



Стан системи антиоксидантного захисту у риб *Danio rerio* за інтоксикації хлорпірифосом

В. В. Довганюк, В. П. Росаловський, Ю. Т. Салига

ros.volodymyr@gmail.com

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

Представлені результати досліджень впливу гострої інтоксикації хлорпірифосом (ХПФ) риб *Danio rerio* у концентраціях 0,5 мг/л; 0,75 мг/л та 1 мг/л акваріумної води впродовж 24 год. на вміст ТБК-активних продуктів активність каталази (КАТ), супероксиддисмути (СОД), глутатіонпероксидази (ГПО), глутатіонредуктази (ГР) у їхніх тканинах. Через 24 год. перебування риб у воді із внесеним ХПФ у концентраціях 0,75 мг/л та 1 мг/л у досліджуваних тканинах виявили зростання вмісту ТБК-активних продуктів порівняно до контрольних значень. Встановлено лінійний характер зростання ензиматичної активності КАТ у тканинах голови і тулуба риб унаслідок впливу ХПФ у дозах 0,5 мг/л; 0,75 мг/л та 1 мг/л. На тлі зростання каталазної активності у *Danio rerio* через 24 год. після дії токсиканта виявлено обернено пропорційну залежність між дозою ХПФ та активністю ГПО обидвох досліджуваних відділів тіла риб. У тканинах голови і тулуба встановлено інгібування активності СОД за дії ХПФ. Активність цього ензиму була найнижчою за дії ХПФ у концентрації 0,75 мг/л. Отримані результати доповнюють дані стосовно токсичної дії ХПФ на іхтіофауну і зокрема на перебіг ХПФ-індукованого оксидативного стресу у риб *Danio rerio*. Отримані дані можуть бути використані в обґрунтуванні розроблення додаткових біохімічних маркерів інтоксикацій тварин ХПФ та іншими фосфорорганічними сполуками (ФОС) під час проведення токсикологічних та екологічних експериментів, враховуючи, що інтенсивність застосування інсектицидних препаратів у сільськогосподарському виробництві та побуті зростає.

Ключові слова: *Danio rerio*, хлорпірифос, інтоксикація, антиоксидантна система, оксидативний стрес, ензими, холінестераза

Застосування пестицидів — важливий фактор у забезпеченні високої врожайності сільськогосподарських і технічних культур впродовж десятиліть. Проте постійне зростання потреби в аграрній продукції нерідко призводить до надмірного використання різноманітних агрохімічних препаратів, які, крім своїх основних функцій, часто становлять екологічні загрози та шкідливо впливають на здоров'я тварин і людей. Пестициди, у яких діючою речовиною є фосфоорганічні сполуки (ФОС), — особливо небезпечні через високий рівень токсичності. Незважаючи на це, масштаби їх використання у багатьох країнах світу залишаються значними, а в країнах, що розвиваються, зокрема Індії і Китаї, — збільшуються з одночасним нарощуванням виробництва фосфорорганічних пестицидів [17, 20]. Україна належить до країн із високим рівнем застосування пестицидів на основі ФОС. Зокрема, з 248 інсектицидних препа-

ратів, дозволених для використання у нашій країні, 37 містять хлорпірифос (ХПФ) — фосфорорганічну сполуку широкого спектру дії, яку застосовують для обробки зернових, плодоовочевих, садових культур, складських приміщень, тваринницьких ферм тощо [13, 20, 23, 25, 26]. За інтенсивного застосування у сільському господарстві ХПФ-вмісних агрохімічних засобів внаслідок дії природних процесів (опадів, вітрів, ерозії ґрунтів тощо) ХПФ може потрапляти до відкритих водойм і впливати там на нецільові організми, зокрема іхтіофауну [10, 16]. У літературі описано вплив ХПФ на двостулкових молюсків, прісноводних равликів [10] та коропа звичайного [32], карася золотистого, тиліпію нільську [6], інші види безхребетних і риб. З іншого боку, здатність ХПФ до біоаккумуляції в різних частинах тіла промислових риб [14] може спричинити потенційні ризики для здоров'я людей.

Основний механізм біологічної дії ХПФ, як і інших представників ФОС, полягає у фосфорилуванні ацетилхолінестерази, що спричиняє втрату активності цього ензиму [30]. Саме тому діагностика гострого отруєння ХПФ ґрунтується на оцінці вираженості холінергічного синдрому — сукупності симптомів, обумовлених стимуляцією мускаринових і нікотинових рецепторів надлишком ацетилхоліну чи екзогенних сполук, здатних стимулювати парасимпатичну нервову систему. Водночас важливо зазначити, що поряд із антихолінестеразною дією ХПФ відомо про низку інших біохімічних і фізіологічних процесів, які також безпосередньо залучені у механізми токсичності цієї сполуки [30]. У наших попередніх роботах, а також дослідженнях багатьох вчених інших країн доведено, що за потрапляння до організму ссавців та інших класів ХПФ спричиняє порушення про-антиоксидантної рівноваги, провокуючи оксидативний стрес [22, 24, 30].

У низці досліджень показано, що дія ХПФ на водні організми супроводжується мутагенним та генотоксичними, гістопатологічними, ендокринними ефектами, порушенням локомоторної активності та виникненням оксидативного стресу [3, 8, 29]. Як відомо, оксидативний стрес є наслідком дисбалансу між антиоксидантами та прооксидантами. Гіперпродукція активних форм оксигену (АФО), надмірне утворення синглетного кисню, супероксид-аніон-радикалу, гідроген пероксиду спричиняє посилене окисне пошкодження клітинних структур [23, 25]. Внаслідок посиленого утворення прооксидантів може змінюватись активність ензимів системи антиоксидантного захисту і змінюватись вміст маркерів оксидативного стресу в клітинах. Водночас варто зазначити, що характер оксидативного стресу, зміни його ключових ензиматичних показників, описані у згаданих вище та інших роботах, не завжди однозначні, а в певних випадках мають суперечливий характер.

Danio rerio надійно утвердилася як успішна модель для досліджень у багатьох галузях біології, зокрема токсикології. Саме цей вид риб є модельним організмом для оцінки якості води за стандартами OECD та ISO [28]. Невисока порівняно з іншими видами лабораторних тварин вартість робіт і можливість формування великої вибірки риб дозволяє використовувати *Danio rerio* як ефективну біологічну модель [7, 11].

З огляду на вищесказане, метою цього дослідження було з'ясувати вплив 24-годинної інтоксикації риб *Danio rerio* ХПФ на стан окремих компонентів системи їх антиоксидантного захисту за умов внесення досліджуваної сполуки до акваріумної води.

Матеріали і методи

Для досліджень використовували ХПФ (CAS №2921-88-2) (О,О-діетил-О3,5,6-трихлор-2-піридилфосфоротіоат, CH₁₁Cl₃NO₃PS) корпорації *Sigma Chemical* (США). Дослідження виконані в Інституті

біології тварин НААН на акваріумних рибах *Danio rerio* дикого типу. Усі маніпуляції з рибами здійснювали 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 у режимі перемикання 14 год. світло/10 год. темрява, аерації, нагріву та фільтрування води. Фізико-хімічні параметри акваріумної води підтримували у такому діапазоні значень: температура (t) — +26...+28°C, кислотність (рН) — 7. Значення рН акваріумної 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 критично важлива з огляду на те, що період напіврозпаду фосфорорганічних пестицидів у водних розчинах суттєво залежить від рівня рН. За проведення усіх експериментів обов'язково здійснювали контроль акваріумної води щодо вмісту в ній нітратів.

Годували риб двічі на добу в один і той самий час стандартним збалансованим сухим кормом, щоб уникнути можливих артефактів у досліджуваних показниках.

Відбір крові у риб *D. rerio* проводили, як описано у [1]. Відібрану кров з метою відділення формених елементів від плазми центрифугували впродовж 15 хв. при 13700 g за температури +4°C. Отриману плазму використовували для дослідження активності холінестерази. Вміст ТБК-активних продуктів визначали за [15]. У гомогенатах тканин тулуба та голови риб визначали каталазу (КАТ) [12], супероксиддисмутазу (СОД) [5], глутатіонредуктазу (ГР) [2] і глутатіонпероксидазу (ГПО) [18] активності.

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

Результати й обговорення

Для ХПФ, як і для всіх інших ФОС, характерним є інгібування холінестеразної (ХЕ) активності, що відбувається через фосфорилування активного центру ензиму ХЕ з утворенням так званої фосфорилізованої ХЕ (ХЕ + залишок ФОС, що містить фосфор у вигляді залишку фосфорної кислоти), яка втрачає здатність гідролізувати ацетилхолін і відновлює свою активність дуже повільно. Варто зазначити, що окремі метаболіти ХПФ також здатні спричинити інактивацію ХЕ.

Унаслідок інгібування активності холінестерази в організмі відбувається накопичення медіатора нервової системи — ацетилхоліну, що призводить до порушення передачі нервового збудження через гангліонарні синапси. Активність ХЕ є загальноприйнятим основним індикаторним показником ступеня інтоксикації організму ФОС, зокрема ХПФ. Тому визначали активність цього ензиму у плазмі крові риб *Danio rerio* за кожної застосовуваної у роботі дози токсиканта.

За дії ХПФ у плазмі крові *Danio rerio* виявлено лінійний характер зниження холінестеразної активності порівняно з показниками контрольної групи (рис. 1). За дії ХПФ у концентраціях 0,5 мг/л; 0,75 мг/л та 1 мг/л виявлено зниження активності вказаного ензиму порівняно з контрольними значеннями на 74,8%, 89% та 91% відповідно ($P < 0,05$).

Останні дослідження неодноразово довели, що в процесі метаболізму ФОС утворюються речовини, які спричиняють посилене утворення АФО — високо-реакційноздатних сполук, що мають у своєму складі один або більше неспарених електронів. АФО викликають про-антиоксидантний дисбаланс у клітинах, спричиняють перекисне окислення ліпідів клітинних мембран, чим порушують їхню цілісність та сприяють посиленій деструкції [9, 15, 16].

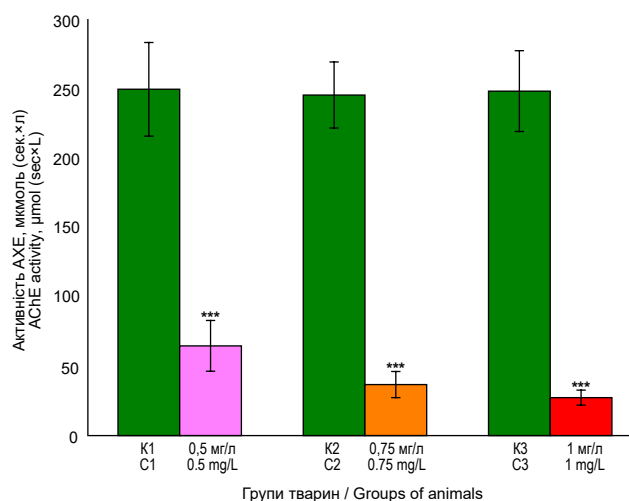
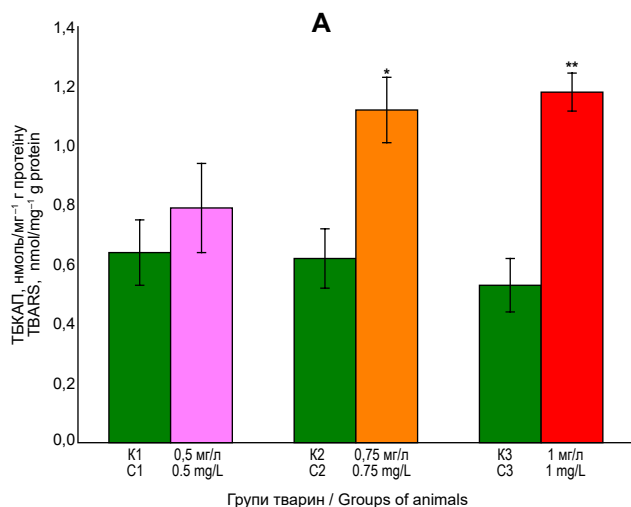


Рис. 1. Активність АХЕ в крові риб *Danio rerio* через 24 год. після інтоксикації ХПФ у концентраціях 0,5 мг/л; 0,75 мг/л та 1 мг/л
Fig. 1. AChE activity in the blood of *Danio rerio* fish 24 h after CPF intoxication at concentrations of 0.5 mg/L; 0.75 mg/L and 1 mg/L

Через 24 год. після інтоксикації ХПФ у концентраціях 0,75 та 1 мг/л у досліджуваних тканинах риб *Danio rerio* виявлено вірогідне зростання вмісту ТБК-активних продуктів (рис. 2).

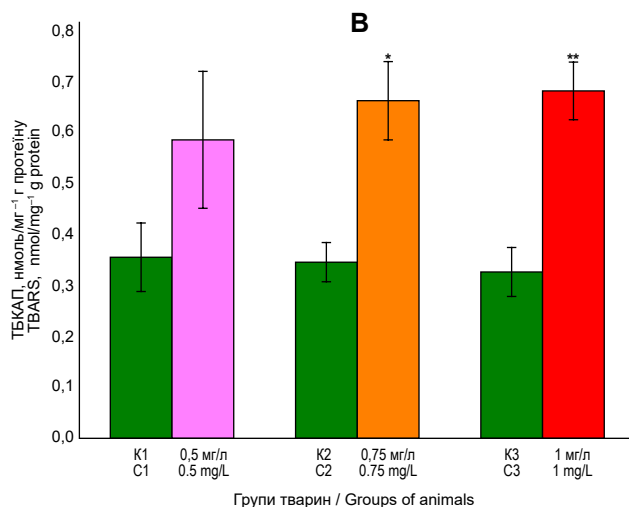


Рис. 2. Вміст ТБК-активних продуктів гомогенатах тканин головного (А) та тулубового відділу тіла (В) риб *Danio rerio* через 24 год. після інтоксикації ХПФ у концентраціях 0,5 мг/л; 0,75 мг/л та 1 мг/л
Fig. 2. TBARS content in the tissue homogenates of the head (A) and torso section (B) of *Danio rerio* fish 24 h after CPF intoxication at concentrations of 0.5 mg/L; 0.75 mg/L and 1 mg/L

Встановлено, що в гомогенатах тканин голови риб вміст ТБК-активних продуктів зростав на 43,6 та 86,4%, натомість у тканинах тулуба риб досліджуваного показник збільшувався на 75 та 84,3% за дії ХПФ у концентраціях 0,75 мг/л та 1 мг/л відповідно ($P < 0,05$). Зростання вмісту кінцевих продуктів перекисного окиснення ліпідів — ТБК-активних продуктів свідчить про посилення прооксидантних процесів в організмі риб через 24 год. за дії зазначених доз ХПФ. Посилене утворення ТБК-активних продуктів є наслідком

активізації процесів ПОЛ і розглядається як один із біологічних маркерів оксидативного стресу [19, 31].

Активність окремих ензимів системи антиоксидантного захисту може застосовуватись як індикатор виникнення оксидативного стресу. Насамперед це стосується КАТ та СОД, які забезпечують протидію клітин оксидативному стресу [4, 15, 32]. За дії ХПФ у концентраціях 0,5 мг/л, 0,75 мг/л та 1 мг/л у риб виявлено вірогідне зростання каталазної активності в гомогенатах тканин голови і тулуба (рис. 3).

У тканинах голови риб встановлено збільшення активності цього ензиму на 35,5%, 43,9% та 60,2%, натомість у тканинах тулуба виявлено зростання каталазної активності, відповідно, на 19%, 21,7% і 34,6% прямо пропорційно до застосованої дози хлорпірифосу ($P < 0,05$). Зростання каталазної активності у риб можна розглядати як адаптаційну відповідь організму на посилення прооксидантних процесів, оскільки КАТ здійснює гетероциклічне розщеплення О-О зв'язку молекули H_2O_2 — токсичного для клітин продукту утилізації молекулярного Оксигену.

Супероксид-аніон-радикал є попередником кількох інших сполук з вільнорадикальними властивостями, тому ензиматичний контроль його концентрації в клітині супероксиддисмутазою є важливим регулятором інтенсивності оксидативного стресу в організмі [4, 20].

СОД як один з ключових ензимів антиоксидантної системи організму здійснює реакцію дисмутації супероксидних аніон-радикалів і перетворює їх на молекули гідрогену пероксиду, які є менш реакційно здатними.

У нашому дослідженні встановлено, що інтоксикація риб ХПФ викликала нелінійний характер зниження супероксиддисмутазної активності у тканинах *Danio rerio* (рис. 4). У гомогенатах тканин голови виявлено зниження активності СОД на 60,2%, 68,6% та 26,1% відповідно порівняно з контрольними значеннями ($P < 0,05$). У гомогенатах тканин тулуба риб найістотніше інгібування активності СОД виявлено за дії ХПФ у дозі 0,75 мг/л — на 71,7% і 68,2% за дози токсиканта 1 мг/л порівняно з контролем.

Аналізуючи отримані результати, зазначимо, що вони корелюють із даними роботи [15], автори якої описують

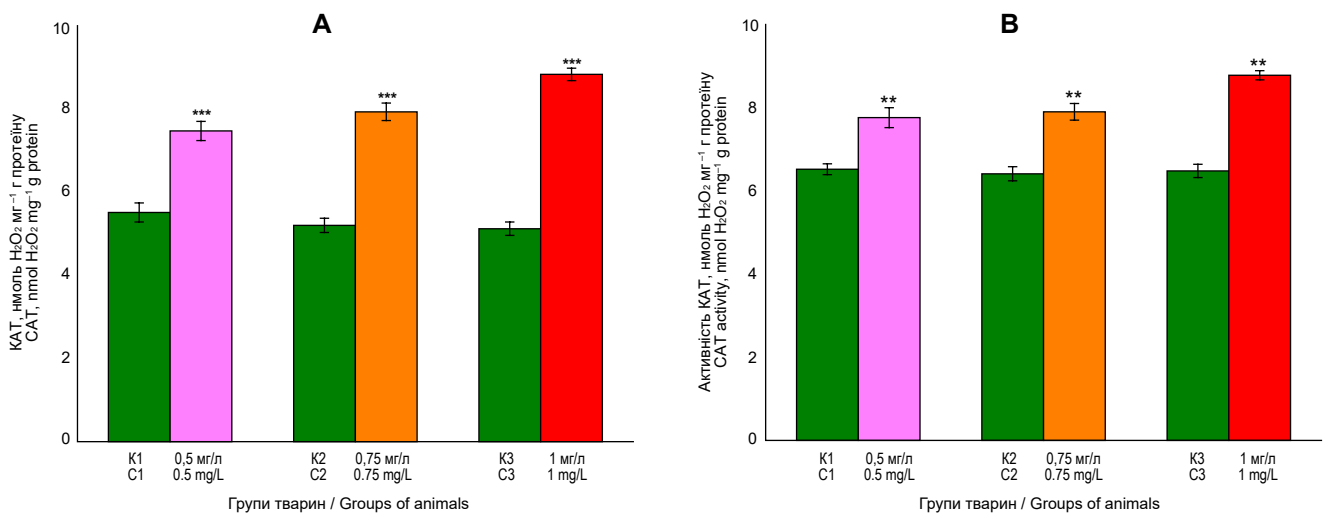


Рис. 3. Активність КАТ у гомогенатах тканин головного (А) і тулубового відділів (В) риб *Danio rerio* через 24 год. після інтоксикації ХПФ у концентраціях 0,5 мг/л; 0,75 мг/л та 1 мг/л
Fig. 3. CAT activity in homogenates of tissues of the head (A) and torso section (B) of *Danio rerio* fish 24 h after CPF intoxication at concentrations of 0.5 mg/L; 0.75 mg/L and 1 mg/L

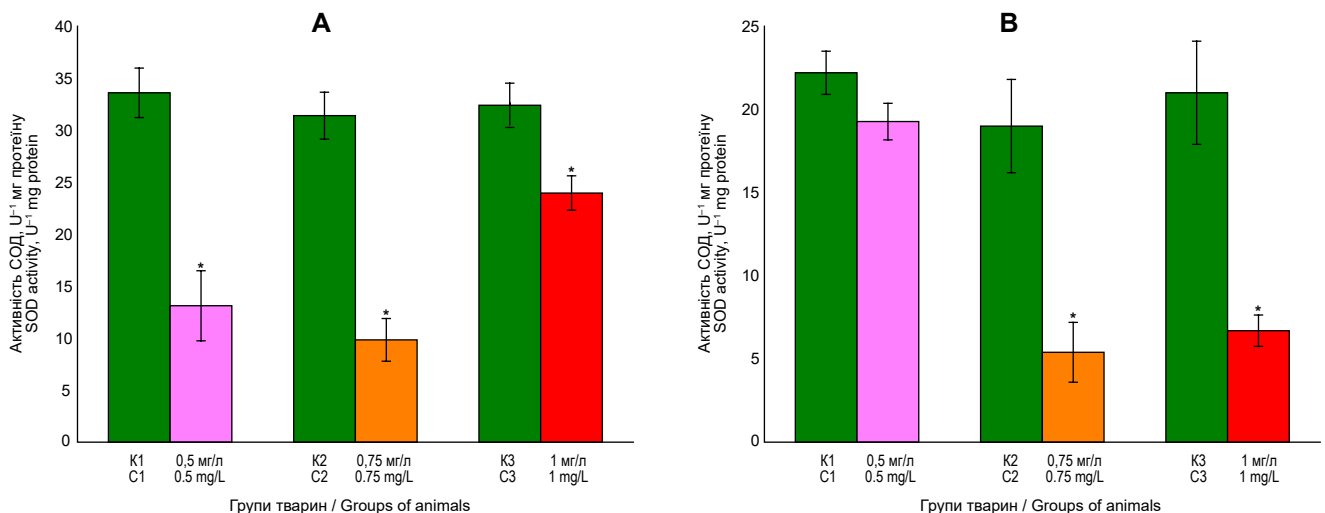


Рис. 4. Активність СОД у гомогенатах тканин головного (А) та тулубового відділів (В) риб *Danio rerio* через 24 год. після інтоксикації ХПФ у концентраціях 0,5 мг/л; 0,75 мг/л та 1 мг/л
Fig. 4. SOD activity in homogenates of tissues of the head (A) and torso section (B) of *Danio rerio* fish 24 h after CPF intoxication at concentrations of 0.5 mg/L; 0.75 mg/L and 1 mg/L

зростання активності КАТ на тлі зниження активності СОД у гігантської годеї (*Goodea atripinnis*) за умов забруднення водойм промисловими стоками. Порушенням структури СОД у риб згадані автори пов'язують з інгибуванням синтезу СОД надмірною кількістю утворених АФО. З іншого боку [4], надмірне утворення супероксид-аніон радикалу спричиняє окислення цистеїну в молекулі СОД, що спричиняє інактивацію цього ензиму.

Показано, що застосування ХПФ у концентраціях 0,5 мг/л, 0,75 мг/л та 1 мг/л призводило до зниження активності ГПО на 56,9%, 52,6% та 78,4% у гомогенатах тканин голови та зниження глутатіонпероксидазної активності цього ензиму на 14,5%, 25,1% та 40,7% відповідно порівняно з контролем ($P < 0,05$) (рис. 5).

Ймовірно, що зниження активності ГПО за дії ХПФ спричинене зниженням пулу внутрішньоклітин-

ного GSH. З іншого боку, накопичення токсичних для риб метаболітів, зокрема кетонів та альдегідів, може спричинити порушення структури цього ензиму [21].

ГР здійснює відновлення дисульфідного зв'язку в молекулі окисленого глутатіону (GSSG) до його сульфгідрильної форми GSH. Аналіз активності ГР у тканинах риб (рис. 6) показав відсутність лінійного характеру зниження цього ензиму, проте у гомогенатах голови риб активність ГР зростала після інтоксикації ХПФ у концентраціях 0,5 мг/л; 0,75 мг/л та 1 мг/л на 107%, 67,1% та в 1,3 раза відповідно порівняно з контрольними значеннями відповідних груп. У тканинах тулуба зафіксували зростання активності ГР на 86,2% за дії ХПФ у концентрації 0,5 мг/л, в 1,6 раза — у концентрації 0,75 мг/л та 1,3 раза — у концентрації 1 мг/л ($P < 0,05$).

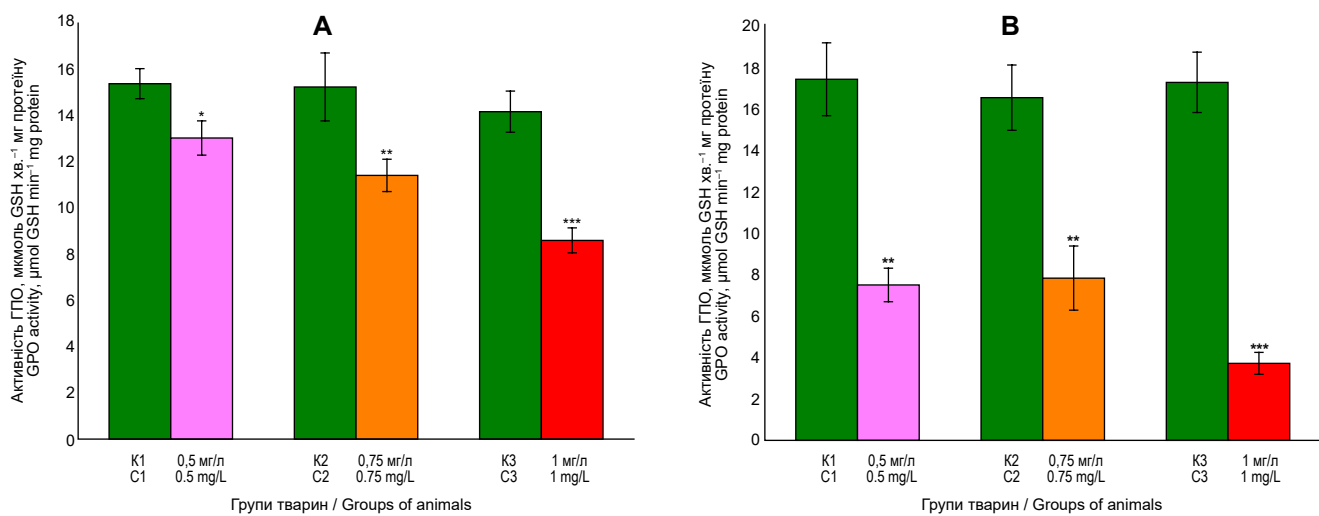


Рис. 5. Активність ГПО у гомогенатах тканин головного (А) і тулубового відділів (В) риб *Danio rerio* через 24 год. після інтоксикації ХПФ у концентраціях 0,5 мг/л; 0,75 мг/л та 1 мг/л

Fig. 5. The activity of GPO in the homogenates of the tissues of the head (A) and torso section (B) of *Danio rerio* fish 24 h after CPF intoxication at concentrations of 0.5 mg/L; 0.75 mg/L and 1 mg/L

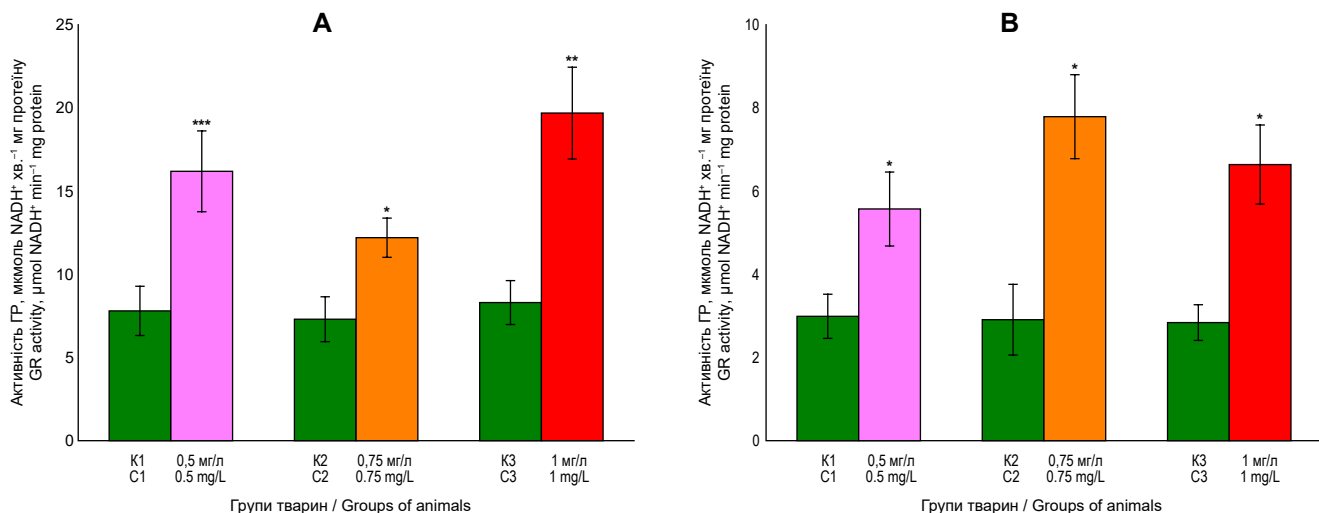


Рис. 6. Активність ГР у гомогенатах тканин головного (А) і тулубового відділів (В) риб *Danio rerio* через 24 год. після інтоксикації ХПФ у концентраціях 0,5 мг/л; 0,75 мг/л та 1 мг/л

Fig. 6. GR activity in homogenates of tissues of the head (A) and torso section (B) of *Danio rerio* fish 24 h after CPF intoxication at concentrations of 0.5 mg/L; 0.75 mg/L and 1 mg/L

Висновки

Через 24 год. після отруєння риб *Danio rerio* доданням до акваріумної води ХПФ у концентраціях 0,5 мг/л; 0,75 мг/л та 1 мг/л у гомогенатах тканин головного та тулубового відділів спостерігали порушення прооксидантно-антиоксидантної рівноваги, про що свідчить зростання вмісту продуктів ПОЛ та змін активностей ензимів системи антиоксидантного захисту.

Встановлено лінійний характер зростання ензиматичної активності КАТ як у тканинах голови, так і тулуба риб унаслідок впливу ХПФ у діапазоні доз 0,5 мг/л; 0,75 мг/л та 1 мг/л. На тлі зростання каталазної активності у *D. rerio* через 24 год. після отруєння виявлено обернено пропорційну залежність між дозою та активністю ГПО у обох досліджуваних тканинах. У тканинах голови та тулуба встановлено інгібування активності СОД за дії ХПФ, мінімальних значень активності цього ензиму досягала за дії ХПФ у концентрації 0,75 мг/л.

Результати дослідження підтверджують виникнення у риб *Danio rerio* ХПФ-індукованого оксидативного стресу після 24 год. інтоксикації ХПФ у концентраціях 0,5 мг/л; 0,75 мг/л та 1 мг/л.

Проведене дослідження розширює знання про механізми перебігу ХПФ-індукованого оксидативного стресу у риб *Danio rerio*. Водночас отримані дані свідчать про участь антиоксидантної системи риб у нормалізації прооксидантно-антиоксидантного дисбалансу за гострого отруєння ФОС.

Перспективи подальших досліджень

Результати досліджень можуть бути використані як підґрунтя для з'ясування механізмів прооксидантно-антиоксидантної регуляції при гострому отруєнні риб сполуками, які застосовують як діючі речовини у складі фосфорорганічних пестицидів.

1. Babaei F, Ramalingam R, Tavendale A, Liang Y, Yan LSK, Ajuh P, Cheng SH, Lam YW. Novel blood collection method allows plasma proteome analysis from single zebrafish. *J. Proteome Res.* 2013; 12 (4): 1580–1590. DOI: 10.1021/pr3009226.
2. Carlberg I, Mannervik B. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *J. Biol. Chem.* 1975; 250 (14): 5475–5480. DOI: 10.1016/S0021-9258(19)41206-4.
3. Deb N, Das S. Chlorpyrifos toxicity in fish: a review. *Curr. World Environ.* 2013; 8 (1): 77–84. DOI: 10.12944/CWE.8.1.17.
4. Dimitrova MT, Tishinova V, Velcheva V. Combined effect of zinc and lead on the hepatic superoxide dismutase-catalase system in carp (*Cyprinus carpio*). *Comp. Biochem. Physiol. C. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 1994; 108 (1): 43–46. DOI: 10.1016/1367-8280(94)90087-6.
5. Dubinina EE. Biological role of superoxide anion radical and SOD in body tissues. *Successes Modern Biol.* 1989; 108 (1): 71–81. (in Russian)

6. Firat Ö, Tutus R. Comparative acute toxicity assessment of organophosphate and avermectin insecticides on a freshwater fish *Oreochromis niloticus*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 2020; 105 (4): 582–587. DOI: 10.1007/s00128-020-02990-y.
7. Hollert H, Keiter SH. *Danio rerio* as a model in aquatic toxicology and sediment research. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2015; 22: 16243–16246. DOI: 10.1007/s11356-015-5362-1.
8. Huang X., Cui H, Duan W. Ecotoxicity of chlorpyrifos to aquatic organisms: a review. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2020; 200: 110731. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2020.110731.
9. Karadag HO, Firat Ö, Firat Ö. Use of oxidative stress biomarkers in *Cyprinus carpio* L. for the evaluation of water pollution in Ataturk Dam lake. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 2014; 92: 289–293. DOI: 10.1007/s00128-013-1187-0.
10. Khalil AM. Toxicological effects and oxidative stress responses in freshwater snail, *Lanistes carinatus*, following exposure to chlorpyrifos. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2015; 116: 137–142. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2015.03.010.
11. Khan FR, Alhewairini SS. Zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism. In: *Current Trends in Cancer Management*. Ed. by L Streba, DI Gheonea, M Schenker. 2019: 3–18. ISBN 978-1-83880-006-2.
12. Korolyuk MA, Ivanova LI, Mayorova IG, Tokarev VE. Method for determining catalase activity. *Lab. Work*, 1988; 1: 16–19. (in Russian)
13. Kurdil NV, Zozulya IS, Ivashchenko OV. Features of acute organophosphate pesticides poisonings in urban area: recommendations for prehospital care. *Family Medicine.* 2014; 4 (54): 54–57. (in Russian)
14. Liu P, Wu CH, Chang XL, Qi XJ, Zheng ML, Zhou ZJ. Assessment of chlorpyrifos exposure and absorbed daily doses among infants living in an agricultural area of the Province of Jiangsu, China. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* 2014; 87 (7): 753–762. DOI: 10.1007/s00420-013-0918-1.
15. López-López E, Sedeño-Díaz JE, Soto C, Favari L. Responses of antioxidant enzymes, lipid peroxidation, and Na⁺/K⁺-ATPase in liver of the fish *Goodea atripinnis* exposed to Lake Yuriria water. *Fish Physiol. Biochem.* 2011; 37: 511–522. DOI: 10.1007/s10695-010-9453-0.
16. 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; 30 (4): 422–429. DOI: 10.1002/tox.21918.
17. Majumder R, Kaviraj A. Acute and sublethal effects of organophosphate insecticide chlorpyrifos on freshwater fish *Oreochromis niloticus*. *Drug Chem. Toxicol.* 2019; 42 (5): 487–495. DOI: 10.1080/01480545.2018.1425425.
18. Moin VM. A simple and specific method for determining the activity of glutathione peroxidase in erythrocytes. *Lab. Work.* 1984; 12: 724–727. (in Russian)
19. Nunes MEM, Müller TE, Murussi C, do Amaral AMB, Gomes JLC, Marins AT, Leitemperger J, Rodrigues CCR, Fiuza TL, Costa MD, Severo ES, Rosemberg DB, Loro VL. Oxidative effects of the acute exposure to a pesticide mixture of cypermethrin and chlorpyrifos on carp and zebrafish — A comparative study. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 2018; 206–207: 48–53. DOI: 10.1016/j.cbpc.2018.03.002.
20. Rao JV, Rani CHS, Kavitha P, Rao RN, Madhavendra SS. Toxicity of chlorpyrifos to the fish *Oreochromis mossambicus*. *Environ. Contam. Toxicol.* 2003; 70: 985–992. DOI: 10.1007/s00128-003-0079-0.
21. Rosalovsky VP, Grabovska SV, Salyha YT. Biochemical and haematological changes in peripheral blood of rats exposed to chlorpyrifos: protective effect of vitamins A and E combination. *Studia Biologica.* 2015; 9 (3): 57–68. DOI: 10.30970/sbi.0903.448.
22. Rosalovsky VP, Grabovska SV, Salyha YT. Changes in glutathione system and lipid peroxidation in rat blood during the first hour after chlorpyrifos exposure. *Ukr. Biochem. J.* 2015; 87 (5): 124–132. DOI: 10.15407/ubj87.05.124.

23. Salyha Y. Biological effects assessment of chlorpyrifos and some aspects of its neurotoxicity. *Visnyk Lviv Univer. Biol. Ser.* 2010; 54: 3–14. Available at: <http://publications.lnu.edu.ua/bulletins/index.php/biology/article/view/8913>
24. Salyha YT. Chlorpyrifos leads to oxidative stress-induced death of hippocampal cells *in vitro*. *Neurophysiol.* 2013; 45 (3): 193–199. DOI: 10.1007/s11062-013-9356-7.
25. Salyha Y, Rosalovsky V. Effects of chlorpyrifos intoxication on biochemical and erythrocytic parameters of rats blood. *Visnyk of the Lviv University. Series Biology* 2016; 71: 56–64. Available at: <http://publications.lnu.edu.ua/bulletins/index.php/biology/article/view/4148>
26. Sandah JF, Baldwin DH, Jenkins JJ, Scholz NL. Comparative thresholds for acetylcholinesterase inhibition and behavioral impairment in coho salmon exposed to chlorpyrifos. *Environ. Toxicol. Chem.* 2005; 24 (1): 136–145. DOI: 10.1897/04-195R.1.
27. Slotkin TA. Developmental cholinotoxicants: nicotine and chlorpyrifos. *Environ. Health Perspect.* 1999; 1: 71–80. DOI: 10.1289/ehp.99107s171.
28. State Standard of Ukraine 4074-2001. Water quality — Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (*Teleostei, Cyprinidae*)] static method (ISO 7346-1:1996, MOD). (in Ukrainian)
29. Sunanda M, Rao JCS, Neelima P, Simhachalam G. Toxicity and effects of chlorpyrifos in a non-target organism (Fish) — A review. *J. Atoms Mol.* 2016; 6 (3): 966–976.
30. Svitlyi SS, Voronina VM, Rudaya LO, Kornuta NO, Bagley EA. More on chlorpyrifos-based preparations in human living environment. *Ukr. J. Modern Probl. Toxicol.* 2019; 1 (85): 26–41. DOI: 10.33273/2663-4570-2019-85-1-26-40. (in Ukrainian)
31. Ural MŞ, Yonar ME, Yonar SM. Protective effect of ellagic acid on oxidative stress and antioxidant status in *Cyprinus carpio* during malathion exposure. *Cell Mol. Biol.* 2015; 61 (5): 58–63. PMID: 26516111.
32. Zhang Z, Liu Q, Cai J, Yang J, Shen Q, Xu S. Chlorpyrifos exposure in common carp (*Cyprinus carpio* L.) leads to oxidative stress and immune responses. *Fish Shellfish Immunol.* 2017; 67: 604–611. DOI: 10.1016/j.fsi.2017.06.048.

State of the antioxidant system in *Danio rerio* fish due to the chlorpyrifos intoxication

V. V. Dovhaniuk, V. P. Rosalovsky, Yu. T. Salyha
ros.volodymyr@gmail.com

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

The article presents the results of studies of acute intoxication in *Danio Rerio* fish by chlorpyrifos at concentrations 0.5 mg/L; 0.75 mg/L and 1 mg/L of aquarium water for 24 h and its influence on the content of TBK-active products, catalase activity (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPO), glutathione reductase (GR) in their tissues. After 24 h in the fish staying in water with chlorpyrifos added in concentrations 0.75 mg/L and 1 mg/L we have revealed an increase of the content of TBK-active products in the studied tissues compared to the control values. The linear nature of the growth of the CAT enzymatic activity in the tissues of head and torso due to the effects of chlorpyrifos in doses of 0.5 mg/L; 0.75 mg/L and 1 mg/L. was shown. On the background of the catalase activity growth in *Danio rerio*, in 24 h after the action of the toxicant, there was an inversely proportional dependence between the dose of chlorpyrifos and the activity of GPOs in both investigated parts of the fish body. In the tissues of the head and torso, inhibition of SOD activity for the action of chlorpyrifos has been established. The activity of this enzyme was the lowest at the chlorpyrifos concentration 0.75 mg/L. The obtained results complement the data on the toxic effect of chlorpyrifos on ichthyofauna and on the course of chlorpyrifos-induced oxidative stress in *Danio rerio* fish. The obtained data can be used in the development of additional biochemical markers of chlorpyrifos and other phosphor organic compounds intoxication and in toxicological and environmental experiments, taking into account the growing intensity of the use of insecticidal preparations in agricultural production and everyday life.

Key words: *Danio rerio*, chlorpyrifos, intoxication, antioxidative system, oxidative stress, enzymes, cholinesterase