

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ  
ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМ. І. ФРАНКА

Кваліфікаційна наукова праця  
на правах рукопису

**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**  
Дисертація на здобуття наукового ступеня  
кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень.  
Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на  
відповідне джерело \_\_\_\_\_ С. В. Грабовська

Науковий керівник:

**САЛИГА Юрій Тарасович**

доктор біологічних наук,

старший науковий співробітник

**Львів – 2018**

## АНОТАЦІЇ

**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 – ЛНУ ім. Івана Франка, Львів, 2018.

Фосфорорганічні сполуки (ФОС) широко використовуються в окремих галузях промисловості, а найчастіше – в якості діючих речовин багатьох пестицидних препаратів з другої половини ХХ століття. У зв'язку з їхньою високою токсичністю, в ряді країн їх застосування законодавчо обмежене, зокрема в побуті, однак у сільському господарстві вони залишаються однією з найбільш популярних груп інсектицидів.

Дисертацію присвячено вивченню впливу одного з найпоширеніших фосфорорганічних інсектицидів – хлорпірифосу (ХПФ) на нейроповедінкові параметри лабораторних щурів, зокрема на рівень їхньої тривожності, дослідницьку активність, короточасну та довготривалу пам'ять. Досліджували зміни згаданих показників як у самих інтоксикованих щурів (за умов гострого і хронічного введення), так і у їхнього потомства. Наукова новизна роботи полягає у дослідженні нейроповедінкових особливостей другого покоління щурів – потомства, отриманого від інтоксикованих самиць, яке, у свою чергу, вже не зазнавало безпосереднього впливу ХПФ ні під час гестації, ні протягом постнатального розвитку до дорослого віку. Їх параметри порівнювали з поведінкою як інтактних щурів такого ж віку, так і тварин, пренатально інтоксикованих ХПФ. Вивчено також ряд біохімічних (активність ацетилхолінестерази, аспартат– та аланінамінотрансфераз, лужної фосфатази та деяких інших ензимів, вміст загального протеїну) та гематологічних показників крові досліджуваних тварин. Провели порівняння двох варіантів установки тесту «Відкрите поле» - з аренами круглої та квадратної форми.

Дослідження проводили на білих лабораторних щурах лінії Вістар обох статей. Сумарно на усіх етапах дисертаційного дослідження було використано 100 тварин. Робота складалася з 3 етапів, кожен з яких включав у себе низку експериментів.

Експериментальне порівняння двох відомих з літератури модифікацій тесту "Відкрите поле" (арен круглої та квадратної форми) не виявило істотних відмінностей в основних інформативних показниках методу. Вірогідні відмінності (при  $p < 0,05$ ) 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, арени круглої та квадратної форми можуть використовуватися рівнозначно.

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. Найістотніші відмінності між дослідними та контрольною групами у тексті «Відкрите поле» спостерігали за параметром «короткий грумінг» у першу добу тестування. У всіх дослідних групах цей показник був статистично вірогідно ( $P < 0,01$ ) вищим, ніж у контролі. В середньому, контрольні тварини за час тестування здійснювали 2–3 акти короткого грумінгу, в той час як дослідні – 9–10 актів, тобто у кілька разів більше. Також статистично вірогідні відмінності було виявлено за кількістю актів дефекації у першу добу тестування: у другій дослідній групі вона була майже втричі ( $P < 0,05$ ) нижчою за контроль. Однак у наступних тестуваннях ці показники інтоксикованих тварин зрівнялися з відповідними показниками контрольної групи. За іншими параметрами у цьому тесті вірогідних відмінностей між дослідними та контрольною групами щурів виявлено не було.

У тесті «Темно–світла камера» тривалість перебування тварин у світлій частині камери до заходу в темну у першому тестуванні залежала від групи: тварини дослідної групи 3, що одержували 15 мг/кг ХПФ, проводили в освітленій частині статистично вірогідно ( $p < 0,01$ ) більше часу (майже у 6 разів більше), ніж щурі з контрольної групи. Тварини другої дослідної групи, тобто ті, яким вводили 10 мг/кг ХПФ, у цій серії тестів провели у світлому відсіку у 5 разів більше часу, ніж контрольні щурі, однак, все ж на 15% менше, ніж тварини групи 3 (самиці щурів, яким вводили 15 мг/кг ХПФ). У наступних тестуваннях ці відмінності також згладжувалися, що свідчило про адаптацію тварин та припинення нейротоксичної дії ХПФ.

Однак, у потомства, яке згодом було отримано від цих інтоксикованих тварин, спостерігали нижчий відсоток виживання до дорослого віку: в той час як у контрольній групі вижили 62% щурят, то у дослідній групі 3 (потомство самиць, що одержували 15 мг/кг ХПФ) – лише 40%. Також у дослідних групах спостерігалось значне (у 2-3 рази, порівняно з контрольною групою) падіння індексу Кетле (індекс маси тіла) після досягнення 21-добового віку (період завершення грудного вигодовування), що може свідчити про труднощі з адаптацією до самостійного харчування.

По досягненні статевозрілого віку у потомства хронічно інтоксикованих ХПФ самиць (найбільше у групі, що зазнавала дії ХПФ у дозі 15 мг/кг) мали місце істотні нейроповедінкові відхилення. У тесті «Відкрите поле» в них спостерігалися надмірна рухова активність, значне зниження тривалості та кількості завмирань. Зокрема, в першому тестуванні зовнішня горизонтальна активність у третій дослідній групі була втричі вищою, ніж у контрольній, у другому - майже в чотири рази вищою. Водночас, під час дослідження завмирань та дефекації у цих тварин практично не спостерігали.

У тесті «Темно-світла камера» у третій дослідній групі також виявляли істотні нейроповедінкові відмінності. Кількість виглядувань з нірки у щурів групи 3 була у 2–3 рази вищою, ніж у контролі. Загалом, у цій групі щурів спостерігали поведінку, що нагадувала прояви синдрому гіперактивності. На

противагу цьому, у тварин, які були одноразово пренатально інтоксиковані ХПФ дозою 30 мг/кг на 6–7 добу вагітності, спостерігали деяке погіршення їх пам'яті, однак ознак гіперактивності ми не виявляли.

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 самиць інтоксикованих ХПФ, зачатого за 10 діб після введення ХПФ, було виявлено ознаки підвищеної тривожності в низько–стресогенних умовах (поміщення в незнайому територію), а саме у тесті «Відкрите поле». Зокрема, зовнішня горизонтальна активність у дослідній групі була нижчою, ніж у контрольній, в обох тестуваннях: на 22% у першому тестуванні та на 19% у другому. Водночас, кількість актів довгого та короткого грумінгу в дослідній групі була у 2-3 рази вищою, ніж у контрольній. У тесті «Темно-світла камера» (в умовах помірного стресу, викликаного яскравим освітленням) у потомства інтоксикованих ХПФ самиць зафіксовано значно вищу кількість виходів в освітлену частину установки та більшу сумарну тривалість перебування в цій частині після заходу в темну. У реакції на гострий стрес (поміщення тварин у водне середовище) суттєвих відмінностей між дослідними і контрольними групами тварин виявлено не було.

Підсумовуючи дані, одержані в роботі, можна стверджувати наявність впливу інтоксикації навіть низькими дозами ХПФ на функціональний стан ЦНС тварин, які піддавалися цій інтоксикації, а також їхнього потомства, зачатого після завершення введення токсиканта. Зокрема, у потомства самиць, яким вводили ХПФ, у поведінкових тестах спостерігалися ознаки гіперактивності. Механізми такої дії ХПФ на поведінку другого покоління потребують подальшого вивчення.

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

## **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) are widely used in industry and agriculture, mostly as active substances of many pesticides, till the second half of the twentieth century. Due to their high toxicity, their use is legislatively limited in many countries, particularly in household, but in agriculture they remain one of the most popular groups of insecticides.

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 work was divided into 3 stages, each including a number of experiments.

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. Significant differences (at  $p < 0,05$ ) were detected by the parameters of the "hole

reflex" and "inner horizontal activity". As it was supposed, in the arena of the round form, animals crossed 3 times more internal segments than in the square one, where they moved mainly near the arena walls. However, according to other parameters (vertical and external horizontal activity, long and short grooming, number and duration of freezing, number of defecation acts), no statistically significant changes were detected. Therefore, according to the obtained data, round and square arenas can be used equally.

In the chronic (daily for 30 days) exposure of adult female rats to CPF at doses of 5, 10 and 15 mg/kg, there were no significant persistent changes in their behavior. In the "Open field" test the most significant differences between the experimental and control groups were observed in "short grooming" at the first day of testing. In all experimental groups, this parameter was statistically significantly ( $P < 0,01$ ) higher than in the control group. On average, control animals carried out 2-3 acts of short grooming during the testing, while the experimental ones - 9-10 acts, that is, several times more. Also, statistically significant differences were detected in the number of defecation acts in the first day of testing: in the second experimental group, it was almost three times ( $p < 0,05$ ) lower than in the control. However, in subsequent tests, these indicators of intoxicated animals approached the corresponding indicators of the control group. According to other parameters in this test, there were no probable differences between experimental and control groups of rats.

In the "Dark Light Box" test, time spent in the light part of the camera before entering the dark one, in the first test depended on the group: animals of experimental group 3 (exposed to 15 mg/kg CPF), spent statistically significantly ( $p < 0,01$ ) more time (almost 6 times more) in the lightened chamber than the rats from the control group. Animals in the second experimental group (exposed to 10 mg / kg of CPF) in this series of tests stayed in a light box for 5 times longer than control rats; however, still 15% less than the animals of group 3. In the following tests, these differences were also smoothed, indicating the adaptation of animals and the termination of neurotoxic effects of CPF.

However, in the offspring that was subsequently obtained from these intoxicated animals, a lower percentage of survival to adulthood was observed: while in the control group survived 62%, in experimental group 3 (offspring of females receiving 15 mg / kg of CRF ) - only 40%. Also, in experimental groups was observed a significant (20-30 times, compared with control group) decrease in the Quetelet index (body mass index) after reaching 21-day age (the end of breastfeeding), which may indicate difficulties in adaptation to self-feeding.

After reaching the sexual maturity, the offspring of the females chronically intoxicated with CPF (most notably in the group exposed to 15 mg/kg CPF) had statistically significant neurobehavioral deviations. In the "Open Field" test they showed excessive motor activity, a significant decrease in the duration and number of freezing. In particular, in the first test, the external horizontal activity in the third experimental group was three times higher than in the control group, in the second one it was almost four times higher. At the same time, freezing and defecation in these animals were practically not observed.

The "Dark Light Camera" test in the third experimental group also showed significant neurobehavioral differences. The number of looking-outs in the group 3 rats was 2-3 times higher ( $p < 0,05$ ) than in the control. In general, in this group of rats we observed a behavior that resembled manifestations of the hyperactivity syndrome. In contrast, in animals prenatally intoxicated with 30 mg/kg CPF at 6-7 gestation days, there was some deterioration in their memory, but they did not show any signs of hyperactivity.

A single exposure to 15, 30 and 60 mg / kg CPF to adult female rats caused a decrease the AChE activity and increase the activity of alkaline phosphatase, but did not lead to significant changes in their behavior.

In the offspring of CPF-intoxicated females, conceived at 10 days after the CPF exposure, signs of increased anxiety in low-stress conditions (placement in an unknown territory), namely the "Open field" test, were observed. In particular, the external horizontal activity in the experimental group was lower than in the control, in both tests: 22% in the first test and 19% in the second. At the same time, the



number of acts of long and short grooming in the experimental group was 2-3 times higher than in the control group. In the "Dark Light Camera" test (in conditions of moderate stress caused by bright light), the offspring of CPF-exposed females showed a significantly higher number of visits to the light part of the camera and a larger total duration of stay in this chamber after entering the dark one. In response to acute stress (drowning in water in the "Extrapolation Escape" test), no significant differences were found between the experimental and control groups of animals.

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.

1. **Grabovskaya S V**, Salyha Yu T. Do Results of the Open Field Test Depend on the Arena Shape? *Neurophysiology*. 2014. Vol. 46 (4). P. 376–380.
2. **Грабовська С**, Салига Ю. Вплив хронічної інтоксикації низькими дозами хлорпірифосу на поведінку самиць щурів. *Фізіологічний журнал*. 2015. № 61 (2). С. 94–101.
3. **Grabovska S**, Salyha Y. ADHD-like behaviour in the offspring of female rats exposed to low chlorpyrifos doses before pregnancy. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*. 2015. Vol. 66 (2). P. 121–127.
4. **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.

5. Rosalovsky V. P., **Grabovska S. V.**, Salyha Yu. T. Changes in glutathione system and lipid peroxidation in rat blood during the first hour after chlorpyrifos exposure. *Ukr. Biochem. J.* 2015. Vol. 87 (5). P. 124–132.
6. **Grabovska S**, Rosalovsky V, Salyha Yu. Neurotoxic effects and other actual risks of chlorpyrifos. *Living organisms and bioanalytical approaches for detoxification and monitoring of toxic compounds*, 2015. P. 195–204.
7. **Грабовська С.** Нейрофізіологічні порушення у самиць щурів та їх потомства за інтоксикації хлорпірифосом до запліднення. *Віол. Tvarin.* 2017. №19 (3). С. 25–35.
8. Салига Ю.Т., Росаловський В.П., **Грабовська С.В.** Нейротоксичність фосфорорганічних пестицидів: екологічні і медико–біологічні аспекти. Всеукраїнський з'їзд екологів з міжнародною участю. Вінниця 2013. С. 413–415
9. Салига Ю.Т. Федяков Р.О. Росаловський В. П., **Грабовська С. В.** Біологічна безпека застосування фосфорорганічних пестицидів в Україні: чи всі ризики враховані? Матеріали міжнародної науково–практичної конференції «Стратегія збалансованого розвитку агроєкосистем України». 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. *Біорізноманіття. Екологія. Адаптація. Еволюція.* Одеса. 2013. С. 189.
11. Салига Ю.Т., Росаловський В.П., **Грабовська С.В.** Механізми токсичного впливу хлорпірифосу на центральну нервову систему щурів. VI Конгрес Українського товариства нейронаук. 2014. С. 106.
12. **Grabovska S**, Rosalovsky V, Salyha Y. Comparing round and square open field test arenas. *Біологія тварин.* 2014. Vol. 16 (3). P. 168.

13. Rosalovskyi V, **Grabovska S**, Salyha Y. Dynamics of hematological parameters of rats during an hour after chlorpyrifos intoxication. *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: збірник тез X Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів [Текст]. Львів : СПОЛОМ. 2014. С. 239.
15. **S Grabovska**. 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. **S Grabovska**, Y Salyha. Open Field Test: comparing square and round arenas. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*. 2014. Vol. 3 (74). P. 363–364.
17. Салига Ю.Т., Росаловський В.П., **Грабовська С.В.** Багатовекторність нейротоксичної дії хлорпірифосу. *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: збірник тез XI Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів [Текст]. Львів : СПОЛОМ. 2015. С. 448–449.
19. Rosalovskyi V, **Grabovska S**, Salyha Y. Low dose chlorpyrifos exposure to female rats before and during pregnancy affects their behavior. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*. 2015. Vol. 4 (75). P. 59.
20. Salyha Y, Rosalovskyi V, **Grabovska S**. Organophosphate compounds: "old" neurotoxicants and new questions. VII Congress of the Ukrainian Society for Neuroscience. Київ, 7–11 червня 2017. С. 51–52.

## ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ І ТЕРМІНІВ .....	14
ВСТУП.....	15
РОЗДІЛ 1.....	20
ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ .....	20
1.1. Загальна характеристика та основи токсичності фосфорорганічних сполук.....	20
1.2. Фізіологічні основи нейротоксичності хлорпірифосу .....	24
1.2.1. Вплив низьких (субтоксичних) доз хлорпірифосу на нервову систему.....	24
1.2.2. Вплив хлорпірифосу на потомство інтоксикованих організмів	28
1.3. Поведінкові тестові методи у дослідженні нейротоксичності фосфорорганічних сполук .....	33
МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ.....	41
2.1. Загальна схема досліджень .....	41
2.2. Загальні принципи експериментів з лабораторними тваринами .....	44
2.3. Відбір експериментального матеріалу від лабораторних тварин .....	46
2.4. Біохімічні та гематологічні показники, які визначали в дослідженнях.....	46
2.4.1. Визначення активності холінестерази (КФ 3.1.1.8). .....	46
2.5. Поведінкові тестові методи .....	48
2.5.1. Тест "Відкрите поле". .....	48
2.5.2. Тест "Темно–світла камера". .....	51
2.5.3. Тест "Водний лабіринт Морріса". .....	53
2.5.4. Тест "Екстраполяційне позбавлення". .....	55

2.6. Вимірювання морфометричних показників та виживання потомства .....	56
2.7. Статистична обробка результатів досліджень.....	57
РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ .....	58
3.1. Вибір модифікації тесту «Відкрите поле» .....	58
3.2. Вплив хронічного введення низьких доз ХПФ на нейроповедінкові параметри статевозрілих самиць щурів.....	64
3.3. Нейроповедінкові зміни у потомства самиць щурів, які зазнавали хронічної інтоксикації ХПФ .....	70
3.4. Вплив гострого одноразового введення ХПФ за 10 діб до запліднення на нейроповедінкові, біохімічні та гематологічні параметри самиць щурів та їхнього потомства .....	80
3.4.1. Біохімічні та гематологічні показники крові щурів дослідних груп через 1 годину після введення ХПФ .....	81
3.4.2. Результати поведінкового тестування щурів, одноразово інтоксикованих ХПФ.....	87
3.4.3. Біохімічні та гематологічні показники крові потомства самиць щурів, одноразово інтоксикованих ХПФ .....	90
3.4.4. Результати поведінкових тестувань потомства самиць щурів, одноразово інтоксикованих ХПФ.....	93
РОЗДІЛ 4.....	100
АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ .....	100
ВИСНОВКИ .....	113

**ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ І ТЕРМІНІВ**

АлАТ	—	аланінамінотрансфераза
АсАТ	—	аспартатамінотрансфераза
АХЕ	—	ацетилхоліністераза
ГДК	—	гранично допустима концентрація
КЕ	—	карбоксилестераза
ЛФ	—	лужна фосфатаза
РАС	—	розлади аутистичного спектру
СДУГ	—	синдром дефіциту уваги з гіперактивністю
ФОС	—	фосфорорганічні сполуки
ХЕ	—	холіністераза
ХПФ	—	хлорпірифос
ШКТ	—	шлунково-кишковий тракт

## ВСТУП

**Актуальність теми.** Фосфорорганічні пестициди, зокрема хлорпірифос (ХПФ), широко використовують у сільському господарстві, промисловості та навіть побуті для боротьби з комахами–шкідниками. За своєю дією вони є високоефективними та економічно вигідними, що забезпечило їм значне поширення по всьому світу [42]. Однак, разом з тим, фосфорорганічним пестицидам притаманна висока токсичність для тварин та людини: гострі отруєння ними призводять до важких неврологічних розладів, що можуть мати летальні наслідки [50]. Хронічні отруєння низькими дозами цих токсикантів можуть спочатку протікати практично безсимптомно, однак з часом викликати ураження, перш за все, нервової системи, призводити до послаблення когнітивних функцій та інших патологічних проявів [44, 49, 60].

В останні роки з'явилася значна кількість досліджень, які свідчать про можливий зв'язок між хронічним пренатальним або раннім постнатальним отруєнням малими дозами фосфорорганічних сполук та розвитком нейродегенеративних захворювань, етіологія багатьох з яких на сьогодні вивчена недостатньо – зокрема, синдроми Альцгеймера та Паркінсона [60]. Більше того – ряд робіт свідчить також про підвищення ризику виникнення аутизму [46, 130], синдрому дефіциту уваги [108] та інших поведінкових розладів, а також зниження інтелекту, погіршення пам'яті та академічної успішності [115–117], порушення статевих відмінностей поведінки [120] дітей, матері яких під час вагітності зазнавали отруєння низькими дозами фосфорорганічних пестицидів. Таким чином, питання про можливі ризики застосування хлорпірифосу (ХПФ), та фосфорорганічних сполук (ФОС) загалом, у сільському господарстві та інших галузях людської діяльності є надзвичайно актуальним. 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 за мету дослідити вплив хронічної інтоксикації низькими дозами

ХПФ на дорослий організм та на його потомство, використовуючи як модельні організми білих лабораторних щурів.

З огляду на те, що основними проявами токсичної дії ХПФ є неврологічні порушення, які проявляються в аномаліях поведінки, для дослідження викликаних ксенобіотиком впливів було використано поведінкові тестові методи (тести «Відкрите поле», «Темно-світла камера», «Водний лабіринт Морріса», «Екстраполяційне позбавлення»). 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 2012–2017 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.** Мета дисертаційної роботи – дослідити вплив хронічного отруєння низькими дозами ХПФ на нейроповедінкові параметри самиць щурів та їхнього потомства.

Для досягнення мети необхідно було вирішити наступні завдання:

- провести порівняльне дослідження круглої та квадратної арен тестової установки "Відкрите поле" для виявлення можливого впливу форми ари на результати досліджень та обрання найдоцільнішого варіанту установки для подальшої роботи;
- дослідити рівні тривожності та рухової активності, роботу короткочасної та довготривалої пам'яті тварин у період хронічного введення різних субтоксичних доз 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 досліджень*: 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 з гіперактивністю (СДУГ) у дітей. Зокрема, для потомства хронічно інтоксикованих ХПФ самиць було характерно 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 спостерігали завмирань, які є характерними для інтактних щурів. Водночас, робота пам'яті та когнітивних механізмів у цих тварин залишалася

практично не порушеною. Водночас, у пренатально інтоксикованих щурів було виявлено часткове погіршення когнітивних функцій, однак ці тварини не проявляли симптомів гіперактивності. Окрім того, потомство всіх самиць, які зазнали впливу ХПФ, у порівнянні з контрольною групою молодих тварин, мало нижчий індекс Кетле, який свідчив про недостатній набір маси у ранній постнатальний період життя.

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

### **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 ари на одержані результати.

**Особистий внесок здобувача.** Дисертантом самостійно проведено аналіз наукової літератури за темою дисертації, 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.** Наукові результати, які лягли в основу дисертаційної роботи, доповідалися на міжнародних конференціях «3<sup>rd</sup> International Seminar on Behavioral Methods» (Szczyrk, Poland, 2014), "12th International Congress of the Polish Neuroscience Society"(Sept. 6–8, 2015, Gdansk, Poland), "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 рр.), на конференціях молодих вчених в Інституті біології тварин НААН (2014–2015 рр).

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

## РОЗДІЛ 1

### ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

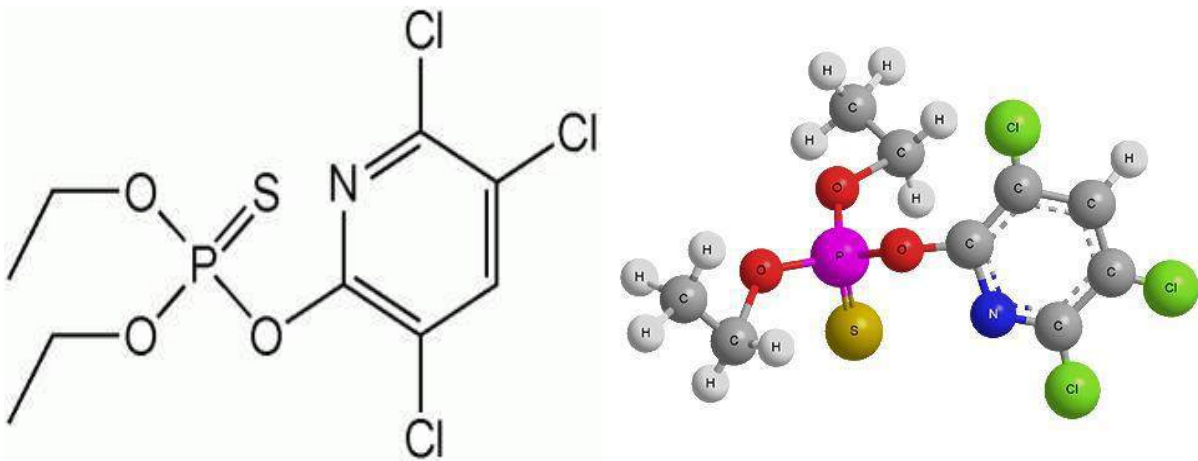
#### 1.1. Загальна характеристика та основи токсичності фосфорорганічних сполук

Фосфорорганічні сполуки (ФОС) – це речовини, що містять в молекулі атом Фосфору, пов'язаний з Карбоном: наприклад, триалкілфосфіни  $R_3P$ , кислоти типу  $RP(OH)_2$  (де  $R$  – органічний радикал) [10]. Деякі автори відносять до ФОС також сполуки, в яких атом  $P$  пов'язаний з Карбоном через атоми  $O$ ,  $N$  або  $S$ , напр. нуклеїнові кислоти, аденозинтрифосфат. ФОС виготовляють синтетично: пестициди, пластифікатори, розчинники, антипірени та інші. Деякі з них (напр., зарин, зоман, ві-газ) є високотоксичними [106] та використовувалися в якості хімічної зброї у військових конфліктах та терористичних актах (заринова атака у метро в Токіо у 1995 році) [110]. Сьогодні широке використання одержали фосфорорганічні пестициди, які вважаються менш небезпечними, ніж хлорорганічні (наприклад, заборонений до використання ДДТ), однак не менш високоефективними та економічно вигідними [23].

У господарській діяльності використовуються понад 150 різних фосфорорганічних пестицидів, серед яких є інсектициди (карбофос, метафос, хлорофос і ін.), акарициди (метилпірофос, октаметил і ін.), фунгіциди (піразофос, хінозан, інезін і ін.), гербіциди (фалон, бенсулід і ін.) і регулювальники зростання рослин (етефон, фосфон-Д і ін.) [9].

Хлорпірифос (ХПФ),  $C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$ , 0 – (3,5,6-трихлорпіридил-2) – 0,0-діетилтіофосфат, 0,0-діетил-0-(3,5,6-трихлор-2-піридил) фосфотіоат (рис. 1.1.) – представник класу фосфорорганічних речовин, основна активна діюча речовина багатьох пестицидів. За нормальних умов у чистому вигляді це біла

кристалічна речовина, температура плавлення якої 41,5–43,5° С. ХПФ добре розчиняється в органічних розчинниках: ацетоні (6500 г/кг), бензолі (7900 г/кг), хлороформі (6300 г/кг), ксилолі (4000 г/кг), етанолі (630 г/кг). У воді при 25° С ХПФ розчиняється дуже погано – 2 мг/л. Сполука є стійкою у нейтральному і кислому середовищах, однак відносно швидко гідролізується в лужному середовищі. Тиск пари (25° С) 2,5 мПа ( $1,87 \cdot 10^{-5}$  мм рт.ст.) [1, 50]. Володіє fumігатною активністю та здатністю проникати в тканини оброблених рослин [51].



*Рис.1.1. Структурна формула та просторова модель молекули хлорпірифосу.*

ХПФ вважається однією з найстійкіших фосфорорганічних сполук [114]. Так, у ґрунті ХПФ може зберігатися до двох років, тому для нього встановлені дуже низькі значення гранично допустимої концентрації (ГДК) [118]. ХПФ присвоєно 2 клас небезпеки для людини [148], а препарати на його основі належать до 2 і 3 класу [114].

Першими препаратами на основі ХПФ, що пройшли реєстрацію для застосування, були Дурсбан, Лорсбан і Ренобан компанії Dow Chemical Company. Застосування всередині житлових приміщень, з огляду на високу токсичність, заборонене у більшості країн світу [88]. У США використання

ХПФ було заборонене [83] через підозри у небезпеці для здоров'я людей, зокрема підвищенню ризику дитячої лейкемії [141] та негативному впливу на репродуктивну, імунну та нервову системи.

Основним механізмом токсичної дії ФОС, та ХПФ зокрема, на організм людини і тварин вважається зворотне інгібування холінестерази – ензиму, що руйнує нейромедіатор ацетилхолін. Таким чином, в організмі виникає надмірне збудження ацетилхоліном холінреактивних структур [24] (не виключається водночас і прямий вплив ФОС на ці структури), що призводить до спазму гладкої мускулатури (бронхів, ШКТ, м'язів зіниці), посилення секреції залозистого апарату ШКТ, слізних, слинних, потових, бронхіальних залоз, розвитку брадикардії та гіпотонії (збудження М–холінореактивних структур міокарда), розвитку гіперкатехоламінемії (що спричиняє тимчасовий підйом артеріального тиску), дрібнофібрилярних периферичних м'язових судом, ураження ЦНС (головний біль, ейфорія, порушення свідомості аж до розвитку глибокої коми, а також генералізовані судоми, що вражають значну частину м'язів тіла) [2, 25, 26, 51]. Ведуться також дослідження інших можливих механізмів токсичної дії ХПФ [141].

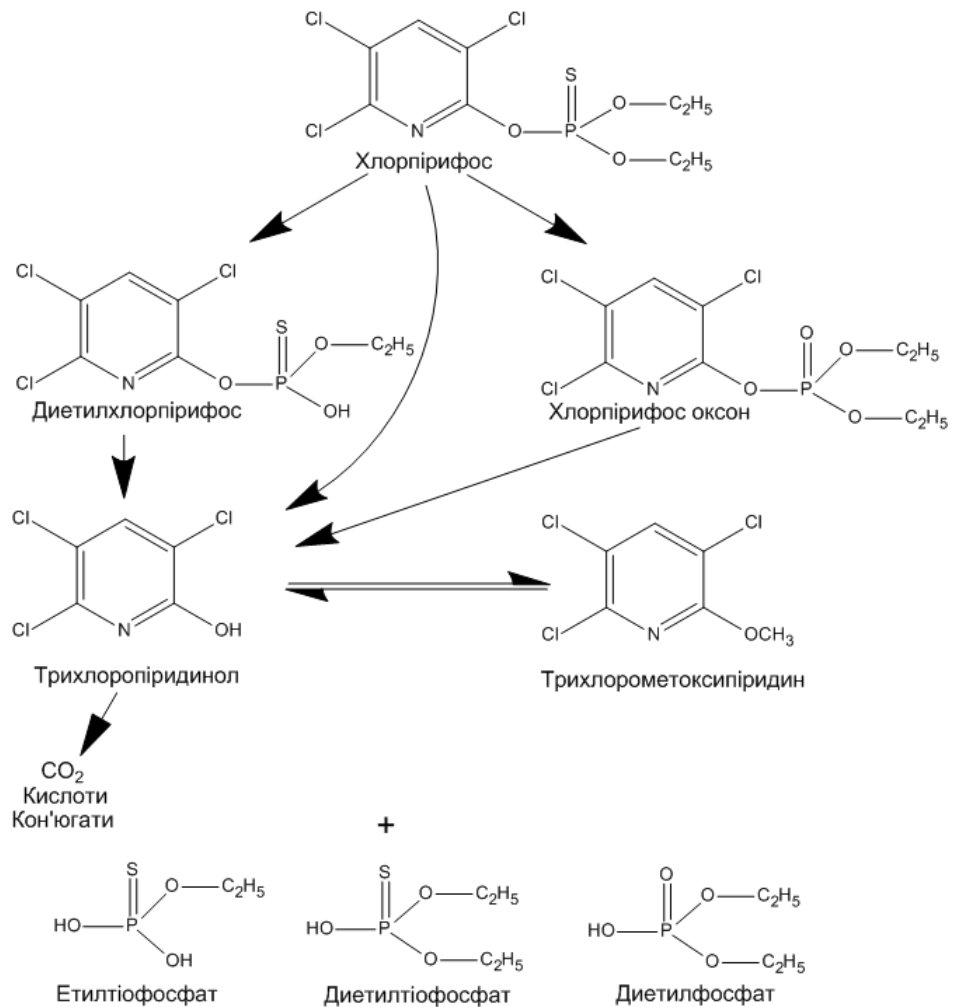
За дії доз ХПФ, значно нижчих за гостро токсичні, видимих ознак отруєння може не спостерігатися; однак, як показують численні дослідження, навіть незначні дози цієї сполуки (особливо за умов хронічного введення) можуть призводити до серйозних порушень у роботі ЦНС та інших систем, про що мова піде далі.

ХПФ здатен потрапляти в організм людини багатьма шляхами: пероральним (через забруднені продукти, питну воду, і т.д.), трансдермальним (при потраплянні на шкіру активно всмоктується), інгаляційним (зважаючи на високу летючість ХПФ, значну небезпеку для здоров'я та навіть життя людини можуть становити його випари) [50].

Потрапляючи в організм, ХПФ метаболізується в печінці з утворенням диетилхлорпірифосу та хлорпірифос–оксону [27, 70]. Хлорпірифос–оксон є навіть токсичнішим, ніж сам ХПФ, його антихолінестеразна інгібіторна

активність є у 1000 разів сильнішою, ніж у ХПФ [61]. Інші метаболіти не спричиняють деактивууючої дії на холінестерази.

Схему метаболізму ХПФ в організмі представлено на рис 2.1. Деактивація ХПФ відбувається в печінці за допомогою ензимів цитохрому Р450 (СYP) [56].



(Адаптовано із Racke [1993.] )

Рис. 1.2. Схема метаболізму ХПФ в організмі

При потраплянні ХПФ в організм, його кінцеві метаболіти – діетилтіофосфат і діетилфосфат – можна виявити у сечі. При цьому, їх можна виявити навіть за дії таких низьких доз ХПФ, які не викликають інгібування ацетилхолінестерази. Було проведено дослідження, в якому 5 добровольців одноразово приймали ХПФ орально у дозі 1 мг, а в їхній сечі визначали рівень

діетилтіофосфату і діетилфосфату. Паралельно визначали активність ацетилхолінестерази: її інгібування виявлено не було [82].

Токсичність та швидкість метаболізму ХПФ може змінюватися залежно від способу введення. У людини максимальна кількість метаболітів ХПФ у сечі за орального введення виявляється на сьому годину після введення, а за трансдермального – між 17 та 24 годинами [109].

Одностайності щодо того, які дози ХПФ варто вважати достатньо низькими, щоб не спричиняти шкідливих впливів, та умовно безпечними, немає. Вплив хімікату залежить від способу введення, тривалості дії, виду організму, його фізіологічного стану та інших факторів [1]. У літературі можна зустріти значні відмінності у даних щодо летальних доз токсиканта навіть для одного й того ж організму. Так, напівлетальна доза ( $LD_{50}$ ) ХПФ для щурів при оральному введенні, за різними даними, коливається від 95 до 270 мг/кг [92, 118, 140], у той час як, для котів вона може становити лише 10 мг/кг, а для морських свинок – порядку 500 мг/кг [100]. У наступному розділі подано дані про негативні впливи на розвиток та функціонування ЦНС навіть таких низьких доз ХПФ, які не спричиняють жодних видимих ознак гострої інтоксикації. Відомо, що плоди та молоді організми значно більш вразливі до дії ХПФ, ніж зрілі тварини того ж виду [146] (про що мова також піде далі).

## **1.2. Фізіологічні основи нейротоксичності хлорпірифосу**

### **1.2.1. Вплив низьких (субтоксичних) доз хлорпірифосу на нервову систему**

Можливість негативного впливу ХПФ на функціонування нервової системи організмів, які не є його мішенями, переконливо показана у дослідях з тваринами різних видів та навіть класів [17, 65, 139, 134].

Так, вплив повторюваного введення низьких доз ХПФ може викликати у щурів посилення імпульсивності поведінки та порушення стійкості уваги [102].



Дорослим щурам підшкірно вводили ХПФ у дозі 18 мг/кг: одній з дослідних груп – щодня протягом 14 діб, другій – раз на дві доби протягом місяця. Пам'ять та поведінкові реакції інтоксикованих тварин вивчали за допомогою поведінкових тестів щоденно у період введення ксенобіотика та ще протягом місяця після його завершення. Стійкість уваги та імпульсивність щурів оцінювали за допомогою тесту 5C–SRTT (Five-choice serial-reaction time task, тест серійного вибору) [123, 33]. В обох дослідних групах, у порівнянні з контрольною, у період введення ХПФ спостерігали підвищення кількості передчасних виборів нірки (ознака імпульсивної поведінки) та помилок і пропусків сигналу (зниження стійкості уваги). У період відновлення (після припинення введення токсиканта) показники всіх груп поступово приходили до рівня контролю, що свідчило про адаптацію організму щурів до нейротоксичного впливу пестициду.

Дослідження вчених з університету Провенс (США) показали, що субхронічне введення невеликих доз (0,01 та 0.1  $\mu\text{M}$ ) ХПФ малькам акваріумних риб *Danio rerio* спричиняє виникнення у них ознак поведінки, пов'язаної з тривогою: зниження швидкості плавання, тигмотаксис (притискання до стінок чи дна акваріума) [121].

Як уже було сказано, основним механізмом токсичної дії ХПФ вважається інгібування холінестерази, що призводить до порушення роботи холінергічних синапсів. Однак, в останні роки повідомляють про інші можливі механізми нейротоксичності ХПФ.

Нещодавно було одержано дані щодо можливості ураження інтоксикацією ХПФ ендоканабіноїдної системи мозку. Р. Карр зі співробітниками [44] поставили на меті з'ясувати, чи впливають на ендоканабіноїдну систему такі низькі дози ХПФ, які не викликають інгібування АХЕ. Для цього щодня протягом 7 діб щуриям (вік тварин на початку експерименту становив 10 діб) орально вводили ХПФ у дозі 0,5 мг/кг маси тіла тварин. Після завершення введення було відібрано проби крові та півкуль мозку тварин і проведено аналіз активності ряду ензимів: карбоксил естерази (КЕ),

АХЕ, амідази, а також вмісту ендоканабіноїду анандаміду. У тканинах мозку спостерігалось накопичення анандаміду та зниження активності амідази. Дослідження також показало, що такі дози ХПФ практично не впливали на активність АХЕ, однак істотно інгібували КЕ. Однак, варто зазначити, що у плазмі людської крові КЕ відсутня.

Вплив ХПФ на серотонінергічну систему щурів було показано дослідженнями китайських вчених [49], які піддавали 4–тижневих самців щурів (підлітків) впливу різних доз хлорпірифосу (10, 20, 40, 80 та 160 мг/кг на добу) протягом 7 послідовних діб. У дослідних щурів з груп, які отримували дози 40–160 мг/кг на добу, значно підвищилася частота заходу у відкриті рукави припіднятого хрестоподібного лабіринту та час перебування у них. У щурів з майже всіх дослідних груп (крім тих, які одержували ХПФ у дозі 10 мг/кг) зросло число шоків у конфліктному тесті Фогеля. У тесті пригнічення новизною затримка приймання їжі в новому оточенні значно зменшилася у всіх дослідних групах. Цікаво, що у тесті примусового плавання у щурів, інтоксикованих 10 мг/кг ХПФ на добу, тривалість нерухомості зросла, у той час як за дози 160 мг/кг – навпаки, значно знизилася.

Введення нижчих (не гостро токсичних) доз ХПФ у період раннього неонатального розвитку також може спричиняти порушення роботи серотонінергічної системи, викликаючи розвиток симптомів депресії [32]. У дослідженні вчених з Дархемського університету (США) було одержано дані, що у щурів, які піддавалися впливові ХПФ (у дозі 1 мг/кг на добу) на першу–четверту доби після народження, по досягненні тваринами дорослого віку розвиваються депресивні симптоми: ангедонія (зниження чи втрата здатності отримувати задоволення), погіршення пам'яті, поведінкові аномалії. У досліді з припіднятим хрестоподібним лабіринтом щурі дослідної групи більше, ніж звичайно, часу проводили у відкритих рукавах лабіринту, що свідчить про порушення захисної та дослідницької поведінки. Тварини дослідної групи також демонстрували ознаки ангедонії: у виборі між шоколадним молоком та водою віддавали перевагу першому значно рідше, ніж це зазвичай роблять

здорові щурі. Окрім того, в інтоксикованих щурів було виявлено послаблення статевих відмінностей поведінки: якщо у контрольній групі у періоді попереднього навчання в тесті «16-рукавний лабіринт» самці зазвичай поведуться обережніше за самок, то у дослідній групі ці відмінності були практично стерті. Також у цьому тесті було спостережено погіршення оперативної та довготривалої пам'яті контрольних щурів.

Є дані про те, що виявлені зміни у поведінці тварин можуть бути спричинені впливом ХПФ не лише на серотонінову систему, але й на кіназу глікогенсинтази  $3\beta$  (GSK- $3\beta$ ) у гіпокампі та смугастому тілі [48]. GSK- $3\beta$  – це ензим, який бере участь у багатьох центральних шляхах метаболізму, тому порушення його роботи має цитотоксичні наслідки, які можуть також проявлятися і в порушеннях функціонального стану ЦНС та пов'язаних із цим когнітивних та поведінкових аномаліях.

Негативний вплив ХПФ на пам'ять тварин показано у багатьох дослідженнях. Так, у роботі [136] у щурів, яким періодично підшкірно (у вигляді ін'єкцій) вводили ХПФ у дозах 10 та 18 мг/кг в добу, спостерігали порушення пам'яті та здатності до просторового навчання у тестах «радіальний лабіринт» та «водний тест Морріса». У водному тесті в інтоксикованих тварин не лише зростав час, потрібний для запам'ятовування розташування підводної платформи, але й виникали складнощі з її виявленням після зміни положення, що може свідчити про зниження гнучкості мислення. Аналогічні дані у дослідженні за допомогою водного лабіринту Морріса одержали також китайські вчені, що описано у роботі [149].

Є ряд свідчень про можливий зв'язок хронічного отруєння фосфорорганічними пестицидами та розвитку нейродегенеративних захворювань, етіологія яких наразі достеменно не відома (хвороби Паркінсона, Альцгеймера) [105, 91].

У 2005 році було проведено статистичне дослідження впливу мікродоз пестицидів на розвиток хвороби Паркінсона [41, 122]. Одержані дані дозволяють виділити хронічне отруєння низькими дозами пестицидів як

важливий фактор ризику цього нейродегенеративного захворювання; однак, дане питання ще потребує поглибленого дослідження.

Одержано дані, що хронічне потрапляння в організм фосфорорганічних пестицидів також може бути в числі факторів ризику розвитку хвороби Альцгеймера [74]. У статистичному дослідженні взяли участь 68 хворих на хворобу Альцгеймера та аналогічна за віком і статтю група здорових людей. Було враховано спадковість, умови та спосіб життя досліджуваних, а також стан забрудненості пестицидами місцевості, де вони проживали. За одержаними даними можна зробити висновок про можливий вплив хронічної інтоксикації ФОС на розвиток захворювання.

### **1.2.2. Вплив хлорпірифосу на потомство інтоксикованих організмів**

Як свідчать дані медичної статистики та результати досліджень на експериментальних тваринах, найвразливішими для нейротоксичного впливу ХПФ є пренатальний та ранній постнатальний періоди розвитку організму [14, 16, 65]. У мозку, що розвивається, ця сполука здатна призводити до значних і часто незворотних функціональних, біохімічних та навіть морфологічних порушень. При цьому, такою дією володіють низькі дози ХПФ, що не викликають істотних розладів у дорослих організмів [95].

Так, у роботі [111] самицям щурів з 10 доби вагітності до 21 доби після пологів (тобто, до закінчення періоду лактації) щоденно вводили ХПФ у дозах 2,8; 14 та 70 мг/кг. Після цього вимірювали активність холінестерази у крові та мозку щуренят. Було виявлено, що навіть за найнижчої з застосованих доз (2,8 мг/кг) у крові знижувався рівень ХЕ. За дози 70 мг/кг активність ензима знижувалась також у мозку. За цієї дози також спостерігали тимчасове, оборотне пригнічення проліферації клітин–попередників типу 2 у зубчастому ядрі гіпокампу.

Аналогічний вплив (тимчасове пригнічення проліферації клітин–попередників 2–го типу у зубчастому ядрі гіпокампу) було виявлено і при

дослідженні на мишах [145]. Як і в попередній роботі, вагітним та годуючим самицям вводили ХПФ (у дозах 4, 20 та 100 мг/кг) шляхом додавання у їжу з 10 дня вагітності по 21 добу після пологів.

У дослідженнях впливу пренатальної інтоксикації низькими дозами ХПФ на майбутню поведінку дорослих та нестатевозрілих щурів [96] було показано, що ця речовина викликає довготривалі, практично необоротні порушення різноманітних аспектів поведінки тварин. Щурів піддавали впливові ХПФ впродовж 17–20ї діб внутрішньоутробного розвитку (тобто у пік періоду нейрогенезу) у дозі 1 або 5 мг/кг в добу (що нижче за порогову дозу, яка викликає порушення росту плоду). Згодом, після досягнення підліткового віку, цих тварин періодично тестували за допомогою низки поведінкових методик (Т-подібний лабіринт, апарат «фігура 8» (8-подібний лабіринт), 16-рукавний лабіринт); тестування продовжували і після досягнення щурами статевої зрілості. Було виявлено локомоторну гіперактивність контрольних щурів у Т-подібному лабіринті. Самки контрольних щурів повільніше звикали до 8-подібного лабіринту, також у них були виявлені порушення оперативної та просторової пам'яті у 16-рукавному лабіринті (зниження точності вибору входу); самці у цих тестах порушень не демонстрували. Врешті, вивчення тестових установок успішно завершилося в усіх групах тварин, однак у дослідних групах воно вимагало більше часу і зусиль, ніж у контрольній.

Дослідження вчених з Римського медичного університету [120] показали, що вплив невеликих доз хлорпірифосу на мишенят у ранньому постнатальному періоді спричиняє порушення розвитку головного мозку. Мишенят однієї з дослідних груп піддавали впливу хлорпірифосу у період внутрішньоутробного розвитку, інших груп – або тільки в постнатальний період, або і у внутрішньоутробний, і в постнатальний періоди. Доза хлорпірифосу була такою, що не інгібує холінестеразу мозку (1 та 3 мг/кг). На 11–14 добу після народження введення хлорпірифосу було припинено. Після досягнення статевої зрілості цих тварин досліджували у тесті «Відкрите поле» та вивчали їхню соціальну взаємодію з незнайомими мишами. Молодих самиць, які ще не

народжували, піддавали тесту індукування материнського інстинкту (підкладали чужих мишенят). Досліджували також тривожність та дослідницький інстинкт мишей обох статей за допомогою припіднятого хрестоподібного лабіриту. Постнатальний вплив хлорпірифосу спричинив посилення індукованого материнського інстинкту у самиць, а також зниження проявів тривожної поведінки при проходженні припіднятого хрестоподібного лабіриту у мишей обох статей, але у самиць ефект був сильнішим. Було показано істотний вплив низьких доз хлорпірифосу на статеві відмінності поведінки шурів.

Також було показано, що введення ХПФ вагітним та лактуючим самицям мишей спричиняє довготермінову затримку розумового розвитку мишенят та підвищення рівня їхньої тривожності [40]. Самицям щоденно (у період вагітності чи лактації) протягом 18 днів перорально вводили невеликі дози (0,2; 1; 5 мг/кг в добу) ХПФ. Після періоду відновлення, який тривав кілька тижнів, потомство досліджували за допомогою поведінкових тестів – «припіднятий хрестоподібний лабіринт» та «темно–світла камера». Предметом дослідження була тривожність молодих мишей. Дослідження показали не тільки зростання тривожності дослідних мишей у порівнянні з контрольною групою, але й нелінійну залежність такого зростання від дози пестициду: найбільший ефект спостерігався за дози 1 мг/кг на добу.

За даними моніторингу пренатального впливу ХПФ на дітей [116], цей пестицид здатен негативно впливати на їхні інтелектуальні здібності. Дослідили 265 новонароджених, рівень пренатальної концентрації ХПФ визначався у плазмі пуповинної крові. Згодом, по досягненні дітьми 7-річного віку, рівень їхнього інтелекту виміряли за допомогою спеціального адаптованого тесту. Було виявлено, що у дітей, які зазнали пренатального впливу хлорпірифосу, коефіцієнт інтелекту знизився на 1,4%, а показники оперативної пам'яті – на 2,8%. Такі фактори, як різниця освіти батьків та обставини середовища, в якому діти зростали, було враховано.

Статистичні дослідження показали також, що пренатальний вплив пестицидів (зокрема хлорпірифосу) на дітей може спричиняти порушення у розвитку їхнього мозку [117]. У дослідженні було порівняно дані магнітно–резонансної томографії 20 дітей у віці 5–11 років, які зазнавали впливу пестицидів під час внутрішньоутробного розвитку (у дозах, які вважаються допустимими для потрапляння в організм людини при обробці сільськогосподарських угідь) з даними такої ж кількості дітей, в організм матерів яких під час вагітності не потрапляли пестициди. Обидві групи дітей не зазнавали впливу тютюнового диму та поліциклічних ароматичних вуглеводів, які могли б спричинити аналогічні до хлорпірифосу ефекти. У дітей дослідної групи було виявлено відмінності у розмірах деяких звивин, викликані аномаліями у білій речовині мозку. Виявили також деяке згладження статевих відмінностей у будові нижньої тім'яної долі та верхньої бокової звивини. У правій медіальній лобній звивині спостерігали навіть реверсію статевих відмінностей. Ці дані перегукуються з дослідженнями тваринних моделей, де було спостережено зміни статевих відмінностей у поведінці тварин під впливом хлорпірифосу [120, 96].

Нещодавні дослідження, проведені у США, свідчать про можливість існування зв'язку між потраплянням мікродоз пестицидів в організм людини у пре– та постнатальному періоді розвитку та зростанням ризику виникнення аутизму [130]. Аутизм та подібні до нього розлади на зразок синдрому Аспергера є функціональними розладами гетерогенного походження, їхні причини ще досі остаточно не встановлені. Вважається, що на розвиток аутизму та розладів аутистичного спектру (РАС) впливають як генетичні чинники, так і несприятливі фактори зовнішнього середовища, які діють на організм у пренатальному періоді та протягом перших одного–трьох років життя. Основними ознаками цих розладів є погіршення соціальної взаємодії (до повного її унеможливлення у найважчих випадках), стереотипні дії та інші поведінкові аномалії, за відсутності явних органічних порушень ЦНС. В останні роки проблема росту кількості діагнозів РАС дуже непокоїть

дослідників: так, у Каліфорнії серед дітей у віці 5 років, народжених у період з 1990 до 2001 року, спостережено 600% зростання частоти діагностування РАС; за приблизними оцінками, у США на сьогодні розлади аутистичного спектру вражають одну дитину з 88 [46]. Третина цього зростання може бути пояснена такими факторами, як покращення методів діагностики, зниження віку виявлення, зміна діагностичних критеріїв та розширення ознак РАС [87], однак решта випадків відображає реальне зростання кількості аутистичних розладів.

Експериментально здатність пренатального впливу ХПФ викликати порушення, що нагадують симптоми аутизму, було виявлено у досліді на мишах [104]. Тварини, які піддавалися впливу ХПФ, демонстрували аномалії ультразвукової вокалізації, поведінки у тесті «відкрите поле», соціальної взаємодії, а також повторювану (стереотипну) поведінку. Аналогічні прояви спостерігалися у мишей з недостатністю утворення позаклітинного матричного білка риліну, які не піддавалися впливові хлорпірифосу. Цікаво, що у мишей, які водночас мали дефект гену риліну та зазнавали впливу хлорпірифосу, поведінкові порушення проявлялися м'якше [104].

Нещодавно було встановлено, що вплив ХПФ на вагітних матерів може викликати у їхніх дітей ускладнення соціальної взаємодії [71]. У дослідженні, яке було розпочато в США у 1998–2002 роках, взяли участь матері на третьому триместрі вагітності. У їхній сечі виявляли присутність та визначали концентрацію метаболіту ХПФ – діалкілфосфату. Згодом, по досягненні дітьми цих жінок 7–9-річного віку, у них досліджували рівень соціальної взаємодії. Було виявлено, що підвищений вміст метаболіту ХПФ у сечі матерів (ознака того, що вагітна жінка зазнавала впливу фосфорорганічного пестициду) корелював з нижчими показниками соціальної взаємодії у їхніх дітей. При цьому відмінностей між білими, афро– та латиноамериканцями не спостерігали, однак виявили статеву відмінність: у хлопчиків даний ефект проявлявся сильніше.

Також у США було проведено масштабне дослідження, що мало на меті виявлення зв'язку між хронічним отруєнням фосфорорганічними пестицидами



та розвитком синдрому гіперактивності з дефіцитом уваги [38]. Вчені дослідили рівні метаболітів ХПФ у сечі понад 1300 дітей, що являли собою репрезентативну вибірку, та опитали їхніх батьків з метою встановлення наявності чи відсутності у дітей симптомів СДУГ. За результатами дослідження, у переважної більшості дітей з симптомами СДУГ в сечі було виявлено підвищений рівень метаболітів ХПФ, зокрема діалкілфосфату; у здорових дітей підвищені рівні цих метаболітів виявлялися значно рідше.

Дія пренатальної інтоксикації ХПФ на інші органи та системи вивчена менше, ніж на ЦНС, однак є дані щодо згубного впливу цього пестициду на розвиток імунної системи. Так, в експерименті на мишах, пренатальна та рання постнатальна інтоксикація ХПФ спричинила довготривале, практично необоротне порушення Т-лімфоцитарної відповіді [107]. Мишенята піддавалися впливу токсиканта з 10ї доби внутрішньоутробного розвитку та протягом 21 діб після народження. У всіх інтоксикованих тварин було виявлено зростання частки CD4-позитивних спленоцитів. Однак, CD4-позитивні регуляторні Т-клітини – єдиний вид імунних клітин, що зазнали негативного впливу ХПФ у цьому дослідженні.

### **1.3. Поведінкові тестові методи у дослідженні нейротоксичності фосфорорганічних сполук**

Поведінкові тести дозволяють виявляти функціональні зміни у роботі ЦНС, викликані відносно слабкою дією різноманітних факторів, яку часто неможливо виявити морфологічно чи біохімічно. Вони використовуються при дослідженні впливу на фізіологічний стан тварин різноманітних факторів (стресогенних чинників зовнішнього середовища, біологічно активних і токсичних речовин та ін.), моделюванні на лабораторних тваринах порушень ЦНС, нейродегенеративних захворювань та інших патологічних станів, що впливають на поведінкові реакції тваринного організму. За допомогою грамотного підбору поведінкових тест-методик можна дослідити такі

параметри, як стресостійкість, стійкість до фізичних навантажень, емоційний стан тварини, швидкість та адекватність реакції на зовнішні чинники, координація моторики, соціальна взаємодія та ін. [45, 85, 143, 54]

У ролі піддослідних тварин можуть виступати як холонокровні (риби, мурахи), так і теплокровні (гризуни, собаки), однак найчастіше використовують дрібних гризунів – мишей та щурів. Це пояснюється, зокрема, їхніми невеликими розмірами, відносною простотою утримання та розмноження, значною кількістю накопичених даних щодо їхньої поведінки та реакції на різноманітні впливи.

Сучасна промисловість виготовляє повністю устатковані тест–системи для різних методів дослідження, які обладнані апаратурою для фіксації поведінкових реакцій тварин та обробки отриманих результатів (відеозапис, комп'ютеризований аналіз даних), а також для комплексного моніторингу фізіологічних та біохімічних параметрів організму тварин.

Під час досліду необхідно проводити як якісну оцінку поведінкових проявів (напр., точність та координованість рухів), так і їхній кількісний облік (кількість повторів кожного прояву рухової активності, час, затрачений на виконання завдання).

При вивченні нейротоксичних ефектів ФОС, та ХПФ зокрема, переважно застосовуються тести для дослідження рівнів тривожності та дослідницької активності («Відкрите поле» [52], «Темно–світла камера» [40], «Конфліктний тест Фогеля» [49]), довготривалої та короткочасної пам'яті («Водний лабіринт Морріса», «Екстраполяційне позбавлення», різноманітні варіації радіальних лабіринтів). Під час дослідження тваринних моделей аутистичних розладів використовуються різноманітні тести для виявлення аномалій соціальної взаємодії [53, 150] та повторюваної поведінки (наприклад, тест закопування камінців [138] або тест на обмеженість інтересів [147]). Значно рідше застосовують тести моторних порушень (доріжка, що звужується [129]), швидкості реакції (5–CSRT (5–choice serial reaction time task, тест 5–серійного вибору) [34]) та ін.

Один з найпопулярніших та найвідоміших тестів для вивчення емоційності тварин, «Відкрите поле» (Open field), був розроблений Калвіном Холлом ще у 1932 році [84], проте не втратив актуальності й сьогодні. В його основі лежить природний потяг щурів та мишей до дослідження нової території та відмінність його інтенсивності у тварин з різним рівнем емоційності [84]. Найчастіше у тестуванні використовуються миші чи щурі, однак є дослідження на піщанках [112], полівках [62], хом'яках [90], собаках [68] та навіть 10–місячних немовлятах [119].

Під час процедури тестування тварину поміщають у відкриту, обмежену з боків бортами арену квадратної чи круглої форми (часом також використовують прямокутні арени з різним співвідношенням довжин сторін). Виготовляють їх з різноманітних матеріалів – пластик, дерево, метал, гума, навіть скло; колір також може бути різним – від білого до чорного [144]. Дно арени розмічене на квадрати (квадратна, прямокутна арени) чи сегменти (кругла). Щодо розмірів установки, то дослідження David Eilam [62] поведінки мишей–полівок в аренах різного розміру (автор використовував прямокутні арени шести різних розмірів, від 40х60см до 260х400см) показали, що рухова активність тварин у тесті практично не залежить від розмірів арени, в той час як просторова організація цієї активності дещо залежала від розмірів: у менших аренах щурі практично рівномірно пересувалися по всій площі поля, в той час як у більших – переважно рухалися по периметру, біля стінок.

Як правило, простір арени є порожнім, однак деякі автори поміщали у нього різноманітні об'єкти – дзеркала, болти і гайки, шматочки корму, мигаючі лампочки, інших щурів у клітках та ін. [68], бажаючи дослідити більше аспектів поведінки тварин (скажімо, їхню реакцію на стрес, потяг до соціальної взаємодії у незнайомому середовищі, і т.д.). Тривалість тестування однієї тварини, як правило, становить 3–5 хвилин, однак може варіюватися і до години [37].

Поведінку тварини в арені спостерігають або фіксують на відеозапис та чисельно реєструють ряд показників. До основних параметрів, які

враховуються, належать: горизонтальна (кількість перетнутих квадратів чи сегментів) та вертикальна (кількість стійок на задніх лапах) активність, кількість актів дефекації та грумінгу (вмивання). Часто горизонтальну активність поділяють на зовнішню (перетинання квадратів чи секторів, що знаходяться біля борта арени) та внутрішню (вихід тварини на середину арени та перетин центральних квадратів чи сегментів), а грумінг – на короткий (2–3 рухи лапками навколо мордочки) та довгий (8–10 рухів, перехід на вмивання інших частин тіла); як один з показників дослідної активності, фіксують нірковий рефлекс (обнюхування ніркоподібних отворів у підлозі). Деякі автори виділяють також окремо вільну (піднімання на задні лапи без опори) та пристінкову (з опорою на борт арени) вертикальну активність, фіксують кількість актів уринації [84]. Є роботи, де враховують інші показники поведінки тварин – швидкість руху, частоту та тривалість зупинок, довжину пройденого шляху, тривалість перебування у певних ділянках арени та ін. [62].

Вважається, що головними показниками емоційності у гризунів є частота дефекації та грумінгу: що цих актів більше, то емоційнішою, зокрема тривожнішою, є тварина. Що ж до вертикальної та особливо горизонтальної активності, то ці показники є, навпаки, обернено пропорційними до умовного «індексу емоційності».

В основу тесту «темно–світла камера» (Light/dark box) покладено інстинктивне прагнення гризунів шукати сховок у затемнених закритих місцях, уникаючи відкритих та яскраво освітлених просторів [39]. Камера складається з двох частин – пофарбованого в чорний колір відділення з кришкою і білого без кришки, яскраво освітленого лампою денного світла. Між відділеннями є невеликий отвір, що нагадує нірку (Рис. 6). Тварину поміщають в освітлену білу частину і фіксують час, за який вона сховається у темну, а також кількість виглядувань з нірки та (за наявності) кількість і тривалість виходів з неї.

У темно–світлій камері гризун переживає конфлікт протилежних інстинктивних мотивацій – до дослідження нового простору (неофілія) та до втечі у безпечну темряву (неофобія). Яка з цих мотивацій переможе, визначає

рівень тривожності – що він вищий, то менше часу тварина проведе в освітленому відсіку і тим менше разів виглядатиме з нірки. Навпаки, за дії анксиолітиків та інших факторів, що зменшують тривожність, піддослідні тварини більше часу проводять у відкритій освітленій частині камери, частіше виглядають з нірки, а то й повертаються в світлу частину, побувавши у темній. Таким чином, при зменшенні тривожності у гризунів бере гору інстинкт дослідження нового (неофілія).

Цей тест використовують у дослідженні впливу різноманітних факторів на функціональний стан нервової системи тварин, зокрема на рівень тривожності та активність дослідницької поведінки [86, 47].

Водний тест (лабіринт) Морріса (Morris water maze), розроблений у 1981 році Річардом Г. Моррісом [103], використовується у численних медичних, фізіологічних та ветеринарних дослідженнях для дослідження просторової пам'яті та здатності до орієнтування. Головною мотивацією в цьому тесті є пошук порятунку з екстремальних умов, якими є для гризунів поміщення у воду.

Установка для тесту складається з басейну діаметром 1,5–2 м, заповненого водою (воду замутнюють сухим молоком, щоб тварина не змогла безпосередньо побачити платформу), та встановленої у ньому дещо нижче рівня води платформи, на якій тварина може знайти порятунок. Навколо басейну розміщуються орієнтири – наприклад, закріплені на штативах картонні геометричні фігури різної форми, розміру та кольору, за місцезнаходженням яких щур чи миша може орієнтуватися при пошуку платформи. Заміряється час, за який тварина знаходить порятунок, а також, за можливості, проводиться відеозапис та подальший комп'ютеризований аналіз траєкторії руху, довжини пройденого шляху, стратегії поведінки [127]. За нормального функціонування механізмів просторової пам'яті та орієнтації час, потрібний для знаходження платформи, та шлях, пройдений до неї, з кожною наступною спробою скорочуються, що свідчить про навчання та запам'ятовування твариною місцезнаходження платформи за розміщенням орієнтирів. При порушеннях

механізмів пам'яті (наприклад, при впливі хімічних речовин на гіпокамп чи ураженні його внаслідок травми чи хвороби [1, 98, 93, 73]) просторова пам'ять порушується, і час, потрібний на відшукування платформи, не скорочується з наступними спробами, а залишається сталим, чи навіть навпаки – збільшується в міру прогресування ураження пам'яті, а поведінка тварини та її траєкторія у басейні стає більш хаотичною [58].

У порівнянні з іншими тестами, що досліджують просторову пам'ять, водний лабіринт Морріса має ряд суттєвих переваг [73]. По-перше, у водному середовищі не залишається пахучих міток та інших ознак, за якими тварина може відшукати правильний шлях без залучення просторової пам'яті. По-друге, що дуже суттєво – успішність проходження цього тесту практично не залежить від бажання, «настрою», біоритмів тварини, її ситості та інших суб'єктивних факторів, які неминуче позначаються на аналогічних тестах, побудованих на основі дослідження нових територій чи підкріпленого навчання. Адже мотивація у тесті Морріса є надзвичайно сильною – порятунок життя. Однак, саме цей фактор є водночас і серйозним недоліком тесту: дослідження є дуже стресогенним та енергозатратним для тварини, тому не можна проводити понад 6 спроб на добу (оптимально – 2–3), а між тестуваннями потрібно робити кількадечну перерву. Потрібно слідкувати за станом тварин – можуть виникнути судоми, носова кровотеча або інші симптоми небезпечної перевтоми; якщо тварини ослаблені, час тестування доцільно скорочувати до 3 чи й 2 хвилин (в разі, якщо за цей час гризун не знайде платформу, його виймають з води). Вода у басейні повинна бути оптимальної температури ( $26 \pm 2^\circ\text{C}$ ), оскільки переохолодження не лише може спричинити проблеми зі здоров'ям тварин, але й погіршує їхню здатність до навчання, викривлюючи результати досліджень.

Тест «Екстраполяційне позбавлення» [64] є відносно новою тестовою методикою, в основі якої, як і у лабіринті Морріса, лежить інстинктивне прагнення щурів врятуватися з ситуації гострого стресу, спричиненого водним середовищем. Установка для цього тесту складається з прозорого

плексигласового циліндра, закріпленого усередині ємності з водою так, що нижній край циліндра занурений у воду на 2,5 см. Вибратися з циліндра щур може, підпірнувши під його край. Тварину поміщають у циліндр хвостом вниз і спостерігають за її поведінкою. Заміряють такі показники: тривалість початкової іммобільності (завмирання), що є ознакою рівня тривожності; час, який витратила тварина на пошук виходу (від поміщення в циліндр до пірнання під його край); частку вдалих спроб від загальної кількості. Якщо за 2 хв щур не знаходить виходу, його виймають з циліндра; однак, виймання проводиться через занурений у воду край циліндра, щоб тварина зрозуміла спосіб виходу з пастки та могла його відтворити у наступній спробі.

Підсумовуючи дані, одержані з літературних джерел, можна стверджувати, що дослідження впливу низьких доз ХПФ на нейроповедінкові параметри організму на сьогодні є надзвичайно актуальним. Незважаючи на високу токсичність ХПФ та інших ФОС, їх широко використовують у різноманітних галузях народного господарства по всьому світу. Внаслідок цього невеликі дози пестицидів можуть потрапляти в організм не лише працівників, які безпосередньо проводять обробку полів чи приміщень хімікатами, але й жителів прилеглих територій та споживачів сільськогосподарської продукції: у тому числі, зазнавати отруєння мікродозами пестицидів можуть вагітні жінки та жінки репродуктивного віку, які планують мати дітей. Зважаючи на значну кількість даних щодо впливу ХПФ на розвиток поведінкових порушень (аутизм, СДВГ), нейродегенеративних захворювань (хвороби Паркінсона, Альцгеймера) та інших патологій нервової системи, які важко піддаються (чи взагалі не піддаються) лікуванню та становлять значний ризик для функціонування і навіть життя людини, поглиблене дослідження можливих ефектів впливу невеликих доз ХПФ на роботу та розвиток нервової системи є надзвичайно актуальним, має велике теоретичне і практичне значення.

Для дослідження впливу ХПФ використовують модельні організми – лабораторних щурів. Функціональний стан їхньої нервової системи досліджують за допомогою поведінкових тестових методик, які дозволяють виявити дію патологічних факторів на рівні, який ще не проявляється на морфологічних чи біохімічних показниках, але вже спричиняє аномалії в емоційному стані, когнітивних параметрах та поведінкових реакціях тварин.



## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Дисертаційна робота виконана протягом 2013–2018 років у лабораторії обміну речовин Інституту біології тварин НААН України.

#### 2.1. Загальна схема досліджень

Загальна схема дослідження впливу ХПФ різними способами введення на перше та друге покоління тварин представлена на рис. 2.1.

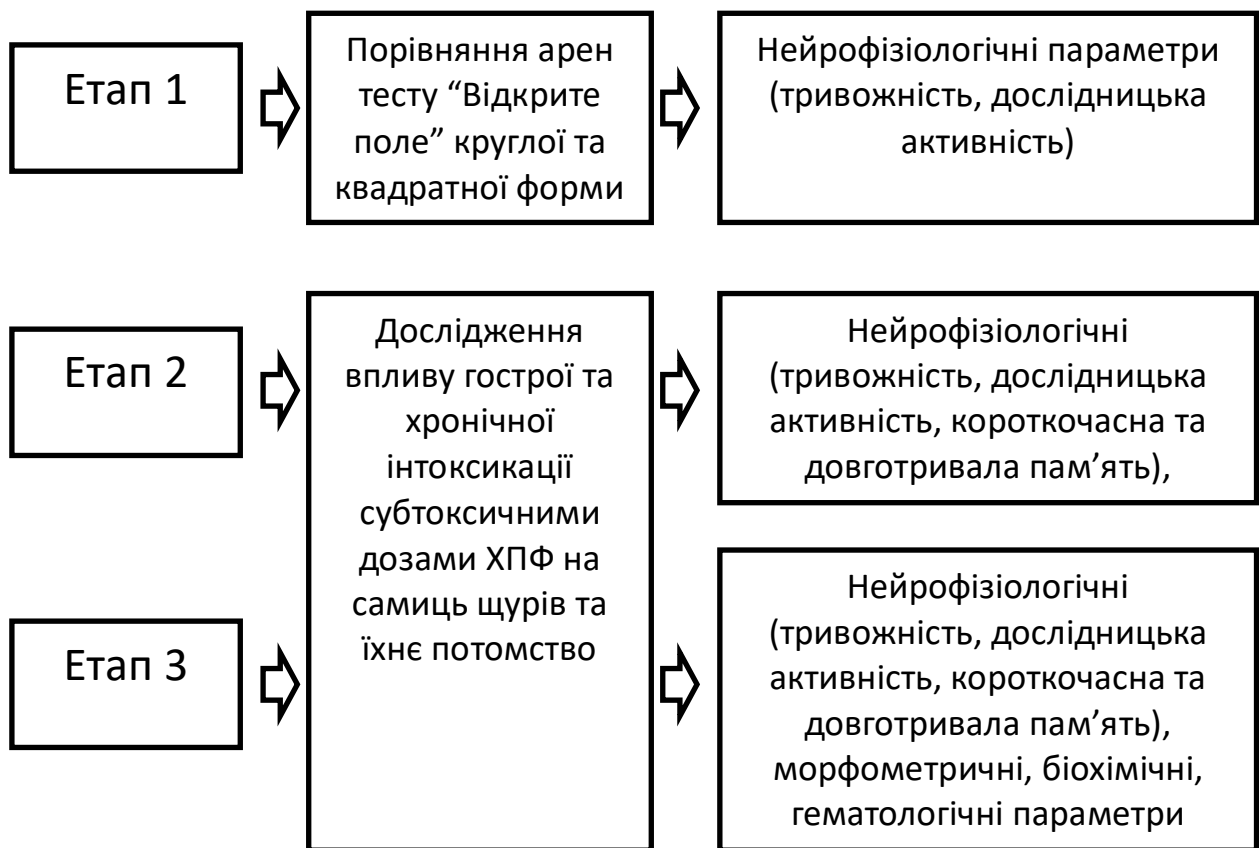


Рис. 2.1. Загальна схема дослідження впливу гострого та хронічного введення ХПФ на нейроповедінкові, біохімічні та гематологічні параметри самиць щурів та їхнього потомства.

Робота з вивчення впливу ХПФ на нейроповедінкові параметри тварин була поділена на три етапи. На першому етапі дослідження (рис. 2.2) статевозрілим самицям щурів вводили хронічно (щоденно 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.

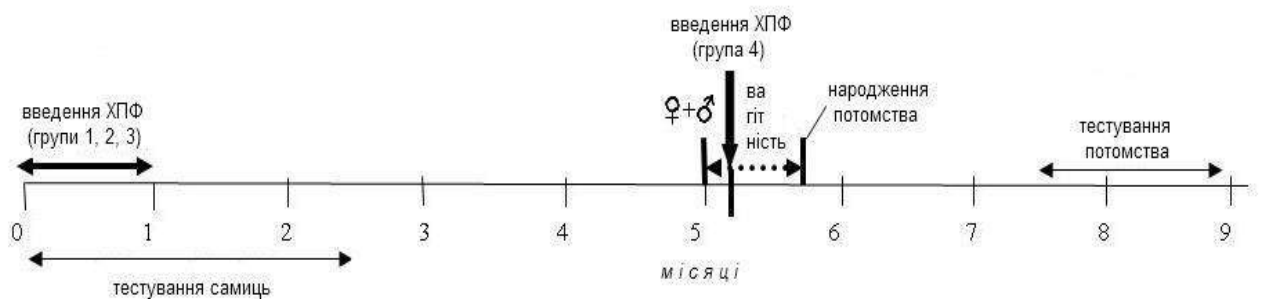


Рис. 2.2. Схема першого та другого етапів дослідження впливу хронічного введення ХПФ на нейроповедінкові параметри самиць щурів та їхнього потомства.

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 (темп 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» (останній був обраний для заміни «Водного лабіринту Морріса», використання якого було унеможливлене з технічних причин).

Третій етап дослідження (рис. 2.3) 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.

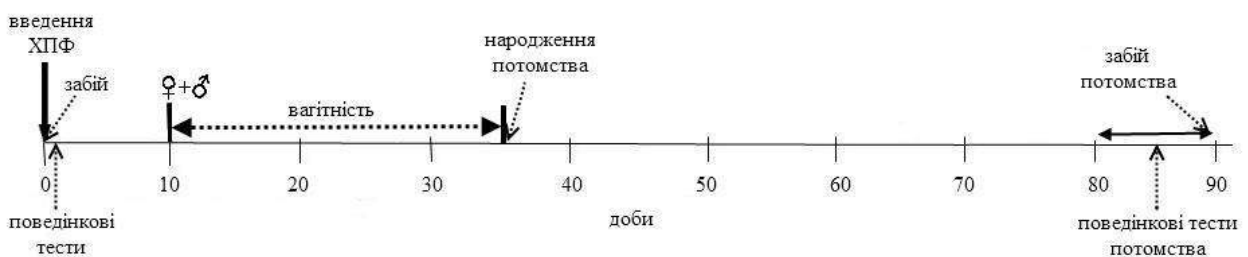


Рис. 2.3. Схема дослідження впливу гострого введення ХПФ на нейроповедінкові, біохімічні та гематологічні параметри самиць щурів та їхнього потомства.

Запліднення самиць щурів 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 тварин 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.

## **2.2. Загальні принципи експериментів з лабораторними тваринами**

Сумарно у всіх етапах дослідження були використані 100 білих лабораторних щурів лінії Вістар (обох статей). Зокрема, у досліді з порівняння круглої та квадратної арен тесту «Відкрите Поле» досліджували 20 щурів (по 10 самців та самиць). Перший етап дослідження впливу ХПФ на нейроповедінкові параметри тварин (хронічне пероральне введення токсиканта дорослим щурам та їх поведінкове тестування) проводився на 20 самицях. На другому етапі дослідження зі щурів, яких використовували на першому етапі, було сформовано 4 групи (3 дослідні та контрольна) по 3 самиці у кожній; окрім того, було сформовано ще одну дослідну групу з інтактних тварин, які не використовувалися на першому етапі дослідження. Також на цьому етапі було задіяно 5 самців, яких використовували для запліднення досліджуваних самиць (вони не входять в загальне число дослідних тварин). Поведінкові тести на даному етапі проводилися на потомстві цих самиць після досягнення ним статевої зрілості: всього було досліджено 40 тварин, з яких 15 самців та 25 самиць. На третьому етапі вивчення впливу ХПФ досліджували 24

статевозрілих самиць щурів, а також їхнє потомство, з якого до дорослого віку дожило 13 тварин обох статей.

Усі досліджувані тварини мали масу тіла 180–270 г, утримувалися у стандартних умовах віварію з дотриманням 12-годинного режиму освітлення темнота/світло та з необмеженим доступом до питної води та корму. Для годування тварин використовували стандартний повноцінний збалансований гранульований комбікорм для лабораторних щурів, який забезпечував фізіологічні потреби їхнього організму у вітамінах, мікроелементах, мінеральних речовинах та енергії. З метою уникнення впливів випадкових факторів на результати тестування усі тварини перебували в однакових умовах; при постановці дослідів намагалися створювати максимально однорідні умови (сезонність, час доби та ін.).

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. [63], Директиви ЄС №109 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» [13]. 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.

У зв'язку з поганою розчинністю ХПФ у воді, перед введенням досліджуваним тваринам його розчиняли у рафінованій соняшниковій олії. Введення здійснювали внутрішлунково за допомогою зонда. Контрольним тваринам замість розчину ХПФ вводили відповідну кількість чистої соняшникової олії.

### **2.3. Відбір експериментального матеріалу від лабораторних тварин**

Для дослідження активності холінестерази у тварин, яким вводили ХПФ, а також у відповідної контрольної групи, відбирали кров з хвостової вени. Даний спосіб відбору крові є малоінвазивним та дозволив проводити подальші поведінкові тестування тварин та одержати від них потомство.

Для проведення досліджень крові за допомогою біохімічного та гематологічного аналізаторів кров відбирали після декапітації тварин. Для отримання плазми кров відбирали у пробірки з попередньо внесеним антикоагулянтом – 1% розчином гепарину, або ЕДТА-К2. Плазму відділяли центрифугуванням при 1000 g впродовж 15 хв. Для визначення гематологічних параметрів на автоматичному гематологічному аналізаторі (Orphèe Mythic 18, Швейцарія), зразки крові вносили у пробірки (Terumo Europe N.V. (Бельгія)), які містили антикоагулянт ЕДТА-К2. Не пізніше, ніж через 2 год. після взяття кров аналізували на автоматичному гематологічному аналізаторі.

### **2.4. Біохімічні та гематологічні показники, які визначали в дослідженнях**

Всі вимірювання під час визначення досліджуваних показників здійснювали за допомогою сертифікованого устаткування та приладів, які пройшли метрологічну перевірку.

#### **2.4.1. Визначення активності холінестерази (КФ 3.1.1.8).**

Визначення активності холінестерази проводили за методом, описаним А.І. Карпищенком [11]. Його принцип ґрунтується на тому, що під дією холінестерази відбувається гідроліз ацетилхолінхлориду з утворенням оцтової кислоти і холіну, що супроводжується утворенням забарвленого комплексу.

*Хід визначення.* У пробірку вносили 2,5 мл вероналового буферу, 0,1 мл дистильованої води і 0,05 мл сироватки крові. Суміш прогрівали при

температурі 37° С протягом 5 хв на водяній бані, додавали 0,1 мл розчину ацетилхолінхлориду та інкубували протягом 30 хв при температурі 37° С. Після інкубації додавали 0,1 мл розчину прозерину. Одночасно готували контроль мутності, калібрувальну та холосту проби. У холосту пробу замість дослідного матеріалу вносили відповідний об'єм фізіологічного розчину. Протягом 10 хв вимірювали оптичну густина на спектрофотометрі при довжині хвилі 540 нм проти дистильованої води.

Активність холінестерази, виражену в мкмоль/с×л розраховували за формулою 2.1:

$$E_{\text{рез.}} = E_{\text{хол.}} - E_{\text{м.}} - E_{\text{досл.}} \text{ мкмоль} \cdot \text{с}^{-1} \cdot \text{л}^{-1} \quad (2.1),$$

де:  $E_{\text{хол.}}$  – оптична густина холостої проби;  $E_{\text{досл.}}$  – оптична густина дослідної проби;  $E_{\text{м.}}$  – оптична густина контролю мутності;  $E_{\text{рез.}}$  – результуюча оптична густина.

Розрахунок активності ХЕ проводили за формулою 2.2:

$$C = \frac{E_{\text{рез.}} \times 37}{E_{\text{хол.}} - E_{\text{кал.}}} \quad (2.2),$$

де:  $C$  – активність ХЕ, мкмоль /с×л; 37 – фактор перерахунку, мкмоль/с×л.

**2.4.2. Дослідження інших біохімічних параметрів.** Дослідження активності аспартат– та аланінамінотрансфераз, лужної фосфатази, вмісту загального протеїну проводили за допомогою біохімічного аналізатора HUMALYZER 2000 (Human GmbH, Німеччина) у плазмі крові щурів, відібраний після декапітації тварин.

**2.4.2. Дослідження гематологічних параметрів.** Визначення гематологічних параметрів, а саме показників лейкоцитів (загальна кількість, кількість та відносна кількість (відсоток) лімфоцитів, моноцитів, гранулоцитів), еритроцитів (загальна кількість еритроцитів, вміст гемоглобіну, середній об'єм еритроцита, MCH, MCHC, RDW), тромбоцитів (кількість, середній об'єм, PCT,

PDW) проводилося на автоматичному гематологічному аналізаторі (Orphèe Mythic 18, Швейцарія).

## **2.5. Поведінкові тестові методи**

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» [39, 84, 103].

З метою уникнення артефактів, за дві години до тестування тварин поміщали у тихе, слабоосвітлюване місце. У цей період не проводили перегрупування тварин, не годували їх і не здійснювали жодних інших маніпуляцій. Такі процедури, як маркування, переміщення з однієї клітки в іншу, формування груп (перегрупування) і т.д., проводили з тваринами не менш як за 24 год до тестування. Усі тестування проводили в один і той самий час доби, за однакових умов освітлення і температури, за відсутності сторонніх запахів і шуму.

### **2.5.1. Тест "Відкрите поле".**

Методику «Відкрите поле» (Open field) [84] використовували на всіх етапах роботи.

В основі даної методики лежить природний потяг тварин, зокрема гризунів, до дослідження незнайомої території, в яку вони потрапляють.

Поведінка тварин у тесті «Відкрите поле» змінюється залежно від рівнів їхньої тривожності та дослідницької активності. За допомогою цього тесту вивчали, як вплинуло отруєння ХПФ на рівень тривожності та дослідницької активності піддослідних щурів.



Тестування у «Відкритому полі» проводили на всіх етапах дослідження. Тривалість одного сеансу становила 3 хвилини, повторне тестування проводили з інтервалом у 10 діб (для відновлення ефекту новизни). Поведінку тварин в арені фіксували за допомогою відеокамери, одержані записи аналізували, а результати статистично обробляли, порівнюючи дані дослідних груп з інтактним контролем.

Використана арена тесту «Відкрите поле» (рис. 2.4) була виготовлена з плексигласу і являла собою квадрат розмірами 80х80см, обмежений стінками висотою 40 см. Дно арени було розмічено на 16 (4х4) квадратів за допомогою ліній, на перетині яких розміщені отвори діаметром 1 см, схожі на нірки (їхнє обнюхування враховують як параметр «нірковий рефлекс»).

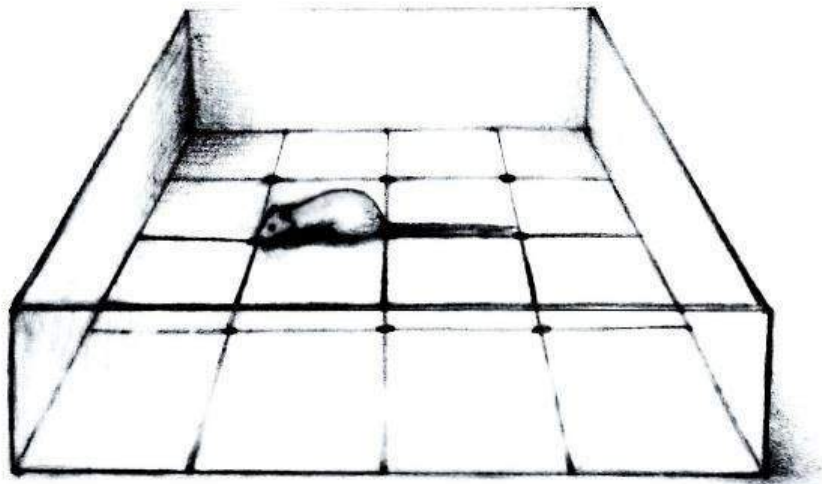


Рис. 2.4. Установка тесту «Відкрите поле».

У тесті визначали такі показники поведінки шурів: внутрішня та зовнішня горизонтальна активність, вертикальна активність, довгий та короткий грумінг,

дефекація, нірковий рефлекс, а також кількість та загальна тривалість завмирань.

Вертикальна активність – це кількість стійок на задніх кінцівках, під час яких передні лапи тварини залишаються у повітрі чи опираються на стінку арени. Деякі дослідники виділяють окремо пристінкову та вільну вертикальну активність (відповідно, з опорою на стінку чи без неї), однак ми вирішили за доцільне враховувати лише загальну кількість стійок. Горизонтальна активність – це кількість квадратів розмітки підлоги, які тварина перетнула за час тестування. Оскільки щурі схильні різко змінювати напрям руху, то перетнутим квадрат вважали лише у випадку, якщо всі чотири кінцівки тварини опинилися за його межами. Горизонтальну активність поділяли на зовнішню (перетин квадратів біля стінки арени) та внутрішню (перетин центральних квадратів). Як вертикальна, так і горизонтальна активність використовується для оцінки рівня тривожності та дослідницької поведінки гризунів: вважається, що обидва показники є обернено пропорційними до рівня тривожності тварин. За підвищеної тривожності (скажімо, викликані стресовими факторами середовища чи дією певних хімічних препаратів) щурі схильні завмирати біля стінок і мало рухатися в просторі арени, а особливо не виходити в її центральні квадрати. При зниженні рівня тривожності тварин (наприклад, за дії анксиолітиків) їхня горизонтальна та вертикальна активність зростає до рівня, який характерний для контрольних (інтактних) тварин. Однак, при значному підвищенні цих показників понад нормальні контрольні значення можна говорити про інший патологічний стан – надмірне рухове збудження (ажитацію), що може бути викликане порушеннями роботи ЦНС.

Ще одним показником дослідницької активності тварин, обернено пропорційним до рівня їхньої тривожності, є кількість обнюхувань ніркоподібних отворів у підлозі арени – нірковий рефлекс.

Грумінг (вмивання) вважається проявом тривожної поведінки гризунів, тому чисельно цей показник є прямо пропорційним до рівня тривожності тварин. Грумінг поділяли на короткий (2–3 "вмивальні" рухи передніх кінцівок

навколо носа) та довгий (8–10 вмивальних рухів, заведення лап за вуха, перехід на вмивання інших частин тіла).

Кількість актів дефекації значною мірою залежить від режиму харчування тварини та фізіологічного стану її травної системи, однак, за відсутності патологій травлення та за однакових умов лабораторного харчування, вища кількість актів дефекації свідчить про вищий рівень тривожності тварини.

Кількість та тривалість завмирань – ще один параметр, прямо пропорційний до рівня тривожності дослідних щурів. За підвищеної тривожності тварини схильні проводити більше часу, нерухомо завмерши (переважно біля стінки арени): така поведінка є інстинктивною реакцією пасивного уникнення небезпеки. Водночас, як і у випадку з руховою активністю, аномальне зниження показника тривожності нижче за контрольні значення (мала кількість грумінгу, дефекації, завмирань, або навіть їх повна відсутність), особливо у поєднанні з високими показниками рухової активності, свідчить про надмірне збудження, рухову ажитацію, що є симптомом ряду патологічних станів – зокрема, гіперактивності [29].

### **2.5.2. Тест "Темно–світла камера".**

Тест «Темно–світла камера» (Light/dark box) [39] був використаний на всіх етапах роботи для дослідження рівня тривожності та дослідницької активності щурів.

Установка для даного тесту (рис. 2.5) являла собою пластикову камеру прямокутної форми розмірами 60х30х30см, розділену перегородкою на два рівних відсіки (кожен площею 30х30см). Стінки одного з відсіків – темного – мали чорний колір і закривалися зйомною кришкою, у світлому відсіку стіни були білими, а кришки не було. Над білою частиною камери закріпили джерело яскравого світла (лампку денного світла) з метою створення для тварин умов помірного стресу. У перегородці між відсіками розташовувалася «нірка» –

отвір, через який щур ховався у темну частину камери після поміщення в установку.

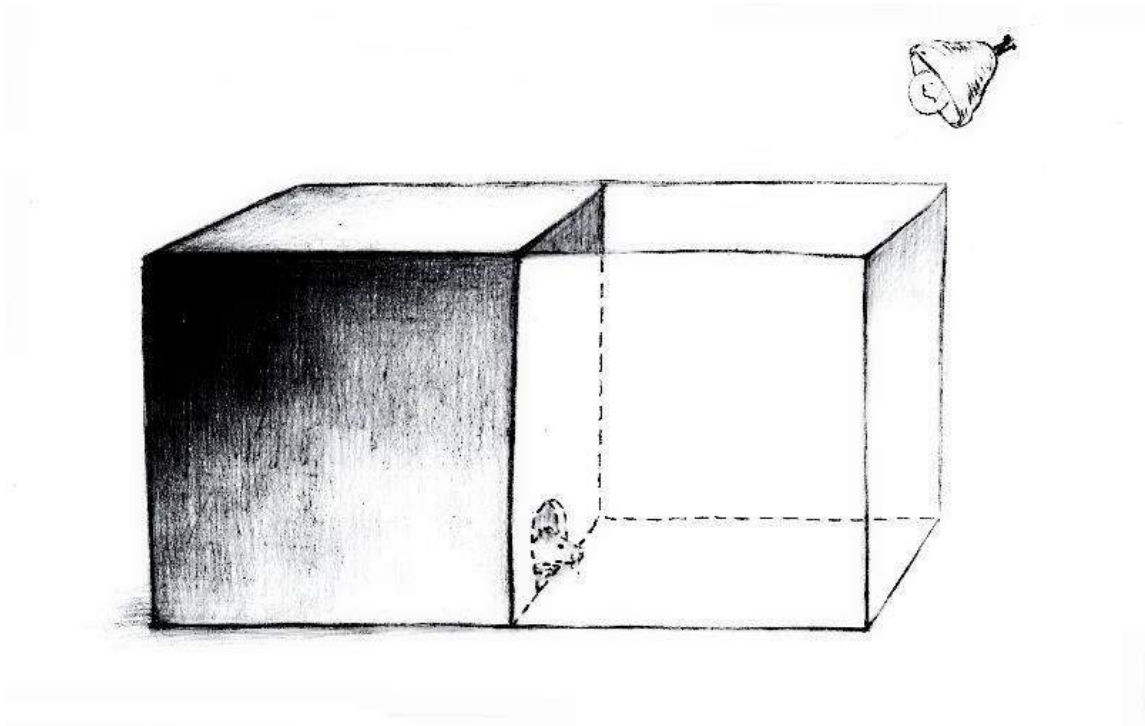


Рис. 2.5. Установка тесту «Темно–світла камера».

Під час тестування піддослідного щура поміщали в освітлену частину камери та спостерігали за його поведінкою. Зокрема, замірювали час, за який тварина заходила у темну частину установки, а також кількість виглядувань та виходів з нірки та загальний час, проведений щуром у світлій частині камери після того, як він побував у темній частині та повернувся у освітлену. Виглядуванням з нірки вважається такий випадок, коли ніс, голова чи передня частина тіла тварини видніється в отворі, а виходом у світлу частину – переміщення всіх чотирьох кінцівок тварини у світлу частину камери після того, як вона побувала у темній.

Тестували статевозрілих тварин. Тривалість кожного сеансу становила 3 хв, інтервал між повторними дослідженнями – 10 діб. Одержані дані

статистично обробляли, порівнюючи результати дослідних груп з показниками інтактного контролю.

Вважається, що час, проведений у світлій частині камери, та кількість виглядувань з нірки залежать від рівня тривожності тварин: що вища тривожність, то більше щурі схильні ховатися та завмирати у темних закритих місцях. Окрім того, як і у випадку «Відкритого поля», аномально висока кількість виглядувань та переходів у світлу частину може свідчити про надмірне рухове збудження тварини. Відсутність реакції втечі, коли щур взагалі не ховається у темну частину камери або проводить більшу частину часу тестування у світлій, перш ніж зайти в темну, також може свідчити про певні патологічні відхилення у функціонуванні ЦНС тварини.

### **2.5.3. Тест "Водний лабіринт Морріса".**

Водний лабіринт Морріса [103] було використано на першому етапі досліджень. За допомогою цієї методики вивчали вплив ХПФ на стан коротко- та довготривалої пам'яті щурів, які зазнали хронічного впливу низьких доз ХПФ.

Досліджували статевозрілих самиць щурів. Кожен сеанс тестування складався з 2 спроб, кожна тривалістю максимум 2 хвилини: якщо за цей час тварина не знаходила платформу, її виймали з води. Тестування повторювали з інтервалом у 7 діб (всього було проведено 3 сеанси по 2 спроби кожен). Одержані дані статистично обробляли, результати дослідних груп порівнювали з інтактним контролем.

Установка для тесту (рис. 2.6) складалася з круглого басейну діаметром 1,8 м та глибиною 40см, заповненого водою (глибина води становила 20см). У певній точці басейну на 1см нижче рівня води було встановлено платформу, знайшовши яку, щур міг врятуватися з води. Щоб відшукати платформу, тварина повинна була запам'ятати її розміщення за допомогою сторонніх орієнтирів: для того, щоб щур не міг прямо побачити ціль, воду в басейні робили непрозорою шляхом розчинення в ній сухого молока. Навколо басейну

розміщували орієнтири – картонні фігури різної форми, кольору та розміру, закріплені на штативах.

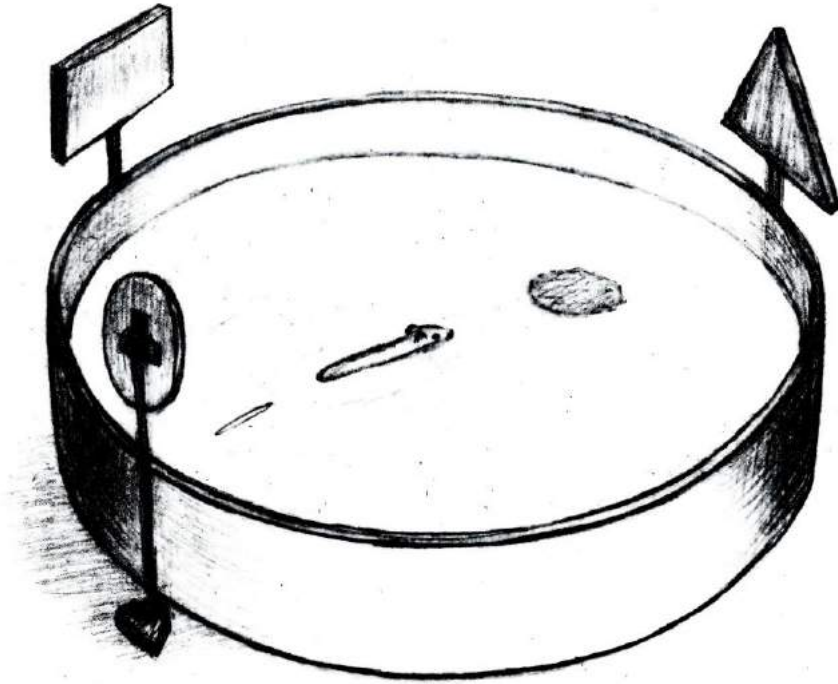


Рис. 2.6. Установка тесту «Водний лабіринт Морріса».

Для запобігання переохолодженню щурів температуру води підтримували в межах 25–28°C, а після виймання з басейну хутро тварин висушували за допомогою рушника та поміщали щурів у тепле приміщення. Слідкували за можливою появою ознак небезпечної перевтоми (кволість, носова кровотеча та ін.).

Під час тестування фіксували час, який тварина витратила на пошук платформи. В разі, якщо протягом 2 хвилин платформа знайдена не була, тварину виймали з басейну, а спробу зараховували як неуспішну (у статистичних обрахунках часу її приймали за 120 с). За різницею часу, затраченого на пошук платформи у першій та другій спробах, визначали ефективність запам'ятовування та справність механізмів короточасної пам'яті

піддослідної тварини. За змінами тривалості пошуку платформи у наступних сеансах тестування (які проводилися з інтервалом у 7 діб) оцінювали роботу довготривалої пам'яті тварин та ефективність їхнього навчання.

#### 2.5.4. Тест "Екстраполяційне позбавлення".

Тест «Екстраполяційне позбавлення» [64] використовувався нами на другому етапі досліджень для оцінювання роботи механізмів пам'яті гризунів при поміщенні їх в умови гострого стресу. Він був обраний нами в якості альтернативи «Водного тесту Морріса», проведення якого виявилось неможливим з технічних причин.

Установка для тесту «Екстраполяційне позбавлення» зображена на рис. 2.7.

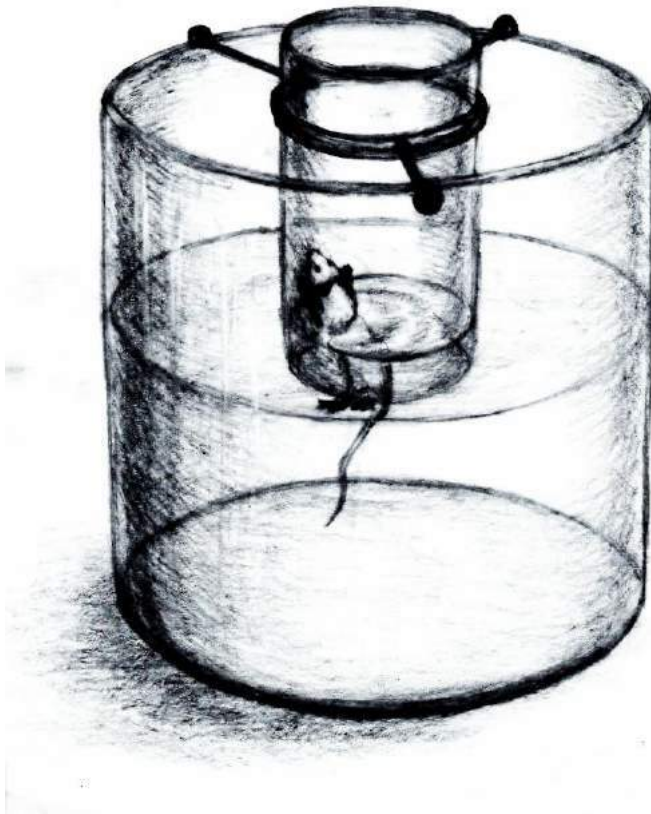


Рис. 2.7. Установка тесту «Екстраполяційне позбавлення».

У пластиковому циліндрі з водою діаметром 35 см закріплювали менший за діаметром (9 см), прозорий плексигласовий циліндр так, щоб його нижній край був на 2,5 см занурений у воду.

Щура поміщали у циліндр хвостом вниз. Вибратися зі стресової ситуації тварина могла, лише пірнувши під край внутрішнього циліндра та випірнувши з іншого боку. Коли тварина випливала зовні циліндра, її виймали з установки. При поміщенні тварини у циліндр розпочинали відлік часу, за який вона знайде вихід; якщо ж цього не відбувалося, то через 2 хвилини щура виймали з установки. Окрім часу пірнання, реєстрували також частку вдалих спроб (кількість спроб, у яких тварина пірнула і вибралася з установки, ділили на загальну кількість спроб) та тривалість початкової іммобільності (завмирання тварини при поміщенні у циліндр, що являється нормальною реакцією гризунів на гостру стресову ситуацію); останній параметр дозволив оцінити рівень рухової збудженості та тривожності піддослідних щурів в умовах гострого стресу.

Тестуванню піддавали статевозрілих щурів. Кожен сеанс тестування складався з 2 спроб, кожна з яких тривала 2 хвилини. Для вивчення стану довготривалої пам'яті тварин тестування повторили з інтервалом в 11 діб (всього було проведено 2 сеанси по 2 спроби кожен).

Одержані дані статистично обробляли, порівнюючи результати дослідних груп з інтактним контролем.

## **2.6. Вимірювання морфометричних показників та виживання потомства**

Після народження потомства самиць, яких піддавали впливу ХПФ до та під час вагітності, та інтактних контрольних тварин, його періодично зважували та вимірювали довжину тіла (назоанальну довжину). Вимірювання проводили на 2, 7, 14, 21 та 30 доби життя. Одержані дані використовували для розрахунку швидкості набору маси та індексу маси тіла (індекс Кетле).



Швидкість набору маси у ранній постнатальний період обчислювали за формулою (2.3):

$$dM/Mdt, \quad (2.3)$$

де  $M$  – маса тіла (г),  $dM$  – різниця маси у кінці та на початку періоду часу,  $dt$  – період часу між зважуваннями.

Індекс Кетле використовували для обрахунку оцінки гармонійності розвитку щурят. Цей показник дозволяє виявити надмір або, навпаки, дефіцит маси тіла. Вираховували індекс Кетле за наступною формулою (2.4):

$$I=M/h^2, \quad (2.4)$$

де  $M$  – маса тіла (г),  $h$  – довжина тіла без хвоста (мм).

Порівняння за всіма параметрами проводили з показниками контрольних щурят, матері яких не піддавалися впливові пестициду.

Також здійснювали реєстрацію та обрахунок частки виживання щурят до дорослого віку.

## **2.7. Статистична обробка результатів досліджень**

Обчислення проводили за допомогою програмного забезпечення Statistica 8.0 (StatSoft, USA), використовуючи аналіз ANOVA. Результати всіх дослідних груп порівнювали з відповідними результатами контрольної групи. [59].

## РОЗДІЛ 3

### РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

#### 3.1. Вибір модифікації тесту «Відкрите поле»

Перед початком дослідження впливу ХПФ на нейроповедінкові параметри щурів було проведено порівняння двох модифікацій тестової установки «Відкрите поле» – з аренами круглої та квадратної форми. Обидві модифікації зустрічаються у літературі з приблизно однаковою частотою, однак літературний пошук не виявив робіт, які б ставили на меті порівняння цих двох форм арен та виявлення можливого впливу наявності чи відсутності кутів у тестовій арені на результати тестування (чи обґрунтовано доводили б відсутність такого впливу).

Відмінності у результатах тестування мишей–полівок у прямокутних аренах різної площі були досліджені David Eilam [62]. У цій роботі тварин поміщали в арени прямокутної форми, площа яких різнилася у кілька разів (від 40х60см до 260х400см), всього дослідили шість різних арен. Автором було виявлено, що на основні показники рухової активності (як горизонтальної, так і вертикальної) та тривожності (грумінг, дефекація, завмирання) площа арени істотного впливу не справляла.

Водночас, поведінка тварин у маленьких та великих аренах все ж дещо різнилася: якщо на полі розмірами 40х60см миші рухалися практично рівномірно по всій його площі, то у найбільших з представлених арен вони прагнули знаходитися ближче до їх стінок, на периферії, та рідко виходили у центральні квадрати.

Однак, враховуючи те, що далеко не у всіх дослідженнях взагалі проводиться поділ горизонтальної активності на центральну та периферичну,

виявлені відмінності не мали істотного значення. За результатами даної роботи було зроблено висновок, що розміри арени доцільно підбирати з позицій зручності тестування та відеозапису, площі лабораторії і т.д., адже на поведінку піддослідних тварин вони істотного впливу не справляють.

Водночас, питання про вплив наявності чи відсутності кутів у дослідній арені (квадратна чи кругла форма) залишалося відкритим. Як відомо, гризунам притаманне інстинктивне прагнення шукати сховок у закритих просторах (нори, коробки, різноманітні закутки). Відкриті, а особливо яскраво освітлені приміщення викликають у цих тварин стрес та прагнення з них втекти. На цьому інстинкті гризунів побудований цілий ряд поведінкових методик: «Темно–світла камера», «О–лабіринт», «Доріжка, що звужується» і багато інших, у тому числі й «Відкрите поле».

Однак, саме за цим параметром (відсутність місць, у яких гризун може відшукати сховок) дві найпоширеніші модифікації тесту дещо різняться. У той час як у круглій арені немає місць, які б могли слугувати тварині хоча б відносним прихистком, оскільки весь периметр майданчика є однаковим, то у квадратній модифікації є чотири кути, у яких тварини теоретично можуть почуватися більш захищеними, демонструючи нижчий рівень тривожності та/або рухової активності.

Таким чином, перед початком роботи було поставлено гіпотезу, що у квадратній арені шурі прагнутимуть сховатися у кутах і проводитимуть у них більше часу, що відобразатиметься у зростанні кількості та тривалості завмирань та зниженні горизонтальної активності. Таким чином, дані показники будуть відображати реакцію тварин не лише на досліджуваний фактор, але й на форму арени, що може спотворювати результати дослідження.

Однак, у нашому дослідженні за більшістю досліджуваних параметрів (зовнішня горизонтальна активність, вертикальна активність, довгий та короткий грумінг, дефекація, кількість та загальна тривалість завмирань) статистично вірогідних змін виявлено не було (Таблиці 3.1, 3.2).

Найбільші відмінності виявили за показником ніркового рефлексу (Таблиця 3.1).

Таблиця 3.1.

**Кількість актів дефекації і ніркового рефлексу, час та кількість завмирань інтактних щурів у круглій та квадратній модифікаціях тесту «Відкрите поле» ( $M \pm m$ ,  $n=20$ ).**

Доба тестування	Форма ацени	Стать	Дефек.	Нірк. Рефл.	Завм. Час, с	Завм. к-сть
1	Кругла	Самці	2,6±0,2	0,4±0,2*	36,2±12,2	1,2±0,5
		Самиці	1,8±0,4	0,4±0,2*	14,4±2,2	1,0±0
	Квадратна	Самці	2,0±0,3	1,2±0,4	49,6±33,8	0,4±0,2
		Самиці	1,8±0,7	1,2±0,4	20,0±12,3	0,6±0,4
10	Кругла	Самці	2,6±0,4	0,6±0,4*	61,6±19,3	1,0±0
		Самиці	1,2±0,8	1,8±0,7*	12,8±12,8	0,2±0,2
	Квадратна	Самці	0,8±0,4	0,2±0,2	103,6±27,2	1,0±0,3
		Самиці	1,0±0,5	0,6±0,4	37,2±16,3	0,8±0,2
16	Кругла	Самці	1,4±0,6	0,2±0,2	66,0±26,0	1,0±0,3
		Самиці	1,0±0,6	1,8±0,7	2,0±2,0	0,2±0,2
	Квадратна	Самці	1,8±1,6	0,2±0,2	98,2±31,7	0,8±0,2
		Самиці	0,6±0,6	1,2±0,2	2,2±2,2	0,2±0,2
46	Кругла	Самці	2,0±0,4	0,6±0,2	115,2±15,6	1,4±0,4
		Самиці	1,4±0,6	2,0±0,3	31,4±24,2	0,4±0,2
	Квадратна	Самці	1,0±0,5	0,2±0,2	122,6±22,0	1,2±0,2
		Самиці	0±0	1,8±0,6	28,0±17,8	0,6±0,4

*Примітка: результати, одержані в арені круглої форми, порівнювали з аналогічними показниками у квадратній.*

\* – відмінності статистично вірогідні з  $P < 0,05$ .

В арені круглої форми в першій серії тестів кількість актів обнюхування нірок була у 3 рази нижчою, ніж в арені квадратної форми. У другій серії (з інтервалом у 7 діб) в арені круглої форми цей показник різко зріс, а у третій – знову дещо знизився ( $P < 0,05$ ).

У квадратній арені спостерігалася діаметрально протилежна динаміка: різке зниження у другій серії (при цьому кількість актів обнюхування отворів у цій арені стала вірогідно вищою, ніж в арені круглої форми) та деяке зростання у третій ( $P < 0,05$ ) (показники в обох варіантах установки приблизно зрівнялися).

У четвертій серії тестів, що проводилася після місячної перерви (для відновлення ефекту новизни), в обох аренах показник «нірковий рефлекс» пропорційно незначно зріс, залишаючись дещо вищим в арені круглої форми. Варто зазначити, що в усіх тестах та в обох аренах показники даного параметра були вищими у самиць, що пов'язано зі статевими відмінностями у поведінці щурів.

В цілому, причину таких відмінностей параметру «нірковий рефлекс» в аренах різної форми пояснити важко. Однак цей показник не належить до числа основних параметрів емоційного стану гризунів, а слугує лише додатковим індикатором активності дослідної поведінки тварин: у ряді робіт він взагалі не береться до уваги.

Очікували, що у квадратній арені виявиться вищою кількість та тривалість завмирань. Однак, вірогідної різниці за цим параметром між двома модифікаціями тесту виявлено не було, хоча деяка тенденція до збільшення тривалості завмирань у квадратній арені спостерігалася: у першому тестуванні в арені квадратної форми як самці, так і самиці завмирили на 25% довше, ніж у круглій. Статеві відмінності за цим показником також зберігалися: в обох варіантах установки тривалість завмирань у самців щурів була вищою, ніж у самиць.

Водночас, у квадратній арені щурі завмирили в кутах, а не у центральній частині та навіть не біля стінок арени на її периферії. В арені круглої форми завмирання, навпаки, спостерігалися під стінками, на периферії арени. Жодного випадку завмирання в центральній частині як круглої, так і квадратної арен зафіксовано не було. За кількістю окремих завмирань різниці між аренами різної форми не спостерігали.

Внутрішня горизонтальна активність (Таблиця 3.2) статистично вірогідно ( $p < 0,05$ ) відрізнялася у третьому тестуванні (на 16-ту добу після початку досліджень), в арені круглої форми вона була у 3 рази вищою, ніж у квадратній. Як і в попередніх показниках, статеві відмінності також були значними (внутрішня горизонтальна активність самиць виявилася у кілька разів вищою, ніж у самців) і пропорційно зберігалися в обох варіантах установки.

Таблиця 3.2.

**Зовнішня та внутрішня горизонтальна активність, вертикальна активність, кількість актів довгого та короткого грумінгу в інтактних щурів у круглій та квадратній модифікаціях тесту «Відкрите поле» ( $M \pm m$ ,  $n=20$ ).**

Доба тестування	Форма арили	Стать	Зовн. Г.а.	Внутр. Г.а.	Верт. Акт.	Довг. Гр.	Кор. Гр.
1	Кругла	Самці	13,4±5,6	0,4±0,2	5,4±2,5	1,2±0,6	1,2±0,7
		Самиці	32,8±9,9	6,8±2,7	16,2±5,4	0,6±0,4	2,2±0,7
	Квадратна	Самці	22,4±9,8	0±0	4,4±1,8	0,8±0,2	0,4±0,2
		Самиці	31,6±6,2	5,0±1,9	15,8±4,9	1,0±0,4	1,8±0,6
10	Кругла	Самці	9,0±3,3	0±0	1,6±0,6	0,6±0,2	1,4±0,5
		Самиці	22,2±4,2	5,6±2,2	12,4±3,8	0,2±0,2	0,2±0,2
	Квадратна	Самці	6,0±2,3	0,4±0,4	2,4±1,2	0,6±0,2	0,4±0,4
		Самиці	26,6±6,6	2,0±0,63	13,6±4,7	0,2±0,2	1,0±0,5
16	Кругла	Самці	10,4±2,9	0,6±0,6	2,0±0,6	0,6±0,2	0,4±0,2
		Самиці	28,2±3,2	8,2±1,4	17,0±4,6	0,2±0,2	1,2±0,4
	Квадратна	Самці	7,6±3,8	0,2±0,2*	1,6±0,9	0,2±0,2	0,2±0,2
		Самиці	29,4±3,0	3,4±0,9*	16,2±4,6	0,2±0,2	0,8±0,4
46	Кругла	Самці	2,8±0,9	1,6±1,0	0,6±0,4	0,6±0,4	0±0
		Самиці	13,8±3,0	2,4±1,0	6,0±1,4	0,4±0,2	1,4±0,9
	Квадратна	Самці	4,0±1,2	0,4±0,2*	1,8±0,7	0,8±0,4	0,4±0,4
		Самиці	16,0±2,8	1,0±0,6*	8,2±2,6	1,0±0,5	1,8±0,4

*Примітка: результати, одержані у круглій арені, порівнювали з аналогічними показниками у квадратній.*

*\* – відмінності статистично вірогідні з  $P < 0,05$ .*

Відповідно, в арені круглої форми щурі частіше виходили на центральну частину арени, а у квадратній – перебували переважно біля стінок. Це у деякій мірі може бути підтвердженням висунутої перед тестуванням гіпотези; однак, суттєвого впливу на загальні результати тестування такий перерозподіл рухової активності не спричинив і не може вважатися достатньою підставою для віддання переваги тій чи іншій модифікації тестової установки.

Тому, підсумовуючи результати дослідження, можна зробити висновок про можливість рівнозначного використання арен тесту «Відкрите поле» як круглої, так і квадратної форми, залежно від конкретних обставин та можливостей дослідника.

Для основних етапів роботи – дослідження поведінкових параметрів тварин, яких піддавали впливові субтоксичних доз ХПФ, та їхнього потомства – використовували квадратну модифікацію арени.

### **Висновки:**

1. 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.
2. 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.

Згідно з одержаними даними, геометрична форма арени тесту «Відкрите поле» не спричиняє істотного впливу на результати поведінкового тестування щурів.

Результати досліджень, описаних у цьому розділі, опубліковано у роботах:

- Grabovska S, Rosalovskyi V, Salyha Y. Comparing round and square open field test arenas. Біологія тварин. 2014. Vol. 16 (3). P. 168.
- Grabovskaya S V, Salyha Yu T. Do Results of the Open Field Test Depend on the Arena Shape? Neurophysiology. 2014. Vol. 46 (4). P. 376–380.

### **3.2. Вплив хронічного введення низьких доз ХПФ на нейроповедінкові параметри статевозрілих самиць щурів**

Дослідження впливу ХПФ на нейроповедінкові параметри щурів складалося з кількох етапів, першим з яких було дослідження впливу хронічної інтоксикації субтоксичними дозами ХПФ на поведінку безпосередньо самих інтоксикованих тварин.

Статевозрілим самицям щурів щоденно протягом 30 діб вводили ХПФ у дозах 5, 10, 15 мг/кг на добу та досліджували нейроповедінкові параметри інтоксикованих тварин. Перші дві дози (5 та 10 мг/кг) не виявляли ознак гострої токсичності та не викликали видимих симптомів отруєння. За дози 15 мг/кг ХПФ у тварин в перші доби після початку введення спостерігалися ознаки інтоксикації (кволість, поява крововиливів у шкіру, навколо очей); однак ці симптоми починали поступово послаблюватися ще протягом періоду введення, а після його завершення – зникли зовсім, і в подальшому самиці з цієї групи не демонстрували відмінностей від решти тварин ні за виглядом, ні за поведінкою, тривалістю життя і т.д.

Головним завданням, поставленим на даному етапі дисертаційної роботи, було в'яснити, чи здатні обрані дози ХПФ впливати на поведінку самиць щурів, а отже, спричиняти до певних функціональних змін у їхній ЦНС. Для дослідження було використано три поведінкові методи: «Водний лабіринт Морріса», «Темно–світла камера» та «Відкрите поле». За допомогою «Водного



лабіринту» ми досліджували ефективність роботи короткочасної та довготривалої пам'яті інтоксикованих тварин, їхню здатність до навчання. Тести «Відкрите поле» та «Темно–світла камера» були застосовані для оцінки емоційного стану піддослідних щурів, рівня їхньої тривожності та рухової активності в умовах вільного дослідження нової території («Відкрите поле») та помірного стресу («Темно–світла камера»).

У «Водному лабіринті Морріса» (Табл. 3.3) не було виявлено статистично вірогідних відмінностей між результатами, показаними дослідними та контрольними тваринами.

Таблиця 3.3.

**Тривалість пошуку платформи та частка вдалих спроб у тесті "Водний лабіринт Морріса" у самиць щурів, які зазнали хронічної інтоксикації 5, 10 та 15 мг/кг ХПФ ( $M \pm m$ ,  $n=3$ ).**

Доба тестування	Група	Тривалість пошуку платформи, с		Частка вдалих спроб, %
		Спроба 1	Спроба 2	
1	Д1	58,4±32,0	56,4±32,0	88
	Д2	76,5±28,3	39,0±19,5	70
	Д3	114,6±40,0	88,0±27,2	70
	Контроль	105,3±25,8	123,0±33,9	80
11	Д1	57,6±32,0	29,7 ±13,8	90
	Д2	40,3±10,3	29,0±8,5	70
	Д3	87,6±37,9	48,0±25,3	80
	Контроль	69,5±38,3	50,2±23,7	80
17	Д1	46,8±16,9	15,4±4,3	88
	Д2	50,75±43,1	21,3±8,4	90
	Д3	58,4±32,4	12,6±6,8	80
	Контроль	23,0±5,5	13,0±5,1	100
21	Д1	21,0±7,8	25,8±18,6	100
	Д2	9,8±4,3	30,5±16,3	80
	Д3	51,0±32,8	51,4±33,8	80
	Контроль	20,0±8,2	27,0±13,1	100

*Примітка: всі порівняння проводили з контролем.*

Серед самиць третьої дослідної групи, які отримували ХПФ у дозі 15 мг/кг, спостерігали деяку тенденцію до погіршення запам'ятовування положення платформи, однак відмінності не досягали рівня статистичної вірогідності і з часом нівелювалися, а показники всіх дослідних груп наближались до контрольних. Зокрема, у першому тестуванні (при першому поміщенні тварин у тестову установку) частка вдалих спроб у цій групі становила 70% (при 80% у контролі), а в четвертому тестуванні – 80% при 100% у контрольній групі.

При цьому процеси навчання відбувалися паралельно у всіх групах, без явних відмінностей між тваринами, які одержували пестицид, та інтактними щурами. Час відшукування платформи у другій спробі від першого до останнього тестування знижувався у всіх групах: у першій дослідній групі – на 55%, у другій – на 21%, у третій – на 42%; однак, найбільш істотне зниження спостерігалось в контрольній групі – на 78%

У тесті «Темно–світла камера» (Табл. 3.4) також було виявлено деякі статистично вірогідні відмінності між дослідними та контрольними щурами. Однак, вони спостерігалися лише у першій серії тестів, а у повторних тестуваннях (на 12 та 24 добу після першого тесту) ці відмінності згладжувалися.

Таблиця 3.4.

**Результати тесту «Темно–світла камера» самиць щурів, які зазнали хронічної інтоксикації 5, 10 та 15 мг/кг ХПФ ( $M \pm m$ ,  $n=3$ ).**

Доба	Група	Час до заходу в нірку, с	Кількість виглядувань з нірки	Загальна тривалість виходів з нірки, с	Кількість виходів з нірки
1	2	3	4	5	6
1	Д1	11,4±3,3	3,3±0,6	2,6±2,6	0,3±0,3
	Д2	91,1±34,1**	1,2±0,8	5,9±5,9	0,4±0,4
	Д3	106,7±35,3**	1,75±0,6	0±0	0±0
	К	17,8±5,7	3,6±0,8	1,9±1,9	0,2±0,2

## Продовження таблиці 3.4.

1	2	3	4	5	6
12	Д1	16,1±5,3	2,5±0,9	0±0	0±0
	Д2	43,4±34,2	3,4±1,1	4,1±4,1	0,4±0,4
	Д3	15,0±3,4	2,5±0,5	0±0	0±0
	К	41,4±34,7	1,4±0,5	0±0	0±0
24	Д1	4,6±0,4	2,3±0,5	3,8±3,8	0,3±0,3
	Д2	8,5±2,4	3,8±0,2	4,2±4,2	0,2±0,2
	Д3	9,3±4,0	4,3±1,1	1,4±1,4	0,3±0,3
	К	9,0±4,7	3,0±0,9	3,0±3,0	0,3±0,3

*Примітка: всі порівняння проводили з контролем.*

*\*\* – відмінності статистично вірогідні з  $P < 0,01$ .*

Так, тривалість перебування тварин у світлій частині камери до заходу в темну у першому тестуванні залежала від групи: тварини дослідної групи 3, що одержували 15 мг/кг ХПФ, проводили в освітленій частині статистично вірогідно ( $p < 0,01$ ) більше часу (майже у 6 разів більше), ніж щурі з контрольної групи. Тварини другої дослідної групи (Д2), тобто ті, яким вводили 10 мг/кг ХПФ, у цій серії тестів провели у світлому відсіку у 5 разів більше часу, ніж контрольні щурі, однак, все ж на 15% менше, ніж тварини групи Д3.

За іншими показниками та в інших серіях тестів не було виявлено вірогідних відмінностей між дослідними та контрольними тваринами.

У тесті «Відкрите поле» (Табл. 3.5) у щурів, що зазнали інтоксикації ХПФ, також було виявлено ряд статистично вірогідних відмінностей від контрольної групи, однак і в цьому тесті відмінності спостерігалися лише у першому тестуванні, а у подальших повторних дослідженнях результати дослідних та контрольної груп тварин були практично однаковими.

Найістотніші відмінності між дослідними та контрольною групами у тесті «Відкрите поле» спостерігали за параметром «короткий грумінг» у першу добу тестування. У всіх дослідних групах цей показник був статистично вірогідно ( $P < 0,01$ ) вищим, ніж у контролі. В середньому, контрольні тварини за

час тестування здійснювали 2–3 акти короткого грумінгу, в той час як дослідні – 9–10 актів, тобто у кілька разів більше. Однак, у подальших серіях тестів відмінності згладилися, і істотної різниці між контрольною та дослідними групами не спостерігалось.

Також статистично вірогідні відмінності було виявлено за кількістю актів дефекації у перший добу тестування: у другій дослідній групі вона була майже втричі ( $P < 0,05$ ) нижчою за контроль. Як і з коротким грумінгом, кількість актів дефекації в наступних серіях тестів у дослідних групах вірогідно не відрізнялася від контрольних показників.

Таблиця 3.5.

**Результати тесту «Відкрите поле» самиць щурів, які зазнали хронічної інтоксикації 5, 10 та 15 мг/кг ХПФ ( $M \pm m, n=3$ ).**

Доба	Груп а	Зовн. гор.акт.	Вн. гор. акт.	Верт.акт.	Гр.довг.	Гр.кор.	Дефек.
1	2	3	4	5	6	7	8
1	Д1	28,6±5,2	1,6±0,4	9,2±1,3	1,0±0	9,2±1,3**	3,6±0,7
	Д2	28,2±3,5	2,0±0,5	9,8±1,0	0,4±0,2	9,8±1,0**	0,8±0,8*
	Д3	31,4±8,6	2,4±1,4	9,2±1,8	0,4±0,2	9,2±1,8**	1,6±0,9
	К	34,2±12,3	1,2±0,5	9,0±2,1	0,6±0,2	2,6±0,9	2,2±0,7
8	Д1	19,0±10,7	1,3±0,9	5,0±1,6	1,8±0,8	1,8±0,8	1,8±0,6
	Д2	17,8±7,8	0,8±0,6	3,8±0,5	1,2±0,7	1,2±0,7	1,6±0,7
	Д3	15,8±6,0	0,5±0,5	3,3±1,8	0,5±0,3	0,5±0,3	1,8±0,9
	К	4,8±2,9	0±0	2,6±0,9	0,8±0,2	1,2±0,2	1,6±0,5
22	Д1	19,5±6,1	2,8±1,1	5,0±2,2	1,0±0	0,8±0,3	0,5±0,5
	Д2	17,0±8,6	2,4±2,2	3,6±1,9	1,2±0,4	2,4±1,4	1,2±0,5
	Д3	19,0±3,5	3,0±0,7	6,8±2,4	0,5±0,3	0,8±0,5	0,5±0,3
	К	13,4±2,8	1,2±0,4	4,4±0,9	0,8±0,2	1,0±0,3	1,4±0,5
29	Д1	4,8±3,1	0±0	3,0±1,7	1,3±0,6	1,0±0,4	2,0±0,9
	Д2	4,4±2,0	0,2±0,2	0,6±0,4	1,4±0,4	1,0±0,3	2,2±0,6
	Д3	2,3±1,3	0±0	2,0±0	1,5±0,3	1,0±0	2,5±0,5
	К	6,4±2,1	0,2±0,2	3,0±1,1	1,8±0,4	1,2±0,4	2,0±0,3

## Продовження таблиці 3.5.

1	2	3	4	5	6	7	8
36	Д1	17,0±6,0	0,8±0,5	5,8±2,9	0,3±0,3	1,3±0,6	2,5±1,8
	Д2	18,0±5,9	2,4±1,2	27,0±21,3	1,4±0,6	1,4±0,7	2,2±0,9
	Д3	13,8±2,0	0,5±0,5	6,0±1,9	1,5±0,3	1,0±0	2,3±1,0
	К	14,6±6,7	1,6±1,2	4,6±1,9	1,6±0,5	0,4±0,2	2,8±1,0

*Примітка: всі порівняння проводили з контролем.*

*\* – відмінності статистично вірогідні з  $P < 0,05$ , \*\* –  $P < 0,01$ .*

За горизонтальною (зовнішньою та внутрішньою) і вертикальною активністю, а також довгим грумінгом не було виявлено статистично вірогідних відмінностей між контрольною та дослідними групами як у першій, так і в наступних серіях тестів.

### **Висновки:**

1. У статевозрілих самиць щурів, які зазнавали хронічного впливу низьких доз ХПФ, рівень тривожності (відображений у кількості актів грумінгу та дефекації) зростав на першу добу після початку введення токсиканта і в подальшому знижувався до контрольних значень.
2. У інтоксикованих самиць було виявлено погіршення короточасної та довготривалої пам'яті, про що свідчило зниження частки вдалих спроб у водному лабіринті Морріса.
3. З часом нейроповедінкові показники інтоксикованих самиць наближалися до показників контролю, що свідчить про процеси адаптації організму щурів до дії токсиканта.

Результати досліджень, описаних у цьому розділі, опубліковано у роботах:

- Грабовська С, Салига Ю. Вплив хронічної інтоксикації низькими дозами хлорпірифосу на поведінку самиць щурів. Фізіологічний журнал. 2015. № 61 (2). С. 94–101.
- Грабовська С. Нейрофізіологічні порушення у самиць щурів та їх потомства за інтоксикації хлорпірифосом до запліднення. Вісн. Тварин. 2017. №19 (3). С. 25–35.

### **3.3. Нейроповедінкові зміни у потомства самиць щурів, які зазнавали хронічної інтоксикації ХПФ**

На цьому етапі роботи було поставлено за мету дослідити, чи здатна хронічна інтоксикація щурів ХПФ до їх запліднення спричиняти в майбутньому нейроповедінкові порушення у потомства самиць щурів.

На попередньому етапі досліду ХПФ вводили молодим статевозрілим самицям щурів. Три групи тварин одержували токсикант у дозах 5, 10 та 15 мг/кг маси тіла, відповідно, щоденно протягом 30 діб. З цих самиць було сформовано дослідні групи 1, 2 та 3. Від завершення введення токсиканта і до запліднення самиць пройшло 4 місяці. Варто нагадати, що істотного стійкого впливу введеного токсиканта на поведінку цих самиць на першому етапі дослідження виявлено не було.

У літературі є значна кількість даних щодо впливу ХПФ на поведінкові параметри дорослих тварин, а також його впливу при пренатальному введенні на поведінку дорослих тварин у майбутньому [40, 42, 91]. Однак, проведений літературний пошук не виявив робіт, які виявляли б взаємозв'язок факту отруєння самиць ХПФ до запліднення та поведінкових аномалій їхнього подальшого потомства за умов відсутності впливу токсиканта безпосередньо під час вагітності. Водночас, існує ряд нейроповедінкових аномалій і захворювань (наприклад, аутизм або синдром дефіциту уваги та гіперактивності), етіологія яких на даний момент до кінця не в'яснена, але серед факторів ризику їхнього виникнення фігурує, зокрема, вплив невеликих

доз фосфорорганічних пестицидів на ранніх етапах розвитку організму [132, 151].

Отже, для дослідження впливу інтоксикації ХПФ на майбутнє потомство, було сформовано 4 дослідні групи по 3 самиці у кожній: 3 групи тварин з попереднього етапу та одна група інтактних тварин, яким на 6 добу вагітності одноразово ввели ХПФ у дозі 30 мг/кг.

Сумарна кількість народженого потомства по групах становила: група 1 – 14; 2 – 12; 3 – 10; 4 – 21; 5 (контроль) – 13 щурят. До дорослого віку дожили з них: група 1 – 8 (57%), 2 – 7 (58%), 3 – 4 (40%), 4 – 12 (57%), 5 (контроль) – 8 (62%)

Таким чином, найвищий відсоток виживання спостерігався у контрольній (5) групі, найнижчий – у групі 3 (потомстві матерів, що на попередньому етапі досліджу одержували найвищу дозу ХПФ, 15 мг/кг щодобово).

За швидкістю набору маси (Рис. 3.1) найвищий показник спостерігали у потомстві групи 3 на 21 добу життя (в середньому 8 г на добу, що у понад 3 рази більше, ніж в контролі).

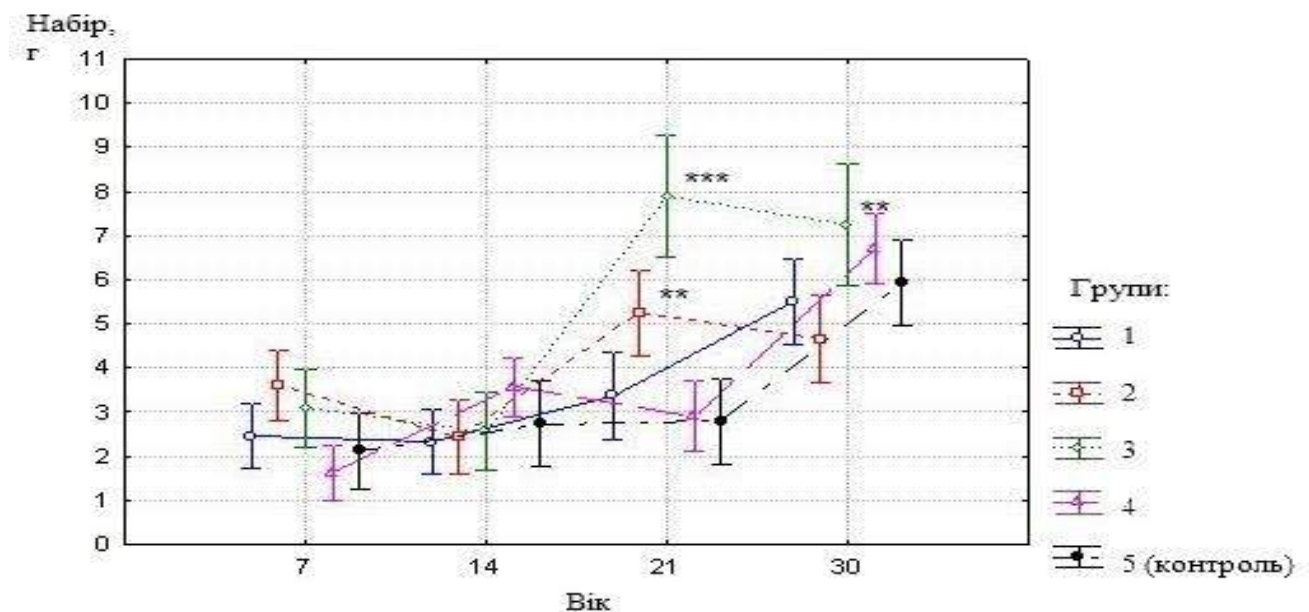


Рис. 3.1. Швидкість набору маси потомства самиць щурів, які зазнали інтоксикації ХПФ, та інтактних самиць щурів.

*Примітка: всі порівняння проводили з контролем.*

*\*\* – відмінності статистично вірогідні з  $P < 0,01$ , \*\*\* – з  $P < 0,001$ .*

На 30 добу темп набору маси у щурят цієї групи сповільнився приблизно на 10%, порівняно з 21-ю добою, однак, все ще залишався вищим (на 23%), ніж у контрольній групі щурят того ж віку.

У дослідній групі 2 (тобто у потомства самиць щурів, які зазнавали хронічної інтоксикації ХПФ у дозі 10 мг/кг) темп набору маси був в 1,5 рази ( $P < 0,05$ ) нижчим, ніж у третій дослідній групі, однак майже вдвічі вищим ( $P < 0,01$ ), ніж у контрольній.

Найвищі показники за **індексом Кетле** (Рис. 3.2) були зафіксовані у контрольній групі на 30-ту добу життя, причому різниця була статистично вірогідною ( $P < 0,001$ ) і дуже різкою: в усіх дослідних групах показник цього індексу був у 2-3 рази нижчим. Окрім того, показники індексу маси тіла в контрольній групі плавно і майже лінійно зростали протягом перших 30 діб життя щурят, в той час як у всіх дослідних групах до 21 доби життя включно він зростав активніше і був на 20-25% вищим, ніж у контролі, а на 30-ту добу спостерігалось його різке зниження (у кілька десятків разів).

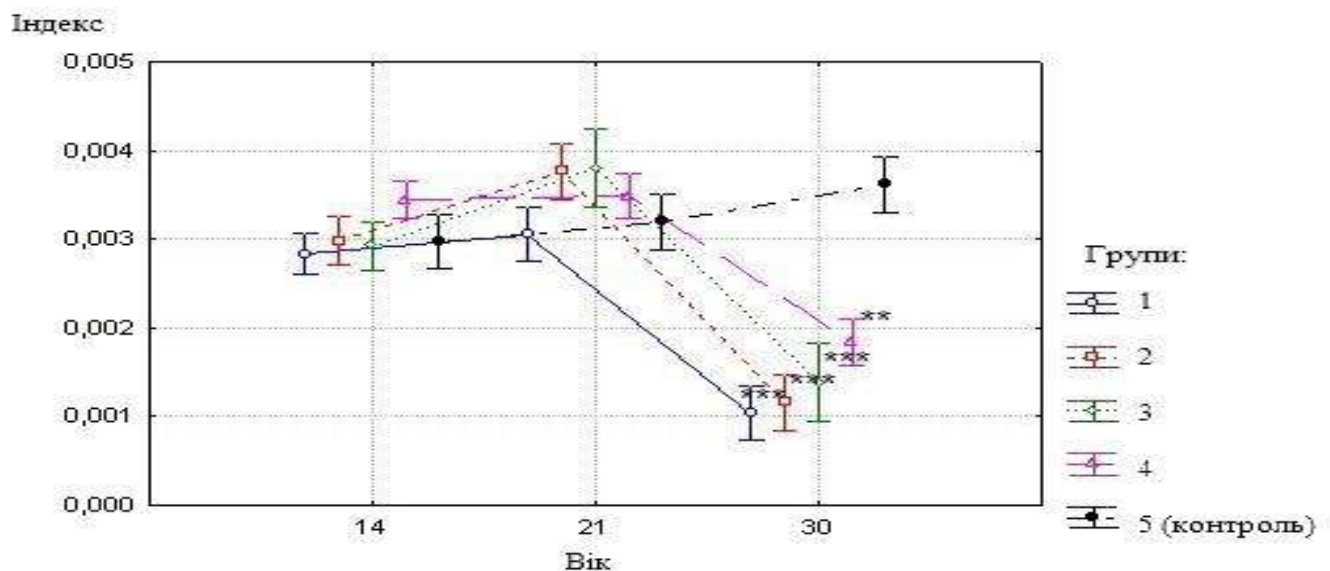


Рис. 3.2. Індекс Кетле потомства самиць щурів з дослідних та контрольної груп.

*Примітка: всі порівняння проводили з контролем.*

*\*\* – відмінності статистично вірогідні з  $P < 0,01$ , \*\*\* – з  $P < 0,001$ .*



Таким чином, у потомства всіх дослідних груп, порівняно з контрольними тваринами, спостерігалось значне відставання у наборі жирової та м'язової маси. Водночас, набір маси тіла в загальному у цих тварин відбувався навіть активніше, ніж у контролі, що свідчить про прискорений ріст скелета щурят, який не супроводжувався адекватним накопиченням поживних речовин.

Після досягнення потомством як інтоксикованих ХПФ, та і інтактних самиць щурів статевозрілого віку його тестували за допомогою нейроповедінкових методик: «Відкрите поле», «Темно–світла камера», «Екстраполяційне позбавлення».

Результати тестів «Відкрите поле» та «Темно–світла камера» продемонстрували схожі тенденції. У «Відкритому полі» у щурів групи 3 спостерігали статистично вірогідно вищу горизонтальну та вертикальну рухову активність, ніж у контрольній групі та решті дослідних груп (Табл. 3.6).

Таблиця 3.6.

**Зовнішня та внутрішня горизонтальна активність, вертикальна активність, кількість актів довгого та короткого грумінгу у тесті «Відкрите поле» потомства інтоксикованих ХПФ та інтактних (контрольних) самиць щурів**

Тестування	Група	Зовнішня горизонтальна активність	Внутрішня горизонтальна активність	Вертикальна активність	Довгий грумінг	Короткий грумінг
1	2	3	4	5	6	7
1	1	28.50±2.73	1.50±0.68	10.50±0.82	0.38±0.26	0.50±0.19
	2	21.63±3.57	0.75±0.49	7.75±1.88	0.25±0.16	0.25±0.16
	3	49.00±4.69**	4.00±1.35	14.75±0.85**	0	0.50±0.29
	4	29.75±3.29	1.08±0.23	10.00±1.33	0.25±0.13	0.75±0.25
	К	16.13±3.27	1.63±0.80	10.00±2.21	1.00±0.46	1.38±0.38

Продовження таблиці 3.6.

1	2	3	4	5	6	7
2	1	18.38±5.14	0.38±0.26	5.25±1.51	0.25±0.16	0.25±0.16
	2	14.88±4.51	1.13±0.88	4.50±1.38	0.50±0.19	0*
	3	42.50±6.50**	1.00±0.71	12.75±2.06**	0.25±0.25*	0*
	4	22.83±4.37	2.67±1.28	9.08±2.25	0.42±0.14	0.67±0.26
	К	11.75±4.46	0.25±0.16	5.63±1.89	0.63±0.26	0.63±0.26

*Примітка: всі порівняння проводили з контролем.*

*\* – відмінності статистично вірогідні з  $P < 0,05$ , \*\* – з  $P < 0,01$ .*

Так, в першому тестуванні зовнішня горизонтальна активність у третій дослідній групі була втричі вищою, ніж у контрольній, у другому - майже в чотири рази вищою.

Показники довгого та короткого грумінгу в потомства інтоксикованих до вагітності самиць були нижчими, ніж у контролі. Зокрема, у другому тестуванні у щурів третьої дослідної групи цей показник був втричі нижчим, ніж у контрольній групі (різниця статистично вірогідна з  $P < 0,05$ ). У цьому ж тестуванні в дослідних групах 2 та 3 короткий грумінг був взагалі відсутнім ( $P < 0,01$ ), в той час як більшість тварин контрольної групи демонстрували хоча б 1 акт короткого грумінгу.

Інші показники тривожності (кількість актів дефекації, кількість та загальна тривалість завмирань) (Табл. 3.7) у третій дослідній групі (потомство самиць, що одержували 15 мг/кг ХПФ) також були істотно нижчими за відповідні показники тварин контрольної групи.

Таблиця 3.7.

**Кількість актів дефекації, обнюхування нірок, кількість та тривалість завмирань у тесті «Відкрите поле» потомства інтоксикованих ХПФ та інтактних (контрольних) самиць щурів**

Тестування	Група	Дефекація (кількість актів)	Обнюхування нірок (кількість)	Тривалість завмирань, с	Кількість завмирань
1	1	0*	1.13±0.27	0	0
	2	2.25±0.84	0.75±0.25	30.25±18.50	0.38±0.18
	3	0.50±0.50	2.25±0.75**	0	0
	4	2.25±0.75	1.33±0.28	5.83±5.83	0.16±0.16
	К	2.75±0.59	0.25±0.16	2.63±2.63	0.13±0.13
2	1	0.50±0.50	1.38±0.63	48.38±15.20	0.88±0.30
	2	1.25±0.45	0.88±0.64	60.38±22.14	0.88±0.35
	3	0*	2.50±1.04**	0**	0**
	4	1.08±0.57	1.83±0.39	27.17±15.04	0.42±0.19
	К	1.88±0.77	1.00±0.38	66.13±19.45	1.13±0.30

*Примітка: всі порівняння проводили з контролем.*

\* – відмінності статистично вірогідні з  $P < 0,05$ , \*\* – з  $P < 0,01$ .

Зокрема, у цій групі у другому тестуванні взагалі не спостерігали дефекації та завмирань, в той час як у контрольній групі фіксували в середньому по 2 акти дефекації та одне завмирання в кожній тварини (різниця статистично вірогідна з  $P < 0,01$ ).

Кількість актів «ніркового рефлексу», навпаки, у третій дослідній групі в обох тестуваннях була статистично вірогідно ( $P < 0,01$ ) вищою, ніж у контролі: значення обох показників у потомства інтоксикованих самиць були в середньому в 2,5 разів вищими, ніж у інтактних тварин.

Загалом, у той час як результати контрольної групи залишалися у межах, нормальних для інтактних тварин в аналогічних умовах (у порівнянні з даними попередніх досліджень), показники щурів дослідної групи 3 значно відрізнялися від них. Так, ці тварини в середньому перетинали 40–60 квадратів,

у той час як контрольні – 10–20, тобто у кілька разів менше. Також у цій групі зафіксовано у 2-3 рази більшу, ніж у контрольній групі, кількість актів обнюхування ніркоподібних отворів у підлозі. Водночас, дефекації, завмирання та короткого грумінгу у дослідній групі 3 взагалі не спостерігали (в той час як у контрольних тварин фіксували 2–3 акти дефекації та 1–2 завмирання). Така поведінка є аномальною для щурів, і можна стверджувати, що вона становить комплекс симптомів, характерних для синдрому гіперактивності у дітей [151].

У таблиці 3.8 подано результати тесту «Темно–світла камера». У цьому тесті також спостерігали значні відмінності поведінки тварин третьої дослідної групи від щурів контрольної групи.

Кількість виглядувань з нірки у щурів групи 3 була у 2-3 рази вищою ( $P < 0,05$ ), ніж у контролі. Такий високий показник в цьому тесті, так само як аномально висока горизонтальна рухова активність у тесті "Відкрите поле", свідчить про зростання рухової активності цих тварин та зниження їхньої тривожності.

Таблиця 3.8.

**Результати тесту «Темно–світла камера» потомства інтоксикованих ХПФ та інтактних (контрольних) самиць щурів**

Група тварин	Час до заходу в нірку, с	Кількість виглядувань	Тривалість виходу з нірки, с	Кількість виходів
1	19.48±5.18	5.63±0.56*	11.38±6.72	0.63±0.32
2	35.6±24.15	4.14±1.24	0.97±0.97	0.14±0.14
3	13.70±3.57	6.25±0.63*	10.63±6.13	0.5±0.29
4	34.13±13.89	5.00±0.77*	21.13±9.23	0.83±0.30
5 (К)	45.70±19.75	1.75±0.67	0	0

Примітка: всі порівняння проводили з контролем. (К)

\* – відмінності статистично вірогідні з  $P < 0,05$ .

Варто зазначити, що у дослідних групах 1 (потомство самиць, інтоксикованих 5 мг/кг ХПФ) та 4 (щурі, одноразово пренатально інтоксиковані 30 мг/кг ХПФ) також спостерігалася вірогідно (з  $P < 0,05$ ) вища, ніж у контролі, кількість виглядувань з нірки. Так, пренатально інтоксиковані тварини виглядували в освітлену частину камери у 4 рази, а потомство інтоксикованих самиць – у 5 разів частіше, ніж контрольні інтактні тварини.

Інші відмінності між групами не досягли статистичної вірогідності.

У тесті «Екстраполяційне позбавлення», який використовували для оцінювання ефективності запам'ятовування та когнітивних здібностей тварин в умовах гострого стресу, між поведінковими реакціями потомства інтоксикованих самиць та щурами контрольної групи також було виявлено низку відмінностей. Однак, ці відмінності були менш вагомими, ніж в описаних вище тестах.

Так, у дослідних групах 2 та 4 частка вдалих спроб (Таблиця 3.9) була статистично вірогідно ( $P < 0,05$ ), майже вдвічі меншою, ніж у контрольних тварин.

Таблиця 3.9.

**Частка вдалих спроб та ефективність навчання у тесті «Екстраполяційне позбавлення» потомства інтоксикованих ХПФ та інтактних (контрольних) самиць щурів**

Тестування	Група	Частка вдалих спроб, %	Ефективність навчання, с
1	1	0.75±0.16	21.30±7.83
	2	0.86±0.14	-20.70±25.07
	3	0.75±0.25	51.98±19.85
	4	0.67±0.14	-1.47±13.35
	5 (контроль)	0.75±0.16	7.61±23.77
2	1	0.88±0.13	5.27±1.50
	2	0.43±0.20*	3.97±2.84
	3	1.00±0	5.28±2.94
	4	0.41±0.15*	3.72±1.48
	5 (контроль)	0.75±0.16	-1.29±15.11

Примітка: всі порівняння проводили з контролем.

\* – відмінності статистично вірогідні з  $P < 0,05$ .

Але й ті тварини дослідних груп, які знайшли вихід, витратили на його пошук більше час: тривалість перебування в установці від поміщення в неї до пірнання (Таблиця 3.10) у них була в середньому вдвічі вищою, ніж у щурів контрольної групи, що свідчить про деяке погіршення когнітивних процесів у дослідних тварин.

Водночас, варто зазначити, що у дослідній групі 3 у другому тестуванні час пірнання був, навпаки, статистично вірогідно ( $P < 0,05$ ) нижчим, ніж у всіх інших груп, у тому числі й контрольної (майже вдвічі нижчим, ніж у контрольній групі, у першій спробі та у п'ять разів – у другій), а частка вдалих спроб – значно вищою (у другому тестуванні всі тварини третьої дослідної групи знайшли вихід з тестової установки).

Таблиця 3.10.

**Тривалість початкового завмирання та час пірнання у тесті  
«Екстраполяційне позбавлення» потомства інтоксикованих ХПФ та  
інтактних (контрольних) самиць щурів**

Тестування	Група тварин	Спроба 1		Спроба 2	
		Завмирання, с	Час пірнання, с	Завмирання, с	Час пірнання, с
1	1	4.20±2.30	61.76±14.50	4.07±1.42	30.35±11.89
	2	0.64±0.64	45.96±13.86	5.59±2.00	80.20±19.25
	3	0	75.64±15.12	3.07±1.62	36.79±14.05
	4	1.70±1.15	67.98±13.19	14.97±9,74	78.99±14.67
	5 (к)	1.99±1.32	38.65±17.89	4.19±2.21	49.65±16.01
2	1	2.95±1.53	40.46±17.23	5.04±2.05	23.20±13.90
	2	1.76±1.31	66.67±21.40	25.37±15.87	76.23±20.85
	3	0	23.66±9.11*	3.62±2.09	5.91±1.53*
	4	2.64±1.22	69.45±13.98	5.84±2.25	27±15.97
	5 (К)	1.99±1.32	38.65±17.89	6.64±2.12	50.95±17.39

Примітка: всі порівняння проводили з контролем (К). \* – відмінності статистично вірогідні з  $P < 0,05$ .

Однак, важко стверджувати, що було причиною цього – дійсно вищий рівень когнітивної гнучкості та хороша робота пам'яті, чи все ж таки рухова ажитація та гіперактивність, яка спостерігалася в інших тестах: оскільки щурі дослідної групи 3 не втрачали час на завмирання, характерне для нормальних щурів при потраплянні в воду, і активно рухалися у циліндрі, вони могли знайти вихід з нього випадково.

### **Висновки:**

1. 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 на 10-20% вища смертність та значно (до 2-3 разів у третій дослідній групі) нижчі показники індекса Кетле (індекса маси тіла), ніж у потомстві контрольних самиць.
2. Потомство інтоксикованих до запліднення самиць демонструвало істотно вищу рухову активність, ознаки рухової ажитації та гіперактивності у тестах “Відкрите поле” та “Темно–світла камера”. Зокрема, потомство самиць, хронічно інтоксикованих ХПФ у дозі 15 мг/кг, перетинало у 4-5 разів більше квадратів розмітки тестової установки «Відкрите поле» та показувало у 2-3 рази більше актів ніркового рефлексу, ніж тварини контрольної групи; водночас, у цій групі були практично відсутні дефекація та завмирання. У тесті «Темно-світла камера» тварини третьої дослідної групи виглядували у світлу частину установки у 2-3 рази частіше, ніж потомство інтактних самиць.
3. У пренатально інтоксикованих щурів частка вдалих спроб у тесті “Екстраполяційне позбавлення” була майже вдвічі нижчою, ніж у контрольної групи тварин, а тривалість пошуку платформи – вдвічі більшою, що свідчить про погіршення ефективності навчання.

Результати досліджень, описаних у цьому розділі, опубліковано у роботах:

- Грабовська С. Поведінкові параметри потомства самиць щурів, хронічно інтоксикованих низькими дозами хлорпірифосу. Молодь і поступ біології: збірник тез XI Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів [Текст]. Львів : СПОЛОМ. 2015. С. 448–449.
- Grabovska S, Salyha Y. ADHD-like behaviour in the offspring of female rats exposed to low chlorpyrifos doses before pregnancy. Archives of Industrial Hygiene and Toxicology. 2015. Vol. 66 (2). P. 121–127.

#### **3.4. Вплив гострого одноразового введення ХПФ за 10 діб до запліднення на нейроповедінкові, біохімічні та гематологічні параметри самиць щурів та їхнього потомства**

На попередньому етапі дослідження було виявлено, що хронічна інтоксикація ХПФ самиць здатна призводити до виникнення поведінкових аномалій у потомства, зачатого за кілька місяців після припинення введення токсиканта. Тому в подальших дослідженнях було поставлено на меті дізнатися, чи викликатиме у потомства поведінкові аномалії одноразове введення ХПФ самицям щурів до настання вагітності. Окрім того, досліджували лише нейроповедінкові параметри, тому на даному етапі вирішено було проаналізувати також деякі біохімічні та гематологічні параметри досліджуваних тварин.

Самицям щурів одноразово вводили 15, 30 та 60 мг/кг ХПФ за 10 діб до настання вагітності. Через 1 годину після введення у них відбирали кров для дослідження на гематологічному та біохімічному аналізаторах, визначення активності АХЕ та стійкості еритроцитів до кислотного гемолізу. Також проводили нейроповедінкові тестування, аналогічні до тих, які застосовували на попередніх етапах роботи.



### 3.4.1. Біохімічні та гематологічні показники крові щурів дослідних груп через 1 годину після введення ХПФ

Біохімічні показники крові щурів дослідних груп через 1 годину після введення ХПФ відповідали типовій реакції на інтоксикацію аналогічними дозами ХПФ.

Зокрема, активність **холінестерази** (див. рис. 3.3) у крові щурів, інтоксикованих ХПФ (за винятком дослідної групи 1), очікувано знизилася порівняно з контрольними значеннями. Так, у дослідній групі 2 (тварини, яким вводили 30 мг/кг ХПФ) вона становила 51,6 од, що складає близько 48% від активності у контролі ( $P < 0,05$ ), у групі Д3 (щурі, які одержали 60 мг/кг ХПФ) – 43,4 од, або 39% ( $P < 0,05$ ), у групі Д1 (15 мг/кг ХПФ) – 73% контрольної активності.

Оскільки основним механізмом токсичності ХПФ є інгібування АХЕ, можна зробити висновок про токсичну дію застосованих у другій та третій дослідних групах доз ХПФ (10 та 15 мг/кг) на холінестеразну систему щурів.

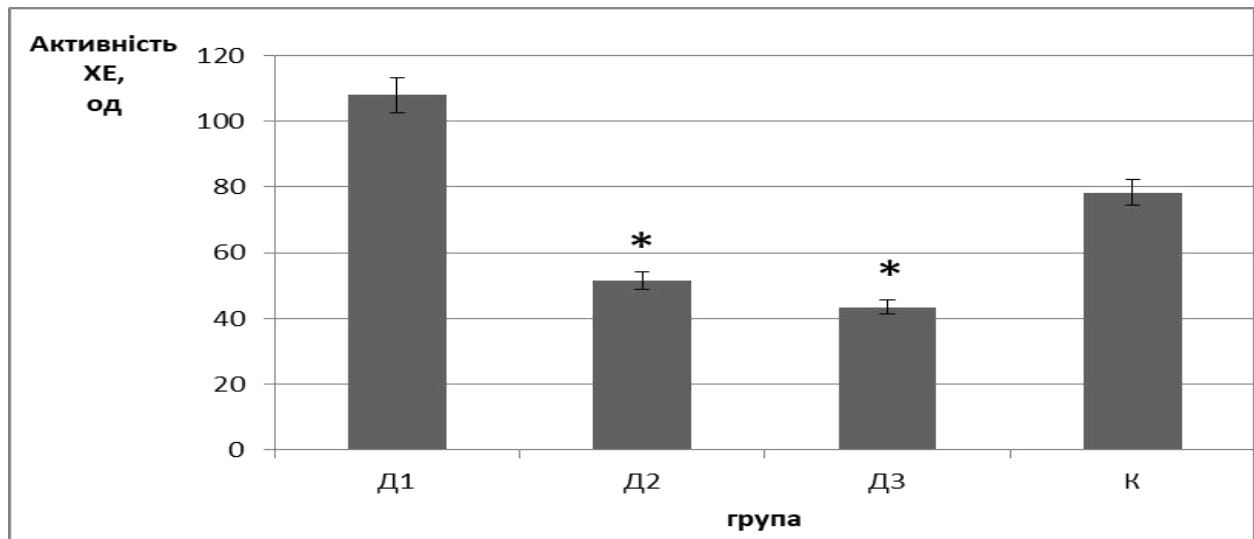


Рис. 3.3. Холінестеразна активність у плазмі крові самиць щурів першого покоління через 1 годину після інтоксикації 15, 30 та 60 мг/кг ХПФ. ( $M \pm m$ ,  $n=6$ )

*Примітка: всі порівняння проводили з контролем. \* – відмінності статистично вірогідні у порівнянні з контролем (з  $P < 0,05$ ).*

Активності деяких інших ензимів у плазмі крові інтоксикованих ХПФ самиць за годину після введення препарату також відрізнялися від показників контролю.

Так, активність **аспартатамінотрансферази** (рис. 3.4) у групі Д2 (щурі, які одержали 30 мг/кг ХПФ) була на 48% вищою ( $P < 0,05$ ), ніж у контрольній групі.

За активністю аланінамінотрансферази істотних змін виявлено не було.

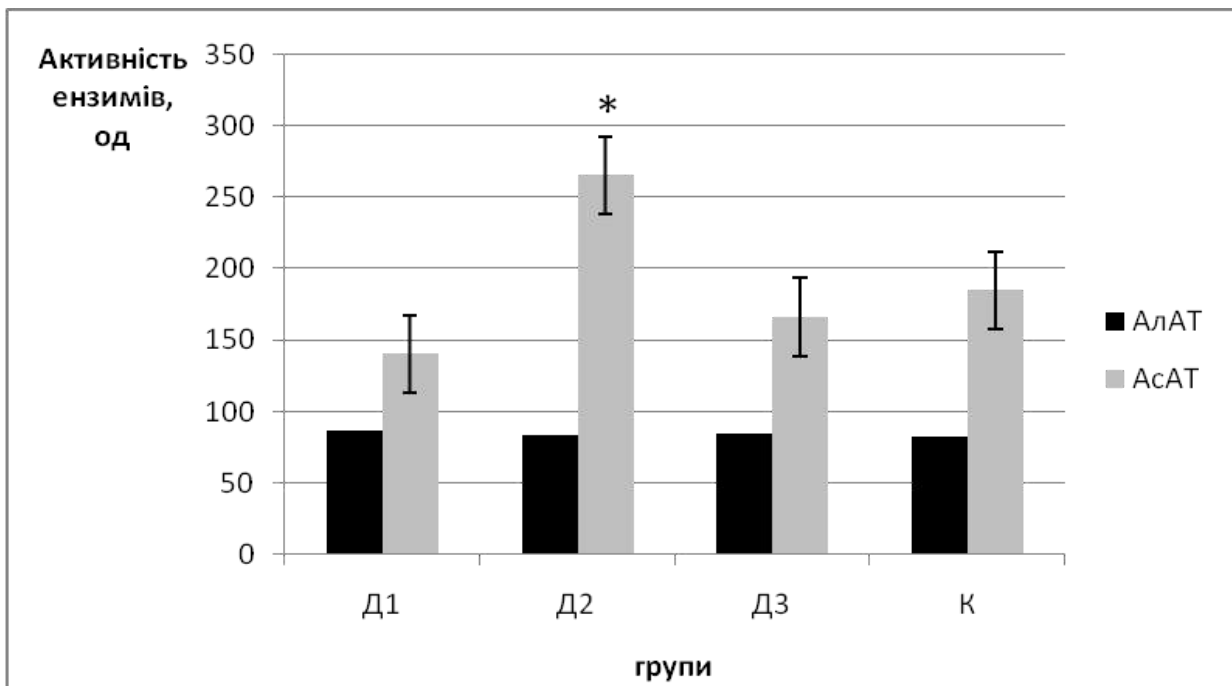


Рис. 3.4. Активність аланін та аспартат амінотрансфераз у плазмі крові самиць щурів першого покоління за годину після інтоксикації 15, 30 та 60 мг/кг ХПФ. ( $M \pm m$ ,  $n=6$ )

*Примітка: всі порівняння проводили з контролем.*

\* – відмінності статистично вірогідні у порівнянні з контролем ( $P < 0,05$ ).

Активність **лужної фосфатази** (рис. 3.4) у всіх трьох дослідних групах була статистично вірогідно ( $P < 0,05$ ) вищою, ніж у контрольній. Так, у дослідній групі 1 вона була вищою на 92%, у групі Д2 – на 164%, у групі Д3 – на 103%

вище, ніж у контролі. Відомо, що зростання активності лужної фосфатази, наряду з інгібуванням активності холінестераз, є однією з класичних діагностичних ознак хлорпірифосної інтоксикації.

Оскільки зміни лужної фосфатази, наряду з холінестеразою, слугують маркером впливу ФОС, то за результатами даного дослідження можна стверджувати про наявність такого впливу і в першій дослідній групі (незважаючи на те, що істотних змін холінестеразної активності у ній виявлено не було).

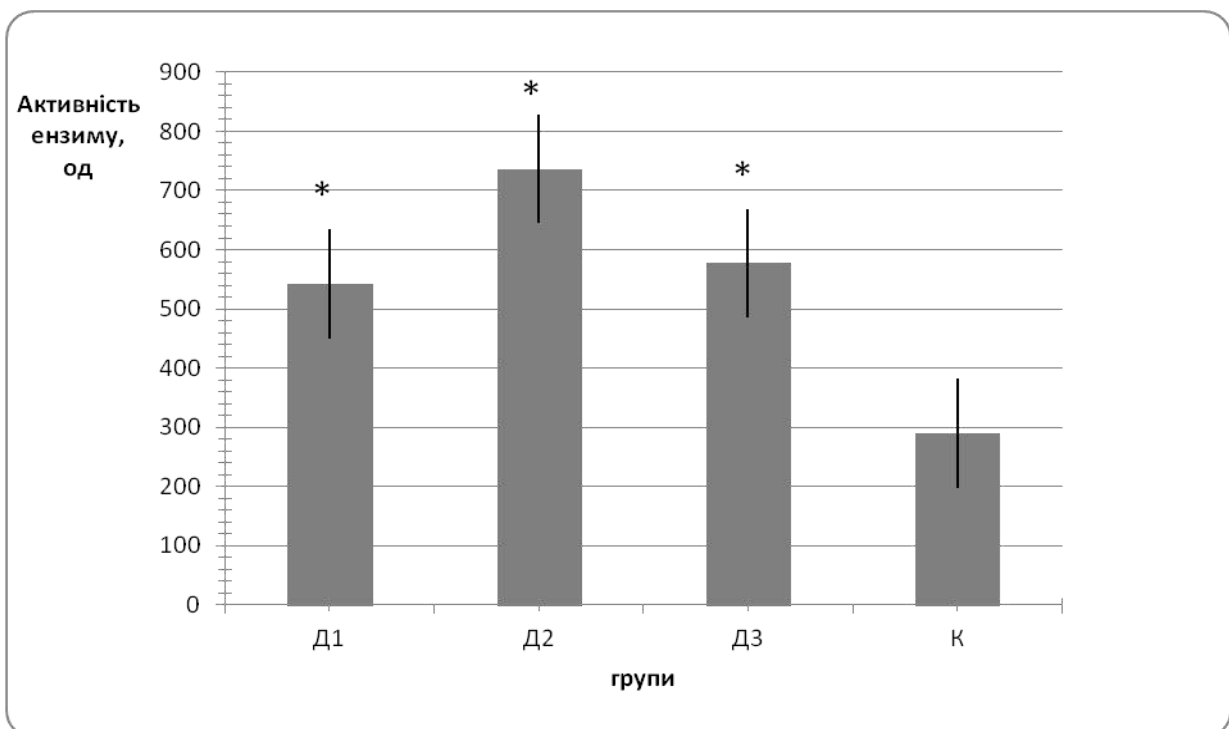


Рис. 3.4. Активність лужної фосфатази у плазмі крові самиць щурів першого покоління за годину після інтоксикації 15, 30 та 60 мг/кг ХПФ (у відсотках від контрольних значень). ( $M \pm m$ ,  $n=6$ )

*Примітка: всі порівняння проводили з контролем.*

\* – відмінності статистично вірогідні у порівнянні з контролем (з  $P < 0,05$ ).

**Коефіцієнт де Рітиса** (відношення активностей аспартат– та аланінамінотрансфераз) (рис. 3.5) статистично вірогідно ( $P < 0,05$ ) відрізнявся від контрольних значень у першій та другій дослідних групах. У першій групі він був на 36% нижчим, ніж у контролі, у другій – навпаки, вищим на 43%.

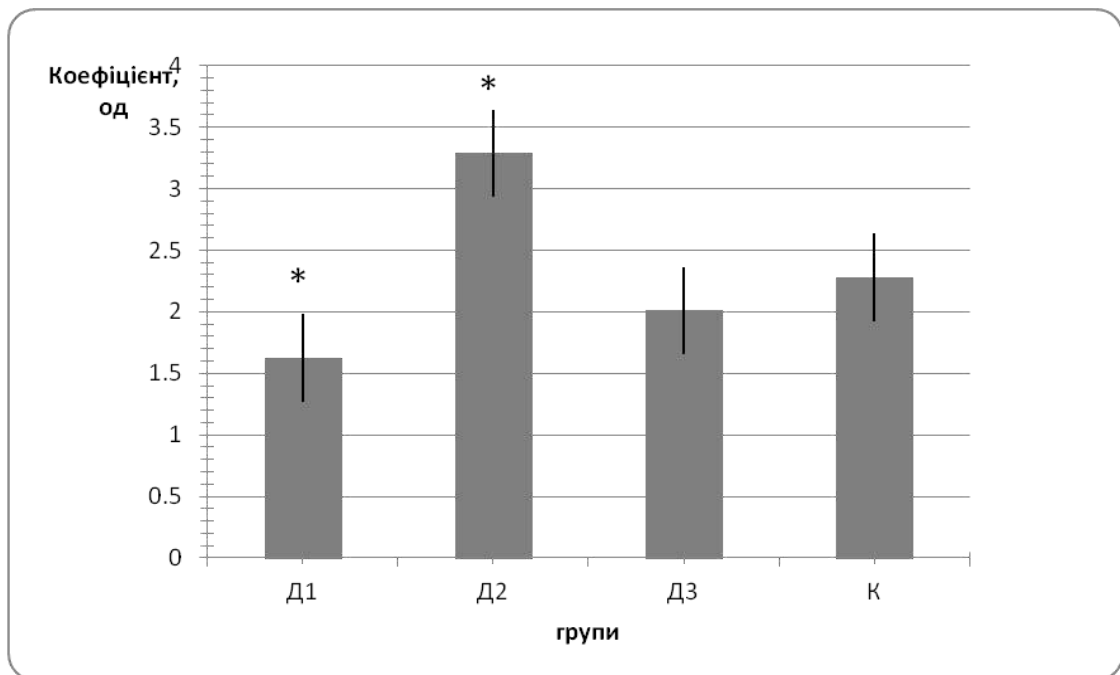


Рис. 3.5. Коефіцієнт де Рітиса у плазмі крові самиць щурів першого покоління за годину після інтоксикації 15, 30 та 60 мг/кг ХПФ. ( $M \pm m$ ,  $n=6$ )

*Примітка: всі порівняння проводили з контролем.*

\* – відмінності статистично вірогідні у порівнянні з контролем ( $P < 0,05$ ).

**Вміст загального протеїну** у плазмі крові дослідних та контрольних тварин істотно не відрізнявся та знаходився в межах норми.

За гематологічними показниками (Табл. 3.11) відмінності від контролю було виявлено тільки за кількістю тромбоцитів: у інтоксикованих тварин їхня кількість зростає, причому зростання було дозозалежним. Найбільше зростання,

порівняно з контрольною групою – на 61% ( $P<0,05$ ) – спостерігалось у групі, що отримала мінімальну дозу (15 мг/кг), а найменше, на 23% – відповідно, у тварин, що одержали максимальну з застосованих доз ХПФ (60 мг/кг). У групі Д2 (30 мг/кг ХПФ) кількість тромбоцитів зросла відносно контролю на 43% ( $P<0,05$ ).

За рештою гематологічних показників істотних відмінностей між контрольними та дослідними тваринами виявлено не було.

Таблиця 3.11

**Гематологічні показники крові самиць щурів за годину після інтоксикації 15, 30 та 60 мг/кг ХПФ. ( $M\pm m$ ,  $n=6$ )**

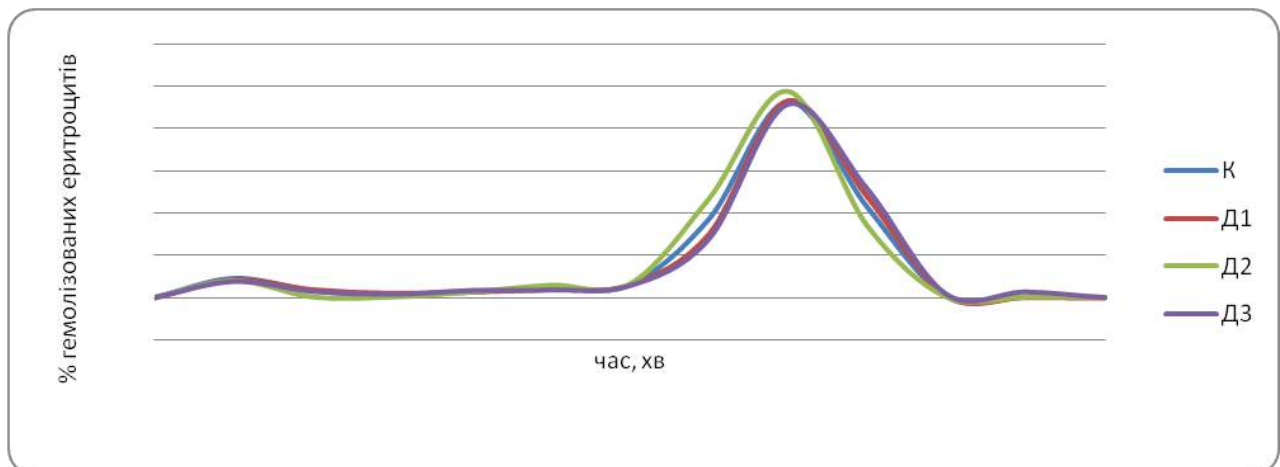
Показник	Група			
	Д1	Д2	Д3	К
Показники лейкоцитів				
Заг к–сть, $10^9/\text{л}$	4,0 $\pm$ 1,37	10,9 $\pm$ 4,48	9,1 $\pm$ 3,14	5,9 $\pm$ 2,12
Лімфоцитів, $10^9/\text{л}$	5,9 $\pm$ 1,70	7,3 $\pm$ 2,90	6,1 $\pm$ 3,13	4,1 $\pm$ 2,33
Моноцитів, $10^9/\text{л}$	1,5 $\pm$ 0,08	1,7 $\pm$ 0,84	1,2 $\pm$ 0,77	0,7 $\pm$ 0,04
Гранулоцитів, $10^9/\text{л}$	1,7 $\pm$ 0,48	1,9 $\pm$ 0,68	1,9 $\pm$ 0,59	1,1 $\pm$ 0,47
% лімфоцитів	63,2 $\pm$ 14,30	67,1 $\pm$ 16,51	66,5 $\pm$ 12,82	69,3 $\pm$ 11,67
% моноцитів	13,91 $\pm$ 4,04	15,3 $\pm$ 3,16	12,7 $\pm$ 4,18	11,9 $\pm$ 3,19
% гранулоцитів	16,2 $\pm$ 3,50	17,7 $\pm$ 2,83	20,8 $\pm$ 3,11	18,8 $\pm$ 3,20
Показники еритроцитів				
К–сть еритроцитів, $10^{12}/\text{л}$	5,75 $\pm$ 1,89	9,09 $\pm$ 3,57	7,4 $\pm$ 2,10	7,7 $\pm$ 1,99
Гемоглобін, г/л	136 $\pm$ 21,72	192 $\pm$ 34,15	158 $\pm$ 24,66	166 $\pm$ 25,81
Гематокрит, л/л	0,283 $\pm$ 0,09	0,417 $\pm$ 0,07	0,337 $\pm$ 0,04	0,358 $\pm$ 0,05
Середній об'єм еритроцита, фл	49,2 $\pm$ 1,88	45,9 $\pm$ 2,13	45,5 $\pm$ 2,72	46,5 $\pm$ 2,49
MCH	23,7 $\pm$ 1,65	21,1 $\pm$ 1,54	21,4 $\pm$ 1,43	21,6 $\pm$ 1,37
MCHC	481 $\pm$ 28,42	460 $\pm$ 17,51	469 $\pm$ 18,60	464 $\pm$ 19,24
RDW	14,1 $\pm$ 3,41	12,8 $\pm$ 2,90	13,9 $\pm$ 2,13	12,2 $\pm$ 2,15

Продовження таблиці 3.11.

Показники тромбоцитів				
Тромбоцитів, $10^9/\text{л}$	$756, \pm 36,7^*$	$517 \pm 31,1^*$	$386 \pm 20,1$	$297 \pm 19,3$
Середній об'єм	$5,7 \pm 1,10$	$5,8 \pm 0,98$	$6,2 \pm 0,65$	$6,5 \pm 0,52$
PCT	$0,431 \pm 0,05$	$0,3 \pm 0,02$	$0,239 \pm 0,03$	$0,193 \pm 0,06$
PDW	$14,2 \pm 4,2$	$22,8 \pm 6,3$	$23,1 \pm 5,1$	$25,3 \pm 5,4$

Примітка: всі порівняння проводили з контролем. \* – відмінності статистично вірогідні у порівнянні з контролем (з  $P < 0,05$ ).

За стійкістю еритроцитів до кислотного гемолізу статистично вірогідних відмінностей між контрольними та дослідними тваринами виявлено не було (рис. 3.7).



Група	Час максимального гемолізу, хв	Час тотального гемолізу, хв	% максимального гемолізу
Д1	$8,8 \pm 0,2$	$11,0 \pm 0,1$	$48,8 \pm 1,8$
Д2	$9,0 \pm 0,1$	$10,9 \pm 0,2$	$48,8 \pm 3,5$
Д3	$8,9 \pm 0,2$	$11,1 \pm 0,1$	$45,8 \pm 2,9$
К	$9,1 \pm 0,1$	$11,0 \pm 0,1$	$46,5 \pm 4,1$

Рис 3.7. Усереднені криві кислотного гемолізу еритроцитів щурів через годину після введення ХПФ у дозах 15, 30 та 60 мг/кг.

Примітка: всі порівняння проводили з контролем. ( $M \pm t$ ,  $n=6$ )

Час максимального і тотального гемолізу та максимальний відсоток гемолізу у всіх чотирьох групах був однаковим.

### 3.4.2. Результати поведінкового тестування щурів, одноразово інтоксикованих ХПФ

**Поведінкове тестування** самиць 1 покоління проводилося до та після введення ХПФ. Тестування до початку інтоксикації мало на меті виявити можливі фенотипові відмінності між тваринами різних груп для уникнення артефактів, які могли б спотворити результати впливу ХПФ.

У тестах «Відкрите Поле» та «Темно–світла камера», проведених до введення ХПФ, істотних міжгрупових відмінностей виявлено не було, що свідчить про достатню рівномірність розподілу тварин між групами за їх поведінковим фенотипом.

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

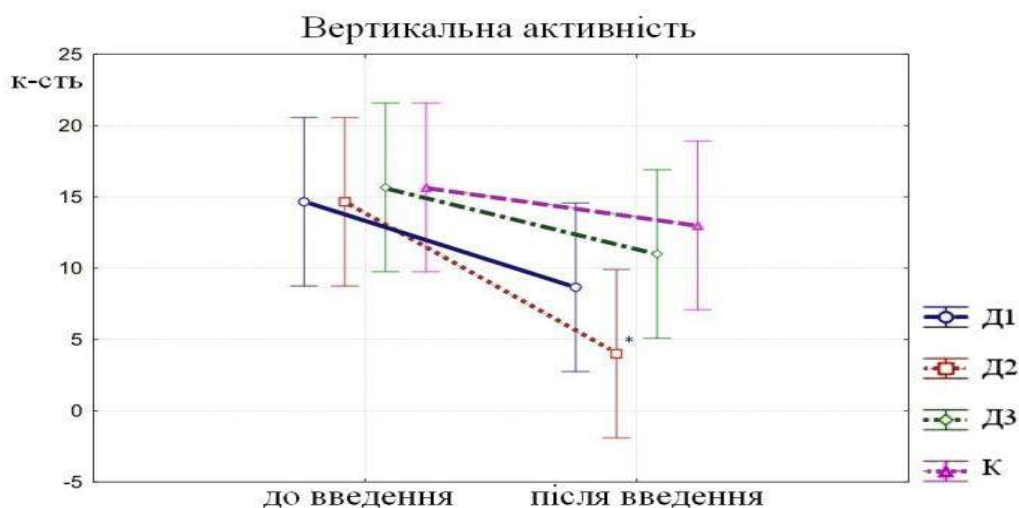


Рис. 3.8. Вертикальна рухова активність щурів у тесті «Відкрите поле» до та після введення ХПФ. ( $M \pm m$ ,  $n=6$ )

*Примітка: всі порівняння проводили з контролем. \* – відмінності статистично вірогідні у порівнянні з контролем (з  $P < 0,05$ ).*

Так, у тесті «*Відкрите Поле*», проведеному на 2 добу після введення ХПФ, у порівнянні з першим тестуванням вертикальна рухова активність (рис. 3.8) дещо знизилася в усіх групах.

Найбільш вираженою та статистично вірогідною ( $P < 0,01$ ) різниця була у дослідній групі 2: якщо у тесті, проведеному до введення препарату, тварини усіх груп робили в середньому 15 стійок на задніх лапах, то після введення у групі Д1 цей показник знизився до 5, а у групі Д2 – до 8, в той час як у контрольній групі практично не змінився.

Показники короткого грумінгу (рис. 3.9) у другому тестуванні також дещо знизилися у всіх групах, однак найістотнішою та статистично вірогідною ( $P < 0,01$ ) ця зміна була у групах Д1 (в середньому з 4 до 1 акту короткого грумінгу за тестування) та Д2 (з 3 актів до 0).

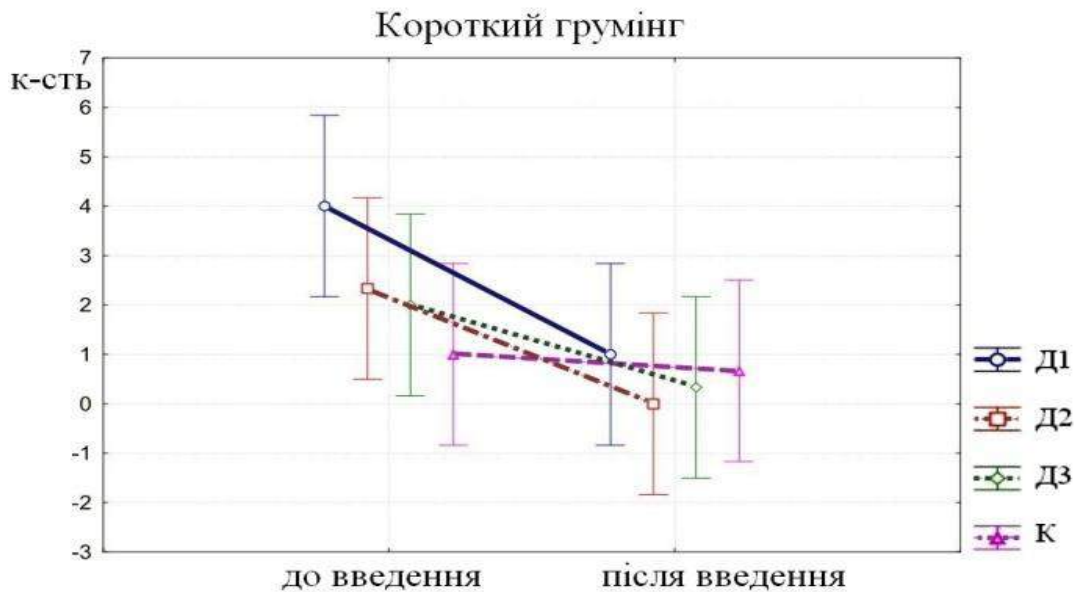


Рис. 3.9. Короткий грумінг у тесті «Відкрите поле» до та після введення ХПФ. ( $M \pm m$ ,  $n=6$ )

*Примітка: всі порівняння проводили з контролем.*

\* – відмінності статистично вірогідні у порівнянні з контролем ( $P < 0,05$ ).



За іншими показниками (зовнішня та внутрішня горизонтальна активність, довгий грумінг, кількість актів дефекації, нирковий рефлекс, кількість та тривалість замирань) істотних відмінностей між дослідними та контрольною групами виявлено не було.

Відмінності у результатах першого та другого тестувань, які спостерігалися як у дослідних, так і у контрольній групах, можуть бути пояснені як дещо зниженою новизною арени, в яку тварини потрапляли вдруге, так і стресом, якому були піддані тварини під час введення препарату (в тому числі контрольні щурі, яким вводили чисту олію).

Тестування тварин за методом «Темно–світла камера» (Табл. 3.12) проводили на 3 добу після введення ХПФ.

Таблиця 3.12

**Результати тестування самиць щурів, інтоксикованих 15, 30 та 60 мг/кг ХПФ, у тесті «Темно–світла камера» ( $M \pm m$ ,  $n=6$ )**

Група тварин	Час до заходу в темний відсік, с	Кількість виглядувань	Кількість виходів	Тривалість виходів
Д1	11,7±5,8	4±2	0	0
Д2	17,1±9,6	2±2	0	0
Д3	13,3±8,6	5±3	0	0
К	5,1±5,4	3±2	0	0

*Примітка: всі порівняння проводили з контролем.*

За результатами тесту «Темно-світла камера» статистично вірогідних відмінностей у поведінці контрольних та дослідних (інтоксикованих ХПФ) тварин виявлено не було.

У самиць щурів дослідних та контрольної груп одержали потомство. Починаючи з другої доби життя, потомство всіх самиць підраховували, вимірювали його масу тіла та назоанальну довжину.

За даними цих вимірювань також було виявлено ряд відмінностей. По-перше, до дорослого віку дожило потомство лише двох груп – другої дослідної та контрольної; щурята з груп Д1 та Д3 загинули на першому тижні життя. Таким чином, у подальших тестуваннях було використано лише одну дослідну групу – потомство самиць з групи Д2, що одержали 30 мг/кг ХПФ до запліднення. Цю групу тварин у подальшому будемо називати просто "дослідною групою".

У дослідній групі 2 смертність щурят також була вищою, ніж у контрольній: відповідно, у цих групах вижили 44% та 75% потомства.

Для аналізу біохімічних та гематологічних параметрів крові її відбирали у щурів у віці 1,5 місяців.

### **3.4.3. Біохімічні та гематологічні показники крові потомства самиць щурів, одноразово інтоксикованих ХПФ**

За біохімічними показниками крові зразки, відібрані у потомства інтоксикованих та інтактних самиць, за більшістю параметрів істотно не відрізнялися.

Істотні відмінності дослідної групи від контролю було виявлено лише за активністю лужної фосфатази (Рис. 3.10). Як видно з графіка, у дослідній групі активність цього ензиму була на 30% нижчою (з  $P < 0,05$ ), ніж у контрольній групі тварин.

Як відомо, інтоксикація ХПФ призводить до зростання активності лужної фосфатази у крові інтоксикованих організмів. Однак причини, що призвели до

зниження її активності у крові потомства інтоксикованих самиць, яке не зазнавало безпосереднього впливу ХПФ, потребують подальшого дослідження.

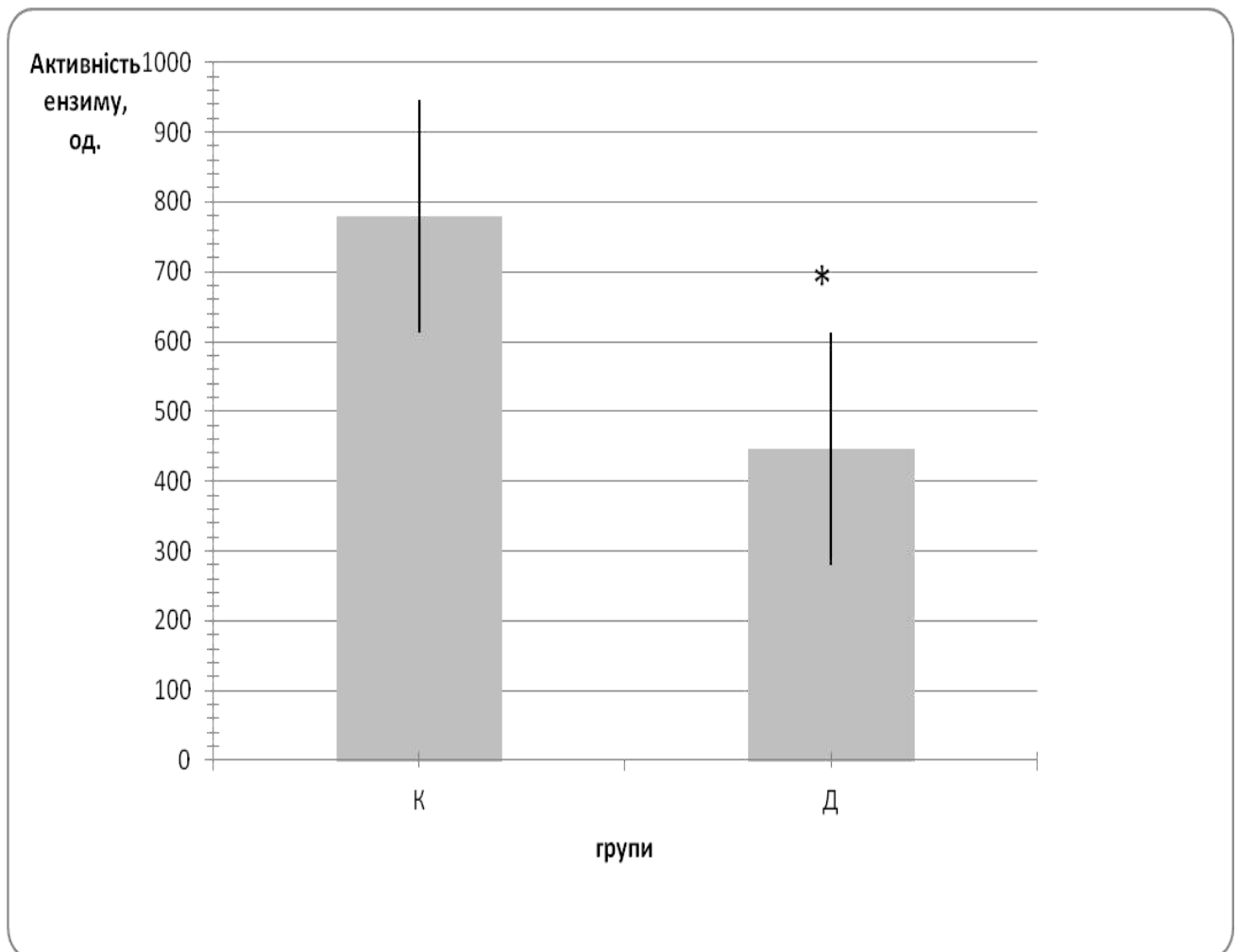


Рис. 3.10. Активність лужної фосфатази у плазмі крові потомства інтоксикованих ХПФ та інтактних самиць. ( $M \pm m$ ,  $n=6$ ).

*Примітка: всі порівняння проводили з контролем. \* – відмінності статистично вірогідні у порівнянні з контролем (з  $P < 0,05$ ).*

Активність **холінестерази**, тобто ензима, активність якого найістотніше змінюється при впливі ХПФ та слугує основною діагностичною ознакою наявності та сили такого впливу, у крові дослідних та контрольних тварин статистично не відрізнялася.

За іншими біохімічними показниками (активність аспартат– та аланінаміноотрансфераз, вміст загального протеїну, холестерину, тригліцеридів та креатиніну) (Рис. 3.11) істотних відмінностей виявлено також не було.

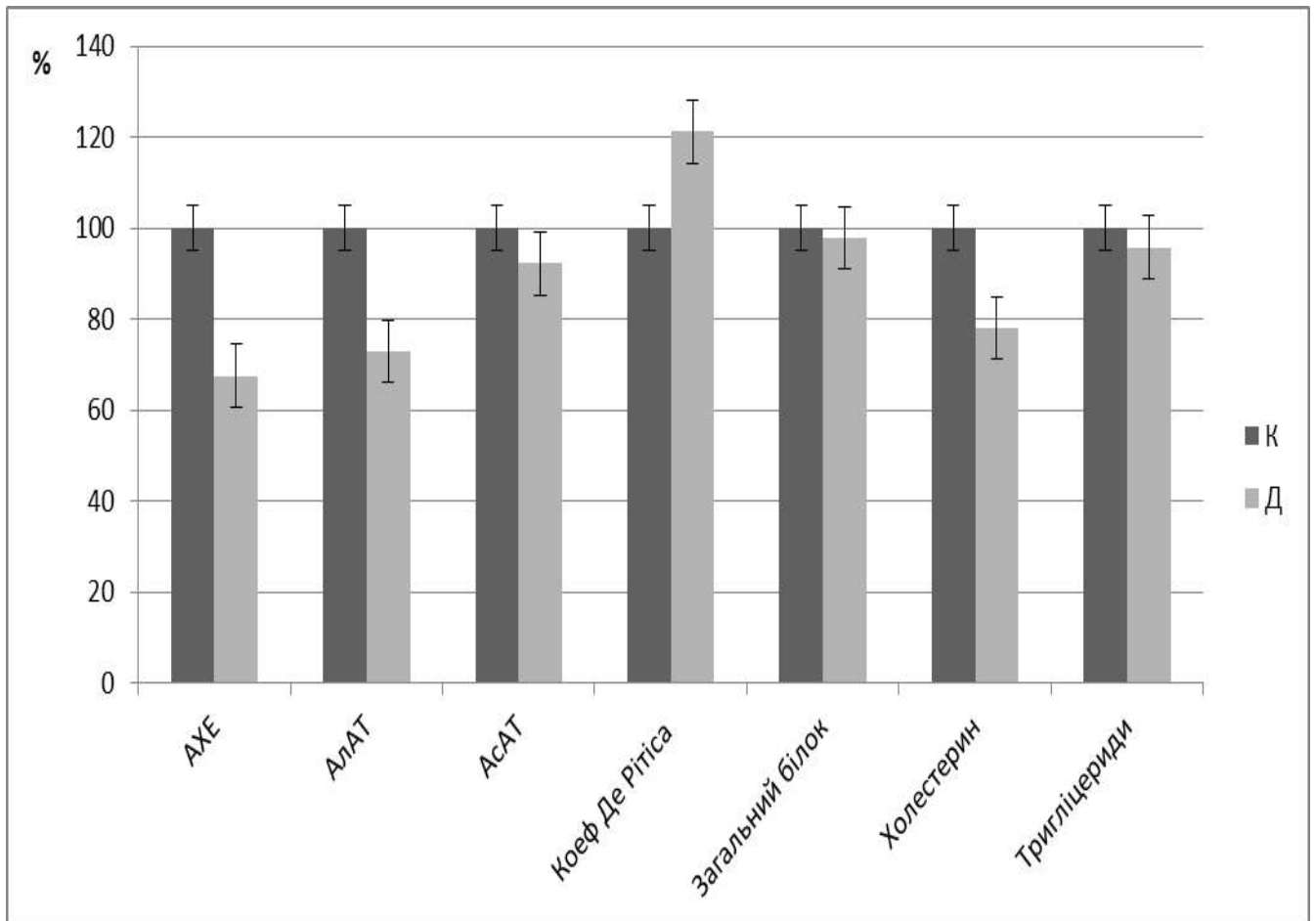
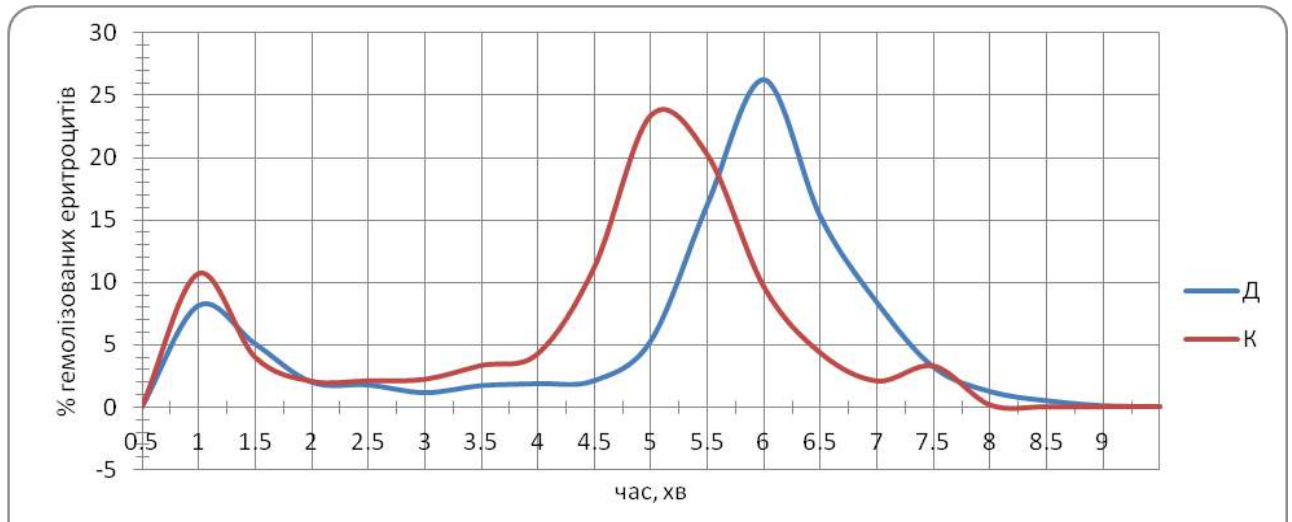


Рис. 3.11. Активність ацетилхолінестерази, аланін та аспартат аміноотрансфераз, коефіцієнт де Рітиса, вміст загального протеїну, холестерину та тригліцеридів у плазмі крові потомства інтоксикованих ХПФ та інтактних самиць (у відсотках від контрольних значень). ( $M \pm m$ ,  $n=6$ )

За стійкістю еритроцитів до кислотного гемолізу (рис. 3.11) було виявлено відмінності ( $P < 0,05$ ) у часі максимального гемолізу: ( $6,0 \pm 0$ ) с для дослідних тварин та ( $5,1 \pm 0,2$ ) с для контрольних.

За часом тотального гемолізу та максимальним відсотком гемолізу статистично вірогідних відмінностей виявлено не було.



Група	Час максимального гемолізу, хв	Час тотального гемолізу, хв	% максимального гемолізу
Дослід	6,0±0*	7,75±0,5	26,3±2,3
Контроль	5,1±0,2	6,9±0,4	29,3±4,3

Рис 3.11. Усереднені еритрограми кислотного гемолізу еритроцитів щурів другого покоління та їх параметри. (M±m, n=13)

Примітка. \* – відмінності статистично вірогідні у порівнянні з контролем ( $P < 0,05$ ).

#### 3.4.4. Результати поведінкових тестувань потомства самиць щурів, одноразово інтоксикованих ХПФ.

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 спостерігали за зовнішньою горизонтальною активністю, довгим та коротким грумінгом.

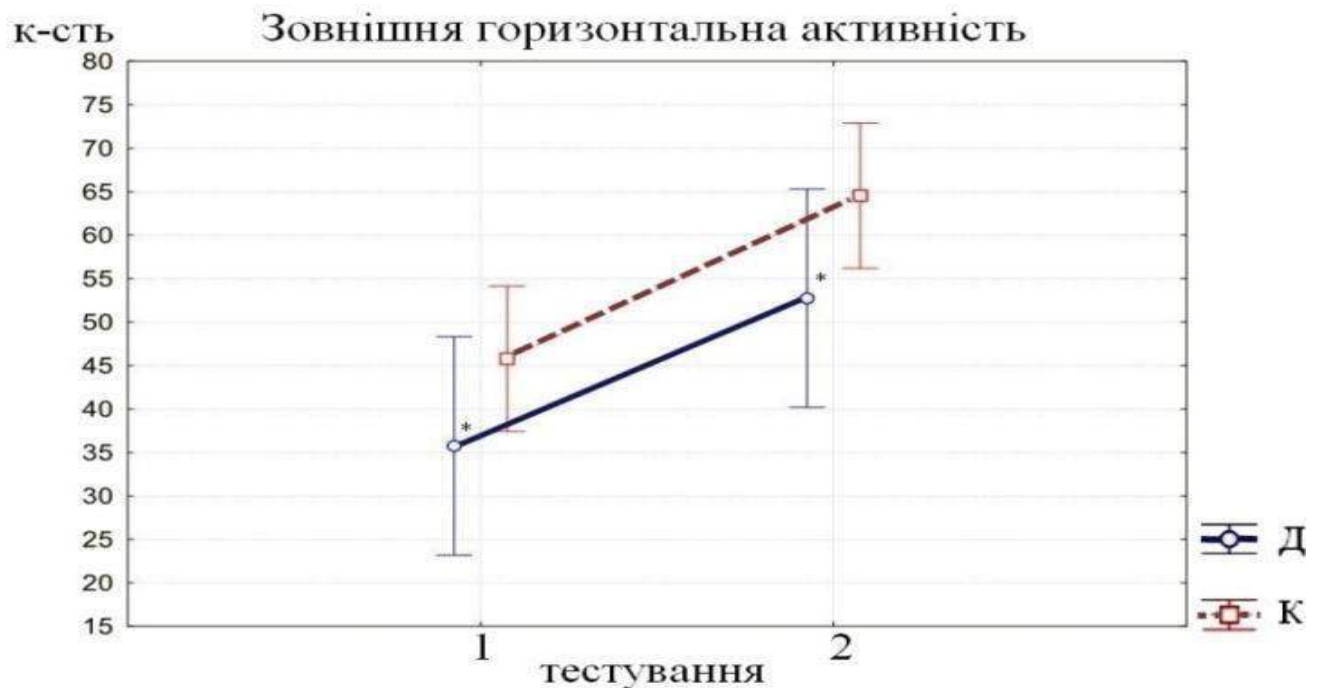


Рис 3.12. Зовнішня горизонтальна активність у тесті «Відкрите поле» у другому поколінні щурів. ( $M \pm m$ ,  $n=13$ )

*Примітка: всі порівняння проводили з контролем.*

\* – відмінності статистично вірогідні у порівнянні з контролем ( $P < 0,05$ ).

Так, кількість перетнутих за час тестування квадратів у дистальній частині арени (зовнішня горизонтальна активність; рис 3.12) 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 (рис. 3.13) в дослідній групі тварин у першому тестуванні була статистично вірогідно ( $P < 0,05$ ) приблизно втричі вищою, ніж у контролі: в той час, як контрольні тварини за час тестування

демонстрували не більше 1 акту, у дослідних спостерігалось 2-3 акти довгого грумінгу.

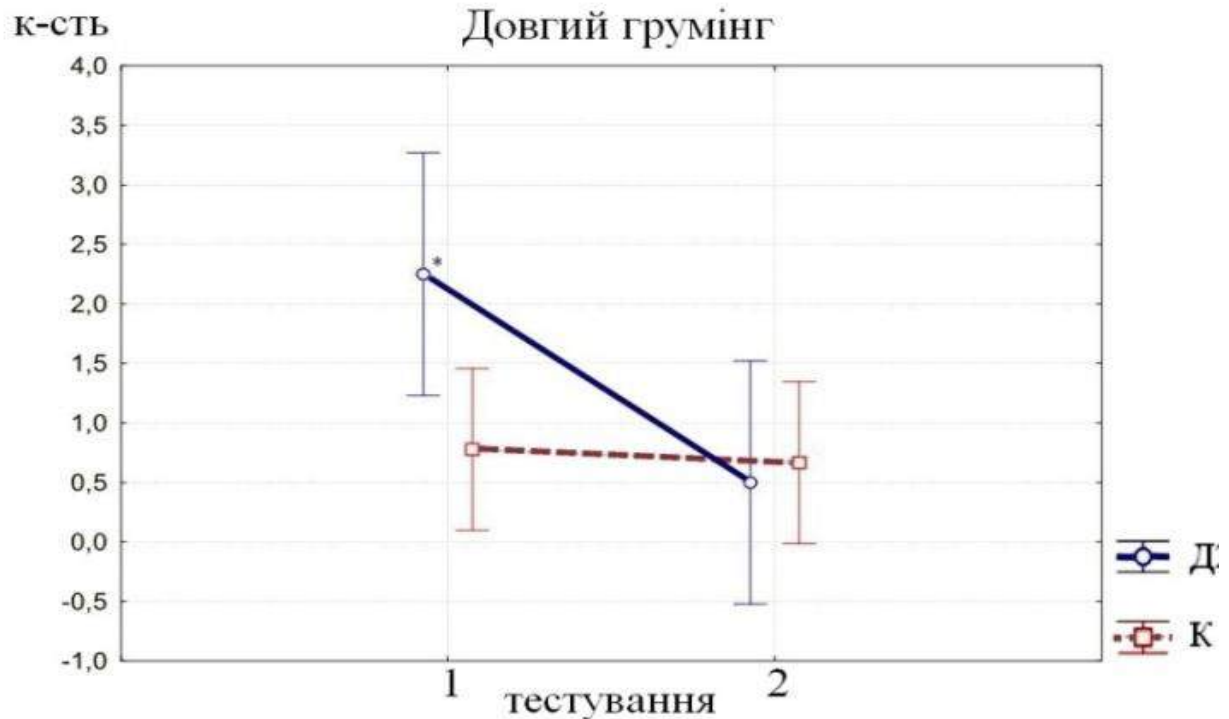


Рис 3.13. Кількість актів довгого грумінгу у тесті «Відкрите поле» у другому поколінні щурів. ( $M \pm m$ ,  $n=13$ )

*Примітка: всі порівняння проводили з контролем.*

\* – відмінності статистично вірогідні у порівнянні з контролем (з  $P < 0,05$ ).

Однак у другому тесті показники обох груп практично зрівнялися.

Найістотніші відмінності у тесті «Відкрите поле» спостерігали за параметром «короткий грумінг» у першому тестуванні (див. рис. 3.14).

У дослідній групі цей показник був статистично вірогідно ( $P < 0,001$ ) у 2-3 рази вищим, ніж у контролі. Так, тварини дослідної групи у першому тестуванні здійснювали 4-5 актів короткого грумінгу, в той час як контрольні – 1-2. У другому тестуванні цей показник у дослідній групі знизився до 1-2 актів,

однак, у контрольній групі в цьому тестуванні короткого грумінгу взагалі майже не спостерігали.

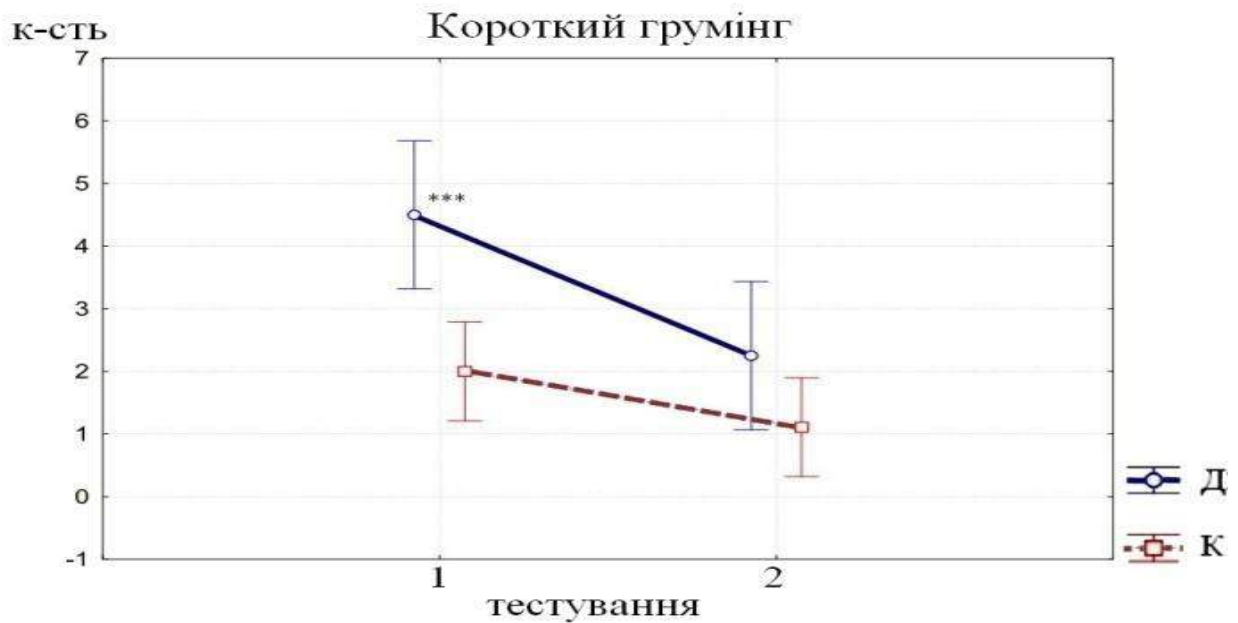


Рис 3.14. Кількість актів короткого грумінгу у тесті «Відкрите поле» у другому поколінні щурів. ( $M \pm m$ ,  $n=13$ )

*Примітка: всі порівняння проводили з контролем.*

\*\*\* – відмінності статистично вірогідні у порівнянні з контролем ( $P < 0,001$ ).

Зменшення горизонтальної активності у поєднанні зі зростанням кількості актів грумінгу вважається ознаками підвищення тривожності тварин [144]. За іншими параметрами даного тесту істотних відмінностей виявлено не було.

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 (див. *рис. 3.15, 3.16*).

Якщо тварини контрольної групи майже не виходили з темної частини камери в освітлену (максимум 1 вихід) (*рис. 3.15*), то потомство інтоксикованих самиць виходило в світлий відсік 1–2 рази у першому тестуванні, 2–3 – у другому і в середньому 4 – у третьому (максимальна кількість виходів однієї тварини становила 9).

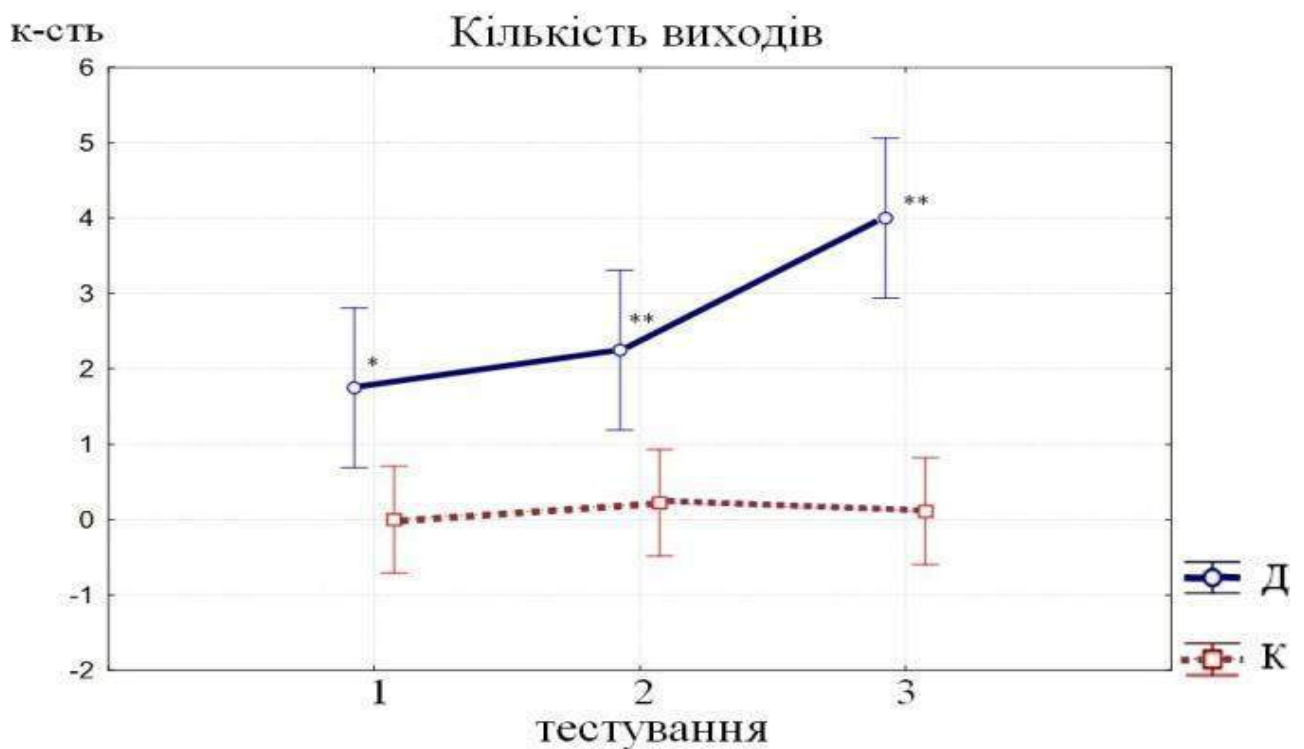


Рис 3.15. Кількість виходів з темної частини камери в освітлену у тесті «Темно–світла камера» для другого покоління щурів. ( $M \pm m$ ,  $n=13$ )

*Примітка: всі порівняння проводили з контролем.*

\* – відмінності статистично вірогідні у порівнянні з контролем з  $P < 0,05$ , \*\* – з  $P < 0,01$ .

Сумарна тривалість виходів (*рис. 3.15*) у світлу частину камери у дослідній групі також зростала в кожному наступному тестуванні (до 120 секунд сумарного перебування в освітленому відсіку), що було статистично

вірогідно ( $p < 0,01$ ) вище, ніж аналогічні показники інтактних контрольних тварин, які взагалі практично не виходили в освітлену частину камери після заходу в темну.

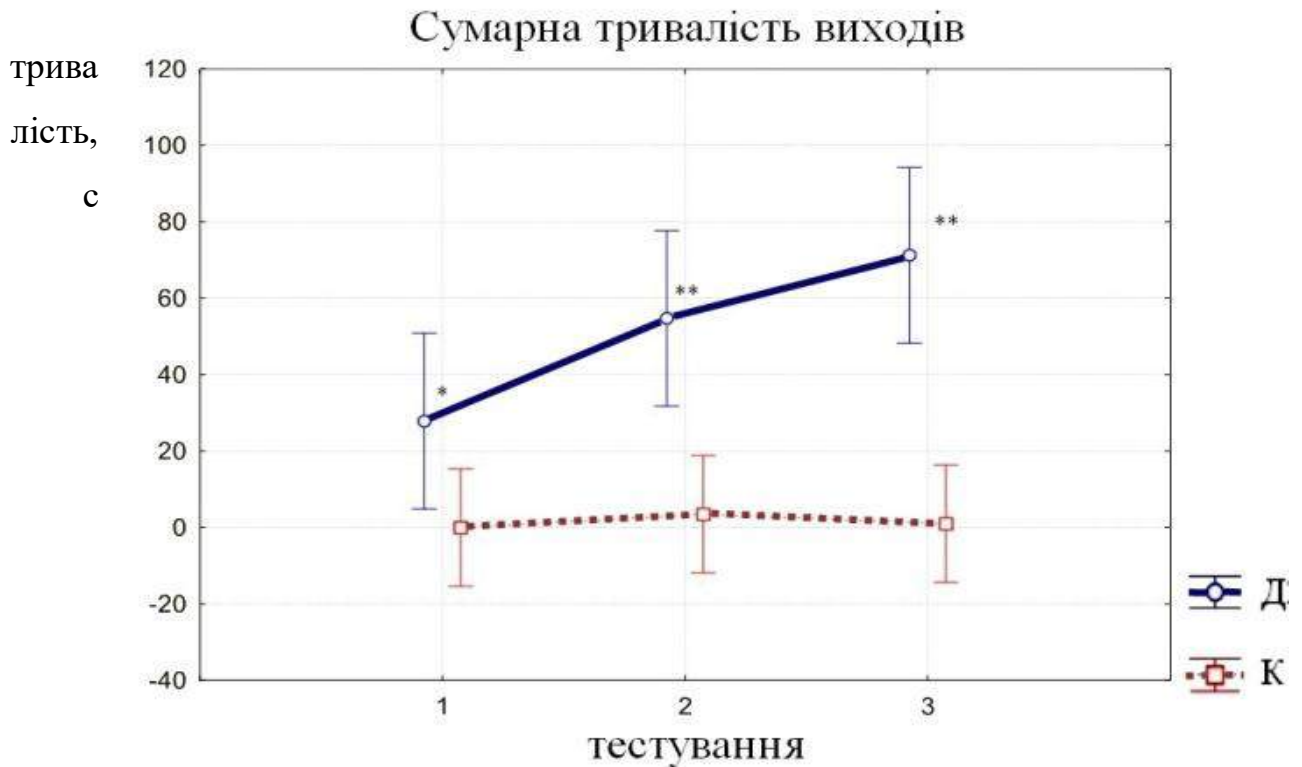


Рис 3.16. Сумарна тривалість виходів з темної частини камери в освітлену у тесті «Темно–світла камера» для другого покоління щурів. ( $M \pm m$ ,  $n=13$ )

*Примітка: всі порівняння проводили з контролем.*

\* – відмінності статистично вірогідні у порівнянні з контролем з  $P < 0,05$ , \*\* – з  $P < 0,01$ .

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 у реакції на стрес дослідних та контрольних тварин. Для перевірки цього припущення ми вирішили використати ще одну тестову методику, в якій тварин поміщають у

стресові умови, а саме «Екстраполяційне позбавлення». Однак, за даними цього тесту суттєвих відмінностей у поведінці дослідних та контрольних щурів виявлено не було.

### **Висновки:**

1. 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.
2. У потомства інтоксикованих ХПФ самиць, зачатого за 10 діб після введення ксенобіютика, було виявлено ознаки підвищеної тривожності в низько–стресогенних умовах (поміщення в незнайому територію), а саме у тесті «Відкрите поле». Зокрема, зовнішня горизонтальна активність у дослідній групі була нижчою, ніж у контрольній, в обох тестуваннях: на 22% у першому тестуванні та на 19% у другому. Водночас, кількість актів довгого та короткого грумінгу в дослідній групі була у 2-3 рази вищою, ніж у контрольній.
3. У тесті «Темно-світла камера» (в умовах помірного стресу, викликаного яскравим освітленням) у потомства інтоксикованих ХПФ самиць зафіксовано значно вищу кількість виходів в освітлену частину установки та більшу сумарну тривалість перебування в цій частині після заходу в темну.
4. У реакції на гострий стрес (поміщення у водне середовище в тесті «Екстраполяційне позбавлення») суттєвих відмінностей від контрольної групи в цих тварин виявлено не було.

Матеріали даного розділу опубліковані у роботах:

- 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.
- Грабовська С. Нейрофізіологічні порушення у самиць щурів та їх потомства за інтоксикації хлорпірифосом до запліднення. Віол. Tvarin. 2017. №19 (3). С. 25–35.

## РОЗДІЛ 4

### АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

У літературі є достатня кількість даних, які свідчать про можливий зв'язок між інтоксикацією ХПФ на ранніх етапах розвитку організму та виникненням нейроповедінкових аномалій, етіологія яких на сьогодні остаточно не з'ясована. Зокрема, ряд моніторингових досліджень показав, що у дітей, матері яких зазнавали дії цього пестицида під час вагітності (у зв'язку з роботою в сільському господарстві або проживання неподалік полів, які оброблялися хімікатом), зростала частота випадків аутизму [46, 130]. Також існують дані про те, що у пренатально інтоксикованих ХПФ дітей зростає ризик виникнення СДУГ [108]. На лабораторних мишах розроблена модель хвороби Паркінсона, індукованої впливом ХПФ [93, 132]. Окрім того, інтоксикація ФОС спричиняє погіршення пам'яті та когнітивних здібностей у тварин [49, 95] і людей [1, 71, 75], які зазнавали такого впливу. Варто зазначити, що в усіх виявлених роботах мова йшла про пренатальний або ранній постнатальний вплив ХПФ, тобто безпосередню дію токсичної речовини на організм, який формується, росте та розвивається. Такий вплив пояснюють не лише прямою нейротоксичністю ХПФ шляхом інгібування АХЕ, але й спричиненням оксидативного стресу, який, у свою чергу, вважається одним з факторів виникнення нейродегенеративних процесів [66]. Одержаних у цих та інших дослідженнях даних виявилось достатньо для подачі у США петиції щодо перегляду нормативів використання ХПФ та скасування його реєстрації [60].

Однак, питання про можливість впливу інтоксикації ХПФ самиць ще до настання вагітності на здоров'я та поведінку їхнього майбутнього потомства висвітлене не було. Вважається, що ФОС, і зокрема ХПФ, не здатні

накопичуватися в організмі [50], тож не мали б спричиняти тривалий віддалений вплив на наступні покоління.

Однак, як свідчать результати, одержані у даній дисертаційній роботі, такий вплив не тільки можливий, але й істотний. Причому він виражений навіть значно сильніше, ніж вплив власне пренатальної інтоксикації ХПФ. У потомства самиць, до вагітності отруєних ХПФ як гостро, та і хронічно, спостерігалися поведінкові аномалії, в той час як самі ці самиці у поведінкових тестуваннях після інтоксикації не проявляли значних відхилень від контрольних результатів.

При дослідженні першого покоління тварин, тобто власне самиць, яким вводили ХПФ, відбувалися процеси адаптації, яка з часом нормалізувала стан ЦНС, поведінку та біохімічні параметри крові. На першому етапі досліджень, коли дорослим самицям щурів вводили 5, 10 або 15 мг/кг ХПФ щоденно протягом 30 діб, відмінності у поведінці інтоксикованих та контрольних (інтактних) тварин спостерігалися у перших серіях тестувань за кожною з використаних методик. У наступних тестуваннях відмінності ставали менш вираженими, не досягали рівня статистичної вірогідності або взагалі були відсутніми. Така часова динаміка свідчить про адаптацію організму дорослих щурів до субтоксичних доз пестициду, які в нього потрапили. Якщо наприкінці періоду введення, коли ХПФ ще залишався в організмі самиць та міг спричиняти пряму токсичну дію (шляхом інгібування ацетилхолінестерази чи іншими шляхами), певні поведінкові відмінності (а отже, й зміни фізіологічного стану ЦНС тварин) ще можна було спостерігати, то з плином часу як рівні тривожності та рухової активності, так і пам'ять і здатність до навчання дослідних тварин поступово прийшла до норми.

Можна було б стверджувати, що організм щурів успішно справився з наслідками отруєння субтоксичними дозами ХПФ та нормалізував діяльність органів та систем, яка була дещо порушена при введенні ХПФ. Однак, результати другого етапу дослідження, в якому інтоксиковані на першому етапі самиці були запліднені і народили потомство, а згодом це потомство

досліджували за допомогою поведінкових методик, не дозволяють зробити таких обнадійливих висновків. Після досягнення статевозрілого віку потомство хронічно інтоксикованих ХПФ самиць демонструвало значні відхилення у поведінці при проходженні тестів «Відкрите поле» та «Темно–світла камера». Зокрема, у цих тварин спостерігали значне зростання рухової активності як у «Темно–світлій камері», так і у «Відкритому полі». В останньому тесті показники горизонтальної активності молодих щурів третьої дослідної групи, тобто потомства самиць, інтоксикованих на першому етапі досліджень найбільшою дозою ХПФ (15 мг/кг на добу), перевищували аналогічні показники інтактних тварин контрольної групи у кілька разів. Окрім того, у цих тварин практично не спостерігали завмирання, грумінг та дефекацію, які є нормальними для здорових щурів та спостерігалися у контрольній групі.

У тесті "Темно–світла камера" ці тварини також поводитися аномально, а саме виглядали з отвору набагато частіше, ніж тварини контрольної групи.

У загальному можна говорити про значну подібність симптомів, що виникли у потомства самиць, хронічно інтоксикованих до запліднення, із деякими ознаками синдрому гіперактивності.

Синдром гіперактивності та дефіциту уваги (СДУГ) [131, 137, 113] на сьогодні вважається одним з найпоширеніших поведінкових порушень у дітей; за приблизними оцінками, його можна діагностувати у 3–5% людей [31].

До основних симптомів цього розладу належать:

- дефіцит уваги (труднощі з концентрацією на поставленому завданні, під час навчання чи гри, легке переключення уваги на сторонні стимули, відволікання, нездатність тривалий час фіксувати увагу на деталях, небажання чи нездатність виконувати завдання, що потребують уважності та посидючості);
- імпульсивність (хворі часто можуть реагувати не подумавши, відповідати на питання ще до того, як дослухають його до кінця, починати діяльність до того, як одержать інструкції; діти з СДУГ часто демонструють невідповідну до

ситуації, а часом і небезпечно для них самих чи оточуючих, поведінку, причому без вагомих на то причин);

- гіперактивність (дитина з СДУГ не може всидіти на місці, крутиться на стільці, бігає по класу, намагається кудись залізти, робить безцільні рухи головою та кінцівками, їй важко дочекатися своєї черги) [108].

СДУГ викликає проблеми з навчанням, академічною успішністю, соціальною адаптацією [142]. Хоча даний синдром вважається невиліковним, однак його прояви можуть бути пом'якшені за допомогою медикаментозних засобів (переважно психостимуляторів) та немедикаментозної поведінкової терапії [97], що сприяє кращій адаптації хворих та покращенню результативності їх навчання. Важливо зазначити, що, хоча СДУГ спричиняє проблеми з соціальною адаптацією та погіршення академічної успішності дітей, однак він не пов'язаний зі зниженням рівня інтелекту, затримкою розумового розвитку чи іншими подібними відхиленнями [142]. При адекватній корекції медикаментами чи поведінковою терапією, діти зі СДУГ часто здатні виявляти не нижчі і навіть вищі інтелектуальні здібності, ніж більшість їхніх здорових однолітків [35, 72].

Причини виникнення СДУГ на сьогодні залишаються нез'ясованими [137, 69]. Вважається, що значний вклад у розвиток цього синдрому вносить генетична схильність [57]: ведуться активні пошуки гена, зміни в якому спричиняють СДУГ. Виявлено, що у дітей, в яких було діагностовано СДУГ, переважно хоча б один з близьких родичів також страждає на це захворювання [67]. Окрім того, якщо СДУГ діагностують в одного з близнюків, то переважно його виявляють і в другого [97]. Однак, до факторів ризику також відносять і несприятливі чинники середовища: жорстоке поводження чи недостатній догляд немовлят [135], ранні (пренатальні, пологові, ранні постнатальні) травми головного мозку, інфекційні захворювання з високою температурою, перенесені у період новонародженості, вживання деяких медикаментів (як вагітними жінками, так і немовлятами), інтоксикація вагітних алкоголем,

нікотинном, наркотиками [94], а також (що особливо важливо у контексті даного дослідження) вплив пестицидів та інших токсичних речовин [69, 55, 99].

У тесті «Відкрите поле» найяскравіше виражені відмінності від контролю спостерігали у руховій активності потомства самиць третьої дослідної групи, інтоксикованих до запліднення найбільшою з хронічних доз пестицида (15 мг/кг на добу щоденно протягом 30 діб). У потомства цієї групи показники горизонтальної рухової активності в середньому становили 40–50, у той час як контрольні щурі (а також інтактні щурі у досліді з порівняння круглої та квадратної арен) перетинали за час тестування лише 10–15 квадратів. Також у потомства третьої дослідної групи була зафіксована практично повна відсутність завмирань, дефекації та грумінгу, тоді як у контрольній групі ці показники залишалися в межах норми. Аналогічні тенденції (щоправда, менш виражені) спостерігалися і в потомства решти самиць, яким вводили токсикант хронічно до запліднення (дослідні групи 1 та 2). У щурів, одноразово інтоксикованих 30 мг/кг ХПФ на 6 добу внутріутробного розвитку (дослідна група 4), таких відхилень у тесті «Відкрите поле» не спостерігалось; отже, пренатальна інтоксикація дорослих щурів не спричинила до появи у них симптомів гіперактивності, у той час як хронічне отруєння самиць пестицидом, введення якого було завершено за 4 місяці до запліднення, спричинило у потомства цих самиць помітні поведінкові порушення. Механізм такої дії потребує подальшого дослідження, адже на сьогодні вважається, що ХПФ не здатен затримуватися та накопичуватися у тваринному організмі, тож яким чином інтоксикація самиць вплинула на майбутнє потомство, не спричинивши помітних відхилень у самих отруєних тварин, наразі сказати важко.

Дані щодо появи рухової гіперактивності під впливом субтоксичних доз ХПФ можна виявити у літературі. Так, у роботі Icenogle зі співробітниками [89] вагітним самицям щурів вводили ХПФ у дозах 1 чи 5 мг/кг на добу на 9–12 добу вагітності, а після досягнення потомством цих самиць підліткового віку та згодом статевої зрілості, досліджували його поведінкові відхилення від контрольної інтактною групи. У цьому дослідженні також було виявлене



зростання рухової активності дослідних тварин: у тесті «Г-подібний лабіринт» щурі-підлітки, пренатально інтоксиковані пестицидом, виявляли ознаки моторної гіперактивності. Також у цих тварин спостерігалось погіршення пам'яті та когнітивних здібностей у тесті «16-рукавний лабіринт».

Водночас, є дослідження, в яких вплив ХПФ призводив, навпаки, до зниження рухової активності. У роботі R.L. Carr зі співробітниками [43] щурів піддавали впливу пестициду на ранньому етапі постнатального розвитку, а згодом досліджували їхню поведінку у тесті «Відкрите поле», а також вимірювали масу їхнього тіла. У цьому дослідженні новонароджені щурі були поділені на 3 групи за дозами ХПФ, які їм вводили. Група найнижчої дози одержувала 3 мг/кг ХПФ щоденно з 1 до 21 добу життя; середня доза становила 3 мг/кг з 1 по 5 добу, а згодом 6 мг/кг з 7 по 21 добу; найвищу дозу токсиканта одержували щурята, яким вводили 3 мг/кг у перші 5 діб життя, 6 мг/кг на 7–13 добу та 12 мг/кг на 15–21 доби. Поведінку тварин досліджували у «Відкритому полі» на 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25 та 30 добу життя. У перші 20 діб відмінностей від контролю за руховою активністю в жодній з дослідних груп виявлено не було. На 25 та 30 доби життя у групах, які одержували середню та найвищу дози токсиканта, спостерігали статистично вірогідне зниження рухової активності. Варто зазначити, що при дослідженні активності ацетилхолінестерази мозку цих груп було виявлено її інгібування. Таким чином, даний ефект можна пояснити прямою дією ХПФ на нервову систему щурів, чого не спостерігалось в інших роботах, де низькі дози ХПФ не спричиняли помітних змін в активності ензимів, однак призводили до поведінкових аномалій.

Варто нагадати, що у нашому дослідженні ознаки гіперактивності були виявлені у щурів, які не піддавалися прямому пренатальному впливові ХПФ: інтоксикація їхніх матерів була завершена ще за 4 місяці до запліднення. Водночас, у тварин, що могли зазнати впливу токсиканту у період внутріутробного розвитку (потомство дослідної групи 4, яким одноразово вводили 30 мг/кг ХПФ на 6–7 добу вагітності), ознак гіперактивності виявлено

не було. Однак, ці тварини демонстрували деяке погіршення когнітивних здібностей у тесті «Екстраполяційне позбавлення», що перегукується з даними роботи [89]. У тварин, чії матері були інтоксиковані до запліднення, значимого погіршення пам'яті та здатності до навчання ми не виявили.

Окрім поведінкових відхилень, у потомства самиць щурів, підданих впливові ХПФ до та під час вагітності, було виявлено істотні відхилення у морфометричних параметрах раннього постнатального розвитку.

Якщо зважати лише на масу тварин, не враховуючи їхніх лінійних розмірів, то щурята дослідних груп набирали масу значно швидше, ніж контрольні інтактні тварини. При цьому, найбільш активне зростання маси тіла спостерігалось у щурят третьої дослідної групи – потомства самиць, які хронічно одержували 15 мг/кг ХПФ за місяць до запліднення. На 21 добу життя (час закінчення вигодовування материнським молоком) темп набору маси у щурят цієї групи статистично вірогідно (з  $P < 0,001$ ) перевищував аналогічні показники контрольних тварин у більш ніж два рази. В інших дослідних групах спостерігалася аналогічна тенденція – однак, вона була менш вираженою та у більшості вимірювань не досягала рівня статистичної вірогідності.

З цих даних можна було б зробити парадоксальний висновок, що дія низьких доз ХПФ, подібно до радіоактивного випромінювання, здатна спричиняти активізуючий вплив на ріст організмів. Однак, обрахування індексу Кетле привело до інших висновків. Цей індекс використовується для виявлення надлишку чи дефіциту маси у людини і тварин; для його обрахунку використовують не лише показник маси тіла та його зміну з часом, але й лінійні розміри тіла (для щурів – назоанальну довжину). За індексом Кетле не було виявлено істотних відмінностей між групами до 21 доби включно; однак, на 30 добу за цим показником було виявлено статистично вірогідні відмінності між контрольними та дослідними щурятами. У той час як в інтактних тварин контрольної групи індекс маси тіла продовжував поступово зростати, засвідчуючи нормальний набір маси ростучими організмами, у дослідних групах він різко знизився.

Тут варто згадати, що саме на 21–23 добу життя у щурів відбувається завершення грудного вигодовування малят та перехід їх на самостійне харчування твердою їжею. Таке різке зниження індексу маси тіла може свідчити про те, що у дослідних тварин виникли труднощі з перебудовою на дорослий режим харчування. Лінійний ріст скелета цих щурят залишався на високому рівні (що й відобразилося на зростанні маси тіла), однак набір жирової та м'язової маси, необхідний для нормального розвитку організму, що активно росте, у дослідних щурят виявився ускладненим.

Якщо для дорослого організму, зокрема людини, збільшення індексу Кетле переважно є негативним явищем, що свідчить про набір надлишкової маси тіла та можливий розвиток ожиріння (очевидно, крім випадків дефіциту маси, який також є шкідливим та потребує корекції), то у дитячому віці ситуація значно відрізняється. Зниження індексу Кетле у дослідних щурят свідчить про виснаження запасів поживних речовин у їхньому організмі, яке може в подальшому призводити до проблем у розвитку та функціонуванні. Для нормального росту та розвитку всіх тканин, органів та систем організму надзвичайно важливе значення має адекватний набір маси тіла, відповідний розвиток м'язової та сполучної тканин, накопичення поживних речовин. Таким чином, незважаючи на активний ріст потомства інтоксикованих ХПФ самиць, його розвиток важко назвати цілком нормальним; перехід на самостійне харчування викликав у цих тварин значне зниження темпів накопичення поживних речовин та виснаження їхніх запасів, якого не спостерігалось у контрольній групі.

На третьому етапі досліджень метою було виявити, чи залежить інтенсивність впливу ХПФ на друге покоління від режиму введення його самицям (гостре чи хронічне). Для цього самицям щурів вводили ХПФ одноразово в дозах 15, 30 та 60 мг/кг за 10 діб до запліднення. За поведінковими тестовими методиками, як і на попередніх етапах роботи, тестували і самих інтоксикованих тварин, і їхнє потомство. Окрім того, досліджували ряд їхніх біохімічних та гематологічних параметрів.

Як і у попередньому досліді, поведінка самих інтоксикованих самиць змінювалася незначно (і навіть менш істотно, ніж на першому етапі). Однак, у потомства цих щурів також виявили ряд нейроповедінкових аномалій, хоч і менш виражених, ніж на попередньому етапі. Зокрема, у потомства інтоксикованих самиць у тесті "Темно–світла камера" спостерігали аномальну реакцію на помірний стрес: тварини дослідної групи проводили значно більше часу в яскраво освітленій частині камери, що статистично вірогідно відрізнялося від поведінки контрольних тварин, а також суперечило вродженим інстинктам, притаманним цим гризунам (страх перед яскраво освітленими відкритими просторами і прагнення заховатися у темне закрите місце). Однак, у тесті "Екстраполяційне позбавлення", в якому тварин поміщали в умови сильного гострого стресу, пов'язаного з прямою загрозою для життя (замкнене середовище, заповнене водою, перед якою у щурів також є вроджений страх), статистично вірогідних відмінностей між контрольною та дослідною групами виявлено не було. Не надто вираженими, порівняно з ефектом хронічного введення на другому етапі, були і відмінності в тесті "Відкрите поле". Зокрема, зовнішня горизонтальна активність у дослідній групі була нижчою, а кількість актів довгого та короткого грумінгу - у 2-3 рази вищою, ніж у контрольній групі тварин. Ці дані свідчать про деяке зростання тривожності потомства одноразово інтоксикованих самиць. Можливо, інтенсивність впливу токсиканта, введеного одноразово, була меншою і недостатньою для формування симптомокомплексу СДУГ; однак, сама наявність статистично вірогідних відмінностей між контрольною та дослідною групами тварин не дозволяє говорити про безпечність таких доз ХПФ.

Щодо біохімічних та гематологічних показників, які ми дослідили на третьому етапі роботи з метою більш глибокого пізнання механізмів виявлених фізіологічних аномалій, то грубих відхилень за ними у потомства інтоксикованих самиць ми не спостерігали. Знижена активність лужної фосфатази, зростання часу максимального кислотного гемолізу еритроцитів та зміни деяких гематологічних показників свідчать про певні порушення

фізіологічного стану організму цих тварин, однак не можуть прямо пояснити нейроповедінкові аномалії. Що ж до показників крові самих інтоксикованих самиць, то у ній були виявлені класичні відмінності, характерні для помірної інтоксикації ФОС. Зокрема, інгібування активності АХЕ свідчило про те, що інтоксикація ХПФ відбулася.

У літературі є чимало даних, які свідчать про шкідливий вплив інтоксикації ХПФ на ранній постнатальний розвиток. Так, введення ХПФ на 1–4 доби після народження у дозах, що не викликали помітного інгібування ацетилхолінестерази, призводило до ознак системної токсичності. У півкулях та стовбурі головного мозку інтоксикованих щурят 5–денного віку спостерігали порушення експресії генів, аномалії росту нервових клітин та міжклітинної сигналізації [133].

Варто відзначити, що хронічне введення низьких доз ХПФ дорослим щурам призводило до зростання їхнього індексу маси тіла [2, 101]. У дослідженні Meggs та Brewer щурам підшкірно вводили 5 мг/кг ХПФ на добу щоденно протягом 4 місяців. Їхню масу тіла замірювали кожного місяця та порівнювали з масою контрольних тварин, які одержували аналогічні дози розчину без ХПФ (таким чином, було виключено можливий вплив стресогенності самої процедури введення на зміни маси тіла тварин). За тваринами, яким вводився токсикант, спостерігали на предмет виявлення видимих ознак гострої токсичності: таких ознак виявлено не було. Було виявлено, що щурі, інтоксиковані ХПФ, набрали значно більше маси та важили статистично вірогідно більше, ніж контрольні тварини; при цьому, величина цієї різниці зростала з часом. Окрім того, у отруєних пестицидом тварин було виявлене посилене накопичення жиру навколо нирок; а як відомо, накопичення жиру на внутрішніх органах є значно більш небезпечною та злякисною формою ожиріння, ніж надлишкове відкладення його у підшкірній клітковині. Таким чином, у цьому дослідженні хронічне введення низьких доз ХПФ, які не викликали ознак гострої токсичності, дорослим щурам спричиняло у них до зростання маси тіла та посиленого накопичення жиру біля нирок. Проводячи

паралелі з нашою роботою, можна стверджувати, що одержані результати не несуть у собі суперечності: як низька швидкість набору маси у період активного росту, так і її активне збільшення у дорослому віці є ознаками порушеного обміну речовин та несуть у собі небезпеку для здоров'я організму.

Водночас, варто зазначити, що у роботі Blakley з співробітниками [ 36] у щурів, хронічно інтоксикованих низькими дозами ХПФ, не було виявлено вірогідних відхилень як у масі тіла, так і у відносній масі окремих органів. У цьому дослідженні щурам вводили ХПФ перорально у дозі 5 мг/кг двічі на тиждень протягом 28 діб. Однак, незважаючи на відсутність впливу токсиканта на масу тіла піддослідних тварин, при дослідженні роботи їхньої імунної системи було виявлено ряд відхилень: порушення утворення Т-лімфоцитів, послаблення вироблення антитіл. Це також свідчить про системну токсичність навіть низьких доз ХПФ.

На рис. 4.1 подано узагальнену схему дослідженого у даній роботі впливу інтоксикації ХПФ на перше та друге покоління тварин.



Рис. 4.1. Узагальнена схема впливу ХПФ на тварин інтоксикованих тварин (перше покоління) та їхнє потомство (друге покоління).

Згідно з одержаними даними, інтоксикація відносно низькими дозами ХПФ статевозрілих тварин здатна викликати у них ознаки отруєння, зокрема інгібування холінергичної активності, зростання активності лужної фосфатази, а також деякі поведінкові аномалії (підвищена тривожність у тестах «Відкрите поле» та «Темно-світла камера», погіршення просторового запам'ятовування у тестах «Водний лабіринт Морріса» та «Екстраполяційне позбавлення»). При цьому ці порушення з часом переставали бути помітними. Однак значно істотніший вплив на поведінку спостерігався у потомства інтоксикованих самиць: у цих тварин спостерігалися ознаки гіперактивності та аномальні реакції на стрес. Окрім того, в ранній постнатальний період тварини виявляли труднощі в адаптації до переходу на самостійне харчування.

Таким чином, одержані у дисертаційному дослідженні дані в цілому збігаються з даними літератури та свідчать про наявність шкідливого впливу навіть низьких доз ХПФ на розвиток молодого організму, причому такий вплив спостерігається незалежно від способу введення токсиканта. Щодо механізмів такого впливу, то це питання потребує подальшого вивчення, адже результати проведених біохімічних та гематологічних досліджень не виявили істотних змін у досліджуваних параметрах, які могли б спричинити вплив на функціонування ЦНС. Можна припустити, що інтоксикація ХПФ спричиняє порушення на генетичному рівні (зокрема, у геномі статевих клітин); однак, це питання також потребує подальших досліджень.

Що можна стверджувати з упевненістю, так це про необхідність перегляду нормативів та положень щодо безпечного застосування фосфорорганічних пестицидів. Адже одержані дані говорять про небезпеку, яку несе наступному поколінню не тільки пренатальна інтоксикація, тобто потрапляння ХПФ в організм вагітної жінки (на сьогодні існує ряд засторог та обмежень щодо роботи з пестицидами вагітних жінок), але й можливі віддалені наслідки отруєння ФОС жінок дітородного віку, які на момент інтоксикації вагітними ще не були. Таким чином, варто як мінімум обмежити можливість

інтоксикації ХПФ молодих жінок, незалежно від того, перебувають вони в стані вагітності чи ні.



## ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі представлено дані щодо впливу інтоксикації фосфорорганічним пестицидом хлорпірифосом самиць щурів на нейповедінкові параметри їхнього потомства. Показано, що хронічне введення субтоксичних доз ХПФ самицям до настання вагітності спричиняло у їхнього майбутнього 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 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, 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.

## ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Балан Г.М., Проданчук Н.Г., Бубало Н.Н. Стан і перспективи антидотної терапії гострих отруєнь пестицидами. Сучасні проблеми токсикології, харчової та хімічної безпеки. 2015. № 1-2. С. 67–76.
2. Бубало Н.М., Балан Г.М. Метаболічні порушення, обезогенні ефекти і дисбаланс гормонів жирової тканини у хворих, які перенесли гострі та хронічні інтоксикації пестицидами. Сучасні проблеми токсикології, харчової та хімічної безпеки. 2018. № 2–3. С. 51–70.
3. Буреш Я., Бурешова О., Хьюстон Д. П. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения. 1991. Москва. Высшая школа. С. 119–122.
4. Грабовська С, Салига Ю. Вплив хронічної інтоксикації низькими дозами хлорпірифосу на поведінку самиць щурів. Фізіологічний журнал. 2015. № 61 (2). С. 94–101.
5. 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.
6. Грабовська С. Вплив тривалого введення низьких доз хлорпірифосу на поведінкові параметри самок щурів. Молодь і поступ біології: збірник тез X Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів [Текст]. Львів : СПОЛОМ. 2014. С. 239.
7. Грабовська С. Нейрофізіологічні порушення у самиць щурів та їх потомства за інтоксикації хлорпірифосом до запліднення. Віол. Tvarin. 2017. №19 (3). С. 25–35.

8. Грабовська С. Поведінкові параметри потомства самиць щурів, хронічно інтоксикованих низькими дозами хлорпірифосу. Молодь і поступ біології: збірник тез XI Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів [Текст]. Львів : СПОЛОМ. 2015. С. 448–449.
9. Державний реєстр пестицидів і агрохімікатів, дозволених до використання в Україні (доповнення з 01.01.2015 згідно вимог постанови Кабінету Міністрів України від 21.11.2007 № 1328)
10. Зинченко В.А. Химическая защита растений: средства, технология и экологическая безопасность. М.: Колос С, 2005. 232 с.
11. Карпищенко А. И. Медицинские лабораторные технологии. С.–П.: Интермедика. 2002. № 1. С. 45–46.
12. Касимова С.К. Тревожное поведение крыс и его зависимость от режима освещенности. Современные проблемы науки и образования. 2006. № 2. С. 45–47
13. Кожем'якін, Ю. М., [et al.] Науково–практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними. К.: Авіцена. 2002. С. 156.
14. Корнута Н.О., Жмін'ю П.Г. Вплив пестицидів на організм вагітних і розвиток плода. Взаємозв'язок між токсичністю організму вагітної та ембріо/фетотоксичністю. Сучасні проблеми токсикології, харчової та хімічної безпеки. 2014. № 5. С. 24–28.
15. Корнута Н.О., Перехрестенко В.А., Жмін'ю П.Г. Стан нервової системи щурят у постнатальному періоді за впливу альфа-циперметрину на вагітних самиць. Сучасні проблеми токсикології, харчової та хімічної безпеки. 2015. № 1–2. С. 25–28.
16. Корнута Н.О., Решавська О.В. Роль гістопатологічної оцінки плаценти в системі мати-плацента-плід в результаті впливу пестицидів на вагітних самиць

щурів. Сучасні проблеми токсикології, харчової та хімічної безпеки. Сучасні проблеми токсикології. 2011. № 5. С. 95.

17. Проданчук М.Г., Балан Г.М., Кривенчук В.Є. та ін. Про необхідність створення виробництва реактиваторів холінестерази в Україні для лікування гострих отруєнь фосфорорганічними сполуками. Сучасні проблеми токсикології, харчової та хімічної безпеки. 2014. № 3–4. С.14–22.

18. Росаловський В.П., Грабовська С.В., Федяков Р.О., Салига Ю.Т. Механізми нейротоксичності фосфорорганічних сполук: роль оксидативного стресу. Біорізноманіття. Екологія. Адаптація. Еволюція. Одеса. 2013. С. 189.

19. Салига Ю.Т. Федяков Р.О. Росаловський В. П., Грабовська С. В. Біологічна безпека застосування фосфорорганічних пестицидів в Україні: чи всі ризики враховані? Матеріали міжнародної науково–практичної конференції «Стратегія збалансованого розвитку агроєкосистем України». К.: ДІА. 2013. С. 140–141.

20. Салига Ю.Т., Росаловський В.П., Грабовська С.В. Багатовекторність нейротоксичної дії хлорпірифосу. Фізіол. журнал. 2014. № 60 (3) (Додаток). С. 49–50.

21. Салига Ю.Т., Росаловський В.П., Грабовська С.В. Механізми токсичного впливу хлорпірифосу на центральну нервову систему щурів. VI Конгрес Українського товариства нейронаук. 2014. С. 106.

22. Салига Ю.Т., Росаловський В.П., Грабовська С.В. Нейротоксичність фосфорорганічних пестицидів: екологічні і медико–біологічні аспекти. Всеукраїнський з'їзд екологів з міжнародною участю. Вінниця 2013. С. 413–415

23. Секун М. П., Жеребко В. М. та ін. Довідник із пестицидів. К.: Колоб'іг, 2007. 360 с.

24. Устінова Л. А., Серединська Н. М., Курділь Н. В., [та ін.] Токсиканти антихолінестеразної дії: механізм дії, клінічні ознаки та актуальні питання

забезпечення засобами антидотної терапії. Сучасні проблеми токсикології, харчової та хімічної безпеки. 2017. № 3. С. 73–82.

25. Харченко О.А., Балан Г.М., Бубало Н.М. Гострі отруєння фосфорорганічними сполуками: основні клінічні синдроми та механізми їх формування (огляд літератури та дані власних досліджень). Сучасні проблеми токсикології, харчової та хімічної безпеки. 2014. № 5. С. 14–28.

26. Шуляк В.Г., Жмінько П.Г. Гематотоксичність як проблема токсикології хімічних речовин та деякі підходи до її вирішення. Сучасні проблеми токсикології, харчової та хімічної безпеки. 2017. № 1–2. С.80– 85.

27. Янович Д.О., Янович Н.С. Біотрансформація ксенобіотиків і механізми її регуляції. біотрансформація ксенобіотиків і механізми її регуляції. Науковий вісник львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького 2011. Т. 13, № 2(2). С. 305–311.

28. Abdel Rasoul G.M., Abou Salem M.E., Mechael A.A., [et al.] Effects of occupational pesticide exposure on children applying pesticides. *Neurotoxicology*. 2008. Vol. 29. P. 833–838.

29. Accili D., Fishburn C. S., Drago J., [et al.] A targeted mutation of the D3 dopamine receptor gene is associated with hyperactivity in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1996. Vol. 93(5). P. 1945-1949.

30. Acharjee S., Nayani N., Tsutsui M., Hill M.N., Ousman S.S., Pittman Q.J. Altered cognitive–emotional behavior in early experimental autoimmune encephalitis – Cytokine and hormonal correlates. *Brain Behav Immun*. 2013. Vol. 33. P. 164–172.

31. ADD/ADHD Health Center. (англ.) Інформація с сайта WebMD.com. Данные собраны 11 декабря 2006 года.

32. Aldridge J.E., Levin E.D., Seidler F.J., Slotkin T.A. Developmental exposure of rats to chlorpyrifos leads to behavioral alterations in adulthood, involving

serotonergic mechanisms and resembling animal models of depression. *Environ Health Perspect.* 2005. Vol. 113 (5). P. 527–531.

33. Bari A. The application of the 5-choice serial reaction time task for the assessment of visual attentional processes and impulse control in rats. *Nature Protocols.* 2008. Vol. 3. P. 759–767.

34. Bari A., Dalley J.W., Robbins T.W. The application of the 5-choice serial reaction time task for the assessment of visual attentional processes and impulse control in rats. *Nat Protoc.* 2008. Vol. 3 (5). P. 759–67.

35. Barnard–Brak L., Stevens T., Albright E. Academic red–shirting and academic achievement among students with ADHD. *Contemporary Educational Psychology.* 2017. Vol. 50. P. 4–12.

36. Blakley B.R., Yole M.J., Brousseau P., Boermans H., Fournier M. Effect of chlorpyrifos on immune function in rats. *Veterinary and Human Toxicology.* 1999. Vol. 41 (3). P. 140–144.

37. Block, J.B., Essman, W.B. Growth hormone administration during pregnancy: A behavioral difference in offspring rats. *Nature.* 1965. Vol. 205. P. 1136–1137.

38. Bouchard M.F., Bellinger D.C., Wright R.O., Weisskopf M.G. Attention deficit/hyperactivity disorder and urinary metabolites of organophosphate pesticides in U.S. children 8–15 years. *Pediatrics.* 2010. Vol. 125 (6). P. 1270–1277.

39. Bourin M., Hascoe M. The mouse light/dark box test. *European Journal of Pharmacology.* 2003. Vol. 463. P. 55–65

40. Braquenier J.B., Quertemont E., Tirelli E., Plumier J.C. Anxiety in adult female mice following perinatal exposure to chlorpyrifos. *Neurotoxicol Teratol.* 2010 Vol. 32 (2). P. 234–239.

41. Brown T.P., Rumsby P.C., Capleton A.C., Rushton L., and Levy L.S. Pesticides and Parkinson's Disease—Is There a Link? *Environ Health Perspect.* 2006. Vol. 114 (2). P. 156–164.
42. Burns C.J., McIntosh L.J., Mink P.J., [et al.] Pesticide exposure and neurodevelopmental outcomes: review of the epidemiologic and animal studies. *J. Toxicol. Environ. Health Part B.* 2013. Vol. 16. P. 127–283.
43. Carr R.L., Chambers H.W., Guarisco J.A., Richardson J.R., [et al.] Effects of Repeated Oral Postnatal Exposure to Chlorpyrifos on Open-Field Behavior in Juvenile Rats. *Toxicological Sciences* . 2001. Vol. 59 (2). P. 260–267.
44. Carr R.L., Graves C.A., Mangum L.C., [et al.] Low level chlorpyrifos exposure increases anandamide accumulation in juvenile rat brain in the absence of brain cholinesterase inhibition. *Neurotoxicology.* 2013. Vol. 43. P. 82–89.
45. Castagné V., Moser P., Roux S., Porsolt R. D. Rodent models of depression: forced swim and tail suspension behavioral despair tests in rats and mice. *Current Protocols in Pharmacology.* 2010. Vol. 49(1). P. 5-8.
46. Centers for Disease Control and Prevention Prevalence of autism spectrum disorders—autism and developmental disabilities monitoring network, 14 sites, United States, 2008. *MMWR Surveill Summ.* 2012. Vol. 61. P. 1–19.
47. Chaouloff F., Durand M., Mormède P. Anxiety- and activity-related effects of diazepam and chlordiazepoxide in the rat light/dark and dark/light tests. *Behav Brain Res.* 1997 Vol. 85 (1). P. 27–35.
48. Chen W.Q., Ma H., Bian J.M., Zhang Y.Z., Li J. Hyper-phosphorylation of GSK-3 $\beta$ : possible roles in chlorpyrifos-induced behavioral alterations in animal model of depression. *Neurosci Lett.* 2012. Vol. 528 (2). P. 148–52.
49. Chen W.Q., Yuan L., Xue R., [et al.] Repeated exposure to chlorpyrifos alters the performance of adolescent male rats in animal models of depression and anxiety. *Neurotoxicology.* 2011. Vol. 32 (4). P. 355–361. doi: 10.1016/j.neuro.2011.03.008.



50. Chlorpyrifos. Pmep.cce.cornell.edu. Retrieved November 20, 2011.
51. Christensen K., Harper B., Luukinen B., Buhl K., Stone D. Chlorpyrifos Technical Fact Sheet. National Pesticide Information Center. 2009.
52. Cole T.B., Fisher J.C., Burbacher T.M. et al. Neurobehavioral assessment of mice following repeated postnatal exposure to chlorpyrifos–oxon. *Neurotoxicol Teratol.* 2012. Vol. 34 (3). P. 311–322.
53. Crawley, J.N. What’s Wrong with My Mouse? Behavioral Phenotyping of Transgenic and Knockout Mice. Wiley–Interscience. 2000. 329 p.
54. Cryan J. F., Valentino R. J., Lucki I. Assessing substrates underlying the behavioral effects of antidepressants using the modified rat forced swimming test. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews.* 2005. Vol. 29(4-5). P. 547-569.
55. Curtis L. T., Patel K. Nutritional and environmental approaches to preventing and treating autism and attention deficit hyperactivity disorder (ADHD): a review. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine.* 2008. Vol. 14 (1). P. 79-85.
56. Dai D [et al.] Identification of variants of CYP3A4 and characterization of their abilities to metabolize testosterone and chlorpyrifos. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 2001. Vol. 299 (3). P. 825-831.
57. Dark C., Jihane Homman–Ludiye J., Robert J. Bryson–Richardson R.J. The role of ADHD associated genes in neurodevelopment. *Developmental Biology.* 2018. Vol. 438 (2). P. 69–83
58. Davis S., Butcher S.P., Morris R.G. The NMDA receptor antagonist D–2–amino–5–phosphonopentanoate (D–AP5) impairs spatial learning and LTP in vivo at intracerebral concentrations comparable to those that block LTP in vitro. *J. Neurosci.* 1992. Vol. 12 (1). P. 21–34.
59. Derkach M. P., Gumenizkiy R. Ya., Chaban M. E. Course of variational statistics. Kyiv: High School, 1977. 210 p. (In Ukrainian)

60. Deveci H. A., Karapehlivan M. Chlorpyrifos–induced parkinsonian model in mice: Behavior, histopathology and biochemistry. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 2018. Vol. 144. P. 36–41.
61. Eaton D.L., Daroff R.B., Autrup H.. Review of the Toxicology of Chlorpyrifos With an Emphasis on Human Exposure and Neurodevelopment. *Critical Reviews in Toxicology*. 2008. Vol. 2. P. 1–125.
62. Eilam D. Open–field behavior withstands drastic changes in arena size. / *Behav Brain Res.*, 2003, 142:53–62
63. European convention for the protection of vertebrate animals use for experimental and other scientific purposes. Council of Europe. Strasbourg. 1986 P. 56.
64. Extrapolation Escape Test. OpenScience, Moscow, Russia. [displayed 13 February 2015]. Available at <http://www.openscience.ru/index.php?page=ts&item=004>
65. Flaskos J. The developmental neurotoxicity of organophosphorus insecticides: A direct role for the oxon metabolites. *Toxicology Letters*. 2012. Vol. 209 (1). P. 86–93.
66. Floyd R. A., Carney J.M. Free radical damage to protein and DNA: mechanisms involved and relevant observations on brain undergoing oxidative stress. *Ann. Neurol*. 1992. Vol. 32. P. 22–27.
67. Forehand R., Parent J., Peisch V. D., [et al.] Do parental ADHD symptoms reduce the efficacy of parent training for preschool ADHD? A secondary analysis of a randomized controlled trial. *Behaviour Research and Therapy*. 2017. Vol. 97. P. 163–169.
68. Fox M.W., Spencer J.W. Exploratory behavior in the dog: Experimental or age dependent? *Developmental Psychobiology*. 1969. Vol. 2. P. 68–74.

69. Froehlich T. E. [et al.] Update on environmental risk factors for attention-deficit/hyperactivity disorder. *Current psychiatry reports*. 2011. Vol. 13 (5). P. 333.
70. Furlong C. E., [et al.] Spectrophotometric assays for the enzymatic hydrolysis of the active metabolites of chlorpyrifos and parathion by plasma paraoxonase/arylesterase. *Analytical biochemistry*. 1989. Vol. 180 (2). P. 242-247.
71. Furlong M.A., Engela S.M., Boyd Barr D., Wolff M.S. Prenatal exposure to organophosphate pesticides and reciprocal social behavior in childhood. *Environment International*. 2014. Vol. 70. P. 125–131
72. Ganor–Stern D., Steinhorn O. ADHD and math – The differential effect on calculation and estimation. *Acta Psychologica*. 2018. Vol. 188. P.55–64.
73. Garthe A., Kempermann G. An old test for new neurons: refining the Morris water maze to study the functional relevance of adult hippocampal neurogenesis. *Front Neurosci*. 2013. Vol. 7. P. 63.
74. Gauthier E., Fortier I., Courchesne F., Pepin P., Mortimer J., Gauvreau D. Environmental Pesticide Exposure as a Risk Factor for Alzheimer's Disease: A Case–Control Study. *Environmental Research*. 2001. Vol. 86 (1). P. 37–45.
75. Gavelle E., Lauzon–Guillain B., Charles M.–A., [et al.] Chronic dietary exposure to pesticide residues and associated risk in the French ELFE cohort of pregnant women. *Environ. Int*. 2016. Vol. 92–93. P. 533–542.
76. Grabovska S, Rosalovsky V, Salyha Yu. Neurotoxic effects and other actual risks of chlorpyrifos. *Living organisms and bioanalytical approaches for detoxification and monitoring of toxic compounds*, 2015. P. 195–204.
77. Grabovska S, Rosalovskyi V, Salyha Y. Comparing round and square open field test arenas. *Біологія тварин*. 2014. Vol. 16 (3). P. 168.

78. Grabovska S, Salyha Y. ADHD-like behaviour in the offspring of female rats exposed to low chlorpyrifos doses before pregnancy. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*. 2015. Vol. 66 (2). P. 121–127.
79. 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.
80. Grabovska S., Salyha Y. Open Field Test: comparing square and round arenas. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*. 2014. Vol. 3 (74). P. 363–364.
81. Grabovskaya S V, Salyha Yu T. Do Results of the Open Field Test Depend on the Arena Shape? *Neurophysiology*. 2014. Vol. 46 (4). P. 376–380.
82. Griffin P., Mason H., Heywood K., Cocker J. Oral and dermal absorption of chlorpyrifos: a human volunteer study. *Occup Environ Med*. 1999 Vol. 56 (1). P. 10–13.
83. Grube A., Donaldson D., Kiely T., Wu L. Pesticide Industry Sales and Usage Report: 2006 and 2007 Market Estimates. U.S. EPA. 2011.
84. Hall, C.S., Ballachey E.L. A study of the rat's behavior in a field: a contribution to method in comparative psychology. *University of California Publications in Psychology*. 1932. Vol. 6. P. 1–12.
85. Hånell A., Marklund N. Structured evaluation of rodent behavioral tests used in drug discovery research. *Frontiers in behavioral neuroscience*. 2014. Vol. 8. P. 252.
86. Heijtza R.D., Wangc Sh., Anuard F., Qiana Y., [et al.] Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. *PNAS*. 2011. Vol. 108 (7). P. 3047–3052.
87. Hertz–Picciotto I., Delwiche L. The rise in autism and the role of age at diagnosis. *Epidemiology*. 2009. Vol. 20 (1). P. 84–90.

88. Horton M.K., Kahn L.G. F., Boyd Barr D., Rauh V. Does the home environment and the sex of the child modify the adverse effects of prenatal exposure to chlorpyrifos on child working memory? *Neurotoxicol Teratol.* 2012 Vol. 34 (5). P. 534–541.
89. Icenogle L.M., Christopher N.C., Blackwelder W.P., Caldwell D.P., [et al.] Behavioral alterations in adolescent and adult rats caused by a brief subtoxic exposure to chlorpyrifos during neurulation. *Neurotoxicology and Teratology.* Vol. 26 (1). P. 95–101
90. Jerrard L.E., Brunnel B. X. Open–field behavior of hippocampal lesioned rats and hamsters. *Journal of Comparative and Physiological Psychology.* 1965. Vol. 66. P. 500–502.
91. Jiang W., Duysen E. G., Hansen H., [et al.] Mice Treated with Chlorpyrifos or Chlorpyrifos Oxon Have Organophosphorylated Tubulin in the Brain and Disrupted Microtubule Structures, Suggesting a Role for Tubulin in Neurotoxicity Associated with Exposure to Organophosphorus Agents. *Toxicol Sci.* 2010. Vol. 115(1). P. 183–193.
92. Kamrin M.A. *Pesticide Profiles: Toxicity, Environmental Impact, and Fate.* Lewis. Boca Raton, FL. 1997. P. 147–152.
93. Karen D.J., Li W., Harp P.R., [et al.] Striatal dopaminergic pathways as a target for the insecticides chlorpyrifos and permethrin. *Neurotoxicology*, 2001. Vol. 22. P. 811–817.
94. Leahy L. G. Diagnosis and Treatment of ADHD in Children vs Adults: What Nurses Should Know. *Archives of Psychiatric Nursing.* 2018. In press, corrected proof, Available online 4 June.
95. Lee I., Eriksson P., Fredriksson A., [et al.] Developmental neurotoxic effects of two pesticides: Behavior and biomolecular studies on chlorpyrifos and carbaryl. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 2015. Vol. 288 (3). P. 429–438.

96. Levin E.D., Addy N., Baruah A., [et al.] Prenatal chlorpyrifos exposure in rats causes persistent behavioral alterations. *Neurotoxicol Teratol.* 2002. Vol. 24 (6). P. 733–741.
97. Levin F. R., Choi C. J., Pavlicova M., [et al.] How treatment improvement in ADHD and cocaine dependence are related to one another: A secondary analysis. *Drug and Alcohol Dependence.* 2018. Vol. 188. P. 135–140.
98. Liu C.L., Chen H., Jiang Y., Tu P.F., [et al.] Effects of echinacoside on extracellular acetylcholine and choline levels of hippocampus and striatum of cerebral ischemia rats. *Yao Xue Xue Bao.* 2013. Vol. 48 (5). P. 790–793.
99. Marks A. R., [et al.] Organophosphate pesticide exposure and attention in young Mexican-American children: the CHAMACOS study. *Environmental health perspectives.* 2010. Vol. 118 (12). P. 1768.
100. McCollister S.B., Kociba R.J., Humiston C.G., McCollister D.D. Studies on the acute and long-term oral toxicity fo chlorpyrifos (0,0-diethyl-0(3,5,6-trichloro-2-pyridyl) phosphorothioate). *Food Cosmet Toxicol.* 1974. Vol. 12 (1). P. 45–61.
101. Meggs W.J., Brewer K.L. Weight gain associated with chronic exposure to chlorpyrifos in rats. *J Med Toxicol.* 2007. Vol. 3(3). P. 89–93.
102. Middlemore-Risher M.L., Buccafusco J.J., Terry A.V., Jr. Repeated exposures to low-level chlorpyrifos results in impairments in sustained attention and increased impulsivity in rats. *Neurotoxicol Teratol.* Vol.32 (4). P. 415–424.
103. Morris R.G.M. Spatial localization does not require the presence of local cues. *Learning and Motivation.* 1981. Vol. 2 (2). P. 239–260.
104. Mullen B.R., Khialeeva E., Hoffman D.B., Ghiani C.A., Carpenter E.M. Decreased Reelin Expression and Organophosphate Pesticide Exposure Alters Mouse Behavior and Brain Morphology. *ASN Neuro.* 2013. Vol. 5 (1). P. 27–42.

105. Mullins R. J., Xu S., Pereira E. F. R., [et al.] Delayed Hippocampal Effects From a Single Exposure of Prepubertal Guinea Pigs to sub-lethal dose of Chlorpyrifos: A Magnetic Resonance Imaging and Spectroscopy Study. *Neurotoxicology*. 2013. Vol. 36. P. 42–48.
106. Murata, K., [et al.] Asymptomatic sequelae to acute sarin poisoning in the central and autonomic nervous system 6 months after the Tokyo subway attack. *Journal of neurology*. 1997. Vol. 244 (10). P. 601-606.
107. Nakamura R., Kimura Y., Matsuoka H. et al. Effects of transplacental and trans–breast milk exposure to the organophosphate compound chlorpyrifos on the developing immune system of mice. *Kokuritsu Iyakuhin Shokuhin Eisei Kenkyusho Hokoku*. 2011. Vol. 129. P. 105–110.
108. NINDS Attention Deficit–Hyperactivity Disorder Information Page. National Institute of Neurological Disorders and Stroke (NINDS/NIH). 2007.
109. Nolan R.J., Rick D.L., Freshour N.L., Saunders J.H. Chlorpyrifos: pharmacokinetics in human volunteers. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1984. Vol. 73 (1). P. 8–15.
110. Ogawa Y., Yamamura Y., Ando A. [et al.] An attack with sarin nerve gas on the Tokyo subway system and its effects on victims. *ACS Symposium Series*. 2000. Vol. 745. P. 333–355.
111. Ohishi T., Wang L., Akane H., [et al.] Reversible effect of maternal exposure to chlorpyrifos on the intermediate granule cell progenitors in the hippocampal dentate gyrus of rat offspring. *Reprod Toxicol.*, 2013. Vol. 35. P.125–136.
112. Oldham J., Morlock H. The effects of open–field size on activity in the mongolian gerbil. *Psychonomic Science*. 1970. Vol. 20. P. 290.
113. Polańska K., Jurewicz J., Hanke W. Review of current evidence on the impact of pesticides, polychlorinated biphenyls and selected metals on attention

deficit/hyperactivity disorder in children. *International journal of occupational medicine and environmental health*. 2013. Vol. 26 (1). P. 16-38.

114. Racke K. D. Environmental fate of chlorpyrifos. *Reviews of environmental contamination and toxicology*. Springer, New York, NY, 1993. P. 1-150.

115. Rauh V. A., Garcia W. A., Whyatt R. M., [et al.] Prenatal exposure to the organophosphate pesticide chlorpyrifos and childhood tremor. *NeuroToxicology*. 2015. Vol. 51. P. 80–86.

116. Rauh V., Arunajadai S., Horton M., [et al.] Seven–year neurodevelopmental scores and prenatal exposure to chlorpyrifos, a common agricultural pesticide. *Environ Health Perspect*. 2011. Vol. 119 (8). P. 1196–1201.

117. Rauh V.A., Perera F.P., Horton M.K., Whyatt R.M., [et al.] Brain anomalies in children exposed prenatally to a common organophosphate pesticide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012. Vol. 109 (20). P. 7871–7876.

118. Reregistration Eligibility Decision (RED) for Chlorpyrifos. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances, Office of Pesticide Programs, U.S. Government Printing Office, Washington, DC. 2006. 260 p.

119. Rheingold, H. L. The effect of a strange environment on the behavior of infants. *Determinants of infant behavior*. 1969. Vol. 4. P. 137–166.

120. Ricceri L., Venerosi A., Capone F., Cometa M.F, [et al.] Developmental neurotoxicity of organophosphorous pesticides: fetal and neonatal exposure to chlorpyrifos alters sex–specific behaviors at adulthood in mice. *Toxicol Sci*. 2006. Vol. 93 (1). P. 105–113.

121. Richendrfer H., Pelkowski S.D., Colwill R.M., Créton R. Developmental sub–chronic exposure to chlorpyrifos reduces anxiety–related behavior in zebrafish larvae. *Neurotoxicol Teratol*. Vol. 34 (4). P. 458–465.



122. Ritz B. R. [et al.] Dopamine transporter genetic variants and pesticides in Parkinson's disease. *Environmental health perspectives*. 2009. Vol. 117 (6). P. 964.
123. Robbins T.W. The 5-choice serial reaction time task: behavioural pharmacology and functional neurochemistry. *Psychopharmacology*. 2002. Vol. 163 (3–4). P. 362–80.
124. Rosalovsky V. P., Grabovska S. V., Salyha Yu. T. Changes in glutathione system and lipid peroxidation in rat blood during the first hour after chlorpyrifos exposure. *Ukr. Biochem. J.* 2015. Vol. 87 (5). P. 124–132.
125. Rosalovskyi V, Grabovska S, Salyha Y. Dynamics of hematological parameters of rats during an hour after chlorpyrifos intoxication. *Біологія тварин*. 2014. Vol. 16 (3). P. 200.
126. Rosalovskyi V, Grabovska S, Salyha Y. Low dose chlorpyrifos exposure to female rats before and during pregnancy affects their behavior. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*. 2015. Vol. 4 (75). P. 59.
127. Saab B.J., Saab A.M.P., Roder J.C. Statistical and theoretical considerations for the platform re-location water maze. *J. Neurosci. Meth.* 2011. Vol. 198 (1). P. 44–52.
128. Salyha Y, Rosalovskyi V, Grabovska S. Organophosphate compounds: "old" neurotoxicants and new questions. VII Congress of the Ukrainian Society for Neuroscience. Київ, 7–11 червня 2017. С. 51–52.
129. Schaller, T., Woodlee M.T., Fleming S.M. Disentangling multiple types of recovery from brain injury. In: Krieglstein J, Klumpp S, editors. *Pharmacology of Cerebral Ischemia*. Stuttgart: Medpharm Scientific Publishers. 2002. P. 201–216.
130. Shelton J.F., Hertz-Picciotto I., Pessah I.N. Tipping the Balance of Autism Risk: Potential Mechanisms Linking Pesticides and Autism. *Environ Health Perspect.* 2012. Vol. 120 (7). P. 944–951.

131. Shue K. L., Douglas V. I. Attention deficit hyperactivity disorder and the frontal lobe syndrome. *Brain and cognition*. 1992. Vol 20 (1). P. 104-124.
132. Silva J. G., Boareto A. C., Schreiber A. K., [et al.] Chlorpyrifos induces anxiety-like behavior in offspring rats exposed during pregnancy. *Neuroscience Letters*. 2017. Vol. 641. P. 94–100.
133. Slotkin T.A., Seidler F.J. Comparative developmental neurotoxicity of organophosphates in vivo: transcriptional responses of pathways for brain cell development, cell signaling, cytotoxicity and neurotransmitter systems. *Brain Res Bull*. 2007. Vol. 72 (4–6). P. 232–274.
134. Smith J. N., Hinderliter P. M., Timchalk C., [et al.] A human life-stage physiologically based pharmacokinetic and pharmacodynamic model for chlorpyrifos: Development and validation. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2014. Vol. 69 (3). P. 580–597.
135. Stern A., Agnew-Blais J., Danese A., [et al.] Associations between abuse/neglect and ADHD from childhood to young adulthood: A prospective nationally-representative twin study. *Child Abuse & Neglect*. 2018. Vol. 81. P. 274–285.
136. Terry A.V. Jr, Beck W.D., Warner S., Vandenhuerk L., Callahan PM. Chronic impairments in spatial learning and memory in rats previously exposed to chlorpyrifos or diisopropylfluorophosphate. *Neurotoxicol Teratol*. 2012 Vol. 34 (1). P. 1–8
137. Thapar A. [et al.] What causes attention deficit hyperactivity disorder? *Archives of disease in childhood*. 2012. Vol. 97(3). P. 260-265.
138. Thomas A., Burant A., Bui N., [et al.] Marble burying reflects a repetitive and perseverative behavior more than novelty-induced anxiety. *Psychopharmacology*. 2009. Vol. 204 (2). P. 361–373.
139. Timofeeva O. A., Levin E. D. Lasting Behavioral Consequences of Organophosphate Pesticide Exposure During Development. In R. Krieger (ed.).

Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology (Third Edition). New York: Academic Press. 2010. P. 837–846.

140. Tomlin C.D.S. The Pesticide Manual. A World Compendium. British Crop Protection Council: Alton, Hampshire, UK. 2006. Vol. 14. P. 186–187.

141. Turner M.C., Wigle D.T., Krewski D. Residential pesticides and childhood leukemia: a systematic review and meta-analysis. Centre for Population Health Risk Assessment, Institute of Population Health, University of Ottawa, Ottawa, ON, Canada. *Cien Saude Colet*. 2011 Vol. 16 (3). P. 1915–1931.

142. Vazquez A.L., Sibley M. H., Campey M. Measuring impairment when diagnosing adolescent ADHD: Differentiating problems due to ADHD versus other sources. *Psychiatry Research*. 2018. Vol. 264, P. 407–411.

143. Walf A. A., Frye C. A. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nature protocols*. 2007. Vol. 2(2). P. 322.

144. Walsh R. N., Cummins R. A. The Open-Field Test: a critical review. *Psychol. Bull.* 1976. Vol. 83. 482–504.

145. Wang L., Ohishi T., Akane H., [et al.] Reversible effect of developmental exposure to chlorpyrifos on late-stage neurogenesis in the hippocampal dentate gyrus in mouse offspring. *Reprod Toxicol*. 2013. Vol. 38. P. 25–36.

146. Whitney K. D., Seidler F. J., Slotkin T. A. Developmental neurotoxicity of chlorpyrifos: cellular mechanisms. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 1995. Vol. 134 (1). P. 53-62.

147. Wöhr M., Scattoni M.L.. Behavioural methods used in rodent models of autism spectrum disorders: Current standards and new developments. *Behavioural Brain Research*. 2013. Vol. 251. P. 5–17.

148. World Health Organization. The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification. 2009 (Report). World Health Organization.
149. Yan C., Jiao L., Zhao J., Yang H., [et al.] Repeated exposures to chlorpyrifos lead to spatial memory retrieval impairment and motor activity alteration. *Neurotoxicol Teratol.* 2012. Vol. 34 (4). P. 442–449.
150. Yang M., Silverman J.L., Crawley J.N. Automated three-chambered social approach task for mice. *Current Protocols in Neuroscience.* 2011. Ch. 8. P. 8–26.
151. Yolton K., Cornelius M., Ornoy A., McGough J., [et al.] Exposure to neurotoxicants and the development of attention deficit hyperactivity disorder and its related behaviors in childhood. *Neurotoxicol Teratol.* 2014. Vol. 44. P. 30–45.
152. Zheng S.Q., An L.X., Cheng X., Wang Y.J. Sevoflurane causes neuronal apoptosis and adaptability changes of neonatal rats. *Acta Anaesthesiol Scand.*