

УДК 577.15:636.4:087.7:612.015.3

ПРИЖИТТЄВЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ВЛИВУ ХЛОРПІРИФОСУ НА НЕЙРОНИ ГІПОКАМПУ ЩУРІВ В УМОВАХ КУЛЬТУРИ КЛІТИН

Ю. Т. Салига, В. В. Влізло
yursalyha@yahoo.com

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

Хлорпірифос належить до фосфорорганічного класу сполук, який широко використовується в якості пестицидів. Одним з ключових механізмів дії хлорпірифосу є його здатність інгібувати ензими холінестеразного ряду. Дослідження вчених різних країн, проведені в останні роки, довели існування також інших холіннезалежних механізмів впливу цієї речовини на живий організм. На жаль, зростає кількість наукових даних, які свідчать про те, що хлорпірифос є набагато небезпечнішим для організму, особливо дитячого, ніж вважали раніше. Нервова система — найуразливіша мішень згаданого вище токсиканта. Відомо, що хлорпірифос порушує нормальну життєдіяльність нервових клітин на різних етапах їх розвитку. У зв'язку з цим актуальним є пошук сучасних інформативних способів вивчення нейротоксичності цієї сполуки і з'ясування її особливостей.

У цій роботі поставили за мету апробувати метод прижиттєвого мікроскопування первинної культури клітин гіпокампу для дослідження їх росту, розвитку і життєдіяльності при внесенні в інкубаційне середовище хлорпірифосу, а також встановити наявність кількісних змін цих параметрів залежно від дози досліджуваного токсиканту і тривалості його дії. Для візуалізації нервових клітин проводили їх генетичне модифікування зеленим

*флуоресцентним білком (GFP) методом магнетофекції. Вивчали нейротоксичний вплив хлорпірифосу на клітини гіпокампу за умов *in vitro*, вносячи препарат у культуральне середовище в концентраціях 5; 15 і 30 μM . Якісний і кількісний аналіз інкубованих нейронів здійснювали через 24; 48 і 72 години експерименту.*

Було підібрано оптимальні параметри і апробовано спосіб прижиттєвого дослідження впливу хлорпірифосу на ріст, розвиток і життєдіяльність нейронів гіпокампу в умовах первинної культури клітин.

*Встановлено, що хлорпірифос при його внесенні до культурального середовища в концентраціях 5; 15 і 30 μM викликає статистично вірогідне ($p < 0,05$) дозозалежне ушкодження та, як наслідок — загибель нейронів гіпокампу в умовах *in vitro*. Водночас виявлено статистично вірогідні ($p < 0,05$) відмінності у показниках життєздатності гіпокампіальних нейронів залежно від тривалості дії на них досліджуваної фосфорорганічної сполуки.*

Ключові слова: ГІПОКАМП, ЗЕЛЕНИЙ ФЛУОРЕСЦЕНТНИЙ БЛОК, КУЛЬТУРА КЛІТИН, КЛІТИННА СМЕРТЬ, НЕЙРОН, НЕЙРОТОКСИЧНІСТЬ, ТРАНСФЕКЦІЯ, ХЛОРПІРИФОС

INTRAVITAL STUDY OF CHLORPYRIFOS EFFECTS ON HIPPOCAMPAL NEURONS OF RATS IN CONDITIONS OF CELL CULTURE

Y. T. Salyha, V. V. Vlizlo
yursalyha@yahoo.com

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

Chlorpyrifos belongs to the class of organophosphate compounds which are widely

used as pesticides. One of the key mechanisms of chlorpyrifos effect is its ability to inhibit

cholinesterases. Research works of scientists from different countries, conducted in recent years have shown the existence of other — cholinesterase-independent mechanisms of influence of this substance on a living organism. Unfortunately, there is the growing amount of scientific data showing that chlorpyrifos is much more dangerous for the animal and human organism, especially for children than previously thought. Nervous system is the most vulnerable target of this toxicant. It is known that chlorpyrifos violates normal activity at different stages of nervous cells development. In connection with this, the search for informative ways to explore the neurotoxicity of this compound and determine its features is very actual.

In this paper, we set a goal to test the method of intravital microscopy of primary hippocampal cell cultures to study their growth, development and functioning under the condition of adding to the incubation medium of chlorpyrifos, as well as to establish the existence of quantitative changes of these parameters depending on the dose and duration of the studied toxicant. To visualize nerve cells we used their genetic modification with the green fluorescent protein (GFP) by the method of magnetofection. We studied the neurotoxic effects of chlorpyrifos

on hippocampal cells in vitro, adding the chlorpyrifos into the culture medium in concentrations of 5, 15 and 30 μ M. Qualitative and quantitative analysis of neurons incubated during 24, 48 and 72 hours of the experiment was made.

Optimal parameters of the method of intravital study of the chlorpyrifos effect on growth, development and the livelihoods of hippocampal neurons in primary cell culture were chosen.

It was found that chlorpyrifos adding into the culture medium in concentrations of 5, 15 and 30 μ M lead to statistically significant ($p < 0.05$) dose-dependent damage and as a consequence — the cell death of hippocampal neurons in vitro. Simultaneously, statistically significant ($P < 0.05$) differences in parameters of neurons viability depending on the duration of studied organophosphorus compound action were observed.

Key words: HIPPOCAMPUS, GREEN FLUORESCENT PROTEIN, CELL CULTURE, CELL DEATH, NEURONS, NEUROTOXICITY, TRANSFECTION, CHLORPYRIFOS

ПРИЖИЗНЕННОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ХЛОРПИРИФОСА НА НЕЙРОНЫ ГИППОКАМПА КРЫС В УСЛОВИЯХ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК

Ю. Т. Салыга, В. В. Влизло
yursalyha@yahoo.com

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

Хлорпирифос относится к классу фосфорорганических соединений, который широко применяется в качестве пестицидов. Одним из ключевых механизмов действия хлорпирифоса является его способность ингибировать ферменты холинэстеразного ряда. Исследования ученых разных стран, проведенные в последние годы доказали существование также других — холиннезависимых механизмов влияния этого вещества на живой организм. К сожалению, постоянно возрастает количество научных данных, свидетельствующих о том, что хлорпирифос намного опаснее для организма, особенно детского, чем считалось ранее. Нервная система — самая уязвимая мишень упомянутого выше токсиканта. Известно, что хлорпирифос нарушает нормальную

жизнедеятельность нервных клеток на разных этапах их развития. В связи с этим актуальным является поиск современных информативных способов изучения нейротоксичности этого соединения и выяснения ее особенностей.

В этой работе мы поставили цель апробировать метод прижизненного микрофотографирования первичной культуры клеток гиппокампа для исследования их роста, развития и жизнедеятельности при внесении в инкубационную среду хлорпирифоса, а также установить наличие количественных изменений этих параметров в зависимости от дозы исследуемого токсиканта и длительности его действия. Для визуализации нервных клеток проводили их генетическое модифицирование зеленым флуоресцентным

белком (GFP) методом магнетофекции. Изучали нейротоксическое влияние хлорпирифоса на клетки гиппокампа в условиях *in vitro*, внося препарат в культуральную среду в концентрациях 5; 15 и 30 μM . Качественный и количественный анализ инкубированных нейронов осуществляли через 24, 48 и 72 часа эксперимента.

Был осуществлен подбор оптимальных параметров и апробирован способ прижизненного исследования влияния хлорпирифоса на рост, развитие и жизнедеятельность нейронов гиппокампа в условиях первичной культуры клеток.

Установлено, что хлорпирифос при его внесении в культуральную среду в концентрациях 5; 15 и 30 μM вызывает статистически достоверные ($p < 0,05$) дозозависимые повреждения и, как следствие — гибель нейронов гиппокампа в условиях *in vitro*. Вместе с тем выявлены статистически достоверные ($p < 0,05$) различия в показателях жизнеспособности гиппокампальных нейронов в зависимости от продолжительности действия на них исследуемого фосфорорганического соединения.

Ключевые слова: ГИППОКАМП, ЗЕЛЕНЫЙ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ БЕЛОК, КУЛЬТУРА КЛЕТОК, КЛЕТОЧНАЯ СМЕРТЬ, НЕЙРОН, НЕЙРОТОКСИЧНОСТЬ, ТРАНСФЕКЦИЯ, ХЛОРПИРИФОС

Уже багато років у біології застосовуються різноманітні техніки світлової, електронної, конфокальної, лазерної та інших типів мікроскопії. Але для використання переважної більшості з них досліджуваний препарат має бути зафіксований і відконтрастований чи забарвлений певним барвником, тобто, як правило, бути не живим. Це, звичайно, накладає серйозні обмеження для вивчення тканин чи клітин у процесі їх життєдіяльності, динаміці їх росту та розвитку. Відкриття явища природної флуоресценції, а невдовзі розробка методів забезпечення примусового «світіння» окремих клітин, тканин і навіть цілих організмів за допомогою їх генетичної модифікації флуорофорами стало справжнім проривом у сучасній науці. У 1962 році американський біохімік японського походження Осаму Сімомура вперше виділив зелений флуоресцентний білок (англ. Green Fluorescent Protein, GFP) з медузи *Aequorea victoria*. Цей білок (рис. 1) масою 26,9 кДа складається з 238 амінокислотних залишків і флуоресцує зеленим світлом при збудженні світлом синього кольору.

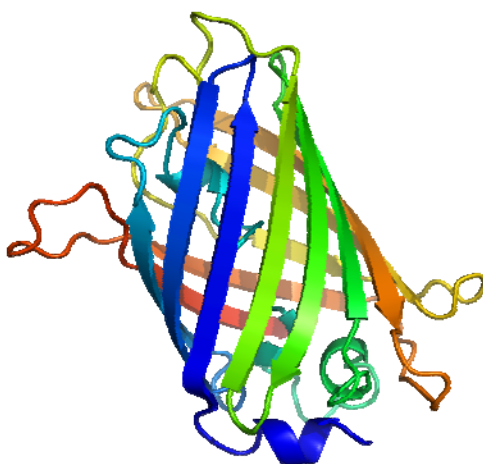


Рис. 1. Тривимірна структура (стрічкова діаграма) зеленого флуоресцентного білка (GFP). Білок представляє собою типову бета-складчасту структуру з 11 поворотів первинної послідовності у формі «бочечки» чи «циліндра», всередині якого є флуорофор*. (*джерело зображення — Банк даних білків (Protein Data Bank, PDB))

Однак застосування GFP в молекулярній біології почалося лише в 1990 роках, відколи він став неперевершеним інструментом візуалізації структур і процесів у живих клітинах, їхніх органелах і організмах від бактерій до ссавців. У 1992 році було клоновано і секвеновано ДНК зеленого флуоресцентного білка. Науковці розпочали використовувати GFP як генетичний маркер, зшиваючи ген GFP воедино з генами інших білків, або вводили мРНК GFP у різного типу клітини. Таким чином, епохальне відкриття GFP, яке, до речі, було відзначено 2008 року Нобелівською премією, зробило можливим «забарвлювати» для флуоресцентного мікроскопування живі клітини та організми. Це виводить на якісно вищий рівень різнопланові дослідження, в тому числі і ті, які стосуються впливу окремих токсичних факторів на життєдіяльність клітини. Культивування клітин *in vitro* дозволяє оцінювати не лише морфологічні та біохімічні зміни, які у них спостерігаються, але і прослідковувати прижиттєву динаміку таких змін, а також реакцію клітин на вплив різноманітних зовнішніх чинників. Вирощуючи клітини в культурі, науковці отримують можливість діяти на них досліджуваними речовинами, наприклад, лікарськими препаратами, гормонами, вітамінами, токсинами та ін. у дуже чітко заданому дозуванні та тривалості цієї дії [10]. Вирішили застосувати GFP-флуоресценцію для прижиттєвого вивчення дії хлорпірифосу на нейрони гіпокампу щурів в умовах культури клітин.

Хлорпірифос — це фосфорорганічна сполука, яка широко відома, перш за все, як основний діючий компонент багатьох пестицидів, зокрема таких, як «Піринекс», «Дурсбан», «Лорсбан», «Сайрен» та ін. Застосовується хлорпірифос переважно як інсекто-акарицид широкого спектру дії. Відомо, що при потрапленні в організм тварин і людини цей препарат може чинити токсичну дію на ряд органів і систем, зокрема серцево-судинну, дихальну,

репродуктивну та інші, але основною і найбільш вразливою мішенню токсичного впливу хлорпірифосу є центральна нервова система організму [1, 6, 8, 15]. Донедавна цей вплив пояснювали тим, що хлорпірифос, як і інші фосфорорганічні речовини інгібує холінестерази — ензими класу гідролаз карбонових кислот. Основний з них — ацетилхолінестераза (КФ 3.1.1.7) (АХЕ) відіграє ключову роль у процесах нейрогуморальної і синаптичної передачі, каталізуючи гідроліз ацетилхоліну в холінергічних синапсах, і в такий спосіб, припиняючи вплив цього медіатора на холінорецептор, що відповідає за збудження нервового волокна. Фосфорорганічні сполуки, в тому числі хлорпірифос, гідролізуються в активному центрі згаданого ензиму, залишок фосфору взаємодіє з ОН-групою серину активного центру з утворенням так званого «Фосфор-ензиму». У наступній стадії каталізу відбувається гідроліз цього «Фосфор-ензиму» водою, але утворення вільного ензиму проходить надзвичайно повільно і його активність практично не відновлюється. Внаслідок цього в організмі відбувається накопичення негідролізованого ацетилхоліну, що призводить спочатку до прискореної передачі нервових імпульсів (збудження) і далі, навпаки — до блокування їх передачі (параліч). Проте в останні роки було неодноразово показано, що механізми нейротоксичної дії хлорпірифосу не обмежуються тільки інгібуванням ним холінестерази. Зокрема, виявлено, що хлорпірифос, а також його метаболіти можуть пригнічувати явища клітинної реплікації і диференціації шляхом порушення процесів зв'язування з ДНК ядерних факторів транскрипції, таких як AP-1 і Sp1 [4, 5]. Також встановлено, що хлорпірифос індукує виникнення оксидативного стресу, який можна описати як дисбаланс окисно-відновної рівноваги у клітині внаслідок надмірного утворення активних форм Оксигену (АФО), або ж порушення функціонування системи антиоксидантного захисту [13, 14].

А нервові клітини, як добре відомо, є надзвичайно чутливими до оксидативного стресу у зв'язку з їх великою залежністю від окисного фосфорилування — процесу енергозабезпечення, в якому у результаті переносу електронів з НАДН або ФАДН₂ до О₂ рядом електронних переносників утворюється АТФ. Є підтвердження взаємозв'язку між оксидативним стресом і виникненням багатьох небезпечних патологій та розладів нервової системи, зокрема таких, як хвороби Альцгеймера, Паркінсона, Хантінгтона, бічного аміотрофічного склерозу та інших.

Таким чином, хлорпірифос діє на нервову систему, в тому числі і на процеси її розвитку, за рахунок поєднання ефектів, спрямованих як на холінергічні рецептори, так і на ланки внутрішньоклітинної сигналізації, які беруть участь у диференціації клітин, енергетичних і пластичних процесах.

Виходячи із вищеконстатованого, виникає потреба у розширенні і поглибленні досліджень різних аспектів нейротоксичності хлорпірифосу на клітинному рівні, в тому числі і в умовах *in vitro*. У цьому напрямку відома низка робіт, проведених на астроцитах, олігодендроцитах, на нейронах кори [3, 7], водночас клітини гіпокампу у цьому аспекті вивчені недостатньо. Необхідно наголосити, що саме гіпокамп є дуже важливою, часто ключовою і надзвичайно чутливою структурою мозку при багатьох видах неврологічних уражень, наприклад, вона є основною зоною дегенерації нейронів при хворобі Альцгеймера.

Метою цієї роботи було спочатку апробувати метод і підібрати оптимальні умови прижиттєвого мікроскопування первинної культури клітин гіпокампу для дослідження параметрів їх росту, розвитку і життєдіяльності при внесенні в інкубаційне середовище хлорпірифосу, а згодом встановити наявність кількісних і якісних змін цих показників у залежності від дози досліджуваного токсиканту і тривалості його дії, з'ясувати, чи викликає

хлорпірифос пошкодження клітин і їх загибель *in vitro*.

Матеріали і методи

Реагенти. У роботі використовували 99,9 % хлорпірифос (CAS № 2921-88-2) (О,О-диетил-О-3,5,6-трихлор-2-піридилфосфотіоат (C₉H₁₁Cl₃NO₃PS)) компанії Sigma Chemical (Сент-Луїс, Міссурі, США). Для приготування маточного розчину хлорпірифосу його розчиняли в диметилсульфоксиді (ДМСО) у концентрації 100 μМ, і зберігали при температурі -80 °С. Для кожного експерименту використовували свіжоприготовані розчини хлорпірифосу необхідних концентрацій.

Первинні культури нейронів гіпокампу щурів і трансфекція нейронів. Нейрони виділяли з гіпокампу ембріонів щурів лінії Вістар 18-денного віку. При цьому, всі маніпуляції з тваринами проводили відповідно до Європейської конвенції «Про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних і наукових цілей» (Страсбург, 1986 р.). З метою ферментативної дезагрегації клітин застосовували їх обробку 0,25 % трипсином протягом 15 хв при 37 °С. Після цього нервові клітини висівали на поверхню покривних скелець, покритих поліетиленіміном, дотримуючись щільності 70000 клітин на см². Нейрони культивували в мінімальному поживному середовищі (MEM), до якого додатково вносили 10 % сироватки Nu фірми BD Biosciences (Франція), 0,45 % глюкози, 1 мМ пірувату натрію, 1,5 мМ HEPES (4-(2-гідроксиетил)1-піперазинетансульфонова кислота), і 10 МО мл⁻¹ пеніцилін-стрептоміцину, як описано [2, 9, 11]. На 7, 10 і 13 доби інкубування культури клітин, половину поживного середовища замінювали середовищем MEM з додаванням 2 % B27 (Invitrogen, США).

Для трансфекції нейронів зеленим флуоресцентним білком (GFP) використовували метод магнетофекції —

новітній високоефективний спосіб перенесення генетичної інформації на основі доставки ДНК на металевих наночастинках під дією спрямованого магнітного поля. У віці 7–10 днів *in vitro* (DIV), змішані культури клітин гіпокампу були трансфектовані з використанням Magnetofection Kit (OZ Biosciences, Марсель, Франція) та ліпофектаміну 2000, як описано [2, 9, 11]. Для трансфекції культур, які вирощували у чашках діаметром 35 мм, 300 μ l середовища Opti-MEM змішували із 7 μ l ліпофектаміну 2000 (Invitrogen), 1,0 μ l реагенту Magnetofection CombiMag (OZ Bioscience, Франція) і 1–1,5 мкг рсДНК. Суміш інкубували протягом 20 хв при кімнатній температурі, а потім акуратно вносили її у чашки до культури нейронів на поверхню середовища. Чашки з культурами поміщали на спеціальні магнітні пластини (OZ Bioscience Марсель, Франція) і витримували так протягом 30–35 хв при 37 °С. Процес трансфекції зупиняли шляхом заміни 90 % інкубаційного розчину свіжим культуральним середовищем. Для трансфекції культур, які інкубували у планшетах з 4 лунками діаметром 16 мм, у кожну таку лунку вносили 60 μ l описаної вище суміші. В подальших експериментах використовували клітини через 2–5 діб після трансфекції.

Після трансфекції клітини досліджували за допомогою люмінесцентної мікроскопії. Культури з низьким рівнем трансфекції (<10 нейронів на покривне скельце) в експериментах не застосовували.

Мікроскопія живих культур нейронів гіпокампу. Інтервальну мікроскопію нервових клітин у процесі їх росту і розвитку проводили за допомогою інвертованого мікроскопа марки «Nikon TE300», який був обладнаний спеціальною CO₂ камерою (Princeton Instruments) у якій безперервно контролювався рівень вуглекислого газу і температура. Протягом трьох діб підряд, з використанням камери Micro-MAX CCD і програмного забезпечення MetaMorph (Roper Scientific)

отримували і аналізували зображення одних і тих же 20–30 трансфектованих нейронів за кожних окремих умов експерименту, знаходячи їх щоразу за системою координат. Одразу після процесу мікроскопування нейронів, чашки з культурами переносили у CO₂-інкубатор. Нейрони з нормальним розвитком дендритів, у яких спостерігався рівномірний розподіл GFP враховувалися як живі, тоді як нейрони з кластеризованим розподілом GFP або ті клітини, де GFP зникав, вважалися мертвими.

Статистичний аналіз. Всі дані підлягали статистичній обробці з використанням Т-тесту Стьюдента. Різниця в отриманих даних з $p < 0,05$ вважалися статистично достовірними.

Результати й обговорення

Перша частина роботи була присвячена пошуку оптимальних методичних підходів для прижиттєвої візуалізації і дослідження гіпокампальних нейронів щурів *in vitro* за впливу на них різних концентрацій хлорпірифосу. Як джерело для первинної культури клітин використовували гіпокамп, який виділяли із головного мозку ембріонів щурів 18-добового віку. Більшість клітин ссавців за умов культури здатні рости тільки у вигляді моношару, прикріпленого до певного субстрату, у якості якого може бути використане модифіковане алюмоборсилікатне скло, полікарбонат, поліетилен, полівінілхлорид, тефлон, високоякісна нержавіюча сталь, титан та деякі інші матеріали. У нашій роботі у якості такого субстрату застосовували поверхню покривних скелець, покритих поліетиленіміном. Варто наголосити, що культуру клітин готували, дотримуючись щільності 70000 клітин на см² поверхні субстрату. Більша густина клітин значно ускладнює, а то й повністю унеможливорює проведення їх кількісного і морфологічного аналізу.

Було складено і апробовано схему експерименту (рис. 2), згідно з якою для

введення у нервові клітини гіпокампу зеленого флуоресцентного білка застосували магнетофекцію — високоефективний метод трансфекції, що дозволяє з використанням магнітного поля здійснювати перенесення наночастинок з асоційованими на них нуклеїновими кислотами в клітини-мішені [2, 12]. Цей метод має ряд переваг над аналогічними біохімічними і фізичними способами трансфекції, зокрема є нетоксичним.

Враховуючи той факт, що у якості розчинника для хлорпірифосу використовували ДМСО, на першому етапі роботи необхідно було встановити можливий вплив цієї хімічної речовини на досліджувані культури клітин. Такі дослідження було проведено і вони показали відсутність дії ДМСО у використовуваних концентраціях на

життєздатність клітин і таким чином — можливість його застосування у подальших експериментах для розчинення хлорпірифосу.

Після трансфекції у культуральне середовище з нейронами вносили хлорпірифос у дозах 5, 15 і 30 μM і продовжували інкубувати клітини ще протягом трьох наступних діб. Через 24, 48 і 72 години здійснювали підрахунок живих клітин при кожних експериментальних умовах, а також проводили флуоресцентне мікроскопування вибраних нейронів у вказані проміжки часу. Наголосимо, що проводили візуалізацію та аналіз одних і тих самих нервових клітин щоразу, що дозволяє прослідковувати зміни їх морфологічних параметрів у віковій динаміці.

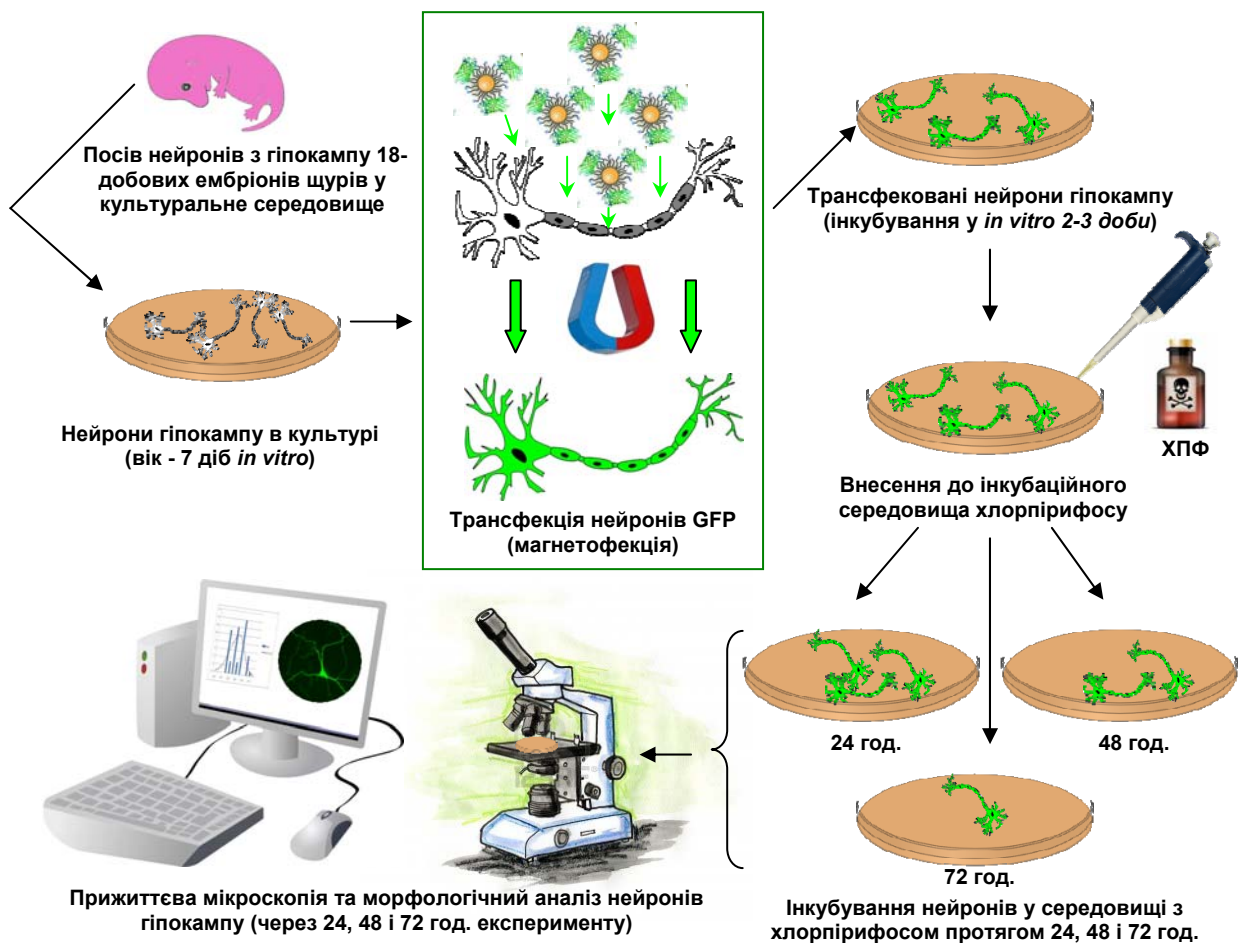


Рис. 2. Загальна схема експерименту з дослідження нейротоксичного впливу хлорпірифосу на нейрони гіпокампу щурів за умов *in vitro*

На рисунку 3 показано один з таких прикладів. Добре видно, що в контролі, тобто, за відсутності у середовищі для культивування хлорпірифосу (мікрофото I, II і III) нервова клітина нормально живе і розвивається протягом усього дослідного періоду, зелений флуоресцентний білок розміщений у сомі, аксоні, дендритах нейрону рівномірно. На відміну від неї, нейрон який інкубувався у середовищі з додаванням 15 μM хлорпірифосу (мікрофото IV, V і VI), має зовсім інший вигляд, розміщення GFP у тілі нейрона і його відростках кластеризоване. За таких умов під дією токсиканта відбуваються інтенсивні нейродегенеративні процеси. Через 48 годин інкубації з хлорпірифосом (мікрофото V) спостерігається чітко виражена інтенсивна вакуолізація його аксона та дендритів, що свідчить про наступний лізис клітини і як наслідок її загибель, яка була в цьому випадку констатована на 72 годину після внесення досліджуваного нейротоксину до культурального середовища (мікрофото VI).

Результати підрахунку кількості живих гіпокампіальних нейронів за умов впливу на них різними дозами хлорпірифосу протягом однієї, двох чи трьох діб представлені на рисунку 4. Із зображених на ньому діаграм видно, що всі використані у дослідженні дози хлорпірифосу чинили токсичну дію на культивовані клітини, яка виражалася у зменшенні кількості живих нейронів у середовищі з додаванням хлорпірифосу порівняно до аналогічних умов, але без застосування цього токсиканту. Через 24

години інкубування статистично достовірні зміни у кількості клітин спостерігали лише за найбільшої експериментальної концентрації хлорпірифосу — 30 μM . Такий вміст цієї токсичної речовини призводив до зниження кількості живих нейронів майже на 20 % у порівнянні до контролю, тобто відсутності у середовищі хлорпірифосу. Концентрації у 5 і 15 μM хлорпірифосу в середовищі викликали тенденцію до зменшення виживання клітин також уже через 24 години інкубування, але ці зміни були недостовірними.

Значно відчутнішою була дія хлорпірифосу у вказаних трьох концентраціях через 48 і, особливо, через 72 години після його внесення до культурального середовища. Так, через 48 годин 30 μM доза хлорпірифосу викликала загибель близько 45 % ($p < 0,05$) нейронів, а через 72 години — 85 % ($p < 0,05$) нервових клітин порівняно до контрольних умов інкубування, тобто без внесення токсиканта у середовище. Внесення хлорпірифосу у концентрації 5 μM спричиняло тенденцію до зменшення кількості живих клітин через 24 і 48 годин, а через 72 години зниження числа клітин, що вижили було статистично вірогідним ($p < 0,05$). Виявлено, що всі застосовані експериментальні концентрації досліджуваної фосфорорганічної сполуки (5, 15 і 30 μM) через 72 години призводили до статистично вірогідного ($p < 0,05$) зменшення кількості нейронів гіпокампу *in vitro* на 25, 45 і 85 % відповідно. За умов, коли хлорпірифос у культуральне середовище не додавали більшість (до 85 %) нейронів нормально розвивалися протягом 3 діб після початку експерименту.

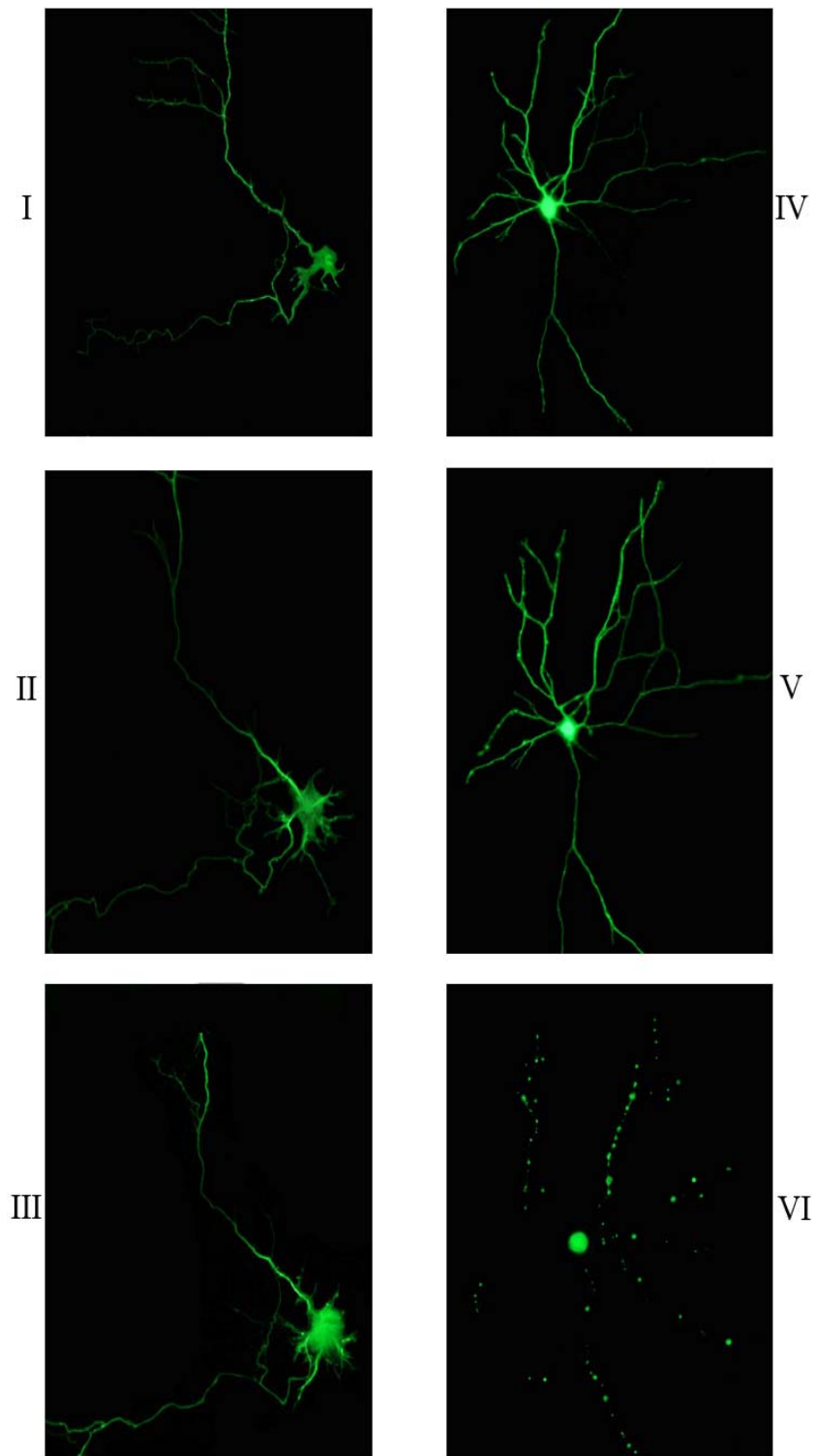


Рис. 3. Вживання нейронів трансфєкованих зеленим флуорисцентним білком у культурах без додавання хлорпірифосу (I, II, III) і аналогічних умовах, але з додаванням у культуральне середовище хлорпірифосу (IV, V, VI). I, II, III і IV, V, VI — зображення одних і тих же нейронів, сфотографовані через 24 (I, IV), 48 (II, V) і 72 (III, VI) години після початку експерименту

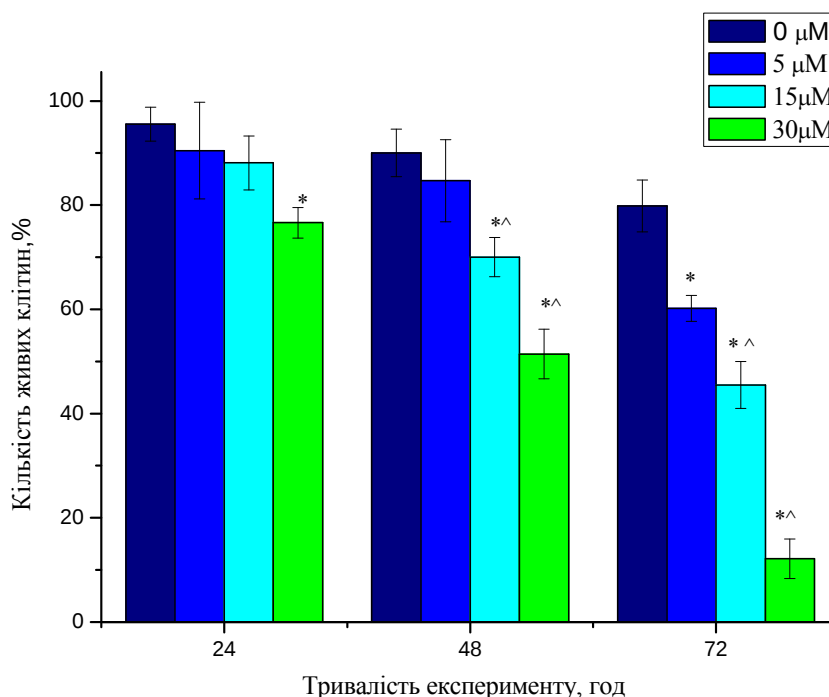


Рис. 4. Виживання нейронів протягом 72 годин експерименту в умовах культури клітин при внесенні у інкубаційне середовище хлорпірифосу у різних концентраціях (від 0 μM до 30 μM).

* — порівняно до 0 μM дози хлорпірифосу, ^ — порівняно до першої доби експерименту, $p < 0,05$

Отже, підсумовуючи результати, отримані в цій частині роботи, можемо з упевненістю стверджувати, що хлорпірифос викликає дозозалежне ушкодження та, як наслідок — загибель нейронів гіпокампу в умовах *in vitro*. Водночас мають місце значні відмінності у показниках життєздатності нейронів залежно від тривалості дії на них досліджуваної фосфорорганічної сполуки.

Таким чином, вдалося підтвердити на первинній культурі гіпокампальних нейронів нейротоксичний ефект хлорпірифосу, що свідчить про його пошкоджуючу дію на процеси нормального розвитку і функціонування нервової системи ссавців, зокрема щурів. Паралельно наголосимо, що абсолютно ототожнювати метаболічні, морфологічні і генетичні характеристики інкубованих *in vitro* клітин до аналогічних особливостей клітин-складових цілісного організму не можна. За умов *in vitro* клітини, з одного боку, позбавлені від контролю нейрогуморальних факторів, а з другого —

змушені максимально пристосовуватися до штучно створених умов існування.

Висновки

Було підібрано оптимальні параметри усього методологічного ланцюга способу прижиттєвого дослідження впливу хлорпірифосу на ріст, розвиток і життєдіяльність нейронів гіпокампу в умовах *in vitro*: отримання від вагітних самок щурів ембріонів 18-добового віку → виділення головного мозку ембріонів → виділення з ембріонального мозку гіпокампу → отримання первинної культури гіпокампальних нейронів → трансфекція (магнетофекція) культивованих *in vitro* нейронів зеленим флуоресцентним білком → дія на трансфектовані нейрони хлорпірифосом у різних концентраціях → іміджинг (мікроскопійна прижиттєва візуалізація) досліджуваних клітин у віковій динаміці → аналіз виживання нейронів. Описаний вище алгоритм дозволяє з високим рівнем інформативності та достовірності проводити дослідження токсичної дії

хлорпірифосу на нервові клітини в умовах *in vitro*.

Виявлено нейротоксичну дію хлорпірифосу і її дозозалежні показники в умовах первинної культури гіпокампіальних клітин. Встановлено, що хлорпірифос при його внесенні до культурального середовища в концентраціях 5; 15 і 30 μM викликає статистично вірогідне ($p < 0,05$) дозозалежне ушкодження та, як наслідок — загибель нейронів гіпокампу в умовах *in vitro*. Водночас виявлено статистично вірогідні ($p < 0,05$) відмінності у показниках життєздатності гіпокампіальних нейронів залежно від тривалості дії на них досліджуваної фосфорорганічної сполуки.

Перспективи подальших досліджень полягають у з'ясуванні біохімічних та молекулярних механізмів токсичного впливу хлорпірифосу на нервові клітини.

Подяки

Частина цієї роботи була виконана у лабораторії розвитку пластичності ГАМК-ергічних синапсів Середземноморського інституту нейробіології (INMED INSERM, м. Марсель, Франція). У зв'язку з цим висловлюємо слова найщирішої подяки керівнику цієї лабораторії — доктору І. Медині за надану можливість використовувати устаткування його лабораторії, а також за безцінні поради і консультації.

1. Bjorling-Poulsen M., Andersen H. R., Grandjean P. Potential developmental neurotoxicity of pesticides used in Europe. *Environmental Health*, 2008, vol. 7. Available at: <http://www.ehjournal.net/content/7/1/50> (Accessed 22 October 2008).

2. Buerli T., Pellegrino C., Baer K., et al., Efficient transfection of DNA or shRNA vectors into neurons using magnetofection. *Nature Protocols*, 2007, vol. 2, pp. 3090–3101.

3. Campbell C. G., Seidler F. J., Slotkin T. A., et al. Chlorpyrifos interferes with cell development in rat brain regions. *Brain Res. Bull.*, 1997, no. 43, pp. 179–189.

4. 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, vol. 78, no. 1, pp. 125–134.

5. Crumpton T. L., Seidler F. J., Slotkin T. A., et al. Developmental neurotoxicity of chlorpyrifos *in vivo* and *in vitro*: effects on nuclear transcription factor involved in cell replication and differentiation. *Brain Res.*, 2000, no. 857, pp. 87–98.

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

7. Garcia S. J., Seidler F. J., Qiao D., et al. Chlorpyrifos targets developing glia: effects on glial fibrillary acidic protein. *Brain Res. Dev. Brain Res.*, 2002, vol. 133, pp. 151–161.

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

9. Ivanov A., Pellegrino C., Rama S., et al., Opposing role of synaptic and extrasynaptic NMDA receptors in regulation of the ERK activity in cultured rat hippocampal neurons. *J. Physiol.*, 2006, vol. 572, no. 3, pp. 789–798.

10. Millet L. J., Gillette M. U. Over a century of neuron culture: From the Hanging drop to Microfluidic devices. *The Yale J. of Biol. and Med.*, 2012. Vol. 85, no. 4, pp. 501–521.

11. Pellegrino C., Gubkina O., Becq H., et al., Knocking-down of the KCC2 in rat hippocampal neurons increases intracellular chloride concentration and compromises neuronal survival. *J. Physiol.*, 2011, vol. 589, pt. 10, pp. 2475–2496.

12. Plank C., Schillinger U., Scherer F., et al. The magnetofection method: using magnetic force to enhance gene delivery. *Biol. Chem.*, 2003, vol. 384, no. 5, pp. 737–47. doi:10.1515/BC.2003.082.

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

14. 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.

15. Vlizlo V. V., Salyha Yu. T. Problemy biologichnoyi 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).