

РОЛЬ ОКСИДАЦІЙНОГО СТРЕСУ В ЗАГИБЕЛІ КЛІТИН ГІПОКАМПА ПІД ДІЄЮ ХЛОРПІРИФОСУ В УМОВАХ *IN VITRO*

Надійшла 12.03.13

Хлорпірифос (ХПФ) є фосфорорганічним інсектицидом, який широко використовується в побуті, сільському господарстві та промисловості. Як і всі фосфорорганічні сполуки, ХПФ впливає на нервову систему, інгібуючи ацетилхолінестеразу (АХЕ). Крім того, в організмі ссавців він перетворюється в ХПФ-оксон, який більш ніж у 3000 разів активніший щодо нервової системи, ніж сам ХПФ. Як з'ясувалось останнім часом, дія цього пестициду на АХЕ є далеко не єдиним механізмом його токсичності. Одним із механізмів може бути здатність фосфорорганічних сполук викликати оксидативний стрес, що призводить до утворення вільних радикалів. Ми досліджували вплив ХПФ на клітини гіпокампа щурів в умовах культури, звертаючи особливу увагу на те, чи опосередковується цитотоксичний ефект впливами активних форм кисню. Використовували трансфекцію культивованих клітин гіпокампа зеленим флуоресцентним білком (GFP). Було визначено дозозалежність ушкодження та загибелі клітин гіпокампа *in vitro* під дією ХПФ, а також залежність від тривалості його дії. Було також досліджено виживання нервових клітин, які інкубували в середовищі тільки з ХПФ і в тих самих умовах, але з додаванням тролоксу (водорозчинного аналога вітаміну Е) як антиоксидантного фактора. Було встановлено, що нейропротекторна дія тролоксу є очевидною при всіх концентраціях ХПФ, використаних протягом періоду дослідження. Таким чином, слід вважати, що негативний вплив ХПФ на клітини гіпокампа значною мірою зумовлений розвитком у цих умовах оксидативного стресу.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: культура клітин, хлорпірифос, гіпокамп, нейрон, нейротоксичність, оксидативний стрес.

ВСТУП

Хлорпірифос (ХПФ) – один із добре відомих фосфорорганічних інсектицидів, який протягом останніх 40 років широко використовується в сільськогосподарських, промислових та побутових цілях приблизно в 100 країнах світу [1, 2]. Незважаючи на нещодавно введені істотні обмеження його застосування в домашніх умовах у низці країн (США, 2001; Європейський Союз, 2003), ХПФ залишається дуже широко вживаним пестицидом. Цей агент використовується для знищення широкого спектра шкідливих комах і кліщів; водночас він демонструє помітну токсичність для більшості видів інших тварин і людини [2]. ХПФ може зумовлювати різноманітні токсичні ефекти в багатьох органах та системах ссавців, впливаючи на серце-

во-судинну, дихальну та репродуктивну системи, але основною мішенню токсичної дії ХПФ є ЦНС [3–7]. Саме цей аспект, що раніше був недооцінений, сьогодні викликає зростаючий інтерес і вимагає ретельнішого вивчення. Як і інші фосфорорганічні сполуки, ХПФ інгібуює ацетилхолінестеразу (АХЕ), котра забезпечує гідроліз ацетилхоліну. Дана властивість ХПФ – його вплив на процеси синаптичної передачі – до недавнього часу розглядалася як ключовий і чи не єдиний механізм його токсичності [8]. В останні роки вчені в багатьох країнах активізували дослідження щодо біологічної безпеки ряду пестицидів, у тому числі фосфорорганічних сполук з антихолінестеразними властивостями. Були з'ясовані деякі нові аспекти механізмів їх дії на живий організм у цілому і нервову систему зокрема. Було неодноразово продемонстровано, що механізм токсичності ХПФ не обмежується лише інгібуванням холінестерази, а

¹Інститут біології тварин НААН України, Львів (Україна).
Ел. пошта: yursalyha@yahoo.com (Ю. Т. Салига).

може бути пов'язаний із впливами на інші важливі біологічні процеси. Є дані, що ХПФ негативно впливає на розвиток мозку ссавців, оскільки ефекти цього агента щодо холінергічної передачі в ЦНС комбінуються із впливом на внутрішньоклітинні сигнальні каскади, задіяні в диференціювання клітин. Накопичуються також свідчення того, що нейротоксичність ХПФ може бути значною мірою пов'язана з феноменом оксидативного стресу [9–13].

Оксидативний стрес можна кваліфікувати як дисбаланс окислювально-відновної рівноваги в клітині, пов'язаний або з надмірним утворенням активних форм кисню (АФК), або ж з порушенням функціонування системи антиоксидантного захисту [14]. Нейрони є високочутливими до оксидативного стресу у зв'язку з тим, що їх енергозабезпечення особливо істотно (порівняно з таким інших клітин) залежить від окисного фосфорилування [15]. Неодноразово підкреслювався тісний зв'язок між оксидативним стресом і виникненням низки патологій та розладів нервової системи (хвороб Альцгеймера, Паркінсона, Хантінгтона, латерального аміотрофічного склероза та ін.) [14–23]. Результати наших попередніх досліджень на лабораторних тваринах і культурах нервових клітин [2, 24] слугували підтвердженням нейротоксичної дії ХПФ та вказували на те, що інтоксикація організму цією сполукою може призвести до порушень оксидативного балансу.

Таким чином, оксидативний стрес може бути одним із факторів, що зумовлюють загибель нервових клітин різних типів у ЦНС. Більшість досліджень нейротоксичності ХПФ в умовах *in vitro* були проведені на нейронах кори, астроцитах та олігодендроцитах [11, 25, 26]. Метою нашої роботи було з'ясувати характер впливів ХПФ на первинну культуру нейронів гіпокампа *in vitro* і перевірити зв'язок між загибеллю таких клітин і оксидативним стресом.

МЕТОДИКА

Реагенти. У роботі використовували ХПФ (CAS № 2921-88-2; O,O-діетил-O-3,5,6-трихлор-2-піридилфосфоріоат (C₉H₁₁Cl₃NO₃PS)) виробництва компанії „Sigma Chemical” (США). Для приготування маточного розчину ХПФ його розчиняли в диметилсульфоксиді (ДМСО) до концентрації 100 мкМ, заморозували і зберігали при температурі

–80 °С. Для кожного експерименту використовували свіжоприготовані розчини ХПФ необхідних концентрацій. Водорозчинний аналог вітаміну Е тролокс (CAS № 53188-07-1; (±)-6-гідрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбонова кислота) виробництва „Sigma Chemical” (США) застосовували в концентрації 100 мкМ. Чистота цього препарату становила не менше 97 %.

Первинна культура нейронів гіпокампа щурів і трансфекція нейронів. Нейрони виділяли з гіпокампа ембріонів лінії Вістар (18-й день пренатального розвитку), застосовуючи обробку зразків цієї структури 0.25 %-вим трипсином протягом 15 хв при 37 °С. Після цього нервові клітини висівали на покривні скельця, покриті поліетиленіміном (щільність 70000 клітин на 1 см²). Нейрони культивували в мінімальному поживному середовищі (MEM), до якого додавали 10 % сироватки NU фірми „BD Biosciences” (Франція), 0.45 % глюкози, 1 мМ пірувату натрію, 1.5 мМ HEPES і 10 МО/мл пеніцилін/стрептоміцину згідно з описаними методиками [27–29]. На сьому, 10-ту і 13-ту доби інкубування культури (доби *in vitro*, DIV) клітин половину поживного середовища замінювали середовищем MEM з додаванням 2 % B27 („Invitrogen”, США).

Для трансфекції нейронів зеленим флуоресцентним білком (GFP) ми використовували метод магнетофекції – новий спосіб перенесення генетичної інформації на основі доставки ДНК на магнітних наночастинках під дією спрямованого магнітного поля. Після семи–10 DIV змішані культури клітин гіпокампа були трансфеговані з використанням Magnetofection Kit („OZ Biosciences”, Франція) та ліпофектаміну 2000 [27–29]. Для трансфекції культур, які вирощували в чашках Петрі діаметром 35 мм, 300 мкл середовища Opti-MEM змішували із 7.0 мкл ліпофектаміну 2000 („Invitrogen”, США), 1.0 мкл реагенту Magnetofection CombiMag („OZ Bioscience”, Франція) і 1.0–1.5 мкг рсДНК. Суміш витримували протягом 20 хв при кімнатній температурі, а потім акуратно додавали в чашки до культури нейронів. Чашки з культурами вміщували на спеціальні магнітні пластини („OZ Bioscience”, Франція) і витримували так протягом 30–35 хв при 37 °С. Процес трансфекції припиняли, замінюючи 90 % інкубаційного розчину свіжим культуральним середовищем. Для трансфекції культур, які інкубували в планшетах з чотирма лунками діаметром 16 мм, у кожену таку лунку вносили 60 мкл описаної вище суміші. У подальших експериментах використовували клітини через дві–п'ять днів після трансфекції.

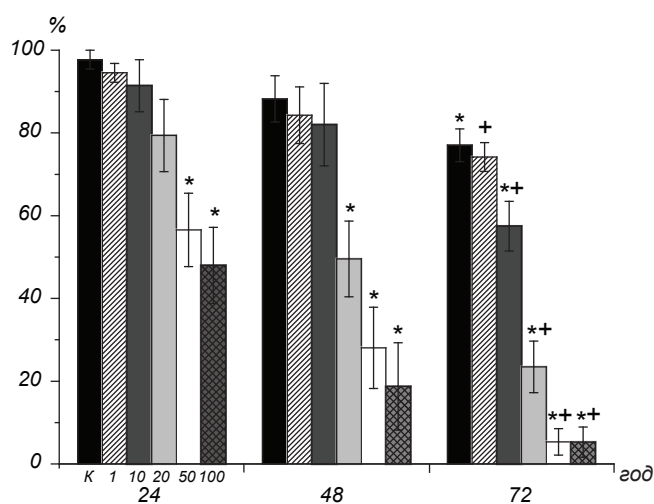
Клітини після трансфекції досліджували за допомогою так званої інтервальної мікроскопії (time lapse-мікроскопія). Культури з низьким рівнем трансфекції (<10 нейронів на покривне скельце) в експериментах не використовували.

Мікроскопія живих культур нейронів гіпокампа. Інтервальну мікроскопію нервових клітин у перебігу їх росту і розвитку проводили за допомогою інвертованого мікроскопа, який був обладнаний спеціальною CO₂-камерою („Princeton Instruments”, США) з безперервним контролем рівня вуглекислого газу і температури. Протягом трьох діб поспіль з використанням камери Micro-MAX CCD і програмного забезпечення MetaMorph („Roper Scientific”, США) отримували та аналізували зображення одних і тих самих 20–30 трансфетованих нейронів у кожних окремих умовах експерименту, знаходячи такі одиниці щоразу за системою координат. Одразу після мікроскопічного дослідження нейронів чашки з культурами переносили у CO₂-інкубатор. Нейрони з нормальним розвитком дендритів, в яких спостерігався рівномірний розподіл GFP, враховували як живі, тоді як нейрони з кластеризованим розподілом GFP або ті клітини, де GFP зникав, вважали загиблими.

Статистичний аналіз. Усі дані підлягали статистичній обробці з використанням *t*-тесту Ст'юдента. Міжгрупові відмінності отриманих даних з $P < 0.05$ вважали статистично вірогідними.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У першій частині нашої роботи ми досліджували нейротоксичну дію ХПФ на первинні культури нейронів гіпокампа щурів. Порівнювалися впливи щодо токсиканта у різних концентраціях на ріст і виживання нейронів гіпокампа в умовах *in vitro*. З цією метою культури клітин гіпокампа, вік яких становив 7 DIV, трансфетували з використанням GFP для візуалізації морфології нейронів. Через три доби після трансфекції клітин в інкубаційне середовище додавали ХПФ у концентраціях 0, 1, 10, 20, 50 і 100 мкМ. Після цього протягом трьох діб поспіль отримували флуоресцентні зображення одних і тих самих нейронів, що дозволило проводити аналіз їх морфологічних змін і рівня виживання. Беручи до уваги те, що як розчинник для ХПФ у роботі використовували ДМСО, перевіряли також можливий вплив останньої хімічної речовини на досліджувані культури. Істотного впливу ДМСО



Р и с. 1. Виживання нейронів протягом 72 год експерименту в умовах культивування клітин при внесенні в інкубаційне середовище хлорпірифосу (ХПФ) у різних дозах (від 1 до 100 мкМ).

По вертикалі – відносна кількість живих клітин, % (за 100 % прийнята кількість таких клітин на початку культивування). Зірочками позначені випадки вірогідної різниці порівняно з контролем (K), хрестиками – зі значеннями в першу добу експерименту (24 год) з $P < 0.05$.

у використаних концентраціях на життєздатність клітин виявлено не було.

Дія ХПФ на культури нейронів гіпокампа щурів протягом 24, 48 і 72 год починаючи з третього дня після трансфекції зумовлювала інтенсивні нейротоксичні ефекти (рис. 1). У переважній більшості випадків додавання до культурального середовища ХПФ у всіх дозах (1, 10, 20, 50 і 100 мкМ) призводило до значного зменшення кількості живих клітин порівняно з числом нейронів у контролі (інкубація без внесення цієї сполуки в середовище). Водночас, як слід підкреслити, відмінності між кількістю клітин, що виживали в умовах дії ХПФ та в контролі, не були прямо пропорційними застосованим концентраціям токсину, хоча дозозалежність була очевидною. ХПФ у відносно високих концентраціях (20, 50 і 100 мкМ) викликав істотні негативні зміни вже в перші дні після його внесення в середовище культивування. На відміну від цього ХПФ у дозах 1 і 10 мкМ призводив до значного зменшення числа живих клітин тільки після 72 год дослідження. Протягом перших 24 і 48 год спостерігалася лише незначна тенденція до зниження цього показника. Внесення до середовища ХПФ у дозах 50 і 100 мкМ протягом 72 год спостережень зумовлювало загибель більше 80 % нейронів гіпокампа. За умов відсутності в середовищі ХПФ значна більшість (до 80 %) нейро-

нів нормально розвивалися протягом трьох діб після початку експерименту.

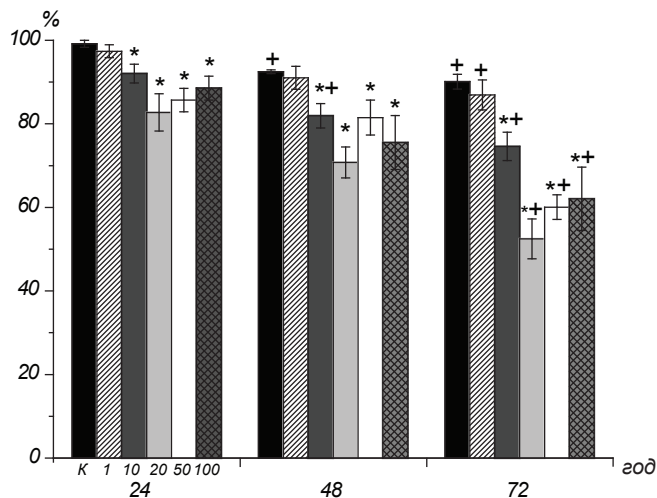
Інша серія експериментів *in vitro* була проведена з використанням тролокса – водорозчинного аналога вітаміну Е – як антиоксидантного фактора (рис. 2; 3). Одночасне внесення до інкубаційного середовища ХПФ і тролокса в концентрації 100 мкМ забезпечувало істотно більший рівень виживання нейронів. При всіх концентраціях ХПФ, які були використані в роботі, навіть через три доби експерименту живими звичайно залишалися 60 і більше відсотків нейронів. Далі ми обговоримо ці результати докладніше.

Нові методи досліджень, базовані на прижиттєвій візуалізації клітин різних типів, у тому числі нервових, дають змогу оцінити стан їх життєдіяльності в умовах дії будь-яких негативних факторів. Для вивчення впливу ХПФ на нейрони гіпокампа *in vitro* ми використовували трансфекцію таких клітин люмінесцентним протеїном GFP. Це дозволило отримати нові дані про механізми токсичності ХПФ і загалом фосфорорганічних сполук щодо ЦНС ссавців. Незважаючи на високий інтерес до нейротоксичної дії ХПФ та доцільності вивчення відповідних ефектів *in vitro*, відомості про впливи цього токсиканту на нервові клітини саме гіпокампа поки що дуже обмежені. Як уже згадувалося вище, аналогічні дослідження проводилися на клітинах ряду інших структур ЦНС. Гіпокамп, як відомо, є дуже чутливим щодо багатьох видів нев-

рологічних уражень; зокрема, він є основною мішенню при дегенерації нейронів у пацієнтів із хворобою Альцгеймера [34].

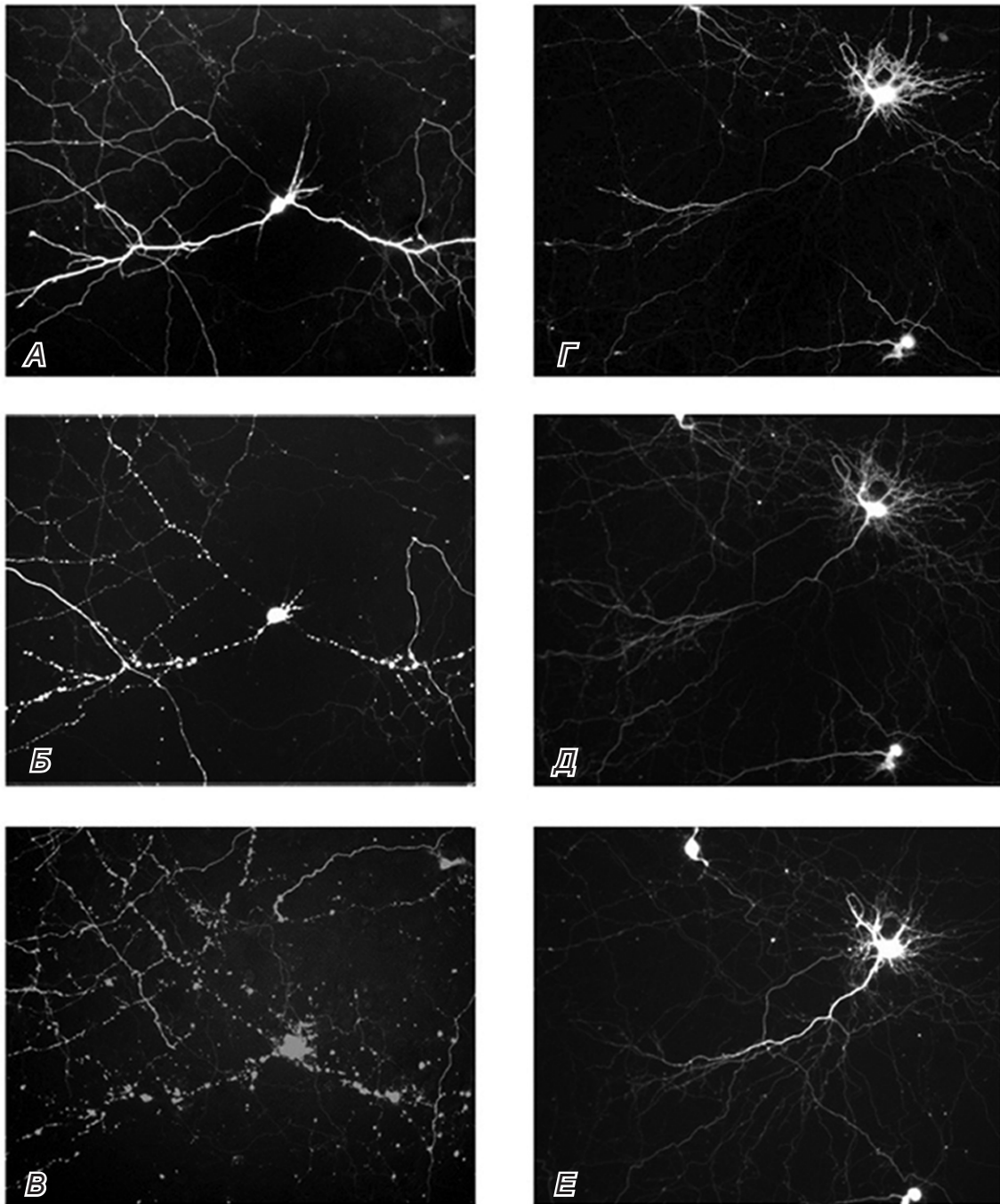
Результати наших експериментів продемонстрували, що ХПФ викликає дозозалежну загибель нейронів гіпокампа *in vitro*. Беручи до уваги дані наших попередніх досліджень, а також робіт цілої низки авторів, які вивчали токсичну дію ХПФ на інші клітини, цей результат є доволі передбачуваним [2, 25, 26]. Підтвердження цього феномену на нервових клітинах іншого типу лише доповнює відому інформацію про токсичність ХПФ, але не наближає до розуміння механізмів зазначеного ефекту. Тому набагато цікавішими виглядають результати другої частини нашої роботи. Вони свідчать про те, що нейротоксичність ХПФ може значною мірою базуватися на оксидативному стресі, індукованому названою сполукою.

ХПФ, як і інші фосфорорганічні сполуки, інгібує холінестеразні ензими, але це є не єдиним механізмом його нейротоксичності. Як було встановлено, ХПФ впливає на процеси синаптичної передачі, пошкоджує реплікацію в перебігу нейрогенезу, пригнічує ріст нейритів, перешкоджає нормальному функціонуванню сигнальних каскадів і транскрипційних подій, що беруть участь у процесі клітинної диференціації нейронів, і (найголовніше) викликає оксидативний стрес [11, 30–33]. Таким чином, нейротоксичність ХПФ може бути частково опосередкована генерацією АФК та активних форм азоту (АФА), і такі механізми дії даної сполуки є доволі важливими. У зв'язку з високою реакційною активністю АФК подібні форми кисню хімічно взаємодіють з низкою біологічних молекул, що призводить до істотних змін у функціонуванні клітини, а згодом можуть зумовити її загибель [14]. Було неодноразово показано, що клітини мозку можуть бути істотно пошкоджені вільними радикалами; при цьому треба мати на увазі, що мозок характеризується надзвичайно високим споживанням кисню. Нейронні мембрани багаті на поліненасичені жирні кислоти, які є значними потенційними мішенями перекисного окиснення ліпідів [34]. Оксидативний стрес – це один із важливих молекулярних механізмів, що призводить до нейродегенерації гіпокампа. Даний механізм працює в поєднанні з іншими токсичними шляхами, які активуються нейрозапаленням, ексайтотоксичністю, внутрішньоклітинним надлишком кальцію та/або мітохондріальною дисфункцією; це певною мірою зумовлює вибіркочу



Р и с. 2. Виживання нейронів протягом 72 год експерименту в умовах культивування клітин при внесенні в інкубаційне середовище хлорпірифосу в різних дозах (від 1 до 100 мкМ) і 100 мкМ тролоксу.

Решта позначень і пояснень ті ж самі, що й на рис. 1.



Р и с. 3. Вживання нейронів, трансфєкованих зеленим флуоресцентним білком, в умовах культивування з додаванням до середовища тільки хлорпірифосу (А–Б) і в аналогічних умовах, але з одночасним додаванням тролоксу (Г–Е). А–Б і Г–Е – зображення одних і тих самих нейронів через 24 (А, Г), 48 (Б, Д) та 72 (Б, Е) год після початку експерименту.

загибель нейронів згаданої структури.

Ми порівнювали інтенсивність загибелі культивованих нейронів гіпокампа в інкубаційному середовищі за присутності тільки ХПФ, а також в тих самих умовах, але з додаванням ефективного антиоксидантного фактора. Як останній

ми обрали тролокс. Даний термін є торговою назвою французької компанії „Hoffman-La Roche’s” для 6-гідрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбонової кислоти – водорозчинного аналога вітаміну Е. Цей антиоксидант, як і вітамін Е, широко використовується в складі біохімічних додатків

для зниження впливу оксидативного стресу і порушень, котрі останній може викликати.

Тролокс проявляв значну нейропротекторну дію при всіх концентраціях ХПФ, які ми використовували, причому протягом усього періоду дослідження. Через 72 год експерименту з використанням усіх концентрацій ХПФ (до 100 мкМ) в інкубаційному середовищі ми спостерігали статистично вірогідні відмінності між кількістю живих клітин у зразках, які інкубували з додаванням тролоксу і без нього.

Найбільш істотний вплив тролоксу відмічався у випадках, коли в інкубаційне середовище ХПФ був внесений у високих дозах (20, 50 і 100 мкМ). У разі використання ХПФ у середовищі в концентраціях 50 і 100 мкМ вірогідні зміни в кількості живих клітин спостерігалися через 48 і 72 год дослідного періоду. При додаванні в тролоксвмісне інкубаційне середовище ХПФ у концентрації 100 мкМ кількість живих клітин була більшою на 46 (24 год), 75 (48 год) і 91.5 (72 год) % порівняно з числом живих клітин у середовищі без тролоксу в межах тих самих часових періодів. Загалом слід зазначити, що додавання до інкубаційного середовища 100 мМ тролоксу в усіх умовах експерименту забезпечувало виживання порядку 60 % і більше нейронів гіпокампа навіть через 72 год досліду. Цікаво, що ХПФ у дозі 20 мМ проявляв сильніший цитотоксичний ефект порівняно з усіма іншими. Це дозволяє говорити про відсутність прямо пропорційної залежності між концентрацією ХПФ в інкубаційному середовищі і рівнем загибелі клітин, що ним викликається. Зараз ми не готові дати вичерпного пояснення отриманих результатів, і це має стати завданням наступних досліджень у вказаному напрямку.

Отримані дані доводять, що ХПФ викликає дозозалежні ефекти токсичності, що призводять до посилення клітинної загибелі. У свою чергу тролокс проявляє нейропротекторну дію щодо нейронів, які інкубували в середовищі з додаванням ХПФ. Наші висновки вносять свою лепту в зростаюче число доказів того, що оксидативний стрес бере істотну участь у механізмах клітинної смерті нейронів ссавців.

Дослідження було проведено з дотриманням вимог Європейської конвенції щодо роботи з експериментальними тваринами (Страсбург, 1986).

Частина дослідження була виконана в лабораторії докт. І. Медіни (I. Medina) у Середземноморському інституті нейробіології (INMED, Марсель, Франція). У зв'язку з цим висловлюю слова щирої подяки докт. І. Медіні за надану можливість використовувати устаткування його лабораторії,

а також за корисні консультації.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Y. T. Salyha, "Potential neurotoxicity of chlorpyrifos and methods of its investigation," *Med. Chem.* [in Ukrainian], **11**, No. 4, 69-72 (2009).
2. Y. Salyha, "Biological effects assessment of chlorpyrifos and some aspects of its neurotoxicity," *Visn. Lviv Univ. Biol. Ser.* [in Ukrainian], **54**, 3-14 (2010).
3. J. E. Aldridge, F. J. Seidler, A. Meyer, et al., "Serotonergic systems targeted by developmental exposure to chlorpyrifos: Effects during different critical periods," *Environ. Health Perspect.*, **111**, No. 14, 1736-1743 (2003).
4. K. Dam, F. J. Seidler, and T. A. Slotkin, "Chlorpyrifos exposure during a critical neonatal period elicits gender-selective deficits in the development of coordination skills and locomotor activity," *Brain Res. Dev. Brain Res.*, **121**, 179-187 (2000).
5. J. Flaskos, "The developmental neurotoxicity of organophosphorus insecticides: A direct role for the oxon metabolites," *Toxicol. Lett.*, **209**, No. 1, 86-93 (2012).
6. S. J. Garcia, F. J. Seidler, and T. A. Slotkin, "Developmental neurotoxicity elicited by prenatal or postnatal chlorpyrifos exposure: effects on neurospecific proteins indicate changing vulnerabilities," *Environ. Health Perspect.*, **111**, No. 3, 297-303 (2003).
7. R. C. Gupta, J. K. Malik, and D. Milatovic, "Organophosphate and carbamate pesticides," in: *Reproductive and Developmental Toxicology*, R. C. Gupta (ed.), Elsevier Acad. Press, Burlington (2011), pp. 471-486.
8. K. D. Whitney, F. J. Seidler, and T. A. Slotkin, "Developmental neurotoxicity of chlorpyrifos: cellular mechanisms," *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **134**, No. 1, 53-62 (1995).
9. A. Caughlan, K. Newhouse, U. Namgung, et al., "Chlorpyrifos induces apoptosis in rat cortical neurons that is regulated by a balance between p38 and ERK/JNK MAP kinases," *Toxicol. Sci.*, **78**, No. 1, 125-134 (2004).
10. E. H. Delgado, E. L. Streck, J. L. Quevedo, et al., "Mitochondrial respiratory dysfunction and oxidative stress after chronic malathion exposure," *Neurochem. Res.*, **31**, No. 8, 1021-1025 (2006).
11. M. D. Saulsbury, S. O. Heyliger, K. Wang, et al., "Chlorpyrifos induces oxidative stress in oligodendrocyte progenitor cells," *Toxicology*, **259**, No. 1, 1-9 (2009).
12. T. A. Slotkin, C. A. Oliver, F. J. Seidler, et al., "Critical periods for the role of oxidative stress in the developmental neurotoxicity of chlorpyrifos and terbutaline, alone or in combination," *Brain Res. Dev. Brain Res.*, **157**, No. 2, 172-178 (2005).
13. T. A. Slotkin and F. J. Seidler, "Comparative developmental neurotoxicity of organophosphates *in vivo*: transcriptional responses of pathways for brain cell development, cell signaling, cytotoxicity and neurotransmitter systems," *Brain Res. Bull.*, **72**, Nos. 4/6, 232-274 (2007).
14. S. Gandhi and A. Y. Abramov, "Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration," *Oxidat. Med. Cell. Longevity*, **2012**, Article ID 428010, 11 pages, Hindawi Publ. Corp., doi:10.1155/2012/428010 (2012).

15. K. Facecchia, L. A. Fochesato, S. D. Ray, et al., "Oxidative toxicity in neurodegenerative diseases: role of mitochondrial dysfunction and therapeutic strategies," *J. Toxicol.*, **2011**, Article ID 683728, 12 pages, Hindawi Publ. Corp., doi:10.1155/2011/683728 (2011).
16. K. J. Barnham, C. L. Masters, and A. I. Bush, "Neurodegenerative diseases and oxidative stress," *Nat. Rev. Drug Discov.*, **3**, No. 3, 205-214 (2004).
17. J. T. Coyle and P. Puttfarcken, "Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders," *Science*, **262**, No. 5134, 689-695 (1993).
18. M. Dumont, M. T. Lin, and M. F. Beal, "Mitochondria and antioxidant targeted therapeutic strategies for Alzheimer's disease," *J. Alzheimer's Dis.*, **20**, No. 2, S633-S643 (2010).
19. J. Emerit, M. Edeas, and F. Bricaire, "Neurodegenerative diseases and oxidative stress," *Biomed. Pharmacother.*, **58**, No. 1, 39-46 (2004).
20. B. Halliwell, "Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now?" *J. Neurochem.*, **97**, No. 6, 1634-1658 (2006).
21. M. T. Lin and M. F. Beal, "Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases," *Nature*, **443**, No. 7113, 787-795 (2006).
22. D. Pratico, "Evidence of oxidative stress in Alzheimer's disease brain and antioxidant therapy: lights and shadows," *Ann. New York Acad. Sci.*, **1147**, 70-78 (2008).
23. X. Wang and E. K. Michaelis, "Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain," *Front. Aging Neurosci.*, **2**, 12 (2010).
24. Y. Salyha, V. Rosalovsky, and R. Fedyakov "Glutathione system in erythrocytes of rats intoxicated by chlorpyrifos," *Visn. Lviv Univ. Biol. Ser.* [in Ukrainian], Is. 60, 99-104 (2012).
25. A. Caughlan, K. Newhouse, U. Namgung, et al., "Chlorpyrifos induces apoptosis in rat cortical neurons that is regulated by a balance between p38 and ERK/JNK MAP kinases," *Toxicol. Sci.*, **78**, No. 1, 125-134 (2004).
26. S. J. Garcia, F. J. Seidler, D. Qiao, et al., "Chlorpyrifos targets developing glia: effects on glial fibrillary acidic protein," *Brain Res. Dev. Brain Res.*, **133**, 151-161 (2002).
27. T. Buerli, C. Pellegrino, K. Baer, et al., "Efficient transfection of DNA or shRNA vectors into neurons using magnetofection," *Nat. Protocols*, **2**, 3090-3101 (2007).
28. A. Ivanov, C. Pellegrino, S. Rama, et al., "Opposing role of synaptic and extrasynaptic NMDA receptors in regulation of the ERK activity in cultured rat hippocampal neurons," *J. Physiol.*, **572**, No. 3, 789-798 (2006).
29. C. Pellegrino, O. Gubkina, H. Becq, et al., "Knocking-down of the KCC2 in rat hippocampal neurons increases intracellular chloride concentration and compromises neuronal survival," *J. Physiol.*, **589**, Part 10, 2475-2496 (2011).
30. S. M. Mense, A. Sengupta, C. Lan, et al., "The common insecticides cyfluthrin and chlorpyrifos alter the expression of a subset of genes with diverse functions in primary human astrocytes," *Toxicol. Sci.*, **93**, No. 3, 125-135 (2006).
31. W. Li and J. E. Casida, "Organophosphorus neuropathy target esterase inhibitors selectively block outgrowth of neurite-like and cell processes in cultured cells," *Toxicol. Lett.*, **98**, No. 3, 139-146 (1998).
32. D. Qiao, F. J. Seidler, and T. A. Slotkin, "Developmental neurotoxicity of chlorpyrifos modeled *in vitro*: comparative effects of metabolites and other cholinesterase inhibitors on DNA synthesis in PC12 and C6 cells," *Environ. Health Perspect.*, **109**, No. 9, 900-913 (2001).
33. D. Qiao, F. J. Seidler, T. A. Slotkin, "Oxidative mechanisms contributing to the developmental neurotoxicity of nicotine and chlorpyrifos," *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **206**, No. 1, 17-26 (2006).
34. C. Behl, F. Lezoualc'h, T. Trapp, et al., "Glucocorticoids enhance oxidative stress-induced cell death in hippocampal neurons *in vitro*," *Endocrinology*, **138**, No. 1, 101-106 (1997).