

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ІВАНА ФРАНКА

ГРАБОВСЬКА Софія Володимирівна

УДК 628.16.094+543.393

**НЕЙРОФІЗІОЛОГІЧНІ РЕАКЦІЇ НА ДІЮ НИЗЬКИХ ДОЗ
ХЛОРПРИФОСУ У ЩУРІВ І ЇХ ПОТОМСТВА**

03.00.13 – фізіологія людини і тварин

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Львів – 2018

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Інституті біології тварин НААН.

Науковий керівник – доктор біологічних наук,
старший науковий співробітник
Салига Юрій Тарасович,
Інститут біології тварин НААН,
завідувач лабораторії обміну речовин

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук,
старший науковий співробітник
Півнева Тетяна Андріївна,
Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН
України, провідний науковий співробітник
відділу сенсорної сигналізації

кандидат біологічних наук
Остапів Роман Дмитрович,
ДНДКІ ветеринарних препаратів і кормових
добавок, науковий співробітник лабораторії
ВЕРХ

Захист відбудеться «_21_» грудня 2018 р. о 15 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради К 35.051.14 Львівського національного університету імені Івана Франка за адресою: 79005, м. Львів, вул. Грушевського, 4, біологічний факультет, ауд. 333.

З дисертацією можна ознайомитись у науковій бібліотеці Львівського національного університету імені Івана Франка за адресою: 79005, Львів, вул. Драгоманова, 17.

Автореферат розісланий «19» листопада 2018 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради К 35.051.14,
кандидат біологічних наук, доцент

М.В. Бура

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Фосфорорганічні пестициди, зокрема хлорпірифос (ХПФ), широко використовуються у сільському господарстві, промисловості та побуті для боротьби з комахами– шкідниками. Вони є високоефективними та економічно вигідними, що забезпечило їм значне поширення [Burns, 2013]. Однак, фосфорорганічним пестицидам притаманна висока токсичність для тварин та людини: гострі отруєння ними призводять до важких неврологічних розладів аж до летальних наслідків, а хронічні отруєння низькими дозами цих токсикантів можуть спочатку протікати практично безсимптомно, однак з часом викликати ураження нервової системи, послаблення когнітивних функцій, інші патологічні прояви [Carr, 2013].

В останні роки з'явилася значна кількість досліджень, які свідчать про можливий зв'язок між хронічним пренатальним або раннім постнатальним отруєнням мікродозами фосфорорганічних пестицидів та розвитком нейродегенеративних захворювань, зокрема синдромів Альцгеймера та Паркінсона [Deveci, 2018]. Більше того – ряд робіт свідчить про підвищення ризику виникнення аутизму [Shelton, 2012], синдрому дефіциту уваги [Silva, 2017] та інших поведінкових розладів, а також зниження інтелекту, погіршення пам'яті та академічної успішності [Rauh, 2015], порушення статевих відмінностей поведінки [Ricceri, 2006] дітей, матері яких під час вагітності зазнавали отруєння низькими дозами фосфорорганічних пестицидів. Таким чином, питання про можливі ризики застосування ХПФ, та фосфорорганічних сполук (ФОС) загалом, у сільському господарстві та інших галузях людської діяльності є надзвичайно актуальним. Окрім того, літературних даних про можливий вплив отруєння цими сполуками майбутніх матерів ще до настання вагітності на поведінкові й неврологічні порушення у їхніх дітей нами виявлено не було. Тому ми поставили на меті дослідити вплив хронічної інтоксикації низькими дозами ХПФ на дорослий організм та на його потомство, використовуючи в якості модельних організмів білих лабораторних щурів.

З огляду на те, що основними проявами токсичної дії ХПФ є неврологічні порушення, які проявляються в аномаліях поведінки, для дослідження викликаних впливів ми використовували поведінкові тестові методики. Поведінкові тести дозволяють оцінити функціональний стан ЦНС піддослідних тварин та виявити такі слабкі впливи, які ще не виявляються у біохімічних чи морфологічних дослідженнях.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконана у межах науково– дослідних робіт Інституту біології тварин НААН у 2012–2018 рр. за темами: 31.14.04.02 «Вивчити фізіолого– біохімічні особливості метаболізму у тварин під дією окремих трофічних і біогеохімічних факторів і розробити методи їх коригування» (№ ДР 0111U006136), 35.00.02.02 «Вивчити фізіолого– біохімічні механізми токсичної дії фосфорорганічних сполук на організм тварин» (№ ДР 0116U001411), у яких

дисертант була виконавцем і досліджувала вплив хронічного отруєння низькими дозами ХПФ на нейроповедінкові параметри самиць щурів та їхнього потомства.

Мета і завдання дослідження. Метою роботи було дослідити вплив хронічного отруєння низькими дозами ХПФ на нейроповедінкові параметри самиць щурів та їхнього потомства.

Для досягнення мети необхідно було вирішити наступні завдання:

- провести методологічне порівняння двох основних модифікацій установки тесту «Відкрите поле»;
- провести хронічну та гостру інтоксикацію різними субтоксичними дозами ХПФ статевозрілих самиць щурів;
- дослідити рівні тривожності та рухової активності, роботу механізмів короткочасної та довготривалої пам'яті тварин у період введення ХПФ та після його завершення;
- дослідити морфометричні параметри на ранніх постнатальних етапах та виживання потомства самиць щурів, одноразово та хронічно інтоксикованих до запліднення, та самиць, які одноразово одержали дозу ХПФ на ранній стадії вагітності;
- дослідити нейроповедінкові параметри потомства дослідних тварин після досягнення ним статевої зрілості;
- дослідити деякі біохімічні та гематологічні параметри інтоксикованих тварин та їхнього потомства.

Об'єкт дослідження – нейроповедінкові та біохімічні параметри щурів під впливом хронічного отруєння ХПФ.

Предмет досліджень – нейроповедінкові та морфометричні параметри потомства інтоксикованих самиць щурів; активність холінестерази, лужної фосфатази, аланін та аспартат амінотрансфераз та вміст загального білка у периферичній крові щурів; гематологічні показники крові щурів.

Методи дослідження: фізіологічні (поведінкові методики: тести «Відкрите поле», «Темно– світла камера», «Водний тест Морріса», «Екстраполяційне позбавлення»); біохімічні (визначення ензиматичних активностей, дослідження крові на гематологічному та біохімічному аналізаторах); статистичні методи.

Наукова новизна одержаних результатів. Уперше досліджено вплив хронічного отруєння самиць щурів низькими дозами ХПФ до запліднення на нейроповедінкові параметри їхнього потомства. З'ясовано, що хронічне введення самицям щурів низьких доз ХПФ, яке не спричиняло у них помітного зниження активності холінестерази та істотних нейроповедінкових відхилень, у їхнього потомства викликало симптоми, аналогічні до проявів синдрому дефіциту уваги і гіперактивності (СДУГ) у дітей. Зокрема, потомство хронічно інтоксикованих ХПФ самиць демонструвало різке зростання рухової активності у тестах «Відкрите поле» та «Темно– світла камера», а в тесті «Екстраполяційне позбавлення» у цих тварин при поміщенні в установку практично не спостерігалось завмирань, які є характерними для інтактних щурів. При цьому

робота пам'яті та когнітивних механізмів у цих тварин залишалася практично не порушеною. Водночас, у пренатально інтоксикованих щурів було виявлено деяке погіршення когнітивних функцій, однак вони не демонстрували симптомів гіперактивності. Окрім того, потомство всіх самиць, які зазнали впливу ХПФ, у порівнянні з контрольними щурятами, мало нижчий індекс Кетле, який свідчив про недостатній набір маси у ранній постнатальний період життя. Також, менша частка народженого потомства цих самиць дожила до статевої зрілості.

Окрім того, вперше було проведено порівняння двох найчастіше використовуваних варіантів тестової установки поведінкового тесту "Відкрите поле". Одержані результати дозволяють підтвердити правомірність рівнозначного використання як круглої, так і квадратної арен.

Практичне значення одержаних результатів. Результати дисертаційної роботи доповнюють і розширюють уявлення про токсичний вплив ФОС на організм ссавців. На основі даних, одержаних у роботі, пропонується перегляд нормативів щодо безпечного застосування ФОС у господарській діяльності. Зокрема, з огляду на виявлені нейроповедінкові порушення у потомства інтоксикованих самиць, яке не зазнавало безпосереднього впливу ХПФ, необхідно вжити заходів для попередження потрапляння пестицидів в організм жінок дітородного віку, незалежно від того, перебувають вони у стані вагітності чи ні.

Одержана в процесі роботи модель синдрому гіперактивності може бути використана для моделювання СДУГ на тваринах.

Методологічне порівняння двох модифікацій тестової установки "Відкрите поле" дозволяє зробити висновок про правомірність використання обох установок, залежно від умов конкретного дослідження, без будь-яких засторог щодо впливу форми арени на одержані результати.

Особистий внесок здобувача. Дисертантом самостійно проведено аналіз наукової літератури, виконано експериментальну частину роботи і статистичну обробку даних. Планування роботи, аналіз та обговорення отриманого матеріалу, підготовка рукописів статей здійснювалася у співпраці з науковим керівником. При проведенні аналізу активності холінестерази та під час досліду з порівняння модифікацій тесту «Відкрите поле» допомогу надав Росаловський В.П., молодший науковий співробітник лабораторії обміну речовин Інституту біології тварин УААН.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертації були представлені на міжнародних конференціях «3rd International Seminar on Behavioral Methods» (Szczyrk, Poland, 2014), "VII Congress of the Ukrainian Society for Neuroscience" (Київ, 7– 11 червня 2017), X та XI Міжнародних наукових конференціях студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології» (Львів, 2014– 2015 pp.), на конференціях молодих вчених в Інституті біології тварин НААН (2014– 2015 pp).

Публікації. За результатами досліджень опубліковано 20 наукових праць, у тому числі 7 статей, у тому числі 4 статті – у фахових журналах, що включені до міжнародної бібліографічної бази даних Scopus.

Структура та обсяг роботи. Дисертаційна робота сформована зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, результатів досліджень та їх обговорення, висновків і списку використаної літератури, який налічує 152 найменування, додатку. Робота викладена на 132 сторінках комп'ютерного набору, з яких 112 займає основна частина. Дисертація проілюстрована 27 рисунками, містить 12 таблиць.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Огляд літератури. В огляді літератури висвітлено сучасні уявлення про нейротоксичний вплив хлорпірифосу на організм тварин та їхнє потомство. Значну увагу приділено зв'язку інтоксикації ХПФ з виникненням нейроповедінкових аномалій у дітей, зокрема, аутизму та СДУГ.

Матеріали і методи дослідження. Дисертаційна робота виконана протягом 2013–2018 років у лабораторії обміну речовин Інституту біології тварин НААН України. Експериментальна частина проведена на 100 білих лабораторних щурах лінії Вістар масою тіла 180–250 г.

Робота з вивчення впливу ХПФ на нейроповедінкові параметри тварин була розділена на три етапи.

На **першому етапі** дослідження (рис. 1) статевозрілим самицям щурів вводили хронічно (щоденно, одноразово, протягом 30 діб) ХПФ у дозах 5, 10 та 15 мг/кг маси тіла тварини. Упродовж періоду введення та після його завершення проводилися поведінкові дослідження за допомогою тестів «Відкрите поле», «Темно– світла камера» та «Водний лабіринт Морріса» – з періодичністю, визначеною методиками даних тестів.

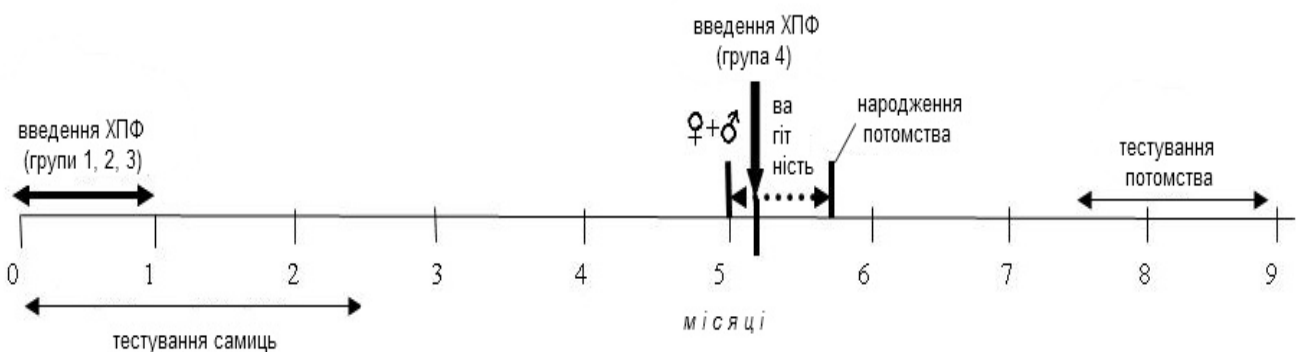


Рис. 1. Схема першого та другого етапів дослідження впливу хронічного введення ХПФ на нейроповедінкові параметри самиць щурів та їхнього потомства.

На **другому етапі** дослідження вивчали вплив інтоксикації ХПФ самиць на нейроповедінкові параметри їхнього потомства. Для цього було сформовано

3 дослідні групи з самиць із попереднього етапу дослідження, які зазнали хронічного впливу низьких доз ХПФ, а також групу з аналогічних за віком та морфометричними параметрами інтактних тварин, та проведено їх запліднення інтактними самцями. На 6–7 добу після запліднення самицям четвертої дослідної групи (інтактним) одноразово ввели 30 мг/кг ХПФ.

Потомство, одержане від усіх тварин, періодично вимірювали та зважували, обраховували морфометричні показники його розвитку (темپ набору маси, індекс Кетле), а також відсоток виживання щурят до дорослого віку.

Після досягнення потомством статевої зрілості фізіологічний стан його ЦНС досліджували за допомогою поведінкових тестів: «Відкрите поле», «Темно– світла камера» та «Екстраполяційне позбавлення».

Третій етап дослідження (рис. 2) мав на меті дослідити вплив гострої одноразової інтоксикації ХПФ самиць до вагітності на їхнє потомство, а також порівняти цей вплив з дослідженою на другому етапі дією хронічної інтоксикації. Окрім того, до використаних на попередніх етапах поведінкових та морфометричних методик було додано ряд біохімічних та гематологічних показників, з метою більш глибокого розуміння фізіологічних та біохімічних механізмів одержаних функціональних змін. Як і у попередніх дослідженнях, самицям щурів трьох дослідних груп до запліднення вводили ХПФ у трьох різних дозах; однак, цього разу введення проводилося одноразово, у дозах 15, 30 та 60 мг/кг. Інтоксикованих та контрольних тварин тестували за допомогою поведінкових методик, а також з кожної групи відбирали тварин для дослідження біохімічних та гематологічних показників крові.

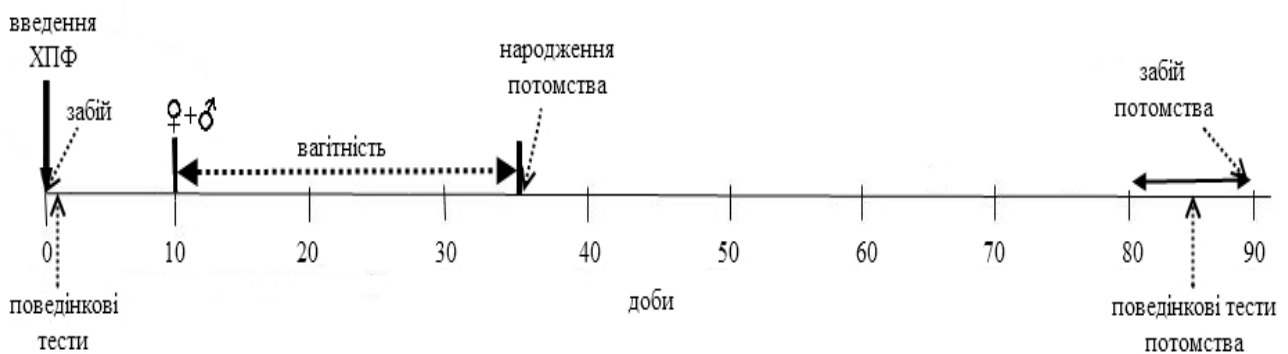


Рис. 2. Схема дослідження впливу гострого введення ХПФ на нейроповедінкові, біохімічні та гематологічні параметри самиць щурів та їхнього потомства.

Запліднення відбувалося через 10 діб після введення токсиканта. Після народження потомства його підраховували (для визначення відсотку виживання до дорослого віку) і вимірювали його масу та назоанальну довжину тіла (щоб вирахувати коефіцієнти маси тіла та швидкості набору маси, що свідчать про гармонійність розвитку організму). По досягненні потомством віку 1,5 місяців його тестували за допомогою поведінкових методик: «Відкрите поле», «Темно–

світла камера» та «Екстраполяційне позбавлення». Після завершення поведінкових тестів проводили біохімічні та гематологічні дослідження крові щурів другого покоління.

Окрім власне дослідження впливу ХПФ на нейроповедінкові параметри тварин, було проведено методологічне дослідження – експериментальне порівняння квадратної та круглої арен тесту «Відкрите поле», яке дозволило зробити більш обґрунтований вибір між цими двома модифікаціями тесту.

Введення ХПФ (розчиненого у соняшниковій олії) досліджуваним тваринам здійснювали внутрішлунково за допомогою зонда. Контрольним тваринам замість розчину ХПФ вводили відповідну кількість чистої соняшникової олії.

Для дослідження впливу ХПФ на функціональний стан ЦНС щурів, які зазнали хронічного отруєння токсикантом, та їхнього потомства проводили тестування за поведінковими методиками: «Відкрите поле», «Темно– світла камера», «Водний лабіринт Морріса» та «Екстраполяційне позбавлення» [Bourin, 2003; Hall, 1932; Morris, 1981].

Для дослідження активності холінергази у тварин, яким вводили ХПФ, а також у контрольній групі, відбирали кров з хвостової вени. Даний спосіб відбору крові є малоінвазивним та дозволив проводити подальші поведінкові тестування тварин та одержати від них потомство. Зразки крові для біохімічних та гематологічних досліджень відбирали у тварин після їх забою шляхом декапітації.

Усі маніпуляції з тваринами 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., «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим Національним конгресом з біоетики у Києві 2001 р. та «Науково– практичних рекомендацій з утримання лабораторних тварин та роботи з ними» [Кожем'якін, 2002]. Комісією з біоетичної експертизи Інституту біології тварин НААН (протокол засідання комісії № 69 від 17 квітня 2018 року) не встановлено порушень морально– етичних норм при проведенні дослідів з тваринами.

Одержані результати опрацьовували статистично за допомогою програмного забезпечення Statistica 8.0 (StatSoft, USA), використовуючи аналіз ANOVA. Результати всіх дослідних груп порівнювали з відповідними результатами контрольної групи.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Порівняння арен тесту "Відкрите поле" круглої та квадратної форми. Вірогідні відмінності (з $P < 0,05$) було виявлено за параметрами «нірковий рефлекс» та «внутрішня горизонтальна активність». Як і передбачалося, в арені круглої форми тварини перетинали у 3 рази більшу кількість внутрішніх сегментів, ніж у квадратній, де рухалися переважно біля стінок арени. Однак, за іншими параметрами (вертикальна та зовнішня

горизонтальна активність, довгий та короткий грумінг, кількість та тривалість завмирань, кількість актів дефекації) статистично вірогідних змін не було виявлено, тому, згідно з одержаними даними, ацени круглої та квадратної форми можуть використовуватися рівнозначно.

Вплив хронічної інтоксикації низькими дозами ХПФ на нейроповедінкові параметри статевозрілих самиць щурів. У статевозрілих щурів, які піддавалися хронічному впливові низьких доз ХПФ, рівень тривожності (відображений у кількості актів грумінгу та дефекації) зростав ($P < 0,05$) на 1 добу після початку введення токсиканта і в подальшому знижувався до контрольних значень. Окрім того, в інтоксикованих самиць було виявлено погіршення короткочасної та довготривалої пам'яті, про що свідчило зниження ($P < 0,05$) частки вдалих спроб у водному лабіринті Морріса. З часом нейроповедінкові показники інтоксикованих самиць наближалися до показників контролю, що свідчить про процеси адаптації організму щурів до дії токсиканта.

Нейроповедінкові та морфометричні порушення у потомства самиць щурів, які зазнавали хронічної інтоксикації ХПФ. Найвищий відсоток виживання (57%) спостерігали у контрольній (5) групі, найнижчий (40%) – у групі 3 (потомстві матерів, що на попередньому етапі досліджу одержували найвищу дозу ХПФ, 15 мг/кг щоденно). За швидкістю набору маси (рис. 3) найвищий показник спостерігали у потомстві групи 3 на 21 добу життя; на 30 добу темп набору маси у щурят цієї групи сповільнився. Тварини групи 2 також демонстрували статистично вірогідно швидший (порівняно з контролем) набір маси на 21 добу, однак у цій групі відмінності були дещо меншими.

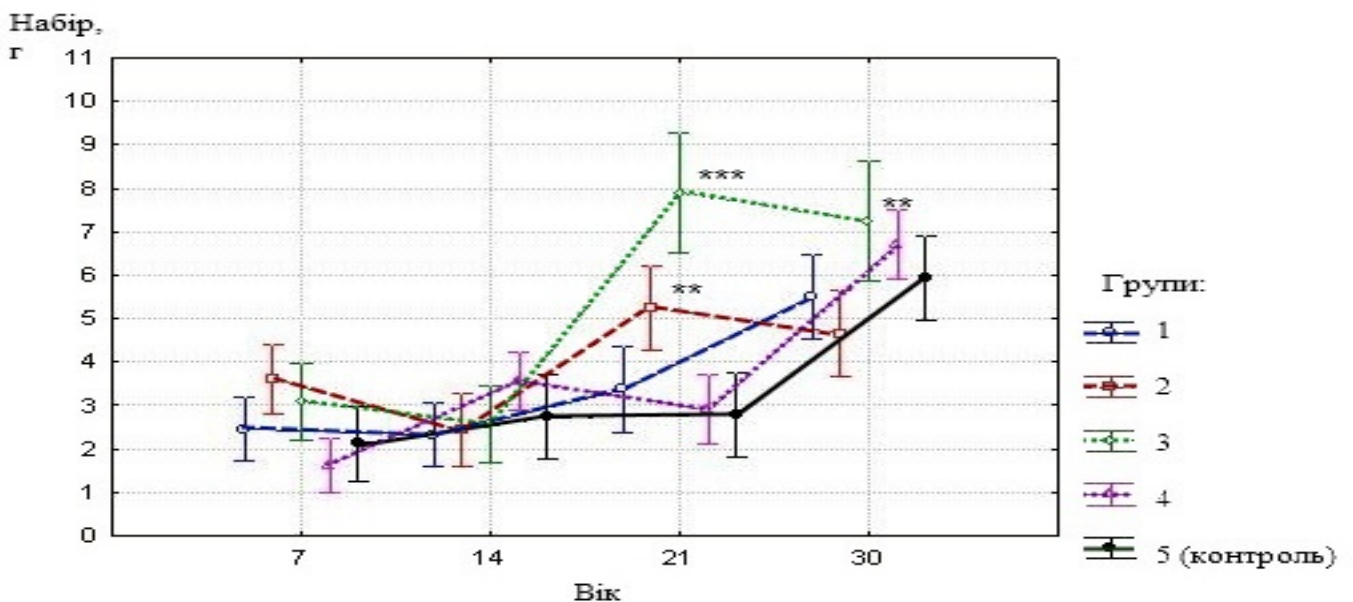


Рис. 3. Швидкість набору маси потомства самиць щурів з дослідних та контрольної груп.

Примітка. Тут і далі: всі порівняння проводили з контролем. * – відмінності статистично вірогідні з $P < 0,01$ ** – з $P < 0,01$, *** – з $P < 0,001$.

Найнижчі ($P < 0,001$). показники за індексом Кетле (рис. 4) були зафіксовані у третій дослідній групі (у 2–3 рази нижче за контрольну групу). Показники індексу Кетле у групах 1 та 2 також були нижчими, ніж у контролі, хоча вищими, ніж у дослідній групі 3.

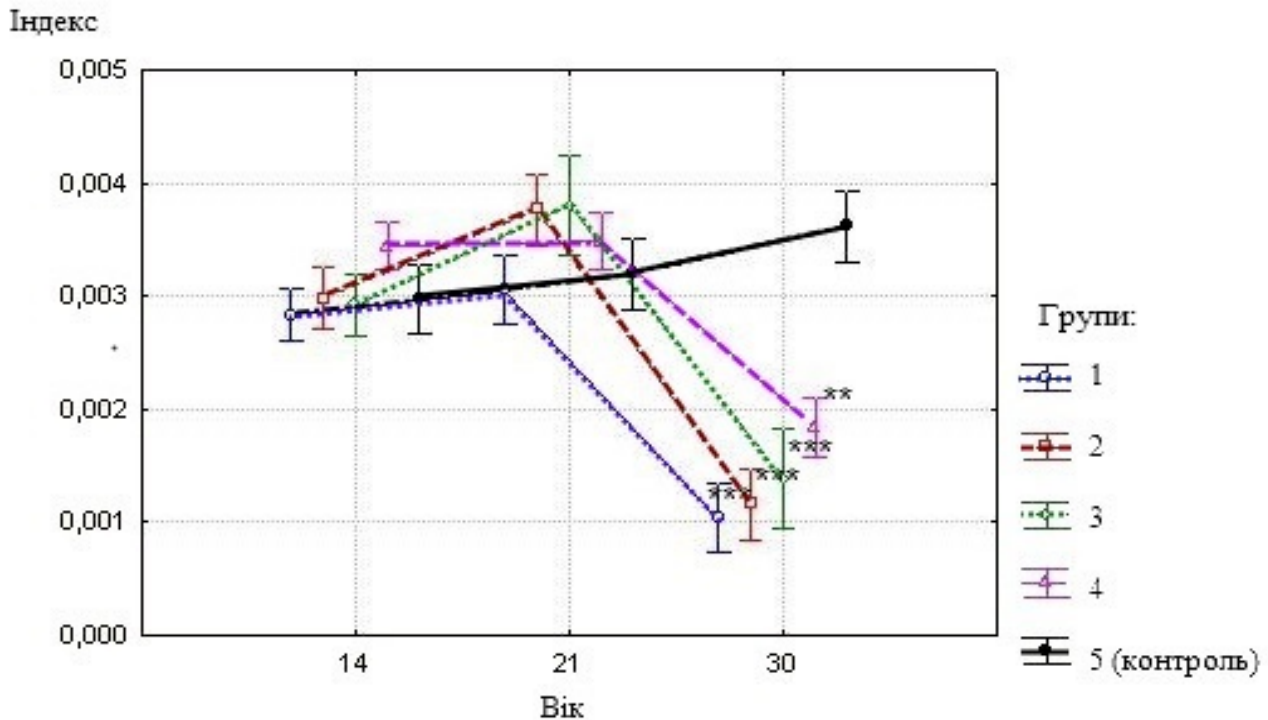


Рис. 4. Індекс Кетле потомства самиць щурів з дослідних та контрольної груп.

Різде зниження індексу маси тіла у дослідних групах відбулося на 21 добу життя щурят. У цей час відбувається завершення грудного вигодовування: вочевидь, у цих тварин виникли труднощі з адаптацією до самостійного харчування.

У поведінкових тестах, проведених після досягнення потомством статевозрілого віку, найістотніші відмінності спостерігали у групі 3 (потомство самиць, які одержували 15 мг/кг ХПФ протягом 30 діб). В інших групах виявили аналогічні, але менш виражені зміни. Так, у тесті "Відкрите поле" у щурів групи 3 спостерігали у 3–4 рази вищу горизонтальну та вертикальну рухову активність, ніж у контрольній групі, та вищу, ніж у решті дослідних груп (рис. 5). Ці тварини в середньому перетинали 40–60 квадратів, у той час як контрольні – 10–20.

Окрім того, кількість актів обнюхування нірок у цій групі також була найвищою ($P < 0,05$). Показники тривожності (довгий та короткий грумінг, кількість актів дефекації, кількість та загальна тривалість завмирань) у третій групі були істотно нижчими ($P < 0,01$) за відповідні показники тварин контрольної групи. Зокрема, дефекація та завмирання у дослідній групі 3 були практично відсутніми. Також у цій групі зафіксовано у 2–3 рази більшу ($P < 0,001$), ніж у контрольній групі, кількість актів обнюхування

ніркоподібних отворів у підлозі. Така поведінка є аномальною для щурів, і можна стверджувати, що вона становить комплекс симптомів, характерних для синдрому гіперактивності у дітей [Yolton, 2014].

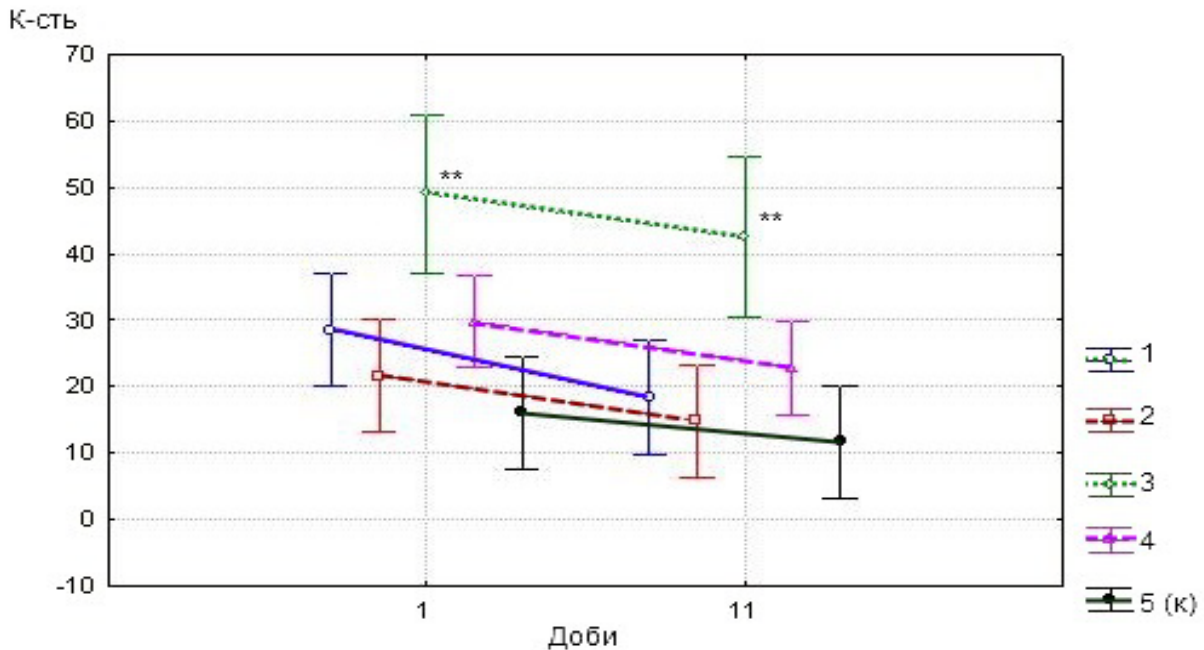


Рис. 5. Зовнішня горизонтальна активність у тесті "Відкрите поле".

У тесті "Темно– світла камера" також спостерігали поведінкові аномалії у щурів дослідних груп. Кількість виглядувань з нірки (рис. 6) у щурів групи 3 була у 2– 3 рази вищою ($P < 0,05$), ніж у контрольній групі, що, так само як аномально висока горизонтальна рухова активність у тесті "Відкрите поле", свідчить про зростання рухової активності цих тварин та зниження їхньої тривожності. Інші відмінності між групами не досягли статистичної вірогідності.

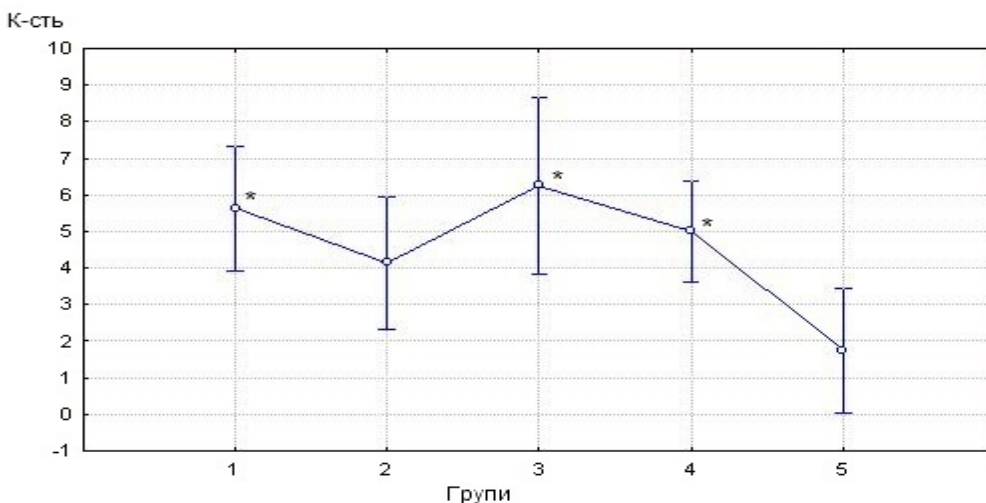


Рис. 6.
Кількість
виглядувань з
нірки у тесті
"Темно– світла
камера"

У тесті «Екстраполяційне позбавлення» у дослідних групах 2 та 4 частка вдалих спроб була статистично вірогідно ($P < 0,05$) меншою, ніж у контрольних тварин (40–45% вдалих спроб у дослідних групах 2 та 4 проти 75% у контрольній групі) (рис. 7), що свідчить про погіршення ефективності навчання.

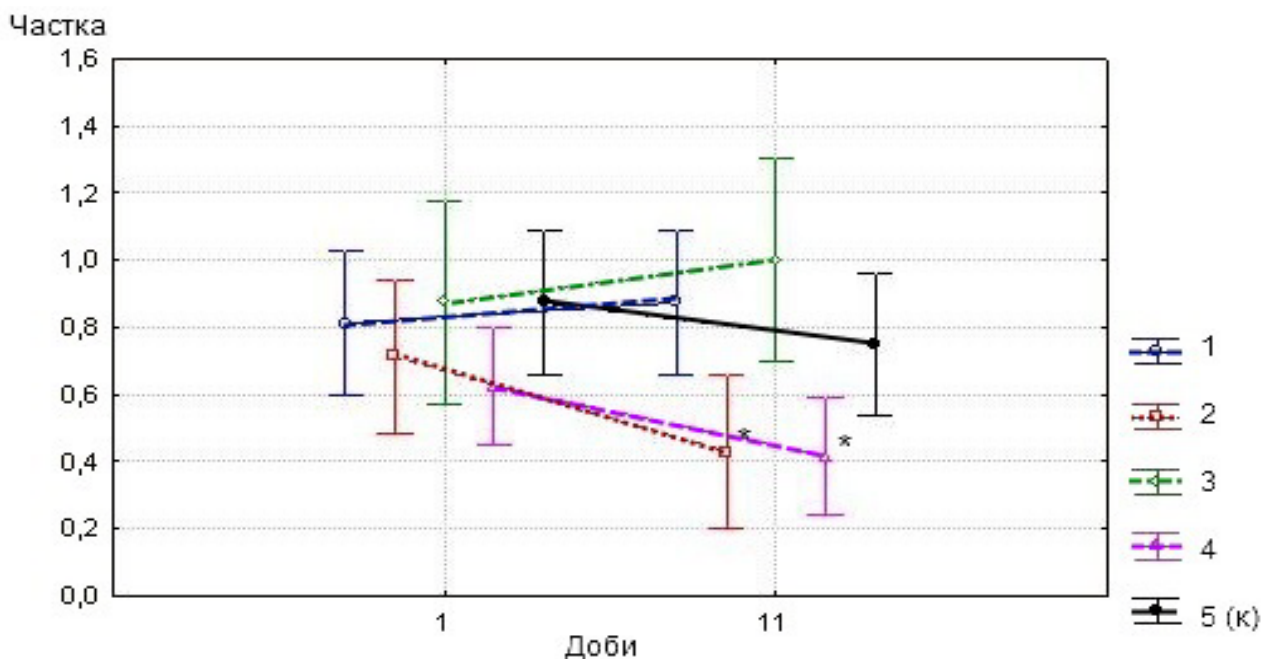


Рис. 7. Тест «Екстраполяційне позбавлення». Частка вдалих спроб.

Вплив гострого одноразового введення ХПФ за 10 днів до запліднення на нейроповедінкові, біохімічні та гематологічні параметри самиць щурів. Біохімічні показники крові щурів дослідних груп через 1 годину після введення ХПФ (див. рис. 8) відповідали типовій реакції на інтоксикацію аналогічними дозами ХПФ. Активність ацетилхолінестерази у крові щурів, інтоксикованих ХПФ, очікувано знизилася порівняно з контрольними значеннями. Так, у групі Д1 (доза 60 мг/кг ХПФ) вона становила близько 48% від активності у контролі ($P < 0,05$), у Д2 – 39% ($P < 0,05$), у групі Д3 – 73% контрольної активності.

Активності деяких інших ензимів у плазмі крові інтоксикованих ХПФ самиць за годину після введення препарату також відрізнялися від показників контролю. Так, активність аспартатамінотрансферази у групі Д2 (щурі, які одержали 30 мг/кг ХПФ) була на 48% вищою ($P < 0,05$), ніж у контрольній групі. Активність лужної фосфатази у всіх трьох дослідних групах була статистично вірогідно ($P < 0,05$) вищою, ніж у контрольній: на 92% у групі Д1, на 164% у Д2 та на 103% у Д3. (Зростання активності ЛФ, як і інгібування АХЕ, є класичною ознакою отруєння ФОС). За активністю аланінамінотрансферази істотних змін виявлено не було.

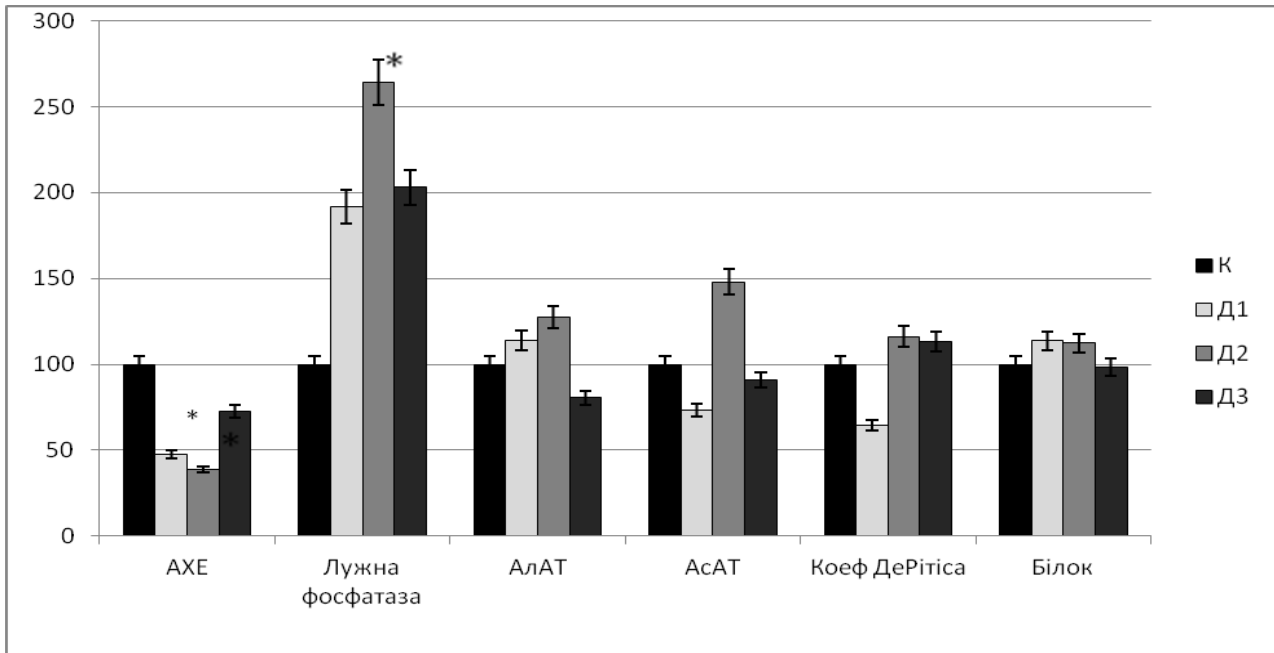


Рис. 8. Деякі біохімічні показники плазми крові самиць щурів першого покоління за годину після інтоксикації 15, 30 та 60 мг/кг ХПФ (у відсотках від контрольних значень). ($M \pm m$, $n=6$)

Після введення ХПФ поведінкові параметри інтоксикованих тварин зазнали деяких змін; при цьому найістотніші відмінності спостерігали у дослідній групі 2 (тварини, що одержали 30 мг/кг ХПФ).

Так, у тесті «Відкрите Поле», проведеному на 2 добу після введення ХПФ, у порівнянні з першим тестуванням вертикальна рухова активність знизилася в усіх групах; однак, найбільш вираженою та статистично вірогідною ($P < 0,01$) ця різниця була у дослідній групі 2 (див. рис. 9), де кількість стійок знизилася у 3 рази.

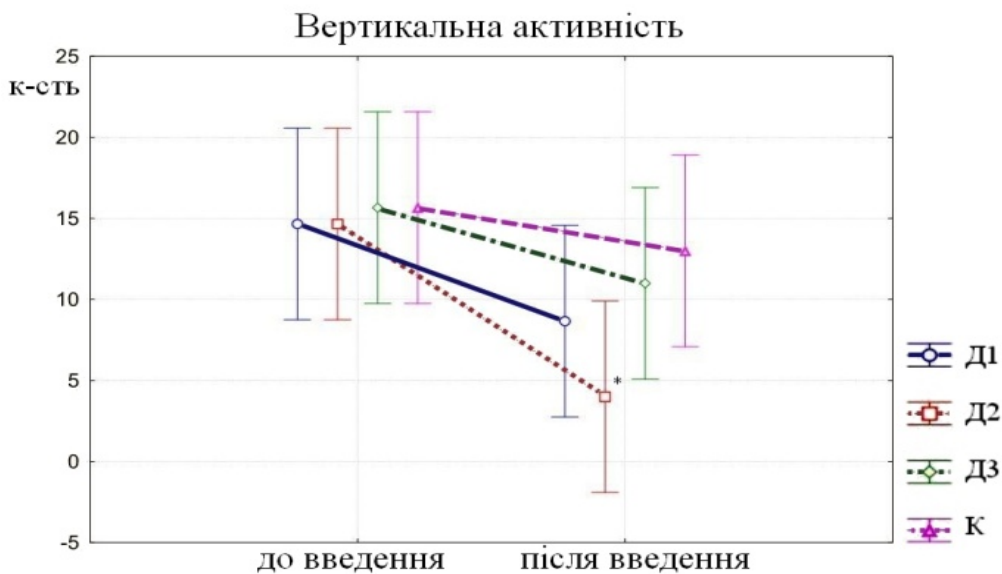


Рис.9. Вертикальна рухова активність у тесті «Відкрите поле» до та після введення ХПФ. ($M \pm m$, $n=6$).

Поведінкові тестування, що були проведені по досягненню щурятами 1,5-місячного віку, виявили ряд відмінностей між контрольними та дослідними тваринами. У тесті «Відкрите поле» статистично вірогідні відмінності спостерігалися за зовнішньою горизонтальною активністю, довгим та коротким грумінгом. Так, кількість перетнутих за час тестування квадратів у дистальній частині арени (зовнішня горизонтальна активність) у дослідній групі була нижчою, ніж у контролі ($P < 0,05$) в обох тестуваннях: на 22% у першому тестуванні та на 19% у другому. Кількість актів довгого грумінгу (див. рис 10) в дослідній групі тварин у першому тестуванні була приблизно втричі ($P < 0,05$) вищою, ніж у контролі, однак у другому тесті показники обох груп практично зрівнялися.

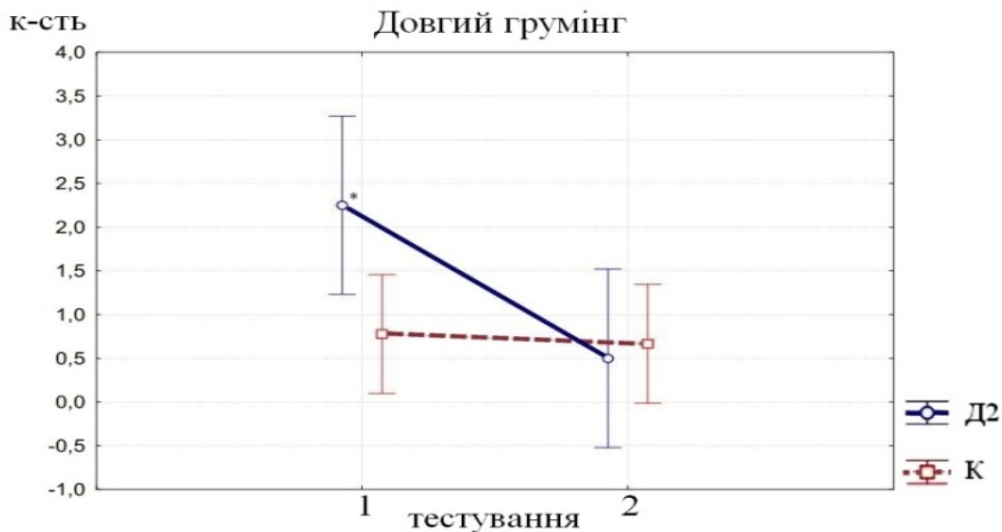


Рис 10.
Кількість актів довгого грумінгу у тесті «Відкрите поле» у другому поколінні щурів. ($M \pm m$, $n=13$)

Найістотніші відмінності у тесті «Відкрите поле» спостерігали за параметром «короткий грумінг» у першому тестуванні: у дослідній групі цей показник був статистично вірогідно (при $P < 0,001$) вищим, ніж у контролі, в середньому 4–5 актів проти 1–2; однак, у другому тестуванні він також наблизився до контрольного рівня.

Зменшення горизонтальної активності у поєднанні зі зростанням кількості актів грумінгу вважається ознаками підвищення тривожності тварин.

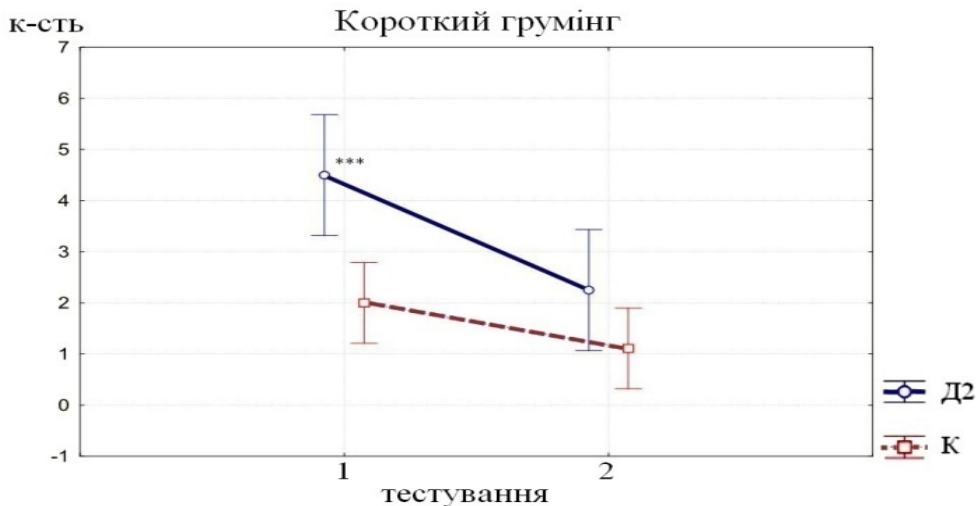


Рис 11.
Кількість актів короткого грумінгу у тесті «Відкрите поле» у другому поколінні щурів. ($M \pm m$, $n=13$)

У тесті «Темно– світла камера» також спостерігали ряд істотних відмінностей у поведінці дослідних та контрольних тварин. За тривалістю перебування у світлій частині камери з моменту поміщення щура в установку до заходу його у нірку, а також за кількістю виглядувань з нірки (без виходу у світлу частину) відмінностей виявлено не було, однак кількість та тривалість виходів з темної частини камери в освітлену істотно відрізнялася ($P < 0,01$) (див. рис. 12).

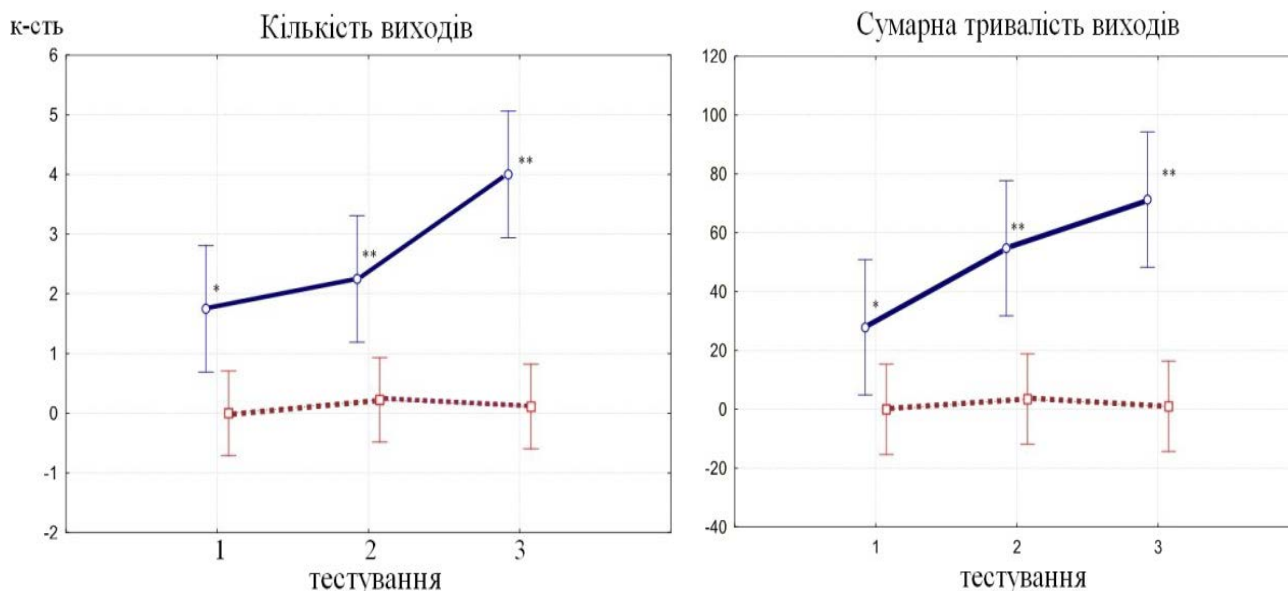


Рис 12. Кількість та сумарна тривалість виходів з темної частини камери в освітлену у тесті «Темно– світла камера» для другого покоління щурів. ($M \pm m$, $n=13$)

Якщо тварини контрольної групи майже не виходили з темної частини камери в освітлену (максимум 1 вихід), то потомство інтоксикованих самиць проводило в освітленій частині установки майже половину всього часу тестування. При цьому кількість та тривалість виходів у світлу частину камери у дослідній групі зростали в кожному наступному тестуванні (до 9 виходів та 120 секунд сумарного перебування в освітленому відсіку), що було статистично вірогідно ($P < 0,01$) вище, ніж аналогічні показники інтактних контрольних тварин.

Оскільки за допомогою тесту «Темно– світла камера» досліджують поведінку гризунів в умовах помірного стресу (викликаного яскравим освітленням світлої частини камери), то на основі одержаних у тестах результатів було зроблено припущення про відмінність реакції на стрес у дослідних та контрольних тварин. Загалом, порівнюючи з попереднім етапом дослідження, у потомства одноразово інтоксикованих тварин також спостерігалися певні аномалії поведінки – однак, вони були виражені дещо слабкіше та проявлялися переважно у стресових умовах.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі представлено дані щодо впливу інтоксикації фосфорорганічною сполукою – хлорпірифосом самиць щурів на нейроповедінкові параметри їхнього потомства. Показано, що хронічне введення субтоксичних доз ХПФ самицям до настання вагітності спричиняло у їхнього потомства поведінкові аномалії, подібні на прояви синдрому гіперактивності, а одноразова гостра інтоксикація самиць ХПФ викликала у потомства аномальну реакцію на помірний стрес.

1. У статевозрілих щурів, які зазнавали хронічного впливу низьких доз ХПФ, рівень тривожності (відображений у кількості актів грумінгу) зростав на 1–шу добу після початку введення токсиканта і в подальшому знижувався до контрольних значень.

2. В інтоксикованих самиць було виявлено погіршення короткочасної та довготривалої пам'яті, про що свідчило зниження частки вдалих спроб у водному лабіринті Морріса. З часом нейроповедінкові показники інтоксикованих самиць наближалися до показників контролю, що свідчить про процеси адаптації організму щурів до дії токсиканта.

3. У потомства самиць, що зазнавали хронічного впливу хлорпірифосу у дозах 5, 10 та 15 мг/кг щоденно протягом 30 діб за 4 місяці до запліднення, а також у одноразово інтоксикованих 30 мг/кг ХПФ пренатально (на 6–7 добу внутріутробного розвитку) щурів була зафіксована вища смертність, а також падіння індекса Кетле (індекса маси тіла) у період переходу на самостійне живлення.

4. Потомство інтоксикованих до запліднення самиць демонструвало істотно вищу рухову активність, ознаки рухової ажитації та гіперактивності у тестах “Відкрите поле” та “Темно–світла камера”.

5. У пренатально інтоксикованих щурів спостерігалось зниження частки вдалих спроб у тесті “Екстраполяційне позбавлення”, що свідчить про погіршення ефективності навчання.

6. Одноразове введення препарату ХПФ у дозах 15, 30 та 60 мг/кг самицям щурів викликало у них зниження активності АХЕ та зростання активності лужної фосфатази, однак не призвело до істотних змін у їхній поведінці.

7. У потомства одноразово інтоксикованих ХПФ самиць, зачатого за 10 діб після інтоксикації, у статевозрілому віці було виявлено ознаки підвищеної тривожності в низько–стресогенних умовах поміщення в незнайому територію (підвищена кількість актів грумінгу та знижена горизонтальна та вертикальна рухова активність у тесті «Відкрите поле»), а також аномальна реакція на помірний стрес, викликаний яскравим світлом (аномально висока частота та тривалість перебування в освітленій частині установки у тесті «Темно–світла камера»). У реакції на гострий стрес (поміщення у водне середовище) суттєвих відмінностей від контролю в цих тварин виявлено не було.

8. Вірогідні відмінності ($P < 0,05$) між аренами круглої та квадратної форми було виявлено за параметрами «нірковий рефлекс» та «внутрішня горизонтальна активність»: в арені круглої форми кількість актів обнюхування нірок була у кілька разів нижчою, а показник внутрішньої горизонтальної активності – навпаки, вищим, ніж в арені квадратної форми. За іншими параметрами (вертикальна та зовнішня горизонтальна активність, довгий та короткий грумінг, кількість та тривалість завмирань, кількість актів дефекації) статистично вірогідних відмінностей між аренами круглої та квадратної форми виявлено не було.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. **Grabovska S.** ADHD– like behaviour in the offspring of female rats exposed to low chlorpyrifos doses before pregnancy / **S. Grabovska**, Yu. Salyha // Archives of Industrial Hygiene and Toxicology. – 2015. – Vol. 66 (2). – P. 121– 127. *(Здобувач здійснила поведінкові тестування потомства інтоксикованих самиць щурів)*
2. **Grabovskaya S. V.** Do Results of the Open Field Test Depend on the Arena Shape? / **S. V. Grabovskaya**, Yu. T. Salyha // Neurophysiology. – 2014. – Vol. 46 (4). – P. 376–380 *(Здобувач провела порівняльне дослідження круглої та квадратної арен тесту "Відкрите поле")*.
3. **Грабовська С.** Вплив хронічної інтоксикації низькими дозами хлорпірифосу на поведінку самиць щурів / **С. Грабовська**, Ю. Салига // Фізіологічний журнал. – 2015. – № 61 (2). – С. 94– 101 *(Здобувач вводила ХПФ самицям щурів та провела їх поведінкові тестування)*.
4. Rosalovsky V. P. Changes in glutathione system and lipid peroxidation in rat blood during the first hour after chlorpyrifos exposure / V. P. Rosalovsky, **S. V. Grabovska**, Yu. T. Salyha // Ukr. Biochem. J. – 2015. – Vol. 87 (5). – P. 124– 132 *(Здобувач вводила ХПФ самицям щурів та приймала участь у біохімічних дослідженнях)*
5. **Грабовська С.** Нейрофізіологічні порушення у самиць щурів та їх потомства за інтоксикації хлорпірифосом до запліднення. // Біологія тварин. – 2017. – №19 (3). – С. 25–35.
6. **Грабовська С.** Вплив введення низьких доз хлорпірифосу до та під час вагітності на постнатальний розвиток другого покоління щурів // Науковий вісник Східноєвропейського національного університету ім. Лесі Українки: Біол. науки. – 2015. – № 2 (302). – С. 147– 150 *(Здобувач повністю провела дослідження)*.
7. **Grabovska S**, Rosalovsky V, Salyha Yu. Neurotoxic effects and other actual risks of chlorpyrifos / **S. Grabovska**, V. Rosalovsky, Yu. Salyha // Living organisms and bioanalytical approaches for detoxification and monitoring of toxic compounds. – 2015. – P. 195– 204. *(Здобувач провела пошук та систематизацію літературних даних)*

8. Салига Ю.Т. Нейротоксичність фосфорорганічних пестицидів: екологічні і медико– біологічні аспекти / Ю. Т. Салига, В.П. Росаловський, **С. В. Грабовська** // Всеукраїнський з'їзд екологів з міжнародною участю, 25–27 вересня 2013 р.: збірник тез. – Вінниця, 2013. – С. 413–415.

9. Салига Ю.Т. Біологічна безпека застосування фосфорорганічних пестицидів в Україні: чи всі ризики враховані? / Ю.Т. Салига, Р.О. Федяков, В. П. Росаловський, **С. В. Грабовська** // Міжнародна науково– практична конференція «Стратегія збалансованого розвитку агроєкосистем України», 28 березня 2013 р.: збірник тез. – К.: ДІА. 2013. – С. 140– 141.

10. Росаловський В.П., **Грабовська С.В.**, Федяков Р.О., Салига Ю.Т. Механізми нейротоксичності фосфорорганічних сполук: роль оксидативного стресу / В.П. Росаловський, **С.В. Грабовська**, Р.О. Федяков, Ю.Т. Салига // Конференція «Біорізноманіття. Екологія. Адаптація. Еволюція», 13– 17 травня 2013 р.: збірник тез. – Одеса, 2013. – С. 189.

11. Салига Ю.Т. Механізми токсичного впливу хлорпірифосу на центральну нервову систему щурів / Ю. Т. Салига, В. П. Росаловський, **С. В. Грабовська** // VI Конгрес Українського товариства нейронаук, 4– 8 червня 2014 р.: збірник тез. – К., 2014. – С. 106.

12. **Grabovska S.** Comparing round and square open field test arenas / **S. Grabovska**, V. Rosalovskyi, Y. Salyha // Біологія тварин. – 2014. – Vol. 16 (3). – P. 168.

13. Rosalovskyi V. Dynamics of hematological parameters of rats during an hour after chlorpyrifos intoxication. / V. Rosalovskyi, **S. Grabovska**, Y. Salyha // Біологія тварин. – 2014. Vol. – 16 (3). – P. 200.

14. **Грабовська С.** Вплив тривалого введення низьких доз хлорпірифосу на поведінкові параметри самок щурів / Молодь і поступ біології: X Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів, 8– 11 квітня 2014 р.: збірник тез. – Львів : СПОЛОМ. – 2014. – С. 239.

15. **Grabovska S.** Effects of chronic low dose chlorpyrifos exposure of female rats on behavioral parameters of their offspring. – Біологія тварин. – 2014. – Vol.16 (4). – P. 184.

16. **Grabovska S.** Open Field Test: comparing square and round arenas / **S. Grabovska**, Y. Salyha // Acta Neurobiologiae Experimentalis. – 2014. – Vol. 3 (74). – P. 363– 364.

17. Росаловський В.П. Багатовекторність нейротоксичної дії хлорпірифосу // В.П. Росаловський, **С.В. Грабовська** // Фізіол. журнал. – 2014. – № 60 (3) (Додаток). – С. 49– 50.

18. **Грабовська С.** Поведінкові параметри потомства самиць щурів, хронічно інтоксикованих низькими дозами хлорпірифосу / Молодь і поступ біології: XI Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів, 20– 24 квітня 2015 р.: збірник тез. – Львів : СПОЛОМ. 2015. – С. 448– 449.

19. Rosalovskyi V. Low dose chlorpyrifos exposure to female rats before and during pregnancy affects their behavior / V. Rosalovskyi, **S. Grabovska**, Y. Salyha // Acta Neurobiologiae Experimentalis. – 2015. – Vol. 4 (75). – P. 59.

20. Salyha Y. Organophosphate compounds: "old" neurotoxicants and new questions/ Y. Salyha, V. Rosalovskyi, **S. Grabovska** // VII Congress of the Ukrainian Society for Neuroscience. 7– 11 червня 2017 р.: збірник тез. – Київ. – 2017. – С. 51– 52.

АНОТАЦІЯ

Грабовська С.В. Нейрофізіологічні реакції на дію низьких доз хлорпірифосу у щурів і їх потомства. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії) за спеціальністю 03.00.13 – фізіологія людини і тварин – Львівський національний університет імені Івана Франка, Львів, 2018.

Дисертацію присвячено вивченню впливу фосфорорганічного пестициду хлорпірифосу (ХПФ) на нейроповедінкові параметри лабораторних щурів, зокрема на рівень їхньої тривожності, дослідницьку активність, короткочасну та довготривалу пам'ять. Досліджували зміни цих показників у інтоксикованих щурів та їхнього потомства. Наукова новизна роботи полягає у дослідженні нейроповедінкових особливостей другого покоління щурів – потомства, отриманого від інтоксикованих самиць, яке не зазнавало безпосереднього впливу ХПФ ні під час гестації, ні протягом постнатального розвитку. За хронічного введення (щоденно впродовж 30 діб) статевозрілим самицям щурів ХПФ у дозах 5, 10 та 15 мг/кг, істотних стійких змін у їхній поведінці виявлено не було. Однак, у потомства, яке згодом було отримано від цих тварин, мали місце істотні статистично вірогідні нейроповедінкові відхилення: надмірна рухова активність, значне зниження тривалості та кількості завмирань. Загалом, у цій групі щурів спостерігали поведінку, що нагадувала прояви синдрому гіперактивності. Окрім того, у цій групі, порівняно з контролем, частка виживання потомства до дорослого віку була значно меншою, коефіцієнт Кетле також знижувався. Одноразове введення препарату ХПФ у дозах 15, 30 та 60 мг/кг самицям щурів викликало у них зниження активності АХЕ та зростання активності лужної фосфатази, однак не призвело до істотних змін у їхній поведінці. У потомства цих самиць, зачатого за 10 діб після інтоксикації, було виявлено ознаки підвищеної тривожності в низько–стресогенних умовах, аномальна реакція на помірний стрес.

Підсумовуючи одержані дані, можна стверджувати наявність впливу інтоксикації навіть низькими дозами ХПФ на функціональний стан ЦНС тварин, які піддавалися інтоксикації, а також їхнього потомства. Зокрема, у потомства самиць, яким вводили ХПФ, спостерігалися ознаки гіперактивності.

Ключові слова: хлорпірифос, поведінка, щурі, тривожність, гіперактивність, поведінкові тести, нейроповедінкові порушення, потомство.

АННОТАЦИЯ

Грабовская С. В. Нейрофизиологические реакции на действие низких доз хлорпирифоса у крыс и их потомства. – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук (доктора философии) по специальности 03.00.13 – физиология человека и животных – Львовский национальный университет им. Ивана Франко, Львов, 2018.

Диссертация посвящена изучению влияния фосфорорганического пестицида хлорпирифоса (ХПФ) на нейроповеденческие параметры лабораторных крыс, в частности на уровень их тревожности, исследовательскую активность, кратковременную и долговременную память. Исследовали изменения этих показателей у интоксикованных крыс и их потомства. Научная новизна работы заключается в исследовании нейроповеденческих особенностей второго поколения крыс – потомства, полученного от интоксикованных самок, не испытывавшего непосредственного влияния ХПФ ни во время гестации, ни в течение постнатального развития. При хроническом введении (ежедневно в течение 30 суток) половозрелым самкам крыс ХПФ в дозах 5, 10 и 15 мг / кг существенных устойчивых изменений в их поведении выявлено не было. Однако, у потомства, которое впоследствии было получено от этих животных, имели место существенные статистически достоверные нейроповеденческие отклонения: чрезмерная двигательная активность, значительное снижение продолжительности и количества замираний. В общем, в этой группе крыс наблюдали поведение, напоминавшее проявления синдрома гиперактивности. Кроме того, в этой группе, по сравнению с контролем, доля выживания потомства до взрослого возраста была значительно меньше, коэффициент Кетле также снижался. Однократное введение препарата ХПФ в дозах 15, 30 и 60 мг / кг самкам крыс вызывало у них снижение активности АХЭ и рост активности щелочной фосфатазы, однако не привело к существенным изменениям в их поведении. У потомства этих самок, зачатого за 10 суток после интоксикации, были выявлены признаки повышенной тревожности в низко– стрессогенных условиях, аномальная реакция на умеренный стресс.

Подытоживая полученные данные, можно утверждать наличие влияния интоксикации даже низкими дозами ХПФ на функциональное состояние ЦНС животных, которые подвергались интоксикации, а также их потомства. В частности, у потомства самок, которым вводили ХПФ, наблюдались признаки гиперактивности.

Ключевые слова: хлорпирифос, поведение, крысы, тревожность, гиперактивность, поведенческие тесты, нейроповеденческие нарушения, потомство.

SUMMARY

Grabovska SV Neurophysiological reactions to the effect of low doses of chlorpyrifos in rats and their offspring. – The manuscript.

Thesis for a PhD degree in biological sciences in specialty 03.00.13 – human and animal physiology. – Lviv Ivan Franko National University, Lviv, 2018.

Organophosphorus compounds (OPs) are widely used in industry and agriculture. Due to their high toxicity, their use is legislatively limited in many countries.

The dissertation reveals the effects of one of the most common organophosphorus insecticides – chlorpyrifos (CPF) on neurobehavioral parameters of laboratory rats, in particular on their level of anxiety, research activity, short – term and long – term memory. Changes in the above mentioned indicators were studied both in adult female intoxicated rats (under conditions of acute and chronic administration) and in their offspring. The scientific novelty of the work consists in the study of neurobehavioral features of the second generation of rats, e.g. offspring derived from intoxicated females, which, in turn, had no direct influence of the CRF either during gestation or during postnatal development until adulthood. Their parameters were compared with the behavior of both intact rats of the same age and animals prenatally intoxicated with CPF. We also studied certain biochemical (acetylcholinesterase, aspartate and alanine aminotransferase activity, alkaline phosphatase and some other enzymes, total protein content) and hematological parameters of rat blood.

The studies were carried out on white laboratory rats of the Vistar line of both sexes. In total, 100 animals were used at all stages of the dissertation study. The experimental comparison of the two commonly used modifications of the "Open field test" array (round and square) did not reveal any significant differences in the main informative parameters of the method, which made it possible to conclude that both modifications can be used equally for rat behavior studies.

During chronic intoxication of adult female rats with 5, 10 and 15 mg/kg CPF (daily for 30 days), there were no significant persistent changes in their behavior: though the general anxiety of the intoxicated animals increased at the beginning of exposure, eventually all indicators have normalized. However, in the offspring of these intoxicated animals (most commonly in the group exposed to 15 mg/kg CPF) we found statistically significant neurobehavioral deviations: excessive motor activity and abnormally low duration and number of freezing. In general, the behavior of this group of rats resembled manifestations of the hyperactivity syndrome. In addition, significantly less rats of this group, compared to control, reached adulthood; the Kettle's coefficient was also lower. In contrast, in animals that were prenatally intoxicated with 30 mg/kg CPF at 6– 7 gestation day, there was some deterioration in their memory, but no signs of hyperactivity.

A single exposure to 15, 30 and 60 mg/kg CPF of adult female rats caused a decrease in activity of AChE and increased the alkaline phosphatase activity, but did not lead to significant changes in their behavior. In the offspring of these females, conceived at 10 days after intoxication, signs of increased anxiety in low– stress

conditions (the placement of animals in an unknown territory), as well as an abnormal reaction to moderate stress caused by bright light, were revealed. In response to acute stress (drowning in water), no significant differences between the experimental and control groups of animals were found.

Summarizing the data obtained in the work, we should confirm the presence of the effects of intoxication even at low doses of CPF on the functional state of the CNS of exposed animals, as well as their offspring conceived after the completion of the exposure. In particular, in the offspring of females intoxicated with CPF, behavioral tests showed signs of hyperactivity. Mechanisms of such effects of the CPF on the behavior of the second generation need further study.

Keywords: chlorpyrifos, behavior, rats, anxiety, hyperactivity, behavioral tests, neurobehavioral disorders, offspring.

Підписано до друку 16.11.2018 р. Гарнітура
«Times New Roman» Формат 60x84/16.
Папір офсетний.
Умов.друк. арк. 0,9. Наклад 100 прим. ТзОВ
«Смарт Систем ЛТД»
79018, м. Львів, вул. О. Степанівни 45, корп. 3
тел./факс: (032) 2368247