

УДК 577.15:636.4:087.7

ВПЛИВ ХЛОРПІРИФОСУ НА ГЛУТАТІОНОВУ СИСТЕМУ ТА ВМІСТ ПРОДУКТІВ ПЕРОКСИДНОГО ОКИСНЕННЯ ЛІПІДІВ У РІЗНИХ ОРГАНАХ ЩУРІВ

Ю. Т. Салига
yursalyha@yahoo.com

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

Незважаючи на обмеження стосовно використання хлорпірифосу, він залишається одним з найбільш поширених фосфорорганічних пестицидів у світі. Як і інші фосфорорганічні сполуки, хлорпірифос інгібує ензим ацетилхолінестеразу. Але механізми токсичності хлорпірифосу не обмежуються лише пригніченням ацетилхолінестеразної активності, вони можуть бути опосередковані іншими чинниками. Зокрема, у ролі токсичного механізму хлорпірифосу розглядається процес утворення в клітинах активних форм Оксигену. Якщо про гостру токсичність хлорпірифосу відомо досить багато, то стосовно хронічного впливу низьких концентрацій цієї сполуки і їх негативну дію на різні системи, органи тварин і людини інформації значно менше.

Метою роботи було дослідити стан окремих параметрів глутатіонової системи (вміст відновленого глутатіону (GSH), активність глутатіонпероксидази (ГПО), глутатіонредуктази (ГР), а також вміст продуктів ПОЛ (ТБК-активних продуктів і гідропероксидів ліпідів) у гомогенатах тканин різних органів щурів за умов їх токсичного ураження, викликаного хлорпірифосом.

Експерименти проводили на щурах-самцях лінії Вістар. Щурів утримували у стандартних умовах віварію з дотриманням 12-годинного режиму освітлення темнота/світло, необмеженим доступом до питної води та корму. У кінці 1-місячного періоду інтоксикації експериментальних тварин низькими концентраціями хлорпірифосу всіх тварин декапітували під ефірним наркозом. Одразу відбирали зразки тканин

печінки, мозку, нирок, легень, селезінки та серця, які заморожували в рідкому Нітрогені і використовували в подальших біохімічних дослідженнях.

Отримані результати в цілому підтверджують вплив хлорпірифосу на антиоксидантну систему тканин організму. Виявлені зміни вказують на активну участь системи глутатіону в процесах детоксикації при хронічному отруєнні хлорпірифосом і одночасну активацію процесів пероксидного окиснення ліпідів. Встановлено зниження активності глутатіонпероксидази при хронічній інтоксикації хлорпірифосом, що найвідчутніше спостерігалось в тканинах печінки та нирок. Менш виражена токсична дія цієї фосфорорганічної сполуки була показана стосовно функціонування глутатіонредуктази. Значне зниження концентрації відновленого глутатіону спостерігалось лише в гомогенатах тканини печінки експериментальних груп тварин. Що стосується продуктів пероксидного окиснення ліпідів — результати вказують на їх значне зростання в тканинах печінки, головного мозку, нирок і серця щурів інтоксикованих хлорпірифосом.

Ключові слова: ХЛОРПІРИФОС, АНТИОКСИДАНТНА СИСТЕМА, ГЛУТАТІОНПЕРОКСИДАЗА, ГЛУТАТІОНРЕДУКТАЗА, ГЛУТАТІОН ВІДНОВЛЕНИЙ, ПРОДУКТИ ПЕРОКСИДНОГО ОКИСНЕННЯ ЛІПІДІВ, ТОКСИЧНІСТЬ, ЩУРИ

EFFECT OF CHLORPYRIFOS ON GLUTATHIONE SYSTEM AND LIPID PEROXIDATION PRODUCTS CONTENT IN VARIOUS ORGANS OF RATS

Y. T. Salyha
yursalyha@yahoo.com

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

Despite restrictions on use chlorpyrifos is one of the most commonly used organophosphate pesticides in the world. Like the other organophosphates, chlorpyrifos inhibits the enzyme acetylcholinesterase. But chlorpyrifos toxicity is not limited to acetylcholinesterase inhibition alone but can act by other mechanisms. In particular the production of reactive oxygen species has been suggested as a possible toxic mechanism. While much is known about toxicity produced by acute chlorpyrifos exposure, relatively there is not a great deal known about the means by which chronic exposure to this compound, particularly low concentrations of chlorpyrifos, may adversely affect different animal and human organs and systems.

The aim of the study was to investigate some parameters of the glutathione system (content of reduced glutathione (GSH), the activity of glutathione peroxidase, glutathione reductase and the content of lipid peroxidation products (TBA-active products and lipid hydroperoxides) in different tissue homogenates of rats under conditions their toxic damage caused by chlorpyrifos.

Experiments were conducted in male Wistar rats. All rats were housed according to standard animal care protocols and fed standard laboratory chow and tap water ad libitum. At the end of 1-month intoxication period of experimental animals by low concentrations of chlorpyrifos they were decapitated under anaesthesia. After that

kidney, lung, spleen, heart, liver and brain were immediately removed and were frozen in liquid nitrogen to be used in subsequent biochemical studies.

The obtained results generally confirm the impact of chlorpyrifos on the antioxidant system. Revealed changes of the studied parameters indicate active participation of glutathione system in the detoxification processes in chronic poisoning with chlorpyrifos and simultaneous activation of lipid peroxidation processes. It is established decrease of glutathione peroxidase activity in chronic chlorpyrifos intoxication that most felt was observed in liver and kidney tissues. Less pronounced toxic effect of investigated organophosphorus compounds was showed on glutathione reductase activity. Significant decrease of reduced glutathione was observed only in homogenates of liver tissue in experimental groups of animals. Concerning the lipid peroxidation products — the results indicate their significant growth in tissues of the liver, brain, kidneys and heart in rats intoxicated by chlorpyrifos.

Keywords: CHLORPYRIFOS, ANTIOXIDANT SYSTEM, GLUTATHIONE PEROXIDASE, GLUTATHIONE REDUCTASE, GLUTATHIONE REDUCED, LIPID PEROXIDATION PRODUCTS, TOXICITY, RATS

ВЛИЯНИЕ ХЛОРПИРИФОСА НА ГЛУТАТИОНОВУЮ СИСТЕМУ И СОДЕРЖАНИЕ ПРОДУКТОВ ПЕРОКСИДНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ В РАЗНЫХ ОРГАНАХ КРЫС

Ю. Т. Салыга
yursalyha@yahoo.com

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

Несмотря на ограничения по использованию хлорпирифоса, он остается одним из наиболее распространенных фосфорорганических пестицидов в мире. Как и другие фосфорорганические соединения, хлорпирифос ингибирует активность ацетилхолинэстеразы. Но механизмы токсичности хлорпирифоса не ограничиваются только угнетением ацетилхолинэстеразной активности, они

могут быть опосредованы другими факторами. В частности, в качестве токсического механизма хлорпирифоса рассматривается процесс образования в клетках активных форм кислорода. Если об острой токсичности хлорпирифоса известно достаточно много, то в отношении хронического воздействия низких концентраций этого соединения и их негативное воздействие на различные системы

и органы животных и человека информации значительно меньше.

Целью данной работы было исследовать состояние отдельных параметров глутатионовой системы (содержание восстановленного глутатиона (GSH), активность глутатионпероксидазы (ГПО), глутатионредуктазы (ГР), а также содержание продуктов ПОЛ (ТБК-активных продуктов и гидропероксидов липидов) в гомогенатах тканей различных органов крыс в условиях их токсического поражения, вызванного хлорпирифосом.

Эксперименты проводили на крысах-самцах линии Вистар. Крыс содержали в стандартных условиях вивария с соблюдением 12-часового режима освещения темнота/свет, с неограниченным доступом к питьевой воде и корму. В конце 1-месячного периода интоксикации экспериментальных животных низкими концентрациями хлорпирифоса, всех животных декапитировали под эфирным наркозом. Сразу отбирали образцы тканей печени, мозга, почек, легких, селезенки и сердца, которые замораживали в жидком азоте и использовали в дальнейших биохимических исследованиях.

Полученные результаты в целом подтверждают влияние хлорпирифоса на антиоксидантную систему тканей организма. Выявленные изменения исследуемых показателей указывают на активное участие системы глутатиона в процессах детоксикации при хроническом отравлении хлорпирифосом и одновременную активацию процессов перекисного окисления липидов. Установлено снижение активности глутатионпероксидазы при хронической интоксикации хлорпирифосом, что ощутимо наблюдалось в тканях печени и почек. Менее выраженное токсическое действие этого фосфорорганического соединения было показано относительно функционирования глутатионредуктазы. Значительное снижение концентрации восстановленного глутатиона наблюдалось лишь в гомогенатах тканей печени экспериментальных групп животных. Что касается продуктов перекисного окисления липидов — результаты указывают на их значительный рост в тканях печени, головного мозга, почек и сердца крыс интоксигированных хлорпирифосом.

Ключевые слова:
ХЛОРПИРИФОС, АНТИОКСИДАНТНАЯ

СИСТЕМА,
ГЛУТАТИОНПЕРОКСИДАЗА,
ГЛУТАТИОНРЕДУКТАЗА, ГЛУТАТИОН
ВОСТАНОВЛЕННЫЙ, ПРОДУКТЫ
ПЕРОКСИДНОГО ОКИСЛЕНИЯ
ЛИПИДОВ, ТОКСИЧНОСТЬ, КРЫСЫ

Незважаючи на науково обґрунтований високий рівень екологічних ризиків, фосфорорганічні сполуки (ФОС) продовжують широко використовувати в Україні, переважно у агропромисловому секторі, як інсектициди, акарициди, дефоліанти. Велика популярність застосування ФОС в якості пестицидів обумовлена високою біологічною активністю, якою вони володіють і порівняно низькою ціною [1]. Хлорпірифос (ХПФ) (О,О-диетил-О-3,5,6-трихлор-2-піридилфосфорогіат ($C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$)) є одним з найвідоміших представників ФОС. Багатьма дослідженнями було встановлено, що ХПФ крім токсичної дії перш за все на центральну нервову систему, може негативно впливати на цілу низку інших систем організму, зокрема на імунну, дихальну, репродуктивну та ін. [2–9]. Добре відомо, що основний механізм згаданої вище токсичності ХПФ полягає у пригніченні цією сполукою (аналогічно іншим ФОС) ацетилхолінестерази — одного з найважливіших ензимів у передачі нервового імпульсу. Незважаючи на це, далеко не всі особливості дії ФОС, зокрема ХПФ, на живий організм, пов'язані з системою ацетилхоліну [3, 4, 5, 7].

Останнім часом, розглядаючи проблеми токсичності ФОС, все більше уваги приділяють участі в її механізмах антиоксидантної системи (АОС), адже загальновідомо, що її роль у підтриманні гомеостазу організму є надзвичайно важливою [5, 6, 9, 10]. Особливий інтерес представляє стан АОС за умов різноманітних фізіологічних порушень і патологічних станів організму, в тому числі і тих, які викликаються токсичною дією ксенобіотиків. Токсиканти різної природи доволі часто спільною рисою мають те, що більшість з них порушують баланс між

утворенням в організмі прооксидантів і їх дезактивацією антиоксидантами, що, як наслідок, призводить до виникнення оксидативного стресу. Останній, разом з активними формами Оксигену (АФО) може здійснювати в числі іншого хімічну модифікацію структури ДНК, викликаючи цитотоксичну дію, захист від якої забезпечується функціонуванням у клітині ензимів АОС, в тім числі і глутатіонзалежних [11]. Надлишкова кількість АФО утворюється внаслідок порушення нормального функціонування електротранспортних процесів, які відбуваються у мітохондріях або мікосоммах. Нагромадження продуктів пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ), що має місце при порушенні функціонування антиоксидантних систем негативно впливає на різноманітні ланки гомеостазу і є однією з причин багатьох захворювань [2, 3, 7, 8].

Дослідження саме глутатіонової системи за токсичної дії хлорпірифосу є актуальним не лише в контексті функціонування загальної АОС організму, а обумовлене також тим, що вона бере безпосередню участь у багатьох біохімічних механізмах детоксикації ліпофільних і гідрофільних ксенобіотиків. Участь глутатіону і зв'язаних з ним систем у процесах біотрансформації та детоксикації ксенобіотиків визначає великою мірою стійкість організму до їх токсичної дії.

Метою роботи було дослідити стан окремих параметрів глутатіонової системи (вміст відновленого глутатіону (GSH), активність глутатіонпероксидази (ГПО), глутатіонредуктази (ГР), а також вміст продуктів ПОЛ (ТБК-активних продуктів і гідропероксидів ліпідів) у гомогенатах тканин різних органів щурів за умов їх токсичного ураження, викликаного хлорпірифосом.

Матеріали і методи

Дослідження проводили на статевозрілих самцях білих лабораторних щурів лінії Вістар масою тіла 200–220 г, яких утримували у стандартних умовах

віварію з дотриманням 12-годинного режиму освітлення темнота/світло, необмеженим доступом до питної води та корму. Тваринам згодовували стандартний комбікорм для лабораторних щурів. Усі маніпуляції з тваринами проводили відповідно до Європейської конвенції «Про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних і наукових цілей» (Страсбург, 1986 р.) і «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим Національним конгресом з біоетики (Київ, 2001). Було сформовано три групи тварин (контрольну (К) і дві дослідні (Д1 і Д2) по 10 щурів у кожній. Протягом місяця тваринам дослідних груп щоденно в один і той самий час дермально аплікували хлорпірифос, занурюючи їхній хвіст у розчин цієї речовини відповідної концентрації на 3 хв. На час цієї процедури досліджуваних тварин поміщали у спеціальні плексигласові фіксатори, що дозволяло знерухомлювати їх та зручно маніпулювати. В якості вихідного розчину хлорпірифосу застосовували комерційний інсектицидний препарат «Дурсбан» (Україна) з концентрацією діючої речовини 480 г/л. Для експериментів препарат розводили у 50 (група Д1) і 5 разів (група Д2). У контрольній групі з інтактними тваринами проводили ті самі маніпуляції, що й у дослідній, але замість хлорпірифосу використовували фізіологічний розчин.

Після закінчення досліду всіх тварин декапітували під ефірним наркозом. Одразу відбирали зразки тканин печінки, мозку, нирок, легень, селезінки та серця, які заморожували в рідкому Нітрогені і використовували в подальших біохімічних дослідженнях.

Глутатіонпероксидазну (ГПО) активність (КФ 1.11.1.9) визначали за швидкістю окиснення GSH до і після інкубації з гідропероксидом третинного бутілу. В основі розвитку кольорової реакції лежить взаємодія SH-груп з 5,5-дитіобіс-2-нітробензойною кислотою, внаслідок чого утворюється забарвлений продукт — тіонітрофенільний аніон [12].

Кількість останнього прямо пропорційна кількості SH-груп, що прореагували з 5,5-дитіобіс-2-нітробензойною кислотою. 0,2 мл гомогенату тканин інкубували на водяній бані при 37 °С протягом 10 хв з 0,83 мл тріс-НCl буфера рН 8,5, який містив 6 мМ розчин ЕДТА і 12 мМ розчин азиду натрію. На цьому буфері готували 4,8 мМ розчин GSH (глутатіону відновленого). Потім додавали 0,05 мл розчину гідропероксиду третинного бутилу 20 мМ і знову інкубували протягом 5 хв при 37 °С. Реакцію зупиняли додаванням 0,4 мл 10 % розчину ТХО кислоти, після чого центрифугували при 7150 g протягом 10 хв. Далі до 0,1 мл супернатанту додавали 5 мл 0,1 М тріс-НCl буфера (рН 8,5), 0,1 мл реактиву Елмана (0,01 М розчин 5,5-дитіобіс-2-нітробензойної кислоти на метанолі). Через 5 хв вимірювали оптичну густину при $\lambda = 412$ нм. Активність ензиму виражали в нмоль GSH/хв на 1 мг протеїну.

Глутатіонредуктазну (ГР) активність (КФ 1.6.4.2) визначали методом, описаним у літературі [13]. Принцип методу базується на каталітичній NADPH-залежній реакції відновлення окисненої форми глутатіону, інтенсивність якої можна оцінити за швидкістю зниження екстинкції, при якій розчин NADPH має максимум світлопоглинання (340 нм).

Для здійснення реакції гомогенати тканин розводили 0,1 М калій-фосфатним буфером (рН 7,4) у співвідношенні 1:9. Реакцію проводили в термостатованій кюветі при температурі 37 °С. У кювету вносили 1,8 мл 0,1 М калій-фосфатного буфера (рН 7,0) з додаванням 1 мМ ЕДТА, 0,1 мл 20 мМ водного розчину окисненого глутатіону і 100 мкл розведеного гомогенату. Через 3 хв реакцію запускали додаванням 0,1 мл 2 мМ розчину NADPH, розчиненого в 10 мМ Тріс-НCl буфері рН 7,0. Вимірювання оптичної густини досліджуваних розчинів проводили при довжині хвилі 340 нм на спектрофотометрі СФ-26 проти дистильованої води у кюветах з довжиною оптичного шляху 10 мм. Як контроль використовували реакційну суміш, в яку замість досліджуваного зразка

вносили в такому самому об'ємі 0,1 М калій-фосфатний буфер (рН 7,4). Розрахунок активності ГР здійснювали відповідно до закону Бугера-Ламберта-Бера, 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.

Концентрацію відновленого глутатіону (GSH) вимірювали до і після реакції колориметрично за методикою, описаною у [14]. В основі розвитку кольорової реакції лежить взаємодія SH-груп з 5,5'-дитіобіс-2-нітробензойною кислотою (ДТНБК) з утворенням забарвленого продукту — тіонітрофенільного аніону. Вміст останнього прямо пропорційний кількості SH-груп, що прореагували з ДТНБК. До 0,6 мл гомогенату тканин з метою осадження протеїну додавали 0,2 мл 20 % розчину сульфосаліцилової кислоти. Пробі центрифугували впродовж 10 хв при 3 000 g. Аліквоту (0,1 мл) переносили в пробірки, які містили 2,55 мл 0,1 М Тріс-НCl буфера з 0,01% ЕДТА, рН 8,5. До отриманої суміші додавали 25 мкл розчину ДТНБК. Після утворення забарвлення визначали показник екстинкції на спектрофотометрі СФ-26 проти дистильованої води при $\lambda=412$ нм у кюветі з довжиною оптичного шляху 10 мм. Розрахунок вмісту GSH проводили за калібрувальним графіком і виражали в ммоль/г тканини.

Концентрацію ТБК-активних продуктів визначали за методом Е. Н. Коробейникової, в основі якого лежить реакція між МДА і тіобарбітуровою кислотою (ТБК), яка при високій температурі і кислому середовищі протікає з утворенням триметинового комплексу, що містить одну молекулу МДА і дві молекули ТБК [15]. У ході визначення до 1 мл гомогенату тканини додавали 4,5 мл 20 % фосфорновольфрамівної кислоти і центрифугували протягом 15 хв при 700 g. Надосадову рідину зливали, а до осаду додавали 1,0 мл 0,8 % розчину ТБК і

витримували протягом 1 год на водяній бані при температурі 100 °С. Після цього пробірки охолоджували і центрифугували. В одержаному центрифугаті вимірювали оптичну густину при довжині хвилі 535 і 580 нм, щоб виключити поглинання зафарбованих комплексів ТБК-речовинами неліпідної природи. Концентрацію ТБК-активних продуктів виражали в нмоль МДА на 1 г тканини.

Вміст гідропероксидів ліпідів визначали методом [16], згідно з яким до 0,2 мл гомогенату тканини додавали 2,8 мл етанолу та 0,05 мл 50 % розчину ТХО кислоти і струшували протягом 5–6 хв. Відбирали 1,5 мл супернатанта і доводили до 2,7 мл етанолом, додавали 0,02 мл концентрованої НСІ і 0,03 мл 1 % розчину солі Мора в 3 % розчині НСІ. Вміст струшували і через 30 с додавали 0,2 мл 20 % розчину тіоціанату амонію, після чого розвивалося малинове забарвлення. Вимірювання оптичної густини проводили після додавання тіоціанату амонію при $\lambda = 480$ нм. Контрольну пробу ставили як дослідну, але замість гомогенату тканини додавали відповідну кількість бідистильованої води. Вміст гідропероксидів ліпідів у біологічному матеріалі виражали в величинах оптичної густини при 480 нм на 1 г тканини.

Концентрацію білка визначали за методом Лоурі [17].

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

Одержані цифрові дані обробляли статистично. Для визначення вірогідних відмінностей між середніми величинами використовували критерій Стюдента.

Результати й обговорення

ГПО каталізує відновлення H_2O_2 , або органічних гідроперексидів за допомогою глутатіону і внаслідок цього захищає клітини та організм у цілому від негативної дії АФО. У наших експериментах (рис. 1) отруєння щурів

хлорпірифосом викликало зниження активності цього ензиму у тварин першої та другої дослідних груп, відповідно у тканинах нирок — на 26,1 та 41 %, печінки — на 23,4 та 52,6 % у порівнянні до щурів контрольної групи. Активність ГПО була нижчою у тканинах легень тварин першої дослідної групи на 16,3 % порівняно до контролю. Очевидно, зниження активності ГПО може бути пов'язане з порушенням синтезу цього ензиму внаслідок дії хлорпірифосу. Проте, водночас, у тканинах серця тварин другої дослідної групи мало місце незначне зростання активності ГПО порівняно до контролю. У свою чергу, у тканинах селезінки та мозку всіх груп статистично вірогідних змін активності ГПО не спостерігалось. Треба мати на увазі, що динаміка багатьох патологічних процесів в організмі значною мірою залежить від активності ГПО. Її суттєве зниження у печінці, наприклад, може свідчити про порушення захисту її клітин від ксенобіотиків, зокрема хлорпірифосу. Аналогічно це стосується і нирок. Основна біологічна роль ензиму ГР полягає у підтриманні необхідної внутрішньоклітинної концентрації GSH — важливого компонента неензиматичної ланки АОС, шляхом забезпечення його синтезу. Як видно з даних представлених на рисунку 2 ГР активність була вірогідно нижчою у тканині нирок двох дослідних груп відповідно на 24,4 та 48,7 % порівняно до контролю. Спостерігали зниження цього показника і у тканинах печінки двох дослідних груп, але вірогідно цей показник змінювався лише у тварин другої дослідної групи (на 36,2 %). У тканинах селезінки, серця і мозку ГР активність тварин обох дослідних груп практично не відрізнялась від контролю. Тенденцію до незначного зниження ГР активності можна спостерігати у тканинах легень обох дослідних груп відносно контролю, але ці зміни не були статистично вірогідними.

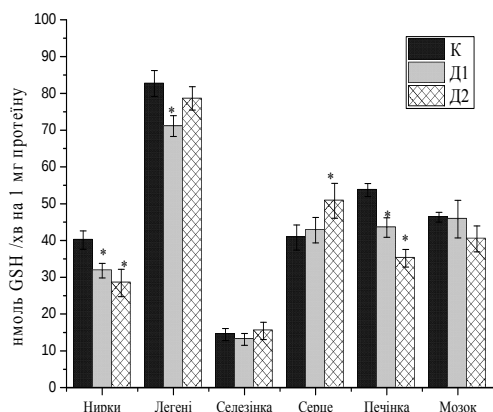


Рис. 1. Активність ГПО у тканинах щурів за дії хлорпірифосу

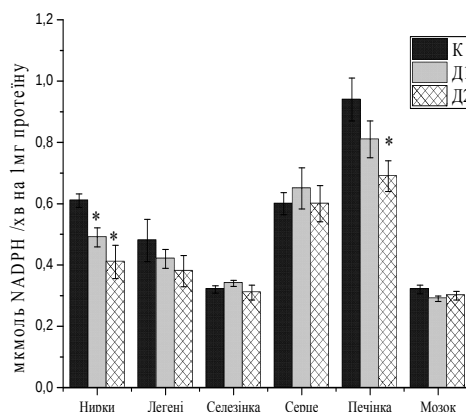


Рис. 2. Активність ГР у тканинах щурів за дії хлорпірифосу

Зниження активності таких ензимів, як ГПО і ГР, свідчать про наявність дисбалансу в проантиоксидантній системі мітохондрій тварин, які зазнавали отруєння хлорпірифосом у різних дозах.

Що стосується вмісту відновленого глутатіону, то як видно з рисунку 3 він був вірогідно нижчим лише у тканинах печінки тварин першої та другої дослідних груп відповідно на 48,8 та 57,8 % відносно контрольної групи тварин. На противагу цьому — у досліджених гомогенатах тканин нирок, легень, селезінки, серця і

мозку усіх груп тварин змін у вмісті GSH виявлено не було.

Слід зазначити, що GSH захищає внутрішньоклітинні альбуміни від ендогенних активних форм Оксигену (АФО), крім того, він підсилює інактивацію гідропериксидів та інших токсичних продуктів окиснення [18]. Враховуючи безпосередню участь глутатіону у багатьох процесах життєдіяльності клітини, в тому числі таких, як диференціація, проліферація та апоптоз, порушення його гомеостазу може свідчити, зокрема про розвиток ряду патологічних явищ [6].

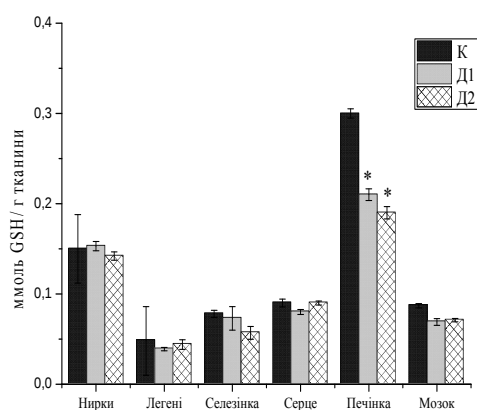


Рис. 3 Вміст відновленого глутатіону у тканинах щурів за дії хлорпірифосу

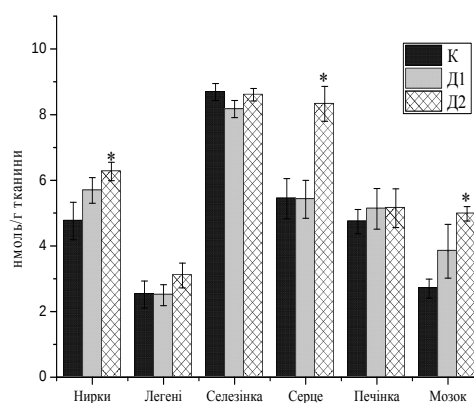


Рис. 4 Вміст ТБК-активних продуктів у тканинах щурів за дії хлорпірифосу

Глутатіон, з одного боку — самостійно, а з другого — опосередковано

— в ролі субстрату GSH-залежних ензимів (глутатіонтрансферази,

глутатіонпероксидази і глутатіонредуктази) модулює клітинну відповідь на дію АФО, займаючи таким чином центральне місце у функціонуванні глутатіонові ланки АОС [6]. Важливо зазначити, що ТБК-активні продукти є одним з основних індикаторів інтенсивності протікання процесів ПОЛ, які відомі, як одні із універсальних механізмів пошкодження клітин на рівні біологічних мембран. Зокрема, порушення цілісності клітинних мембран призводить до активації фосфоліпаз і оксигеназ, які стимулюють утворення вільних радикалів, провокуючи порушення у системі ПОЛ та впливають на характер перебігу мембрано-деструктивних процесів у клітинах [19–20].

Гідропероксида ліпідів — первинні продукти ПОЛ є нестійкі і швидко руйнуються з утворенням альдегідів (МДА), спиртів, кетонів і епоксидів — вторинних продуктів ПОЛ. Аналізуючи

отримані дані, видно, що вміст ТБК-активних продуктів (рис. 4) був вірогідно вищим у тканинах нирок, серця та мозку тварин другої дослідної групи відповідно на 31,72 (нирки), 53,1 (серце), 84,4 % (мозок).

Як і вміст ТБК-активних продуктів, вміст гідропероксидів ліпідів характеризує ступінь впливу різних чинників на організм, в тому числі токсичних і, таким чином, є важливим показником ліпопероксидаційних процесів. Як показали результати наших досліджень цього параметра (рис. 5), вміст гідропероксидів ліпідів був вірогідно вищим у тварин першої та другої дослідних груп у тканинах печінки відповідно на 61,7 та 78,7 % і тканинах мозку — відповідно на 98,7 та 91,5 % у порівнянні з контролем. Також слід зазначити зростання вмісту цього показника у тканинах нирок тварин першої дослідної групи.

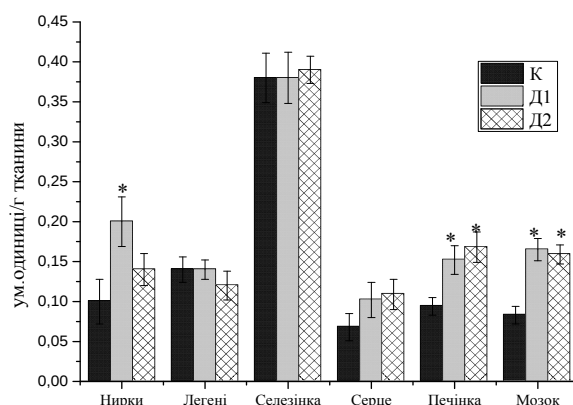


Рис. 5. Вміст гідропероксидів ліпідів у тканинах шурів за дії хлорпірифосу

Висновки

Отримані результати, загалом, підтверджують вплив хлорпірифосу на АОС. Виявлені зміни досліджуваних показників свідчать про активну участь глутатіонові системи у процесах детоксикації організму при хронічному отруєнні хлорпірифосом і одночасну активацію процесів ПОЛ.

Встановлено зниження глутатіонпероксидазної активності при хронічній хлорпірифосній інтоксикації, яке найвідчутніше спостерігалось у тканинах печінки і нирок. Аналогічний, але менш виражений вплив, інтоксикація

досліджуваною фосфорорганічною сполукою проявляла на глутатіонредуктазну активність. Вірогідне зниження вмісту відновленого глутатіону спостерігали лише у гомогенатах тканин печінки дослідних груп тварин. Стосовно продуктів ПОЛ — результати свідчать про їх вірогідне зростання у тканинах печінки, мозку, нирок та серця інтоксикованих хлорпірифосом шурів.

Перспективи подальших досліджень. Варто вивчити стан різних ланок АОС на ранніх етапах інтоксикації організму хлорпірифосом, а також у динаміці постінтоксикаційного періоду,

розширивши при цьому спектр досліджуваних біохімічних показників.

1. Vlizlo V. V., Salyha Yu. T. Problemy biologichnoi bezpeky zastosuvannya pestytsydiv v Ukrayini [Some problems of biological safety of application of pesticides in Ukraine]. *Visnyk agrarnoyi nauky — Herald of Agrarian Science*, 2012, no 1, pp. 24–27 (in Ukrainian).

2. Salyha Y. T. Potentsiyna neyrotoksychnist chlorpiryfosu i sposoby yiyi vyvchennya [Potential neurotoxicity of chlorpyrifos and methods of its investigation]. *Medychna khimiya — Medical chemistry*, 2009, vol. 11, no. 4, pp. 69–72 (in Ukrainian).

3. Salyha Y. Biological effects assessment of chlorpyrifos and some aspects of its neurotoxicity. *Visnyk Lvivsko Universytetu, Seriya Biologichna — Visnyk of Lviv Univ. Biology Series*, 2010, Is. 54, pp. 3–14.

4. Gupta R. C., Malik J. K., Milatovic D. Organophosphate and carbamate pesticides. *Reproductive and Developmental Toxicology*, 2011, pp. 471–486.

5. Flaskos J. The developmental neurotoxicity of organophosphorus insecticides: A direct role for the oxon metabolites. *Toxicol. Lett.*, 2012, vol. 209, no.1, pp. 86–93.

6. Saulsbury M. D., Heyliger S. O., Wang K. [et. al.] Chlorpyrifos induces oxidative stress in oligodendrocyte progenitor cells, *Toxicology*, 2009, vol. 259, no.1, pp.1–9.

7. Lukaszewicz-Hussain A. Subchronic intoxication with chlorfenvinphos, an organophosphate insecticide, affects rat brain antioxidative enzymes and glutathione level. *Food and Chem. Tox.*, 2008, vol. 46, no.1, pp. 82–86.

8. M. A. Sandhu, Saeed A. A., Khilji M. S. et al. Genotoxicity evaluation of chlorpyrifos: a gender related approach in regular toxicity testing. *J. Toxicol. Sci.*, 2013, vol. 38, no. 2, pp. 237–244.

9. Ki Y. W., Park J. H., Lee J. E. et al. JNK and p38 MAPK regulate oxidative stress and the inflammatory response in chlorpyrifos-induced apoptosis. *Toxicol Lett.*, 2013, Is. 26; vol. 218, no. 3, pp. 235–45.

10. Leonenko N. S. Stan perekysnoho okyslennya lipidiv ta okyslyuvalnoyi modyfikaciyi bilkiv v organizmi shhuriv pry diyi metsulfuron-metylu v malyh dozah [Status of lipid peroxidation and oxidative modification of proteins in rats when exposed to metsulfuron-methyl in small doses]. *Suchasni problemy toksykologiyi — Modern problems of toxicology*, 2005, no 4, pp. 53–57 (in Ukrainian).

11. Tymoshenko M., Gajda L., Kravchenko O., Ostapchenko L. Vmist

vidnovlenogo glutationu v klitynah slyzovoyi obolonky shlunka za umov eksperymentalnoho gastrokancerohenezu [The content of reduced glutathione in the cells of the gastric mucosa under experimental hastrokantserohenez]. *Visnyk Kyivskoho nacionalnoho universytetu imeni Tarasa Shevchenka. — Bulletin of Kyiv National Taras Shevchenko University*, 2011, no 14, pp. 37–39 (in Ukrainian).

12. Moin V. M. Prostoy i spetsificheskyy metod opredeleniya aktivnosti glutationperoksidazy v eritrothitah [Simple and specific method determination of glutathione peroxidase activity in erythrocytes]. *Lab. Delo — The Lab. Work*, 1986, no. 12, pp. 724–727 (in Russian).

13. Carlberg I., Mannervik B. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *J. Biol. Chem.*, 1975, vol. 250, pp. 5475–5480.

14. Hissin P. J., Hilf R. A. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Analyt. Biochem.*, 1976, no.74, pp. 214–226.

15. Korobeynikova E. N. Modifikatsiya opredeleniya POL v reakzii s TBK [Modification of determination of lipid peroxidation in reaction with TBA]. *Lab. Delo — The Lab. Work*, 1989, no. 7, pp. 8–10 (in Russian).

16. Mironchik V. V. Sposob opredeleniya gidroperekisey lipidov v biologicheskikh tkanyach. [Method of determination of lipid hydroperoxides in biological tissues]. Patent SU, no. 1084681, 1984 (in Russian).

17. Lowry O. H. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Biol. Chem.*, 1951, vol. 193, No 1, pp. 265–275.

18. Zenkov N. K., Menschikova E. B., Tkachev V. O. Nekotorye printsipy i mehanizmy redoks-regulyatsii [Some of the principles and mechanisms of redox regulation]. *Kislород i antioksidanty — Oxygen and antioxidants*, 2009, no. 1, pp. 3–64 (in Russian).

19. Mogurova T. V., Lazareva D. N. Vliyanie lekarstvennykh sredstv na svobodno-radikalnoe okislenie [The influence of drugs on the free-radical oxidation]. *Ekspirim. i klin. farmakologiya — Experimental and clinical pharmacology*, 2000, vol. 63, no 1, pp. 71–75 (in Russian).

20. Dubinina O. Yu. Okyslyuvalnyy stres i okyslyuvalna modyfikatsiya bilkiv [Oxidative stress and oxidative modification of proteins]. *Medychna himiya — Medical chemistry*, 2001, issue 3, no 2, pp. 5–12 (in Ukrainian).

Стаття надійшла до друку 07.06.2013 р.