

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Nataša HOJNIK

**VPLIV INSEKTICIDA KUMAFOSA NA OBNAŠANJE
LABORATORIJSKIH MIŠI KOT MODEL ZA
STRUPENOST PRI LJUDEH**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Nataša HOJNIK

**VPLIV INSEKTICIDA KUMAFOSA NA OBNAŠANJE
LABORATORIJSKIH MIŠI KOT MODEL ZA STRUPENOST PRI
LJUDEH**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**THE EFFECT OF INSECTICIDE COUMAPHOS ON BEHAVIOUR
OF LABORATORY MICE AS A MODEL FOR HUMAN TOXICITY**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2013

Hojnik N. Vpliv insekticida kumafosa na obnašanje laboratorijskih miši kot model za strupenost pri ljudeh.
Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, 2013

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija biotehnologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Eksperimentalni del naloge je bil opravljen na Centru za genomiko živali na Veterinarski fakulteti Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija medoddelčnega dodiplomskega študija biotehnologije je na seji dne 20. 6. 2012 za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Gregorja Majdiča in za recenzenta prof. dr. Marka Živina.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Branka JAVORNIK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član: prof. dr. Gregor MAJDIČ
Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta, Center za genomiko živali

Član: prof. dr. Marko ŽIVIN
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko fiziologijo

Datum zagovora:

Diplomsko delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svojega diplomskega dela v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Nataša HOJNIK

KLJUČNA INFORMACIJSKA DOKUMENTACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 632.95.024:611.81:57.084(043.2)=163.6
KG	kumafos/insekticidi/organofosfati/dolgotrajna izpostavljenost/razvoj možganov/duševne motnje/poskusi na živalih/miši/testi obnašanja/med
AV	HOJNIK, Nataša
SA	MAJDIČ, Gregor (mentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije
LI	2013
IN	VPLIV INSEKTICIDA KUMAFOSA NA OBNAŠANJE LABORATORIJSKIH MIŠI KOT MODEL ZA STRUPENOST PRI LJUDEH
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	IX, 90 str., 23 sl., 111 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Kumafos je organofosfatni insekticid, ki se pri nas uporablja za zatiranje <i>Varroa Jacobsoni</i> v čebelarstvu. Organofosfati (OP) v osnovi z nepovratnim zaviranjem pomembne enote holinergičnega dela živčnega sistema – encima acetilholin-esteraze (AChE) delujejo strupeno tudi na ljudi, še posebej zaskrbljujoča je dolgotrajna izpostavljenost nizkim odmerkom, sploh v času razvoja, kar bi se lahko kasneje v življenju odražalo v nepravilnem delovanju možganov in pojavu različnih duševnih bolezni pri ljudeh. V diplomskem delu smo preučevali vplive izpostavljenosti nizkim odmerkom kumafosa (1 mg/kg in 0,1 mg/kg) na razvoj možganov miši seva balb/c. Morebitne spremembe v delovanju možganov smo pri odraslih miših spremljali s standardnimi testi obnašanja, s katerimi ugotavljamo določena stanja, značilna za duševne motnje pri ljudeh. Obnašanje, podobno anksioznosti smo preverjali s testom dvignjenega labirinta (EPM), testom z zakopavanjem frnikol in testom odprtega polja (OFT). Socialno obnašanje in spomin, katerih odstopanja so značilna tudi za avtizem pri ljudeh, smo spremljali s testom socialnega prepoznavanja. Depresiji podobno obnašanje smo ugotavljali s testom prisiljenega plavanja (FST). Pri nobenem izmed izvedenih testov ni prišlo do statistično značilnih razlik med kumafosu izpostavljenima skupinama in kontrolno skupino. Pri EPM, testu socialnega prepoznavanja in OFT so se pojavile statistično značilne razlike med spoloma. To se sklada z že znano ugotovitvijo, da so samice prirojeno bolj nagnjene k anksioznemu obnašanju. Kumafos v nizkih odmerkih in dolgotrajni izpostavljenosti tako glede na naše rezultate ne vpliva na razvoj možganov miši, kar se ne sklada z ugotovitvami o delovanju nekaterih drugih predstavnikov OP, zato bi bilo smiselno, da se raziskava razširi v smeri povečanja testnih skupin miši in uporabe drugih standardnih testov obnašanja, opravljanja dodatnih študij z višjimi omerki v času razvoja, izpostavljenostjo v odraslosti testnih miši ter zaradi prisotnosti drugih OP in pesticidov v medu tudi preverjanje vpliva takšnih mešanic.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
 DC UDC 632.95.024:611.81:57.084(043.2)=163.6
 CX coumaphos/insecticides/organophosphates/longterm exposure/development of brain/psychiatric diseases/animal testing/mice/behavioural tests/honey
 AU HOJNIK, Nataša
 AA MAJDIČ, Gregor (supervisor)
 PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
 PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study Programme in Biotechnology
 PY 2013
 TI THE EFFECT OF INSECTICIDE COUMAPHOS ON BEHAVIOUR OF LABORATORY MICE AS A MODEL FOR HUMAN TOXICITY
 DT Graduation Thesis (University Studies)
 NO IX, 90 p., 23 fig., 111 ref.
 LA SI
 AL sl/en
 AB Coumaphos is organophosphate insecticide, used to treat varosis (caused by *Varroa Jacobsoni*) in beekeeping. Organophosphates (OP) with their irreversible inhibition of enzyme acetylcholinesterase as an important component of cholinergic part of the nervous system are also very harmful for humans. Very worrying is potential constant exposure to low concentrations of OP, specially at the time of organism development what can possibly result in an abnormal activity of brain function and consecutively contribute to the development of various mental disorders. In our study, we have examined the effects of low doses of coumaphos (1 mg/kg and 0,1 mg/kg) on brain development balb/c mouse strain. Potential changes in the brain of adult mice were examined by standard behavioural tests as models for different neuropsychiatric disorders in humans. Anxiety related behaviours were tested with elevated plus maze test (EPM), marble burying test and open field test (OFT). Social behaviour and social memory disorders, which are one of the signs for autism by humans, were tested with social recognition test. Depression related behaviors were tested with forced swim test (FST). Results did not reveal any statistically significant differences between two groups exposed to coumaphos and control group. In EPM, OFT and social recognition test there were statistically significant differences between sexes, as expected. In our study long neonatal exposure to low doses of coumaphos didn't cause permanent effects on brain development in mice, what differs with studies of some other OPs. For this reason it would be appropriate to expand our study in the direction of enlargement of testing groups, use of other behaviour tests, examination of possible effects of higher doses at the time of development, exposure in adulthood and investigation of effects of OP mixtures because of the presence of other members of OP in honey samples.

KAZALO VSEBINE

	KLJUČNA INFORMACIJSKA DOKUMENTACIJA	III
	KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
	KAZALO VSEBINE	V
	KAZALO SLIK	VII
	OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	VIII
1	UVOD	1
1.1	NAMEN DELA IN HIPOTEZI	2
2	PREGLED OBJAV	4
2.1	PESTICIDI IN NJIHOVA PROBLEMATIKA	4
2.1.1	Organofosfati	5
2.1.2	Zastrupitev z organofosfati	7
2.1.2.1	Zastrupitev z visokimi odmerki	7
2.1.2.2	Strupenost dolgotrajne izpostavljenosti nizkih odmerkov	9
2.1.2.3	Mehanizmi delovanja organofosfatov na razvoj	10
2.1.2.4	Organofosfati kot hormonski motilci	14
2.1.2.5	Vpliv organofosfatov na delovanje možganov in obnašanje	15
2.2	KUMAFOS	19
2.2.1	Osnovne značilnosti kumafosa	19
2.2.2	Uporaba kumafosa	20
2.2.2.1	Zatiranje klopov pri živalih	20
2.2.2.2	Zatiranje škodljivih zajedavskih pršic pri čebelah	20
2.2.3	Strupenost kumafosa	21
2.2.3.1	Tveganje za ljudi, ki se rokujejo s kumafosom	22
2.2.3.2	Vsebnost kumafosa v medu in ostalih čebelarških produktih	23
2.3	TESTI OBNAŠANJA KOT MODEL ZA SLEDENJE VPLIVOM ORGANOFOSFATOV	25
2.3.1	Testiranje nevrotoksičnosti	25
2.3.2	Laboratorijske živali kot modeli za ugotavljanje odstopanj v obnašanju	26

2.3.3	Testi obnašanja	27
2.3.4	Ugotavljanje obnašanja, podobnega anksioznosti	28
2.3.4.1	Test dvignjenega labirinta	30
2.3.4.2	Test odprtega polja	31
2.3.4.3	Obrambno zakopavanje	34
2.3.4.3.1	Test z zakopavanjem frnikol	35
2.3.5	Ugotavljanje odstopanj v socialnem obnašanju	36
2.3.5.1	Test socialnega prepoznavanja	38
2.3.6	Ugotavljanje obnašanja, podobnega depresiji	39
2.3.6.1	Test prisiljenega plavanja	40
3	MATERIALI IN METODE	42
3.1	TESTNE ŽIVALI	42
3.2	PRIPRAVA ZALOŽNE RAZTOPINE KUMAFOSA	42
3.3	PRIPRAVA VODE Z RAZLIČNIMI ODMERKI KUMAFOSA IN IZPOSTAVITEV MIŠI	43
3.4	TESTI OBNAŠANJA	43
3.4.1	Test dvignjenega labirinta (EPM)	44
3.4.2	Test z zakopavanjem frnikol	45
3.4.3	Test socialnega prepoznavanja	46
3.4.4	Test odprtega polja (OFT)	47
3.4.5	Test prisiljenega plavanja (FST)	48
3.5	STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV	49
4	REZULTATI	50
4.1	REZULTATI TESTA DVIGNJENEGA LABIRINTA (EPM)	50
4.2	REZULTATI TESTA Z ZAKOPAVANJEM FRNIKOL	56
4.3	REZULTATI TESTA SOCIALNEGA PREPOZNAVANJA	57
4.4	REZULTATI TESTA ODPRTEGA POLJA	60
4.5	REZULTATI TESTA PRISILNEGA PLAVANJA (FST)	68
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	70
6	POVZETEK	77
7	VIRI	80
	ZAHVALA	

KAZALO SLIK

Sl. 1: Oprema za opravljanje EPM	31
Sl. 2: Test odprtega polja (Gould in sod., 2009: 5)	34
Sl. 3: Oprema za test zakopavanja frnikol	36
Sl. 4: Test socialnega prepoznavanja (Crawley, 2007: 145)	39
Sl. 5: Test prisiljenega plavanja (Hascoët in Bourin, 2009: 86)	41
Sl. 6: Rezultati skupnega časa zadrževanja testnih miši v odprtih krakih EPM	51
Sl. 7: Rezultati skupnega časa zadrževanja testnih miši v zaprtih krakih EPM	52
Sl. 8: Rezultati števila vstopov testnih miši v odprta kraka EPM	53
Sl. 9: Rezultati števila vstopov testnih miši v zaprta kraka EPM	54
Sl. 10: Rezultati časa do prvega vstopa testnih miši v odprta kraka EPM	55
Sl. 11: Rezultati časa do prvega vstopa testnih miši v zaprta kraka EPM	56
Sl. 12: Rezultati testa z zakopavanjem frnikol	57
Sl. 13: Rezultati časov ovohavanja testnih živali pri mišjih samicah	59
Sl. 14: Rezultati časov ovohavanja testnih živali pri mišjih samcih	60
Sl. 15: Rezultati skupnega časa gibanja testnih miši pri OFT	61
Sl. 16: Rezultati skupnega časa zadrževanja testnih miši v zunanji coni pri OFT	62
Sl. 17: Rezultati skupnega časa zadrževanja testnih miši v notranji coni pri OFT	63
Sl. 18: Rezultati skupnega časa gibanja testnih miši v zunanji coni pri OFT	64
Sl. 19: Rezultati skupnega časa gibanja testnih miši v notranji coni pri OFT	65
Sl. 20: Rezultati časa do prvega vstopa testnih živali v notranjo cono pri OFT	66
Sl. 21: Rezultati števila vstopov testnih živali v notranjo cono pri OFT	67
Sl. 22: Rezultati opravljenje razdalje tesnih miši v notranji coni pri OFT	68
Sl. 23: Rezultati skupnega časa lebdenja na vodi tesnih miši pri FS	69

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Okrajšava	Pomen
ACh	Acetilholin (angl. acetylcholine)
AChE	Acetilholinesteraza (angl. acetylcholinesterase)
AR	Androgeni receptor
BZ	Benzodiazepini
ChAT	Holinacetil transferaza (angl. choline acetyltransferase)
CŽS	Centralni živčni sistem
COPIND	Nevropsihiatrična motnja, nastala zaradi kronične izpostavitve OP (angl. chronic organophosphate induced neuropsychiatric disorder)
DDT	Diklorodifenolotrikloroetan
DFP	Disopropilfluorofosfat
DMSO	Dimetil sulfoksid
DNK	Deoksiribonukleinska kislina
EPA	Agencija za zaščito okolja ZDA (angl. U.S. Environmental Protection Agency)
EPM	Test dvignjenega labirinta (angl. elevated plus maze)
ER	Estrogeni receptorji
FAO	Organizacija za prehrano in kmetijstvo (angl. Food and Agriculture Organization of the United Nations)
FSH	Folikle spodbujajoči hormon
FST	Test prisiljenega plavanja (angl. forced swim test)
GABA	Gama-aminobutirično kislina
GC-MS	Plinska kromatografija – masna spektrometrija (angl. gas chromatography – mass spectrometry)
GC-ECD	Plinska kromatografija – ločevalec ujetih elektronov (angl. gas chromatography – electron-capture dissociation)
GnRH	Gonadotropine sproščajoči hormon
HepG2	Celična linija, pridobljena iz humanega jetrnega karcinoma

IUPAC	Mednarodna zveza za čisto in uporabno kemijo (angl. The International Union of Pure and Applied Chemistry)
LD50	Srednja letalna doza
LH	Lutenizirajoči hormon
mAChRs	Muskarinski ACh receptorji (angl. muscarinic acetylcholine receptor)
NAD ⁺	Nicotinamid adenin dinukleotid
NTE	Esteraza, tarčna za nastanek nevropatije (angl. neuropathy target esterase)
OFT	Open field test (angl. open field test)
OP	Organofosfat (angl. organophosphate)
OPIDPN	Organofosfatna zakasnela polinevropatija (angl. organophosphate-induced delayed polyneuropathy)
PC12	Celična linija izolirana iz feokromocitoma podgan
PON1	Serumska paraoksonaza/arilesteraza 1
p,p' – DDE	Diklorodifenildikloroetilen
RNK	Ribonukleinska kislina
UVSs	Ultrazvočno oglašanje
WHO	Svetovna zdravstvena organizacija (angl. World Health Organization)

1 UVOD

Kumafos je organofosfatni insekticid, ki se v Evropi uporablja predvsem za zatiranje čebeljega zajedavca pršice *Varroa jacobsoni* (Maver in Poklukar, 2003), v ZDA pa predvsem za uničevanje klopov, ki s prenašanjem parazita *Babesia bigemina* povzročajo pogin živine in tako veliko škodo v kmetijstvu (Thomas in sod., 2010).

Tudi ostali organofosfati (OP) se uporabljajo predvsem kot insekticidi in so skozi zgodovino pripomogli k napredku in razcvetu kmetijstva ter tako posredno izboljšali ekonomske razmere po svetu. Njihova pesticidna aktivnost temelji na nepovratnem zavrtju delovanja encima acetilholin-esteraze (AChE). Ker je AChE zelo pomembna komponenta živčnega sistema drugih organizmov, so OP zelo strupeni tudi za živali in ljudi, o čemer nenazadnje priča dejstvo, da so se in se še uporabljajo kot bojni plini. Akutna zastrupitev z OP povzroča vrsto znanih in dobro raziskanih simptomov. Zaradi širjenja znanja o učinkih OP in zaradi pravilne uporabe OP je danes akutna zastrupitev z OP relativno redka. Veliko manj je znanega o dolgoročnih učinkih dolgotrajne izpostavitve nizkim odmerkom OP, ki smo jim zaradi intenzivne uporabe in zadrževanja v okolju neprestano izpostavljeni. Rezultati različnih raziskav kažejo, da lahko OP poškodujejo krvno-možgansko pregrado in s tem povzročijo trajne poškodbe možganov. To je še posebej kritično v času rasti in razvoja organizmov in se lahko kasneje odraža v nepravilnem delovanju možganov, kar se kaže v težavah s pomnjenjem, povečani pojavnosti nevropsihiatričnih bolezni, motnjah delovanja hormonskega sistema in ostalih podobnih zdravstvenih težavah (Gupta, 2006a).

Kumafos naj bi bil relativno varen, učinki akutne zastrupitve z njim so dobro znani. V ZDA se je v zadnjem času povečalo število raziskav, ki se ukvarjajo predvsem z zaskrbljujočimi posledicami neposrednega in nenehnega stika delavcev v kmetijstvu z nizkimi odmerki kumafosa, ko ti pri svojem delu pripravljajo raztopino kumafosa in jo nato nanašajo na živino (Thomas in sod., 2010). Podobni pomisleki se pojavljajo tudi v Evropi, kjer je veliko raziskav usmerjenih predvsem v določanje vsebnosti kumafosa v čebelarskih proizvodih pa tudi v učinke kumafosa na domače čebele. Izkazalo se je namreč, da se kumafos zadržuje v satju in vosku ter lahko prehaja v med, kar pa seveda

pomeni, da smo lahko ljudje kumafosu izpostavljeni tudi z uživanjem medu in ostalih čebelarских proizvodov (Fernandez-Muiño in sod., 1994).

Ni še znano, kakšni so učinki dolgoročne izpostavljenosti nizkim odmerkom kumafosa. Na osnovi raziskav z drugimi OP je možno sklepati, da lahko zgodnja izpostavljenost kumafosu vpliva na delovanje možganov in posledično povzroča odstopanja pri obnašanju živali in verjetno tudi ljudi v smislu pojava različnih duševnih motenj.

1.1 NAMEN DELA IN HIPOTEZI

Namen diplomskega dela je bil raziskati posledice dolgotrajne izpostavljenosti nizkim odmerkom kumafosa v času razvoja organizmov. Glede na predznanje o delovanju ostalih OP, smo se osredotočili na potencialni negativni vpliv kumafosa na možgane v času pred in po rojstvu. To smo ugotavljali na podlagi razlik v obnašanju odraslih miši, ki so bile kumafosu izpostavljene v času intenzivnega razvoja.

Na voljo je veliko raziskav, ki govorijo o kratkotrajnih učinkih zastrupitev z visokimi odmerki OP (Woods, 1999), medtem ko je takšnih, ki govorijo o dolgoročnih učinkih neprestane izpostavljenosti nizkim odmerkom OP, veliko manj. Nekatere od teh raziskav potrjujejo, da lahko OP v nizkih odmerkih na dolgi rok prav tako povzročajo različne negativne posledice predvsem na nivoju živčnega sistema oziroma možganov, med katerimi so številne duševne motnje.

Na pojav duševnih motenj smo se osredotočili tudi v naši raziskavi. Ugotavljali smo, če izpostavljenost nizkim odmerkom kumafosa vpliva na razvoj anksioznosti, depresije in odstopanj v socialnem obnašanju in spominu, kar je ena izmed značilnosti avtizma pri ljudeh. Pričakovali smo, da bomo pri miših, ki smo jih izpostavljali kumafosu, prišli do podobnih rezultatov. Na podlagi ugotovitev podobnih raziskav z drugimi OP smo predvidevali, da se bodo pokazale razlike med mišmi, ki so bile izpostavljene kumafosu, in tistimi, ki kumafosu niso bile izpostavljene.

Posledice delovanja OP smo ugotavljali z različnimi standardnimi testi obnašanja, ki so bili razviti kot modeli za ugotavljanje določenih duševnih motenj pri ljudeh. Za preverjanje stanja, podobnega anksioznosti, smo uporabili test dvignjenega labirinta (EPM), test z zakopavanjem frnikol in test odprtega polja (OFT). Za preverjanje socialnega spomina smo uporabljali test socialnega prepoznavanja. Za ugotavljanje stanja, podobnega depresiji, smo uporabili test prisiljenega plavanja (FST).

Naši hipotezi se torej glasita:

- Nizki odmerki kumafosa delujejo na razvoj možganov in povzročajo razvoj obnašanja, podobnega anksioznosti in depresiji ter odstopanj v socialnem obnašanju pri odraslih miših.
- Pri miših, ki bodo izpostavljene kumafosu, se bodo na ravni zgoraj omenjenih motenj v obnašanju pokazale statistično zanesljive razlike v primerjavi z mišmi, ki kumafosu ne bodo izpostavljene.

2 PREGLED OBJAV

2.1 PESTICIDI IN NJIHOVA PROBLEMATIKA

Pesticidi so različne vrste snovi ali mešanica le teh, ki se uporabljajo za uničevanje, odvracanje ali obvladovanje škodljivcev. Med škodljivce praviloma sodijo različni prenašalci človeških in živalskih bolezni, nezaželenne vrste rastlin ali živali, ki povzročajo škodo ali na kakršenkoli drug način ovirajo procese pridelave, predelave, shranjevanja, transporta ali prodajo hrane in krme, kmetijskih proizvodov ter lesa in lesnih izdelkov (Manual ... , 2010).

Glede na tarčne organizme, ki so lahko živali, rastline, bakterije ali glive, obstaja več vrst pesticidov. Najbolj uporabljene so različne vrste herbicidov, insekticidov in fungicidov. Večina se jih uporablja v kmetijstvu, v manjši meri tudi v industriji in v komercialne namene. Poleg organizmov, na katere pesticidi delujejo, se med seboj razlikujejo tudi po kemijski zgradbi, o čemer priča kemijsko široka paleta pesticidov, kakršni so klorirani ogljikovodiki, organofosfati, karbamati, triazini, benzojske kisline, klorirani fenoli in ostali (Winter, 2003).

Prvi dokazi o uporabi pesticidov segajo daleč v zgodovino. Sumerci bi naj že 2500 let pred našim štetjem uporabljali žveplove spojine kot sredstvo proti škodljivim žuželkam. Pesticidi so se torej uporabljali že v eni prvih velikih civilizacij, bolj komercialno uporabo pa so doživeli v 17. in 18. stoletju. Razvoj sintetičnih pesticidov se je začel med 1930 in 1940 z uvajanjem uporabe kloriranih ogljikovodikov. Mednje sodi tudi diklorodifenolotrikloroetan, sicer bolj znan kot DDT, za katerega je leta 1929 ob odkritju njegovih insekticidnih lastnosti Paul Müller prejel tudi Nobelovo nagrado. Danes je uporaba DDT kot tudi drugih kloriranih ogljikovodikov zaradi strupenosti za človeka in negativnih posledic za okolje v večini držav prepovedana (Pretty in sod., 2005).

Pri uporabi pesticidov velja prepričanje, da so sicer prav vsi škodljivi tudi za človeka, vendar naj nanj ne bi imeli pomembnega vpliva zaradi majhnosti tarčnih organizmov in

temu primerno nizkega uporabljenega odmerka. Veliko študij je žal pokazalo nasprotno. Pesticidi, ki na primer delujejo kot hormonski motilci, so za človeka škodljivi že v nizkih odmerkih, prav tako so v majhnih količinah strupene tudi njihove mešanice (Winter, 2003).

Ljudje smo pesticidom izpostavljeni preko kmetijske dejavnosti, komercialne in domače dezinfekcije, uporabe pesticidov na vrtovih, preko odpadkov proizvodnje, napačne uporabe pesticidov in različnih ekoloških nesreč. Ostanke pesticidov najdemo tako v vodi kot tudi v hrani, poleg tega je veliko pesticidov hlapljivih in smo jim zato izpostavljeni tudi z dihanjem. Praktično so navzoči povsod okoli nas. Analiza vode v ZDA je pokazala, da so pesticidi prisotni tako rekoč v vsakem viru vode, ki so ga testirali (Zeliger, 2008). Prav tako je ameriško ministrstvo za kmetijstvo leta 2004 ugotovilo, da se pesticidi nahajajo v več kot 70 % hrane. Zelo zaskrbljujoče je tudi dejstvo, da je ameriški Center za nadzor bolezni in zaščito poročal o najdbi ostankov pesticidov v več kot polovici vseh testiranih odraslih ljudi in otrok. Trenutno je registriranih na stotine različnih pesticidov in ostanki približno 300 se po njihovi uporabi še vedno nahajajo v pridelkih. Z akutno zastrupitvijo s pesticidi smo dobro seznanjeni in se ji lahko relativno učinkovito izognemo, večji problem predstavljajo dolgoročni učinki manjših odmerkov. Ti zaradi njihove uporabe in posledično vsesplošne prisotnosti v okolju negativno vplivajo na razvoj in predstavljajo nevarnost za bolj ali manj vse živeče organizme. Velik del pozornosti se v tem pogledu namenja prav organofosfatnim pesticidom (Winter, 2003).

2.1.1 Organofosfati

Organofosfati (OP) so derivati fosforne, fosfonatne in fosfinatne kisline. V splošnem se izraz organofosfat uporablja za vse organske spojine, ki vsebujejo fosfor, kar je tudi skupna lastnost vseh podrazredov OP. Skupna jim je tudi značilna fosfatna vez ($P=O$) ali tiofosfatna vez ($P=S$). V osnovi so estri fosforne kisline s pripetimi različnimi kombinacijami kisika, ogljika in dušika. Njihova strupenost je odraz zaviralnega delovanja na encim AChE, s čimer motijo normalno delovanje holinergičnega sistema (Gupta, 2006b).

Prva navedba sinteze OP se nahaja v poročilu Phillipa de Clemonta za Francosko akademijo znanosti leta 1854. 80 let kasneje sta Lange in Kruger opisala sintezo dimetil in dietilfosforofluoridata in opazila, da vdihovanje hlapov omenjenih učinkovin povzroča motnost vida in občutek dušenja. Ta opažanja so kemika Gerharda Schraderja verjetno spodbudila k nadaljnjemu raziskovanju OP kot potencialnih insekticidov, z razvojem katerih se je v podjetju I. G. Farbenindustrie tudi ukvarjal. Eden izmed prvih sintetiziranih OP pod njegovim okriljem je bil paration, ki se še danes veliko uporablja. Schraderjeva je ideja bila tudi uporaba OP v vojaške namene, v času II. svetovne vojne pa je po naročilu Nemškega ministrstva za obrambo dejansko začel razvijati bojne pline na osnovi OP. OP kot orožje žal niso stvar preteklosti in še vedno predstavljajo veliko nevarnost, saj jih nekatere države še zmeraj hranijo kot bojne pline za vojne razmere. Z razvojem OP bojnih plinov so začeli nastajati tudi za ljudi neškodljivi derivati OP, uporabni kot insekticidi. V petdesetih letih so tako sintetizirali malation, ki je za nadaljnjih 50 let veljal za enega najbolj uporabljenih in varnih insekticidov pri zatiranju določenih žuželk, kot so komarji in mušice, dokler ni leta 1967 v Pakistanu prišlo do masovne zastrupitve nanašalcev insekticida in sicer posredno zaradi izomalationa, v katerega se je med shranjevanjem pretvoril malation (Gupta, 2006a).

OP so poleg karbamatov najbolj uporabljeni insekticidi. Poleg tega, da se v okolju ne kopičijo v veliki meri, razlog za obsežno uporabo najverjetneje tiči v tem, da žuželke na njih niso razvile odpornosti. Prav tako OP, ki imajo na fosfor vezano žveplo, v *in vitro* razmerah ne zavirajo AChE in delujejo toksično šele, ko v tarčnih organizmih pod vplivom mikrosomalnih encimov žveplo na fosforju zamenja kisik. Takšna reakcija je v organizmih insektov bistveno hitrejša kot pri sesalcih in omogoča insekticidno delovanje ob sorazmerni varnosti za sesalce (Grubič, 2008). Iz zdravstvenega in gospodarskega vidika je uporaba OP danes nuja, saj bi v nasprotnem primeru različni prenašalci povzročiteljev človeških in živalskih bolezni (npr. komarji in malarija) resno ogrožali zdravje in povzročali tudi ogromno ekonomsko škodo. Hkrati se je potrebno zavedati, da je veliko OP izjemno strupenih tudi za ostale živali in zaradi množične uporabe zanje predstavljajo resno nevarnost. Preko *in vivo* in *in vitro* raziskav smo prišli do spoznanj, da lahko OP delujejo toksično na možgane oziroma celotno živčevje in prav tako ostale predele, poleg

tega se lahko obnašajo kot hormonski motilci in skupaj z ostalimi mehanizmi motijo razvoj in razmnoževanje (Gupta, 2006b).

2.1.2 Zastrupitev z organofosfati

Primarni učinek OP je nepovratna blokada delovanja encima AChE. Naloga AChE je presnavljanje acetilholina, ki je pomemben živčni prenašalec v žičnih in živčno - mišičnih sinapsah. Zaviranje aktivnosti encima povzroča kopičenje acetilholina (ACh) v sinaptični špranji v možganih in hrbtenjači, živčno-mišičnih spojih, ganglijih avtonomnega živčnega sistema ter parasimpatičnih živčnih končičih. To povzroča neprekinjeno aktivacijo receptorjev, kar privede do različnih oblik posledic glede na vrsto receptorja oziroma glede na del živčnega sistema (Woods, 1999).

OP tako kot zaviralci AChE vplivajo na celoten holinergični sistem kot funkcionalni del živčnega sistema. Njegova središča z inervacijami so razporejena po večjem delu centralnega živčnega sistema (CŽS). Močno je zastopan v možganski skorji, hipokampusu in talamusu, okcipitalnem režnju, amigdali, bazalnih ganglijih in sredinskem telesu ter s tem uravnava funkcije, ki so povezane s temi deli. Mednje sodijo najrazličnejša področja delovanja živčnega sistema, od osnovnega uravnavanja delovanja mišic, predvsem tistih s spontanim delovanjem, do kognitivnih procesov, sposobnosti pomnjenja oziroma upravljanja spomina, čustvovanja, motivacije in ostalih (Pope, 2006).

2.1.2.1 Zastrupitev z visokimi odmerki

Zastrupitev z visokimi odmerki OP se odraža na več načinov.

Običajna zastrupitev z visokimi odmerki OP povzroča *akutni sindrom*. Temelji na vezavi OP z AChE, kar povzroči nastanek njenih neaktivnih organofosforiliranih oblik. Simptome akutne zastrupitve povzroča izpostavljenost visokim odmerkom vseh OP, ki so trenutno v uporabi. Njihova moč delovanja je odvisna od reaktivnosti, poti delovanja, obsega izpostavljenosti, relativnega obsega bioaktivacije in deaktivacije ter od drugih dejavnikov, ki se med drugim tičejo tudi sposobnosti kopičenja OP v maščobah (Woods, 1999).

Učinki, ki so posledica akutnega sindroma, so vrtoglavica, napadi tesnobe, nemirnost, glavobol, zmedenost, težave s koncentracijo in dihanjem. Med simptome, ki so povezani z delovanjem na muskarinske receptorje pri gladkih mišicah in žlezah, spadajo prekomerno izločanje telesnih tekočin (solzenje, potenje, bronhosekrecija, slinjenje ipd.), zoženje zenic in nezmožnost ostrenja vida, nenadzorovano uhajanje urina in blata ter bradikardija in hipotenzija. Na ravni nikotinskih receptorjev N1 oziroma avtonomnega živčnega sistema se ob delovanju visokih odmerkov OP pojavijo povišan, bledica srčni utrip in povišan krvni pritisk. Vpliv na živčno - mišične povezave (nikotinski receptorji N2) se odraža kot trzanje mišic, njihova oslABLjenost in v končni fazi tudi paraliza ter smrt. Če pride do zastrupitve, je potrebno čim hitreje posredovati z dovajanjem antagonistov in reaktivatorjev encimske aktivnosti, kot so atropin in oksimi. Večkratna izpostavitve OP lahko privede do določene stopnje tolerance in posledično se zgoraj navedeni simptomi kljub neprestanemu zaviranju AChE ne pojavijo (Woods, 1999).

Intermediatni sindrom spremljajo mišična slabost v okončinah, vratu in dihalnem traktu. Pojavi se 1 do 4 dni po zastrupitvi, traja 5 do 18 dni in lahko povzroči mišične nekroze. Pri takšni zastrupitvi posredovanje z atropinom in oksimi nima učinka (Woods, 1999). Izkazalo se je sicer, da se lahko z uporabo reaktivatorjev AChE in antagonistov acetilholinskih receptorjev ustavi oziroma prepreči nastajanje mišičnih nekroz (Dettbarn, 1984), prav tako pa tudi, da se učinke intermediatnega sindroma lahko ublaži z dovolj zgodnjim posredovanjem (Nutley in Cocker, 1993).

Tretja skupina učinkov je posledica t.i. *organofosfatna zakasnele polinevropatije* (Organophosphate-induced delayed polyneuropathy ali OPIDPN) ali senzorično – motorične neuropatije, ki večinoma povzroča nekoordinirane gibe ali ataksijo spodnjih okončin. Simptomi se razvijejo od 1 do 4 tednov po zastrupitvi. Nastane zaradi degeneracije koncev daljših aksonov nekaterih distalnih in hrbtenjačnih živcev, čemur sledi propad mielina, proliferacija Schwannovih celic in kopičenje makrofagov. OPIDPN se ne odziva na zdravila, ki temeljijo na antiholinergičnem delovanju ali na oksime. Zdravljenje je dolgotrajno in pogosto zaradi trajnih poškodb delov CŽS tudi nepopolno. Nastanek OPIDPN je povezan s fosforilacijo in staranjem posebne vrste esteraze, ki je pri

tem mehanizmu ključna tarča (neuropathy target esterase ali NTE, predhodno imenovana nevrotoksična esteraza). Prisotnost negativnega naboja na fosforilirani strani NTE predstavlja enega od poglavitnih razlogov, da prihaja do staranja in s tem do razvoja OPIDPN (Johnson, 1990). Vsi OP naj ne bi povzročali OPIDPN, kar je tudi eden od ključnih dejavnikov, ki se preverjajo, preden se OP odobri uporaba. OP testirajo predvsem na kokoših, ker so bolj občutljive kot druge testne živali in so njihovi klinični znaki razvoja OPIDPN podobni tistim pri ljudeh (Barrett in Oehme, 1985).

2.1.2.2 Strupenost dolgotrajne izpostavljenosti nizkih odmerkov

Prav tako prisotni in zelo zaskrbljujoči so tudi dolgoročni učinki kronične izpostavljenosti nizkim odmerkom OP. Dolgotrajna izpostavljenost vodi v vrsto dolgoročnih zdravstvenih težav, kot so možnost pojava raka in nevrodegenerativnih bolezni, motenj pri razmnoževanju in razvoja organizma ter dihalnih nepravilnosti. Različne raziskave so pokazale, da lahko izpostavljenost OP v času kritičnih obdobj razvoja organizma povzroča trajne škodljive učinke ne samo v času razvoja, ampak tudi v kasnejših obdobjih življenja, še posebej na nivoju delovanja možganov in motenj hormonskega sistema (Hernández in sod., 2012).

Mehanizmi, ki povzročajo te učinke, niso nujno povezani z zaviranjem AChE kot pri akutni zastrupitvi. Različne raziskave neprestani izpostavljenosti nizkim odmerkom OP na testnih živalih nakazujejo, da so v mehanizme poleg encima AChE vključeni tudi druge pomembne možganske beljakovine (Ray in Richards, 2001). Takšni učinki se pri ljudeh kažejo od sprememb na nivoju obnašanja do sprememb na nivoju krvno-možganske pregrade in vse do nepravilnega delovanja skeletnih mišic. Na nivoju obnašanja pri rizičnih skupinah obravnavanih posameznikov, ki se pri svojem delu neposredno rokujejo z OP, so se pojavili različni znaki duševnih motenj, razdražljivosti, težav s spominom in koncentracijo ter zmanjšanja pozornosti. Natančni mehanizmi takšne zastrupitve še niso povsem razjasnjeni, se pa v veliko primerih pojavijo podobne nevropsihološke spremembe (Blain, 2001).

Zaradi intenzivne uporabe OP in kontaminacije okolja z njimi se ne pojavlja zgolj problem izpostavljenosti nizkim odmerkom določenega OP, temveč tudi izpostavljenost večim OP hkrati in možnost njihovega vzajemnega delovanja ter s tem potenciranje strupenih učinkov. V večini primerov se učinki le seštevajo (*aditivno* delovanje), manj pogoste, a toliko bolj škodljive so interakcije med prisotnimi OP, pri katerih so učinki bolj intenzivni od aditivnega delovanja. Mednje uvrščamo *potenciranje* ali *sinergizem*. Poleg tega lahko pride med njimi tudi do zaviralnega delovanja, kot so *infra-aditivni*, *inhibitorni* ali *antagonistični* učinki. Do podobnih interakcij lahko pride tudi med OP in drugimi vrstami pesticidov (Hernández in sod., 2012).

Moser in sod. (2006) so na podganjih mladičih ugotavljali učinke mešanice petih različnih OP (klorpirifos, acefat, diazinon, malation in dimetoat). Merili so zaviranje AChE in spremembe v vedenju, predvsem v hoji, motorični aktivnosti in odzivu na ščip v rep. Dobljene rezultate so kasneje primerjali z modeliranjem aditivnega delovanja, ki je temeljil na podatkih o učinkih posameznega OP, oziroma seštevku učinkov nizkih koncentracij vseh prisotnih OP v mešanici. Rezultati so pokazali, da so bili učinki mešanice veliko bolj intenzivni od modelirane aditivnosti, kar nakazuje na prisotnosti sinergističnega delovanja OP (Moser in sod., 2006). Prav tako sta Gomes in Lloyd (2009) v svoji raziskavi mišim peroralno dodajala različne mešanice OP v zelo nizkih koncentracijah, kakšnim so izpostavljeni prebivalci na področjih z intenzivnim kmetijstvom in same po sebi niso škodljive. Pri izpostavljenosti miših se je v primerjavo s kontrolno skupino pogosteje pojavila smrt plodov, matere so slabše pridobivale na telesni masi in prav tako so bili lažji tudi mladiči (Gomes in Lloyd, 2009).

2.1.2.3 Mehanizmi delovanja organofosfatov na razvoj

Veliko število OP ima nevrotoksičen učinek na razvoj organizmov. Mednje sodijo klorpirifos, diazinon, paration, metil paration in mnogi drugi. Kot že rečeno, te snovi nepovratno zavirajo aktivnost AChE in s tem povzročajo oksidativni stres, posledica česar so poškodbe vitalnih organov, še posebej možganov, ki so na učinke OP in oksidativen stres še posebej občutljivi. Možgani za svoje delovanje potrebujejo veliko kisika, lipidi v

membranah možganskih celic so bogati z oksidiranimi nenasičenimi maščobnimi kislinami, hkrati pa možgani vsebujejo malo antioksidantov in so zato zelo podvrženi učinkom peroksidacije lipidov. V času razvoja in rasti se metabolne potrebe možganov največje. Vsa našeta dejstva o možganih prispevajo k temu, da zaradi učinkov onesnažil iz okolja v času razvoja možganov pride v njih do oksidativnega stresa (Gupta in sod., 2011). O tem poroča tudi študija o učinkih klorpirifosa na celične kulture celic PC12, pri katerih se je izkazalo, da klorpirifos bolj vpliva na gene, povezane z oksidativnim stresom pri diferenciranih celicah kot pri nediferenciranih celicah. Pokazalo se je tudi, da se mehanizmi delovanja OP razlikujejo, vendar vsi privedejo do podobnih znakov oksidativnega stresa. Poleg tega bi naj klorpirifos motil tudi številne druge mehanizme holinergičnega in tudi neholinergičnega sistema, ki v končni fazi privedejo do razvojnih nepravilnosti in teratogeneze (Slotkin in Seidler, 2009).

Pred škodljivimi snovmi, ki se nahajajo v krvi, CZS varuje krvno-možganska pregrada. Njena propustnost se poveča ob poškodbah in določenih boleznih, prav tako lahko nastopi smrt v primeru otekanja in krvavitev. Pri mladih podganah je injiciranje OP paraoksona podganam v nizkih odmerkih, ki ne povzročijo standardnih znakov akutne zastrupitve, povečalo prepustnost krvno-možganske pregrade. Povečano prepustnost kapilar je paraokson povzročil le pri mladih podganah. Apliciranje piridostigmina, perifernega zaviralca aktivnosti AChE, pred paraoksonom je preprečilo škodljivo delovanje paraoksona na krvno-možgansko pregrado (Song in sod., 2004).

Inhibicija AChE kot primarni, a ne edini učinek OP, je povezana tudi z dejstvom, da OP in njihovi metaboliti lahko prehajajo placento in tako zavirajo AChE pri materi in zarodku in tudi AChE v placenti, vplivajo na holinergične in neholinergične dele razvoja živčnega sistema, oziroma tako vplivajo direktno na celoten razvoj, kar se lahko nadaljuje tudi po rojstvu preko okoljskih dejavnikov in hrane. V času razvoja torej glede na opravljene študije povzročajo OP trajne spremembe različnih živčnih prenašalcev in receptorjev (Gupta, 2009).

ACh je živčni prenašalec, ki skrbi za prenos živčnega signala in s tem regulira tudi podvojevanje, diferenciacijo in migracijo njegovih tarčnih celic. Če pride do zaviranja

aktivnosti AChE, sta kopičenje ACh in povečana vzdraženost holinergičnih celic glavna vzroka za nevrotoksičnost OP (Slotkin, 2006). Gupta in sod. so v svoji raziskavi leta 1985 brejim podganam dodajali OP metil paration v količinah 1 mg/kg ali 1,5 mg/kg dnevno in opazovali ključne holinergične dele možganov samic in zarodkov. Pri nižjem odmerku je prišlo do manjših in začasnih znižanj aktivnosti AChE. Pri materah se je povečala aktivnost holinacetil transferaze (ChAT) v možganih in zmanjšala aktivnost muskarinskih ACh receptorjev (mAChRs). Vidnih znakov zastrupitve tako pri materah kot pri zarodkih niso opazili. Pri višjem odmerku je prišlo do vidnega zmanjšanja delovanja AChE in povečanja delovanja ChAT v možganih samic in zarodkov v različnih stopnjah razvoja. Podobne rezultate so dobili tudi pri nebrehjih podganah, kar pomeni, da takšno stanje ni povezano z brejostjo. Vezavna mesta mAChRs so bila zmanjšana le v možganih mater, pri nekaterih samicah se je opazila tudi holinergična hiperaktivnost. Pri višjem odmerku se je pojavil tudi upad teže pri samicah, pri zarodkih se je povišala resorpcija. V njihovih možganih ni prišlo do sprememb v morfologiji (Gupta in sod., 1985).

Že zelo zgodnje študije so pokazale, da se mehanizmi, ki so vpleteni v delovanje OP na razvoj zarodkov in teratogenezo, razlikujejo od tistih, ki so vključeni v akutno zastrupitev z OP. Ti so alkilacija koencima NAD⁺, spremenjene količine RNK, glikogena, sulfatnih mukopolisaharidov in kalcija pri razvoju kosti (Gupta in sod., 2011). Ena izmed študij na osnovi OP metil parationa to potrjuje, saj se je pri izpostavljanju podgan OP pokazalo, da moti normalno sintezo različnih beljakovin pri materi, plodu in v placenti (Gupta in sod., 1984).

OP z zaviranjem aktivnosti AChE vplivajo neposredno na živčni sistem, še posebej motijo nastajanje sinaps in rast aksonskih podaljškov. Raziskave z OP klorpirifosom so pokazale, da je ta negativno vplival na proliferacijo in diferenciacijo glia celic in tako posredno povzročal nepravilen razvoj možganov (Slotkin, 2006). Druga raziskava s klorpirifosom na možganih podgan je pokazala, da ta med drugim ovira normalno tvorbo DNK in sporočilno pot adenilil ciklaze, blokira pravilno vezavo transkripcijskih faktorjev na DNK in povzroča nastanek prostih kisikovih radikalov (Garcia in sod., 2005).

V prejšnjem poglavju je bilo navedeno, da različni predstavniki OP zavirajo normalni potek učenja, spomina in ostalih kognitivnih sposobnosti ter povzročajo različna nevropsihiatrična stanja. OP torej povzročijo spremembo delovanja holinergičnega dela živčnega sistema, ki ima pri kognitivnih sposobnostih eno izmed pglavitnih vlog. Izpostavitev podgan OP metil parationu pred rojstvom je povzročila zaviranje tvorbe beljakovin, ki sodelujejo pri takšnih nevroloških procesih (Gupta in sod., 1984). Tudi raziskava z OP dimetoatom potrjuje, da ta opazno znižuje količino testosterona pri podganah, posledica česar je lahko nepravilen potek kognitivnih procesov (Varma in Mohanty, 2009). Preučevanje vpliva nizkih odmerkov OP klormefosa na razvoj miši, ki so mu bile izpostavljene v času brejosti in do odstavitve od mater, je pokazalo, da so se pri izvajanju testa dvignjenega labirinta pokazali znaki anksioznosti podobnega obnašanja (Čeh in sod., 2012).

Na podlagi teh izsledkov vplivov nizkih doz OP na živali smo lahko še toliko bolj zaskrbljeni. Kar nekaj študij je pokazalo, da so zelo kritična področja, ki so kontaminirana z OP zaradi njihove intenzivne uporabe v kmetijske namene v preteklosti in tudi sedanjosti. Takšna področja predstavljajo veliko tveganje za v bližini živeče ljudi, predvsem so ranljivi otroci, ki se še razvijajo (Eskenazi in sod., 1999). Raziskovalci so se ukvarjali z vsebnostjo metabolitov različnih OP v urinu mater ter prisotnostjo OP klorpirifosa in diazinona v materini plazmi ter plazmi popkovnične krvi. Ista skupina znanstvenikov je preučevala genotipe serumske paraoksonaze *PON1* in *PON1* substratno specifično aktivnost, ki odigra pomembno vlogo pri razstrupljanju OP. Ugotavljali so, kako *PON1* vpliva na vsebnost OP v krvi in urinu oziroma kakšna je učinkovitost delovanja encima. Prisotnost OP je bila pri izpostavljenih materah in novorojencih nekoliko višja v primerjavi z ostalimi kontrolnimi skupinami, vendar ta razlika ni bila statistično značilna. Nasprotno je bilo pri novorojencih prisotnega dosti manj *PON1* encima, kar nakazuje na še en mehanizem, ki je vključen v razvojno strupenost OP. Na osnovi teh rezultatov lahko ponovno sklepamo, da so organizmi v času razvoja toliko bolj ranljivi in dovzetni za škodljivo delovanje OP (Huen in sod., 2012).

2.1.2.4 Organofosfati kot hormonski motilci

Hormonski motilci so sintetične snovi, ki rušijo homeostazo in vplivajo na normalno reprodukcijo, razvoj in obnašanje organizmov, kar je posledica delovanja na tvorbo, izločanje, transport, vezavo, oponašanje in s tem izpodbijanje naravnih hormonov. Zgodnje študije o hormonskih motilcih so se osredotočale predvsem na ksenoestrogene, med katere uvrščamo kemične snovi, ki so sposobne motenja normalnega delovanja estrogenskih receptorjev (ER). Poleg ksenoestrogenov so se ukvarjali tudi s snovmi z antiandrogenero aktivnostjo, ki so zmožne vplivati na normalno delovanje androgenih receptorjev (AR). Raziskave so pokazale, da tudi OP lahko motijo endokrini sistem in tudi razvoj možganov z enim ali več mehanizmov hkrati (Gupta in sod., 2011).

Kitamura in sod. (2006) v podrobnem pregledu OP kot hormonskih motilcev navajajo različne študije izvedene na laboratorijskih živalih. Opazili so, da so OP motijo reproduktivne funkcije pri obeh spolih in normalno spolno diferenciacijo, delovanje jajčnikov, proizvodnjo semenčic, brejost in tako dalje. Ker pri odraslih organizmih hormoni uravnavajo različne fiziološke procese, lahko vplivajo na delovanje celotnega organizma. Raziskave so pokazale tudi, da so učinkom hormonskih motilcev bolj podvrženi razvijajoči se organizmi, ker vplivajo na izražanje genov, ki so zadolženi tako za razvoj organov kot tudi normalne poti delovanja hormonov, ki potekajo skozi vse življenje. Takšna mehanizma sta, recimo, število določenih receptorjev ali splošna proizvodnja hormonov (Kitamura in sod., 2006).

Primer OP kot hormonskega motilca je široko uporabljen fenitrotion. Ugotavljali so njegovo interakcijo s humanim AR. Fenitrotion je blokiral aktivnost od dihidrotestosterona odvisnega AR v HepG2 humanih hepatom jetrnih celicah, ki so bile transfencirane s humanim AR in genom za AR-odvisno luciferazo. Antiandrogenero učinkovanje fenitrotiona so določali tudi pri 7 tednov starih podganah, ki so dobivale OP enkrat dnevno, 7 dni zaporedoma s testosteron propionatom in koruznim oljem ali fenitrotionom, druga skupina pa je prejela testosteron propionat in flutamid, ki je znan po svojem antiandrogenernem delovanju. Fenitrotion je podobno kot flutamid zniževal težo različnih

organov in tkiv, kot so trebušna prostata, mehurica in okoliške mišice. Aktivnost AChE je bila znižana samo ob dodatku večjih količin OP. Rezultati torej kažejo, da je fenitrothion kompetitiven AR antagonist in da je po učinkovitosti podoben farmacevtskemu antiandrogenu flutamidu ter celo močnejši po delovanju kot znana antiandrogena linuron in p,p'-DDE (Tamura in sod., 2001).

Eden od možnih mehanizmov delovanja OP je vpliv na hipotalamusno-hipofizno-gonadno os, ki uravnava tvorbo testosterona v leydigovih celicah. Ko raven tega v krvi pade, je to znak, da se v hipotalamusu sprosti gonadotropine sproščajoči hormon (GnRH) in ta potem spodbudi hipofizo, da sprosti luteinizirajoči hormon (LH) in folikle spodbujajoči hormon (FSH), ki pa sporočata leydigovim celicam v modih, naj tvorijo testosteron. Ko raven testosterona v krvi naraste, se z negativno povratno zanko zavre izločanje gonadotropin sproščajočega hormona iz hipotalamusa ter FSH in LH iz hipofize (Sferdlhoff in sod., 1992). Motenje hipotalamosne-hipofizne-gonadne osi pri novorojenih živalih se kaže kasneje kot trajna hormonska nefunkcionalnost odraslih živali in spremembe v obnašanju. Verma in Mohanty (2009) sta ugotavljala vpliv OP dimetioata na prej omenjeni del hormonskega sistema pri novorojenih miših. Pokazalo se je, da dimetioat zmanjšuje število in velikost celic, ki proizvajajo LH in tako znižuje nivo krvnega LH. To posledično vpliva tudi na znižan nivo testosterona, kar je tudi rezultat posrednega toksičnega delovanja dimetioata na leydigove celice in zaviranje steroidogeneze. Pokazalo se je tudi, da izpostavljenost mladičev OP povzroča večjo in bolj trajno škodo kot izpostavljenost odraslih živali ter tako omejujejo normalen potek razvoja (Verma in Mohanty, 2009).

2.1.2.5 Vpliv organofosfatov na delovanje možganov in obnašanje

Zaviralci AChE omejujejo prenos ACh in tako vplivajo na delovanje živčnega sistema sesalcev in posredno tudi na njihovo obnašanje, kar je lahko v nekaterih primerih tudi koristno, vendar zaradi množične uporabe OP prej zaskrbljujoče. OP kot povzročitelji sprememb obnašanja so že nekaj časa tema raziskav. Za začetnika tovrstnih raziskav štejemo Gershona in Shawa leta 1961, ki sta prva opisovala anksioгене učinke OP na ljudi. Med tistimi, ki se ukvarjajo s tovrstnimi raziskavami prevladujeta dve struji. Prva trdi, da

izpostavljenost OP pri vseh živalskih vrstah povzroča dolgotrajne in celo nepovratne škodljive posledice. Druga struja raziskovalcev trdi, da OP naj ne bi imeli tolikšnega vpliva na ljudi, da so rezultati, pridobljeni z raziskavami na živalih, težko prenosljivi in kljub temu, da je na voljo veliko informacij o delovanju OP, je med njimi malo takšnih, ki zadevajo spremembe obnašanja. Kljub različnim zaključkom sta si obe struji enotni, da so nujne glede dodatne poglobljene študije o vplivu OP na vedenje (Bushnell in Moser, 2006).

Levin in sod. (1976) so se že zelo zgodaj lotili raziskovanja tega vprašanja. Preučevali so skupino ljudi, ki je bila sicer preko dela v neposrednem stiku z OP, a ni kazala značilnih kratkoročnih znakov. Njihove metode dela je temeljila na različnih testih osebnosti, intervjujih in merjenju ravni aktivne AChE. Rezultati so pokazali, da se je pri testiranih posameznikih, ki so se pri delu rokovali z OP v obliki škropiv, pojavila povišana stopnja anksioznosti in znižana raven aktivne AChE v krvi v primerjavi s kontrolno skupino. Noben delavec sicer ni kazal ostalih simptomov akutne zastrupitve, vendar je pojav anksioznosti pri izpostavljeni skupini potrjeval delovanje nizkih odmerkov OP (Levin in sod., 1976).

Bazylewicz-Walczak in sod. so se leta 1999 lotili raziskovanja žensk, zaposlenih v vrtnarstvu. Od tega jih je več kot polovica delala v rastlinjakih in bila v stiku z več vrstami OP. Kot kontrolno skupino so obravnavali skupino žensk, ki ni bila izpostavljena nobenim zaviralcem AChE ali drugim snovem, ki delujejo strupeno na živčni sistem. Vplive izpostavljenosti OP so preučevali celotno časovno obdobje intenzivne uporabe pesticidov v rastlinjakih (od marca do junija). Meritve izpostavljenosti so vključevale tudi onesnaženost zraka z OP, količino OP, ki so se zadržali na površini kože in obleke delavk ter delovni čas. Izkazalo se je, da so bile delavke izpostavljene nizkim, načeloma nenevarnim odmerkom OP. Poleg navedenih parametrov so Bazylewicz-Walczak in sod. S standardnimi testi preverjali tudi nevropsihološko stanje žensk pred in po intenzivnem nanašanju OP. Rezultati so pokazali, da sta se pri delavkah, izpostavljenih OP, v primerjavi s kontrolno skupino pojavila občutno daljši reakcijski čas in zmanjšana sposobnost motorike. Prav tako so delavke kazale znake napetosti, depresije in utrujenosti ter ostalih

motenj CZS, kar potrjuje predvidevanje, da je lahko kronična izpostavljenost nizkim odmerkom OP povezana z duševnimi motnjami (Bazylewicz-Walczak in sod., 1999).

Jamal in sod. (2002) so v pregledu različnih raziskav iskali povezavo med dolgotrajno izpostavljenostjo nizkim odmerkom OP in nastankom nevroloških in vedenjskih znakov strupenosti ter te motnje tudi na novo poimenovali nevropsihiatrična motnja, nastala zaradi kronične izpostavitve OP (chronic organophosphate induced neuropsychiatric disorder – COPIND). Raziskave so razdelili v tri skupine. Prva skupina je zajemala pet študij, opravljenih na laboratorijskih živalih, pri vseh pa so dobili rezultate, ki so kazali na povezavo med OP in nevrotoksičnostjo. V drugo skupino so uvrstili sedem študij, ki niso zajemale kontrolnih skupin in so se v glavnem nanašale na veliko število bolnikov z možnimi posledicami izpostavljenosti OP. Tudi tukaj so dobili podobne rezultate. Tretjo skupino je sestavljalo devetnajst raziskav, v katere so bili poleg testnih skupin vključene tudi kontrolne skupine. Tudi v tej skupini se je v petnajstih študijah pokazala povezava med izpostavljenostjo OP z nastankom COPIND. Pri teh študijah se je pokazalo tudi, da se pojav simptomov, ki so posledica nevrotoksičnega delovanja, pri ljudeh izpostavljenih OP, poviša tudi do 40 krat. Pomembno je tudi poudariti, da so se pri vseh obravnavanih študijah pojavljali podobni nevrološki znaki in da so se ti razlikovali od predhodno opisanih učinkov akutne zastrupitve z visokimi odmerki.

Pri eni izmed novejših študij so se raziskovanja vpliva večkratnim izpostavitvam nizkim odmerkom OP in ugotavljanja vpliva na kognitivne in psihološko-motorne sposobnosti lotili še bolj sistematično. Z metodo meta-analize so iskali odstopanja od normalnega stanja in delovanja živčnega sistema pri skupinah kmetijskih delavcev in nanašalcev OP. Z vključitvijo 17 različnih raziskav so zajeli 21 neodvisnih raziskovalnih skupin. Študije so zajemale 16 nevrofizioloških testov, povezanih z določenim področjem živčnega sistema in njegovega delovanja. Izkazalo se je, da je prišlo pri izpostavljenih posameznikih do značilnega upadanja sposobnosti, kot so pozornost, spomin, vizualno – motorna integracija, govor in zaznavanje (Ismail, 2012).

Kljub potrjenim tezam o delovanju OP na dolgi rok se je skrb o možnih negativnih učinkih kronične izpostavljenosti nizkim odmerkom pri ljudeh pojavila relativno pozno. Študije na

živalih v tem pogledu potekajo že dalj časa in rezultati se lahko v kombinaciji s primerjavo s predhodnim znanjem o akutnih učinkih prenesejo tudi na človeka. Pri testnih živalih med drugim potekajo tudi raziskave, ki se ukvarjajo z vprašanjem, kako kronična izpostavljenost vpliva na toleranco AChE, kar je privedlo do nadaljnjih ugotovitev, da so se ponekod nepravilnosti vedenja pokazale tudi ob normalnih ravneh aktivnosti encima (Burshnell in Moser, 2006).

Venerosi in različne skupine sodelavcev so se v več serijah študij ukvarjali z delovanjem nizkih odmerkov OP klorpirifosa na miših in pokazali, da izpostavljenost OP v času razvoja povzroča nastanek obnašanj, značilnih za določene duševne motnje. Leta 2010 so objavili rezultate raziskave, v kateri so opazovali vpliv izpostavljenosti omenjenemu OP v času brejosti na odrasle miši. Odmerki so bile primerljivi s tistimi, ki naj bi se ujemali z rezultati meritev prisotnosti klorpirifosa v okolju, ki so bile tako nizke, da naj ne bi vplivale na aktivnost možganskih AChE in zelo šibko delovale na serumske AChE. Opravljali so različne teste obnašanja, kot sta svetlo-temno raziskovalni test za ugotavljanje stanja, podobnega anksioznosti in test prisilnega plavanja za ugotavljanje stanja, podobnega depresiji, pri samicah so testirali tudi agresivno materinsko obnašanja. Rezultati so pokazali, da je pri samicah, izpostavljenim OP, prišlo do obnašanja, podobnega anksioznosti. Nobena od testiranih živali ni kazala znakov depresije. Pri ugotavljanju agresivnega obnašanja v času materinstva so se izpostavljene samice do svojih mladičev obnašale manj naklonjeno in tudi bolj agresivno. Sodeč po rezultatih, se torej da torej sklepati, da klorpirifos vpliva na razvoj miši, kar se kaže v razvoju nekaterih vedenjskih nepravilnosti pri odraslih živalih in da se učinki klorpirifosa razlikujejo glede na spol (Venerosi in sod., 2010).

Pred to študijo so Venerosi in sod. (2006) prav tako ugotavljali vpliv klorpirifosa na socialni spomin mišjih samic, ki so mu bile izpostavljene prenatalno in postnatalno. Med testom socialnega prepoznavanja so preverjali ultrazvočno oglašanje (UVSs) in socialno raziskovalno vedenje, ki ga sproži prisotnost druge samice. Samice, ki so bile izpostavljene klorpirifosu prenatalno, so se bolj pogosto oglašale in tudi število ovohavanj je bilo višje. Izkazalo se je, da izpostavljenost klorpirifosu med razvojem povzroča spremembe tudi v socialnem obnašanju (Venerosi in sod., 2006).

Za tem so Venerosi in sod. (2009) preverjali tudi vpliv prenatalne izpostavitve klorpirifosa na motorične sposobnosti mišjih mladičev in na klice njihovih mater po izolaciji iz gnezda. Klorpirifosu so bili izpostavljeni v času pozne brejosti. Motorične sposobnosti so preverjali s testom spontane aktivnosti, oglašanje pa so merili s pomočjo naprave za beleženje ultrazvočnih vokalizacij. Tudi tokrat se je izkazalo, da takšna izpostavljenost nizkim odmerkom klorpirifosa v času razvoja v obdobju pozne brejosti vpliva na obnašanje mišjih mladičev, saj se je v določenem času po rojstvu pojavilo zmanjšanje števila klicev matere po izolaciji, prav tako je bil čas do prvega klica daljši v primerjavi s kontrolno skupino mladičev. V primerjavi z njimi so bili izpostavljeni mladiči tudi manj aktivni (Venerosi in sod., 2009).

Nizki odmerki klorpirifosa so se tudi v drugih raziskavah izkazali kot zelo nevarni, klorpirifos pa še zdaleč ni osamljen primer v skupini OP. Kofman in Ben-Bashat (2006) sta ugotavljala vpliv nizkih odmerkov OP disopropilfluorofosfata (DFP). Miši so po rojstvu v različnih časovnih obdobjih dobivale nizke odmerke DFP, kasneje pa so jih pri starosti od 4 do 5 mesecev testirali z različnimi testi obnašanja, med drugim tudi s testom dvignjenega labirinta, s katerim so preverjali anksioznosti podobno obnašanje. Pri skupini, ki je bila DFP izpostavljena najpozneje v razvoju, se spremembe niso pokazale, medtem ko se je pri miših ostalih skupin pri drugi izvedbi EPM testa pokazala večja prisotnost obnašanja, podobnega anksioznosti, še posebej pri samicah. Takšno vedenje miši, ki so bile DFP izpostavljene v dovolj zgodnjem obdobju, potrjuje, da DFP tako kot ostali OP vpliva na razvoj organizma. Rezultati te študije so še eden v vrsti mnogih dokazov za strupenost OP, ki so prisotni v našem okolju v nizkih količinah (Kofman in Ben – Bashat, 2006).

2.2 KUMAFOS

2.2.1 Osnovne značilnosti kumafosa

Kumafos je OP insekticid. Po podatkih FAO in WHO iz leta 1969 je v osnovi blede rjav prah, ki ima šibak neprijeten vonj. Njegovo poimenovanje po IUPAC je O-(3-kloro-4-metil

-7-kumarinil)-O,O dietil fosforotionat. Temperatura tališča je med 90 in 92 ° C. Topen je v aromatskih topilih, manj topen v alkoholih in ketonih ter netopen v vodi (Coumaphos, 1969).

2.2.2 Uporaba kumafosa

2.2.2.1 Zatiranje klopov pri živalih

Dokument EPA-R.E.D. iz leta 1996 navaja, da je bil kumafos v ZDA registriran leta 1958 in se od takrat uporablja za zatiranje različnih škodljivcev iz skupine členonožcev, predvsem klopov kot povzročiteljev piroplazmoze pri živini; ta je v preteklosti predstavljala velik problem in povzročala ogromne izgube v živinoreji. Čeprav so uspeli znotraj ZDA te težave skoraj popolnoma odpraviti, se še vedno pojavljajo pri živini, ki se seli iz Mehike (Thomas in sod., 2010). Ministrstvo za kmetijstvo ZDA zato po celotni meji z Mehiko namešča kadi z vodno raztopino kumafosa, ki jih mora živina v primeru migracije prečkati. Poleg tega živali z raztopino kumafosa tretirajo še ročno (s posipalniki), visoko in nizko tlačnimi razpršilniki ter ostalimi podobnimi pripomočki. Za uporabo je kumafos dostopen v obliki praškov, emulzij in prahu (Coumaphos, 1996).

2.2.2.2 Zatiranje škodljivih zajedavskih pršic pri čebelah

Varroa jacobsoni (tudi *Varroa destructor*) je prvi opisal Oudemans leta 1904 kot nepatogenega parazita azijske čebele *Apis cerana*. Z uvajanjem evropske čebele *A. mellifera* na območja *A. cerana* se je pršica prilagodila na novega gostitelja. Za evropsko čebelo se je pršica izkazala za veliko bolj škodljivo in od takrat predstavlja enega glavnih povzročiteljev škode v čebelarstvu. Za zatiranje *V. jacobsoni* je bilo tako raziskanih in uporabljenih veliko pesticidov, med bolj uporabljene spada tudi kumafos (Fernandez-Muiño in sod., 1994). Nemca Ritter in Neuhauser sta bila prva, ki sta kumafos predvidela kot kandidata za zatiranje *V. jacobsoni* in leta 1985 raziskala njegovo akaricidno delovanje. Kasneje tega leta so v Nemčiji kumafos registrirali kot sredstvo v obliki emulzije, ki so ga nanašali neposredno na čebele in okvirje satja (Kochansky in sod., 2001).

Slovenija kot članica EU ni izjema in se s problemom *V. jacobsoni* v čebelarški dejavnosti sooča od 80. let prejšnjega stoletja. Sprva so uporabljali močne piretroide, kot so fluvalinat, fluometrin in akrinakril, katerih učinkovitost se je začela v 90-ih zmanjševati zaradi vse večje odpornosti *V. jacobsoni*, kar je čebelarstvo prisililo v iskanje novih rešitev in uporabo drugih sredstev. Eno izmed možnosti je predstavljal kumafos, Veterinarska uprava Slovenije pa ga je leta 2000 registrirala in odobrila za uporabo kot produkt Perizin® (Maver in Poklukar, 2003).

2.2.3 Strupenost kumafosa

V študijah na laboratorijskih živalih, ki jih zajema dokument EPA (1996), je kumafos povzročal srednje do močno akutno zastrupitev. Je zelo strupen ob zaužitju ali vdihovanju ter manj strupen ob stiku s kožo. Ne povzroča OPIDPN. Raziskave *in vitro* na bakterijah za ugotavljanje genskih mutacij in poškodb DNK so pokazale, da kumafos ne učinkuje mutageno. Prav tako naj ne bi bil karcinogen. Nadaljnje študije na zajcih in podganah so pokazale, da ne vpliva na delovanje razmnoževalnih organov. Glavne tarče njegovega delovanja so AChE v plazmi in krvnih celicah. Poskusi na podganah so pokazali, da se iz telesa izloči preko urina in blata 7 dni po zaužitju (Coumaphos, 1996).

Kumafos je torej po teh poročilih človeku nevaren predvsem iz vidika akutne zastrupitve. V ZDA bi se naj v nizkih koncentracijah nahajal v mesu in mleku, kar pa poleg dejstva, da ni registriran za uporabo v poljedelstvu, naj ne bi predstavljalo tveganja tako v akutnem kot kroničnem smislu. Več skrbi se pojavlja pri tistih, ki se s kumafosom rokujejo – delavcih, ki kumafos pripravljajo in nanašajo. Zaradi tega EPA uvaja vrsto ukrepov za zmanjševanje tveganja. Med te ukrepe spada primerna zaščitna oprema, zaprti sistemi rokovanja s kumafosom, beleženje podatkov o izpostavitvi in podobno (Coumaphos, 1996).

EPA dokument ne ugotavlja negativnih posledic izpostavitve nizkim odmerkom na dolgi rok. Kot že navedeno, so do takšnih zaključkov prišli pri novejših študijah nekaterih drugih OP, kar nakazuje, da bi lahko kumafos vplival podobno, še posebej zaradi njegove

obstoynosti in nemobilnosti v naravi. Prav tako se že od samega začetka uporabe pesticidov za zatiranje zajedavcev čebel zastavlja vprašanje, kakšna je kontaminacija medu in drugih čebelarških produktov (Fernandez-Muino in sod., 1994).

2.2.3.1 Tveganje za ljudi, ki se rokujejo s kumafosom

Vpliv kumafosa na ljudi so preučevali predvsem pri tehnikih, ki se z njim rokujejo bodisi pri proizvodnji, bodisi pri pripravljanju njegovih raztopin in nanašanju na živino v ZDA.

Thomas in sod. so kljub preverjanjem izpostavljenosti teh delavcev, ki jih je predpisala EPA v R.E.D. dokumentu, ostali skeptični in se v svoji raziskavi odločili iskati novo in boljšo metodo preverjanja od obstoječih. Ta preverjanja delavci opravljajo na določeno časovno obdobje, s čimer naj bi se izognili morebitnim zastrupitvam. V raziskovalno skupino so vključili tiste, ki so zadolženi za razprševanje kumafosa na konje, namakanje goveda in pripravljanje raztopine. Pred in po rokovanju s kumafosom so merili AChE aktivnost v krvi in vsebnost metabolita kumafosa – klorferona v urinu. Prav tako so ugotavljali, koliko kumafosa je ostalo na izpostavljenih delih kože in rok, na njihovih oblačilih in površini zaščitnih mask. Preverjali so tudi vsebnost kumafosa v zraku. Rezultati so pokazali, da je bila aktivnost AChE v krvi normalna, medtem ko se je količina klorferona v urinu po opravljanju dela povišala. Kumafos se je pojavil v sledovih v enem vzorcu zraka in bil v nasprotju prisoten skoraj v vseh vzorcih, zajetih iz izpostavljenih delov kože, površine rok, oblačil in zaščitne maske. Glede na povišano vsebnost klorferona v urinu so sklepali, da kumafos prehaja v telo preko kože in na ta način pokazali, da obstoječi monitoring aktivnosti AChE v plazmi ne zadostuje. Delavci so pri svojem delu torej neprestano izpostavljeni manjšim odmerkom. Ob tem se ponovno postavlja vprašanje, kakšne so posledice takšne dolgotrajne izpostavljenosti glede na zaskrbljujoče ugotovitve raziskav, ki so se nanašale na druge OP (Thomas in sod., 2010).

Čeprav dokument EPA-R.E.D. ne ugotavlja karcinogenih učinkov, avtorji nekaterih študij trdijo drugače. Kar nekaj epidemioloških raziskav je pokazalo povezavo med izpostavljenostjo kumafosu in pojavnostjo raka. Pri odraslih kmetovalcih, ki uporabljajo

kumafos, naj bi se statistično značilno povečalo tveganje nastanka glioma (Lee in sod., 2005). Prav tako bi se naj pri ljudeh, ki so kumafosu večkrat izpostavljeni, povečala pojavnost ne-Hodgkinove vrste limfoma (De Roos in sod., 2003). Pri uporabniki, pri katerih se je v ožjem sorodstvu že pojavil rak na prostati, se je s statistično analizo pokazala povezava med izpostavljenostjo in nastankom te vrste raka v primerjavi s skupino, ki ni bila nikoli v stiku s kumafosom. Do te povezave sicer ni prišlo pri skupini uporabnikov, pri katerih se v družini še ni pojavil rak, kar nakazuje, da kumafos najverjetneje deluje bolj karcinogeno pri posameznikih, ki so genetsko bolj dovzetni za razvoj rakavih obolenj (Alavanja in sod., 2003).

Kumafos naj bi povečal tudi tveganje za nastanek astme, diagnosticirane po 20 letu starosti posameznika. Ena izmed raziskav večjega števila pesticidov in kmetovalcev je ponovno z uporabo statističnih analiz potrdila povezavo med izpostavljenostjo in razvojem ne-alergijske astme. (Hoppin in sod., 2009).

2.2.3.2 Vsebnost kumafosa v medu in ostalih čebelarških produktih

Z uporabo pesticidov v čebelarstvu se je pojavila tudi skrb o njihovem zadrževanju v medu in drugih čebelarških produktih, kar je sprožilo kar nekaj raziskav z uporabo različnih metod za ugotavljanje vsebnosti kumafosa. Ugotovljeno je bilo, da se v prebavilih čebel nahaja 24 % uporabljenega kumafosa, kar pomeni, da preostali del ostaja v panjih. Panji so v notranjosti prekriti s tanko plastjo voska. Lipofilne snovi, med katere spada tudi kumafos, se lahko zadržujejo v vosku in prehajajo tudi v med (Van Buren in sod., 1992).

Fernandez-Muiño in sod. v pregledu obstoječih raziskav (1994) navajajo več različnih metod detekcije različnih akaricidov, uporabljenih za zatiranje *V. jacobsoni*, med drugim tudi kumafosa. Tem metodam so v večini skupni osnovni koraki, ki zajemajo ekstrakcijo raztopljenega medu, čiščenje in na koncu kvantitativne in kvalitativne analize. Ločevalne tehnike so zajemale različne vrste kromatografij. S pomočjo densitometričnih in fluorometričnih metod, določanja elektronov, določanja dušika in fosforja in masne

spektrometrije se je nato določala dejanska količina kumafosa v medu (Fernandez-Muiño in sod., 1994).

Prva raziskava, ki je ugotavljala količino kumafosa v medu in razvila svojo različico preverjanja, je potekala leta 1988 pod vodstvom Bachvarove, ki ga je določal z metodo GC-MS s kumafosnim produktom Potasan® kot standardom. Preverjali so vzorce bolgarskega medu pri meji detekcije 0,02 mg/kg in ugotovili, da je bilo v vzorcih bolgarskega medu prisotnega tudi med 0,04 do 0,07 mg/kg kumafosa (Bachvarova in sod., 1988).

Druga razvita metoda za detekcijo kumafosa v medu je nastala pod okriljem Taccheo in sod., ki so ga določali denzitometrično. Pri stopnji obnove, ki je bila več kot 87 % in meji detekcije 0,010 mg/kg, so pregledali vzorce medu iz različnih panjev, kjer se je uporabljal kumafos. Pri večini je bila vsebnost kumafosa pod mejo detekcije, le v enem je znašala 0,023 mg/kg (Taccheo in sod., 1989).

Nasprotno je raziskava glede vsebnosti pesticidov v grškem medu pokazala, da večina vzorcev kumafosa ni vsebovala (Thrasyvolou in Pappas, 1985). Sledov kumafosa v medu in čebeljem vosku niso našli tudi v študiji Van Burna in sod. leta 1992 in Fernandez-Muiñoa in sod. leta 1994.

Tudi v Sloveniji so že potekala preverjanja vsebnosti kumafosa v medu. Pri raziskavi so se posluževali podobnih metod kot ostali – po ekstrakciji in čiščenju so vsebnost določali z ločevalcem ujetih elektronov (GC-ECD) z mejo detekcije pri 0,005 mg/kg. Rezultati so pokazali, da je bil kumafos prisoten v več vzorcih slovenskega medu, ponekod tudi v koncentraciji 0,025 mg/kg, kar presega predpisano dovoljeno vsebnost v medu v Italiji in Nemčiji, ki znaša 0,01 mg/kg (Maver in Poklukar, 2003).

Chauzat in Faucan (2007) sta se pri svoji študiji osredotočila bolj na splošno prisotnost pesticidov v čebeljem vosku na področju Francije in zastopanosti posameznih pesticidov. Z uporabo podobnih metod sta ugotovila, da je kumafos eden izmed tistih, ki zavzema največji delež med vsemi prisotnimi pesticidi (Chauzat in Faucan, 2007).

Vse te študije dokazujejo, da je kumafos v majhnih količinah prisoten v medu in so zaradi tega še toliko bolj nujna preverjanja njegovega vpliva v takšnih količinah, saj lahko kumafos neposredno preko uživanja medu in ostalih čebelarskih proizvodov resno ogroža zdravje ljudi.

2.3 TESTI OBNAŠANJA KOT MODEL ZA SLEDENJE VPLIVOM ORGANOFOSFATOV

2.3.1 Testiranje nevrotoksičnosti

S testi nevrotoksičnosti ugotavljamo funkcionalne in strukturne pomanjkljivosti delovanja živčnega sistema, ki nastanejo kot posledica vplivov izpostavljenosti različnim strupenim snovem v času razvoja ali odraslega stanja organizma. Te pomanjkljivosti zajemajo začasne razpoloženske motnje, spremembe v kognitivnih sposobnostih, pa tudi trajna in ireverzibilna nenormalna stanja živčnega sistema, kar vodi v nastanek duševnih bolezni in senzorično-motoričnih poškodb. Kratkoročno delovanje različnih nevarnih vplivov iz okolja je največkrat popravljivo, dolgoročno izpostavitve pa največkrat vodi do trajnih okvar, ki se lahko pojavijo zakasnelo, brez predhodnih kratkoročnih znakov zastrupitve. Za odkrivanje takšnega učinkovanja je zato pomembno pravilno načrtovanje in izvajanje testiranja. Testi za ugotavljanje nevrotoksičnosti se po navadi izvajajo naknadno po ostalih klasičnih preverjanjih, predvsem ko raziskujemo posledice dolgotrajne in večkratne izpostavitve. Pri izvajanju smo osredotočeni na širok spekter znakov potencialne nevrotoksičnosti. S pomočjo takšnih testov, ki se bolj ali manj osredotočajo na vedenje in pravilno delovanje določenih procesov, pridobimo predvsem nevropatološki vpogled v stanje, na podlagi katerega lahko določimo, do kakšnih nepravilnosti je prišlo. Znaki nevrotoksičnosti se v večini pojavijo v odrasli dobi organizma in so velikokrat posledica delovanja negativnih vplivov v času njegovega razvoja. Takšna bolezenska stanja je nemogoče zaznati z že znanimi in utečenimi metodami, ki so primerne predvsem za preverjanje neposredne akutne zastrupitve. Zato so testi zastavljeni tako, da odkrivajo morebitne funkcionalne in morfološke spremembe razvijajočega se organizma predvsem v

najbolj občutljivem obdobju – obdobju zarodka. Med parametre rutinskih študij, s katerimi se preverja možnost nevrotoksičnosti, spadajo histopatološke preiskave, preverjanje stanja organizma ob pomembnih mejnikih razvoja, kot sta rast in dozorevanje ter ugotavljanje kliničnih znakov, ki zajemajo preverjanja gibanja in refleksov, vedenja ter pravilnega delovanja življenjskih funkcij, povezanih z delovanjem živčnega sistema. Izvajanje raziskav z namenom odkrivanja odstopanj normalnega razvoja organizma je že nekaj časa predpisano za različne farmacevtske spojine in določene pesticide, pri katerih obstaja sum pojava nepravilnosti takšnega značaja (Barlow in sod., 2002).

2.3.2 Laboratorijske živali kot modeli za ugotavljanje odstopanj v obnašanju

Laboratorijske živali služijo kot modeli različnih normalnih in bolezenskih stanj zaradi fiziološke podobnosti ljudem. Njihova prednost je predvsem ta, da se pod kontroliranimi pogoji doseže vpogled v delovanje organizma in tudi mehanizme različnih nepravilnosti in bolezni pri ljudeh, tudi takšnih nevrološkega značaja, ki se lahko kažejo kot različne možganske nepravilnosti in posledično odstopanje od normalnega obnašanja živali (Van der Staay, 2006).

Kot modeli za nevropsihiatrične bolezni testne živali posnemajo eno ali več stanj določene bolezni. Z njihovo pomočjo poskušamo priti do natančnih mehanizmov določene bolezni ali predvideti odziv na izpostavitve določenim substancam. Dober živalski model mora biti robusten, ponovljiv in preprost, kar omogoča rutinsko uporabo v raziskovalne namene v laboratoriju. Poskusi z njimi naj bi bili čim bolj merljivi in samodejni. Ker služi kot posnemovalec enega ali več simptomov določene človeške bolezni, nanj delujejo enako tudi enake metode zdravljenja za odpravljanje ali lajšanje takšnega stanja. Pri posnemanju različnih bolezenskih stanj se mora paziti tudi na izvor nastanka, ki mora biti prav tako enak človeškemu (Crawley, 2007).

Prednost miši kot laboratorijskih živali je v prvi vrsti njihova majhnost. Za namestitev večje skupine miši ne potrebujemo velike kletke, skupinska namestitev tudi onemogoči neželena vedenja, značilna za izolirane miši, kot so agresivnost in hiperaktivnost. Prav tako so primerne iz ekonomskega vidika, saj so stroški oskrbe nizki. Zaradi teh prednosti lahko

hitro pridobimo veliko število testnih miši oziroma skupin, kar je še ena velika prednost za raziskovanje. Zaradi že omenjene majhnosti niso nujni veliki namestitveni prostori za ohranjanje legla in tudi ne za izvajanje testov. Poleg tega je na voljo velika genetska raznovrstnost standardnih mišjih sevov komercialnih gojiteljev in ogromno informacij oziroma podatkovnih baz, ki ponujajo podatke o genetskih in fenotipskih značilnostih določenih mišjih sevov. Izbiramo lahko tudi med veliko rekombinantnimi linijami, ki so uporabne za raziskave zahtevnejših problemov. Transgena tehnologija za izvajanje tarčnih mutacij je zelo utečena in dovršena, kar pomeni, da je miš z izbitim posameznim genom relativno enostavno pridobiti (Wahlsten, 2011).

Celotna žival kot model je zelo uporabna in uspešna pri raziskovanju nevrološko-bioloških mehanizmov obnašanj človeka, tudi tistih, ki so prisotna pri motnjah razpoloženja in čustvovanja. Dosedanja dognanja na tem področju kažejo, da so čustveni procesi povezani s spremembami nekaterih živčnih prenosnikov, živčnih modulatorjev in hormonov, ki so vpleteni v delovanje določenih mest CŽS, kot so hipokampus, amigdala in ostale dele limbičnega sistema. Kljub temu se pri vedenjskih in čustvenih spremembah, ki so prisotne ob nevropsihiatričnih motnjah, pojavlja velika raznovrstnost. Kot že rečeno, s sistemskim pristopom uporabe živalskih modelov oponašamo motnje pri ljudeh in tako pridobimo znanje o potencialnih vzrokih za nastanek ob enakih pogojih (Walf in Fyre, 2009).

2.3.3 Testi obnašanja

Vedenje je merljiv fenotip in lahko služi kot parameter za testiranje določenih stanj. Je proces, na katerega vplivajo različni dejavniki, kar pripomore k temu, da se zato meri na različne načine. Pri testu se potem raziskovalec osredotoča na tiste vedenjske znake, ki so tema raziskovanega problema. Pred izvedbo se mora glede na to tudi odločiti, katere teste bo izvajal, v kakšnem obsegu, nabaviti mora tudi primerno opremo in naprave ter se seznaniti z navodili izvajanja. Testiranja mora nujno odobriti etična komisija (Wahlsten in Crabbe, 2007).

Vedenje in njegove motnje so kompleksnega značaja. Pojavlja se velika raznolikost med posamezniki, kar nakazuje, da je za določeno stanje najverjetneje odgovorno večje število

genov. Veliko psihiatričnih bolezni, kot so razna odstopanja v kognitivnih procesih, anksioznost, depresija in zasvojenosti, so v vsaki populaciji normalno prisotne. Razlikovanje med normalni in »nenormalnim« stanjem ali klinično vidnim je vprašanje dogovora (Flint in sod., 1995).

Izpostaviti je potrebno tudi, da so čustva stvar posameznika. Ne obstaja metoda, s katero bi lahko točno določili, če se miš počuti prestrašeno, anksiozno ali depresivno, kajti tudi pri živalih je čustvovanje subjektivno in se od primera do primera razlikuje. Prav tako mentalne bolezni zajemajo določena nevrološka stanja, ki se pojavljajo samo pri človeku in so lahko pri podobnih ali enakih bolezenskih znakih pri miših tudi odsotna. Kljub temu lahko opazujemo določene vedenjske in fiziološke odzive miši, ki so značilna za določena stanja, podobna človeškim – ne moremo torej poustvariti človeška nevropsihiatrična obolenja v miših, lahko pa posnemamo določene simptome, vzroke in odzive na zdravljenje (Carwley, 2007).

2.3.4 Ugotavljanje obnašanja, podobnega anksioznosti

Anksioznost ali tesnoba je psihološko in fiziološko stanje, ki ga spremljajo neprijetni občutki strahu in zaskrbljenosti. Anksioznost se razvije kot obrambni mehanizem posameznika na negativne spremembe. Služi kot opozorilo pred življenje ogrožajočo nevarnostjo. Če živali ne bi razvile anksioznega odziva, ne bi preživele. Normalna mera anksioznosti torej uravnava predvsem odziv na nevarnost v bližini, »patološka« oblika anksioznosti pa moti normalno delovanje organizma in zahteva primerno zdravljenje. Anksioznost naj bi nastala kot kombinacija vpliva genov in okoljskih faktorjev v zgodnjem razvoju možganov. Ker je v mehanizme nastanka vključenih veliko število genov in interakcij z vplivi iz okolja, so poti nastanka še vedno dokaj neznane in razumevanja mehanizmov slabo (Holsboer in Ströhle, 2005).

Strah in tesnoba sta torej definirana kot odziv na resnične ali potencialne nevarnosti in lahko vodita v porušitev homeostaze pri organizmih. Tak odziv se odraža fiziološko kot povišan pulz srca ali zvišanje krvnega pritiska ter na ravni obnašanja živali. Ko se ti znaki pojavljajo prekomerno, govorimo o »patološki« anksioznosti. Na klinični ravni takšen

odziv zajemajo stanja, kot so fobije, splošna anksioznost, post-travmatski stres, panika in obsesivno-kompulzivne motnje. Mišji modeli in testi večinoma zajemajo izpostavitve zunanjim ali notranjim dražljajem, ki naj bi povzročali nastanek tesnobnega stanja. Ker se pri miših ne pojavljajo znaki, povezani s patološko anksioznostjo, se pri njih opazuje znake tako imenovane anksioznosti »stanja«. Ta se nanaša predvsem na odzive, ki se pojavijo ob določenih trenutkih, ko je prisoten anksiojeni dražljaj in sproži obnašanje obrambnega značaja. Z odkritjem benzodiazepinov (BZ) v začetku 60. let prejšnjega stoletja in njihovim uspehom glede zdravljenja anksioznosti so se razvili tudi različni testi za ugotavljanje stanja, podobnega anksioznosti. Ker so bili takrat BZ edini na trgu, so tudi testi temeljili na osnovi njihovega farmakološkega učinkovanja, kar je prišlo še posebej do izraza ob začetkih uporabe novih anksiolitikov v 80. letih, katerih mehanizmi delovanja so drugačni v primerjavi z BZ in zato uveljavljeni testi obnašanja zanj niso prišli v poštev. To je botrovalo k razvoju novih načinov testiranja anksioznosti podobnega vedenja, ki so temeljili na brezpogojnem konfliktu, eden izmed bolj znanih primerov takšnega načina preverjanja pa je test dvignjenega labirinta. Kasneje se je izkazalo, da k temu pripomorejo predvsem različne vrste tesnobnih stanj z različnimi potmi delovanja, ki se različno odzovejo na anksiolitike in tudi dajejo različne rezultate pri vedenjskih testih za ugotavljanje takšnih stanj, kar je še eden izmed dodatnih dejavnikov pri izbiri načina preverjanja anksioznosti podobnega vedenja. Poleg določanja anksiojenih in anksiolitičnih učinkov različnih substanc in vplivov se danes ti testi uporabljajo tudi za določanje fenotipa transgenih miši ali miši z izbitim genom (Belzung in Griebel, 2001).

Strah se torej pojavi ob specifičnih, največkrat neznanih predmetih ali dražljajih, tudi takšnih, kot sta stres in bolečina. Miš se bo v takšni situaciji umaknila, oziroma preživela manj časa ob predmetu, ki povzroča stres. Anksioznost je v nasprotju s strahom dosti manj specifična. Nanaša se bolj na splošno stanje, ki vpliva na vedenje v različnih situacijah in povzroča, da se miš izogiba mestom, ki zanje predstavljajo tveganje. Anksiozno stanje miši se ne da meriti direktno, ampak preko spremembe normalnega vedenja miši. Pri manjših sesalcih, ki so lahki plen večjim plenilcem, veliko tveganje predstavlja že odprt prostor, ker to zanj pomeni večjo izpostavljenost. Laboratorijske miši v primerjavi s prostoživečimi v naravi takšnih izkušenj nimajo, a se odprtim delom kljub temu izogibajo. Na podlagi tega večina testov, s katerimi se ugotavlja anksioznosti podobno vedenje,

vrednoti čas, ki ga miš preživi na izpostavljenih delih v primerjavi s tistim, ki ga preživi v zavetju (Wahlsten, 2011).

Značilnost miši je tudi spontano kopanje, ko se znajdejo na primernem substratu, med katere spada tudi strelja. Ta lastnost izvira iz njihovih prednikov iz divjine, kjer s kopanjem iščejo semena, zrna, mrtve žuželke in druge vrste hrane, ki je zakopana v zemlji. Podoben odziv miši je tudi obrambno zakopavanje, ki se pojavi ob prisotnosti predmetov (tudi večjih živali), ki zanj predstavljajo nevarnost in tveganje. Zakopavanje se od kopanja razlikuje tudi v topologiji – zajema več ali manj gibe naprej s sprednjimi tačkami, zadnje okončine pa služijo brcanje substrata nazaj. Takšno vedenje se pojavi ob povečani anksioznosti in se zato tudi izkorišča kot pokazatelj podobnega stanja pri ljudeh (Deacon, 2009).

2.3.4.1 Test dvignjenega labirinta

Test dvignjenega labirinta (»elevated plus maze« ali EPM) se uporablja kot model ugotavljanja stanja brezpogojne anksioznosti in je eden izmed najbolj uporabljenih testov za ugotavljanje takšnega vedenja pri miših (Hogg, 1996). Zgodovina EPM se je začela z uporabo dvignjenega labirinta v obliki Y, ki ima dva odprta kraka in ga je prvi opisal Montgomery (1958). Pri preverjanju je uporabil podgane, ki so v labirintu raje zadrževale v zaprtem kraku in se izogibale odprtima krakoma. Handley in Mithani (1984) sta kasneje pri svojem raziskovanju vedenja, povezanega s strahom, Montgomeryjev test priredila tako, da je labirint zajemal dva odprta in dva zaprta kraka z zidovi, ki so med seboj pravokotni in tako tvorijo obliko plusa. Opisala sta tudi, da se lahko anksioznosti podobno obnašanje pri podganah vrednoti glede na razmerje časa zadrževanja med zaprtim in odprtim delom (Handley in Mithani, 1984).

Tudi odziv miši se vrednoti podobno. Miš je postavljena na sredino labirinta in čas, ki ga preživi na odprtih delih ter število vhodov v odprte krake, se upošteva kot objektivni kazalec vedenja, ki ni podobno anksioznosti. Njihovo vedenje v labirintu temelji na konfliktu med njihovim prirojenim nagnjenjem po raziskovanju novih delov in zadrževanju

na varnih in manj izpostavljenih mestih, kar je odraz brezpogojnega odziva (Carobrez in Bertoglio, 2005).

Zanesljivost uporabe EPM temelji na pravilnem usposabljanju oseb, ki izvajajo test in na uporabi dobro definiranih in lahko sledljivih merilih. Meritve se zapisujejo z uporabo avtomatiziranih sistemov in tudi opazovalcev. Značilno pri izvajanju EPM testa je, da miš po njeni naravi več časa preživi v zaprtih krakih. Poleg tega se kot zanj značilno vedenje, povezano s strahom oziroma anksioznostjo, pojavlja tudi negibnost, ki se poveča, ko se miš zadržuje v odprtih prostorih. Veljavnost testa se še dodatno podkrepi z uporabo anksiolitikov kot pozitivne kontrole v primerjavi z uporabo anksiozenov kot negativne kontrole (Walf in Fyre, 2009).



Slika 1: Oprema za opravljanje EPM

2.3.4.2 Test odprtega polja

Test odprtega polja (»open field test« ali OFT) se uporablja za merjenje težnje k raziskovanju in splošne aktivnosti glodavcev. Največje zasluge pri zasnovi OFT ima

Calvin Hall (1939), ki je test uporabljal pri raziskovanju vedenjskih značilnosti podgan. Že od vsega začetka se OFT uporablja tudi pri miših. Poleg splošne aktivnosti v smislu celotne prehojene dolžine, ki jo miš opravi med testom, se vrednotijo tudi številni drugi parametri, kot so čas, preživet ob steni v primerjavi s tistim, ko se miš zadržuje v notranji coni polja, prehojena razdalja v določenih časovnih obdobjih in ostali. Uporablja se lahko samo kot kontrolni test v kombinaciji z ostalimi testi obnašanja ali bolj pogosto za preverjanje toksičnih, pomirjevalnih ali stimulativnih učinkov snovi in novih substanc. Polje največkrat zajema obliko kvadrata, lahko pa tudi pravokotnika ali kroga z zidom, da miš ne pobegne. Pojem odprto polje se torej ne nanaša na obširno območje, kjer se žival lahko prosto giba, ampak predstavlja bolj obliko arene, kjer je na voljo polje od 25 cm² pa do 250 cm². Raziskovalec postavi miš v polje in jo s tem prisili, da se seznani z novim okoljem. OFT traja tipično od 2 do 10 minut, kar zajema bolj ali manj raziskovanje novega prostora. S snemanjem in uporabo računalniških programov se je čas testiranja začel podaljševati. Kot splošno aktivnost se merijo razdalja gibanja, mobilni čas, dvigovanje in razne spremembe v aktivnosti ter splošno zadrževanje v notranji, bolj izpostavljeni in zunanji, varnejši coni ob zidu. Poleg tega se lahko beleži tudi nemobilni čas, vohanje, oglašanje in šklepet zob. Programi lahko zajemajo tudi parametre, kot so nenadni gibi, tekstura poti gibanja in gostota aktivnosti (Stanford, 2007).

Najbolj enostaven parameter je »gibanje«, ki je produkt motoričnega izdatka miši, želje po raziskovanju in na drugi strani paraliziranosti ali drugih vedenj povezanih s strahom. OFT s krajšim časom trajanja ni primeren za ugotavljanje spontane aktivnosti, ki se lahko meri le v dolgih časovnih obdobjih v okolju, ki je miši znano. Prav tako z njim ni enostavno meriti motorične aktivnosti, ker so v to vključeni tudi ostali faktorji, kot je želja po raziskovanju oziroma radovednost miši ter strah in anksioznost. Večina miši bo težila k zadrževanju pri zidovih (tigmotaksija). OFT se tako najprej začne s privajanjem na novo okolje in če traja dovolj dolgo, se lahko meri tudi splošna aktivnost. Anksioznosti podobno obnašanje miši se odraža v zmanjšani aktivnosti in večjem zadrževanju ob steni polja (Blizard in sod., 2007).

Nekateri izidi, kot so odvajanje blata, zadrževanje v sredini in aktivnost prvih 5 minut, so lahko odraz določenega čustvenega stanja miši. Zgodnja aktivnost se lahko nanaša na

anksioznost, ker sproži stres zaradi novega okolja in straha pred odprtimi prostori, ki je drugačen od domače kletke. Prav tako so raziskave pokazale, da anksiolitiki, ki delujejo na gama-aminobutirično kislino (GABA), vplivajo na zadrževanje miši v centru, medtem kot anksiolitiki, ki vplivajo na delovanja serotonina, na ta parameter nimajo vpliva. Ugotovili so tudi, da anksiolitiki, ki delujejo na delovanje serotonina, ne vplivajo na zadrževanje v centru. Ta dognanja so privedla do tega, da čas zadrževanja na sredini kaže na »normalno« prisotno anksioznost in da je manj občutljiv za nekatere »patološke« oblike anksioznosti (Pruet in Belzung, 2003). Pokazalo se je tudi, da je zadrževanje v sredini odvisno od doze. Pri študiji z anksiolitikom fluksetinom so miši izpostavljene višji dozi večkrat stopile v sredinsko cono, medtem kot tiste, ki so bile izpostavljene nižji dozi, niso (Dulawa in sod., 2004).

Skozi čas so se razvijale tudi metode merjenja različnih parametrov. Sprva so polje označili s vzporednimi navpičnimi in vodoravnimi črtami, tako da je nastala mreža. Opazovalec je meril število prehodov od enega kvadrata do drugega kvadrata mreže in število vstopov v notranji ali zunanji kvadrat. Druga metoda uporablja infrardeče senzorje. Najbolj sodobna metoda vključuje sledljivo kamero, ki je nameščena nad testom in računalniški program, ki beleži želene parametre (Gould in sod., 2009).



Slika 2: Test odprtega polja (Gould in sod., 2009: 5)

2.3.4.3 Obrambno zakopavanje

Poleg izogibanja odprtim delom se pri glodavcih pojavlja tudi obrambno zakopavanje predmetov, ki predstavljajo nevarnost. Med te predmete spadajo recimo pasti, predmeti, ki so neprijetnega vonja, mrtve živali in plenilci (Boer in Koolhaas, 2003).

Prvi, ki je posvetil pozornost takšnemu vedenju glodavcev, je bil Hudson (1950). Pri podganah je opazil, da pred svojimi bivalnimi prostori ostružke rade potiskajo proti in preko predmeta, kot je kovinska posoda za hrano, ker predstavlja za njih šok. Takšno vedenje se pojavlja tudi pri vevericah in Hudson je zaključil, da je verjetno značilno tudi za ostale glodavce in predstavlja enega izmed obrambnih mehanizmov pred nevarnostjo v naravi. Podgane so podobno zakopale vhod v svojo duplino ob prisotnosti podgan, ki so socialno močnejše (Calhoun, 1963). Nadaljnje raziskave z uvajanjem cigaretnega dima so pokazale, da podgane ter tudi miši in hrčki nalagajo žagovino in iztrebke na vhodne cevi, iz katerih je prihajal dim (Silverman, 1978). Ugotovljeno je bilo tudi, da talne veverice brcajo pesek v približajoče kače, kar te potem spodbudi, da sikajo ali klopotajo. To

vevericam omogoči, da locirajo mesto nevarnosti (Owings in Cross, 1978). Ta opažanja nakazujejo, da je takšno vedenje posledica naravne in čustveno negativno naravnane reakcije na različne vrste nevarnosti v bližini. Pinel in sod. (1978) so bili prvi, ki so takšno vedenje poimenovali »obrambno zakopavanje«. Prav tako so prvi to lastnost uporabili v nevro-znanstvene in psiho-farmakološke raziskave. Od takrat naprej se obrambno zakopavanje redno uporablja kot test obnašanja (Pinel in sod., 1978).

Miši zakopavajo tudi neškodljive predmete, kot so frnikole. S takšnim odzivom se uspešno izognejo nevarnostim v njihovem habitatu. Ob dodatku anksiolitikov se takšen odziv pri miših zmanjša, kar pomeni, da se obrambno zakopavanje lahko uporablja kot model določanja anksioznosti podobnega vedenja (Boer in Koolhaas, 2003).

2.3.4.3.1 Test z zakopavanjem frnikol

Test z zakopavanjem frnikol kot neškodljivih predmetov so prvi uvedli Broekkamp in njegovi sodelavci (1986). Test v osnovi poteka 30 minut in sicer tako, da se na površino stelje v enakih razmikih položi večinoma 20 frnikol v 4 ali 5 vrstah. Gre za enega manj invazivnih načinov testiranja za žival. Ob koncu testa se preštejejo frnikole, ki so bile zakopane tako, da je pod steljo več kot dve tretjini frnikole. Broekkamp in sod. so ugotovili tudi, da se ob dodatku anksiolitikov število zakopanih frnikol zmanjša in prav tako, da je do tega prišlo ob takšni dozi, ki pri določenih drugih testih takšnega značaja ni imela vpliva (Broekkamp in sod., 1986). Zakopavanje frnikol se je zmanjšalo tudi ob dodajanju antidepressivov. Ker so ta zdravila uporabljajo tudi pri zdravljenju obsesivno-kompulzivne motnje, se je test s frnikolami včasih uporabljal tudi za odkrivanje takšnega stanja (Takeuchi in sod., 2002).

Poleg tega so nadaljnje raziskave uporabe frnikol za ugotavljanje anksiolitičnih oziroma anksio-genih učinkov pokazale, da frnikole ne predstavljajo dražljaja, ki spodbudi strah in tako naj njihovo zakopavanje ne bi spadalo v obrambno zakopavanje. Prej bi naj služile za merjenje splošne aktivnosti miši pri njihovi težnji h kopanju in izdelovanju duplin (Gyertyan, 1995).

V ta namen so Nicolas in sod. (2006) uvedli še sledenje aktivnosti s kamero med testom. Ob dodatku anksiolitikov, anksigenov, antidepresivov, antipsihotikov in ostalih podobnih snovi mišim se je pri primerjavi med rezultati zakopavanja in meritvah motorike pokazalo, da je večina anksiolitikov in antidepresivov selektivno zmanjšala zakopavanje v primerjavi z ostalimi. Pojavile so se tudi razlike med različnimi anksiolitiki, ki delujejo na različne receptorje. Te ugotovitve kažejo, da test z zakopavanjem frnikol služi kot primeren način ugotavljanja anksiolitičnih oz. anksigenih učinkov in da je zaradi različne odzivnosti na različne poti delovanja takih snovi primerno uporabiti še druge teste za ugotavljanje anksioznosti podobnega vedenja (Nicolas in sod., 2006).



Slika 3: Oprema za test zakopavanja frnikol
Test v stanju pred in po izvajanju.

2.3.5 Ugotavljanje odstopanj v socialnem obnašanju

Miši so socialne živali, ki živijo v skupinah, v katerih so prisotna kompleksna razmerja, kot so dominantna hierarhija, interakcije med spoloma in agresija. Miši prepoznavajo pripadnike iste skupine in tuje miši preko različnih čutnih zaznav, kot je vohanje, vid in

dotik. Socialno vedenje miši se preučuje z širokim spektrom pristopov skozi celotno življenjsko obdobje. Ti pristopi zajemajo ultrazvočno zaznavanje zvoka mladičev, njihovo igro, razni socialni pristopi, ki se tičejo odraslih živali, kot so socialno prepoznavanje, agresija, dominanca, paritveno vedenje in oglašanje in materinsko vedenje. Testi, ki temeljijo na socialnem vedenju miši, temeljijo na prirojeni nagnjenosti k približevanju in raziskovanju neznane miši preko sledenja, ovohavanja in dvorjenja. Miši, pri katerih se pojavljajo motnje v socialnem obnašanju, so največkrat nezainteresirane in tako posvetijo manj časa raziskovanju novega in neznanega osebk. Socialno vedenje je v osnovi pri vseh miših dokaj podobno, prihaja do določenih razlik med različnimi linijami, med mišmi s prisotnimi določenimi genetskimi mutacijami na nivoju živčnega sistema in tudi pri delovanju določenih farmakoloških snovi in negativnih okoljskih vplivov (Kuti in Page, 2011).

Odklonsko socialno vedenje ali pomanjkanje socialnih interakcij lahko služi kot model za različne psihiatrične motnje, med katere spadajo avtizem, anksioznost, depresija, šizofrenija in socialne fobije (Crawley, 2007). Prvi testi, ki so vključevali socialne interakcije laboratorijskih glodavcev, so bili zasnovani za ugotavljanje stanja podobnega anksioznosti. File in Hyde sta leta 1978 opazovala, kako na socialno prepoznavanje podgan vplivata svetloba in tema in ugotovila, da je pri svetlobi prisotnega manj ovohavanja med testnima podganama. File je kasneje ugotovila, da se ob dodatku anksiolitikov zanimanje za neznano podgano poveča (File in sod., 2004).

Avtizem je prvi opisal Leo Kanner leta 1943 pri skupini 11 otrok, pri katerih je opazil, da so se vedli nenormalno in bili odsotni, vendar pri tem niso imeli težav s pomnjenjem in motoriko. Opazil je tudi prekomerno občutljivost na dražljaje in težave z ali nesposobnost govorjenja. Beseda avtizem se je sicer prvič pojavila v začetku 20. stoletja pri Bleulerju, ampak Kanner je bil prvi, ki je to stanje tudi opisal. Na začetku so avtizem enačili s šizofrenijo in psihozo (Herbert, 2006). Zanj so značilni trije glavni sklopi simptomov – odsotnost normalnih socialnih interakcij, komunikacijska nesposobnost in prisotnost določenih stereotipnih ponavljajočih se vedenj. Miši lahko s pojavom podobnih odstopanj pri normalnih socialnih interakcijah in socialnem spominu služijo kot model, ki kaže na stanje podobno avtizmu pri človeku (Moy in sod., 2007). V ozadju nastanka veliko vlogo

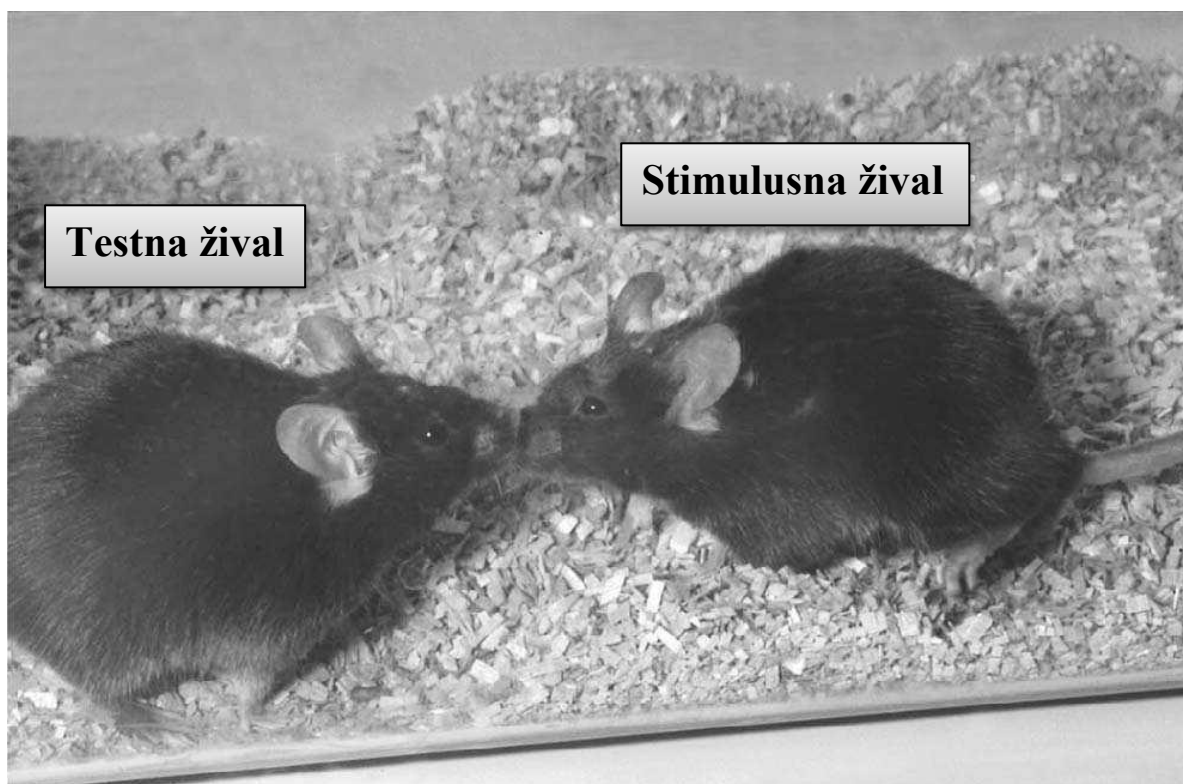
igrajo geni, kar je vodilo v razvoj modelov miši z izbitimi kandidatnimi geni, do katerih so prišli preko študij pri ljudeh in prav tako s selekcioniranimi linijami z nenavadnimi recesivnimi geni, ki povzročajo podobna odklonska vedenja (Crawley, 2004).

2.3.5.1 Test socialnega prepoznavanja

Test socialnega prepoznavanja temelji na interakcijah med mišmi, ki so ključne pri vzpostavljanju in ohranjanju socialnih struktur znotraj skupin, v katerih živijo. Prva sta ga opisala in definirala Thor in Holloway (1982). Osnova testa je še danes podobna in temelji na individualnem prepoznavanju, kjer miš več časa posveti raziskovanju njej nepoznani miši kot poznani preko večkratnih izpostavitvev. Opazovalec med temi serijami izpostavitvev beleži predvsem čas, ki ga miš porabi za raziskovanje (Winslow, 2003).

Vedenje, ki je značilno za dve med seboj tuji si miši, zajema ovohavanje, sledenje in plazenje druge po drugi. Pri testu socialnega prepoznavanja se pri teh interakcijah beleži število pristopov, celoten čas, ki ga preživita v socialnem stiku in druge specifične dejavnike, ki jih zastavi vsaka raziskovalna skupina posebej (McFarlane in sod., 2008). Večina komunikacije oziroma prepoznavanja med mišmi pri testu torej poteka preko zaznavanja vonja (Keverne, 2002).

Preko ponavljajočih izpostavitvev se vrednoti socialni spomin miši. Če deluje pravilno, miš skozi izpostavitve pokaže manj zanimanja za njej nepoznano miš in ob vsaki ponovitvi preživi manj časa za raziskovanje (Winslow, 2003).



Slika 4: Test socialnega prepoznavanja (Crawley, 2007: 145)

2.3.6 Ugotavljanje obnašanja, podobnega depresiji

Ljudje se z depresijo spopadajo že zelo dolgo časa, o čemer pričajo zgodnji zgodovinski zapisi. Stari Grki so takšno stanje opisovali kot sindrom melanholije, ki v prevodu iz grške besede pomeni »črni žolč«. V humoralni teoriji je črni žolč veljal kot znak melanholije. Konec 19. in začetek 20. stoletja se je začela uporabljati beseda depresija, ki se je nanašala na klinični sindrom melanholije (Gruenberg in sod., 2005).

Danes depresija predstavlja zdravstveno stanje, ki vpliva na posameznikovo razmišljanje, občutke in tudi telo. Zajema različne psihične težave, ki lahko vplivajo na spanje, apetit, energijo in libido. Najboljši način razlikovanja med normalno žalostjo in depresijo je, da je depresija sistemska motnja in vključuje celotno telo, kar se kaže kot zmanjšanje fiziološke aktivnosti na fizični ravni ter tudi na ravni čustvovanja in kognitivnih sposobnosti. Psihološko gledano je torej stanje slabega razpoloženja in pasivnosti, kar vpliva na posameznikove misli, vedenje, občutke, pogled na svet in telesno počutje. Takšno stanje je po navadi odraz določenih življenjskih dogodkov, posledica drugih

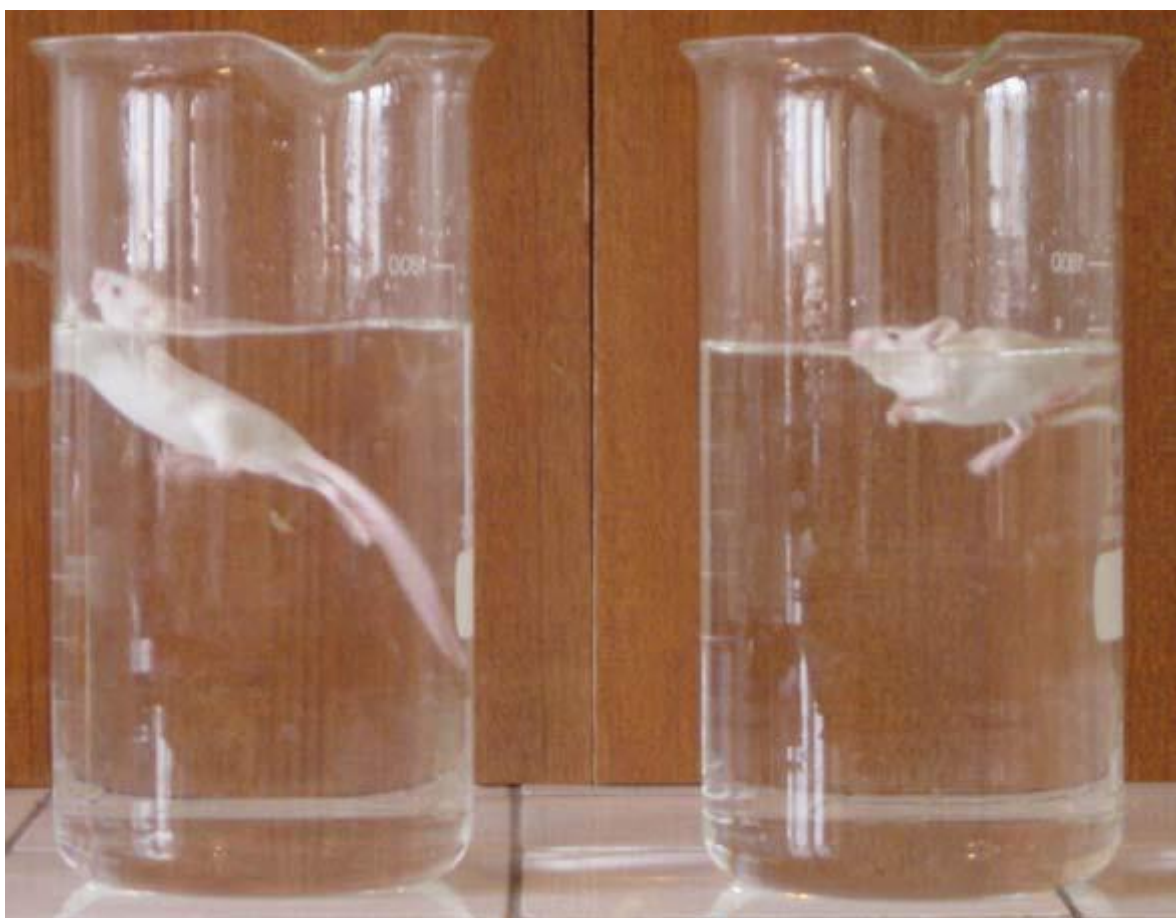
bolezni ali pa stranski učinek delovanja določenih zdravil ter nevtrotoksičnih snovi in okoljskih vplivov (Albrecht in Herrick, 2010).

Obširne študije so pokazale, da depresija prizadene med 10 in 20 % prebivalstva in da so glede na naraščanje pojavnosti pri ljudeh skozi leta obeti zelo slabi. V primeru unipolarne depresije se kaže, da nanj vplivajo tako okolje kot geni. Kot okoljski dejavnik ima največjo vlogo stres, ki ga je v naših življenjih vedno več. V namene raziskovanja so bili razviti različni živalski modeli in vrste vedenjskih testov. Živalski modeli omogočajo raziskovanje molekularnih efektov različnih vrst stresa in nevrobioloških mehanizmov depresije. Na podlagi tega lahko služijo tudi za preverjanje antidepresivne aktivnosti potencialnih antidepresivov (Zhao in sod., 2008).

2.3.6.1 Test prisiljenega plavanja

Test prisilnega plavanja (»Forced swim test« ali FST) se v veliki meri uporablja za ugotavljanje farmakoloških učinkov antidepresivnih zdravil. Prav tako se uporablja kot pokazatelj sprememb v vedenju, ki nastanejo zaradi prisotnosti različnih vrst stresa (Crowley in sod., 2004). Prvi, ki so FST opisali kot novo metodo ugotavljanja obnašanja podobnega depresiji pri miših, so bili Porsolt in sod. leta 1977. Idejo so prenesli iz poskusov, pri katerih so preverjali pomnjenje in učenje podgan v vodnem labirintu. Pri podganah so poleg tega, da jih večina najde izhod po 10 minutah, opazili tudi, da nekatere prenehajo iskati izhod in pasivno lebdijo na vodi. Svoj poskus z mišmi so potem zasnovali tako, da so jih eno uro po injiciranju antidepresiva dali za 6 min v cilinder z vodo. Ker so bile vse v prvih 2 minutah zelo aktivne, so za merjenje upoštevali samo zadnje 4 minute. Beležili so čas trajanja negibnosti oziroma lebdenja na gladini in preizkusili več vrst antidepresivov ter ugotovili, da je prišlo do zmanjšanja časa lebdenja. Tako so potrdili delovanje antidepresivov, kajti manj časa, ko je miš lebdela, boljše je bilo učinkovanje uporabljenih antidepresivov. Rezultati so se ujemali tudi z drugimi študijami, kjer so za ugotavljanje podobnih učinkov uporabili druge načine testiranja (Porsolt in sod., 1977).

FST se danes izvaja bolj ali manj podobno kot pri Porsoltovi raziskovalni skupini. Odlikuje ga zanesljivost in ponovljivost. Poleg ugotavljanja antidepresivnih učinkov se uporablja tudi v drugih raziskavah nevrofiziološkega značaja, kot sta recimo manipuliranje z ionskimi kanalčki in živčnimi prenosniki. S FST se preverja tudi delovanje različnih snovi in drugih okoljskih vplivov, ki so zaradi svojega nevrotoksičnega delovanja potencialni povzročitelji nastanka depresije (Hascoët in Bourin, 2009).



Slika 5: Test prisiljenega plavanja (Hascoët in Bourin, 2009: 86)

3 MATERIALI IN METODE

3.1 TESTNE ŽIVALI

Dovoljenje za raziskavo je izdala Veterinarska uprava Slovenije, št. dovoljenja 34401-45/2011/6 raziskava pa je bila narejena v skladu z etičnimi standardi.

Poskusi so bili narejeni na miših (*Mus musculus*) seva balb/c, ki so bile vzgojene na Centru za genomiko živali na Veterinarski fakulteti Univerze v Ljubljani. Izpostavljene so bile standardnim pogojem (temperatura: 20 – 25 °C, vlažnost: 40 – 60 %, svetlo-temni cikel: 12/12). Dobivale so hrano, ki ni vsebovala fitoestrogenov (2016, Harlan Teklad, Velika Britanija) in pitno vodo z različnimi količinami dodane osnovne raztopine kumafosa ali samo dimetil sulfoksidu (DMSO). Hrana in voda sta bili mišim dostopni *ad libitum*. Kletke miši smo nastiljali z Lignocelom (hygienic animal bedding).

Pri poskusu smo glede na odmere kumafosa testne živali razdelili v 3 skupine:

- skupina, ki je bila izpostavljena visoki dozi kumafosa (1 mg/kg), kar je 50 krat manj kot LD50 pri miši
- skupina, ki je bila izpostavljena nizki dozi kumafosa (0,1 mg/kg), kar je 100 krat manj kot LD50 za miši
- kontrolna skupina, ki ni bila izpostavljena kumafosu.

3.2 PRIPRAVA ZALOŽNE RAZTOPINE KUMAFOSA

Založno raztopino kumafosa smo pripravljali v DMSO. Na tehtnici (AB54-S/FACT METTLER TOLEDO CLASSIC Plus) smo zatehtali 6,25 mg kumafosa in ga nato raztopili v 1 ml DMSO, ki smo ga predhodno odpipetirali v epico. V času neuporabe smo epico hranili v hladilniku. Opisan postopek smo zaradi strupenosti obeh uporabljenih snovi izvajali v digestoriju.

3.3 PRIPRAVA VODE Z RAZLIČNIMI ODMERKI KUMAFOSA IN IZPOSTAVITEV MIŠI

Uporabljali smo navadno pitno vodo, ki smo jo predhodno avtoklavirali. V steklenem valju, ki smo ga predhodno sterilizirali z žganjem, smo odmerili 3 krat po 500 ml avtoklavirane vode in jo prelili v čiste steklenice. Nato smo s polavtomatskimi pipetami glede na testno skupino odpipetirali različne količine založne raztopine kumafosa oziroma DMSO in jih dodali vodi v steklenici. Pri visokem odmerku kumafosa (1 mg/kg) smo odpipetirali 500 µl založne raztopine kumafosa, pri nizkem odmerku kumafosa (0,1 mg/kg) 50 µl založne raztopine kumafosa in pri kontroli 500 µl DMSO. Steklenice smo nato dobro zaprli z gumijastimi zamaški, pretresli in jih do uporabe postavili v hladilnik. Zaradi strupenosti kumafosa in DMSO na sobni temperaturi smo steklenice pripravljali v digestoriju.

Odraslim mišim, ki smo jih razdelili glede na zgoraj omenjene skupine (4 samice in 1 samec na skupino), smo 2 tedna pred paritvijo začeli dajati pitno vodo z dodatkom kumafosa oziroma DMSO. Nato smo samce in samice glede na pripadajočo skupino izpostavljenosti kumafosu združili in jim dajali tako pripravljeno vodo ves čas do zabrejitve, med brejostjo in laktacijo in tudi po odstavitvi mladičev do naslednje paritve oziroma do konca poskusa. Mladiče smo pri 21. dnevu starosti odstavili in jih nehali izpostavljati kumafosu. Po odstavitvi smo jim dajali navadno pitno vodo. Spremljali smo čas zabrejitve, število mladičev v gnezdu in telesno težo mladičev ob odstavitvi.

3.4 TESTI OBNAŠANJA

Ko so mladiči presegli starost 70 dni in tako postali odrasle miši, smo začeli z izvajanjem različnih standardnih testov obnašanja. Mišim smo pred opazovanji zakrili informacijo o pripadajoči skupini izpostavljenosti kumafosu, da s strani opazovalca ni prišlo do subjektivnega ocenjevanja. Testi so potekali v vrstnem redu od najmanj do najbolj invazivnega za miš:

- a. Test dvignjenega labirinta
- b. Test z zakopavanjem frnikol
- c. Test socialnega prepoznavanja
- d. Test odprtega polja
- e. Test prisilnega plavanja

Test dvignjenega labirinta in test z zakopavanjem frnikol smo izvajali na isti dan, nato ob naslednjem dnevu poskusov test socialnega prepoznavanja in v zadnjem dnevu testiranj še test odprtega polja in test prisiljenega plavanja. Pri tem smo pazili, da testnim mišim 3 dni pred opazovanjem nismo menjali nastilja. Prav tako smo pri samicah bili pozorni na to, da so bile v času opazovanj v diestrusu in se s tem izognili vplivu spolnih hormonov, ki so v tem delu cikla na najnižjem nivoju.

Stanje cikla samic smo določali z odvzemom mokrih vaginalnih brisov. S plastično pasterjevo pipeto smo 3 do 5 krat sprali nožnico samice s fiziološko raztopino. Fiziološko raztopino smo nato prenesli na predmetnico. Pri tako nastalem mokrem vaginalnem brisu smo pod mikroskopom preverili citološko stanje in na podlagi tega ugotovili, v katerem delu cikla se nahaja samica (v času diestrusa prevladujejo levkociti).

6 do 8 dni po zadnjem testu so bile miši žrtvovane. V primeru razlik med kontrolno in testno skupino se bo naknadno ugotavljala izraženost genov v možganih z metodami imunohistokemije in *in situ* hibridizacije, prav tako se bo izvedla tudi analiza transkriptoma možganov z uporabo genomskih mikromrež.

3.4.1 Test dvignjenega labirinta (EPM)

Test dvignjenega labirinta uporabljamo za ugotavljanje stanja podobnega tesnobi ali anksioznosti. Miši so sicer radovedne živali, vendar se raje zadržujejo v neizpostavljenih in zaprtih prostorih kot v odprtih, kar pomeni, da odprti krak labirinta predstavlja večjo grožnjo oziroma tveganje. Znano je, da anksiolitiki miš spodbudijo k daljšemu zadrževanju v odprtem delu (Walf in Fyre, 2009).

Labirint ima obliko križa, ki je sestavljen iz dveh pravokotnih, enako dolgih (66 cm) in širokih (5 cm) krakov. Odprta kraka sta brez sten, medtem ko zaprta obdajata steni višine 20 cm in dolžine 60 cm. Celoten labirint je za 50 cm dvignjen od tal.

Miši smo testirali v zadnjih urah svetlega cikla (med 12:00 in 15:00). Poskrbeli smo, da je bilo okolje okrog vseh 4 strani, kar se da, podobno. Labirint je bil postavljen tako, da sta bila zaprta kraka obrnjena proti opazovalcu. Prostor, v katerem smo izvajali opazovanja, je bil enakomerno osvetljen.

Testno miš smo postavili na sredino labirinta obrnjeno proti zaprtemu kraku in pričeli opazovati. Med testiranjem smo uporabljali program Stopwatch+ (verzija 1.5.1., Center for behavioral neuroscience, Atlanta, ZDA) in z njim beležili čas zadrževanja, latenco prvega vstopa in število vstopov v zaprti krak z vsemi 4 tačkami, v odprti krak z vsemi 4 tačkami in v vmesni prostor z najmanj 1 in največ 3 tačkami v odprtem kraku.

Med opazovanji smo poskušali testno miš čim manj motiti, kar pomeni, da smo bili tiho in smo se čim manj premikali. Test je trajal 5 minut. Po končanem testiranju smo miš vrnili v kletko, labirint pa očistili mišjih iztrebkov s papirnato brisačo ter 70 % etanolom in počakali, da se posuši. Nato smo po enakem postopku nadaljevali z naslednjo testno mišjo.

3.4.2 Test z zakopavanjem frnikol

Obrambno zakopavanje se pojavlja pri miših kot odziv na objekte, ki miši predstavljajo grožnjo. Poteka tako, da miš premešča steljo z uporabo gobčka in sprednjih tačk z namenom, da škodljiv predmet zakrije. Prav tako zakopajo tudi druge, neškodljive predmete, med katere spadajo tudi steklene frnikole. To značilno obnašanje lahko izkoristimo za ugotavljanje stanja podobnega anksioznosti pri človeku. Miš v primeru večje ogroženosti zakoplje več frnikol. Dokazano je, da bi naj izpostavljenost miši anksiolitikom znižala število zakopanih frnikol (Deacon, 2009).

Test smo si zastavili tako, da smo testne kletke velikosti 40 cm x 25cm x 15 cm napolnili s 5 do 6 cm debelo plastjo svežega nastilja in nanj postavili 20 enakih steklenih frnikol, ki

smo jih predhodno avtoklavirali. Frnikole smo postavili v formacijo 4 x 5 frnikol in to tako, da so bile med seboj približno enako oddaljene. Testirali smo v enakomerno osvetljenem prostoru v zadnjih urah svetlega cikla (med 12.00 in 15.00). Ko smo testno miš postavili v kletko, smo jo prekrili s pokrovom s filtrom in se umaknili iz testnega prostora. Prav tako smo pazili, da je bilo v času testiranja v okolju čim manj motečih dejavnikov. Test je trajal 30 minut.

Po končanem testiranju smo miš vrnili v kletko in prešteli vse zakopane frnikole, med katere smo upoštevali vse tiste, ki so bile zakopane vsaj dve tretjini. Končno stanje smo tudi fotografirali.

Med zaporednimi testiranjmi smo v kletko dali vsakič svežo steljo in frnikole umili z destilirano vodo. Pokrovov nismo menjavali.

3.4.3 Test socialnega prepoznavanja

Test socialnega prepoznavanja predstavlja model za nepravilnosti v socialnem vedenju, kar je eden izmed znakov avtizma pri človeku. Miši se prepoznavajo predvsem preko vonja. Po določenem času takšnega obnašanja si miš žival zapomni, kar se da opaziti predvsem v krajšanju časa ovohavanja iste živali. S testom torej preverjamo »socialni spomin« živali (Ferguson in sod., 2000).

Test smo izvajali v kletkah mer 35 cm x 15 cm x 13 cm. Miši smo opazovali v prvih urah temnega cikla ob šibki rdeči svetlobi, ki je enakomerno osvetljevala testne kletke. Ker mora biti v testnem prostoru vsaj pol ure tema, smo z opazovanji pričeli najhitreje ob 16:00, kar je eno uro po ugasnitvi luči.

Testne živali smo najkasneje 5 ur pred testiranjem osamili in jih nastanili po eno miš v eno testno kletko z malo nastilja iz domače kletke, tako da je bila obdana s sebi znanimi vonjavami.

Kot stimulusne samice smo uporabili samice seva balb/c, ki smo jih ovariektomizirali po puberteti. S tem smo se izognili vplivu spolnega cikla na potek testa.

Pred začetkom opazovanja smo iz kletke s testno mišjo odstranili rešetko s hrano in vodo in jo pokrili z narobe obrnjenim čistim pokrovom s filtrom. Test je potekal tako, da smo testni miši za 1 minuto dodali stimulusno netretirano samico in jo nato za 9 minut odstranili iz kletke. Vse skupaj smo z isto stimulusno samico ponovili 8 krat. Po osmi ponovitvi in 9 minutnem premoru smo k testni miši za 1 minuto dali drugo stimulusno netretirano samico. Med testiranjem smo s programom Stopwatch+ (verzija 1.5.1., Center for behavioral neuroscience, Atlanta, ZDA) merili začetek, število in skupni čas ovohavanja katerega koli dela telesa. Pazili smo, da smo bili med opazovanji tiho in da smo se čim manj premikali. Prav tako smo poskrbeli, da v bližini testnih kletk ni bilo kakršnihkoli motečih dejavnikov.

3.4.4 Test odprtega polja (OFT)

S testom odprtega polja ugotavljamo splošno aktivnost (hiperaktivnost), lokomotorne aktivnosti in raziskovalno obnašanje pri miših. Prav tako služi kot model za ugotavljanje obnašanja, podobnega anksioznosti pri človeku. Miši se izogibajo osvetljenim, novim in odprtim prostorom, ker nanj delujejo anksiogeno in se zato raje zadržujejo ob robovih odprtega prostora (Gould in sod., 2009).

Odprto polje predstavlja steklena kletka s kvadratnim dnom dimenzij 40 cm x 40 cm, ki je dvignjena od tal za 50 cm. Postavili smo ga tako, da je bilo okolje z vseh štirih strani, kar se da, podobno in čim manj moteče za testno miš. Testiranja so potekala v zadnjih urah svetlega cikla, to je med 12:00 in 15:00.

Testno miš smo položili na sredino polja in pustili, da se prosto giblje. Test je trajal 30 minut. V tem času smo testni prostor zapustili. Po končanem testiranju smo miš vrnili v domačo kletko in pred testiranjem naslednje miši polje očistili vseh izločkov s papirnato brisačo ter 70 % etanolom in počakali, da se je dno posušilo.

Miš smo med testom snemali s kamero in premikanje oziroma obnašanje miši vrednotili s programom ANY-maze. Osredotočili smo se na splošen čas mobilnosti in nemobilnosti, razdaljo, število vstopov in latenco prvega vstopa v notranjo cono ter razdaljo, čas zadrževanja, čas mobilnosti in nemobilnosti v zunanji in notranji coni posebej.

3.4.5 Test prisiljenega plavanja (FST)

Test prisilnega plavanja uporabljamo kot model ugotavljanja obnašanja, podobnega depresiji pri človeku. Z njim merimo čas plavanja in lebdenja v visokem steklenem valju, napolnjenem z vodo. Ugotovljeno je bilo, da se čas lebdenja pri miših izpostavljenih antidepressivom skrajšuje (Hascoët in Bourin, 2009).

Vodo, ki smo jo uporabili za testiranje, smo predhodno prekuhali in jo ohladili do sobne temperature. Nalili smo jo do višine 15 cm in s tem preprečili, da se bi testna miš lahko dotikala dna ali skočila iz steklenega valja. Vode pri zaporednih izvajanjih testov na isti dan nismo menjavali. Opazovanja so potekala v enakomerno osvetljenem prostoru v zadnjih urah svetlega cikla (med 13:30 in 15:00). Testno posodo smo postavili tako, da je bilo okolje okoli nje podobno in s čim manj motečih faktorjev.

Testno miš smo spustili na sredino vodne gladine in hkrati zagnali program Stopwatch+ (verzija 1.5.1., Center for behavioral neuroscience, Atlanta, ZDA). Po pretečenih 2 minutah smo z njim pričeli meriti čas trajanja in latenco plavanja z vsemi 4 tačkami, z zadnjima tačkama in lebdenja na gladini vode brez premikanja tačk.

Test je trajal 7 minut. Po koncu smo miš vzeli iz vode, obrisali s papirnato brisačo, jo dokončno posušili pod žarnico in šele potem vrnili v domačo kletko. Med opazovanji smo bili tiho in se poskušali čim manj premikati.

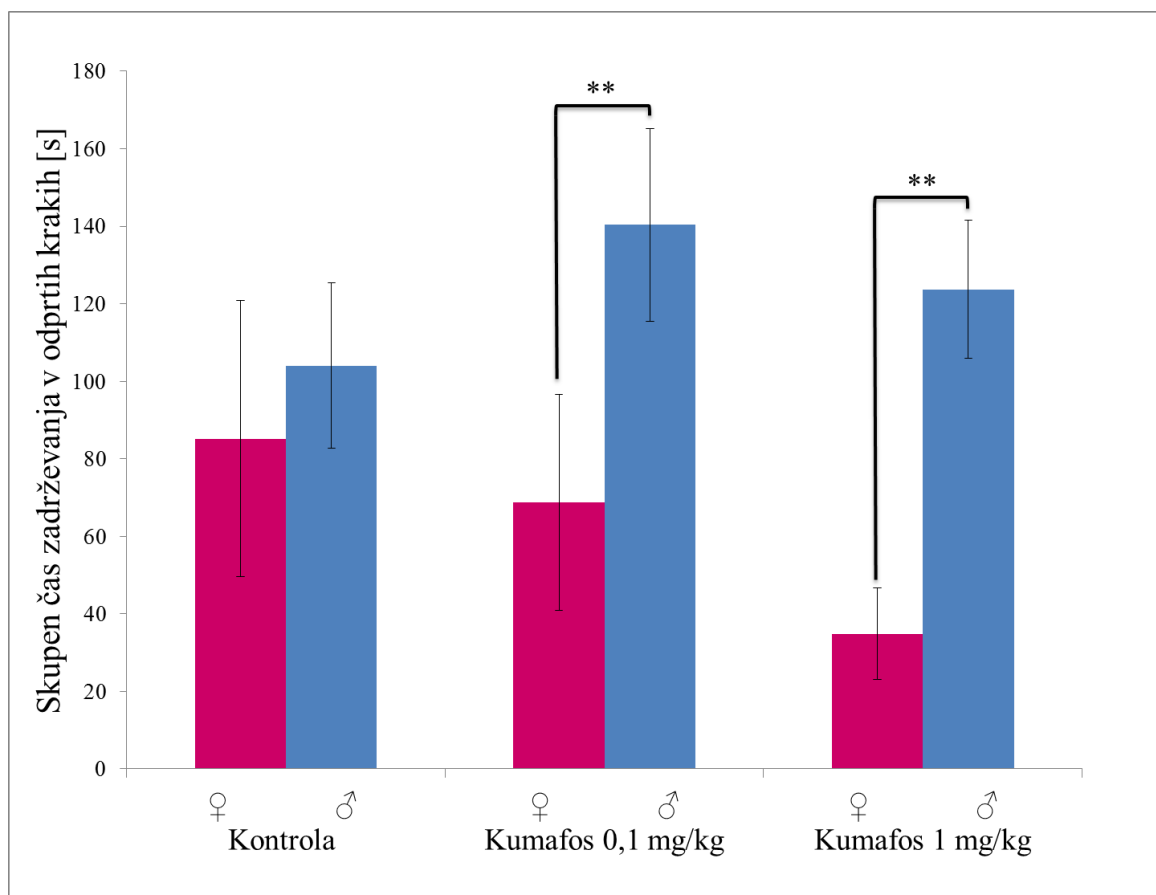
3.5 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV

Pridobljene podatke smo po končanih testih statistično analizirali. Najprej smo izračunali povprečja parametrov in njihove standardne napake. Nato smo s pomočjo programa NCSS software package (NCSS 2007, Kaysville, UT, ZDA) rezultate obdelali še z dvosmerno analizo variance. Če je bil p manjši od 0,05, smo razliko vrednotili kot statistično značilno.

4 REZULTATI

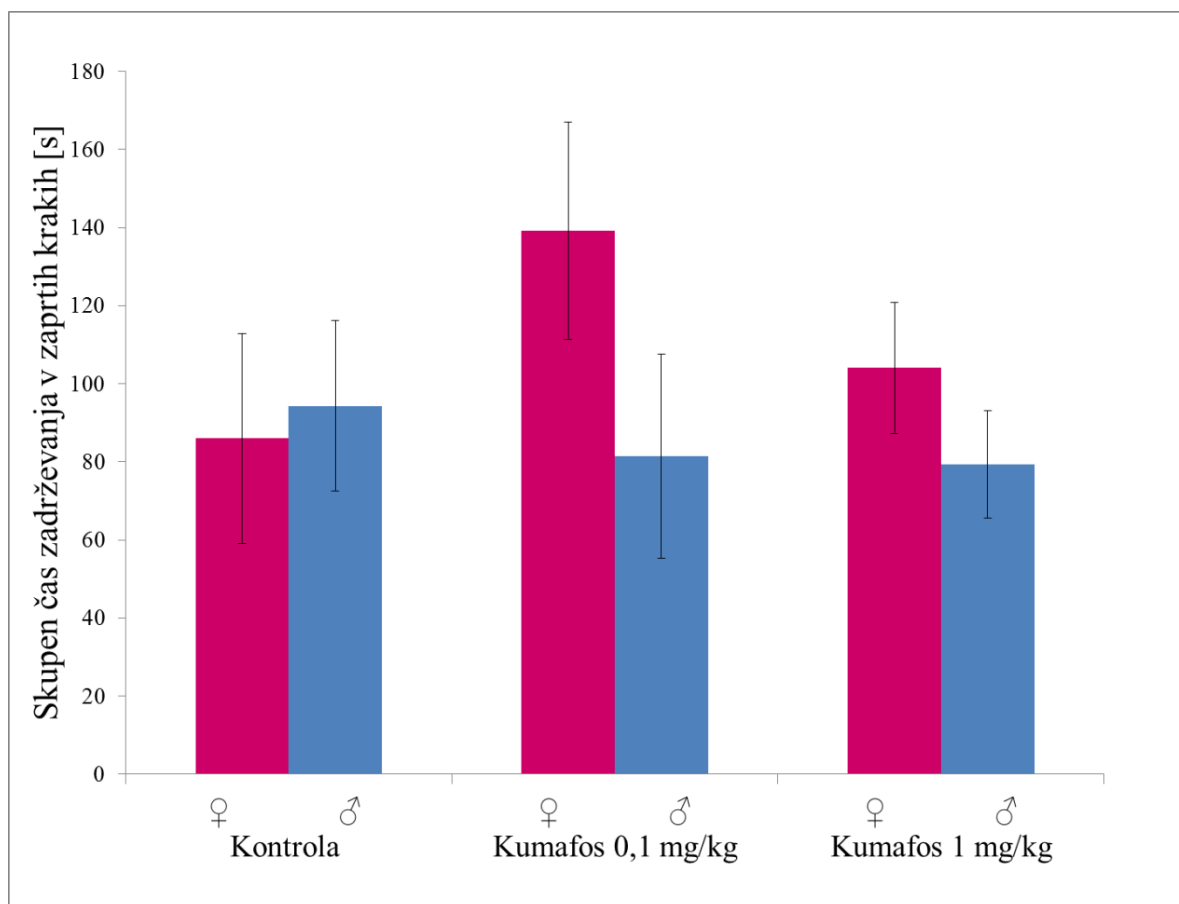
4.1 REZULTATI TESTA DVIGNJENEGA LABIRINTA (EPM)

Prvi izmed načrtovanih preverjanj je bil test dvignjenega labirinta, s katerim smo preverjali anksioznosti podobno obnašanje. Testirali smo 11 samcev in 10 samic, ki so bili izpostavljeni visokemu odmerku kumafosa (1 mg/kg), 10 samcev in 10 samic, ki so bili izpostavljene nizkemu odmerku kumafosa (0,1 mg/kg) in kontrolno skupino miši, ki je zajemala 9 samcev in 10 samic. Večina miši je izhajala iz prvega gnezda samic, le 4 samci iz skupine, izpostavljene višjemu odmerku kumafosa, so bili iz drugega gnezda. Spremljali smo čas zadrževanja, število vstopov in čas do prvega vstopa v odprt in zaprt krak ter vmesni prostor labirinta. Pri rezultatih smo se osredotočili na parametre odprtega in zaprtega kraka in jih obdelali z dvosmerno analizo variance, kjer smo kot spremenljivki vzeli spol in odmerek kumafosa. Izračuni so pokazali, da pri parametrih v zaprtem kraku razlik ni. Nasprotno je pri vseh parametrih odprtega kraka prišlo do statično značilnih razlik. Samci so v primerjavi s samicami več časa preživel v odprtem kraku ($p < 0,01$; sl. 6), prav tako so vanj tudi večkrat stopili ($p < 0,001$; sl. 8) in potrebovali manj časa do prvega vstopa ($p < 0,01$; sl. 10). Prav tako se je pri podrobnejši analizi, kjer smo upoštevali samo skupino, ki je bila izpostavljena visokemu odmerku kumafosa in kontrolno skupino, prišlo do statistično značilne razlike ($p < 0,05$; sl. 8). Pri skupini samcev z visokimi odmerki se je pojavilo večje število vstopov v odprti krak kot pri kontrolni skupini.



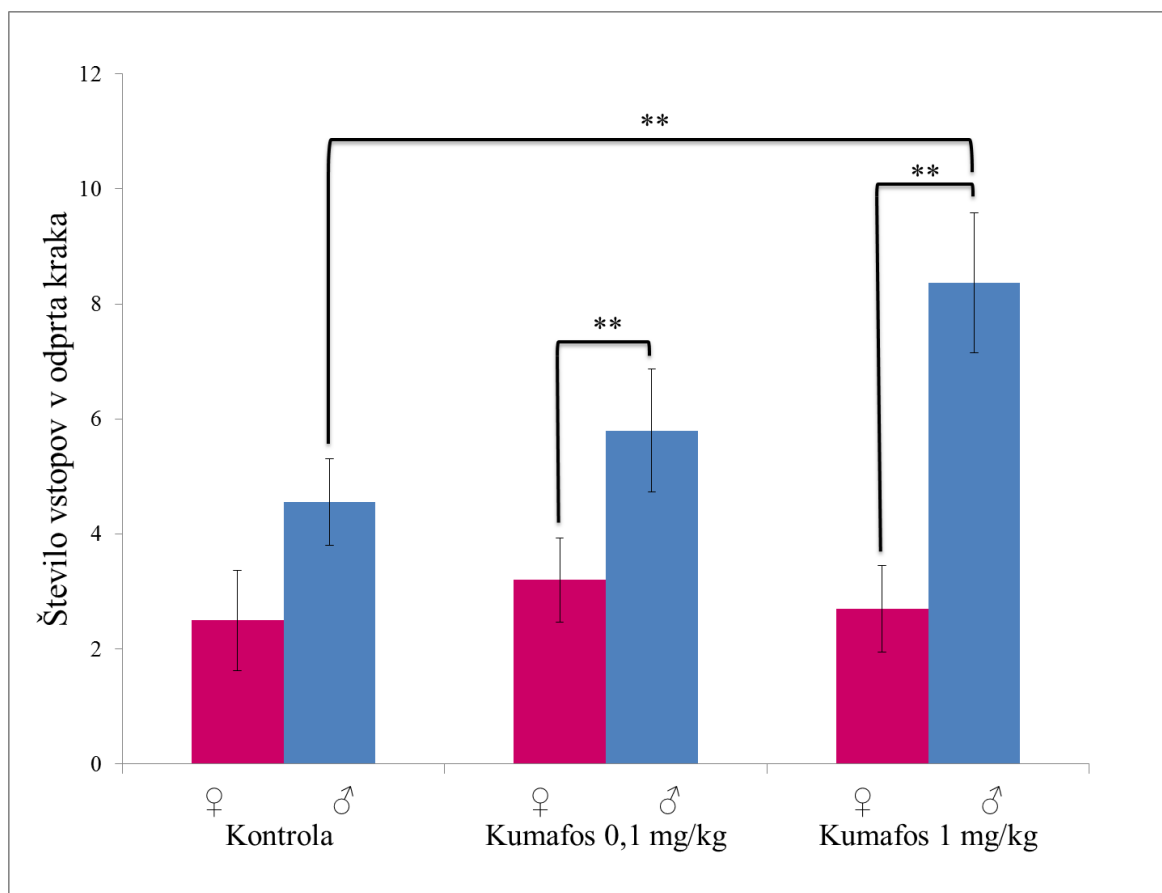
Slika 6: Rezultati skupnega časa zadrževanja testnih miši v odprtih krakih EPM

Primerjava časa, ki ga je testna miš preživela v odprtih krakih, glede na izpostavitve kumafosu in spol ter prikaz intervalov standardnih napak in statistično značilnih razlik. Statistično značilni razliki sta se pojavili med spoloma obeh kumafosu izpostavljenih skupin. *Legenda:* Kontrola – kontrolna skupina testnih miši, ki ni bila izpostavljena kumafosu; Kumafos 0,1 mg/kg – skupina testnih miši, ki je bila izpostavljena nižjemu odmerku kumafosa (0,1 mg/kg); Kumafos 1 mg/kg – skupina testnih miši, ki je bila izpostavljena višjemu odmerku kumafosa (1 mg/kg); ♀ – samice znotraj testne skupine; ♂ – samci znotraj testne skupine; ** – statistično značilna razlika



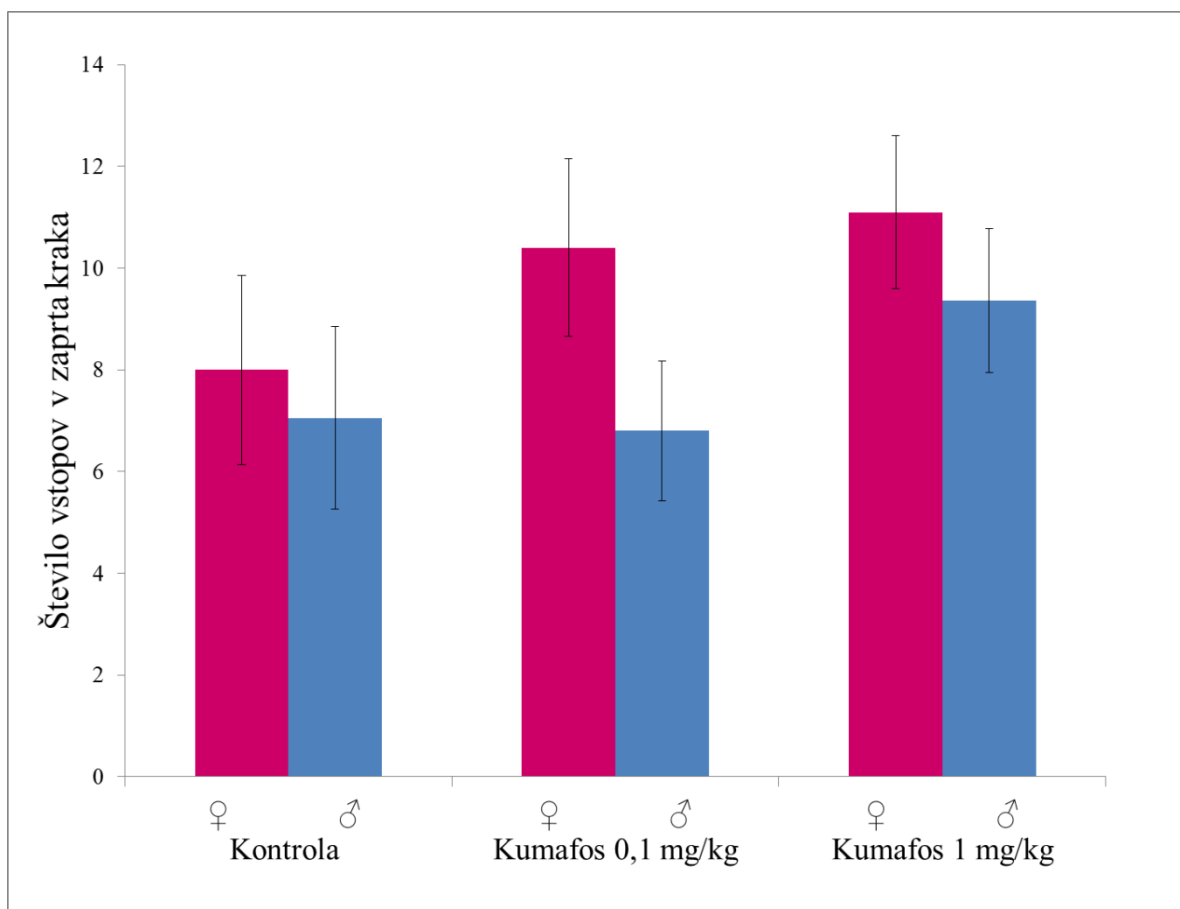
Slika 7: Rezultati skupnega časa zadrževanja testnih miši v zaprtih krakih EPM

Primerjava časa, ki ga je testna miš preživela v zaprtih krakih, glede na izpostavitve kumafosu in spol ter prikaz intervalov standardnih napak. Legenda: Kontrola – kontrolna skupina testnih miši, ki ni bila izpostavljena kumafosu; Kumafos 0,1 mg/kg – skupina testnih miši, ki je bila izpostavljena nižjemu odmerku kumafosa (0,1 mg/kg); Kumafos 1 mg/kg – skupina testnih miši, ki je bila izpostavljena višjemu odmerku kumafosa (1 mg/kg); ♀ – samice znotraj testne skupine; ♂ – samci znotraj testne skupine



Slika 8: Rezultati števila vstopov testnih miši v odprta kraka EPM

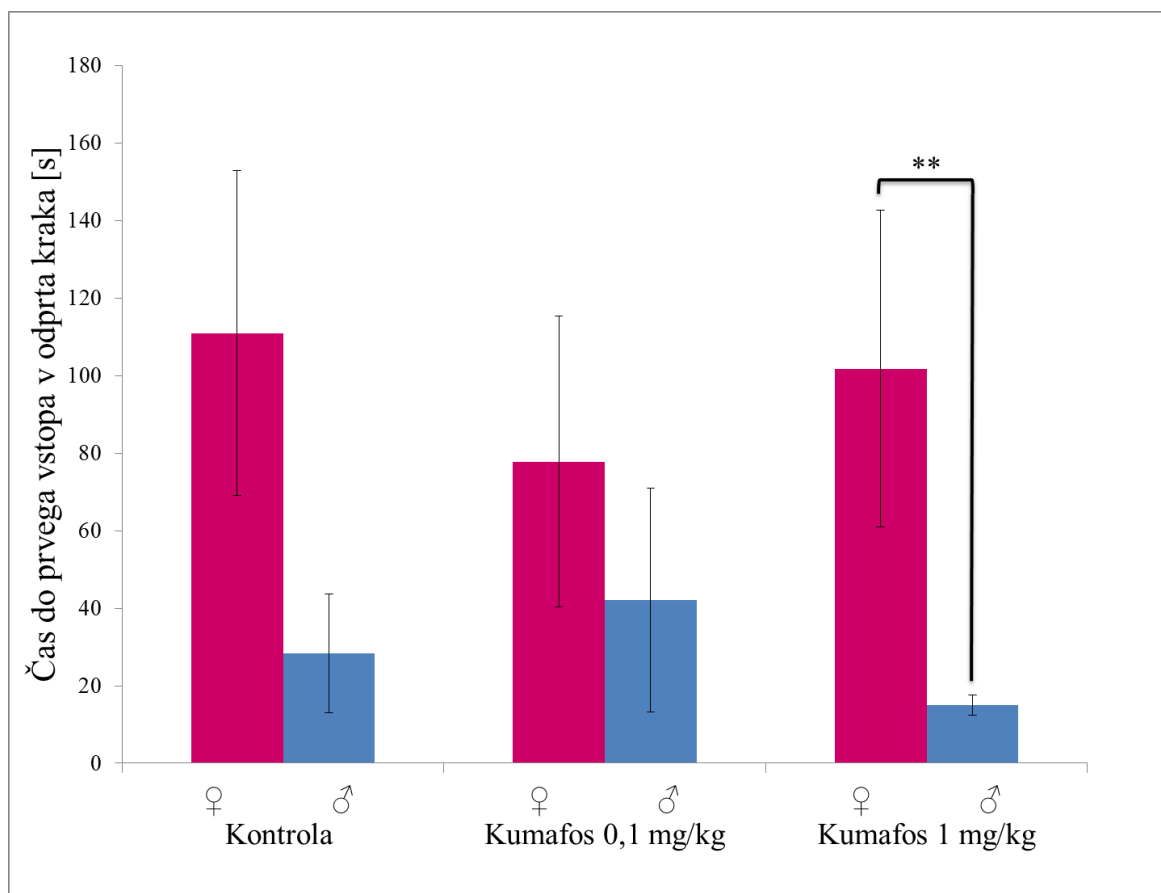
Primerjava števila vstopov glede na izpostavitve kumafosu in spol ter prikaz intervalov standardnih napak in statistično značilnih razlik. Statistično značilne razlike so se pojavile med spoloma obeh kumafosu izpostavljenih skupin in tudi med samci kontrolne skupine in skupine, ki je bila izpostavljena višjemu odmerku kumafosa (1 mg/kg). Legenda: Kontrola – kontrolna skupina testnih miši, ki ni bila izpostavljena kumafosu; Kumafos 0,1 mg/kg – skupina testnih miši, ki je bila izpostavljena nižjemu odmerku kumafosa (0,1 mg/kg); Kumafos 1 mg/kg – skupina testnih miši, ki je bila izpostavljena višjemu odmerku kumafosa (1 mg/kg); ♀ – samice znotraj testne skupine; ♂ – samci znotraj testne skupine; ** – statistično značilna razlika



Slika 9: Rezultati števila vstopov testnih miši v zaprta kraka EPM

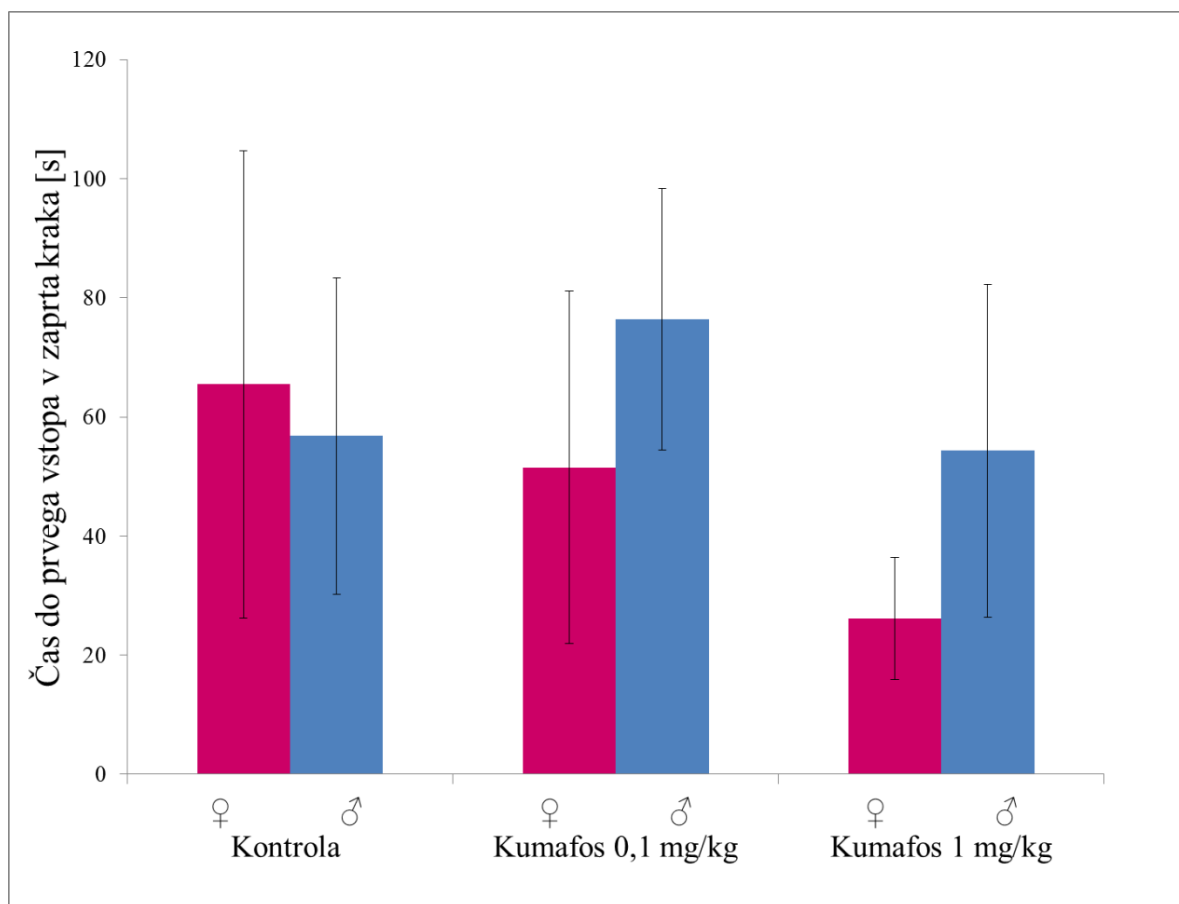
Primerjava števila vstopov glede na izpostavitve kumafosu in spol ter prikaz intervalov standardnih napak.

Legenda: Kontrola – kontrolna skupina testnih miši, ki ni bila izpostavljena kumafosu; Kumafos 0,1 mg/kg – skupina testnih miši, ki je bila izpostavljena nižjemu odmerku kumafosa (0,1 mg/kg); Kumafos 1 mg/kg – skupina testnih miši, ki je bila izpostavljena višjemu odmerku kumafosa (1 mg/kg); ♀ – samice znotraj testne skupine; ♂ – samci znotraj testne skupine



Slika 10: Rezultati časa do prvega vstopa testnih miši v odprta kraka EPM

Primerjava časov glede na izpostavitve kumafosu in spol ter prikaz intervalov standardnih napak in statistično značilnih razlik. Statistično značilna razlika se je pojavila med spoloma skupine, ki je bila izpostavljena višjemu odmerku kumafosa (1 mg/kg). Legenda: Kontrola – kontrolna skupina testnih miši, ki ni bila izpostavljena kumafosu; Kumafos 0,1 mg/kg – skupina testnih miši, ki je bila izpostavljena nižjemu odmerku kumafosa (0,1 mg/kg); Kumafos 1 mg/kg – skupina testnih miši, ki je bila izpostavljena višjemu odmerku kumafosa (1 mg/kg); ♀ – samice znotraj testne skupine; ♂ – samci znotraj testne skupine; ** – statistično značilna razlika



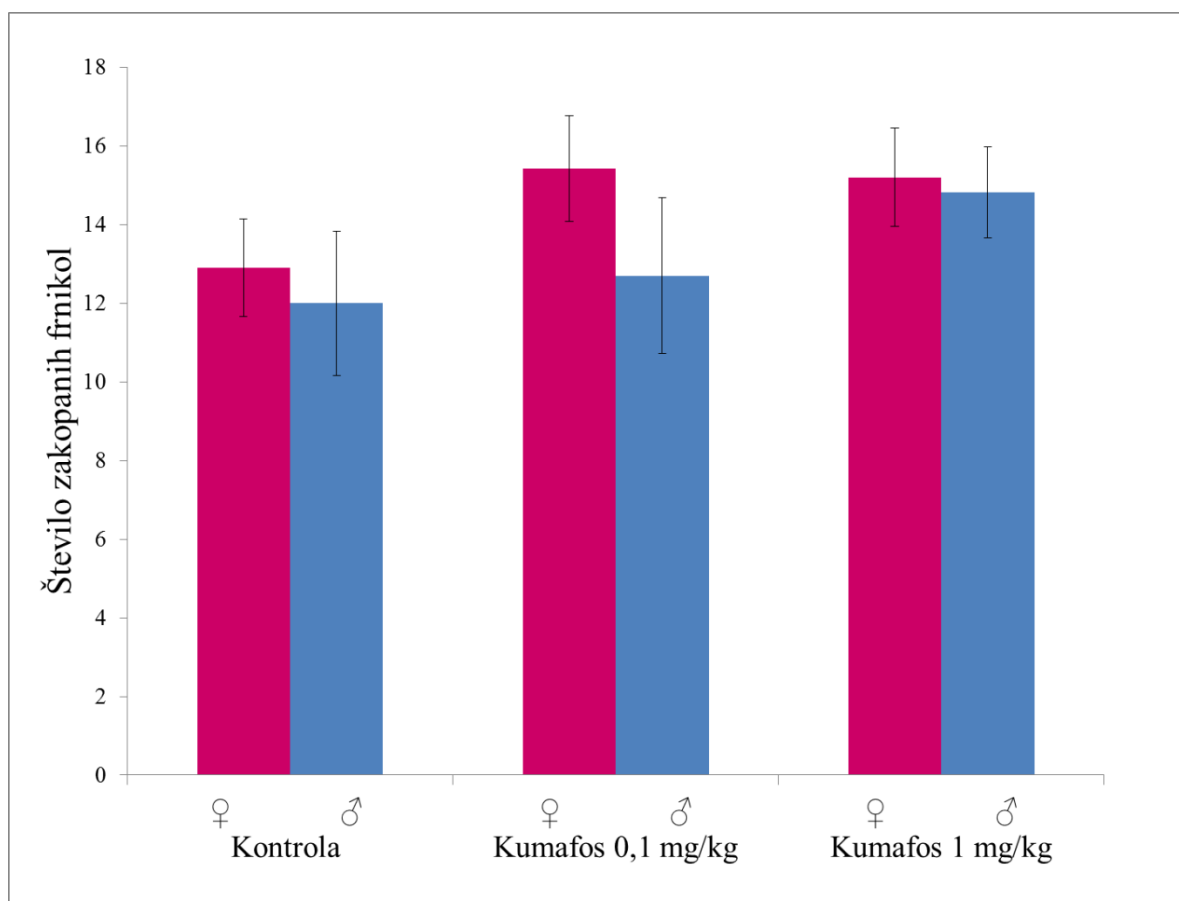
Slika 11: Rezultati časa do prvega vstopa testnih miši v zaprta kraka EPM

Primerjava časov glede na izpostavitve kumafosu in spol ter prikaz intervalov standardnih napak. Legenda: Kontrola – kontrolna skupina testnih miši, ki ni bila izpostavljena kumafosu; Kumafos 0,1 mg/kg – skupina testnih miši, ki je bila izpostavljena nižjemu odmerku kumafosa (0,1 mg/kg); Kumafos 1 mg/kg – skupina testnih miši, ki je bila izpostavljena višjemu odmerku kumafosa (1 mg/kg); ♀ – samice znotraj testne skupine; ♂ – samci znotraj testne skupine

4.2 REZULTATI TESTA Z ZAKOPAVANJEM FRNIKOL

Test z zakopavanjem frnikul smo izvajali kot drugi zaporedni test in v istem dnevu kot EPM. Uporabili smo 10 samic in 11 samcev, ki so bili izpostavljeni visokemu odmerku kumafosa (1 mg/kg), 7 samic in 10 samcev, ki so bili izpostavljeni nizkemu odmerku kumafosa (0,1 mg/kg) ter 10 samic in 9 samcev, ki so predstavljali kontrolno skupino. Večina miši je izhajala iz prvega gnezda samic, le 4 samci iz skupine, izpostavljene višjemu odmerku kumafosa, so bili iz drugega gnezda. Opazovali smo, koliko frnikul je posamezna miš zakopala. Kot zakopano frnikulo smo upoštevali najmanj 2/3 celotne

frnikule pod steljo. Rezultate smo obdelali z dvosmerno analizo variance in kot spremenljivki upoštevali odmerek kumafosa in spol. Pokazalo se je, da ni prišlo do statistično značilnih razlik med obravnavanimi skupinami in tudi med spoloma ne (sl. 12).



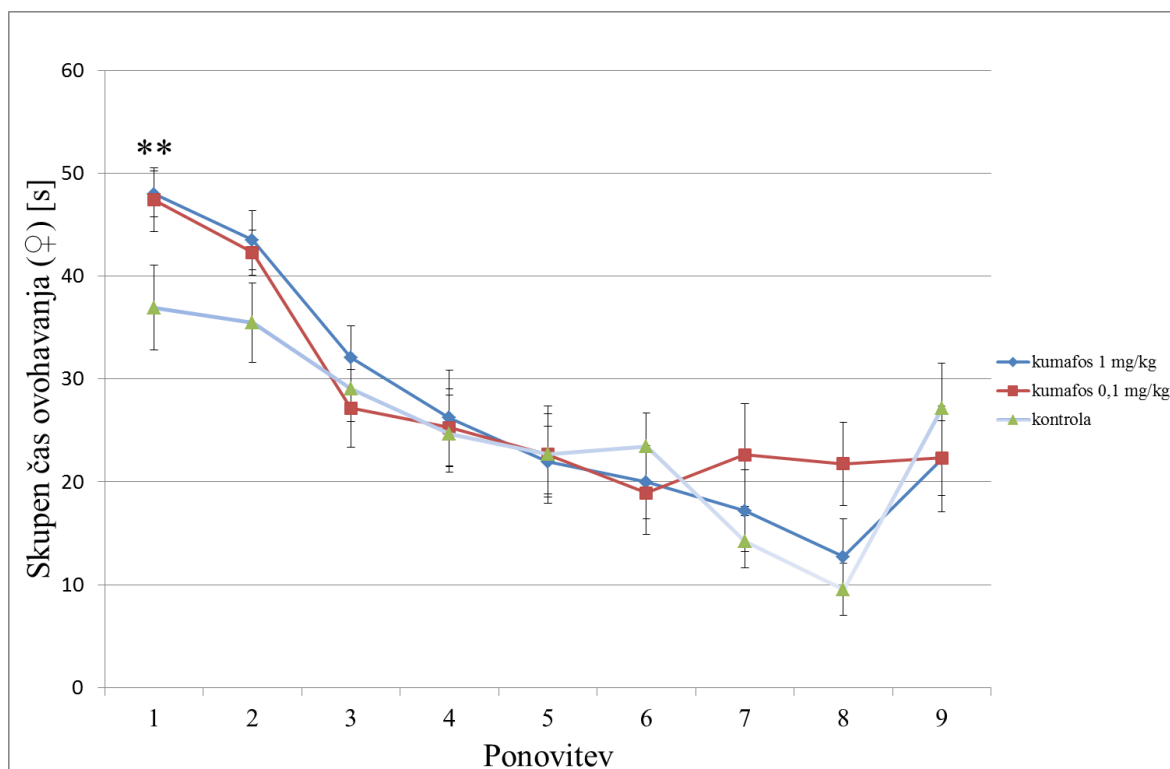
Slika 12: Rezultati testa z zakopavanjem frnikol

Primerjava števila frnikol, ki so jih zakopale testne miši, glede na izpostavitve kumafosu in spol ter prikaz intervalov standardnih napak. Kontrola – kontrolna skupina testnih miši, ki ni bila izpostavljena kumafosu; Kumafos 0,1 mg/kg – skupina testnih miši, ki je bila izpostavljena nižjemu odmerku kumafosa (0,1 mg/kg); Kumafos 1 mg/kg – skupina testnih miši, ki je bila izpostavljena višjemu odmerku kumafosa (1 mg/kg); ♀ – samice znotraj testne skupine; ♂ – samci znotraj testne skupine

4.3 REZULTATI TESTA SOCIALNEGA PREPOZNAVANJA

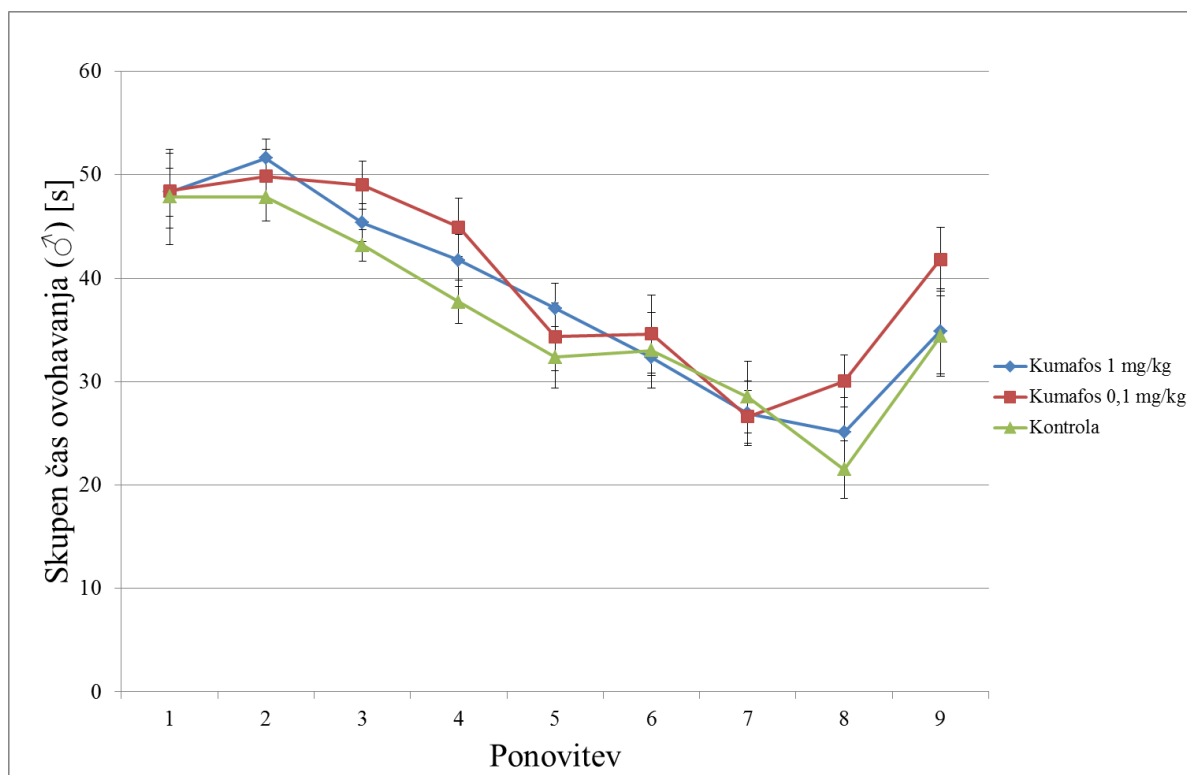
Test socialnega prepoznavanja je sledil testu zakopavanja frnikul, med njima je bil razmik vsaj en dan. Uporabili smo 10 samic in 10 samcev, ki so bili izpostavljeni visokemu odmerku kumafosa (1 mg/kg), 10 samic in 9 samcev, ki so bili izpostavljeni nizkemu

odmerku kumafosa (0,1 mg/kg) ter 9 samic in 8 samcev, ki so bili kontrolna skupina. Ponovno je večina testnih živali izhajala iz prvega gnezda, 3 samci izpostavljeni visokemu odmerku kumafosa pa so izhajali iz drugega gnezda. Pri testu smo beležili celotno trajanje ovohavanja, latenco ovohavanja in število ovohavanj na eno ponovitev izpostavljenosti testne miši stimulusni samici. Pri rezultatih smo se osredotočili na trajanje ovohavanja in s pomočjo statistične obdelave ugotovili, da med testnimi skupinami ni prišlo do statistično značilnih razlik. Z analizo variance, kjer smo izračune naredili za vsak spol posebej, smo najprej preverili, če se pojavijo razlike med 1. in 8. ponovitvijo ter 8. in 9. ponovitvijo. Kot spremenljivki smo vzeli odmerek kumafosa in ponovitev testa. Statistično značilna razlika med 1. in 8. ponovitvijo se je pojavila pri obeh spolih ($p < 0,001$), čas ovohavanja se je pri obeh opazno zmanjšal (sl. 13 in sl. 14). Pri 1. ponovitvi se je statistično značilna razlika pokazala tudi med kontrolno skupino in obema izpostavljenima skupinama samic, kjer so samice kontrolne skupine pokazale občutno manjše zanimanje za stimulusno žival v primerjavi z ostalima skupinama ($p < 0,01$). Tudi med 8. in 9. ponovitvijo se je tako pri samicah ($p < 0,01$) kot tudi pri samcih ($p < 0,001$) pokazala statistično značilna razlika, pri obeh spolih se je čas ovohavanja pri 9. ponovitvi povečal (sl. 13 in sl. 14).



Slika 13: Rezultati časov ovohavanja testnih živali pri mišjih samicah

Primerjava časov ovohavanja skozi ponovitve izpostavljanja stimulusni samici glede na izpostavljenost kumafosu ter prikaz intervalov standardnih napak in statistično značilnih razlik. Statistično značilna razlika se je pojavila med kontrolno skupino samic in obema kumafosu izpostavljenima skupinama samic. Legenda: Kontrola – kontrolna skupina testnih miši, ki ni bila izpostavljena kumafosu; Kumafos 0,1 mg/kg – skupina testnih miši, ki je bila izpostavljena nižjemu odmerku kumafosa (0,1 mg/kg); Kumafos 1 mg/kg – skupina testnih miši, ki je bila izpostavljena višjemu odmerku kumafosa (1 mg/kg); ♀ – samice; ** – statistično značilna razlika



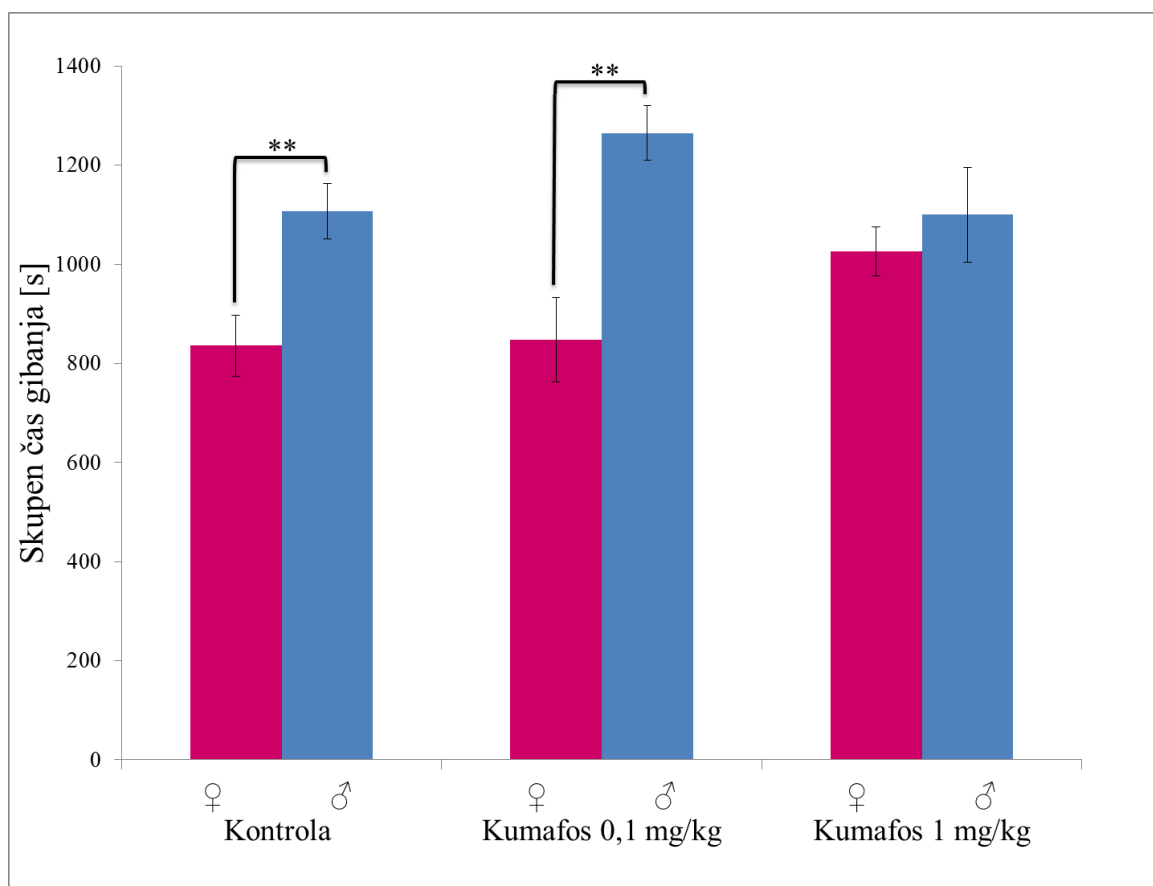
Slika 14: Rezultati časov ovohavanja testnih živali pri mišjih samcih

Primerjava časov ovohavanja skozi ponovitve izpostavljanja stimulusni samici glede na izpostavljenost kumafosu ter prikaz intervalov standardnih napak. Legenda: Kontrola – kontrolna skupina testnih miši, ki ni bila izpostavljena kumafosu; Kumafos 0,1 mg/kg – skupina testnih miši, ki je bila izpostavljena nižjemu odmerku kumafosa (0,1 mg/kg); Kumafos 1 mg/kg – skupina testnih miši, ki je bila izpostavljena višjemu odmerku kumafosa (1 mg/kg); ♂ – samci

4.4 REZULTATI TESTA ODPRTEGA POLJA

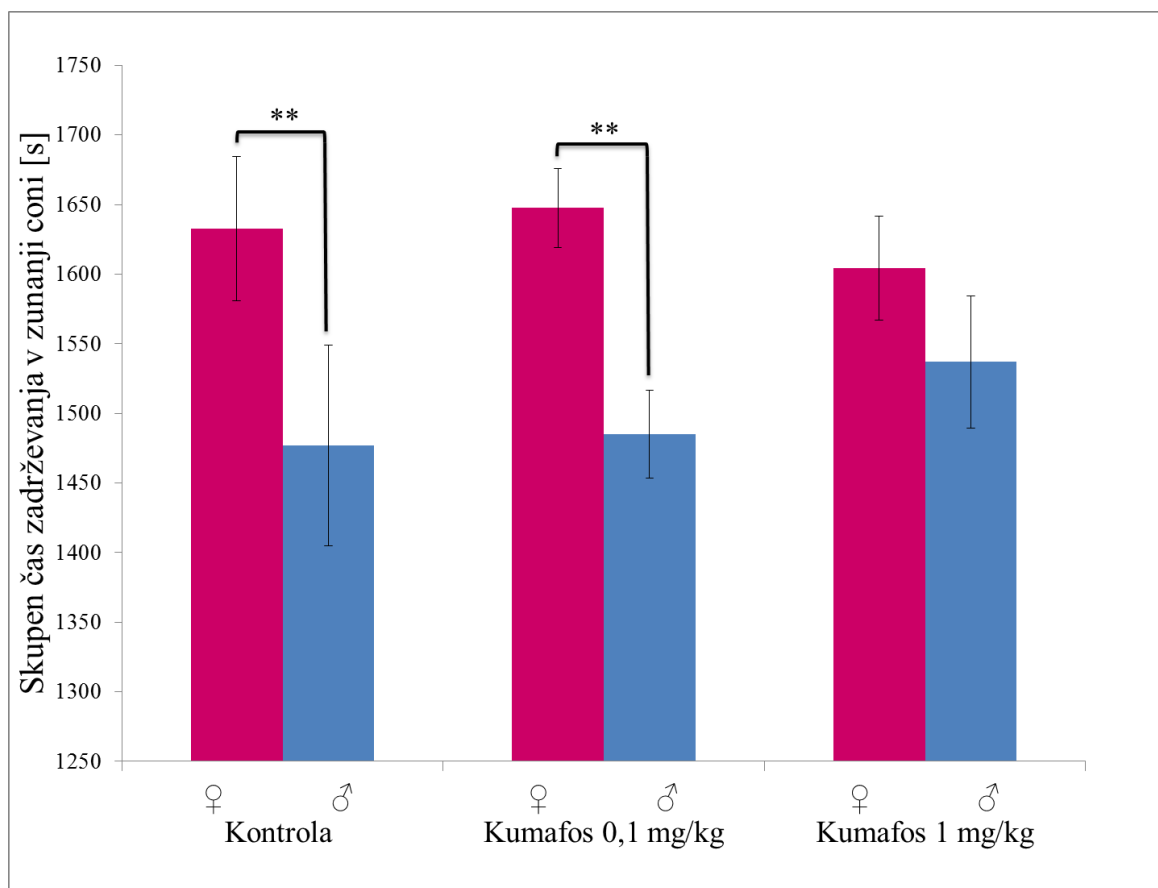
Po testu socialnega prepoznavanja smo z najmanj enodnevnim zamikom opravljali OFT. Uporabili smo 10 samic in 9 samcev, ki so bili izpostavljeni visokemu odmerku kumafosa (1 mg/kg), 10 samic in 8 samcev, ki so bili izpostavljeni nizkemu odmerku kumafosa (0,1 mg/kg) ter 9 samic in 8 samcev iz kontrolne skupine. Večina jih je bila iz prvega gnezda, 2 samca izpostavljena višji koncentraciji kumafosa pa sta izhajala iz 2. gnezda. Pri testu smo beležili več parametrov in se pri rezultatih osredotočili na čas gibanja, čas zadrževanja v zunanji coni, čas gibanja v zunanji coni, čas zadrževanja v notranji coni, čas gibanja v notranji coni, število vstopov v notranjo cono, čas do prvega vstopa v notranjo cono in razdalja, opravljena v notranji coni. Rezultate smo pregledali z dvosmerno analizo

variance, kjer smo kot spremenljivki vzeli odmerek kumafosa in spol. Tudi tukaj se razlike med skupinami niso pokazale, ponovno so bile v večini primerov prisotne statistično značilne razlike med spoloma, kjer so samci bili manj časa v nepremičnem stanju ($p < 0,001$; sl. 15), se manj časa zadrževali v zunanji coni ($p < 0,01$; sl. 16), večkrat vstopili v notranjo cono ($p < 0,001$; sl. 21), se tam zadrževali več časa ($p < 0,01$; sl. 17) in opravili tudi večjo razdaljo ($p < 0,001$; sl. 22).



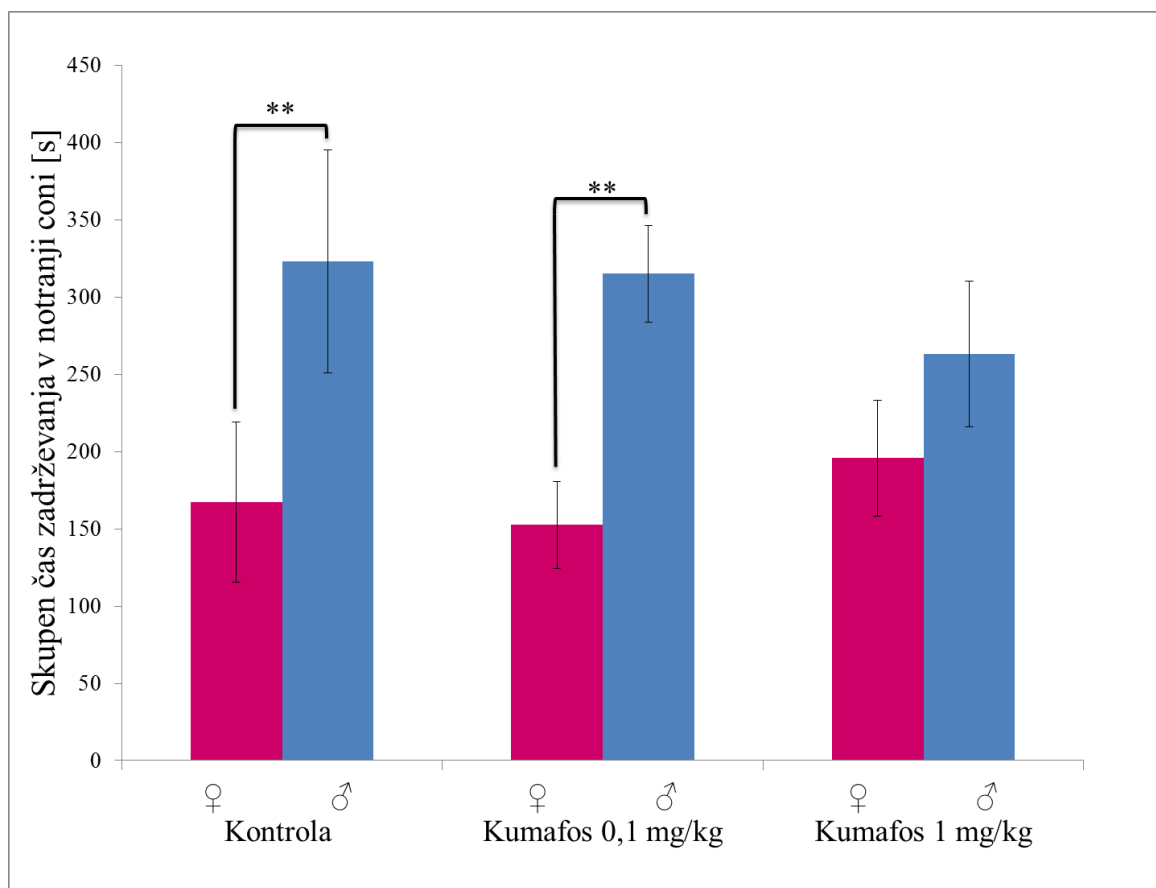
Slika 15: Rezultati skupnega časa gibanja testnih miši pri OFT

Primerjava časov glede na izpostavitve kumafosu in spol ter prikaz intervalov standardnih napak in statistično značilnih razlik. Statistično značilni razliki sta se pojavili med spoloma kontrolne skupine in skupine, ki je bila izpostavljena nižjemu odmerku kumafosa (0,1 mg/kg). Legenda: Kontrola – kontrolna skupina testnih miši, ki ni bila izpostavljena kumafosu; Kumafos 0,1 mg/kg – skupina testnih miši, ki je bila izpostavljena nižjemu odmerku kumafosa (0,1 mg/kg); Kumafos 1 mg/kg – skupina testnih miši, ki je bila izpostavljena višjemu odmerku kumafosa (1 mg/kg); ♀ – samice znotraj testne skupine; ♂ – samci znotraj testne skupine; ** – statistično značilna razlika



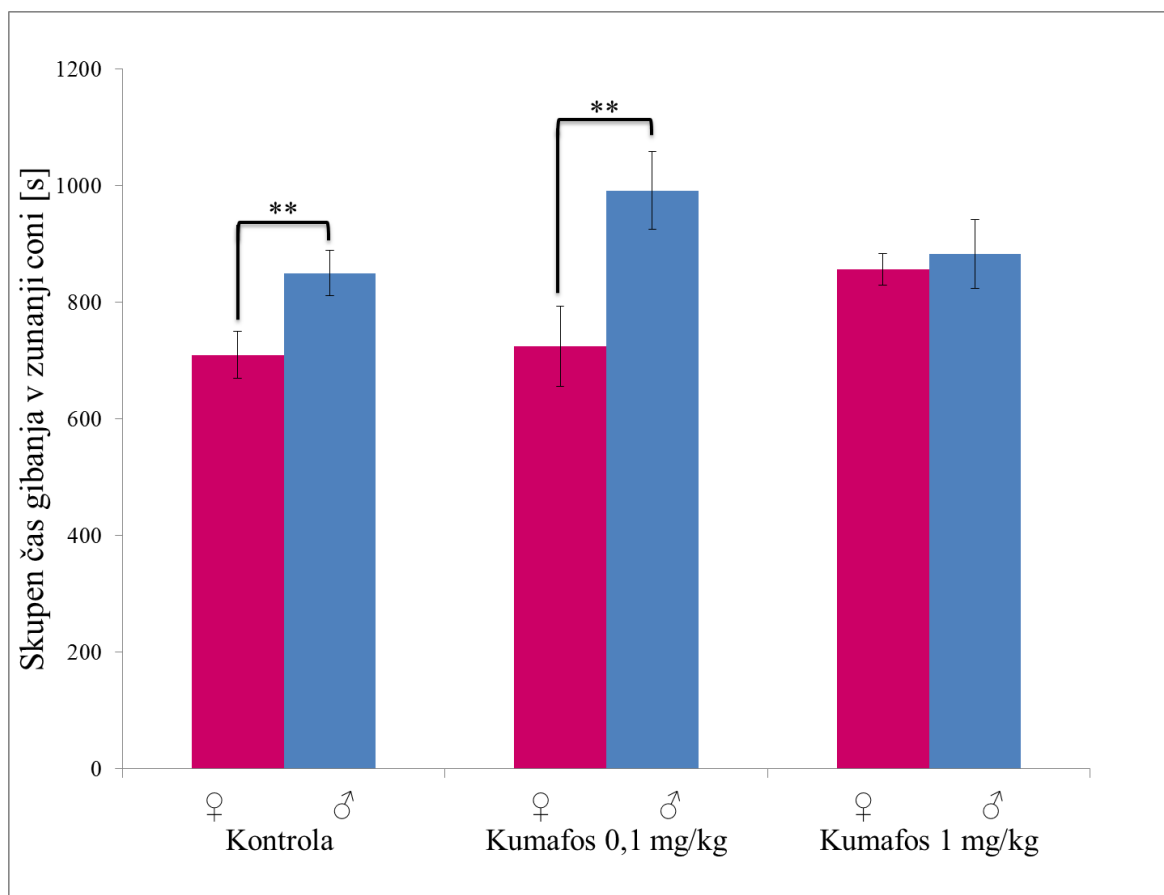
Slika 16: Rezultati skupnega časa zadrževanja testnih miši v zunanji coni pri OFT

Primerjava časov glede na izpostavitve kumafosu in spol ter prikaz intervalov standardnih napak in statistično značilnih razlik. Statistično značilni razliki sta se pojavili med spoloma kontrolne skupine in skupine, ki je bila izpostavljena nižjemu odmerku kumafosa (0,1 mg/kg). Legenda: Kontrola – kontrolna skupina testnih miši, ki ni bila izpostavljena kumafosu; Kumafos 0,1 mg/kg – skupina testnih miši, ki je bila izpostavljena nižjemu odmerku kumafosa (0,1 mg/kg); Kumafos 1 mg/kg – skupina testnih miši, ki je bila izpostavljena višjemu odmerku kumafosa (1 mg/kg); ♀ – samice znotraj testne skupine; ♂ – samci znotraj testne skupine; ** – statistično značilna razlika



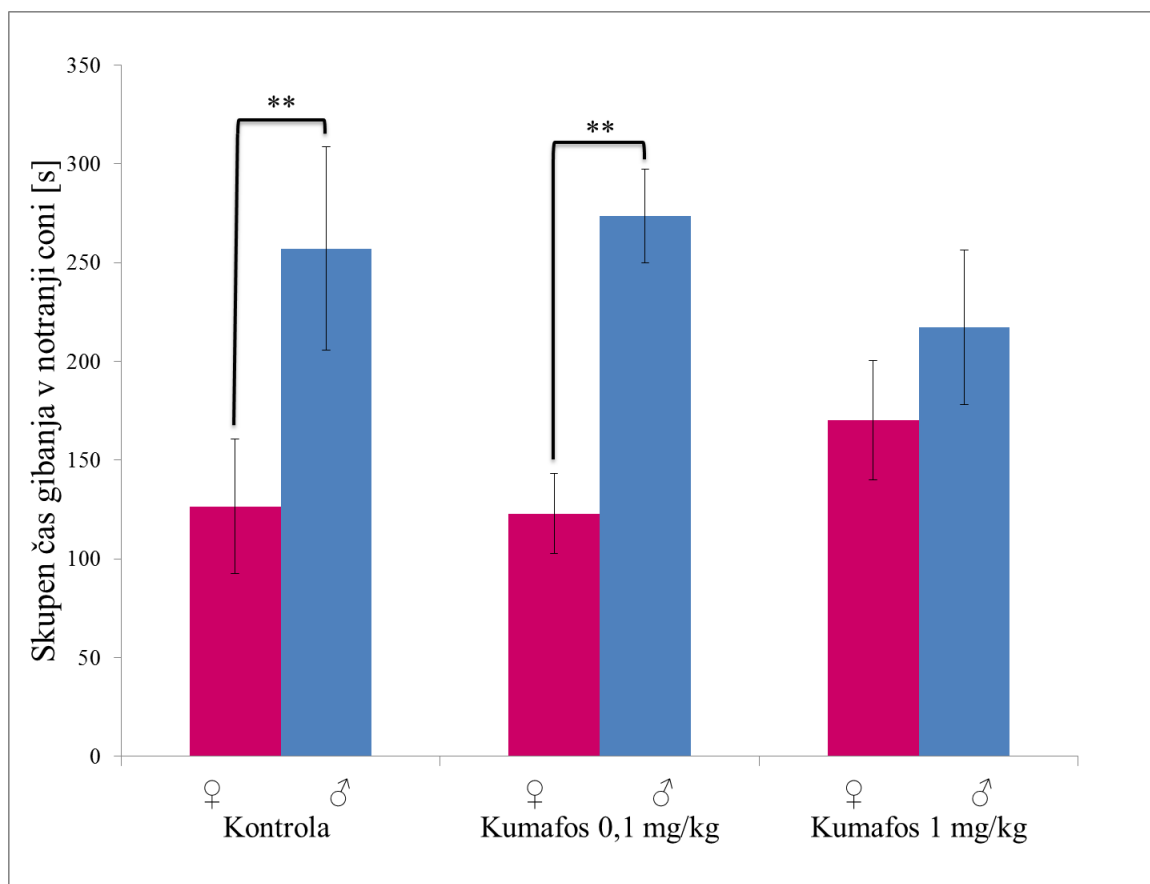
Slika 17: Rezultati skupnega časa zadrževanja testnih miši v notranji coni pri OFT

Primerjava časov glede na izpostavitve kumafosu in spol ter prikaz intervalov standardnih napak in statistično značilnih razlik. Statistično značilni razliki sta se pojavili med spoloma kontrolne skupine in skupine, ki je bila izpostavljena nižjemu odmerku kumafosa (0,1 mg/kg). Legenda: Kontrola – kontrolna skupina testnih miši, ki ni bila izpostavljena kumafosu; Kumafos 0,1 mg/kg – skupina testnih miši, ki je bila izpostavljena nižjemu odmerku kumafosa (0,1 mg/kg); Kumafos 1 mg/kg – skupina testnih miši, ki je bila izpostavljena višjemu odmerku kumafosa (1 mg/kg); ♀ – samice znotraj testne skupine; ♂ – samci znotraj testne skupine; ** – statistično značilna razlika



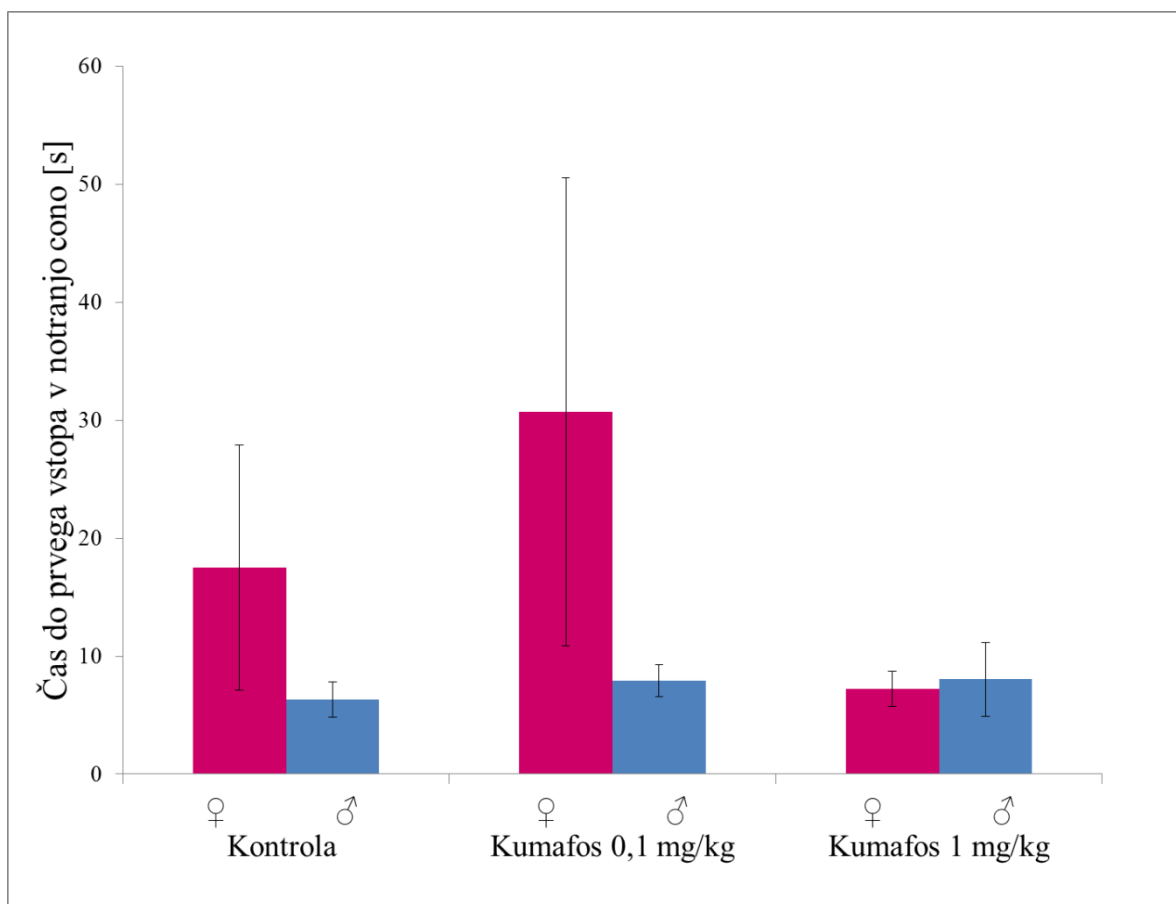
Slika 18: Rezultati skupnega časa gibanja testnih miši v zunanji coni pri OFT

Primerjava časov glede na izpostavitve kumafosu in spol ter prikaz intervalov standardnih napak in statistično značilnih razlik. Statistično značilni razliki sta se pojavili med spoloma kontrolne skupine in skupine, ki je bila izpostavljena nižjemu odmerku kumafosa (0,1 mg/kg). Legenda: Kontrola – kontrolna skupina testnih miši, ki ni bila izpostavljena kumafosu; Kumafos 0,1 mg/kg – skupina testnih miši, ki je bila izpostavljena nižjemu odmerku kumafosa (0,1 mg/kg); Kumafos 1 mg/kg – skupina testnih miši, ki je bila izpostavljena višjemu odmerku kumafosa (1 mg/kg); ♀ – samice znotraj testne skupine; ♂ – samci znotraj testne skupine; ** – statistično značilna razlika



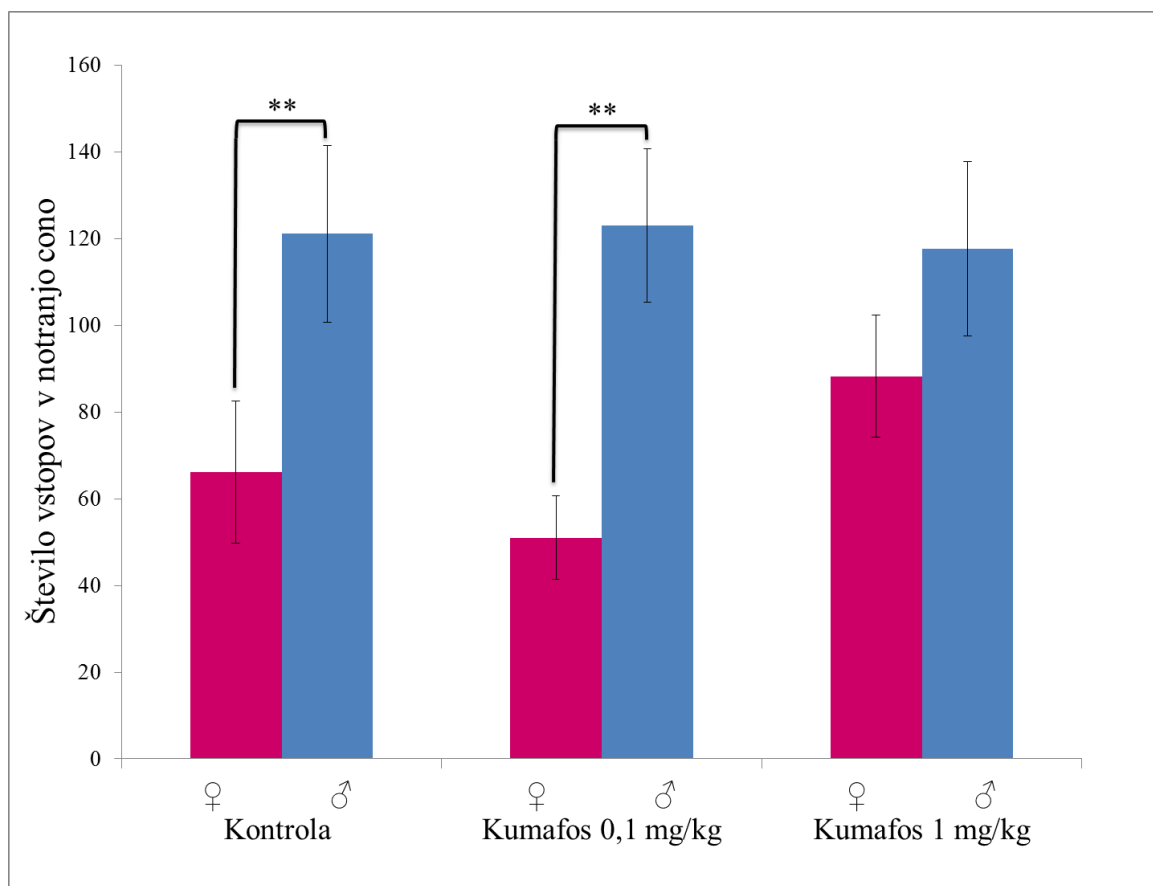
Slika 19: Rezultati skupnega časa gibanja testnih miši v notranji coni pri OFT

Primerjava časov glede na izpostavitve kumafosu in spol ter prikaz intervalov standardnih napak in statistično značilnih razlik. Statistično značilni razliki sta se pojavili med spoloma kontrolne skupine in skupine, ki je bila izpostavljena nižjemu odmerku kumafosa (0,1 mg/kg). Legenda: Kontrola – kontrolna skupina testnih miši, ki ni bila izpostavljena kumafosu; Kumafos 0,1 mg/kg – skupina testnih miši, ki je bila izpostavljena nižjemu odmerku kumafosa (0,1 mg/kg); Kumafos 1 mg/kg – skupina testnih miši, ki je bila izpostavljena višjemu odmerku kumafosa (1 mg/kg); ♀ – samice znotraj testne skupine; ♂ – samci znotraj testne skupine; ** – statistično značilna razlika



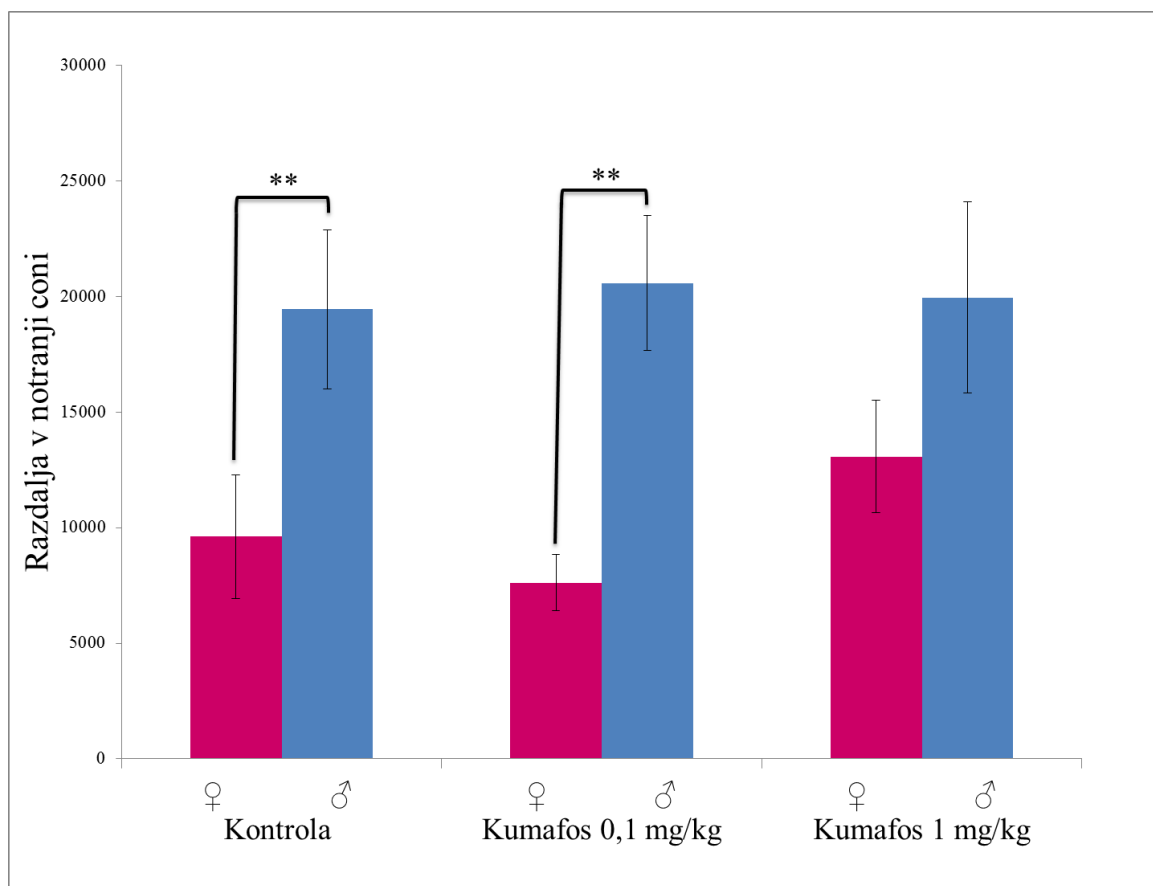
Slika 20: Rezultati časa do prvega vstopa testnih živali v notranjo cono pri OFT

Primerjava časov glede na izpostavitve kumafosu in spol ter prikaz intervalov standardnih napak. Legenda: Kontrola – kontrolna skupina testnih miši, ki ni bila izpostavljena kumafosu; Kumafos 0,1 mg/kg – skupina testnih miši, ki je bila izpostavljena nižjemu odmerku kumafosa (0,1 mg/kg); Kumafos 1 mg/kg – skupina testnih miši, ki je bila izpostavljena višjemu odmerku kumafosa (1 mg/kg); ♀ – samice znotraj testne skupine; ♂ – samci znotraj testne skupine



Slika 21: Rezultati števila vstopov testnih živali v notranjo cono pri OFT

Primerjava števila vstopov glede na izpostavitve kumafosu in spol ter prikaz intervalov standardnih napak in statistično značilnih razlik. Statistično značilni razliki sta se pojavili med spoloma kontrolne skupine in skupine, ki je bila izpostavljena nižjemu odmerku kumafosa (0,1 mg/kg). Legenda: Kontrola – kontrolna skupina testnih miši, ki ni bila izpostavljena kumafosu; Kumafos 0,1 mg/kg – skupina testnih miši, ki je bila izpostavljena nižjemu odmerku kumafosa (0,1 mg/kg); Kumafos 1 mg/kg – skupina testnih miši, ki je bila izpostavljena višjemu odmerku kumafosa (1 mg/kg); ♀ – samice znotraj testne skupine; ♂ – samci znotraj testne skupine; ** – statistično značilna razlika



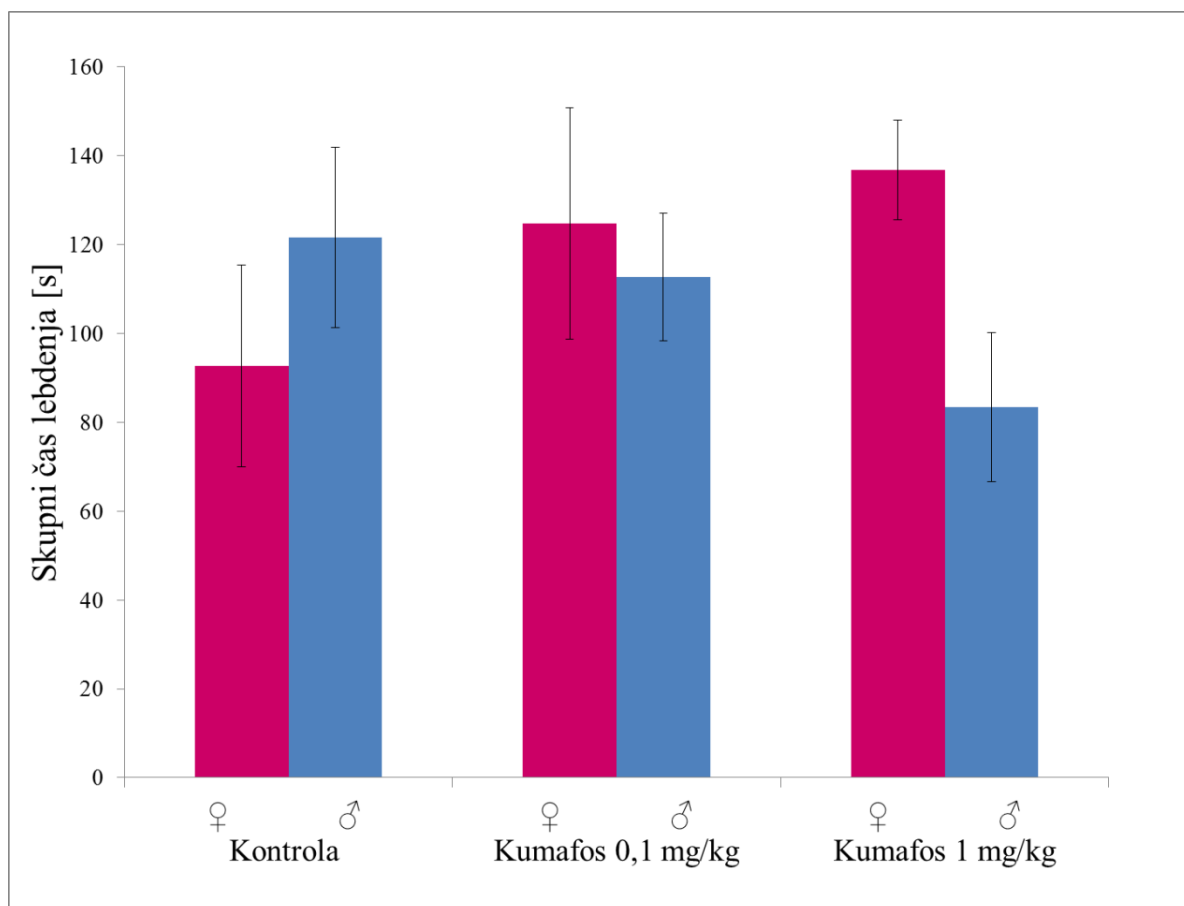
Slika 22: Rezultati opravljenega razdalje tesnih miši v notranji coni pri OFT

Primerjava razdalj glede na izpostavitve kumafosu in spol ter prikaz intervalov standardnih napak in statistično značilnih razlik. Statistično značilni razliki sta se pojavili med spoloma kontrolne skupine in skupine, ki je bila izpostavljena nižjemu odmerku kumafosa (0,1 mg/kg). Legenda: Kontrola – kontrolna skupina testnih miši, ki ni bila izpostavljena kumafosu; Kumafos 0,1 mg/kg – skupina testnih miši, ki je bila izpostavljena nižjemu odmerku kumafosa (0,1 mg/kg); Kumafos 1 mg/kg – skupina testnih miši, ki je bila izpostavljena višjemu odmerku kumafosa (1 mg/kg); ♀ – samice znotraj testne skupine; ♂ – samci znotraj testne skupine; ** – statistično značilna razlika

4.5 REZULTATI TESTA PRISILNEGA PLAVANJA (FST)

FST smo izvajali po testu odprtega polja na isti dan. Uporabili smo 10 samic in 9 samcev, ki so bili izpostavljeni visokemu odmerku kumafosa (1 mg/kg), 10 samic in 9 samcev, ki so bili izpostavljeni nizkemu odmerku kumafosa (0,1 mg/kg) ter 9 samic in 8 samcev iz kontrolne skupine. Večina jih je bila iz prvega gnezda, 2 samca, izpostavljena visokemu odmerku kumafosa, pa sta prihajala iz 2. gnezda. Merili smo več različnih parametrov in se

pri analizi rezultatov osredotočili na čas plavanja in lebdenja ter latenco plavanja in lebdenja. Tudi pri tem testu smo rezultate obdelali z dvosmerno analizo variance, kjer smo kot spremenljivki ponovno vzeli spol in odmerek kumafosa. Izračuni so pokazali, da ni prišlo do statistično značilne razlike ne med skupinama, izpostavljenima kumafosu in kontrolno skupino ter prav tako ne med spoloma (sl. 23).



Slika 23: Rezultati skupnega časa lebdenja na vodi tesnih miši pri FS

Primerjava časov glede na izpostavitve kumafosu in spol ter prikaz intervalov standardnih napak. Legenda: Kontrola – kontrolna skupina testnih miši, ki ni bila izpostavljena kumafosu; Kumafos 0,1 mg/kg – skupina testnih miši, ki je bila izpostavljena nižjemu odmerku kumafosa (0,1 mg/kg); Kumafos 1 mg/kg – skupina testnih miši, ki je bila izpostavljena višjemu odmerku kumafosa (1 mg/kg); ♀ – samice znotraj testne skupine; ♂ – samci znotraj testne skupine

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

OP predstavljajo resno grožnjo za okolje in žive organizme tudi v nizkih odmerkih, kar je bilo dokazano s številnimi raziskavami, v katere so bili vključeni živalski modeli in tudi različne izpostavljene skupine ljudi, ki živijo na področjih intenzivnega kmetijstva. OP ovirajo normalno delovanje živčnega sistema, povzročajo oksidativni stres in se obnašajo kot hormonski motilci (Gupta in sod., 2011). Literatura navaja veliko primerov vpliva neprestane izpostavljenosti nizkim odmerkom OP na nastanek različnih duševnih bolezni, kot so napadi tesnobe, depresija in zmanjšanje kognitivnih sposobnosti (Bushnell in Moser, 2006). O vplivih izpostavljenosti kumafosu pri ljudeh je bilo narejenih nekaj raziskav (Alavanja in sod., 2003; Christensen in sod., 2010; Thomas in sod., 2010). Veliko znanstvenikov tudi potrjuje potencialno nevarnost zaradi njegove prisotnosti v medu kot posledico intenzivnega zatiranja *V. Jacobsoni* v čebelarstvu v EU (Bachvarova in sod., 1988; Fernandez-Muiño in sod., 1994; Maver in Poklukar, 2003). Raziskav, ki bi ugotavljale vplive kumafosa na laboratorijske živali, praktično ni. Zato smo se odločili raziskati vpliv dolgotrajnega izpostavljanja nizkim odmerkom kumafosa na laboratorijske miši seva balb/c. Miši smo izpostavljali OP v obdobju razvoja, ko naj bi bili organizmi najbolj dovzetni za strupeno delovanje in posledično nastanek dolgoročnih poškodb možganov ter nepravilnosti v smislu pojava duševnih motenj. V ta namen smo uporabljali teste obnašanja in z njimi ugotavljali obnašanje podobno anksioznosti, depresiji in odstopajočega socialnega vedenja.

Predpostavili smo torej, da nizki odmerki kumafosa delujejo na razvoj možganov in povzročajo razvoj obnašanj prej omenjenih motenj pri odraslih miših. Pri tistih, ki so bile izpostavljene kumafosu, se bi naj pokazale statistično značilne razlike v primerjavi z mišmi, ki kumafosu niso bile izpostavljene.

Za preverjanje obnašanja, podobnega anksioznosti, smo se posluževali treh različnih testov. Prvi izmed njih je bil EPM. Osredotočeni na število vstopov, čas do prvega vstopa in čas zadrževanja v odprtem in zaprtem kraku labirinta smo po statistični obdelavi ugotovili, da v večini parametrov med kontrolno skupino in izpostavljenima skupinama ni

prišlo do statistično značilnih razlik. Razlika se je pojavila le pri samcih v številu vstopov v odprti krak. Samci, ki so bili izpostavljeni 1 mg/kg kumafosa, kar je višji odmerek izpostavljenosti, so večkrat vstopili v odprta kraka v primerjavi s kontrolno skupino, kar v tem primeru kaže celo na anksiolitično učinkovanje kumafosa izpostavljenih samcev in tako popolnoma nasprotuje našima predpostavkama. Omeniti je treba tudi trend zmanjšanja časa zadrževanja v odprtih krakih z višanjem odmerka kumafosa pri samicah, čeprav se med skupinami niso pokazale statistično značilne razlike. Ker tudi pri ostalih parametrih med skupinami miši ni prišlo do razlik, je večja verjetnost, da kumafos v nizkih koncentracijah ne vpliva na razvoj miši in ne povzroča nastanka anksioznosti podobnega obnašanja. Pri raziskavah z drugimi OP so bili rezultati drugačni. Čeh in sodelavci (2012) so en del svoje raziskave OP klormefosa zastavili zelo podobno kot mi, le da so namesto kumafosa uporabili klormefos. Miši so prav tako testirali z EPM in izkazalo se je, da klormefos v dozi 3,5 µg/ml deluje anksiogeno, sodeč po daljšem zadrževanju miši v zaprtem kraku. Tudi pri vplivu OP klorpirifosa na mišje samice so Braquenier in sodelavci (2010) z EPM ugotovili, da se je pri samicah, katerih matere so bile v času brejosti ali dojenja 18 dni izpostavljene klorpirifosu, prav tako pojavilo anksioznosti podobno obnašanje. Pri treh različnih izpostavitvah (0,2 mg/kg, 1 mg/kg in 5 mg/kg) so bile najbolj nagnjene k anksioznosti podobnemu stanju samice, ki so prejemale 1 mg/kg, kar se je kazalo z najnižjim številom vstopov in časom zadrževanja v odprtem prostoru v primerjavi z ostalimi. Rezultati EPM torej kažejo, da kumafos v primerjavi z ostalimi OP ne deluje tako anksiogeno.

Naši rezultati opravljenih testov EPM prav tako kažejo razliko med samicami in samci. Samci več časa preživijo na odprtem kraku, tudi večkrat stopijo vanj in tudi latenca prvega vstopa je manjša v primerjavi s samicami. Ti rezultati potrjujejo že ugotovljeno dejstvo, da se samice raje zadržujejo v zaprtih krakih in se prirejeno obnašajo bolj anksiozno v primerjavi s samci, kar v pregledu dosedanjih dognanj glede testa EPM navajata tudi Walf in Frye (2009). Omeniti je treba, da se z višanjem odmerka izpostavljenosti kumafosu pri parametrih odprtega kraka povečujejo tudi razlike med spoloma.

Naslednji test, s katerim smo pri miših ugotavljali anksioznosti podobno obnašanje, je bil test z zakopavanjem frnikol. Statistična obdelava rezultatov je pokazala, da med

izpostavljenimi skupinami in kontrolno skupino ni prišlo do statistično značilnih razlik. Ta ugotovitev sovпада tudi z rezultati EPM. Nasprotno pa ni prišlo do razlik med spoloma. V drugih raziskavah na področju ugotavljanja delovanja OP se nikjer niso posluževali metode z zakopavanjem frnikul za ugotavljanje anksiozenih učinkov. Postavlja se tudi vprašanje, če je zakopavanje frnikul sploh lahko odraz takšnega učinkovanja. Thomas in sodelavci (2009) so v svoji raziskavi, kjer so preverjali, če se test z zakopavanjem frnikul lahko uporablja kot preverjanje obnašanja, podobnega anksioznosti, ugotovili, da je takšno vedenje pri miših prej odraz kopanja in neke vrste ponavljajočega se odziva na neznan ali znan predmet.

Kot zadnji test za preverjanje anksioznosti podobnega obnašanja je bil opravljen OFT. Podobno kot pri EPM se je tudi pri večini parametrov OFT pojavila statistično značilna razlika zgolj med samicami in samci. Pri merjenju razdalje so samci prehodili več kot samice. Tudi njihovo gibanje je bilo hitrejše, kar z drugimi besedami pomeni, da so bile samice več časa v nepremičnem stanju. Glede na že bolj prirojeno anksiozno vedenje samic so se pričakovano v primerjavi s samci zadrževale več časa v zunanji coni. Kljub temu so samci v zunanji coni naredili večjo razdaljo. Razlika se je pojavila tudi pri številu vstopov v notranjo cono, samci so v primerjavi s samicami ponovno to opravili večkrat, bili tam tudi več časa in naredili večjo razdaljo. Za razliko od EPM se pri OFT razlika med spoloma ni povečevala glede na višanje odmerka kumafosa. Po rezultatih sodeč, so samci bolj aktivni od samic, kar sovпада tudi z dognanji Guolda in sodelavcev (2009), kjer so v pregledu dosedanjih ugotovitev glede OFT navedli, da so pri miših tipa balb/c samci bolj aktivni.

Med izpostavljenima skupina in kontrolo do statistično značilnih razlik ni prišlo, kar še dodatno ovrže naše predvidevanje, da kumafos v nizkih odmerkih izpostavljenosti v času razvoja miši vpliva na nastanek nepravilnosti na ravni možganov in posledično vpliva na obnašanje. Ta ugotovitev pa se ne ujema samo z našo hipotezo, ampak tudi z nekaterimi raziskavami in dognanji o drugih OP. Ricceri in sodelavci (2006) so ugotavljali vpliv takšnih odmerkov klorpirifosa, ki ne povzročajo spremembe nivoja aktivnosti AChE v možganih v pre- in ponatalnem obdobju mladičev in potem s pomočjo izvedbe OFT na

mišjih samcih ugotovili, da določeni odmerki izpostavljenosti v določenem obdobju povzročajo hiperaktivnost.

Če povzamemo, dolgotrajna izpostavljenost nizkim odmerkom kumafosa v razvojnem času miši po izvedbi vseh treh testov, ki služijo za ugotavljanje stanja podobnega anksioznosti pri miših, ne povzroča odstopanj od normalnega obnašanja miši. S tem je naša osnovna hipoteza o anksioznem delovanju kumafosa ovržena.

Predvidevali smo, da bo dolgotrajna izpostavljenost nizkim odmerkom kumafosa povzročala odstopanja v normalnem socialnem obnašanju in spominu testnih miši, kar bi lahko namigovalo, da lahko s strupenim delovanjem v času razvoja sproži nastanek avtizma (Crawley, 2007). Rezultati naših testov socialnega prepoznavanja so pokazali, da kumafos ne povzroča takšnih sprememb, saj je socialno obnašanje miši potekalo normalno. Zanimanje za stimulusno samico skozi ponovitve se je zmanjševalo in potem ob njeni zamenjavi pri 9. ponovitvi spet povečalo. S tem je naša predpostavka o tem, da kumafos povzroča odstopanja v socialnem obnašanju izpostavljenih testnih miši, ponovno ovržena. V grafu so torej rezultati zarisali značilno krivuljo, ki do 8. ponovitve pada, pri 9. pa se trend spremeni v naraščanje. Takšne ugotovitve smo podkrepili tudi z analizo variance, kjer smo naredili primerjavo znotraj testnih skupin in tudi skupine med sabo 1. in 8. izpostavitve ter 8. in 9. izpostavitve. V prvi primerjavi je pri vseh skupinah v prvi ponovitvi prišlo do daljšega časa ovohavanja kot pri 8. ponovitvi (tako pri samicah kot pri samcih je bil p zelo majhen). Pri samicah se je pri 1. testu pokazala tudi razlika med kontrolno skupino in obema izpostavljenima skupinama, kar kaže na bolj anksioznosti podobno obnašanje izpostavljenih samic. V kasnejših ponovitvah se časi ovohavanja izenačijo, kar najverjetneje nakazuje, da na razlike ni vplivala izpostavljenost kumafosu. Prav tako tudi primerjava 8. in 9. ponovitve kaže na normalno socialno vedenje testnih živali, saj se je pokazala statistično značilna razlika, kjer se ob zamenjavi stimulusne samice zaradi večjega zanimanja za novo žival v testni kletki poveča čas ovohavanja. Ker so že te primerjave pokazale, da ni prišlo do odstopanj od normalnega socialnega vedenja miši, nadaljnjih statističnih obdelav podatkov nismo delali. Ugotovili smo še, da je prišlo tudi do manjše razlike med spoloma, kar je tudi normalno, saj samci prirojeno pokažejo večje zanimanje za novo žival v njihovem okolju. Rezultati torej kažejo socialno obnašanje

miši, ki se sklada s predhodnimi ugotovitvami o normalnem vedenju in spominu miši pri testu socialnega prepoznavanja (Winslow, 2003).

O vplivu OP na odstopajoče socialno obnašanja kot enega izmed znakov avtizma zaradi izpostavitve v razvoju pri ljudeh raziskav skoraj ni. Le raziskovalna skupina Venerosi je v svojem sklopu ugotavljanja strupenosti klorpirifosa na podlagi številnih testov obnašanja ugotavljala njegov morebitni vpliv na socialnost testnih miši. Štiri mesece stare samice, ki so bile pre- in postnatalno izpostavljene različnim nizkim odmerkom klorpirifosa, so testirali s testom socialnega prepoznavanja, kjer so bili osredotočeni na raziskovanje nove neznane samice in hkrati merili tudi ultrazvočno oglašanje. V nasprotju z našimi ugotovitvami o kumafosu se je pri prenatalno izpostavljenih samicah povišala frekvenca oglašanja in ovohavanja ter tako potrdila tezo, da dolgotrajna izpostavljenost nizkim odmerkom klorpirifosa v času razvoja povzroča dolgoročne spremembe v socialnem obnašanju miši (Venerosi in sod., 2006).

Depresiji podobno obnašanje smo ugotavljali s testom prisiljenega plavanja. Izvajali smo ga kot zadnjega, saj gre za najbolj invazivnega med vsemi izvedenimi testi. Predpostavili smo, da bodo nizki odmerki kumafosa dolgoročno vplivali na razvoj depresiji podobnega obnašanja. Ob morebitnem vplivu bi se pri miših pri testu prisiljenega plavanja pokazali znaki depresiji podobnega obnašanja, kot je daljši čas lebdenja na vodi. Naši rezultati so pokazali, da pri tem parametru ni prišlo do razlik med izpostavljenima skupinama in kontrolno skupino. Kumafos tako v nizkih odmerkih pri miših ni povzročil nastanka depresiji podobnega obnašanja. Literatura navaja tudi, da se lahko pojavijo razlike med spoloma (Hascoët in Bourin, 2009), kar pa se pri naših testiranih miših ni pokazalo.

Do podobnih rezultatov so prišli tudi Venerosi in sod. (2010) pri še eni raziskavi vpliva prenatalne izpostavitve klorpirifosa, tokrat na razvoj znakov, značilnih za depresiji podobno obnašanje pri miših. Miši so prejemale tudi antidepresiv fluvoksamin, kar je mogoče pripomoglo k takšnim zaključkom, po drugi strani pa so opazovali tudi anksioznosti podobno obnašanje, ki je bilo v večji meri prisotno pri izpostavljenih samicah.

Po rezultatih vseh petih testov sodeč, dolgotrajna izpostavljenost kumafosu v nizkih odmerkih v času razvoja ne vpliva na normalno delovanje možganov pri odraslih miših, s čimer naši osnovni hipotezi, ki predpostavljata nasprotno in sta nastali na podlagi nekaterih ugotovitev o drugih OP, nismo potrdili. Ker je bilo obnašanje miši normalno, najverjetneje ni prišlo do poškodb možganov in zaradi tega nadaljnji vpogled izraženosti genov z mikromrežami hipofize in imunohistokemičnimi metodami rezin možganov ni nujen. Predvsem pri samicah se kažejo določeni trendi v smeri povišanega anksioznosti podobnega obnašanja glede na višanje odmerka izpostavitve kumafosa. Zato bi bilo smiselno našo raziskavo razširiti v smeri povečanja testnih skupin in tudi opravljanja še drugih standardnih vedenjskih testov, s katerimi ugotavljamo anksioznosti podobno obnašanje testnih miši. Ker so se drugod pojavili znaki negativnega delovanja določenih OP tudi, ko so bile testne živali dolgotrajno izpostavljene v času odraslosti, bi bilo smiselno opraviti tudi vsa testiranja pri takšni izpostavljenosti miši. Primer takšnega delovanja OP so ugotovili, recimo, Lima in sod. (2009), ki so preverjali vpliv kronične izpostavljenosti nizkim odmerkom OP metamidofosa pri že odraslih miših na pojav depresiji podobnega vedenja. Rezultati njihove študije so pokazali, da so izpostavljene miši pri FST leblede več časa v primerjavi z manj ali neizpostavljenimi skupinami, kar kaže na razvoj depresiji podobnega stanja v odraslosti brez sistemske zastrupitve z metamidofosom in prav tako brez njegovega delovanja v času razvoja organizma. Glede na to, da so pri omenjenih raziskavah drugih OP testne živali izpostavljali tudi višjim odmerkom, bi lahko ponovili poskus z malenkost povišanimi odmerki kumafosa, ki še ne povzročajo sistemske zastrupitve in pretirano ne zmanjšajo delovanja AChE. To še dodatno podkrepijo druge študije, ki poročajo o tem, da se kumafos v naši neposredni bližini lahko nahaja nad dovoljenimi vrednostmi, kot nakazujejo različne ugotovitve o vsebnosti kumafosa v medu in pri kmetovalcih oz. delavcih, ki se z njim direktno rokujejo. Omeniti je potrebno tudi, da se poleg kumafosa za zatiranje *V. jacobsoni* v čebelarstvu uporabljajo še drugi OP in snovi z akarocidnim delovanjem. Številne študije kažejo na to, da se poleg kumafosa v medu in vosku nahajajo tudi snovi, kot so amitraz, bromopropilat, fluvalinat, malation, endosulfan, klorfenvifos, klorpirifos in ostali. Pri tem je treba poudariti, da nekateri na področjih vzorčenja medu in voska sploh niso dovoljeni za uporabo v čebelarstvu (Chauzat in Faucon, 2010; Fernandez-Muiño in sod., 1994; Serra-Bonvehí in Orantes-Bermejo, 2010). Veliko raziskav opozarja na še večjo strupenost določenega OP v kombinaciji z ostalimi

predstavniki te skupine in mešanic OP z drugimi pesticidi (Hernández in sod., 2012; Moser in sod., 2006), kar pomeni, da kumafos sam po sebi glede na rezultate našega dela ne predstavlja tveganja za ljudi, se pa zastavlja vprašanje, kakšen vpliv ima v kombinaciji z drugimi pesticidi. Zato bi bilo dobro našo raziskavo razširiti tudi v smeri ugotavljanja vpliva dolgotrajnega izpostavljanja nizkim odmerkom mešanic OP in drugih uporabljenih snovi v čebelarstvu na možgane v času razvoja organizma in tako posledično na razvoj različnih duševnih motenj v odraslem stanju.

6 POVZETEK

OP predstavljajo eno izmed glavnih okoljevarstvenih skrbi, saj zaradi njihove intenzivne uporabe v preteklosti in tudi v modernih časih resno ogrožajo zdravje ljudi. Akutni učinki OP so predvsem posledica nepovratnega zaviranja encima AChE, ki ima poglavitno vlogo v holinergični podenoti živčnega sistema. Akutne zastrupitve so zaradi dobrega razumevanja mehanizmov relativno dobro nadzorovane, medtem ko se pojavlja vse več vprašanj na temo posledic dolgotrajne izpostavljenosti OP v nizkih odmerkih, s katerimi smo zaradi obsežne uporabe in nepredvidenega zadrževanja skoraj neprestano v stiku preko okolja, predvsem na kmetijsko razvitih območjih, natančneje preko vode in hrane ter v neposrednem stiku tisti, ki se pri svojem delu rokujejo z OP bodisi v proizvodnji bodisi pri pripravi in nanašanju.

Številne raziskave potrjujejo sume o vplivu nizkih količin OP na ljudi, rezultat tega so predvsem različna odstopanja od normalnega delovanja živčnega sistema, ki pa se razlikujejo od tistih, ki nastanejo ob akutni zastrupitvi, kar kaže na druge mehanizme delovanja. Veliko raziskav kaže, da OP na tak način delujejo na normalno delovanje možganov, se vedejo tudi kot hormonski motilci in povzročajo oksidativni stres. Še posebej so občutljivi organizmi v času razvoja, kar se odraža predvsem kasneje v odraslem stanju v obliki različnih duševnih motenj, kot so napadi tesnobe, depresija, motnje kognitivnih sposobnosti ter odstopanja od normalnega socialnega vedenja in avtizem.

Kumafos še zmeraj velja za relativno varnega predstavnika OP, čeprav vse več raziskav kaže, da zaradi prisotnosti v okolju in neposrednega stika pri uporabi predstavlja potencialno nevarnost. Kumafos se uporablja kot zatiralec različnih prapadnikov debela členonožcev, predvsem za zatiranje klopov, ki povzročajo škodo živini v ZDA in za zatiranje *Varroa jacobsoni* v EU, ki je poglavitni krivec za pogin čebel in škodo v čebelarstvu. Številne študije potrjujejo njegovo prisotnost v našem okolju – pri delavcih v ZDA sicer ne zmanjšano aktivnostjo AChE, ampak prej preko presnovkov in zadrževanju na oblekah, maskah ter v zraku, kjer kumafos mešajo ali ga nanašajo. V EU veliko raziskav kaže na njegov negativen vpliv na čebele, predvsem pa se pojavljajo

vprašanja o njegovem prehajanju v med ter zadrževanju v medu oziroma njegovemu vplivu na ljudi preko uživanja medu. Različne raziskave potrjujejo njegovo prisotnost in čeprav so pod postavljenimi kritičnimi mejami, se zaradi ugotovitev, vezanih na konstantno izpostavljenost nizkim odmerkom nekaterih drugih OP pojavlja zaskrbljenost, če morda tudi kumafos ne deluje podobno.

O kumafosu v takšnih količinah in takšni izpostavljenosti je znanega zelo malo in raziskav, ki bi ugotavljale njegov vpliv na razvoj organizma in posledično pojavnost duševnih obolenj pri testnih živalih, dejansko ni. Zato smo se pri diplomskem delu osredotočili prav na to področje in preverjali njegov vpliv na miši balb/c, predvsem na ugotavljanje anksioznosti in depresiji podobnega stanja ter nepravilnega socialnega vedenja s pomočjo petih različnih standardnih testov obnašanja, ki služijo za odkrivanje omenjenih motenj. Za preverjanje anksioznosti podobnega obnašanja smo uporabili test dvignjenega labirinta (EPM), test z zakopavanjem frnikol in test odprtega polja (OFT). Za ugotavljanje depresiji podobnega vedenja smo uporabili test prisiljenega plavanja (FST). Socialno vedenje miši smo spremljali s testom socialnega prepoznavanja.

Preverjali smo 3 različne skupine, ki so bile izpostavljene dvema različnima odmerkoma kumafosa (1 mg/kg in 0,1 mg/kg), ena skupina pa je služila kot kontrola. Miši smo začeli izpostavljati dva tedna pred paritvijo. Njihovi potomci, ki smo jih kasneje v odraslem stanju testirali, so prejemale kumafos preko placente v neonatalnem času in nato po skotitvi preko materinega mleka do 21. dne starosti, ko smo jih odstavili.

Ko so bile miši stare 70 dni, smo začeli s testi. Kot prvega smo izvajali EPM, kjer smo v času 5 minut beležili čas zadrževanja, število vstopov in latenco prvega vstopa v odprt in zaprt krak ter vmesni prostor labirinta. Sledil je test z zakopavanjem frnikul, pri katerem smo po 30 minutah prešteli zakopane frnikule. Naslednji je bil test socialnega prepoznavanja, kjer smo v 9 ponovitvah po 1 minuto testni miši dodajali ovarioktemizirano stimulusno samico in socialno vedenje ocenjevali preko časa ovohavanja. Potem smo izvedli OFT, kjer smo 30 minut beležili aktivnost miši predvsem v smislu nepremičnosti in gibanja, zadrževanja v notranji in zunanji coni, aktivnosti v vsaki coni posamezno in tudi število vstopov ter latenco prvega vstopa v notranjo cono. Nazadnje smo opravili še FST,

kjer smo v 7 minut trajajočem testu merili predvsem čas lebdenja in plavanja. Sedem dni po zaključku testiranja smo miši žrtvovali in jim odvzeli možgane ali hipofizo za morebitno ugotavljanje izraženosti genov preko imunohistokemičnega barvanja ali mikromrež.

Rezultate smo nato obdelali z analizo variance in pokazalo se je, da se pri nobenem testu ni pokazala razlika med izpostavljenima in kontrolno skupino, pri EPM in OFT se je pokazale le statistično značilna razlika med spoloma, kar je pri miših normalno.

Po rezultatih sodeč kumafos torej ni povzročal razlike med izpostavljenimi mišmi in kontrolno skupino pri testih obnašanja, kar pomeni, da ni vplival na nastanek stanja, podobnega anksioznosti in depresiji pri miših, tudi njihovo socialno vedenje ni odstopalo. Kumafos torej naj ne bi negativno vplival na razvoj organizma in povečal pojavnost nevropsihiatričnih obolenj, vendar je zaradi majhnega števila raziskav na tem področju zaželeno, da se povečajo testne skupine miši in uporabijo tudi drugi standardni testi za ugotavljanje anksioznosti podobnega obnašanja, ter da se opravijo še dodatne študije, ki bi vključevale nekoliko višje odmerke in izpostavljenost v odraslem stanju testnih miši. Prav tako bi bilo dobro, da bi se glede na prisotnost ostalih OP in pesticidov v medu in vosku preverilo tudi vplive kronične izpostavljenosti nizkim odmerkom takšnih mešanic.

7 VIRI

- Alavanja M. C., Samanic C., Dosemeci M., Lubin J., Tarone R., Lynch C. F., Knott C., Thomas K., Hoppin J. A., Barker J., Coble J., Sandler D. P., Blair A. 2003. Use of agricultural pesticides and prostate cancer risk in the Agricultural Health Study cohort. *American Journal of Epidemiology*, 157, 9: 800-814
- Albrecht A. T., Herrick C. 2011. 100 Questions & Answers About Depression. 2nd edition. Boston, Jones and Bartlett Publishers: 206 str.
- Bachvarova D., Demirov P., Mollova N., Blagoeva Y. 1988. Mass spectral method for determination of insecticide residues in complex organic mixtures. *Doklady Bolgarskoi Akademii Nauk*, 41: 75-77
- Barlowa S. M., Greigh J. B., Bridges J. W., Carered A., Carpye A. J. M., Gallif C. L., Kleinerg J., Knudsenh I., Koëteri H. B. W. M., Levya L. S., Madseni C., Mayerj S., Narbonne J.-F., Pfannkuchl F., Prodanchukm M. G., Smithn M. R., Steinbergo P. 2002. Hazard identification by methods of animal-based toxicology. *Food and Chemical Toxicology*, 40, 2/3: 146-191
- Barrett D. S., Oehme F. W. 1985. A review of OP ester induced delayed neurotoxicity. *Veterinary and Human Toxicology*, 27: 22-37
- Bazylewicz-Walczak B., Majczakowa, W., Szymczak M. 1999. Behavioral effects of occupational exposure to organophosphorous pesticides in female greenhouse plantingworkers. *Neurotoxicology*, 20: 819-826
- Belzung C., Griebel G. 2001. Measurement of normal and pathological anxiety-like behaviour in mice: a review. *Behavioural Brain Research*, 125: 141-149
- Blain P. G. 2001. Adverse health effects after low level exposure to organophosphates. *Occupational and Environmental Medicine*, 58: 689-690
- Blizard D. A., Takahashi A., Galsworthy M. J., Martin B., Koide T. 2007. Test standardization in behavioural neuroscience: a response to Stanford. *Journal of Psychopharmacology*, 2, 2: 136-139
- Braqueniera J. B., Quertemontb E., Tirellib E., Plumiera J. C. 2010. Anxiety in adult female mice following perinatal exposure to chlorpyrifos. *Neurotoxicology and Teratology*, 32, 2: 234-239

- Broekkamp C. L., Rijk H. W., Joly-Gelouin D., Lloyd K. L. 1986. Major tranquilizers can be distinguished from minor tranquilizers on the basis of effects on marble burying and swim-induced grooming in mice. *European Journal of Pharmacology*, 126: 223-229
- Bushnell P. J., Moser V. C. 2006. Behavioral toxicity of cholinesterase inhibitors. V: *Toxicology of Organophosphates and Carbamates*. Gupta R. C. (ed.). Amsterdam, Elsevier, Academic Press: 347-360
- Calhoun J. 1963. *The Ecology and Sociology of the Norway Rat*. Bethesda, US Department of Health, Education and Welfare: 288 str.
- Carobrez A. P., Bertoglio L. J. 2005. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 29: 1193-1205
- Chauzat M.-P., Faucon J.-P. 2007. Pesticide residues in beeswax samples collected from honey bee colonies (*Apis mellifera* L.) in France. *Pest Management Science*, 63: 1100-1106
- Coumaphos. 1969. 1968 Evaluations of Some Pesticide Residues in Food. Geneva, Food and Agriculture Organization and World Health Organization: 12. str. <http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/v068pr10.htm> (27. 8. 2012)
- Coumaphos. 1996. EPA-738-F-96-014. Washington, D.C., US Environmental Protection Agency: 13 str.
- Crabbe, J. C., Morris R. G. M. 2004. Festina lente: late-night thoughts on high-throughput screening of mouse behavior. *Nature Neuroscience*, 7, 11: 1175-1179
- Crawley J. N. 2004. Designing mouse behavioral tasks relevant to autistic-like behaviors. *Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews*, 10: 248-258
- Crawley J. N. 2007. *What's Wrong With My Mouse? Behavioral Phenotyping of Transgenic and Knockout Mice*. 2nd edition. New Jersey, John Wiley & Sons, Inc.: 523 str.
- Crowley J. J., Jones M. D., O'Leary O. F., Lucki I. 2004. Automated tests for measuring the effects of antidepressants in mice. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 78, 2: 269-274

- Čeh K., Ježek D., Žužek M., Čebulj-Kadunc N., Majdič G. 2012. Effects of organophosphate chlormephos on development and function of testes and brain. *Slovenian Veterinary Research*, 49, 1: 41-49
- Deacon R. M. J. 2009. Digging in mice: marble burying, burrowing, and direct observation reveal changes in mouse behavior. V: *Mood and Anxiety Related Phenotypes in Mice. Characterization Using Behavioral Tests*, Volume I. Gould T. D. (ed.). New York, Springer: 37-46
- De Boer S. F., Koolhaas J. M. 2003. Defensive burying in rodents: ethology, neurobiology and psychopharmacology. *European Journal of Pharmacology*, 463: 145-161
- De Roos A. J., Zahm S. H., Cantor K. P., Weisenburger D. D., Holmes F. F., Burmeister L. F., Blair A. 2003. Integrative assessment of multiple pesticides as risk factors for non-Hodgkin's lymphoma among men. *Occupational and Environmental Medicine*, 60, 9: e11
doi: 10.1136/oem.60.9.e11
- Dettbarn W. D. 1984. Pesticide induced muscle necrosis: mechanisms and prevention. *Fundamental and Applied Toxicology*, 4: 18-26
- Dulawa S. C., Holick K. A., Gundersen B., Hen R. 2004. Effects of chronic fluoxetine in animal models of anxiety and depression. *Neuropsychopharmacology*, 29, 7: 1321-1330
- Eskenazi B., Bradman A., Castorina R. 1999. Exposures of children to organophosphate pesticides and their potential adverse health effects. *Environmental Health Perspectives*, 107, 3: 409-419
- Ferguson J. N., Young L. J., Hearn E. F., Matzuk M. M., Insel T. R., Winslow J. T. 2000. Social amnesia in mice lacking the *oxytocin* gene. *Nature Genetics*, 25, 3: 284-288
- Fernandez-Muiño M. A., Sancho M. T., Muniategui S., Huidobro J. F., Simal-Lozano J. 1994. Acaricide residues in honey: analytical methods and levels found. *Journal of Food Production*, 58, 4: 449-454
- File S. E., Lippa A. S., Beer B., Lippa M. T. 2004. Animal tests of anxiety. *Current Protocols in Neuroscience: Unit 8.3*
doi: 10.1002/0471142301.ns0803s26
- File S. E., Hyde J. R. 1978. Can social interactions be used to measure anxiety? *British Journal of Pharmacology*, 62, 1: 19-24

- Flint J., Corley R., DeFries J. C., Fulker D. W., Gray J. A., Miller S., Collins A. C. 1995. A simple genetic basis for a complex psychological trait in laboratory mice. *Science*, 269, 5229: 1432–1435
- Garcia S. J., Seidler F. J., Slotkin T. A. 2005. Developmental neurotoxicity of chlorpyrifos: targeting glial cells. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 19: 455-461
- Gomes J., Lloyd O. L. 2009. Oral exposure of mice to formulations of organophosphorous pesticides: gestational and litter outcomes. *International Journal of Environmental Health Research*, 19: 125-137
- Gould T. D., Dao D. T., Kovacsics C. E. 2009. The open field test. V: *Mood and Anxiety Related Phenotypes in Mice. Characterization Using Behavioral Tests*, Volume I. Gould T. D. (ed.). New York, Springer: 1-20
- Grubič Z. 2008. Zastrupitev z organofosfati. V: *Seminarji iz patološke fiziologije*, 1. izdaja. Ribarič S. (ur.). Ljubljana, Littera picta: 193-199
- Gruenberg A. M., Goldstein R. D., Pincus H. A. 2005. Classification of depression: research and diagnostic criteria: DSM-IV and ICD-10. V: *Biology of Depression*. Licinio J., Wong M. L. (ed.). Weinheim, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: 1-12
- Gupta R. C., Thornburg J. E., Stedman D. B., Welsch F. 1984. Effect of subchronic administration of methyl parathion on *in vivo* protein synthesis in pregnant rats and their conceptuses. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 72: 457-468
- Gupta R. C., Rech R. H., Lovell K. D., Welsch F., Thornburg J. E. 1985. Brain cholinergic, behavioral and morphological development in rats exposed *in utero* to methyl parathion. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 77: 405-413
- Gupta R. C. 2006a. Introduction. V: *Toxicology of Organophosphates and Carbamates*. Gupta R. C. (ed.). Amsterdam, Elsevier, Academic Press: 3-4
- Gupta R. C. 2006b. Classification and uses of organophosphates and carbamates. V: *Toxicology of Organophosphates and Carbamates*. Gupta R. C. (ed.). Amsterdam, Elsevier, Academic Press: 5-24
- Gupta R. C. 2009. Toxicology of the placenta. V: *General and Applied Toxicology*. Ballantyne B., Marrs T. C., Syversen T. (ed.). 3rd edition. Chichester, John Wiley & Sons, Ltd: 2003-2040

- Gupta R. C., Malik J. K., Milatovic D. 2011. Organophosphate and carbamate pesticides. V: Reproductive and Developmental Toxicology. Gupta R. C. (ed.). 1st edition. Amsterdam, Elsevier, Academic Press: 471-486
- Gyertyan I. 1995. Analysis of the marble burying response: marbles serve to measure digging rather than evoke burying. Behavioural Pharmacology, 6: 24-31
- Hall C. 1934. Drive and emotionality: factors associated with adjustment in the rat. Journal of Comparative Psychology, 27: 89-108
- Handley S. L., Mithani S. 1984. Effects of α -adrenoreceptoragonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. Naunyn-Schmeideberg's Arch Pharmacology, 327: 1-5
- Hascoët M., Bourin M. 2009. The forced swimming test in mice: a suitable model to study antidepressants. V: Mood and Anxiety Related Phenotypes in Mice. Characterization Using Behavioral Tests, Volume I. Gould T. D. (ed.). New York, Springer: 85-118
- Herbert M. R. 2006. Autism. V: Neurobiology of Disease. 1st edition. Gilman S. (ed.). Burlington, Academic Press: 581-591
- Hernández A. F., Parrón T., Tsatsakis A. M., Requena M., Alarcón R., López-Guarnido O. 2012. Toxic effects of pesticide mixtures at a molecular level: their relevance to human health. Toxicology, 307: 136-145
doi: 10.1016/j.tox.2012.06.009
- Hoggs S. 1996. A review of the validity and variability of the elevated plus maze as an animal model of anxiety. Pharmacology Biochemistry and Behavior, 54: 21-30
- Holsboer F., Ströhle A. 2005. Preface. V: Anxiety and Anxiolytic Drugs. Holsboer F., Ströhle A. (ed.). Berlin, Heidelberg, Springer: V-X
- Hoppin J. A., Umbach D. M., London S. J., Hennenberger P. K., Kullman G. J., Coble J., Alavanja M. C. R., Beane Freeman L. E., Sandler D. P. 2009. Pesticide use and adult-onset asthma among male farmers in the agricultural health study. European Respiratory Journal, 34: 1296-1303
- Hudson B. B. 1950. One-trial learning in the domestic rat. General Psychology, 41: 99-145
- Huen H., Bradman A., Harley K., Yousefi Y., Boyd Barr D., Eskenazi B., Holland N. 2012. Organophosphate pesticide levels in blood and urine of women and newborns living in an agricultural community. Environmental Research, 117: 8-16

- Ismail A.A., Bodner T. E., Rohlman D. S. 2012. Neurobehavioral performance among agricultural workers and pesticide applicators: a meta-analytic study. *Occupational and Environmental Medicine*, 69: 457-464
- Jamal G. A., Hansen S., Julu P. O. O. 2002. Low level exposures to organophosphorus esters may cause neurotoxicity. *Toxicology*, 181/182: 23-33
- Johnson MK. 1990. Organophosphates and delayed neuropathy – is NTE alive and well? *Toxicology and Applied Pharmacology*, 102: 385-399
- Keverne E. B. 2002. Mammalian pheromones: from genes to behaviour. *Current Biology*, 12, 23: R807-R809
- Kitamura S., Sugihara K., Fugimoto N. 2006. Endocrine disruption by organophosphate and carbamate pesticides. V: *Toxicology of Organophosphate and Carbamate Compounds*. Gupta R. C. (ed.). Amsterdam, Elsevier, Academic Press: 481-94
- Kochansky J., Wilzer K., Feldlaufer M. 2001. Comparison of the transfer of coumaphos from beeswax into syrup and honey. *Apidologie*, 32: 119-125
- Kofman O., Ben-Bashat G. 2006. Diisopropylfluorophosphate administration in the pre – weanling period induces long-term changes in anxiety behavior and passive avoidance in adult mice. *Psychopharmacology*, 183: 452-461
- Kuti O. J., Page D. T. 2011. Assessment of social approach behavior in mice. V: *Mood and Anxiety Related Phenotypes in Mice. Characterization Using Behavioral Tests, Volume II*. Gould T. D. (ed.). New York, Humana Press: 83-96
- Lee W. J., Colt J. S., Heineman E. F., McComb R., Weisenburger D. D., Lijinsky W., Ward M. 2005. Agricultural pesticide use and risk of glioma in Nebraska, United States. *Occupational and Environmental Medicine*, 62, 1: 786-792
- Levin H. S., Rodnitzky R. L., Mick D. L. 1976. Anxiety associated with exposure to organophosphate compounds. *Archives of General Psychiatry*, 33: 225-228
- Lima C. S., Ribeiro-Carvalho A., Filgueiras C. C., Manhães A. C., Meyer A., Abreu-Villaça Y. 2009. Exposure to methamidophos at adulthood elicits depressive-like behavior in mice. *Neurotoxicology*, 30, 3: 471-478
- Manual on development and use of FAO and WHO specifications for pesticides. 2010. Rome, Food and Agriculture Organization and World Health Organization.
http://whqlibdoc.who.int/publications/2006/9251048576_eng_update3.pdf
(29.5.2013)

- Maver L., Poklukar J. 2003. Coumaphos and amitraz residues in Slovenian honey. *Apiacta*, 38: 54-57
- McFarlane H. G., Kusek G. K., Yang M., Phoenix J. L., Bolivar V. J., Crawley J. N. 2008. Autism-like behavioral phenotypes in BTBR T+ tf/J mice. *Genes, Brain and Behavior*, 7, 2: 152-163
- Montgomery K. C. 1958. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 48: 254-260
- Moser V. C., Simmons J. E., Gennings C. 2006. Neurotoxicological interactions of a five-pesticide mixture in preweanling rats. *Toxicological Sciences*, 92: 235-245
- Moy S. S., Nadler J. J., Young N. B., Perez A., Holloway L. P., Barbaro R. P., Barbaro J. R., Wilson L. M., Threadgill D. W., Lauder J. M., Magnuson T. R., Crawley J. N. 2007. Mouse behavioral tasks relevant to autism: phenotypes of 10 inbred strains. *Behavioural Brain Research*, 176: 4-20
- Nicolas L. B., Kolb Y., Prinssen E. P. M. 2006. A combined marble burying-locomotor activity test in mice: a practical screening test with sensitivity to different classes of anxiolytics and antidepressants. *European Journal of Pharmacology*, 547: 106-115
- Nutley B. P., Cocker J. 1993. Biological monitoring of workers occupationally exposed to organophosphorus pesticides. *Pesticide Science*, 38: 315-322
- Owings, D. H., Coss, R. G. 1978. Snake mobbing by California Ground Squirrels: adaptive variation and ontogeny. *Behaviour*, 62, 1: 50-68
- Pilkington A., Buchanan D., Jamal G.A., Hansen S., Kidd M., Hurley J. F., Soutar C. A. 2001. An epidemiological study of the relations between exposure to organophosphate pesticides and indices of chronic peripheral neuropathy and neuropsychological abnormalities in sheep farmers and dippers. *Occupational and Environmental Medicine*, 58: 702-710
- Pinel J. P. J., Treit D. 1978. Burying as a defensive response in rats. *Journal of Comparative & Physiological Psychology*, 92: 708-712
- Pope C. N. 2006. Central nervous system effects and neurotoxicity. V: *Toxicology of Organophosphates and Carbamates*. Gupta R. C. (ed.). Amsterdam, Elsevier, Academic Press: 271-292

- Porsolt R. D., Bertin A., Jalfre M. 1977. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Archives internationales de pharmacodynamie et de thérapie*, 229, 2: 327-336
- Pretty J. N., Hine R., Kishi M. 2005. Pesticide use and the environment. The health impacts of pesticides: what do we now know? V: *The Pesticide Detox: Towards a More Sustainable Agriculture*. Norris D. O. (ed.). London, Sterling, VA: Earthscan: 1-38
- Prut L., Belzung C. 2003. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *European Journal of Pharmacology*, 463, 1: 3-33
- Ray D. E., Richards P. G. 2001. The potential for toxic effects of chronic, low-dose exposure to organophosphates. *Toxicology Letters*, 120: 343-351
- Ricceri L., Venerosi A., Capone F., Cometa M. F., Lorenzini P., Fortuna S., Calamandrei G. 2006. Developmental neurotoxicity of organophosphorous pesticides: fetal and neonatal exposure to chlorpyrifos alters sex-specific behaviors at adulthood in mice. *Toxicological Science*, 93, 1: 105-113
- Serra-Bonvehía J., Orantes-Bermejob J. 2010. Acaricides and their residues in Spanish commercial beeswax. *Pest Management Science*, 66: 1230-1235
- Slotkin T. A. 2006. Developmental neurotoxicity of organophosphates: a case study of chlorpyrifos. V: *Toxicology of Organophosphate and Carbamate Compounds* Gupta R. C. (ed.). Amsterdam, Elsevier, Academic Press: 293-314
- Slotkin T. A., Seidler F. J. 2009. Oxidative and excitatory mechanisms of developmental neurotoxicity: transcriptional profiles for chlorpyrifos, diazinon, dieldrin and divalent nickel in PC12 cells. *Environmental Health Perspectives*, 117: 587-96
- Song X., Pope C., Murthy R., Shaikh J., Lal B., Bressler J. P. 2004. Interactive effects of paraoxon and pyridostigmine on blood-brain barrier integrity and cholinergic toxicity. *Toxicological Sciences*, 78: 241-247.
- Stanford S. C. 2007. The open field test: reinventing the wheel. *Journal of Psychopharmacology*, 21, 2: 134-135
- Swerdlloff R. S., Wang C., Bhasin S. 1992. Developments in the control of testicular function. *Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism*, 6, 2: 451-483
- Taccheo M. B., DePali M., Spessotto C. 1989. The determination of coumaphos residues in honey by HPTLC with in-situ fluorimetry. *Pesticide Science*, 25: 11-15

- Takeuchi H., Yatsugi S.-I., Yamaguchi T. 2002. Effect of YM992, a novel antidepressant with selective serotonin re-uptake inhibitory and 5-HT_{2A} receptor antagonistic activity, on a marble-burying behavior test as an obsessive-compulsive disorder model. *Japan Journal of Pharmacology*, 90: 197-200
- Tamura H., Maness S. C., Reischmann K., Dorman D. C., Gray L. E., Gaido K. W. 2001. Androgen receptor antagonism by the organophosphate insecticide fenitrothion. *Toxicological Sciences*, 60: 56-62
- Thrasyvoulou A. T., Pappas N. 1988. Contamination of honey and wax with malathion and coumaphos used against the *Varroa* mite. *Journal of Apicultural Research*, 27: 55-61
- Thomas A., Burant A., Bui N., Graham D., Yuva-Paylor L. A., Paylor R. 2009. Marble burying reflects a repetitive and perseverative behavior more than novelty-induced anxiety. *Psychopharmacology*, 204: 361-373
- Thomas A. G., Delaney L. J., Mueller C., Page E. 2010. Evaluation of coumaphos exposure among tick eradication workers. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 52, 2: 131-136
doi: 10.1097/JOM.0b013e3181cd7e80
- Thor D. H., Holloway W. R. 1982. Anosmia and play fighting behavior in prepubescent male and female rats. *Physiology & Behavior*, 29, 2: 281-285
- Van Buren N. W. M., Marien J., Velthuis H. H. W., Oudejans R. C. H. M. 1992. Residues in beewax and honey of Perizin: An acaricide to combat *Varroa jacobsoni*. *Environmental Entomology*, 21: 860-865
- Van Buren N. W. M., Marien A. G. H., Velthuis H. H. W. 1992. The rolle of trophallaxis in the distribution of Perizin in a honeybee colony with regard to the control of *varroa* mite. *Entomologia Experimentalis Et Applicata*, 65: 157-164
- Van der Staay F. J. 2006. Animal models of behavioral dysfunctions: basic concepts and classifications, and an evaluation strategy. *Brain Research Reviews*, 52: 131-159
- Varma D. R., Mulay S. 2006. The bhopal accident and methyl isocyanate toxicity. V: *Toxicology of Organophosphate and Carbamate Compounds*. Gupta R. C. (ed.). Amsterdam, Elsevier, Academic Press: 79-88

- Venerosi A., Calamandrei G., Ricceri L. 2006. A social recognition test for female mice reveals behavioral effects of developmental chlorpyrifos exposure. *Neurotoxicology and Teratology*, 28: 466-471
- Venerosi A., Ricceri L., Scattoni M. L., Calamandrei G. 2009. Prenatal chlorpyrifos exposure alters motor behavior and ultrasonic vocalization in cd-1 mouse pups. *Environmental Health*, 8, 12: 1-11
doi: 10.1186/1476-069X-8-12
- Venerosi A., Ricceri L., Rungi A., Sanghez V., Calamandrei G. 2010. Gestational exposure to the organophosphate chlorpyrifos alters social–emotional behaviour and impairs responsiveness to the serotonin transporter inhibitor fluvoxamine in mice. *Psychopharmacology*, 208: 99-107
- Verma R., Mohanty B. 2009. Early-life exposure to dimethoate-induced reproductive toxicity: evaluation of effects on pituitary-testicular axis of mice. *Toxicological Sciences*, 112: 450-458
- Wahlsten D. 2011. *Mouse Behavioral Testing. How to use Mice in Behavioral Neuroscience*. Amsterdam, Elsevier, Academic Press: 288 str.
- Walf A. A., Frye C. A. 2009. Using the elevated plus maze as a bioassay to assess the effects of naturally occurring and exogenously administered compounds to influence anxiety-related behaviors of mice. V: *Mood and Anxiety Related Phenotypes in Mice. Characterization Using Behavioral Tests*, Volume I. Gould T. D. (ed.). New York, Springer: 225-246
- Winslow J. T. 2003. Mouse social recognition and preference. *Current Protocols in Neuroscience*, Unit 8.16.
doi: 10.1002/0471142301.ns0816s22
- Winter C. K. 2003. Pesticides and herbicides. *Toxicology. V: Encyclopedia of Food Science And Nutrition*. 2nd edition. Caballero B., Finglas P., Trugo L. (eds.). Amsterdam, Academic Press, Elsevier Science: 4494-4501
- Woods H. F. 1999. Organophosphates. London, Department of Health, Committee on Toxicology of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment: 104 str.
<http://cot.food.gov.uk/pdfs/opchap.pdf> (10. 5. 2012)

Zhao Y., Ma R., Shen J., Su H., Xing D., Du L. 2008. A mouse model of depression induced by repeated corticosterone injections. *European Journal of Pharmacology*, 581, 1/2: 113-120

Zeliger H. I. 2008. *Human Toxicology of Chemical Mixtures*. Norwitch, New York, William Andrew Inc.: 626 str.

ZAHVALA

**Vsak, ki si bo vzel čas za branje naslednjih vrstic, naj, prosim, hkrati posluša pesem Feels Like We Only Going*

*Backwards zasedbe Tame Impala**

To je torej to. Ko enkrat priležeš do zahvale, pomeni, da se stvar res približuje koncu. Sicer o zahvali razmišljam že skozi celoten postopek izdelave diplome, kar je lahko, sklepajoč po dolgotrajnosti nastajanja, tudi »problem« - nisem bila osredotočena na prave cilje! Ali pa sem zaradi vseh pripetljajev skozi ta dolgotrajen proces nastajanja malo izgubila nit. Včasih človek pač malo zatava. Vendar ko so cilji doseženi, se na vse prepreke, padce, izgube prave smeri preprosto pozabi in ostanejo le pozitivni in lepi spomini. Na koncu šteje le to, da smo dosegli, kar smo si zastavili. Zaradi vsega tega je zahvala zame sredstvo, s katerim lahko izrazim svojo hvaležnost, kajti vsak trenutek tekom študija, pa naj je bil dober ali slab, mi je nekaj dal. Zato ne mislim skopariti z besedami. Navsezadnje gre za moje diplomsko delo, teh par listov več gor ali dol.

Hvala:

- **Mentorju mojega diplomskega dela, prof. dr. Gregorju Majdiču**, da ste mi sploh omogočili izdelavo diplomske naloge s tako zanimivo temo in seveda za vso pomoč pri izdelavi. Hvala, ker ste me konkretno seznanili s svetom znanosti in naučili, da se dobre ideje uresničijo samo ob primerni meri drznosti in vztrajnosti.
- **Ostalom članom komisije, prof. dr. Branki Javornik in prof. dr. Marku Živinu**, za pregled dela in nasvete
- **Družini**, da me je naučila imeti rada ljudi in predvsem imeti rada samo sebe:
Mami in atiju, ker sta najboljša starša. Naučila sta me iskrenosti in skromnosti. Vedno sta verjela vame, mi stala ob strani in mi pustila, da sem lahko to, kar res sem. Hvala, da sta mi sploh omogočila študirati. Hvala za nauk vseh naukov, ki pravi, da se je treba učiti predvsem za življenje!
Babici, da si tako super. Ne vem, če se zavedaš, kakšna frajerka si. Želim si, da bi bila tudi sama tako odprte glave in da bi se znala postaviti zase kot ti. Tudi tebi hvala, ker si mi omogočila študij in me vedno znova opominjala, kako pomembna je v življenju izobrazba.
Vesni, ker boljše sestrice na svetu enostavno ni. Že od malega si moja vzornica in boš to tudi ostala. Hvala, ker si mi pokazala, da so vsi cilji dosegljivi, le lotiti se jih je treba. Hvala za tvoj trud in vložek v mojo glasbeno izobraževanje in repertoar videnih koncertov ter za vpeljavo v tek in maratone.
Borutu, ker si najboljši bratec na svetu. Hvala, da si me naučil, kako poskrbeti zase in da se samo od sebe ne bo nič zgodilo. Tudi ti si moj vzornik, odkar pomnim. Hvala, ker si me uvedel

v svet računalniških igrice, karateja in divjih filmov. Brez tebe bi se verjetno igrala samo z barbikami. Aja, ne, moje barbikice so tako ali tako zamenjale kure in zajci, ne?

Tini, da si tako super najboljša svakinja. Pokazala si mi, da se pridnost in osredotočenost vedno obrestuje. Vedno znova sem navdušena nad tvojim treznim razmišljanjem, ki bi ga nekoč rada tudi sama bolj obvladala.

Urški, Maticu in Juriju, da ste tako super nečaki. Da me spravljate v dobro voljo s svojo posebno logiko, smehom in metodami, kako doseči svoj prav.

- **Mojci**, ker si moja prijateljica že več kot 18 let. Čeprav nisva vedno v neposredni bližini, veva, da sva druga drugi vedno na voljo. Dobro se zavedam, da me verjetno najbolje poznaš. Hvala za vse skupne trenutke, za vse pogovore, nasvete in iskrenost ter za igranje nesmiselnih in domišljijsko nadvse zanimivih igrice in seveda za najboljšo sodelovanje na karaokah!
- **Urški M.**, še eni prijateljici z veliko začetnico. Hvala za vso pomoč, podporo in posluh, za odpravljanje vseh mojih neutemeljenih dvomov. Vedno sem občudovala tvojo lahkotno in uspešno lotevanje problemov. Hvala za vse skupne rekreativne podvige, za vse nore čage, zvite noge in »izgube podatkov na osebni disku«😊.
- **Nini P.**, še eni super prijateljici, za podporo in prizemljene pogovore o tem in onem. In predvsem za razumevanje tegob v hudih časih, kot je recimo PMS😊. Hvala za vse filmske in glasbene debate, obiske koncertov in za tisto super potovanje v Španijo, ki je bilo celo tako razbremenjujoče, da sva na koncu zamudili na letalo.
- **Ostalih sošolkam in sošolcem iz srednje šole**, ker ste še vedno težko ponovljiva kombinacija super ljudi in ker vem, da bo naše iskreno, prijetnih dogodkov polno prijateljstvo večno.
- **Katarini T.**, da sva se končno našli! Hvala za zaveznitvo na področju glasbe in ostalih vej kulture, za vse nesmiselne in hkrati nadvse izvirne podvige in za iskanje originalnih rešitev za boljši jutri! SFS!
- **Celotni ekipi iz laboratorija na genomiki na VF** za pomoč in za sproščeno vzdušje pri delu:
Katji, poleg skupnega preživljanja časa v laboratoriju tudi hvala za ohranjanje dobrih sosedskih odnosov, za vse učne ure pozno v noč ob nuteli in skakanje po lužah. Pokazala si mi, da se z iskrenostjo in poštenostjo v življenju pride najdlje. Hvala za razumnost in oporo. Hvala, ker si pazila mojo vodo 😊!
Katerini, za vso pomoč, spodbudne besede in pozitivno energijo, ki jo oddajaš. Res si človek s srcem! Ena redkih, ki ima resnično vse stvari postavljene na pravo mesto in še ena izmed mojih vzornic v smislu, kako se spopadati s preprekami, kako se poslušati in biti kos neštetim obveznostim.
Tanji, za vse odprte pogovore, pomoč in pozitivno. Da si me vsake toliko spomnila, da je v življenju treba uživati in biti zvest samemu sebi in da je čisto vsaka naloga izvedljiva. Hvala za vse glasbene, plesne in politične debate. Muse forever!

Nini Š., za vso pomoč ob miškah. Kot sva že velikokrat ugotovili, sva na neki zelo podobni valovni dolžini in se pač...razumeva☺. Še veliko najinih štosov v prihodnje!

Jasmini, za vso nesebično pomoč in nasvete glede laboratorijskega dela, za deljenja izkušenj in pogovore z mišjo in manj mišjo tematiko.

Neži, mogoče ne toliko iz vidika sodelovanja, ampak že zaradi občutka, da se lahko vedno obrnem tudi nate.

Tomažu, za pomoč in za nasvete, ki vam jih ni bilo nikoli težko deliti. Predvsem je super občutek, da je v bližini še kak Mariborčan, s katerim lahko rečeš kako o grozni božični jelki na Glavnem trgu in ostalih aktualnih zadevah občinskega značaja (gotof je!). Hvala za vsakokratno usposabljanje našega »avtoklava«!

Luki, ne samo za laboratorijsko sobivanje, ampak tudi za prijetno druženje v času faksa, za vse kulinarčne presežke in za predajo znanja o Prlekih in Lotmerku. Hvala za vse Grossmannove festivale, na katere upam, da bom vabljen tudi v bodoče.

- **Ostalim sošolkam in sošolcem s faksa** za nepozabne študentske trenutke:

Katarini K., za lekcijo o ne pretiranem sekiranju in uživanju v življenju nasploh, za vse učne ure wuajdowskega narečja ter za super delujoče festivalsko partnerstvo.

Eriki, za nore skupne dogodivščine in vse nadvse praktične zasavske življenjske nauke, za vse ajlinerje, kafeje lejt in vratolomne padce. Muse forever!

Ajdi, za realizacijo različnih norih idej in posledično nastalo obilico smeha ter za vzajemno sodelovanje pri različnih organizacijskih izzivih! Thank you, miss February!

Aniti, za posluh in pogovore, vse palačinke in slemer klub partije ter seveda že za sam občutek družiti se s tako pomembno osebo (predsednica doma). Mimogrede, Podvelka spada k nam!

Kristini, prav tako za posluh, pogovore in vedno polno vrečo vspodbudnih besed, za uvajanje v svet različnih madžarskih dobrot, navad in vztrajnost pri učenju madžarščine.

Le(i)i, za lepe nohtke, inovativne frizure, izletke z nepravilnim parkiranjem in ostalo skupno selotejp/trololo/čiknofdsi preživljanje časa ter za vedno gostoljubne sprejeme v Logatcu.

Nuši, za takojšnjo sklenitev prijateljskega pakta, ki je primarno nastal zaradi dobre komunikacije (beri: brežhibno razumevanje narečja) in temeljil na sproščenem druženju - od koriščenja bonov do nočnih pohodov po Ljubljani.

- mojim **11 cimram in socimram, katerih števila ne vem na pamet**, da ste me in me še vedno prenašate!
- **Glasbi Muse, Depeche Mode, Sigur Ros, Radiohead in Tame Impala** za pomoč pri prebijanju skozi proces nastajanja diplome in seveda **Freddieju Mercuryju**, mojemu največjemu vzorniku, za nauk, da je življenje ena velika zabava in hkrati nekaj, kar je treba jemati resno. Kot pravi del pesmi Innuendo zasedbe Queen: *»You can be anything you want to be, just turn yourself into anything you think that you could ever be!«*