



UNIVERZA V LJUBLJANI
VETERINARSKA FAKULTETA

KATERINA ČEH

**VPLIV NIZKIH KONCENTRACIJ ORGANOFOSFATA
KLORMEFOSA NA RAZVOJ IN DELOVANJE
SPOLNIH ORGANOV IN MOŽGANOV PRI MIŠIH**

Doktorska disertacija

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI

VETERINARSKA FAKULTETA

UDK: 611.068:611.631+611.81:615.285.7:661.164.2:636.028(043.3)

KATERINA ČEH, dr. vet. med.

**VPLIV NIZKIH KONCENTRACIJ ORGANOFOSFATA
KLORMEFOSA NA RAZVOJ IN DELOVANJE SPOLNIH
ORGANOV IN MOŽGANOV PRI MIŠIH**

Doktorska disertacija

**EFFECTS OF LOW DOSES OF ORGANOPHOSPHATE
CHLORMEPHOS ON DEVELOPMENT AND FUNCTIONING
OF SEX GLANDS AND BRAIN IN MICE**

Doctoral dissertation

Ljubljana, 2012

Avtor: Katerina Čeh

Naslov doktorske disertacije: VPLIV NIZKIH KONCENTRACIJ ORGANOFOSFATA
KLORMEFOSA NA RAZVOJ IN DELOVANJE SPOLNIH ORGANOV IN MOŽGANOV
PRI MIŠIH

Delo je bilo opravljeno v Centru za genomiko živali Veterinarske fakultete v Ljubljani.

Predstojnik prof. dr. Gregor Majdič.

Javni zagovor je bil opravljen:

Mentor: prof. dr. Gregor Majdič

Člani strokovne komisije za oceno in zagovor:

Predsednik: Prof. dr. Robert Frangež, predsednik

Član: Prof. dr. Nina Čebulj Kadunc, članica

Član: Prof. dr. Davor Ježek, član

Izjavljam, da je doktorska disertacija rezultat lastnega raziskovalnega dela, da so rezultati korektno navedeni in nisem kršila avtorskih pravic in intelektualne lastnine drugih.

Doktorandka: Katerina Čeh

KAZALO VSEBINE

KAZALO TABEL	7
KAZALO SLIK	8
KAZALO GRAFOV	10
KAZALO OKRAJŠAV	11
IZVLEČEK	15
ABSTRACT	16
1 UVOD	17
2 PREGLED LITERATURE	20
2.1 RAZVOJ SPOLNIH ŽLEZ IN DIFERENCIACIJA SPOLNIH ORGANOV	20
2.1.1 Razvoj spolnih žlez	20
2.1.2 Razvoj spolnega sistema	21
2.1.3 Spolna diferenciacija zunanjih spolnih organov	22
2.2 MOLEKULSKI MEHANIZMI SPOLNE DIFERENCIACIJE	23
2.2.1 Kromosomsko obdobje	23
2.2.2 Genetsko obdobje	23
2.2.3 Hormonsko obdobje	25
2.3 PESTICIDI IN ORGANOFOSFATI	26
2.4 HORMONSKI MOTILCI	28
2.5 VPLIV HORMONSKIH MOTILCEV NA SPOLNE ORGANE SAMIC IN SAMCEV SESALCEV	31
2.6 VPLIVI HORMONSKIH MOTILCEV NA RAZVOJ IN DELOVANJE SPOLNIH ORGANOV SAMIC SESALCEV	34
2.7 VPLIVI HORMONSKIH MOTILCEV NA RAZVOJ IN DELOVANJE SPOLNIH ORGANOV SAMCEV SESALCEV	37
2.8 VPLIVI HORMONSKIH MOTILCEV NA RAZVOJ IN DELOVANJE MOŽGANOV TER OBNAŠANJE LJUDI IN ŽIVALI	40
3 MATERIALI IN METODE	45
3.1 ŽIVALI	45
3.2 METODE DELA	48
3.2.1 Ugotavljanje števila mladičev v gnezdih	48
3.2.2 Ugotavljanje histološke zgradbe mod	48
3.2.3 Ugotavljanje izražanja antimüllerjevega hormona in 3 β -hidroksisteroidne dehidrogenaze	48
3.2.4 Ugotavljanje apoptoze v modih	49
3.2.5 Telesna masa, maso mod in mehurčic ter premer semenskih cevč	50
3.2.6 Ocena dnevne proizvodnje semenčic	50
3.2.7 Merjenje koncentracij hormonov	51
3.2.8 Razmnoževanje potomcev	51
3.2.9 Opazovanje obnašanja, podobnega anksioznemu	52
3.2.10 Ugotavljanje izraženosti beljakovin v tkivnih rezinah možganov	52
3.2.10.1 Analiza področij v možganih	54
3.2.11 Ugotavljanje izraženosti genov v možganih	54
3.2.11.1 Izolacija RNK	54

3.2.11.2 Mikromreže.....	55
3.2.11.3 Priprava komplementarne DNK (cDNK)	55
3.2.12.4 Reakcija PCR v realnem času.....	56
3.2.11.5 Statistične metode reakcije PCR v realnem času.....	58
3.2.12 Ugotavljanje zgradbe krvno-možganske pregrade.....	58
3.2.13 Zajem digitalnih slik.....	59
3.2.14 Statistične metode.....	59
4 REZULTATI	60
4.1 VPLIV NIZKIH KONCENTRACIJ KLORMEFOSA NA ŠTEVILO MLADIČEV V GNEZDIH.....	60
4.2 VPLIV NIZKIH KONCENTRACIJ KLORMEFOSA NA HISTOLOŠKO ZGRADBO MOD	60
4.3 VPLIV NIZKIH KONCENTRACIJ KLORMEFOSA NA IZRAŽANJE ANTIMÜLLERJEVEGA HORMONA IN 3B-HIDROKSISTEROIDNE DEHIDROGENAZE	61
4.4 VPLIV NIZKIH KONCENTRACIJ KLORMEFOSA NA APOPTOZO V MODIH.....	62
4.5 VPLIV NIZKIH KONCENTRACIJ KLORMEFOSA NA TELESNO MASO, MASO MOD IN MEHURNIC, TER PREMIER SEMENSKIH CEVK.....	64
4.5.1 Telesna masa, masa mod in mehurnic.....	64
4.5.2 Premier semenskih cevk	64
4.6 VPLIV NIZKIH KONCENTRACIJ KLORMEFOSA NA DNEVNO PROIZVODNJO SEMENČIC	65
4.7 VPLIV NIZKIH KONCENTRACIJ KLORMEFOSA NA KONCENTRACIJO HORMONOV	67
4.8 VPLIV NIZKIH KONCENTRACIJ KLORMEFOSA NA RAZMNOŽEVANJE POTOMCEV.....	67
4.9 VPLIV NIZKIH KONCENTRACIJ KLORMEFOSA NA OBNAŠANJE PODOBNO ANKSIOZNEMU	68
4.10 VPLIV NIZKIH KONCENTRACIJ KLORMEFOSA NA IZRAŽENOST BELJAKOVIN V TKIVNIH REZINAH MOŽGANOV	69
4.11 VPLIV NIZKIH KONCENTRACIJ KLORMEFOSA NA IZRAŽANJE GENOV V MOŽGANIH	73
4.12 VPLIV NIZKIH KONCENTRACIJ KLORMEFOSA NA ZGRADBO KRVNO-MOŽGANSKE PREGRADE... ..	74
5 RAZPRAVA.....	77
5.1 VPLIV NIZKIH KONCENTRACIJ KLORMEFOSA NA RAZVOJ IN DELOVANJE SPOLNIH ORGANOV	77
5.2 VPLIV NIZKIH KONCENTRACIJ KLORMEFOSA NA RAZVOJ IN DELOVANJE MOŽGANOV IN OBNAŠANJE	80
5.2.1 Vpliv nizkih koncentracij klormefosa na obnašanje podobno anksioznemu	80
5.2.2 Vpliv nizkih koncentracij klormefosa na raven hormonov.....	82
5.2.3 Vpliv nizkih koncentracij klormefosa na krvno-možgansko pregrado	84
5.2.4 Vpliv nizkih koncentracij klormefosa na izraženost beljakovin v tkivnih rezinah možganov.....	85
5.2.5 Vpliv nizkih koncentracij klormefosa na izražanje genov v možganih.....	88
5.2.6 Vpliv nizkih koncentracij klormefosa na zgradbo krvno-možganske pregrade	90
6 SKLEPI	92
7 POVZETEK.....	93
8 SUMMARY.....	96
9 ZAHVALE	99
10 REFERENCE	101

KAZALO TABEL

TABELA 1: PREGLED SKUPNEGA ŠTEVILA ŽRTVOVANIH POTOMCEV OB RAZLIČNIH STAROSTIH TER OPRAVLJENE PREISKAVE.	47
TABELA 2: URADNE OZNAKE, POLNA IMENA, DOSTOPNA ŠTEVILKA IN FUNKCIJA OCENJENIH REFERENČNIH GENOV.	57
TABELA 3: TELESNA MASA POTOMCEV PRI STAROSTI 48 DNI, ABSOLUTNA IN RELATIVNA MASA MOD IN MASA MEHURNIC (POVPREČJE $\pm$ SEM).	64
TABELA 4: KONCENTRACIJE HORMONOV TRIIODOTIRONINA (T3), KORTIKOSTERONA IN TESTOSTERONA PRI POTOMCIH IZPOSTAVLJENIH ŽIVALI (POVPREČJE $\pm$ SEM).	67

KAZALO SLIK

SLIKA 1: HISTOLOŠKE REZINE MOD, POBARVANE S HEMATOKSILINOM IN EOZINOM. SLIKE A - C MODA 9 DNI STARIH MIŠI, SLIKE D - F MODA 19 DNI STARIH MIŠI, SLIKE G - I MODA 48 DNI STARIH MIŠI. KONTROLNE MIŠI - A,D,G; MIŠI IZPOSTAVLJENE VIŠJI KONCENTRACIJI KLORMEFOSA (3,5MG/MĹ VODE) - B,E,H IN MIŠI, IZPOSTAVLJENE NIŽJI KONCENTRACIJI KLORMEFOSA (0,35MG/MĹ VODE) - C,F,I (POVEČAVA 400X, MERILO = 100 MM VELJA ZA A-I).....	61
SLIKA 2: IMUNOHISTOKEMIČNO BARVANJE MOD 9-DNEVNIH MIŠI PROTI ANTIMÜLLERJEVEMU HORMONU. OBARVANOST SERTOLIJEVIH CELIC JE BILA MED SKUPINAMI IZRAŽENA ENAKO MOČNO. KONTROLNE MIŠI - A, VIŠJI DOZI KLORMEFOSA IZPOSTAVLJENE MIŠI (3,5MG/MĹ VODE) - B, NIŽJI DOZI KLORMEFOSA IZPOSTAVLJENA MIŠ (0,35MG/MĹ VODE) - C (POVEČAVA 400X, MERILO = 100 MM IN VELJA ZA A-C).....	62
SLIKA 3: IMUNOHISTOKEMIČNO BARVANJE MOD 19-DNEVNIH MIŠI PROTI 3B-HIDROKSISTEROIDNI DEHIDROGENAZI. PRISOTNOST LEYDIGOVIH CELIC, DOLOČENIH Z IZRAŽANJEM 3B-HIDROKSISTEROIDNE DEHIDROGENAZE, SE NI RAZLIKOVALA MED SKUPINAMI. A - KONTROLNA MIŠ, B - VIŠJI DOZI KLORMEFOSA IZPOSTAVLJENA MIŠ (3,5MG/MĹ VODE), C - NIŽJI DOZI KLORMEFOSA IZPOSTAVLJENA MIŠ (0,35MG/MĹ VODE) (POVEČAVA 400X, MERILO = 100 MM VELJA ZA A-C).....	62
SLIKA 4: APOPTOTIČNE CELICE V MODIH KONTROLNIH MIŠI - A, VIŠJI KONCENTRACIJI KLORMEFOSA IZPOSTAVLJENI MIŠI (3,5 MG/MĹ VODE) - B IN MIŠI, IZPOSTAVLJENI 0,35 MG KLORMEFOSA NA MILILITER PITNE VODE - C (PUŠČICE - APOPTOTIČNE CELICE, POVEČAVA 200X, MERILO = 100 MM VELJA ZA A-C).....	63
SLIKA 5: IMUNOREAKTIVNE CELICE ZA NEUROPEPTID Y V PODROČJU MEDIALNEGA MANDLJA 1,0 MM KAVDALNO OD BREGME PRI KONTROLNIH ŽIVALIH (SLIKI A IN C) IN POSKUSNO SKUPINO, IZPOSTAVLJENO 3,5 MG KLORMEFOSA NA MILILITER VODE (SLIKI B IN D). PROUČEVANO PODROČJE JE OZNAČENO S PUŠČICAMI (3V - TRETJI VENTRIKEL, PVN - PARAVENTRIKULARNO JEDRO, OT - OPTIČNI TRAKT, MEA - MEDIALNI MANDELJ, SLIKI A IN B, POVEČAVA 200X, MERILO 100 MM; SLIKI C IN D, POVEČAVA 40X, MERILO 500 MM).....	71
SLIKA 6: IMUNOREAKTIVNI NEVRONI, KI IZRAŽAJO ARGININ VAZOPRESIN V PARAVENTRIKULARNEM JEDRU. MED KONTROLNO (A) IN POSKUSNO SKUPINO, IZPOSTAVLJENO 3,5 MG KLORMEFOSU NA MILILITER VODE (B), NI BILO OČITNIH RAZLIK V IMUNSKEM OBARVANJU CELIC, KI IZRAŽAJO ARGININ VAZOPRESIN. (PVN - PARAVENTRIKULARNO JEDRO, 3V - TRETJI VENTRIKEL, POVEČAVA 100X, MERILO ZA A IN B 100 MM)	72
SLIKA 7: IMUNOREAKTIVNE CELICE ZA SEROTONINSKI RECEPTOR 1A V OBMOČJU RAFE. MED KONTROLNO SKUPINO (SLIKA A) IN SKUPINO, KI JE BILA IZPOSTAVLJENA VIŠJI KONCENTRACIJI KLORMEFOSA (3,5 MG/MĹ; SLIKA B) V PITNI VODI, NI BILO OČITNIH RAZLIK V IMUNSKEM OBARVANJU CELIC, KI SO IZRAŽALE SEROTONINSKI RECEPTOR 1A. (AQ - VODNI KANAL, MLF - SREDINSKI VZDOLŽNI SNOP, POVEČAVA 100X, MERILO 100 MM ZA A IN B).....	73
SLIKA 8: ELEKTRONSKO - MIKROSKOPSKA SLIKA MOŽGANSKE SKORJE KONTROLNE MIŠI (NP - NEVROPIL, E - ERITROCIT, EC - ENDOTELNA CELICA, BL - BAZALNA MEMBRANA, PVS - PERIVASKULARNI PROSTOR, A - 3000X POVEČAVA, B - 20 000X POVEČAVA, MERILO 1 MM).....	75
SLIKA 9: ELEKTRONSKO - MIKROSKOPSKA SLIKA KRVNO-MOŽGANSKE PREGRADE MIŠI, IZPOSTAVLJENE VISOKI DOZI KLORMEFOSA (3,5 MG/MĹ). ZGRADBA KRVNO-MOŽGANSKE PREGRADE SE NI RAZLIKOVALA MED SKUPINAMA (E - ERITROCIT, EC - ENDOTELNA CELICA, NP - NEVROPIL, BL - BAZALNA MEMBRANA, M - MITOHONDRIJ, → - TESNE STIČNICE, A - 7000X POVEČAVA, MERILO 5 MM; B - 20 000X POVEČAVA, MERILO 1 MM).....	76

SLIKA 10: STRUKTURA NEVRONOV ŽIVALI, KI JE BILA IZPOSTAVLJENA VIŠJI DOZI KLORMEFOSA (N1, N2 – NEVRONI, NP – NEVROPIL, G- CELICA GLIJE, A, B - 3000X POVEČAVA, MERILI 5 MM).76

KAZALO GRAFOV

GRAF 1: POVPREČNO ŠTEVILO APOPTOTIČNIH CELIC V ENEM VIDNEM POLJU PRI 400-KRATNI POVEČAVI PRI 48 DNI STARIH SAMICH IZ KONTROLNE SKUPINE IN SKUPIN TRETIRANIH S 3,5 MG (3,5) IN 0,35 MG KLORMEFOSA (0,35) NA MILILITER PITNE VODE (POVPREČJE $\pm$ SEM)	63
GRAF 2: POVPREČEN PREMER SEMENSKIH CEVK (μ M) MOD PRI KONTROLNI SKUPINI (KONTROLA, N = 5) IN SKUPINAMA, TRETIRANIMA S 3,5 MG (3,5; N = 5) IN 0,35 MG (0,35; N=5) KLORMEFOSA NA MILILITER PITNE VODE (POVPREČJE $\pm$ SEM).	65
GRAF 3: DNEVNA PROIZVODNJA SEMENČIC NA GRAM TKIVA MOD PRI KONTROLNI SKUPINI (KONTROLA, N=8) SAMCEV IN PRI SKUPINAMA MIŠI, IZPOSTAVLJENIH KLORMEFOSU V KONCENTRACIJI 3,5 MG (3,5, N=4) IN 0,35 MG (0,35, N=5) NA MILILITER PITNE VODE (POVPREČJE $\pm$ SEM).	66
GRAF 4: POVPREČNO ŠTEVILO MLADIČEV V DRUGEM GNEZDU PRI PARITVI GENERACIJE F1. ŠTEVILO PRI KONTROLNI SKUPINI (KONTROLA, N=8); SKUPINI, KI JE BILA TRETIRANA S 3,5 MG KLORMEFOSA NA MILILITER PITNE VODE (3,5, N=4) IN 0,35 MG KLORMEFOSA NA MILILITER PITNE VODE (0,35, N=4). REZULTATI SO PRIKAZANI KOT POVPREČJE $\pm$ SEM. ŠTEVILO MLADIČEV V GENERACIJI F2 SE MED SKUPINAMI NI RAZLIKOVALO ($P>0,05$).	68
GRAF 5: ČAS (S) V ODPRTI ROKI DVIGNJENEGA LABIRINTA PRI KONTROLNIH MIŠIH (K SAMEC, K SAMICA), MIŠIH, IZPOSTAVLJENIH S 3,5 MG KLORMEFOSA NA MILILITER PITNE VODE (3,5 SAMEC, 3,5 SAMICA) IN 0,35 MG KLORMEFOSA NA MILILITER PITNE VODE (0,35 SAMEC IN 0,35 SAMICA). MIŠI, IZPOSTAVLJENE VIŠJIM KONCENTRACIJAM KLORMEFOSA, SO SE STATISTIČNO ZNAČILNO (** $P < 0.01$) MANJ ČASA ZADRŽEVALE V ODPRTI ROKI LABIRINTA. REZULTATI SO PRIKAZANI KOT POVPREČNI ČAS $\pm$ SEM.....	69
GRAF 6: POVPREČNO ŠTEVILO IMUNOREAKTIVNIH CELIC ZA BELJAKOVINO NEUROPEPTID Y V MEDIALNEM MANDLJU SE NI RAZLIKOVALO MED KONTROLNO (KONTROLA; N=9) IN POSKUSNO SKUPINO (3.5; N=7) (POVPREČJE $\pm$ S.E.).	70
GRAF 7: RELATIVNA IZRAŽENOST GENOV ZA KADHERIN 7 IN SEROTONINSKI RECEPTOR 1A MED KONTROLNO SKUPINO IN SKUPINO MIŠI, KI JE BILA IZPOSTAVLJENA VIŠJO DOZO KLORMEFOSA (3,5 MG/ML) PREKO VODE.	74

KAZALO OKRAJŠAV

3 β -HSD – 3 β -hidroksisteroidna dehidrogenaza

ABP – androgene vezajoči protein

ACh – acetilholin

AChE – acetilholinesteraza

AKR1C1 in AKR1C2 – aldo keto reduktaza 1 in 2

AMH – antimüllerjev hormon

AVP – arginin vazopresin

AVPV – anteroventralni del periventrikularnega jedra

BPA – bisfenol A

BUB1 – kinaza za urejanje celičnega cikla

Cdh7 – kadherin 7

cDNA – komplementarna DNK

CPF – centromerna beljakovina F

CŽŠ – centralni živčni sistem

DAX1 – DSS-AHC kritično področje na kromosomu X

DDT – diklorodifenolotrikloroetan

DEPC voda – voda brez nukleaz

DES – dietilstilbestrol

DNK – deoksiribonukleinska kislina

DSP – dnevna proizvodnja semenčic

EBBP – beljakovina z zaporedjem B, ki je pod vplivom estrogenov

ED – hormonski motilci

EPM – test dvignjenega labirinta

ER α in ER β – estrogenski receptor α in β

FGF9 – rastni dejavnik fibroblastov 9

FOXL2 – forkhead box L2

FSH – folikel stimulirajoči hormon

Gapdh – gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza

GATA4 – vezavna beljakovina za GATA

GnRH – gonadotropine sproščujoči hormon

GR – glukokortikoidni receptor

H₂O₂ – vodikov peroksid

HOX a-10 in Hox a-11 – homeo-zaporedje a -10 in a -11

HPA – hipotalamusno - hipofizna–nadledvična os

Htr1a – serotonininski receptor 1a

INSL3 – inzulinu podobni rastni faktor 3

LH – luteinizirajoči hormon

MDA – malondialdehid

MeA – medialno jedro mandlja

mRNA – informacijska RNK

MTX – metoksiklor

NPY – neuropeptid Y

ODS – sindrom nepravilnega razvoja jajčnikov

OP – organofosfati

PAP – kompleks peroksidaza – antiperoksidaza

PB – fosfatni pufer

PBB – polibromirani bifenili

PBS – fosfatni pufer z NaCl

PCB – poliklorirani bifenili

PCR – verižna reakcija s polimerazo

PDD – predvidljivi razvojni problemi

PLAT – aktivator plazminogena

PVN – paraventrikularno jedro

qPCR – PCR v realnem času

RFC3 – podvojevalni faktor C

RNK – ribonukleinska kislina

RT-PCR – obratna transkripcija in verižna reakcija s polimerazo

SF-1 – prepisovalni steroidogeni dejavnik 1

SOX9 – SRY - sorodna beljakovina s homeo zaporedjem

SRY – spol določujoče področje na kromosomu Y

T.M. – telesna masa

T3 – tiroksin

T3 – trijodtironin

TCF – triklorfon

TDS – sindrom nepravilnega razvoja mod

TdT – terminalna transferaza

TYMS – timidilat sintetaza

WNT4 in WNT 7a – člana družine wingless proteinov 4 in 7a

WT1 – prepisovalni dejavnik wilmsovega tumorja 1

VPLIV NIZKIH KONCENTRACIJ ORGANOFOSFATA KLORMEFOSA NA RAZVOJ IN DELOVANJE SPOLNIH ORGANOV IN MOŽGANOV PRI MIŠIH

IZVLEČEK

Ključne besede: Insekticidi – toksičnost; organofosforne spojine – toksičnost; možgani – rast in razvoj; testisi – rast in razvoj; miši

Ljudje in živali smo v vsakodnevem življenju izpostavljeni mnogim škodljivim snovem, med katerimi je tudi veliko število pesticidov. Snovi iz okolja lahko delujejo na razvoj različnih organskih sistemov, katerih vpliv se lahko pokaže šele v odrasli dobi. V raziskavi smo proučili vpliv nizkih koncentracij organofosfata klormefosa na razvoj in delovanje spolnega sistema in možganov pri miših. Miši so bile izpostavljene dvema različnima koncentracijama klormefosa (3,5 mg/mL in 0,35 mg/mL) pred rojstvom in do odstavitve pri 21 dneh. Proučevali smo vpliv na histologijo mod, telesno maso, na različne reprodukcijske parametre (izražanje antimüllerjevega hormona (AMH) in 3β -hidroksisteroidne dehidrogenaze (3β -HSD), masa mod in semenskih mešičkov, dnevna proizvodnja semenčic, apoptoza v modih, premer semenskih cevk, paritvena sposobnost) potomcev izpostavljenih miši. Preverili smo tudi vpliv klormefosa na koncentracijo plazemskih hormonov, obnašanje, podobno anksioznemu, izražanje nekaterih neuropeptidov in zgradbo krvno-možganske pregrade. Vplive izpostavljenosti klormefosu smo preverili tudi na nivoju izražanja prepisov genov z analizo mikromrež.

Klormefos ni vplival na reprodukcijo izpostavljenih živali, saj so bila gnezda po velikosti med seboj primerljiva. Pri potomcih izpostavljenih živali nismo našli statistično značilnih razlik med skupinami pri pregledanih reprodukcijskih parametrih. Prav tako nismo ugotovili sprememb v proizvodnji kortikosterona in tiroksina (T3). Pri živalih, izpostavljenih višji koncentraciji klormefosa, smo ugotovili pojačano obnašanje, podobno anksioznemu, vendar pa nismo ugotovili spremenjenega izražanja nekaterih neuropeptidov (neuropeptida Y (NPY), serotoninškega receptorja 1a (HT1A) in arginin vazopresina (AVP)), ki so povezani z uravnavanjem tega obnašanja. Analiza mikromrež je pokazala razlike v izražanju kadherina 7 in serotoninškega receptorja 1a. Vendar razlik nismo potrdili z verižno reakcijo v realnem času (qPCR). Prav tako nismo ugotovili negativnega vpliva klormefosa na zgradbo krvno-možganske pregrade.

EFFECTS OF LOW DOSES OF ORGANOPHOSPHATE CHLORMEPHOS ON DEVELOPMENT AND FUNCTIONING OF SEX GLANDS AND BRAIN IN MICE

ABSTRACT

Key words: Insecticides – toxicity; organophosphorus compounds – toxicity; brain – growth and development; testis - growth and development; mice

In everyday life animals and people are exposed to many harmful chemicals, including pesticides. Environmental chemicals can affect different organ systems, and some of their effects are not seen until adult life. In our study, we examined possible effects of low doses of chlormephos on the development and functioning of reproductive and central nervous system in mice. Mice were exposed to two different doses of chlormephos (3,5 mg/mL and 0,35 mg/mL) *in utero* and until weaning at 21 days through their mothers. Different reproductive parameters were studied such as histology, mass of testes and seminal vesicles, body mass, daily sperm production, apoptosis in testes, expression of antimüllerian hormone (marker of Sertoli cell maturation) and 3beta hydroxysteroid dehydrogenase enzyme (marker of Leydig cells), diameter of seminiferous tubules and reproductive capacity of an adult offspring of exposed mice. We also examined the effects of chlormephos on the concentration of plasma hormones, anxiety-like behaviour, expression of some neuropeptides and the structure of blood-brain barrier. Microarray analysis was performed to examine possible effects of exposure to chlormefos on global gene expression in testes and brain of exposed mice. The number of the offsprings in the litters directly exposed to chlormephos did not differ from the control group. In the offsprings of the exposed animals no differences were found between the control and two experimental groups. No difference was observed between the groups in the serum levels of corticosterone and thyroxin (T3). However, increased anxiety-like behaviour as determined by testing in elevated plus maze was noted in mice exposed to higher concentration of chlormephos. The expression of neuropeptide Y (NPY), serotonin receptor 1A (HT1A) and arginine vasopressin (AVP), all involved in the regulation of anxiety-like behaviour was also similar between the control and treated groups. Microarray analysis revealed the differences in the expression of cadherin 7 and serotonin receptor 1A, but no differences were confirmed by the real-time PCR, and there were no differences in the ultrastructure of blood-brain barrier between the control group and chlormephos exposed mice.

1 UVOD

V zadnjih petdesetih letih je bilo v okolje spuščeno veliko sintetičnih kemičnih snovi, ki so rezultat novih proizvodnih procesov. Ugotovljeno je bilo, da nekatere od teh snovi, ki jih imenujemo hormonski motilci, lahko porušijo hormonsko homeostazo v telesu na različne načine. V primerjavi z endogenimi hormoni imajo te snovi šibko hormonsko aktivnost, vendar jim topnost v maščobah in dolg razpolovni čas razgradnje omogočata nabiranje in obstojnost v maščobnem tkivu, kar povečuje njihovo koncentracijo v telesu (Gandolfi in sod., 2002). Razdelitev hormonskih motilcev je težko opredeliti, saj so te molekule zelo heterogene. Mednje spadajo snovi, ki jih uporabljajo v industriji – poliklorirani bifenili (PCB), polibromirani bifenili (PBB), dioksini; plastifikatorji – bisfenol A (BPA), ftalati, alkilfenoli; pesticidi – metoksiklor (MTX), klorpirifos, diklorodifeniltrikloroetan (DDT); fungicidi – vinklozolin in dietilstilbestrol (DES). Hormonske motilce tako lahko razdelimo glede na njihov namen uporabe (npr. pesticidi) ali glede na kemično zgradbo (npr. dioksini). Med pesticidi, ki lahko delujejo kot hormonski motilci, poznamo več kemičnih skupin, kot so na primer organoklorni pesticidi (DDT), organofosfati, karbamati, triazini in piretroidi. (Diamanti-Kandarakis in sod., 2009; Casals-Casas in Desvergne, 2011). Hormonski motilci delujejo tako, da na primer posnemajo delovanje tako estrogenih kot androgenih hormonov. Razgradni produkti hormonskih motilcev imajo prav tako lahko različno delovanje. Na primer DDT deluje kot estrogeni agonist, njegov razgradni produkt diklorodifenildikloroetan (DDE) pa kot androgeni antagonist (International Programme on Chemical Safety, 1986; Woods, 1999).

Znano je, da imajo nekatere organofosforne snovi v visokih koncentracijah neposreden vpliv na delovanje spolnega oziroma endokrinega sistema tako pri ljudeh (Guven in sod., 1999; Recio in sod., 2005) kot pri živalih (Narayana in sod., 2005; Okamura in sod., 2005). Več raziskav je pokazalo, da lahko organofosforne snovi v visokih odmerkih vplivajo na delovanje spolnega sistema neposredno ali centralno z motenjem delovanja endokrinega dela možganov, ki ima nevroendokrino vlogo (Sarkar in sod., 2000; Bustos-Obregon in Gonzalez-Hormazabal, 2003). Z izjemo fenitrothiona pa ni dovolj znanega o morebitnem vplivu nizkih koncentracij organofosfatnih snovi na razvoj spolnega sistema pred rojstvom in po njem, v zelo občutljivem obdobju, ko se vnaprej programira delovanje spolnih organov v odraslem življenju (Okahashi in sod., 2005).

Organofosforne snovi, med katere sodi tudi klormefos, predstavljajo raznoliko skupino kemičnih spojin, kot so estri, amidi ali tiolni derivati fosforne kisline. Mnoge organofosforne spojine v svoji kemični zgradbi vsebujejo ogljik in fosfor, ne zavirajo delovanja AChE. V praksi in strokovni literaturi pa se izraz organofosfati uporablja za organofosfatne snovi, ki zavirajo delovanje AChE, kar bomo uporabljali tudi v nadaljevanju tega besedila. Zanje je značilno, da so ireverzibilni zaviralci acetilholinesteraze (AChE) in povzročajo kopičenje nevrottransmiterja acetilholina (ACh) v živčno-mišičnem stiku (International Programme on Chemical Safety, 1986). ACh se veže na postsinaptične holinergične receptorje (nikotinski in muskarinski) v avtonomnih ganglijih in organih, ki jih oživčujejo parasimpatična živčna vlakna npr. srce, gladke mišice (v očesu, sapnicah, spolnih žlezah, krvnih žilah itd.), slinske in solzne žleze (Silbernagl in Despopoulos, 2008). Akutni nikotinski in muskarinski učinki zastrupitve z organofosfatnimi snovmi so večinoma dobro znani in proučeni (Weinbroum, 2004). Organofosfati ne zavirajo samo AChE, ampak se vežejo tudi na druge proteine in zavirajo delovanje številnih encimov, ki vsebujejo aminokislino serin (Woods, 1999). Organofosfati se uporabljajo kot kemično orožje, insekticidi in antiparazitiki. V kemični strukturi organofosfatov, ki so jih razvili kot kemično orožje, je prisotna zelo reaktivna vez med fosforjem in kisikom $P(=O)$. Pri učinkovinah za nevojaško rabo je ta vez pogosto nadomeščena z manj reaktivno vezjo med fosforjem in žveplom $P(=S)$, tako da se toksičnost teh snovi zmanjša. Organofosfati, ki se uporabljajo kot insekticidi ali antiparazitiki, so slabo hlapni, na sobni temperaturi so trdni in bolj stabilni v vodnih raztopinah, manj strupeni za sesalce in zelo za insekte ali parazite. Organofosfati se bolje resorbirajo preko prebavil kot preko kože. Pri sesalcih je razpolovna doba od nekaj ur do nekaj tednov. Tiofosfatni organofosfati, kot je na primer klorpirifos, se najprej presnovijo v bolj toksično obliko okson. Večina organofosfatov se hidrolizira in izloči z urinom preko glavnih hidrolitičnih presnovkov. Večina registriranih organofosfatov (75 %) se v telesu presnovi v presnovke dialkil fosfata. Presnovke najdemo v urinu tudi po izpostavljenosti zelo nizkim koncentracijam organofosfatov, ne zavirajo delovanja AChE in niso toksični, vendar so označevalci izpostavljenosti organofosfatom. Poznamo šest presnovkov dialkil fosfata, vsak izmed njih lahko nastane s presnovo različnih organofosfatov. Zato nam sam presnovek v urinu ne more dati natančne informacije o tem, kateremu organofosfatu je bila žival izpostavljena. Pri presnovi nekaterih organofosfatov (klorpirifos, klorpirifos metil, kumafos,

diazonin, malation, etil paration, metil paration in pirimifos metil) pa nastanejo specifični presnovki (Centers for Disease Control and Prevention, 2009).

Organofosforne pesticide lahko uporabljamo kot modelne snovi za proučevanje morebitnih učinkov drugih organofosfornih snovi (npr. kemičnega orožja v primeru terorističnega napada). Onesnaženost okolja z organofosfornimi pesticidi pa zaradi njihove razširjene uporabe v kmetijstvu že sedaj predstavlja pereč ekološki problem. V okviru projekta MORS TP MIR-06, katerega del je bila tudi pričujoča doktorska disertacija, smo proučevali posledice dolgotrajne izpostavljenosti nizkim dozam organofosfornih snovi, do kakršne bi lahko prišlo v daljšem obdobju, po končani uporabi tovrstnih snovi v bojne ali teroristične namene in ob morebitnih kemijskih nesrečah. V raziskavi smo ugotavljali škodljive učinke modelnega organofosfata klormefosa pri miših (*Mus musculus*) seva Balb/C, kot modelnem organizmu za človeka in druge živalske vrste, ki so prejemale klormefos v nižjih koncentracijah s pitno vodo daljše obdobje. Klormefos je organofosfatni insekticid, ki je na trg prišel leta 1973. Uporabljali so ga za nadzor nad populacijo majskih hroščev, bramorjev, struna, stonog in drugih insektov. Prodajali so ga pod imenom Dotan (Aventis, Francija). Akutna smrtna doza (LD₅₀) klormefosa pri peroralni aplikaciji za sesalce je 7 mg/kg telesne teže, zato ga je Svetovna zdravstvena organizacija uvrstila med zelo nevarne snovi. V državah članicah Evropske unije so ga umaknili s tržišča do leta 2006. Kljub prepovedi v Evropi je možno, da klormefos še vedno uporabljajo v nekaterih manj razvitih državah (Hrženjak, 2009). Klormefos so v Evropi uporabljali več kot trideset let, vendar kljub temu, da povzroči akutno zastrupitev v nizkih koncentracijah, je le malo znanega o njegovih dolgoročnih vplivih na sesalce.

V raziskavi smo preverili naslednje hipoteze:

- Izpostavljenost staršev nizkim koncentracijam organofosfata klormefosa zmanjša razmnoževalno sposobnost odraslih izpostavljenih miši.
- Izpostavljenost nizkim koncentracijam organofosfata klormefosa v obdobju pred rojstvom in po njem negativno vpliva na razvoj in delovanje spolnih organov.
- Izpostavljenost nizkim koncentracijam organofosfata klormefosa v obdobju pred rojstvom in po njem negativno vpliva na razvoj in delovanje endokrinih delov možganov.

2 PREGLED LITERATURE

2.1 RAZVOJ SPOLNIH ŽLEZ IN DIFERENCIACIJA SPOLNIH ORGANOV

V procesu spolne diferenciacije nastanejo temeljne in očitne razlike med spoloma. Razvoj spolnih žlez se razlikuje od razvoja vseh drugih tkiv v organizmu. Vsi zametki organov se lahko diferencirajo le v točno določen organ, zametek spolnih žlez pa je bipotencialen, saj se lahko razvije v modo ali jajčnik (Gilbert, 1994).

V procesu spolne diferenciacije se oblikujejo spolne žleze, spolni sistem in zunanji spolni organi. Spol pri sesalcih je določen z dvema spolnima kromosomoma, X in Y, ki nosita gene za zelo različne lastnosti. Za razvoj moškega osebka je pomembna produkcija androgenov v modih in maskulinizacija možganov (predvsem hipotalamusa) s testosteronom v obdobju pred rojstvom in po njem. Spolno diferenciacijo lahko okvirno razdelimo na tri obdobja kromosomsko, genetsko in hormonsko. Vsako od teh vpliva na naslednje in povzroči spolne razlike tako v razmnoževalnem sistemu kot tudi v možganih. Spolne razlike v morfološkem in funkcionalnem smislu vplivajo na spolno identiteto, spolno orientacijo, spolno obnašanje in kognitivne funkcije (Berne in sod., 2004; Wilson in Davies, 2007).

Pri sesalcih je osnovni princip razvoja spolnih organov ženski. Za nastanek moškega fenotipa so pri spolni diferenciaciji pomembni trije koraki. Prvi je razvoj indiferentne zasnove v moda in izločanje testosterona. V drugem koraku se razvije notranji razmnoževalni sistem pod vplivom testosterona, hkrati pa antimüllerjev hormon (AMH) povzroči propad zametkov za ženske spolne organe. V tretjem koraku se razvijejo zunanji spolni organi pod vplivom testosterona oz. 5 α -dihidrotestosterona.

2.1.1 Razvoj spolnih žlez

Med razvojem sesalcev primordialne zarodne celice potujejo do spolnega grebena, kjer se združijo s tkivom mezonefroza in oblikujejo indiferentne zasnove, ki so pri človeku prisotne 7 - 10 dni in imajo skorjo ter sredico. Pri miših se primordialne zarodne celice oblikujejo pri embrionalni starosti 6 dni.

Spolni greben je zasnova za spolne žleze in se pri miših oblikuje v desetem dnevu embrionalne starosti. Pri obeh spolih se sredica diferencira v primordialne spolne nitke. Pri moških zarodkih se primordialne spolne nitke diferencirajo, medtem ko skorja zakrni.

Bodoče semenske cevke se začnejo tvoriti v starosti zarodka 6 do 7 tednov, ko se začnejo diferencirati sertolijeve celice. Leydigove celice opazimo pri 8-9 tednov starih zarodkih, ko že lahko opazimo moda, ki izločajo testosteron. Pri samicah primordialne spolne nitke zakrnijo in iz skorje se razvijejo sekundarne spolne nitke, ki postanejo jajčnik. Pri ljudeh se ta razvoj začne pri devet tednov starih plodovih (Nussey in Whitehead, 2001; Berne in sod., 2004; Arango in Donahoe, 2011).

2.1.2 Razvoj spolnega sistema

Za diferenciacijo notranjih in zunanjih spolnih organov so potrebni hormoni. Pri plodvih obeh spolov na obeh straneh razvijajočega se plodu rasteta wolffov in müllerjev vod. Pri samicah zakrni wolffov vod, pri samcih pa müllerjev. Iz wolffovih vodov se pri plodovih moškega spola razvijejo nadmodek, semenovod, sekundarne spolne žleze ter ejakulatorni aparat. Iz müllerjevih vodov nastanejo jajcevedi, maternica in sprednji del nožnice (Nussey in Whitehead, 2001).

V moškem plodu se pod vplivom hormonov razvijejo penis, nadmodek, semenovod in sekundarne spolne žleze (prostata, mehurice, bulbouretralne žleze). Razvoj sekundarnih spolnih organov in znakov pri sesalskih zarodkih urejata predvsem dva hormona, in sicer antimüllerjev hormon (AMH) in testosteron, ki ju izloča moda. AMH izločajo sertolijeve celice in povzroča propad müllerjevih vodov, ki bi se drugače razvili v maternico, jajcevod in zgornji del nožnice. Testosteron, ki ga izločajo leydigove celice, sproži razvoj wolffovih vodov v nadmodek, semenovod in mehurice (Berne in sod., 2004). Pri miših se AMH začne izločati približno pri starosti plodu 12,5 dni. Müllerjevi vodi propadejo med šestnajstim in dvajsetim dnevom fetalne starosti (Arango in Donahoe, 2011). Sertolijeve celice so prve izoblikovane celice v modih, ki jih lahko tudi morfološko prepoznamo. Ob koncu delitve sertolijevih celic kmalu po rojstvu ostane njihovo število nespremenjeno celo življenje. Ker sertolijeve celice podpirajo spolne celice med spermatogenezo, ena sertolijeva celica pa lahko podpira le določeno število spolnih celic, sta velikost moda v odraslem življenju in možnost

proizvodnje semenčic določena že v času kmalu po rojstvu (Roser, 2008). Razvoj sertolijevih celic je zelo občutljiv na številne notranje in zunanje dejavnike, kot so folikel stimulirajoči hormon (FSH), ščitnični hormoni in različne snovi zunanjega izvora, ki lahko motijo normalno delovanje osi hipotalamus-hipofiza-spolne žleze (Sharpe, 1994).

Pomembno endokrino funkcijo v modih plodov in odraslih živali imajo leydigove celice, ki se razvijejo iz intersticijskih celic. Leydigove celice v zarodku so videti kot grozd celic, ki so postavljene tesno skupaj. Skladno z dozorevanjem leydigovih celic v zarodku poteka pričetek proizvodnje testosterona. Leydigove celice plodu imajo večjo zmožnost proizvodnje steroidnih hormonov kot odrasle leydigove celice. To je verjetno nujno zaradi velikih potreb po testosteronu v času maskulinizacije moškega zarodka, po rojstvu pa odrasle leydigove celice zamenjajo leydigove celice zarodka. Mehanizem, ki ureja razvoj odraslih leydigovih celic, še ni znan, verjetno pa igra pomembno vlogo pri tem procesu lutenizirajoči hormon (LH) iz hipofize. Za biosintezo testosterona je potrebno delovanje štirih steroidogenih encimov, ki holesterol preko vmesnih stopenj pretvorijo v testosteron (Wu in sod., 2007). V odsotnosti AMH se razvijejo müllerjevi vodi, pri miših med razvojem plodu med 11,75 in 13,5 dnevom. Müllerjevi vodi potekajo vzporedno z wolffovimi vodi in se na distalnem delu združijo z njimi v urogenitalni sinus (Arango in Donahoe, 2011). Pri ljudeh se diferenciacija müllerjevih vodov začne pri desetih tednih gestacijske starosti (Nussey in Whitehead, 2001).

2.1.3 Spolna diferenciacija zunanjih spolnih organov

Tako kot pri razvoju spolnih žlez so strukture, ki se razvijejo v zunanje spolne organe, na začetku enake pri obeh spolih. Za razvoj moškega fenotipa in normalno diferenciacijo je potrebna pretvorba testosterona v njegov aktivni metabolit 5α -dihidrotestosteron, ki je desetkrat bolj aktiven androgen. Pri moških plodovih pri ljudeh se razvoj zunanjih spolnih organov prične med sedmim in trinajstim tednom starosti plodu. Iz spolne nabuhline se razvijejo moda, sečno-spolna guba se zapre in nastane uretra ter gobasto tkivo, glavica penisa se razvije iz sečno-spolne grbice, prostata pa iz sečno-spolnega zakotja (Berne RM, 2004).

Diferenciacija zunanjih ženskih organov se prične kasneje in v odsotnosti testosterona. Velike sramne ustnice nastanejo iz spolne nabuhline, male sramne ustnice nastanejo iz nezaprte sečno-spolne gube, sečno-spolna grbica oblikuje klitoris, sečno-spolno zakotje pa spodnji del

vagine. Vendar za nastanek ženskega fenotipa vseeno ni pogoj samo odsotnost androgenov. Raziskave so namreč pokazale, da se v odsotnosti estrogenov ne razvije spolno dimorfen del v možganskem prečniku (Norris, 2007).

2.2 MOLEKULSKI MEHANIZMI SPOLNE DIFERENCIACIJE

2.2.1 *Kromosomsko obdobje*

Spol je kromosomsko določen ob oploditvi jajčeca, ko s pronukleusom semenčice pride v pronukleus jajčeca kromosom X ali Y. Moški imajo 44 avtosomskih kromosomov in en par spolnih kromosomov X in Y. Spol samcev določa prisotnost kromosoma Y. Ženske imajo prav tako 44 avtosomskih kromosomov in dva spolna kromosoma XX. V jajčnikih sta aktivna oba kromosoma X, medtem ko je v drugih telesnih tkivih en kromosom X neaktiven. Razvoj jajčnika je odvisen od prisotnosti dveh kromosomov X in odsotnosti kromosoma Y. Razvoj spolnih žlez in možganov je odvisen od prisotnosti ali odsotnosti testosterona. Razvoj spolnega sistema temelji glede na genotip na dejstvu, da se ženski spolni sistem razvije v odsotnosti mod. Na kromosomu X je pri sesalcih približno 3000 do 4000 genov in je relativno velik glede na kromosom X pri primitivnih sesalcih npr. stokovcih. Pri ljudeh ima kromosom Y samo 33 genov in ponavljajoča se zaporedja, za katera pa funkcija še ni znana. Večina genov na kromosomu Y se izraža v embrionalnem razvoju spolnega grebena in so povezani z razvojem mod in spermatogenezo (Gilbert, 1994; Marshall Graves, 2000; Berne in sod., 2004; Wilson in Davies, 2007).

2.2.2 *Genetsko obdobje*

Spolna diferenciacija se začne že kmalu po spočetju. Dva dni po oploditvi ima človeški zarodek moškega spola več celic kot ženski, prav tako je pri moškem zarodku presnovna aktivnost višja. Zaradi pospeševalnih vplivov genov kromosoma Y in zavirajočega delovanja genov kromosoma X je pri miših na stopnji blastociste, pri ljudeh pa je že na stopnji zigote moški zarodek večji od ženskega (Mittwoch, 2000; Wilson in Davies, 2007).

Pri sesalcih se v prisotnosti kromosoma Y iz spolnega grebena razvijejo moda in nastanejo sertolijeve celice, ki so prvi znak spolne diferenciacije mod (Mittwoch, 2000). Kmalu po

nastanku spolnega grebena se začne izražati gen *SRY* (*angl.* sex-determining region on Y chromosome), ki uravnava razvoj zametkov spolnih žlez v moda. Pri miših se *Sry* izraža kratek čas. Dejavniki, ki nadzirajo izražanje *SRY*, so zaenkrat še neznani. Verjetno imajo na njegovo izražanje pomemben vpliv drugi geni, kot na primer geni *WT1*, *SF1* in *GATA4*. Gen *SRY* sestavlja en ekson z zapisom za homeo-zaporedje (*angl.* HMG-box) za vezavo na DNK, ki sodeluje pri upogibanju DNK. Tako se odpirajo nova vezna mesta za druge jedrne proteine. *SRY* skupaj z genom *SF-1* aktivira kaskado drugih genov, ki so pomembni za nastanek mod (Wilson in Davies, 2007). Eden pomembnejših je *SOX9* (*angl.* SRY-related HMG box 9), ki se izraža v razvijajočih se sertolijevih celicah. Delovanje *SOX9* gena je pomembno za normalen razvoj in diferenciacijo moškega osebka. *SOX9* diferenciacijo in razvoj lahko sproži tudi v odsotnosti gena *SRY*. Eden izmed genov, ki jih aktivira *SRY*, je tudi *FGF9* (*angl.* fibroblast growth factor 9), ki je član velike družine fibroblastnih rastnih faktorjev, ki so sporočilne molekule. *FGF9* je pomemben pri delitvah sertolijevih celic ter razvoju mod (McClelland in sod., 2012).

Gen *DAX1* (*angl.* dosage-sensitive sex-reversal, adrenal hyperplasia congenital X chromosome 1) je na kromosomu X, njegovo izražanje spodbujata gena *SF-1* in *WT1*. *DAX1* uravnava razvoj mod, saj se ob njegovi odsotnosti ne razvijejo sertolijeve celice, prav tako je motena spermatogeneza ter proliferacija in diferenciacija leydigovih celic (Sharpe, 2006). V primeru prevelikega izražanja gena *DAX1*, na primer ob podvojitvi gena, vpliva na razvoj mod tako, da zavira delovanje različnih genov: *SRY*, *SF1* in *SOX9* (Park in Jameson, 2005). *DAX1* se pri obeh spolih izraža v prvi polovici *intra uterinega* razvoja (pri miših do starosti plodu 12,5), nato ga najdemo samo pri osebkih ženskega spola, kjer verjetno vpliva na razvoj jajčnikov oziroma zavira razvoj mod (Vilain in McCabe, 1998).

Za razvoj ženskega spolnega sistema načeloma velja, da je privzeti način razvoja. V razvoju ženskega spolnega sistema do sedaj niso dokazali genov, sorodnih *SOX9* in *SRY*. Vendar pa se v jajčniku izražajo nekateri zaviralni proteini, ki preprečujejo nastanek mod, na primer produkt gena *DAX1*, ki zavira aktivnost *SOX9* in *SF-1*. Drugi tak primer je *WNT4*, ki se pri ženskah izraža v drugi polovici nosečnosti in vzdržuje število jajčec. *FOXL 2* in *FIG X* sta prepisovalna faktorja, ki nadzorujeta razvoj celic granuloze in jajčnih celic v jajčniku (Wilson in Davies, 2007). Pri živalih so pokazali, da *Wnt 7a* vpliva na izražanje *Wnt 4*, ki nato spodbuja izraženost nekaterih genov *Hox a* ter *Hox d*. Ob pomanjkanju *Wnt 7a* je zmanjšano izražanje *Wnt 4* in *Hox a-10* ter *Hox a-11*, kar se kaže kot nenormalnost v razvoju ženskih

spolnih organov (npr. v jajcevodu morfološka zgradba maternice, vrat in nožnica se ne združita ipd.). Estrogeni zmanjšajo izražanje Wnt 7a, tako so posledice izpostavljenosti umetnemu estrogenemu hormonu dietilstilbestrolu v maternici vidne kot motnje v razvoju ženskega spolnega trakta (Kitajewski in Sassoon, 2000).

2.2.3 Hormonsko obdobje

Pri moških XY mišjih zarodkih se spolni greben začne diferencirati v moda pri embrionalni starosti 11,2 do 11,4 dni tako, da nastanejo modne niti, sledi diferenciacija leydigovih celic in na končno oblikovanje mod. To je pomembno zato, da se zmanjša ženski vpliv okolnega tkiva mezonefrosa, ki bi lahko zavrl nastanek modnih nitk, zaviral steroidogenezo v leydigovih celicah in spodbujal mejozo zarodnih celic v nepravem obdobju razvoja plodu (Wilson in Davies, 2007; Arango in Donahoe, 2011). Prvi označevalec nastanka mod je izražanje AMH v sertolijevih celicah, pri miših se pojavi pri embrionalnem dnevu 12,5, pri ljudeh pa pri šestih tednih nosečnosti. Na izražanje AMH vpliva predvsem SOX9 skupaj z SF-1, WT1 in GATA4. AMH povzroči propad müllerjevih vodov v embrionalni starosti 16 – 20 dni pri podganah in 8 – 9 tednov *inta uterinega* razvoja pri ljudeh. AMH vpliva na razvoj preko AMH receptorjev tipa 2, ki so prisotni v določenem kritičnem obdobju, nato pa se njihovo izražanje ustavi. Zaradi tega se vpliv AMH zmanjša, kljub temu da se izloča v fetalnem obdobju in obdobju pred puberteto (Rey in sod., 2003). Leydigove celice zarodka pri podganah začnejo s tvorbo testosterona od petnajstega dne starosti plodu dalje, višek je med starostjo plodu 18,5 in 19,5. V fetalnih leydigovih celicah podgan je začetek tvorbe testosterona neodvisen od izločanja LH. LH v hipofizi lahko zaznamo šele šestnajsti dan starosti plodu, medtem ko je v plazmi zaznaven šele sedemnajsti dan (El-Gehani in sod., 1998). Pri ljudeh začnejo leydigove celice tvoriti testosteron od dvanajstega do sedemnajstega tedna razvoja. Testosteron deluje enostransko, kar pomeni, da testosteron iz enega moda deluje samo na wolffov vod na isti strani telesa (Berne in sod., 2004). 5 α -dihidrotestosteron je pomemben pri nastanku sečevoda, prostate, penisa in modnik, pomemben je tudi pri rasti tkiva med zadnjikom in spolnimi organi. Za raziskovanje možnih vplivov na spolno diferenciacijo pri novorojenih glodalcih se uporablja merjenje razdalje med zadnikom in genitalno odprtino ali med zadnikom in korenem penisa. Leydigove celice izločajo tudi inzulinu podobnen rastni faktor 3 (INSL3), ki je pomemben za razvoj gubernakuluma mod in

zgodnji spust mod v trebušni votlini, kasnejši spust v modnik pa je pod vplivom testosterona (Sharpe, 2006).

Pri samicah glodavcev se v zgodnjem obdobju razvoja jajčnikov zarodne predniške celice hitro mitotično delijo med štirinajstim in petnajstim dnevom starosti plodu. Meiotična delitev se najprej pojavi v bližini mezonefrosa v sredini jajčnika, zato je verjetno, da mezonefros izloča neko snov, ki sproža mejozo (Wilson in Davies, 2007). Na delitev zarodnih celic pri samicah in samcih verjetno vpliva aktivin. Pri samcih podgan zavira nastajanje DNK, pri samicah pa predvsem med štirinajstim in petnajstim dnevom starosti plodu pospešuje nastajanje DNK. Po osemnajstem dnevu starosti plodu pri podganah aktivin postane neaktiven in mejoza se zaustavi. Folistatin je prisoten tudi v jajčnikih zarodkov in novorojenih glodavcev, vendar njegova vloga še ni razjasnjena (Kaipia in sod., 1994).

2.3 PESTICIDI IN ORGANOFOSFATI

Pesticidi so kakršnakoli snov ali mešanica različnih snovi ali mikroorganizmov (tudi virusov), ki se uporabljajo za odganjanje, uničevanje ali nadzor škodljivcev. Mednje spadajo tudi prenašalci človeških ali živalskih bolezni, neželjene vrste rastlin ali živali, ki povzročajo škodo ali kako drugače motijo proizvodnjo, shranjevanje, transport ali skladiščenje hrane ali krme, drugih kmetijskih proizvodov, lesa in lesnih proizvodov. Uporabljamo jih za nadzor nad žuželkami ali drugimi škodljivci na ali v telesu živali (FAO in WHO, 2006). Pesticide v kmetijstvu uporabljamo za uničevanje neželenih organizmov, kot so insekti, pleveli in plesni. Pesticidi delujejo tako, da vplivajo na različne biokemične in fiziološke procese rastlin in živali. Žal pa pesticidi ne vplivajo samo na ciljno vrsto, ampak tudi na neciljane organizme, kot so domače in divje živali ter ljudje. Pesticidi lahko povzročijo smrt, v nizkih koncentracijah lahko povzročajo bolezni. Pesticidi niso modernen izum, saj so Sumerci že 2500 let pred našim štetjem uporabljali insekticide na osnovi žveplovih spojin, nato pa so se pesticidi pojavljali skozi vsa obdobja zgodovine. Vendar niso prišli v splošno uporabo do industrijske revolucije v 17. in 18. stoletju. Razvoj sintetičnih pesticidov se je začel okoli leta 1930, ko so odkrili alkil tiocianatne insekticide, prve organske fungicide itd. Leta 1939 je Paul Müller odkril insekticidne lastnosti DDT-ja (diklorodifenolotrikloroetana) (Pretty in sod., 2005), za kar je leta 1948 prejel Nobelovo nagrado.

V zadnjih letih je bilo ugotovljeno, da številne snovi, ki jih lahko zaradi človekovega delovanja najdemo v okolju, vplivajo na razvoj in delovanje endokrinega sistema pri sesalcih, vključno s človekom. Med temi snovmi najdemo veliko pesticidov, ki spadajo v različne kemijske skupine, med njimi pa pomembno mesto zavzemajo organofosfati.

Organofosfate (OP) so naključno odkrili pred drugo svetovno vojno med razvojem novih insekticidov, v času druge svetovne vojne pa so nacisti razvijali organofosfatne živčne pline. Prvi organofosfat, ki je prišel v komercialno uporabo, je bil paration. Je učinkovit insekticid, ki je zelo toksičen za sesalce. V širšo uporabo je po letu 1950 prišel malation, ki za sesalce ni zelo toksičen. Organofosfati ireverzibilno zavirajo encim AChE, ki hidrolizira živčni prenašalec ACh v neaktivni holin in acetat po koncu nevrokemičnega prenosa. ACh je nujen za živčne prenose v centralnem in perifernem živčnem sistemu. Organofosfati in karbamati zavirajo AChE tako, da fosforilirajo aktivno mesto encima. Večina organofosfatov se veže z AChE na estrskem aktivnem mestu, stabilnost vezi pa je odvisna od vezane molekule. Aktivnost AChE pada, medtem ko narašča izpostavljenost organofosfatom in karbamatom. Zaradi tega se v sinapsah kopiči ACh, kar povzroča prekomerno aktivnost v sinapsah in motnje pri prenosu sporočil (Woods, 1999). Znaki zastrupitve z organofosfati pri živalih so slinjenje, solzenje, povečano uriniranje in izločanje blata, težko dihanje, upočasnitev krvnega utripa in mioza, lahko tudi tresenje in slabost mišic. Ob akutni zastrupitvi lahko nastopi smrt, ki je posledica odpovedi dihanja (Harms in sod., 1998).

Organofosfati se v okolju dokaj hitro razgradijo v sekundarne produkte, vendar so tudi ti produkti lahko tudi ti zelo toksični za sesalce, saj so biološko aktivni. Kmalu po odkritju organofosfatov so jih začeli hitro uporabljati po vsem svetu na praktično vseh pridelkih. Vendar je kmalu postalo jasno, da ima mnogo teh novih proizvodov, poleg očitnih in takojšnjih pozitivnih lastnosti, lahko tudi resne in nepričakovane negativne posledice za zdravje ljudi in živali. Kasnejše generacije insekticidov so karbamati in sintetični piretroidi, ki so, z nekaj izjemami, manj toksični za ljudi in živali v primerjavi z organofosfati. V kmetijstvu je po nekaterih podatkih letna svetovna poraba pesticidov 2,5 milijarde kilogramov, kar predstavlja približno 400 g pesticidov na vsakega človeka na svetu. Velik problem predstavlja prevelika ali nepravilna uporaba pesticidov (Merrington, 2002; Weinbroum, 2004; Pretty in sod., 2005; Levine, 2007). Aktar in sod. (2009) poročajo, da svetovna poraba insekticidov predstavlja 44 % vseh pesticidov, sledijo s 30 % herbicidi,

fungicidi predstavljajo 21 % vseh pesticidov, ostali pa 5 % (Aktar in sod., 2009). Organofosfatni insekticidi se uporabljajo že veliko desetletij in trenutno predstavljajo 65 % vseh uporabljenih insekticidov. Načeloma v naravi niso dolgo obstojni, vendar njihove ostanke lahko najdemo v zraku, dežju in megli. Najpogosteje najdemo ostanke diazonina, metilparationa, parationa, malationa, klorpirifosa in metidationa. V zadnjih treh desetletjih so najpogosteje uporabljeni organofosfatni insekticidi diazonin, metil paration in malation (Levine, 2007).

Organofosfate pogosto uporabljajo za škropljenje različnih pridelkov, ki so pomembni pri prehrani dojenčkov in otrok, kot so na primer koruza, sadje, zelenjava in različni oreški. Ostanke vsaj dveh pesticidov lahko najdemo na več kot 25 % sadja, zelenjave in žit, ki jih gojimo v Evropski uniji. Največ ostankov najdemo v pripravljeni in otroški hrani. Poleg tega se različni organofosfati lahko uporabijo kot insekticidi v domovih in okoli njih. V ZDA je trenutno registriranih okoli 40 organofosfatov in ti predstavljajo 50 % vseh uporabljenih insekticidov (Levine, 2007). Zaradi podobnosti v nevrokemičnih procesih pri sesalcih in žuželkah, ki jih želimo z organofosfati zatreti, je velika možnost, da organofosfati vplivajo tudi na delovanje živčnega sistema pri ljudeh in živalih. Redko se lahko zgodi, da bi akutno zastrupitev povzročili organofosfati, ki jih zaužijemo s hrano ali pijačo, vendar pa se organofosfati lahko kopičijo v telesu mater in škodujejo razvijajočemu se zarodku, dojenčkom in otrokom, ki so v dobi rasti in razvoja izredno občutljivi. Organofosfati lahko tudi v zelo nizkih koncentracijah škodljivo vplivajo na razvoj in delovanje razmnoževalnega sistema, vedno več je tudi dokazov, da lahko povzročijo poškodbe na razvijajočih se možganih in živčnem sistemu. Dojenčki in otroci do petega leta so v večji nevarnosti, da bodo s hrano vnesli v telo previsoke količine organofosfatov zaradi specifične prehrane, saj pojedjo več zelenjave in sadja glede na svojo telesno maso (Levine, 2007; Bjorling-Poulsen in sod., 2008).

2.4 HORMONSKI MOTILCI

Hormonski motilci, med katere spadajo tudi organofosfati, so snovi iz okolja, ki lahko motijo delovanje endokrinega sistema in lahko vplivajo na zdravje in razmnoževanje živali in ljudi. Živali in ljudje smo hormonskim motilcem izpostavljeni preko različnih virov: kontaminirana

hrana, voda, zrak ali zemlja. Lahko vplivajo na nastanek, sproščanje, metabolizem ali izločanje hormonov. Prav tako lahko posnemajo delovanje hormonov. (Casals-Casas in Desvergne, 2011). Večina hormonskih motilcev ima določene lastnosti, zaradi katerih so lahko zelo nevarni – dolga razpolovna doba, slaba topnost v vodi in dobra topnost v maščobi, kar vodi k njihovemu kopičenju v maščobnem tkivu. Velike količine hormonskih motilcev lahko najdemo v vodi in v industrijskih, kmetijskih in gospodinjskih odpadkih. To večinoma recikliramo na kmetijskih površinah, tako preko vode in hrane lahko pridejo v organizem domačih živali, nato pa do človeka (Brevini in sod., 2005).

Hormonske motilce lahko razdelimo v dve skupini, v prvi so tisti, ki so prisotni v naravi, v drugi pa so antropogeni hormonski motilci. Med naravne hormonske motilce spadajo fitoestrogeni, kot sta npr. kumestol in genistin, ki jih najdemo v nekaterih semenih, gobah, travah, deteljah in sadju in so slabše aktivni kot endogeni hormoni. V drugi skupini najdemo različne snovi, kot so na primer nekateri pesticidi (DDT, organofosfori pesticidi, verjetno atrazin), poliklorirani in polibromirani bifenili, plastifikatorji (oktilfenol, nonilfenol ipd.), različne komponente v plastiki (bisfenol A - BPA), industrijski onesnaževalci (težke kovine, dioksin) (Elobeid in Allison, 2008; Woodruff in sod., 2008; Majdič, 2010).

Bjørning-Poulsen in sod. (2008) so v preglednem članku opisali pesticide, ki se uporabljajo v Evropi in lahko vplivajo na razvoj in delovanje živčnega sistema. Med temi pesticidi so organofosfatni in karbamatni insekticidi, ki zavirajo delovanje AChE, piretroidni insekticidi, ditiokarbatni in klorofenoksi fungicidi (Bjørning-Poulsen in sod., 2008).

V zadnjih dveh desetletjih se veliko pozornosti posveča posrednim vplivom pesticidov, ki jih je težko opaziti in tudi oceniti. Veliko pomembnih hormonov, kot so estrogeni, progesteron, testosteron in tiroksin, se z veliko afiniteto veže na specifične receptorje v tarčnih celicah in tako sproži niz različnih učinkov (Pretty in sod., 2005; Hotchkiss in sod., 2008; Diamanti-Kandarakis in sod., 2009). Predvideva se, da je najpogostejši način delovanja hormonskih motilcev preko neposredne vezave na receptorje, kot so na primer estrogenski receptorji, delujejo pa lahko kot agonisti ali antagonisti receptorjev (Zoeller in sod., 2005; Gore, 2010). Možno je, da ED delujejo tudi posredno tako, da zavirajo aktivnost encima aromataze (P450 CYP19), ki pretvarja androgene hormone v estrogene (Vinggaard in sod., 2000; Benachour in sod., 2007; Diamanti-Kandarakis in sod., 2009). Lahko vplivajo na količino hormonov tudi tako, da vplivajo na izraženost genov za encime iz skupine citokromov P450, ki sodelujejo pri

nastajanju steroidnih hormonov (Storvik in sod., 2011). Mnogo hormonskih motilcev posnema delovanje spolnih hormonov, zato lahko povzročajo motnje v hormonskem delovanju. Veliko teh snovi lahko spremeni delovanje androgenih, estrogenih ali ščitničnih hormonov, ki so pomembni za normalen razvoj zarodka in razmnoževalno aktivnost pri vseh do sedaj proučevanih vretenčarjih. Hormonski motilci lahko tudi spremenijo tvorbo plazemskih proteinov in procese biotransformacije v jetrih. Lahko tudi motijo delovanje živčnih celic in imunskega sistema. Hormonski motilci lahko neposredno ali posredno vplivajo na izražanja genov, tak vpliv je metilacija DNK, ki je lahko tudi dedna. Shinomiya in Shinomiya (2003) sta s poskusi in vitro pokazala, da DDT zavira rast nevritov v odvisnosti od koncentracije. DDT v visokih koncentracijah povzroči apoptozo podganjih celic PC12, ki se uporabljajo kot model za proučevanje razvoja živčevja (Shinomiya in Shinomiya, 2003; Elobeid in Allison, 2008). Colborn in sod. (1993) navajajo vplive različnih kemičnih snovi na endokrini sistem pri živalih, ljudeh in na celice v celičnih kulturah. Ena prvih in pomembnejših študij, ki je poročala o vplivu pesticidov na divje živali, je bila študija o vplivu diklorodifenolotrikloroetana (DDT) na kakovost jajc beloglavega orla v okolici Velikih jezer v ZDA. Analize so pokazale, da so lupine jajc tanjše in zato bolj lomljive. Koncentracije DDT-ja v jajcih so bile tako visoke, da bi šele pri desetkrat nižjih koncentracijah lahko vzdrževali stalno populacijo orlov. Tudi mladiči, ki so se izvalili, so imeli zelo nizko preživetveno sposobnost (Colborn in sod., 1993). Zelo pomembno je, da se raziskovalci zavedamo tudi kumulativnih učinkov različnih hormonskih motilcev, saj je večina raziskav in določil o varnih mejah izpostavljenosti usmerjena na izpostavljenost eni snovi, ne pa več snovem naenkrat. Vendar smo živali in ljudje v življenju izpostavljeni več snovem hkrati (Woodruff in sod., 2008; Aktar in sod., 2009; Centers for Disease Control and Prevention).

Ameriški Center za nadzor in preprečevanje bolezni (Center for Disease Control and Prevention (CDC)) od leta 1999 meri vsebnost nekaterih snovi in njihovih presnovkov, ki onesnažujejo okolje, v serumu in urinu ljudi. Pri določenem delu proučevane populacije so v vzorcih našli tudi 150 različnih onesnaževalcev. Pri večini pregledane populacije so prisotni na primer ostanki tobačnega dima, svinec, živo srebro in ftalati. Zavedati se tudi moramo, da so poleg načina izpostavljenosti in koncentracije pomembne tudi razlike v individualni občutljivosti. Starost, spol in genotip lahko vplivajo na dovzetnost za nastanek različnih motenj, anatomskih sprememb in bolezni (Woodruff in sod., 2008; Centers for Disease Control and Prevention). V zadnjih desetletjih je predvsem laična populacija zelo zaskrbljena

zaradi domnevno vedno večjih problemov na področju razmnoževanja ljudi. Nekatere raziskave kažejo na to, da se je povečalo število moških, ki so zboleli za rakom na modih, ki imajo zmanjšano število semenčic, zniževal naj bi se nivo serumskega testosterona, pojavlja se tudi vedno več reprodukcijskih motenj, ki se pokažejo ob rojstvu, kot npr. kriptorhizem in hipospadija. Vendar nekatere raziskave teh sprememb ne potrjujejo (Moller, 1998; Paulozzi, 1999; Andersen in sod., 2000; Travison in sod., 2007; Giwercman in Giwercman, 2011). Skakkebaek in sod. (2001) so postavili hipotezo o sindromu nepravilnega razvoja moda (ang. Testicular dysgenesis syndrome; TDS). Hipoteza pravi, da ima nepravilni razvoj mod lahko več primarnih vzrokov, ki posredno vodijo do nepravilnega delovanja leydigovih in sertolijevih celic v času razvoja moških spolnih organov. Hitro naraščajoča pojavnost reprodukcijskih motenj pri ljudeh kaže da imajo, poleg redkih genetskih napak (npr. genske mutacije, kromosomske napake itd.), verjetno vpliv tudi hormonski motilci oz. spremenjen način življenja (Skakkebaek in sod., 2001).

2.5 VPLIV HORMONSKIH MOTILCEV NA SPOLNE ORGANE SAMIC IN SAMCEV SESALCEV

Pravilno razmerje med koncentracijama androgenih in estrogenih hormonov je pomembno za normalen razvoj spolnega sistema pri sesalcih v zarodku in v obdobju po rojstvu, ki je izjemno pomembno za normalno delovanje spolnih organov pri odraslem osebk. Glavna skrb toksikologije, ki se ukvarja s področjem reprodukcije, je, ali lahko izpostavljenost snovem v okolju vpliva na razvoj v obdobju pred rojstvom in po njem ter v puberteti (Stoker in sod., 2002). Raziskave so pokazale, da izpostavljenost različnim kemičnim snovem lahko povzroči spremembe v spolnem obnašanju, zmanjšano plodnost ali neplodnost, povečanje pojavnosti splavitev, zaostalo rast, smrti zarodkov, poškodbe ob rojstvu in propad jajčnikov (Gandolfi in sod., 2002).

Delovanje moškega in ženskega spolnega sistema ureja hipotalamusno-hipofizno-gonadna os, po sistemu negativne povratne zanke. Gonadoliberin (gonadotropine sproščajoči hormon; GnRH) se pulzno izloča iz posebnih celic v predoptičnem področju možganov. GnRH ureja proizvodnjo in izločanje LH in FSH iz hipofize, ta dva hormona pa vplivata na dva različna tipa celic v modih. LH ureja delovanje leydigovih celic, ki tvorijo testosteron, medtem ko

FSH deluje na sertolijeve celice in sodeluje pri urejanju spermatogeneze. Poleg testosterona in estrogenov imajo pri urejanju hipotalamusno-hipofizno-gonadne osi z negativno povratno zanko pomembno vlogo tudi beljakovina za vezavo androgenov (ABP-androgene vezajoči protein), ki je androgenski transportni protein in inhibin B, sestavljen iz alfa in beta podenote zavira izločanje FSH iz hipofize (Knobil in Neill, 1994). Raziskave pri živalih so pokazale, da izpostavljenost hormonskim motilcem v maternici in v zgodnjem obdobju po rojstvu lahko vpliva na nastop in razvoj v puberteti. Hormonski motilci lahko potencialno delujejo na vseh treh ravneh hipotalamusno-hipofizno-gonadne osi, saj lahko vplivajo na hipotalamus, hipofizo ali neposredno na spolne žleze. Pomembno je, da poznamo mehanizme delovanja hormonov, saj tako lahko razumemo delovanje hormonskih motilcev.

Estrogeni vplivajo na celice preko dveh vrst receptorjev, to sta estrogenski receptor α in β (ER α in ER β). Receptorja sta prepisovalna dejavnika, ki sta vključena v številnih fizioloških funkcijah, kot so na primer razvoj, razmnoževanje, presnova, obnašanje, delovanje srčno-žilnega sistema, vzdrževanje homeostaze v kosteh. Estrogenska receptorja sta vpletena v patološke procese kot na primer rak dojk in prostate, zato sta tudi tarči za mnoga zdravila. Izražata se v različnih tkivih in imata različne vloge. V maternici, mlečni žlezi, modih, hipofizi, ledvicah, jetrih in srcu najdemo največ ER α , medtem ko je ER β izražen predvsem v prostati in jajčnikih. Zato so fenotipske posledice pri miših, ki so brez enega ali drugega receptorja, različne. Nekatere *in vitro* raziskave kažejo, da imajo hormonski motilci večjo afiniteto do ER β kot do ER α . Ob vezavi hormonskih motilcev na ER β se aktivira več koaktivatorjev kot ob vezavi na ER α , kar privede do povečanega prepisovanja genov (Swedenborg in sod., 2010). Pri odraslih podganah dodajanje visokih odmerkov estrogenov zavira aktivnosti steroidogenega encima P450 17 alfa hidroksilaze in povzroča znižanje proizvodnje testosterona. Možno je, da izpostavljenost estrogenom ali estrogenskim kemikalijam med razvojem plodu vpliva na proizvodnjo testosterona in na maskulinizacijo moškega zarodka (Sikka in Wang, 2008; Mathews in sod., 2009). Izpostavljenost nekaterim snovem zgodaj v razvoju ali v puberteti lahko povzroči nastanek bolezni kasneje v življenju (Gandolfi in sod., 2002; Uzumcu in sod., 2006). Aksglaede in sod. (2009) so pokazali, da je pri deklicah na Danskem v zadnjih petnajstih letih prej nastopila puberteta, pa tudi dojke so se jim začele prej razvijati. Pri pregledanih dekletih niso ugotovili, da bi na te posledice vplivala telesna masa ter količina hormonov, prav tako so izključili genetske faktorje. Avtorji so

izpostavili možen vpliv hormonskih motilcev, vendar tega niso mogli potrditi (Aksghlaede in sod., 2009).

Steroidni hormoni, posebej še estrogeni, so pomembni pri organizaciji in razvoju neuroendokrinega sistema, ki uravnava spolno specifično fiziologijo v obdobjih pred rojstvom in razvoj po njem. Nevroni, ki izločajo gonadotropin sproščajoči hormon (GnRH), nimajo estrogenskih receptorjev α , vendar jih imajo nekateri drugi nevroni v hipotalamusu, ki lahko vplivajo na aktivnost nevronov, ki izločajo GnRH (Clarke, 2011). Pillon in sod. (2012) so proučevali možen vpliv 17- α -etinilestradiola na razvoj nevronov, ki izločajo gonadotropin sproščajoči hormon pri miših. *Per os* so brejim samicam dajali 17- α -etinilestradiol v dveh koncentracijah, ki so podobne, kot jih najdemo v okolju in v koncentracijah, ki se uporabljajo pri kontracepciji ali za nadomestno hormonsko zdravljenje. Brejim samicam so 17- α -etinilestradiol dodajali v času nevrogeneze in potovanja nevronov iz nosne plakode. Učinke so opazovali pri plodovih, starih 13,5 dni. Ugotovili so, da je izpostavljenost plodov 17- α -etinilestradiolu povzročila statistično značilno povečanje števila nevronov, ki izločajo GnRH, v odvisnosti od koncentracije. Možni mehanizmi delovanja so preko povečane nevrogeneze in/ali zmanjšane apoptoze (Pillon in sod., 2012).

Motnje v hipotalamusu, hipofizi ali reprodukcijskem sistemu se lahko pokažejo kot motnje v delovanju jajčnikov in posledično kot neplodnost. Jajčnik ima dve pomembni vlogi, sproščanje jajčec in proizvodnjo hormonov jajčnika – estrogenov, progesterinov (progesteron) in inhibina. Veliko raziskav bo še potrebno, da bomo razjasnili način delovanja različnih strupenih snovi na jajčnik. Na jajčnike lahko posredno vpliva spremenjena količina hormonov hipofize (FSH in LH), zaradi motenj v neuroendokrini osi estrogenov in progesterona. Možno je, da imajo strupene kemikalije neposreden vpliv na proizvodnjo steroidnih hormonov v jajčniku, kar bi lahko vplivalo na zorenje jajčec in vzdrževanje zgodnje nosečnosti. Hormonski motilci lahko prizadenejo delovanje jajčnikov tudi tako, da uničijo jajčeca. Strupene kemikalije uničujejo jajčeca tako, da neposredno znižajo preživetveno sposobnost jajčeca. Jajčeca so v vseh stopnjah razvoja obkrožena s celicami granulose. Toksične kemikalije lahko povzročajo spremembe v celicah granulose in tako posredno poškodujejo jajčece (Buccione in sod., 1990; Hooser in sod., 1994; Pocar in sod., 2003). Veliko uničenje jajčec povzroči poškodbo jajčnih foliklov, zaradi tega je zmanjšana proizvodnja steroidnih hormonov, to pa lahko povzroči uničenje jajčnika. Uničenje jajčec torej lahko povzroči

motnje v endokrinem ravnotežju, znižanje količine estrogenov in progesterona in povečanje izločanja FSH in LH iz hipofize. Kolikšen vpliv imajo kemikalije na razmnoževanje, je odvisno od tega na kateri stopnji razvoja je bilo jajčece ob uničenju. Kemikalije, ki uničujejo jajčeca v primordialnih in primarnih foliklih, povzročajo zakasnele učinke na razmnoževanje v taki meri, da je povečanje števila rastočih in antralnih foliklov nemogoče (Hooser in sod., 1994). Kemikalije, ki uničujejo rastoče ali antralne folikle, povzročajočasne motnje v razmnoževanju, saj se folikli lahko obnovijo iz množice primarnih foliklov. Takšne kemikalije povzročajo neplodnost, ki jo zaznamo kmalu po izpostavitvi (Jarrell in sod., 1991). Pomemben faktor pri ocenjevanju učinka izpostavljenosti je tudi raven izpostavljenosti toksičnim kemikalijam. Le redko se zgodi, da je posameznik izpostavljen takšnim koncentracijam snovi, strupenih za jajčnike, ki jih je lahko izmeriti in oceniti. Pogosto smo ljudje izpostavljeni dlje časa nižjim koncentracijam strupenih snovi. Veliko tveganje predstavlja tudi dejstvo, da se nekateri hormonski motilci kopičijo v zarodkih, kar potrjujejo raziskave pri živalih in ljudeh, kjer so imeli potomci izpostavljenih mater v krvi ob rojstvu do 25 % višje koncentracije dioksinov kot njihove matere (Gandolfi in sod., 2002; Pocar in sod., 2003; Brevini in sod., 2005; Uzumcu in Zachow, 2007).

2.6 VPLIVI HORMONSKIH MOTILCEV NA RAZVOJ IN DELOVANJE SPOLNIH ORGANOV SAMIC SESALCEV

Kronična ali subkronična izpostavitve organofosfatu diklorvosu lahko povzroči histopatološke spremembe različnih tkiv (Oral in sod., 2006). Izpostavljenost hormonskim motilcem v kritičnih obdobjih razvoja živali ali človeka lahko omogoči razvoj različnim boleznim v odraslem obdobju, med drugim tudi raku. Hormonski motilci preko epigenetskih sprememb lahko vplivajo tudi na potomce izpostavljenih živali. Pri proučevanju hormonskih motilcev je pomembno, da posameznik ni izpostavljen samo enemu hormonskemu motilcu, ampak večim naenkrat oz. v času življenja, zato je lahko prizadetih več hormonskih sistemov in je razumevanje delovanja hormonskih motilcev zelo zapleteno (Ma, 2009). Vpliv kemikalij na razvoj ženskega spolnega sistema in zdravje v odraslem obdobju so Buck Louis in sod. (2011) združili v sindromu, imenovanem sindrom nepravilnega razvoja jajčnikov (ang. Ovarian dysgenesis syndrome; ODS), ki združuje različne komponente nenormalnega razvoja jajčnikov, müllerjevih vodov in tudi razvoj drugih bolezni, kot na primer raka jajčnikov (Buck

Louis in sod., 2011). Visoka koncentracija DDT-ja v serumu mater statistično značilno zmanjša verjetnost nosečnosti pri hčerah (Cohn in sod., 2003). Dietilstilbestrol (DES) je nesteroidni umetni estrogen, ki so ga med leti 1940 in 1970 predpisovali ženskam za preprečitev spontanih splavov, čeprav dokazov za njegovo pozitivno delovanje niso imeli. Tako pri moških kot ženskih potomcih žensk, ki so jemale DES, je bilo opisanih veliko nepravilnosti v spolnem, srčno-žilnem in imunskem sistemu (Herbst in sod., 1971; Newbold, 2004; Titus-Ernstoff in sod., 2006). Podobne spremembe, kot so na primer neplodnost, neredni spolni cikli, spremenjena zgradba spolnega sistema, vaginalni adenokarcinom, so ugotovili tudi na živalskih modelih po izpostavljenosti DES. Blatt in sod. (2003) so opozorili na možnost vpliva DES preko epigenetskih sprememb. Petnajstletno dekle je namreč zbolelo za karcinomom malih celic jajčnika, ki se v puberteti pojavlja zelo redko in njegova etiologija je zaenkrat neznana. Obolela je bila vnukinja ženske, ki je dobivala DES v času nosečnosti z materjo pacientke (Blatt in sod., 2003). Prav tako je zelo proučen vpliv bisfenola A (BPA) na endokrini sistem. BPA je plastifikator, ki se uporablja za utrditev in razbistritev polikarbonatne plastike kot tudi pri proizvodnji epoksi smol. V raziskavi reprezentativnega vzorca ljudi, ki je vključevala 394 odraslih v Združenih državah Amerike, je 95 % preiskovanih ljudi imelo v seču zaznavne koncentracije BPA-ja. Ti rezultati kažejo, da je verjetno velika večina populacije v ZDA izpostavljena BPA-ju (Calafat in sod., 2005). Miši, izpostavljene BPA-ju v koncentracijah, ki je takšna, kot je izpostavljenost v okolju, je povzročila hitrejši začetek pubertete, prej se pojavi odpiranje nožnice, spremeni se morfologija jajčnikov, telesna masa in koncentracija LH v krvi (Zama in Uzumcu, 2010). Kljub vsemu se mnenja in znanstvena dognanja močno razlikujejo med seboj. Večino trditev o strupenosti BPAja pri koncentracijah, katerim smo izpostavljeni tako ljudje kot živali v okolju, je ovrгла raziskava Ryana in sod. iz leta 2010, vendar strokovnjaki še vedno niso zavzeli enotnega stališča. BPA lahko s svojo šibko estrogensko aktivnostjo še vedno prispeva k škodljivim vplivom različnih drugih kemikalij, vendar je pri oralni izpostavljenosti verjetno njegov vpliv minimalen (Ryan in sod., 2010; Sharpe, 2010).

Veliko raziskav je namenjenih proučevanju vpliva različnih snovi iz okolja na nastanek in razvoj raka na dojki, ki je najpogostejša oblika raka pri ženskah. Starost ob pojavljanju raka na doji pa se iz leta v leto niža.

Raziskavi iz leta 1992 in 1993 sta poročali o višjih koncentracijah PCB-jev pri ženskah obolelih za rakom dojk v primerjavi s kontrolno skupino žensk. Domnevali so, da so neznani estrogeni ali ksenoestrogeni povzročitelji raka na dojkah (Falck in sod., 1992; Wolff in sod., 1993). Safe (1995) je opozarjal, da je tudi v prehrani ljudi veliko naravnih fitoestrogenov, ki imajo estrogenske učinke, njihova prisotnost v hrani pa je precej višja kot vsebnost kemikalij z estrogenim delovanjem in zato potencialno predstavljajo večjo nevarnost (Safe, 1995). Leta 1995 so Ahlborg in sod. pregledali raziskave in ugotovili, da dotedanje raziskave *in vitro* in epidemiološke študije ter raziskave na živalih ne podpirajo teorije o nastanku raka na dojkah zaradi ksenoestrogenov, vendar je tudi dokončno ne zavračajo (Ahlborg in sod., 1995).

Vpliv ksenoestrogenov na nastanek raka na dojkah so proučevali v več raziskavah, kjer so primerjali količino PCB-jev v maščobnem tkivu ali serumu obolelih in zdravih žensk. Raziskave iz različnih držav so pokazale, da količina PCB-jev pri obolelih za rakom na dojkah ni statistično značilno višja kot pri kontrolni skupini. Primerjali so tudi vplive različnih PCB-jev in organokloriranih pesticidov pri obolelih in zdravih ženskah. Hoyer in sod. poročajo, da je bila količina dieldrina (insekticid) v serumu višja pri obolelih za rakom na dojkah kot pri kontrolni skupini, čas preživetja se je nižal z višanjem nivoja dieldrina (Hoyer in sod., 1998; Hoyer in sod., 2000). Nasprotno so Ward in sod. izmerili količino dieldrina v krvi Norvežank, ki so darovale kri med leti 1973 in 1990, vendar pri ženskah, obolelih za rakom na dojkah, niso našli povišanega nivoja dieldrina (Ward in sod., 2000). Veliko raziskavo so naredili Gammon in sod. (2002) v New Yorku med prebivalci Long Islanda. Avtorji so dognali, da ne morejo podpreti hipoteze, da organoklorini povečujejo možnost za nastanek raka na dojkah pri belkah, ki živijo na Long Islandu (Gammon in sod., 2002a; Gammon in sod., 2002b). Krogenaes in sod. (1998) so proučili vplive PCB 153 in PCB 126 na goveja jajčeca v raziskavah *in vitro*. Koncentracije, ki so jih uporabljali v poskusu so bile takšne da so dosegli koncentracije, kot so jih izmerili pri ženskah, ki niso bile posebej izpostavljene tem PCB-jem. Dodatek izomere PCB 153 zoritvenemu mediju je povzročil zmanjšan odstotek jajčec, ki so zaključila prvi celični cikel, ni pa neposredno vplival na zorenje jajčec. Izomera PCB 126 je pri višjih koncentracijah – 1.006 pg/mL negativno vplivala na zorenje jajčec, pri nižjih koncentracijah – 10,06 pg/mL in 100,6 pg/mL je prizadela razvoj zarodka. Poleg tega, da so uporabljene koncentracije tolikšne, kot jih najdemo v serumu žensk, so rezultati pomembni tudi zato, ker je PCB 153 glavni in zelo stabilni PCB in ga najpogosteje najdemo v krvi, mleku in drugih tkivih ljudi. Veliko je tudi

podatkov, ki govorijo, da so mešanice PCB-jev bolj strupene kot samo ena vrsta PCB - ja (Krogenaes in sod., 1998).

Študija Uzumcu in sod. (2006) je pokazala, da izpostavljenost podgan metoksiloru v zgodnjem obdobju po rojstvu povzroči znižano maso jajčnikov, zavira rast foliklov in spodbuja proizvodnjo antimüllerjevega hormona v obdobju pred puberteto (Uzumcu in sod., 2006). Oral in sod. (2006) so podganam *peroralno* aplicirali nizke odmerke organofosfata diklorvosa. Eni skupini so dodajali samo diklorvos, drugi diklorvos ter vitamina E in C, tretji pa samo koruzno olje kot kontrolo. Ugotovili so, da diklorvos, v primerjavi s kontrolno skupino, povzroči statistično značilno povišanje koncentracije malondialdehida (MDA) v plazmi. MDA je presnovni produkt, ki je uporaben za oceno membranske lipidne peroksidacije. V skupini podgan, ki so prejemale diklorvos ter vitamina E in C, je bila koncentracija MDA v primerjavi z diklorvosno skupino statistično značilno nižja, prav tako je bil manjši obseg histopatoloških sprememb in apoptoze v jajčnikih (Oral in sod., 2006).

Triklorfon (TCF), širokospektralni organofosfat, je bil leta 2005 četrti najpogosteje uporabljan pesticid na Kitajskem. Ostanke TCF-ja so našli na večini zelenjave na kitajskem trgu. TCF v nizkih koncentracijah (pod 10 mg/kg/dan) in ob daljšem času izpostavljenosti ni vplival na razmnoževalne parametre samic (dolžina gonitve, zorenje jajčec) in rast plodov miši (Ding in sod., 2011).

2.7 VPLIVI HORMONSKIH MOTILCEV NA RAZVOJ IN DELOVANJE SPOLNIH ORGANOV SAMCEV SESALCEV

V zadnjih desetletjih se je povečala pogostnost raka na modih, pogostnost nekaterih prirojenih napak, kot so nepravilen razvoj sečnice (hipospadija) in kriptorhizem pri moških. Več poročil govori tudi o zniževanju količine semenčic v ejakulatu pri moških, vse te motnje so poimenovali sindrom nepravilnega razvoja mod (ang. Testis dysgenesis syndrome; TDS) (Skakkebaek in sod., 2001). Biološki vzrok za TDS bi lahko bila povečana izpostavljenost estrogenom v času razvoja zarodka ali spremenjeno izražanje AMH. Visoka koncentracija materinih estrogenov bi lahko znižala koncentracijo FSH pri moških potomcih, z negativno povratno zanko preko osi hipotalamus-hipofiza-moda in posledično znižala koncentracijo AMH. Tako bi bil moten normalen razvoj spolnega sistema samcev, kar pogosto lahko

privede do kriptorhizma in hipospadije. Vplivi hormonskih motilcev na spermatogenezo bi lahko potekali preko štirih mehanizmov delovanja, motenj v delovanju Sertolijevih in drugih podpornih celic, nepravilnega urejanja delovanja spolnih hormonov (zmanjšano število leydigovih celic, zmanjšana steroidogeneza v leydigovih celicah, nepravilno delovanje osi hipotalamus-hipofiza-moda), apoptoze zarodnih celic ali epigenetske spremembe genoma (Phillips in Tanphaichitr, 2008). Veliko raziskav je posvečenih raziskovanju števila semenčic v ejakulatu pri ljudeh. Vzorce so raziskovalci dobili iz semenskih bank, plodnostnih klinik ali klinik, kjer opravljajo vazektomije. Auger in sod. (1995) so analizirali podatke o številu semenčic ki so bili dostopni v semenski banki v Parizu in so bili zbrani od 1351 moških od leta 1973 do 1992. Rezultati so pokazali velik padec v povprečnem številu semenčic, in sicer od 89 milijonov/mL v letu 1973 na 60 milijonov/mL v letu 1992. Poleg tega so ugotovili, da se je v teh dvajsetih letih povečalo število semenčic z morfološkimi napakami in zmanjšano gibljivostjo (Auger in sod., 1995). Raziskava na kliniki v Toulousu, kjer so proučili 302 vzorca, odvzete od leta 1977 do 1992 ni pokazala nobenih sprememb v kakovosti semena (Bujan in sod., 1996). Tudi mnogo drugih raziskav je pokazalo nasprotujoče rezultate, vzroki za takšne rezultate so lahko različne merilne tehnike, sezonske spremembe in razlike med moškimi, ki so darovali vzorce. Ugotovljene so bile velike razlike v številu semenčic v ejakulatu moških med državami in tudi v posameznih področjih znotraj držav. Vendar vzrokov za take razlike ne poznamo, saj so področne razlike pri raziskavah, ki so pokazale nasprotujoče si rezultate, v onesnaževalcih kot so PCB-ji, DDE in pesticidi, minimalne in je zato malo verjetno, da bi razlike v onesnaženosti lahko razložile področne razlike v številu semenčic. Thomas in sod. (1998) so z meritvami hormonov pri nosečih ženskah ugotovili, da imajo ženske, ki nosijo dvojčke, višje koncentracije serumskega estradiola v primerjavi s tistimi ženskami, ki nosijo samo enega otroka, poleg tega naj bi bila koncentracija serumskega estradiola višja pri ženskah, ki nosijo dvojajčne dvojčke kot pri tistih, ki nosijo enojajčne dvojčke (Thomas in sod., 1998). Swerdlow in sod. (1997) so na podlagi tega preverili hipotezo, da lahko izpostavljenost materinim estrogenom v obdobju pred rojstvom poveča tveganje za nastanek raka na dojki in modih. Pregledali so podatke o pojavnosti raka na modih in raka dojk pri enojajčnih in dvojajčnih dvojčkih. Njihovi rezultati so dejansko pokazali povečano tveganje za raka na modih in za rak dojk pri dvojajčnih dvojčkih v primerjavi z enojajčnimi (Swerdlow in sod., 1997). Leta 2002 so Storgaard in sod. v podobni raziskavi proučili vpliv estrogenov na število semenčic in kakovost semena pri odraslih

enojajčnih in dvojajčnih dvojčkih, ter moških, ki niso bili rojeni kot dvojčki. Med temi skupinami pa ni bilo razlik, kar kaže, da višje koncentracije estrogenov pred rojstvom niso povezane z zmanjšanjem števila semenčic pri odraslih ljudeh (Storgaard in sod., 2002).

Najvišjim koncentracijam estrogenih hormonov pred rojstvom so bili izpostavljeni potomci žensk, ki so v nosečnosti prejemale DES. Raziskave Wilcoxa in sod. (1995), ter Hemminkija in sod. (1999) so pokazale, da se plodnost moških, pred rojstvom izpostavljenih DES-u, ne razlikuje od plodnosti moških, ki DES-u niso bili izpostavljeni pred rojstvom (Wilcox in sod., 1995; Hemminki in sod., 1999). Vendar pa so moški potomci žensk, ki so bili kot zarodki izpostavljeni DES-u (njihove matere so jemale DES), imeli večjo verjetnost za nastanek hipospadije kot potomci mater, ki DES-u niso bile izpostavljene preko njihovih mater (Brouwers in sod., 2006). Kobayashi in sod. (2009) so podkožno injicirali nizke koncentracije DES-a brejim podganam med sedmim in enaindvajsetim dnevom brejosti. Proučevali so vpliv na moške potomce in ugotovili znižan nivo serumskega testosterona in povečano koncentracijo mRNK za androgenski receptor. Avtorji predvidevajo, da je povečana izraženost gena za androgenski receptor nastopila zato, da se vzdržuje normalna spermatogeneza (Kobayashi in sod., 2009).

Peroralna izpostavljenost odraslih samcev podgan organofosfatu klorpirifosu je povzročila zmanjšano število semenčic, njihovo slabšo gibljivost, kot tudi povečano število nenormalno razvitih semenčic (Farag in sod., 2010). Narayana in sod. (2006) so proučevali morebitni vpliv organofosfata metil-parationa na potomce izpostavljenih podgan. Ugotovili so, da je metil-paration vplival na morfologijo in število semenčic, ter koncentracijo askorbinske kisline v modih pri odraslih potomcih izpostavljenih podgan. Vendar metil-paration ni vplival na telesno maso potomcev, plodnost izpostavljenih samic ali samcev ter preživetveno sposobnost mladičev (Narayana in sod., 2006a). Raziskava Okahashija in sod. (2005) o izpostavljenosti podgan organofosfatu fenitroionu je pokazala, da izpostavljenost takšnim količinam, kot jih najdemo v okolju, ne vpliva na endokrini sistem, kljub temu da so podgane imele močno znižano aktivnost možganske AChE (Okahashi in sod., 2005). Dolgotrajna raziskava Recia in sod. je pokazala, da izpostavljenost organofosfatom pri delavcih v kmetijstvu povzroča hormonske motnje predvsem tako, da moti delovanje osi hipotalamus – hipofiza; največje vplive so imeli na FSH in LH, katerih koncentracija se je povečala ob povečani izpostavljenosti organofosfatom (Recio in sod., 2005).

Delavci, ki so bili na delovnem mestu izpostavljeni pesticidom, so imeli statistično značilno znižano količino semenske tekočine, zmanjšano število normalno oblikovanih semenčic in zmanjšano gibljivost semenčic, nižjo koncentracijo serumskega testosterona in LH v primerjavi s tistimi delavci, ki pesticidom niso bili izpostavljeni. Niso pa ugotovili opazne razlike v koncentraciji semenčic. (Yucra in sod., 2008). Gomes in Lloyd (2009) sta mišim peroralno dodajala različne mešanice organofosfatov v zelo nizkih koncentracijah, kakšnim so izpostavljeni prebivalci na področjih z intenzivnim kmetijstvom. Izpostavljene miši so, v primerjavo s kontrolno skupino, imele statistično značilno spremenjene razmnoževalne parametre (pogostejša smrt plodov), nižjo telesno maso potomcev, slabše pridobivanje telesne mase matere (Gomes in Lloyd, 2009). Podobne učinke so pri podganah opisali tudi Jacobson in sod. (2010). Proučili so pet fungicidov (procimidon, mankozeb, epoksikonazol, tebukonazol in prokloraz), ki vsak zase ne povzročajo sprememb v razmnoževalnih parametrih. Vseh pet fungicidov je v mešanici, v kateri je bila koncentracija vsakega fungicida ista, povzročilo statistično značilne spremembe, kot so podaljšana dolžina brejosti in povečana umrljivost potomcev. Spremembe v spolni diferenciaciji potomcev so se pokazale kot povečanje anogenitalnega indeksa pri samicah in znižanje anogenitalnega indeksa pri samcih, povečano število bradavic pri samčkah ter povečan odstotek samčkov s hipospadijo. Rezultati kažejo, da koncentracije posameznega fungicida, ki ne povzroča sprememb v opazovanih reprodukcijskih parametrih, skupaj z drugimi takšnimi fungicidi povzročajo izrazite spremembe (Jacobsen in sod., 2010).

2.8 VPLIVI HORMONSKIH MOTILCEV NA RAZVOJ IN DELOVANJE MOŽGANOV TER OBNAŠANJE LJUDI IN ŽIVALI

Epidemiološke raziskave ljudi in raziskave na živalih so pokazale, da endokrini motilci lahko motijo razvoj možganov. Znano je, da imajo spolni in ščitnični hormoni pomembno vlogo pri razvoju možganov, med drugim spolni hormoni vplivajo na razvoj spolnega dimorfizma v obdobju pred rojstvom. Pomanjkanje ščitničnih hormonov v času razvoja pri ljudeh in živalih povzroči kretinizem. Možno je, da izpostavljenost endokrinim motilcem v obdobju pred rojstvom lahko moti normalen razvoj možganov tako, da vplivajo endokrini motilci na tvorbo, transport, delovanje in presnovo hormonov (McGarvey in sod., 2001; Khan in Hansen, 2003; Dickerson in Gore, 2007). Relativno nizke koncentracije endokrinih motilcev lahko pri

poskusnih živalih povzročijo poškodbo centrov, ki nadzorujejo funkcije kot sta spolno obnašanje in učenje. Vendar med spoloma obstaja razlika pri poškodbi možganskih centrov. Endokrini motilci lahko povzročijo povečanje prostornine nekaterih možganskih jeder, kot na primer spolno dimorfno jedro v predoptičnem področju in *locus ceruleus*.

Hormonski motilci lahko negativno vplivajo na nastanek sinaps tako, da vplivajo na izražanje nekaterih genov, motijo delovanje ščitničnih hormonov ali motijo nastanek sinaps preko receptorjev (Schantz in Widholm, 2001; Takahama in Shirasaki, 2001; Diamanti-Kandarakis in sod., 2009; Hajszan in Leranth, 2010).

Obdobje, v katerem je človek ali žival izpostavljen hormonskim motilcem, ima ključen pomen pri tem, kakšni so njihovi vplivi. Vemo, da so v razvoju določena kritična obdobja, v katerih steroidni in drugi hormoni vplivajo na razvoj nevroendokrinega sistema. Hormoni ščitnice, steroidni hormoni nadledvične žleze in spolni steroidni hormoni imajo pomembno vlogo pri razvoju možganov v obdobju pred rojstvom in po njem. Zaradi podobnih mehanizmov delovanja lahko izpostavljenost endokrinim motilcem v obdobju ob rojstvu moti normalen razvoj možganov in spremeni njihovo delovanje. Rezultati različnih raziskav kažejo, da izpostavljenost endokrinim motilcem v obdobju pred rojstvom lahko povzroči spremembe v strukturi možganskih področij (sprememba velikosti jeder, spremenjen nivo izraženosti nevrotransmiterjev in beljakovin v živčnih celicah) in delovanju možganov (spremembe v spolnem obnašanju in sposobnosti učenja) (Takahama in Shirasaki, 2001; Wilson in Davies, 2007; Gore, 2010). V nekaterih epidemioloških raziskavah, kjer so bile živali podvržene kronično nizkim koncentracijam organofosfatov, so se kazale tudi spremembe pri nekaterih obnašanjih. Mehanizmov, ki privedejo do takšnih posledic, še ne poznamo dovolj dobro, vendar pa verjetno niso povezani z zaviranjem delovanja AChE. Ugotovljeno je bilo, da koncentracije, prenizke, da bi povzročile holinergične znake akutne zastrupitve, lahko povzročijo izboljšano učenje v nekaterih testih z labirinti in počasnejše prevajanje živcev. Možno je, da so tarča za takšno delovanje nekatere bolj občutljive možganske beljakovine. Učinki, ki bi nastali preko takih tarčnih beljakovin, bi bili najverjetneje precej drugačni kot učinki akutne zastrupitve preko AChE (Ray in Richards, 2001). Izpostavljenost podgan bisfenolu A ali fitoestrogenu genisteinu v zgodnjem obdobju po rojstvu je povzročila povišano število imunoreaktivnih celic za kalbindin v področju spolno dimorfnega jedra hipotalamusa, ni pa povzročila povečane prostornine tega jedra (Patisaul in

sod., 2007). Ugotavljali so tudi vpliv zgodnje izpostavljenosti podgan genisteinu in ugotovili povečano prostornino anteroventralnega periventrikularnega jedra (AVPV) pri samcih. AVPV je področje v možganih, ki je pomembno za nevroendokrini nadzor ovulacije pri samicah in verjetno ureja sproščanje GnRH pri obeh spolih (Gore, 2010).

Izpostavljenost plodov visokim koncentracijam klorpirifosa v obdobju pred rojstvom je povzročila pomanjkanje pozornosti in sindrom hiperaktivnosti ter predvidljive razvojne probleme pri ljudeh (ang. pervasive developmental disorder -PDD) v prvih treh letih življenja (Rauh in sod., 2006). Veliko raziskovalcev proučuje vpliv izpostavljenosti nizkim koncentracijam organofosfatov v brejosti na razvoj živčevja in obnašanje potomcev izpostavljenih živali. Palanza in sod. (1999) so opravili raziskave o vplivu nizkih koncentracij dveh pesticidov – DDT-ja in metoksiklora (MTX) ter nizkih koncentracij umetnega estrogena DES na razvoj živčevja in kasnejšega obnašanja pri hišnih miših. Koncentracije, uporabljene v poskusu, so bile takšne, kot jih lahko najdemo v okolju. Ugotovili so, da izpostavljenost nizkim koncentracijam MTX pred rojstvom povečajo reaktivnost refleksov v zgodnjem obdobju po rojstvu. Te miši v predadolescentnem obdobju kažejo zmanjšan reakcijski čas pri odkrivanju novega okolja in novega objekta. Začetek agresivnosti med samci, ki so bili pred rojstvom izpostavljeni MTX, je nastopil kasneje. Zmanjšan nivo agresivnosti izpostavljeni samci kažejo v zgodnji adolescenci, ko odrastejo pa ni razlik. Samci, ki so bili pred rojstvom izpostavljeni DES-u, DDT-ju in MTX-u so večkrat označevali svoje področje v novem okolju. Razmerje med samicami in samci, ki so napadli pripadnika istega spola, je bilo povečano pri miših, ki so bile pred rojstvom pod vplivom nizkih doz DES-a in DDT-ja (Palanza in sod., 1999). Izpostavljenost organofosfatu klorpirifosu v času pred rojstvom in preko mleka v zgodnjem poporodnem obdobju je pri odraslih potomkah izpostavljenih miši povzročila statistično značilno poudarjeno obnašanje, podobno anksioznemu (Braquenier in sod., 2010). Samice podgan, ki so jim 1., 3. in 5. dan injicirali visoke odmerke MTX so v odraslem obdobju kazale več spolno nespejemljivega obnašanja, kar se je odražalo kot ugrizi in odrivi stimulusnih samcev (Bertolasio in sod., 2011). Eskenazi in sod. (2008) so opisali, da so otroci mater, ki so v krvi imele visoke koncentracije dialkilofosfata (presnovek OP), kazali počasnejši duševni razvoj in predvidljive razvojne probleme pri 24 mesecih starosti (Eskenazi in sod., 2008).

Krvno-možganska pregrada ščiti centralni živčni sistem pred snovmi, ki so v krvi in bi lahko škodljivo vplivale na delovanje živčnega sistema. Ob poškodbah in določenih boleznih se poveča prepustnost krvno-možganske pregrade in lahko nastopi smrt zaradi otekanja in krvavitev (Song in sod., 2004). Večina hormonskih motilcev prehaja krvno-možgansko pregrado in bi lahko neposredno vplivala na možganske celice. Vendar je težko primerjati serumske koncentracije teh hormonskih motilcev s koncentracijo v samih možganih. Vemo namreč, da so hormonski motilci večinoma topni v maščobah in imajo dolgo razplovno dobo, zato se tudi nabirajo v možganih, zaradi česar bi lahko bila koncentracija teh snovi v možganih višja kot npr. v krvi (Parent in sod., 2011). Kaže, da imajo miši bolj propustno krvno-možgansko pregrado kot podgane (Gupta in sod., 1999; Sinha in Shukla, 2003). Injiciranje organofosfatnega insekticida paraoksona podganam v odmerkih, ki ne povzročijo holinergičnih znakov zastrupitve, povzroči povečano 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). Slotkin in sod. (2006) so proučevali vpliv različnih koncentracij organofosfatov klorpirifosa, diazinona in parationa na razvoj možganov. Živalim so podkožno injicirali različne odmerke organofosfatov od prvega do četrtega dneva po rojstvu. Vplive so proučevali peti dan po rojstvu. Uporabljali so koncentracije, ki niso povzročale smrti pri izpostavljenih mladičih, prav tako te koncentracije niso vplivale na razmerje med maso možganov in telesno maso. Za paration so uporabili doze med 0,02 in 0,1 mg/kg, kar je tudi maksimalna tolerantna doza, za klorpirifos so uporabili maksimalno tolerantno dozo 1 mg/kg, in diazinon 0,5-2 mg/kg (maksimalna tolerantna doza je 5 mg/kg). Klorpirifos in diazinon sta v koncentracijah, nižjih od maksimalne tolerantne doze, škodljivo vplivala na rast nevritov v možganskem deblu in prednji možganih, kar so dokazali z zmanjšanim razmerjem med membranskimi proteini in skupnimi proteini. Prav tako sta v teh dozah klorpirifos in diazinon znižala aktivnost AChE, nista pa vplivala na vezavo hemiholina-3, ki je presinaptični holinski transporter in indeks holinergične živčne aktivnosti. Paration v maksimalni tolerantni dozi ni povzročil podobnih sprememb. S temi rezultati so dokazali, da imajo različni organofosfatni insekticidi drugačno pot delovanja na možgane, kot je njihova sistemska toksičnost. Paration v relativno nizkih dozah (0,1 mg/kg) povzroči smrt pri podganah, njegovih škodljivih učinkovna na možgane pa

niso opazili. Nasprotno velja za klorpirifos in diazinon, ki sta že v nižjih dozah kot je maksimalna tolerantna doza škodljivo vplivala na možgane (Slotkin in sod., 2006a).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 ŽIVALI

Spolno zrele (60 – 70 dni stare) miši Balb/c ženskega in moškega spola smo parili pri standardnih pogojih, temperatura 20 – 25° C, vlažnost 55 – 65%, dnevno : nočni cikel 12:12. Hrano (2916, Harlan Tekland, Velika Britanija) brez fitoestrogenov so miši imele na razolago *ad libitum*. Za vse poskuse na živalih je dovoljenje izdala Veterinarska uprava republike Slovenije (številka dovoljenja 3440-176/2006). Vsi poskusi na živalih so bili izvedeni skladno z etičnimi določili direktive EU (86/609/EEC).

Živali smo razdelili v dve poskusni skupini, prva je bila izpostavljena klormefosu v vodi v koncentraciji 3,5 µg/mL, druga v koncentraciji 0,35 µg/mL (10- in 100- krat nižja doza kot LD₅₀ za podgane). Ker klormefos ni zelo topen v vodi, smo ga najprej raztopili v etanolu. Kontrolna skupina živali je bila zato izpostavljena samo etanolu v koncentraciji 3,5 µl/mL vode.

Spolno zrele samce in samice smo naključno razdelili v skupine glede na dozo izpostavljenosti klormefosu. Miši smo pred paritvijo stekali in jih za sedem dni izpostavili klormefosu/etanolu. Po sedmih dneh smo v posamične kletke namestili po eno samico in enega samca. Miši so bile izpostavljene klormefosu/etanolu med paritvijo, brejestjo in do odstavitve mladičev pri 21 dneh. Pri neposredno izpostavljenih živalih smo spremljali število mladičev v gnezdih, mladiče smo vedno prešteli na dan rojstva. Vse ostale preiskave o vplivu klormefosa na razvoj in delovanje spolnih organov in možganov smo spremljali pri potomcih miši izpostavljenih klormefosu/etanolu. Samčke iz različnih gnezd smo ob odstavitvi naključno razporedili v različne skupine ter jih žrtvovali ob doseženi starosti (v vsaki starostni skupini so bili samčki iz vsaj treh različnih gnezd).

Mladiče smo žrtvovali 9, 19, 48, 56 in 70 - 80 dni po rojstvu. Samčki, ki so bili žrtvovani 48, 56 in 70 – 80 dni po rojstvu, so bili klormefosu/etanolu izpostavljeni le do odstavitve pri 21 dneh.

Samčke, stare 9 dni, smo žrtvovali s CO₂.

Samčke, stare 19, 48 in 70 – 80 dni, smo anestezirali z mešanico ketamina (Vetoquinol Biowet, Gorzowie, Poljska; 100 µg/g telesne mase (TM)), ksilazina (Chanelle

Pharmaceuticals Ltd., Loughrea, Irska; 10 µg/g TM) in acepromazina (Fort Dodge Animal Health, Fort Dodge, IA, ZDA; 2 µg/g TM). 19 in 48 dni starim samčkom smo odvzeli kri iz desnega srčnega prekata s heparinom (1 U/ml, Sigma) preprano injekcijo in iglo (0,8x 40 mm 21Gx1 9/16"). Heparinizirano kri smo centrifugirali 5 min. na 3000 obratih/min. pri 4 °C, odpipetirali smo krvno plazmo in jo shranili pri -20 °C do meritve hormonov. Preostalo kri smo iz živali sprali s hladnim 0,05 M slanim fosfatnim pufrom (PBS), ki mu je sledilo učvrščevanje z bouinovo raztopino. Odvzeta moda smo po odvzemu fiksirali v bouinovi raztopini še 4 do 20 ur, odvisno od velikosti. Nato smo moda vklopili v parafin po standardnem postopku.

Samčke, stare 56 dni, smo anestezirali z enako mešanico anestetikov, kot je opisano zgoraj, ko so bili v globoki anesteziji, smo naredili cervikalno dislokacijo in jim takoj odvzeli možgane za izolacijo RNK.

Živali, ki smo jih testirali v testu dvignjenega labirinta, smo teden dni po testu žrtvovali in jim odvzeli možgane za imunohistološke analize, ter moda za merjenje dnevne proizvodnje semenčic; tako smo zmanjšali število žrtvovanih živali v poskusu. Pred odvzemom mod smo stisnili trebušno aorto in veno cavo caudalis s kirurško prijemalko in na ta način preprečili izkrvavitev. Po odvzemu mod smo opravili perfuzijo s hladnim 0,05 M pufrom PBS, ki mu je sledilo učvrščevanje z raztopino 4-odstotnega paraformaldehida v 0,05 M PBS s pomočjo peristaltične črpalke (Ecoline ISM1076, Ismatec SA, Zürich, Švica) pri hitrosti pretoka tekočine 5 mL/min. Po končani fiksaciji smo živalim odvzeli možgane in jih hranili do uporabe v 0,1 M fosfatnem pufru (PB) pri 4 °C.

Tabela 1: Pregled skupnega števila žrtvovanih potomcev ob različnih starostih ter opravljene preiskave.

Starost potomcev ob žrtvovanju	Skupno število žrtvovanih potomcev	Preiskave
9 dni	5♂ kontrolna skupina 5♂ klormefos 3,5µg/mL 5♂ klormefos 0,35µg/mL	histološke preiskave mod, imunohistokemično barvanje (AMH) mod
19 dni	9♂ kontrolna skupina 8♂ klormefos 3,5µg/mL 8♂ klormefos 0,35 µg/mL	histološke preiskave mod, imunohistokemično barvanje (3β-HSD) mod, merjenje koncentracije hormonov v krvni plazmi
48 dni	7♂ kontrolna skupina 5♂ klormefos 3,5µg/mL 5♂ klormefos 0,35µg/mL	histološke preiskave mod, ugotavljanje apoptotičnih celic v modih, telesna masa, masa mod, masa semenskih mešičkov, premer semenskih cevk, merjenje koncentracije hormonov v krvni plazmi
56 dni	3♂ kontrolna skupina 3♂ klormefos 3,5µg/mL	izražanje genov v možganih
70 – 80 dni	12♂ kontrolna skupina 10♂ klormefos 3,5 µg/mL 5♂ klormefos 0,35 µg/mL 13♀ kontrolna skupina 13♀ klormefos 3,5µg/mL 6♀ klormefos 0,35µg/mL	dnevna proizvodnja semenčic, test dvignjenega labirinta, elektronska mikroskopija krvno-možganske pregrade

3.2 METODE DELA

3.2.1 Ugotavljanje števila mladičev v gnezdih

Opazovali smo velikost gnezd pri miših, ki so bile izpostavljene etanolu in klormefosu (skupaj 18 samic kontrolne skupine, 16 samic, izpostavljenih višji koncentraciji, in 12 nižji koncentraciji klormefosa).

3.2.2 Ugotavljanje histološke zgradbe mod

Parafinske bloke mod živali, starih 9, 19, 48 in 70 – 80 dni, smo narezali na 7 µm debele rezine in jih na predmetnih steklih sušili preko noči na 37 °C. Naslednji dan smo jih pobarvali po standardnem postopku s hematoksilinom in eozinom. Rehidrirali smo jih v ksilenu (Merck, Darmstadt, Nemčija) 5 min., nato pa po 5 min. v padajočih koncentracijah etanola (100 %, 96 %, 70 %). Rezine smo potem za približno 45 s. pomočili v hematoksilin (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Nemčija), jih sprali v navadni vodi ter še za približno 1 minuto barvali v eozinu. Sledila je dehidracija v naraščajočih koncentracijah etanola in ksilena za 5 minut. Rezine smo nato prekrili s hidrofobnim medijem za pripravo trajnih histoloških preparatov (Pertex Medite, Burgdorf, Nemčija). Splošno histologijo mod smo opazovali na mikroskopu Nikon Eclipse 80i (Nikon, Japonska). Ocenjevali smo prisotnost različnih razvojnih stopenj spolnih celic ter popolnost spermatogeneze.

3.2.3 Ugotavljanje izražanja antimüllerjevega hormona in 3β-hidroksisteroidne dehidrogenaze

Z imunohistokemičnim barvanjem smo ugotavljali izraženost antimüllerjevega hormona (AMH) (po 5 samcev v vsaki skupini, starih 9 dni), ki nam je pokazal dozorevanje sertolijevih celic, in 3β-hidroksisteroidne dehidrogenaze (3β-HSD) (po 5 samcev v vsaki skupini, starih 19 dni) s katero smo ugotavljali razvoj lejdigovih celic. Specifična poliklonska kunčja protitelesa proti AMH smo dobili od Nacinalnega medicinskega inštituta za zdravje in raziskovanje, Pariz, Francija poliklonska kunčja protitelesa proti 3β-HSD iz Univerze v Edinburgu, Edinburg, Velika Britanija. V parafinske bloke vključena moda smo narezali na 7

µm debele rezine in jih na predmetnih steklih sušili preko noči na 37 °C. Naslednji dan smo rezine deparafinizirali 5 minut v ksilenu, jih rehidrirali v padajočih koncentracijah etanola (100 %, 96 % in 70 %) in jih spirali v destilirani vodi 5 minut. Sledilo je spiranje v PBS-u 5 minut. Endogene peroksidaze smo blokirali z 1 % vodikovim peroksidom v PBS 30 minut na sobni temperaturi. Rezine smo nato inkubirali 30 minut na sobni temperaturi s kozjim serumom, razredčenim 1:5 v PBS.-u. Nato smo normalni serum odlili, stekelca obrisali in na rezine dodali 100 µl primarnih protiteles v primerni razredčitvi (AMH 1:200, 3β-HSD 1:1000). Rezine smo pokrili s pokrovnim stekelcem in vzorce inkubirali čez noč v hladilniku na 4 °C. Naslednji dan smo rezine spirali dvakrat po pet minut na sobni temperaturi v PBS-u, jih 30 minut inkubirali s sekundarnimi kunčjimi protitelesi v raztopini 1:100 v PBS na sobni temperaturi in jih ponovno spirali dvakrat po pet minut v PBS-u. Za detekcijo vezanih protiteles smo rezine inkubirali 30 minut z zajčjim kompleksom peroksidaza – antiperoksidaza (PAP; Dako), v razredčitvi 1:100 v 0,05M Tris HCl, pH 7,4. Po ponovnem spiranju v PBS-u smo barvo razvijali v 0,05% 3,3'-diaminobenzidin tetrahidroklorid DAB (Sigma, Taufkirchen, Nemčija) do 30 minut. Encimsko reakcijo smo prekinili s spiranjem v destilirani vodi. Ozadje smo pobarvali v 15 sekundah s hematoksilinom. Rezine smo dehidrirali v naraščajočih koncentracijah etanola po 1 minuto (70 %, 96 % in 100 %), jih razbistrili v ksilenu in jih pokrili z nevodnim medijem (Meditex Pertex, Burgdorf, Nemčija).

3.2.4 Ugotavljanje apoptoze v modih

Apoptozo v rezinah mod 48 dni starih samčkov (5 samčkov v vsaki skupini) smo ugotavljali z metodo TUNEL (angl. Terminal Deoxynucleotide Transferaze dUTP Nick End Labeling). Za detekcijo apoptotičnih celic smo uporabili komercialni kit ApopTag® Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit (Millipore, Billerica, MA, ZDA) po navodilih proizvajalca. Parafinske bloke smo narezali na 7 µm debele rezine in jih na predmetnih steklih sušili preko noči na 37 °C. Naslednji dan smo rezine deparafinizirali 5 minut v ksilenu in jih rehidrirali v padajočih koncentracijah etanola (100 %, 96 % in 70 %), ter spirali v destilirani vodi 5 minut. Nato smo rezine inkubirali s proteinazo K (20 µg/mL) ~60 µL/5 cm². Rezine smo nato spirali v destilirani vodi 2x 5 min. Endogene peroksidaze smo blokirali s 3% vodikovim peroksidom v PBS-u 15 minut na sobni temperaturi, sledilo pa je spiranje. Potem smo dodali ekvilibracijski pufer, sledila pa je inkubacija z encimom terminalno transferazo

(TdT) na 37 °C 1 uro v prisotnosti z digoksigeninom označenih nukleotidov. Zatem smo rezine inkubirali v pufru za ustavljanje reakcije ter s protitelesi proti digoksigeninu 30 minut. Barvo smo razvijali v ustreznem substratu. Sledilo je spiranje in barvanje ozadja v 15 sekundah s hematoksilinom. Rezine smo dehidrirali v naraščajočih etanolih po 5 minut (70 %, 96 % in 100 %), jih razbistrili v ksilenu (3 x 2 minuti) ter jih pokrili z nevodnim medijem (Pertex, Burgdorf, Nemčija). Apoptotične celice smo prešteli v štiridesetih vidnih poljih v vsakem vzorcu z mikroskopom Nikon Eclipse 80i. Rezultate smo predstavili kot povprečno število apoptotičnih celic v enem vidnem polju.

3.2.5 Telesna masa, maso mod in mehurnic ter premer semenskih cevk

Samčke, stare 48 dni (potomce izpostavljenih živali), smo stehali in nato žrtvovali z anestezijsko mešanico. Meritve smo opravili pri 48 dni starih samcih (5 samcev v vsaki skupini), ki smo jih pred žrtvovanjem stehali. Ob žrtvovanju smo jim odvzeli obe modi, jih stehali in nato dali v bouinovo raztopino za približno 20 ur. Živalim smo tudi odvzeli mehurnice in jih stehali. Moda smo po 20 urah prestavili v epruveto s 70 % etanolom, kjer so ostala do zalitja s parafinom. Moda, vklopljena v parafinske bloke, smo nato pripravili po postopku opisanem v poglavju 3.2.1. V tako pripravljenih histoloških rezinah smo pri 40x povečavi z umerjenim merilnim okularjem izmerili premer 50 naključno izbranih, prečno prerezanih semenskih cevk, katerih prerez je bil čim bolj okrogel, tako smo izmerili samo semenske cevke, ki so bile prerezane pod kotom 90°.

3.2.6 Ocena dnevne proizvodnje semenčic

Dnevno proizvodnjo semenčic (DSP) smo ocenili pri 70 – 80 dni starih samčkah, ki smo jih pred tem uporabili v testu dvignjenega labirinta, možgane nekaterih pa smo uporabili z imunohistologijo na plavajočih rezinah možganov. DSP smo izračunali po modificirani metodi Thayer in sod. (Thayer in sod., 2001) pri 8 potomcih kontrolnih živalih, 4 potomcih živali iz skupine, ki je prejela 3,5 µg klormefosa na mililiter vode, in 5 potomcih, ki je prejela 0,35 µg klormefosa na mililiter vode. Moda smo takoj po odstranitvi stehali in homogenizirali v 5 mL fiziološke raztopine z 0,05 % Tritona X-100. Homogenizacijo

preživijo spermatide, ki so med štirinajsto in šestnajsto stopnjo, zato lahko štejemo njihova jedra. Eno kapljico homogenata smo kapnili na Bürker – Türkovo kamrico in semenčice prešteli pod 400-kratno povečavo. Od vsakega odvzetega vzorca smo sešteli semenčice v desetih kvadratkih površine $1/25 \text{ mm}^2$ in globine 0,1 mm. Iz števila prešteti celic smo izračunali dnevno proizvodnjo semenčic. Število semenčic v vzorcu smo izračunali po formuli $N \times 25 \times 5000$ (N - število prešteti semenčic, 25 – faktor za izračun števila semenčic v $1 \mu\text{L}$, 5000 – razredčitveni faktor). Dobljeni produkt smo delili z maso mod, da smo dobili število semenčic na gram tkiva. Ker razvoj od 14. do 16. stopnje spermatid traja 4,84 dni, smo predhodno izračunano vrednost delili s 4,84, da smo dobili dnevno proizvodnjo semenčic na gram tkiva mod (Thayer in sod., 2001).

3.2.7 Merjenje koncentracij hormonov

Koncentracijo hormonov smo po navodilih proizvajalca (Diagnostic Systems Laboratories, Inc., Webster, Texas, ZDA) merili pri potomcih izpostavljenih živali, s komercialnimi encimskoimunskimi (EIA) testi, validiranimi za miši. Kortikosteron smo merili s testom Active Rat Corticosterone EIA (DSL-10-81100), trijodotironin (T3) s testom Active Total T3 EIA (DSL-10-3100S), ter testosteron s testom Active (R) Testosterone EIA (DSL-10-4000).

3.2.8 Razmnoževanje potomcev

Spolno zrele potomce izpostavljenih živali smo naključno izbrali in med seboj parili, da bi ugotovili, ali ima klormefos morebiten vpliv na njihovo plodnost. Parili smo 8 parov potomcev kontrolne skupine, 9 parov potomcev skupine, izpostavljene klormefosu v višji koncentraciji, in 6 parov potomcev skupine, izpostavljene klormefosu v koncentraciji $0,35 \mu\text{g/mL}$. Ob kotitvi smo prešteli mladiče, upoštevali pa smo število mladičev v drugem gnezdu.

3.2.9 Opazovanje obnašanja, podobnega anksioznemu

Potomce izpostavljenih živali obeh spolov, stare 70 – 80 dni, smo testirali v standardiziranem testu dvignjenega labirinta (EPM) za preverjanje obnašanja, podobnega anksioznemu. Testirali smo 8 samcev in 13 samic, potomcev kontrolne skupine, 9 samcev in 13 samic, potomcev staršev izpostavljenih višji koncentraciji klormefosa, ter po 6 samcev in 6 samic, potomcev staršev izpostavljenih nižji koncentraciji klormefosa. Miši pred tem testom niso bile uporabljene v drugih testih. Labirint je sestavljen iz dveh zaprtih in dveh odprtih krakov (dolžina 66 cm in širina 5 cm), ki se križata pod pravim kotom na sredini. Odprta kraka sta brez stene, zaprta pa obdaja stena (višina 20 cm in širina 30 cm). Labirint je narejen iz črnega pleksi stekla, ki ga je mogoče enostavno umiti in razkužiti. Postavili smo ga na stojalo 50 cm od tal, tako da je bilo okolje labirinta na vseh štirih straneh kar se da podobno. Labirint je bil obrnjen z enim zaprtim krakom proti opazovalki in od nje oddaljen za približno 0,5 m. Poskusno miš smo dali na sredino labirinta in pričeli z opazovanjem. Test smo opravili v začetku temnega cikla pri rdeči luči in je trajal 5 min. Vsako miš smo opazovali enkrat kot je opisano v literaturi (Carobrez in Bertoglio, 2005; Schneider in sod., 2011). Ocenjevalec ni vedel, iz katere skupine je opazovana žival. Čas, ko se je miš zadrževala v zaprtem/odprtem kraku labirinta, ter čas, preden je vstopila v zaprto/odprto roko, smo neposredno merili s programom Stopwatch+ (verzija 1.5.1., Center for behavioral neuroscience, Atlanta, ZDA). Nahajanje v odprtem ali zaprtem kraku smo ocenili, ko je miš z vsemi štirimi tačkami stala v enem ali drugem kraku. Kadar se je miš nagnila oziroma samo pogledala iz zaprtega kraka ali je samo z dvema tačkama stala v odprtem kraku, smo ocenili nahajanje v prostoru na sredini labirinta.

3.2.10 Ugotavljanje izraženosti beljakovin v tkivnih rezinah možganov

Možgane smo odvzeli 9 samcem iz kontrolne skupine in 7 samcem iz skupine, izpostavljene višji koncentraciji klormefosa. Možgane smo pred rezanjem zalili v 5% agarozne bloke (Sigma) in jih v hladnem 0,05M PBS-u, z vibrotomom (Integraslice 7550 MM, Campden Instruments, Velika Britanija) razrezali na 50 μ m debele rezine. Rezine smo inkubirali v 0,1 M glicinu (Sigma) v 0,05 M PBS-u 30 minut, nato pa inkubirali v 0,5% natrijevem borohidridu (Sigma) za 15 minut na 4 °C, s čimer smo odstranili sledi fiksativa v tkivu rezin in prekinili ob fiksaciji nastale povezave med beljakovinami v celicah. Glicin in natrijev

borohidrid smo sprali s 15- in 20-minutnim spiranjem v 0,05M PBS-u. Rezone smo blokirali v 5% normalnem kozjem serumu (Chemicon, Temecula, CA, ZDA) z 0,5% Tritonom X-100 (Sigma) in 1% H₂O₂ (Merck, Darmstadt, Nemčija) za 30 minut na 4 °C. Kunčja primarna protitelesa proti arginin vazopresinu (AVP, 1: 15 000, ImmunoStar, Hudson, WI, ZDA), kunčja proti neuropeptidu Y (1:10 000, Dia Sorin, Stillwater, MN, USA) in kunčja protitelesa proti serotoninскому receptorju 1a (1:10 000) smo razredčili v 0,05 M PBS-u, ki je vseboval 1% goveji serumski albumin (Sigma) in 0,5% Triton x-100. Rezone smo inkubirali s primarnimi protitelesi na stresalniku 3 dni na 4 °C. Nato smo jih štirikrat po 15 minut spirali na sobni temperaturi v 0,05 M PBS-u, ki je vseboval 1% goveji serumski albumin in 0,02 % Triton X-100.

Po spiranju smo na rezine dali sekundarna protitelesa (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, ZDA), vezana z biotinom, proti primarnim kunčjim protitelesom v koncentraciji 1:500 v 0,05 M PBS-u z 1% normalnim kozjim serumom in 0,5% Tritonom X-100. Rezone smo inkubirali s sekundarnimi protitelesi 2 uri, nato pa ponovno štirikrat po 15 minut spirali v 0,05 M PBS-u z 0,02% Tritonom X-100. V mešanici streptavidina in hrenovi perooksidazi (Jackson ImmunoResearch), razredčeni 1:2000 v 0,05 M PBS-u z 0,5 % Tritonom X-100, smo inkubirali rezine 1 uro na sobni temperaturi, nato pa jih 1 uro spirali v 0,05 M slanem pufru Tris (TBS; 0,05 M Tris-HCl/0,9 % NaCl; pH 7.5; Sigma) pri sobni temperaturi. Komplekse antigen-protitelo smo vizualizirali z inkubiranjem rezin 5 minut v substratu 0,025 % 3'3'-diaminobenzidin/ amonij niklov (II) sulfat (Sigma) v pufru Tris (pH 7.5), ki je vseboval 0,02 % H₂O₂ na sobni temperaturi.

Peroksidazno reakcijo smo prekinili s spiranjem rezin v pufru nizke ionske jakosti trikrat po 15 min na stresalniku pri sobni temperaturi. Po imunohistokemičnem barvanju smo rezine nanесли na predmetnice, obdelane s silanom (APES, Sigma), in jih pustili sušiti čez noč. Naslednji dan smo rezine na predmetnicah sprali z destilirano vodo, jih posušili in pokrili s hidrofobnim medijem za pripravo trajnih mikroskopskih preparatov (Pertex Medite, Burgdorf, Nemčija). Kontrolo in oceno delovanja primarnih protiteles ter imunoreaktivne vzorce distribucije smo ocenili pod mikroskopom. Izraženost NPY smo proučevali v delih mandlja, v oddaljenosti 1 mm kaudalno od bregme pod 100-kratno povečavo. Izraženost AVP in serotoninского receptora 1a smo opazovali v hipotalamusu izpostavljenih živali pod 100-kratno povečavo.

3.2.10.1 Analiza področij v možganih

Za ustrezno kvalitativno in kvantitativno analizo biokemijsko označenih elementov (telesca nevronov, dendriti in aksoni, podporne celice) in analizo njihovega mesta nahajanja v rezinah možganov moramo biti pozorni na dve stvari: na kot, pod katerim so možgani rezani, in na meje področja v možganih, ki ga proučujemo. Kadar primerjamo posamezne rezine možganov med seboj, je treba preveriti kot rezanja. Prerezi skozi enako jedro pod različnimi koti se lahko razlikujejo, še posebej, kadar so področja oz. jedra zavrtih oblik. Kadar primerjamo med seboj rezine, je treba vedno določiti nekaj referenčnih točk (najmanj dve), ki morajo biti enako umeščene glede na področje, ki ga proučujemo, med rezinami. Če se področje razlikuje glede na položaj elementov, napačna vzporeditev rezin prekrije razlike v položaju elementov v področju. Pristopi so opisani in uporabljeni v literaturi (Tobet in Fox, 1992; Budefeld in sod., 2008). Vse strukture in področja v možganih ter oddaljenost posameznih rezin od bregme, ki so uporabljeni v tej nalogi, smo določili na osnovi atlasa mišjih možganov (Paxinos in Franklin, 2001).

3.2.11 Ugotavljanje izražanosti genov v možganih

3.2.11.1 Izolacija RNK

Po tri samce iz skupin, ki so prejemale etanol (kontrolna skupina) in višjo dozo klormefosa, smo žrtvovali v starosti 56 dni. Takoj za tem smo jim odstranili možgane, in sicer samo osrednji del možganov (ki vključuje preoptično področje in hipotalamus, mandelj, hipokampus in del možganske skorje, ne vključuje pa vohalnih betičev, malih možganov in podaljšane hrbtenjače). Iz delov možganov smo nemudoma izolirali ribonukleinsko kislino (RNK) po standardnem postopku s Trizolom. Možgane smo homogenizirali v 1 mL Trizola s homogenizatorjem IKA T10 Basic Ultra – Turrax (Nemčija). Nato smo homogenizirani vzorec pustili za 5 min na 15– 30 °C, za popoln razpad beljakovinskih kompleksov. Nato smo dodali 0,2 mL kloroforma in močno stresali 15 sekund, zatem pa pustili 2– 3 min na 15– 30 °C. Sledilo je centrifugiranje na 4 °C pri 10.000 obratih 15 minut. Zgornjo brezbarvno vodno fazo smo odpipetirali v novo epruveto in RNK precepitirali z dodatkom hladnega izopropil alkohola. Po 10- minutni inkubaciji na sobni temperaturi smo epruveto centrifugirali na 4 °C pri 10000 obratih 15 minut. Po tem centrifugiranju je RNK tvorila belo usedlino na dnu

epruvete. Odpipetirali smo supernatant in RNK sprali z 1 mL 75% etanola, nato smo epruveto dobro premešali in centrifugirali na 4 °C pri 10000 obratih 5 minut. Etanol smo nato odpipetirali, RNK usedlino smo sušili na zraku približno 10 minut. RNK smo nato raztopili v 20 µL vode brez nukleaz, nato pa dali za 10 minut v vodno kopel na 55 °C. Pripravljeno RNK smo nato shranili pri -80 °C do nadaljevanja dela na Centru za funkcijsko genomiko in biočipe na Medicinski fakulteti v Ljubljani.

3.2.11.2 Mikromreže

Za pripravo cDNK za mikromreže smo po navodilih proizvajalca za vsak vzorec potrebovali 5 µg celotne RNK in GeneChip® Expression 3'-Amplification One-Cycle Target Labeling and Control Reagents Kit (Affymetrix, Santa Clara, CA, ZDA). Vzorce smo hibridizirali na mikromreže GeneChip® Mouse Genome 430 2.0 Array (Affymetrix, Santa Clara, CA, ZDA) in jih sprali z GeneChip® Fluidics Station 450 kot je priporočil proizvajalec. Mikromreže smo skenirali z GeneChip® Scanner 3000 7G in slike analizirali z GCOS (GeneChip® Operating Software). Podatke smo normalizirali z Robust Multichip Average (RMA) in jih prenesli v računalniški program »Expression Console«. Klasifikacijo diferencialno izraženih genov smo naredili z BRB-Array Tools Version 3.7.0 beta_2, ki sta jo razvila dr. Richard Simon in sod. (Simon in sod., 2007), z uporabo logaritma primerjave gruč med skupinami. Za statistično značilno razliko smo uporabili prag pri $p \leq 0.001$.

Rezultate genskih mikromrež smo preverili s qPCR analizo.

3.2.11.3 Priprava komplementarne DNK (cDNK)

RNK možganov, ki nam je ostala po analizi mikromrež, smo uporabili za PCR z obratnim prepisom (RT-PCR), s tem smo izvedli prepis RNK v komplementarno DNK (cDNK).

Najprej smo izmerili absorbanco (pri 260 nm) RNK s spektrofotometrom (SmartSpec 3000™). Izračunali smo približno koncentracijo (upoštevajoč, da če je $A_{260}=1$, je koncentracija RNK 40 µg/mL, koncentracija = $A_{260} \times 40 \times \text{redčitev}$).

Reakcija RT-PCR je potekala v reakcijski mešanici končnega volumna 20 μ L, koncentracija vstopne RNK je bila 2 μ g. Za reagente smo uporabili High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, 4368814).

Reakcijska mešanica RT-PCR končnega volumna 20 μ L je vsebovala:

- 2 μ L PCR pufer (10X RT Buffer)
- 0,8 μ L mešanica deoksiribonukleotidov (25X dNTP Mix)
- 2 μ L naključni oligonukleotidni začetniki (10X RT Random Primers)
- 1 μ L RNazni inhibitor (RNase inhibitor)
- 2 μ g RNK
- do 20 μ L DEPC vode (voda brez nukleaz)

Reakcijske epruvetke smo nato vstavili v aparaturu za PCR in vzpostavili temperaturno-časovni protokol (določen v protokolu High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems):

- 25 °C, 10 minut
- 37 °C, 120 minut
- 85 °C, 5 minut
- 4 °C, neomejeno (shranjevanje)

3.2.12.4 Reakcija PCR v realnem času

V naslednjem koraku smo izvedli reakcijo PCR v realnem času (qPCR) na aparaturi Applied Biosystems Abi Prism 7000. Uporabili smo reagente TaqMan® Gene Expression Assay in reakcijo izvajali na 96-mestnih mikrotitrskih ploščah (Applied Biosystems), s specifičnimi oligonukleotidnimi začetniki za naslednje gene: kadherin 7 (*Cdh 7*, *Mm01305247_m1*), serotonin1A (*Htr1a*, *Mm00434106_s1*) in gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenazo (*Gapdh*, *Mm99999915_g1*), ki smo jo uporabili za notranjo kontrolo.

Pripravili smo reakcijske mešanice v končnem volumnu 10 μ L. Vse reagente in mikrotitrsko ploščo smo med pripravo hranili ves čas na ledu.

Posamezna reakcijska mešanica qPCR končnega volumna 10 μ L je vsebovala:

- 5,0 µL izhodiščne zmesi (TaqMan® Universal Master Mix II with UNG (Uracil-N-Glikozilaza), 2X)
- 0,5 µL specifičnih oligonukleotidnih začetnikov (za encime: *Cdh7*, *Htr1a*, *Gapdh*)
- 3,5 µL vode DEPC
- 1 µL cDNK

Mikrotitrne plošče smo nato vstavili v aparaturo za PCR v realnem času (Applied Biosystems Abi Prism 7000) in vzpostavili temperaturno-časovni protokol:

- 50 °C, 2 minuti (inkubacija Uracil-N-Glikozilaze, UNG)
- 95 °C, 10 minut (aktivacija polimeraze)
- 40 ciklov:
 - 95 °C, 15 sekund (denaturacija DNK)
 - 60 °C, 1 minuta (prileganje začetnih oligonukleotidov in ustvarjanje novih verig DNK)

Sledila je analiza podatkov.

Tabela 2: Uradne oznake, polna imena, dostopna številka in funkcija ocenjenih referenčnih genov.

Oznaka	Ime gena	Dostopna številka	Vrsta/tip gena
<i>Gapdh</i>	gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza	NM_008084.2	Sodeluje pri presnovi glukoze, aktivaciji prepisovanja genov, na začetku apoptoze (NCBI, 2012b)
<i>Htr1a</i>	Serotoninski receptor 1a	NM_008308.4	Površinski celični receptor za prenosnik v centralnem živčnem sistemu, povezujejo ga z depresivnim in anksioznim obnašanjem (NCBI, 2012c)
<i>Cdh7</i>	kadherin 7, tip 2	NM_172853.2	Prenos sporočil, celična komunikacija, celična adhezija (NCBI, 2012a)

3.2.11.5 Statistične metode reakcije PCR v realnem času

Za statistično obdelavo smo uporabili primerjalno $C_t (2^{-\Delta\Delta C_t})$ metodo. Primerjalna C_t metoda je matematični model, s katerim se računajo spremembe v izraženosti genov kot relativni večkratnik razlik med preiskovanim genom in notranjo kontrolo – kalibratorjem.

Poskus je temeljil na RNK, izolirani iz kompleksnih vzorcev tkiva, zato je bilo potrebno rezultate normalizirati, da bi zmanjšali variabilnost v začetni količini in sestavi vzorca. Uporabili smo *Gapdh* kot notranjo kontrolo oz. kalibrator. Rezultate smo izrazili kot razmerje med preiskovanim genom in kalibratorjem (Livak in Schmittgen, 2001; Huggett in sod., 2005; Wong in Medrano, 2005).

Za računanje razlik med skupinami smo uporabili enačbi: $\Delta\Delta C_t = (C_{t \text{ preiskovana}} - C_{t \text{ kalibrator}})$ in $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

Za statistično obdelavo rezultatov smo uporabili programsko opremo Microsoft Excel for Mac 2011, verzija 14.1.4.

3.2.12 Ugotavljanje zgradbe krvno-možganske pregrade

Potomce miši (3 živali vsakega spola), izpostavljene višji dozi klormefosa in etanolu, smo žrtvovali v starosti 70 do 80 dni. Del možganske skorje iz čelnega režnja smo fiksirali v 4% glutaraldehidu 2 uri. Vzorce smo nato pripravili po standardnem postopku za elektronsko mikroskopijo s Fluka Durcupan (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, Pennsylvania, USA) medijem. Rezone možganov, ki so bile fiksirane v glutaraldehidu, smo izpirali dvakrat po 15 min. s svežim 0,05 M PBS (pH=7,1-7,4; 800 mOsm), nato pa jih fiksirali z 1% OsO_4 . OsO_4 smo nato dvakrat sprali z 0,05 M fosfatnim pufrom in jih dehidrirali v naraščajočih alkoholih po 15 min. Tkivo smo nato inkubirali v mešanici absolutnega alkohola in acetona (1:1, 30 min.), nato v absolutnem acetonu (30 min.) in mešanici absolutnega acetona in smoli Fluka Durcupan (1:1, 2h). Nato smo tkivo vklopili v 100% smolo Durcupan. Po polimerizaciji smole v termostatu (pri 60 °C, 72 h) smo pripravljene bloke obrezali in pripravili za rezanje. Pripravo rezin in mikroskopiranje smo opravili v Centru za elektronsko mikroskopijo Medicinske fakultete v Zagrebu. Poltanke rezine (debeline 0,9 μm) smo naredili s Power-Tome XL ultramikrotomom (Bal Tec/RMC) in jih pobarvali z 1% toluidinskim modrilom. Tako smo dobili poltanke rezine, ki smo jih analizirali z binokularnim mikroskopom Nikon Eclipse E200. Na osnovi pregleda mikroskopskih analiz poltankih rezin smo naredili

ultratanke rezine (debeline 70 nm), ki smo jih položili na bakrene mrežice in jih pobarvali s svinčevim citratom in uranil acetatom. Rezine smo nato pregledali z elektronskim mikroskopom Zeiss 902A (Carl Zeiss, Nemčija).

3.2.13 Zajem digitalnih slik

Moda in možgane smo slikali s pomočjo mikroskopa z vgrajeno digitalno kamero (Microphot FXA mikroskop s 3CCD-kamero Nikon, Japonska in mikroskop Eclipse 80i z digitalno kamero DS-Fi1 (Nikon)). Digitalne slike smo uredili s pomočjo programa Photoshop 8.0. Pri tem je šlo za urejanje osvetlitve in kontrasta slike pri analizi možganov. S tem nismo vplivali na kakovost imunohistokemičnega barvanja na sliki. Na slikah možganov smo prešteli pozitivno obarvane celice.

3.2.14 Statistične metode

Statistično analizo podatkov smo izvedli s statističnim programom NCSS software package (NCSS 2007, Kaysville, UT, ZDA). Vpliv klormefosa na razlike v številu apoptotičnih celic v modih, telesni masi, masi mod in mehurnic, v premeru semenskih cevk, dnevni proizvodnji semenčic, v koncentraciji hormonov v plazmi, plodnosti potomcev, obnašanju, podobnemu anksioznemu, in izražanju nevropeptida Y v mandlju, smo ovrednotili z enofaktorsko analizo variance. Razliko smo sprejeli za statistično značilno, če je bila dobljena vrednost p nižja od 0,05. Rezultati so navedeni kot povprečje $\pm$ standardna napaka srednje vrednosti (povprečje $\pm$ SEM).

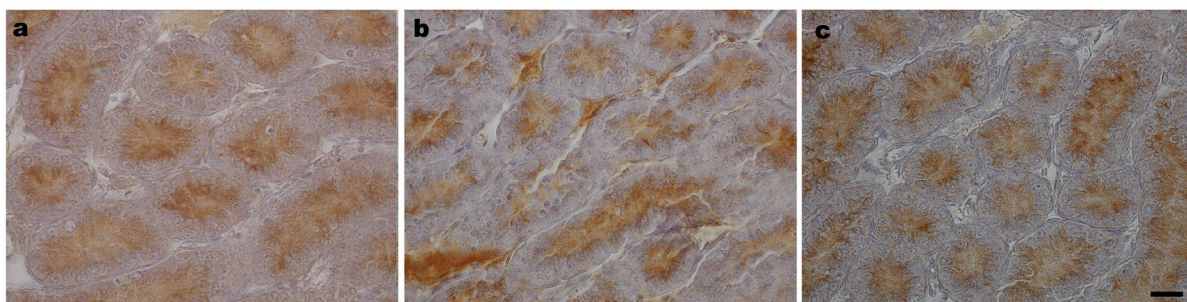
4 REZULTATI

4.1 VPLIV NIZKIH KONCENTRACIJ KLORMEFOSA NA ŠTEVILO MLADIČEV V GNEZDIH

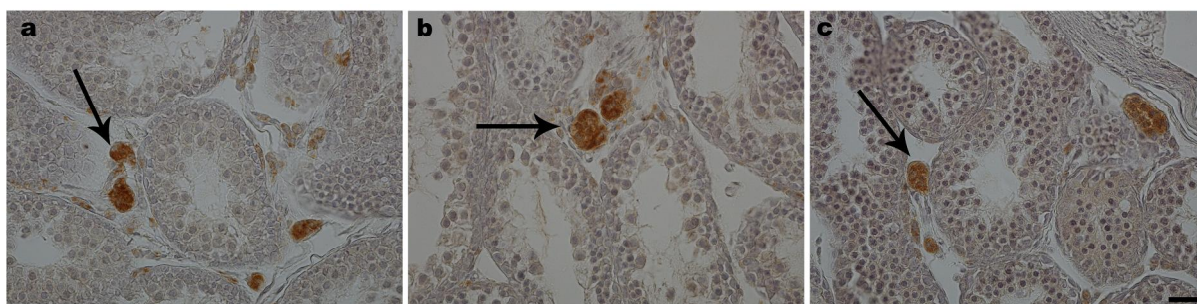
Med kontrolno in poskusnima skupinama ni bilo razlik v velikosti gnezd. Število mladičev pri kontrolni skupini ($n=18$) je bilo $7,35 \pm 0,67$, v skupini, ki je prejela klormefos v višji koncentraciji ($n=16$) $6,8 \pm 0,68$, v skupini, ki je prejela $0,35 \mu\text{g/mL}$ klormefosa ($n=12$) pa $7,35 \pm 0,65$.

4.2 VPLIV NIZKIH KONCENTRACIJ KLORMEFOSA NA HISTOLOŠKO ZGRADBO MOD

Pregledali smo histološke rezine mod miši starih 9, 19 in 48 dni, pobarvane s hematoksilinom in eozinom, da bi ugotovili morebitne nepravilnosti v poteku spermatogeneze in pri 48-dnevnih samcih tudi morebitne zamike v končanju prvega vala spermatogeneze. Med kontrolno in tretiranimi skupinama ob natančnem histološkem pregledu nismo ugotovili nobenih razlik.



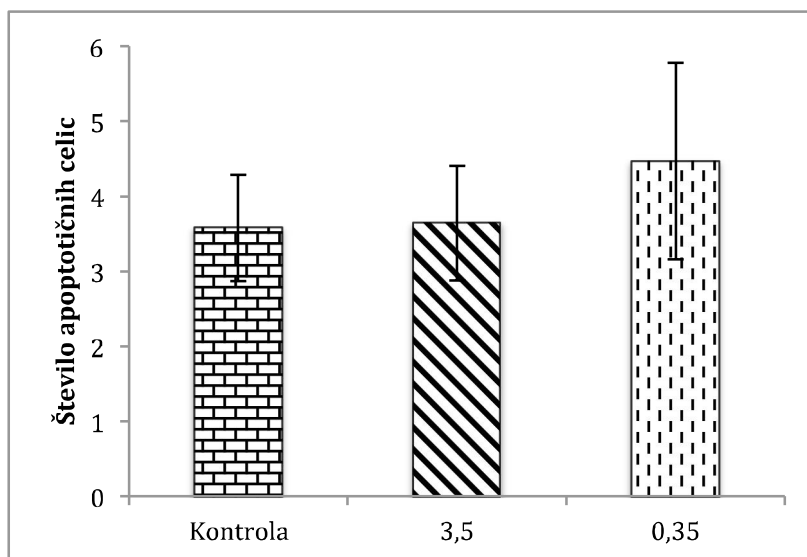
Slika 2: Imunohistokemično barvanje mod 9-dnevnih miši proti antimüllerjevemu hormonu. Obarvanost sertolijevih celic je bila med skupinami izražena enako močno. Kontrolne miši – a, višji dozi klormefosa izpostavljene miši ($3,5\mu\text{g/mL}$ vode) – b, nižji dozi klormefosa izpostavljena miš ($0,35\mu\text{g/mL}$ vode) – c (povečava 400x, merilo = $100\mu\text{m}$ in velja za a-c).



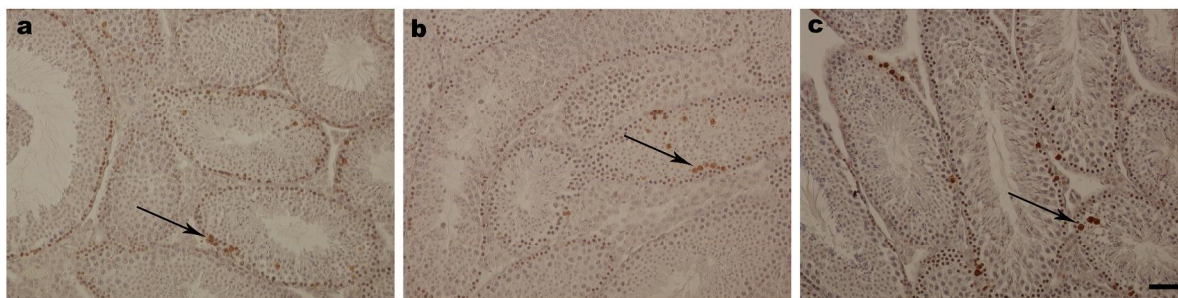
Slika 3: Imunohistokemično barvanje mod 19-dnevnih miši proti 3β -hidroksisteroidni dehidrogenazi. Prisotnost leydigovih celic, določenih z izražanjem 3β -hidroksisteroidne dehidrogenaze, se ni razlikovala med skupinami. a – kontrolna miš, b – višji dozi klormefosa izpostavljena miš ($3,5\mu\text{g/mL}$ vode), c – nižji dozi klormefosa izpostavljena miš ($0,35\mu\text{g/mL}$ vode) (povečava 400x, merilo = $100\mu\text{m}$ velja za a-c).

4.4 VPLIV NIZKIH KONCENTRACIJ KLORMEFOSA NA APOPTOZO V MODIH

V vzorcih mod 48 dni starih potomcev, tretiranih in kontrolnih živali, smo ugotavljali število apoptotičnih celic, obarvanih s pomočjo metode TUNEL. V vsaki skupini je bilo po pet samčkov. Statistična analiza je pokazala, da med skupinami ni značilnih razlik v številu apoptotičnih celic.



Graf 1: Povprečno število apoptotičnih celic v enem vidnem polju pri 400-kratni povečavi pri 48 dni starih samih iz kontrolne skupine in skupin tretiranih s 3,5 µg (3,5) in 0,35 µg klormefosa (0,35) na mililiter pitne vode (povprečje ± SEM)



Slika 4: Apoptotične celice v modih kontrolnih miši – a, višji koncentraciji klormefosa izpostavljeni miši (3,5 µg/mL vode) – b in miši, izpostavljeni 0,35 µg klormefosa na mililiter pitne vode – c (puščice – apoptotične celice, povečava 200x, merilo = 100 µm velja za a-c).

4.5 VPLIV NIZKIH KONCENTRACIJ KLORMEFOSA NA TELESNO MASO, MASO MOD IN MEHURNIC, TER PREMIER SEMENSKIH CEVK

4.5.1 Telesna masa, masa mod in mehurnic

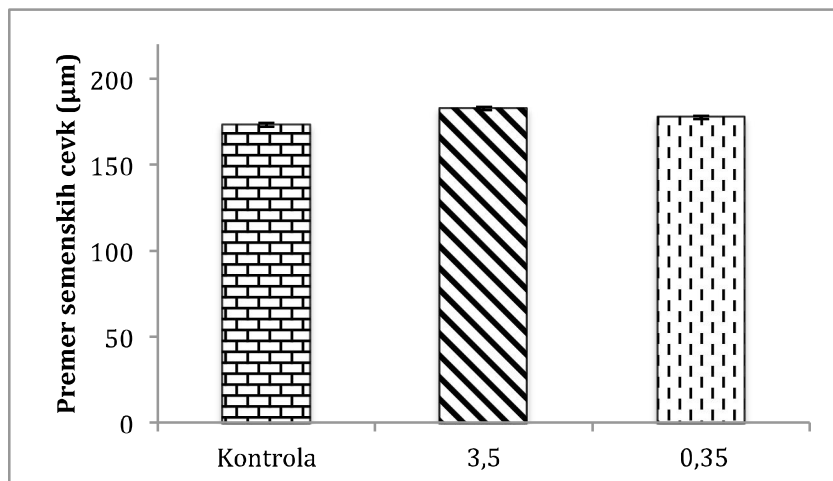
Maso mod (povprečje, izračunano iz mase levega in desnega moda) 48 dni starih samčkov smo izrazili kot absolutno maso mod in kot odstotek telesne mase, ki ga predstavljajo moda (relativna masa mod). Med kontrolno in poskusnima skupinama miši ni bilo statistično značilnih razlik v telesni masi, relativni ali absolutni masi mod in masi semenskih mešičkov (tabela 3).

Tabela 3: Telesna masa potomcev pri starosti 48 dni, absolutna in relativna masa mod in masa mehurnic (povprečje $\pm$ SEM).

	Kontrola (n=6)	Klormefos 0,35 $\mu\text{g/mL}$ (n=6)	Klormefos 3,5 $\mu\text{g/mL}$ (n=6)
Telesna masa (g)	26,97 $\pm$ 0,36	26,88 $\pm$ 0,78	26,61 $\pm$ 0,60
Absolutna masa mod (g)	0,18 $\pm$ 0,01	0,17 $\pm$ 0,02	0,20 $\pm$ 0,01
Relativna masa mod (1/1)	0,007 $\pm$ 0,020	0,006 $\pm$ 0,023	0,008 $\pm$ 0,012
Masa mehurnic (g)	0,29 $\pm$ 0,01	0,30 $\pm$ 0,02	0,29 $\pm$ 0,01

4.5.2 Premier semenskih cevk

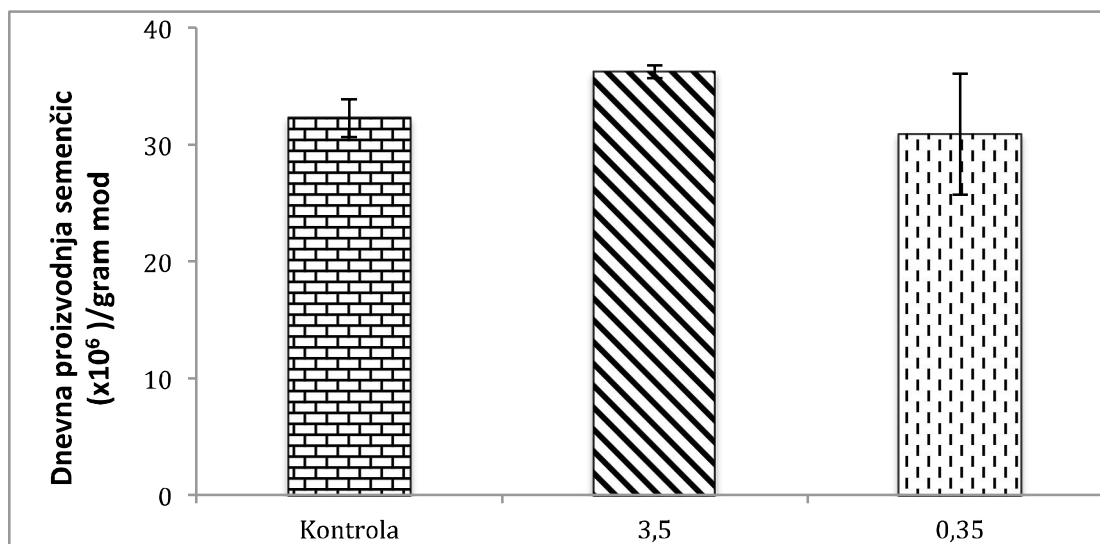
Med skupinami nismo ugotovili statistično značilnih razlik. Povprečen premer semenskih cevk pri samcih iz kontrolne skupine je bil 173,139 $\pm$ 1,09 μm (n = 5), pri samcih, katerih starši so bili izpostavljeni 3,5 $\mu\text{g/mL}$ klormefosa je znašal 182,659 $\pm$ 1,02 μm (n = 5), pri potomcih, izpostavljenih v obdobju pred rojstvom in po njem 0,35 $\mu\text{g/mL}$ klormefosa, pa 177,531 $\pm$ 0,95 μm (n = 5); (povprečje $\pm$ standardna napaka).



Graf 2: Povprečen premer semenskih cevk (µm) mod pri kontrolni skupini (kontrola, n = 5) in skupinama, tretiranimi s 3,5 µg (3,5; n = 5) in 0,35 µg (0,35; n=5) klormefosa na mililiter pitne vode (povprečje ± SEM).

4.6 VPLIV NIZKIH KONCENTRACIJ KLORMEFOSA NA DNEVNO PROIZVODNJO SEMENČIC

Analiza dnevne proizvodnje semenčic pri izpostavljenih odraslih potomcih, starih 70 dni, ni pokazala statistično značilnih razlik med potomci tretiranih staršev. DSP pri samcih, potomcih živali kontrolne skupine (n=8), je bila $32.259.999 \pm 1.602.126$; pri potomcih miši, izpostavljenih višji koncentraciji klormefosa (n=4) je bila $36.207.131 \pm 539.750$, medtem ko je bila pri samcih, ki so potomci miši, izpostavljenih nižji dozi klormefosa (n=5) $30.877.956 \pm 5.151.737$ na gram tkiva.



Graf 3: Dnevna proizvodnja semenčic na gram tkiva mod pri kontrolni skupini (kontrola, n=8) samcev in pri skupinama miši, izpostavljenih klormefosu v koncentraciji 3,5 μg (3,5, n=4) in 0,35 μg (0,35, n=5) na mililiter pitne vode (povprečje $\pm$ SEM).

4.7 VPLIV NIZKIH KONCENTRACIJ KLORMEFOSA NA KONCENTRACIJO HORMONOV

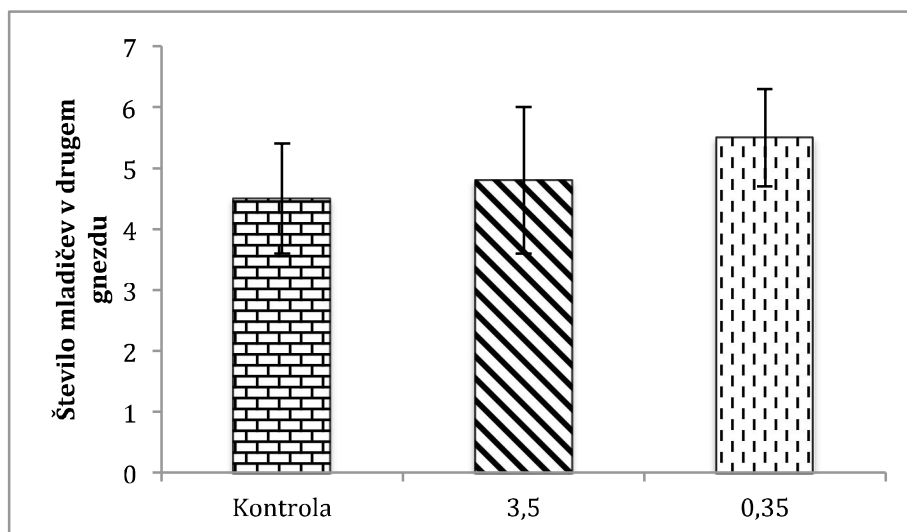
Analiza izmerjenih koncentracij triiodotironina (T3), testosterona in kortikosterona v plazmi potomcev tretiranih živali niso pokazala statistično značilnih razlik med tretiranima skupinama in kontrolno skupino.

Tabela 4: Koncentracije hormonov triiodotironina (T3), kortikosterona in testosterona pri potomcih izpostavljenih živali (povprečje $\pm$ SEM).

Koncentracija hormonov	Kontrola	Klormefos 0,35 $\mu\text{g/mL}$	Klormefos 3,5 $\mu\text{g/mL}$
T3 (ng/100 mL) pri 19 dni starih potomcih	62,64 $\pm$ 2,26 (n=9)	62,18 $\pm$ 3,77 (n=8)	56,99 $\pm$ 2,31 (n=8)
T3 (ng/100 mL) pri 48 dni starih potomcih	55,99 $\pm$ 1,70 (n=7)	55,56 $\pm$ 2,17 (n=5)	54,94 $\pm$ 1,95 (n=4)
Kortikosteron (ng/mL) pri 19 dni starih potomcih	770,8 $\pm$ 80,85 (n=9)	689,38 $\pm$ 103,59 (n=8)	912,98 $\pm$ 107,61 (n=8)
Kortikosteron (ng/mL) pri 48 dni starih potomcih	412,68 $\pm$ 56,57 (n=7)	302,98 $\pm$ 118,67 (n=5)	343,10 $\pm$ 54,24 (n=5)
Testosteron (ng/mL) pri 48 dni starih potomcih	7,79 $\pm$ 4,82 (n=7)	8,00 $\pm$ 4,63 (n=5)	6,04 $\pm$ 3,25 (n=5)

4.8 VPLIV NIZKIH KONCENTRACIJ KLORMEFOSA NA RAZMNOŽEVANJE POTOMCEV

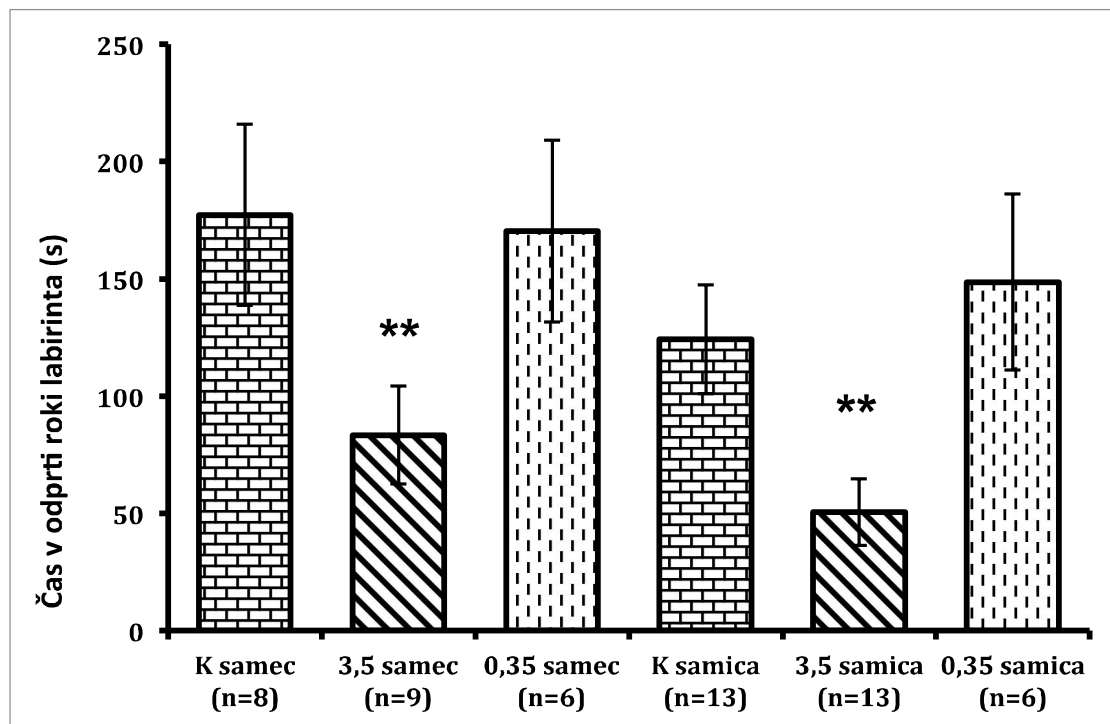
Ugotovili smo, da izpostavljenost nizkim koncentracijam klormefosa v obdobju pred rojstvom in v zgodnjem poporodnem obdobju ne vpliva na plodnost. Število mladičev v kontrolni skupini (n=8) je bilo 4,5 $\pm$ 0,9, v poskusnih skupinah pa 4,8 $\pm$ 1,2 (n=4) pri skupini, izpostavljeni 3,5 $\mu\text{g/mL}$ vode, in 5,5 $\pm$ 0,8 (n= 4) pri skupini, izpostavljeni 0,35 $\mu\text{g/mL}$ vode.



Graf 4: Povprečno število mladičev v drugem gnezdu pri paritvi generacije F1. Število pri kontrolni skupini (kontrola, n=8); skupini, ki je bila tretirana s 3,5 μg klormefosa na mililiter pitne vode (3,5, n=4) in 0,35 μg klormefosa na mililiter pitne vode (0,35, n=4). Rezultati so prikazani kot povprečje $\pm$ SEM. Število mladičev v generaciji F2 se med skupinami ni razlikovalo ($p > 0,05$).

4.9 VPLIV NIZKIH KONCENTRACIJ KLORMEFOSA NA OBNAŠANJE PODOBNO ANKSIOZNEMU

Rezultati testa z dvignjenim labirintom so pokazali statistično značilne razlike med kontrolno in poskusnima skupinama. Miši obeh spolov iz poskusne skupine, katerih matere so bile izpostavljene 3,5 μg klormefosa na mililiter pitne vode, so se manj časa zadrževale v odprtem kraku labirinta, kar kaže na pojav pojačanega obnašanja, podobnega anksioznemu (** $p < 0.01$; graf 5).

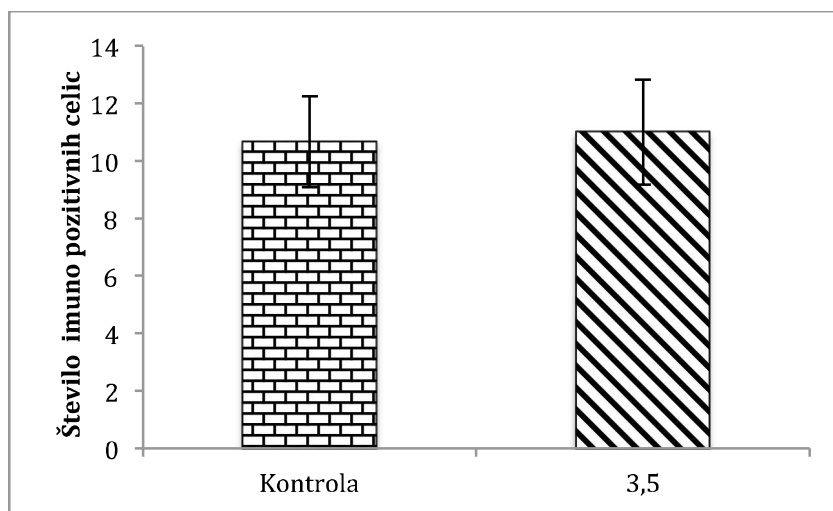


Graf 5: Čas (s) v odprti roki dvignjenega labirinta pri kontrolnih miših (K samec, K samica), miših, izpostavljenih s 3,5 µg klormefosa na mililiter pitne vode (3,5 samec, 3,5 samica) in 0,35 µg klormefosa na mililiter pitne vode (0,35 samec in 0,35 samica). Miši, izpostavljene višjim koncentracijam klormefosa, so se statistično značilno (** $p < 0.01$) manj časa zadrževale v odprti roki labirinta. Rezultati so prikazani kot povprečni čas ± SEM.

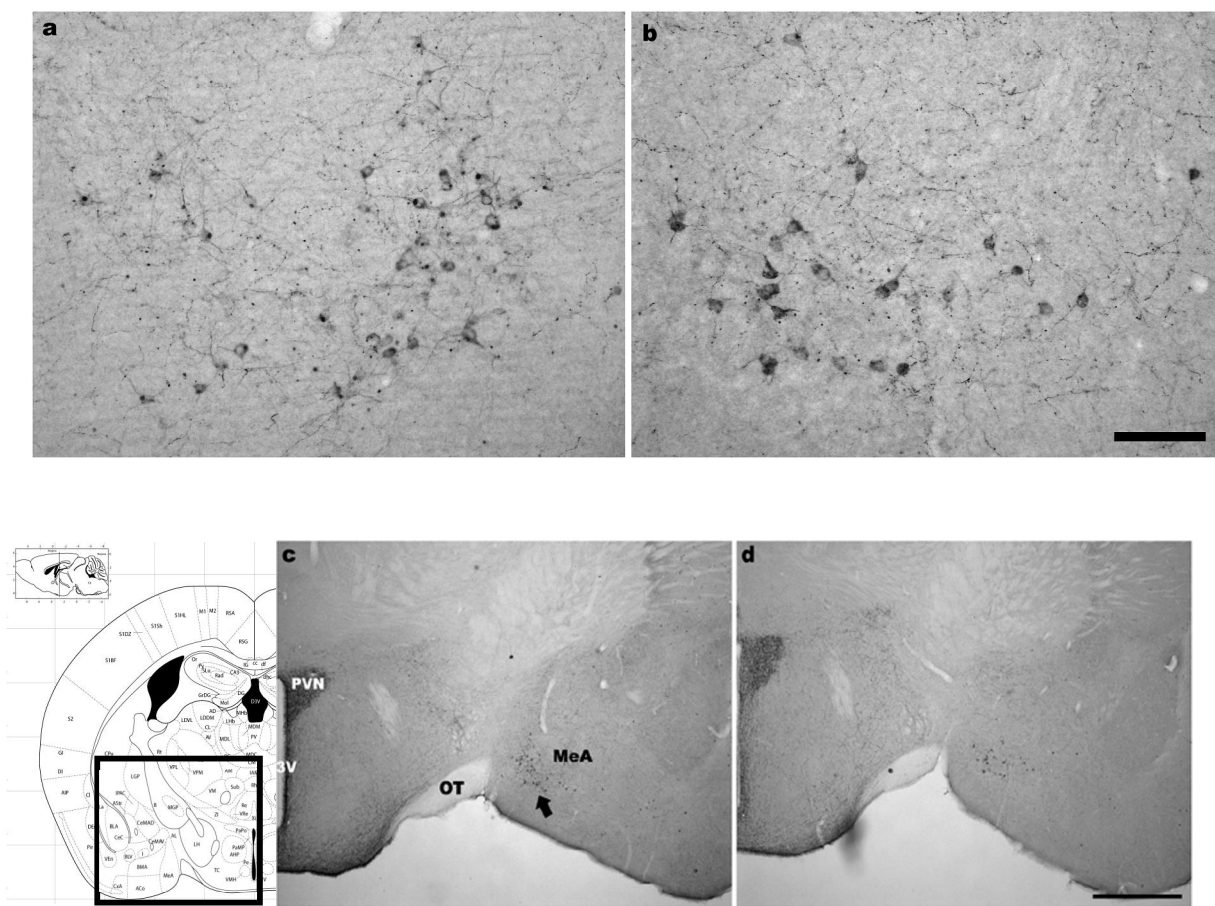
4.10 VPLIV NIZKIH KONCENTRACIJ KLORMEFOSA NA IZRAŽENOST BELJAKOVIN V TKIVNIH REZINAH MOŽGANOV

Ker smo razlike v testu dvignjenega labirinta ugotovili samo med kontrolno skupino in skupino, ki je prejela višjo koncentracijo klormefosa, smo z imunohistokemičnim barvanjem preverili izraženost treh različnih beljakovin pri kontrolni skupini in skupini, katere starši so bili izpostavljeni 3,5 µg /mL klormefosa. V primeru, če bi ugotovili razlike med skupinama, bi preverili še izraženost beljakovin pri skupini miši, katerih starši so bili izpostavljeni nižji koncentraciji klormefosa. Pregledali smo izraženost beljakovine neuropeptid Y v mandlju pri 9 samcih iz kontrolne skupine in 7 samcih iz skupine, izpostavljene 3,5 µg/mL klormefosa. V medialnem mandlju so se obarvala jedra živčnih celic

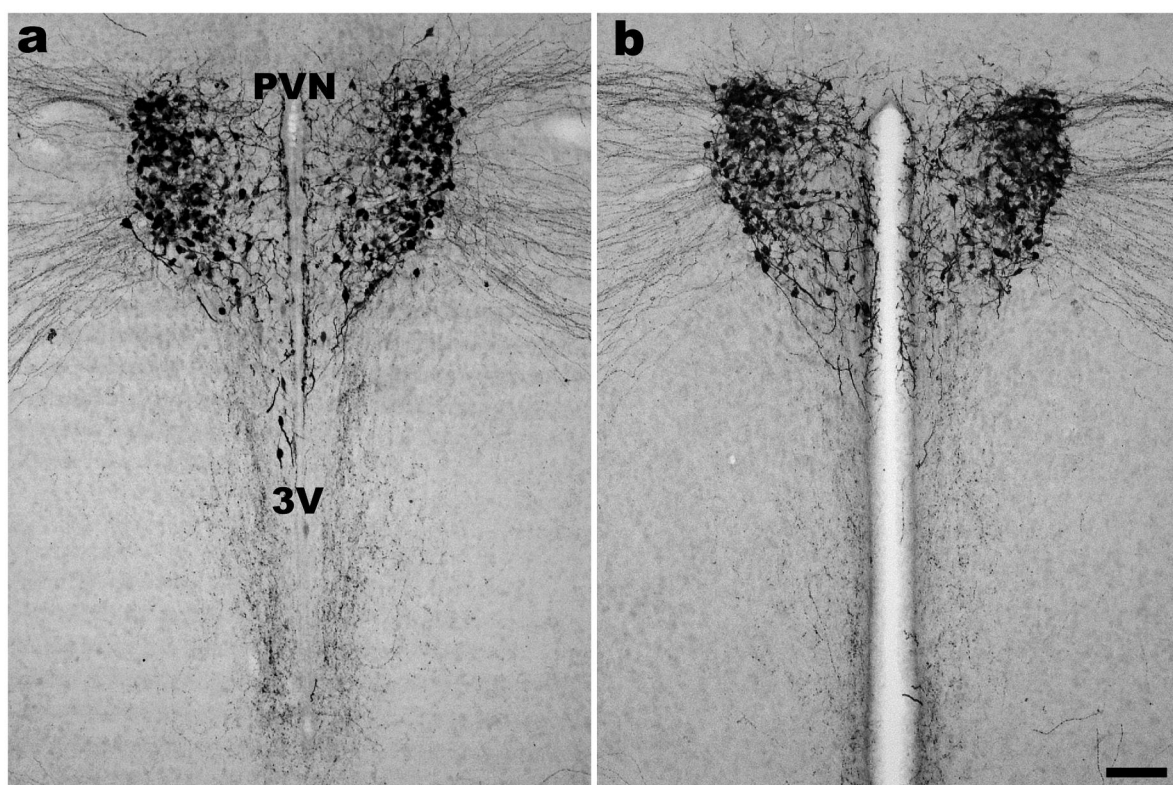
(slika 5). Jedra celic smo prešteli, vendar med skupinama nismo ugotovili statistično značilnih razlik ($p > 0,05$). Pri natančnem mikroskopskem pregledu izraženosti arginin vazopresina in serotonininskega receptorja 1a smo ugotovili, da ni očitnih razlik v izražanju med tema dvema skupinama, zato kvantitativne analize nismo izvedli.



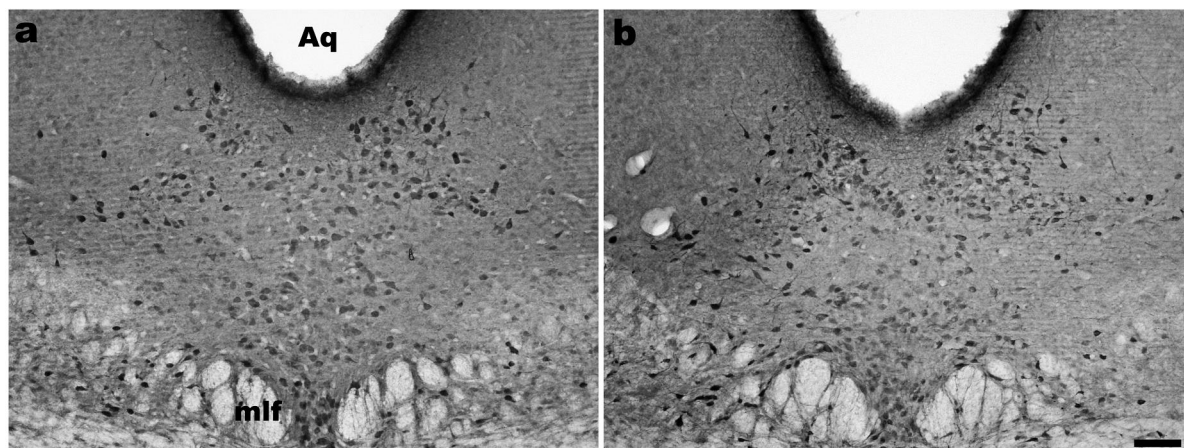
Graf 6: Povprečno število imunoreaktivnih celic za beljakovino neuropeptid Y v medialnem mandlju se ni razlikovalo med kontrolno (kontrola; $n=9$) in poskusno skupino (3.5; $n=7$) (povprečje $\pm$ S.E.).



Slika 5: Imunoreaktivne celice za neuropeptid Y v področju medialnega mandlja 1,0 mm kaudalno od bregme pri kontrolnih živalih (sliki a in c) in poskusno skupino, izpostavljeno 3,5 μg klormefosa na mililiter vode (sliki b in d). Proučevano področje je označeno s puščicami (3V – tretji ventrikel, PVN – paraventrikularno jedro, OT – optični trakt, MeA – medialni mandelj, sliki a in b, povečava 200x, merilo 100 μm ; sliki c in d, povečava 40x, merilo 500 μm).



Slika 6: Imunoreaktivni nevroni, ki izražajo arginin vazopresin v paraventrikularnem jedru. Med kontrolno (a) in poskusno skupino, izpostavljeno 3,5 µg klormefosu na mililiter vode (b), ni bilo očitnih razlik v imunskem obarvanju celic, ki izražajo arginin vazopresin. (PVN – paraventrikularno jedro, 3V – tretji ventrikel, povečava 100x, merilo za a in b 100 µm)



Slika 7: Imunoreaktivne celice za serotoninški receptor 1a v območju rafe. Med kontrolno skupino (slika a) in skupino, ki je bila izpostavljena višji koncentraciji klormefosa (3,5 µg/mL; slika b) v pitni vodi, ni bilo očitnih razlik v imunskem obarvanju celic, ki so izražale serotoninški receptor 1a. (Aq – vodni kanal, mlf - sredinski vzdolžni snop, povečava 100x, merilo 100 µm za a in b)

4.11 VPLIV NIZKIH KONCENTRACIJ KLORMEFOSA NA IZRAŽANJE GENOV V MOŽGANIH

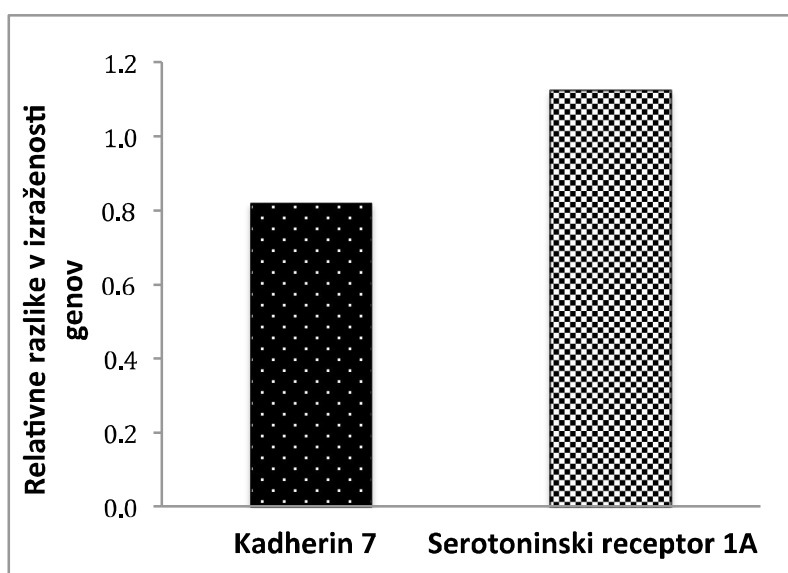
Analizo mikromrež smo opravili s programom GenePattern. Pri analizi rezultatov poskusa z uporabo mikromrež DNK smo ugotovili razlike v izraženosti nekaterih genov, kot so kadherin, serotoninški receptor 1a, mielinski bazični protein in še nekateri, ki bi lahko bili povezani s spremenjenim anksioznim obnašanjem.

Z metodo kvantitativnega qPCR smo zato preverili, ali so razlike v izraženosti kadherina 7 in serotoninškega receptorja 1a, ki so jih pokazali rezultati poskusa z mikromrežami, dejansko prisotne in dovolj velike, da bi morda lahko bile vzrok za razlike med skupinami v anksioznemu podobnem obnašanju. Kadherin 7 je namreč udeležen pri nastanku krvno-možganske pregrade, ki je po nekaterih podatkih lahko tarčno tkivo organofosfornih snovi, serotonin pa preko različnih receptorjev sodeluje pri urejanju različnih obnašanj, vključno z anksioznim obnašanjem.

Statistično značilne so tiste razlike, ki so večje kot 2, kar pomeni, da je izražanje preiskovanega gena za 2-krat bolj izraženo med testno in kontrolno mišjo. Razlika relativne

izraženosti med skupinama za kadherin 7 je bila 0,82, za serotonininski receptor 1a pa 1,12, vendar te razlike niso statistično značilne.

Razlik v izraženosti genov za kadherin 7 in serotonininski receptor 1a tako nismo potrdili. Ker nismo potrdili razlik v izraženosti teh dveh genov, ki sta pri analizah mikromrež kazala največje razlike v izraženosti, hkrati pa sta bila po svojem delovanju kandidatna tarčna gena za rezultate naših raziskav, smo se odločili, da ne bomo potrjevali razlik pri ostalih kandidatnih genih.

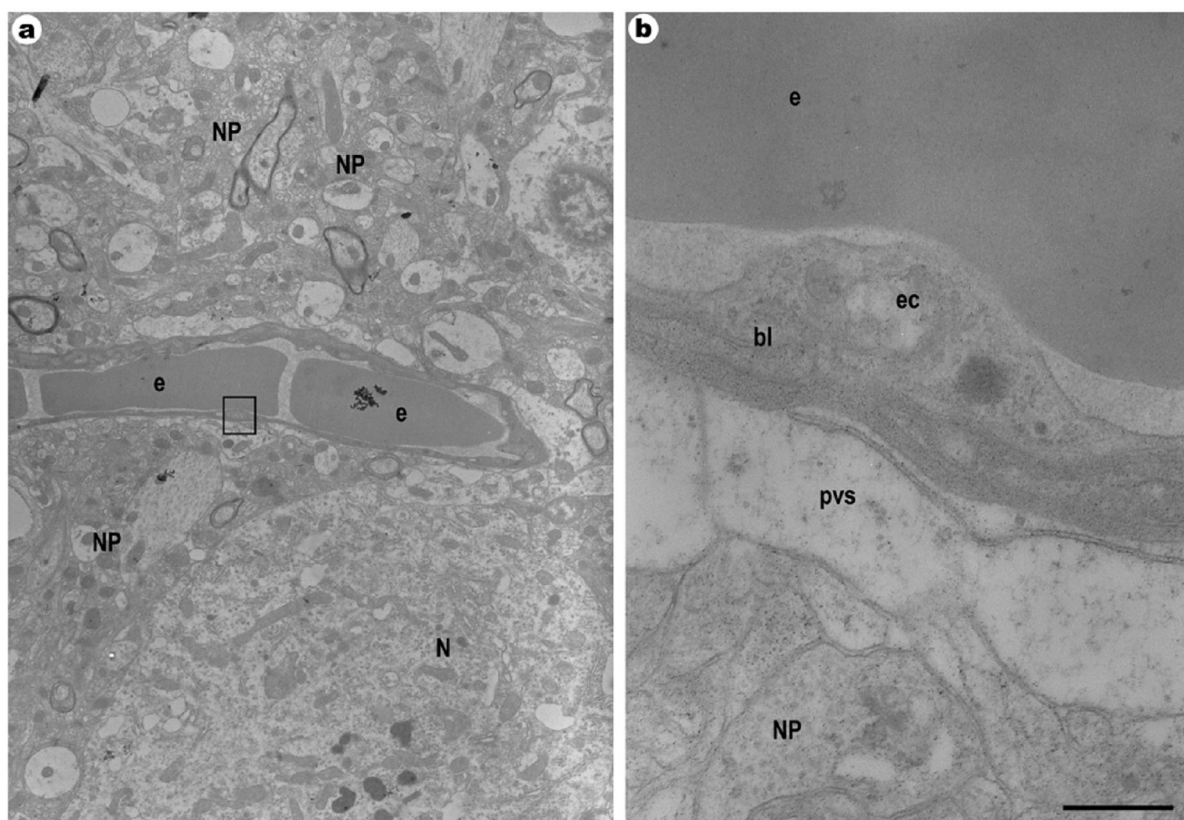


Graf 7: Relativna izraženost genov za kadherin 7 in serotonininski receptor 1a med kontrolno skupino in skupino miši, ki je bila izpostavljena višjo dozo klormefosa (3,5 µg/mL) preko vode.

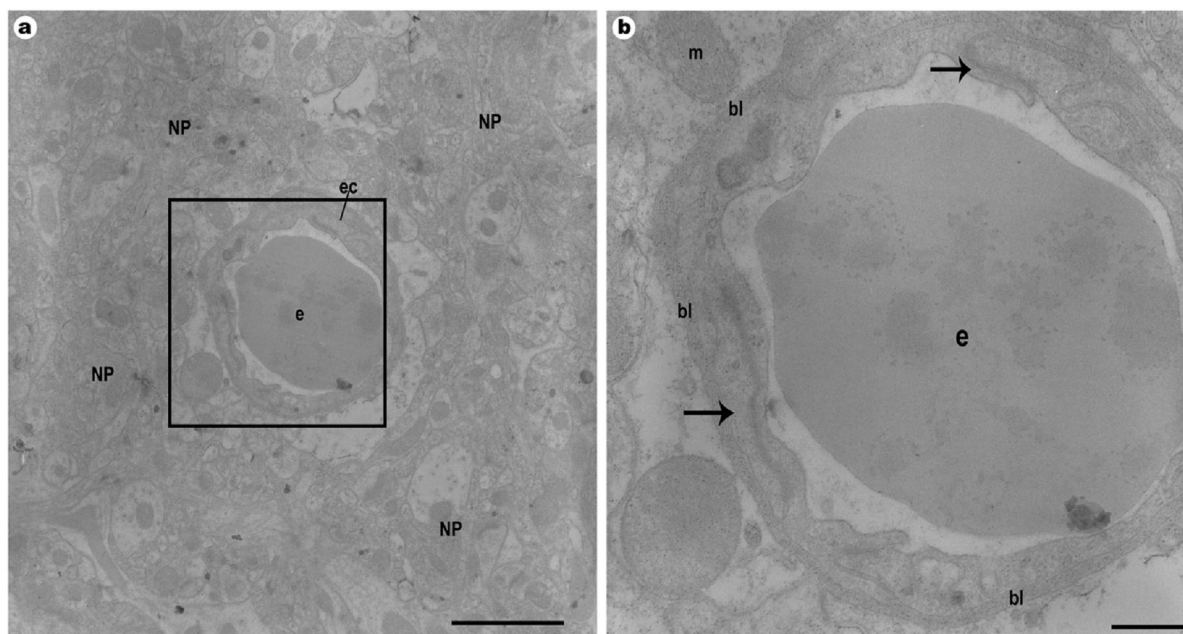
4.12 VPLIV NIZKIH KONCENTRACIJ KLORMEFOSA NA ZGRADBO KRVNO-MOŽGANSKE PREGRADE

Natančna analiza krvno-možganske pregrade dela skorje možganov kontrolnih in klormefosu izpostavljenih živali ni pokazala nikakršnih strukturnih sprememb. Krvne kapilare kontrolnih in testnih živali so kazale normalno strukturo – endotelne celice so imele sploščeno jedro in podaljšano citoplazmo. Evkromatin je bil v centralnem delu jedra, medtem ko je bil heterokromatin razporejen ob jedrni membrani. Sosednje endotelne celice so imele dobro

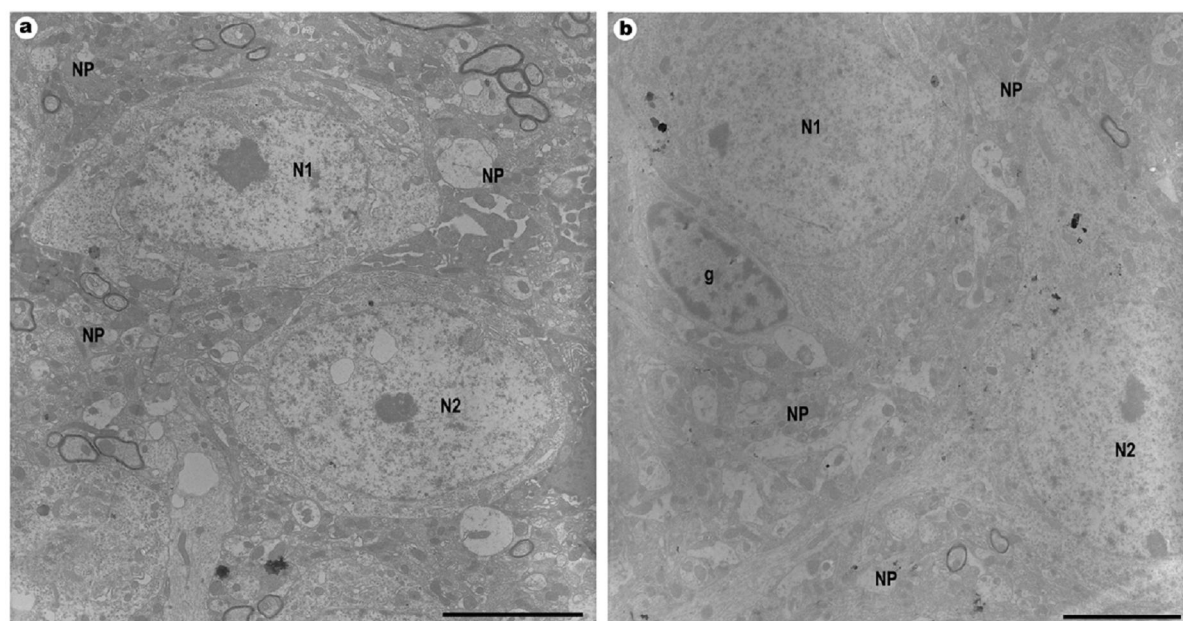
razvite združitvene komplekse in so ležale ob neprekinjeni bazalni membrani. Bazalna membrana in/ali endotelne celice niso bile poškodovane. Kapilare so pri vseh živalih imele normalen perivaskularni prostor. Nevroni in spremljajoče celice glije, ter nevropili so tudi pri klormefosu izpostavljenih živalih ohranili normalno strukturo, podobno kot pri živalih iz kontrolne skupine (slike 8 – 10).



Slika 8: Elektronsko – mikroskopska slika možganske skorje kontrolne miši (NP – nevropil, e – eritrocit, ec – endotelna celica, bl – bazalna membrana, pvs – perivaskularni prostor, a – 3000x povečava, b – 20 000x povečava, merilo 1 μ m).



Slika 9: Elektronsko – mikroskopska slika krvno-možganske pregrade miši, izpostavljene visoki dozi klormefosa ($3,5 \mu\text{g/mL}$). Zgradba krvno-možganske pregrade se ni razlikovala med skupinama (e – eritrocit, ec – endotelna celica, NP – nevropil, bl – bazalna membrana, m – mitohondrij, → - tesne stičnice, a – 7000x povečava, merilo 5 μm ; b – 20 000x povečava, merilo 1 μm).



Slika 10: Struktura nevronov živali, ki je bila izpostavljena višji dozi klormefosa (N1, N2 – nevroni, NP – nevropil, g- celica glije, a, b - 3000x povečava, merili 5 μm).

5 RAZPRAVA

Hormonski motilci so različne kemijčne spojine, ki lahko vplivajo na delovanje hormonskega sistema, posledično vplivajo na zdravje in razmnoževalno sposobnost živali in ljudi (Rasier in sod., 2006). Največ jih posnema delovanje estrogenih hormonov, nekateri delujejo tudi kot zaviralci aktivnosti androgenih hormonov. Veliko hormonskih motilcev spada med pesticide. Mnif in sod. so leta 2011 v preglednem članku navedli 105 pesticidov, ki delujejo kot hormonski motilci, med njimi je 46 % (49) insekticidov, 21 % (22) herbicidov in 32 % (34) fungicidov. Od odkritja DDT-ja leta 1939 se je na svetu uporabljalo mnogo pesticidov (organofosfati, organokloridi, karbamati) brez omejitev ali navodil za uporabo (Mnif in sod., 2011). V primerjavi z endogenimi hormoni imajo te snovi šibko hormonsko aktivnost, vendar jim topnost v maščobah in dolg razpolovni čas razgradnje omogočata nabiranje in obstojnost v maščobnem tkivu, kar povečuje njihovo koncentracijo v telesu (Gandolfi in sod., 2002). Svetovna poraba pesticidov v kmetijstvu nenehno narašča, po različnih podatkih so ocene 0,49 kg/ha v letu 1961 do 2 kg/ha v letu 2004 (Lucas in Pau Vall, 2012). Veliko snovi, ki kažejo lastnosti hormonskih motilcev, je v uporabi tudi v domovih, šolah, vrtcih, na javnih mestih, ter v zdravstvu in veterini. Na zdravje tako domačih kot divjih živali lahko vplivajo velike količine pesticidov v naravi. Hormonskim motilcem smo potencialno lahko izpostavljeni tudi ljudje. Hormonski motilci lahko škodujejo razvoju spolnega sistema, glede na to, kakšne posledice ima izpostavljenost hormonskim motilcem imajo velik vpliv spol, starost, prehrana, poklic in številni drugi zunanji vplivi, do neke mere verjetno tudi genetska slika posameznika. Posebno vlogo pri tem ima starost, saj so zarodki, dojenčki in otroci bolj občutljivi kot odrasli. Kljub temu da hormonski motilci lahko največ škodljivih učinkov povzročijo v obdobju pred rojstvom in v zgodnjem poporodnem obdobju, so posledice velikokrat vidne šele v odraslem obdobju (McLachlan, 2001; Mnif in sod., 2011).

5.1 VPLIV NIZKIH KONCENTRACIJ KLORMEFOSA NA RAZVOJ IN DELOVANJE SPOLNIH ORGANOV

Med hormonske motilce sodijo tudi organofosforne snovi, ki jih uporabljamo kot insekticide, fungicide, antiparazitike in zdravila. Podatki iz literature kažejo, da nekatere organofosforne snovi lahko delujejo tudi kot hormonski motilci. Narayana in sod. (2005, 2006) poročajo, da

je izpostavljenost metilparationu v dozah, kakršnim smo lahko izpostavljeni tudi ljudje (0,5-1 mg/kg), povzročila zmanjšano število semenčic ter povečano število morfološko spremenjenih semenčic pri izpostavljenih odraslih podganah. Določili so tudi količino askorbinske kisline, ki je znani antioksidant tudi v modih. Ugotovili so, da imajo izpostavljene živali znižano koncentracijo askorbinske kisline v modih, čeprav znižanje ni bilo v korelaciji z dozami metilparationa. Tretiranje z metilparationom ni vplivalo na število mladičev pri izpostavljenih živalih, je pa povzročilo morfološke spremembe in motnje v delovanju pomožnih spolnih žlez pri podganah. 25-dnevno dodajanje metilparationa, tako s hrano kot *intraperitonealno*, je povzročilo zvišanje vsebnosti testosterona v modih, znižanje ravni LH v krvi ter citotoksične spremembe v modih, kot so izginjanje zarodnih celic mod, vakuole, fokalne nekroze itd. (Narayana in sod., 2005; Narayana in sod., 2006a; Narayana in sod., 2006b). Rezultati te raziskave kažejo, da metilparation tudi v nizkih koncentracijah, kakršnim smo lahko izpostavljeni ljudje, lahko škodljivo vpliva na razmnoževalni sistem. Tudi diklorvos je v nizkih koncentracijah zmanjšal gibljivost semenčic pri odraslih podganah, vendar ni imel vpliva na morfologijo semenskih cevk, število semenčic, morfologijo semenčic, koncentracijo plazemskega testosterona ali maso organov (Okamura in sod., 2005). Vendar so pri teh raziskavah tretirali odrasle živali. Prav tako je vprašljiv način aplikacije teh snovi, saj so samo Narayana in sod. (2006) živali v eni raziskavi izpostavili metilparationu preko hrane oz. vode, v ostalih pa so dodajali organofosforne snovi parenteralno (pod kožo ali v trebušno votlino) in je zato njihov pomen za razumevanje morebitnih škodljivih vplivov/mehanizmov delovanja teh snovi pri človeku vprašljiv. V naši raziskavi so bile miši izpostavljene nizkim koncentracijam klormefosa preko pitne vode, vplive pa smo proučevali na generaciji F1 in ne na neposredno izpostavljenih živalih. Tako so tudi Okahashi in sod. (2005) proučevali vpliv organofosfatnega insekticida fenitrotona na podgane, ki so bile izpostavljene fenitrotonu preko hrane. Ugotovili so, da fenitroton v visokih dozah povzroči zmanjšano aktivnost možganske AChE v starševski generaciji, medtem ko nima vpliva na razmnoževalno sposobnost, težo organov, morfologijo spolnih organov in ne vpliva na lastnosti semena. Prav tako niso ugotovili vpliva na anogenitalno razdaljo, začetek pubertete, maso organov in morfologijo spolnih organov pri potomcih, katerih starši so prejeli fenitroton (Okahashi in sod., 2005). Tem rezultatom so zelo podobni rezultati naše raziskave o vplivu klormefosa na spolni sistem. Ugotovili smo, da klormefos ni vplival na število mladičev v gnezdu niti na druge reprodukcijske parametre (histopatološka zgradba mod,

koncentracija hormonov T3, testosterona in kortikosterona, izraženost antimüllerjevega hormona in 3 β -hidroksisteroidne dehidrogenaze, na premer semenskih cevk, maso mod in mehurnic, plodnost potomcev) (Čeh in sod., 2009; Čeh in sod., 2012).

V raziskavi nismo ugotovili razlik v dnevni proizvodnji semenčic ali v številu apoptotičnih celic v modih pri potomcih, katerih starši so bili izpostavljeni klormefosu, vendar pa smo ta dva parametra spremljali le pri potomcih izpostavljenih živali, ne pa tudi pri neposredno izpostavljenih živalih, tako kot Narayana in sod. (2005), zaradi česar neposrednega vpliva klormefosa na število in razvoj semenčic ne poznamo. Vendar so Žužek in sod. (2009) ugotovili, da nizke koncentracije klormefosa ne vplivajo na število apoptotičnih celic v jetrih, ledvicah in vranici pri izpostavljenih odraslih miših (Žužek in sod., 2009). Poleg tega pri neposredno tretiranih miših nismo ugotovili razlik v času do zabrejitve ali v številu potomcev zato domnevamo, da pomembnejšega škodljivega vpliva klormefosa na spermatogenezo pri proučevanih dozah ni bilo. Klormefos prav tako ni vplival na koncentracijo testosterona v plazmi miši, ki so bile pred rojstvom in zgodaj po rojstvu (preko staršev) izpostavljene klormefosu. Prav tako nismo ugotovili statistično značilnih razlik v koncentraciji T3 pri 19- in 48- dnevnih potomcih izpostavljenih živali, zato verjetno klormefos ni vplival niti na delovanje ščitnice pri potomcih.

Raziskave v preteklosti so sicer pokazale, da nekateri organofosfati, kot na primer metilparation in klorpirifos, prehajajo posteljico in tako lahko vplivajo na razvoj plodu (Narayana in sod., 2006a; Gray in Lawler, 2011). Glede na to, da je klormefos lipofilna molekula, je velika verjetnost, da prehaja preko posteljice in v mleko, ker pa o tem nimamo podatkov, tega ne moremo z gotovostjo trditi. V primeru, če se to ne dogaja, mladiči sploh ne bi bili izpostavljeni klormefosu preko mater, kar bi lahko pojasnilo odsotnost večjih vplivov klormefosa v naši raziskavi in bi hkrati pomenilo, da klormefos ob takem načinu izpostavljenosti ne predstavlja nevarnosti za zdravje ljudi in živali. Kljub temu so potomci izpostavljenih živali kazali statistično značilno anksioznemu podobno obnašanje, kar lahko kaže na to, da je klormefos morda vseeno vplival na mladiče preko posteljice ali mleka. Ker pa klormefosa nismo merili v zarodkih ali v mleku izpostavljenih mater, tega zaenkrat ne vemo. Možno je tudi, da so izpostavljene matere imele spremenjeno raven hormonov (zmanjšano, povečano), in bi ti preko placent vplivali na potomce. Potencialno bi klormefos lahko vplival na obnašanje izpostavljenih mater, ki bi tako slabše negovale mladiče, s tem bi

se pri mladičih povečalo anksioznosti podobno obnašanje. Miši, ki so bile v brejosti izpostavljene nizkim koncentracijam metoksiklora, manj časa negujejo mladiče kot miši, ki niso bile izpostavljene metoksikloru (Palanza in sod., 2002).

V zadnjih 15 letih se pojavlja vedno več raziskav, ki proučujejo vpliv izpostavljenosti mešanice hormonskih motilcev z različnim delovanjem (estrogensko, antiandrogensko ipd.). Mešanice različnih pesticidov, ki imajo enak učinek (npr. estrogenski) delujejo sinergistično, kar pomeni, da se učinki posameznih sestavin mešanice seštevajo, čeprav vsaka posamezna sestavina ne povzroča kakršnih koli opaznih sprememb na izpostavljenih živalih. Zaenkrat še ne vemo veliko, kako na organizme vplivajo mešanice hormonskih motilcev iz različnih skupin, čeprav je videti, da tudi take mešanice lahko povzročijo škodljive učinke (Recio in sod., 2005; Kortenkamp, 2007; Kortenkamp in sod., 2007; Perobelli in sod., 2010). V prihodnosti bi bilo smiselno proučiti morebitne negativne učinke nizkih koncentracij klormefosa v mešanici različnih pesticidov. Pri raziskavah nismo ugotovili, da bi klormefos zmanjšal razmnoževalno sposobnost izpostavljenih živali, zaradi česar lahko zavržemo prvo hipotezo naše naloge. Prav tako nismo našli nikakršnega vpliva klormefosa na razvoj spolnih organov pri miših, ki so bile klormefosu izpostavljene pred rojstvom in po njem preko mater, zato lahko zavrtnemo tudi drugo hipotezo. Možno je, da klormefos v proučenih koncentracijah sploh ne deluje kot hormonski motilec in ne vpliva neposredno na delovanje hormonskega sistema, za morebitne centralne učinke preko hipotalamusa in hipofize pa so bile koncentracije lahko premajhne.

5.2 VPLIV NIZKIH KONCENTRACIJ KLORMEFOSA NA RAZVOJ IN DELOVANJE MOŽGANOV IN OBNAŠANJE

5.2.1 Vpliv nizkih koncentracij klormefosa na obnašanje podobno anksioznemu

Nekateri hormonski motilci lahko vplivajo tudi na razvoj in/ali delovanje centralnega živčnega sistema, ne le na spolne organe. Zato smo v naši raziskavi proučevali obnašanje, podobno anksioznosti, zgradbo krvno-možganske pregrade ter izražanje neuropeptida Y, arginin vazopresina in serotoninkega receptorja 1a, ki sodelujeta pri uravnavanju anksioznega obnašanja. Raziskave so pokazale, da nekatere kemične snovi, kot so bisfenol A in metoksiklor, lahko vplivajo na spolno in nespolno obnašanje (Palanza in sod., 2002;

Gioiosa in sod., 2007; Panzica in sod., 2007; Palanza in sod., 2008). Izpostavljenost malationu, klorpirifosu in drugim organofosfatom med razvojem lahko povzroči dolgotrajne vplive na intelektualne funkcije in tudi zapoznele vplive na delovanje centralnega živčnega sistema (Rauh in sod., 2006; Eskenazi in sod., 2007; Eskenazi in sod., 2008). Palanza in sod. (2002) so breje miši izpostavili metoksikloru, raztopljenemu v olju, ki so ga spontano pile od enajstega do sedemnajstega dne brejosti. Pokazali so, da je izpostavljenost mišjih plodov metoksikloru v nizkih koncentracijah, podobnih, kot jih lahko najdemo v okolju, vplivala na njihovo obnašanje v obdobju pred puberteto pri obeh spolih. Začetek agresivnosti med samci je nastopil kasneje pri izpostavljenih samcih, vendar v odrasli dobi ni bilo razlik (Palanza in sod., 2002). Miši, ki so bile kronično izpostavljene klorpirifosu preko mater od 15. dneva brejosti do 14 dni starosti preko posteljice ali mleka, so pri testu dvignjenega labirinta in testu temnega in svetlega polja kazale povečano obnašanje, podobno anksioznemu (Braquenier in sod., 2010). Nasprotno so v raziskavi, ki je prav tako proučevala vplive izpostavljenosti klorpirifosu med razvojem v maternici in zgodnjem poporodnem obdobju na obnašanje pri miših, ugotovili, da je klorpirifos povzročil zmanjšanje anksioznemu podobnega obnašanja, kar je bilo bolj izrazito pri samicah kot samcih. Živali so bile klorpirifosu izpostavljene preko posteljice med petnajstim in osemnajstim dnevom brejosti ter s podkožnimi injekcijami med enajstim in štirinajstim dnevom po rojstvu (Ricceri in sod., 2006). Med obema raziskavama so razlike tako v času trajanja izpostavljenosti kot tudi v načinu aplikacije klorpirifosa. Naša raziskava je bila glede na trajanje, način in nenazadnje tudi glede na rezultate testa v dvignjenem labirintu bolj podobna raziskavi Braquenierja in sod. (2010). Vpliv klormefosa na obnašanje, podobno anksioznemu, smo ugotavljali s testom dvignjenega labirinta in ugotovili, da so miši obeh spolov, izpostavljene visoki dozi klormefosa pred rojstvom in zgodaj po njem, kazale statistično značilno bolj poudarjeno obnašanje, podobno anksioznemu v primerjavi s kontrolno skupino. Naše (in druge - Braquenier in sod.; 2010, Ricceri in sod.; 2006) raziskave torej kažejo, da izpostavljenost organofosfatom med razvojem vpliva na obnašanje, podobno anksioznemu pri odraslih poskusnih živalih, vendar so ti učinki lahko različni zaradi časa in trajanja izpostavljenosti ter doze in načina aplikacije organofosfatov. Pri pojasnjevanju mehanizmov delovanja organofosfatov na razvoj možganov je zato potrebno upoštevati količine, katerim so živali izpostavljene, obdobje v katerem so živali izpostavljene tem snovem, pogostnost izpostavljenosti in seveda tudi način izpostavljenosti.

Haviland in sod. (2010) so opisali, da izpostavljenost plodov nizkim koncentracijam klorpirifosa med sedemnajstim in dvajsetim dnevom brejosti povzroči spremembo obnašanja v zvezdastem labirintu ter povečano koncentracijo prostega tiroksina pri odraslih samicah, ne pri samcih. Zvezdast labirint je na novo razvit labirint, s katerim lahko zaznamo in ocenjujemo spremembe v obnašanju, kot na primer raziskovanje novega okolja in spontanega obnašanja. Avtorji navajajo, da je ta labirint idealen za opazovanje skoraj neopaznih sprememb v obnašanju pri odraslih miših, izpostavljenih škodljivim snovem iz okolja (Haviland in sod., 2010). Verjetno bi s tem testom lahko odkrili morebitne spremembe v obnašanju tudi pri naši raziskavi, saj je že test dvignjenega labirinta pokazal statistično značilno pojačano obnašanje, podobno anksioznemu. Vendar smo do objave tega članka že izvedli vse načrtovane poskuse, ter živali žrtvovali za imunohistološke preiskave na možganih.

5.2.2 Vpliv nizkih koncentracij klormefosa na raven hormonov

Nekateri hormonski motilci lahko vplivajo tudi na delovanje ščitnice, zato smo v raziskavi merili koncentracijo ščitničnih hormonov v plazmi. De Angelis in sod. (2009) so proučili vpliv nizkih doz organofosfata klorpirifosa na delovanje ščitnice pri miših seva Cd1. Breje miši so izpostavili nizkim dozam klorpirifosa, raztopljenega v olju, preko ustne sode med petnajstim in osemnajstim dnevom brejosti. Proučevali so vpliv na izpostavljene miši in na njihove potomce. Potomce so dodatno izpostavili nizkim dozam klorpirifosa še s podkožnimi injekcijami med enajstim in štirinajstim dnevom po rojstvu. Nizke doze klorpirifosa so znižale koncentracijo serumskega tiroksina pri izpostavljenih samicah kot tudi pri potomcih izpostavljenih živalih. Klorpirifos je povzročil tudi različne morfološke spremembe v ščitnici, kot na primer povečano število nekrotičnih folikularnih celic, zmanjšanje velikosti foliklov pri potomcih izpostavljenih živali ter povečano višino ščitničnih celic pri samicah, izpostavljenih v brejosti (De Angelis in sod., 2009). V naši raziskavi nismo potrdili vpliva klormefosa na delovanje ščitnice, saj se serumske koncentracije trijodotironina (T3) pri 19- in 48- dnevnih miših, niso razlikovale med skupinama klormefosu izpostavljenih živali in kontrolno skupino. Vendar pa živalim nismo odstranili ščitnice, da bi pregledali morfološko zgradbo. Znano je, da motnje v delovanju ščitnice vplivajo na morfologijo in delovanje mod (Wagner in sod., 2008), prav tako pa ščitnični hormoni vplivajo na razvoj možganov (Rivas in Naranjo, 2007).

Vendar v naši raziskavi ni bilo vpliva na ščitnico, ki bi lahko vplivala na razvoj in delovanje mod in možganov.

Stresni dražljaji pri živalih povzročijo sproščanje glukokortikoidnih hormonov iz nadledvične žleze, ki živali omogočijo primeren odgovor na stres. Sistem je nadzorovan predvsem preko osi hipotalamus - hipofiza - nadledvična žleza (HPA). Skorja nadledvične žleze izloča glukokortikoide, glavni glukokortikodi sesalcev so kortizol, kortikosteron in do neke mere tudi 11- deoksikortizol. V raziskavi smo preverili koncentracijo kortikosterona v serumu potomcev izpostavljenih živali. Zanimalo nas je, ali lahko izpostavljenost nizkim koncentracijam klormefosa preko placente in mleka vpliva na razvoj in delovanje stresnega sistema (os HPA). Glukokortikoidni hormoni igrajo pomembno vlogo tudi pri razvoju možganov. Podgane imajo v prvih dveh tednih po rojstvu zelo nizko koncentracijo kortikosterona ter počasnejši odziv osi HPA na različne stresne situacije. V tem obdobju so možgani zelo občutljivi na vplive iz okolja ali izpostavljenost kemičnim snovem. Različni stresni vplivi, kot so na primer izpostavljenost novostim ali rokovanje z živalmi, električni šok, vročinski stres, so povzročili dolgotrajne ali stalne spremembe v izražanju glukokortikoidnih receptorjev in v obnašanju. Najbolj proučen je vpliv rokovanja s podganami v zgodnjem poporodnem obdobju. Takšne podgane so imele stalno povečano število glukokortikoidnih receptorjev v hipokampusu, kar je povzročilo večjo občutljivost hipokampusa na glukokortikoide in boljše urejanje stresnega odziva. Med stresom so izločale manj kortikosterona, ki se je hitro povrnil na osnovno vrednost. To je pomenilo manj izpostavljanja glukokortikoidom in manj izgub celic v hipokampusu ter manjšo izgubo spominskih funkcij med staranjem. Matere teh mladičev so več časa posvečale lizanju in skrbi zanje, kar je verjetno vzrok za spremembe v delovanju glukokortikoidov. Miši z mutacijo v genu za glukokortikoidni receptor (GR) kažejo spremembe v delovanju HPA osi, ki so primerljive s spremembami pri depresivnih pacientih in so verjetno lahko pomembni modeli za raziskave depresije (Chourbaji in Gass, 2008). Glukokortikoidi lahko potujejo preko placente ter tako poškodujejo HPA os v razvoju in povzročijo spremembe v delovanju osi za celo življenje. Stres, povzročen brejim podganam, vpliva na spremembe delovanja HPA osi pri potomcih, ter na njihovo obnašanje. Pri poskusnih živalih so ugotovili, da izpostavljenost plodov prevelikim količinam glukokortikoidov, preko epigenetskih sprememb poveča možnost nastanka kroničnih bolezni kasneje v življenju. Pri otrocih, ki so bili v maternici izpostavljeni umetnim glukokortikoidom, se pojavlja sindrom pomanjkanja pozornosti in

hiperaktivnosti (Schantz in Widholm, 2001; Panzica in Melcangi, 2008). V raziskavi smo izmerili koncentracijo kortikosterona v serumu devetih kontrolnih miši, ter osmih miši iz vsake poskusne skupine. Zanimalo nas je ali lahko izpostavljenost nizkim koncentracijam klormefosa preko placente in mleka vpliva na razvoj in delovanje nadledvične žleze, posledično pa tudi na druge organske sisteme. Med mišmi, izpostavljenimi klormefosu, in kontrolno skupino nismo ugotovili statistično značilnih razlik v koncentraciji kortikosterona. Vendar ne vemo, ali so zaradi izpostavljenosti klormefosu nastale spremembe v izraženosti glukokortikoidnih receptorjev v možganih, kar bi lahko vplivalo na opažene spremembe v obnašanju pri skupini miši izpostavljenih višji koncentraciji klormefosa.

5.2.3 Vpliv nizkih koncentracij klormefosa na krvno-možgansko pregrado

V raziskavi smo s pomočjo elektronske mikroskopije proučili tudi zgradbo krvno-možganske pregrade potomcev živali, ki so bile izpostavljene klormefosu in etanolu v obdobju pred rojstvom in v zgodnejem obdobju po rojstvu. Organofosfati so namreč topni v maščobi, zato lahko prečkajo krvno-možgansko pregrado in pridejo v stik neposredno z živčnimi celicami in jih tako dolgotrajno poškodujejo. Raziskave kažejo, da imajo nizke doze organofosfatov škodljiv dolgoročen vpliv na krvno-možgansko pregrado pri glodavcih (Gupta in sod., 1999; Sinha in Shukla, 2003; Song in sod., 2004). Kljub temu obstajajo velike medvrstne razlike že samo med glodavci, saj imajo podgane manj občutljivo krvno-možgansko pregrado kot miši (Sinha in Shukla, 2003). Veliko raziskav je pokazalo, da lahko izpostavljenost organofosfatom negativno vpliva na rast in diferenciacijo živčnih podaljškov, predvsem aksonov, v razvijajočih se možganih. Organofosfati lahko povzročijo dolgoročne spremembe v možganih, ki pa se lahko pokažejo šele v odraslem življenju (Qiao in sod., 2003; Howard in sod., 2005; Slotkin in sod., 2006a). Song in sod. (2004) so pokazali, da izpostavljenost organofosfatu paraoksonu, v koncentracijah, ki ne povzročijo holinergičnih znakov zastrupitve, pri 25 – 30 dni starih podganah poškoduje krvno-možgansko pregrado, niso pa opazili poškodb pri odraslih podganah, ki so prejemale paraokson. To kaže, da je krvno-možganska pregrada bolj občutljiva na paraokson v obdobju razvoja. Piridostigmin je periferni zaviralec aktivnosti AChE. Krvno-možganska pregrada podgan, ki so jim 50 minut pred aplikacijo paraoksona dodali piridostigmin, je bila manj prizadeta kot pri podganah, ki so bile izpostavljene zgolj paraoksonu. Mehanizma njegovega delovanja zaenkrat ne morejo

razložiti, menijo pa, da piridostigmin spodbuja izločanje glukokortikoidnih hormonov iz skorje nadledvične žleze, ti pa bi lahko ščitili krvno-možgansko pregrado tako, da spodbujajo nastanek beljakovin, ki sodelujejo pri vzpostavljanju tesnih stičnic (Song in sod., 2004). Kronična izpostavljenost podgan organofosfatu metrifonatu je povečala zunajcelično raven AChE z zaviranjem aktivnosti AChE, vendar pa ni vplivala na prepustnost krvno-možganske pregrade (Rakonczay in Papp, 2001). Qiao in sod. (2003) so pokazali, da so podgani možgani v obdobju razvoja plodu manj občutljivi na škodljive vplive klorpirifosa kot v zgodnjem poporodnem obdobju (Qiao in sod., 2003). Mi smo pod elektronskim mikroskopom proučili celično strukturo možganske skorje, a nismo ugotovili sprememb v ultrastrukturni zgradbi krvno-možganske pregrade. Vendar zagotovo ne moremo izključiti morebitnega škodljivega vpliva klormefosa na dele krvno-možganske pregrade, saj smo z elektronsko mikroskopijo pregledali le manjši del možganske skorje. Možno je, da bi klormefos lahko poškodoval krvno-možgansko pregrado v katerem drugem specifičnem delu možganov. V raziskavi tudi nismo merili aktivnosti AChE ali koncentracije ACh v zunajceličnem prostoru, tako da ne vemo, ali je klormefos mogoče povzročil kopičenje ACh izven celic, ni pa poškodoval krvno-možganske pregrade.

5.2.4 Vpliv nizkih koncentracij klormefosa na izraženost beljakovin v tkivnih rezinah možganov

Nizke koncentracije organofosfatov, ki ne povzročajo holinergičnih znakov zastrupitve, lahko povzročijo fosforilacijo drugih ciljnih encimov. Ti imajo slabe kompenzatorne mehanizme, zato lahko motnje v njihovem delovanju povzročijo na primer počasnejše prevajanje živcev, izboljšano učenje v nekaterih labirintih itd. (Ray in Richards, 2001). V raziskavi smo pri potomcih klormefosu izpostavljenih živali z imunohistokemičnim barvanjem proučili morebiten vpliv na izraženost beljakovin serotoninški receptor 1a, arginin vazopresin (AVP) in neuropeptid Y (NPY). Raziskava Taita in sod. (2009) se je osredotočila na vpliv nizkih koncentracij klorpirifosa na nevrohipofizne hormone, povezane s socialnim obnašanjem pri sesalcih. Breje miši so med petnajstim in osemnajstim dnevom brejosti preko ustne sonde izpostavili nizkim dozam klorpirifosa. Novorojene miši so s podkožnimi injekcijami izpostavili klorpirifosu med enajstim in štirinajstim dnem starosti. Uporabljene doze so bile tolikšne kot so jim izpostavljeni ljudje pred rojstvom in v otroštvu, to je 1 mg/kg ali 3 mg/kg.

Živali so žrtvovali v starosti 50 dni in v hipotalamusu proučili izraženost oksitocina, arginin vazopresina in prolaktina. Pri samicah in samcih so ugotovili povečano izraženost oksitocina, izraženost arginin vazopresina pa je bila statistično značilno nižja pri samcih, ki so prejeli višje koncentracije klorpirifosa pred rojstvom in po njem. Razlik v izraženosti prolaktina niso opazili. Izpostavljenost klorpirifosu med razvojem lahko očitno trajno spremeni izraženost nekaterih genov v hipotalamusu, spremembe pa so odvisne od časa in doze izpostavljenosti ter od spola izpostavljene živali (Tait in sod., 2009).

AVP igra pomembno vlogo pri uravnavanju socialnega prepoznavanja, agresije, učenja in spomina pri sesalcih. Zato smo z imunohistokemičnim barvanjem rezin možganov z arginin vazopresin protitelesi ugotavljali morebitne vplive nizkih koncentracij klormefosa na ta sistem. Pri sesalcih tako estrogeni kot androgeni hormoni lahko povzročijo maskulinizacijo tega področja. Pri odraslih vretenčarjih spolni hormoni vplivajo na izražanje AVP. Zaradi teh razlogov je AVP potencialna tarča za delovanje hormonskih motilcev (Panzica in sod., 2011). V raziskavi Taita in sod. (2009) so miši izpostavili klorpirifosu v nizkih dozah pred rojstvom in po njem, prav tako kot smo to storili v naši raziskavi o vplivu klormefosa. Vendar so novorojene miši podkožno injicirali s klorpirifosom, izpostavljenost klorpirifosu po rojstvu je zgolj potencirala učinke, povzročene pred rojstvom. V naši raziskavi novorojene miši nismo injicirali s podkožnimi injekcijami. Vpliva klormefosa na izražanje arginin vazopresina v hipotalamusu nismo potrdili. Rezultati kažejo, da lahko različni organofosfati v nizkih koncentracijah drugače vplivajo na razvoj in delovanje možganov.

Serotonin je prenosnik v centralnem živčnem sistemu in je povezan s pomembnimi fiziološkimi funkcijami (prehranjevanje, čustvena stanja, kognitivne funkcije, spanje). Različni organofosfati škodljivo delujejo na razvijajoče se možgane preko specifičnih sistemov živčnih prenosnikov, kot je na primer serotoninški sistem. Serotoninški sistem v možganih je verjetno eden izmed najbolj občutljivih na spremembe v razvoju iz več razlogov. Prvič, serotonin je morfogen v razvijajočem se centralnem živčnem sistemu sesalcev, motnje v delovanju serotoninškega sistema v času razvoja zarodkov lahko povzročijo napake v strukturi možganov, kot na primer slabše povezave med nevroni in spremenjeno morfološko strukturo nevronov. Drugič, motnje v delovanju serotoninških stičnic v zgodnjem razvoju lahko trajno spremenijo delovanje serotoninškega sistema, tako da se lahko takšne motnje izrazijo šele kasneje, v odraslem življenju v obliki vedenjskih motenj. Tretjič, spremembe v

delovanju serotoninskega sistema povzročijo spremembe v čustvenih odzivih, urejanju telesne mase in urejanju spanja (Slotkin in sod., 2006b). Na nivo serotonina v razvijajočih se možganih lahko vplivajo stres, okužbe, genetski polimorfizmi, nekatera zdravila, mamila in druge kemične snovi kot na primer organofosfati (Daubert in Condron, 2010). Slotkin in sod. (2006) so novorojene podgane med prvim in četrtem dnevom starosti izpostavili nizkim koncentracijam diazonina in klorpirifosa s podkožno aplikacijo. Podgane so žrtvovali peti dan starosti ter jim odvzeli možgansko deblo in prednje možgane za oceno serotoninskih receptorjev in serotoninskih transporterjev. Diazonin je povečal izraženost serotoninskih receptorjev 1a in 2 v možganskem deblu in prednjih možganih, medtem ko je paration znižal ekspresijo serotoninskega receptorja 1a. Diazonin je podobno kot klorpirifos zmanjšal izražanje serotoninskega transporterja v možganskem deblu in ga povečal v prednjih možganih, medtem ko je imel paration manjše, statistično neznačilne učinke (Slotkin in sod., 2006b; Tait in sod., 2009). V naši raziskavi smo s pomočjo imunohistokemije na plavajočih rezinah opazovali izraženost serotoninskega receptorja 1a, saj spada klormefos med organofosfate in bi mogoče lahko vplival na izraženost serotoninskega receptorja 1a v možganih. Ugotovili smo, da klormefos ni vplival na izražanje AVP in serotoninskega receptorja 1a v celicah hipotalamusa. Števila celic v hipotalamusu nismo kvantitativno ovrednotili, ker pri natančnem pregledu obarvanih rezin nismo ugotovili očitnih razlik, ki bi nakazovale spremembe v izraženosti AVP ali serotoninskega receptorja 1a pri miših, izpostavljenih klormefosu.

S pomočjo imunohistokemičnega barvanja na plavajočih rezinah smo ocenili tudi izraženost NPY v mandlju možganov miši, potomcev živali, ki so bile izpostavljene višji koncentraciji klormefosa ali etanolu, saj je NPY pomemben pri zmanjšanju obnašanja, podobnega anksioznemu. Izraženost NPY nas je zanimala, ker so rezultati dvignjenega labirinta pokazali izrazito povečano obnašanje, podobno anksioznemu pri skupini, izpostavljeni klormefosu. NPY se običajno izraža v številnih delih možganov, vključno s hipotalamusom in drugimi deli limbičnega sistema (Panzica in sod., 2011). Urejanje delovanja NPY poteka preko več receptorjev, receptorje tipa Y1 in Y2 so našli v različnih delih možganov, ki se aktivirajo ob vplivih, ki povzročijo anksiozno obnašanje (Kask in sod., 2002). NPY poleg tega sodeluje pri urejanju mnogih možganskih funkcij, kot na primer obnašanje pri prehranjevanju in pitju, učenju, spominu, gibanju, uravnavanju telesne temperature, spolnega obnašanja, čustvenih odzivov, vzdraženost živcev, homeostaze srčno-žilnega sistema, izločanja hormonov in

dnevno-nočnih ciklov. NPY igra pomembno vlogo pri različnih nevroloških motnjah, kot so depresija, prehranjevalne motnje, epilepsija in kot že rečeno anksioznost (Landgraf, 2001). Med skupinami nismo ugotovili statistično značilnih razlik v izražanju NPY v medialnem mandlju.

5.2.5 Vpliv nizkih koncentracij klormefosa na izražanje genov v možganih

Kljub temu da so organofosfati eni izmed najpogostejše uporabljenih insekticidov na svetu, je zelo malo podatkov o možnih vplivih na izražanje genov pri ljudeh in živalih. Veliko vprašanj se pojavlja o možnih vplivih organofosfatov na razvoj in delovanje možganov, saj vemo, da organofosfati lahko povzročajo poškodbe tudi v koncentracijah, ki ne povzročijo akutne zastrupitve. Organofosfati lahko v celičnih kulturah povzročijo zaznavne spremembe na izražanje genov, kar nam je lahko iztočnica za raziskave na živalih. Leta 2005 je skupina Gwinn in sod. (2005) raziskala *in vitro* vpliv organofosfata malationa na izražanje genov v štirih celičnih linijah normalnih epitelnih celic mlečne žleze žensk, ki so bile operirane zaradi zmanjšanja dojk. Pri vseh celičnih linijah so našli devet genov, katerih izraženost se je pod vplivom malationa spremenila. Trije (aldo keto reduktaza 1 in 2 - AKR1C1 in AKR1C2 ter beljakovina z zaporedjem B, ki je pod vplivom estrogenov - EBBP) od teh genov, pri katerih so ugotovili povišano izraženost, so povezani s tumorsko preobrazbo celic, trije (centromerna beljakovina F - CPF, podvojevalni faktor C - RFC3 in timidilat sintetaza - TYMS), pri katerih so ugotovili zmanjšano izraženost, pa so povezani s podvojevanjem DNK, en gen (kinaza za urejanje celičnega cikla - BUB1) pa z urejanjem celičnega cikla. Izraženost se je spremenila tudi pri genu z neznano funkcijo (dostopna številka na Gene Bank AI859865) ter genu aktivator plazminogena (PLAT), ki je serinska proteaza in je pomemben pri aktivaciji plazminogena v plazmin. Rezultate, pridobljene z mikromrežami, so potrdili z qPCR (Gwinn in sod., 2005). Z mikromrežami sta Slotkin in Seidler (2007) poskušala ugotoviti podobnosti in razlike v delovanju organofosfatov klorpirifosa in diazonina na razvijajoče se možgane podgan. Novorojene podgane sta od prvega do četrtega dneva starosti izpostavila nizkim dozam organofosfatov, ki ne povzročajo zaviranja aktivnosti AChE. Ocenjevala sta vplive na izraženost 252 genov, ki so pomembni pri splošnem razvoju živčnih celic, sporočanje med celicami, citotoksičnost, ter tvorbo živčnih prenosnikov. Pri več kot šestdesetih odstotkih genov so ugotovili statistično značilne razlike, kar pove, da sta klorpirifos in diazonin

statistično značilno vplivala na izražanje teh genov, vendar te razlike seveda še ne pomenijo nujno tudi pomembnega fiziološkega učinka. Tako klorpirifos kot tudi diazonin sta imela podobne vplive na proučene gene, vendar pa so bili vplivi diazonina nekoliko večji. Njihovi rezultati kažejo, da različni organofosfati lahko vplivajo na različne poti, ki so pomembne za razvoj živčevja. Vplivi različnih organofosfatov se na ključnih mestih lahko zelo razlikujejo in privedejo do različnih sprememb v razvoju živčevja. Avtorji navajajo, da je takšen pristop primerjave vplivov z mikromrežami lahko uporaben za proučevanje razvojne nevrotoksičnosti (Slotkin in Seidler, 2007). Vpliv klorpirifosa na razvoj in delovanje možganov pri izpostavljenih živalih in njihovih potomcih, izpostavljenih preko mater, so proučevali tudi Moreira in sod. (2010). Brejim samicam so od šestega do sedemnajstega dneva brejosti podkožno injicirali različne doze klorpirifosa. Osemnajsti dan brejosti so breje samice žrtvovali, za analizo z mikromrežami so uporabili možgane samic in plodov. Ugotovili so, da je klorpirifos pri izpostavljenih samicah vplival na izražanje genov, ki so pomembni pri oblikovanju celičnih stikov, obnašanju, presnovi maščob, razvoju živčnega sistema, nevrogenezi, prenosu sporočil preko sinapse in drugih. Pri plodovih so nižje doze klorpirifosa statistično značilno spremenile izražanje genov, pomembnih pri delitvi celic, proizvodnji beljakovin, prenosu živčnih sporočil in urejanju kromatina (Moreira in sod., 2010). V naši raziskavi smo proučili izraženost genov v možganih miši, ki so verjetno bile preko mater izpostavljene klormefosu. Uporabili smo mišje genomske mikromreže, ki vsebujejo več kot 39 000 sond za vse gene v mišjem genomu. Rezultati so pokazali nekaj različno izraženih genov med skupinama. Eden od njih je bil gen za kadherin 7. Kadherini so glavne povezovalne molekule med celicami in so pomembni pri razvoju in vzdrževanju strukture mehkih tkiv. Izražanje različnih genov za kadherine vpliva na povezave med njimi. Stabilno in močno povezavo celic kadherini še dodatno učvrstijo tako, da se povežejo z aktinom citoskeleta (Moore in sod., 2004). Poleg mehanične povezave med celicami imajo kadherini tudi druge zelo pomembne vloge, kot je medsebojno prepoznavanje, oblikovanje in vzdrževanje mej med tkivi, koordinirano gibanje celic, ustvarjanje in vzdrževanje strukture, delovanje celic in polarnost tkiv (Halbleib in Nelson, 2006). Kadherine delimo na podtip I in II, v razvijajočih se in tudi odraslih možganih se posamično izražajo v različnih delih (Ueno, 2007; Takahashi in Osumi, 2008). Rezultate analize z mikromrežami, ki so kazali na različno izražanje kadherinov med kontrolno in poskusno skupino, smo preverili še z qPCR. Vendar razlik v izražanju kadherina 7 z qPCR nismo potrdili.

Rezultati genskih mikromrež so pokazali tudi razlike v izraženosti serotoninskega receptorja 1a, ki ima pomembno vlogo v kognitivnih procesih kot tudi pri čustvenih stanjih. Serotoninski receptorji 1a so izraženi tudi v hipotalamusu in so pomembni za urejanje nevroendokrinega delovanja in odgovora na stres (Hensler, 2003). Slotkin in Seidler (2007) sta uporabila mikromreže, ki so vsebovale samo gene, ki so pomembni pri določenih funkcijah, na katere organofosfati vplivajo, za razliko od nas in Moreira in sod. (2010), ki smo uporabljali mikromreže s celotnim mišjim genomom. Tudi za serotoninski receptor 1a nismo mogli potrditi razlik v izraženosti med skupinama. Takšen rezultat kvantitativnega PCR ni presenetljiv, saj analize s pomočjo mikromrež velikokrat pokažejo nekaj lažno pozitivnih rezultatov. Pri hkratni proučitvi več deset tisoč genov namreč lahko med sondami pride do navzkrižne hibridizacije. Rezultate mikromrež je vedno potrebno potrditi z drugimi metodami kot so qPCR, hibridizacija *in situ* ali imunohistokemija. Možno je, da je klormefos kljub našim negativnim rezultatom vplival na izražanje nekaterih genov, predvsem v hipotalamusu, vendar je bil naš odvzeti vzorec možganov prevelik in smo zato lahko te gene pri analizi zgrešili. Mogoče bi z mikromrežami, ki bi vsebovale manj sond za natančno določene gene, ki npr. sodelujejo pri splošnem razvoju živčnih celic ali drugih procesih, lahko dobili več različno izraženih genov. Vendar smo se glede na pomanjkanje strokovne literature o delovanju klormefosa odločili, da pregledamo izražanje genov z mikromrežami, ki vsebujejo sonde za čim več prepisov.

5.2.6 Vpliv nizkih koncentracij klormefosa na zgradbo krvno-možganske pregrade

Dodatno smo s pomočjo elektronske mikroskopije pregledali še zgradbo krvno-možganske pregrade. Organofosfati so topni v maščobah, zato lahko prehajajo krvno-možgansko pregrado in jo tako lahko tudi poškodujejo. Možnost vpliva na krvno-možgansko pregrado je še dodatno podkrepil rezultat mikromrež, ki je kazal različno izraženost gena za kadherin 7 med kontrolno in poskusno skupino. Natančen pregled zgradbe krvno-možganske pregrade ni pokazal razlik med kontrolno skupino in višji koncentraciji klormefosa izpostavljeni skupini miši. V raziskavi smo pregledali krvno-možgansko pregrado v čelnem režnju možganov, zato ne moremo z gotovostjo trditi, da je krvno-možganska pregrada po celotnem delu nepoškodovana. Miši so bile izpostavljene klormefosu v občutljivem obdobju, ko se krvno-možganska pregrada še razvija. Do petindvajsetega dne starosti miši postane krvno-

možganska pregrada neprepustna za beljakovine in izražanje nekaterih prenašalnih molekul doseže vrh, nekatere strukture te pregrade pa se še razvijajo (Song in sod., 2004). Merjenje aktivnosti AChE bi nam pokazalo, ali je klormefos prešel v možgane. Vendar je naša raziskava temeljila na uporabi nizkih doz klormefosa, pri katerih vpliva na aktivnost AChE nismo pričakovali. Shinka in Skuhla (2003) poročata, da je krvno-možganska pregrada miši bolj občutljiva od podganje (Sinha in Shukla, 2003). Zato ne moremo izključiti, da bi nizke koncentracije klormefosa pri drugih živalskih vrstah ali človeku lahko povzročile poškodbe krvno-možganske pregrade. Ne smemo zanemariti tudi možnega škodljivega učinka klormefosa skupaj z drugimi, v okolju prisotnimi snovmi.

6 SKLEPI

Na osnovi rezultatov opravljenih študij pri potomcih miši, izpostavljenih klormefosu, ugotavljamo:

- Klormefos v proučevanih nizkih koncentracijah ne deluje kot hormonski motilec, saj ni zmanjšal števila potomcev ali spremenil časa do zabrejitve pri izpostavljenih živalih.
- Klormefos v nizkih koncentracijah ne deluje kot hormonski motilec na miši, ki so mu bile izpostavljene pred rojstvom in v zgodnjem poporodnem obdobju.
- Možno je, da klormefos vpliva na razvoj in delovanje možganov pri miših. Potomci mater, izpostavljenih višji koncentraciji klormefosa, so v testu dvignjenega labirinta ne glede na spol kazali statistično značilno pojačano obnašanje, podobno anksioznemu.

Z raziskavami smo ovrgli prvi dve postavljeni hipotezi.

Glede na rezultate testa dvignjenega labirinta bi bilo potrebno opraviti še dodatne teste obnašanja s katerimi bi lahko potrdili ali ovrgli hipoteze, da izpostavljenost nizkim dozam klormefosa vpliva na razvoj in delovanje možganov pri miših.

7 POVZETEK

Zaradi naraščajočega števila svetovnega prebivalstva in vse večje potrebe po hrani poraba pesticidov v zadnjih sedemdesetih letih strmo narašča. Vrednost svetovnega trga pesticidov je bila v začetku 21. stoletja ocenjena na 25 milijard dolarjev. Med pesticide spadajo herbicidi, insekticidi, fungicidi in drugi (nematocidi, rodenticidi ipd.). Organofosfatne insekticide uporabljamo že več desetletij in predstavljajo 65 % svetovne porabe insekticidov. Organofosfati delujejo kot ireverzibilni zaviralci AChE in tako povzročijo kopičenje ACh v sinapsah, kar povzroča prekomerno stimulacijo in motnje v prenosu sinaps. Simptomi blage do srednje zastrupitve pri ljudeh in živalih so glavobol, slabost, zamegljen vid, vrtoglavica, slaba koordinacija, tresenje in slabost mišic, hropenje in kašelj. Simptomi močne zastrupitve so inkontinenca, krči in nezavest. Organofosfati lahko tudi preko svojih razgradnih produktov negativno delujejo na zdravje ljudi in živali, ki so neciljni organizmi za organofosfate. Vemo, da številne snovi, med njimi tudi organofosfati, ki jih najdemo v okolju zaradi človekovega delovanja, vplivajo na razvoj in delovanje endokrinega sistema pri sesalcih, vključno s človekom. V preteklosti se ni posvečalo dovolj pozornosti proučevanju škodljivih učinkov teh snovi v nižjih koncentracijah, ki ne povzročajo akutnih posledic. Namen našega dela je bil proučiti vpliv nizkih koncentracij organofosfata klormefosa na razvoj in delovanje spolnega sistema in možganov miši, ki so bile klormefosu izpostavljene pred rojstvom in v zgodnjem obdobju po rojstvu, saj se motnje v obdobju razvoja lahko pokažejo šele kasneje v življenju. Miši seva Balb/C smo izpostavili 100x in 10x (0,35 µg/mL in 3,5 µg/mL) nižji koncentraciji klormefosa kot je LD₅₀ za podgane. Kontrolne miši so bile izpostavljene etanolu v koncentraciji 3,5 µg/mL, saj smo klormefos zaradi njegove netopnosti v vodi najprej raztopili v njem. Ugotovili smo, da klormefos ni vplival na razmnoževanje izpostavljenih miši, saj ni bilo razlik v velikosti gnezd med skupinami. Pri miših, izpostavljenih klormefosu v obdobju pred rojstvom pa do enaindvajsetega dne starosti, tudi nismo ugotovili razlik v različnih opazovanih reprodukcijskih parametrih – masa mod in mehurnic, premer semenskih cevk v modih, dnevna proizvodnja semenčic, plodnost potomcev. Prav tako nismo ugotovili vpliva na telesno maso, histologijo mod, koncentracijo plazemskih hormonov in število apoptotičnih celic v modih. Izražanje AMH in 3β-HSD, ki sta pokazatelja motenj v dozorevanju mod pri mladih živalih, tudi ni bilo prizadeto. Pri proučevanju vplivov na razvoj in delovanje možganov smo opravili več preiskav. Živali, katerih starši so bili izpostavljenih višji

koncentraciji klormefosa, so kazale pojačano obnašanje, podobno anksioznemu, v testu dvignjenega labirinta, ki je standardiziran test za proučevanje takega obnašanja. V možganih potomcev izpostavljenih miši smo, s postopkom imunohistokemije na plavajočih rezinah, ugotavljali število imunoreaktivnih celic za različne neuropeptide – neuropeptid Y, arginin vazopresin in serotoninški receptor 1a, ki sodelujejo pri urejanjih različnih vrst obnašanja. Razlik v izražanju teh neuropeptidov nismo našli. Zanimalo nas je tudi ali klormefos lahko vpliva na izražanje genov v možganih, zato smo samcem iz kontrolne skupine in višji koncentraciji klormefosa izpostavljenih miši odvzeli možgane za analize z mikromrežami. Ugotovili smo, da sta kadherin 7 in serotoninški receptor 1a statistično značilno diferencialno izražena med skupinama. Rezultate, pridobljene z mikromrežami smo preverili še z drugo metodo qPCR. Ugotovili smo, da ni razlik med skupinami v izražanju kadherina 7, ki ima pomembno vlogo pri povezavi med celicami, in serotoninškega receptorja 1a. Glede na to, da organofosfati lahko poškodujejo krvno-možgansko pregrado ter da so rezultati z mikromrež kazal na razlike med skupinami v izražanju kadherina 7, smo se odločili, da pregledamo krvno-možgansko pregrado z elektronsko mikroskopijo. Natančen pregled krvno-možganske pregrade v čelnem režnju ni pokazal nikakršnih poškodb.

Pri izpostavljenih živalih smo opazovali samo velikost gnezd pri čemer nismo opazili razlik. Ne vemo pa, ali je klormefos vplival na reprodukcijske parametre, kot na primer na DSP, koncentracijo hormonov ipd. Pri potomcih izpostavljenih živali nismo ugotovili motenj v opazovanih reprodukcijskih parametrih. Negativni rezultati v merjenih parametrih imajo lahko več vzrokov. Koncentracija klormefosa v plazmi izpostavljenih živali je bila zelo nizka. Glede na to, da smo uporabljali nizke koncentracije klormefosa, saj smo želeli simulirati dolgotrajno izpostavljenost nizkim dozam organofosfatov, katerim smo lahko izpostavljeni tudi ljudje, je možno, da je bila koncentracija prenizka, da bi izzvala kakršnekoli učinke na spolni sistem. Pri raziskavah razvoja in delovanja možganov smo ugotovili bolj pojačano obnašanje, podobno anksioznemu pri živalih, izpostavljenih višji dozi klormefosa, vendar mehanizma delovanja zaenkrat še ne poznamo, saj z imunohistokemijo možganov nismo ugotovili razlik v izraženosti nekaterih neuropeptidov, ki sicer vplivajo na obnašanje. Analiz mikromrež nismo potrdili z qPCR analizo. Tudi zgradba krvno-možganske pregrade izpostavljenih živali ni bila prizadeta, vendar je bil pregledani del majhen in možno je, da bi lahko bile poškodbe prisotne na kakšnem drugem delu možganov.

V zaključku lahko rečemo, da klormefos ni vplival na razmnoževanje izpostavljenih živali. Prav tako ni vplival na razvoj in delovanje mod in spolnega trakta pri potomcih izpostavljenih živalih. Ne smemo pozabiti na to, da smo tako ljudje kot živali v okolju vsakodnevno izpostavljeni mešanici različnih kemičnih snovi. Vemo, da določene snovi vsaka zase v nizkih dozah ne vplivajo škodljivo na izpostavljene živali. Šele v primeru mešanic različnih snovi, v nizkih koncentracijah, pa bi se lahko pokazali njihovi negativni učinki.

Pri potomcih izpostavljenih živali, ki so bili izpostavljeni višji koncentraciji klormefosa (3.5 µg/mL), smo opazili pojačano obnašanje, podobno anksioznemu. Potrebne so še nadaljnje raziskave, da ugotovimo možne dolgoročne vplive in mehanizme delovanja na razvoj in delovanje možganov, pri čemer ne smemo zanemariti tudi genetskih dejavnikov, zaradi katerih je lahko določen del populacije bolj nagnjen k poškodbam. Glede na rezultate naše raziskave lahko domnevamo, da klormefos v nizkih koncentracijah ne deluje kot hormonski motilec na razvoj in delovanje spolnega sistema, vendar so za dokončno potrditev vpliva potrebne še nadaljnje raziskave.

8 SUMMARY

The use of pesticides in the last 70 years has been on the increase as a result of the growing human population and its increased demand for food. At the beginning of the 21st century the value of pesticide market was estimated at 25 millions of dollars. Pesticides include herbicides, insecticides, fungicides and others (nematocides, rodenticides...). Organophosphate insecticides have been used for many decades and represent 65% of all insecticides used today. Organophosphates are irreversible inhibitors of acetylcholinesterase, an enzyme required for the degradation of neurotransmitter acetylcholine. As a result of their action, acetylcholine is accumulated in the synapses, overstimulates them, and the transfer across the synapses is disturbed. Symptoms of mild poisoning are a headache, nausea, blurred vision, vertigo, bad coordination, tremor, and muscle weakness, stertor and coughing. The main symptoms at severe acute poisoning are incontinence, paroxysm and unconsciousness. Organophosphates are also harmful for the health of non-target organisms such as humans and animals, either directly or through exposure to their breakdown products. Many compounds are found in the environment because of human action; among them are many organophosphates that can possibly affect the development and function of endocrine system in mammals, including humans. However, in the past decades limited attention was dedicated to the studies of such chemicals in low doses, that have no acute effects. The aim of our study was to examine the effects of low doses of organophosphate chlormephos on the development and function of reproductive system and brain in mice, which were exposed to chlormephos before birth and in the early postnatal life. Balb/c mice were exposed to 0,35 µg/mL in 3,5 µg/mL of chlormephos through drinking water. Doses chosen represent 10- and 100-times lower doses than LD₅₀ for rats. Since chlormephos is insoluble in water, it was diluted in ethanol. Control mice received ethanol in concentration of 3,5 µg/mL. The number of the offsprings in the litters exposed to chlormephos directly did not differ from the control group. No differences such as testes and seminal vesicles weight, seminiferous tubules diameter, daily sperm production and reproductive capacity were found in any of the observed reproductive parameters in the mice exposed to chlormephos before birth and until weaning at 21 days after birth. Similarly, no effects were found on body mass, histology of testes, concentration of corticosterone and thyroxine in blood serum and the number of apoptotic

cells in the testes. Immunoexpression of antimüllerian hormone and 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase was also unaffected in the testes of 9 and 16 days old mice, respectively.

Elevated plus-maze (EPM) is a standardized test for the studies of anxiety-like behaviour and the test revealed that mice exposed to a higher dose of chlormephos before birth and until weaning expressed increased anxiety-like behavior in comparison to mice from the control group. Immunohistochemistry on floating brain sections was performed to study the number of immunoreactive cells for neuropeptide Y, arginine vasopressin and serotonin receptor 1a which are all thought to be involved in the regulation of anxiety behaviour. No differences were detected in the expression of these peptides/proteins. The brain of male mice exposed to a higher dose of chlormephos and the control male mice were used for microarray analyses by the use of Affymetrix GeneChip® Mouse Genome 430 2.0 Array. Cadherin 7 and serotonin receptor 1a were the genes with the highest differences in expression between control and chlormephos treated group. However, when the results were validated by the use of real time qPCR method, we could not confirm these differences. Since the blood-brain barrier is reported to be one of the target tissues for organophosphorous compounds, we examined it in the control and chlormephos exposed mice by the use of electron microscopy. Careful examination of the blood-brain barrier in the frontal lobe of the brain did not reveal any damage to the structure of blood-brain barrier.

In directly exposed mice, only the number of the offsprings was observed and this did not differ between the exposed and control groups. We do not know if chlormephos had any effects on any other reproductive parameters such as daily sperm production, hormone concentration, etc. However, since the number of the offsprings did not differ between the control group and chlormephos exposed mice, it is unlikely that chlormephos significantly affected any reproductive parameters. No effect on reproductive parameters in mice, exposed only neonatally to chlormephos, could have several different explanations. It is possible that the offsprings were not exposed to chlormephos at all. We do not know if chlormephos crosses the placenta, and we were unable to measure the concentration of chlormephos in the milk of the lactating females. Furthermore, the concentration of chlormephos in blood plasma in directly exposed mice was low, further suggesting that any exposure of the offsprings

through their mothers was very low. Low concentrations of chlormephos were used as we were interested in potential effects of environmental residues, and therefore it is possible that such doses do not affect the reproductive tract. Behavioural studies revealed that mice exposed to a higher dose of chlormephos have an increased anxiety-like behaviour, although the mechanisms behind this behavioural change remain unknown as immunohistochemistry of the brain sections did not show any differences in the expression of neuropeptide Y (NPY), serotonin receptor 1a (HT1A) and arginine vasopressin (AVP) that affect the behaviour. By the use of microarrays, over 39,000 gene transcripts were analysed. However, results from microarray analyses were not confirmed by the qPCR analysis. With blood-brain barrier, only small part of the cortex was analysed, so it is still possible that some other part of the blood-brain barrier could have been affected.

In conclusion, chlormephos did not affect reproductive capacity of the directly exposed animals. Also, chlormephos did not affect development and functioning of the testes and reproductive tract in mice exposed to chlormephos *in utero* and through milk from their mothers. However, we have to bear in mind that people and animals are daily exposed to a mixture of different chemicals, not just to a single chemical, and such mixtures could be more harmful than single chemicals alone. Furthermore, genetic factors that could affect only a part of population, and could predispose some individuals to higher susceptibility should not be neglected.

Increased anxiety-like behaviour in the offspring of the animals exposed to a higher dose of chlormephos (3.5 µg/L) was observed. Additional studies are needed to determine other possible long-term effects as well as the mechanisms of the action of chlormephos on the development and functioning of the brain. In conclusion, our results suggest that chlormephos does not act as an endocrine disruptor on the development and functioning of reproductive system, but more studies, especially those with possible effects on the central nervous system, should be done.

9 ZAHVALE

Mentorju prof. dr. Gregorju Majdiču.

Gregor, v čast si štejem, da si bil moj mentor. Hvala ti za pomoč in vodenje na znanstveni poti, verjamem, da bo najina skupna profesionalna pot tudi v prihodnje uspešna.

Članom strokovne komisije

Prof. dr. Robert Frangež, prof. dr. Nina Čebulj Kadunc, prof. dr. Davor Ježek, hvala vam za potrpežljivost, nasvete in pomoč pri nastanku pričujočega dela.

Mama, ate, mama naša, Metoda in Jurij, brez vas danes verjetno ne bi bila tukaj, hvala ker ste mi vedno stali ob strani!

Vida in Jože, hvala za vso pomoč!

Moji najdražji in najbližji, Simon, Zala in Luka, hvala, da me imate radi takšno kot sem.

Zahvaljujem se inštitucijam, ki so mi s svojo opremo, prostori in osebjem pomagali, da sem lahko opravila raziskave:

Inštitutu za fiziologijo, farmakologijo in toksikologijo (prof. dr. Nina Čebulj Kadunc, Boštjan Drolc), Inštitutu za anatomijo in embriologijo (Prof. dr. Gregorju Fazarincu, asist. dr. Matjažu Uršiču, dr. Marku Cotmanu, Jasni Šporar), Centru za informatiko in knjižnico (mag. Giti Grecc-Smole)Veterinarske fakultete v Ljubljani.

Inštitutu za anatomijo, histologijo in embriologijo Medicinske fakultete in Hrvaškemu inštitut za raziskovanje možganov (prof. dr. Davor Ježek, ga. Iris Elezovič) v Zagreb.

Centru za funkcijsko genomiko in biočipe (dr. Tadeji Režen) Medicinske fakultete v Ljubljani.

Nacionalnemu medicinskemu inštitutu za zdravje in raziskovanje, Pariz, Francija (prof. dr. Nathalie Josso)

Univerzi v Edinburgu, Velika Britanija (prof. dr. Ian Mason)

Javni agenciji Republike Slovenije za raziskovalno dejavnost.

Hvala dr. B., za znanje, ki si ga delil z mano, pomoč v laboratoriju, fotografiranje preparatov, uvajanje v svet Photoshopa, nasvete, spodbudo, pozitiven pogled v najbolj črnih trenutkih in še veliko tega bi lahko naštevala. Tomaž hvala!

Tanči, hvala ti za pomoč pri interpretaciji analiz qPCRja. Hvala za nasvete, spodbudo, smeh, ki ga prinašaš in vsa tista mala ter velika dejanja, ki naj ostanejo med nama!

Monika, hvala za pomoč pri izvedbi poskusov, obilo pozitivne energije, nasvetov in pomoči v laboratoriju!

Neža, hvala za tvoje poglede na nastanek in razvoj doktorata!

Nina, hvala za vso pomoč pri miškah in pozitivno energijo!

Luka, Katja, Nataša hvala za prijetno vzdušje v laboratoriju!

Tanči, Monika, Neža, Nina, Katja, Nataša, Tomaž in Luka, hvala, ker ste moji prijatelji!

Hvala tudi drugim prijateljem, ki ste mi vedno stali ob strani!

10 REFERENCE

Ahlborg UG, Lipworth L, Titus-Ernstoff L et al. (1995). Organochlorine compounds in relation to breast cancer, endometrial cancer, and endometriosis: an assessment of the biological and epidemiological evidence. *Crit Rev Toxicol* 25: 463-531.

Aksglaede L, Sorensen K, Petersen JH, Skakkebaek NE, Juul A (2009). Recent decline in age at breast development: the Copenhagen Puberty Study. *Pediatrics*. 123: e932-9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19403485>. 03.05.2012.

Aktar MW, Sengupta D, Chowdhury A (2009). Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdiscip Toxicol*. 2: 1-12. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21217838>. 16.4.2012.

Andersen AG, Jensen TK, Carlsen E et al. (2000). High frequency of sub-optimal semen quality in an unselected population of young men. *Hum Reprod* 15: 366-72.

Arango NA, Donahoe PK. (2011). Sex differentiation in mouse and man and subsequent development of the female reproductive organs. In: Girard L, ed. *Stem book. Germ cell and somatic stem cell biology and reproduction*. Cambridge: Harvard stem cell Institute, Harvard University. e9. <http://www.stembook.org/>. 14.3.2012.

Auger J, Kunstmann JM, Czyglik F, Jouannet P (1995). Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years. *N Engl J Med* 332: 281-5.

Benachour N, Moslemi S, Sipahutar H, Seralini GE (2007). Cytotoxic effects and aromatase inhibition by xenobiotic endocrine disrupters alone and in combination. *Toxicol Appl Pharmacol* 222: 129-40.

Berne R, Levy M, Koeppen B, Stanton B (2004). The reproductive glands. In: Berne R, ed. *Physiology*, 5th. ed. St. Louis, Missouri, ZDA: Elsevier, Inc., 920 - 26.

Bertolasio J, Fyfe S, Snyder BW, Davis AM (2011). Neonatal injections of methoxychlor decrease adult rat female reproductive behavior. *Neurotoxicology* 32: 809-13.

Bjorling-Poulsen M, Andersen HR, Grandjean P (2008). Potential developmental neurotoxicity of pesticides used in Europe. *Environ Health*. 7: e50. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18945337>. 23.3.2012.

Blatt J, Van Le L, Weiner T, Sailer S (2003). Ovarian carcinoma in an adolescent with transgenerational exposure to diethylstilbestrol. *J Pediatr Hematol Oncol* 25: 635-6.

Braquenier JB, Quertemont E, Tirelli E, Plumier JC (2010). Anxiety in adult female mice following perinatal exposure to chlorpyrifos. *Neurotoxicol Teratol* 32: 234-9.

Brevini TA, Cillo F, Antonini S, Gandolfi F (2005). Effects of endocrine disrupters on the oocytes and embryos of farm animals. *Reprod Domest Anim* 40: 291-9.

Brouwers MM, Feitz WF, Roelofs LA, Kiemeny LA, de Gier RP, Roeleveld N (2006). Hypospadias: a transgenerational effect of diethylstilbestrol? *Hum Reprod* 21: 666-9.

Buccione R, Schroeder AC, Eppig JJ (1990). Interactions between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. *Biol Reprod* 43: 543-7.

Buck Louis GM, Cooney MA, Peterson CM (2011). The ovarian dysgenesis syndrome. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease* 2: 25-35.

Budefeld T, Grgurevic N, Tobet SA, Majdic G (2008). Sex differences in brain developing in the presence or absence of gonads. *Dev Neurobiol* 68: 981-95.

Bujan L, Mansat A, Pontonnier F, Micusset R (1996). Time series analysis of sperm concentration in fertile men in Toulouse, France between 1977 and 1992. *BMJ* 312: 471-2.

Bustos-Obregon E, Gonzalez-Hormazabal P (2003). Effect of a single dose of malathion on spermatogenesis in mice. *Asian J Androl* 5: 105-7.

Calafat AM, Kuklenyik Z, Reidy JA, Caudill SP, Ekong J, Needham LL (2005). Urinary concentrations of bisphenol A and 4-nonylphenol in a human reference population. *Environ Health Perspect* 113: 391-5.

Carobrez AP, Bertoglio LJ (2005). Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. *Neurosci Biobehav Rev* 29: 1193-205.

Casals-Casas C, Desvergne B (2011). Endocrine disruptors: from endocrine to metabolic disruption. *Annu Rev Physiol* 73: 135-62.

Čeh K, Čebulj Kadunc N, Majdič G (2009). Vpliv nizkih doz organofosfatov na razvoj in delovanje spolnih organov pri miših. In: Kožuh Eržen N, ed. Proučevanje škodljivih učinkov in mehanizmov dolgotrajnega delovanja organofosfornih snovi na ljudi, živali in okolje in načrtovanje ustreznih protiukrepov. ed. Domžale: Oikos d.o.o., 51 - 58.

Čeh K, Ježek D, Žužek M, Čebulj Kadunc N, Majdič G (2012). Effect of organophosphate chlormephos on development and function of testes and brain. *Slo Vet Res* 49: 41 - 49.

Centers for Disease Control and Prevention, Department of Health and Human Services (2009). In: Fourth National Report on Human Exposure to Environment Chemicals. 529 pp. Buford Highway.
<http://www.cdc.gov/exposurereport/pdf/FourthReport.pdf>. 23.12.2011.

Chourbaji S, Gass P (2008). Glucocorticoid receptor transgenic mice as models for depression. *Brain Res Rev* 57: 554-60.

Clarke IJ (2011). Control of GnRH secretion: one step back. *Front Neuroendocrinol* 32: 367-75.

Cohn BA, Cirillo PM, Wolff MS et al. (2003). DDT and DDE exposure in mothers and time to pregnancy in daughters. *Lancet* 361: 2205-6.

Colborn T, vom Saal FS, Soto AM (1993). Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ Health Perspect* 101: 378-84.

Daubert EA, Condron BG (2010). Serotonin: a regulator of neuronal morphology and circuitry. *Trends Neurosci* 33: 424-34.

De Angelis S, Tassinari R, Maranghi F et al. (2009). Developmental exposure to chlorpyrifos induces alterations in thyroid and thyroid hormone levels without other toxicity signs in CD-1 mice. *Toxicol Sci* 108: 311-9.

Diamanti-Kandarakis E, Bourguignon JP, Giudice LC et al. (2009). Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. *Endocr Rev* 30: 293-342.

Dickerson SM, Gore AC (2007). Estrogenic environmental endocrine-disrupting chemical effects on reproductive neuroendocrine function and dysfunction across the life cycle. *Rev Endocr Metab Disord* 8: 143-59.

Ding G, Zhou S, Tian Y, Gao Y, Shi R (2011). Effects of trichlorfon on maternal estrous cycle, oocyte maturation, and near-term fetal developmental outcome in mice. *Ind Health* 49: 619-25.

El-Gehani F, Zhang FP, Pakarinen P, Rannikko A, Huhtaniemi I (1998). Gonadotropin-independent regulation of steroidogenesis in the fetal rat testis. *Biol Reprod* 58: 116-23.

Elobeid MA, Allison DB (2008). Putative environmental-endocrine disruptors and obesity: a review. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 15: 403-8.

Eskenazi B, Marks AR, Bradman A et al. (2007). Organophosphate pesticide exposure and neurodevelopment in young Mexican-American children. *Environmental health perspectives* 115: 792-8.

Eskenazi B, Rosas LG, Marks AR et al. (2008). Pesticide toxicity and the developing brain. *Basic clinical pharmacology and toxicology* 102: 228-36.

Falck FJ, Ricci AJ, Wolff MS, Godbold J, Deckers P (1992). Pesticides and polychlorinated biphenyl residues in human breast lipids and their relation to breast cancer. *Arch Environ Health* 47: 143-6.

FAO, WHO. (2006). Manual on development and use of FAO and WHO specifications for pesticides. http://www.fao.org/ag/AGP/AGPP/Pesticid/Specs/Pdf/Manual_update_2006.pdf. 20.5.2012.

Farag AT, Radwan AH, Sorour F, El Okazy A, El-Agamy el S, El-Sebae Ael K (2010). Chlorpyrifos induced reproductive toxicity in male mice. *Reprod Toxicol* 29: 80-5.

Gammon MD, Santella RM, Neugut AI et al. (2002a). Environmental toxins and breast cancer on Long Island. I. Polycyclic aromatic hydrocarbon DNA adducts. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 11: 677-85.

Gammon MD, Wolff MS, Neugut AI et al. (2002b). Environmental toxins and breast cancer on Long Island. II. Organochlorine compound levels in blood. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 11: 686-97.

Gandolfi F, Pocar P, Brevini TA, Fischer B (2002). Impact of endocrine disruptors on ovarian function and embryonic development. *Domest Anim Endocrinol* 23: 189-201.

Gilbert SF (1994). Sex determination. In: Gilbert SF, ed. *Developmental biology*. 4th ed. Sunderland, Massachusetts, ZDA: Sinauer Associates, Inc., 754 - 68.

Gioiosa L, Fissore E, Ghirardelli G, Parmigiani S, Palanza P (2007). Developmental exposure to low-dose estrogenic endocrine disruptors alters sex differences in exploration and emotional responses in mice. *Horm Behav* 52: 307-16.

Giwerzman A, Giwerzman YL (2011). Environmental factors and testicular function. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 25: 391-402.

Gomes J, Lloyd OL (2009). Oral exposure of mice to formulations of organophosphorous pesticides: gestational and litter outcomes. *Int J Environ Health Res* 19: 125-37.

Gore AC (2010). Neuroendocrine targets of endocrine disruptors. *Hormones (Athens)* 9: 16-27.

Gray K, Lawler CP (2011). Strength in numbers: three separate studies link in utero organophosphate pesticide exposure and cognitive development. *Environ Health Perspect* 119: A328-9.

Gupta A, Agarwal R, Shukla GS (1999). Functional impairment of blood-brain barrier following pesticide exposure during early development in rats. *Hum Exp Toxicol* 18: 174-9.

Güven M, Bayram F, Unluhizarci K, Keleştimur F (1999). Endocrine changes in patients with acute organophosphate poisoning. *Hum Exp Toxicol* 18: 598-601.

Gwinn MR, Whipkey DL, Tennant LB, Weston A (2005). Differential gene expression in normal human mammary epithelial cells treated with malathion monitored by DNA microarrays. *Environ Health Perspect* 113: 1046-51.

Hajszan T, Leranth C (2010). Bisphenol A interferes with synaptic remodeling. *Front Neuroendocrinol* 31: 519-30.

Halbleib JM, Nelson WJ (2006). Cadherins in development: cell adhesion, sorting, and tissue morphogenesis. *Genes Dev* 20: 3199-214.

Harms J, Wilson C, Everson R, Hooser S (1998). Organophosphate and Carbamate Insecticide Poisoning.
<https://http://www.addl.purdue.edu/newsletters/1998/summer/organos.html> <20.5.2012>

Haviland JA, Butz DE, Porter WP (2010). Long-term sex selective hormonal and behavior alterations in mice exposed to low doses of chlorpyrifos in utero. *Reprod Toxicol* 29: 74-9.

Hemminki E, Gissler M, Merilainen J (1999). Reproductive effects of in utero exposure to estrogen and progestin drugs. *Fertil Steril* 71: 1092-8.

Hensler JG (2003). Regulation of 5-HT1A receptor function in brain following agonist or antidepressant administration. *Life Sci* 72: 1665-82.

Herbst AL, Ulfelder H, Poskanzer DC (1971). Adenocarcinoma of the vagina. Association of maternal stilbestrol therapy with tumor appearance in young women. *N Engl J Med* 284: 878-81.

Hooser SB, Douds DP, DeMerell DG, Hoyer PB, Sipes IG (1994). Long-term ovarian and gonadotropin changes in mice exposed to 4-vinylcyclohexene. *Reprod Toxicol* 8: 315-23.

Hotchkiss AK, Rider CV, Blystone CR et al. (2008). Fifteen years after "Wingspread"--environmental endocrine disrupters and human and wildlife health: where we are today and where we need to go. *Toxicol Sci* 105: 235-59.

Howard AS, Bucelli R, Jett DA, Bruun D, Yang D, Lein PJ (2005). Chlorpyrifos exerts opposing effects on axonal and dendritic growth in primary neuronal cultures. *Toxicol Appl Pharmacol* 207: 112-24.

Hoyer AP, Grandjean P, Jorgensen T, Brock JW, Hartvig HB (1998). Organochlorine exposure and risk of breast cancer. *Lancet* 352: 1816-20.

Hoyer AP, Jorgensen T, Brock JW, Grandjean P (2000). Organochlorine exposure and breast cancer survival. *J Clin Epidemiol* 53: 323-30.

Hrženjak RZ, P.; Virant Celestina, T.; Kožuh Eržen, N.; Kolar, L. (2009). Toxicity of organophosphorus insecticide chlormephos to the earthworm *Eisenia andri* and the terrestrial isopod *Porcellio scaber*. *Acta biologica slovenica* 52: 85-94.

Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A (2005). Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun* 6: 279-84.

International Programme on Chemical Safety, INCHEM (1986). Organophosphorus insecticides: a general introduction 145 pp. Geneva.

<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc63.htm>, 20.12.2011.

Jacobsen PR, Christiansen S, Boberg J, Nellemann C, Hass U (2010). Combined exposure to endocrine disrupting pesticides impairs parturition, causes pup mortality and affects sexual differentiation in rats. *Int J Androl* 33: 434-42.

Jarrell JF, Bodo L, YoungLai EV, Barr RD, O'Connell GJ (1991). The short-term reproductive toxicity of cyclophosphamide in the female rat. *Reprod Toxicol* 5: 481-5.

Kaipia A, Toppari J, Huhtaniemi I, Paranko J (1994). Sex difference in the action of activin-A on cell proliferation of differentiating rat gonad. *Endocrinology* 134: 2165-70.

Kask A, Harro J, von Horsten S, Redrobe JP, Dumont Y, Quirion R (2002). The neurocircuitry and receptor subtypes mediating anxiolytic-like effects of neuropeptide Y. *Neurosci Biobehav Rev* 26: 259-83.

Khan MA, Hansen LG (2003). Ortho-substituted polychlorinated biphenyl (PCB) congeners (95 or 101) decrease pituitary response to thyrotropin releasing hormone. *Toxicol Lett* 144: 173-82.

Kitajewski J, Sassoon D (2000). The emergence of molecular gynecology: homeobox and Wnt genes in the female reproductive tract. *Bioessays* 22: 902-10.

Knobil E, Neill JD (1994). *The Physiology of reproduction*. New York: Raven Press.

Kobayashi T, Shirai M, Sakaue M et al. (2009). Effects of maternal exposure to low doses of DES on testicular steroidogenesis and spermatogenesis in male rat offspring. *J Reprod Dev* 55: 629-37.

Kortenkamp A (2007). Ten years of mixing cocktails: a review of combination effects of endocrine-disrupting chemicals. *Environ Health Perspect* 115 (Suppl 1): 98-105.

Kortenkamp A, Faust M, Scholze M, Backhaus T (2007). Low-level exposure to multiple chemicals: reason for human health concerns? *Environ Health Perspect* 115 (Suppl 1): 106-14.

Krogaes AK, Nafstad I, Skare JU, Farstad W, Hafne AL (1998). In vitro reproductive toxicity of polychlorinated biphenyl congeners 153 and 126. *Reprod Toxicol* 12: 575-80.

Landgraf R (2001). Neuropeptides and anxiety-related behavior. *Endocr J* 48: 517-33.

Levine MJ (2007). The pesticide problem. Pesticides in agriculture. Pesticides in food. In: Levine MJ, ed. *Pesticides: a toxic time bomb in our midst*. 1st ed. Westport, ZDA: Praeger Publishers, 1 - 111.

Livak KJ, Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25: 402-8.

Lucas S, Pau Vall M (2012). Pesticides in the European Union.
http://ec.europa.eu/agriculture/envir/report/en/pest_en/report_en.htm <13.5.2012>

Ma L (2009). Endocrine disruptors in female reproductive tract development and carcinogenesis. *Trends Endocrinol Metab* 20: 357-63.

Majdič G (2010). Endocrine disrupting chemicals and domestic animals *Slo Vet Res* 47: 5 -11.

Marshall Graves JA (2000). Human Y chromosome, sex determination, and spermatogenesis- a feminist view. *Biol Reprod* 63: 667-76.

Mathews E, Braden TD, Williams CS, Williams JW, Bolden-Tiller O, Goyal HO (2009). Mal-development of the penis and loss of fertility in male rats treated neonatally with female contraceptive 17alpha-ethinyl estradiol: a dose-response study and a comparative study with a known estrogenic teratogen diethylstilbestrol. *Toxicol Sci* 112: 331-43.

McClelland K, Bowles J, Koopman P (2012). Male sex determination: insights into molecular mechanisms. *Asian J Androl* 14: 164-71.

McGarvey C, Cates PA, Brooks A et al. (2001). Phytoestrogens and gonadotropin-releasing hormone pulse generator activity and pituitary luteinizing hormone release in the rat. *Endocrinology* 142: 1202-8.

McLachlan JA (2001). Environmental signaling: what embryos and evolution teach us about endocrine disrupting chemicals. *Endocr Rev* 22: 319-41.

Merrington G (2002). Pesticides. In: Merrington G, Winder L, Parkinson R, Redman M, eds. Agricultural pollution : environmental problems and practical solutions. ed. London ; New York: Spon Press, 153-91.

Mittwoch U (2000). Genetics of sex determination: exceptions that prove the rule. *Mol Genet Metab* 71: 405-10.

Mnif W, Hassine AI, Bouaziz A, Bartegi A, Thomas O, Roig B (2011). Effect of endocrine disruptor pesticides: a review. *Int J Environ Res Public Health* 8: 2265-303.

Moller H (1998). Trends in sex-ratio, testicular cancer and male reproductive hazards: are they connected? *APMIS* 106: 232-39.

Moore R, Champeval D, Denat L et al. (2004). Involvement of cadherins 7 and 20 in mouse embryogenesis and melanocyte transformation. *Oncogene* 23: 6726-35.

Moreira EG, Yu X, Robinson JF et al. (2010). Toxicogenomic profiling in maternal and fetal rodent brains following gestational exposure to chlorpyrifos. *Toxicol Appl Pharmacol* 245: 310-25.

Narayana K, Prashanthi N, Nayanatara A, Bairy LK, D'Souza UJ (2006a). An organophosphate insecticide methyl parathion (o- o- dimethyl o-4-nitrophenyl phosphorothioate) induces cytotoxic damage and tubular atrophy in the testis despite elevated testosterone level in the rat. *J Toxicol Sci* 31: 177-89.

Narayana K, Prashanthi N, Nayanatara A, Kumar HH, Abhilash K, Bairy KL (2005). Effects of methyl parathion (o,o-dimethyl o-4-nitrophenyl phosphorothioate) on rat sperm morphology and sperm count, but not fertility, are associated with decreased ascorbic acid level in the testis. *Mutat Res* 588: 28-34.

Narayana K, Prashanthi N, Nayanatara A et al. (2006b). A broad-spectrum organophosphate pesticide O,O-dimethyl O-4-nitrophenyl phosphorothioate (methyl parathion) adversely affects the structure and function of male accessory reproductive organs in the rat. *Environ Toxicol Pharmacol* 22: 315-24.

NCBI (2012a). Cdh7 cadherin 7, type 2 [*Mus musculus*].
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?term=NM_172853.2 <24.2.2012>

NCBI (2012b). Gapdh glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [*Mus musculus*].
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?term=NM_008084.2 <24.2.2012>

NCBI (2012c). Htr1a 5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1A [*Mus musculus*]. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?term=NM_008308.4 <24.2.2012>

Newbold RR (2004). Lessons learned from perinatal exposure to diethylstilbestrol. *Toxicol Appl Pharmacol* 199: 142-50.

Norris DO (2007). In: Norris DO, ed. *Vertebrate endocrinology*. 4th ed. Amsterdam ; London: Elsevier Academic Press, 323 - 32.

Nussey S, Whitehead SA. (2001). The gonad. In: *Endocrinology: An Integrated Approach*. Oxford: BIOS Scientific Publishers Limited. 10.11.2011.

Okahashi N, Sano M, Miyata K et al. (2005). Lack of evidence for endocrine disrupting effects in rats exposed to fenitrothion in utero and from weaning to maturation. *Toxicology* 206: 17-31.

Okamura A, Kamijima M, Shibata E et al. (2005). A comprehensive evaluation of the testicular toxicity of dichlorvos in Wistar rats. *Toxicology* 213: 129-37.

Oral B, Guney M, Demirin H et al. (2006). Endometrial damage and apoptosis in rats induced by dichlorvos and ameliorating effect of antioxidant vitamins E and C. *Reprod Toxicol* 22: 783-90.

Palanza P, Gioiosa L, vom Saal FS, Parmigiani S (2008). Effects of developmental exposure to bisphenol A on brain and behavior in mice. *Environ Res* 108: 150-7.

Palanza P, Morellini F, Parmigiani S, vom Saal FS (1999). Prenatal exposure to endocrine disrupting chemicals: effects on behavioral development. *Neurosci Biobehav Rev* 23: 1011-27.

Palanza P, Morellini F, Parmigiani S, vom Saal FS (2002). Ethological methods to study the effects of maternal exposure to estrogenic endocrine disruptors: a study with methoxychlor. *Neurotoxicol Teratol* 24: 55-69.

Panzica GC, Bo E, Martini MA et al. (2011). Neuropeptides and enzymes are targets for the action of endocrine disrupting chemicals in the vertebrate brain. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 14: 449-72.

Panzica GC, Melcangi RC (2008). The endocrine nervous system: source and target for neuroactive steroids. *Brain Res Rev* 57: 271-6.

Panzica GC, Viglietti-Panzica C, Mura E et al. (2007). Effects of xenoestrogens on the differentiation of behaviorally-relevant neural circuits. *Front Neuroendocrinol* 28: 179-200.

Parent AS, Naveau E, Gerard A, Bourguignon JP, Westbrook GL (2011). Early developmental actions of endocrine disruptors on the hypothalamus, hippocampus, and cerebral cortex. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 14: 328-45.

Park SY, Jameson JL (2005). Minireview: transcriptional regulation of gonadal development and differentiation. *Endocrinology* 146: 1035-42.

Patisaul HB, Fortino AE, Polston EK (2007). Differential disruption of nuclear volume and neuronal phenotype in the preoptic area by neonatal exposure to genistein and bisphenol-A. *Neurotoxicology* 28: 1-12.

Paulozzi LJ (1999). International trends in rates of hypospadias and cryptorchidism. *Environ Health Perspect* 107: 297-302.

Paxinos G, Franklin KBJ (2001). The mouse brain in stereotaxic coordinates. San Diego: Academic Press.

Perobelli JE, Martinez MF, da Silva Franchi CA, Fernandez CD, de Camargo JL, Kempinas Wde G (2010). Decreased sperm motility in rats orally exposed to single or mixed pesticides. *J Toxicol Environ Health A* 73: 991-1002.

Phillips KP, Tanphaichitr N (2008). Human exposure to endocrine disruptors and semen quality. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 11: 188-220.

Pillon D, Cadiou V, Angulo L, Duittoz AH (2012). Maternal exposure to 17-alpha-ethinylestradiol alters embryonic development of GnRH-1 neurons in mouse. *Brain Res* 1433: 29-37.

Pocar P, Brevini TA, Fischer B, Gandolfi F (2003). The impact of endocrine disruptors on oocyte competence. *Reproduction* 125: 313-25.

Pretty JN, Hine R, Kishi M (2005). Pesticide Use and the Environment. The Health Impacts of Pesticides: What Do We Now Know? In: Norris DO, ed. The pesticide detox: towards a more sustainable agriculture. ed. London; Sterling, VA: Earthscan, 1 - 38.

Qiao D, Seidler FJ, Tate CA, Cousins MM, Slotkin TA (2003). Fetal chlorpyrifos exposure: adverse effects on brain cell development and cholinergic biomarkers

emerge postnatally and continue into adolescence and adulthood. *Environ Health Perspect* 111: 536-44.

Rakonczay Z, Papp H (2001). Effects of chronic metrifonate treatment on cholinergic enzymes and the blood-brain barrier. *Neurochem Int* 39: 19-24.

Rasier G, Toppari J, Parent AS, Bourguignon JP (2006). Female sexual maturation and reproduction after prepubertal exposure to estrogens and endocrine disrupting chemicals: a review of rodent and human data. *Mol Cell Endocrinol* 254-255: 187-201.

Rauh VA, Garfinkel R, Perera FP et al. (2006). Impact of prenatal chlorpyrifos exposure on neurodevelopment in the first 3 years of life among inner-city children. *Pediatrics*. 118: e1845-59. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17116700>. 15.12.2011.

Ray DE, Richards PG (2001). The potential for toxic effects of chronic, low-dose exposure to organophosphates. *Toxicol Lett* 120: 343-51.

Recio R, Ocampo-Gomez G, Moran-Martinez J et al. (2005). Pesticide exposure alters follicle-stimulating hormone levels in Mexican agricultural workers. *Environ Health Perspect* 113: 1160-3.

Rey R, Lukas-Croisier C, Lasala C, Bedecarras P (2003). AMH/MIS: what we know already about the gene, the protein and its regulation. *Mol Cell Endocrinol* 211: 21-31.

Ricceri L, Venerosi A, Capone F et al. (2006). Developmental neurotoxicity of organophosphorous pesticides: fetal and neonatal exposure to chlorpyrifos alters sex-specific behaviors at adulthood in mice. *Toxicol Sci* 93: 105-13.

Rivas M, Naranjo JR (2007). Thyroid hormones, learning and memory. *Genes Brain Behav* 6 (Suppl 1): 40-4.

Roser JF (2008). Regulation of testicular function in the stallion: an intricate network of endocrine, paracrine and autocrine systems. *Anim Reprod Sci* 107: 179-96.

Ryan BC, Hotchkiss AK, Crofton KM, Gray LE, Jr. (2010). In utero and lactational exposure to bisphenol A, in contrast to ethinyl estradiol, does not alter sexually dimorphic behavior, puberty, fertility, and anatomy of female LE rats. *Toxicol Sci* 114: 133-48.

Safe SH (1995). Environmental and dietary estrogens and human health: is there a problem? *Environ Health Perspect* 103: 346-51.

Sarkar R, Mohanakumar KP, Chowdhury M (2000). Effects of an organophosphate pesticide, quinalphos, on the hypothalamo-pituitary-gonadal axis in adult male rats. *J Reprod Fertil* 118: 29-38.

Schantz SL, Widholm JJ (2001). Cognitive effects of endocrine-disrupting chemicals in animals. *Environ Health Perspect* 109: 1197-206.

Schneider P, Ho YJ, Spanagel R, Pawlak CR (2011). A novel elevated plus-maze procedure to avoid the one-trial tolerance problem. *Front Behav Neurosci* 5: 43.

Sharpe RM (1994). Regulation of spermatogenesis. *Physiol Reprod* 1: 1370-73.

Sharpe RM (2006). Pathways of endocrine disruption during male sexual differentiation and masculinization. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 20: 91-110.

Sharpe RM (2010). Is it time to end concerns over the estrogenic effects of bisphenol A? *Toxicol Sci* 114: 1-4.

Shinomiya N, Shinomiya M (2003). Dichlorodiphenyltrichloroethane suppresses neurite outgrowth and induces apoptosis in PC12 pheochromocytoma cells. *Toxicol Lett* 137: 175-83.

Sikka SC, Wang R (2008). Endocrine disruptors and estrogenic effects on male reproductive axis. *Asian J Androl* 10: 134-45.

Silbernagl S, Despopoulos A (2008). *Color Atlas of Physiology*. In: 6th ed. Stuttgart, New York: Thieme, 78-87.

Simon R, Lam A, Li MC, Ngan M, Menenzes S, Zhao Y (2007). Analysis of gene expression data using BRB-ArrayTools. *Cancer Inform* 3: 11-7.

Sinha C, Shukla GS (2003). Species variation in pesticide-induced blood-brain barrier dysfunction. *Hum Exp Toxicol* 22: 647-52.

Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E, Main KM (2001). Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. *Hum Reprod* 16: 972-8.

Slotkin TA, Levin ED, Seidler FJ (2006a). Comparative developmental neurotoxicity of organophosphate insecticides: effects on brain development are separable from systemic toxicity. *Environ Health Perspect* 114: 746-51.

Slotkin TA, Seidler FJ (2007). Comparative developmental neurotoxicity of organophosphates in vivo: transcriptional responses of pathways for brain cell development, cell signaling, cytotoxicity and neurotransmitter systems. *Brain Res Bull* 72: 232-74.

Slotkin TA, Tate CA, Ryde IT, Levin ED, Seidler FJ (2006b). Organophosphate insecticides target the serotonergic system in developing rat brain regions: disparate effects of diazinon and parathion at doses spanning the threshold for cholinesterase inhibition. *Environ Health Perspect* 114: 1542-6.

Song X, Pope C, Murthy R, Shaikh J, Lal B, Bressler JP (2004). Interactive effects of paraoxon and pyridostigmine on blood-brain barrier integrity and cholinergic toxicity. *Toxicol Sci* 78: 241-7.

Stoker TE, Guidici DL, Laws SC, Cooper RL (2002). The effects of atrazine metabolites on puberty and thyroid function in the male Wistar rat. *Toxicol Sci* 67: 198-206.

Storgaard L, Bonde JP, Ernst E, Andersen CY, Kyvik KO, Olsen J (2002). Effect of prenatal exposure to oestrogen on quality of semen: comparison of twins and singleton brothers. *BMJ* 325: 252-3.

Storvik M, Huuskonen P, Kyllonen T et al. (2011). Aflatoxin B1--a potential endocrine disruptor--up-regulates CYP19A1 in JEG-3 cells. *Toxicol Lett* 202: 161-7.

Swedenborg E, Pongratz I, Gustafsson JA (2010). Endocrine disruptors targeting ERbeta function. *Int J Androl* 33: 288-97.

Swerdlow AJ, De Stavola BL, Swanwick MA, Maconochie NE (1997). Risks of breast and testicular cancers in young adult twins in England and Wales: evidence on prenatal and genetic aetiology. *Lancet* 350: 1723-8.

Tait S, Ricceri L, Venerosi A, Maranghi F, Mantovani A, Calamandrei G (2009). Long-term effects on hypothalamic neuropeptides after developmental exposure to chlorpyrifos in mice. *Environ Health Perspect* 117: 112-6.

Takahama K, Shirasaki T (2001). [Endocrine disruptors and brain estrogen receptors: the current state of behavioral, neurochemical, and molecular biological studies]. *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi* 21: 103-11.

Takahashi M, Osumi N (2008). Expression study of cadherin7 and cadherin20 in the embryonic and adult rat central nervous system. *BMC Dev Biol.* 8: e87 (19).
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18801203>. 26.2.2012.

Thayer KA, Ruhlen RL, Howdeshell KL et al. (2001). Altered prostate growth and daily sperm production in male mice exposed prenatally to subclinical doses of 17alpha-ethinyl oestradiol. *Hum Reprod* 16: 988-96.

Thomas HV, Murphy MF, Key TJ, Fentiman IS, Allen DS, Kinlen LJ (1998). Pregnancy and menstrual hormone levels in mothers of twins compared to mothers of singletons. *Ann Hum Biol* 25: 69-75.

Titus-Ernstoff L, Troisi R, Hatch EE et al. (2006). Menstrual and reproductive characteristics of women whose mothers were exposed in utero to diethylstilbestrol (DES). *Int J Epidemiol* 35: 862-8.

Tobet SA, Fox TO (1992). Sex differences in neural morphology influenced hormonally throughout life. In: Gerall AA et al., ed. *Sexual differentiation: A lifespan approached*. ed. New York: Plenum Press, 41-83.

Travison TG, Araujo AB, O'Donnell AB, Kupelian V, McKinlay JB (2007). A population-level decline in serum testosterone levels in American men. *J Clin Endocrinol Metab* 92: 196-202.

Ueno M (2007). Molecular anatomy of the brain endothelial barrier: an overview of the distributional features. *Curr Med Chem* 14: 1199-206.

Uzumcu M, Kuhn PE, Marano JE, Armenti AE, Passantino L (2006). Early postnatal methoxychlor exposure inhibits folliculogenesis and stimulates anti-Mullerian hormone production in the rat ovary. *J Endocrinol* 191: 549-58.

Uzumcu M, Zachow R (2007). Developmental exposure to environmental endocrine disruptors: consequences within the ovary and on female reproductive function. *Reprod Toxicol* 23: 337-52.

Vilain E, McCabe ER (1998). Mammalian sex determination: from gonads to brain. *Mol Genet Metab* 65: 74-84.

Vinggaard AM, Hnida C, Breinholt V, Larsen JC (2000). Screening of selected pesticides for inhibition of CYP19 aromatase activity in vitro. *Toxicol In Vitro* 14: 227-34.

Wagner MS, Wajner SM, Maia AL (2008). The role of thyroid hormone in testicular development and function. *J Endocrinol* 199: 351-65.

Ward EM, Schulte P, Grajewski B et al. (2000). Serum organochlorine levels and breast cancer: a nested case-control study of Norwegian women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 9: 1357-67.

Weinbroum AA (2004). Pathophysiological and clinical aspects of combat anticholinesterase poisoning. *Br Med Bull* 72: 119-33.

Wilcox AJ, Baird DD, Weinberg CR, Hornsby PP, Herbst AL (1995). Fertility in men exposed prenatally to diethylstilbestrol. *N Engl J Med* 332: 1411-6.

Wilson CA, Davies DC (2007). The control of sexual differentiation of the reproductive system and brain. *Reproduction* 133: 331-59.

Wolff MS, Toniolo PG, Lee EW, Rivera M, Dubin N (1993). Blood levels of organochlorine residues and risk of breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 85: 648-52.

Wong ML, Medrano JF (2005). Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques* 39: 75-85.

Woodruff TJ, Carlson A, Schwartz JM, Giudice LC (2008). Proceedings of the Summit on Environmental Challenges to Reproductive Health and Fertility: executive summary. *Fertil Steril* 89: e1-e20.

Woods HF. (1999). Working group on organophosphates. Organophosphates. Committee on Toxicology of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment. 104. <http://cot.food.gov.uk/pdfs/opchap.pdf>. 10.5.2011.

Wu X, Wan S, Lee MM (2007). Key factors in the regulation of fetal and postnatal Leydig cell development. *J Cell Physiol* 213: 429-33.

Yucra S, Gasco M, Rubio J, Gonzales GF (2008). Semen quality in Peruvian pesticide applicators: association between urinary organophosphate metabolites and semen parameters. *Environ Health*. 7: e59 (10). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19014632>. 16.8.2011.

Zama AM, Uzumcu M (2010). Epigenetic effects of endocrine-disrupting chemicals on female reproduction: an ovarian perspective. *Front Neuroendocrinol* 31: 420-39.

Zoeller RT, Bansal R, Parris C (2005). Bisphenol-A, an environmental contaminant that acts as a thyroid hormone receptor antagonist in vitro, increases serum thyroxine, and alters RC3/neurogranin expression in the developing rat brain. *Endocrinology* 146: 607-12.

Žužek M, Frangeš P, Juntos P et al. (2009). Vpliv klormefosa pri subkronični izpostavitvi miši na patomorfologijo, apoptozo in citoskelet v jetrih, ledvici in vranici. In: Kožuh Eržen N, ed. Proučevanje škodljivih učinkov in mehanizmov dolgotrajnega delovanja organofosfornih snovi na ljudi, živali in okolje in načrtovanje ustreznih protiukrepov. ed. Domžale: Oikos d.o.o., 65 - 77.