

Вплив введення низьких доз хлорпірифосу до та під час вагітності на постнатальний розвиток другого покоління щурів

Досліджено вплив хронічного введення самицям щурів низьких доз хлорпірифосу до запліднення, а також одноразового введення його субтоксичної дози під час вагітності на виживання та параметри раннього постнатального розвитку потомства (темп набору маси, індекс Кетле). У потомстві самиць, інтоксикованих хлорпірифосом, спостерігалася нижча частка виживання, а також статистично достовірні відмінності за обома індексами маси тіла.

Ключові слова: хлорпірифос, щурі, друге покоління, виживання потомства, індекс Кетле.

Постановка наукової проблеми та її значення. Хлорпірифос (ХПФ) – фосфорорганічна сполука, що використовують як діючу речовину в багатьох пестицидних препаратах. ХПФ – найстійкіший з фосфорорганічних сполук, для якого характерна небезпека накопичення в організмі та виділення з грудним молоком. Може зберігатися в ґрунті до двох років, тому для нього встановлені дуже низькі значення ГДК [1].

Основним механізмом токсичності ХПФ є незворотне інгібування ацетилхолінестерази. Внаслідок цього у холінергічних областях мозку відбувається накопичення негідролізованого ацетилхоліну, що призводить спершу до надмірного збудження холінергічних рецепторів, а згодом – до блокування передачі нервових імпульсів (гальмування) [2].

Отруєння ХПФ також призводить до інших порушень, зокрема до оксидативного стресу [2]. Завдяки цьому ефекту ХПФ здатен спричиняти загибель ізольованих нейронів гіпокампу *in vitro* [3].

Вплив ХПФ на інші системи організму вивчений менше, проте є дані, що він спричиняє порушення, зокрема імунної системи. Так, дослідження японських вчених показало, що дія цього пестициду на плоди в материнській утробі та на новонароджених мишенят спричиняє довготривале, майже незворотне порушення Т-лімфоцитарної відповіді [4]. Мишенята піддавалися впливу ХПФ з 10-го дня утробного розвитку та протягом 21 дня після народження. Було виявлено зростання частки CD4-позитивних спленоцитів. Однак CD4-позитивні регуляторні Т-клітини – єдиний вид імунних клітин, що зазнав негативного впливу ХПФ.

При гострому отруєнні ХПФ спостерігається м'язова слабкість, тремтіння, судоми, гіпотонія, порушення свідомості аж до глибокої коми, може наступити смерть. Хронічне отруєння низькими дозами ХПФ може не спричиняти до появи негайних симптомів, однак, накопичуючись в організмі, отрута здатна призводити до серйозних порушень, зокрема неврологічних. Повторюване введення порівняно низьких доз ХПФ викликало у щурів посилення імпульсивності поведінки та порушення стійкості уваги [5]. Субхронічне введення невеликих доз (0.01 та 0.1 μM) ХПФ малькам акваріумних риб даніо-реріо спричиняє послаблення у них ознак поведінки, пов'язаної з тривогою: зниження швидкості плавання, тигмотаксис (притискання до стінок чи дна посудини) [6]. Є дані, що хронічне отруєння низькими дозами ХПФ людини може навіть бути причиною розвитку хвороби Паркінсона [7].

У дослідженні [8] показано, що введення вагітним самицям ХПФ у дозах від 0,1 до 15 кг/добу спричиняло зниження темпу набору ними ваги, а також зниження маси новонароджених щурят і деякі зміни у морфології їхнього мозку та зниження у ньому активності АХЕ.

Даних щодо негативного впливу введення ХПФ вагітним самицям на розвиток їхнього потомства отримано вже досить багато, однак, недостатньо дослідженим залишається вплив отруєння ХПФ самиць до запліднення на їхнє майбутнє потомство. Цей аспект особливо актуальний, оскільки механізми захисту та усунення від шкідливих умов праці (зокрема, контакту з пестицидами) вагітних жінок не поширюються на молодих працівниць до настання їхньої вагітності, а отже, ці жінки можуть піддаватися впливові токсичних речовин, які можуть в подальшому спричиняти проблеми зі здоров'ям у їх майбутніх дітей. Тому ми поставили мету – дослідити параметри раннього постнатального розвитку потомства самиць щурів, які були хронічно інтоксовані ХПФ до запліднення або одержали одноразову субтоксичну дозу ХПФ у першому триместрі вагітності. Параметрами

дослідження обрано темп набору маси тіла та індекс Кетле (індекс маси тіла), як найбільш явні якісні та кількісні показники постнатального розвитку, а також частку виживання щурят до дорослого віку.

Методика дослідження. Дослід проведено на самицях білих лабораторних щурів лінії Wistar, які перорально (за допомогою зонда) отримували ХПФ у дозах 5, 10 та 15 мг/кг щодобово протягом 30 діб (введення було припинене за 4 місяці до вагітності). З них було сформовано три дослідні групи по три тварини у кожній – групи 1, 2 та 3, (відповідно до введеної дози – 5, 10 та 15 мг/кг). Також було сформовано дві групи інтактних самиць по три тварини у кожній – дослідно група 4 та контрольна 5.

Кожну групу було поселено в окремій клітці, всіх тварин пронумеровано та зважено. До кожної групи на три доби підсаджували самця для запліднення. Самці не піддавалися впливу ХПФ або інших факторів, які могли б позначитися на здоров'ї їхнього потомства.

Самицям групи 4 на 6–7 добу вагітності перорально (за допомогою зонда) одноразово вводили ХПФ у дозі 30 мг/кг.

Після народження потомства його періодично зважували та вимірювали довжину тіла. Вимірювання проводили на 2, 7, 14, 21 та 30 добу життя. Одержані дані використовували для розрахунку швидкості набору маси та індексу маси тіла (індекс Кетле).

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

$$dM/Mdt,$$

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

Індекс Кетле – один з класичних методів виявлення відхилень у масі тіла. Він був запропонований Адольфом Кетле ще у середині XIX сторіччя [9], і до сьогодні залишається широко вживаним як у медицині та дієтології (для виявлення ожиріння чи недостатності маси тіла), так і в фізіологічних, токсикологічних та інших біологічних дослідженнях.

Індекс Кетле вираховували за такою формулою:

$$I = \frac{M}{h^2},$$

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

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

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

Обчислення проводили за допомогою програмного забезпечення Statistica 8.0, використовуючи аналіз ANOVA.

Всі дослідження було проведено на базі віварію Інституту біології тварин НААН України, у м. Львові.

Виклад основного матеріалу й обґрунтування отриманих результатів дослідження. Після спарювання у групі 4 завагітніли 2 тварини, у решті груп – по одній. Сумарна кількість народженого потомства по групах становила: група 1 – 14; 2 – 12; 3 – 10; 4 – 21; 5 (контроль) – 13. До дорослого віку з них дожили: група 1 – 8 (57 %), 2 – 7 (58 %), 3 – 4 (40 %), 4 – 12 (57 %), 5 (контроль) – 8 (62 %) (рис. 1). Таким чином, найвищий відсоток виживання спостерігався у контрольній (5) групі, найнижчий – у групі 3 (потомстві матерів, що на попередньому етапі дослідження одержували найвищу дозу ХПФ, 15 мг/кг щоденно).

За швидкістю набору маси (рис. 2 А) найвищий показник було спостережено у потомстві групи 3 на 21 добу життя, на 30 добу темп набору маси у щурят цієї групи сповільнився. Тварини групи 2 також демонстрували статистично достовірно швидший (порівняно з контролем) набір маси на 21 добу, однак у цій групі відмінності були дещо меншими.

Проте маса тіла – недостатній показник для оцінювання темпів розвитку та його відхилень. Важливими параметрами є також набір жирової маси, розвиток м'язової тканини, скелету. Для оцінювання цих показників застосовуються різноманітні індекси маси тіла. На сьогодні існує кілька таких індексів, з яких для нашого дослідження ми обрали індекс Кетле.

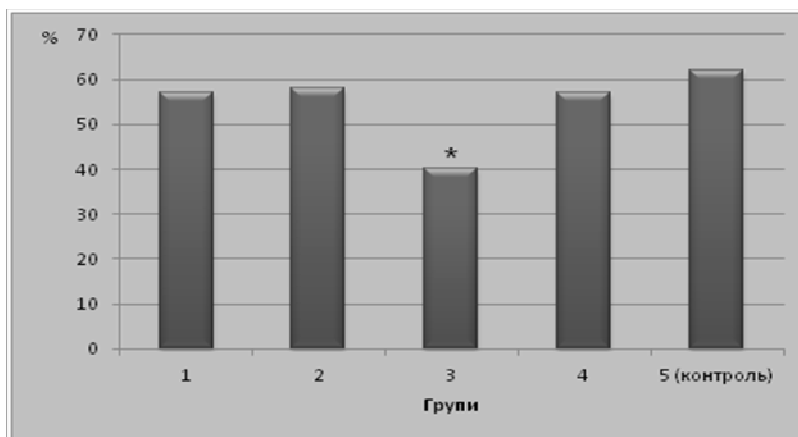


Рис. 1. Відсоток виживання щурят різних груп до дорослого віку. * Відмінності статистично достовірні порівняно з контролем ($p < 0,05$)

Найвищі показники за *індексом Кетле* (Рис. 2, Б) були зафіксовані у контрольній групі, причому ця різниця була статистично достовірною (за $p < 0,001$). Найнижчі показники цього індексу були спостережені у групах 1 та 2, а також у групі 3.

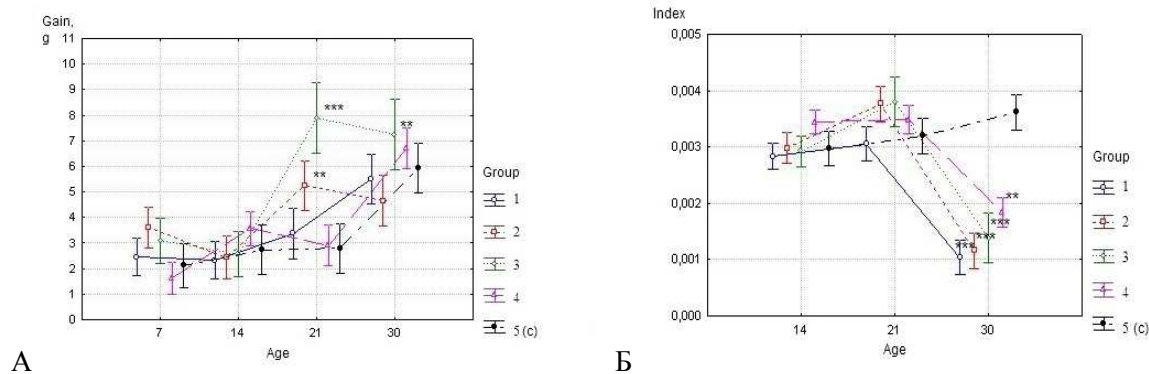


Рис. 2. Швидкість набору маси (А) та індекс Кетле (Б) потомства. Відмінності статистично достовірні порівняно з контролем: А ($p < 0,01$), Б ($p < 0,001$).

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

Якщо у дорослих тварин (і людини) вищий індекс маси тіла зазвичай свідчить про шкідливі для здоров'я процеси – надлишкову вагу, ризик ожиріння, метаболічні порушення, та у ранній період постнатального розвитку спостерігається протилежна тенденція. Для організму, що активно розвивається, небезпечним та несприятливим показником є саме недостатній темп набору маси та недостатня кількість жирової тканини в організмі. Різницю між показником темпу набору маси та індексом Кетле у групі 3 можна пояснити швидким ростом тварин, який не супроводжувався достатньо активним набором маси. Механізм цього відхилення у розвитку потомства самиць, що піддавалися впливові ХПФ до запліднення, важко пояснити однозначно, однак наявність статистично достовірних відмінностей від контролю сама по собі може слугувати ознакою негативного впливу токсиканта на наступні покоління.

Висновки. За результатами проведеного дослідження встановлено, що хронічний вплив низьких доз ХПФ на самиць, який припинили за чотири місяці до запліднення, а також одноразове введення субтоксичної дози (30 мг/кг) ХПФ на 6–7 добу вагітності позначилися на параметрах раннього постнатального розвитку потомства цих самиць. Так, серед потомства самиць, які до вагітності отримували 15 мг/кг ХПФ щодобово протягом 30 діб, до дорослого віку дожило на 22 % менше щурят, ніж в контролі. Нижча частка виживання також спостерігалася в інших дослідних групах.

Окрім того, у потомства отруєних ХПФ самиць були значно нижчими показники індексу Кетле, що свідчить про недостатній набір маси при нормальному чи навіть підвищеному темпі росту.

Отже, хронічне отруєння самиць щурів низькими дозами ХПФ навіть за 4 місяці до вагітності спричинило різке зниження частки виживання їхнього потомства, а також порушення процесів його розвитку у перші 30 днів життя. Таким чином, вплив пестициду на самиць до запліднення та під час вагітності спричинив зміни у параметрах постнатального розвитку їхнього потомства.

Джерела та література

1. Зинченко В.А. Химическая защита растений: средства, технология и экологическая безопасность / В. А. Зинченко. – М. : Колос С, 2005. – 232 с.
2. Salyha Y. Biological effects assessment of chlorpyrifos and some aspects of its neurotoxicity / Y. Salyha // *Visnyk of Lviv University. Biology series.* – 2010. – № 54. – P. 3–14.
3. Salyha Y. Chlorpyrifos leads to oxidative stress-induced death of hippocampal cells in vitro / Y. Salyha // *Neurophysiology.* – 2013. – 45, № 3. – P. 193–199.
4. Nakamura R. Effects of transplacental and trans-breast milk exposure to the organophosphate compound chlorpyrifos on the developing immune system of mice / R. Nakamura, Y. Kimura, H. Matsuoka et al // *Kokuritsu Iyakuin Shokuhin Eisei Kenkyusho Hokoku.* – 2011. – № 129. – P. 105–110.
5. Middlemore-Risher M. L. Repeated exposures to low-level chlorpyrifos results in impairments in sustained attention and increased impulsivity in rats / M. L. Middlemore-Risher, J. J. Buccafusco, A. V. Terry, Jr // *Neurotoxicol Teratol.* – 2011.
6. Richendrfer H. Developmental sub-chronic exposure to chlorpyrifos reduces anxiety-related behavior in zebrafish larvae / H. Richendrfer, S. D. Pelkowski, R. M. Colwill et al // *Neurotoxicol Teratol.* – 2012. – 34, № 4. – P. 458–465.
7. Brown T. P. Pesticides and parkinson's disease – is there a link? / T. P. Brown, P. C. Rumsby, A. C. Capleton et al // *Environ Health Perspect.* – 2006. – 2, № 114. – P. 156–164.
8. Breslin W.J. Evaluation of the Developmental and Reproductive Toxicity of Chlorpyrifos in the Rat // W. J. Breslin, A. B. Liberacki, D. A. Dittenber et al // *Fundamental and Applied Toxicology.* – 1996. – № 29. – P. 119–130.
9. Eknayan G. Adolphe Quetelet (1796–1874) – the average man and indices of obesity / G. Eknayan // *Nephrology Dialysis Transplantation.* – 2007. – Vol. 23, № 1. – P. 47–51.

Грабовская София Влияние введения низких доз хлорпирифоса до и во время беременности на постнатальное развитие потомства крыс. Хлорпирифос – фосфорорганический пестицид. Основным механизмом его токсического действия является ингибирование ацетилхолинэстеразы, приводящее к неврологическим нарушениям, однако он может негативно влиять и на другие системы организма. В настоящее время активно исследуется влияние интоксикации пестицидом матерей на отклонения в развитии их потомства. В данной работе мы исследовали влияние хронической интоксикации самок хлорпирифосом до оплодотворения, а также однократного введения субтоксической дозы пестицида в первой трети беременности на процент выживания потомства и параметры его развития в первые 30 дней после рождения (темп набора массы, индекс Кетле). Согласно полученным результатам, интоксикация самок самой высокой из представленных доз (15 мг/кг ежедневно в течение 30 дней, за 4 месяца до начала беременности) привела к статистически достоверному (по сравнению с контролем) снижению выживаемости крысят, а также к снижению их индекса массы тела при высоком темпе роста. В остальных экспериментальных группах тенденция была аналогичной, но менее выраженной.

Ключевые слова: хлорпирифос, крысы, второе поколение, выживание потомства, индекс Кетле.

Grabovska Sofiy/ Low Dose Chlorpyrifos Exposure Before and During Pregnancy Alters the Postnatal Development of Rat Offspring. Chlorpyrifos is an organophosphate pesticide. The main mechanism of its toxicity is acetylcholinesterase inhibition, causing neurological disorders, but it may also affect other body systems. Recently, the effects of pesticide exposure to mothers on deviations in their offspring development are studied actively. In this study, we investigated the effects of chronic chlorpyrifos intoxication of females before fertilization and a single injection of sub-toxic dose of the pesticide at the first trimester of pregnancy on the survival rate of the offspring and parameters of its development at the first 30 postnatal days (weight gain rate, Quetelet body mass index). According to the results, exposure to the highest of presented doses (15 mg / kg daily for 30 days, 4 months prior to pregnancy) caused a statistically significant (compared to control) pups survival decrease, and also a decrease in their body mass indexes, along with a high growth rate. In the other experimental groups, there were similar but less prominent tendencies.

Key words: chlorpyrifos, rats, second generation, offspring survival, Quetelet index.

Стаття надійшла до редколегії
22.01.2015 р.