

ВПЛИВ ХЛОРПРИФОСУ НА ДЕЯКІ ФІЗІОЛОГО-БІОХІМІЧНІ ПОКАЗНИКИ РИБ *DANIO RERIO**

В. В. Довганюк, В. П. Росаловський, Ю. Т. Салига
DovhanyukV@inenbiol.com.ua

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

У роботі досліджено окремі фізіолого-біохімічні показники риб *Danio rerio* за умов їх токсичного ураження хлорпірифосом — однією з широковідомих фосфорорганічних сполук, яка є діючою речовиною багатьох пестицидів.

Дослідження проведені на дорослих рибах *Danio rerio* з середньою масою 0,6 г по 10 особин у групі. Для визначення показників токсичності хлорпірифосу (ХПФ) експериментальні групи риб поміщали в акваріуми об'ємом 5 л на 96 год з водою, до якої вносили ХПФ у діапазоні концентрацій 0,375–2 мг/л. Біохімічні дослідження проводили у плазмі крові, яку відбирали у риб за різних доз і тривалості дії ксенобіотика.

Визначено параметри гострої токсичності хлорпірифосу для риб *Danio rerio* при внесенні його в акваріумну воду. За тривалості експерименту 96 год максимальна концентрація хлорпірифосу, при якій не було загибелі риб *Danio rerio*, становила 0,375 мг/л, абсолютна смертельна концентрація — 2 мг/л, напівлетальна концентрація (LC_{50}) — 1,23 мг/л.

Інттоксикація риб *Danio rerio* за обраних доз та тривалості дії хлорпірифосу супроводжується зниженням холінергетичної активності плазми крові. За дії хлорпірифосу в дозі 1 мг/л на 16,5 % ($P < 0,05$) зростає кількість гемолізованих еритроцитів; це може свідчити про виникнення структурних пошкоджень білково-ліпідного матриксу їх мембран. Водночас тривалість гемолізу еритроцитів риб дослідних груп, порівняно з контрольними, не зазнає вірогідних змін.

Отримані результати доводять ефективність застосування риб *Danio rerio* як біологічної моделі для токсикологічних досліджень фосфорорганічних сполук, зокрема хлорпірифосу.

Ключові слова: ХЛОРПРИФОС, *DANIO RERIO*, ОТПРУСННЯ, ХОЛІНЕСТЕРАЗА, КРОВ

INFLUENCE OF CHLORPYRIFOS ON SOME PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL INDICES OF *DANIO RERIO*

V. V. Dovhanyuk, V. P. Rosalovsky, Yu. T. Salyha
DovhanyukV@inenbiol.com.ua

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

Physiological and biochemical parameters of *Danio rerio* fish with toxic injury by chlorpyrifos, one of the most well-known organophosphorus compounds, an active substance of many pesticides were studied.

The studies were conducted on adult *Danio rerio* fishes with an average weight of 0.6 g per 10 individuals per group. To determine the toxicity of chlorpyrifos, the experimental groups of fishes were placed in 5 l aquariums for 96 hours with water in which chlorpyrifos was added in the range of concentrations of 0.375–2 mg/l. Biochemical studies were carried out in blood plasma, which was taken from fish at different concentrations and duration of exposure to the xenobiotic.

The parameters of the acute toxicity of chlorpyrifos for *Danio rerio* were determined. With experiment duration of 96 hours, the maximum concentration of chlorpyrifos, in which the death of *D. rerio* fish was not fixed, was 0.375 mg/l, the absolute lethal concentration was 2 mg/l, half-lethal concentration (LC_{50}) was 1.23 mg/l.

Danio rerio intoxication by selected concentrations and duration of chlorpyrifos was accompanied by a decrease of cholinesterase activity in blood plasma; at the influence of chlorpyrifos at the concentration of 1 mg/l, an increase in the number of hemolysed erythrocytes was observed at 16.5 % ($P < 0.05$), which may indicate a structural damage to the protein-lipid matrix of erythrocytes membranes, while the duration of hemolysis of erythrocytes of experimental fish compared to control did not undergo significant changes.

* Публікація містить результати досліджень, проведених за грантом Президента України за конкурсним проектом № Ф78/197-2018.

*The obtained results prove the efficiency of the use of *Danio rerio* fish as a biological model for toxicological studies of organophosphorus compounds, in particular chlorpyrifos.*

Keywords: CHLORPYRIPHOS, *DANIO RERIO*, INTOXICATION, CHOLINESTERASE, BLOOD

ВЛИЯНИЕ ХЛОРПИРИФОСА НА НЕКОТОРЫЕ ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ РЫБ *DANIO RERIO*

В. В. Довганюк, В. П. Росаловский, Ю. Т. Салыга
DovhanyukV@inenbiol.com.ua

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

В работе исследованы отдельные физиолого-биохимические показатели рыб *Danio rerio* в условиях их токсического поражения хлорпирифосом — одним из широко известных фосфорорганических соединений, которое является действующим веществом многих пестицидов.

Исследования выполнены на взрослых рыбах *Danio rerio* со средней массой 0,6 г по 10 особей в группе. Для определения показателей токсичности хлорпирифоса рыб опытных групп помещали в аквариумы объемом 5 л на 96 ч с водой, в которую его вносили в диапазоне концентраций 0,375–2 мг/л. Биохимические исследования проводили в плазме крови, которую отбирали у рыб при различных концентрациях и длительности воздействия на них ксенобиотика.

Определены параметры острой токсичности хлорпирифоса для рыб *Danio rerio* при внесении его в аквариумную воду. При продолжительности эксперимента 96 ч максимальная концентрация хлорпирифоса, при которой не отмечали гибели рыб *D. rerio*, составила 0,375 мг/л, абсолютная смертельная концентрация — 2 мг/л, полулетальная концентрация (LC_{50}) — 1,23 мг/л. Интоксикация рыб *Danio rerio* за избранных доз и длительности действия хлорпирифоса сопровождается снижением холинэстеразной активности в плазме крови; при действии хлорпирифоса в дозе 1 мг/л на 16,5 % ($P < 0,05$) возрастает количество гемолизированных эритроцитов, что может свидетельствовать о возникновении структурных повреждений белково-липидного матрикса их мембран. Одновременно продолжительность гемолиза эритроцитов рыб опытных групп достоверно не изменяется в сравнении с контролем.

Полученные результаты доказывают эффективность применения рыб *Danio rerio* в качестве биологической модели для токсикологических исследований фосфорорганических соединений, в частности хлорпирифоса.

Ключевые слова: ХЛОРПИРИФОС, *DANIO RERIO*, ОТРАВЛЕНИЕ, ХОЛИНЭСТЕРАЗА, КРОВЬ

Хлорпірифос (ХПФ) — один із найпопулярніших фосфорорганічних пестицидів, який широко використовують в агропромисловому секторі багатьох країн, зокрема України [12, 14]. У зв'язку з цим існують значні ризики отруєнь та шкідливих впливів ХПФ на здоров'я населення, особливо дітей [3, 6]. Основним механізмом токсичної дії ХПФ, як і інших фосфорорганічних сполук (ФОС), є незворотне інгібування ацетилхолінестерази (АХЕ), що призводить до порушень у передачі нервових імпульсів. Проте, крім описаного, в організмі існує низка інших біологічних мішеней, які можуть зазнавати впливу ФОС. Тому виникає велика потреба глибшого дослі-

дження біохімічних особливостей токсичної та нейрофізіологічної дії ФОС; встановлення найнебезпечніших з них у контексті екологічних та медико-біологічних, навіть воєнних загроз (ФОС можуть бути використані як хімічна зброя); розроблення нових фізіолого-біохімічних та молекулярно-біологічних методів вивчення впливу окремих ФОС на організм людини і тварин.

Дедалі частіше в багатьох галузях експериментальної біології як біологічну модель успішно використовують риб виду *Danio rerio*. Відносно невисока, порівняно з експериментами на ссавцях, вартість робіт, можливість формування великої вибірки тварин дозволяє

використовувати їх як недорогого альтернативу тест-системам на гризунах [4, 9, 13, 15].

Метою роботи було апробувати цей вид риб як можливу біомодель, придатну для вивчення токсичних ефектів хлорпірифосу на окремі фізіолого-біохімічні параметри.

Матеріали і методи

Дослідження виконані в лабораторії обміну речовин імені С. Гжицького Інституту біології тварин НААН на акваріумних рибах *D. rerio*. Усі маніпуляції проводили відповідно до Європейської конвенції «Про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних і наукових цілей» від 18.03.1986 р., Директиви ЄС № 609 від 24.11.1986 р. і «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим Національним конгресом з біоетики у Києві 2001 р. Дослідних риб *D. rerio* утримували у скляних акваріумах об'ємом 20 л, обладнаних автоматизованими системами освітлення (люмінесцентні лампи, які працювали у автоматичному режимі перемикання 14 год. світло / 10 год. темрява), аерації, нагріву та фільтрування води.

Для експериментальних акваріумів застосовували водопровідну воду, яку з метою дехлорування попередньо витримували щонайменше протягом двох діб. З метою зниження рівня твердості води, яка обумовлюється переважно кількістю розчиненого у ній карбонату кальцію (CaCO_3), а також солей Магнію та низки інших металів, її змішували навпіл з дистильованою водою. Фізико-хімічні параметри акваріумної води підтримували у такому діапазоні значень: температура (t) $+26 \dots +28$ °C, кислотність (pH) — 7. Значення pH води перевіряли щодня і підтримували на стабільному рівні, за необхідності додаючи у воду бікарбонат натрію. Варто наголосити, що важливість кислотності води в експериментах з вивчення токсичності внесеного у неї ХПФ є критично важливою з огляду на те, що період напіврозпаду фосфорорганічних пестицидів у водних розчинах суттєво залежить від рівня pH. За проведення усіх експериментів обов'язково здійснювали контроль акваріумної води на вміст у ній нітратів, концентрація яких

не перевищувала 20 мг/л. Крім того, в межах одного експерименту домагалися, щоб міжгрупові різниці у концентрації нітратів не відрізнялися між собою більше, ніж на 3 мг/л. Аналіз вмісту нітратів проводили за допомогою «Нітратоміра лабораторного Н-401» (Україна) не рідше, ніж один раз на дві доби. Кожні 7–14 діб здійснювали заміну від 15 до 20–25 % об'єму води в акваріумах.

Годівлю риб здійснювали двічі на добу в один і той самий час уніфікованим кормом, щоб уникнути можливих артефактів у досліджуваних фізіолого-біохімічних показниках.

Для дослідження параметрів гострої токсичності хлорпірифосу застосовували метод Кербера [8]. Для цього з риб *D. rerio* масою $0,6 \text{ г} \pm 15 \%$ формували дослідні і контрольну групи, по 10 особин у кожній і поміщали їх в акваріуми об'ємом 5 л на 96 год з водою, в яку вносили ХПФ у діапазоні концентрацій 0,375–2 мг/л. Обчислення LC_{50} здійснювали з використанням безпосередніх результатів експерименту за формулою:

$$\text{LC}_{50} = \text{LC}_{100} - (S(z \times d)/m),$$

де LC_{100} — концентрація досліджуваної речовини, яка викликала очікуваний ефект у всієї групи особин,

d — інтервал між кожними двома суміжними концентраціями,

z — середнє арифметичне з числа особин, у яких спостерігали очікувану реакцію під впливом кожних двох суміжних концентрацій,

m — число особин у кожній групі,

S — сума.

В експерименті з вивчення гострої токсичності ХПФ за його короткотривалої дії (3 хв) ксенобіотик вносили в акваріумну воду у концентрації 5 мг/л.

Забір крові у риб *D. rerio* проводили, як описано у F. Babaei et al. [2]. Риб попередньо знерухомлювали, поміщаючи їх на 10–20 сек у холодну воду температурою $+2 \dots +5$ °C. Після цього у риб гострим лезом відсікали хвостовий плавник, на рану наносили краплю гепарину, а рибу негайно переносили у перфоровану мікропробірку об'ємом 0,5 мл, яку поміщали

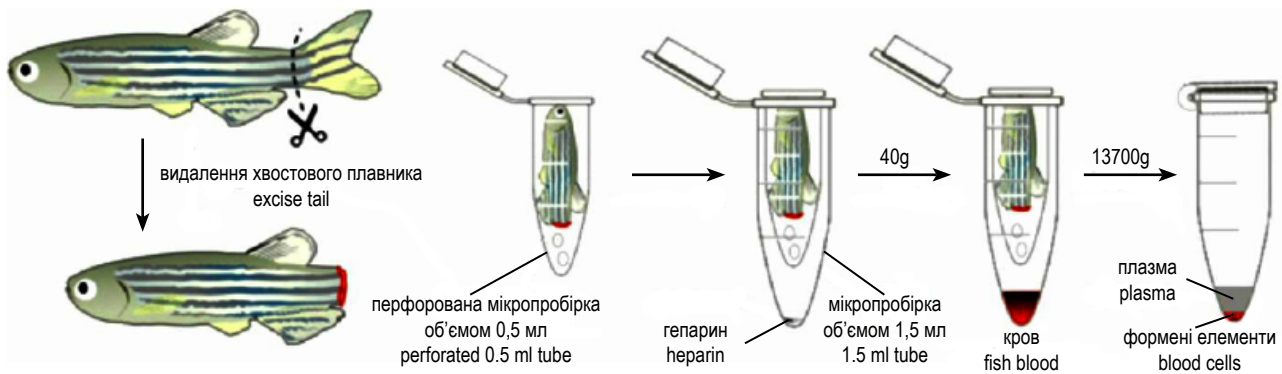


Рис. 1. Схематичне зображення основних етапів відбору крові у риб *Danio rerio* за F. Babaei et al. [2]

Fig. 1. Schematic representation of the main stages of blood sampling in *Danio rerio* fish by F. Babaei et al. [2]

у мікропробірку об'ємом 1,5 мл, куди попередньо вносили 10 мкл гепарину. Мікропробірки центрифугували впродовж 5 хв при 40 g за температури +11 °C, що забезпечувало максимальний відбір крові риби. Відібрану кров одразу центрифугували впродовж 15 хв при 13700 g за температури +4 °C для відділення формених елементів від плазми. Отриману плазму використовували для подальших біохімічних досліджень. Схематично описані етапи відбору крові показані на рис. 1.

Активність холінестерази (КФ 3.1.1.8) визначали за методом [7], який ґрунтується на тому, що під дією холінестерази (ХЕ) відбувається гідроліз ацетилхолінхлориду з утворенням оцтової кислоти і холіну, що супроводжується утворенням забарвленого комплексу. Оптичну густину вимірювали на спектрофотометрі при довжині хвилі 540 нм проти дистильованої води.

Резистентність еритроцитів крові риб *Danio rerio* за дії ХПФ до кислотного гемолізу визначали методом побудови кривих гемолізу еритроцитів [10]. 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: час максимального гемолізу (хв); відсоток гемолізованих еритроцитів у момент максимального гемолізу (% max); тривалість тотального гемолізу (хв). Відмиті еритроцити розводили 0,150 Мм NaCl у співвідношенні 1:1000. Отриману суспензію розводили для досягнення суспензії екстинції в межах 0,700–750 при довжині хвилі 630 нм. У кювету вносили 2 мл суспензії еритроцитів і додавали аналогічний

об'єм гемолізуючого розчину 0,004 Н HCl. З моменту додавання гемолітика через кожні 30 сек 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. Розподіл еритроцитів за резистентністю у % зображували у вигляді еритрограм — кривої залежності між процентом гемолізованих еритроцитів і часом гемолізу.

Отримані результати статистично опрацьовували за допомогою комп'ютерного пакета програм *OriginPro 8.5* (Microcal, США) з використанням *t*-критерію Стюдента. Вірогідно різними вважали результати при $P < 0,05$.

Результати й обговорення

Отримано такі результати визначення параметрів гострої токсичності ХПФ при введенні його у воду (рис. 2): у перші 24 год проведення дослідження загибель риб фіксували при

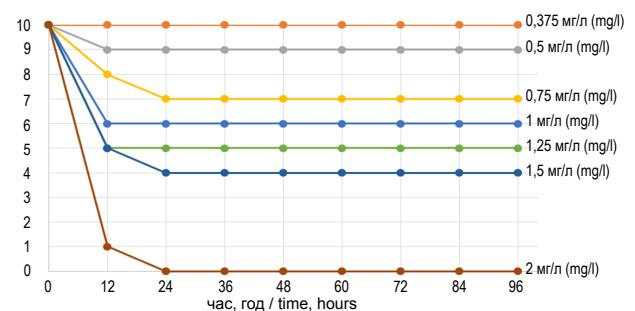


Рис. 2. Виживання риб *Danio rerio* за внесення у воду різних концентрацій хлорпірифосу (n=10)

Fig. 2. Survival of *Danio rerio* fish under the various concentrations of chlorpyrifos in water (n=10)

вищих концентраціях токсиканта — 1,5–2 мг/л, тоді як нижчі концентрації (0,375–0,5 мг/л) досліджуваного діапазону не спричиняли загибелі риб. У наступні 72 год спостерігали загибель частини дослідних риб у концентраціях ХПФ від 0,75 до 1,25 мг/л. Максимальна концентрація ХПФ, за якої не було загибелі риб *D. rerio*, становила 0,375 мг/л. За введення досліджува-

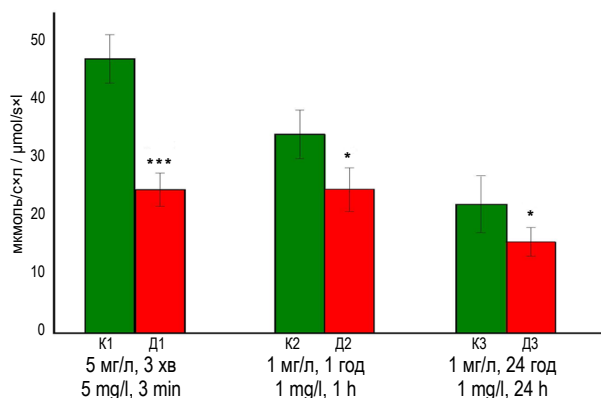


Рис. 3. Холінестеразна активність плазми крові *D. rerio* за дії хлорпірифосу у різних концентраціях 5 мг/л упродовж 3 хв (K1 D1); у концентрації 1 мг/л впродовж 1 год (K2 D2); у концентрації 1 мг/л впродовж 24 год (K3 D3) ($M \pm m$, $n=10$)

Fig. 3. Cholinesterase activity of blood plasma of *D. rerio* under the effect of chlorpyrifos at the concentration 5 mg/l during 3 min (K1 D1); at the concentration 1 mg/l during 1 h (K2 D2); at the concentration 1 mg/l during 24 h (K3 D3) ($M \pm m$, $n=10$)

Примітка: у цьому та наступних графіках * — $P < 0,05$; ** — $P < 0,01$; *** — $P < 0,001$ різниця вірогідна порівняно з контрольною групою.

Note: in this and next figures * — $P < 0.05$; ** — $P < 0.01$; *** — $P < 0.001$ difference significant compared to control group.

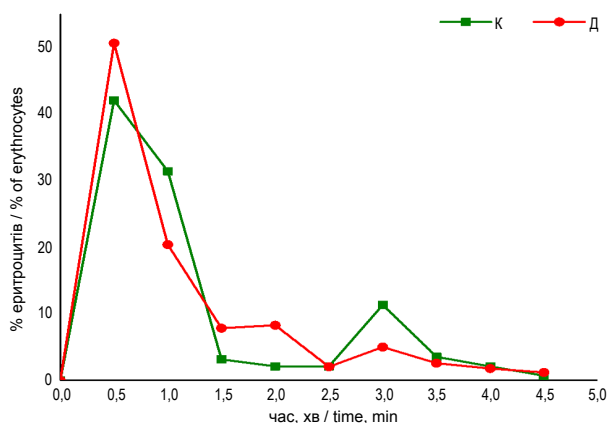


Рис. 4. Усереднені еритрограми риб *Danio rerio* контрольної (K) та дослідної (D) групи через 2 год після дії хлорпірифосу у концентрації 1 мг/л ($M \pm m$, $n=10$)

Fig. 4. Averaged erythrograms of *Danio rerio* fish in control (C) and experimental (D) groups 2 hours after effect of chlorpyrifos at the concentration of 1 mg/l ($M \pm m$, $n=10$)

ного пестициду у концентрації 0,5 мг/л було відмічено один випадок загибелі дослідних риб із 10. Абсолютна смертельна концентрація хлорпірифосу для риб *Danio rerio* становила 2 мг/л, а напівлетальна доза — 1,23 мг/л.

Оскільки загальноприйнятим індикаторним показником ступеня інтоксикації ФОС і, зокрема ХПФ, є холінестеразна ензиматична активність, було проведено визначення її активності у плазмі крові риб за різних доз і тривалості дії ХПФ. Встановлено, що найсуттєвіше (на 51,6 %) холінестеразна активність знижувалась через 3 хв після застосування ХПФ у дозі 5 мг/л, натомість при застосуванні ХПФ у дозі 1 мг/кг ензиматична активність ХЕ знижувалась на 36,2 % та 35,3 % на 1- та 24-ту год експерименту відповідно порівняно з контролем (рис. 3).

Варто зазначити, що взаємодія між ХПФ і активним центром ХЕ відбувається за типом конкурентного інгібування та призводить до незворотної втрати активності ензиму. Відновлення активності ХЕ можливе лише за синтезу ензиму *de novo*. У токсикологічному аспекті для прояву дії ХПФ на організм важливе значення мають екзогенні 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 ХЕ порівняно з іншими інсектицидами фосфорорганічної природи [3].

Зважаючи на функціональне значення еритроцитів у системі крові, сталість фізико-хімічних характеристик їх мембран, реакції органів і тканин за дії ендогенних та екзогенних чинників можуть викликати зміни динаміки метаболічних процесів у цих клітинних структурах. У механізмах рН-індукованого гемолізу першими зазнають пошкодження саме мембрани еритроцитів. Тому час, впродовж якого мембрана забезпечує опірність до стресу, може бути використаний як критерій оцінки її фізико-хімічного стану. Зниження осмотичної резистентності еритроцитів відбувається внаслідок структурних змін еритроцитів, що призводять до виникнення захворювання, ускладнень і структурних порушень. На резистентність

еритроцитів впливають процеси фізіологічного старіння, стрес, склад кормів, рН середовища, температура, токсиканти та інші чинники [1, 5].

Одним із факторів, який 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 мембранна цілісність в умовах зростання внутрішньоклітинного тиску [5]. У кислому середовищі лізис еритроцитів охоплює такі основні етапи: проникнення йонів гідрогену, протонування гемоглобіну та руйнування еритроцитів з поступовою агрегацією їх мембранних протеїнів [5, 11].

Аналіз показників кислотного гемолізу риб *Danio rerio* (рис. 4) показав, що у риб, які зазнавали дії ХПФ у концентрації 1 мг/л, не було вірогідних змін показника тотального гемолізу порівняно з контролем. Тривалість гемолізу еритроцитів риб дослідних груп, порівняно з контролем, також не змінювалася. Встановлено, що за обраної дози ХПФ та тривалості досліджень кількість гемолізованих еритроцитів зростає на 16,5 % ($P < 0,05$). Виявлені зміни можуть свідчити про виникнення прихованих структурних пошкоджень білково-ліпідного матриксу мембран еритроцитів.

За дії ХПФ у дозі 1 мг/л було виявлено посилення процесів руйнування еритроцитів, що проявлялося зростанням відсотка зруйнованих клітин.

Отже, можна констатувати, що описані вище фізіолого-біохімічні параметри можуть бути інформативними при токсикологічних дослідженнях з використанням риб *Danio rerio* як біологічної моделі.

Висновки

1. Визначено параметри гострої токсичності хлорпірифосу для риб *Danio rerio* за внесення його в акваріумну воду. Встановлено, що максимальна концентрація хлорпірифосу (тривалість експерименту 96 год), при якій не було загибелі риб *Danio rerio*, становить 0,375 мг/л, абсолютна смертельна концентрація — 2 мг/л, напівлетальна концентрація (LC_{50}) — 1,23 мг/л.

2. За дії ХПФ у концентрації 1 мг/л кількість гемолізованих еритроцитів зростає на 16,5 % ($P < 0,05$), що може свідчити про виникнення структурних пошкоджень білково-ліпідного матриксу мембран еритроцитів.

3. Акваріумні риби *Danio rerio* можуть застосовуватись як біологічна модель для дослідження фізіолого-біохімічних параметрів токсичного впливу на організм фосфорорганічних сполук, зокрема хлорпірифосу.

Перспективи подальших досліджень.

У подальших дослідженнях *Danio rerio* як біологічної моделі для вивчення токсичності фосфорорганічних сполук чи інших ксенобіотиків доцільно розширити діапазон біохімічних і фізіологічних показників, які можна використовувати як індикаторні. Також варто провести дослідження, використовуючи риб *Danio rerio* у різні онтогенетичні періоди, починаючи від ікри і завершуючи періодом зрілості організму.

1. Ambali S. F., Ayo J. O., Ojo S. A., Esievo K. A. N. Vitamin E protects Wistar rats from chlorpyrifos-induced increase in erythrocyte osmotic fragility. *Food and Chemical Toxicology*, 2010, vol. 48, issue 12, pp. 3477–3480. DOI: 10.1016/j.fct.2010.09.026.

2. Babaei F., Ramalingam R., Tavendale A., Liang Y., Yan L. S. K., Ajuh P., Cheng S. H., Lam Y. W. Novel blood collection method allows plasma proteome analysis from single zebrafish. *Journal of Proteome Research*, 2013, vol. 12, issue 4, pp. 1580–1590. DOI: 10.1021/pr3009226.

3. Burke R. D., Todd S. W., Lumsden E., Mullins R. J., Mamczarz J., Fawcett W. P., Gullapalli R. P., Randall W. R., Pereira E. F. R., Albuquerque E. X. Developmental neurotoxicity of the organophosphorus insecticide chlorpyrifos: from clinical findings to preclinical models and potential mechanisms. *Journal of Neurochemistry*, 2017, vol. 142, issue S2, pp. 162–177. DOI: 10.1111/jnc.14077.

4. Cao F., Souders C. L. II, Li P., Pang S., Qiu L., Martyniuk C. J. Biological impacts of organophosphates chlorpyrifos and diazinon on development, mitochondrial bioenergetics, and locomotor activity in zebrafish (*Danio rerio*). *Neurotoxicology and Teratology*, 2018, vol. 70, pp. 18–27. DOI: 10.1016/j.ntt.2018.10.001.

5. Dudok K., Starykovich L., Rechytsky O., Shkavolyak A., Sybirna N. Role of pyrrolopyrimidinediones derivatives in the regulation of hemoglobin physical and chemical characteristics and human blood antioxidant enzymes activity *in vitro*. *Visnyk of the Lviv University: Biology Series*, 2012, issue 60, pp. 126–136. Available at: <http://prima.lnu.edu.ua/faculty/biologh/wis/60/2/13/13.pdf> (in Ukrainian)

6. Hertz-Picciotto I., Sass J. B., Engel S., Bennett D. H., Bradman A., Eskenazi B., Lanphear B., Whyatt R. Or-

ganophosphate exposures during pregnancy and child neurodevelopment: Recommendations for essential policy reforms. *PLoS Medicine*, 2018, vol. 15, issue 10, p. e1002671. DOI: 10.1371/journal.pmed.1002671.

7. Karpyschenko A. I. *Medical laboratory technologies*. Saint Petersburg, Intermedica, 2002, vol. 1, pp. 45–46. (in Russian)

8. Kotsumbas I. Ya., Malyk O. G., Patereha I. P. *Preclinical research of veterinary medicinal products*. Ed. by I. Ya. Kotsumbas. Lviv, Triada plus, 2006, 360 p. (in Ukrainian)

9. Shontz E. C., Souders C. L. II, Schmidt J. T., Martyniuk C. J. Domperidone upregulates dopamine receptor expression and stimulates locomotor activity in larval zebrafish (*Danio rerio*). *Genes, Brain and Behavior*, 2018, vol. 17, issue 4, p. e12460. DOI: 10.1111/gbb.12460.

10. Terskov I. A., Guitelzon M. I. *Erythrograms as a method of clinical reserch of blood*. Krasnoyarsk, Sib. dep. USSR Academy of Sciences, 1959, 246 p. (in Russian)

11. Uchendu C., Ambali S. F., Ayo J. O., Esievo K. A. N., Umosen A. J. Erythrocyte osmotic fra-

gility and lipid peroxidation following chronic co-exposure of rats to chlorpyrifos and deltamethrin, and the beneficial effect of alpha-lipoic acid. *Toxicology Reports*, 2014, vol. 12, pp. 373–378. DOI: 10.1016/j.toxrep.2014.07.002.

12. Vlizlo V. V., Salyha Yu. T. Problems of biological safety of pesticide use in Ukraine. *Visnyk of Agrarian Science*, 2012, vol. 1, pp. 24–27. Available at: http://agrovisnyk.com/oldpdf/visnyk_01_2012.pdf (in Ukrainian)

13. Wang X., Shen M., Zhou J., Jin Y. Chlorpyrifos disturbs hepatic metabolism associated with oxidative stress and gut microbiota dysbiosis in adult zebrafish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2019, vol. 216, pp. 19–28. DOI: 10.1016/j.cbpc.2018.11.010.

14. Watts M. *Chlorpyrifos as a possible global POP*. Pesticide Action Network North America, 2012, 34 p.

15. Zhang J., Liu L., Ren L., Feng W., Lv P., Wu W., Yan Y. The single and joint toxicity effects of chlorpyrifos and beta-cypermethrin in zebrafish (*Danio rerio*) early life stages. *Journal of Hazardous Materials*, 2017, vol. 334, pp. 121–131. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2017.03.055.