасні проблеми токсикології. 2013. Т.1, № 2. С. 17–31.
86. Шуляк В. Г. Достижения в области изучения влияния пестицидов на систему кроветворения. Совр. пробл. Токсикологи. 2002. № 1. С. 52–57.
87. Abolaji A., Awogbindin I., Adedara I., Farombi E. Insecticide chlorpyrifos and fungicide carbendazim, common food contaminants mixture, induce hepatic, renal, and splenic oxidative damage in female rats. Human & Experimental Toxicology. 2016. Т. 36, № 5. P. 483–493.
88. Acker C.I., Nogueira C.W. Chlorpyrifos acute exposure induces hyperglycemia and hyperlipidemia in rats. Chemosphere. 2012. V. 89 (5). P. 602–608.
89. Agrawal, A. The effects of melatonin on brain injury in acute organophosphate toxicity. In: Brain Injury - pathogenesis, monitoring, recovery and management. 2012. P. 534.
90. Ahmad M., Khan A., Javed M., Hussain I. Impact of chlorpyrifos on health biomarkers of broiler chicks. Pestic Biochem Physiol. 2015. V. 122. P. 50–58.
91. Al-Awthan Y. S., Al-Douis M. A., El-Sokkary G. H., Aqlan E. M. Dimethoate-induced oxidative stress and morphological changes in the liver of guinea pig and the protective effect of Vitamin C and E. Asian Journal of Biological Sciences. 2012. V. 5 (1). P. 9–19.

92. Al-Baggou B. N., Naser A. S., Mohammad F. K. Hydrogen peroxide potentiates organophosphate toxicosis in chicks. *Human & Veterinary Medicine International Journal of the Bioflux Society*. 2011. V. 3 (2). P. 142–149.
93. Aly N., El-Gendy K., Mahmoud F. Protective effect of vitamin C against chlorpyrifos oxidative stress in male mice. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 2010. V. 97. P. 7–12.
94. Ali D., Nagpure N.S., Kumar S. Assessment of genotoxic and mutagenic effects of chlorpyrifos in freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch) using micronucleus assay and alkaline single-cell gel electrophoresis. *Food Chem Toxicol*. 2009. V. 47. №3. P. 650-656.
95. Amara I. Dimethoate-induced oxidative damage in erythrocytes of female adult rats: possible protective effect of vitamin E and selenium supplemented to diet. *Toxicology and Industrial Health*. 2011. V. 28 (3). P.222–237.
96. Ambali S. F., Ayo J. O, Ojo S. A., Esievo K. A. Vitamin E protects Wistar rats from chlorpyrifos-induced increase in erythrocyte osmotic fragility. *Food Chem. Toxicol*. 2010. V. 48 (12). P. 3477–80.
97. Ambali S. F., Akanbi D.O., Oladipo O.O., Yaqub L.S., Kawu M.U. Subchronic chlorpyrifos-induced clinical, hematological and biochemical changes in Swiss albino mice: Protective effect of vitamin E. *Int. J. Bio. Med. Res*. V. 2, № 2, P. 497-503.
98. Ambali S., Abubakar A., Shittu M. Chlorpyrifos-induced alteration of hematological parameters in Wistar rats: ameliorative effect of zinc. *Res. J. of Envirom. Toxicol*. 2010. V. 4 (2). P. 55–66.
99. Ambali S., Akanbi D., Igbokwe N., Shittu M., [et al.] Evaluation of subchronic chlorpyrifos poisoning on hematological and serum biochemical changes in mice and protective effect of vitamin C. *Journal of toxicol sciences*. 2007. V. 32. P. 111–120.

100. Ambali S. F., Ayo J. O., Esievo K. A., Ojo S. A. Hemotoxicity induced by chronic chlorpyrifos exposure in Wistar rats: mitigating effect of vitamin C. *Veterinary Medicine International*. 2011. P. 1–7.
101. Arukwe A., Carteny C., Eggen, T. Lipid peroxidation and oxidative stress responses in juvenile salmon exposed to waterborne levels of the organophosphate compounds tris (2-butoxyethyl)- and tris (2-chloroethyl) phosphates. *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A*. 2016. V. 13 (15). P. 515–525.
102. Attademo A., Peltzer P., Lajmanovich R., Cabagna M. Plasma B-esterase and glutathione S-transferase activity in the toad *Chaunus schneideri* (Amphibia, Anura) inhabiting rice agroecosystems of Argentina. *Ecotoxicology*. 2007. V. 16 (8). P. 533–539.
103. Balali-Mood, M., Saber, H. Recent advances in the treatment of organophosphorous poisonings. *Iran J Med Sci*. 2012. V. 37 (2). P. 74–91.
104. Banerjee B., Seth V., Ahmed R. Pesticides induced oxidative stress: perspectives and trends. *Rev. Environment. Health*. 2001. V. 16. P. 1–40.
105. Bass H., Kalender Y. Chlorpyrifos induced cardiotoxicity in rats and the protective role of quercetin and catechin. *GUJS*. 2011. V. 24 (3). P. 387–395.
106. Begum S., Upadhyaya T., Rahman T., Pathak C. Hematobiochemical and pathological alterations due to chronic chlorpyrifos intoxication in indigenous chicken. *Indian J Pharmacol*. 2015. V. 47 (2). P. 206–211.
107. Ben Salem I., Boussabbeh M., Graiet I., Rhouma A. [et al.]. Quercetin protects HCT116 cells from Dichlorvos-induced oxidative stress and apoptosis. *Cell Stress and Chaperones*, 2015. V. 21 (1). P. 179–186.
108. Boussabbeh M., Ben Salem I., Hamdi M., Ben Fradj S. [et al.] Diazinon, an organophosphate pesticide, induces oxidative stress and genotoxicity in cells deriving from large intestine. *Environmental Science and Pollution Research*, 2015. V. 23 (3). P. 2882–2889.
109. Cacciatore L. C., Nemirovsky S. I., Guerrero N. R., Cochon A. C. Azinphosmethul and chlorpyrifos, alone or in a binary mixture, produce oxidative

stress and lipid peroxidation in the freshwater gastropod. *Planorbarius corneus*. *Aquat. Toxicol.* 2015. V. 167. P. 12–19.

110. Carlberg I. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *J. Biol. Chem.* 1975. V. 250, P. 5475–5480.

111. Caughlan A., Newhouse K., Namgung U., Xia Z. Chlorpyrifos induces apoptosis in rat cortical neurons that is regulated by a balance between p38 and ERK/JNK MAP kinases. *Toxicol. Sci.* 2004. V. 78 (1). P. 125–134.

112. Celik G., Yöntem M., Bilge M. The Relationship between the antioxidant system and anaemia in haemodialysis patients. *J. Int. Med. Res.* 2011. V. 39 (5). P. 1954–1960.

113. Celik I., Yilmaz Z., Turkoglu V. Hematotoxic and hepatotoxic effects of dichlorvos at sublethal dosages in rats. *J. Environ. Toxicol.* 2009. V. 24. P. 128–132.

114. Cemek M., Buyukokuroglu M. E., Buuyukben A., Aymelek F. Effects of vitamin E and selenium on tissue bio-element status in organophosphate toxicity of rats. *Pesticide Biochemistry and Physiology.* 2010. V. 98 (1). P. 9–18.

115. Chelikani P., Fita I., Loewen P. Diversity of structures and properties among catalases. *Cell. Mol. Life Sci.* 2004. V. 61 (2). P. 192–208.

116. Chiapella G., Flores-Martin J., Ridano M., Reyna L. The organophosphate chlorpyrifos disturbs redox balance and triggers antioxidant defense mechanisms in JEG-3 cells. *Placenta.* 2013. V. 34 (9). P. 792–798.

117. Croom E., Wallace A., Hodgson E. Human variation in CYP-specific chlorpyrifos metabolism. *Toxicology.* 2010. V. 276. № 3 (29). P. 184–191.

118. Cinzia A., Baldracchini F., Piazzoli A., Frosini R. Activity changes of glyoxalase system enzymes and glutathione-S-transferase in the bivalve mollusk *Scapharca inaequivalvis* exposed to the organophosphate chlorpyrifos. *Pesticide Biochem. Physiol.* 2006. V. 86. P. 72–77.

119. Coban F. K., Ince S., Kucukkurt I., Demirel H. H. Boron attenuates malathion-induced oxidative stress and acetylcholinesterase inhibition in rats. *Drug and Chemical Toxicology.* 2014. V. 38 (4). P. 391–399. doi:10.3109/014

120. Costa L. G. Current issues in organophosphate toxicology. *Clinica Chimica Acta*. 2006. V. 366 (1). P. 1–13.
121. D'Souza U. J. Pesticide toxicity and oxidative stress: a review. *Borneo Journal of Medical Sciences*. 2017. V. 11 (1). P. 9–19.
122. Dash R. K., Bassingthwaite J. B. Blood HbO₂ and HbCO₂ dissociation curves at varied O₂, CO₂, pH, 2, 3-DPG and temperature levels. *Ann. Biomed. Eng.* 2010. V. 38 (4). P. 1683–1701.
123. De Felice A., Greco A., Calamandrei G., Minghetti, L. Prenatal exposure to the organophosphate insecticide chlorpyrifos enhances brain oxidative stress and prostaglandin E₂ synthesis in a mouse model of idiopathic autism. *Journal of Neuroinflammation*. 2016. V. 13(1). P. 149. doi:10.1186/s12974-016-0617-4
124. Deeba F., Raza I., Muhammad N., Rahman H. Chlorpyrifos and lambda cyhalothrin-induced oxidative stress in human erythrocytes. *Toxicol Ind Health*. V. 33 (4). P. 297–307.
125. Delfino R. T., Ribeiro T. S., Figueroa-Villar, J. D. Organophosphorus compounds as chemical warfare agents: a review. *J. Braz. Chem. Soc.* 2009. V. 20. P. 407–428.
126. Demir F., Uzun F. G., Durak D., Kalender Y. Subacute chlorpyrifos-induced oxidative stress in rat erythrocytes and the protective effects of catechin and quercetin. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 2011. V. 99 (1). P. 77–81.
127. Dimov D., Hadjiolova R., Kanev K., Tomova R., Michova A., Todorov T., Dimova I. Cardiac and renal nitrosative-oxidative stress after acute poisoning by a nerve agent Tabun. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*. 2015. V. 50 (8). P. 824–829.
128. Dominah G., McMinimy R., Kallon S., Kwakye G. Acute exposure to chlorpyrifos caused NADPH oxidase mediated oxidative stress and neurotoxicity in a striatal cell model of Huntington's disease. *Neurotoxicology*. 2017. V. 60. P. 54–69.
129. Durak D., Kalender Y., Kaya S., Uzun F., Demir F. Protective effects of catechin and quercetin on antioxidant status, lipid peroxidation and testis-

histoarchitecture induced by chlorpyrifos in male rats. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2012. V. 33. № 2., P. 141-148.

130. Durak D., Uzun F., Kalender S., Ogutcu A. [et al.] Malathion-induced oxidative stress in human erythrocytes and the protective effect of vitamins C and E in vitro. *Environmental Toxicology.* 2009. V. 24 (3), P. 235–242.

131. Eaton D. L., Daroff R. B., Autrup H., Bridges J. Review of the toxicology of chlorpyrifos with an emphasis on human exposure and neurodevelopment. *Critical Reviews in Toxicology.* 2008. V. 38 (sup2). P. 1–125.

132. Elahi M. M., Kong Y. X. Oxidative stress as a mediator of cardiovascular disease. *Matata Oxid. Med. Cell. Longev.* 2009. V. 2. P. 259–269.

133. El-Demerdash F. M. Oxidative stress and hepatotoxicity induced by synthetic pyrethroids-organophosphate insecticides mixture in rat. *Journal of Environmental Science and Health, Part C.* 2011. V. 29 (2). P. 145-158.

134. El-Demerdash F. M. Lipid peroxidation, oxidative stress and acetylcholinesterase in rat brain exposed to organophosphate and pyrethroid insecticides. *Food and Chemical Toxicology.* 2011. V. 49 (6). P. 1346–1352.

135. Elsharkawya E. E., Yahiaa D. A., El-Nisrb N. A. Sub-chronic exposure to chlorpyrifos induces haematological, metabolic disorders and oxidative stress in rat: Attenuation by glutathione. *Env. toxic. and pharm.* 2013. V. 35. P. 218–227.

136. El-Shenawy N. S., El-Salmy F., Al-Eisa R. A., El-Ahmary B. Amelioratory effect of vitamin E on organophosphorus insecticide diazinon-induced oxidative stress in mice liver. *Pesticide Biochemistry and Physiology,* 2010. V. 96 (2). P. 101–107.

137. Eroglu S., Pandir D., Uzun F. G., Bas H. Protective role of vitamins C and E in diclorvos-induced oxidative stress in human erythrocytes in vitro. *Biological Research.* 2013. V. 46 (1). P. 33–38.

138. European convention for the protection of vertebrate animals use for experimental and other scientific purposes. Council of Europe. Strasbourg. 1986 P. 56.

139. Eyer F., Roberts D. M., Buckley N. A., Eddleston M., Thiermann H., Worek F., Eyer P. Extreme variability in the formation of chlorpyrifos oxon (CPO) in

patients poisoned by chlorpyrifos (CPF). *Biochemical Pharmacology*. 2009. V. 78, (5). P. 531–537.

140. Eyer F., Heilmair R., Eyer P. Enzyme-based assay for quantification of chlorpyrifos oxon in human plasma. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2016. № 5, P. 4859–4867.

141. Ezzi L., Belhadj Salah I., Haouas Z., Sakly A. [et al.] Histopathological and genotoxic effects of chlorpyrifos in rats. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int*. 2016. V. 23 (5). P. 4859–4867.

142. Fakhri-Bafghi M., Ghasemi-Niri S., Mostafalou S., Navaei-Nigjeh M. Protective effect of selenium-based medicines on toxicity of three common organophosphorus compounds in human erythrocytes in vitro. *Cell J*. 2016. V. 17. (4). P. 740–747.

143. Farag A. T., Radwan A. H., Sorour F., El Okazy A., [et al.] Chlorpyrifos induced reproductive toxicity in male mice. *Reproductive Toxicology*, 2010. V. 29 (1). P. 80–85.

144. Fattman C. L., Schaefer L. M., Oury T. D. Extracellular superoxide dismutase in biology and medicine. *Free Radic. Biol. Med*. 2003. V. 35 (3). P. 236–256.

145. Ferdinand N., Herman N., Bebe N., Augustave K., Valence M., Ghislaine N., Herve T. Antouka Super induced oxidative stress and reproductive toxicity in male japanese quail (*cotumix cotumix japonica*). *Heliyon*. 2017. V. 3. P. 1–19.

146. Ferents I. V., Brodyak I. V., Lyuta M. Ya. Effects of agmatine treatment on morphofunctional characteristics of the erythron in experimental in experimental diabetes mellitus in rats. *Fiziol. Zh*. 2014. V. 60 (4). P. 70–79.

147. Fibach E., Rachmilewitz E. The role of oxidative stress in hemolytic anemia. *Curr Mol Med*. 2008. V. 8 (7). P. 609–619.

148. Flores D., Souza V., Betancourt M., Teteltitla M., [et al.] Oxidative stress as a damage mechanism in porcine cumulus-oocyte complexes exposed to malathion during in vitro maturation. *Environmental Toxicology*. 2017. V. 32 (6). P. 1669–1678.

149. Ghayomi F., Navaei-Nigjeh M., Baeri M., Rezvanfar M. et al. A mechanistic approach for modulation of chlorpyrifos-induced toxicity in human lymphocytes by melatonin, coenzyme Q10, and vinpocetine. *Hum Exp Toxicol.* 2016. V. 35 (8). P. 839–50.

150. Goel A., Dani V., Dwaram K. Role of zinc in mitigating the toxic effects of chlorpyrifos on hematological alterations and electron microscopic observations in rat blood. *Biometals.* 2006. V. 19 (5). P. 483–492.

151. Grabovska S., Rosalovsky V., Salyha Y. Neurotoxic effects and other actual risks of chlorpyrifos. In *Living organisms and bioanalytical approaches for detoxification and monitoring of toxic compounds.* 2015. P. 195–204.

152. Gupta R., Malik J., Milatovic D. Organophosphate and carbamate pesticides, in: *reproductive and developmental toxicology.* Burlington: Elsevier Academic Press. 2011. P. 976.

153. Habig W. H., Parst M. J., Jakoby W. B. Glutathione-S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 1974. V. 249 (22). P. 7130–7139.

154. Hargreaves A. J. Organophosphate-induced oxidative stress and neurotoxicity in reactive oxygen species in biology and human health. *CRC Press.* 2016. P. 487–499.

155. Hassani S. I., Sepand M. R., Jafari A. N. Protective effects of curcumin and vitamin E against chlorpyrifos-induced lung oxidative damage. *Hum Exp Toxicol.* 2015. V. 34 (6). P. 668–676.

156. Hayes J. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 1995. V. 30 (6). P. 445–600.

157. Hazarika R., Das S. Health hazard due to exposure of pesticide. *J. Epidemiol. and Community Health.* 2011. V. 1. P. 436–437.

158. Heinzelmann S., Bauer G. Multiple protective functions of catalase against intercellular apoptosis-inducing ROS signaling of human tumor cells. *Biol. Chem.* 2010. V. 391 (6). P. 675–693.

159. Hissin P. J., Hilf R. A. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Analyt. Biochem.* 1976. V. 74. P. 214–226.
160. Hseu Y., Hsu T., Lin, H., Chen C. H. Molecular mechanisms of disrotophos-induced toxicity in HepG2 cells: The role of CSA in oxidative stress. *Food and Chemical Toxicology.* 2017. V. 103. P. 253–260.
161. Ismail M., Ali R., Shahid M., Khan M. Genotoxic and hematological effects of chlorpyrifos exposure on fresh water fish *Labeo rohita*. *Drug Chem Toxicol.* 2018. V. 41 (1). P. 22–26.
162. Jablonska-Trypuc A. Pesticides as inducers of oxidative stress. *Reactive Oxygen Species.* 2017. V. 3 (8). P. 96–110.
163. Jansen E. H., Beekhof P. K., Viezeliene D., Muzakova V. [et al.] Long-term stability of oxidative stress biomarkers in human serum. *Free Radical Research,* 2017. P. 1–141.
164. Janssens, L., Stoks, R. Chlorpyrifos-induced oxidative damage is reduced under warming and predation risk: Explaining antagonistic interactions with a pesticide. *Environmental Pollution,* 2017. V. 226. P. 79.
165. Jin Y., Liu Z., Peng T., Fu Z. The toxicity of chlorpyrifos on the early life stage of zebrafish: a survey on the endpoints at development, locomotor behavior, oxidative stress and immunotoxicity. *Fish Shellfish Immunol.* 2015. V. 43 (2). P. 405–414.
166. Johansson K. Järvliden J., Gogvadze V. Multiple roles of microsomal glutathione transferase 1 in cellular protection: a mechanistic study. *Free Radic. Biol. Med.* 2010. V. 49 (11). P. 1638–1645.
167. John J., Gujar N., Prasad G., Bhattacharya R. Effect of N-acetylcysteine on time-dependent biochemical and oxidative changes after acute diisopropyl phosphorofluoridate poisoning in mice. *International Journal of Pharmacological Research.* 2017. V.7 (2). P. 43–54.
168. Jowzi N., Rahimifard M., Navaei-Nigjeh M., Baeri M. [et al.] Reduction of chlorpyrifos-induced toxicity in human lymphocytes by selected

phosphodiesterase inhibitors. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 2016. V. 128. P. 57–62.

169. Kaur R., Sandhu H. In vivo changes in antioxidant system and protective role of selenium in chlorpyrifos-induced subchronic toxicity in *bubalus bubalis*. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2008 V. 26 (1). P. 45–48.

170. Khaksar M. R., Rahimifard M., Baeeri M., Maqbool F., [et al.] Protective effects of cerium oxide and yttrium oxide nanoparticles on reduction of oxidative stress induced by sub-acute exposure to diazinon in the rat pancreas. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 2017. V. 41. P. 79–90.

171. Khalil A. M. Toxicological effects and oxidative stress responses in freshwater snail, *Lanistes carinatus*, following exposure to chlorpyrifos. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2015. V. 116:137–142.

172. Khokhar J. Y., Tyndale, R. F. Rat brain CYP2B-enzymatic activation of chlorpyrifos to the oxon mediates cholinergic neurotoxicity. *Toxicol Sci*. 2012. V. 126. №2 P. 325-35.

173. Kim R.O., Kim B.M., Jeong C.B., Lee J. S. et al. Effects of chlorpyrifos on life cycle parameters, cytochrome P 450S expression, and antioxidant systems in the monogonont rotifer *Brachionus koreanus*. *Environ Toxicol Chem*. 2016. V. 35 (6). P. 1449–57.

174. Kovacic P. Mechanism of organophosphates (nerve gases and pesticides) and antidotes: electron transfer and oxidative stress. *Current Medicinal Chemistry*. 2003. V.10 (24). P. 2705–2709.

175. Kovacic, P. Cardiovascular toxicity from the perspective of oxidative stress, electron transfer, and prevention by antioxidants. *Curr Vasc Pharmacol*. 2005, № 2 P. 107-17.

176. Kwong T. C. Organophosphate pesticides: biochemistry and clinical toxicology. *Ther. Drug Monit*. 2002. V. 24. P. 144–149.

177. Lahouel A., Kebieche M., Lakroun Z., Rouabhi R., [et al.] Neurobehavioral deficits and brain oxidative stress induced by chronic low dose

exposure of persistent organic pollutants mixture in adult female rat. *Environmental Science and Pollution Research*. 2016. V. 23 (19). P. 19030–19040.

178. Lazarevic-Pasti T., Nastasijevic B., Vasic V. Oxidation of chlorpyrifos, azinphos-methyl and phorate by myeloperoxidase. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 2011. V. 101, № 3. P. 220–226.

179. Lessenger J. E., Resse B. E. The patophysiology of acetylcholinesterase inhibiting pesticides. *Agromed*. 2000. V. 2. P. 5–19.

180. Li F., Li B., Wu J., Chang A. Transition from oxidative stress to nitrosative stress in rostral ventrolateral medulla underlies fatal intoxication induced by organophosphate mevinphos. *Toxicological Sciences*. 2013. V. 135 (1). P. 202–217.

181. Lopez-Granero C., Canadas F., Cardona D., Gimenez E., Chlorpyrifos diisopropylphosphorofluoridate-, and parathion-induced behavioral and oxidative stress effects: are they mediated by analogous mechanisms of action? *Toxicol Sci*. 2013. V. 131. P. 206–16.

182. Lowry, O. H. Rosebrough, N. J., Farr, A. L. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem*. 1951. V. 193 (1). P. 265–75.

183. Lu S. Regulation of glutathione synthesis. *Mol. Aspects Med*, 2009. V. 30 (1–2). P. 42–59.

184. Lu S., Li Y., Zhang T., Cai D., [et al.] Effect of E-waste recycling on urinary metabolites of organophosphate flame retardants and plasticizers and their association with oxidative stress. *Environmental Science & Technology*, 2017. V. 51 (4). P. 2427–2437.

185. Lukaszewicz-Hussain, A. Subchronic intoxication with chlorfenvinphos, an organophosphate insecticide, affects rat brain antioxidative enzymes and glutathione level. *Food and Chem. Tox*. 2008. V. 46 (1). P. 82–86.

186. Lushchak V. I. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology*. 2011. V. 101 (1). P. 13–30.

187. Lushchak V. I. Glutathione homeostasis and functions: potential targets for medical interventions. *J. Amino Acids*. 2012. P. 1–26.

188. Lushchak V. I., Gospodaryov D. V. Introductory chapter, in oxidative stress and diseases. InTech, 2012. P. 610.
189. Lushchak V. I., Gospodaryov D.V. Oxidative stress: cause and consequence of diseases, in oxidative stress and diseases. InTech, 2012. P. 610.
190. Lushchak, V. I. Adaptive response to oxidative stress: Bacteria, fungi, plants and animals. Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology CBP. 2011. V. 153 (2). P. 175–190.
191. Ma J., Liu Y., Niu D., Li X. Effects of chlorpyrifos on the transcription of CYP3A cDNA, activity of acetylcholinesterase, and oxidative stress response of goldfish (*Carassius auratus*). Environ Toxicol. 2014. V. 30 (4). P. 422–9.
192. Ma P., Wu Y., Zeng Q., Gan Y. et al. Oxidative damage induced by chlorpyrifos in the hepatic and renal tissue of Kunming mice and the antioxidant role of vitamin E. Food Chem. Toxicol. 2013. V. 58. P. 177–83.
193. Majmundar A. J., Wong W. J., Simon M. C. Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress. Mol. Cell. 2010. V. 40 (2). P. 294–309.
194. Malinin N. L., West X. Z., Byzova T. V. Oxidation as “the stress of life”. Aging. 2011. V. 3 (9). P. 906–910.
195. Mansour S. A., Mossa A.T. Adverse effects of exposure to low doses of chlorpyrifos in lactating rats. Toxicol. Ind. Health. 2011. V. 27 (3). P. 213–24.
196. Mansour S., Gamet-Payrastre L. Ameliorative effect of vitamin E to mouse dams and their pups following exposure of mothers to chlorpyrifos during gestation and lactation periods. Toxicol Ind Health. 2016. V. 32 (7). P. 1179–96.
197. Margis R., Dunand C., Teixeira F. K., Margis-Pinheiro M. Glutathione peroxidase family – an evolutionary overview. FEBS Journal. 2008. V. 275 (15). P. 3959–3970.
198. Mashali A. Role of oxidative stress and apoptosis in acute organophosphorus intoxicated patients. JMIR. 2005. V. 26 (3). P. 255–263.
199. Masoud A., Sandhir R. Increased oxidative stress is associated with the development of organophosphate-induced delayed neuropathy. Human & Experimental Toxicology. 2012. V 31 (12). P. 1214–1227. doi:10.1177/09603

200. Mehta A., Verma R., Srivastava N. Chlorpyrifos induced alterations in the levels of hydrogen peroxide, nitrate and nitrite in rat brain and liver. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 2009. V. 94 № 2 (3). P. 55–59.
201. Milatovic D., Gupta R. C., Aschner M. Anticholinesterase toxicity and oxidative stress. *The Scientific World Journal*. 2006. V. 6. P. 295–310.
202. Mishra B. P, Badade Z. G, Rastogi S. K, Singh S. Antioxidant status and oxidative stress in organophosphate pesticide poisoning. *IOSR Journal of Dental and Medical Sciences*, 2013. V. 7 (6). P.20–24. doi:10.9790/0853-0762024.
203. Mishra V., Sharma S., Khatri S., Srivastava N. Evaluation of genotoxicity of monocrotophos and quinalphos in rats and protective effects of melatonin. *Integrative Pharmacology, Toxicology and Genotoxicology*. 2015. V.1 (1). P.33–42.
204. Mosbah R., Yousef M., Maranghi F., Mantovani A. et al. Protective role of *Nigella sativa* oil against reproductive toxicity, hormonal alterations, and oxidative damage induced by chlorpyrifos in male rats. *Toxicol Ind Health*. 2016. V. 32 (7). P. 1266–1277.
205. Muhammad G., Rashid I., Firyal S. Practical aspects of Treatment of organophosphate and carbamate insecticide poisoning in animals. *Matrix Science Pharma (MSP)*. 2017. V. 1 (1). P. 10–11.
206. Narra M. R., Rajender K., Reddy R. R., Murty U. S. [et al.] Insecticides induced stress response and recuperation in fish: Biomarkers in blood and tissues related to oxidative damage. *Chemosphere*, 2017. V 168. P. 350–357. doi:10.1016/j.chemosphere.2016.10.066
207. Needham L. L. Assessing exposure to organophosphorus pesticides by biomonitoring in epidemiologic studies of birth outcomes. *Environ. Health Persp.* 2005. V. 113, № 4. P. 494–498.
208. Nishi K., Hundal S.S. Chlorpyrifos induced toxicity in reproductive organs of female Wistar rats. *Food Chem Toxicol*. 2013. V. 62. P. 732–738.
209. Noshay M., Saad-Hussein A., Shahy E., El-Shorbagy H. Assessment of anticholinesterase toxicity, oxidative stress and antioxidant status in carbamate and

organophosphorus pesticides - exposed agricultural workers. *International Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 2017. V 9 (3). P. 205–209.

210. Nurulain S., Szegi P., Tekes K., Naqv S. Antioxidants in organophosphorus compounds poisoning *Arh Hig Rada Toksikol*. 2013. V. 64. P.169–177.

211. Ogura S., Shimosawa T. Oxidative stress and organ damages. *Curr Hypertens Rep*. 2014. V. 16 (8). P. 452–457.

212. Ojha A., Srivastava N. Redox imbalance in rat tissues exposed with organophosphate pesticides and therapeutic potential of antioxidant vitamins. *Ecotoxicology and Environ. Safety* 2012. V. 75. P. 230–241.

213. Ojo O., Oyinloye B., Ajiboye B., Ojo A. Dichlorvos-induced oxidative stress in rat brain: protective effects of the ethanolic extract of *Alstonia boonei* stem bark. *Asian Journal of Pharmaceutics*. 2014. V.8 (4). P. 216.

214. Ola-Davies O. E., Oyagbemi A. A., Omobowale T. O. Concentration-dependent inhibition of acetylcholinesterase by organophosphate poisoning in dogs: a biochemical and electrocardiograph study. *Toxicology International (Formerly Indian Journal of Toxicology)*. 2016. V. 23 (1). P. 63–72.

215. Oruc E. Oxidative stress responses and recovery patterns in the liver of *Oreochromis niloticus* exposed to chlorpyrifos-ethyl. *Bull. Env. Contam. Toxicol*. 2012. V. 88. P. 678–684.

216. Ozkan F., Gunduz S., Berkoz M., Hunt A. et al. The protective role of ascorbic acid (vitamin C) against chlorpyrifos-induced oxidative stress in *Oreochromis niloticus*. *Fish Physiol Biochem*. 2012. V. 38 (3). P. 635–643.

217. Padilla S., Lassiter L., Crofton K. Blood cholinesterase activity: Inhibition as an indicator of adverse effect. In *Biomarkers for Agrochemicals and Toxic Substances*. Washington DC: American Chemical Society. 1996. P. 70–78.

218. Pakzad M., Fouladdel S., Nili-Ahmadabadi A., Pourkhalili N. Sublethal exposures of diazinon alters glucose homostasis in Wistar rats: Biochemical and molecular evidences of oxidative stress in adipose tissues. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 2013. V. 105 (1), P. 57–61.

219. Patetsini E., Dimitriadis V. K., Kaloyianni M. Biomarkers in marine mussels, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to environmentally relevant levels of the pesticides, chlorpyrifos and penoxsulam. *Aquat. Toxicol.* 2013. V.126. P. 338–345.

220. Pearson J., Patel M. The role of oxidative stress in organophosphate and nerve agent toxicity. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2016. V. 1378, № 1. P. 17-24.

221. Pearson M. Lu C., Barr D., Waller L. Dietary intake and its contribution to longitudinal organophosphorus pesticide exposure in urban/suburban children. *Environ Health Perspect.* 2008. V. 116. №4. P. 537–542.

222. Pena-Llopis S., Ferrando M., Pena J. B. Fish tolerance to organophosphate-induced oxidative stress is dependent on the glutathione metabolism and enhanced by N-acetylcysteine. *Aquatic Toxicology*. 2003. V. 65. № 4, P. 337–360.

223. Perutz M. F. Regulation of oxygen affinity of hemoglobin: influence of structure of the globin on the heme iron. *Ann. Rev. Biochem.* 1979. V. 48. P. 327–386.

224. Kapoor U., Srivastava M.K., Srivastava L.P. Toxicological impact of technical imidacloprid on ovarian morphology, hormones and antioxidant enzymes in female rats. *Food Chem Toxicol.* 2011. Vol. 49 (12) P. 3086-9

225. Pohanka, M., Romanek, J., Pikula, J. Acute poisoning with sarin causes alteration in oxidative homeostasis and biochemical markers in Wistar rats. *Journal of Applied Biomedicine*. 2012. V. 10 (4). P. 187–193.

226. Pope C. N. Organophosphorus pesticides: do they all have the same mechanism of toxicity?. *J. Tox. and Env. Health.* 1999. V. 2 (2). P. 161–180.

227. Prins J., Chao C., Jacobson S., Thompson C. Oxidative stress resulting from exposure of a human salivary gland cells to paraoxon: An in vitro model for organophosphate oral exposure. *Toxicology in Vitro*. 2014. V. 28 (5). P. 715–721.

228. Rafieian-Kopaei M., Baradaran A., Rafieian M. Oxidative stress and the paradoxical effects of antioxidants. *J. Res. Med. Sci.* 2013. V. 18. P. 629.

229. Rathod A. L., Garg R. K. Chlorpyrifos poisoning and its implications in human fatal cases: A forensic perspective with reference to Indian scenario. *Journal of forensic and legal medicine*. 2017. V. 47. P. 29–34.
230. Rauh V., Arunajadai S., Horton M., Perera F., Hoepner L. Seven-year neurodevelopmental scores and prenatal exposure to chlorpyrifos, a common agricultural pesticide. *Everyday Environmental Toxins*, 2015. P. 201–219. doi:10.1201/b18221-17.
231. Ray D. *Pollution and Health*. New Delhi: Wiley Eastern Ltd. New Delhi, 1992.
232. Rizvi S. I., Maurya P. K. Markers of oxidative stress in erythrocytes during aging in humans. *Ann. NY Acad. Sci.* 2007. V. 1100. P. 373–382.
233. Rodriguez-Fuentes G., Rubio-Escalante F., Norena-Barroso E., Escalante-Herrera K. Impacts of oxidative stress on acetylcholinesterase transcription, and activity in embryos of zebrafish (*Danio rerio*) following Chlorpyrifos exposure. *Comp Biochem Physiol. Toxicol Pharmacol.* 2015. V. 172–173. P. 19–25.
234. Rosalovsky V. P. Haematological indices of rats during the first hour after chlorpyrifos exposure. *Biol. Bulletin of B. Chm. Melit. State Ped. Univ.* 2015. V. 1. P. 123–132.
235. 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. *Studia Biologica*, 2015. V. 9. P. 57–68.
236. Rosalovsky V., Grabovska S., Salyha Y. 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.
237. Rosalovsky V., Salyha Y. New biochemical and physiological aspects of chlorpyrifos neurotoxicity. *Toxicology letters*. 2013. V. 221. P. 200.
238. Salyha Y. Biological effects assessment of chlorpyrifos and some aspects of its neurotoxicity. *Visnyk of Lviv University. Biology Series*. 2010. V. 54. P. 3–

14.

239. Salyha Y. Toxic effect of chlorpyrifos on hippocampal neurons in vitro. *The Animal biology*, 2010, V. 12 (1). P. 163–168.

240. Salyha Y., Rosalovsky V., Grabovska S. Organophosphate compounds: «old» neurotoxicants and new questions. VII Congress of the Ukrainian Society for Neuroscience P. 51-52.

241. Salyha Yu. T. Chlorpyrifos leads to oxidative stress-induced death of hippocampal cells in vitro. *Neurophysiology*. 2013. V. 45 (3). P. 193–199.

242. Szpyrka E., Matyaszek A., Slowik-Borowiec M. Dissipation of chlorantraniliprole, chlorpyrifos-methyl and indoxacarb—insecticides used to control codling moth (*Cydia Pomonella* L.) and leafrollers (*Tortricidae*) in apples for production of baby food. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 2017. V. 24. № 13. P. 12128–12135.

243. Saulsbury M. D., Heyliger S. O., Wang K. Characterization of Chlorpyrifos Induced Apoptosis in Placental Cells. *Toxicology*. 2008. V. 244. № 2-3, P. 98–110.

244. Saoudi M., Hmida I., Kammoun W., Rebah B. et al. Protective effects of oil of *Sardinella pilchardis* against subacute chlorpyrifos-induced oxidative stress in female rats. *Arch Environ Occup Health*. 2017. V. 10. P. 1–8.

245. Saoudi M., Messarah M., Boumendjel A. Oxidative stress induced by thyroid dysfunction in rat erythrocytes and heart. *Free Radic. Biol. Med.*, 2010. V. 117. P. 469–484.

246. Sargazi S., Moghadam-Jafari A., Heidarpour M. Protective effect of tert butyl hydroquinone on diazinon-induced oxidative stress in brain and heart of male rats. *Zahedan Journal of Research in Medical Sciences*. 2016. P. 1–5.

247. Sargazi S., Jafari A., Heydarpour M. Tert-butylhydroquinone (TBHQ) improves antioxidant status in rat tissues following chronic diazinon intoxication. *Iranian Journal of Veterinary Science and Technology*. 2014. V. 2 (6). P. 42–52.

248. Saulsbury M., Heyliger S., Wang K., Johnson D. Chlorpyrifos induces oxidative stress in oligodendrocyte progenitor cells. *Toxicology*. 2009. V. 2, № 259. P. 1–9.
249. Savithri Y., Sekhar P., Doss P. Changes in hematological profiles of albino rats under chlorpyrifos toxicity. *Inter. J. Pharma and Bio Sci*. 2010. V. 1 (3). P. 1–7.
250. Saxena R., Garg P., Jain D. In vitro anti-oxidant effect of vitamin E on oxidative stress induced due to pesticides in rat erythrocytes. *Toxicol Int*. 2011. V. 18 (1). P. 73–76.
251. Schieber M., Chandel N. ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. *Current Biology*. 2014. V. 24 (10). P.453–462.
252. Schweikert K., Burritt D. J. The organophosphate insecticide Coumaphos induces oxidative stress and increases antioxidant and detoxification defences in the green macroalgae *Ulva pertusa*. *Aquatic Toxicology*. 2012. V. 122 (123). P. 86–92.
253. Sharma D., Sangha G., Khera K. Triazophos-induced oxidative stress and histomorphological changes in ovary of female Wistar rats. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 2015. V. 117. P. 9–18.
254. Sidhu I. P., Bhatti J. S., Bhatti G. K. Modulatory action of melatonin against chlorpyrifos induced hepatotoxicity in Wistar rats. *Asian Journal of Multidisciplinary Studies*. 2014. V. 2 (9). P. 123–131.
255. Sies H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biology*. 2015. V. 4. P. 180–183. doi:10.1016/j.redox.2015.01.002
256. Singh M. Erythrocyte antioxidant enzymes in toxicological evaluation of commonly used organophosphate pesticides. *Indian J. Exp. Biol*. 2006. V. 44 (7). P. 580–583.
257. Singh V., Panwar R. In vivo antioxidative and neuroprotective effect of 4-Allyl-2-methoxyphenol against chlorpyrifos-induced neurotoxicity in rat brain. *Mol Cell Biochem*. 2014. V. 388 (1–2). P. 61–74.
258. Slotkin T. A. Developmental cholinotoxicants: nicotine and chlorpyrifos. *Environ. Health Perspect*. 1999. V. 1. P. 71–80.

259. 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. V. 117 (4). P. 587–596.

260. Slotkin T. A., Levin E. D., Seidler F. J. Comparative developmental neurotoxicity of organophosphate insecticides: effects on brain development are separable from systemic toxicity. *Environ Health Perspect.* 2006. V. 114 (5). P. 746–51.

261. Smida A., Ncibi S., Taleb J., Ben Saad A. [et. al]. Immunoprotective activity and antioxidant properties of cactus (*Opuntia ficus indica*) extract against chlorpyrifos toxicity in rats. *Biomed Pharmacother.*, 2017. V. 88, P. 844–851.

262. Soltaninejad K., Abdollahi M. Current opinion on the science of organophosphate pesticides and toxic stress: a systematic review. *Med Sci Monit.* 2009. V. 15 (3). P. 75–90.

263. Sosnowska B., Huras B., Bukowska B. Oxidative stress in human erythrocytes treated with bromfenvinphos and its impurities. *Pesticide Biochemistry and Physiology.* 2015. V. 118, P. 43–49.

264. Spodniewska A. Barski D., Gizejewska A. Effect of enrofloxacin and chlorpyrifos on the levels of vitamins A and E in Wistar rats. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2015. V. 40 (2). P. 587–91.

265. Stoliar O. B., Lushchak V. I. Environmental pollution and oxidative stress in fish, in oxidative stress – environmental induction and dietary antioxidants. *InTech.* 2012. P. 132–166.

266. Sung S., Yao Y., Uryu K. Early vitamin E supplementation in young but not aged mice reduces Abeta levels and amyloid deposition in a transgenic model of Alzheimer's disease. *The FASEB Journal.* 2004. V. 18 (2). P. 323–325.

267. Surajudeen Y. A., Sheu R. K., Ayokulehin K. M., Olatunbosun A. G. Oxidative stress indices in Nigerian pesticide applicators and farmers occupationally exposed to organophosphate pesticides. *International Journal of Applied and Basic Medical Research.* 2014. V. 4 (3), P. 37.

268. Taib I., Budin S., Ghazali A., Jayusman P. Fenitrothion induced oxidative stress and morphological alterations of sperm and testes in male sprague-dawley rats. *Clinics*, 2013. V. 68 (1). P. 93–100.
269. Testai, E., Buratti, F., Consiglio, E. Chlorpyrifos. In *Handbook of Pesticide Toxicology*. London: Elsevier Inc. 2010. P. 1505–1526.
270. Tuzmen N., Candan N., Kaya E., Demiryas N. et al. Biochemical effects of chlorpyrifos and deltamethrin on altered antioxidative defense mechanisms and lipid peroxidation in rat liver. *Cell Biochem Funct*. 2008. V. 26 (1). P. 119–124.
271. Uchendu C., Ambali S., Ayo J. [et al.] The protective role of alpha-lipoic acid on long-term exposure of rats to the combination of chlorpyrifos and deltamethrin pesticides. *Toxicology and Industrial Health*. 2017. V. 33 (2). P. 159–170.
272. Uchendu C., Ambali S., Ayo J., Esievo K. Erythrocyte osmotic fragility and lipid peroxidation following chronic co-exposure of rats to chlorpyrifos and deltamethrin, and the beneficial effect of alpha-lipoic acid. *Toxicol. Rep*. 2014. V. 12 (1). P. 373-378.
273. Umosen A., Ambali S., Ayo J., Mohammed B. Alleviating effects of melatonin on oxidative changes in the testes and pituitary glands evoked by subacute chlorpyrifos administration in Wistar rats. *Asian Pac. J. Trop. Biomed*. 2012. V. 2 (8). P. 645-50.
274. Ural M., Yonar M., Yonar S. Protective effect of ellagic acid on oxidative stress and antioxidant status in *Cyprinus carpio* during malathion exposure. *Cell Mol. Biol. (Noisy-le-grand)*. 2015. V. 61(5), P. 58-63.
275. Uzun F.G., Kalender Y. Chlorpyrifos induced hepatotoxic and hematologic changes in rats: the role of quercetin and catechin. *Food Chem. Toxicol*. 2013. V. 55. P. 549-556.
276. Velacquez-Melendez G. Roncada M., Toporovski J., Okani E. [et al.] Relationship between acute diarrhoea and low plasma levels of vitamin A and retinol binding protein. *Rev. Inst. med. trop. Sao Paulo*. 1996. V. 5. P. 365–369.

277. Venerosi A., Ricceri L., Rungi A., Sanghez V. Gestational exposure to the organophosphate chlorpyrifos alters social–emotional behaviour and impairs responsiveness to the serotonin transporter inhibitor fluvoxamine in mice. *Psychopharmacology*. 2009. V. 208 (1). P. 99–107.

278. Venkatesh S., Ramachandran A. Mitochondrial ATP synthase inhibition and nitric oxide are involved in muscle weakness that occurs in acute exposure of rats to monocrotophos. *Toxicol. Mech. Methods*. 2009. V. 1 (3). P.239–245.

279. Verma R., Mehta A., Srivastava N. *In vivo* chlorpyrifos induced oxidative stress: Attenuation by antioxidant vitamins. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 2007. V. 88. P. 191–196.

280. Vioque-Fernandez A., de Almeida E., Lopez-Barea J. Biochemical and proteomic effects in *Procambarus clarkii* after chlorpyrifos or carbaryl exposure under sublethal conditions. *Biomarkers*. 2009. V. 14. (5). P. 299–310.

281. Voso M., Hohaus T., Guidi F. Prognostic role of glutathione S-transferase polymorphisms in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2008. V. 22 (9). P. 1685–1691.

282. Wright K. D., Morris A N., Kuehn J. L. Effects of low level intermediate exposure to atrazine and chlorpyrifos in Sprague Dawley rats. *Bios*, 2015. V. 86 (2). P. 99–103.

283. Wu H., Zhang Y., Shi X., Zhang J., Ma E. Overexpression of Mn-superoxide dismutase in *Oxya chinensis* mediates increased malathion tolerance. *Chemosphere*. 2017. V. 181. P. 352–359.

284. Xing H. J., Wang L. L., Yao H. D., Wang X. L. [et al.] Effects of atrazine and chlorpyrifos on autophagy-related genes in the brain of common carp: health-risk assessments. *Arch Environ Contam Toxicol*. 2016. V. 70 (2). P. 301–10.

285. Xu L., Long C., Wang J., Yu M., Investment of oxidative stress in tri-ortho-cresyl phosphate-induced liver injury in male mice. *Human & Experimental Toxicology*, 2016. V. 35 (10). P. 1093–1101.

286. Yazdinezhad A., Abbasian M., Hosseini, S., Naserzadeh P. [et al.] Protective effects of Ziziphora tenuior extract against chlorpyrifos induced liver and lung toxicity in rat: Mechanistic approaches in subchronic study. *Environmental Toxicology*. 2017. V. 32 (9). P. 2191–2202.
287. Yu F., Wang Z., Ju B., Wang Y., Apoptotic effect of organophosphorus insecticide chlorpyrifos on mouse retina in vivo via oxidative stress and protection of combination of vitamins C and E. *Exp. Toxicol. Pathol.* 2008. V. 59 (6). P. 415–423.
288. Yu Q., Fang S., Zuo W., Dai F. [et al.] Effect of organophosphate phoxim exposure on certain oxidative stress biomarkers in the silkworm. *Journal of Economic Entomology*. 2011. V. 104 (1). P. 101–106.
289. Zhang Z., Liu Q., Cai J., Yang J. Chlorpyrifos exposure in common carp (*Cyprinus carpio* L.) leads to oxidative stress and immune responses. *Fish Shellfish Immunol.* 2017. V. 67. P. 604–611.
290. Zhao L., Xie F., Wang T. Chlorpyrifos induces the expression of the Epstein-Barr virus lytic cycle activator BZLF-1 via reactive oxygen species. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2015. V. 1–8. P. 3091.

ДОДАТОК

Декан біологічного факультету
Львівського національного університету

Імені Івана Франка
факультет
канд. біол. наук, доц.

І. С. Хамар

2018 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

матеріалів дисертаційної роботи до навчального процесу

1. Назва пропозиції для впровадження: «Біохімічні особливості токсичної дії хлорпірифосу на гематологічні показники периферичної крові тварин».

2. Установа, автори: Інститут біології тварин НААН, лабораторія обміну речовин імені Степана Гжицького, м.н.с. Росаловський Володимир Петрович.

3. Джерела інформації: Rosalovsky V. P., Grabovska S. V., Salyha Yu. T. (2015). Biochemical and haematological changes in peripheral blood of rats exposed to chlorpyrifos: protective effect of vitamins A and E combination. *Біологічні Студії / Studia Biologica*, 9 (3). – P. 57–68.

Rosalovsky V. P., Grabovska S. V., Salyha Yu. T. (2015). Changes in glutathione system and lipid peroxidation in rat blood during the first hour after chlorpyrifos exposure. *Ukr. Biochem. J.*, 87 (5), – P. 124–132.

Росаловський В. П. (2017). Кисень-транспортна функція гемоглобіну шурів за гострої і хронічної інтоксикації хлорпірифосом у різних дозах. *Біологічні Студії / Studia Biologica*, 11 (1). – С. 51–58.

4. Де та коли впроваджено: у навчальний матеріал курсів «Біохімія крові», «Метаболізм ксенобіотиків» і наукову роботу кафедри біохімії Львівського національного університету імені Івана Франка протягом 2016/ 2017 н. р.

5. Результати впровадження: Використання результатів дослідження у навчальному процесі та науковій роботі дозволяє поглибити знання про біохімічні механізми дії хлорпірифосу на організм тварин.

6. Термін впровадження: 2016-2017 р.

7. Базова установа, яка проводить впровадження: кафедра біохімії Львівського національного університету імені Івана Франка

Завідувач кафедри біохімії, доктор біол. наук., проф.

Сибірня Н. О.

Секретар кафедри, канд. біол. наук, доц.

Стасик О. Г.