

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ  
ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ  
ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΥΓΙΕΙΝΗ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕ ΤΙΤΛΟ:**

**Επίδραση της μακροχρόνιας έκθεσης υποτοξικών δόσεων του  
οργανοφωσφορικού chlorpyrifos στο κεντρικό και περιφερικό  
νευρικό σύστημα νεαρών ενήλικων μυών**

**ΑΓΓΕΛΙΚΗ ΘΕΟΔΩΡΟΥ ΓΙΑΝΝΑΚΟΠΟΥΛΟΥ**  
*Πτυχιούχος της Κτηνιατρικής Σχολής  
του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης*

**2011**

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ  
ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ  
ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΥΓΙΕΙΝΗ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕ ΤΙΤΛΟ:**

**Επίδραση της μακροχρόνιας έκθεσης υποτοξικών δόσεων του  
οργανοφωσφορικού chlorpyrifos στο κεντρικό και περιφερικό  
νευρικό σύστημα νεαρών ενήλικων μυών**

**ΑΓΓΕΛΙΚΗ ΘΕΟΔΩΡΟΥ ΓΙΑΝΝΑΚΟΠΟΥΛΟΥ**  
*Πτυχιούχος της Κτηνιατρικής Σχολής  
του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης*

**2011**

Τριμελής Επιτροπή

A. Καθηγητής Τόντης Δημήτριος,

Επιβλέπων

E. Καθηγητής Μηνάς Αναστάσιος

Μέλος Τριμελούς Επιτροπής

E. Καθηγήτρια Γκορτζή Όλγα

Μέλος Τριμελούς Επιτροπής

## ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕ ΤΙΤΛΟ:

### **Επίδραση της μακροχρόνιας έκθεσης υποτοξικών δόσεων του οργανοφωσφορικού chlorpyrifos στο κεντρικό και περιφερικό νευρικό σύστημα νεαρών ενήλικων μυών**

#### Περίληψη

Τα μισά περίπου από τα οργανικά παρασιτοκτόνα που χρησιμοποιούνται σήμερα ανήκουν στην κατηγορία των οργανοφωσφορικών (ΟΦ), με κύριο αντιπρόσωπό τους το chlorpyrifos (CPF). Η κυριότερη παρενέργεια από την εφαρμογή του είναι η οξεία του τοξικότητα με συμπτωματολογία υπερδιέγερσης των νικοτινικών και μουσκαρινικών υποδοχέων. Εκτός από την οξεία υπάρχει και η χρόνια τοξικότητα μετά από παρατεταμένη έκθεση. Άτομα που εκτέθηκαν επανειλημμένα σε χαμηλές δόσεις CPF, χωρίς να εκδηλώσουν χολινεργικά συμπτώματα, εμφάνισαν διαταραχές συμπεριφοράς, πολυνευροπάθειες, επιδείνωση νευρολογικών νοσημάτων και διαταραχές στην εγκεφαλική ανάπτυξη.

Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκαν οι επιπτώσεις της μακροχρόνιας έκθεσης υποτοξικών δόσεων του CPF στην συμπεριφορά, στην λειτουργική ακεραιότητα του ΝΣ και στην νευρογένεση στον ενήλικο εγκέφαλο σε νεαρούς ενήλικες μύες. Στους μύες χορηγούνταν καθημερινά υποδόρια το CPF, στην υποτοξική δόση των 5 mgr/kg, για χρονικό διάστημα ενός μήνα, ο οποίος αντιστοιχεί σε 4-5 ανθρωποέτη, ενώ χρησιμοποιήθηκε και μια ομάδα μυών στους οποίους χορηγήθηκε ο διαλύτης του CPF, το διμεθυλσουλφοξείδιο, σαν ομάδα ελέγχου. Τρεις επαναλήψεις του ίδιου πειραματισμού επιτεύχθηκαν για να εξασφαλιστεί η επαναληπτικότητα των αποτελεσμάτων.

Προκειμένου να εκτιμηθεί και ποσοτικοποιηθεί η κινητικότητα και η αισθητικότητα τα πειραματόζωα εξετάστηκαν πριν από την έναρξη, στο μέσο και με το πέρας του πειραματισμού με μια σειρά από τα κλινικές δοκιμές: δοκιμή σύγκλισης των οπίσθιων άκρων κατά την πτώση (Landing footsplay), ανάλυση στα ίχνη των πελμάτων κατά τη βάδιση (Footprint analysis), δοκιμή δύναμης της χειρολαβής (Grip strength), δοκιμή ανάρτησης του σώματος (Body suspension test), δοκιμή της θερμαινόμενης πλάκας (Hot plate test) και δοκιμή απόκρισης σε μηχανικό ερέθισμα von Frey (Frey hair pinch test). Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων των δοκιμών αποκάλυψε διαταραχές στον βηματισμό, στο συγχρονισμό των κινήσεων και στην ικανότητα ισορροπίας, ενώ σημειώθηκαν και αισθητικές διαταραχές όπως μηχανική αλλοδυνία και υπεραισθητικότητα.

Η ιστολογική μελέτη με τη βοήθεια των χρώσεων Kluver-Barrera και τροποποιημένη Bielshowskey αποκάλυψε νευρωνοπάθεια και ήπια αστροκυττάρωση στον Κεντρικό νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ) και αξονοπάθεια στα ισχιακά νευρα των ζώων που έλαβαν το ΟΦ, ενώ στα ίδια ζώα ανοσοϊστοχημικά επίσης διαπιστώθηκε και συναπτοπάθεια. Επιπλέον ανιχνεύθηκαν αποπτωτικοί νευρώνες κυρίως στα ραχιαία κέρατα του νωτιαίου μυελού και σε πυρήνες του εγκεφαλικού στελέχους, υποδηλώνοντας ότι η μακροχρόνια έκθεση στον ΟΦ παράγοντα CPF καθιστά τα νευρικά κύτταρα ευάλωτα στον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο.

Τέλος, μελετήσαμε την επίδραση της μακροχρόνιας έκθεσης στο ΟΦ CPF, στην νευρογένεση στον ενήλικο εγκέφαλο, χρησιμοποιώντας ένα ανάλογο της θυμιδίνης, που έχει την ικανότητα να ενσωματώνεται στα διαιρούμενα κύτταρα και να ανιχνεύεται ανοσοϊστοχημικά. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν τέσσερις εγχύσεις BrdU (δόση 75 mg/kg), ανά δύο ώρες διαστήματα την προηγούμενη μέρα από τη θανάτωση των πειραματοζώων. Με την εφαρμογή ανοσοϊστοχημικών χρώσεων έναντι της BrdU, καθώς και έναντι της doublecortin, μιας πρωτεΐνης που απαντάται στους νευροβλάστες, διαπιστώθηκε μείωση του αριθμού των νεοπαραχθέντων κυττάρων στην οδοντωτή έλικα του υποκάμπειου σχηματισμού, μια εγκεφαλική περιοχή που συνδέεται κατεξοχήν με τις γνωστικές λειτουργίες μνήμης και μάθησης.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης συνηγορούν υπέρ της άποψης ότι η μακροχρόνια έκθεση σε ΟΦ παράγοντες, σε επίπεδα κάτω από το ανιχνεύσιμο όριο και την εμφάνιση χολινεργικών συμπτωμάτων, ενέχει τον κίνδυνο εμφάνισης κινητικών και αισθητικών διαταραχών και είναι ικανή να εξασθενίσει την φυσιολογική ενήλικο νευρογένεση, με επακόλουθες συνέπειες στις γνωστικές λειτουργίες. Οι διαταραχές αυτές μπορεί να είναι το αποτέλεσμα δομικών ή χημικών μεταβολών στις χολινεργικές οδούς του νευρικού συστήματος που επάγει το ΟΦ CFP, σαν αποτέλεσμα των εναλλαγών στους ρυθμούς αγωγής των νευρικών ώσεων που επιφέρει.

Περιεχόμενα	
Ευχαριστίες .....	I
Κατάσταση Διαγραμμάτων .....	II
Κατάσταση πινάκων .....	II
Κατάσταση εικόνων .....	II
Εισαγωγή .....	1
Γενικά.....	1
Φαρμακοκινητικά χαρακτηριστικά του <i>chlorpyrifos</i> .....	3
Υλικά και μέθοδοι.....	6
Χρησιμοποιηθέντα πειραματόζωα.....	6
Δραστική ουσία και δοσολογία.....	6
Πειραματικός σχεδιασμός.....	6
Έλεγχος της γενικής συμπεριφοράς και φυσικής κατάστασης των πειραματόζωων .....	7
Έλεγχος της κινητικότητας των ζώων του πειράματος .....	8
Δοκιμές ελέγχου της αισθητικότητας των ζώων του πειράματος.....	9
Σήμανση των νεοπαραχθέντων κυττάρων .....	10
Μονιμοποίηση και επεξεργασία των ιστών.....	11
Επεξεργασία των ιστών και λήψη των τομών .....	11
Ιστολογικές χρώσεις .....	12
Χρώση Αιματοξυλίνης –Εωσίνης (H&E) .....	12
Χρώση τροποποιημένη Bielschowski.....	13
Χρώση Klüver-Barrera.....	13
Χρώση τροποποιημένη Gallyas.....	14
Ανοσοϊστοχημικές χρώσεις .....	14
Χρησιμοποιηθέντα πρώτα αντισώματα .....	15
Χρησιμοποιηθέντα δεύτερα αντισώματα .....	17
Η διαδικασία των ανοσοϊστοχημικών χρώσεων.....	18
Μικροσκοπική παρατήρηση των τομών.....	19
Στατιστική ανάλυση.....	19
Αποτελέσματα.....	21
Κλινική εικόνα των ζώων του πειράματος.....	21
Γενικές παρατηρήσεις .....	21
Επιπτώσεις στην κινητικότητα των μυών ύστερα από μακροχρόνια έκθεση σε υποτοξικές δόσεις του <i>chlorpyrifos</i> .....	21
Επιπτώσεις στην αισθητικότητα των μυών ύστερα από μακροχρόνια έκθεση σε υποτοξικές δόσεις του <i>chlorpyrifos</i> .....	30
Ιστολογικές αλλοιώσεις στο ΚΝΣ και στα περιφερικά νεύρα .....	33
Αστρογλοίωση και κυτταροπλασματικά έγκλειστα σε διάφορες περιοχές του εγκεφάλου.....	36
Μελέτη της απόπτωσης και της συναπτοπάθειας στο ΚΝΣ.....	39
Επίδραση του <i>chlorpyrifos</i> στην νευρογένεση στον ενήλικο εγκέφαλο .....	44
Συζήτηση .....	48
Πολυνευροπάθειες επαγόμενες από τα ΟΦ .....	48
Συσχέτιση της μακροχρόνιας έκθεσης σε ΟΦ με την εμφάνιση Παρκινσονισμού .....	49
Η μακροχρόνια έκθεση στα ΟΦ επιφέρει διαταραχές στις γνωστικές λειτουργίες .....	50
Τα ΟΦ διαταράσσουν τους φυσιολογικούς ρυθμούς παραγωγής νέων νευρικών και νευρογλοιακών κυττάρων.....	52
Βιβλιογραφία .....	54

## Ευχαριστίες

Η εργασία αυτή είναι το αποτέλεσμα μιας συνεργασίας μεταξύ του Εργαστηρίου Ανατομικής και Ιστολογίας της Κτηνιατρικής Σχολής του Α.Π.Θ. με το Εργαστήριο της Παθολογικής Ανατομικής της Κτηνιατρικής Σχολής της Λάρισας και το Εργαστήριο Υγιεινής και Επιδημιολογίας της Ιατρικής Σχολής της Λάρισας. Στην προσπάθεια αυτή ανεκτίμητη ήταν η συμπαράσταση και καθοδήγηση του καθηγητή Ανατομικής και Ιστολογίας κ. Παπαδόπουλου Γεώργιου και του Αναπληρωτή καθηγητή της Παθολογικής Ανατομικής της Κτηνιατρικής σχολής της Λάρισας κ. Δ. Τόντη στους οποίους εκφράζω τις ευχαριστίες μου για τις εποικοδομητικές παρατηρήσεις τους και τις πολύτιμες συμβουλές τους για την ολοκλήρωσή της.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στην επίκουρη καθηγήτρια Ανατομικής και Ιστολογίας της Κτηνιατρικής Σχολής κ. Αναστασία Τσιγκοτζίδου για την πολύτιμη συνεισφορά της στον πειραματικό σχεδιασμό και στην υλικοτεχνική υποστήριξη της πειραματικής διαδικασίας της παρούσας μελέτης, στην παροχή πολύτιμων γνώσεων σχετικά με την νευροπαθολογία του περιφερικού συστήματος, καθώς και στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων και τη συγγραφή αυτής της εργασίας.

Ευχαριστώ επίσης την αναπληρώτρια καθηγήτρια κ. Ι. Δωρή για την συμβολή της στην μελέτη της απόπτωσης στα ιστολογικά παρασκευάσματα και την περάτωση της παρούσας μελέτης.

Θερμά ευχαριστώ την επιστημονική συνεργάτιδα και υποψήφια διδάκτορα του εργαστηρίου Ανατομικής και Ιστολογίας της Κτηνιατρικής Σχολής του Α.Π.Θ., κ. Μπεκιάρη Χρυσάνθη για τη σημαντική βοήθειά της στην εκτέλεση του πειραματικού μέρους της μελέτης αυτής. Ευχαριστίες οφείλω και στα μέλη του εργαστηρίου της Ανατομικής και Ιστολογίας της Κτηνιατρικής Σχολής του Α.Π.Θ. ιδιαίτερα στην κ. Χιωτέλη Μ. και Δρόσο Χρυσέλη, για την τεχνική τους υποστήριξη, τις σημαντικές υποδείξεις και συμβουλές τους.

## **Κατάσταση Διαγραμμάτων**

Γράφημα 1 .....	22
Γράφημα 2 .....	24
Γράφημα 3 .....	27
Γράφημα 4 .....	29
Γράφημα 5 .....	30
Γράφημα 6 .....	32
Γράφημα 7 .....	33
Γράφημα 8 .....	45

## **Κατάσταση πινάκων**

Πίνακας 1 Χρησιμοποιηθέντα πρώτα αντισώματα .....	17
Πίνακας 2 Συγκεντρωτικός πίνακας των αποτελεσμάτων της δοκιμής Body Suspension .....	22
Πίνακας 3 Συγκεντρωτικός πίνακας των αποτελεσμάτων της δοκιμής Grip Strength ....	23
Πίνακας 4. Συγκεντρωτικός πίνακας των αποτελεσμάτων της δοκιμής Landing foot splay .....	28
Πίνακας 5. Συγκεντρωτικός πίνακας των αποτελεσμάτων της δοκιμής Von Frey-hair pinch .....	31
Πίνακας 6 Συγκεντρωτικός πίνακας των νεοπαραχθέντων κυττάρων .....	45

## **Κατάσταση εικόνων**

Εικόνα 1 .....	25
Εικόνα 2 .....	34
Εικόνα 3 .....	36
Εικόνα 4 .....	38
Εικόνα 5 .....	38
Εικόνα 6 .....	40
Εικόνα 7 .....	41
Εικόνα 8 .....	42
Εικόνα 9 .....	46
Εικόνα 10 .....	47



## Εισαγωγή

### Γενικά

Τα μισά περίπου από τα οργανικά παρασιτοκτόνα που χρησιμοποιούνται σήμερα ανήκουν στην κατηγορία των οργανοφωσφορικών (ΟΦ). Το περισσότερο ίσως ευρέως χρησιμοποιούμενο ΟΦ παρασιτοκτόνο παγκοσμίως, αλλά και στην χώρα μας είναι το chlorpyrifos (CPF). Είναι πολύ δραστικό, αποικοδομείται και μεταβολίζεται γρήγορα και δεν βιοσυσσωρεύεται στους ιστούς. Η κυριότερη παρενέργεια από την εφαρμογή του είναι η χολινεργική του τοξικότητα σε οξεία δηλητηρίαση. Η οξεία τοξικότητά των ΟΦ οφείλεται στο ότι αναστέλλουν το ένζυμο ακετυλοχολινεστεράση (AChE) που εντοπίζεται στις νευρικές απολήξεις και έτσι προκαλείται συσσώρευση του νευροδιαβιβαστή ακετυλοχολίνη (ACh), που οδηγεί σε υπερδιέγερση των νικοτινικών και μουσκαρινικών υποδοχέων στο κεντρικό (ΚΝΣ) και περιφερικό νευρικό σύστημα (ΠΝΣ) με τα επακόλουθα κλινικά συμπτώματα. Κατά καιρούς έχουν αναφερθεί χιλιάδες οξείες δηλητηριάσεις από τα ΟΦ, η πλειονότητά των οποίων σχετιζόταν με αυτοκτονίες ή ατυχήματα, ενώ λιγότερες ήταν επαγγελματικές (Moretto and Lotti 1993).

Εκτός από την οξεία τοξικότητα αναφέρεται και η χρόνια τοξικότητα των ΟΦ παρασιτοκτόνων μετά από παρατεταμένη έκθεση. Άτομα που εκτέθηκαν επανειλημμένα σε χαμηλές δόσεις ΟΦ, χωρίς να εκδηλώσουν χολινεργικά συμπτώματα, εμφάνισαν μετά από κάποιο χρονικό διάστημα, διαταραχές στην ικανότητα συγκέντρωσης, επίλυσης προβλημάτων, οπτικής προσοχής, αλλά και γνωστικές διαταραχές όπως εξασθένιση μνήμης, μείωση της ταχύτητας εκτέλεσης εργασιών, μεταβολές της διάθεσης και συμπεριφοράς, όπως αϋπνία, κατάθλιψη, απώλεια προσανατολισμού κ.α. (Lotti et al., 1993; Rodnitzky 1975). Οι παραπάνω διαταραχές οφείλονται κατά κύριο λόγο στο ότι τα ΟΦ προκαλούν μόνιμη εκφύλιση του σεροτονινεργικού συστήματος των πυρήνων του ραβδωτού σώματος του εγκεφάλου, ακόμα και σε υποτοξικές δόσεις (Hancock et al., 2007; Pung et al., 2006). Η μειωμένη λειτουργία του σεροτονινεργικού συστήματος αποτελεί το ορόσημο της κατάθλιψης καθώς και της εμφάνισης καταναγκαστικών και παρορμητικών συμπεριφορών (London et al., 2005; Roldan-Tapia et al., 2006). Ειδικότερα για το ΟΦ CPF στην βιβλιογραφία υπάρχουν αρκετές αναφορές ότι προκαλεί ακόμα και σε υποτοξικές δόσεις μόνιμες μεταβολές του σεροτονινεργικού συστήματος που σχετίζονται με την κατάθλιψη και την εκδήλωση αγχωτικής συμπεριφοράς (Moreno et al., 2008; Sanchez-Amate et al., 2001).

Η έκθεση στα ΟΦ έχει επίσης σχετιστεί με συμπτώματα Παρκινσονισμού ή ακόμα και με την εμφάνιση της νόσου αυτής (Gorell et al., 1998; Salvi et al., 2003; Senanayake and Sanmuganathan 1995) μιας και έχει βρεθεί ότι τα ΟΦ ασκούν κυτταροτοξικότητα στους δοπαμινεργικούς νευρώνες του εγκεφάλου. Επίσης, ακόμα και σε σχετικά χαμηλές δόσεις, υπερρυθμίζουν την μεταφορά της δοπαμίνης από τους δοπαμινεργικούς νευρώνες της μέλαινας ουσίας στα συναπτικά κυστίδια στο ραβδωτό σώμα (Bloomquist et al., 2002). Η νόσος Parkinson (PD) άλλωστε, είναι κυρίως το αποτέλεσμα της εκφύλισης των δοπαμινεργικών ινών που συνιστούν τη μελαινοραβδωτή νευρική οδό του εγκεφάλου. Ο ακριβής μηχανισμός πρόκλησης βλαβών στο δοπαμινεργικό σύστημα του εγκεφάλου δεν έχει ακόμα τεκμηριωθεί, ενώ στη σύγχρονη βιβλιογραφία υπάρχει ένδεια μελετών για τις μακροπρόθεσμες επιπτώσεις των ΟΦ στο σύστημα αυτό.

Πέρα από την προσβολή βασικών νευρωνικών δικτύων του ΚΝΣ, τα ΟΦ προσβάλλουν και το ΠΝΣ. Τα ΟΦ εμπλέκονται στην πρόκληση, πολυνευροπαθειών (επιβραδυμένου τύπου, επαγόμενες από τα ΟΦ πολυνευροπάθειες ή OP-induced delayed polyneuropathy, OPIDP) που χαρακτηρίζονται από χαλαρή παράλυση των οπίσθιων (κάτω) και σε ακόμα βαρύτερες κατάστασεις των πρόσθιων (άνω) άκρων. Παθογενωμονική ιστοπαθολογική αλλοίωση στις πολυνευροπάθειες OPIDP είναι η αξονική νευροεκφύλιση των απομακρυσμένων τμημάτων των μακριών και μεγάλου διαμετρήματος νευραξόνων στα νεύρα, ενώ σε σοβαρές περιπτώσεις προσβάλλεται και ο νωτιαίος μυελός. Ο πιθανός στόχος στις πολυνευροπάθειες OPIDP είναι μια πρωτεΐνη μη συσχετιζόμενη με την AChE, που καλείται εστεράση-στόχος νευροπάθειας (neuropathy target esterase, NTE). Σε πειραματόζωα, η αναστολή της NTE >75% σε οξεία δηλητηρίαση, προδικάζει την εμφάνιση OPIDP 10–20 μέρες μετά (Moretto et al., 1991; Moretto and Lotti 1993; Moretto and Lotti 1998). Είναι αξιοσημείωτο ότι σε μια έρευνα που πραγματοποιήθηκε σε ανθρώπους, κάποιοι ασθενείς εμφάνισαν αισθητική νευροπάθεια ύστερα από επαναλαμβανόμενη, χαμηλής δόσης (αν και μη ποσοτικοποιημένη) έκθεση στο CPF, η οποία δεν προκάλεσε εμφανή χολινεργική τοξικότητα (Kaplan et al., 1993). Επιπλέον πρόσφατα παρατηρήθηκε ότι κάποια ΟΦ, όπως το CPF, επιδεινώνουν ή επιταχύνουν την κλινική εκδήλωση κάποιας νευρολογικής προσβολής του ΠΝΣ. Αυτό το φαινόμενο ονομάστηκε προαγωγή των αξονοπαθειών (Lotti et al., 1991; Moretto and Lotti 1993; Moretto and Lotti 1998; Pope and Padilla 1990) και έχει παρατηρηθεί κατά κύριο λόγο σε πειραματόζωα.

Τέλος, σύγχρονες μελέτες υποστηρίζουν ότι τα ΟΦ έχουν δυσμενείς επιδράσεις στην ανάπτυξη του νευρικού συστήματος και μάλιστα σε συγκεντρώσεις πολύ μικρότερες από εκείνες που απαιτούνται για να εμφανιστούν συμπτώματα τοξίκωσης. Μάλιστα τα ΟΦ φαίνεται πως επηρεάζουν την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος όχι με έναν, αλλά με πολλαπλούς μηχανισμούς όπως είναι μέσω οξειδωτικού στρες, διαταράσσοντας τους καταρράκτες κυτταρικής σηματοδότησης, παρεμβαίνοντας στην έκφραση και λειτουργία πυρηνικών μεταγραφικών παραγόντων και μεταβάλλοντας τις αλληλεπιδράσεις νευρικών και νευρογλοιακών κυττάρων. Η ουδός ενεργοποίησης των μηχανισμών αυτών στον αναπτυσσόμενο εγκέφαλο απαιτεί συγκεντρώσεις ΟΦ πολύ χαμηλότερες από αυτές που απαιτούνται για την ανίχνευση της έκθεσης του πληθυσμού με μέτρηση της ενεργότητας της AChE (Whitney (Campbell et al., 1997; Slotkin and Seidler 2005; Slotkin and Seidler 2007; Slotkin et al., 2007; Whitney et al., 1995). Αυτό σημαίνει ότι μπορούν να συμβούν ανεπανόρθωτες βλάβες στον εγκέφαλο εμβρύων και νεογεννήτων χωρίς να υπάρχουν ενδείξεις ότι έχει συμβεί έκθεση στον παράγοντα αυτό.

Από τα παραπάνω γίνεται σαφές ότι τα ΟΦ παρασιτοκτόνα, ελλοχεύουν πολύ περισσότερους κινδύνους για την ανθρώπινη υγεία από αυτούς που πιστευόταν αρχικά. Μάλιστα οι κίνδυνοι δεν φαίνεται να είναι τόσο σπάνιοι αφού ελλοχεύουν μετά από έκθεση σε χαμηλές δόσεις, αν και μακροχρόνιας έκθεσης. Λαμβάνοντας υπόψη την εκτεταμένη χρήση των ΟΦ και την αύξηση του προσδόκιμου επιβίωσης στο σύγχρονο κόσμο, η εκτίμηση της επικινδυνότητας ενός παρασιτοκτόνου παράγοντα, που χρησιμοποιείται στη γεωργο-κτηνοτροφία, πρέπει να λαμβάνει υπόψη την μακροχρόνια επίδρασή του στον πληθυσμό, ακόμα και αν δεν βιοσυσσωρεύεται. Στην παρούσα μελέτη θα διερευνηθούν οι επιπτώσεις της μακροχρόνιας έκθεσης υποτοξικών δόσεων του ΟΦ CPF στο ΚΝΣ και ΠΝΣ νεαρών ενήλικων μυών με απώτερο σκοπό να προβλεφθούν οι επιπτώσεις στον ανθρώπινο πληθυσμό. Ακόμα από τα αποτελέσματα

της μελέτης αυτής θα εξαχθούν συμπεράσματα για τον βαθμό και τον τρόπο κατά τον οποίο η μακροχρόνια έκθεση επηρεάζει τις νευρικές και νοητικές λειτουργίες.

### ***Φαρμακοκινητικά χαρακτηριστικά του chlorpyrifos***

Μέχρι σήμερα διάφορες εργασίες, έχουν μελετήσει την τοξικότητα και τα φαρμακοκινητικά χαρακτηριστικά του CPF χρησιμοποιώντας διαφορετικούς οδούς χορήγησης και τρόπους έκθεσης (Breslin et al., 1996; Howard et al., 2007; Karanth et al., 2006; Karanth and Pope 2003; Marty et al., 2007; Moser and Padilla 1998; Slotkin et al., 2006; Timchalk et al., 2002; Whitney et al., 1995; Won et al., 2001). Ανεξάρτητα από την οδό χορήγησης μόλις το CPF εισέλθει στο σώμα μεταβολίζεται με δύο διαφορετικά μονοπάτια. Ένζυμα του κυτοχρώματος P450 (CYP) οξειδώνουν το CPF σε ένα ενδιάμεσο μεταβολίτη το phosphooxythiiran intermediate. Αυτός εν συνεχεία αποδιατάσσεται είτε για να υποστεί οξειδωτική αποθείωση και να σχηματιστεί το οξόνιο του CPF (CPF-oxon), που αποτελεί τη δραστική τοξική ουσία που δεσμεύει την AchE, αναστέλλοντας τη δράση της, είτε για να υποστεί διαχωρισμό του αρωματικού δακτυλίου μέσω των εστερασών A και B σχηματίζοντας δύο νέους μεταβολίτες το 3,5,6- trichloro-2-pyridinol (TCPy) και το diethylthiophosphate (DETP). Το CPF-oxon με τη σειρά του μπορεί να μεταβολιστεί από ηπατικές και εξωηπατικές εστεράσες, όπως η παραοξονάση-1 (PON-1) και ιστικές β- εστεράσες (χολινεστεράσες) για να σχηματιστεί το TCPy και το DETP (Chanda et al., 1997; Kamataki et al., 1976; Pond et al., 1998; Sultatos 1994).

Το CPF μεταβολίζεται ταχύτατα καθώς ο μεταβολίτης του TCPy ανιχνεύεται στο αίμα μέσα σε 5 λεπτά ανεξάρτητα από την οδό χορήγησης (από το στόμα, υποδόρια ή ενδοφλέβια) ενώ ένα σημαντικό κλάσμα της χορηγούμενης δόσης (που κυμαίνεται από 15-85% ανάλογα της οδού χορήγησης) ανιχνεύεται στα ούρα μέσα σε 12 ώρες από την στιγμή της αρχικής χορήγησης. Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις στο αίμα του μεταβολίτη TCPy καθώς και το υψηλότερο ποσοστό απέκκρισης της χορηγούμενης δόσης με τα ούρα ανιχνεύονται όταν χρησιμοποιείται η από του στόματος χορήγηση του CPF, και μάλιστα όταν σαν διαλυτικό μέσο χρησιμοποιείται ο φυσιολογικός ορός/Tween 20 παρά σαν διαλύτης κάποιο ελαιώδες μέσο. Συνεπώς το CPF μεταβολίζεται και αποβάλλεται πιο γρήγορα από το σώμα όταν χορηγείται από το στόμα, σε σχέση με άλλους οδούς χορήγησης όπως η υποδόρια και ενδοφλέβια (Smith et al., 2009). Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι στην από του στόματος χορήγηση το CPF μεταβολίζεται εκτεταμένα στο έντερο και στο ήπαρ πριν κατανεμηθεί σε ολόκληρο το σώμα. Κάτι τέτοιο άλλωστε είναι αναμενόμενο καθώς κατά την συστηματική χορήγηση (υποδόρια και ενδοφλέβια), μόνο το 25% της καρδιακής αιματικής παροχής ρέει προς το ήπαρ στα περισσότερα ζώα (επίμυς). Στο ρυθμό απορρόφησης/μεταβολισμού σημαντικό ρόλο παίζει και το μέσο διάλυσης, καθώς όταν χρησιμοποιείται ως μέσο έλαιο έναντι του υδάτινου μέσου επιβραδύνεται ο ρυθμός απορρόφησης του από το έντερο και ο μεταβολισμός του (Staats et al., 1991; Withey et al., 1983).

Όσον αφορά την υποδόρια έκθεση στο CPF, η μέγιστη συγκέντρωση του μεταβολίτη TCPy, επιτυγχάνεται σε μικρότερο χρόνο στο πλάσμα του αίματος όταν χρησιμοποιείται σαν μέσο το καλαμποκέλαιο, παρά το διμεθυλσουλφοξείδιο (DMSO). Στην τελευταία περίπτωση η μέγιστη συγκέντρωση στο αίμα παρατηρείται 6 ώρες μετά την υποδόρια χορήγηση (Marty et al., 2007). Καθώς το DMSO απορροφάται ταχέως από το σώμα, αφήνει ένα μέρος του CPF στο σημείο έγχυσης, προκαλώντας μια βραδύτερη

απελευθέρωσή του και συνεπώς ένα βραδύτερο μεταβολισμό του. Επιπρόσθετα, μόνο το 44% του CPF απεκκρίνεται με τα ούρα μέσα σε 48 ώρες όταν χορηγείται υποδόρια με DMSO, ενώ αντίθετα όταν χορηγείται από το στόμα έχει σχεδόν πλήρως απεκκριθεί μέσα στο ίδιο χρονικό διάστημα (48 ώρες). Συνεπώς, στην από του στόματος χορήγηση το CPF υφίσταται πιο έντονο και εκτεταμένο μεταβολισμό από άλλες οδούς χορήγησης, άρα για τις ίδιες δόσεις το συνολικό φορτίο του στο σώμα είναι μικρότερο. Αντίθετα στην υποδόρια χορήγηση πέρα από την παρατεταμένη απελευθέρωση του από το σημείο έγχυσης είναι βραδύτερος και ο μεταβολισμός και παρατηρούνται υψηλότερα επίπεδα συγκεντρώσεώς του στο αίμα σε σχέση με την από του στόματος χορήγησή του.

Αναφορικά με την αναστολή στην ενεργότητα της AChE αυτή είναι ταχύτερη και μεγαλύτερη στην από του στόματος χορήγηση (λόγω του αυξημένου μεταβολισμού του CPF όχι μόνο σε TCPy αλλά και σε CPF-oxon) από ότι στην υποδόρια. Αντίθετα είναι περισσότερο παρατεταμένη όταν το CPF χορηγείται υποδόρια είτε σε έλαιο είτε σε DMSO, παρά στην από του στόματος χορήγηση (Smith et al., 2009). Όλες οι παραπάνω μελέτες συνολικά υπογραμμίζουν ότι οι ίδιες δόσεις με διαφορετικούς οδούς χορήγησης οδηγούν σε διαφορετική επιβάρυνση του CPF στο σώμα, σε διαφορετικούς ρυθμούς απορρόφησης /μεταβολισμού και βιοδραστικότητας του CPF-oxon και συνεπώς σε διαφορετικές τοξικές επιδράσεις. Αυτό αποκτά ιδιαίτερη σημασία καθώς θα πρέπει να είμαστε πολύ προσεκτικοί όταν συγκρίνουμε διάφορες εργασίες που χρησιμοποιούν διαφορετικούς οδούς χορήγησης του CPF για την εξαγωγή συμπερασμάτων και την εκτίμηση της επικινδυνότητας του ΟΦ αυτού παράγοντα στον ανθρώπινο πληθυσμό.

Η κύρια οδός απέκκρισης είναι με τα ούρα, τόσο στον άνθρωπο όσο και στα τρωκτικά. Ο άνθρωπος απεκκρίνει με τα ούρα το 70% της χορηγούμενης per os δόσης, ενώ οι επίμυες το 90%. Ο χρόνος ημίσειας ζωής του CPF στο ανθρώπινο σώμα είναι 26,9 ώρες, ενώ όπως ήδη αναφέρθηκε γρήγορα μεταβολίζεται σε TCPy τόσο στον άνθρωπο και τους επίμυες. Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις του, ανιχνεύονται στο ήπαρ και τους νεφρούς, αλλά δεν βιοσυσσωρεύεται στους ιστούς. Στις γίδες λιγότερο από το 0,1% της χορηγούμενης δόσης ανιχνεύτηκε στο γάλα.

Το CPF ανήκει στην κατηγορία II των παρασιτοκτόνων με LD50 για από του στόματος χορήγηση στους αρουραίους να κυμαίνεται από 69 έως 276 mg/kg. Όταν χορηγείται από το στόμα δεν προκαλεί καρκινογένεση τόσο στους αρουραίους, όσο και στα ποντίκια. Επίσης ύστερα από διάφορες πειραματικές μελέτες, δεν υπάρχουν ενδείξεις για μεταλλαξιογόνο δράση του ΟΦ αυτού τόσο σε βακτήρια όσο και σε κύτταρα ωοθηκών των hamsters, ούτε προκαλεί χρωμοσωμική βλάβη ή βλάβη στο DNA.

Μακροχρόνια διατροφική έκθεση αρουραίων στα 10 mg/kg/ημέρα είχε σαν αποτέλεσμα αξιοσημείωτη μείωση του σωματικού τους βάρους, ενώ η κυριότερη μετρήσιμη επίδραση σε μακροχρόνια έκθεση σε πειραματόζωα ήταν η πτώση της AChE στον εγκέφαλο, στα ερυθρά αιμοσφαίρια και στο πλάσμα του αίματος. Η δόση στην οποία δεν παρατηρήθηκε επίδραση (noobserved- effect level, NOEL) στην πτώση της χολινεστεράσης του εγκεφάλου για από του στόματος χορήγηση ήταν 1 mg/kg/ημέρα για τους επίμυες (μελέτη 2 ετών) και για τους σκύλους (μελέτη ενός έτους), ενώ η αντίστοιχη δόση για την ενεργότητα της χολινεστεράσης των ερυθροκυττάρων και του πλάσματος ήταν 0,1 και 0,05 για τους αρουραίους και 0,03 και 0,01 για τους σκύλους αντίστοιχα. Σε μια μελέτη αναφορικά με την φαρμακοκινητική του CPF στους ανθρώπους δεν παρατηρήθηκαν χολινεργικά συμπτώματα σε δόση 0.5 mg/kg, ακόμα και όταν η χολινεστεράση του πλάσματος εμφάνισε πτώση κατά 85%. Στην ίδια μελέτη

η δόση στην οποία δεν παρατηρήθηκε επίδραση (NOEL) στην πτώση της χολινεστεράσης του πλάσματος ήταν 0.03 mg/kg/ημέρα (Cochran et al., 1995).

## **Υλικά και μέθοδοι**

### ***Χρησιμοποιηθέντα πειραματόζωα***

Ο πειραματισμός διενεργήθηκε σε ενήλικες αρσενικούς μύες BalbC (3 μηνών, βάρους  $\approx 20-25$  gr) που γεννήθηκαν και μεγάλωσαν στην Μονάδα Εκτροφής Πειραματόζωων (Animal House) του Εργαστηρίου Ανατομικής, Ιστολογίας και Εμβρυολογίας της Κτηνιατρικής Σχολής του Α.Π.Θ.

Ο χώρος όπου φιλοξενήθηκαν οι μύες κατασκευάστηκε με βάση τις οδηγίες Ευρωπαϊκής Ένωσης (Official Journal of the European Communities / No L 374/11) έτσι ώστε να δημιουργεί το κατάλληλο περιβάλλον για τα στεγαζόμενα ζώα εργαστηρίου. Η θερμοκρασία του ελέγχεται μέσω αυτόνομης μονάδας κλιματισμού και είναι σταθεροποιημένη στους  $23^{\circ}\text{C}$ . Τα επίπεδα της σχετικής υγρασίας στο θάλαμο εκτροφής κυμαίνονται μεταξύ  $60\% \pm 5\%$  και διατηρούνται εντός αυτών των ορίων μέσω του συστήματος εξαερισμού. Υπάρχει ελεγχόμενος φωτισμός και τα ζώα βρίσκονται σε περιοδική 12ωρη εναλλαγή φωτός-σκότους με λαμπτήρες.

Οι μύες φιλοξενήθηκαν σε ειδικά κλουβιά με ατομικά φίλτρα για προστασία τους από πιθανά αντιγόνα του περιβάλλοντος χώρου. Τα κλουβιά ήταν κατασκευασμένα από υλικά που δεν έθεταν σε κίνδυνο την υγεία των ζώων εργαστηρίου και ήταν ανθεκτικά στις εφαρμοζόμενες τεχνικές καθαρισμού και απολύμανσης. Οι μύες λάμβαναν ειδικής διαίτας τροφή και ελεύθερο μικροβίων, πόσιμο νερό κατά βούληση καθ' όλη τη διάρκεια του πειραματισμού. Όλοι οι πειραματισμοί πριν από τη διενέργειά τους έλαβαν την έγκριση της Κτηνιατρικής Διεύθυνσης της Νομαρχιακής Αυτοδιοίκησης της Θεσσαλονίκης και εκτελέστηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες της Ελληνικής Κυβέρνησης περι χειρισμού των πειραματόζωων και σε συμμόρφωση με της οδηγίες Υγείας των Διεθνών Οργανισμών. Η μελέτη χρησιμοποίησε τον ελάχιστο απαιτούμενο αριθμό ζώων και λήφθηκαν όλα τα κατάλληλα μέτρα για να ελαχιστοποιηθεί ο οιοσδήποτε πόνος ή ενόχληση στα ζώα κατά τη διάρκεια των πειραματισμών.

### ***Δραστική ουσία και δοσολογία***

Το ΟΦ που χρησιμοποιήθηκε ήταν το chlorpyrifos (Dursban 100mgr, neat, 44-2573, Lot:LB71983, Supelco, USA). Η δόση για την *per os* χορήγηση ήταν 10 φορές χαμηλότερη από την αναφερόμενη στη βιβλιογραφία ως οξεία από του στόματος χορήγηση ( $\text{LD}_{50}$ ) και περίπου ίση με εκείνη που ενώ επηρεάζει την νευρική λειτουργία, δεν προκαλεί εμφανή συστηματική τοξικότητα ( $5\text{mgr/kg/ημέρα}$ ) (Smith et al., 2009, Garcia et al., 2002). Το ΟΦ CPF χορηγήθηκε υποδόρια ραχιαία εκατέρωθεν κατά μήκος της σπονδυλικής στήλης από τη βάση της ουράς μέχρι την αυχενική περιοχή, αφού πρώτα γινόταν διάλυση σε διμεθυλσουλφοξείδιο (DMSO) όγκου  $1\text{ml/kg}$  σωματικού βάρους (Σ.Β.), ώστε να εξασφαλίζεται πλήρη απορρόφηση.

### ***Πειραματικός σχεδιασμός***

Συνολικά χρησιμοποιήθηκαν 45 ενήλικες αρσενικοί μύες BalbC (3 μηνών, βάρους  $\approx 20-25$  gr) που χωρίστηκαν σε τρεις ομάδες των 15 μυών, που αντιστοιχούν σε τρεις

επαναλήψεις του ίδιου πειράματος. Οι μύες κάθε ομάδας άνηκαν στην ίδια τοκετοομάδα ή ήταν απόγονοι αδελφών θηλυκών γονέων και του ίδιου αρσενικού γονέα. Η κάθε ομάδα χωρίστηκε σε δύο υποομάδες: α) στη μια υποομάδα που απαρτιζόταν από 8 πειραματόζωα χορηγήθηκε το ΟΦ CPF (=experimental group), ενώ β) στην άλλη υποομάδα που απαρτιζόταν από τα υπόλοιπα πειραματόζωα της κάθε ομάδας (=7), χορηγήθηκε μόνο ο διαλύτης του ΟΦ (=control group ή ομάδα ελέγχου). Συνεπώς, η κάθε υποομάδα απαρτιζόταν από τουλάχιστον 7 πειραματόζωα, που αποτελεί ένα ικανοποιητικό δείγμα για την εξαγωγή αξιόπιστων συμπερασμάτων από την στατιστική επεξεργασία.

### ***Έλεγχος της γενικής συμπεριφοράς και φυσικής κατάστασης των πειραματοζώων***

Κατά τη διάρκεια του πειραματισμού, οι μύες ελεγχόταν καθημερινά για αλλαγές στην συμπεριφορά τους, την όρεξή τους και την απώλεια ή απόκτηση βάρους. Επισκοπούνταν επίσης για να ανιχνευθούν μη φυσιολογικά κλινικά σημεία, όπως ανόρθωση τριχώματος, αδυναμία των οπισθίων άκρων και διαταραχές του γαστρεντερικού συστήματος.

Οι δοκιμασίες που αφορούσαν τον έλεγχο της κινητικότητας και αισθητικότητας των ζώων του πειράματος επιτεύχθηκαν με συγκεκριμένη σειρά σε διάστημα δύο ημερών και έλαβαν χώρα σε συγκεκριμένες χρονικές περιόδους (πριν από την έναρξη, στο μέσο και με το πέρας του πειράματος). Μεταξύ κάθε δοκιμής παρεμβалλόταν χρονικό διάστημα τουλάχιστον μιας ώρας προκειμένου να αποφευχθεί το ενδεχόμενο τα ζώα να υφίστανται μια νέα δοκιμασία ήδη καταπονημένα. Οι περισσότερες δοκιμασίες περιλάμβαναν περισσότερο από μια επαναλήψεις προκειμένου να ελαχιστοποιηθεί η πιθανότητα υποκειμενικής παρατήρησης.

### *Έλεγχος της κινητικότητας των ζώων του πειράματος*

Για τον έλεγχο της κινητικότητας των ζώων χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθες δοκιμές:

1) Δοκιμή ανάρτησης του σώματος (Body Suspension Test). Η δομική αυτή εκτελέστηκε πριν από την έναρξη, στο μέσο και με το πέρας του πειράματος. Κάθε δοκιμή περιλάμβανε τρεις επαναλήψεις για την εξαγωγή του μέσου όρου για κάθε πειραματόζωο. Μεταξύ κάθε επανάληψης μεσολαβούσε διάστημα 30 λεπτών.

Κατά τη δοκιμή αυτή το ζώο αφηνόταν να αιωρηθεί, με τα πρόσθια άκρα του, από μια μεταλλική ράβδο διαμέτρου 2 mm και μετρούνταν ο χρόνος στον οποίο μπορούσε να παραμείνει στη ράβδο, μέχρι να χάσει τη λαβή της και να πέσει κάτω. Σε πολλές περιπτώσεις τα ζώα κουλούριαζαν το σώμα τους γύρω από την ράβδο και έστρεφαν τα οπίσθια άκρα τους προς τα πάνω ερχόμενα σε επαφή με τα ράβδο προκειμένου να σταθεροποιήσουν τη θέση του σώματός τους. Τελικά κατέληγαν συνήθως να πέφτουν αφήνοντας τη λαβή ενός εκ των δύο οπίσθιων άκρων ή ακόμα και της ουράς που ελίσσόταν γύρω από την μπάρα. Συνεπώς στη δοκιμή αυτή δεν ελέγχθηκε μόνο η κινητική ικανότητα των πρόσθιων άκρων αλλά και των οπίσθιων καθώς και η γενικότερη ικανότητα του ζώου να ισορροπεί και να συντονίζει τις κινήσεις του για να εξασφαλίσει την παραμονή του στη μεταλλική ράβδο (Metz and Schwab 2004).

2) Δοκιμή δύναμης της χειρολαβής (Grip Strength) (Authier et al., 2003; Meyer et al., 1979). Επίσης η δομική αυτή εκτελέστηκε πριν από την έναρξη, στο μέσο και με το πέρας του πειράματος. Στη δοκιμή αυτή, το ζώο συγκρατούνταν από την ουρά του και αφηνόταν να αιωρηθεί μέχρι να συλλάβει με τα δύο πρόσθια άκρα του μια ράβδο που ήταν εγκάρσια συνδεδεμένη με ένα Νιουτόμετρο (Newton metre). Αφού το ζώο είχε συλλάβει τη ράβδο, συγκρατούμενο από την ουρά και αιωρούμενο απομακρυνόταν από το Νιουτόμετρο με αργή και σταθερή ταχύτητα μέχρι τη στιγμή που θα αναγκαζόταν να αφήσει τη ράβδο. Η δύναμη λαβής που κατέγραφε το Νιουτόμετρο τη στιγμή που το ζώο έχανε την επαφή με την ράβδο καταγραφόταν από τον παρατηρητή. Η εξαγωγή του μέσου όρου για κάθε πειραματόζωο γινόταν από τρεις επαναλήψεις, μεταξύ των οποίων μεσολαβούσε χρονικό διάστημα 30 λεπτών.

Τόσο η δοκιμή αυτή όσο και η προηγούμενη (Body Suspension Test) ελέγχουν τη δύναμη των μυών των πρόσθιων και των οπίσθιων άκρων και ανιχνεύουν μεταβολές στην κινητική λειτουργία. Ειδικά επειδή η δοκιμή της δύναμης της χειρολαβής εξαρτάται από τον αριθμό των μυϊκών ινών, οι λαμβανόμενες μετρήσεις ουσιαστικά αντανakλούν με ακρίβεια την απώλεια των μυϊκών ινών.

3) Ανάλυση στα ίχνη των πελμάτων (Footprint analysis). Η μέθοδος ανάλυσης που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη ήταν τροποποιημένη από αυτή που περιγράφεται για τους αρουραίους από τους (de Medinaceli et al., 1982). Η δοκιμή αυτή επιτρέπει την εκτίμηση του συντονισμού των άκρων και της υποστήριξης του βάρους του σώματος. Συγκεκριμένα εκτιμήθηκαν η περιστροφή των άκρων (=rotation), το μήκος βήματος (=stride length), το εύρος βήματος ή η βάση στήριξης (=stride width or base of support) και η απόσταση μεταξύ δυο διαδοχικών πατημασιών (=interpandal distance).



Τα οπίσθια άκρα των ζώων χρωματίστηκαν με μελάνι και αφέθηκαν να διανύσουν ένα διάδρομο, ο οποίος ήταν καλυμμένος με λευκό διηθητικό χαρτί για να ληφθούν τα αποτυπώματά τους κατά τον βηματισμό τους. Ο διάδρομος είχε μήκος 50 cm και πλάτος 5 cm και αποσκοπούσε στο να προκαθορίσει την κατεύθυνση πορείας των ζώων ώστε να ληφθεί μια σειρά βημάτων σε ευθεία γραμμή. Ο διάδρομος κατέληγε σε ένα σκοτεινό κλουβί και όλα τα ζώα αφέθηκαν να τον διασχίσουν πριν την οριστική δοκιμή 2 με 3 φορές (στις οποίες συχνά διέκοπταν την πορεία τους για να τον εξερευνήσουν) προκειμένου να εγκλιματιστούν με το χώρο (Varejao et al., 2001). Μια σειρά από τουλάχιστον 10 διαδοχικά βήματα ανά πειραματόζωο χρησιμοποιήθηκε για να εξαχθούν οι μέσες τιμές για τις εξεταζόμενες παραμέτρους. Συγκεκριμένα εκτιμήθηκαν: 1) η περιστροφή των άκρων (=rotation), που αντιπροσωπεύει την γωνία που σχηματίζεται από την τομή του ευθύγραμμου τμήματος που ενώνει το τρίτο δάχτυλο με το κεντρικό φύμα (=το αποτύπωμα που αντιπροσωπεύει την μετατάρσιο-φαλαγγική άρθρωση) και της ευθείας που διέρχεται από το κεντρικό φύμα και είναι παράλληλη με τη διεύθυνση βαδίσματος, 2) το μήκος βήματος (=stride length) που είναι η απόσταση μεταξύ δύο κεντρικών φυμάτων από δύο διαδοχικά αποτυπώματα του ίδιου άκρου σε κάθε πλευρά, 3) το εύρος βήματος ή η βάση στήριξης (=stride width or base of support) που είναι η απόσταση μεταξύ των παράλληλων ευθειών διεύθυνσης βαδίσματος που διέρχονται από το κεντρικό φύμα κάθε οπίσθιου άκρου και 4) η απόσταση μεταξύ δυο διαδοχικών πατημασιών (=interpupal distance). Επιπρόσθετα, για την αξιολόγηση του συγχρονισμού των άκρων χρωματίστηκαν τα πέλματα των πρόσθιων και των οπίσθιων άκρων με διαφορετικά χρώματα και λήφθηκαν αποτυπώματα βάδισης των υπό μελέτη ζώων με παρόμοιο τρόπο. Ακολούθως εκτιμήθηκε η απόσταση μεταξύ των κεντρικών φυμάτων των πρόσθιων και των οπίσθιων άκρων για κάθε πλευρά του σώματος. Η δοκιμή αυτή επίσης εκτελέστηκε πριν από την έναρξη, στο μέσο και με το πέρας του πειράματος.

4) Δοκιμή ικανότητας σύγκλεισης των άκρων κατά την πτώση (ή δοκιμή προσγείωσης, Landing foot splay). Η δοκιμή αυτή χρησιμοποιείται για την έμμεση αξιολόγηση του ρυθμού αγωγής των νευρικών ώσεων (Fricker et al., 2008). Στη δοκιμή αυτή οι μύες συγκρατούνται από την ράχη και την ουρά, και ανυψώνονται κατά 15 cm από το πειραματικό τραπέζι και αφήνονται να πέσουν. Όταν τα ζώα συγκρατούνται κατά αυτό τον τρόπο, αυτόματα εκτείνουν προς τα έξω τα οπίσθια άκρα τους ενώ κατά την πτώση τους έχουν την τάση φυσιολογικά να τα συμπλησιάσουν ξανά, προκειμένου να πέσουν με ασφάλεια στο έδαφος. Τα οπίσθια άκρα των ζώων πριν αυτά ανυψωθούν χρωματίζονταν με μελάνι και αφήνονταν να πέσουν πάνω σε λευκό διηθητικό χαρτί. Ακολούθως υπολογιζόταν η απόσταση μεταξύ των δύο οπίσθιων άκρων τη στιγμή της προσγείωσης. Ο πειραματισμός επαναλαμβανόταν πέντε φορές για την εξαγωγή του μέσου όρου για κάθε πειραματόζωο. Η μέση απόσταση μεταξύ των δύο οπίσθιων άκρων κατά την πτώση του ζώου συσχετίζεται στενά με την ταχύτητα αντίδρασης του κάθε ζώου και για αυτό αντανakλά το ρυθμό της νευρικής αγωγιμότητας. Η δοκιμή αυτή εκτελέστηκε πριν από την έναρξη, στο μέσο και με το πέρας του πειράματος.

#### ***Δοκιμές ελέγχου της αισθητικότητας των ζώων του πειράματος***

Για τον έλεγχο της αισθητικότητας των ζώων χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθες δοκιμές:

1) Δοκιμή της θερμαινόμενης πλάκας (Hot plate test). Η δοκιμή αυτή γινόταν πάντοτε τελευταία, προκειμένου να αποκλειστεί το ενδεχόμενο η αυξημένη θερμοκρασία της πλάκας να μεταβάλει την αισθητικότητα των οπίσθιων άκρων και να επηρεάσει τα

αποτελέσματα των επόμενων δοκιμών. Στη δοκιμή αυτή το ζώο τοποθετούνταν πάνω σε μια ειδική θερμαινόμενη μεταλλική πλάκα, θερμοκρασίας 52,5 °C, τα όρια της οποίας περιβαλλόταν από ένα ψηλό διαφανές πλαίσιο από Plexiglas, για την αποφυγή διαφυγής του ζώου και την απρόσκοπτη παρατήρησή του. Στη δοκιμή αυτή καταμετρούνταν με ειδικό χρονομετρητή ο χρόνος που μεσολαβούσε από την τοποθέτηση του ζώου στην πλάκα, μέχρι την στιγμή που θα αντιλαμβανόταν το θερμικό ερέθισμα. Η απόκριση εκδηλωνόταν είτε συνήθως με γλείψιμο των πρόσθιων αρχικά ή οπίσθιων άκρων ή με ανύψωση των οπίσθιων άκρων και αερισμό τους.

2) Δοκιμή απόκρισης σε μηχανικό ερέθισμα (Von Frey-hair pinch test), (Chaplan et al., 1994). Η δοκιμή αυτή χρησιμοποιείται για να ανιχνεύσει αλλαγές στην ουδό μηχανικών επώδυνων ερεθισμάτων (ανίχνευση μηχανικής αλλοδυνίας). Η ικανότητα των ζώων να αντιλαμβάνονται τα μηχανικά ερεθίσματα στα οπίσθια άκρα τους ελέγχθηκε με την βοήθεια ειδικών βαθμονομημένων από nylon τριχοειδικών κατασκευών (ελαστικές μονο-τριχοειδείς βελόνες) (Von Frey-hair) που ασκούν σταθερή δύναμη πίεσης που κυμαίνεται από 0,6 σε 6 g. Χρησιμοποιήθηκαν 6 διαφορετικές τέτοιες βελόνες, των οποίων η σκληρότητα αυξανόταν λογαριθμικά, ταυτόχρονα με την αύξηση και της διαμέτρου τους, καθεμία εκ των οποίων αντιστοιχούσε σε πίεση 0,6, 1, 1,4, 2, 4 και 6g αντίστοιχα.

Κατά τη δοκιμή αυτή οι μύες τοποθετούνταν μέσα σε ένα στενό διαφανή από Plexiglas κλωβό το έδαφος του οποίου ήταν διάτρητο μεταλλικό πλέγμα, ώστε να επιτρέπει στον ερευνητή να ερεθίσει μηχανικά τα πέλματα των ζώων με τις μονο-τριχοειδείς βελόνες. Οι μύες αφηνόταν να εγκλιματιστούν στο χώρο για 30 λεπτά πριν την έναρξη του πειραματισμού. Σε κάθε μυ ασκήθηκαν και οι 6 βελόνες κατά σειρά αυξανόμενης διαμέτρου (που αντιστοιχεί και σε αυξανόμενη δύναμη) πρώτα στο πέλμα του αριστερού και μετά του δεξιού οπίσθιου άκρου και ελέγχθηκε η ανταπόκρισή τους στον μηχανικό ερεθισμό (αντίληψή του και βαθμός αντίδρασης). Η άσκηση πίεσης μέσω των βελόνων εφαρμόστηκε στο μέσο περίπου κάθε οπίσθιου πέλματος. Για κάθε πέλμα γινόταν 6 επαναλήψεις με την ίδια τριχοειδή βελόνα και μεταξύ κάθε ερεθισμού μεσολαβούσε χρονικό διάστημα 30 δευτερολέπτων. Σαν θετική βαθμολογούνταν η αντίδραση όταν υπήρχε μια απότομη και έντονη απομάκρυνση (ανύψωση) του πέλματος του ζώου από το ερέθισμα. Για κάθε ζώο εξαγόταν το ποσοστό απόκρισης στο μηχανικό ερεθισμό από τις έξι επαναλήψεις για κάθε άκρο και για κάθε βελόνα και οι τιμές αυτές λήφθηκαν για τη στατιστική ανάλυση των δεδομένων. Η δομική αυτή εκτελέστηκε πριν από την έναρξη, στο μέσο και με το πέρας του πειράματος.

### ***Σήμανση των νεοπαραχθέντων κυττάρων***

Προκειμένου να μελετήσουμε πως επηρεάζεται η νευρογένεση στον ενήλικο εγκέφαλο κατά την μακροχρόνια υποτοξική έκθεση στο ΟΦ CPF, χορηγήθηκε σε μια ομάδα ζώων, μια μέρα πριν τη θανάτωσή τους και το τερματισμό του πειράματος, ένα ανάλογο της θυμιδίνης, το BrdU (5-Bromo 2'-Deoxyuridine, prod. No B5002, Sigma-Aldrich, USA) που έχει την ικανότητα να ενσωματώνεται σε όλα τα διαιρούμενα και συνεπώς νεοπαραγόμενα κύτταρα και να ανιχνεύεται ανοσοϊστοχημικά. Προκειμένου να σημανθούν τα ταχέως διαιρούμενα κύτταρα συνολικά έγιναν 4 εγχύσεις (δόση κάθε έγχυσης 70mg/kg BrdU σε 0,9% φυσιολογικό ορό), ανά 2 ώρες και η τελευταία έγχυση έγινε 18 ώρες πριν την θανάτωσή τους.

### ***Μονιμοποίηση και επεξεργασία των ιστών***

Με το πέρας του πειράματος τα ζώα θανατώθηκαν υπό γενική αναισθησία με διακαρδιακή διήθηση μονιμοποιητικού παραφορμαλδεΐδης (PFA) 4%. Πιο συγκεκριμένα, κάτω από γενική αναισθησία με χρήση αιθέρα, οι μύες τοποθετούνταν ύπτιο στο χειρουργικό τραπέζι και γινόταν διάνοιξη της θωρακικής τους κοιλότητας. Στην αριστερή κοιλία της καρδιάς τοποθετούνταν καθετήρας που κατέληγε σε βελόνα με εσωτερική διάμετρο 23G και με τη βοήθεια καταθλιπτικής αντλίας εγχύσεων, χορηγήθηκαν στα πειραματόζωα διαδοχικά τα ακόλουθα διαλύματα: α. 5 ml διαλύματος PBS με pH 7,4 και θερμοκρασίας 4 °C για την έκπλυση των αγγείων από το αίμα, β. 70 ml διαλύματος παραφορμαλδεΐδης (PFA) 4% σε PBS και pH 7,4 επίσης θερμοκρασίας 4°C. Ο διαλύτης PBS παρασκευάζεται από πρότυπο διάλυμα PBS 10x που αποτελείται από 3,45 γρ.  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (Fluka, 71496), 10,65γρ.  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Fluka, 71639) και 86,19gr NaCl (131659.1211 της Panreav) με ρυθμισμένο pH 7,4. Ταυτόχρονα με τη διεύδυση της βελόνας στην αριστερή κοιλία της καρδιάς και την έναρξη χορήγησης του PBS γινόταν διατομή του δεξιού ωτός της καρδιάς για να δημιουργηθεί ένα ανοιχτό σύστημα κυκλοφορίας των διαλυμάτων, τα οποία αφού διαπερνούσαν όλους τους ιστούς του ζώου εξέρχονταν από το ους. Μετά την μονιμοποίηση *in situ* αφαιρούνταν οι ακόλουθοι ιστοί των ζώων: εγκέφαλος, νωτιαίος μυελός, ισχιακά νεύρα με τους κλάδους τους, ήπαρ, σπλήνα, νεφροί, καρδιά που εμβαπτίζονταν στο ίδιο μονιμοποιητικό μέσο στους 4°C και παρέμειναν εκεί για 4 ώρες.

### ***Επεξεργασία των ιστών και λήψη των τομών***

Ακολούθως οι ιστοί ξεπλύθηκαν από την (PFA) σε τρεχούμενο νερό βρύσης και αφού αφυδατώθηκαν σε διαδοχικά διαλύματα αλκοόλης συνεχούς αυξανόμενης πυκνότητας και διαυγάστηκαν σε ξυλόλη εγκλείστηκαν σε παραφίνη και θα ληφθούν τομές 6-8  $\mu\text{m}$ . Εξαίρεση από την παραπάνω επεξεργασία αποτέλεσαν οι εγκέφαλοι οι οποίοι αρχικά χωρίστηκαν στα δύο ημισφαίρια και μόνο το δεξί ημισφαίριο εγκλείστηκε σε παραφίνη, ενώ το αριστερό διατηρήθηκε σε διάλυμα PB 0,1M με ρυθμισμένο pH 7,4 για δύο ημέρες. Το αριστερό ημισφαίριο χρησιμοποιήθηκε για την λήψη στεφανιαίων τομών πάχους 50  $\mu\text{m}$  σε μικροτόμο δόνησης (Leica VT1000S, V1.5. Deutsch) προκειμένου να γίνουν οι κατάλληλες ανοσοϊστοχημικές χρώσεις.

Όσον αφορά του εγκλεισμένους ιστούς σε παραφίνη από το αριστερό εγκαφαλικό ημισφαίριο ελήφθησαν οβελιαίες τομές, ενώ από τις διάφορες μοίρες τις σπονδυλικής στήλης και από τα ισχιακά νεύρα εγκάρσιες τομές. Οι τομές που χρησιμοποιήθηκαν για τις ιστολογικές και ανοσοϊστοχημικές χρώσεις ήταν διαδοχικές πάχους 7 $\mu\text{m}$ , λήφθηκαν από μικροτόμο παραφίνης (Rotary Microtome HM315, Microm, Laborgeräte GmbH, Germany) και συλλέχθηκαν σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 50°C είτε πάνω σε αντικειμενοφόρες πλάκες οι οποίες προηγούμενα είχαν ζελατινοποιηθεί, είτε σε Super Frost Plus (Menzel-Gläser) αντικειμενοφόρες. Οι μεν πρώτες χρησιμοποιήθηκαν στις ιστολογικές χρώσεις, που ενώ οι δεύτερες στις ανοσοϊστοχημικές.

Οι αντικειμενοφόρες πλάκες που έφεραν τις τομές αφήνονταν να στεγνώσουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος όλο το βράδυ και την επόμενη μέρα ήταν έτοιμες για τις διάφορες χρώσεις. Όσες τομές δεν χρησιμοποιήθηκαν άμεσα αποθηκεύτηκαν σε

αεροστεγείς πλαστικούς περιέκτες σε ψυχρό και ξηρό περιβάλλον, ώστε να μην υποστούν την βλαπτική επίδραση της υγρασίας για μελλοντική χρήση.

Αναφορικά με τη λήψη των στεφανιαίων τομών από το αριστερό εγκεφαλικό ημισφαίριο των ζώων του πειράματος, οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό των νεοπαραχθέντων νευρικών κυττάρων στην υποκοιλιακή ζώνη (YKZ) και υποκάμπειο σχηματισμό ακολουθήθηκε διαδικασία συλλογής επιλεγμένων τομών που ισο-απείχαν μεταξύ τους για τις ανοσοϊστοχημικές χρώσεις σήμανσης των νεοπαραχθέντων νευρικών κυττάρων. Συγκεκριμένα οι τομές λήφθηκαν με φορά από μπρος προς τα πίσω δηλαδή ρυγχαίως προς ουραίως. Για την YKZ και για κάθε ανοσοϊστοχημική χρώση λήφθηκαν τρεις τομές που ισο-απείχαν μεταξύ τους 10 τομές των 50  $\mu\text{m}$  ή 0,5 mm με την πρώτη τομή να αντιστοιχεί προσθίως του βρέγματος  $1 \pm 0,2\text{mm}$  (rostral from Bregma  $1 \pm 0,2\text{ mm}$ , ή  $B=1 \pm 0,2\text{ mm}$ ) και την τελευταία  $B=0 \pm 0,2\text{ mm}$ . Για τον υποκάμπειο σχηματισμό για κάθε ανοσοϊστοχημική χρώση ελήφθησαν 5 τομές που επίσης ισο-απείχαν μεταξύ τους 10 τομές των 50  $\mu\text{m}$  ή 0,5 mm με την πρώτη τομή να αντιστοιχεί οπισθίως του βρέγματος  $1 \pm 0,5\text{mm}$  (caudal from Bregma  $1 \pm 0,5\text{ mm}$ , ή  $B=1 \pm 0,5\text{ mm}$ ) και την τελευταία  $B=3 \pm 0,5\text{ mm}$ . Οι τριάδες ή πεντάδες τομών για κάθε χρώση ανά πειραματόζωο ήταν διαδοχικές μεταξύ τους. Οι τομές αυτές αφού πρώτα σημάνθηκαν με τα κατάλληλα αντισώματα ως πλεύουσες (free floating), μετά συλλέχθηκαν σε Super Frost Plus (Menzel-Gläser) αντικειμενοφόρες πλάκες και αφέθηκαν εκεί υπό συνθήκες κόστους να στεγνώσουν και να προσκολληθούν πριν την μικροσκοπική τους παρατήρηση.

### **Ιστολογικές χρώσεις**

Στις ληφθείσες τομές παραφίνης εγκεφάλου, νωτιαίου μυελού και ισχιακών νεύρων έγιναν οι ακόλουθες ιστολογικές χρώσεις: Αιματοξυλίνη-εωσίνη (H&E), Giemsa, Klüver-Barrera, τροποποιημένη Bielschowski, τροποποιημένη Gallyas προκειμένου να ελεγχθούν για αξονοπάθεια, νευροεκφύλιση, απομυελίνωση των νευρικών ινών και αστρογλίωση.

### **Χρώση Αιματοξυλίνης –Εωσίνης (H&E)**

Αρχικά τομές παραφίνης υφίσταντο αποπαραφίνωση σε δυο διαδοχικά διαλύματα ξυλόλης των 7 λεπτών. Στη συνέχεια ενυδατωνόταν σε διαδοχικά διαλύματα αλκοόλης σε σειρά με μειούμενη πυκνότητα (διαλύματα 100%, 95%, 80%, 70%, 50% αλκοόλης σε μονοαπεσταγμένο ύδωρ, D.W.) και τέλος αφηνόταν σε DW για 5 λεπτά. Ακολουθούσε χρωμάτισμα των βασίφιλων κυτταρικών στοιχείων (πυρήνες) σε διάλυμα αιματοξυλίνης (Papanicolaou's solution 1a Harris' hematoxylin solution of Merk, Germany) για 10 λεπτά και έπειτα ξέπλυμα των τομών σε τρεχούμενο νερό βρύσης για 2-3 λεπτά μέχρι οι τομές να μεταβάλλουν το χρώμα τους από ιώδες σε μπλέ. Η διαφοροποίηση γινόταν με εμβαπτίσεις σε διάλυμα υδροχλωρικού οξέως % (2 ml hydrochloric acid 37% ή 12N σε 200ml νερό βρύσης) και καλό ξέπλυμα των τομών σε τρεχούμενο νερό. Μετά από παραμονή τομών για 2 λεπτά σε DW, οι τομές εμβαπτιζόνταν στην οξύφιλη χρωστική εωσίνη (1gr yellowish eosin, Code No. 32617, Riedel-deHaën, Sigma-Aldrich) σε 200 ml DW και προσθήκη 2ml acetic acid glacial Cod. No.401422 Carloerba Reagents, SA) για 4 λεπτά. Έπειτα οι τομές ξεπλύθηκαν σε DW και αφυδατώθηκαν γρήγορα σε διαδοχικά διαλύματα αλκοολών αυξανόμενης

πυκνότητας, διαυγάστηκαν σε ξυλόλη και εγκλείστηκαν με καλυπτρίδες με τη βοήθεια του μέσου DPX mountant (της BDH, England, 360294H). Με τη χρώση αυτή οι πυρήνες χρωματίστηκαν μπλε – ιώδες και το κυτταρόπλασμα ροζ.

#### **Χρώση τροποποιημένη Bielschowski** (modified Bielschowski, mBLS)

Οι τομές αποπαραφινώθηκαν και ενυδατώθηκαν όπως αναφέρεται ανωτέρω για την χρώση H&E και εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα νιτρικού αργύρου 10% σε DW για 45 λεπτά σε RT. Στη συνέχεια οι τομές ξεπλύθηκαν σε DW, τρεις φορές για 5 λεπτά και επώαστηκαν σε εναμμώνιο διάλυμα νιτρικού αργύρου (silver nitrate, Panreac, PA 131459, Spain) 10% (pH=12,1-12,3) για επίσης 45 λεπτά σε RT. Το διάλυμα αυτό προέκυψε από το αρχικό διάλυμα νιτρικού αργύρου 10% στο οποίο υπό συνεχή ανάδευση προστέθηκε στάγδην αμμωνία. Με την πρώτη ποσότητα αμμωνίας το διάλυμα αποκτά ένα σκούρο καφέ χρώμα, όμως με συνεχή στάγδην προσθήκη σταδιακά διαυγάζει. Επειδή η προσθήκη της αμμωνίας μεταβάλλει το pH του διαλύματος, το οποίο είναι καθοριστικής σημασίας για την επιτυχία της χρώσης, η προσθήκη σταματά με την έναρξη της διαύγασης του διαλύματος.

Στη συνέχεια οι τομές ξεπλύθηκαν σε διάλυμα αμμωνίας 0,2 %, 2 φορές για 10 λεπτά. Το εναμμώνιο διάλυμα νιτρικού αργύρου που χρησιμοποιήθηκε προηγούμενα συλλέχθηκε ξανά και ογκομετρήθηκε, προκειμένου να υπολογιστεί η ποσότητα του διαλύματος developer που προστέθηκε ανά όγκο διαλύματος (1μm από το developer ανά 1ml διαλύματος εναμμώνιου νιτρικού αργύρου). Το διάλυμα developer αποτελείται από 200ml φορμόλης (formaldehyde 40%, Code No.415666, Carloerba Reagents, RPE) 37%, 50μl αμμωνίας 25%, και 0,5 gr κιτρικού οξέως (citric acid, monohydrate 242.1000 της Merk, Stockholm) σε 100ml DW. Οι τομές αφέθηκαν στο διάλυμα αυτό για 5-15 λεπτά ελεγχόμενα, ανάλογα με το βαθμό χρωματισμού τους και ξεπλύθηκαν αρχικά σε διάλυμα αμμωνίας 0,2 %, για 1 λεπτό και μετά σε μονοαπεσταγμένο ύδωρ. Προκειμένου να απομακρυνθεί η πλεονάζουσα ή μη εκλεκτική χρώση του νιτρικού αργύρου οι τομές επώαστηκαν για 3 λεπτά σε διάλυμα sodium thiosulfate (Hypo, M&R) 5% σε DW και ξεπλύθηκαν με μονοαπεσταγμένο. Ακολούθως χρωματίστηκαν οι πυρήνες των κυττάρων σε διάλυμα Cresyl Fast Violet (Nissl) 0,25% σε DW και οι τομές αφυδατώθηκαν σε διαδοχικά διαλύματα αλκοολών, διαυγάστηκαν σε ξυλόλη και εγκλείστηκαν με τη βοήθεια DPX mountant.

#### **Χρώση Klüver-Barrera**

Η χρώση αυτή χρησιμοποιήθηκε για να διαπιστωθεί η ακεραιότητα ή μη της μυελίνης και να διερευνηθεί ενδεχόμενη απομυελίνωση. Πρόκειται ουσιαστικά για μια διπλή χρώση με την οποία χρωματίζεται η μυελίνη με Luxol Fast Blue και οι πυρήνες του ιστού και τα σωμάτια Nissl με Cresyl Fast Violet. Οι τομές αφού αποπαραφινώθηκαν διαυγάστηκαν σε απόλυτη αλκοόλη και ενυδατώθηκαν σε αλκοόλη 95%. Ακολούθως επώαστηκαν όλο το βράδυ στους 57°C σε διάλυμα Luxol Fast Blue 1% σε 95% αλκοόλη ή απόλυτη μεθανόλη με 0,2% οξικό οξύ. Ακολούθως οι τομές εμβαπτίστηκαν αρχικά σε διάλυμα 95% αλκοόλης για 3 λεπτά και έπειτα σε 70% αλκοόλη και ξεπλύθηκαν σε μονοαπεσταγμένο ύδωρ για 5 λεπτά. Ακολούθησε διαφοροποίηση των τομών σε διάλυμα ανθρακικού λιθίου (Lithium Carbonate 2312120, The British Drug Houses Ltd,

England) 0,05% σε DW, μέχρις ότου να ήταν δυνατό να μπορεί να διακριθεί η λευκή (μπλε χρώματος) από την φαιά ουσία (γκρι χρώματος). Η διαφοροποίηση επιτεύχθηκε με διαδοχικές εμβαπτίσεις των τομών στο διάλυμα ανθρακικού λιθίου και αλκοόλης 70% για περίπου τρεις φορές. Έπειτα οι τομές ξεπλύθηκαν σε DW για 5 λεπτά και χρωματίστηκαν σε διάλυμα Cresyl Fast Violet (acetate, της Merk, Germany, FN1048735\_744) 0,5% σε DW για 10 δευτερόλεπτα. Ακολούθως οι τομές ξεπλύθηκαν σε τρεχούμενο νερό βρύσης και εμβαπτίστηκαν για 1-2 λεπτά σε διάλυμα διαφοροποίησης του Cresyl Fast Violet (αποτελούμενο από 44ml αλκοόλης 95%, 60ml χλωροφόρμιο (Chloroform, 32211, Riedel-deHaën, Sigma-Aldrich) και 0,5ml Glacial acetic acid). Στη συνέχεια οι τομές αφυδατώθηκαν, διαυγάστηκαν σε ξυλόξη και εγκλείστηκαν σε DPX.

### **Χρώση τροποποιημένη Gallyas**

Οι τομές αφού αποπαραφινώθηκαν και ενυδατώθηκαν επώαστηκαν σε διάλυμα 5% περιοδικού οξέως για 5 λεπτά και ακολούθως ξεπλύθηκαν καλά σε μονοαπεσταγμένο ύδωρ. Στη συνέχεια επώαστηκαν για ένα λεπτό μόνο σε ιωδιούχο αλκαλικό διάλυμα νιτρικού αργύρου (4% καυστικό νάτριο, 10% ιωδιούχο κάλιο και 0,1% νιτρικό άργυρο σε μονοαπεσταγμένο ύδωρ) και ξεπλύθηκαν πολύ καλά σε διάλυμα οξικού οξέως 0,5%. Έπειτα οι τομές επώαστηκαν στο διάλυμα developer που αποτελείται από 120ml διαλύματος ανθρακικού νατρίου 5%, 36 ml διαλύματος 0,2% νιτρικού αργύρου, 0,2% νιτρικού αργύρου και 1% βολφραμιοπυριτικού οξέως και 84ml διαλύματος 0,2% νιτρικού αργύρου, 0,2% νιτρικού αργύρου, 1% βολφραμιοπυριτικού οξέως και 0,3% φορμόλης. Οι τομές αφέθηκαν στο διάλυμα αυτό για 20 λεπτά ελεγχόμενα, ανάλογα με το βαθμό χρωματισμού τους και ξεπλύθηκαν αρχικά σε διάλυμα οξικού οξέως 0,5 %, για 3 λεπτά και μετά σε μονοαπεσταγμένο ύδωρ. Προκειμένου να απομακρυνθεί η πλεονάζουσα ή μη εκλεκτική χρώση οι τομές επώαστηκαν για 5 λεπτά σε διάλυμα sodium thiosulfate (Hypo, M&R) 1% σε DW και ξεπλύθηκαν και πάλι σε μονοαπεσταγμένο ύδωρ. Ακολούθως οι τομές αφυδατώθηκαν σε διαδοχικά διαλύματα αλκοολών, διαυγάστηκαν σε ξυλόξη και εγκλείστηκαν με τη βοήθεια DPX mountant. Με τη χρώση αυτή αποκαλύφθηκαν οι εκφυλισμένοι νευρώνες που περιέχουν τοπίλια νευροϊνιδίων (neurofibrillary tangles) και οι οποίοι χρωματίστηκαν μαύροι και καλούνται σκοτεινοί νευρώνες (dark neurons). Οι νευρικές ίνες χρωματίστηκαν καφέ.

### **Ανοσοϊστοχημικές χρώσεις**

Από το σύνολο των προαναφερόμενων διαθέσιμων διαδοχικών τομών παραφίνης που συλλέχθηκαν, η επιλογή των τομών για κάθε χρώση έγινε με συστηματική τυχαία δειγματοληψία. Από κάθε δηλαδή ομάδα διαδοχικών τομών που αντιστοιχεί σε ένα ζώο επιλέχτηκε τυχαία ένας αριθμός από 1-10 π.χ. 5 και η απόσταση για την επόμενη θέση ορίστηκε ο αριθμός 10. Επομένως οι επιλεγείσες συνολικά τομές ύστερα από δειγματοληψία σε σύνολο π.χ.100 τομών είναι οι 5η, 15η, 25η, 35η, 45η, 55η, 65η, δηλαδή σε πλήθος 6 τομές όσο και το δειγματοληπτικό μέγεθος, ανά ιστοτεμάχιο, π.χ. εγκέφαλου, οσφυϊκής μοίρας νωτιαίου μυελού, ήπαρ, κ.λ.π. κάθε ζώου και ανά χρώση.

Πριν από κάθε ανοσοϊστοχημική χρώση οι τομές υφίσταντο αποπαραφίνωση σε δυο διαδοχικά διαλύματα ξυλόλης των 7 λεπτών. Στη συνέχεια ενυδατωνόταν σε διαδοχικά

διαλύματα αλκοόλης σε σειρά, με μειούμενη πυκνότητα (διαλύματα 100%, 95%, 80%, 70%, 50% αλκοόλης σε D.W.) και τέλος γινόταν με εμβάπτιση σε PBS. Ακολούθως οι τομές πάνω στις αντικειμενοφόρες πλάκες οριοθετούνταν πριν την προσθήκη του 1<sup>ου</sup> διαλύματος με τη βοήθεια μιας κέρινης ουσίας υπό μορφή μαρκαδόρου (papen), αφού προηγουμένως η περιφέρεια τους στεγνωνόταν με τη βοήθεια διηθητικού χαρτιού. Μέσα στην οριοθετημένη αυτή περιοχή εφαρμοζόταν τα διαλύματα που έφεραν τα πρώτα (Πίνακας 1) και τα δεύτερα αντισώματα. Έτσι συνήθως πάνω σε κάθε τομή ανάλογα με την έκτασή της με τη χρήση πιπέττας εναποθέτονταν 50-70 μl διαλύματος. Επιπλέον οι αντικειμενοφόρες πλάκες ήταν στερεωμένες εντός ειδικού περιέκτη που περιείχε νερό και έκλεινε ερμητικά για να διατηρείται στο εσωτερικό του υψηλή υγρασία και να αποφεύγεται η ξήρανση των τομών.

### **Χρησιμοποιηθέντα πρώτα αντισώματα**

Προκειμένου να διαπιστώσουμε εάν τα νευρικά ή/και τα νευρογλοιακά κύτταρα του νευρικού συστήματος των ζώων του πειράματος υφίστανται κυτταρικό θάνατο με τη διαδικασία της απόπτωσης χρησιμοποιήσαμε τα αντισώματα αντι- κασπάση 3 (Affinity-Purified Rabbit Anti-mouse Caspase 3 Active, Millipore, Temecula, California, USA, Catalog Number: AB 3623) και αντι-φρακτίνη (Rabbit anti-Fractin polyclonal Antibody της Millipore Catalog Number: AB3150). Το πρώτο αντίσωμα ανιχνεύει την υπομονάδα p17 της κασπάσης 3, ενώ ανιχνεύει ελάχιστα ή καθόλου την πρόδρομη μορφή αυτής. Επίσης ανιχνεύει και άλλα αποπτωτικά προϊόντα και μπορεί να διακρίνει αξιόπιστα τα αποπτωτικά κύτταρα από τα μη αποπτωτικά. Το δεύτερο αντίσωμα αναγνωρίζει ένα θραύσμα 32 kDa της βήτα ακτίνης, γνωστό ως φρακτίνη. Κατά την διάρκεια της απόπτωσης, η βήτα ακτίνη διασπάται ή υφίσταται σχίσματα από τις ενεργοποιημένες κασπάσες στην περιοχή του ασπαρτικού. Αυτή η διάσπαση έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση περίπου 130 αμινοξέων (15kDa) από το καρβοξυ-τελικό άκρο της υπομονάδας της βήτα ακτίνης για να παραχθεί ένα 32 kDa (244 αμινοξέα) αμινοτελικό σπασμένο κομμάτι ακτίνης, γνωστό ως φρακτίνη. Το καρβοξυτελικό άκρο του κομματιού της φρακτίνης επειδή δεν είναι αντιγονικό στην γηγενή πλήρους μήκους υπομονάδα βήτα ακτίνης, αντιπροσωπεύει ένα πρωτοποριακό δείκτη με τον οποίο μπορούν να διακριθούν τα αποπτωτικά από τα μη αποπτωτικά κύτταρα.

Προκειμένου να διερευνηθεί πιθανή συναπτοπάθεια στα ζώα τα οποία έλαβαν το ΟΦ, διενεργήθηκαν ανοσοϊστοχημικές χρώσεις σε τομές παραφίνης έναντι του υποδοχέα N-Methyl-D-Aspartate (NMDA-R1, 1:400, BD Pharmingen). Το γλουταμινικό αποτελεί τον βασικό εκκρινόμενο νευροδιαβιβαστή στο ΚΝΣ των θηλαστικών και η νευροδιαβίβαση αυτή μεσολαβείται από μια μεγάλη οικογένεια υποδοχέων του γλουταμινικού που διαιρείται σε δύο ομάδες τους ιονοτρόπους (GluR) και τους μεταβοτρόπους (mGluR). Στην πρώτη ομάδα ανήκει ο NMDA-R1 που αποτελεί βασικό υποδοχέα του γλουταμινικού.

Η διερεύνηση προσβολής των κυττάρων της αστρογλοίας έγινε ανοσοϊστοχημικά σε επιπλέουσες τομές των 50 μm (free floating sections) που λήφθηκαν στον μικροτόμο δόνησης έναντι της ινιδώδους όξινης πρωτεΐνης της αστρογλοίας GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein, Polyclonal Rabbit anti-GFAP της Dako, Denmark, code no. Z 0334).

Για την μελέτη της επίδρασης της μακροχρόνιας χορήγησης υποτοξικών δόσεων των ΟΦ στην νευρογένεση σημάνθηκαν με ανοσοϊστοχημικές μεθόδους τα νεοπαράγόμενα

νευρικά κύτταρα στην YKZ και στην οδοντωτή έλικα του ιπποκάμπειου σχηματισμού με επιπλέουσες τομές των 50  $\mu\text{m}$  (free floating sections). Συγκεκριμένα σημάνθηκαν με το αντίσωμα anti-BrdU (Monoclonal Mouse anti- Bromodeoxyuridine Clone Bu20a, dako, Denmark, Code no.M0744) τα νεοπαραγόμενα κύτταρα, ενώ με το αντίσωμα anti-doublecortin ή anti-DCX (Guinea Pig Polyclonal anti-DPX, Millipore, Temecula, California, USA, Catalog Number: AB 2253) οι ανώριμοι νευρώνες της οδοντωτής έλικας του ιπποκάμπειου σχηματισμού και οι μεταναστευτικοί νευροβλάστες της YKZς.



**Πίνακας 1 Χρησιμοποιηθέντα πρώτα αντισώματα**

1 <sup>ο</sup> Αντίσωμα	Εταιρεία	Catalog Number	Είδος αντισώματος	Χρησιμοποιούμενη συγκέντρωση / Διάρκεια εφαρμογής.	Κυτταρική εντόπιση του αντιγόνου που ανιχνεύει
<b>Guinea Pig Polyclonal anti-DCX</b>	<b>Millipore</b>	<b>AB2253</b>	<b>Πολυκλωνικό, από ινδικό χοιρίδιο, IgG</b>	<b>1:800 / όλο το βράδυ στους 4° C.</b>	<b>Κυτταρόπλασμα</b>
<b>Monoclonal Mouse anti-BrdU Clone Bu20a</b>	<b>Dako</b>	<b>M0744</b>	<b>Μονοκλωνικό, από μυ, IgM</b>	<b>1:200 / όλο το βράδυ στους 4° C.</b>	<b>Πυρήνας</b>
<b>Rabbit anti GFAP polyclonal antibody</b>	<b>Dako</b>	<b>Z 0334</b>	<b>Πολυκλωνικό, από κουνέλι, IgG</b>	<b>1:800 / όλο το βράδυ στους 4° C</b>	<b>Κυτταρόπλασμα</b>
<b>Rabbit Anti-mouse Caspase 3 Active</b>	<b>Millipore</b>	<b>AB3623</b>	<b>Πολυκλωνικό, από κουνέλι, IgG</b>	<b>1:100 / όλο το βράδυ στους 4° C.</b>	<b>Κυτταρόπλασμα και πυρήνας</b>
<b>Rabbit anti-Fractin polyclonal Antibody</b>	<b>Millipore</b>	<b>AB3150</b>	<b>Πολυκλωνικό, από κουνέλι, IgG</b>	<b>1:1000/ 1 ώρα</b>	<b>Κυτταρόπλασμα</b>
<b>Purified Mouse Anti-rat NMDAR1</b>	<b>BP Pharmingen</b>	<b>556308</b>	<b>Μονοκλωνικό, από μυ, IgG2a</b>	<b>1:400 / όλο το βράδυ στους 4° C.</b>	<b>Κυτταρική μεμβράνη και κυτταρόπλασμα</b>

**Χρησιμοποιηθέντα δεύτερα αντισώματα**

Τα φθορίζοντα δεύτερα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στις ανοσοϊστοχημικές χρώσεις των πλεούμενων τομών ήταν τα ακόλουθα:

1. Alexa Fluor 488 goat anti-mouse, highly cross-adsorbed, A11029, Invitrogen, Eugene, Oregon, USA σε διάλυση 1:200, για την αποκάλυψη του 1<sup>ου</sup> αντισώματος anti-BrdU.
2. Alexa Fluor 555 goat anti-rabbit, highly cross-adsorbed, A21429, Invitrogen, Eugene, Oregon, USA σε διάλυση 1:200, για την αποκάλυψη του 1<sup>ου</sup> αντισώματος anti-GFAP.
3. Rhodamine Red™-X-conjugated goat anti-guinea pig, Gt x GP IgG (H+L) Millipore, Temecula, California, USA, Catalog Number: AP108R. (Απορρόφηση στα 570nm και εκπομπή στα 590nm) σε διάλυση 1:100 για την αποκάλυψη του 1<sup>ου</sup> αντισώματος anti-DCX.

Τα μη φθορίζοντα αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκαν στις ανοσοϊστοχημικές χρώσεις των τομών παραφίνης ήταν τα ακόλουθα:

1. Goat anti-Rabbit IgG (H+L) της Vector (περιεχόταν στο Vectastain ABC kit Elite, PK-6101 Rabbit IgG) σε διάλυση 1:200 για την ανίχνευση των εξής 1<sup>ov</sup> αντισωμάτων: anti-caspase 3 active και anti-fractin,
2. Polyclonal Rabbit anti-mouse immunoglobulins/biotinylated, Dako, Denmark, E0354 σε διάλυση 1:200 για την ανίχνευση του αντισώματος anti-NMDAR1.

## **Η διαδικασία των ανοσοϊστοχημικών χρώσεων**

Οι τομές παραφίνης αφού αποπαραφινωνόταν σε διάλυμα ξυλόλης ενυδατωνόταν με διαδοχικά διαλύματα αλκοολών συνεχώς μειούμενης πυκνότητας, όπως ήδη αναφέρθηκε και τελικά εμβαπτιζόνταν σε διάλυμα PBS. Για την αποκάλυψη των αντιγονικών θέσεων οι τομές υποβαλλόταν σε θερμική επεξεργασία με διάλυμα κιτρικού οξέως (Citrate buffer, 0.01M, pH=6) που παρασκευαζόταν ως εξής: σε 1 λίτρο μονοαπεσταγμένο ύδωρ DW γινόταν προσθήκη 2,94 gr trisodium citrate 2-hydrate (Merk, Germany) και γινόταν προσαρμογή του pH στο 6 με προσθήκη κιτρικού οξέως (citric acid, monohydrate 242.1000 της Merk, Stockholm). Ακολούθως γινόταν πλύσεις σε PBS επί τρεις φορές, επί 5 λεπτά η κάθε πλύση, και εμβαπτιζόταν σε διάλυμα υπεροξειδίου του υδρογόνου 2% (κατασκευασμένο από διάλυμα Hydrogen Peroxide, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% w/v, 141076.1211 της Panreav) με 5% μεθανόλη (J.T. Baker, UN1230) σε PBS επί 10 λεπτά προκειμένου να κατασταλεί η ενδογενής υπεροξειδάση. Μετά από ξέπλυμα των τομών επί τρεις φορές σε PBS επί 5 λεπτά και επώασή τους στο ακόλουθο διάλυμα blocking: 4% Normal Goat Serum (NGS, Biosera) 1% Triton X (56029 της Riedel-de Haën) σε PBS για μια ώρα, γινόταν προσθήκη του 1<sup>ov</sup> αντισώματος σε διάλυμα 2% NGS με 0,5% Triton X σε PBS. Η συγκέντρωση του 1<sup>ov</sup> αντισώματος και ο χρόνος επώασης εξαρτιόταν από το είδος του χρησιμοποιούμενου αντισώματος και αναγράφεται στον πίνακα. Το Triton X που χρησιμοποιήθηκε είναι ένα ήπιο απορρυπαντικό το οποίο προκαλεί ρήξη της κυτταρικής μεμβράνης και διευκολύνει επομένως τη διείσδυση του αντισώματος. Έπειτα μετά από ξέπλυμα των τομών επί τρεις φορές σε PBS επί 5 λεπτά η κάθε πλύση, γινόταν επώαση των τομών με το αντίστοιχο 2<sup>o</sup> αντίσωμα που αναγράφεται ανωτέρω για 1 ώρα σε RT. Μετά από πλύσεις των τομών επί τρεις φορές σε PBS επί 5 λεπτά η κάθε πλύση, προσθέτονταν το σύμπλοκο ABCComplex (περιεχόταν στο Vectastain ABC kit Elite, PK-6101 Rabbit IgG) που αφηνόταν να δράσει για 30 λεπτά σε RT υπό σκοτάδι και ύστερα από τρεις πλύσεις με PBS γινόταν ενστάλλαξη των τομών με το χρωμογόνο της DAB που παρασκευαζόταν από το DAB Substrate Kit for Peroxidase Catalog Number SK-4100, Vector laboratories, California, USA και αφηνόταν να δράσει για 3-5 λεπτά μόνο. Μετά από ξέπλυμα με απεσταγμένο νερό, γινόταν σήμανση των πυρήνων με αιματοξυλίνη (Papanicolaou's solution 1a Harris' hematoxylin solution of Merk, Germany) για 15 δευτερόλεπτα για να ακολουθήσει ξέπλυμα με νερό βρύσης. Ακολουθούσε αφυδάτωση των τομών μέσω εμβαπτίσεων σε διαλύματα αλκοόλης συνεχώς αυξανόμενης συγκέντρωσης (70%, 95%, και τέλος 100%) και τελικά σε ξυλόλη Xylene (131769.2714 Panreac) δύο φορές επί 5 λεπτά η φορά και τελικά οι αντικειμενοφόρες πλακες επικαλύπτονταν με καλυπτρίδες με τη βοήθεια DPX mountant (της BDH, England, 360294H).

Για την ανοσοϊστοχημική χρώση πλεύμενων τομών (free floating) ακολουθήθηκε διαφορετική διαδικασία, αφού η χρώση τους δεν έγινε πάνω σε αντικειμενοφόρες πλάκες αλλά με εναιώρησή τους μέσα σε διαλύματα. Οι πλεύμενες τομές αρχικά

πλύθηκαν σε PBS και μεταφέρθηκαν μέσα σε μικρούς πλαστικούς περιέκτες των 1,5 ml (eppendorfs) που περιείχαν διάλυμα blocking 4% NGS και 1% Triton X σε PBS όπου παρέμεναν για 2 ώρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Όσες τομές θα σημειώνταν για το αντίσωμα anti-BrdU προηγούμενα επωάστηκαν σε διάλυμα υδροχλωρικού οξέως 4N (από διάλυμα Hydrochloric acid 37% ή 12N, Carloerba Reagents) για 15 λεπτά προκειμένου να γίνει κατακερματισμός του DNA και αποκάλυψη των αντιγονικών θέσεων. Στη συνέχεια οι τομές επωάστηκαν υπό συνθήκες σκότους σε διάλυμα του 1<sup>ου</sup> αντισώματος διαφορετικής συγκέντρωσης ανάλογα με το τύπο του αντισώματος, με 2% NGS σε PBS υπό συνεχή ανάδευση για όλο το βράδυ στους 4°C. Την επόμενη μέρα γινόταν καλό ξέπλυμα των τομών επί τρεις φορές σε PBS επί 5 λεπτά η κάθε πλύση και οι τομές επωάζονταν σε διάλυμα του 2<sup>ου</sup> αντισώματος με συνήθη διάλυση 1:200 σε 2% NGS σε PBS που αφηνόταν να δράσει για τρεις ώρες. Το είδος του χρησιμοποιούμενου 2<sup>ου</sup> διαλύματος επιλέχτηκε με βάση το 1<sup>ο</sup> αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε σε κάθε ανοσοϊστοχημική χρώση, όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Στη συνέχεια ακολουθούσαν πλύσεις με PBS με τον τρόπο που ήδη αναφέρθηκε. Ύστερα οι τομές στερεώθηκαν πάνω σε αντικειμενοφόρες πλάκες Super Frost Plus και αφέθηκαν να στεγνώσουν υπό συνθήκες σκότους. Έπειτα καλύφθηκαν με καλυπτρίδες με τη βοήθεια κατάλληλου στερεωτικού μέσου που αποτρέπει την εξασθένηση του φθορισμού (Antifade Fluorescent Mounting Medium Ref S3023, Dako, North America, Carpinteria, CA, USA) και διατηρήθηκαν υπό ψύξη και σκότος μέχρι την παρατήρησή τους υπό μικροσκόπιο φθορισμού.

### ***Μικροσκοπική παρατήρηση των τομών***

Η μελέτη των ιστολογικών τομών έγινε με τη χρήση οπτικού μικροσκοπίου (Zeiss Axioplan), μικροσκοπίου φθορισμού (με λάμπα υδραργύρου) και συνεστιακού μικροσκοπίου (Nikon confocal microscope Eclipse 80i), οι μικροφωτογραφίες του οπτικού και του μικροσκοπίου φθορισμού λήφθηκαν με τη βοήθεια μιας Nikon ψηφιακής φωτογραφικής βιντεοκάμερας DS-Fi1-L2 ενώ οι φωτογραφίες της συνεστιακής μικροσκοπίας με τη βοήθεια του ενσωματωμένου software EZ-C1. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του λογισμικού Image Analysis Pro – Plus 6.3 Program for Windows (media Cybernetics, 2008). Σε διαδοχικές τομές και με εφαρμογή της κατάλληλης μορφομετρικής μεθόδου καταμετρήθηκαν τα σεσημασμένα για τον επιθυμητό παράγοντα κάθε φορά κύτταρα ανά ιστολογική δομή (για οδοντωτή έλικα ιπποκάμπειου σχηματισμού) ή ανά επιφάνεια (mm<sup>2</sup>) τομής ή περιοχής (π.χ. καταμέτρηση αποπτωτικών κυττάρων ανά mm<sup>2</sup> σε εγκάρσια διατομή νωτιαίου μυελού, ή καταμέτρηση νευροβλαστών ανά mm<sup>2</sup> στην οδοντωτή έλικα).

### ***Στατιστική ανάλυση***

Από όλες τις ποσοτικές μετρήσεις εξήχθηκε ο μέσος όρος, η διακύμανση και το τυπικό σφάλμα (SE), και τα δεδομένα εκφράστηκαν σαν μέσος όρος  $\pm$  SE. Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε χρησιμοποιώντας το στατιστικό πρόγραμμα SPSS 17. Όλα τα δεδομένα των κατηγορικών μεταβλητών πριν την στατιστική επεξεργασία τους ελέγχθηκαν αν πληρούν τα κριτήρια της κανονικότητας και ομοιογένειας των διακυμάνσεων με τα Shapiro-Wilk and Kolmogorov-Smirnov normality tests, προκειμένου να εφαρμοστούν τα τεστ των συσχετιζόμενων ή μη δειγμάτων two-tailed *t* test για να ανιχνευθούν οι διαφορές μεταξύ των διαφόρων

ομάδων. Σε όλες εκείνες τις περιπτώσεις που τα δεδομένα δεν εμφάνιζαν κανονική κατανομή και ομοιογένεια στις διακυμάνσεις και δεν ήταν ικανός κάποιος μετασχηματισμός των δεδομένων να επιφέρει την κανονικότητα, εφαρμοζόταν τα αντίστοιχα μη παραμετρικά τεστ Mann-Whitney *U*-test ή Kruskal-Wallis. Στατιστικώς σημαντικές χαρακτηρίστηκαν οι διαφορές που είχαν  $P < 0.05$ .

## **Αποτελέσματα**

### ***Κλινική εικόνα των ζώων του πειράματος***

#### **Γενικές παρατηρήσεις**

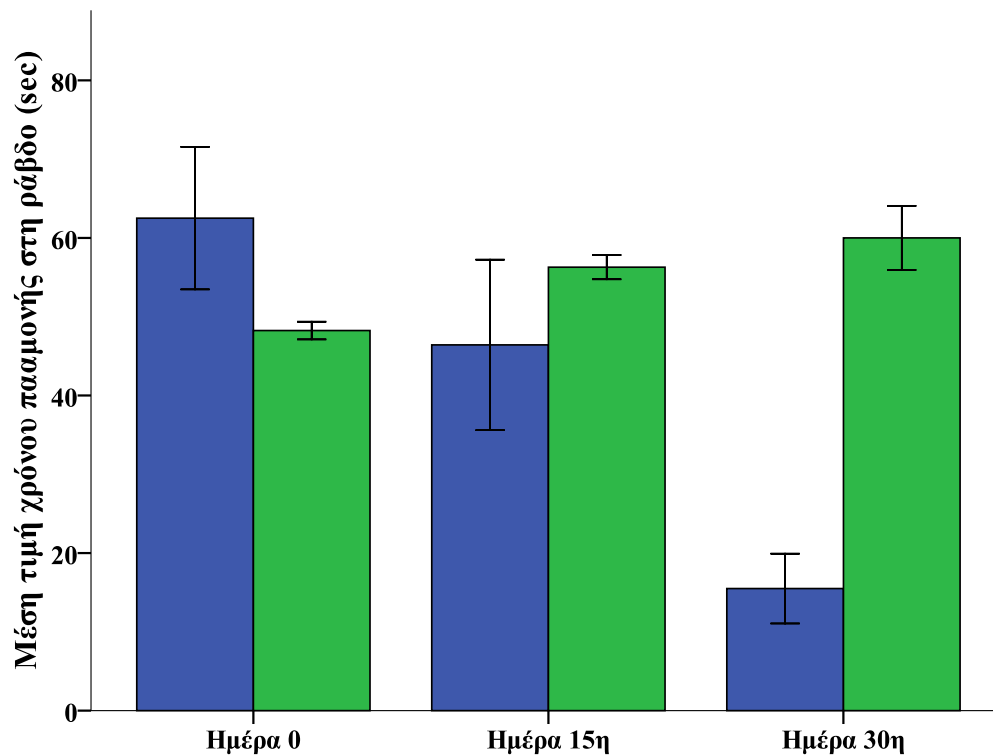
Τα ζώα που έλαβαν το ΟΦ CPF, εμφάνισαν διαφορές αναφορικά με τη φυσική τους κατάσταση, την συμπεριφορά τους, την γενικότερη στάση του σώματός τους σε σχέση με τα ζώα της ομάδας ελέγχου. Αν και το μεγαλύτερο ποσοστό των ζώων που πέθαναν κατά τη διάρκεια του πειραματισμού, άνηκαν στην ομάδα που λάμβανε το ΟΦ (15%), τα αίτια θανάτου δεν αποδόθηκαν στην φυσική τους κατάσταση, αλλά σε πειραματικούς χειρισμούς. Το μέσο Σ.Β. των ζώων που λάμβαναν το ΟΦ δεν διέφερε σημαντικά από το μέσο Σ.Β. των ζώων της ομάδας ελέγχου, τόσο από την έναρξη όσο και στο τέλος του πειράματος. Το κάθε ζώο ζύγιζε από 24 με 26 γραμμάρια και διατήρησε σχεδόν σταθερό το ΣΒ καθ' όλη τη διάρκεια του πειραματισμού. Πάντως τα ζώα που έλαβαν το ΟΦ, από την ημέρα έναρξης χορήγησής του δεν απέκτησαν βάρος, σε αντίθεση με τα ζώα ελέγχου που αύξησαν ελαφρώς το βάρος τους, όχι όμως σημαντικά. Στα ζώα που λάμβαναν το ΟΦ μετά από την πρώτη εβδομάδα του πειράματος εμφάνισαν υπερευαισθησία, ευερεθιστότητα και υπερδιέγερση που εκδηλώθηκε με υπερβολική αντίδραση στα ερεθίσματα και μεταξύ τους εκδήλωση εχθρικής συμπεριφοράς σε σχέση με τη ομάδα ελέγχου. Επίσης στα ζώα που λάμβαναν το ΟΦ παρατηρήθηκε από το μέσο περίπου και έπειτα του πειραματισμού κακή όψη τριχώματος και εστιακή αλωπεκία στην περιοχή του ρύγχους με απώλεια και των αισθητηρίων τριχών, που συσχετίστηκαν με τις διαταραχές στη συμπεριφοράς και την ευερεθιστότητα.

#### **Επιπτώσεις στην κινητικότητα των μυών ύστερα από μακροχρόνια έκθεση σε υποτοξικές δόσεις του chlorpyrifos**

Η δοκιμή ανάρτησης του σώματος των ζώων από τη ράβδο έδειξε ότι τα ζώα που ελάμβαναν το ΟΦ στο μέσο και στο τέλος του πειράματος είχαν σημαντικά μικρότερο χρόνο παραμονής στην ράβδο σε σχέση με τον αντίστοιχο χρόνο πριν την έναρξη της χορήγησης ( $P=0,003$  εφαρμογή μη παραμετρικού τεστ k συσχετιζόμενων δειγμάτων, Friedman test, με την μέθοδο Exact), γεγονός που υποδηλώνει ότι εξασθένησε η ικανότητα ισορροπίας σε αυτή και περιορίστηκε η μυϊκή τους δύναμη. Κάτι ανάλογο δεν ίσχυε για τα ζώα της ομάδας ελέγχου ( $P=0,5$ ). Με την εφαρμογή όμως του μη παραμετρικού τεστ 2 ανεξάρτητων δειγμάτων, Mann-Whitney U-Test, με την μέθοδο Exact δεν ανιχνεύθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των ζώων που έλαβαν το ΟΦ και των ζώων της ομάδας ελέγχου, στην έναρξη (κάτι το αναμενόμενο και ευκαταίο) και στο μέσο παρά μόνο στο τέλος του πειραματισμού, υποδεικνύοντας ότι η κινητική εξασθένηση έγινε καταφανής με τη δοκιμασία αυτή μετά τη 15<sup>η</sup> μέρα χορήγησης του ΟΦ (Πίνακας 2 και Γράφημα 1).

**Πίνακας 2 Συγκεντρωτικός πίνακας των αποτελεσμάτων της δοκιμής Body Suspension**

Ζώα πειράματος	Ημέρα 0		Ημέρα 15η		Ημέρα 30η		P
	Μέση τιμή	Τυπικό Σφάλμα	Μέση τιμή	Τυπικό Σφάλμα	Μέση τιμή	Τυπικό Σφάλμα	
που έλαβαν το ΟΦ CPF	62,51 <sup>α,γ</sup>	9,04	46,42 <sup>αβ</sup>	10,81	15,5 <sup>β,γ</sup>	4,43	$\alpha=0,018$ $\beta=0,017$ $\gamma=0,017$
ομάδας ελέγχου	48,25 <sup>α',γ'</sup>	1,13	56,29 <sup>α',β'</sup>	1,54	60,01 <sup>β',γ'</sup>	4,06	$\alpha'=0,18$ $\beta'=0,655$ $\gamma'=0,18$
P	0,4		0,711		0,044		

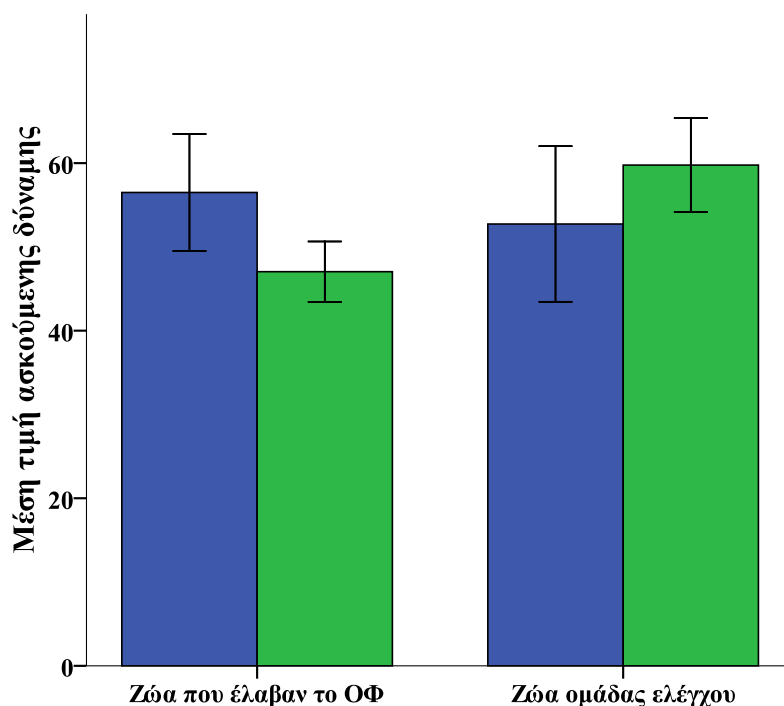


**Γράφημα 1** Μέση τιμή του χρόνου παραμονής στη ράβδο κατά την δοκιμασία Body Suspension test, στα ζώα που ελάμβαναν το ΟΦ (μπλε στήλες) και στα ζώα της ομάδας ελέγχου(πράσινες στήλες), κατά τις διάφορες φάσεις του πειράματος. Ανά ζώο εφαρμόστηκαν τρεις επαναλήψεις της ίδιας δοκιμής για την εξαγωγή μιας μέσης τιμής που το αντιπροσώπευε και χρησιμοποιήθηκε στη στατιστική επεξεργασία. Όπως φαίνεται μόνο στα πρώτα μειώθηκε σημαντικά ο χρόνος παραμονής κατά τη διάρκεια του πειραματισμού, ενώ στα δεύτερα ελαφρώς αυξήθηκε, πιθανώς λόγω εκμάθησης της δοκιμής αυτής. Οι ράβδοι παριστάνουν το τυπικό σφάλμα ( $\pm$  SE).

Προκειμένου να μελετήσουμε πως επηρεάζεται η μυϊκή δύναμη των ζώων από την μακροχρόνια έκθεση στο ΟΦ και συνεπώς η νευρομυϊκή λειτουργία χρησιμοποιήσαμε τη δοκιμή της χειρολαβής (grip strength test). Σύμφωνα με τη στατιστική επεξεργασία των δεδομένων που ελήφθησαν (εφαρμογή μη παραμετρικού τεστ 2 συσχετιζόμενων δειγμάτων, Wilcoxon signed-rank test, με την μέθοδο Exact) φάνηκε ότι τα ζώα που ελάμβαναν το ΟΦ είχαν σημαντικά μικρότερη μέση τιμή ασκούμενης μυϊκής δύναμης στο τέλος του πειράματος σε σχέση με την έναρξή του ( $P=0,047$ ), γεγονός που υποδηλώνει απώλεια μυϊκών ινών και διαταραχές στη νευρομυϊκή λειτουργία. Σε αντιδιαστολή, η μέση τιμή ασκούμενης δύναμης στα ζώα της ομάδας ελέγχου ήταν περίπου η ίδια στην έναρξη και στο τέλος του πειράματος ( $P=0,188$ ). Με την εφαρμογή όμως του μη παραμετρικού τεστ 2 ανεξάρτητων δειγμάτων, Mann-Whitney U-Test, με την μέθοδο Exact δεν ανιχνεύθηκαν σημαντικές διαφορές στα ζώα που έλαβαν το ΟΦ και στα ζώα της ομάδας ελέγχου, αναφορικά με την ασκούμενη δύναμη, τόσο κατά την έναρξη όσο και στο τέλος του πειράματος (Πίνακας 3 και Γράφημα 2).

**Πίνακας 3 Συγκεντρωτικός πίνακας των αποτελεσμάτων της δοκιμής Grip Strength**

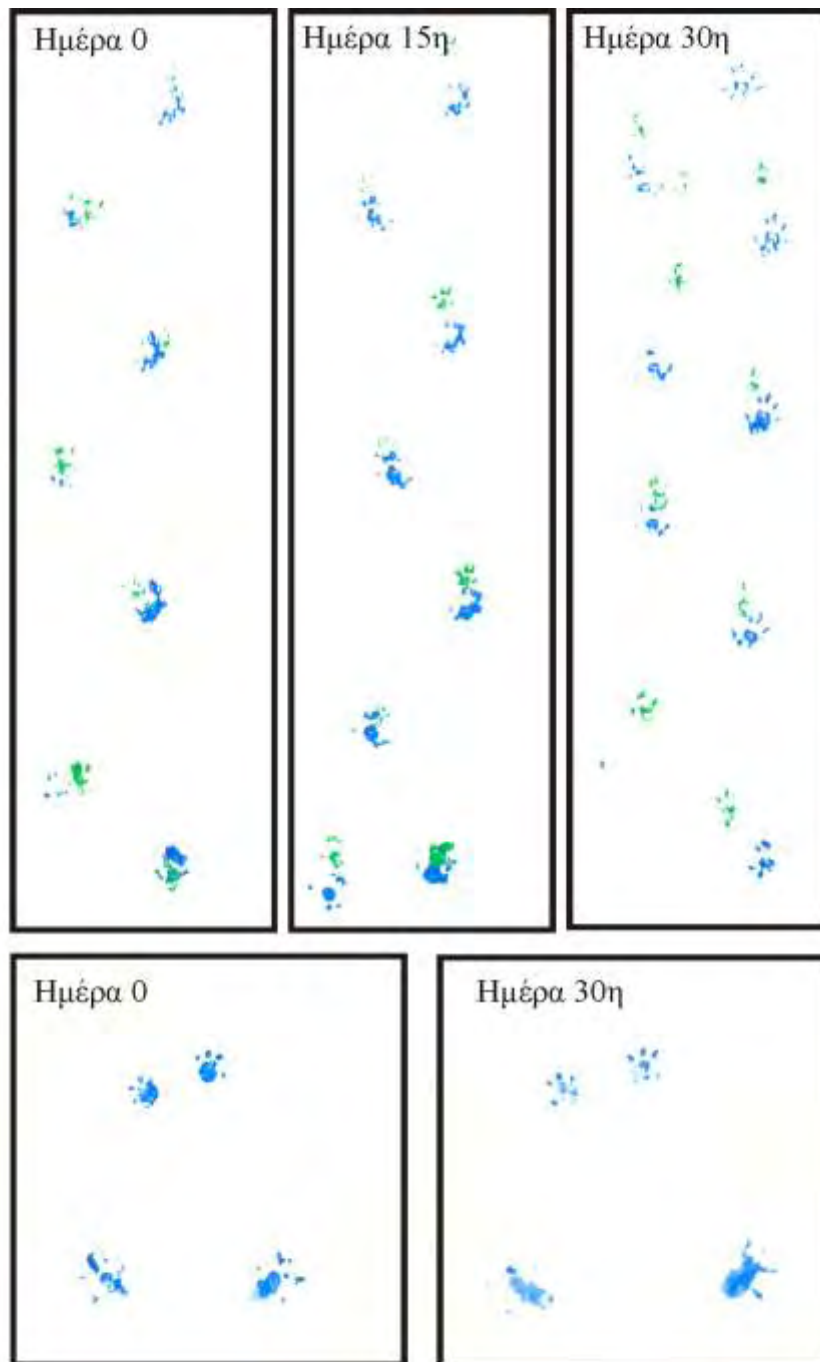
Ζώα πειράματος	Ημέρα 0			Ημέρα 30η			<i>P</i>
	Μέση τιμή	Τυπικό Σφάλμα	Διάμεσος	Μέση τιμή	Τυπικό Σφάλμα	Διάμεσος	
που έλαβαν το ΟΦ CPF	56,5 <sup>a</sup>	6,97	48,33	47,04 <sup>a</sup>	3,6	45	$\alpha=0,047$
ομάδας ελέγχου	52,73	9,28	60,67	59,78	5,6	61	0,188
<i>P</i>	0,751			0,160			



**Γράφημα 2** Μέση τιμή ασκούμενης δύναμης κατά τη δοκιμασία Grip Strength, στα ζώα που ελάμβαναν το ΟΦ και στα ζώα της ομάδας ελέγχου, πριν από την έναρξη (μπλε στήλες) και στο τέλος του πειράματος (πράσινες στήλες). Ανά ζώο εφαρμόστηκαν τρεις επαναλήψεις της ίδιας δοκιμής για την εξαγωγή μιας μέσης τιμής που το αντιπροσώπευε και χρησιμοποιήθηκε στη στατιστική επεξεργασία. Όπως φαίνεται μόνο στα πρώτα μειώθηκε σημαντικά η ασκούμενη δύναμη κατά τη διάρκεια του πειραματισμού, ενώ στα δεύτερα παρέμεινε περίπου η ίδια ή και αυξήθηκε. Οι ράβδοι παριστάνουν το τυπικό σφάλμα ( $\pm$  SE).

Η ανάλυση των βημάτων (footprint analysis) βοήθησε στην ποσοτικοποίηση των ανωμαλιών βαδίσματος των υπο μελέτη ζώων και επέτρεψε να εξαχθούν συμπεράσματα αναφορικά με την επίδραση του ΟΦ CPF στην κινητικότητα των μυών. Κατά την παρατήρηση μέσα στους κλωβούς τους, τα ζώα που λάμβαναν το ΟΦ εμφάνιζαν υπομετρικές κινήσεις των άκρων τους και ανυψωμένη στάση του σώματος με κυρτωμένη ράχη, σε σχέση με τα ζώα της ομάδας ελέγχου. Όπως αποκάλυψε η ανάλυση των βημάτων τα ζώα που ελάμβαναν το ΟΦ είχαν μεγαλύτερη έξω στροφή των οπίσθιων άκρων τους, μεγαλύτερη βάση στήριξης και ακανόνιστο μήκος βήματος σε σχέση με την ομάδα ελέγχου και σε σχέση με τα πρότυπα βαδίσματος τους πριν την έναρξη του πειραματισμού.

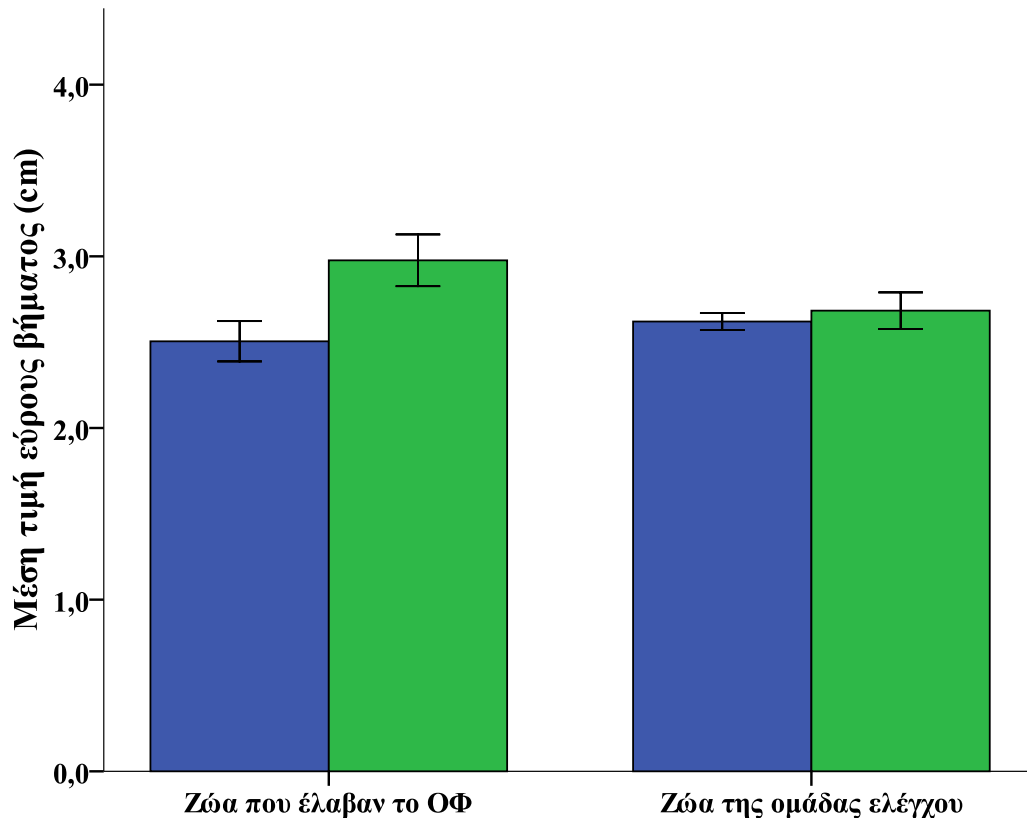




**Εικόνα 1.** Τα τρία άνω πλαίσια περιέχουν τα ίχνη των πελμάτων ενός ζώου κατά τη δοκιμασία footprint analysis που έλαβε το ΟΦ CFP πριν την έναρξη (Ημέρα 0), στο μέσο (Ημέρα 15η) και στο τέλος του πειραματισμού (Ημέρα 30η), όπου με το χρώμα μπλε είναι βαμμένα τα οπίσθια άκρα, ενώ με το πράσινο τα πρόσθια. Παρατηρείστε το τέλειο συγχρονισμό των άκρων πριν την έναρξη της χορήγησης του ΟΦ, όπου κατά τη βάρδιση το πέλμα του πρόσθιου άκρου της κάθε πλευρά συμπίπτει με το πέλμα του οπίσθιου άκρου της ίδιας πλευράς και την συμμετρικότητα των βημάτων. Την 30<sup>η</sup> μέρα από την έναρξη του πειραματισμού είναι εμφανείς η μείωση στο μήκος του βήματος, η αύξηση της βάσης στήριξης και ο μη συντονισμός των άκρων κατά τη βάρδιση. Τα δύο κάτω πλαίσια παριστάνουν τα ίχνη των πελμάτων των άκρων ενός ζώου που έλαβε το ΟΦ CFP κατά την δοκιμασία landing foot splay πριν την έναρξη (Ημέρα 0) και στο τέλος του πειραματισμού (Ημέρα 30η). Παρατηρείστε την μεγαλύτερη απόσταση μεταξύ των δύο οπίσθιων άκρων στη δεύτερη περίπτωση.

Η ανάλυση στα ίχνη των πελμάτων (Footprint analysis), αποκάλυψε ότι στα ζώα που έλαβαν το ΟΦ μακροχρόνια σε υποτοξικές δόσεις επηρεάστηκε ο συντονισμός των άκρων τους και η στήριξη του βάρους του σώματός τους. Πιο συγκεκριμένα όσον αφορά το μήκος βήματος (=stride length) η στατιστική επεξεργασία (με την εφαρμογή μη παραμετρικού τεστ 2 ανεξάρτητων δειγμάτων, Mann-Whitney *U*-Test, με την μέθοδο Exact) των δεδομένων έδειξε ότι φάνηκε ότι τα ζώα που ελάμβαναν το ΟΦ είχαν σημαντικά μικρότερο μήκος βήματος (μέση τιμή  $5,66 \pm 0,14$  cm, διάμεσος 5,6 cm) σε σχέση με τα ζώα της ομάδας ελέγχου (μέση τιμή  $6,39 \pm 0,22$  cm, διάμεσος 6,4 cm) κατά τον πειραματισμό ( $P=0,04$ ). Η διαφορά αυτή δεν υπήρχε πριν την έναρξη του πειράματος (τα ζώα που θα ελάμβαναν το ΟΦ είχαν το ίδιο περίπου μήκος βήματος: μέση τιμή  $5,73 \pm 0,15$  cm και διάμεσο 5,9 cm σχέση με τα ζώα της ομάδας ελέγχου: μέση τιμή  $5,89 \pm 0,22$  cm και διάμεσο 5,75 cm,  $P=0,829$ ).

Αναφορικά με το εύρος βήματος ή τη βάση στήριξης (=stride width or base of support) η στατιστική επεξεργασία (με την εφαρμογή μη παραμετρικού τεστ 2 συσχετιζόμενων δειγμάτων, Wilcoxon signed-rank test, με την μέθοδο Exact) των δεδομένων έδειξε ότι τα ζώα που ελάμβαναν το ΟΦ είχαν σημαντικά μεγαλύτερο εύρος βήματος κατά τον πειραματισμό (μέση τιμή  $2,51 \pm 0,12$  cm, διάμεσος 2,46 cm) από εκείνο πριν την έναρξη της χορήγησης του ΟΦ (μέση τιμή  $2,98 \pm 0,15$  cm, διάμεσος 3,1 cm,  $P=0,004$ ), ενώ το αντίστοιχο δεν ίσχυε για τα ζώα της ομάδας ελέγχου, που πριν από την έναρξη του πειράματος είχαν εύρος βήματος με μέση τιμή  $2,62 \pm 0,05$  cm και διάμεσο 2,63 cm ενώ κατά τη διάρκεια του πειράματος είχαν το ίδιο σχεδόν εύρος βήματος με μέση τιμή  $2,68 \pm 0,11$  cm και διάμεσο 2,73 cm,  $P=0,75$ , Γράφημα 3).



**Γράφημα 3** Μέση τιμή εύρους βήματος κατά τη δοκιμασία Footprint analysis, στα ζώα που ελάμβαναν το ΟΦ και στα ζώα της ομάδας ελέγχου, πριν από την έναρξη (μπλε στήλες) και στο μέσο του πειράματος (πράσινες στήλες). Όπως φαίνεται μόνο στα πρώτα αυξήθηκε σημαντικά το εύρος βήματος κατά τη διάρκεια του πειραματισμού, ενώ στα δεύτερα παρέμεινε περίπου το ίδιο. Οι ράβδοι παριστάνουν το τυπικό σφάλμα ( $\pm$  SE).

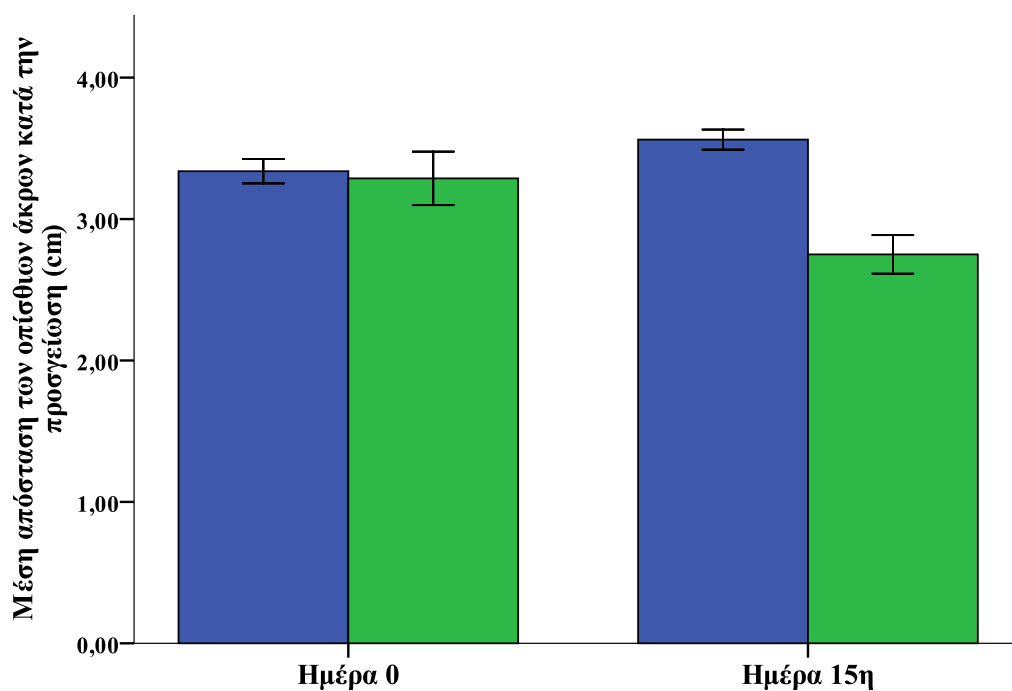
Σχετικά με την απόσταση μεταξύ δυο διαδοχικών πατημασιών (=interpredal distance), αν και στα ζώα που έλαβαν το ΟΦ η μέση απόσταση ( $2,84 \pm 0,19$  cm) ήταν μικρότερη τόσο από την αντίστοιχη των ζώων ελέγχου ( $3,32 \pm 0,42$  cm) όσο και από την δικιά τους μέση απόσταση πριν την έναρξη του πειράματος ( $3,05 \pm 0,19$  cm) η στατιστική επεξεργασία έδειξε ότι η διαφορά αυτή δεν ήταν στατιστικώς σημαντική (για την πρώτη περίπτωση εφαρμογή μη παραμετρικού τεστ 2 ανεξάρτητων δειγμάτων, Mann-Whitney U-Test, με την μέθοδο Exact,  $P=0,288$ , ενώ για την δεύτερη περίπτωση εφαρμογή μη παραμετρικού τεστ 2 συσχετιζόμενων δειγμάτων, Wilcoxon signed-rank test, με την μέθοδο Exact,  $P=0,447$ )

Αξιοσημείωτο είναι ότι τα ζώα που ελάμβαναν το ΟΦ εμφάνισαν κατά τη βάδισή τους μη συντονισμένες κινήσεις των πρόσθιων με τα οπίσθια άκρα. Ενώ τόσο τα ζώα ελέγχου, αλλά και τα ίδια πριν την έναρξη του πειράματος είχαν συντονισμένο βάδισμα, δηλαδή τα αποτυπώματα των πρόσθιων με των οπίσθιων άκρων της ίδιας πλευράς ήταν λίγο πολύ το ένα πάνω στο άλλο, τα ζώα που έλαβαν το ΟΦ εμφάνισαν ένα ασυντόνιστο πρότυπο βαδίσματος, όπως φαίνεται από την κυμαινόμενη απόσταση του πρόσθιου με το οπίσθιο άκρο της ίδιας πλευράς κατά τη βάδιση (Εικόνα 1).

Για να μελετήσουμε την μεταβολή ή μη στην νευρική αγωγιμότητα στα περιφερικά νεύρα ύστερα από μακροχρόνια χορήγηση του ΟΦ CPF, χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία Landing foot splay. Κατά τη δοκιμασία αυτή υπολογίστηκε η απόσταση μεταξύ των δύο οπίσθιων άκρων των μυών όταν προσγειώνονται στο έδαφος ύστερα από ελεύθερη πτώση από ύψος 15cm. Στη δοκιμασία αυτή το κάθε ζώο υποβαλλόταν πέντε φορές από τις οποίες εξαγόταν μια μέση τιμή και στη συνέχεια εξαγόταν ένας μέσος όρος για κάθε ομάδα. Ο πειραματισμός έλαβε χώρα πριν από την έναρξη του πειράματος, στο μέσο και με το πέρας του πειραματισμού. Σύμφωνα με τη στατιστική επεξεργασία των δεδομένων που ελήφθησαν (παραμετρικά τεστ 2 ανεξάρτητων δειγμάτων) φάνηκε ότι τα ζώα που ελάμβαναν το ΟΦ είχαν σημαντικά μεγαλύτερη μέση απόσταση μεταξύ των δυο οπίσθιων άκρων τους ( $3,56 \pm 0,32$ ) και συνεπώς επιβράδυνση στην ταχύτητα αγωγής των νευρικών ώσεων σε σχέση με την μέση απόσταση των ζώων της ομάδας ελέγχου ( $2,75 \pm 0,38$ ,  $P < 0,001$ ), ενώ πριν την έναρξη του πειράματος οι μέσες αποστάσεις στις δύο ομάδες δεν διέφεραν σημαντικά ( $3,34 \pm 0,4$  και  $3,29 \pm 0,54$ ,  $P = 0,78$ ), Πίνακας 4. Επιπλέον, (με την εφαρμογή μη παραμετρικού τεστ 2 συσχετιζόμενων δειγμάτων, Wilcoxon signed-rank test, με την μέθοδο Exact) φάνηκε ότι τα ζώα που ελάμβαναν το ΟΦ είχαν επίσης σημαντικά μεγαλύτερη απόσταση στα οπίσθια άκρα τους σε αυτή τη δοκιμασία κατά τον πειραματισμό από την απόσταση πριν την έναρξη της χορήγησης του ΟΦ ( $P = 0,004$ ) Γράφημα 4.

**Πίνακας 4. Συγκεντρωτικός πίνακας των αποτελεσμάτων της δοκιμής Landing foot splay**

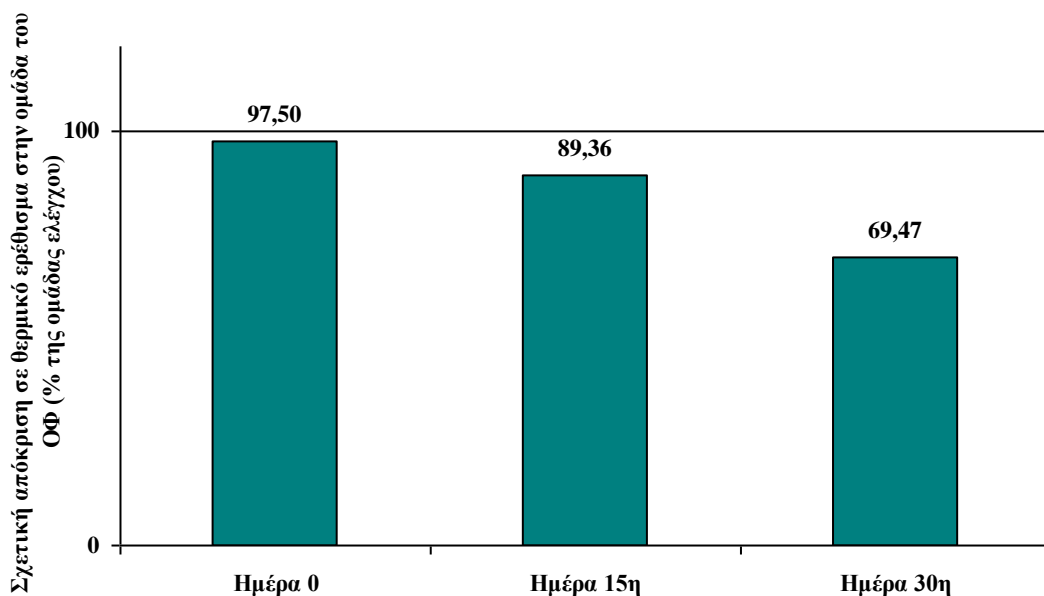
<b>Ζώα πειράματος</b>	<b>Αριθμός</b>	<b>Μέση απόσταση</b>	<b>Τυπική απόκλιση</b>	<b>Τυπικό Σφάλμα</b>
<b>Ημέρα 0</b> που έλαβαν το ΟΦ CPF	21	3,3381	0,39557	0,08632
ομάδας ελέγχου	8	3,2875	0,53569	0,18940
<b>Ημέρα 15η</b> που έλαβαν το ΟΦ CPF	21	3,5619	0,32477	0,07087
ομάδας ελέγχου	8	2,7500	0,38545	0,13628



**Γράφημα 4.** Μέση απόσταση των οπίσθιων άκρων κατά την προσγείωση (Landing footsplay test), στα ζώα που ελάμβαναν το ΟΦ (μπλε στήλες) και στα ζώα της ομάδας ελέγχου (πράσινες στήλες), πριν από την έναρξη και στο μέσο του πειράματος, που διατηρήθηκε περίπου ίδια και με την ολοκλήρωσή του. Οι ράβδοι παριστάνουν το τυπικό σφάλμα ( $\pm$  SE).

## Επιπτώσεις στην αισθητικότητα των μυών ύστερα από μακροχρόνια έκθεση σε υποτοξικές δόσεις του chlorpyrifos

Για να διαπιστώσουμε ένα η μακροχρόνια έκθεση στο ΟΦ CPF, επηρεάζει την απόκριση σε θερμικό ερέθισμα και συνεπώς την αισθητικότητα που σχετίζεται με αυτό υποβάλαμε τα ζώα του πειράματος στην δοκιμασία Hot plate test, πριν την έναρξη, στο μέσο και με το πέρας του πειράματος. Στη δοκιμασία αυτή καταμετρήθηκαν οι χρόνοι (σε δευτερόλεπτα), που γίνεται αντιληπτό το ερέθισμα θερμαινόμενης πλάκας των 52°C. Τα δεδομένα ύστερα από στατιστική επεξεργασία (παραμετρικά τεστ 2 ανεξάρτητων δειγμάτων), κατέδειξαν ότι τα ζώα που ελάμβαναν το ΟΦ είχαν σημαντικά μικρότερο μέσο χρόνο απόκρισης στο θερμικό ερέθισμα στη μέση και με το πέρας της πειραματικής διαδικασίας από τον αντίστοιχο μέσο χρόνο απόκρισης της ομάδας ελέγχου ( $P=0,017$  και  $P=0,015$ , αντίστοιχα), ενώ πριν την έναρξη του πειράματος οι μέσοι χρόνοι απόκρισης στις δύο ομάδες δεν διέφεραν σημαντικά ( $P=0,302$ ). Επιπλέον, (με την εφαρμογή μη παραμετρικού τεστ 2 συσχετιζόμενων δειγμάτων, Wilcoxon signed-rank test, με την μέθοδο Exact) φάνηκε ότι τα ζώα που ελάμβαναν το ΟΦ είχαν σημαντικά μικρότερο χρόνο απόκρισης στο θερμικό ερέθισμα στο μέσο και στο τέλος της πειραματικής διαδικασίας από εκείνον πριν την έναρξη της χορήγησης του ΟΦ ( $P=0,043$ ), συγκριτικά με τους αντίστοιχους χρόνους της ομάδας ελέγχου ( $P=0,109$ ). Συνεπώς τα ζώα που ελάμβαναν μακροχρόνιες υποτοξικές δόσεις του ΟΦ CPF εμφάνισαν θερμική υπεραλγησία και αλλοδυνία.

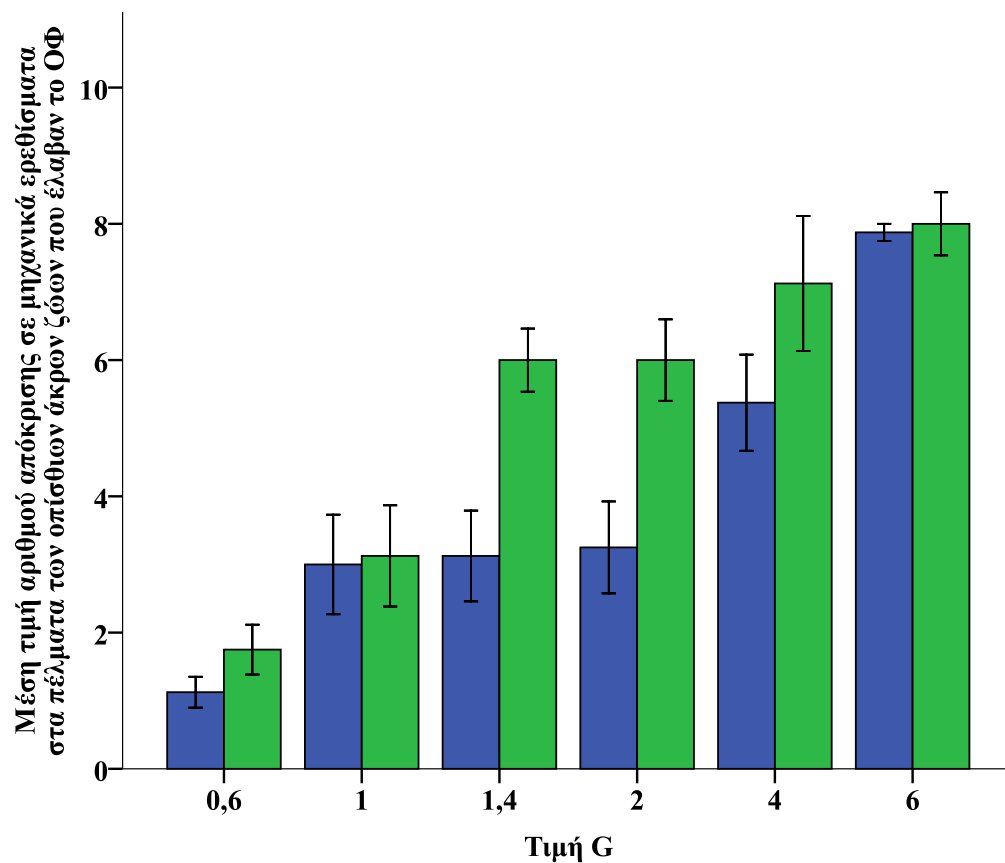


Γράφημα 5. Μέση σχετική απόκριση σε θερμικό ερέθισμα (Hot plate test), στα ζώα που ελάμβαναν το ΟΦ, εκφρασμένη σε % ποσοστό της αντίστοιχης απόκρισης στα ζώα ελέγχου, πριν από την έναρξη, στο μέσο και με το πέρας του πειράματος.

Πέρα από τη θερμική υπεραλγησία τα ζώα που έλαβαν το ΟΦ σε υποτοξικές δόσεις μακροχρόνια ανέπτυξαν και μηχανική υπερευαισθησία, η οποία ανιχνεύθηκε την 30<sup>η</sup> μέρα από την έναρξη της χορήγησης. Στη δοκιμασία Von Frey-hair pinch test, χρησιμοποιήθηκαν μια σειρά από τριχοειδείς βελόνες για την αναγνώριση του μηχανικού ερεθίσματος από τα ζώα του πειράματος. Όσο μεγαλύτερη ήταν η τιμή G της κάθε βελόνας τόσο αυξανόταν η διάμετρός της και το ασκούμενο μηχανικό ερέθισμα. Οι βελόνες με μικρές τιμές G ασκούν ανεπαίσθητο μηχανικό ερέθισμα στα πέλματα των ζώων και γίνονται μόλις αντιληπτές από αυτά, ενώ με μεγάλες τιμές γίνονται εντονα αντιληπτές και προκαλούν γρήγορη απομάκρυνση του ερεθιζόμενου άκρου. Με βάση τη στατιστική επεξεργασία των δεδομένων και συγκεκριμένα με εφαρμογή μη παραμετρικού τεστ 2 συσχετιζόμενων δειγμάτων, Wilcoxon signed-rank test, με την μέθοδο Exact, τα ζώα που ελάμβαναν το ΟΦ εμφάνισαν σημαντικά εντονότερη απόκριση (υπερευαισθησία) στα μηχανικά ερεθίσματα των 1,4 και 2 G την 30<sup>η</sup> μέρα της πειραματικής διαδικασίας συγκρινόμενη με εκείνη πριν την έναρξη της χορήγησης του ΟΦ ( $P=0,023$  και  $P=0,039$  αντίστοιχα). Παρόμοια τα ζώα αυτά για τα ίδια μηχανικά ερεθίσματα εμφάνισαν σημαντικά εντονότερη απόκριση την 30<sup>η</sup> μέρα της πειραματικής διαδικασίας συγκριτικά με εκείνη των ζώων της ομάδας ελέγχου ( $P=0,045$  και  $P=0,037$  αντίστοιχα με την εφαρμογή μη παραμετρικού τεστ 2 ανεξάρτητων δειγμάτων, Mann-Whitney U-Test, με την μέθοδο Exact) παραμετρικά τεστ 2 ανεξάρτητων δειγμάτων), κατέδειξαν ότι τα ζώα που ελάμβαναν το ΟΦ είχαν σημαντικά μικρότερο μέσο χρόνο απόκρισης στο θερμικό ερέθισμα στη μέση και με το πέρας της πειραματικής διαδικασίας από τον αντίστοιχο μέσο χρόνο απόκρισης της ομάδας ελέγχου ( $P=0,017$  και  $P=0,015$ , αντίστοιχα), ενώ πριν την έναρξη του πειράματος οι τιμές απόκρισης στις δύο ομάδες για όλες τις τιμές G δεν διέφεραν σημαντικά ( $P=0,302$ ). Το γεγονός ότι στατιστικώς σημαντικές διαφορές ανιχνεύθηκαν μόνο για τις δύο τιμές G 1,4 και 2, μπορεί να ερμηνευτεί από το γεγονός ότι οι μικρότερες και μεγαλύτερες τιμές προκαλούν ανεπαίσθητα και πολύ έντονα ερεθίσματα αντίστοιχα και δεν αποτελούν τόσο ευαίσθητους δείκτες της προκαλούμενης από το ΟΦ μηχανικής αλλοδυνίας (Πίνακας 5, Γράφημα 6 και Γράφημα 7)

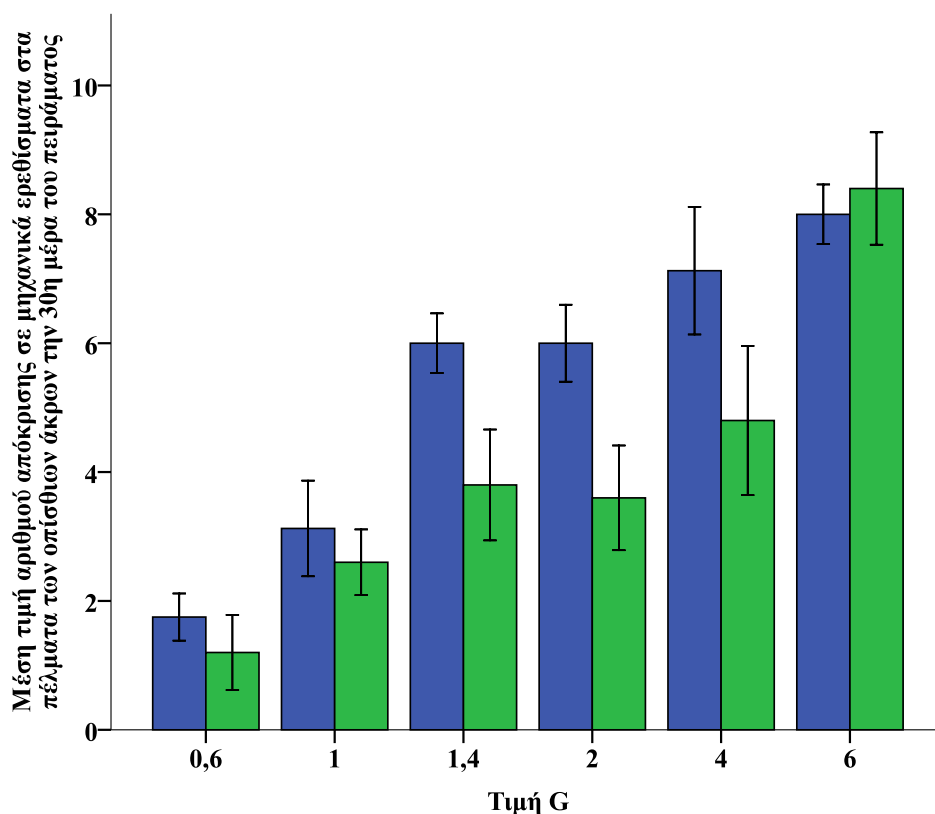
**Πίνακας 5. Συγκεντρωτικός πίνακας των αποτελεσμάτων της δοκιμής Von Frey-hair pinch**

Ζώα πειράματος	G	Ημέρα 0			Ημέρα 30η			P
		Μέση τιμή	Τυπικό Σφάλμα	Διάμεσος	Μέση τιμή	Τυπικό Σφάλμα	Διάμεσος	
που έλαβαν το ΟΦ CPF	<b>0,6</b>	1,13	0,23	1	1,75	0,37	2	0,375
	<b>1</b>	3	0,73	2,5	3,13	0,74	3	0,625
	<b>1,4</b>	3,13 <sup>α</sup>	0,67	3	6 <sup>α, γ</sup>	0,46	6	α=0,023
	<b>2</b>	3,25 <sup>β</sup>	0,67	2,5	6 <sup>β, δ</sup>	0,6	7	β=0,039
	<b>4</b>	5,36	0,71	5,5	7,13	0,99	7	0,172
	<b>6</b>	7,86	0,13	8	8	0,46	8	0,705
ομάδας ελέγχου	<b>0,6</b>	2	0,55	2	1,2	0,58	1	0,5
	<b>1</b>	2,6	1,03	3	2,6	0,5	3	1
	<b>1,4</b>	4,4	0,51	4	3,8 <sup>γ</sup>	0,86	4	0,75
	<b>2</b>	4,6	1,5	4	3,6 <sup>δ</sup>	0,81	3	0,625
	<b>4</b>	5,8	1,02	5	4,8	1,16	4	0,25
	<b>6</b>	6,4	1,21	6	8,4	0,87	7	0,5
<b>P</b>		γ=0,045 δ=0,037						



**Γράφημα 6.** Μέση τιμή του αριθμού απόκρισης σε μηχανικά ερεθίσματα στα πέλματα των οπίσθιων άκρων (σε 6 επαναλήψεις ανά πέλμα) με τριχοειδείς βελόνες συνεχούς αυξανόμενης τιμής G στα ζώα που ελάμβαναν το ΟΦ πριν από την έναρξη (μπλε στήλες) και στο τέλος του πειράματος (πράσινες στήλες). Οι ράβδοι παριστάνουν το τυπικό σφάλμα ( $\pm$  SE).



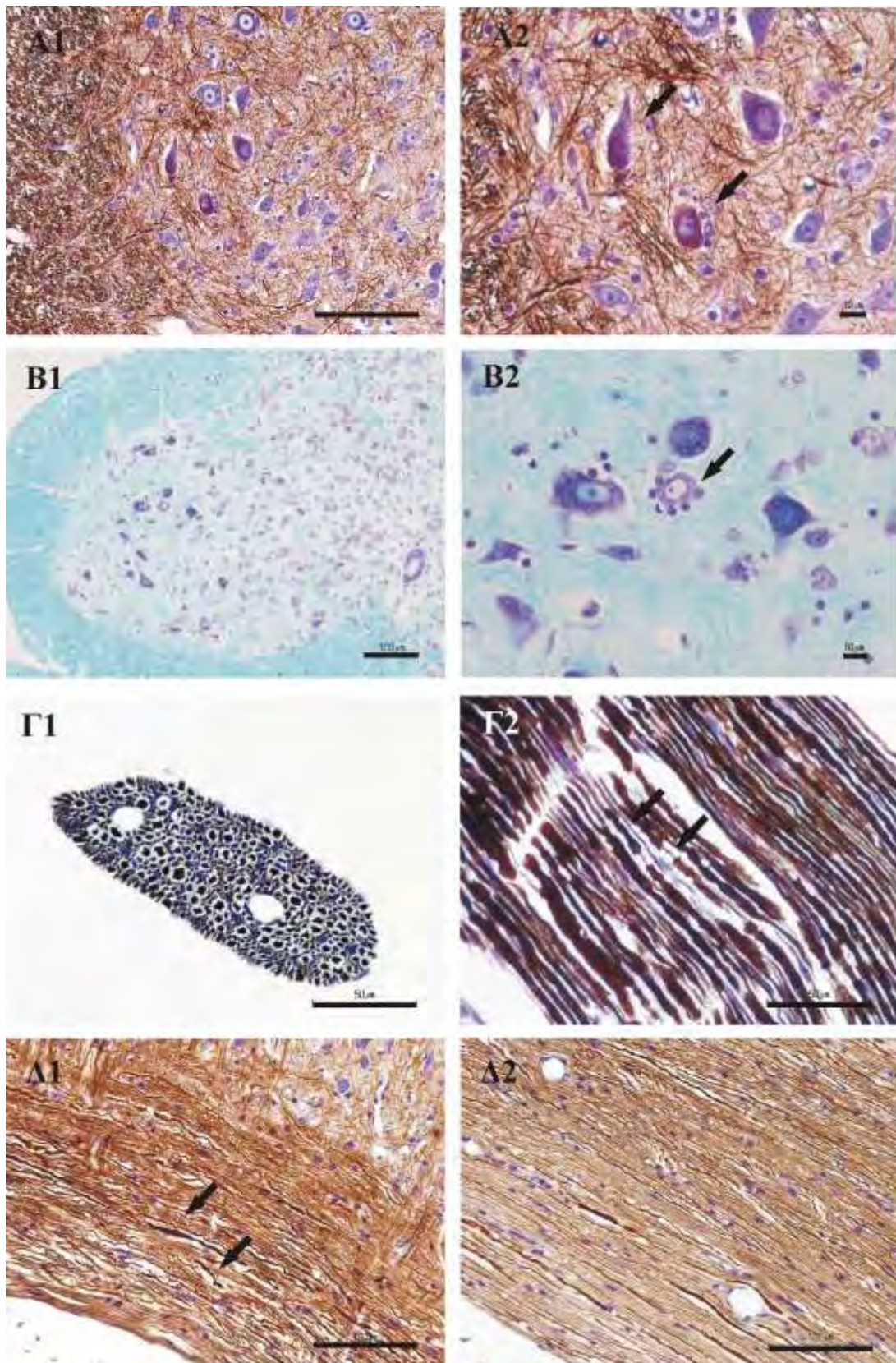


**Γράφημα 7.** Μέση τιμή του αριθμού απόκρισης σε μηχανικά ερεθίσματα στα πέλματα των οπίσθιων άκρων (σε 6 επαναλήψεις ανά πέλμα) με τριχοειδείς βελόνες συνεχούς αυξανόμενης τιμής G στο τέλος του πειράματος στα ζώα που ελάμβαναν το ΟΦ (μπλε στήλες) και στα ζώα της ομάδας ελέγχου (πράσινες στήλες). Οι ράβδοι παριστάνουν το τυπικό σφάλμα ( $\pm$  SE). Παρατηρείστε ότι στα ζώα που ελάμβαναν το ΟΦ ο μέσος βαθμός απόκρισης στα μηχανικά ερεθίσματα είναι μεγαλύτερος για όλες σχεδόν τις τιμές G (πλην της τιμής 6), αλλά στατιστικώς σημαντικές διαφορές ανιχνεύθηκαν μόνο για τις τιμές G 1,4 και 2.

Όπως φάνηκε από τα αποτελέσματα της δοκιμής της θερμαινόμενης πλάκας και από τη δοκιμή απόκρισης σε μηχανικό ερέθισμα (Von Frey-hair pinch test) διαπιστώθηκε θερμική υπεραλγησία και μηχανική αλλοδυνία αντίστοιχα στα ζώα που έλαβαν το ΟΦ υποδεικνύοντας την ανάπτυξη αισθητικής περιφερικής πολυνευροπάθειας ύστερα από μακροχρόνια έκθεση.

### ***Ιστολογικές αλλοιώσεις στο ΚΝΣ και στα περιφερικά νεύρα***

Οι χρώσεις τροποποιημένη BLS και Kluver-Barrera, χρησιμοποιήθηκαν για μια αδρή εκτίμηση των ιστολογικών παρασκευασμάτων των ζώων του πειράματος. Κατά την παρατήρηση διαπιστώθηκε νευροεκφύλιση, κυρίως σε κινητικούς νευρώνες του ραχιαίου κέρατος του νωτιαίου μυελού και αξονοπάθεια στα περιφερικά νεύρα και σε δομές ης λευκής ουσίας του εγκεφαλικού στέλεχους με δυστροφικούς νευράξονες (κατά τμήματα λήπτυνση ή διάταση της διαμέτρου του νευράξονα) στα ζώα που εκτέθηκαν μακροχρόνια στο ΟΦ CPF. Στα ίδια ζώα παρατηρήθηκε μικρού βαθμού αστρογλοίωση, τόσο στον εγκέφαλο, όσο και στο νωτιαίο μυελό (Εικόνα 2)



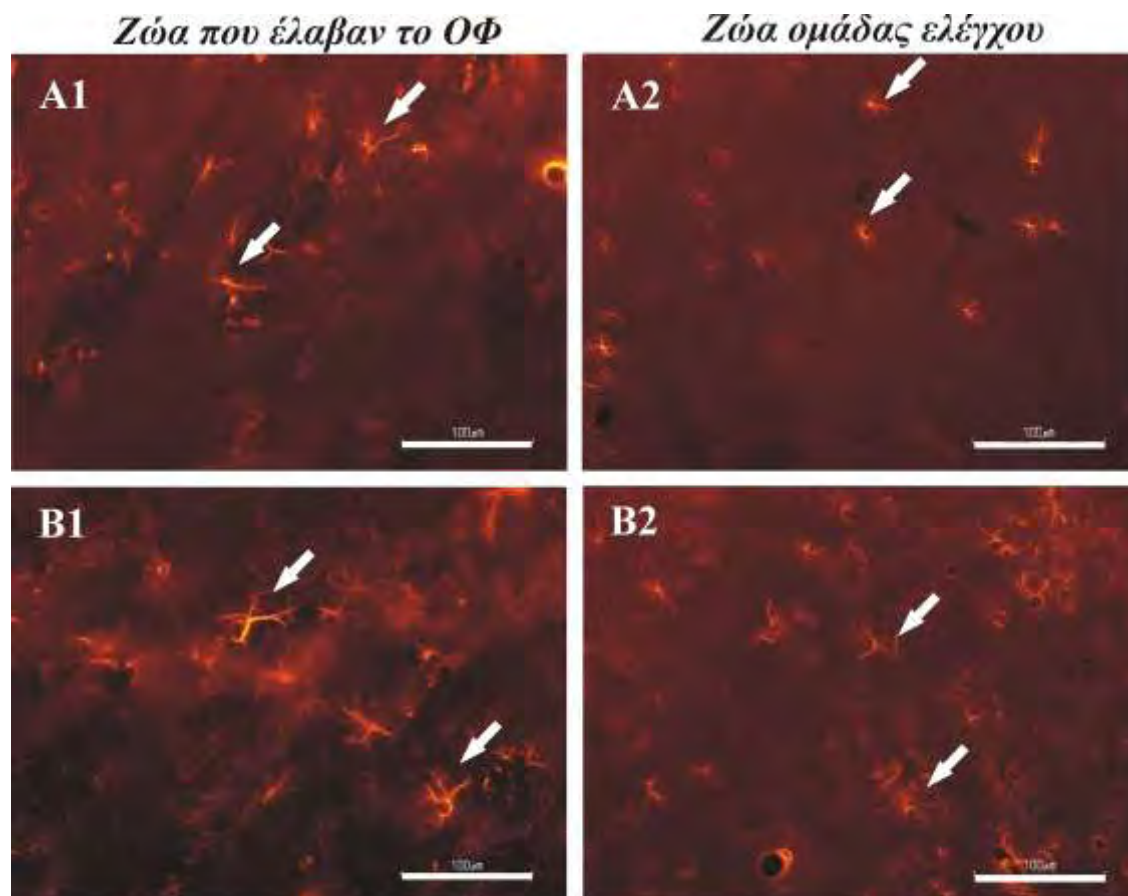
**Εικόνα 2** α) A1 –A2, (η A2 αποτελεί μια μεγεθυσμένη περιοχή της A1): Φωτομικρογραφίες από εγκάρσια τομή παραφίνης πάχους 7 μm νωτιαίου μυελού ζώων που έλαβαν το ΟΦ, χρωματισμένες με BLS, όπου τα νευρικά ινίδια των νευραξόνων χρωματίζονται μαύρο-καφέ. Διακρίνονται δυο εκφυλισμένοι πυκνωτικοί νευρώνες

(βέλη) στο κοιλιακό κέρας του νωτιαίου μυελού, ο ένας εκ των οποίων περιβάλλεται από άφθονα κύτταρα νευρογλοίας. β) B1 –B2, (η B2 αποτελεί μια μεγεθυσμένη περιοχή της B1) Φωτομικρογραφίες από εγκάρσια τομή παραφίνης πάχους 7  $\mu\text{m}$  νωτιαίου μυελού ζώων του πειράματος που έλαβαν το ΟΦ, χρωματισμένες με Kluver-Barrera, όπου η μυελίνη χρωματίζεται γαλάζια. Το βέλος υποδεικνύει ένα νευρώνα, ο οποίος περιβάλλεται από άφθονα κύτταρα νευρογλοίας. γ) Γ1 Φωτομικρογραφία εγκάρσιας τομής περιφερικού νεύρου από ζώο που έλαβε το ΟΦ χρωματισμένη με BLS, όπου οι νευράξονες εμφανίζονται ως μαύρες κουκκίδες και περιβάλλονται από τα έλυτρα μυελίνης (ανοιχτό γκρι χρώμα). δ) Γ2 Φωτομικρογραφία επιμήκους τομής περιφερικού νεύρου από ζώο που έλαβε το ΟΦ χρωματισμένη με BLS, όπου οι νευράξονες φαίνονται διαταγμένοι παράλληλα και έχουν σκούρο καφέ χρώμα. Παρατηρείστε το ακανόνιστο πάχος τους κατά την πορεία τους. Τα βέλη δείχνουν θέσεις όπου υπάρχει τμηματική λέπτυνση του πάχους των νευραξόνων. ε) Δ1-Δ2 Φωτομικρογραφίες οβελιαίων τομών αντίστοιχων περιοχών του εγκεφαλικού στελέχους από ζώο που έλαβε το ΟΦ (Δ1) και από ζώο της ομάδας ελέγχου (Δ2) χρωματισμένες με BLS. Παρατηρείστε τους ακανόνιστους και δυστροφικούς νευράξονες στην πρώτη περίπτωση (βέλη) σε σύγκριση με εκείνους του ζώου της ομάδας ελέγχου. Οι μπάρες στις φωτογραφίες A1, B1, Δ1 και Δ2 αντιπροσωπεύουν 100 $\mu\text{m}$ , στις φωτογραφίες Γ1 και Γ2 50 $\mu\text{m}$ , ενώ στις A2 και B2 10 $\mu\text{m}$ .



### *Αστρογλοΐωση και κυτταροπλασματικά έγκλειστα σε διάφορες περιοχές του εγκεφάλου*

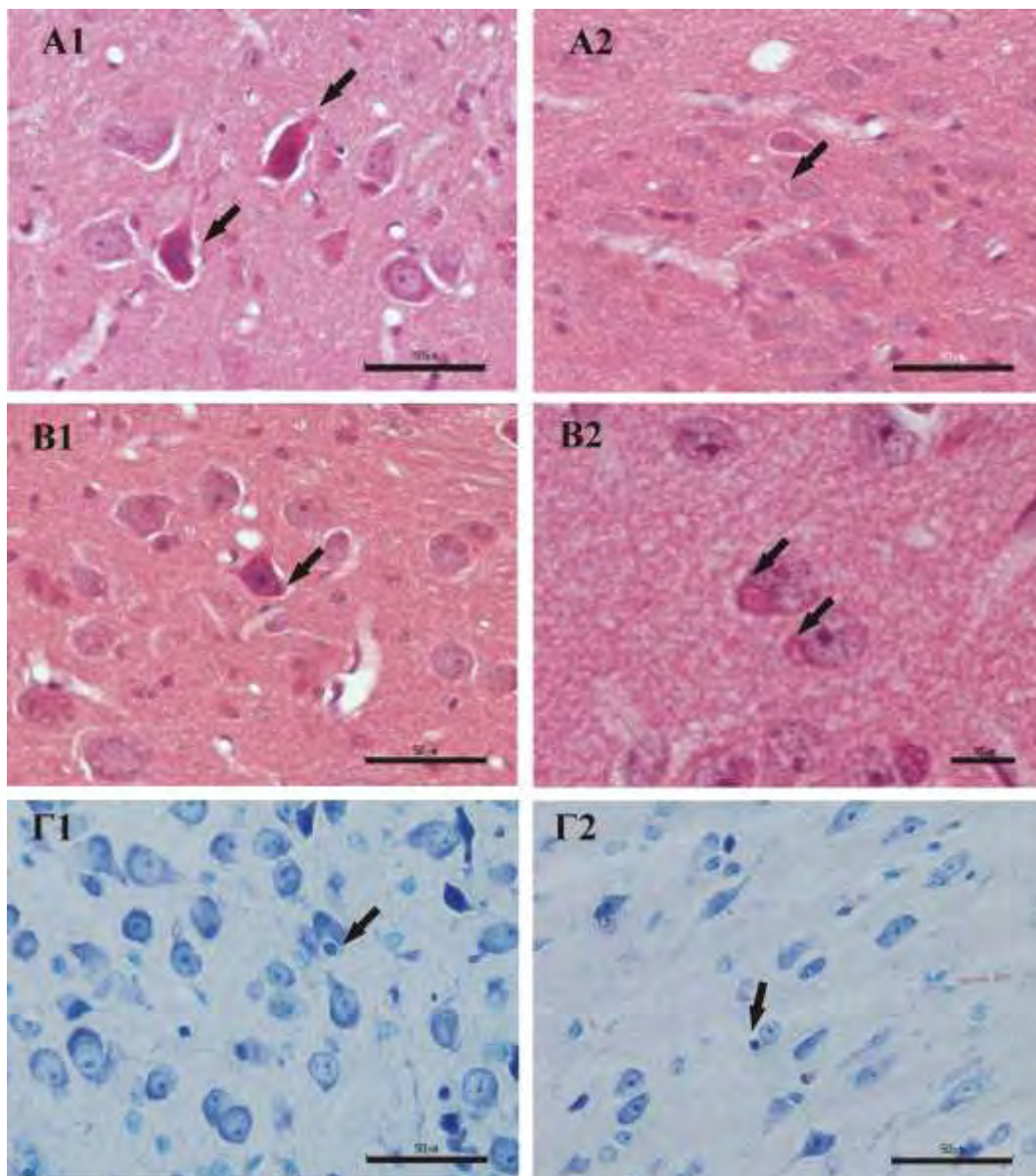
Στα ζώα που έλαβαν το ΟΦ CPF παρατηρήσαμε ανοσοϊστοχημικά αυξημένη ενεργότητα της πρωτεΐνης GFAP, σε διάφορες περιοχές του εγκεφάλου, όπως δομές λευκής ουσίας (μεσολόβιο, έσω κάψα), στον ιπποκάμπειο σχηματισμό, στον θάλαμο και υποθάλαμο, στο ραβδωτό σώμα και άλλο. Ενώ δεν φαίνεται να αυξήθηκε ο αστροκυτταρικός πληθυσμός, τα κύτταρα αυτά στα ζώα που εκτέθηκαν σε μακροχρόνια έκθεση του CPF ήταν ενεργοποιημένα, δηλαδή είχαν μακριές και εύρωστες αποφυάδες σε αντίθεση με τα ζώα της ομάδας ελέγχου που ήταν μικρότερα και λεπτές αποφυάδες οπότε τα διεγείρει έμμεσα. Εξάλλου τα αστροκύτταρα είναι ο πρώτος αμυντικός μηχανισμός άμυνας που ανταποκρίνεται σε οποιαδήποτε βλάβη του ΚΝΣ, έχοντας ένα διττό ρόλο, αφενός την ενεργοποίηση επιπρόσθετων αμυντικών μηχανισμών για την αποκατάσταση της βλάβης και αφετέρου την ιστική υποστήριξη των βαλλόμενων νευρώνων (Εικόνα 3).



**Εικόνα 3** Φωτομικρογραφίες εγκάρσιων τομών ραβδωτών σωμάτων στις οποίες τα στροκύτταρα (βέλη) σημάνθηκαν με ανοσοϊστοχημική χρώση της πρωτεΐνης GFAP. Οι φωτομικρογραφίες είναι από αντίστοιχες περιοχές του ραβδωτού σώματος στα ζώα που έλαβαν το ΟΦ (A1, B1) και στα ζώα της ομάδας ελέγχου (A2, B2). Παρατηρείστε ότι στην πρώτη περίπτωση τα αστροκύτταρα είναι πιο μεγάλα, με εύρωστες και μακριές

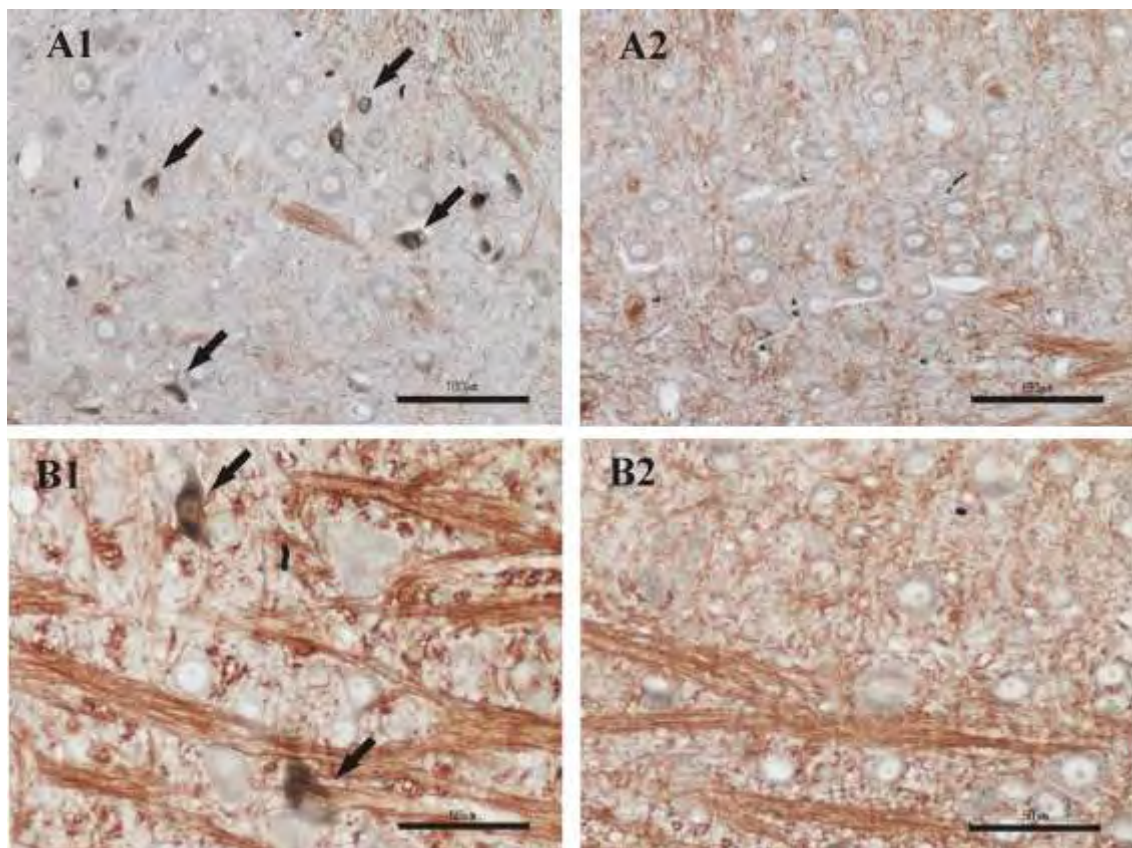
αποφυάδες με αυξημένη ενεργότητα της πρωτεΐνης GFAP, ενώ στα ζώα της ομάδας ελέγχου είναι μικρότερα με λεπτεπίλεπτες αποφυάδες. Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν 100μm.

Με την χρώση H&E και τροποποιημένη Gallyas ανιχνεύθηκαν εκφυλισμένοι νευρώνες κατά κύριο λόγο σε πυρήνες του εγκεφαλικού στελέχους (πυρήνας του προσωπικού, πυρήνας του κοινού κινητικού, ραχιαίος πυρήνας του πνευμονογαστρικού κ.α.), στη CA2 και CA3 περιοχή του ιπποκάμπου, στην κοιλιακή περιοχή της καλύπτρας (VTA) και σποραδικά σε άλλες θέσεις, όχι όμως και στη μέλαινα ουσία ή υπομέλα τόπο. Όξυφιλα έγκλειστα παρατηρήθηκαν στο κυτταρόπλασμα των νευρώνων των περιοχών αυτών που πιθανά να αποτελούν σωματίδια Lewis ή πρόδρομα στάδια αυτών, η ταυτοποίησή τους όμως ως τέτοια είναι αδύνατη μιας και η συγκεκριμένη χρώση δεν αποτελεί μέθοδο εκλογής για την ανίχνευσή τους. Η ανοσοϊστοχημική τους σήμανση με τα αντισώματα έναντι της α-συνουκλείνης πρωτίστως ή της ubiquitin ή των νευροινιδίων (neurofilaments, NFT), θα μπορούσε με ασφάλεια να οδηγήσει στην ταυτοποίησή τους.





**Εικόνα 4** Φωτομικρογραφίες από οβελιαίες τομές εγκεφάλου ζώων που έλαβαν το ΟΦ, οι οποίες χρωματίστηκαν με H&E (A1-B2) και Giemsa (Γ1-Γ2). Στην A1 φωτομικρογραφία διακρίνονται 2 εκφυλισμένοι πυκνωτικοί οξύφιλοι νευρώνες (βέλη) σε πυρήνα του εγκεφαλικού στελέχους. Στην A2 φωτομικρογραφία διακρίνονται ασθενώς βαμμένοι οι νευρώνες της μέλαινας ουσίας, όπου ένα νευρικό κύτταρο φέρει ένα κενотоπιώδες κυτταροπλασματικό έγκλειστο (βέλος). Στις επόμενες δύο φωτομικρογραφίες τα βέλη δείχνουν οξύφιλα κυτταροπλασματικά έγκλειστα: μέσα σε ένα νευρώνα που εντοπίζεται σε πυρήνα του εγκεφαλικού στελέχους (B1) και μέσα σε δυο νευρικά κύτταρα του ραβδωτού σώματος (B2). Στις μικροφωτογραφίες Γ1 και Γ2 διακρίνονται κυτταροπλασματικοί σφαιρικοί σχηματισμοί μέσα σε νευρώνες του πρόσθιου εγκεφάλου που περιβάλλονται από ωχρή άλω και μοιάζουν με σωμάτια Lewis. Οι μπάρες στις φωτομικρογραφίες αντιπροσωπεύουν 50μm, εκτός από την B2 που αντιπροσωπεύει 10μm.



**Εικόνα 5** Φωτομικρογραφίες από οβελιαίες τομές εγκεφάλου ζώων του πειράματος, οι οποίες χρωματίστηκαν με τροποποιημένη Gallyas. Οι φωτομικρογραφίες είναι από αντίστοιχες περιοχές του εγκεφαλικού στελέχους στα ζώα που έλαβαν το ΟΦ (A1, B1) και στα ζώα της ομάδας ελέγχου (A2, B2). Παρατηρείστε ότι στα ζώα που έλαβαν το ΟΦ έχουμε εκφυλισμένους σκοτεινούς νευρώνες (βέλη) στις περιοχές αυτές, σε αντίθεση με τα ζώα της ομάδας ελέγχου που απουσιάζουν. Οι νευρικές ίνες έχουν χρωματιστεί καφέ, ενώ οι φυσιολογικοί νευρώνες φέρουν έναν αχνό γκρι χρωματισμό. Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν στις φωτομικρογραφίες A1 και A2 τα 100μm, ενώ στις B1 και B2 τα 50μm.

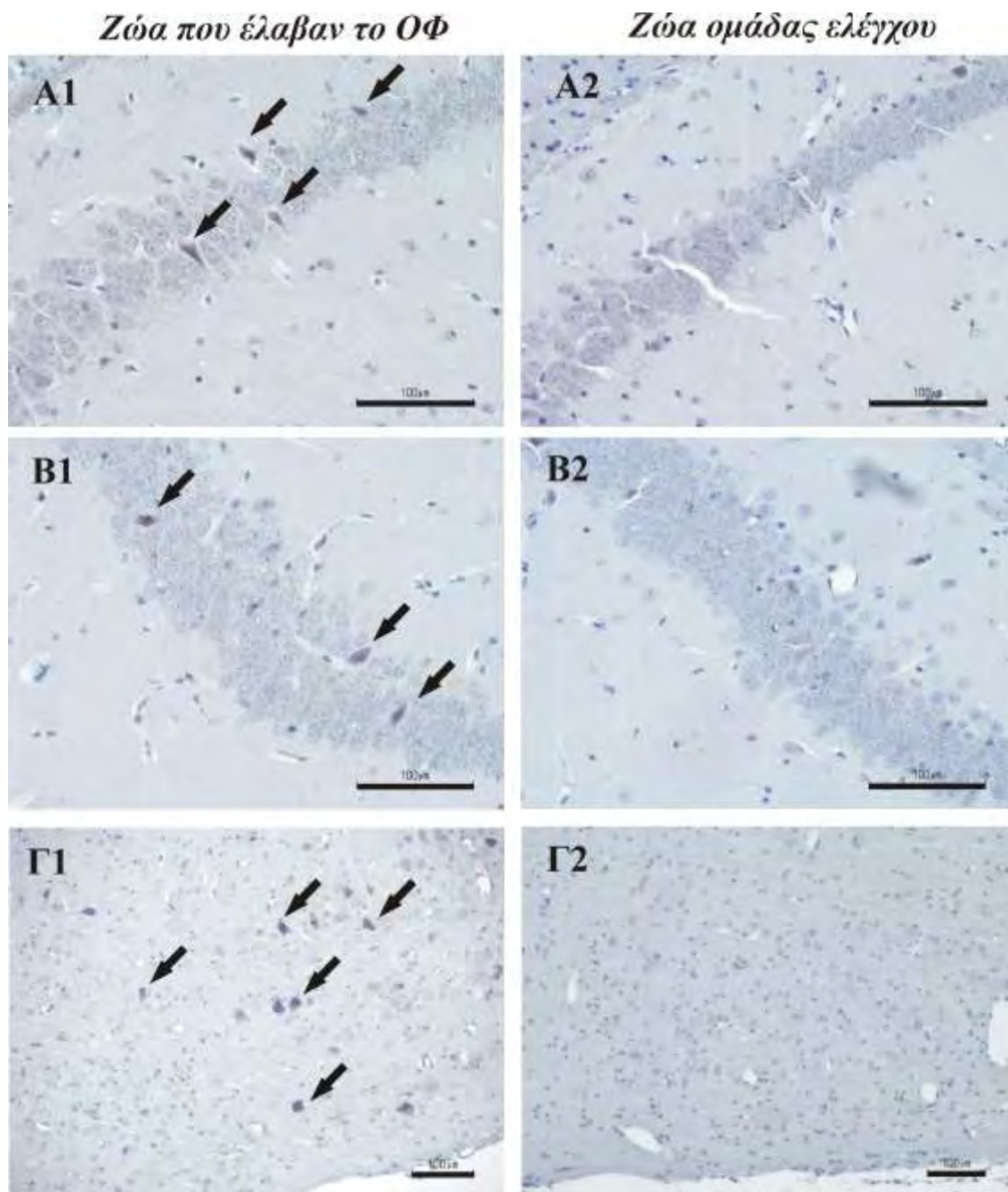
## *Μελέτη της απόπτωσης και της συναπτοπάθειας στο ΚΝΣ*

Προκειμένου να διαπιστώσουμε αν η μακροχρόνια επίδραση του ΟΦ σε υποτοξικές δόσεις είναι ικανή να προκαλέσει κυτταρικές βλάβες, μελετήσαμε το φαινόμενο του αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου σε τομές παραφίνης από τον εγκέφαλο και τον νωτιαίο μυελό των ζώων του πειράματος. Οι δύο αποπτωτικοί δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η ενεργοποιημένη κασπάση 3 και η φρακτίνη που σημαίνουν διαφορετικά στάδια του κυτταρικού θανάτου. Αυτός μπορεί να είναι και ο λόγος που με τον δεύτερο δείκτη ανιχνεύθηκαν περισσότερα αποπτωτικά κύτταρα από ότι χρησιμοποιώντας τον πρώτο, ενώ αξίζει να σημειωθεί ότι όσα κύτταρα εισάγονται στη διαδικασία της απόπτωσης, οπότε ανιχνεύονται θετικά, δεν σημαίνει ότι καταλήγουν πάντα σε κυτταρικό θάνατο, αφού η άρση του αιτιολογικού παράγοντα στα αρχικά στάδια της απόπτωσης, επιτρέπει στο κύτταρο να διαφύγει του κυτταρικού θανάτου.

Αποπτωτικά κύτταρα ανιχνεύθηκαν κατά κύριο λόγο στα ραχιαία κέρατα του νωτιαίου μυελού. Τα κύτταρα αυτά ήταν κινητικοί νευρώνες και παρατηρήθηκαν μόνο στα ζώα που έλαβαν το ΟΦ, σε αντίθεση με τα ζώα της ομάδας ελέγχου που απουσίαζαν εντελώς (Εικόνα 7). Όσον αφορά τον εγκέφαλο, τα αποπτωτικά κύτταρα ήταν περιορισμένα και ανιχνεύθηκαν κυρίως στην στιβάδα των κοκκοειδών κυττάρων του ιπποκάμπειου σχηματισμού, σε νευρώνες φαιών σχηματισμών πυρήνων του στελέχους (υπομέλας τύπος, γιγαντοκυτταρικός δικτυωτός πυρήνας, πυρήνας του προσωπικού, του πνευμονογαστρικού, κ.α) στην κοιλιακή περιοχή της καλύπτρας (Ventral Tegmental Area, VTA) και σποραδικά σε νευρώνες των εγκεφαλικών ημισφαιρίων (Εικόνα 6).

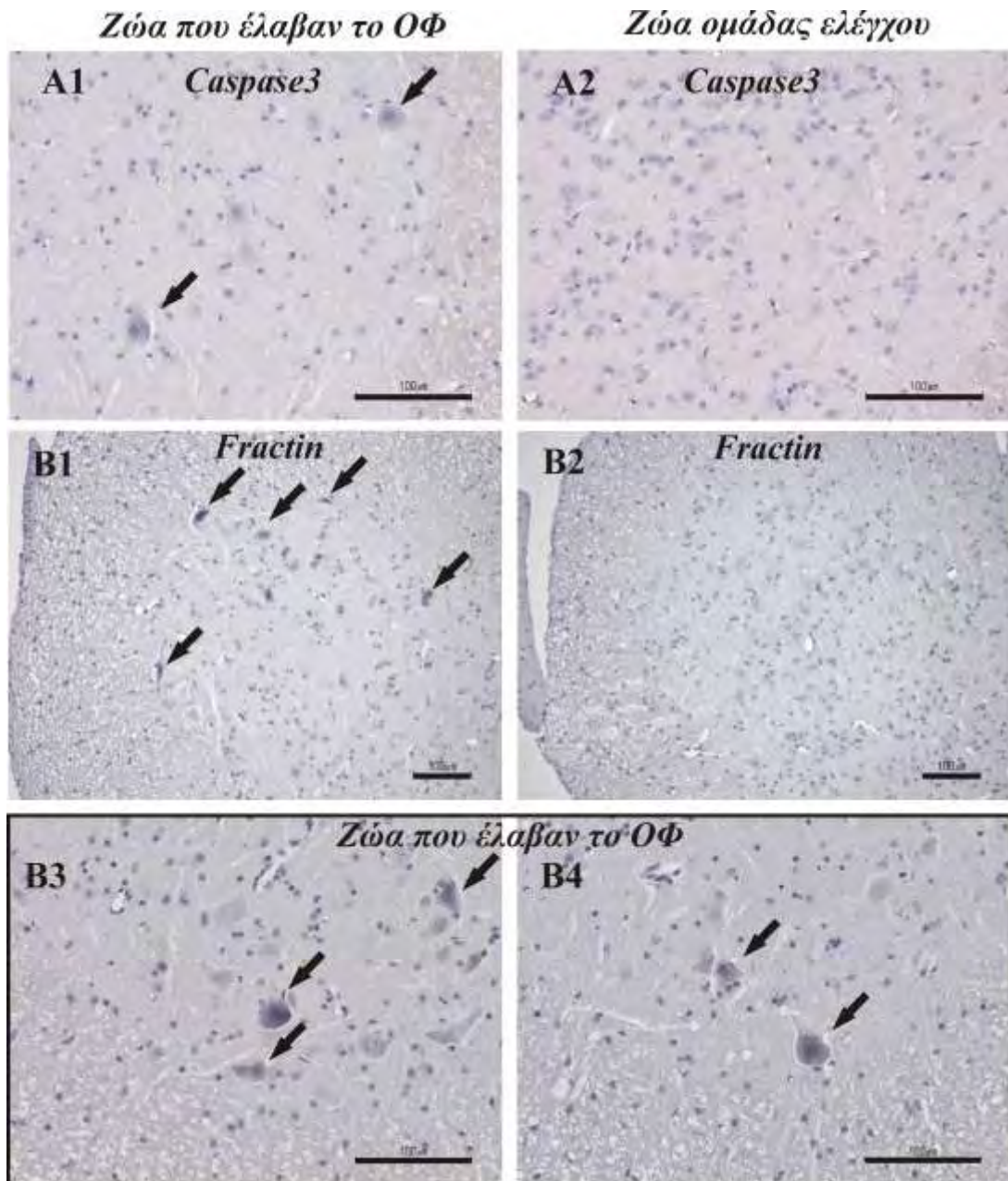
Όπως είναι γνωστό το εγκεφαλικό στέλεχος δέχεται πλούσια χολινεργική εννεύρωση και αυτός πιθανά είναι ο λόγος που ανιχνεύθηκαν εκεί τα περισσότερα αποπτωτικά νευρικά κύτταρα. (Τα κύτταρα των πυρήνων του στελέχους φέρουν άφθονους υποδοχείς ακετυλοχολίνης, με αποτέλεσμα μεταβολές στη συγκέντρωση αυτού του νευροδιαβιβαστή να τα καθιστά ευάλωτα σε απόπτωση). Παρόμοια ισχύουν για τον πρόσθιο εγκέφαλο όπου επίσης ανιχνεύθηκαν κάποια αποπτωτικά κύτταρα (δέχεται άφθονη χολινεργική εννεύρωση), ενώ αντίθετα στην παρεγκεφαλίδα που έχει φτωχή χολινεργική εννεύρωση, δεν παρατηρήθηκαν αλλοιώσεις.

Για να μελετήσουμε την επίδραση του ΟΦ CPF σε επίπεδο συνάψεων επιλέξαμε να σημάνουμε τον ιονοτρόπο υποδοχέα NMDAR1, ενός βασικού εκκρινόμενου νευροδιαβιβαστή του ΚΝΣ το γλουταμινικό οξύ. Μεταβολές στην ομοιόσταση του γλουταμινικού παίζουν σημαντικό ρόλο σε νευροεκφυλιστικά φαινόμενα, ενώ τα υψηλά επίπεδά του μπορεί να επιφέρουν θάνατο στους νευρώνες. Η ανοσοϊστοχημική σήμανση του υποδοχέα αυτού, αποκάλυψε ότι υπο-εκφράζεται στα ζώα που έλαβαν το ΟΦ σε σχέση με τα ζώα της ομάδας ελέγχου και πιθανά αυτό να αποτελεί έναν αντισταθμιστικό μηχανισμό της υπερρύθμισης του γλουταμινικού οξέως. Έχει βρεθεί ότι οι Παρκινσονικοί ασθενείς εμφανίζουν μείωση των υποδοχέων NMDA στον εγκέφαλο (Difazio et al., 1992), και ότι το ίδιο ισχύει και σε πειραματικά μοντέλα της νόσου (Hallett et al., 2005), ενώ διάφοροι ανταγωνιστές των NMDA υποδοχέων έχει βρεθεί ότι δρουν θεραπευτικά στη νόσο Πάρκινσον (Hallett and Standaert 2004; Kelsey et al., 2004).



**Εικόνα 6** Φωτομικρογραφίες οβελιαίων τομών του εγκεφάλου πάχους 7  $\mu\text{m}$  στις οποίες τα αποπτωτικά κύτταρα (βέλη) σημάνθηκαν με ανοσοϊστοχημική χρώση της φρακτίνης. Οι φωτομικρογραφίες είναι από αντίστοιχες περιοχές στα ζώα που έλαβαν το ΟΦ (Α1, Β1, Γ1) και στα ζώα της ομάδας ελέγχου (Α2, Β2, Γ3). Οι φωτομικρογραφίες Α1 και Α2 είναι από την περιοχή CA2 του ιπποκάμπου, οι φωτομικρογραφίες Β1 και Β2 είναι από την περιοχή CA1 του ιπποκάμπου, και οι φωτομικρογραφίες Γ1 και Γ2 είναι από το εγκεφαλικό στέλεχος. Παρατηρείστε ότι στα ζώα που έλαβαν το ΟΦ έχουμε πολλά αποπτωτικά κύτταρα στις περιοχές αυτές, σε αντίθεση με τα ζώα της ομάδας ελέγχου που είναι μικρότερα ή απουσιάζουν. Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν 100 $\mu\text{m}$ .

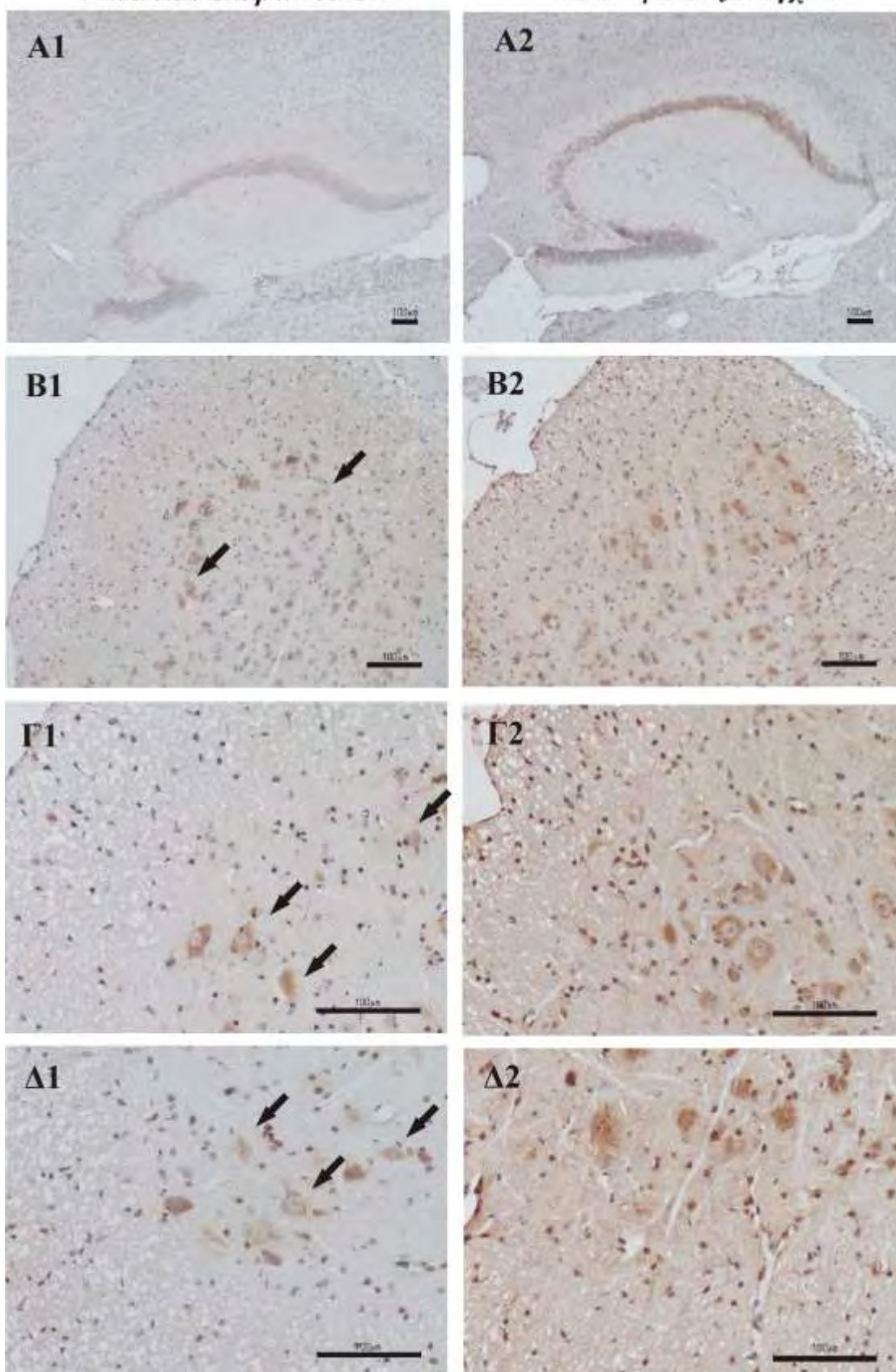




Εικόνα 7 Φωτομικρογραφίες εγκάρσιων τομών παραφίνης 7  $\mu\text{m}$  νωτιαίου μυελού στις οποίες τα αποπτωτικά κύτταρα σημάνθηκαν με ανοσοϊστοχημεία ενεργοποιημένης κασπάσης 3 (A1 και A2) ή φρακτίνης (B1, B2, B3 και B4). Οι φωτομικρογραφίες είναι από αντίστοιχες περιοχές του νωτιαίου μυελού στα ζώα που έλαβαν το ΟΦ (A1, B1) και στα ζώα της ομάδας ελέγχου (A2, B2), ενώ οι φωτομικρογραφίες B3 και B4 είναι από το κοιλιακό κέρασ του νωτιαίου μυελού των ζώων που έλαβαν το ΟΦ. Παρατηρείστε τα άφθονα αποπτωτικά κύτταρα στα ζώα που έλαβαν το ΟΦ, σε αντίθεση με τα ζώα της ομάδας ελέγχου που απουσιάζουν. Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν 100 $\mu\text{m}$ .

*Ζώα που έλαβαν το ΟΦ*

*Ζώα ομάδας ελέγχου*



**Εικόνα 8** Φωτομικρογραφίες οβελιαίων τομών πρόσθιου εγκεφάλου (Α1 και Α2) και εγκάρσιων τομών νωτιαίου μυελού στις οποίες σημάνθηκαν οι υποδοχείς NMDAR1, οι

οποίοι εντοπίζονται τόσο σε νευρικά όσο και σε νευρογλοιακά κύτταρα (ορισμένα από αυτά δείχνονται με βέλη). Οι φωτομικρογραφίες είναι από αντίστοιχες περιοχές στα ζώα που έλαβαν το ΟΦ (Α1, Β1, Γ1, Δ1) και στα ζώα της ομάδας ελέγχου (Α2, Β2, Γ3, Δ2). Ο σχηματισμός στο κέντρο των εικόνων Α είναι ο ιπποκάμπειος σχηματισμός, η περιοχή που αντιστοιχεί στις εικόνες Β είναι ο νωτιαίος μυελός σε εγκάρσια διατομή, ενώ η περιοχή που φαίνεται στις εικόνες Γ και Δ αντιστοιχεί στο κοιλιακό κέρασ του νωτιαίου μυελού με τους κινητικούς νευρώνες. Παρατηρείστε την ασθενή έκφραση του υποδοχέα αυτού στα ζώα που έλαβαν το ΟΦ, σε σύγκριση με τα ζώα της ομάδας ελέγχου. Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν 100μm.

### *Επίδραση του chlorpyrifos στην νευρογένεση στον ενήλικο εγκέφαλο*

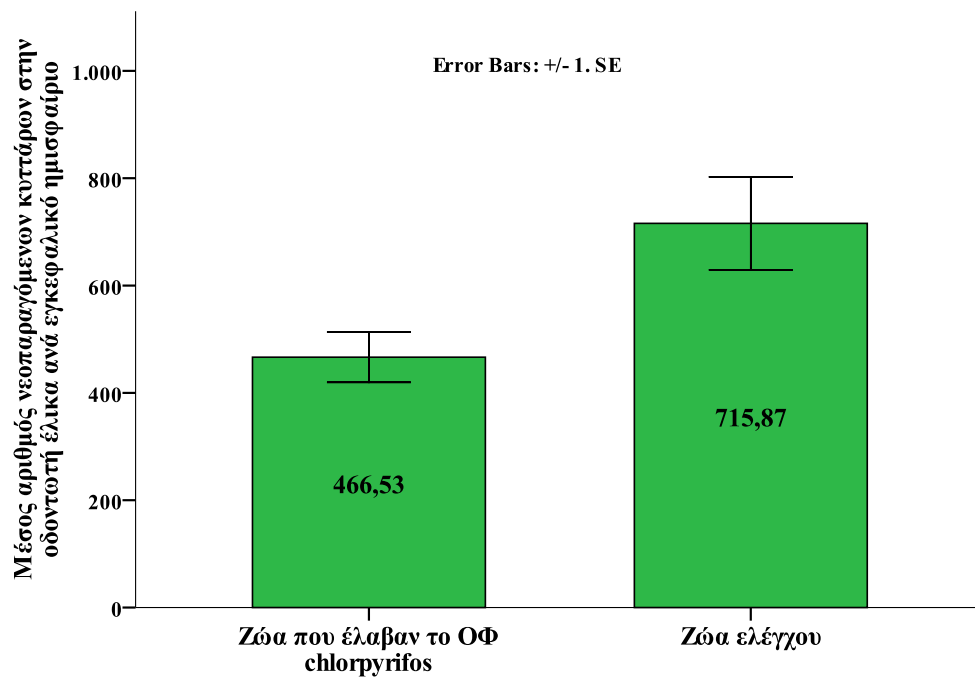
Προκειμένου να μελετήσουμε εάν και πώς επηρεάζεται η νευρογένεση στον ενήλικο εγκέφαλο νεαρών μυών που εκτίθενται μακροχρόνια σε υποτοξικές δόσεις του ΟΦ CPF χορηγήσαμε σε μια ομάδα ζώων μια μέρα πριν την θανάτωσή τους, την ουσία BrdU, ένα ανάλογο της θυμιδίνης που ενσωματώνεται στα κύτταρα που υφίστανται διαίρεση. Στη συνέχεια σημάναμε την ουσία αυτή ανοσοϊστοχημικά σε πλεούμενες τομές από το αριστερό ημισφαίριο των υπό μελέτη ζώων, η οποία ανιχνεύθηκε στους πυρήνες προγονικών κυττάρων κυρίως της YKZ και της οδοντωτής έλικας του ιπποκάμπειου σχηματισμού, οι οποίες αποτελούν τις δύο βασικές περιοχές όπου παρατηρείται γένεση νευρικών κυττάρων στον ενήλικο εγκέφαλο. Η καταμέτρηση των κυττάρων περιορίστηκε στην οδοντωτή έλικα του ιπποκάμπειου σχηματισμού αφού αυτή σχετίζεται με τις γνωστικές λειτουργίες και ειδικότερα με τη μνήμη και μάθηση. Από πέντε σεσημασμένες ανοσοϊστοχημικά τομές που ισο-απείχαν μεταξύ τους 500μm και που περιείχαν την αριστερή οδοντωτή έλικα, υπολογίστηκε ο συνολικός αριθμός νεοπαραχθέντων κυττάρων της νευρογενούς αυτής περιοχής, ανά πειραματόζωο. Ακολούθως υπολογίστηκε η μέση τιμή ανά υποομάδα (ζώα που ελάμβαναν το ΟΦ και ζώα ελέγχου) και συγκρίθηκαν στατιστικά μεταξύ τους (Independent Samples *t*-test). Στα ζώα που λάμβαναν το ΟΦ ο αριθμός των νεοπαραχθέντων κυττάρων (BrdU+) στην οδοντωτή έλικα του αριστερού ημισφαιρίου ήταν σημαντικά μικρότερος ( $466,53 \pm 46,9$ ) από εκείνον των ζώων της ομάδας ελέγχου ( $715,87 \pm 86,6$ ),  $P=0,016$ , *t*-test (Πίνακας 6, Γράφημα 8, και Εικόνα 9).

Όσον αφορά τα προγονικά νευρικά κύτταρα που σημάνθηκαν με το αντίσωμα anti-DCX τόσο στην YKZ όσο και στην οδοντωτή έλικα του ιπποκάμπειου σχηματισμού του αριστερού εγκεφαλικού ημισφαιρίου, έγινε ποιοτική εκτίμηση του πληθυσμού τους στις ληφθείσες μικροφωτογραφίες από το συνεστιακό μικροσκόπιο. Όπως μπορεί να διαπιστωθεί και από την **Εικόνα 10** η έκφραση της DCX από τα προγονικά νευρικά κύτταρα δεν διέφερε μεταξύ των ζώων που ελάμβαναν το ΟΦ και τον ζώων της ομάδας ελέγχου.

Αν και θα περιμέναμε παράλληλα με τη μείωση του ρυθμού παραγωγής νέων κυττάρων (BrdU θετικών) να βρεθούν και λιγότερα μεταναστεύοντα κύτταρα (DCX θετικά), εντούτοις φαίνεται πως κάτι τέτοιο δεν συμβαίνει. Μια πιθανή εξήγηση είναι ότι πέρα από την αναστολή της παραγωγής νέων νευρικών κυττάρων είναι πιθανό το ΟΦ αυτό, να αναστέλλει και τη διαφοροποίηση των νεοπαραχθέντων κυττάρων, με αποτέλεσμα να παρεμποδίζει την ωρίμανση τους και έτσι να μην ανιχνεύονται διαφορές σε αυτό το στάδιο εξέλιξής τους. Πιστεύουμε ότι η ποσοτική καταμέτρηση των κυττάρων αυτών, με παράλληλη ανοσοϊστοχημική σήμανση και άλλων σταδίων διαφοροποίησης των νευρικών προγονικών κυττάρων της οδοντωτής έλικας να διαλευκάνει το ζήτημα αυτό.

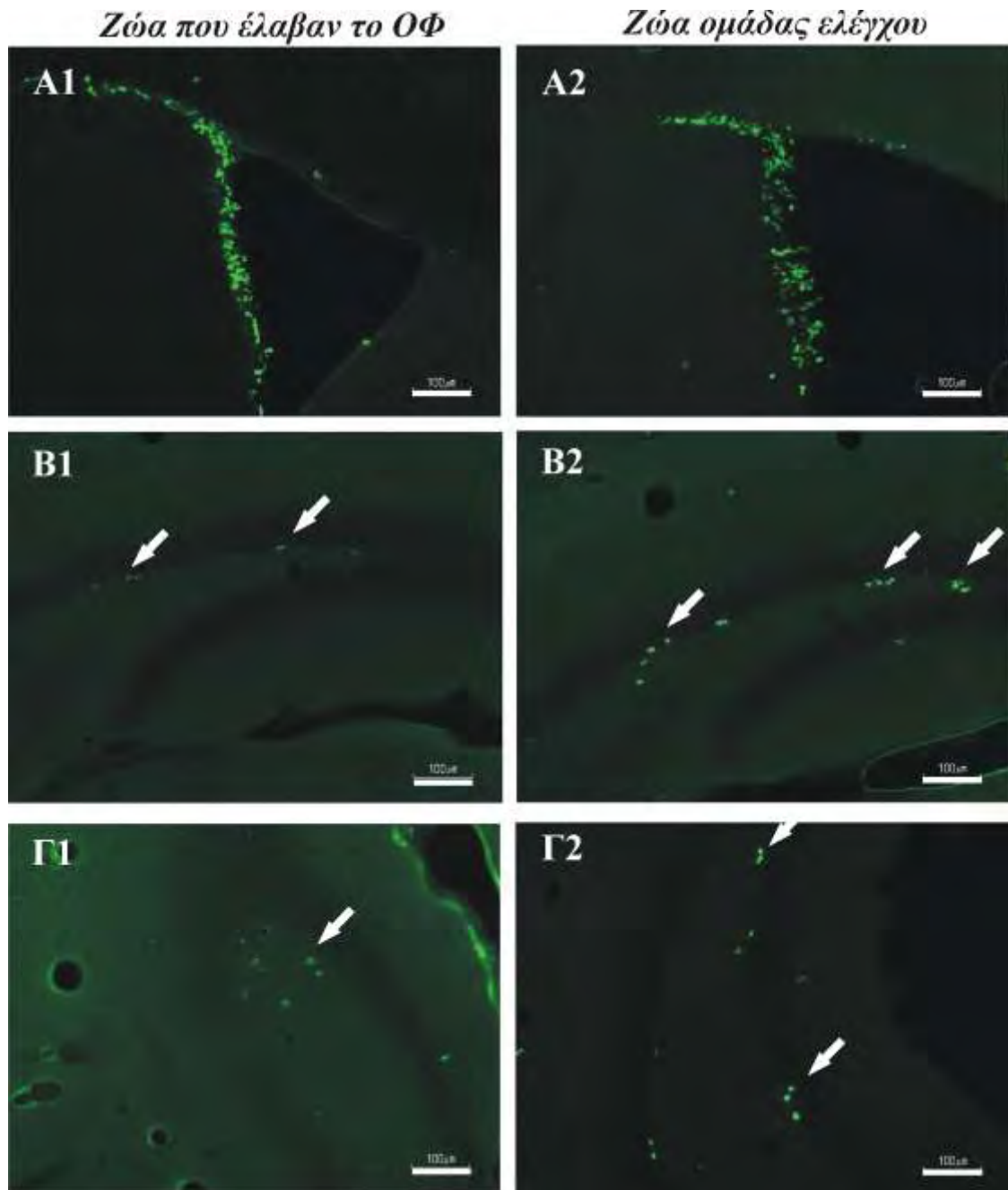
**Πίνακας 6 Συγκεντρωτικός πίνακας των νεοπαραχθέντων κυττάρων**

Ζώα πειράματος	Αριθμός	Μέσος όρος νεοπαραχθέντων κυττάρων στην οδοντωτή έλικα	Τυπική απόκλιση	Τυπικό Σφάλμα
που έλαβαν το ΟΦ CPF	9	466,5333	140,72019	46,90673
ομάδας ελέγχου	6	715,8667	212,11973	86,59752

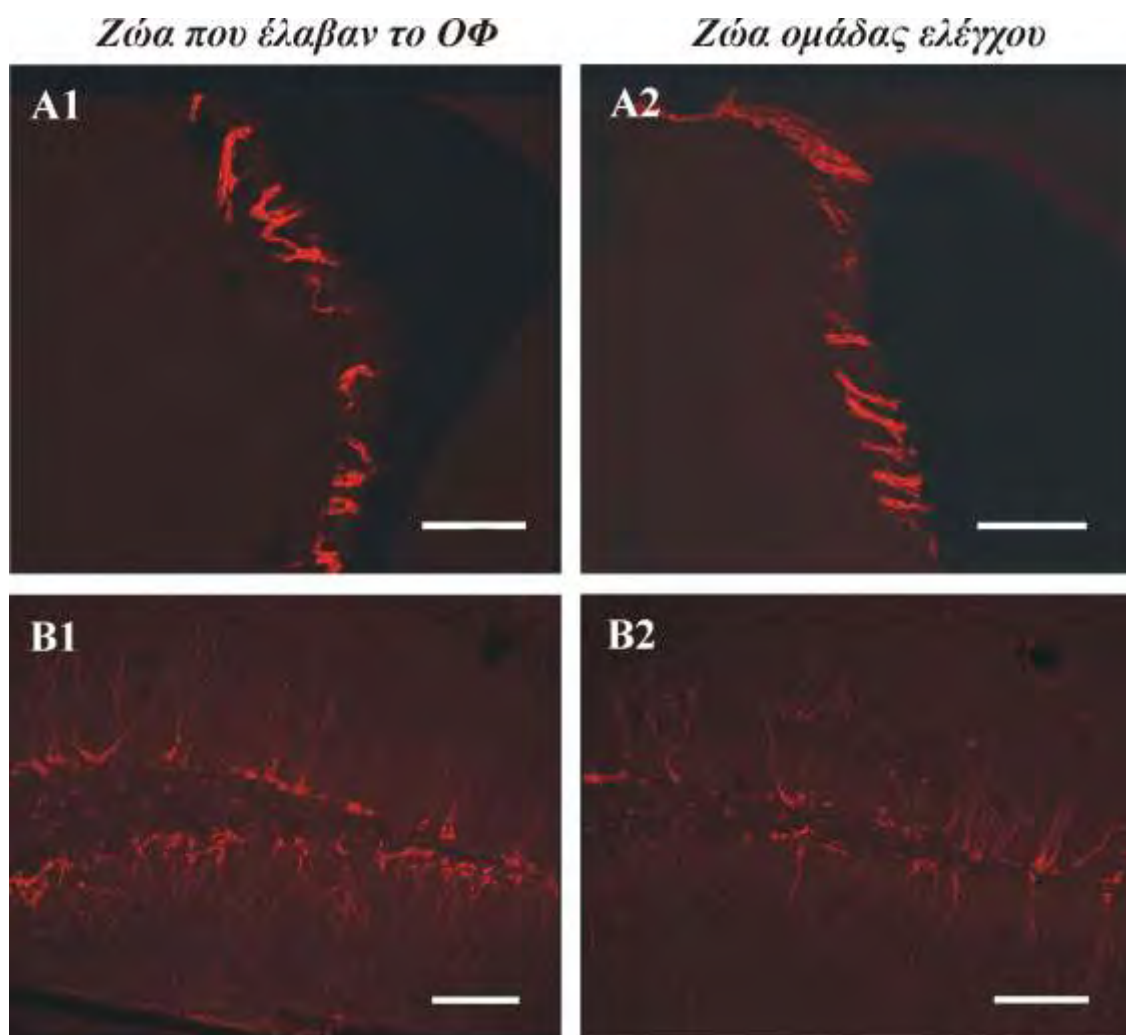


**Γράφημα 8.** Μέσος αριθμός νεοπαραχθέντων κυττάρων (BrdU+) στην οδοντωτή έλικα του ιπποκάμπειου σχηματισμού στα ζώα που έλαβαν το ΟΦ και στα ζώα ελέγχου.





Εικόνα 9 Φωτομικρογραφίες στεφανιαίων τομών του πρόσθιου εγκεφάλου 50  $\mu\text{m}$  στις οποίες τα νεοπαραχθέντα κύτταρα (φθορίζουν πράσινα υπό μικροσκόπιο φθορισμού και δείχνονται με βέλη) σημάνθηκαν με ανοσοφθορισμό μετά από προηγούμενη χορήγηση BrdU. Ανιχνεύθηκαν στο εγκεφαλικό παρέγχυμα τόσο των ζώων που έλαβαν το ΟΦ (A1, B1, Γ1), όσο και στα ζώα της ομάδας ελέγχου (A2, B2, Γ2). Συγκεκριμένα ανιχνεύθηκαν πολυάριθμα νεοπαραχθέντα κύτταρα στην υποκοιλιακή ζώνη (Α), όπου φαίνεται να μεταναστεύουν στο μεσολόβιο και λιγότερα στην οδοντωτή έλικα του ραχιαίου (Β) και του κοιλιακού υποκάμπειου σχηματισμού (Γ). Αξιοσημείωτος είναι ο μικρότερος αριθμός τους στις δύο τελευταίες περιπτώσεις στα ζώα που έλαβαν το ΟΦ. Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν 100 $\mu\text{m}$ .



Εικόνα 10 Φωτομικρογραφίες συνεστιακού μικροσκοπίου που προέρχονται από στεφανιαίες τομές των 50  $\mu\text{m}$ , στις οποίες νεοπαραχθέντα μεταναστεύοντα κύτταρα (φθορίζουν κόκκινα) της υποκοιλιακής ζώνης (A1 και A2) και της οδοντωτής έλικας (B1 και B2) ανοσοσημάνθηκαν με DCX. Παρατηρείστε την διαφορετική μορφολογία τους στις δύο αυτές θέσεις: στην πρώτη περίπτωση διατάσσονται σε σειρά, ενώ στην δεύτερη το κυτταρικό τους σώμα εντοπίζεται στην υποκοκκιώδη ζώνη και εκτείνουν διακλαδιζόμενες αποφυάδες στην κοκκώδη στιβάδα της οδοντωτής έλικας του ιπποκάμπου. Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν 100 $\mu\text{m}$ .

## Συζήτηση

Είναι ευρέως γνωστό ότι ο αγροτικός πληθυσμός υπόκειται στον κίνδυνο της μακροχρόνιας έκθεσης σε σχετικά χαμηλά επίπεδα ΟΦ. Οι αγρότες εκτίθενται καθημερινά σε παρασιτοκτόνους ΟΦ παράγοντες, συνήθως χρησιμοποιούν ελάχιστα προστατευτικά μέσα, για κοινωνικούς και οικονομικούς λόγους και συχνά υποτιμούν την τοξικότητα των παραγόντων αυτών. Βασικά προβλήματα στην μελέτη της μακροχρόνιας έκθεσης του αγροτικού πληθυσμού σε ΟΦ παράγοντες είναι η αδυναμία προσδιορισμού της ακριβούς δόσης έκθεσης και η μακροχρόνια παρακολούθηση. Συγχυτικοί παράγοντες αποτελούν η πιθανότητα της αναστρεψιμότητας των κλινικών συμπτωμάτων ύστερα από μια περίοδο μη έκθεσης και το γεγονός ότι στις διάφορες μελέτες τα άτομα εκτίθενται σε διαφόρους τύπους παρασιτοκτόνων, που πιθανά να έχουν συνεργηστική δράση.

Η εκτεταμένη χρησιμοποίηση των πειραματοζώων στην έρευνα τα τελευταία χρόνια έκανε εφικτή την απάντηση ερευνητικών ερωτημάτων που φαντάζουν αδύνατο να απαντηθούν από στοιχεία επιδημιολογικών μελετών στον ανθρώπινο πληθυσμό. Έτσι και στην παρούσα μελέτη προκειμένου να διερευνηθούν οι επιδράσεις της μακροχρόνιας έκθεσης υποτοξικών δόσεων των ΟΦ, προσφύγαμε στην χρησιμοποίηση των μυών, των περισσότερο χρησιμοποιούμενων ζώων εργαστηρίου. Ο σκοπός της παρούσας μελέτης επικεντρώθηκε τις επιδράσεις ενός ευρέως χρησιμοποιούμενου ΟΦ του CPF, στο ΚΝΣ και ΠΝΣ νεαρών ενήλικων μυών, καθώς και στη νευρογένεση στον ενήλικο εγκέφαλο. Μελετήθηκε η μακροχρόνια χορήγηση του, δηλαδή για ένα μήνα στα πειραματόζωα, που αντιστοιχεί σε 4-5 ανθρωποέτη και σε υποτοξικές δόσεις που με βάση την βιβλιογραφία δεν παρατηρείται εμφανή χολινεργική τοξικότητα και δεν διαταράσσονται στο αίμα τα επίπεδα της ενεργότητας της AChE.

## Πολυνευροπάθειες επαγόμενες από τα ΟΦ

Χρησιμοποιώντας διάφορες νευρολογικές δοκιμές που εξετάζουν την αισθητικότητα, την κινητικότητα και γενικά την λειτουργική ακεραιότητα των νευρικού συστήματος δείξαμε ότι η μακροχρόνια υποτοξική έκθεση δεν είναι άμοιρη συνεπειών στο τόσο βασικό για την ζωή σύστημα αυτό. Μερικές από τις κινητικές διαταραχές που διαπιστώσαμε ήταν η αδυναμία σύγκλεισης των οπίσθιων άκρων κατά την πτώση που συνδέεται με επιβράδυνση της ταχύτητας αγωγής των νευρικών ώσεων, ο μικρότερος βηματισμός, η αύξηση της βάσης στήριξης, η έξω στροφή των οπίσθιων άκρων, η αδυναμία συντονισμού των άκρων κατά τη βάδιση και η απώλεια μυϊκής δύναμης που ίσως συνδέονται με συμπτωματολογία παρκινσονισμού. Αν και δεν είναι δυνατό να αποδώσουμε την παραπάνω συμπτωματολογία αποκλειστικά είτε σε βλάβη του κεντρικού είτε του περιφερικού νευρικού συστήματος, η προσβολή του δεύτερου είναι δεδομένη μιας και η μακροχρόνια έκθεση επιφέρει βλάβες στα περιφερικά νεύρα και συγκεκριμένα προκαλεί αξονοπάθεια. Η αξονοπάθεια αυτή μπορεί να είναι πρωτοπαθής και να σχετίζεται με την παρατεταμένη αναστολή του ενζύμου εστεράση-στόχος των νευροπαθειών, NTE, είτε δευτεροπαθής από προσβολή και εκφύλιση των σωμάτων των νευρικών κυττάρων στο ΚΝΣ.



Στην παρούσα μελέτη παρατηρήθηκαν πέρα από τις κινητικές και αισθητικές διαταραχές όπως αλλοδυνία και υπεραίσθησία, καθώς και διαταραχές της συμπεριφοράς όπως ευερεθιστότητα και υπερδιέγερση. Η παρατηρούμενη αυτή πολυνευροπάθεια στα ζώα που έλαβαν το ΟΦ CPF δεν θα πρέπει να σχετίζεται με την καθυστερημένου τύπου νευροπάθεια (επιβραδυμένου τύπου, επαγόμενη από τα ΟΦ πολυνευροπάθεια ή OP-induced delayed polyneuropathy, OPIDP), που εμφανίζεται στα τρωκτικά 10-15 μέρες μετά (στον άνθρωπο βδομάδες μετά) ύστερα από μια οξεία τοξική έκθεση στα ΟΦ. Η OPIDP νευροπάθεια είναι συμμετρική, προσβάλλει τα περιφερικά νεύρα και σχετίζεται με την αναστολή του ενζύμου εστεράση-στόχος των νευροπαθειών που υπάρχει στο νευρικό σύστημα (Aiuto et al., 1993; Ray and Richards 2001; Stapleton and Chan 2009). Πέρα όμως από αυτή τη νοσολογική οντότητα, έχει βρεθεί ότι η μακροχρόνια έκθεση σε ΟΦ ενέχει κινδύνους για την εμφάνιση περιφερικής πολυνευροπάθειας, βραδείας εξέλιξης με ηπιότερη συμπτωματολογία που μάλιστα συνοδεύεται από κατάθλιψη και εμφάνιση αγχώδους συμπεριφοράς (Jamal 1997; Stallones and Beseler 2002). Με μια σειρά ιστολογικών και ανοσοϊστοχημικών χρώσεων προσπαθήσαμε να συσχετίσουμε τα κλινικά ευρήματα υποδηλωτικά της νευροπάθειας με ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις ή με την κυτταρική απόπτωση και τη συναπτοπάθεια στο ΚΝΣ αντίστοιχα. Πράγματι διαπιστώσαμε αξονοπάθεια στα περιφερικά νεύρα και στο εγκεφαλικό στέλεχος, καθώς και νευροεκφύλιση και αστρογλοίωση στο ΚΝΣ των ζώων που έλαβαν το ΟΦ. Επιπλέον από την ανοσοϊστοχημική ανίχνευση του βασικού υποδοχέα του νευροδιαβιβαστή γλουταμινικό οξύ, παρατηρήσαμε την επαγωγή διαταραχών στις συνάψεις λόγω της μακροχρόνιας έκθεσης στον ΟΦ παράγοντα CPF.

### **Συσχέτιση της μακροχρόνιας έκθεσης σε ΟΦ με την εμφάνιση Παρκινσονισμού**

Αν και τα κυριότερα παρασιτοκτόνα που έχουν συνδεθεί με την εμφάνιση του Παρκινσονισμού είναι οι πυρεθρίνες, εντούτοις τα τελευταία χρόνια έχουν ενοχοποιηθεί και τα ΟΦ, τα οποία όμως φαίνεται να προκαλούν συμπτωματολογία παροδικού Παρκινσονισμού (transient Parkinsonism) (Betarbet et al., 2000; Bhatt et al., 1999; Bloomquist et al., 2002). Η συμπτωματολογία αυτή συνίσταται στην εμφάνιση χρόνιας κόπωσης, δυσαυτονομίας και εμφάνισης εξωπυραμιδικών συμπτωμάτων όπως δυστονία, τρόμο ηρεμίας, βραδυκινησία, ανικανότητα σε στάση, ακαμψία των μυών του προσώπου και μη ανταπόκριση σε θεραπεία με levodopa.

Οι περιγραφές για εμφάνιση μόνιμου Παρκινσονισμού ύστερα από μακροχρόνια επαγγελματική έκθεση στα ΟΦ είναι ελάχιστες. Σε διάφορες μελέτες, σε αγρότες που επαγγελματικά εκτέθηκαν μακροχρόνια σε ΟΦ σημειώνεται εξασθένηση των εξωπυραμιδικών συμπτωμάτων μερικούς μήνες μετά από τη διακοπή έκθεσης, εντούτοις τα άτομα αυτά είχαν μεγαλύτερη πιθανότητα εμφάνισης της νόσου Πάρκινσον και μάλιστα σε ηλικία κάτω των 60, όπου ο πρωτοπαθής Παρκινσονισμός είναι σπάνιος. Οι υποκείμενοι παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί για αυτό το φαινόμενο δεν είναι ξεκάθαροι ακόμα αλλά οι (Bhatt et al., 1999; Clegg and van Gemert 1999) υποστηρίζουν ότι η μη ανταπόκριση στο levodopa, υποδηλώνει δυσλειτουργία των υποδοχέων στους δοπαμινεργικούς νευρώνες του ραβδωτού σώματος.

Σε μια εργασία των (Slotkin and Seidler 2005), όπου χορηγήθηκε το ΟΦ CPF (για 4 μέρες σε υποτοξικές δόσεις), σε νεογέννητους αρουραίους παρατηρήθηκε σημαντικά μειωμένη ανάπτυξη του ραβδωτού σώματος, μια περιοχή του εγκεφάλου με την υψηλότερη συγκέντρωση δοπαμίνης, ενώ για αυτήν την νευροεκφυλιστική απώλεια

θεωρήθηκε υπεύθυνη η συμμετοχή ενός προ-οξειδωτικού κατεχολαμινεργικού νευροδιαβιβαστή (Blum et al., 2001; Junn and Mouradian 2001; Karen et al., 2001). Πράγματι, το CPF είναι ικανό να αυξήσει την απελευθέρωση κατεχολαμινών στο ραβδωτό σώμα (Dam et al., 1999b; Karen et al., 2001; Slotkin et al., 2002), και αυτό από μόνο του είναι ικανό να προκαλέσει οξειδωτικό στρες και νευροεκφύλιση (Gupta 2004), οδηγώντας σε συμπτωματολογία της νόσου Πάρκινσον.

Υπάρχουν πολλοί πειστικοί λόγοι που συνηγορούν στο γιατί το ραβδωτό σώμα, αποτελεί μια περιοχή-στόχος του ΟΦ CPF στον εγκέφαλο. Πρώτον η περιοχή αυτή περιέχει τη μεγαλύτερη συγκέντρωση ντοπαμίνης, που είναι ένας νευροδιαβιβαστής που όταν απελευθερώνεται σε υπερβολικό βαθμό προκαλεί οξειδωτικό στρες (Betarbet et al., 2000; Junn and Mouradian 2001) και η χορήγηση του CPF προάγει την απελευθέρωση της ντοπαμίνης (Dam et al., 1999a). Δεύτερον το CPF, προκαλεί από μόνο του οξειδωτικό στρες και ευαισθητοποιεί τους νευρώνες και τη γλοία σε άλλες οξειδωτικές ουσίες (Bagchi et al., 1995; Crumpton et al., 2000; Garcia et al., 2001) και συνεπώς και τα κύτταρα του ραβδωτού σώματος στην επίδραση της ντοπαμίνης. Τέλος το CPF προκαλεί αύξηση στην έκφραση της GFAP και αστρογλοίωση στο ραβδωτό σώμα, επιβαρύνοντας ακόμα περισσότερο την οξειδωτική βλάβη (Breese et al., 1994). Στην μελέτη αυτή, πράγματι διαπιστώσαμε αύξηση στην ενεργότητα της GFAP πρωτεΐνης, η οποία υποδηλώθηκε με το γεγονός ότι τα αστροκύτταρα έγιναν ενεργοποιημένα με εύρωστες και εκτεταμένες τις κυτταρικές τους αποφυάδες, αξίζει όμως να σημειωθεί ότι δεν παρατηρήθηκε αύξηση του αριθμού των κυττάρων αυτών.

Λαμβάνοντας υπόψη όλα τα παραπάνω, φαίνεται ότι τόσο οι κινητικές διαταραχές που παρατηρήσαμε στα ζώα των πειραμάτων της μελέτης αυτής που έλαβαν το ΟΦ, όσο και η εμφάνιση συμπτωματολογίας Παρκινσονισμού στον ανθρώπινο πληθυσμό σχετίζονται με βλάβη των δοπαμινεργικών οδών του ραβδωτού σώματος. Στον ανθρώπινο πληθυσμό η επιβάρυνση πιθανώς να είναι μεγαλύτερη αν λάβει κανείς υπόψη την φυσιολογική έκπτωση στην δοπαμινεργική εννεύρωση του ραβδωτού σώματος κατά τη γήρανση (Volkow et al., 1998).

### **Η μακροχρόνια έκθεση στα ΟΦ επιφέρει διαταραχές στις γνωστικές λειτουργίες**

Τα τελευταία χρόνια στη διεθνή βιβλιογραφία γίνονται συχνά αναφορές για το σύνδρομο των επαγόμενων από την μακροχρόνια έκθεση στα ΟΦ νευροψυχιατρικών διαταραχών (chronic organophosphate-induced neuropsychiatric disorders, COPIND). Η μακροχρόνια έκθεση υποτοξικών δόσεων διαφόρων ΟΦ έχει συσχετιστεί με την ανάπτυξη διαφόρων νευροψυχιατρικών συμπτωμάτων στον ανθρώπινο πληθυσμό, χωρίς να επηρεάζονται τα επίπεδα της ενεργότητας της AChE στο πλάσμα του αίματος κατά την έκθεση. (Salvi et al., 2003). Οι περισσότερες από τις επιδράσεις των ΟΦ στο ΚΝΣ σχετίζονται άμεσα με την φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών στόχων όπως η AChE και η NTE εστεράση (=εστεράση στόχος των νευροπαθειών) ή έμμεσα με την δέσμευση των νικοτινικών υποδοχέων από τα ΟΦ (Miles et al., 1998). Τα περισσότερα κοινά κλινικά συμπτώματα περιλαμβάνουν: εξασθένιση στη μνήμη, συγκέντρωση και μάθηση, άγχος, κατάθλιψη, ψυχωτικά συμπτώματα και χρόνια κόπωση, χωρίς να είναι γνωστοί οι υποκείμενοι μηχανισμοί, οι οποίοι όμως δεν εξαρτώνται από την αναστολή της AChE (Levin et al., 1976; Prendergast et al., 1998).

Πρέπει να υπογραμμιστεί ότι η μακροχρόνια έκθεση σε υποτοξικές δόσεις ΟΦ δεν οδηγεί στην εμφάνιση κλινικής συμπτωματολογίας που παρατηρείται μετά από οξεία

έκθεση, πιθανώς λόγω υπορρύθμισης ή λειτουργικής προσαρμογής των μουσκαρινικών και των νικοτινικών υποδοχέων του ΚΝΣ, σαν μια αντισταθμιστική απάντηση στα αυξημένα επίπεδα ακετυλοχολίνης (Prendergast et al., 1998). Είναι πιθανό ότι η υπορρύθμιση αυτών των υποδοχέων να ευθύνεται για τις διαταραχές στις γνωστικές λειτουργίες. Αναφορικά με τα ψυχιατρικά συμπτώματα, οι (Amr et al., 1997), βρήκαν ότι άτομα τα οποία εκτέθηκαν μακροχρόνια σε ΟΦ (40 ώρες τη βδομάδα, 9 μήνες τον χρόνο), είχαν σημαντικά αυξημένη συχνότητα εμφάνισης ψυχιατρικών διαταραχών και ειδικότερα νεύρωση και δυσθυμία, συγκρινόμενα με τα άτομα της ομάδας ελέγχου.

Αξίζει πάντως να σχολιάσουμε ότι ο υπολογισμός της ενεργότητας της AChE δεν είναι μια αξιοπιστή παράμετρος για τον έλεγχο των επιπτώσεων στην υγεία της μακροχρόνιας έκθεσης, μιας και έχει βρεθεί ότι οι τιμές της μπορεί να είναι φυσιολογικές σε άτομα που εκτέθηκαν σε ΟΦ και εμφάνισαν ψυχοκινητικές μεταβολές, διαταραχές στη μνήμη και την προσοχή και μείωση των γνωστικών λειτουργιών. Πάντως οι διαταραχές αυτές μπορούν να περιοριστούν σημαντικά αν ακολουθήσει μια περίοδος μη έκθεσης (3 μήνες), στις περισσότερες περιπτώσεις, αν και όχι πλήρως (Salvi et al., 2003).

Σε πειραματικό επίπεδο, όσον αφορά την μνήμη και τις γνωστικές λειτουργίες, τα ΟΦ δεν φαίνεται να επηρεάζουν την χωρική εξερευνητική ικανότητα των πειραματοζώων, την ικανότητα να ανακαλούν μνήμες ή να εκτελούν δοκιμασίες που έχουν ήδη μάθει καλά πριν την έναρξη χορήγησής τους. Όμως εξασθενούν την βραχυχρόνια μνήμη και μειώνουν την ικανότητα μάθησης νέων δοκιμασιών (Prendergast et al., 1998).

Οι (Terry et al., 2007), βρήκαν ότι η μακροχρόνια έκθεση (1 μήνα) επίμυων σε υποτοξικές δόσεις του ΟΦ CPF οδήγησε στην μείωση έκφρασης υποδοχέων του αυξητικού παράγοντα των νεύρων (nerve growth factor) και χολινεργικών πρωτεϊνών, όπως είναι ο κυστιδικός μεταφορέας της ακετυλοχολίνης (vesicular acetylcholine transporter), ο υψηλής συγγένειας μεταφορέας της χολίνης και ο  $\alpha 7$  νικοτινικός υποδοχέας της ακετυλοχολίνης, επιφέροντας διαταραχές στην ικανότητα επεξεργασίας των πληροφοριών και στις γνωστικές λειτουργίες. Οι ανεπάρκειες των υποδοχέων των αυξητικών παραγόντων και των χολινεργικών πρωτεϊνών αποδόθηκαν σε αντίστοιχες μειώσεις στην απαγωγό και προσαγωγό αξονική μεταφορά στην περιφέρεια, όπως καταμετρήθηκε με ηλεκτροφυσιολογικές μεθόδους στα ισχιακά νεύρα των επιμύων, *ex vivo*.

Στη μελέτη αυτή δεν χρησιμοποιήθηκαν συμπεριφορικά τεστ για να ελέγξουν την ικανότητα της μνήμης και της μάθησης των ζώων του πειράματος. Στηριχθήκαμε όμως στην ανοσοϊστοχημική μελέτη του ιπποκάμπειου σχηματισμού, που σχετίζεται με τις δύο αυτές νοητικές λειτουργίες για να εξάγουμε έμμεσα κάποια συμπεράσματα και μελετήσαμε τον βαθμό απόπτωσης και την ικανότητα παραγωγής νέων νευρικών κυττάρων, υπό την επίδραση του ΟΦ παράγοντα. Αποπτωτικά κύτταρα βρέθηκαν στην κοκκώδη στιβάδα του ιπποκάμπου, ενώ παρατηρήθηκε μείωση των ταχέως διαιρούμενων βλαστικών κυττάρων στην υποκοκκιώδη ζώνη της οδοντωτής έλικας, ευρήματα που υποδηλώνουν την εν δυνάμει διαταραχή στις γνωστικές λειτουργίες.

## Τα ΟΦ διαταράσσουν τους φυσιολογικούς ρυθμούς παραγωγής νέων νευρικών και νευρογλοιακών κυττάρων

Από διάφορες μελέτες έχει αναφερθεί ότι το ΟΦ CPF διαταράσσει τα μονοπάτια της ωρίμανσης και διαφοροποίησης των νευρικών κυττάρων, τον σχηματισμό και την ενεργότητα των συνάψεων, οδηγώντας σε διαταραχές της συμπεριφοράς (Casida and Quistad 2004; Gupta 2004; Pope 1999; Qiao et al., 2004; Qiao et al., 2002; Qiao et al., 2003; Yanai et al., 2002). Εξίσου σημαντικό είναι να τονίσουμε ότι οι μηχανισμοί αυτοί είναι πιθανό να ισχύουν και για άλλα ΟΦ που χρησιμοποιούνται ευρέως σε παγκόσμια κλίμακα (Slotkin and Seidler 2005). Ενώ η νευροτοξικότητα του CPF έχει μελετηθεί εκτενώς στον αναπτυσσόμενο εγκέφαλο, υπάρχει ένδεια πληροφοριών για τις επιδράσεις του στα νεοπαραγόμενα κύτταρα του εγκεφάλου κατά την ενήλικη ζωή. Οι (Whitney et al., 1995) απέδειξαν ότι το CPF αναστέλλει τη σύνθεση του DNA σε όλες τις εγκεφαλικές περιοχές σε νεογέννητους επίμυες, ακόμα και όταν χορηγείται σε υποτοξικές δόσεις (2mg/kg) και μάλιστα απέδειξαν ότι η δράση αυτή δεν είναι δευτερογενής λόγω συστηματικής τοξικότητας στη περιφέρεια. Η επίδραση αυτή του CPF αποδόθηκε στις ασκούμενες χολινεργικές επιδράσεις στους νικοτινικούς υποδοχείς, οι οποίοι ως γνωστόν διαμεσολαβούν στη σύνθεση του DNA. Επιπρόσθετα το CPF επιδρά και στη πρωτεϊνοσύνθεση, και μάλιστα η επίδραση αυτή είναι ένα διαφορετικό φαινόμενο από την αναστολή της σύνθεσης του DNA και δεν είναι δευτερογενής από την γενικευμένη κυτταρική βλάβη ή την καταστολή του κυτταρικού μεταβολισμού.

Σε συμφωνία με όλα τα παραπάνω είναι το γεγονός ότι η υπερβολική χολινεργική διέγερση είτε από τη νικοτίνη, είτε από την πρόσληψη μεγάλων ποσοτήτων χολίνης από διαιτητικά συμπληρώματα, έχει ως αποτέλεσμα μόνιμες ανεπάρκειες στον αριθμό των νευρικών κυττάρων στον αναπτυσσόμενο εγκέφαλο με ανάλογες διαταραχές στις γνωστικές λειτουργίες (Bell and Lundberg 1985; Bell and Slotkin 1985; Lichtensteiger et al., 1988; McFarland et al., 1991; Slotkin et al., 1987).

Όπως αποδεικνύεται στη μελέτη αυτή ο αριθμός των νεοπαραχθέντων νευρώνων στον υποκάμπειο σχηματισμό ήταν μικρότερος στους μύες που εκτέθηκαν μακροχρόνια στο ΟΦ σε υποτοξικές δόσεις, σε σύγκριση με τα αντίστοιχα της ομάδας ελέγχου. Η μείωση αυτή μπορεί να οφείλεται σε ενεργοποίηση μοριακών μηχανισμών αναστολής της κυτταρικής διαίρεσης των προγονικών κυττάρων, η στην απόπτωση των νεοπαραχθέντων κυττάρων ή σε άλλους παράγοντες που χρήζουν διερεύνησης.

Το ΟΦ CPF δεν επηρεάζει μόνο την ανάπτυξη των νευρικών κυττάρων, αλλά και τον νευρογλοιακών που διαδραματίζουν τροφικό και υποστηρικτικό ρόλο στους νευρώνες. Το CPF *in vitro* αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των νευρογλοιακών κυττάρων, διαταράσσοντας σηματοδοτικά μονοπάτια και πυρηνικούς μεταγραφικούς παράγοντες που εμπλέκονται στη διαφοροποίηση, με την παραγωγή και την ενίσχυση των επιδράσεων διαφόρων ελεύθερων ριζών οξυγόνου. (Garcia et al., 2001). Παρόμοια *in vivo*, η ανάπτυξη των νευρογλοιακών κυττάρων διαταράσσεται κατά την εμβρυική περίοδο και σε νεογέννητους επίμυες ύστερα από έκθεση στον παράγοντα αυτό και μάλιστα σε δόσεις που δεν παράγουν εμφανή συμπτώματα οξείας τοξίκωσης (Garcia et al., 2002).

Λαμβάνοντας υπόψη το δεδομένο ότι η νευρογλοία διαδραματίζει ουσιαστικότατο ρόλο στην νευρωνική μετανάστευση και ωρίμανση του ΚΝΣ, στην αξονογένεση και συναπτογένεση (Cameron and Rakic 1991; Guerri and Renau-Piqueras 1997; Ullian et al., 2001), μπορεί να φανταστεί κανείς ότι καθώς βάλλεται και αυτός ο κυτταρικός πληθυσμός από το CPF, αναστέλλεται επιπρόσθετα η νευρογένεση και η δημιουργία νέων συνάψεων από τους ανώριμους νευρώνες (Slotkin 1999). Στα ιστολογικά μας παρασκευάσματα δεν βρέθηκαν αποπτωτικά νευρογλοιακά κύτταρα, αλλά μάλλον ενεργοποιημένα δραστικά αστροκύτταρα όπως ανιχνεύονται με την αυξημένη ενεργότητα της πρωτεΐνης GFAP. Τυπικά, όταν συμβαίνει κάποια προσβολή του ΚΝΣ, όπως φλεγμονή, εκφύλιση κ.α., η ενεργότητα της GFAP αυξάνεται σαν ένα πρόδρομο σημάδι κυτταρικής βλάβης (O'Callaghan 1988; O'Callaghan 1993; O'Callaghan and Miller 1993). Αυτό πιθανά να συμβαίνει και ύστερα από μακροχρόνια έκθεση στο CPF, όπου λόγω της προσβολής των νευρικών κυττάρων, παρατηρείται σαν αντιδραστική απάντηση η αστρογλίωση.

Συμπερασματικά μπορούμε να πούμε ότι ο ανθρώπινος πληθυσμός εκτίθεται καθημερινά, ακόμα από την ενδομήτρια ζωή, σε τοξικούς παράγοντες όπως τα ΟΦ, σε χαμηλές δόσεις που δεν προκαλούν εμφανή συμπτωματολογία. Νεότερα όμως δεδομένα συνηγορούν στο ότι η μακροχρόνια έκθεση στους παράγοντες αυτούς δεν είναι άμοιρη συνεπειών, αλλά μπορεί να έχει δυσμενείς επιδράσεις σε βασικά συστήματα όπως το νευρικό και να ευθύνεται για παθολογικές καταστάσεις άγνωστης μέχρι σήμερα αιτιολογίας ή για την επιδείνωση νευρολογικών νοσημάτων ή ακόμα για την μείωση του ουδού αυτόματης εμφάνισής τους.

## Βιβλιογραφία

- Aiuto LA, Pavlakis SG, Boxer RA.** *"Life-threatening organophosphate-induced delayed polyneuropathy in a child after accidental chlorpyrifos ingestion"*. **J Pediatr** 122(4) 1993 658.
- Amr MM, Halim ZS, Moussa SS.** *"Psychiatric disorders among Egyptian pesticide applicators and formulators"*. **Environ Res** 73(1-2) 1997 193.
- Authier N, Gillet JP, Fialip J, Eschaliere A, Coudore F.** *"An animal model of nociceptive peripheral neuropathy following repeated cisplatin injections"*. **Exp Neurol** 182(1) 2003 12.
- Bagchi D, Bagchi M, Hassoun EA, Stohs SJ.** *"In vitro and in vivo generation of reactive oxygen species, DNA damage and lactate dehydrogenase leakage by selected pesticides"*. **Toxicology** 104(1-3) 1995 129.
- Bell JM, Lundberg PK.** *"Effects of a commercial soy lecithin preparation on development of sensorimotor behavior and brain biochemistry in the rat"*. **Dev Psychobiol** 18(1) 1985 59.
- Bell JM, Slotkin TA.** *"Perinatal dietary supplementation with a commercial soy lecithin preparation: effects on behavior and brain biochemistry in the developing rat"*. **Dev Psychobiol** 18(5) 1985 383.
- Betarbet R, Sherer TB, MacKenzie G, Garcia-Osuna M, Panov AV, Greenamyre JT.** *"Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease"*. **Nat Neurosci** 3(12) 2000 1301.
- Bhatt MH, Elias MA, Mankodi AK.** *"Acute and reversible parkinsonism due to organophosphate pesticide intoxication: five cases"*. **Neurology** 52(7) 1999 1467.
- Bloomquist JR, Barlow RL, Gillette JS, Li W, Kirby ML.** *"Selective effects of insecticides on nigrostriatal dopaminergic nerve pathways"*. **Neurotoxicology** 23(4-5) 2002 537.
- Blum D, Torch S, Lambeng N, Nissou M, Benabid AL, Sadoul R, Verna JM.** *"Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease"*. **Prog Neurobiol** 65(2) 2001 135.
- Breese GR, Criswell HE, Johnson KB, O'Callaghan JP, Duncan GE, Jensen KF, Simson PE, Mueller RA.** *"Neonatal destruction of dopaminergic neurons"*. **Neurotoxicology** 15(1) 1994 149.
- Breslin WJ, Liberacki AB, Dittenber DA, Quast JF.** *"Evaluation of the developmental and reproductive toxicity of chlorpyrifos in the rat"*. **Fundam Appl Toxicol** 29(1) 1996 119.
- Cameron RS, Rakic P.** *"Glial cell lineage in the cerebral cortex: a review and synthesis"*. **Glia** 4(2) 1991 124.
- Campbell CG, Seidler FJ, Slotkin TA.** *"Chlorpyrifos interferes with cell development in rat brain regions"*. **Brain Res Bull** 43(2) 1997 179.
- Casida JE, Quistad GB.** *"Organophosphate toxicology: safety aspects of nonacetylcholinesterase secondary targets"*. **Chem Res Toxicol** 17(8) 2004 983.
- Chanda SM, Mortensen SR, Moser VC, Padilla S.** *"Tissue-specific effects of chlorpyrifos on carboxylesterase and cholinesterase activity in adult rats: an in vitro and in vivo comparison"*. **Fundam Appl Toxicol** 38(2) 1997 148.

- Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM, Yaksh TL.** "Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw". **J Neurosci Methods** 53(1) 1994 55.
- Clegg DJ, van Gemert M.** "Expert panel report of human studies on chlorpyrifos and/or other organophosphate exposures". **J Toxicol Environ Health B Crit Rev** 2(3) 1999 257.
- Cochran RC, Kishiyama J, Aldous C, Carr WC, Jr., Pfeifer KF.** "Chlorpyrifos: hazard assessment based on a review of the effects of short-term and long-term exposure in animals and humans". **Food Chem Toxicol** 33(2) 1995 165.
- Crumpton TL, Seidler FJ, Slotkin TA.** "Is oxidative stress involved in the developmental neurotoxicity of chlorpyrifos?" **Brain Res Dev Brain Res** 121(2) 2000 189.
- Dam K, Garcia SJ, Seidler FJ, Slotkin TA.** "Neonatal chlorpyrifos exposure alters synaptic development and neuronal activity in cholinergic and catecholaminergic pathways". **Brain Res Dev Brain Res** 116(1) 1999a 9.
- Dam K, Seidler FJ, Slotkin TA.** "Chlorpyrifos releases norepinephrine from adult and neonatal rat brain synaptosomes". **Brain Res Dev Brain Res** 118(1-2) 1999b 129.
- de Medinaceli L, Freed WJ, Wyatt RJ.** "An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks". **Exp Neurol** 77(3) 1982 634.
- Difazio MC, Hollingsworth Z, Young AB, Penney JB, Jr.** "Glutamate receptors in the substantia nigra of Parkinson's disease brains". **Neurology** 42(2) 1992 402.
- Fricker B, Muller A, Rene F.** "Evaluation tools and animal models of peripheral neuropathies". **Neurodegener Dis** 5(2) 2008 72.
- Garcia SJ, Seidler FJ, Crumpton TL, Slotkin TA.** "Does the developmental neurotoxicity of chlorpyrifos involve glial targets? Macromolecule synthesis, adenylyl cyclase signaling, nuclear transcription factors, and formation of reactive oxygen in C6 glioma cells". **Brain Res** 891(1-2) 2001 54.
- Garcia SJ, Seidler FJ, Qiao D, Slotkin TA.** "Chlorpyrifos targets developing glia: effects on glial fibrillary acidic protein". **Brain Res Dev Brain Res** 133(2) 2002 151.
- Gorell JM, Johnson CC, Rybicki BA, Peterson EL, Richardson RJ.** "The risk of Parkinson's disease with exposure to pesticides, farming, well water, and rural living". **Neurology** 50(5) 1998 1346.
- Guerri C, Renau-Piqueras J.** "Alcohol, astroglia, and brain development". **Mol Neurobiol** 15(1) 1997 65.
- Gupta RC.** "Brain regional heterogeneity and toxicological mechanisms of organophosphates and carbamates". **Toxicol Mech Methods** 14(3) 2004 103.
- Hallett PJ, Dunah AW, Ravenscroft P, Zhou S, Bezard E, Crossman AR, Brotchie JM, Standaert DG.** "Alterations of striatal NMDA receptor subunits associated with the development of dyskinesia in the MPTP-lesioned primate model of Parkinson's disease". **Neuropharmacology** 48(4) 2005 503.
- Hallett PJ, Standaert DG.** "Rationale for and use of NMDA receptor antagonists in Parkinson's disease". **Pharmacol Ther** 102(2) 2004 155.
- Hancock S, Ehrich M, Hinckley J, Pung T, Jortner BS.** "The effect of stress on the acute neurotoxicity of the organophosphate insecticide chlorpyrifos". **Toxicol Appl Pharmacol** 219(2-3) 2007 136.
- Howard MD, Mirajkar N, Karanth S, Pope CN.** "Comparative effects of oral chlorpyrifos exposure on cholinesterase activity and muscarinic receptor binding in neonatal and adult rat heart". **Toxicology** 238(2-3) 2007 157.

- Jamal GA.** *"Neurological syndromes of organophosphorus compounds"*. **Adverse Drug React Toxicol Rev** 16(3) 1997 133.
- Junn E, Mouradian MM.** *"Apoptotic signaling in dopamine-induced cell death: the role of oxidative stress, p38 mitogen-activated protein kinase, cytochrome c and caspases"*. **J Neurochem** 78(2) 2001 374.
- Kamataki T, Lee Lin MC, Belcher DH, Neal RA.** *"Studies of the metabolism of parathion with an apparently homogeneous preparation of rabbit liver cytochrome P-450"*. **Drug Metab Dispos** 4(2) 1976 180.
- Kaplan JG, Kessler J, Rosenberg N, Pack D, Schaumburg HH.** *"Sensory neuropathy associated with Dursban (chlorpyrifos) exposure"*. **Neurology** 43(11) 1993 2193.
- Karanth S, Liu J, Mirajkar N, Pope C.** *"Effects of acute chlorpyrifos exposure on in vivo acetylcholine accumulation in rat striatum"*. **Toxicol Appl Pharmacol** 216(1) 2006 150.
- Karanth S, Pope C.** *"Age-related effects of chlorpyrifos and parathion on acetylcholine synthesis in rat striatum"*. **Neurotoxicol Teratol** 25(5) 2003 599.
- Karen DJ, Li W, Harp PR, Gillette JS, Bloomquist JR.** *"Striatal dopaminergic pathways as a target for the insecticides permethrin and chlorpyrifos"*. **Neurotoxicology** 22(6) 2001 811.
- Kelsey JE, Mague SD, Pijanowski RS, Harris RC, Kleckner NW, Matthews RT.** *"NMDA receptor antagonists ameliorate the stepping deficits produced by unilateral medial forebrain bundle injections of 6-OHDA in rats"*. **Psychopharmacology (Berl)** 175(2) 2004 179.
- Levin HS, Rodnitzky RL, Mick DL.** *"Anxiety associated with exposure to organophosphate compounds"*. **Arch Gen Psychiatry** 33(2) 1976 225.
- Lichtensteiger W, Ribary U, Schlumpf M, Odermatt B, Widmer HR.** *"Prenatal adverse effects of nicotine on the developing brain"*. **Prog Brain Res** 73 1988 137.
- London L, Flisher AJ, Wesseling C, Mergler D, Kromhout H.** *"Suicide and exposure to organophosphate insecticides: cause or effect?"* **Am J Ind Med** 47(4) 2005 308.
- Lotti M, Caroldi S, Capodicasa E, Moretto A.** *"Promotion of organophosphate-induced delayed polyneuropathy by phenylmethanesulfonyl fluoride"*. **Toxicol Appl Pharmacol** 108(2) 1991 234.
- Lotti M, Moretto A, Capodicasa E, Bertolazzi M, Peraica M, Scapellato ML.** *"Interactions between neuropathy target esterase and its inhibitors and the development of polyneuropathy"*. **Toxicol Appl Pharmacol** 122(2) 1993 165.
- Marty MS, Domoradzki JY, Hansen SC, Timchalk C, Bartels MJ, Mattsson JL.** *"The effect of route, vehicle, and divided doses on the pharmacokinetics of chlorpyrifos and its metabolite trichloropyridinol in neonatal Sprague-Dawley rats"*. **Toxicol Sci** 100(2) 2007 360.
- McFarland BJ, Seidler FJ, Slotkin TA.** *"Inhibition of DNA synthesis in neonatal rat brain regions caused by acute nicotine administration"*. **Brain Res Dev Brain Res** 58(2) 1991 223.
- Metz GA, Schwab ME.** *"Behavioral characterization in a comprehensive mouse test battery reveals motor and sensory impairments in growth-associated protein-43 null mutant mice"*. **Neuroscience** 129(3) 2004 563.
- Meyer OA, Tilson HA, Byrd WC, Riley MT.** *"A method for the routine assessment of fore- and hindlimb grip strength of rats and mice"*. **Neurobehav Toxicol** 1(3) 1979 233.



- Milesion BE, Chambers JE, Chen WL, Dettbarn W, Ehrich M, Eldefrawi AT, Gaylor DW, Hamernik K, Hodgson E, Karczmar AG and others. "Common mechanism of toxicity: a case study of organophosphorus pesticides". **Toxicol Sci** 41(1) 1998 8.
- Moreno M, Canadas F, Cardona D, Sunol C, Campa L, Sanchez-Amate MC, Flores P, Sanchez-Santed F. "Long-term monoamine changes in the striatum and nucleus accumbens after acute chlorpyrifos exposure". **Toxicol Lett** 176(2) 2008 162.
- Moretto A, Capodicasa E, Peraica M, Lotti M. "Age sensitivity to organophosphate-induced delayed polyneuropathy. Biochemical and toxicological studies in developing chicks". **Biochem Pharmacol** 41(10) 1991 1497.
- Moretto A, Lotti M. "Promotion of peripheral axonopathies by certain esterase inhibitors". **Toxicol Ind Health** 9(6) 1993 1037.
- Moretto A, Lotti M. "Poisoning by organophosphorus insecticides and sensory neuropathy". **J Neurol Neurosurg Psychiatry** 64(4) 1998 463.
- Moser VC, Padilla S. "Age- and gender-related differences in the time course of behavioral and biochemical effects produced by oral chlorpyrifos in rats". **Toxicol Appl Pharmacol** 149(1) 1998 107.
- O'Callaghan JP. "Neurotypic and gliotypic proteins as biochemical markers of neurotoxicity". **Neurotoxicol Teratol** 10(5) 1988 445.
- O'Callaghan JP. "Quantitative features of reactive gliosis following toxicant-induced damage of the CNS". **Ann N Y Acad Sci** 679 1993 195.
- O'Callaghan JP, Miller DB. "Quantification of reactive gliosis as an approach to neurotoxicity assessment". **NIDA Res Monogr** 136 1993 188.
- Pond AL, Chambers HW, Coyne CP, Chambers JE. "Purification of two rat hepatic proteins with A-esterase activity toward chlorpyrifos-oxon and paraoxon". **J Pharmacol Exp Ther** 286(3) 1998 1404.
- Pope CN. "Organophosphorus pesticides: do they all have the same mechanism of toxicity?" **J Toxicol Environ Health B Crit Rev** 2(2) 1999 161.
- Pope CN, Padilla S. "Potentiation of organophosphorus-induced delayed neurotoxicity by phenylmethylsulfonyl fluoride". **J Toxicol Environ Health** 31(4) 1990 261.
- Prendergast MA, Terry AV, Jr., Buccafusco JJ. "Effects of chronic, low-level organophosphate exposure on delayed recall, discrimination, and spatial learning in monkeys and rats". **Neurotoxicol Teratol** 20(2) 1998 115.
- Pung T, Klein B, Blodgett D, Jortner B, Ehrich M. "Examination of concurrent exposure to repeated stress and chlorpyrifos on cholinergic, glutamatergic, and monoamine neurotransmitter systems in rat forebrain regions". **Int J Toxicol** 25(1) 2006 65.
- Qiao D, Seidler FJ, Abreu-Villaca Y, Tate CA, Cousins MM, Slotkin TA. "Chlorpyrifos exposure during neurulation: cholinergic synaptic dysfunction and cellular alterations in brain regions at adolescence and adulthood". **Brain Res Dev Brain Res** 148(1) 2004 43.
- Qiao D, Seidler FJ, Padilla S, Slotkin TA. "Developmental neurotoxicity of chlorpyrifos: what is the vulnerable period?" **Environ Health Perspect** 110(11) 2002 1097.
- Qiao D, Seidler FJ, Tate CA, Cousins MM, Slotkin TA. "Fetal chlorpyrifos exposure: adverse effects on brain cell development and cholinergic biomarkers emerge postnatally and continue into adolescence and adulthood". **Environ Health Perspect** 111(4) 2003 536.

- Ray DE, Richards PG.** *"The potential for toxic effects of chronic, low-dose exposure to organophosphates"*. **Toxicol Lett** 120(1-3) 2001 343.
- Rodnitzky RL.** *"Occupational exposure to organophosphate pesticides: a neurobehavioral study"*. **Arch Environ Health** 30(2) 1975 98.
- Roldan-Tapia L, Nieto-Escamez FA, del Aguila EM, Laynez F, Parron T, Sanchez-Santed F.** *"Neuropsychological sequelae from acute poisoning and long-term exposure to carbamate and organophosphate pesticides"*. **Neurotoxicol Teratol** 28(6) 2006 694.
- Salvi RM, Lara DR, Ghisolfi ES, Portela LV, Dias RD, Souza DO.** *"Neuropsychiatric evaluation in subjects chronically exposed to organophosphate pesticides"*. **Toxicol Sci** 72(2) 2003 267.
- Sanchez-Amate MC, Flores P, Sanchez-Santed F.** *"Effects of chlorpyrifos in the plus-maze model of anxiety"*. **Behav Pharmacol** 12(4) 2001 285.
- Senanayake N, Sanmuganathan PS.** *"Extrapyramidal manifestations complicating organophosphorus insecticide poisoning"*. **Hum Exp Toxicol** 14(7) 1995 600.
- Slotkin TA.** *"Developmental cholinotoxicants: nicotine and chlorpyrifos"*. **Environ Health Perspect** 107 Suppl 1 1999 71.
- Slotkin TA, Levin ED, Seidler FJ.** *"Comparative developmental neurotoxicity of organophosphate insecticides: effects on brain development are separable from systemic toxicity"*. **Environ Health Perspect** 114(5) 2006 746.
- Slotkin TA, Orband-Miller L, Queen KL, Whitmore WL, Seidler FJ.** *"Effects of prenatal nicotine exposure on biochemical development of rat brain regions: maternal drug infusions via osmotic minipumps"*. **J Pharmacol Exp Ther** 240(2) 1987 602.
- Slotkin TA, Seidler FJ.** *"The alterations in CNS serotonergic mechanisms caused by neonatal chlorpyrifos exposure are permanent"*. **Brain Res Dev Brain Res** 158(1-2) 2005 115.
- Slotkin TA, Seidler FJ.** *"Prenatal chlorpyrifos exposure elicits presynaptic serotonergic and dopaminergic hyperactivity at adolescence: critical periods for regional and sex-selective effects"*. **Reprod Toxicol** 23(3) 2007 421.
- Slotkin TA, Seidler FJ, Fumagalli F.** *"Exposure to organophosphates reduces the expression of neurotrophic factors in neonatal rat brain regions: similarities and differences in the effects of chlorpyrifos and diazinon on the fibroblast growth factor superfamily"*. **Environ Health Perspect** 115(6) 2007 909.
- Slotkin TA, Tate CA, Cousins MM, Seidler FJ.** *"Functional alterations in CNS catecholamine systems in adolescence and adulthood after neonatal chlorpyrifos exposure"*. **Brain Res Dev Brain Res** 133(2) 2002 163.
- Smith JN, Campbell JA, Busby-Hjerpe AL, Lee S, Poet TS, Barr DB, Timchalk C.** *"Comparative chlorpyrifos pharmacokinetics via multiple routes of exposure and vehicles of administration in the adult rat"*. **Toxicology** 261(1-2) 2009 47.
- Staats DA, Fisher JW, Connolly RB.** *"Gastrointestinal absorption of xenobiotics in physiologically based pharmacokinetic models. A two-compartment description"*. **Drug Metab Dispos** 19(1) 1991 144.
- Stallones L, Beseler C.** *"Pesticide poisoning and depressive symptoms among farm residents"*. **Ann Epidemiol** 12(6) 2002 389.
- Stapleton AR, Chan VT.** *"Subtoxic chlorpyrifos treatment resulted in differential expression of genes implicated in neurological functions and development"*. **Arch Toxicol** 83(4) 2009 319.
- Sultatos LG.** *"Mammalian toxicology of organophosphorus pesticides"*. **J Toxicol Environ Health** 43(3) 1994 271.

- Terry AV, Jr., Gearhart DA, Beck WD, Jr., Truan JN, Middlemore ML, Williamson LN, Bartlett MG, Prendergast MA, Sickles DW, Buccafusco JJ.** *"Chronic, intermittent exposure to chlorpyrifos in rats: protracted effects on axonal transport, neurotrophin receptors, cholinergic markers, and information processing"*. **J Pharmacol Exp Ther** 322(3) 2007 1117.
- Timchalk C, Nolan RJ, Mendrala AL, Dittenber DA, Brzak KA, Mattsson JL.** *"A Physiologically based pharmacokinetic and pharmacodynamic (PBPK/PD) model for the organophosphate insecticide chlorpyrifos in rats and humans"*. **Toxicol Sci** 66(1) 2002 34.
- Ullian EM, Sapperstein SK, Christopherson KS, Barres BA.** *"Control of synapse number by glia"*. **Science** 291(5504) 2001 657.
- Varejao AS, Meek MF, Ferreira AJ, Patricio JA, Cabrita AM.** *"Functional evaluation of peripheral nerve regeneration in the rat: walking track analysis"*. **J Neurosci Methods** 108(1) 2001 1.
- Volkow ND, Wang GJ, Fowler JS, Ding YS, Gur RC, Gatley J, Logan J, Moberg PJ, Hitzemann R, Smith G and others.** *"Parallel loss of presynaptic and postsynaptic dopamine markers in normal aging"*. **Ann Neurol** 44(1) 1998 143.
- Whitney KD, Seidler FJ, Slotkin TA.** *"Developmental neurotoxicity of chlorpyrifos: cellular mechanisms"*. **Toxicol Appl Pharmacol** 134(1) 1995 53.
- Withey JR, Collins BT, Collins PG.** *"Effect of vehicle on the pharmacokinetics and uptake of four halogenated hydrocarbons from the gastrointestinal tract of the rat"*. **J Appl Toxicol** 3(5) 1983 249.
- Won YK, Liu J, Olivier K, Jr., Zheng Q, Pope CN.** *"Age-related effects of chlorpyrifos on acetylcholine release in rat brain"*. **Neurotoxicology** 22(1) 2001 39.
- Yanai J, Vatury O, Slotkin TA.** *"Cell signaling as a target and underlying mechanism for neurobehavioral teratogenesis"*. **Ann N Y Acad Sci** 965 2002 473.