

**Danuta Maślińska**

**WYBRANE ASPEKTY METABOLIZMU I STRUKTURY  
ROZWIJAJĄCEGO SIĘ OŚRODKOWEGO UKŁADU  
NERWOWEGO W ZATRUCIU ZWIĄZKIEM  
FOSFOROORGANICZNYM**

**Rozprawa habilitacyjna**

**Instytut - Centrum Medycyny  
Doświadczalnej i Klinicznej  
Polskiej Akademii Nauk**

---

**WARSZAWA 1987**

<http://rcin.org.pl>





75  
119





119  
25  
H3159

Danuta Maślińska

WYBRANE ASPEKTY METABOLIZMU I STRUKTURY  
ROZWIJAJACEGO SIĘ OSRODKOWEGO UKŁADU NERWOWEGO  
W ZATRUCIU ZWIĄZKIEM FOSFOROORGANICZNYM

Rozprawa habilitacyjna

Instytut Centrum Medycyny  
Doświadczalnej i Klinicznej  
Polskiej Akademii Nauk

Warszawa 1987



Mam zaszczyt złożyć najserdeczniejsze  
podziękowania Pani Profesor  
dr hab. med. Marii Dąbbskiej  
za kierowanie moim rozwojem naukowym,  
inspirowanie do pracy badawczej  
oraz życzliwą pomoc i opiekę.

Panu Profesorowi  
dr hab. med. Mirosławowi Mossakowskiemu  
dziękuję za wiele cennych uwag poczynionych  
w trakcie przygotowywania niniejszej pracy.

Autorka



## SPIS TREŚCI

	Str.
WSTĘP . . . . .	1
Budowa chemiczna związków fosforoorganicznych . . . . .	4
Metabolizm dichlorfosu . . . . .	5
Związki fosforoorganiczne jako inhibitory cholinesteraz . . . . .	8
Odnowa aktywności acetylocholinoesterazy w mózgu po zatruciu związkami fosforoorganicznymi . . . . .	12
Zatrucia związkami fosforoorganicznymi . . . . .	15
Uszkodzenia tkanki nerwowej po zatruciach związkami fosforoorganicznymi . . . . .	17
Udział serotoniny /5-hydroksytryptaminy, 5-HT/ w rozwoju mózgu . . . . .	23
Związki fosforoorganiczne a rozwój mózgu . . . . .	26
CEL PRACY . . . . .	30
Plan badań . . . . .	31
MATERIAŁ I METODY . . . . .	32
Metody . . . . .	35
Badania biochemiczne . . . . .	35
Aktywność acetylocholinoesterazy . . . . .	35
Aktywność oksydazy monoaminowej . . . . .	36
Hydroksylaza tryptofanowa . . . . .	37
Stężenie białka . . . . .	38



Stężenie tryptofanu . . . . .	39
Stężenie serotoniny i kwasu 5-hydroksyindoloocetowego . . . . .	39
Obrót serotoniny . . . . .	41
Badania histochemiczne . . . . .	43
Aktywność acetylocholinoesterazy . . . . .	43
Badania morfologiczne . . . . .	44
WYNIKI . . . . .	46
Aktywność acetylocholinoesterazy . . . . .	48
Badania biochemiczne . . . . .	48
Badania histochemiczne . . . . .	52
Metabolizm serotoniny . . . . .	55
Stężenie tryptofanu . . . . .	55
Aktywność hydroksylazy tryptofanowej . . . . .	58
Aktywność oksydazy monoaminowej . . . . .	61
Serotonina . . . . .	64
Kwas 5-hydroksyindoloocetowy . . . . .	67
Obrót serotoniny . . . . .	67
Badania morfologiczne . . . . .	71
Neuropil . . . . .	71
Perykariony . . . . .	74
Naczynia krwionośne . . . . .	75
DYSKUSJA . . . . .	76
WNIOSKI . . . . .	104
STRESZCZENIE . . . . .	105
PIŚMIENNICTWO . . . . .	112



## WSTĘP

Pierwszy związek fosforoorganiczny /FO/ - czteroetylopirofosforan zsyntetyzowany został w roku 1854 /Clermont 1854 wg. Karczmar 1970/ i już wkrótce okazało się, że substancja ta oraz jej pochodne są silnymi truciznami biologicznymi. Najbardziej toksyczne związki znalazły zastosowanie jako broń chemiczna i stąd rozkwit badań nad ich syntezą przypada na okres I i II Wojny Światowej. W laboratoriach niemieckich powstały w tym czasie soman, sarin i tabun, a w Ameryce i Angli wyprodukowano dwuizopropylofosforofluoran /diisopropylphosphorofluoridate, DFP/ /Koelle 1975/.

Po zakończeniu działań wojennych związki FO wykorzystano jako pestycydy do zwalczania szkodników roślinnych i zwierzęcych. Wprowadzenie pestycydów do rolnictwa i medycyny weterynaryjnej szybko przyniosło wymierne korzyści w postaci zwiększonej produkcji artykułów żywnościowych.

Dzięki pestycydom opanowano wiele groźnych chorób /żółta febra, malaria, tyfus, czarna ospa/ /Englund 1972/ oraz podniesiono stan sanitarny pomieszczeń mieszkalnych i hodowlanych. Okazało się jednak, że powszechne stosowanie związków FO prowadzi do niebezpiecznego skażenia środowiska i zagraża zdrowiu ludzi i zwierząt.



Według Matsumara i Madhukara /1985/ styczność człowieka z pestycydami może mieć charakter pośredni i bezpośredni /schemat 1/. Do bezpośredniego kontaktu dochodzi przy: produkcji, dystrybucji i użytkowaniu pestycydów oraz na skutek nieszczęśliwych wypadków /masowych zatruc, samobójstw/.

Konsekwencją takich kontaktów są zatrucia ostre, charakteryzujące się szeregiem typowych objawów silnego pobudzenia układu cholinergicznego. Chorzy zdają sobie zwykle sprawę z przyczyn swych dolegliwości, co pozwala na odizolowanie ich od źródła zatrucia i szybkie zastosowanie leczenia.

Przyczyną pośrednich kontaktów człowieka z pestycydami jest skażone środowisko /woda, powietrze, produkty żywnościowe/. W takich wypadkach do organizmu przenikają systematycznie niewielkie dawki pestycydów. Dochodzi do zatruc przewlekłych o nietypowym obrazie klinicznym. Wywiad rzadko bywa pomocny w ustalaniu diagnozy. Leczenie objawowe nie przynosi pożądanych efektów, tym bardziej że pestycydy obecne w otoczeniu nie przestają działać na chory organizm.

Od dawna sugerowano, że szereg chorób związanych z dysfunkcją ośrodkowego układu nerwowego może być następstwem stosowania dużych ilości środków ochrony roślin na pewnych terenach rolniczych /Barnes 1961, Bidstrup 1961, Gershon, Show 1961, Golz 1961, Durham 1965/.

Mimo ścisłych przepisów określających sposób użytkowania pestycydów /Hayes 1975/, doniesienia o zatruciach tymi substancjami nie należą do rzadkości /Jędrzejowska i wsp. 1980,



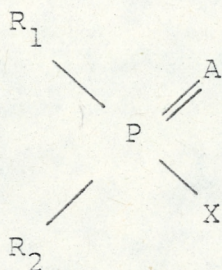




Senanayake, Jeyaratnam 1981, Senanayake, Johnson 1981/ i uzasadniają potrzebę systematycznego pogłębiania wiedzy o mechanizmach działania związków FO na organizm.

### Budowa chemiczna związków fosforoorganicznych

Budowa chemiczna związków FO oparta jest na następującym schemacie /Schrader, 1952/:



Możliwość podstawienia w poszczególnych pozycjach tego schematu różnych pierwiastków lub grup chemicznych pozwoliła na uzyskanie bardzo licznej /ponad 50 tys./ grupy związków /Chedwick, 1963/. Wspólną ich cechą jest zdolność blokowania centrum aktywnego cholinoesteraz - enzymów ważnych dla prawidłowego funkcjonowania większości żywych organizmów /Taylor 1980/.

Pozycja A w cząsteczce wysycona jest <sup>np.:</sup> siarką, selenem lub tlenem ale tylko tlen obecny w tym miejscu zapewnia danej substancji aktywność biologiczną /Usdin 1970/. Jeżeli w pozycji A znajduje się selen lub siarka związek nabywa właściwości inhibitora enzymatycznego dopiero po przejściu przez proces bio-transformacji /Neal 1966, 1967/.



$R_1$  i  $R_2$  mogą być podstawione różnymi grupami chemicznymi: alkilowymi, aryłowymi, amidowymi itp.

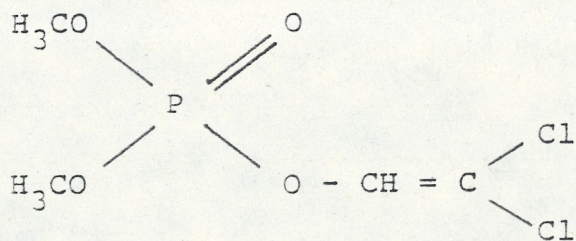
W pozycji X znajduje się grupa czynna, która wchodzi w bezpośredni kontakt z centrum aktywnym enzymu /Usdin 1970/. Rodzaj podstawnika w tym miejscu cząsteczki posłużył za podstawę do wyodrębnienia 5 grup związków FO. Oznaczono je dużymi literami alfabetu od A do E /Holmstedt 1959, 1963, Usdin 1970/. Najbardziej toksyczne substancje jak tabun, sarin, soman, DFP znalazły się w grupie A, natomiast dichlorfos - związek stosowany w obecnych badaniach zakwalifikowano do grupy B /Hobbiger 1976/.

#### Metabolizm dichlorfosu

Metabolizmowi związków FO poświęcono wiele uwagi, a dichlorfos był używany często jako substancja modelowa. Dlatego wewnątrzustrojowe przemiany tego pestycydu poznano z wieloma szczegółami /Hodgson, Casida 1962, Hallingsworth 1969, Burton 1971, Dicowsky, Morello 1971, Loeffler i wsp. 1971, Pagi i wsp. 1971, Schultz i wsp. 1971/.

Cząsteczka dichlorfosu  $C_4H_7Cl_2O_4P$  zbudowana według schematu wspólnego dla wszystkich związków FO jest fosforanem O-/2,2-dwuchlorowinylo/-O,O-dwumetylowym /O,O-dimetylo O-/2,2-dichlorovinyl/phosphate, DDVP/ /Stecher 1968/.





Wzór strukturalny dichlorofosu

Obecność tlenu w pozycji A /schemat str. 4/ zapewnia związkowi aktywność biologiczną, bez konieczności wstępnej biotransformacji. Grupą "czynną" w cząsteczce, która łączy się z centrum aktywnym acetylocholinoesterazy /AChE/ jest reszta dwuchlorowinylova. Grupy metylowe wysycają pozycje  $R_1$  i  $R_2$ . Szlak przemian metabolicznych dichlorofosu jest niezależny od drogi wziewna, doustna, dożylna/ wprowadzenia tej substancji do ustroju /Hutson i wsp. 1971, Loeffler i wsp. 1971, Page i wsp. 1972/. Rozpad cząsteczki DDVP rozpoczyna się zwykle zerwaniem wiązania między fosforem a resztą dwuchlorowinylova z udziałem enzymu obecnego w wątrobie i surowicy /Hodgson, Casida 1962, Potter i wsp. 1973/. Może nastąpić również hydroliza wiązania między fosforem a resztą metylową prowadząc do powstania monometylodichlorofosu /Hodgson, Casida 1962, Potter i wsp. 1973/.

Sądzone, że pierwszy typ przemian charakterystyczny jest dla człowieka i wielu gatunków ssaków /Hutson i wsp. 1971, Hutson, Hoadley 1972, Page i wsp. 1972/, natomiast drugi występuje głównie u gryzoni /Hallingsworth 1969, Hutson,



Hoadley 1972/. Z badań Hodgsona i Casida /1962/ wynika jednak, że o przewadze danego toru przemian decyduje stężenie dichlorfosu w ustroju. Przy niskich stężeniach katabolizm zaczyna się rozpadem wiązania między fosforem a resztą dwuchlorowinyłową, natomiast wysokie stężenia sprzyjają demetylacji. Jeżeli katabolizm DDVP rozpoczyna się demetylacją to następuje po niej rozpad wiązania między fosforem a winylem i powstaje monometylofosforan oraz alkohol dwuchlorowinyłowy. Dalsza demetylacja monometylofosforanu prowadzi do nieorganicznego fosforanu. Natomiast alkohol dwuchlorowinyłowy przekształcony zostaje do aldehydu dwuchlorooctowego, a ten ulega redukcji do dwuchloroetanolu lub kwasu dwuchlorooctowego /Potter i wsp. 1973/. Dwuchloroetanol sprzężony z kwasem glukuronowym wydalany jest z moczem lub po odłączeniu atomów chloru pod postacią dwutlenku węgla - z powietrzem wydechowym /Hutson, Hoadley 1972/. Metabolity dichlorfosu /znakowane pierwiastkami radioaktywnymi:  $^{14}\text{C}$ ,  $^{37}\text{Cl}$ ,  $^{32}\text{P}$  w różnych miejscach cząsteczki/ nie kumulują się w ustroju /Burton 1971, Hutson i wsp. 1971, Hutson, Hoadley 1972, Potter i wsp. 1973/. Obserwowana radioaktywność tkanek jest konsekwencją wbudowywania się znakowanych fragmentów cząsteczki do wielu endogennie syntetyzowanych związków takich jak: glicyna, seryna, glukoza, kwasy tłuszczowe, cholesterol, kwasy nukleinowe itp. /Hutson, Hoadley 1972, Page i wsp. 1972/. Produkty rozpadu dichlorfosu nie posiadają właściwości inhibitorów enzymatycznych i są stosunkowo mało toksyczne, jeżeli nie osiągają



niebezpiecznych stężeń w organizmie /Hutson, Hoadley 1972, Page i wsp. 1972/. Do zaburzeń obserwowanych w zatruciach, dochodzi więc głównie pod wpływem działania niezmięnionej cząsteczki dichlorfosu a nie jego metabolitów.

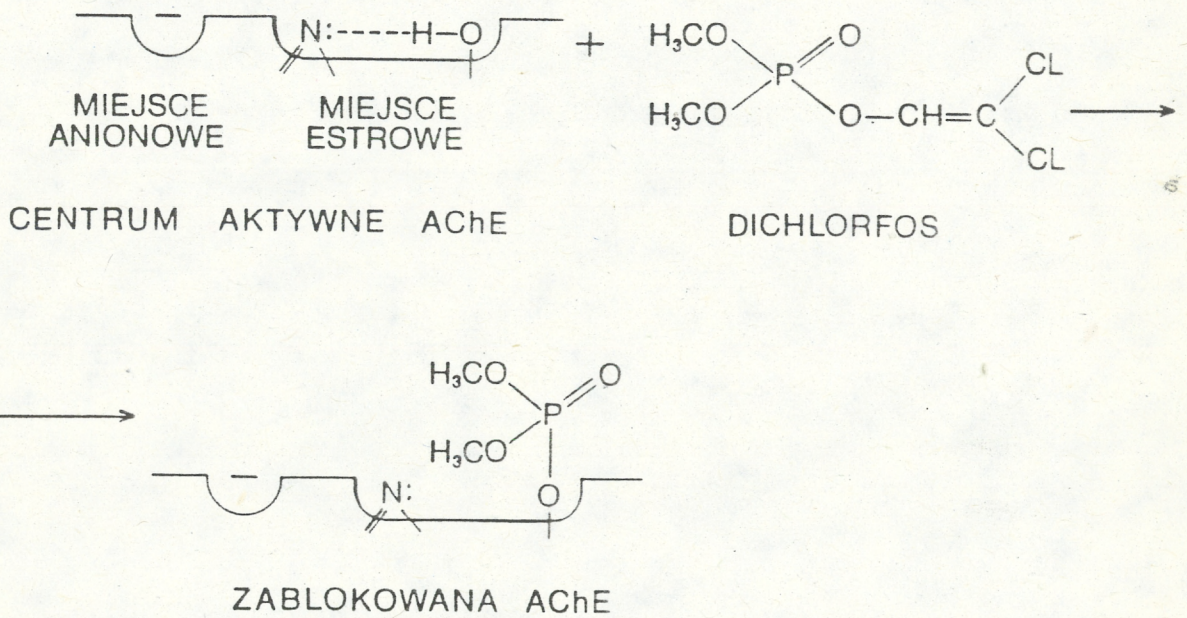
#### Związki fosforoorganiczne jako inhibitory cholinesteraz

Podstawowym mechanizmem biologicznego działania związków FO jest blokowanie aktywności cholinesteraz /Eto 1974/ /schemat 2/. Substancje te współzawodniczą z endogennym substratem o centrum aktywne enzymu /O'Brien 1967/. Związki FO blokują enzym w sposób nieodwracalny, to znaczy powstający kompleks enzym-inhibitor nie ulega samoistnej hydrolizie w warunkach środowiska wewnątrzustrojowego. Ścisłej mówiąc proces ten zachodzi tak wolno, że nie ma praktycznego znaczenia dla odnowy aktywności enzymu /Hovanec, Lieske 1972, Hovanec i wsp. 1977, Lieske i wsp. 1980/ /schemat 3/. Rozpad kompleksu przyspieszają substancje o określonej budowie chemicznej noszące nazwę reaktywatorów /Aldridge, Reiner 1972/ /schemat 4/. Reaktywatory są pochodnymi hydroksylaminy /Wilson, Ginsburg 1955/ o budowie chemicznej oksymów. W obecności oksymów proces hydrolizy kompleksu enzym-inhibitor przebiega znacznie szybciej /Hobbinger, Vojvodic 1966/. Reaktywatory nie są substancjami obojętnymi dla organizmu. W dużych dawkach wywołują objawy zatrucia /tachykardię, zawroty głowy, nudności, podwójne widzenie/ /Elliott, Bokums 1968, Koelle 1975/.



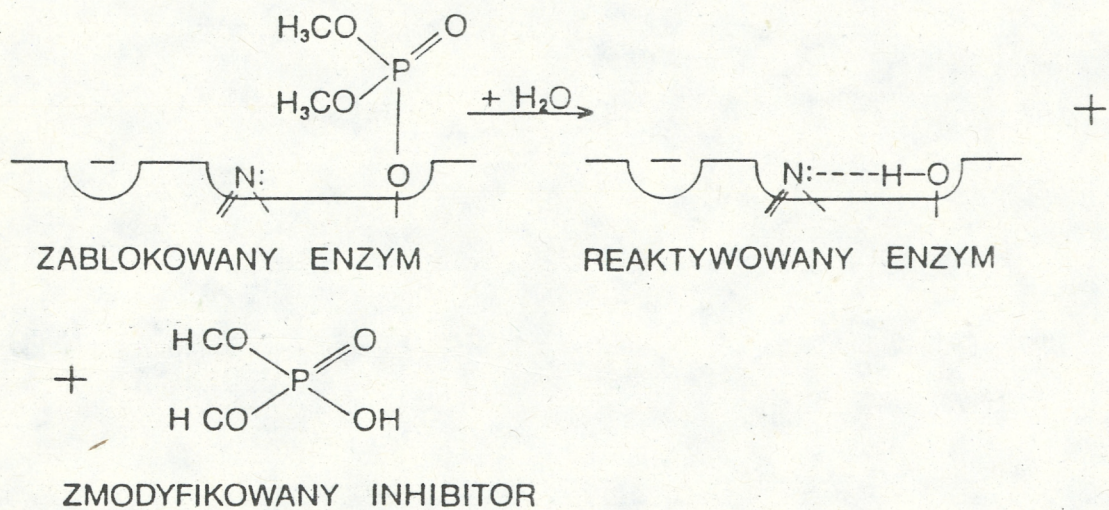
SCHEMAT 2

### MECHANIZM BLOKOWANIA AChE PRZEZ DICHLORFOS



SCHEMAT 3

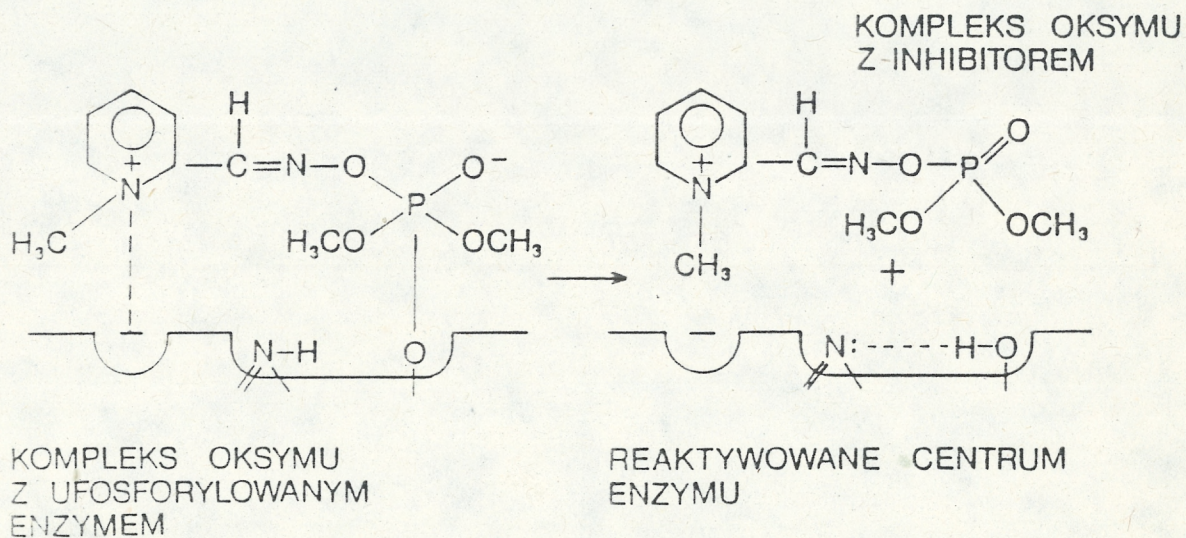
### MECHANIZM SAMOISTNEJ REAKTYWACJI AChE





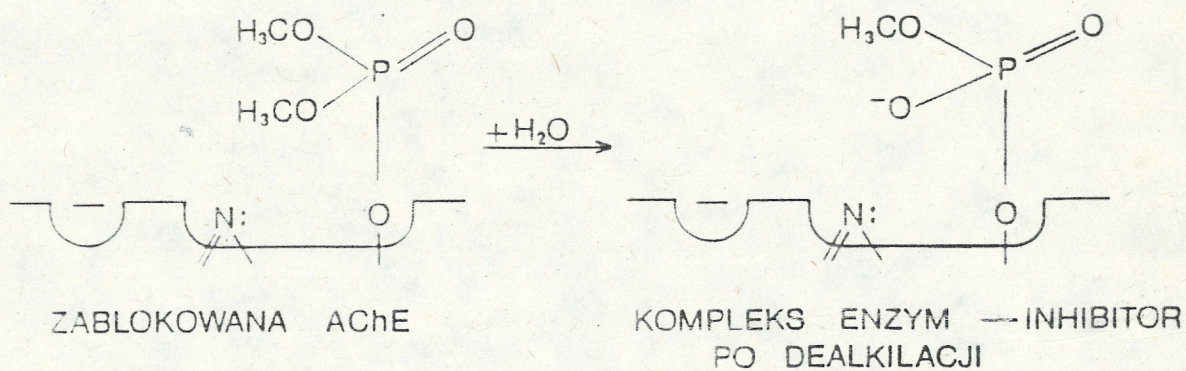
SCHEMAT 4

### MECHANIZM REAKTYWACJI Z UDZIAŁEM OKSYMU



SCHEMAT 5

### MECHANIZM DEALKILACJI





Efektywność działania reaktywatorów ograniczona jest przez szereg czynników. Najważniejszym z nich jest tzw. starzenie się kompleksu enzym-inhibitor /Horris i wsp. 1966, Smith, Usdin 1966, Schoene i wsp. 1980/. Proces ten polega na odłączeniu od ufosforylowanego enzymu jednej z grup chemicznych należących do cząsteczki inhibitora /Johnson 1982/ /schemat 5/. Szybkość tej reakcji zależy od struktury chemicznej inhibitora, pH środowiska oraz budowy centrum aktywnego enzymu. Proces starzenia się jest charakterystyczny dla tych związków FO, które w pozycjach  $R_1$  i  $R_2$  posiadają określone grupy chemiczne /Lotti i wsp. 1984/, głównie rodniki alkilowe. Im więcej takich rodników zawiera cząsteczka inhibitorowa tym łatwiej i szybciej zachodzi proces starzenia się /Sun i wsp. 1979/ czyli dealkilacji. Sun i wsp. /1979/ uważają, że dealkilacja jest procesem enzymatycznym, katalizowanym przez samą acetylocholinoesterazę, dzięki obecności grupy anionowej w centrum aktywnym enzymu /Fleischer, Harris 1965/. Prawdopodobnie reakcja ta może zachodzić również samoistnie /Sun i wsp. 1979/. Aktualnie poszukuje się sposobów opóźnienia procesu dealkilacji w zatrutym organizmie aby stworzyć warunki dla skutecznego działania reaktywatorów /Crone 1974, Sterri 1977/.



Odnowa aktywności acetylocholinoesterazy w mózgu  
po zatruciu związkami fosforoorganicznymi

Acetylocholinoesteraza /EC.3.1.1.7/ jest enzymem polimorficznym. Występuje w tkankach w wielu formach molekularnych. Formy te różnią się od siebie liczbą podjednostek katalitycznych i kształtem cząsteczki /Massoulie, Bon 1982, Marsh i wsp. 1984, Massoulie i wsp. 1984, Muller i wsp. 1985/. Pod względem kształtu rozróżnia się postać globularną i asymetryczną. Postać globularna występuje w tkankach jako izoenzym jedno-, dwu- i cztero-podjednostkowy / $G_1$ ,  $G_2$ ,  $G_4$ / /Bon, Massoulie 1976, Rosenberry, Richardson 1977, Dudai, Silman 1979/. Formy asymetryczne AChE / $A_4$ ,  $A_8$  i  $A_{12}$ / zbudowane są z różnych ilości podjednostek globularnych oraz łańcuchów kolagenopodobnych /Anglister i wsp. 1976, 1979, Anglister, Silman 1978, Rosenberry i wsp. 1980/.

W mózгах ssaków AChE znajduje się głównie w formie globularnej a postać asymetryczna stanowi zaledwie 0,2% całkowitej aktywności enzymu /Rieger i wsp. 1980, Grassi i wsp. 1982/. W OUN przeważa izoenzym  $G_4$  /Wade, Timiraś, 1980, Grassi i wsp. 1982/, za wyjątkiem mózdzku i pnia, gdzie  $G_1$  i  $G_2$  ilościowo równoważą  $G_4$  /Clark, Lenz 1983/. Podczas rozwoju mózgu formy  $G_1$  i  $G_2$  nie ulegają ilościowym zmianom, narasta natomiast stężenie formy  $G_4$  /Rieger, Vigny 1976, Marchand i wsp. 1977/. Polimorfizm AChE w mózгах ssaków zwiększa się dodatkowo przez obecność form związanych z błonami oraz występujących w postaci rozpuszczalnej /Hollunger, Niklasson 1973, Adamson i wsp.



1975, Niemierko, Skangiel-Kramska 1976, Adamson 1977/. Rozpuszczalna forma enzymu stanowi około 20% całkowitej aktywności AChE i w skład jej wchodzi trzy dalsze postacie: wielkocząsteczkowa - wolno migrująca podczas elektroforezy w żelu poliakrylamidowym /56%/ , średnicząsteczkowa /16%/ oraz postać niskocząsteczkowa - najszybciej migrująca /28%/ /Vijayan, Brownson 1974, Meneguz i wsp. 1981/. Znajomość budowy izoenzymatycznej AChE przyczyniła się do bliższego poznania mechanizmów blokowania i odnowy aktywności enzymu po zatruciach związkami FO /Michalek i wsp. 1979, Michalek i wsp. 1981 a, b, 1982, Bisso i wsp. 1982/.

Podczas zatrucia ilość blokowanej AChE jest wprost proporcjonalna do aktywności enzymu w badanej okolicy mózgu /Kozar i wsp. 1976, Meneguz i wsp. 1981/. Poszczególne formy izoenzymatyczne blokowane są w różnym stopniu /Vijeyan, Brownson 1975, Srinivasan i wsp. 1976, Overstreet i wsp. 1979, Meneguz i wsp. 1981, Michalek i wsp. 1981 a, b/. Najwcześniej następuje spadek aktywności wysokocząsteczkowej formy rozpuszczalnej postaci AChE /Michalek i wsp. 1981 a, b, Bisso i wsp. 1982/.

Odnowa aktywności AChE po zatruciach związkami FO polega na syntezie de novo monomerycznych form enzymu /Blaber, Creasey 1960, Davis, Agranoff 1968/. Następnie, w wyniku polimeryzacji dochodzi do gromadzenia się form dwu- i cztero- podjednostkowych /Rieger i wsp. 1976, Huther i wsp. 1978/. Podczas odnowy najszybciej narasta stężenie formy średnicząsteczkowej /Srinivasan i wsp. 1976, Michalek i wsp. 1979/.



Przypuszcza się więc, że tempo polimeryzacji do form dwupodjednostkowych jest wyższe niż tworzenie się wielkocząsteczkowych izoenzymów AChE /Michalek i wsp. 1981 a, b, Meneguz i wsp. 1981/.

Wpływ związków FO na blokowanie i odnowę AChE podczas rozwoju mózgu badano w różnych układach doświadczalnych /Brodeur, Du Bois 1963, Lu i wsp. 1965, Talens, Woolley 1973, Kewitz i wsp. 1977, Mendoza, Shields 1977, Zalewska i wsp. 1977, Maślińska, Zalewska 1978, Bisso i wsp. 1982/. Najczęściej substancje te podawano samicom ciężarnym i aktywność enzymu oznaczano w mózгах płodów /Kewitz i wsp. 1977, Bisso i wsp. 1982/ lub u potomstwa po porodzie /Talens, Woolley 1973, Zalewska i wsp. 1977, Maślińska, Zalewska 1978 b/.

Niektórzy autorzy /Bisso i wsp. 1980, 1982/ sugerują, że tempo odnowy AChE jest wyraźnie związane ze stopniem dojrzałości mózgu. Im młodsze zwierzę tym zdolność wyrównywania niedoborów aktywności AChE jest większe. Różnice są znaczne i podczas gdy u 18 dniowych płodów szczura aktywność AChE wraca do normy w ciągu kilkudziesięciu godzin po zablokowaniu /w 95% enzymu pestycydem, to u zwierząt 20 dniowych czas powrotu do wartości prawidłowych trwa wiele dni a u dorosłych zwierząt nawet wiele tygodni /Bisso i wsp. 1982/.

W badaniach tych nie uwzględniono niestety okresu poporodowego, w którym fizjologiczne tempo syntezy AChE jest najwyższe a rozwijający się mózg najbardziej podatny na działanie uszkodzających czynników środowiskowych. Wydaje się również, że podczas rozwoju mózgu, przebieg odnowy enzymu byłby



odmienny przy długotrwałym blokowaniu jego aktywności przez wielokrotne podanie pestycydu.

### Zatrucia związkami fosforoorganicznymi

Objawy zatrucia substancjami FO związane są z różnego stopnia zahamowaniem aktywności acetylocholinoesterazy i z następczym pobudzeniem cholinergicznym.

Odmienny przebieg zatruc ostrych i przewlekłych wynika nie tylko z różnego nasilenia zmian ilościowych i dlatego wymaga osobnego omówienia.

Objawy charakteryzujące zatrucia ostre sprowadzają się do silnego pobudzenia układu cholinergicznego. Patomechanizm tych zaburzeń polega na nagłym wypadnięciu funkcji acetylocholinoesterazy z ustrojowych przemian metabolicznych i gromadzeniu się nadmiaru acetylocholino w przestrzeniach synaptycznych. Przedłużone działanie neurotransmitera na postsynaptyczne receptory układu cholinergicznego wywołuje szereg typowych objawów nadczynności tego układu /Karczmar 1967/.

Kliniczny obraz ostrych zatruc jest zwykle wypadkową pobudzenia zakończeń muskarynowych, nikotynowych i tzw. objawów centralnych /Karczmar 1967/. W sumie na plan pierwszy wysuwają się zaburzenia oddechowo-krażeniowe, które są również najczęstszą, bezpośrednią przyczyną zgonów. Leczenie ostrych zatruc polega na stosowaniu blokerów receptorów muskarynowych /Holmstedt 1970, Milosevic 1970/ oraz podawaniu reaktywatorów celem uwolnienia AChE od połączeń z inhibitorami /Wills 1970/.



Działanie reaktywatorów jest skuteczne jedynie we wczesnej fazie zatrucia /Koelle 1975/, w pozostałych przypadkach odnowa aktywności enzymu odbywa się poprzez syntezę nowych cząsteczek enzymu.

Długotrwałe działanie na ustrój niewielkich dawek związków FO prowadzi do zatruc przewlekłych. W przeciwieństwie jednak do zatruc ostrych, obniżonej aktywności AChE nie towarzyszą objawy silnego pobudzenia cholinergicznego /Overstreet 1973, Russel i wsp. 1975, Schiller 1979, Davis, Richardson 1980, Ehlert i wsp. 1980, Russel i wsp. 1981/. Zjawisko to nazwano "tolerancją" i wykazano, że składa się na nią szereg mechanizmów zabezpieczających ustrój przed nadmiarem acetylocholinyl:

- spadek wrażliwości i liczby receptorów muskarynowych w błonach postsynaptycznych /Uchida i wsp. 1979/,
- metabolizm nadmiaru acetylocholinyl w bocznych torach przemian /Dross, Kewitz 1968, Dross 1975, Herman 1979/.
- zmniejszenie dostawy substratu do syntezy neurotransmitera w komórkach nerwowych /Carson, Jenden 1973/.

Brak charakterystycznych objawów pobudzenia cholinergicznego sprawia, że zatrucia przewlekłe stwarzają trudności diagnostyczne. Na pierwszy plan wysuwają się niespecyficzne zaburzenia świadczące wprawdzie o dysfunkcji OUN ale nie wskazujące na bezpośrednie podłoże zaburzeń.

Dokładna analiza przeprowadzona w czasie prób leczenia chorób psychicznych związkami FO wykazała, że substancje te pogłębiają depresje i aktywują schizofrenię ale łagodzą



objawy psychozy maniakalnej. U zdrowych ochotników wywołują one apatię, znużenie, przygnębienie i depresję /Rowentree i wsp. 1950/.

Gershon i Show /1961/ obok reakcji schizofrenicznych obserwowali u osób narażonych na przewlekłe działanie pestycydów FO, ciężkie zaburzenia pamięci i koncentracji. Sugerowali również, że narastające skażenie środowiska może zagrozić zdrowiu psychicznemu stałych mieszkańców terenów rolniczych. Z obserwacji klinicznych i badań doświadczalnych wynika, że wrażliwość osobnicza organizmu /Fleisher i wsp. 1970, Russel 1983/ i struktura chemiczna związków FO /Bistrup i wsp. 1953, Hierons, Johnson 1978, Xintaras i wsp. 1978, Jędrzejowska i wsp. 1980, Senanayake, Jeyaratnam 1981, Senanayake, Johnson 1982/ mają istotny wpływ na kształtowanie obrazu zatruc.

#### Uszkodzenia tkanki nerwowej po zatruciach związkami fosforoorganicznymi

Szybkie zastosowanie właściwego leczenia w ostrych zatruciach niektórymi związkami FO daje choremu szansę na całkowite wyzdrowienie /Wills, Albany 1970/. Jeżeli jednak zatrucia te kończą się śmiercią, w mózgu i w wielu narządach wewnętrznych obserwuje się obrzęk, przekrwienie i poszerzenie naczyń włosowatych /Grob i wsp. 1950, Holmstedt i wsp. 1957, Arterberry i wsp. 1961/. Rozległość tych zmian wiąże się ściśle z nasileniem i czasem trwania zaburzeń krążeniowo-oddechowych /Taylor 1980/.



Istnieje także grupa związków FO, które niezależnie od stosowanego leczenia prowadzą do uszkodzenia tkanki nerwowej. Objawy zatrucia charakteryzują się występowaniem ostrych, cofających się szybko zaburzeń żołądkowo-jelitowych. Po okresie pozornego wyzdrowienia trwającego około 2-4 tygodni pojawiają się niedowłady a nawet porażenia, którym towarzyszy niewielki ubytek czucia. Jeżeli proces chorobowy toczy się również w obrębie długich dróg rdzenia kręgowego to łącznie z niedowładami wiotkimi występować może zespół kurczowy. Choroba prowadzi często do trwałego kalectwa /Morgan, Penovich 1978, Vasilescu 1979, Senanayake 1981/.

W literaturze anglosaskiej ten typ zaburzeń nazwano opóźnioną polineuropatią wywołaną związkami fosforoorganicznymi /Organophosphorus Induced Delayed Polineuropathy, OPIDP/.

Zaburzenia takie obserwowano podczas masowych zatruc, których przyczyną był najczęściej fosforan trójortokrezyłowy /TOCP/ /Smith, Lillie 1931, Barnes, Danz 1953, Durham, Gaines 1956, Vasilescu 1979/.

Oprócz TOCP szereg związków FO posiada podobne właściwości neurotoksyczne /Bidstrup i wsp. 1953, Hopkins 1975, Hierons, Johnson 1978, Xintaras i wsp. 1978, Jędrzejowska i wsp. 1980, Senanayake, Jeyaratnam 1981, Senanayake, Johnson 1981/.

Podłożem objawów neurologicznych w OPIDP są uszkodzenia nerwów obwodowych z wtórnym rozpadem osłonek mielinowych i zmianami w komórkach nerwowych rdzenia kręgowego /Hern 1971, Bouldin, Cavanagh 1979 a, b, Koller, Klawans 1979, Baker i wsp. 1980/.



Zmiany ultrastrukturalne obserwowano we wszystkich elementach tkanki nerwowej /Ahmed, Glees 1968, Bischoff 1970, Le Vay i wsp. 1971, Spoerri, Glees 1979, 1980/.

Według opinii wielu autorów, pierwszą reakcją komórki na trujące działanie TOCP jest gromadzenie się licznych, elektronowo-ciemnych, wydłużonych mitochondriów w aksonie i cytoplazmie perykarionów /Ahmed 1973 a, b, 1975, Spoerri, Glees 1979/. Następnie organelle te ulegają stopniowemu zwyrodnieniu, które polega na obrzmieniu i rozpadzie grzebieni i macierzy mitochondriów. Ostatecznie mitochondria przekształcają się w duże, elektronowo-puste wakuole /Ahmed 1970, 1971, 1977/.

Wielokrotnie podkreślano ścisły związek tych zmian z powstawaniem złogów barwnika w uszkodzonych komórkach /Coleough i wsp. 1972, Hasan, Glees 1972, Gopinath, Glees 1974, Glees i wsp. 1974, Glees 1975, Prentice, Roberts 1983/. Barwnik ma, według autorów, strukturę typową dla lipofuscyny i gromadzi się zarówno w komórkach nerwowych, jak i glejowych /Ahmed 1977, Spoerri, Glees 1980/. Wypełnia znaczne przestrzenie perykarionów i wypustek komórkowych leżąc zawsze w sąsiedztwie uszkodzonych mitochondriów /Ahmed, Glees 1977/.

Równoległe do zmian w mitochondriach, narasta w komórkach ilość gładkiej siatki śródplazmatycznej i włókienek cytoplazmatycznych /Ahmed 1977, Spoerri, Glees 1979/. Początkowo zmiany te pojawiają się w aksonach. Włókienka ułożone jedno obok drugiego wypełniają cały przekrój aksonu.



Później liczba ich narasta również w perykarionach komórek /Le Vay i wsp. 1971/. Obok znajdują się liczne lizosomy i ciała gęste. Tak zmieniona komórka sprawia wrażenie elektro-nowo-ciemnej /Spoerri, Glees 1980/. W niektórych komórkach zmiany są mniej nasilone i wyrażają się jedynie przerostem aparatu Golgiego lub zmianami mitochondrialnymi.

Mimo wieloletnich badań nie zdołano wyjaśnić patomechanizmu polineuropatii fosforoorganicznych. Początkowo sądzono, że podłożem obserwowanych zmian może być zaburzony metabolizm niektórych witamin /Swank, Prados 1942, Carpenter i wsp. 1959/. Sugerowano następnie, że zaburzona synteza białek lub zmieniony przepływ aksoplazmy mogą prowadzić do polineuropatii /Pleasure 1969, James, Austin 1970, Bradley, Williams 1973, Cavanagh 1973, Reichert, Abou-Donia 1980/.

Również niedobór AChE w płytce nerwowo-mięśniowej odpowiedzialny bezpośrednio za toksyczną martwicę mięśni może inicjować uszkodzenia tkanki nerwowej /Laskowski, Dettbarn 1975, Akaike i wsp. 1984, Albuquerque i wsp. 1984, Dettbarn 1984/.

Ostatnio zwrócono uwagę na czynność enzymów, określanych jako esterazy neurotoksyczne /NTE/. Zablockowanie przez związki FO 70-80% aktywności tych enzymów uruchamia ciąg przemian, które prowadzą do uszkodzenia tkanki nerwowej /Johnson, Lauwersy 1969, Johnson 1974, 1980, 1982, Lotti, Johnson 1980, Caroldi, Lotti 1982/.

Esterazy neurotoksyczne występują w wielu komórkach ustroju, między innymi w limfocytach /Dudek, 1979, Caroldi, Lotti 1982, Dudek, Richardson 1982, Johnson 1982/. Ich obecność w tych



komórkach wykorzystano do testów prognostycznych mających na celu określenie prawdopodobieństwa wystąpienia uszkodzeń tkanki nerwowej u ludzi zatrutych pestycydami /Dudek 1979, Lotti i wsp. 1983, Osterloh i wsp. 1983/.

Teoria wiążąca polineuropatie toksyczne z dysfunkcją NTE ma wiele słabych punktów. Trudno między innymi wytłumaczyć, dlaczego po zablokowaniu tych enzymów dochodzi do wybiórczych uszkodzeń tkanki nerwowej, mimo że NTE występują prawie we wszystkich komórkach ustroju, tym bardziej, że aktywność NTE nie jest potrzebna tkance nerwowej do utrzymania jej prawidłowego metabolizmu lub funkcji. Odnosi się wrażenie, że rola zaburzeń aktywności NTE w indukowaniu polineuropatii nie zostanie wyjaśniona dopóki nie określi się fizjologicznej funkcji tych enzymów w tkance nerwowej.

W większości dotychczasowych prac, polineuropatie doświadczalne wywoływano przez podanie zwierzętom fosforanu trójortokrezyłowego. Zwrócono jednak uwagę, że wrażliwość różnych gatunków zwierząt na działanie tej substancji nie jest jednokowa. Polineuropatie powstawały najłatwiej u ptactwa domowego. Podanie kurom jednorazowej dawki TOCP prowadziło do ciężkich porażań nerwów obwodowych /Glees, Janzik 1965, Spoerri, Glees 1979/. Krańcowo odmiennie reagowały szczury. Ten gatunek zwierząt okazał się wyjątkowo oporny na trujące działanie związków FO /Johnson 1975, 1982, Abou-Donia 1981/. Polineuropatie pojawiały się u nich dopiero po długotrwałym /6 tygodni/ podawaniu TOCP /Veronesi 1984/. Zjawisko to, wiąże się z określoną specyfiką przemian metabolicznych /Abou-Donia 1983,



Hansen 1983/ oraz aktywnością enzymów /Clothier, Johnson 1980, Saliman i wsp. 1982/, które zabezpieczają organizm szczura przed toksycznym działaniem związków FO.

Konsekwencją stosunkowo częstego występowania polineuropatii w zatruciach pestycydami było sformułowanie opinii, że związki FO uszkadzają jedynie nerwy obwodowe i rdzeń kręgowy /Ahmed, Glees 1971, Hern, Glees 1972, Abou-Donia 1979, Boul-din, Cavanagh 1979 a,b, Lotti i wsp. 1984/. Ograniczenie badań morfologicznych do jednego praktycznie modelu doświadczalnego spowodowało, że sporadycznie badano reakcję tkanki nerwowej mózgu na zatrucia związkami FO. Brak jest szczególnie informacji o zmianach jakie powstają w OUN po długotrwałym działaniu pestycydów FO.

Obserwowane po podaniu substancji FO zmiany psychiczne /Gershon, Show 1961, Grob 1963, Dill, Smith 1964, Korsak, Sato 1977, Duffy i wsp. 1979/ sugerują, że związki te zaburzać mogą wzajemne relacje między poszczególnymi neurotransmiterami. Jest to tym bardziej prawdopodobne, że jak wykazały ostatnie badania doświadczalne, pod wpływem związków FO dochodzi do zmian stężenia lub metabolizmu niektórych substancji neuroprzekąźnikowych w mózgu /Stavinoha i wsp. 1966, Freed i wsp. 1976, Ali i wsp. 1979, Prionx-Gurpanneau i wsp. 1982, Maślińska 1983a, Sivam i wsp. 1983, Dun, Karczmar 1984, Fernando i wsp. 1984/ głównie serotoniny /Ali i wsp. 1979, Prionx-Guyanneau i wsp. 1982, Maślińska 1983 b, Dun, Karczmar 1984/.



Czynny udział serotoniny w rozwoju układu nerwowego przed i po porodzie /Lauder, Krebs 1976, 1978, Lauder i wsp. 1981/ pozwala sądzić, że skażenie środowiska związkami FO i przenikanie tych substancji do młodych organizmów może stanowić poważne zagrożenie dla prawidłowego rozwoju struktury i funkcji OUN.

Udział serotoniny /5-hydroksytryptaminy, 5-HT/  
w rozwoju mózgu

Serotonina /5-hydroksytryptamina, 5-HT/ jako neurotransmitter bierze udział w kształtowaniu wielu funkcji ośrodkowego układu nerwowego. Jej rola sprowadza się przede wszystkim do hamowania procesów zachowania /Meyerson 1964, Tagliamonte i wsp. 1969, Jouvét 1972, Tissari 1973, Kostowski 1975/, uczenia się i reakcji na różnego rodzaju bodźce /dotykowe, słuchowe, bólowe/ /Kostowski 1980/. Substancja ta uczestniczy w regulacji temperatury ciała /Meyerson 1964, Reid i wsp. 1968, Tagliamonte i wsp. 1969, Weiss, Aghajanian 1971/ oraz synchronizacji bioelektrycznej czynności kory mózgowej /Jouvét 1969, Verzeano, Mahuke 1972, Morgane, Stern 1974/. Wpływa na wydzielanie hormonów podwzgórza /Fuxe i wsp. 1970, Kostowski 1980/, a poprzez nie na metabolizm całego organizmu.

Serotonina jest ściśle związana z rozwojem układu nerwowego. Uczestniczy w tym procesie nie tylko jako neurotransmitter ale również jako substancja o właściwościach troficznych /Lauder, Krebs 1976, Lauder, Krebs 1978 a, Lauder, Krebs 1978 b/.



Udział serotoniny zaznacza się na wielu ważnych etapach rozwoju mózgu: zamykaniu cewy nerwowej, organogenezie mózgu, podziale na somity /Lauder 1983/. Leki zaburzające metabolizm serotoniny, podawane w czasie ciąży działają teratogennie prowadząc do wad rozwojowych układu nerwowego /Palen i wsp. 1979, Jurand 1980/.

Neurony serotonergiczne wyodrębniają się z populacji blastycznych komórek nerwowych w początkowym okresie rozwoju zarodka /Wallace 1982, Wallace, Lauder 1983/. Wkrótce potem podejmują produkcję serotoniny /Lauder, Bloom 1974, 1975/, która mimo braku połączeń synaptycznych stymuluje podziały i różnicowanie się innych komórek neuroblastycznych /Lauder, Krebs 1976, Lauber, Krebs 1978 a, b/. Są to głównie komórki, z którymi, w późniejszym okresie rozwoju neurony serotonergiczne utworzą liczne połączenia nerwowe /Lauder i wsp. 1981, 1982/.

Po porodzie, związek serotoniny z rozwojem wyraża się wpływem na procesy namnażania i różnicowania się komórek glejowych /Lauder i wsp. 1982, Lauder 1983/ oraz jej udziałem w regulacji wydzielania hormonu wzrostu /Smythe i wsp. 1975, Stuart i wsp. 1976, Kuhn i wsp. 1978, Kuhn, Schanberg 1981/.

Mimo licznych funkcji jakie spełnia 5-HT w rozwoju, u wielu gatunków zwierząt /szczur, królik/ podobnie jak u człowieka w dniu porodu układ serotonergiczny jest stosunkowo mało dojrzały /Karki i wsp. 1960, 1962, Agrawal i wsp. 1966, Tissari 1975, Daszuta i wsp. 1979/. Pewien stopień dojrzałości wyka-



zują co prawda jądra szwu w rdzeniu przedłużonym i śródmózgowiu /Olson, Seiger 1972/, ale rozwój układu serotonergicznego w strukturach przodomózgowia następuje dopiero w okresie pierwszych tygodni życia po porodzie /Green, Sawyer 1966, Tissari 1973/. Obserwuje się wtedy rozrost wypustek komórkowych neuronów 5-HT /Loizou 1969, 1972, Hattori, McGeer 1973/, oraz tworzenie się połączeń synaptycznych /Aghajanian, Bloom 1967, Tissari 1975/.

Stopniowo podejmują swoją funkcję poszczególne połączenia tego układu np. układ hamujący w hipokampie /Moorcroft 1971, Marby, Campbelli 1974/, którego zadaniem jest obniżanie nadmiernej pobudliwości nerwowej wywołanej u młodych zwierząt wcześniejszym dojrzewaniem połączeń katecholaminergicznych /Campbell i wsp. 1969, Moorcroft i wsp. 1971, Campbell, Spear 1972/.

W miarę rozwoju ujawniają się współzależności funkcjonalne układu serotonergicznego z innymi neurotransmiterami /Garattini i wsp. 1980, Butcher, Woolf 1982/.

Obserwuje się dwojakiego rodzaju interakcje z układem cholinergicznym: hamujący wpływ agonistów receptorów nikotynowych /N-cholinergicznych/ oraz pobudzające oddziaływanie agonistów receptorów muskarynowych /M-cholinergicznych/ na układ 5-HT /Hery i wsp. 1977, Robinson 1982/. Znany jest również wpływ neuronów 5-HT na komórki nerwowe uwalniające acetylocholinę /Vizi i wsp. 1981/.



Wzajemne powiązania różnych układów powodują, że zaburzenia powstające w jednym z nich mogą wywołać reakcję kompensacyjną lub prowadzić do dysfunkcji innych. Przypuszcza się, że w przypadku zatrucia związkami FO, czynnikiem pierwotnym inicjującym cykl wzajemnych oddziaływań są zaburzenia powstające w układzie cholinergicznym /Dun, Karczmar 1984/.

#### Związki fosforoorganiczne a rozwój mózgu

Związki FO są szczególnie toksyczne dla młodych organizmów /Brodeur, Du Bois 1963, Lu i wsp. 1965, Mendoza, Shields 1977/. Substancje te łatwo pokonują barierę łożyskową i przedostają się do płodu /Edery i wsp. 1966, Fish 1966, Budreau, Singh 1973, Maślińska i wsp. 1979/. Niektóre z nich działają teratogennie /Fish 1966, Kimbrough, Gaines 1968, Khera, Clegg 1969, Vogin, Carson 1971, Thorpe i wsp. 1972/, ale zdarza się, że mimo uszkadzającego wpływu na strukturę DNA in vitro /Lofroth 1970, Lawley i wsp. 1974, Wennerberg, Lofroth 1974, Wooder i wsp. 1977, Oliński i wsp. 1980/ zastosowane w czasie ciąży nie wywołują wad rozwojowych. Podane w końcowym okresie ciąży często opóźniają tempo rozwoju potomstwa po porodzie /Dąbska i wsp. 1979, Dąbska, Maślińska 1982/.

Wpływają na czynność gruczołów dokrewnych i uwalnianie hormonu wzrostu. Mogą zaburzać metabolizm mózgu, zmieniając aktywność wielu ważnych enzymów /Cehovic i wsp. 1972, Spyker, Avery 1977, Zalewska i wsp. 1977, Maślińska, Zalewska 1978, Spyker i wsp. 1978, Suliński, Bicz 1979/.



W dotychczasowych pracach rzadko brano pod uwagę etap i tempo rozwoju mózgu u badanego gatunku zwierzęcia. Z tego powodu pomijano zwykle okres najbardziej intensywnego rozwoju mózgu, podczas którego tkanka nerwowa wykazuje największą wrażliwość na działanie czynników środowiskowych /Dobbing 1968/. Ten etap rozwoju OUN pojawia się, w zależności od gatunku zwierzęcia, w różnym okresie rozwoju organizmu. U jednych gatunków występuje w ostatniej fazie życia płodowego, u innych w kilka dni po porodzie /schemat 6/.

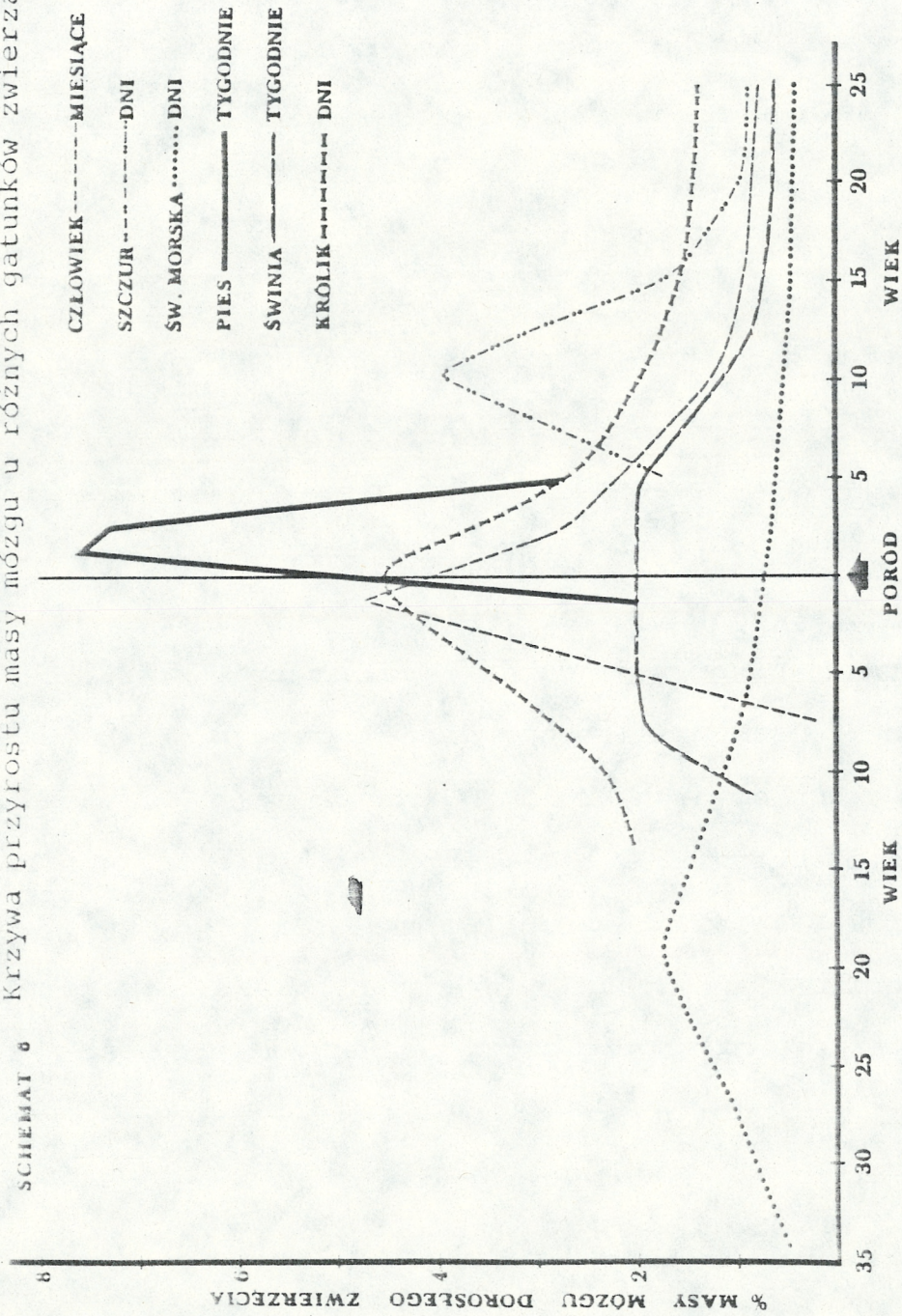
Odnosząc ten etap rozwoju do momentu porodu wyodrębniono trzy grupy zwierząt /Davison, Dobbing 1968/: przedporodową, okołoporodową i poporodową.

Zwierzęta należące do pierwszej grupy rodzą się z dojrzałym układem nerwowym i zdolne są bezpośrednio po porodzie podjąć wiele czynności życiowych. Do grupy tej należą między innymi: kurczak /Bensted i wsp. 1957/, świnia domowa /Dickerson, Dobbing 1967/, świnka morska /Altman, Das 1967, Dobbing, Sands 1970 b/.

W drugiej grupie znajdują się zwierzęta, które rodzą się niezdolne do samodzielnego życia i wymagają troskliwej opieki matki. Należy do nich królik /Harel i wsp. 1972/, pies /Davison, Dobbing 1968/, u których podobnie jak u człowieka /Davison 1966, Davison, Dobbing 1968, Dobbing 1968, Winick 1969, Dobbing, Sands 1970a/ intensywny okres rozwoju mózgu rozpoczyna się na krótko przed porodem.



SCHEMAT 6 Krzywa przyrostu masy mózgu u różnych gatunków zwierząt w odniesieniu do dnia porodu



wg. Davison, Dobbing 1968



W grupie trzeciej, mózg rozpoczyna swój szybki proces dojrzewania w kilka dni po porodzie. Przedstawicielem tej grupy jest szczur /Eayrs, Goodhead 1959, Winick, Noble 1965, Davison, Dobbing 1968, Dobbing 1968/.

Znajomość przytoczonych danych pozwala na dobór właściwego gatunku zwierzęcia do doświadczeń prowadzonych podczas rozwoju oraz pełniejszą interpretację otrzymanych wyników.

Spośród zwierząt laboratoryjnych na uwagę zasługuje królik, u którego tempo rozwoju mózgu jest podobne do obserwowanego u człowieka. Zwierzę to nadaje się szczególnie do badań okołoporodowych.

Okres intensywnego rozwoju mózgu królika przypada na pierwsze 4-6 tygodni życia po porodzie. W tym czasie następuje szybki przyrost masy mózgu, wzrasta również poziom cholesterolu, sulfatydów i cerebrozydów wchodzących w skład tworzących się osłonek mielinowych /Harel i wsp. 1972/. Pod koniec pierwszego miesiąca życia spada intensywność procesów rozwojowych /dojrzewania/ i w ciągu następnych dwóch tygodni mózg królika nabiera cech charakterystycznych dla mózgu zwierząt dorosłych /Mathers 1970, 1974, 1977, Roboz i wsp. 1970, Harel i wsp. 1972, Marshall, Mathers 1977, Dąbska, Zgorzalewicz 1984/.



## CEL PRACY

Konieczność stosowania pestycydów FO w wielu dziedzinach codziennego życia prowadzi do narastającego skażenia środowiska i sprzyja powstawaniu przewlekłych zatruc. Szereg substancji FO wykazuje silne działanie neurotoksyczne, stwarzając duże zagrożenie dla tkanki nerwowej.

W początkowym okresie życia po porodzie u człowieka i niektórych gatunków zwierząt OUN wykazuje szczególną podatność na uszkodzenia, tymczasem ten właśnie okres rozwoju rzadko bywał przedmiotem badań w aspekcie toksycznego działania związków FO. W obecnej pracy podjęto próbę kompleksowej /biochemicznej, histochemicznej i morfologicznej/ oceny wpływu tych substancji na mózg królika we wczesnym okresie życia po porodzie. Badano zmiany: aktywności acetylocholinesterazy, metabolizmu serotoniny oraz ultrastrukturalne występujące pod wpływem powszechnie stosowanego pestycydu - dichlorfosu.



## Plan badań

Zgodnie z podjętym celem pracy przeprowadzono następujące badania mózgow królików poddanych działaniu związku fosforoorganicznego - dichlorfosu:

### A. Oznaczanie aktywności acetylocholinoesterazy /AChE/

1. Badanie aktywności AChE po jednorazowym podaniu dichlorfosu w określonych dniach życia królików podczas rozwoju /oznaczenia biochemiczne/
2. Badanie procesu odnowy aktywności AChE po wielokrotnym podaniu dichlorfosu
  - a/ oznaczenia biochemiczne
  - b/ oznaczenia histochemiczne

### B. Badanie metabolizmu 5-hydroksytryptaminy

/5-HT, serotoniny/

po wielokrotnym podaniu dichlorfosu

1. Oznaczanie stężenia tryptofanu
2. Oznaczanie aktywności hydroksylazy tryptofanowej
3. Oznaczanie aktywności oksydazy monoaminowej
4. Oznaczanie stężenia serotoniny
5. Oznaczanie stężenia kwasu 5-hydroksyindolooctowego
6. Oznaczanie obrotu serotoniny

### C. Badania ultrastrukturalne tkanki nerwowej

ośrodkowego układu nerwowego

po wielokrotnym podaniu dichlorfosu



## MATERIAŁ I METODY

Badania prowadzono na młodych królikach rasy Nowozelandzkiej. Ciężarne samice umieszczano w dużych klatkach /1,0 x 1,5 x 1,0 m/ przystosowanych do wychowywania potomstwa /kotniki/. Młode pozostawały przy matce przez cały okres prowadzonych badań tzn. do 30 dnia życia.

Samice karmiono standardową paszą granulowaną pozostawiając wolny dostęp do wody. Pomieszczenia zwierzętarni oświetlano w cyklu 12 godzinnym i utrzymywano temperaturę 20-22°C.

Podawanie pestycydu: króliki otrzymywały dichlorfos /fosforan O-/2,2-dwuchlorowinylo/-O,O-dwumetylowy; DDVP/ począwszy od 6 dnia życia w jednorazowej dawce dziennej między godziną 10.00-11.00. Substancję podawano w roztworze olejowym /olej słonecznikowy/ 1 ml/kg masy ciała per os /sondą/. Dawkę dichlorfosu dla zwierzęcia w określonym dniu życia ustalano doświadczalnie.

Ustalenie dawki dichlorfosu:

Królikom między 6 a 15 dniem życia po porodzie podano dichlorfos jednorazowo w dawkach: 2, 4, 6, 8 i 10 mg/kg masy ciała.

Objawy zatrucia: przekrwienie spojówek, ślinotok, defekacja, oddawanie moczu, jeżenie sierści, łzawienie, zaburzenia oddechu, drżenia mięśniowe, drgawki, oceniano według arbitralnej skali 0-3.



Przyjęto za:

- 0 - brak objawów
- 0,5 - 1,0 - objawy słabe trwające do 15 min
- 1,1 - 2,0 - objawy o średnim nasileniu ustępujące po około 30 min
- 2,1 - 3,0 - objawy ciężkie trwające ponad 60 min lub kończące się śmiercią

Uzyskane wyniki zamieszczono w tabeli 1.

W dalszych badaniach stosowano dawki, które w odpowiednich dniach życia królika wywoływały średnie nasilenie objawów zatrucia /1,1-2,0/:

- 6, 7 i 8 - dniowe - 4 mg/kg masy ciała zwierząt
- 9, 10 i 11 - dniowe - 6 mg/kg " " "
- 12, 13, 14 i 15 - dniowe - 8 mg/kg " " "

Dichlorfos podawano królikom przez 10 dni, między 6 a 15 dniem życia a rówieśnikom kontrolnym odpowiednią objętość /1 ml/kg/ czystego oleju jadalnego.

Masa ciała zwierząt w tym okresie rozwoju wahała się od  $110 \pm 17,1$  g do  $284,3 \pm 33,8$  g.

Materiał do badań biochemicznych pobierano zawsze w okresie wiosennym /15 marzec - 15 czerwiec/ między godziną 12.00 a 13.00. Zwierzęta dekapitowano po 1 i 24 godzinach oraz po 3, 6, 9, 12 i 15 dobach od podania ostatniej dawki dichlorfosu. Wyjęte mózgi zamrażano w suchym lodzie w całości lub izolowano w temp.  $+4^{\circ}\text{C}$  następujące okolice: kora mózgu, hipokamp, zwoje podstawy, śródmózgowie, pień mózgu /most + rdzeń przedłużony/. Tkanekę po zamrożeniu ważono i przechowywano w temp.  $-70^{\circ}\text{C}$  do chwili przeprowadzenia określonych badań.



Tabela 1

Nasilenie objawów zatrucia  
po podaniu różnych dawek dichlorfosu  
w kolejnych dniach rozwoju królika

Dni życia	Dawki dichlorfosu				
	2 mg/kg	4 mg/kg	6 mg/kg	8 mg/kg	10 mg/kg
6	0,4 ± 0,1	1,9 ± 0,3	2,6 ± 0,3	2,9 ± 0,4	
7		1,7 ± 0,4	2,4 ± 0,4		
8		1,6 ± 0,4	2,6 ± 0,3		
9		1,0 ± 0,2	1,9 ± 0,2	2,5 ± 0,2	
10		0,6 ± 0,1	2,0 ± 0,3	2,5 ± 0,2	
11			1,8 ± 0,2	2,3 ± 0,4	
12			1,0 ± 0,3	2,0 ± 0,2	2,8 ± 0,3
13			1,0 ± 0,4	1,8 ± 0,1	2,4 ± 0,4
14				1,9 ± 0,2	2,7 ± 0,3
15				1,8 ± 0,4	2,5 ± 0,3

Nasilenie objawów wg arbitralnej skali 0-3

Wyniki podano w wartościach  $\bar{x} \pm SD$  przy  $n = 5$ .



## METODY

### Badania biochemiczne

#### Aktywność acetylocholinoesterazy

Aktywność acetylocholinoesterazy /AChE, EC.3.1.1.7/ oznaczano według metody opisanej przez Ellman'a i wsp. /1961/.

Tkanekę homogenizowano przez 2 min w 0,038 M buforze Tris/HCl pH 8,5 /1;6 v/w/ używając homogenizatora Potter'a-Elvehjema z tłokiem teflonowym /temp. 0-4°C/. 5 µl rozcienczonego homogenatu preinkubowano z 0,01 M roztworem iso-OMPA przez 30 min w temp. 37°C celem zablokowania aktywności nieswoistych cholinoesteraz /Michalek i wsp. 1984/. Następnie dodawano substrat - 0,56 mM roztwór acetylotiocholiny i inkubowano przez 60 min w łaźni wodnej z wytrząsaniem /temp. 37°C/. Reakcję enzymatyczną przerywano dodając stężonej ezeryny i przenosząc próbówki do zimnej kąpieli /woda + lód/. Uwolniona podczas hydrolizy enzymatycznej tiocholina w obecności 0,2 mM roztworu kwasu dwutionitrobenzoesowego prowadziła do powstania żółtego anionu tego kwasu. Absorpcję mierzono przy długości fali 412 nm w spektrofotometrze Beckman Acta III.

Aktywność enzymatyczną acetylocholinoesterazy wyrażano w nanomolach zhydrolizowanego substratu w czasie 1 minuty reakcji.



### Aktywność oksydazy monoaminowej

Aktywność oksydazy monoaminowej /MAO, EC.1.4.3.4/ oznaczano metodą spektrofluorymetryczną /Bogdański i wsp. 1957/ adaptowaną do badań aktywności MAO, podczas rozwoju mózgu przez Kraml'a /1965/ oraz Suzuki i wsp. /1978/.

Tkanke homogenizowano w 9 objętościach 0,3 M buforu fosforanowego pH 7,2. Wirowano przez 15 min /15 tys. obrotów/min/. Po 2 ml nadsączu przenoszono do kolejnych próbek. Do próby kontrolnej dodawano 2 ml 2% roztworu kwasu trójchlorooctowego lub iproniazydu /fosforan iproniazydu  $10^{-3}$  M - inhibitor MAO/. Wszystkie próbki /kontrolne i badane/ umieszczano w łaźni wodnej w temp.  $37^{\circ}\text{C}$  na okres 15 min. Następnie dodawano do nich po 50  $\mu\text{g}$  siarczanu serotoniny /0,05 ml roztworu 1 mg 5-HT/ml 0,01 N HCl/. Inkubowano przez 30 min w temp.  $37^{\circ}\text{C}$ . Do próby badanej dodawano 2 ml 2% roztworu kwasu trójchlorooctowego. Wszystkie próby wirowano przez 10 min /5 tys. obrotów/min/. Nadsącz rozcieńczano 10 krotnie 0,1 N HCl. W naczyniach zawierających próby kontrolne i badane znajdowało się obecnie po 2 ml rozcieńczonego nadsącza, próba standardowa - 2 ml rozcieńczonego standardu, próba ślepa - 2 ml 0,1 N HCl. Do wszystkich naczyń dodawano po 3 ml buforu boranowego /pH 10,0/, 2,5 ml 1,5% roztworu  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  /pH 9,2/, NaCl do nasycenia oraz 7,5 ml n-butanolu. Próby wytrząsano przez 10 min, wirowano 5 min /5 tys. obrotów/min/.

Po 2,5 ml nadsącza używano do oznaczenia stężenia serotoniny według metody Curzona i wsp. /1981/. Opis metody umieszczono



poniżej. Aktywność MAO wyrażano w  $\mu\text{g}$  serotoniny zmetabolizowanej w ciągu 1 godziny przy udziale enzymu zawartego w badanej tkance przeliczając na ilość mg białka obecnego w tej tkance.

#### Hydroksylaza tryptofanowa

Aktywność hydroksylazy tryptofanowej /EC.1.14.16.4/ określano metodą *in vivo* /Carlsson i wsp. 1972/ oznaczając wzrost stężenia 5-hydroksytryptofanu [ $\mu\text{g/g}$  tkanki/ w mózgu królików po podaniu NSD-1015 /3-hydroksybenzylhydrazyna/ substancji blokującej dekarboksylazę aromatycznych aminokwasów /EC.4.1.1.28/. NSD-1015 /100 mg/kg/ podawano podskórnice 30 minut przed dekapitacją zwierząt.

Metoda oznaczania 5-hydroksytryptofanu  
/Atack, Lindqvist, 1973/

Mózgi homogenizowano w 0,4 N roztworze  $\text{HClO}_4$  /5 ml/g tkanki/ przy pomocy umieszczonego w lodzie homogenizatora szklanego Potter'a-Elvehjema z tłokiem i wkładką teflonową. Do homogenatu dodawano roztwory: 5%  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  /0,01 ml/ml/ i 10% EDTA /0,02 ml/ml/. Następnie wirowano 10 min w temp.  $0^\circ\text{C}$  przy 14 tys. x g. Nadsącz doprowadzono do pH 2,0 przy pomocy 5 N  $\text{H}_2\text{CO}_3$  i przechowywano do trzech dni w temperaturze poniżej  $-20^\circ\text{C}$ . Przed dalszym postępowaniem ekstrakt ponownie wirowano w temp.  $0^\circ\text{C}$ .

Do rozdzielania substancji użyto kolumny /4,0 mm x 75 mm/ wypełnionej żywicą /forma sodowa/ Dowex 50 W, X-4 /200-400 mesh/.



Po przemyciu kolumny, nakładano na nią ekstrakt /pH 2,0/ i eluowano 5-hydrokсыtryptofan przy pomocy 9 ml 0,1 M sodowego buforu fosforanowego /pH 6,5/ zawierającego 0,1% EDTA. Stężenie 5-hydrokсыtryptofanu w eluacie oznaczano spektrofluorymetrycznie /Spektrofluorymetr Aminco-Bowman/ przy długości fali wzbudzenia 295 nm i odczytu 540 nm. Oznaczenia wykonywano równolegle z podwójnymi próbkami kontrolnymi, tkanekowymi, standardowymi i odczynnikowymi. Wartość oznaczeń odczytywano z krzywej standardowej wykreślonej dla odpowiednich stężeń 5-hydrokсыtryptofanu /5-HTP/. Odzysk standardów wynosił średnio /6 oznaczeń/ - 87%.

#### Stężenie białka

Stężenie białka w badanej tkance określano według metody Lowry i wsp. /1951/. Do próbki zawierającej 0,3 ml nadsączu /5-100 µg białka/ dodawano 0,3 ml roztworu zawierającego w 100 ml 2%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1 ml 2% winianu potasu i 1 ml 1%  $\text{CuSO}_4$ . Po zamieszaniu odstawiano próbkę na 10 min. Następnie dodawano 0,3 ml rozcieńczonego /1:3/ odczynnika Folin'a. Po energicznym zamieszaniu odstawiano ponownie próbkę na 30 min. Jeżeli stężenie białka w próbce wynosiło 5-25 µg, odczytu na spektrofotometrze Beckman Acta III dokonywano przy długości fali 700 nm, przy stężeniach wyższych przy 500 nm. Stężenie białka odczytywano z krzywej standardowej wykreślonej dla odpowiednich stężeń albuminy wołowej.



### Stężenie tryptofanu

Stężenie tryptofanu u mózgu oznaczano metodą Escande i wsp. /1978/. Pobraną tkankę homogenizowano w wodzie redestylowanej i dejonizowanej /5 ml/g tkanki/ przy pomocy homogenizatora Potter'a Elvehjema. Następnie 0,1 ml homogenatu wlewano do probówki zawierającej 1,5 ml 10% roztworu kwasu trójchlorooctowego /TCA/ i wirowano przez 10 min /12 tys. obrotów/min/. Przenoszono 0,2 ml nadsącza do probówki zawierającej 0,2 ml 0,5% roztworu nadtlenu wodoru: 0,2 ml 18% roztworu formaldehydu oraz 2 ml 1% roztworu TCA. Probówkę umieszczano w łaźni wodnej o temp. 85°C na okres 15 min celem przeprowadzenia reakcji kondensacji. Po 10 min od wyjęcia z łaźni oznaczano fluorescencję próby na spektrofluorymetrze Aminco-Bowman przy długości fali wzbudzenia 382 nm i odczytu 447 nm. Oznaczenia wykonywano równolegle z podwójnymi próbami kontrolnymi, tkankowymi, standardowymi i odczynnikowymi. Wartość oznaczeń odczytywano z krzywej standardowej wykreślonej dla odpowiednich stężeń L-tryptofanu. Odzysk standardów wynosił średnio /8 oznaczeń/ - 90%.

### Stężenie serotoniny /5-hydroksytryptaminy, 5-HT/ i kwasu 5-hydroksyindolooctowego /5-HIAA/

Stężenie serotoniny /5-hydroksytryptaminy, 5-HT/ i kwasu 5-hydroksyindolooctowego /5-HIAA/ oznaczano według metody Curzona i wsp. /1981/. Mózgi homogenizowano w szklanym homo-



genizatorze Potter'a w proporcjach 1 g tkanki na 10 ml n-butanolu zakwaszonego 850  $\mu$ l stężonego HCl/1. Homogenat wirowano przez 10 min przy 1500 obrotów na minutę. Nadsącz - 2,5 ml przenoszono do probówki zawierającej 5 ml n-heptanu, 60  $\mu$ l 100 nM roztworu kwasu solnego z 0,1% cysteiną. Wirowano przez 5 min przy 2000 obrotów na minutę. Po oddzieleniu się faz, 5 ml fazy organicznej /górna/ pobierano aby oznaczyć kwas 5-hydroksyindolooctowy. Resztę tej fazy odrzucano. Z fazy wodnej /dolnej/ 200  $\mu$ l przenoszono do probówki zawierającej 20  $\mu$ l 1% roztworu cysteiny, 800  $\mu$ l stężonego kwasu solnego oraz 0,004% roztworu aldehydu ortoftalowego celem oznaczenia stężenia serotoniny /5-HT/. Całość podgrzewano przez 15 min w temp. 77°C. Po ostudzeniu, oznaczano fluorescencję na spektrofluorymetrze Aminco-Bowman, stosując światło o długości fali 370 nm celem wzbudzenia fluorescencji, a 480 nm do odczytu pomiaru. Aby oznaczyć poziom kwasu 5-hydroksyindolooctowego 5 ml uzyskanej z nadsączu fazy organicznej dodawano do probówki zawierającej 600  $\mu$ l 500 nM buforu fosforanowego pH 7,0 i 0,1% roztwór cysteiny. Wytrząsano przez 5 min. Po oddzieleniu się faz roztworu, górną graniczną fazę odrzucano a 400  $\mu$ l fazy wodnej przenoszono do probówki, w której znajdowało się 40  $\mu$ l 1% roztworu cysteiny, 800  $\mu$ l stężonego kwasu solnego oraz 0,004% roztwór aldehydu ortoftalowego. Podgrzewano przez 15 min w temp. 77°C. Po ostudzeniu oznaczano fluorescencję w identyczny sposób jak dla serotoniny.



Badanie wykonywano równoległe z podwójnymi próbnami kontrolnymi: tkankowymi, standardowymi i odczynnikowymi. Wartości oznaczeń odczytywano z krzywych standardowych wykreślonych dla odpowiednich stężeń 5-HT i 5-HIAA.

Odzysk standardów wynosił dla 5-HT - 87%, a dla 5-HIAA - 95%.

### Obrót serotoniny

Obrót serotoniny określano według metody Costa i Neff'a /1970/. Badania przeprowadzono na królikach 16 dniowych czyli 24 godziny po podaniu ostatniej dawki dichlorfosu lub oleju jadalnego /grupa kontrolna/. W tym dniu zwierzęta otrzymywały dootrzewnowo 10 mg/kg tranylcyprominy - inhibitora oksydazy monoaminowej /MAO/. Po upływie 15, 30, 45 i 60 min króliki dekapitowano i wyjmowano mózgi. Mózgi pobrano również od zwierząt, które nie otrzymały inhibitora /czas 0/. Każda z grup liczyła 8 królików. Mózgi zamrażano w suchym lodzie, ważono i przechowywano w temp. poniżej  $-20^{\circ}\text{C}$ . Oznaczano w nich następnie stężenie 5-HT według metody Curzona i wsp. /1981/. Otrzymane wyniki użyto do wyliczenia współczynnika regresji /K/ dla 5-HT z podanego wzoru:

$$\log(5\text{-HT})_t = \log(5\text{-HT})_0 - 0,434 Kt,$$

gdzie:  $(5\text{-HT})_t$  - poziom serotoniny w czasie t

/po: 15, 30, 45 i 60 min/,



$(5\text{-HT})_0$  - poziom serotoniny w czasie 0

0,434 - wartość logarytmu naturalnego

t - czas po którym oznaczano 5-HT

K - współczynnik regresji 5-HT po  
zablokowaniu oksydazy monoaminowej  
przez tranylcyprominę.

Odwrotność współczynnika regresji ( $\frac{1}{K}$ ) określała czas obrotu 5-HT. Wartość obrotu 5-HT obliczano mnożąc wartość współczynnika regresji (K) przez wartość 5-HT w czasie 0 i wyrażano w nanomolach 5-HT na gram mokrej masy tkanki na godzinę.

Uzyskane wyniki badań biochemicznych poddawano analizie statystycznej posługując się testem t-Studenta.

Odczynniki:

dichlorfos /99,2%/ - Instytut Chemii Fizycznej PAN, jodek acetylotiocholiny - Serva, iso-OMPA - Sigma, DTNB - Fluka, NSD-1015 - Aldrich, Dowex 50W x 4 - Sigma, 5-hydroksytryptofan - Sigma, L-tryptofan - Sigma, tranylcypromina - Sigma, serotonina /siarczan kreatyniny/ - Sigma, kwas 5-hydroksyindoloctowy - Sigma, BW-284 - Wellcome.



## Badania histochemiczne

### Aktywność acetylocholinoesterazy

Mózgi przeznaczone do badań histochemicznych zamrażano w suchym lodzie i krojono w kriostacie Pearse  $-20^{\circ}\text{C}$ . Skrawki grubości 15  $\mu\text{m}$  pobierano w płaszczyźnie czołowej z półkul mózgowych na poziomie: przedniej, środkowej i tylnej części wzgórza wzrokowego; ze śródmózgowia na wysokości wzgórków górnych blaszki czworaczej oraz z pnia mózgu na poziomie rozwiniętych jąder nerwów przedsionkowych.

Skrawki suszono przez 3 dni w temperaturze pokojowej, aby zgodnie z doświadczeniem uzyskanym przy wykonywaniu oznaczeń na niedojrzałej tkance nerwowej /Maślińska, Thomas 1975/ otrzymać prawidłową lokalizację aktywności AChE. Reakcję histochemiczną na obecność AChE w badanej tkance wykonywano zgodnie z metodą opisaną przez Karnovsky'ego i Roots'a /1964/.

Tkanekę inkubowano przez 3 godziny w temp.  $37^{\circ}\text{C}$  w roztworze zawierającym:

- 5 mg jodku acetylotiocholiny
- 6,5 ml 0,1 M buforu maleinowego - NaOH pH 6,0
- 0,5 ml 0,1 M cytrynianu sodowego
- 1,0 ml 0,03 M wodnego roztworu  $\text{CuSO}_4$
- 1,0 ml wody destylowanej
- 1,0 ml 0,05 M wodnego roztworu żelazicjanku potasu.

W próbach kontrolnych zamiast wody dodawano odpowiednią ilość roztworów inhibitorów:



$10^{-5}$  M BW 284 /blokowanie AChE/

$10^{-6}$  M iso-OMPA /blokowanie nieswoistych cholinesteraz/

lub nie dodawano substratu do roztworu inkubacyjnego.

Dodatkowe skrawki tkankowe ze wszystkich wyżej wymienionych okolic mózgu barwiono fioletem krezyłu używając ich przy identyfikacji struktur mózgowych dla ustalenia lokalizacji aktywności AChE. W badaniach posługiwano się atlasami Girgis'a i Wang'a /1980/ oraz opracowaniami Silver /1974/ i Friede'go /1966/.

#### Badania morfologiczne

Badania morfologiczne przeprowadzono na mózgach pobranych od zwierząt po upływie 24 godzin lub 15 dni od podania ostatniej dawki dichlorfosu tzn. w 16 i 30 dniu życia.

Każda z badanych grup liczyła po 5 zwierząt. Usypiano je przez dootrzewnowe podanie 10% roztworu uretanu. Następnie perfundowano poprzez serce zbuforowanym płynem utrwalającym /2,5% paraformaldehyd + 1,5% aldehyd glutarowy pH 7,4, wg. Karnovsky'ego 1965/. Używano od 400-800 ml płynu w zależności od wieku zwierzęcia. Wycinki tkanki pobierano z okolicy szwu mózgu na wysokości wzgórków górnych blaszki czworaczej oraz z górnego odcinka rdzenia przedłużonego. Posługiwano się przy tym opracowaniem Steinbusch'a /1981/ przedstawiającym lokalizację neuronów serotonergicznym w ośrodkowym układzie nerwowym.



Dokładny schemat miejsc pobrania tkanki zamieszczono w albumie zawierającym dokumentację morfologiczną pracy.

Wycinki tkanki umieszczano w naczyniach zawierających płyn perfuzyjny i utrwalano przez dalsze 2 godziny w temp. 4°C. Płukano w 3 zmianach buforu kakodylowego pH 7,4. Przenoszono do 2% roztworu czterotlenku osmu. Odwadniano w roztworach o wzrastających stężeniach alkoholu etylowego i w tlenku propylenu. Zatapiano w Eponie. Otrzymane bloczki tkankowe krojono w ultramikrotomie LKB. Skrawki barwiono nasyconym roztworem octanu uranylu i cytrynianem ołowiu. Preparaty oglądano i fotografowano w mikroskopie elektronowym JEM 100 B. Przy identyfikacji struktur subkomórkowych korzystano z atlasu Peters'a i wsp. /1976/. Dodatkowo po dwa zwierzęta z każdej grupy użyto do badań w mikroskopie świetlnym. Mózgi tych zwierząt utrwalane były w 4% roztworze formaliny. Pobrane wycinki tkankowe zatapiano w parafinie. Skrawki barwiono fioletem krezylu i metodą Klüvera.



## WYNIKI

Dichlorfos podany jednorazowo zwierzętom w 6, 7 i 8 dniu życia wywoływał zatrucie o średnim nasileniu objawów, zgodnie z ustaloną wcześniej arbitralną skalą ocen. Dawki dichlorfosu stosowane w następnych dniach życia nie nasilały tych objawów, obserwowano natomiast stopniowe skracanie się czasu ich trwania. Objawy zatrucia ustępowały bez pozostawienia wyraźnych zmian a rozwój zwierząt przebiegał bez widocznych odchyłeń. Dobowy przyrost masy ciała był jednak mniej regularny niż u zwierząt kontrolnych. Po zakończeniu podawania dichlorfosu /w 15 dniu życia/ stwierdzono pewien stopień niedożywienia zwierząt. Masa ich ciała była znamienne niższa /o około 18%/ niż królików z grupy kontrolnej. Masa mózgu była jednak prawidłowa /tabela 2/.

Przy próbach krótkotrwałego izolowania od matki zatrute zwierzęta sprawiały wrażenie znacznie bardziej pobudzonych ruchowo niż rówieśnicy z grupy kontrolnej. Nie zauważono jednak żadnych objawów neurologicznych wskazujących na ogniskowe uszkodzenia układu nerwowego.

W ciągu następnych 15 dni rozwoju stopniowy przyrost masy mózgu był jednakowy w obu badanych grupach /tabela 2/. W grupie zatrutych zwierząt niedobór masy ciała był szybko wyrównywany i w 21 dniu życia nie stwierdzono już istotnych różnic /tabela 2/.



Tabela 2

Parametry wagowe masy mózgu i ciała królików po zatruciu dichlorofosem

Dni życia	Masa mózgu /Mm/ w g		Masa ciała /Mc/ w g		Mm/Mc x 100	
	Kontrola	DDVP	Kontrola	DDVP	Kontrola	DDVP
15	4,6 ± 0,4	4,1 ± 0,2	284,3 ± 33,8	233,6 ± 45,8*	1,6	1,7
21	5,5 ± 0,2	5,7 ± 0,1	417,2 ± 27,7	429,1 ± 28,9	1,3	1,3
30	6,3 ± 0,1	6,5 ± 0,3	675,5 ± 39,2	715,1 ± 40,1	0,9	0,9

Wyniki przedstawiono w wartościach średnich  $\bar{x} \pm SD$

n = 8

\* p < 0,01



### Aktywność acetylocholinoesterazy

#### Badania biochemiczne:

Podczas rozwoju królików kontrolnych w mózgu następował stopniowy wzrost aktywności AChE. Między 6 a 15 dniem życia przyrost tej aktywności wynosił 64,4% /tabela 3/. W dalszym rozwoju mózgu tempo przyrostu aktywności było znacznie wolniejsze. Między 15 a 30 dniem życia aktywność enzymu wzrastała już tylko o około 30% /tabela 5/.

Wybrane dawki dichlorfosu, które u zwierząt od 6 do 15 dnia życia wywoływały średnie nasilenie objawów zatrucia /tabela 1/, podane jednorazowo w określonych dniach rozwoju blokowały od 65 do 73% aktywności AChE w mózgu /tabela 3/. Aktywność AChE u królików, poddanych działaniu dichlorfosu przez 10 kolejnych dni życia, spadała w całym mózgu do 30% wartości kontrolnych /tabela 4/. Natomiast w badanych okolicach mózgu wahała się od 27 do 40%. Najwięcej enzymu ulegało zablokowaniu w pniu mózgu /73%/, najmniej w korze pólkul mózgowych /60%/ /tabela 4/.

W ciągu kolejnych 15 dni, po podaniu ostatniej dawki dichlorfosu obserwowano w mózgach zatrutych zwierząt stopniową odnowę aktywności enzymu /tabela 5/. W tym czasie AChE wzrastała ponad trzykrotnie i w 30 dniu życia osiągała aktywność równą tej jaką obserwowano w mózgach 15 dniowych zwierząt kontrolnych. Pozostawała jednak nadal znamienne niższa niż w mózgach 30 dniowych zwierząt kontrolnych /tabela 5/.



Tabela 3

Aktywność acetylocholinoesterazy /AChE/ w mózгах królików  
po 1 godzinie od podania jednorazowej dawki dichlorfosu  
w kolejnych dniach rozwoju

Dni życia	Dawka DDVP	Aktywność AChE nmol AcThCh/mg białka/min		AChE % kontroli
		Kontrola	DDVP	
6	4 mg/kg	50,3 ± 9,2	15,5 ± 2,7	30,8
7	"-	49,7 ± 7,4	17,3 ± 3,5	34,8
8	"-	59,8 ± 9,7	18,7 ± 3,3	31,2
9	6 mg/kg	58,2 ± 6,9	15,5 ± 3,1	26,6
10	"-	69,2 ± 5,9	24,2 ± 5,2	34,9
11	"-	61,2 ± 7,7	18,4 ± 3,2	30,0
12	8 mg/kg	70,8 ± 8,3	21,9 ± 3,4	30,9
13	"-	75,3 ± 7,4	22,6 ± 2,8	30,0
14	"-	72,3 ± 8,9	23,1 ± 2,2	31,9
15	"-	82,7 ± 9,9	27,3 ± 5,3	33,0

Wyniki podano w wartościach średnich  $\bar{x} \pm SEM$

n = 5

AcThCh - acetylotiocholina, substrat



Tabela 4

Aktywność acetylocholinoesterazy /AChE/ w mózgach królików po 1 godzinie od podania ostatniej dawki dichlorfosu /DDVP/

	Aktywność AChE nmol AcThCh/min/mg białka		AChE % kontroli
	Kontrola	DDVP	
Kora mózgu	48,8 ± 8,8	19,5 ± 2,2*	40
Hipokamp	69,4 ± 12,6	26,4 ± 4,3*	38
Zwoje podstawy	162,6 ± 29,5	52,1 ± 8,6*	32
Sródmózgowie	95,4 ± 17,3	28,6 ± 4,7*	30
Pień mózgu	87,8 ± 15,9	23,7 ± 3,9*	27
Cały mózg	83,5 ± 15,1	25,1 ± 4,1*	30

Wyniki przedstawiono w wartościach średnich  $\bar{x} \pm$  SEM

n = 8

\* p < 0,01

AcThCh - acetylotiocholina, substrat



Tabela 5

Odnowa aktywności acetylocholinoesterazy /AChE/  
w mózgach królików w kolejnych dniach po podaniu  
ostatniej dawki dichlorfosu /DDVP/

Dni życia	Czas przeżycia /w dobach/	Aktywność AChE nmol AcThCh/mg białka/min		AChE § kontroli
		Kontrola	DDVP	
15	0	83,5 ± 15,1	25,1 ± 4,1**	30
18	3	88,9 ± 7,1	43,9 ± 9,9**	47
21	6	96,0 ± 6,7	62,6 ± 8,3**	65
24	9	101,1 ± 6,3	69,2 ± 6,7**	69
27	12	105,7 ± 6,0	78,7 ± 8,6*	76
30	15	108,3 ± 6,7	84,2 ± 6,6*	78

Wyniki przedstawiono w wartościach średnich  $\bar{x} \pm SEM$

n = 8

\* p < 0,05 \*\* p < 0,01

AcThCh - acetylotiocholina, substrat



#### Badania histochemiczne:

Wyniki badań histochemicznych przedstawione zostały na rycinach H-1 - H-13 /album/.

#### Aktywność AChE w mózgach zwierząt kontrolnych

U królików w 15 dniu życia rozmieszczenie AChE w strukturach mózgu było ostatecznie ustalone. Dalszy przyrost aktywności jaki obserwowano między 15 a 30 dniem życia nie zmieniał tej lokalizacji i wpływał jedynie na intensywność odczynu histochemicznego w niektórych okolicach mózgu.

W strukturach tkankowych pobranych na poziomie pnia mózgu silny odczyn histochemiczny występował w obrębie istoty szarej środkowej, jąder nerwów przedsionkowych oraz jądra nerwu trójdzielonego. Pozostałe okolice miały na tym przekroju nieco niższą aktywność enzymu, głównie w neuropilu /ryc. H-3/.

Lokalizacja aktywności AChE w korze mózdzku była różna w zależności od badanej okolicy. W archicerebellum silną reakcję histochemiczną obserwowano zarówno w warstwie ziarnistej wewnętrznej jak i w warstwie molekularnej. W pozostałych okolicach AChE występowała głównie w warstwie ziarnistej wewnętrznej natomiast w warstwie molekularnej aktywność enzymu była znacznie słabsza i zajmowała zwykle dolną 1/3 część tej warstwy sąsiadującej z warstwą komórek Purkinjego. W tych ostatnich nie obserwowano aktywności AChE /ryc. H-3/.

W śródmózgowiu, na poziomie wzgórków górnych blaszki czworaczej najwyższa aktywność AChE występowała w warstwach istoty



szarej tych wzgórków, w istocie czarnej, w zespole jąder nerwu okoruchowego oraz w jądrze międzykonarowym /ryc. H-5/. W okolicy jądra czerwienego neuropil wybarwiał się słabiej, dzięki czemu widoczna była wysoka aktywność enzymu w perykarionach komórek nerwowych.

Na wszystkich przekrojach przez półkule mózgowe bardzo silną reakcję histochemiczną obserwowano w jądrze ogoniastym i skorupie oraz w sektorach H<sub>2</sub> i H<sub>3</sub> hipokampa /ryc. H-8, H-11, H-13/.

W przedniej okolicy wzgórza wzrokowego najsilniejsza aktywność enzymu występowała w jądrze przednim grzbietowym i w jądrze przednim brzuszny /ryc. H-13/.

W środkowej okolicy wzgórza AChE lokalizowała się głównie w perykarionach komórek nerwowych a mniej w neuropilu /ryc. H-11/.

W tylnej okolicy wzgórza wzrokowego: jądra ciał kolankowatych bocznych, istota czarna, część centralna jądra brzuszno oraz jądra tylne wzgórza należały do struktur najbogatszych w enzym /ryc. H-8/.

W ciele migdałowatym intensywność odczynu histochemicznego zmianała się w zależności od poziomu, z którego pobrano skrawek tkankowy, ponieważ poszczególne jądra tej struktury zawierały różną aktywność AChE.



Aktywność AChE w mózgach królików  
po 1 godzinie od podania ostatniej dawki dichlorfosu

Na wszystkich badanych przekrojach mózgowych aktywność AChE była bardzo niska.

W rdzeniu przedłużonym niewielki stopień aktywności zachował się w obrębie istoty szarej środkowej i w jądrach nerwów przedsionkowych /ryc. H-1/.

W mózdzku obecność AChE zaznaczała się w warstwie ziarnistej wewnętrznej kory /ryc. H-1/.

Na przekrojach przez półkule mózgowie wyraźną aktywność enzymu zachowało prążkowie /ryc. H-9/ oraz struktury szare śródmózgowia /ryc. H-4/.

Aktywność AChE w mózgach królików  
po 3 dobach od podania ostatniej dawki dichlorfosu

Początkowo, odnowa aktywności AChE widoczna była tylko w nielicznych okolicach mózgu. Enzym pojawił się ponownie w kilku jądrach wzgórza wzrokowego. W przedniej okolicy wzgórza słabą aktywność AChE obserwowano w jądrze przednim brzuszonym i jądrze przednim grzbietowym /ryc. H-12/. W pozostałej części wzgórza obecność enzymu zaznaczyła się w obrębie jądra przysrodkowego oraz jądra brzuszego /ryc. H-10/. Narastała również aktywność enzymu w prążkowie i hipokampie /ryc. H-12/.



Aktywność AChE w mózgach królików  
po 6 dobach od podania ostatniej dawki dichlorfosu

Aktywność AChE pojawiła się już w większości struktur mózgowych, które wykazywały jej obecność w mózgach zwierząt kontrolnych. Charakterystyczną cechą odnowy enzymu w tym okresie, była lokalizacja aktywności głównie w perykarionach komórek nerwowych. W neuropilu wielu okolic mózgu aktywność AChE była ciągle niska /ryc. H-2 i H-6/.

Aktywność AChE w mózgach królików  
po 12 dobach od podania ostatniej dawki dichlorfosu

Obserwowano pełny powrót aktywności AChE w komórkach i neuropilu wszystkich struktur mózgowych /ryc. H-7/. Intensywność odczynów histochemicznych była podobna do tej jaka występowała w mózgach zwierząt kontrolnych. Ilościowe różnice aktywności enzymu trudne były do obiektywnej oceny.

Metabolizm serotoniny  
/5-hydroksytryptaminy, 5-HT/

Stężenie tryptofanu /TP/

Wyniki badań stężenia TP w mózgach królików przedstawiono na wykresie 1, natomiast stężenie w poszczególnych okolicach w tabeli 6.



Wykres 1. Stężenie tryptofanu w mózgu królików w kolejnych dniach po podaniu ostatniej dawki dichlorofosu /DDVP/

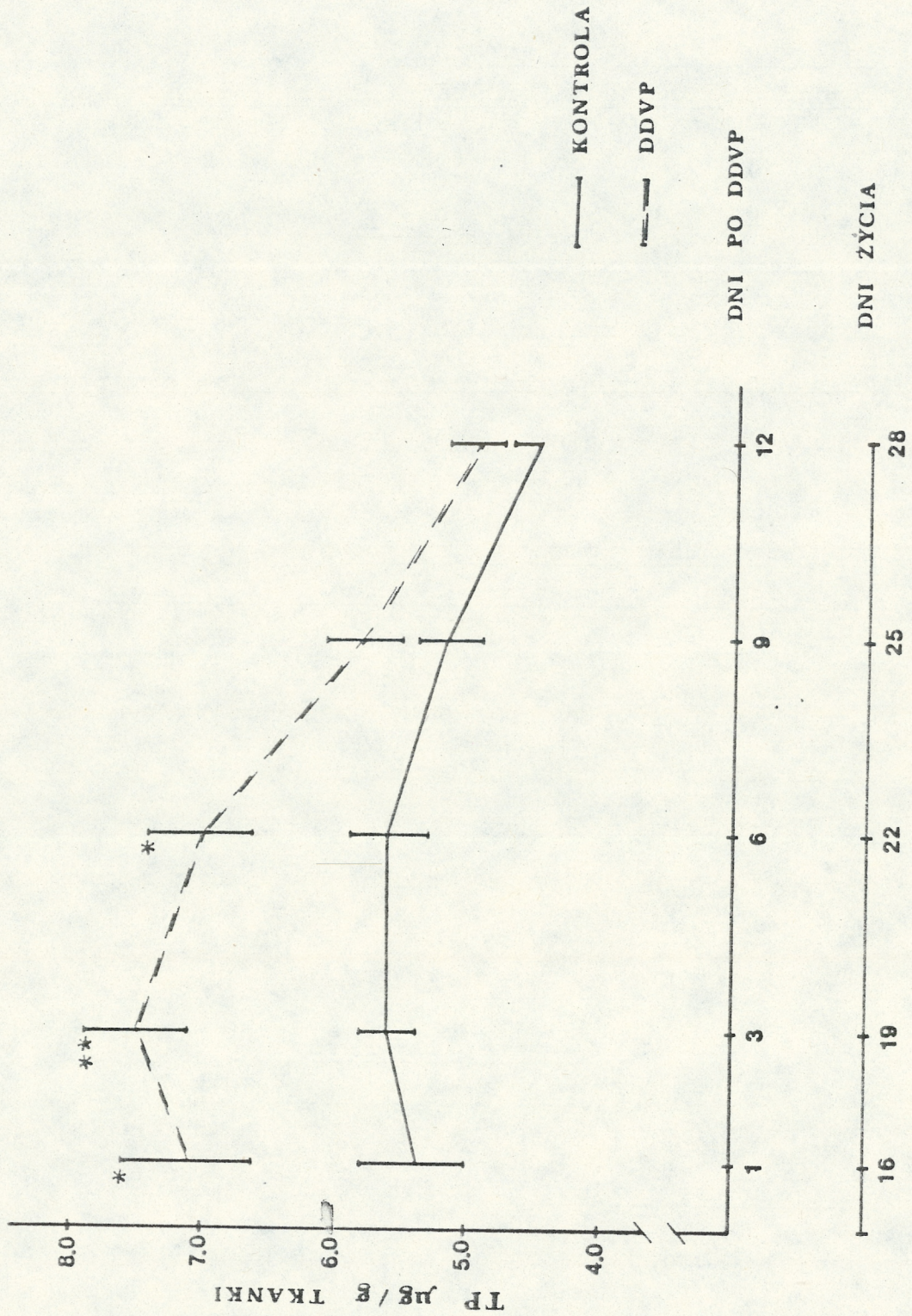




Tabela 6

Stężenie tryptofanu  
w wybranych okolicach mózgu królików  
24 godziny po podaniu  
ostatniej dawki dichlorfosu /DDVP/

	Tryptofan $\mu\text{g/g}$ tkanki	
	Kontrola	DDVP
Kora mózgu	3,63 $\pm$ 0,27	5,08 $\pm$ 0,38**
Hipokamp	3,57 $\pm$ 0,25	5,17 $\pm$ 0,37**
Zwoje podstawy	4,73 $\pm$ 0,35	6,15 $\pm$ 0,44*
Śródmózgowie	4,42 $\pm$ 0,49	5,79 $\pm$ 0,42*
Pień mózgu	5,72 $\pm$ 0,43	7,26 $\pm$ 0,52*

Wyniki przedstawiono w wartościach średnich  $\bar{x} \pm \text{SEM}$

n = 8

\*  $p < 0,05$     \*\*  $p < 0,01$



W mózгах królików kontrolnych w 16 dniu życia średnie  $\bar{x} \pm \text{SEM}$  stężenie tryptofanu wynosiło  $5,39 \pm 0,46 \mu\text{g/g}$  tkanki. Najwyższy poziom TP występował w pniu mózgu  $5,72 \pm 0,43 \mu\text{g/g}$ , a najniższy w hipokampie  $3,57 \pm 0,25 \mu\text{g/g}$ . Między 16 a 22 dniem życia stężenie aminokwasu pozostawało na stałym poziomie  $/5,39 \pm 0,46 - 5,58 \pm 0,32/$ . Począwszy od 22 dnia życia obserwowano łagodny spadek poziomu TP i w 28 dniu życia królików wynosił on  $4,5 \pm 0,25 \mu\text{g/g}$  badanej tkanki mózgowej.

U królików, które otrzymywały dichlorfos, stężenie TP w mózgu w 16 dniu życia, czyli 24 godziny po otrzymaniu ostatniej dawki pestycydu, było znamienne wyższe niż u zwierząt kontrolnych i wynosiło  $7,18 \pm 0,56 \mu\text{g/g}$  tkanki. Poziom TP najbardziej wzrastał w hipokampie /o około 45%/, najmniej w pniu mózgu /o około 27%/. Znamienne wysokie stężenie TP utrzymywało się do 22 dnia życia, a następnie spadało do wartości  $4,95 \pm 0,27 \mu\text{g/g}$  tkanki w 28 dniu życia zwierząt.

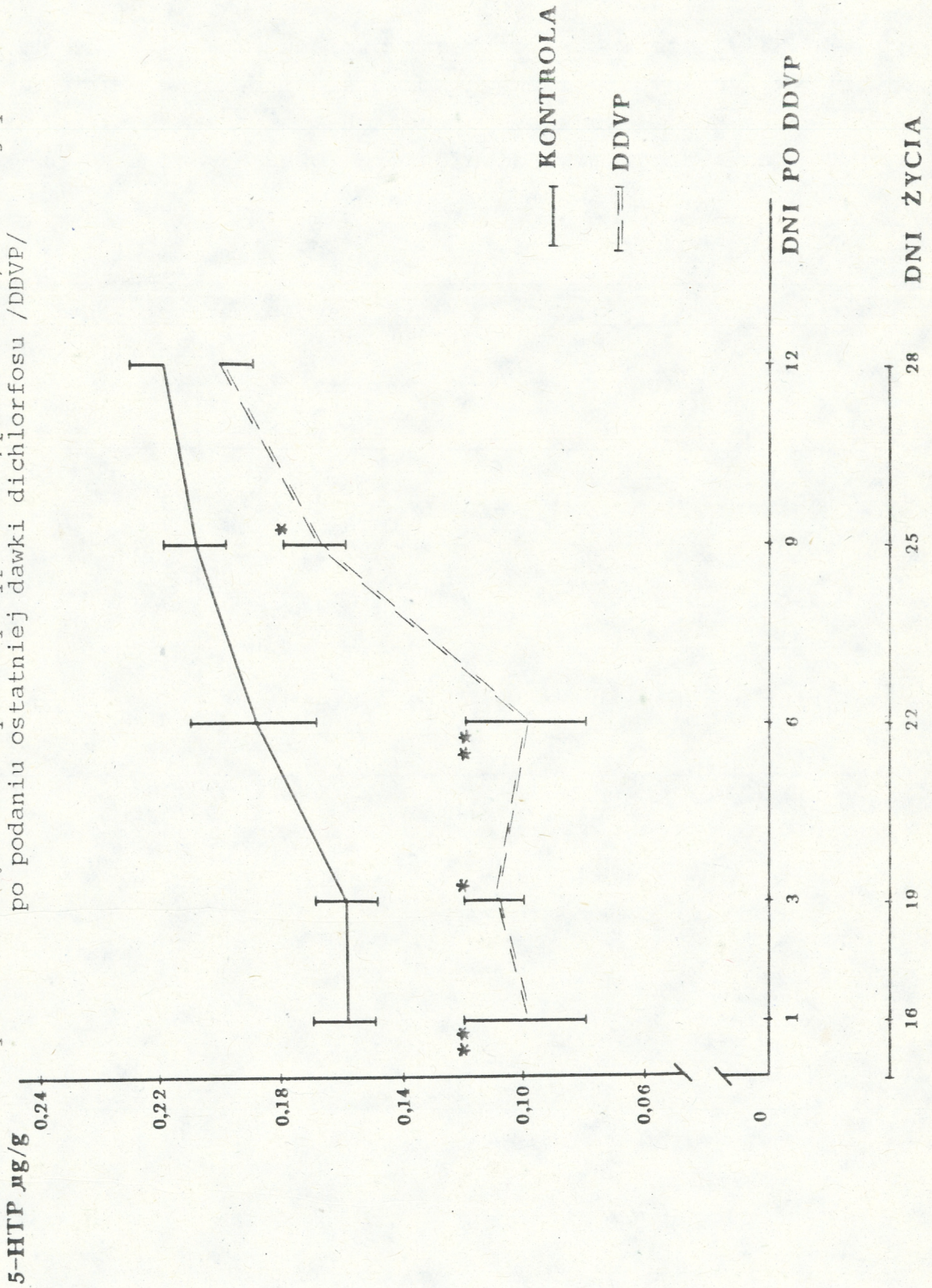
#### Aktywność hydroksylazy tryptofanowej

Aktywność hydroksylazy tryptofanowej w mózгах królików przedstawiono na wykresie 2, natomiast aktywność enzymu w poszczególnych okolicach mózgu w tabeli 7.

W mózгах kontrolnych królików między 16 a 28 dniem życia następował wzrost aktywności hydroksylazy tryptofanowej, wyrażający się przyrostem stężenia 5-hydroksytryptofanu /5-HTP/ o około 38%. W 16 dniu życia poziom 5-HTP  $\bar{x} \pm \text{SEM}$  w całym



Wykres 2. Stężenie 5-hydrokсыtryptofanu /po NSD-1015/ w kolejnych dniach po podaniu ostatniej dawki dichlorofosu /DDVP/



Wyniki podano w wartościach średnich  $\bar{x} \pm SEM$  /n = 8-10/  
p 0,05 p 0,01



Tabela 7

Stężenie 5-hydroksytryptofanu  
w wybranych okolicach mózgu królików  
24 godziny po podaniu  
ostatniej dawki dichlorfosu /DDVP/

	5-hydroksytryptofan µg/g tkanki	
	Kontrola	DDVP
Kora mózgu	0,17 ± 0,02	0,13 ± 0,01*
Hipokamp	0,18 ± 0,02	0,11 ± 0,02*
Zwoje podstawy	0,23 ± 0,02	0,15 ± 0,03*
Śródmózgowie	0,27 ± 0,03	0,14 ± 0,03**
Pień mózgu	0,35 ± 0,05	0,19 ± 0,02*

Wyniki przedstawiono w wartościach średnich  $\bar{x} \pm$  SEM

n = 8-10

\* p < 0,05

\*\* p < 0,01



mózgu wynosił  $0,16 \pm 0,01 \mu\text{g/g}$  badanej tkanki. Z badanych struktur, najwięcej 5-HTP znajdowało się w pniu mózgu  $0,35 \pm 0,05 \mu\text{g/g}$ , a najmniej w korze mózgu  $0,17 \pm 0,02 \mu\text{g/g}$ . W 28 dniu życia mózgi królików zawierały 5-HTP  $0,22 \pm 0,01 \mu\text{g/g}$  mokrej masy tkanki. U zwierząt, które otrzymywały dichlorfos aktywność hydroksylazy tryptofanowej była obniżona. Najniższy poziom 5-HTP występował 24 godziny po podaniu ostatniej dawki pestycydu i wynosił  $0,10 \pm 0,02 \mu\text{g/g}$  badanej tkanki mózgowej. W poszczególnych okolicach mózgu u 16 dniowych królików stężenie 5-HTP było niższe od kontrolnego o 24-48%. Podczas następnych dni życia obserwowano stopniowy powrót poziomu 5-HTP do prawidłowych wartości. Mimo to aż do 25 dnia życia pozostawał on statystycznie znamienne niższy niż w kontroli.

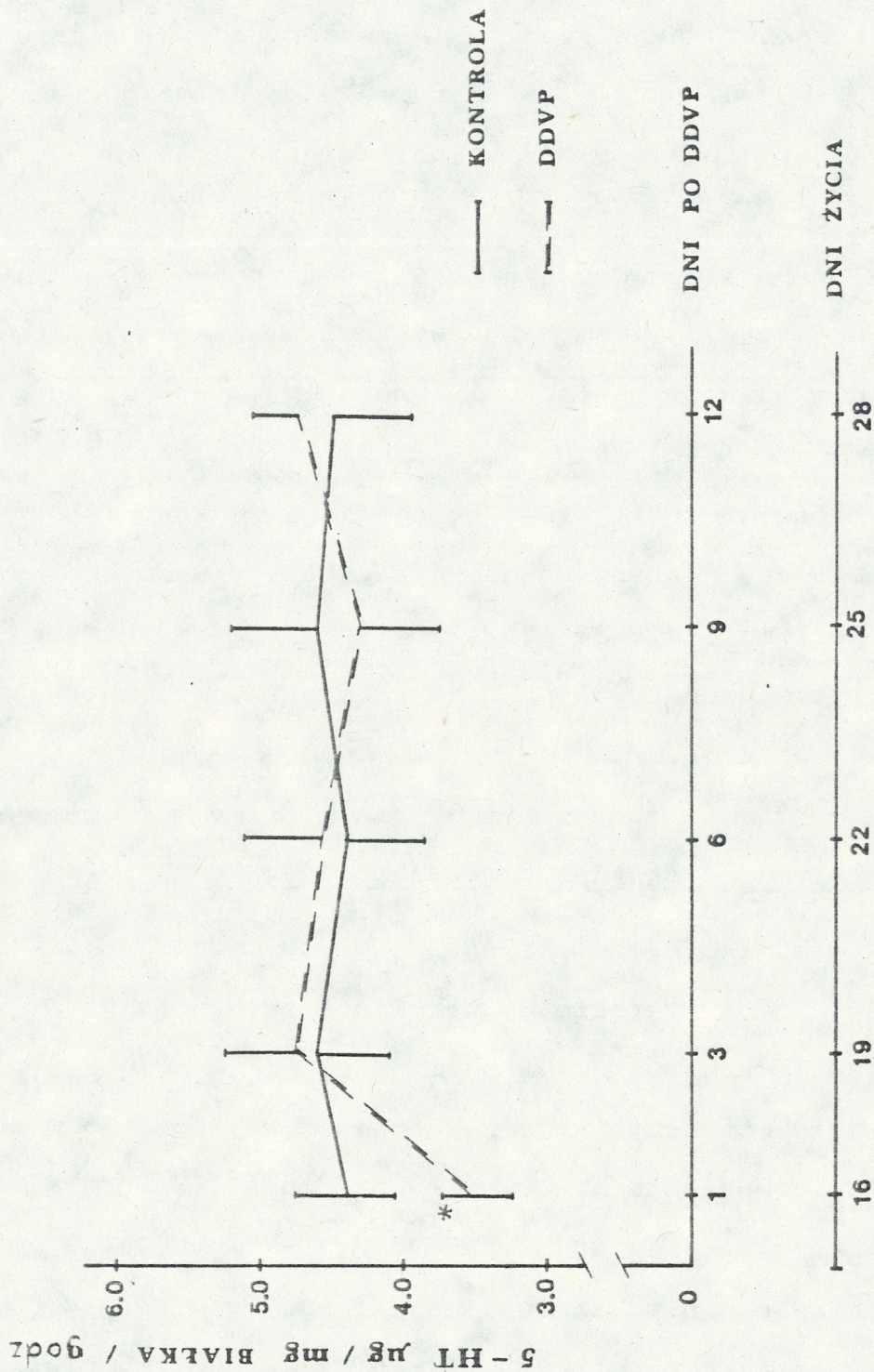
#### Aktywność oksydazy monoaminowej /MAO/

Wyniki badań aktywności MAO w mózгах królików przedstawiono na wykresie 3, natomiast aktywność MAO w poszczególnych okolicach mózgu w tabeli 8.

W mózгах kontrolnych królików między 16 a 28 dniem życia aktywność MAO nie ulegała istotnym zmianom. W 16 dniu życia aktywność jej wynosiła  $4,4 \mu\text{g 5-HT/mg białka/godz}$  i była najniższa w hipokampie  $3,68 \mu\text{g 5-HT/mg białka/godz}$ , a najwyższa w zwojach podstawy  $5,32 \pm 0,32 \mu\text{g 5-HT/mg białka/godz}$ . W 28 dniu życia aktywność MAO wynosiła  $4,49 \pm 0,56 \mu\text{g 5-HT/mg białka/godz}$ . W mózгах królików, które otrzymywały dichlorfos,



Wykres 3. Aktywność oksydazy monoaminowej / $\mu\text{g}$  5-HT/mg białka/godz w mózgach królików w kolejnych dniach po podaniu ostatniej dawki dichlorofosu /DDVP/



Wyniki podano w wartościach średnich  $\bar{x} \pm \text{SEM}$  /n = 8/

p < 0,05



Tabela 8

Aktywność oksydazy monoaminowej /MAO/  
w wybranych okolicach mózgu królików  
24 godziny po podaniu  
ostatniej dawki dichlorfosu /DDVP/

	oksydaza monoaminowa µg 5-HT/mg białka/godz	
	Kontrola	DDVP
Kora mózgu	4,16 ± 0,28	3,12 ± 0,21**
Hipokamp	3,68 ± 0,18	3,05 ± 0,15*
Zwoje podstawy	5,32 ± 0,32	4,36 ± 0,27*
Śródmózgowie	5,41 ± 0,33	4,43 ± 0,27*
Pień mózgu	5,03 ± 0,34	3,67 ± 0,25**

Wyniki przedstawiono w wartościach średnich  $\bar{x} \pm$  SEM

n = 8

\*  $p < 0,05$

\*\*  $p < 0,01$



aktywność MAO była znamienne niższa od kontroli jedynie 24 godziny po podaniu ostatniej dawki pestycydu. W całym mózgu wynosiła 3,47  $\mu\text{g}$  5-HT/mg białka/godz i była niższa od aktywności MAO w badanych okolicach mózgu zwierząt kontrolnych o 17-27%.

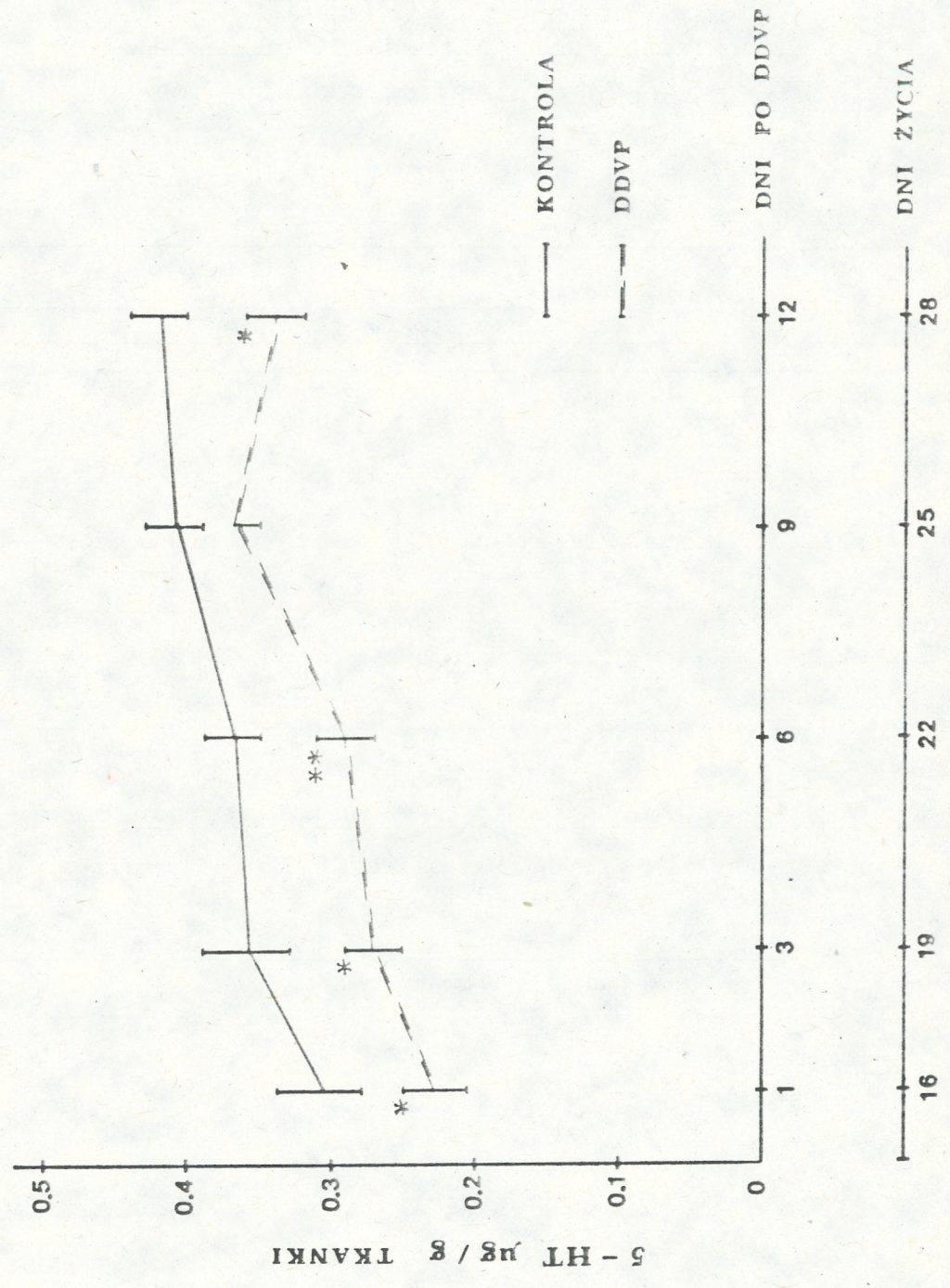
#### Serotonina /5-hydroksytryptamina, 5-HT/

Wyniki badań stężenia 5-HT w mózгах królików przedstawiono na wykresie 4, natomiast stężenie 5-HT w poszczególnych okolicach mózgu w tabeli 9.

W mózгах zwierząt kontrolnych między 16 a 28 dniem życia stężenie serotoniny wzrastało o 35,5%. W 16 dniu życia poziom 5-HT  $/\bar{x} \pm \text{SEM}/$  wynosił  $0,31 \pm 0,03 \mu\text{g/g}$  mokrej masy tkanki. Najwyższe stężenie tej indoloaminy występowało w pniu mózgu  $0,41 \pm 0,04 \mu\text{g/g}$ , a najniższe w korze mózgu  $0,15 \pm 0,01 \mu\text{g/g}$ . W 28 dniu życia mózgi zwierząt zawierały  $0,42 \pm 0,02 \mu\text{g/g}$  tkanki serotoniny. W mózгах zwierząt, które otrzymywały dichlorfos poziom 5-HT w 16 dniu życia wynosił  $0,23 \pm 0,02 \mu\text{g/g}$  tkanki. W badanych okolicach mózgu, w tym dniu życia był on niższy o około 22-45% od poziomu serotoniny u równieśników kontrolnych. W następnych dniach obserwowano stopniowy wzrost stężenia serotoniny i w 28 dniu życia wynosiło ono  $0,42 \pm 0,02 \mu\text{g/g}$  tkanki, mimo to było znamienne niższe niż u królików kontrolnych.



Wykres 4. Stężenie serotoniny w mózgu królików w kolejnych dniach po podaniu ostatniej dawki dichlorofosu /DDVP/



Wyniki podano w wartościach średnich  $\bar{x} \pm \text{SEM}$  /n = 8/  
 $p < 0,05$      $p < 0,01$



Tabela 9

Stężenie serotoniny /5-HT/  
w wybranych okolicach mózgu królików  
24 godziny po podaniu  
ostatniej dawki dichlorfosu /DDVP/

	Serotonina /5-HT/ $\mu\text{g/g}$	
	Kontrola	DDVP
Kora mózgu	0,15 $\pm$ 0,01	0,11 $\pm$ 0,01*
Hipokamp	0,17 $\pm$ 0,02	0,11 $\pm$ 0,01*
Zwoje podstawy	0,27 $\pm$ 0,02	0,21 $\pm$ 0,01*
Śródmózgowie	0,38 $\pm$ 0,04	0,21 $\pm$ 0,03**
Pień mózgu	0,41 $\pm$ 0,04	0,24 $\pm$ 0,03**

Wyniki przedstawiono w wartościach średnich  $\bar{x} \pm \text{SEM}$

n = 8

\*  $p < 0,05$       \*\*  $p < 0,01$



### Kwas 5-hydroksyindoloocetowy /5-HIAA/

Wyniki badań stężenia 5-HIAA w mózgach królików przedstawiono na wykresie 5, a stężenie 5-HIAA w poszczególnych okolicach mózgu w tabeli 10.

W mózgach kontrolnych królików poziom 5-HIAA między 16 a 28 dniem życia nie ulegał istotnym zmianom. W 16 dniu życia wynosił  $0,33 \pm 0,02$   $\mu\text{g/g}$  mokrej masy tkanki i był najwyższy w pniu mózgu  $0,55 \pm 0,07$   $\mu\text{g/g}$ , a najniższy w korze mózgu  $0,19 \pm 0,01$   $\mu\text{g/g}$  tkanki. Stężenie 5-HIAA w mózgach zwierząt 28 dniowych wynosiło  $0,36 \pm 0,03$   $\mu\text{g/g}$  tkanki. U zwierząt, które otrzymywały dichlorfos, najniższy poziom 5-HIAA występował w 16 dniu życia  $0,18 \pm 0,03$   $\mu\text{g/g}$  tkanki i był niższy od poziomu kontrolnego o 24-50% we wszystkich badanych okolicach mózgu. Do 22 dnia życia pozostawał znacznie niższy od stężenia 5-HIAA w mózgach królików kontrolnych a następnie szybko zbliżał się do wartości prawidłowych.

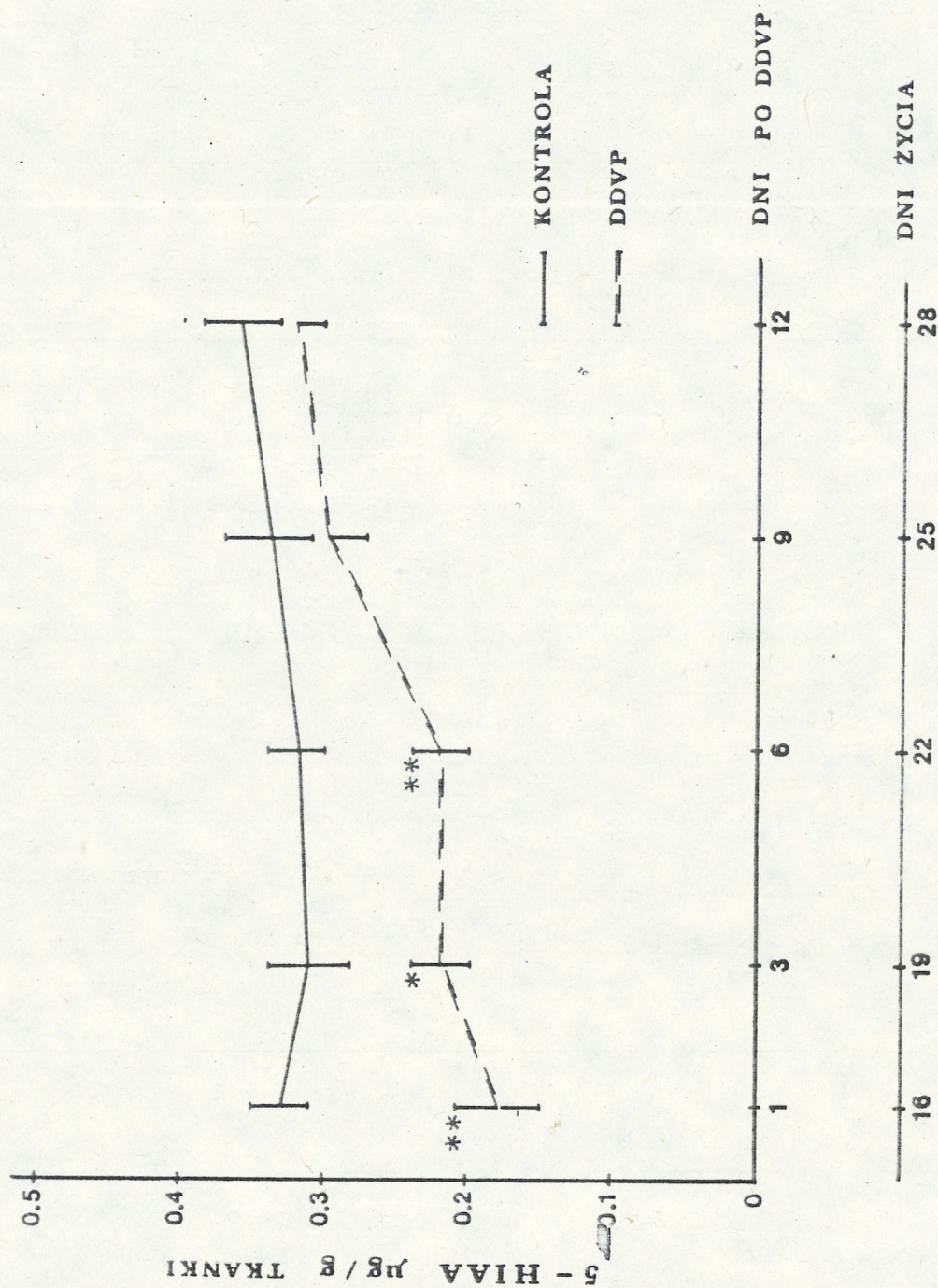
### Obrót serotoniny /5-HT/

U królików, które badano 24 godziny po podaniu ostatniej dawki dichlorfosu stężenie serotoniny w mózgu  $0,23 \pm 0,02$  było znacznie niższe  $/p < 0,05/$  niż u rówieśników kontrolnych  $0,31 \pm 0,03$  /tabela 11/.

Obrót 5-HT obliczano ze wzrostu stężenia tej substancji w mózgu po zablokowaniu przez tranylcyprominę oksydazy mono-



Wykres 5. Stężenie kwasu 5-hydroksyindolooctowego w mózgu królików w kolejnych dniach po podaniu ostatniej dawki dichlorofosu /DDVP/



Wyniki podano w wartościach średnich  $\bar{x} \pm \text{SEM}$  /n = 8/  
p < 0,05    p < 0,01



Tabela 10

Stężenie kwasu 5-hydroksyindolooctowego /5-HIAA/  
w wybranych okolicach mózgu królików  
24 godziny po podaniu  
ostatniej dawki dichlorfosu /DDVP/

	kwas 5-hydroksyindolooctowy $\mu\text{g/g}$	
	Kontrola	DDVP
Kora mózgu	0,19 $\pm$ 0,01	0,14 $\pm$ 0,01**
Hipokamp	0,21 $\pm$ 0,02	0,16 $\pm$ 0,01*
Zwoje podstawy	0,25 $\pm$ 0,01	0,19 $\pm$ 0,01*
Śródmózgowie	0,42 $\pm$ 0,06	0,21 $\pm$ 0,05*
Pień mózgu	0,55 $\pm$ 0,07	0,29 $\pm$ 0,04**

Wyniki przedstawiono w wartościach średnich  $\bar{x} \pm \text{SEM}$

n = 8

\*  $p < 0,05$       \*\*  $p < 0,01$



Tabela 11

Obrót serotoniny /5-HT/ w mózгах królików  
24 godziny po podaniu  
ostatniej dawki dichlorfosu /DDVP/

	Kontrola	Dichlorfos	
Poziom 5-HT w czasie 0 ( $\mu\text{g/g/godz}$ ) $\bar{x} \pm \text{SEM}$	0,31 $\pm$ 0,03	0,23 $\pm$ 0,02*	
Współczynnik regresji 5-HT K( $\text{godz}^{-1}$ ) $\bar{x} \pm \text{SEM}$	0,344 $\pm$ 0,02	0,270 $\pm$ 0,02*	
Wartość obrotu 5-HT	ng/g/godz	106,64	62,10
	nmol/g/godz	0,605	0,352
Czas obrotu (godz)	2,9	3,7	

\*  $p < 0,05$



aminowej. U zwierząt, które otrzymywały dichlorfos wartość współczynnika regresji 5-HT wynosiła  $0,270 \pm 0,02$  i była znamienne  $/p < 0,05/$  niższa od współczynnika wyliczonego dla grupy zwierząt kontrolnych  $/0,344 \pm 0,02/$ .

Wartość obrotu 5-HT wyrażona w nanomolach 5-HT na gram mokrej masy tkanki na godzinę była o około 42% niższa niż w grupie zwierząt kontrolnych, natomiast czas obrotu 5-HT był o 48 min dłuższy niż w kontroli.

#### Badania morfologiczne:

Badania prowadzone w mikroskopie świetlnym nie wykazały obecności zmian ogniskowych w mózgach obu grup królików /16 i 30 dniowych/ zatrutych DDVP. Jedynie istota biała półkul mózgowych wybarwiała się słabiej przy zastosowaniu metody Klüvera.

W mikroskopie elektronowym natomiast obserwowano zmiany we wszystkich elementach badanej tkanki nerwowej. Wyniki badań ultrastrukturalnych przedstawiono na rycinach M-1 - M-28 /album/.

#### Neuropil

W grupie zwierząt 16 dniowych, wypustki komórkowe zawierały bardzo liczne, ciemne wydłużone mitochondria /ryc. M-6/. Ułożone ciasno jedno obok drugiego wypełniały często całą



przeźren wypustki. Niektóre z nich były miejscowo poszerzone i zawierały elektronowo-puste przeźrenie. W innych wypustkach spotykano liczne ciała gęste /ryc. M-7, M-8/, nieregularne wakuole /ryc. M-7/, uszkodzone mitochondria /ryc. M-9/. W wielu wypustkach widoczne były liczne złogi barwnika prawdopodobnie lipofuscyny, w postaci drobnoziarnistych tworów zawierających jasne krople tłuszczu /ryc. M-9/.

Zakończenia nerwowe: obserwowano różne stadia zwyrodnienia kolbek presynaptycznych. Pęcherzyki synaptyczne w tych kolbkach skupiały się często w pobliżu dużych elektronowociemnych tworów, z dala od błon presynaptycznych /ryc. M-10/. Twory te zajmowały znaczną przeźren kolbki. Otoczone wyraźną błoną, składały się z mniejszych podjednostek. We wnętrzu widoczne były zarysy struktur przypominających małe, okrągłe pęcherzyki /ryc. M-10/. W niektórych zakończeniach nerwowych znajdowały się liczne ciała gęste zawierające homogenną, ciemną masę lub liczne blaszki /ryc. M-11/. W wielu kolbkach widoczne były uszkodzone mitochondria /ryc. M-12, M-13/. Zwyrodnienie zakończeń nerwowych /ryc. M-13/ obserwowano często w sąsiedztwie obumierających komórek nerwowych. Zmiany w postsynaptycznych częściach zakończeń nerwowych charakteryzowały się obecnością dużych, wielokształtnych elektronowopustych kanałów - wakuoli /ryc. M-14, M-15/.

Włókna nerwowe: uszkodzenia aksonów należały do najbardziej charakterystycznych zmian powstających w tkance nerwowej OUN pod wpływem dichlorfosu. Nasilenie tych zmian było



niezależne od przekroju włókna nerwowego /ryc. M-16/. Można było wyróżnić trzy rodzaje uszkodzeń aksonów. Jeden z nich polegał na stopniowym gromadzeniu się w aksoplazmie neurofilamentów, które wypełniały ostatecznie cały przekrój włókna /ryc. M-16, M17/. W zbitej ciemnej masie włókienek widoczne były uszkodzone mitochondria w postaci elektronowo-pustych wakuoli, czasem z resztkami rozpadających się grzebieni na obwodzie /ryc. M-16, M-17/.

Inny rodzaj zmian charakteryzował się dużym zniekształceniem aksonu i powstaniem w jego wnętrzu licznych, elektronowo-pustych wakuoli, prawdopodobnie na skutek zwyrodnienia mitochondriów /ryc. M-18/. Resztki zachowanej aksoplazmy zawierały liczne włókienka śródplazmatyczne.

Stosunkowo rzadko spotykano trzeci typ uszkodzeń. W aksoplazmie widoczne były wtedy liczne ciała gęste, degenerujące organelle i włókienka śródplazmatyczne /ryc. M-19/.

Osłonki mielinowe: zmiany w nich były znacznie mniej nasilone niż w aksonach. Otaczając ciężko uszkodzone włókno, osłonki zachowywały często prawidłową strukturę blaszek /ryc. M-19/. Pierwszym objawem zachodzących w nich zmian były miejscowe rozwarstwienia i pofałdowania blaszek /ryc. M-16, M-17/. Zaawansowaną degenerację osłonek z tworzeniem się ziarnistych produktów rozpadu mieliny spotykano sporadycznie i zwykle w grupie zwierząt 30 dniowych /ryc. M-20/.



## Perykariony

Nasilenie zmian w perykarionach było umiarkowane. W cytoplazmie większości komórek widoczne były bardzo liczne, ciemne mitochondria /ryc. M-21/. Niektóre z nich ulegały zwyrodnieniu, były duże, często elektronowo-puste, z częściowo zachowanymi grzebieniami na obwodzie, kontrastowały więc z zagęszczoną strukturą cytoplazmy komórki /ryc. M-24/. W cytoplazmie występowały liczne wolne ribosomy /ryc. M-21, M-23, M-24/, poszerzone kanały siatki śródplazmatycznej /ryc. M-22, M-23/, lizosomy i ciała gęste /ryc. M-21, M-23, M-24/. Jądra wielu komórek miały kształt nieregularny /ryc. M-21, M-23/. Zawierały wielokształtne twory, które w postaci pofałdowanych gładkich błon układały się na obwodzie ogniskowych przejaśnień karioplazmy /ryc. M-23/ lub jako ciemne, ziemiste błony tworzyły rozgałęzione struktury /ryc. M-24/.

W grupie zwierząt 16 dniowych spotykano perykariony komórek prawdopodobnie astrocytarnych /ryc. M-25/, których cytoplazma zawierała pojedyncze zniekształcone organelle a struktura macierzy była rozrzedzona i elektronowo-pusta. Komórek tego typu nie spotykano u zwierząt 30 dniowych.

Liczną grupę stanowiły komórki ciemne. Były to perykariony komórek nerwowych /ryc. M-26/. W bardzo ciemnej, ziarnistej cytoplazmie występowały liczne, długie kanały siatki śródplazmatycznej, kanały dobrze rozwiniętego aparatu Golgiego, a w jądrze wyraźne jąderko. Na obwodzie komórki widoczne były liczne obrzmiałe uszkodzone zakończenia nerwowe /ryc. M-13,



M-26/. Jądro komórki miało kształt nieregularny a karioplazmę zagęszczoną i ciemną. Cytoplazma komórki zawierała dość liczne lizosomy. Z powierzchnią jej sąsiadowały włókna nerwowe o prawidłowej budowie aksonu i osłonki mielinowej /ryc. M-26/. Spotykano ponadto komórki o bardzo zaawansowanych zmianach zwyrodnieniowych /ryc. M-27/. Ich ciemna, ziarnista cytoplazma zawierała bardzo liczne lizosomy i elektronowo-puste przestrzenie. Jądro o nieregularnym kształcie wypełniała bardzo ciemna, ziarnista karioplazma /ryc. M-27/. Nieliczne komórki tego typu spotykano również u 30-dniowych królików kontrolnych.

#### Naczynia krwionośne

Ściany naczyń krwionośnych mózgu były dobrze zachowane. W grupie zwierząt 16 dniowych w przestrzeniach okołonaczyniowych występowały obrzmiałe wypustki astrocytów zawierające zmienione mitochondria i ciała gęste /ryc. M-28/. Zmian tych nie obserwowano w mózgach zwierząt 30 dniowych.



## DYSKUSJA

Przebieg zatrucia związkami FO zależny jest od osobniczej wrażliwości uwarunkowanej predyspozycją gatunkową, płcią i etapem rozwoju ontogenetycznego /Desi 1983, Russell i wsp. 1983/. Wiele uwagi poświęcono badaniom wpływu substancji FO na rozwijający się płód /Fish 1966, Kimbrough 1968, Khera, Clegg 1969, Vogin, Carson 1971, Thorpe i wsp. 1972/. Powszecznie stosowanym modelem doświadczalnym jest zatrucie tymi substancjami ciężarnych samic, a często podawanym preparatem - dichlorfos /Carson 1971, Thorpe i wsp. 1972, Zalewska i wsp. 1977/. U królików efekt toksycznego działania pestycydu był ściśle związany z okresem ciąży. Vogin i Carson /1971/ obserwowali dobrą tolerancję dawki 12 mg/kg masy ciała w początkowym okresie ciąży, natomiast w jej ostatniej fazie wrażliwość królików wyraźnie wzrastała /Dąbska i wsp. 1978, Maślińska, Zalewska 1978 a, b/. Prowadząc badania na noworodkach królików stosowaliśmy początkowo dichlorfos w dawce 9 mg/kg masy ciała /Dąbska i wsp. 1981, Dąbska, Maślińska 1982 a, Dąbska i wsp. 1984/. Silne objawy zatrucia eliminowały jednak z dalszych badań bardziej wrażliwe zwierzęta /około 15%. W związku z tym zastosowano dawki wywołujące łagodne objawy zatrucia.



Zmiana wrażliwości zwierząt na dichlorfos w pierwszych tygodniach życia po porodzie wymagała dostosowania odpowiedniej dawki pestycydu do określonego wieku zwierząt. Dichlorfos podobnie jak inne związki FO jest silnym inhibitorem AChE, więc wrażliwość zwierząt na działanie tej substancji wiązała się ściśle z procesem narastania aktywności enzymu obserwowanym w przebiegu rozwoju mózgu /Aprison, Himwich 1954, McCaman, Aprison 1964, Silver 1974/. Zależność ta szczególnie wyraźnie występuje u tych zwierząt, u których podobnie jak u człowieka, struktura i funkcja mózgu dojrzewa w początkowym okresie życia po porodzie /Aprison, Himwich 1954, Aprison 1964, Altman, Das 1970, Wender, Kozik 1970/. Ich typowym przedstawicielem jest królik a okres między 6 a 15 dniem życia charakteryzuje się u tego zwierzęcia szybkim przyrostem aktywności AChE w mózgu /McCaman, Aprison 1964, Niemierko, Skangiel-Kramaska 1976/. Uzyskanie pożądanego efektu toksycznego było możliwe po zastosowaniu w tym okresie rozwoju trzech różnych dawek pestycydu. Podczas dalszych badań stwierdzono, że każda z nich blokowała w mózgowach 65-73% aktywności AChE. Uzyskane wyniki potwierdzają wcześniejsze obserwacje, zgodnie z którymi pierwsze objawy zatrucia związkami FO pojawiały się po zablokowaniu 50-60% aktywności AChE /Bignami i wsp. 1975, Karczmar 1984/. Zauważono, że u różnych gatunków zwierząt spadek aktywności AChE o 70% można wywołać podając dichlorfos w dawkach znacznie mniejszych niż dawki LD<sub>50</sub> /Caroldi, Lotti 1981, Lotti i wsp.



1984/. Biorąc pod uwagę jedynie wartość dawki LD<sub>50</sub> można odnieść mylne wrażenie o zakresie toksycznego działania dichlorfosu na badany gatunek zwierzęcia. U kur, które należą do zwierząt bardzo wrażliwych na działanie związków FO /Spoerri, Glees 1979, Caroldi, Lotti 1981/ i reagują silnymi, nieodwracalnymi objawami zatrucia przy dawce 20 mg/kg, dawka LD<sub>50</sub> dichlorfosu wynosi 100 mg/kg /Caroldi, Lotti 1981/. Natomiast dla szczura LD<sub>50</sub> wynosi 70-80 mg/kg /Stecher i wsp. 1968, Fest, Schmidt 1973/ mimo, że są to zwierzęta bardzo odporne na uszkodzenie związkami FO i dobrze tolerują jeszcze dawki rzędu 40 mg/kg /Zelman 1977, Zelman, Majdecki 1979/. Najczęściej jednak wyboru dawki doświadczalnej dokonuje się w oparciu o dawkę LD<sub>50</sub> dla danego gatunku zwierzęcia. Zwiększona wrażliwość zwierząt podczas rozwoju sprawia, że wartość dawki LD<sub>50</sub> jest dla nich niższa niż dla dorosłych. Dotyczy to również związków FO /Michalek i wsp. 1984/.

#### Aktywność acetylocholinoesterazy

Wybrane dawki dichlorfosu zastosowane wielokrotnie zamiast nasilać objawy zatrucia skracały czas ich trwania. Zjawisko to obserwowano u wielu zwierząt narażonych na przewlekłe działanie związków FO /Russel i wsp. 1981/. W ustrojach tych zwierząt uruchomione zostają mechanizmy zapobiegające działaniu nadmiaru acetylocholino, której rozkład ulega zaburzeniu na skutek niskiej aktywności AChE /Dross, Kewitz 1968,



Carson, Jenden 1973, Dross 1975, Herman 1979, Uchida i wsp. 1979/. Zatrucie nie prowadzi więc do wzmożonego pobudzenia układu cholinergicznego i wystąpienia charakterystycznych objawów patologicznych.

Mimo dobrej tolerancji dichlorfosu u królików wystąpił niedobór masy ciała, uważany przez niektórych autorów za istotny wskaźnik toksycznego działania związków FO /Weil, McColister 1963/. Nie zauważono istotnego znaczenia tego niedożywienia dla rozwoju królików. Zwierzęta w ciągu kilku dni wyrównywały niedobory wagowe. Natomiast dobrym wskaźnikiem toksycznego działania dichlorfosu był spadek /do około 30%/ aktywności AChE w mózgach tych zwierząt. W badaniach histochemicznych mimo blokowania, najwyższą aktywność AChE obserwowano w tych strukturach mózgu, które również w normie zawierały najwięcej enzymu. Dotychczas uważano, że procent AChE ulegającej zablokowaniu pod wpływem związków FO jest tym większy im bogatsza w enzym jest badana okolica mózgu /Kozar i wsp. 1976, Meneguz i wsp. 1981/. Obecne wyniki badań biochemicznych nie potwierdzają jednoznacznie tych spostrzeżeń. Wprawdzie najmniejszy stopień zahamowania AChE wystąpił w korze mózgu, gdzie aktywność wyjściowa jest najniższa, ale jednocześnie w strukturach o najwyższej aktywności enzymu takich jak zwoje podstawy /Michalek, Stavinoha 1978/ procent inaktywacji AChE nie różnił się od obserwowanego w innych okolicach mózgu.



Dichlorfos podobnie jak inne związki FO blokuje AChE w sposób nieodwracalny /Modak i wsp. 1975, Michalek, Stavinoha 1977/, więc odnowa aktywności wymaga syntezy nowych cząsteczek enzymu /Blaber, Creasey 1960, Davis, Agranoff 1968, Welsch, Dettbarn 1972/. Znalazło to odzwierciedlenie w dynamice procesu odnowy enzymu po zatruciu dichlorfosem. Charakterystyczną cechą tej odnowy było pojawienie się aktywności enzymu początkowo w perykarionach komórek nerwowych a znacznie później w neuropilu. Wskazuje to na proces syntezy nowych cząsteczek enzymu i raczej wyklucza reaktywację AChE zablokowanej przez pestycyd. Synteza AChE odbywa się bowiem zawsze w perykarionach komórek a następnie enzym transportowany jest wzdłuż wypustek komórkowych z prądem cytoplazmy /Fonnum i wsp. 1973, Chippendale i wsp. 1974, Frizell, Sjöstrand 1974, Somogyi, Chubb 1976, Homor, Kasa 1978/.

Tempo odnowy enzymu w mózгах zatrutych królików nie było równomierne. W pewnych okolicach mózgu /jądra przednie i przyśrodkowe wzgórza wzrokowego - badanie histochemiczne/ AChE pojawiała się wcześniej niż w innych. W całym mózgu proces ten zachodził stopniowo i znacznie wolniej niż opisywano to w mózгах płodów i noworodków po podaniu związków FO samicom ciężarnym /Zalewska i wsp. 1977, Bisso i wsp. 1982/. U płodów pełną odnowę aktywności enzymu obserwowano bowiem już po upływie 48 godzin, podczas gdy u matek, w tym samym doświadczeniu, czas odnowy AChE w mózgu był znacznie



dłuższy /Bisso i wsp. 1982/. Badając u szczurów zjawisko odnowy AChE po zatruciu związkami FO stwierdzono, że u zwierząt 20 dniowych resynteza enzymu przebiega znacznie wolniej niż u płodów, szybciej jednak niż u zwierząt dorosłych /Bisso i wsp. 1980, 1982, Michalek i wsp. 1981 a, b, 1982/. Chociaż nie we wszystkich układach doświadczalnych udaje się tę zależność zaobserwować /Kewitz i wsp. 1977, Maślińska, Zalewska 1978, Suliński, Bicz 1979/ przyjmuje się, że tempo resyntezy AChE w mózgu jest związane z etapem rozwoju organizmu. Prawidłowość ta znalazła potwierdzenie w badaniach własnych, w których wykazano, że króliki zatrute dichlorfosem syntetyzowały AChE kilkakrotnie szybciej niż zwierzęta kontrolne. Ze zwiększoną zatem wrażliwością na działanie związków FO u rozwijających się zwierząt koresponduje wyraźnie ich zdolność do szybszej odnowy AChE co może stanowić również istotny mechanizm obrony przed działaniem środowiskowych czynników uszkodzających.

#### Metabolizm 5-hydroksytryptaminy

U zwierząt, które rodzą się, jak szczur czy królik, z całkowicie lub w znacznym stopniu niedojrzałym układem nerwowym morfologiczny i biochemiczny rozwój układu serotonergicznego przypada na pierwsze tygodnie życia po porodzie /Karki i wsp. 1960, 1962, Agrawal i wsp. 1966, Hedner, Lundborg 1980 a, b/. Najbardziej nasilone procesy dojrzewania zachodzą w drugim tygodniu życia zwierząt /Eayrs, Good-



head 1959, Aghajanian, Bloom 1967, Schmidt, Sanders-Buch 1971, Degushi, Barchas 1972, Loizou 1972, Hattori, McGeer 1973, Baker i wsp. 1973, 1974, Tissari 1975/. W tym okresie rozwoju króliki otrzymywały dichlorfos podczas prowadzonych badań. Skutki działania tego pestycydu były obserwowane w 3 i 4 tygodniu życia, kiedy przebieg procesów rozwojowych w układzie 5-HT ulega wyraźnemu zwolnieniu /McCaman, Aprison 1964/.

#### Tryptofan /TP/

Poziom tryptofanu w mózgach kontrolnych królików między 16 a 22 dniem życia utrzymywał się na stałym poziomie. Później łagodnie ale wyraźnie obniżał się w miarę osiągnięcia dojrzałości. Podobną dynamikę spadku poziomu tryptofanu wykazano w mózgach szczurów /Tyce i wsp. 1964, Bourgoin i wsp. 1974 b, Hoff i wsp. 1974, Miller i wsp. 1977, Hamon, Bourgain 1979/ przy czym obserwowano pewne różnice regionalne /Hedner, Lundborg 1980 a/.

Po zatruciu dichlorfosem poziom tryptofanu w mózgach królików był z namiennie wyższy niż u kontrolnych równieśników. Utrzymywał się na takim poziomie przez szereg dni po zakończeniu podawania pestycydu. Zgodnie z obserwacjami wielu autorów napływ tryptofanu do mózgu jest związany z pewnymi zjawiskami, które limitują jego transport przez barierę krew-mózg /Gessa, Togliamonte 1974, Hamon, Glowinski 1974, Perez-Cruet i wsp. 1974, Pardridge 1979, Pratt 1979,



Sourkes 1979, Curzon 1980/. Należy do nich między innymi łączenie się tryptofanu z białkami krwi /Mc Menamy 1965/ oraz współzawodniczenie tryptofanu z aminokwasami osocza o połączenie z nośnikiem barierowym transportującym je do mózgu /Fernstrom, Wurtman 1972, Perez-Cruet i wsp. 1974, Fernstrom i wsp. 1975, Mollar i wsp. 1976/. Tryptofan jest jedynym aminokwasem występującym we krwi w połączeniu z albuminami. Część nie związana z białkami tworzy pulę wolnego tryptofanu, który w tej postaci ma większe szanse łączenia się z nośnikiem barierowym /Etienne 1976, De Montis i wsp. 1977, Korpi, Oja 1978/. Wszystkie okoliczności wpływające hamująco na połączenia z białkami zwiększają transport tryptofanu przez barierę krew-mózg /Bourgoin i wsp. 1974, Gessa, Togliamonte 1974, Knott i wsp. 1974, Curzon, Knott 1977/.

Badając wcześniej przyczyny wysokiego stężenia tryptofanu w mózgach królików zatrutych dichlorfosem stwierdziliśmy, że we krwi tych zwierząt znamienne wzrasta pula wolnego tryptofanu /Maślińska, Rewekant 1982/, co wiązaliśmy z wysokim stężeniem wolnych kwasów tłuszczowych /Maślińska, Rewekant 1983 a, b/, które konkurują z tryptofanem o połączenie z albuminami krwi /Mc Menamy 1965/. Zauważono również, że pod wpływem pestycydu spadało istotnie stężenie aminokwasów /Rewekant i wsp. 1983, Maślińska i wsp. 1984/ konkurujących z tryptofanem o połączenie z nośnikiem barierowym. Ostatecznie wszystkie wymienione wyżej zmiany prowadziły do wysokiego stężenia tryptofanu w mózgach zatrutych dichlorfosem zwierząt /Maślińska 1984/.



Tryptofan jako prekursor wywiera istotny wpływ na syntezę serotoniny w mózgu /Bourgoin i wsp. 1974, Fernstrom, Wurtman 1974, Wurtman, Wurtman 1977, Fernstrom 1979, Wurtman 1979/. U osobników dorosłych, wysokie stężenie tryptofanu nasilało syntezę 5-HT w OUN /Fernstrom, Wurtman 1971, Bourgoin i wsp. 1974 a, b, Hamon, Glowinski 1974, Hamon i wsp. 1974/, w wyniku tylko częściowego wysycenia substratem hydroksylazy tryptofanowej - enzymu limitującego tempo syntezy 5-HT w mózгах zwierząt /Fernstrom 1982/. Podczas rozwoju rola tryptofanu w regulacji syntezy 5-HT jest znacznie ograniczona a hydroksylaza tryptofanowa jest w tym czasie całkowicie wysycona substratem /Bourgoin i wsp. 1974, Hoff i wsp. 1976, Hoff i wsp. 1977/. Z tego prawdopodobnie powodu u królików zatrutych dichlorfosem wysokie stężenie tryptofanu nie miało istotnego wpływu na syntezę i poziom serotoniny w mózgu. Przemawia za tym również brak korelacji między poziomem tryptofanu a stężeniem serotoniny w mózгах królików, obserwowany w obecnych badaniach.

#### Aktywność hydroksylazy tryptofanowej

Narastanie aktywności hydroksylazy tryptofanowej podczas rozwoju jest uważane za wskaźnik dojrzewania układu serotonergicznego w mózgu /Schmidt, Sanders-Buch 1971, Degushi, Barchas 1972, Baker i wsp. 1973, 1974/. Metoda pomiaru aktywności hydroksylazy tryptofanowej przez blokowanie dekarboksylazy aromatycznych aminokwasów, swoistym inhibitorem NSD



1015 pozwoliła na prześledzenie zmian aktywności enzymu podczas rozwoju mózgu. Badania takie prowadzono *in vitro* /Schmidt, Sanders-Buch 1971, Degushi, Barchas 1972/ oraz *in vivo* /Hedner, Lundborg 1980 a/ u różnych gatunków zwierząt. U szczura obserwowano dwufazowy wzrost aktywności hydroksylazy tryptofanowej: wolny w pierwszych 14 dniach i szybki między 14 a 28 dniem życia /Schmidt, Sanders-Buch 1971, Degushi, Barchas 1972, Hedner, Lundborg 1980 a/. W poszczególnych okolicach mózgu wzrost aktywności hydroksylazy TP związany był z dojrzałością określonych struktur.

W badaniach własnych u królików kontrolnych między 16 a 25 dnim życia występował również bardzo szybki rozwój aktywności hydroksylazy tryptofanowej. Poziom 5-hydroksytryptofanu, będący wskaźnikiem aktywności enzymu wzrastał w tym czasie o około 47%. Natomiast podczas następnych /25-28/ dni życia aktywność enzymu pozostawała na stałym poziomie. Podobnie, przebiegał w mózгах królików rozwój aktywności innego ważnego dla metabolizmu serotoniny enzymu - dekarboksylazy aromatycznych aminokwasów opisany przez McCammon i Aprison'a /1964/.

U zwierząt zatrutych dichlorfosem aktywność hydroksylazy tryptofanowej w OUN była znamienne niższa przez szereg dni po podaniu ostatniej dawki pestycydu. Mimo to, widoczna była postępująca odnowa enzymu, którego aktywność ostatecznie osiągała wartości kontrolne około 28 dnia życia królików.



Wyniki prowadzonych równolegle badań morfologicznych, pozwalają przypuszczać, że niska aktywność hydroksylazy tryptofanowej po zatruciu dichlorfosem, mogła wiązać się z uszkodzeniami mitochondriów w wielu elementach tkanki nerwowej. Enzym jest bowiem zlokalizowany w tych organelach a aktywność jego ściśle wiąże się z dopływem tlenu do tkanki /Green, Sawyer 1966, Davis, Carlsson 1973 a, b, Davis i wsp. 1973/.

#### Aktywność oksydazy monoaminowej /MAO/

Oksydaza monoaminowa występuje w mózgu w dwóch formach A i B /Collingham, Parkinson 1979/ różniących się między sobą powinowactwem do substratów /Kinemuchi i wsp. 1979, 1980, 1982, Fowler, Tipton 1982/ i wrażliwością na inhibitory /Johnston 1968, Magyar 1972, Fowler i wsp. 1978, Fowler i wsp. 1980, Tipton i wsp. 1982/. MAO jest enzymem mitochondrialnym mieszczącym się w błonie zewnętrznej ściany mitochondriów /Tipton 1967, Greenawalt, Schnaitman 1970, Yang, Neff 1974, Roth, Gallis 1975, Roth 1976, Murphy 1978/. Podczas rozwoju mózgu u wielu gatunków zwierząt / Jourdikian i wsp. 1975, Blatchford i wsp. 1976, Mantle i wsp. 1976, Franz i wsp. 1978, Nelson i wsp. 1979/ i u człowieka /Suzuki, Yagi 1978/ rozwój formy A enzymu jest szybszy niż formy B. U królika McCaman i Aprison /1964/ obserwowali szczyt aktywności MAO około 15 dnia życia, a podczas dalszego rozwoju łagodny, niewielki spadek aktywności tego enzymu. W badaniach własnych aktywność MAO w mózgach królików kontrolnych między 16 a 28 dniem życia nie



ulegała istotnym zmianom. Po zatruciu dichlorfosem spadek aktywności enzymu występował jedynie w grupie zwierząt badanych 24 godziny po podaniu ostatniej dawki pestycydu. Powrót MAO do wartości kontrolnych następował zaskakująco szybko w porównaniu z innym enzymem mitochondrialnym - hydroksylazą tryptofanową. Wyjaśnienie tego zjawiska trudne jest na obecnym etapie badań. Należy jedynie wspomnieć, że Kadir i Knowles /1981/ badając bezpośredni wpływ różnych rodzajów pestycydów na aktywność MAO stwierdzili, że spośród związków FO, dichlorfos wykazywał minimalne oddziaływanie na ten właśnie enzym.

#### Serotonina /5-hydroksytryptamina, 5-HT/

Wzrost stężenia serotoniny w niedojrzałym mózgu jest wyraźnie związany z tempem rozwoju aktywności hydroksylazy tryptofanowej. U szczura poziom tej indoloaminy jest niski po porodzie, narasta powoli przez 2 pierwsze tygodnie życia, natomiast szybki wzrost stężenia 5-HT następuje między 15 a 28 dniem życia /Hedner, Lundborg 1980 b/. Zmiany te wyraźnie korelowały z narastaniem aktywności hydroksylazy tryptofanowej w mózgach tych zwierząt.

W mózgach królików kontrolnych wzrost stężenia serotoniny był również równoległy do narastania aktywności hydroksylazy tryptofanowej. W 25 dniu życia poziom 5-HT w mózgach królików był o około 32% wyższy niż w 16 dniu. Pozostawał na tym samym poziomie od 25 do 28 dnia życia. Podobnie jak aktywność



hydroksylazy tryptofanowej, stężenie serotoniny było różne w badanych okolicach mózgu. Najwyższy poziom 5-HT obecny był w śródmózgowiu i pniu, gdzie zlokalizowane są neurony serotonergiczne /Fuxe i Jonsson 1974/. Nie zauważono wyraźnych zależności między stężeniem 5-HT a poziomem tryptofanu w mózgu. Wpływ stężenia tryptofanu na syntezę serotoniny podczas rozwoju mózgu pozostaje sprawą dyskusyjną. Tryptofan może nasilać syntezę i metabolizm serotoniny w mózgach młodych szczurów /Bourgoin i wsp. 1974, Howd i wsp. 1975/ ale istnieją też przekonujące dowody, że hydroksylaza tryptofanowa jest całkowicie wysycona substratem podczas rozwoju i wzrost tryptofanu w mózgu nie zmienia poziomu 5-HT /Bennett, Giarman 1965, Howd i wsp. 1975/. U królików zatrutych dichlorfosem wysoki poziom tryptofanu w mózgu nie zapobiegał spadkowi stężenia serotoniny. Powrót prawidłowych wartości 5-HT obserwowano u tych zwierząt mimo normalizacji poziomu tryptofanu. Należy więc przyjąć, że głównym czynnikiem regulującym sprawność syntezy 5-HT w mózgu była aktywność hydroksylazy tryptofanowej.

#### Kwas 5-hydroksyindolooctowy /5-HIAA/

Głównym metabolitem serotoniny jest kwas 5-hydroksyindolooctowy. Stężenie 5-HIAA podczas rozwoju mózgu zależy nie tylko od poziomu 5-HT, ale również od aktywności MAO oraz skutecznego eliminowania metabolitu z tkanki nerwowej.



W początkowym okresie życia 5-HIAA usuwany jest z mózgu przez splot naczyniówkowy /Bass, Lundborg 1973, Atack i wsp. 1974/, następnie wykształca się jak u dorosłych zwierząt bezpośrednia droga eliminacji 5-HIAA do krwi /Bass, Lundborg 1973, Atack i wsp. 1974/. Informacje dotyczące stężeń 5-HIAA w mózгах noworodków są sprzeczne. Bezpośrednio po porodzie poziom metabolitu w mózgu szczura dorównywać może wartościom u zwierząt dorosłych /Tyce i wsp. 1964, Tissari, Pekkarinen 1966/ bądź też dopiero po początkowym spadku następuje szybki wzrost poziomu 5-HIAA w mózgu /Bourgoin i wsp. 1974 b/. U królików kontrolnych między 16 a 28 dniem życia nie występowały istotne wahania stężenia 5-HIAA w mózgu. W badanych okolicach OUN poziom kwasu naśladował stężenie 5-HT i aktywność hydroksylazy tryptofanowej. Podobnie zachowywało się stężenie 5-HIAA w mózгах królików zatrutych dichlorfosem. Przez pierwsze dni po podaniu ostatniej dawki pestycydu poziom 5-HIAA w mózgu był niski podobnie jak stężenie 5-HT i aktywność MAO. W późniejszym okresie niskie stężenie metabolitu odzwierciedlało prawdopodobnie obniżone tempo syntezy serotoniny.

#### Obrót serotoniny /5-HT/

Wyniki uzyskane podczas badania poziomów 5-HT i 5-HIAA w mózгах dają jedynie częściowy wgląd w metabolizm serotoniny. Badaniem, które pozwala na lepszą ocenę znaczenia biologicznego obserwowanych zmian jest określenie tempa



obrotu tej indoloaminy. Uważa się, że tempo obrotu neurotransmitera może być uznane za wskaźnik stanu dynamicznego określonego toru nerwowego /Costa, Neff 1970, Grahame-Smith 1973, Erdo i wsp. 1982/. Tempo obrotu może być określane dwiema metodami: opartą o oznaczanie metabolizmu egzogennych, znakowanych substratów oraz drugą związaną z użyciem specyficznego inhibitora nieodwracalnie blokującego jeden z istotnych dla metabolizmu serotoniny enzymów /Costa, Neff 1970, Neff i wsp. 1971/. Obie metody obarczone są szeregiem trudności. Panuje jednak opinia, że lepszą przy badaniu obrotu serotoniny w mózgu jest metoda druga /Tozer i wsp. 1966, Erdo i wsp. 1982, Sarna i wsp. 1983/. Stosując ją można blokować aktywność oksydazy monoaminowej i określać obrót serotoniny mierząc tempo narastania stężenia 5-HT lub tempo spadku poziomu 5-HIAA w tkance.

W obecnej pracy obrót serotoniny określano badając tempo gromadzenia się 5-HT po zablokowaniu MAO przez tranilycyprominę. Inhibitor ten obok pargyliny zalecany jest przez autorów metody jako substancja blokująca skutecznie całkowitą aktywność enzymu i pozwalająca na otrzymanie porównywalnych wyników /Tozer i wsp. 1966, Costa, Neff 1970/.

Badanie przeprowadzono u zwierząt 16 dniowych. Uzyskane wyniki wykazały, że po zatruciu pestycydem spada wartość obrotu 5-HT w niedojrzałej tkance nerwowej oraz że czas tego obrotu wydłuża się. Można więc przypuszczać, że stymulacja serotonergiczna receptorów postsynaptycznych po zatruciu



dichlorfosem jest słabsza. Słuszność tych obserwacji wydają się potwierdzać wstępne wyniki badań nad wrażliwością receptorów 5-HT w hipokampie zwierząt zatrutych tym pestycydem. Stwierdzono, że u królików zatrutych dichlorfosem wzrasta powinowactwo tkanki nerwowej do znakowanej serotoniny [ $^3\text{H}$  5-HT] /Skangiel-Kramska, Maślińska - dane nieopublikowane/. Pełna ocena tych wyników jest w obecnej chwili bardzo trudna, ponieważ istnieje duża rozbieżność poglądów na rozwój receptorów serotonergicznym w mózgu. Uzbekow i wsp. /1979/ badając korę wzrokową szczura stwierdzali spadek liczby receptorów między 4 a 10 dniem życia po urodzeniu. Wyniki te potwierdzały spostrzeżenia innych autorów, którzy wykazali, że rozwój zakończeń nerwowych /synaptycznych/ w układzie serotonergicznym i noradrenergicznym przebiegał niezależnie od rozwoju receptorów dla tych substancji w tkance nerwowej /Harden i wsp. 1977 a, b, Jonsson, Hallman 1978, Jonsson i wsp. 1980, Jonsson, Kasamatsu 1983/. Za wczesnym wykształceniem się receptorów serotonergicznym przemawiałyby również "troficzna" rola 5-HT, jaką substancja ta spełnia we wczesnym okresie rozwoju mózgu /Lauder, Krebs 1976, 1978, Lauder i wsp. 1981, 1982, Lauder 1983/.

Jednak zdaniem Bennett'a, Snyder'a /1976/, Uphose'a, Bondy'a /1981/ rozwój receptorów 5-HT jest równoległy do rozwoju mózgu. Autorzy ci obserwowali u noworodków szczura 30-40% zdolność wiązania  $^3\text{H}$  5-HT i narastanie tych wartości do końca trzeciego tygodnia życia, kiedy rozwój receptorów



5-HT osiągał, w ich opinii, poziom charakterystyczny dla mózgu dorosłych zwierząt. Sprawę dodatkowo komplikuje fakt, że zgodnie z aktualnym stanem wiedzy, w mózgu występuje kilka typów receptorów 5-HT o odmiennej lokalizacji komórkowej, funkcji oraz prawdopodobnie różnym tempie rozwoju /Jacobs 1976, Aghajanian 1981, Peroutka i wsp. 1981, Snyder 1981, Van Neuten i wsp. 1981, Colpaert, Janssen 1983, Yap, Taylor 1983, Lucki i wsp. 1984/. W tej sytuacji śledzenie wpływu dichlorfosu na rozwój receptorów serotonergicznym wymaga osobnych wnikliwych badań.

Całość przedstawionych wyników ujawnia głębokie i długotrwałe zaburzenia metabolizmu serotoniny powstające w nie-dojrzałym mózgu po wielokrotnym podaniu pestycydu.

Wcześniejsze badania prowadzone na zwierzętach dorosłych sugerują, że reakcja 5-HT na zatrucie związkami FO zmienia się w zależności od typu zatrucia.

W zatruciach ostrych Prioux-Guyanneau i wsp. /1982/ obserwowali podwyższony poziom 5-HT i 5-HIAA w mózgu i sugerowali, że towarzyszy temu wzrost obrotu serotoniny. Po przewlekłym zatruciu Ali i wsp. /1979/ stwierdzili istotny spadek poziomu 5-HT oraz innych monoamin /dopaminy i noradrenaliny/. Podobne wyniki dotyczące dopaminy uzyskali Freed i wsp. /1976/, Sivam i wsp. /1983/ oraz Fernando i wsp. /1984/. Zaburzenia te próbowano tłumaczyć /Sivam i wsp. 1983, Fernando i wsp. 1984, Karczmar 1984/ reakcją kompensacyjną różnych układów neurotransmisyjnych w odpowiedzi



na dysfunkcję układu cholinergicznego powstającą pod wpływem działania związków FO. Taka interpretacja zmian wydaje się jednak mało prawdopodobna szczególnie w odniesieniu do przewlekłych zatruc, w których zaburzenia cholinergiczne są zbyt słabo wyrażone /Chippendale i wsp. 1972, Russel i wsp. 1981, Sivam i wsp. 1983/ i nie mogą bezpośrednio odpowiadać za głębokie i długotrwałe zmiany w metabolizmie monoamin.

Stężenia zarówno serotoniny jak i dopaminy w mózgu wzrastają w zatruciach ostrych /Glisson i wsp. 1974, Prioux-Guyonneau i wsp. 1982/ i spadają przy zatruciach przewlekłych /Freed i wsp. 1976, Ali i wsp. 1979/. Zaskakująca jest ta jednorodność reakcji niezależnie od funkcji jaką spełnia w OUN układ neurotransmisyjny reprezentowany przez daną monoaminę.

Wyniki badań prowadzonych na królikach pozwalają przypuszczać, że podłożem powyższych zaburzeń mogą być rozsiane uszkodzenia ultrastrukturalne tkanki nerwowej poprzedzone wieloma zmianami metabolicznymi, do których można zaliczyć wpływ związków FO na skład fosfolipidowy i białkowy błon biologicznych /Hokin, Hokin 1960, Michell 1975, Domenech i wsp. 1977, Hokin-Neaverson 1977, Michell i wsp. 1977, Antunes-Madeira, Madeira 1979, de Domenech i wsp. 1980, Maślińska i wsp. 1984/. Aktywność wielu enzymów związanych między innymi z metabolizmem monoamin zależy od prawidłowego składu fosfolipidowego tych błon /Huang, Faulkner 1981, Navarro-Welch, McCanley 1982/.



Wielokrotna penetracja pestycydów FO do ustroju wywołuje powtarzające się epizody pobudzenia układu cholinergicznego, wyrażające się między innymi zaburzeniami krążeniowo-oddechowymi o różnym stopniu nasilenia. Powstaje więc konieczność zastanowienia się nad ewentualnym wpływem niedotlenienia na obserwowane w zatruciu dichlorfosem zaburzenia metabolizmu serotoniny. Wpływ hypoksji i asfiksji na metabolizm monoamin w mózgu podczas rozwoju był przedmiotem szeregu publikacji /Hedner, Lundborg 1977, Hedner i wsp. 1977, 1978, Hedner 1978/. Zamieszczone tam wyniki były wyraźnie zbieżne z tymi jakie otrzymano badając króliki zatrute dichlorfosem. Również w niedotlenieniu główne zmiany dotyczyły aktywności hydroksylazy tryptofanowej /Hedner, Lundberg 1980 a, b/. Ostra hypoksja wywołała u szczurów spadek aktywności enzymu niezależnie od wieku /Davis, Carlsson 1973 a, b, Davis 1975, Hedner, Lundborg 1977, Hedner i wsp. 1977, 1978/. Prawidłowa funkcja hydroksylazy tryptofanowej związana ściśle z dostawą tlenu cząsteczkowego /Davis i wsp. 1973/ ulegała zaburzeniu w warunkach narastającego niedotlenienia /Hedner 1978/. Dotyczyło to również aktywności oksydazy monoaminowej /Davis, Carlsson 1973 b/. Wzrastało stężenie tryptofanu w mózgu /Davis, Carlsson 1973 a, Hedner i wsp. 1977/ ale stężenie serotoniny nie ulegało zmianie. Długotrwałe niedotlenienia prowadziły ponadto do uszkodzenia tkanki nerwowej /Myers 1972/ i niedożywienia organizmu /Simon, Volicer 1976, Vannuci, Duffy 1976/. Przedstawione obserwacje pozwalają



przypuszczać, że niedotlenienie może mieć istotne znaczenie dla patomechanizmu zmian powstających podczas przewlekłych zatruc pestycydami FO.

Do zaburzeń, które mogą wpływać na metabolizm serotoniny w mózgu należą również niedobory pokarmowe i związane z nimi niedożywienie organizmu, które spotykano u zwierząt zatrutych pestycydami /Weil, McColister 1963/.

W niedożywieniu wywołanym jedynie niedostateczną podażą białka stwierdzono co prawda wzrost stężenia tryptofanu w mózgu /Miller i wsp. 1977/ ale towarzyszył mu również wzrost poziomu 5-HT i 5-HIAA /Stern i wsp. 1975, Hisatoni, Nijyama 1980, Resnick, Morgane 1984/. Wydaje się więc, że niedożywienie królików po zatruciu dichlorfosem nie miało istotnego wpływu na obserwowane w obecnej pracy zmiany metabolizmu serotoniny.

#### Badania morfologiczne

Otrzymane wyniki wskazują, że dichlorfos uszkadza tkankę nerwową podobnie jak inne substancje należące do grupy neurotoksycznych związków FO. Wszystkie one wykazują wspólną cechę budowy chemicznej. Zawierają w pozycji  $R_1$  i  $R_2$  grupy alkilowe, które uwalniane są do środowiska po zablokowaniu centrum aktywnego enzymu. Istnieją przypuszczenia, że reakcja dealkylacji uruchamia w ustroju cykl przemian, które prowadzą do uszkodzenia tkanki /Caroldi, Lotti 1982, Johnson 1982/.



Dichlorfos posiada w swej cząsteczce grupy metylowe, spełnia więc warunki stawiane substancji neurotoksycznej.

Badanie morfologiczne mózgow po podaniu dichlorfosu /Zelman, 1977, Zelman, Majdecki 1979/ jak i innych substancji FO /Barnes, Danz 1953, Prineas 1969, Johnson 1975, 1982, Bouldin, Cavanagh 1979 a, b, Vasilescu 1979, Abou-Donia 1981/ podkreślają istnienie różnic wrażliwości zależnych od gatunku zwierząt i okresu rozwoju OUN. W obecnej pracy dichlorfos podany młodemu królikom wywoływał szeroką gamę zmian ultrastrukturalnych w mózgu. Podobnie jak przy zatruciach innymi związkami FO największe nasilenie uszkodzeń obserwowano w obwodowych częściach neuronu. Zmiany w aksonach polegały, zgodnie z obserwacjami innych autorów /Le Vay i wsp. 1971/, na gromadzeniu się znacznych ilości włókienek śródplazmatycznych /neurofilamentów/ w aksoplazmie włókna. Nasilenie tych zmian było u królików tak duże, że przekształcało akson w ciemną, zbitą masę. Drugi rodzaj uszkodzeń włókna nerwowego polegał na powstawaniu w aksoplazmie dużych, elektro-nowo-pustych wakuoli. Część z nich pochodziła prawdopodobnie z uszkodzonych mitochondriów. Akson ulegał wybitnemu zniekształceniu. Ten typ zmian nie był dotychczas opisywany. Na udział wakuoli w uszkodzeniu aksonów zwróciła wcześniej uwagę Veronesi /1984/. Jej zdaniem patomechanizm zmian miał polegać na ucisku aksonu przez wakuole tworzącą się między nim a osłonką mielinową.



Jeżeli przyjąć, że gromadzenie się neurofilamentów jest wynikiem zaburzenia przepływu aksoplazmy /Le Vay i wsp. 1971/ to dwa rodzaje uszkodzeń aksonów występujące u królików, można uznać za obraz zmian na różnych poziomach tego samego włókna nerwowego.

Struktura osłonek mielinowych, otaczających często bardzo uszkodzone aksony, była dobrze zachowana, wskazując, że proces chorobowy dotyczył pierwotnie włókna osiowego.

Nasilenie zmian w zakończeniach nerwowych u królików po zatruciu dichlorfosem było zdecydowanie większe niż opisywane wcześniej u dorosłych zwierząt w zatruciu TOCP /Ahmed 1970/. Ciemne, duże konglomeraty degenerujących prawdopodobnie pęcherzyków synaptycznych oraz liczne ciała gęste wypełniające znaczne przestrzenie zakończeń nerwowych spotykano często w badanych okolicach mózgu /okolica szwu w śródmózgowiu i pniu/. Uzupełnieniem obrazu zmian były uszkodzone mitochondria i wielokształtne kanały - wakuole w postsynaptycznej części zakończenia nerwowego. Poszczególne elementy wyżej podanych zmian nie są charakterystyczne wyłącznie dla zatruc związkami FO i spotykano je również w synapsach podczas różnych stanów patologicznych /Glees, Miller 1964, Blackspad i wsp. 1965, Roizin, Schade 1968/.

Zmiany wywołane przez dichlorfos w perykarionach komórek nerwowych były umiarkowane. Znacznie większe opisywano wcześniej u dorosłych zwierząt po zatruciu różnymi związkami FO /Ahmed, Glees 1977, Spoerri, Glees 1979, 1980/. Sądzone



wówczas, że zmiany w perykarionach miały u tych zwierząt charakter objawowy i były wyrazem reakcji komórki na uszkodzenie jej aksonu /Le Vay i wsp. 1971, Aldskogius 1978, Spoerri, Glees 1979, 1980/.

W obecnej pracy zaawansowane zmiany w aksonach kontrastowały z niewielkimi zmianami w perykarionach. Biorąc pod uwagę obecność w tkance licznych ciemnych prawdopodobnie nieodwracalnie zmienionych komórek można przyjąć, że część z nich to perykariony ciężko uszkodzonych aksonów. Niedojrzałe, młode komórki nerwowe odpowiadają słabą reakcją regeneracyjną na uszkodzenie aksonu /Hess 1956, 1957, La Velle, La Velle 1958 a, b/. Ciężkie uszkodzenia włókna nerwowego w pobliżu perykarionu kończą się częściej śmiercią niż regeneracją neuronu /Cragg 1970, Lieberman 1974, Henry 1975 a, b, Banlae, Meininger 1983/. Obserwacje te mogą tłumaczyć obecność licznych ciemnych neuronów w mózгах 16 dniowych królików. Oprócz komórek ciemnych spotykano w tkance również obumarłe komórki. Sporadycznie, tego typu komórki występowały również w grupie 30 dniowych zwierząt kontrolnych. Były to prawdopodobnie komórki, które po okresie intensywnego rozwoju danej okolicy mózgu ulegały z różnych przyczyn fizjologicznej eliminacji /Jacobson 1970, Aguayo i wsp. 1973, Ronnevi, Conradi 1974, Weiss, Pysh 1978/. Umiarkowane zmiany w perykarionach odpowiadałyby aksonom nieznacznie dotkniętym przez dichlorfos. Nie można też wykluczyć, że zmiany te są bezpośrednią reakcją organelli subkomórkowych



na toksyczne działanie pestycydu. Gromadzenie się dużej ilości ciemnych, wydłużonych mitochondriów uważano za najwcześniejszą reakcję komórki na trujące działanie związku FO /Ahmed, Glees 1968, Ahmed 1970, 1971, 1973 a, b, Spoerri, Glees 1979/. Sugerowano, że tak zmienione mitochondria podlegały dalszemu zwyrodnieniu przekształcając się ostatecznie w duże, elektronowo-puste wakuole. W badaniach własnych obserwowano w mitochondriach wszystkie formy opisywanych zmian. Były one najbardziej widoczne w uszkodzonych aksonach.

W wielu miejscach badanej tkanki obiektywna ocena stopnia uszkodzenia tych mitochondriów była trudna, ponieważ ulegają one łatwo zmianom artefaktycznym /np. w procesie utrwalania/ i czynnościowym nie związanym z procesem patologicznym.

Wielokrotnie podkreślano, że istnieje ścisły związek między zaburzonym metabolizmem mitochondrialnym a tworzeniem się lipofuscyny w tkance /Colcolough i wsp. 1972, Hasan, Glees 1972, Glees i wsp. 1974, Gopinath, Glees 1974, Glees 1975, Prentice, Roberts 1983/. Lipofuscyna jest substancją występującą w tkance nerwowej zdrowych zwierząt a ilość jej wzrasta wraz z wiekiem /Gopinath, Glees 1974, Glees 1975/. W młodej, rozwijającej się tkance nerwowej lipofuscyna pojawia się sporadycznie. Gromadzenie się tej substancji po podaniu dichlorfosu królikom w okresie rozwoju mózgu można uznać za objaw zaburzonego metabolizmu komórki. Podobne znaczenie miały prawdopodobnie zmiany występujące w jądrach komórkowych. Ogniskowe przejaśnienia karioplazmy, błoniaste i rozgałęzione



twory występujące w obrębie jądra były opisywane w wielu stanach patologicznych /Field 1968, Tani i wsp. 1971, Bartel i wsp. 1981, Kroh, Cervos-Navarro 1983, Kroh 1984/ oraz u zwierząt zdrowych w okresach pobudzenia lub przestrojenia metabolizmu jądra /Field, Peat 1971, Seite i wsp. 1977, David, Nathaniel 1978/. Zmiany w jądrach mogły być wywołane również przez bezpośrednie alkilujące działanie dichlorfosu na strukturę cząsteczki DNA /Lofroth 1970, Lawley i wsp. 1974/.

Z przeprowadzonych badań wynika, że zaawansowany obraz zmian w mózгах po zatruciu związkami FO może występować niezależnie od uszkodzeń w nerwach obwodowych. Wielodniowe podawanie dichlorfosu nie uszkadzało bowiem obwodowego układu nerwowego. Wypływa stąd wniosek, że lokalizacja zmian w tkance może zależeć od rodzaju zatrucia /ostre lub przewlekłe/ rozwijającego się w organizmie narażonym na działanie toksycznej substancji.

Charakterystyczną cechą encefalopatii toksycznych wydaje się być występowanie największego nasilenia zmian w dolnych piętrach ośrodkowego układu nerwowego. Taką lokalizację uszkodzeń obserwowano po zatruciu dichlorfosem /Dąbska i wsp. 1981, Dąbska, Maślińska 1982 a, wyniki obecnej pracy/, kolchicyną /Klatzo i wsp. 1965, Wiśniewski, Terry 1967/, aluminium /Wiśniewski i wsp. 1966, 1967/ a nawet po podaniu winkrystyny /Maślińska, Tubylewicz 1986, Tubylewicz, Maślińska 1986/. Zmiany w rdzeniu kręgowym, pniu mózgu



i śródmózgowiu spotyka się w takich przypadkach zarówno podczas rozwoju mózgu jak i po jego zakończeniu. Występowanie uszkodzeń w tych miejscach OUN jest więc niezależne od stopnia dojrzałości tkanki nerwowej.

#### P o d s u m o w a n i e

Dotychczasowy brak informacji o skutkach przewlekłego działania pestycydów na mózg w okresie intensywnego dojrzewania, wiąże się prawdopodobnie z uciążliwością i pracochłonnością badań prowadzonych w dynamicznym układzie zmian rozwojowych. Wszystkie wyniki uzyskiwane w tym modelu doświadczalnym wymagają analizowania zmian wywołanych przez pestycydy w odniesieniu do postępujących w mózgu zmian rozwojowych.

W obecnej pracy przy użyciu kompleksowych badań przedstawiono nie tylko bezpośrednie skutki działania dichlorfosu na rozwijający się mózg ale również dynamikę procesu normalizacji powstałych zaburzeń. Pozwoliło to na stwierdzenie, że szereg obserwowanych zmian ma charakter odwracalny. Pewna rozbieżność wystąpiła między wynikami oznaczeń ilościowych a obrazem uszkodzeń tkankowych. Normalizujące się wskaźniki biochemiczne nie szły bowiem w parze z postępującymi zmianami degeneracyjnymi w mózgu. Ustępowanie niewielkich zmian obrzękowych obecnych w tkance trudno uznać za dostateczną podstawę do cofania się zmian ilościowych.



Ustalenie związków przyczynowych między niską aktywnością acetylocholinoesterazy, zaburzeniami metabolizmu serotoniny i uszkodzeniami ultrastruktury tkanki nerwowej nie jest możliwe na obecnym etapie badań. Nie można jednak wykluczyć, że zmiany metaboliczne inicjują proces uszkodzeń strukturalnych, które rozwijają się dalej niezależnie od normalizacji wskaźników biochemicznych.

W dotychczasowej literaturze patomechanizm zmian powstających w mózgu pod wpływem związków FO budził wiele kontrowersji. Pogląd, że związki FO wywołują przede wszystkim zaburzenia w układzie cholinergicznym a wszystkie pozostałe zmiany są reakcją kompensacyjną lub konsekwencją dysfunkcji tego układu /Sivam i wsp. 1983, Fernando i wsp. 1984, Karczmar 1984/ wymaga weryfikacji.

Przebieg przewlekłych zatruc, w których brak zaburzeń cholinergicznym /Chippendale i wsp. 1972, Russel i wsp. 1981/ a na plan pierwszy wysuwają się zaburzenia innych układów neurotransmisyjnych nasunął przypuszczenie, że związki FO działają wieloogniskowo i zaburzają równocześnie metabolizm wielu neurotransmiterów w mózgu /Dun, Karczmar 1984, Karczmar 1984/. Te dwa pozornie sprzeczne poglądy zbliża

cykl badań prowadzonych w ostatnich latach z zakresu neuroanatomii /Albanese, Butcher 1979, Bolam i wsp. 1984/, biochemii /Hollunger, Nicklasson 1973, Silver 1974, Yaksh i wsp. 1975, Chubb i wsp. 1980, Massoulie, Bon 1982, Greenfield i wsp. 1983 a, Rotundo 1984/, farmakologii



/Graybiel i wsp. 1981, Greenfield i wsp. 1983 b, Greenfield, Weston 1984/, neurofizjologii /Greenfield i wsp. 1981/ i zachowania się zwierząt /Greenfield i wsp. 1984/ nad lokalizacją i funkcją AChE w mózgu. Wynika z nich, że udział AChE w hydrolizie acetylocholiny jest jedną ale wbrew dotychczasowej opinii nie jedyną rolą jaką enzym ten odgrywa w mózgu.

Związki FO blokując aktywność AChE mogą zaburzyć jednocześnie wszystkie szlaki metaboliczne, w których enzym ten bierze udział, a więc działać wielogniskowo.

Również rozległy charakter zmian biochemiczno-morfologicznych obserwowany w obecnych badaniach trudno jest wytłumaczyć znanymi mechanizmami działania związków FO. Można sądzić, że w miarę dalszego doskonalenia metod badawczych możliwe będzie pełniejsze poznanie wszystkich zjawisk zachodzących w ustroju pod wpływem substancji FO a szczególnie ustalić ich sekwencję.

Jest to tym bardziej istotne, że jak wynika z obecnej pracy pozorną dobrą tolerancją tych substancji nie chroni organizmu przed poważnymi i długotrwałymi zaburzeniami, które mogą rzutować na jego rozwój osobniczy.



## WNIOSKI

1. Wielokrotne dawki pestycydu FO są pozornie dobrze tolerowane przez króliki.
2. W mózgu występuje głęboki spadek aktywności acetylocholinoesterazy.
3. Metabolizm serotoniny w mózgu ulega zaburzeniu.
4. W tkance OUN powstają rozsiane zmiany ultrastrukturalne dotyczące zarówno komórek nerwowych jak i glejowych.
5. Największe uszkodzenia powstają w obwodowych częściach neuronu /aksony, zakończenia nerwowe/.
6. Większość obserwowanych zaburzeń metabolicznych ma charakter odwracalny a proces normalizacji jest stopniowy i powolny.
7. W obrazie morfologicznym jedynie zmiany obrzękowe mają charakter odwracalny.
8. Przewlekłe działanie związków FO na mózg podczas intensywnego dojrzewania jego struktury i funkcji może zaburzyć rozwój osobniczy organizmu.



## STRESZCZENIE

Związki fosforoorganiczne /FO/ są silnymi truciznami biologicznymi. Jako pestycydy wykorzystywane są do zwalczania szkodników roślinnych i zwierzęcych. Konieczność ich stosowania w różnych dziedzinach codziennego życia prowadzi do narastającego skażenia środowiska i zagraża zdrowiu ludzi. Kontakty z tymi substancjami mogą wywołać zatrucia ostre i przewlekłe. Między obu typami zatrucí istnieje wiele istotnych różnic o charakterze nie tylko ilościowym.

Związki FO są silnymi inhibitorami cholinoesteraz. Najbardziej gorzkie dla organizmu jest nieodwracalne blokowanie przez te substancje aktywności acetylocholinoesterazy /AChE/ - enzymu biorącego udział w katabolizmie acetylocholino.

Zatrucia ostre powstają na skutek przedostania do organizmu dużej dawki związku FO, który blokuje około 90% aktywności AChE. Pojawiają się wówczas typowe objawy silnego pobudzenia układu cholinergicznego a ciężkie zaburzenia oddechowo-krażeniowe mogą być bezpośrednią przyczyną śmierci.

Obraz kliniczny przewlekłych zatrucí nie posiada cech charakterystycznych. Systematyczne przenikanie do organizmu niewielkich dawek pestycydów FO prowadzi do różnego rodzaju dysfunkcji ośrodkowego układu nerwowego, których etiologia jest trudna do ustalenia.



Wśród związków FO istnieje grupa substancji o silnych właściwościach neurotoksycznych. Zatrucia nimi wywołują uszkodzenie tkanki nerwowej.

W mózgu, związki FO zaburzają funkcję nie tylko układu cholinergicznego ale również metabolizm innych neurotransmiterów, głównie serotoniny.

Badania ostatnich lat wykazują, że serotonina ma istotny wpływ na rozwój układu nerwowego. Związki FO ze względu na swoje właściwości neurotoksyczne, zdolności blokowania AChE i zaburzanie poziomu serotoniny mogą stanowić duże zagrożenie dla rozwijającej się tkanki nerwowej. Tkanka ta podczas intensywnego rozwoju mózgu jest bardzo wrażliwa na działanie szkodliwych czynników środowiskowych.

U człowieka i niektórych gatunków zwierząt /królik/ intensywny rozwój mózgu przypada na początkowy okres życia po porodzie.

Celem obecnej pracy była próba kompleksowej /biochemicznej, histochemicznej i morfologicznej/ oceny wpływu jednego z powszechnie stosowanych pestycydów FO - dichlorfosu na mózg królika w tym okresie rozwoju.

Badania prowadzono na królikach rasy Nowozelandzkiej, które przez cały okres trwania doświadczenia pozostawały pod opieką matek. W badaniach wstępnych ustalono wartość dawek dichlorfosu, które wywoływały średnie nasilenie objawów zatrucia /wg arbitralnej skali ocen/. Następnie dawki te podawano królikom przez 10 kolejnych /od 6 do 15/ dni życia.



Dichlorfos /4-8 mg/kg/ stosowano w roztworze olejowym /1 ml/kg/ per os.

Materiał do badań biochemicznych i histochemicznych pobierano po 1 i 24 godzinach oraz po 3, 6, 9, 12 i 15 dobach od podania ostatniej dawki pestycydu.

Zwierzęta dekapitowano a mózgi zamrażano w suchym lodzie w całości lub po wyizolowaniu określonych jego części /kora mózgu, hipokamp, zwoje podstawy, śródmózgowie, pień mózgu/.

Do badań morfologicznych mózgi pobierano w 16 i 30 dniu życia. Utrwalano je przez zanurzenie w 4% roztworze formaliny lub perfundowano zbuforowanym roztworem 2,5% paraformaldehydu z 1,5% aldehydem glutarowym. Do badań w mikroskopie świetlnym utrwaloną tkankę zatapiano w parafinie natomiast tkankę przeznaczoną do badań ultrastrukturalnych zatapiano w eponie.

W pobranej tkance oznaczano: 1/ aktywność acetylocholinesterazy /AChE/ metodą Ellmana i wsp. /1961/ oraz metodą Karnovsky'ego i Roots'a /1964/, 2/ stężenie tryptofanu - metodą Escande /1978/, 3/ stężenie serotoniny /5-hydroksytryptaminy, 5-HT/ - metodą Curzona i wsp. /1981/, 4/ stężenie kwasu 5-hydroksyindolooctowego /5-HIAA/ - metodą Curzona i wsp. /1981/, 5/ aktywność hydroksylazy tryptofanowej - metodą Carlsson'a i wsp. /1972/, 6/ aktywność oksydazy monoaminowej - metodą Bogdańskiego i wsp. /1957/ w modyfikacji Kraml'a /1965/, Suzuki i wsp. /1978/, 7/ obrót serotoniny - metodą Cost'a i Neff'a /1970/, 8/ zawartość białka w tkance metodą Lowry i wsp. /1951/.



Otrzymane wyniki opracowywano statystycznie posługując się testem t-Studenta.

Zwierzęta pozornie dobrze tolerowały podawany pestycyd, obserwowano u nich jednak około 20% niedobór masy ciała.

W mózgach dichlorfos blokował około 70% aktywności AChE. W badanych okolicach mózgu aktywność enzymu wynosiła 27-40% wartości kontrolnych. W badaniach histochemicznych najwyższą aktywność AChE wykazywały te struktury, które w normie były również najbogatsze w enzym. Po zakończeniu podawania dichlorfosu obserwowano odnowę AChE w mózgu. Mimo to przez cały okres prowadzonych badań aktywność enzymu pozostawała znacznie niższa niż w kontroli. W niektórych ugrupowaniach komórkowych tempo odnowy enzymu było wyższe niż w pozostałych okolicach mózgu. Charakterystyczną cechą tego procesu było pojawienie się aktywności AChE początkowo w perykarionach komórek nerwowych a znacznie później w neuropilu. Mimo długo utrzymującej się w mózgu niskiej aktywności enzymu/AChE/nie obserwowano u królików objawów pobudzenia układu cholinergicznego.

Wpływ dichlorfosu na metabolizm serotoniny wyrażał się spadkiem stężenia tej indoloaminy oraz jej głównego metabolitu kwasu 5-hydroksyindolooctowego mimo znamiennego wzrostu poziomu substratu /tryptofan/ w OUN. Aktywność enzymów związanych z metabolizmem serotoniny /oksydazy monoaminowej i hydroksylazy tryptofanowej/ była obniżona.

Wartość obrotu serotoniny spadała i wydłużał się czas trwania tego obrotu.



Wyniki badań prowadzonych podczas następnych dni życia zwierząt wskazywały na stopniową normalizację obserwowanych zaburzeń. Po 6 dobach od podania ostatniej dawki dichlorfosu stężenie tryptofanu i kwasu 5-HIAA zbliżało się do wartości prawidłowych, po 9 dobach podobnie zachowywało się stężenie 5-hydroksytryptofanu /aktywność hydroksylazy tryptofanowej/. Poziom serotoniny pozostawał znamienne niższy od kontroli przez cały czas prowadzonych badań, natomiast aktywność oksydazy monoaminowej tylko w pierwszej dobie po zakończeniu podawania dichlorfosu.

Całość uzyskanych wyników wskazywała na złożony, wielogniskowy charakter zaburzeń metabolizmu serotoniny wywołanych podawaniem pestycydu.

Podczas prowadzonych badań morfologicznych nie znaleziono ogniskowych uszkodzeń tkanki nerwowej. Zmiany ultrastrukturalne miały charakter zmian rozsianych i dotyczyły zarówno komórek nerwowych jak i glejowych. Największe nasilenie zmian obserwowano w obwodowych częściach neuronu /aksony, zakończenia nerwowe/. W aksonach gromadziły się bardzo liczne włókienka śródplazmatyczne /neurofilamenty/, które stopniowo przekształcały aksoplazmę w zbitą, elektronowo-ciemną, włóknistą masę. Inny typ zmian w aksonach polegał na tworzeniu się w aksoplazmie dużych elektronowo-pustych wakuoli. Uszkodzony akson ulegał bardzo znacznym zniekształceniom. Osłonki mielinowe były zwykle dobrze zachowane. Wokół niektórych uszkodzonych aksonów pojawiały się jedynie miejscowe roz-



warstwienia blaszek osłonki. W zakończeniach nerwowych spotykano różne stadia zwyrodnienia kolbek presynaptycznych. Występowały w nich liczne ciała gęste. Pęcherzyki tworzyły skupiska i przekształcały się w elektronowo-ciemne konglomeraty. W postsynaptycznych częściach zakończeń nerwowych powstawały wielokształtne, elektronowo-puste kanały - wakuole.

W wielu wypustkach komórkowych gromadziły się złogi barwnika /lipofuscyny/ i liczne ciała gęste.

W perykarionach komórek nerwowych zmiany były niewielkie lub minimalne. Spotykano w nich opisywane wcześniej po zatruciach związkami FO, zmiany w mitochondriach, poszerzone kanały siatki śródplazmatycznej, ciała gęste i bardzo liczne wolne ribosomy. Jądra komórkowe miały często nieregularny kształt i zawierały wielokształtne twory zbudowane z gładkich lub ziarnistych błon.

Dość liczną grupę stanowiły komórki nerwowe o ciemnej, ziarnistej cytoplazmie i nieregularnym jądrze. Liczne organelle tych komórek wtopione były w ciemną masę cytoplazmy.

Spotykano również komórki o daleko posuniętych zmianach zwyrodnieniowych, których przynależność do komórek glejowych lub nerwowych trudno było ocenić. Ściany naczyń krwionośnych nie ulegały zmianie. W grupie zwierząt 16 dniowych obserwowano obrzmienie wypustek naczyniowych astrocytów. Zmian tych nie spotykano w starszej grupie zwierząt /30 dniowych/.



Przeprowadzone badania wykazały, że „łagodne” zatrucie dichlorfosem prowadzi do spadku aktywności kilku ważnych enzymów, zaburzenia metabolizmu serotoniny i uszkodzenia ultrastruktury tkanki nerwowej. Tolerancja wielokrotnych dawek dichlorfosu jest więc jedynie pozorna i wydaje się, że przewlekłe działanie związków FO na mózg podczas intensywnego dojrzewania jego struktury i funkcji może zaburzyć rozwój osobniczy organizmu.



PISMIENNICTWO

1. Abou-Donia M.B.: Delayed neurotoxicity of phenylphosphonothioate esters. *Science* 205, 713-715, 1979.
2. Abou-Donia M.B.: Organophosphorus ester-induced delayed neurotoxicity. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 21, 511-548, 1981.
3. Abou-Donia M.B.: Toxicokinetics and metabolism of delayed neurotoxic organophosphorus esters. *Neurotoxicol.* 4, 113-130, 1983.
4. Adamson E.D.: Acetylcholinesterase in mouse brain, erythrocytes and muscle. *J. Neurochem.* 28, 605-615, 1977.
5. Adamson E.D., Ayers S.E., Deussen Z.A., Graham C.F.: Analysis of the forms of acetylcholinesterase from adult mouse brain. *Biochem. J.* 147, 205-214, 1975.
6. Aghajanian G.K.: The modulatory role of serotonin at multiple receptors in brain. In: *Serotonin, Neurotransmission and Behavior*. Eds. Jacobs B.L., Celperin A. Cambridge, Massachusetts. MIT Press, 1981, pp. 156-185.
7. Aghajanian G.K., Bloom F.E.: The formation of synaptic junctions in developing rat brain: A quantitative electron microscopic study. *Brain Res.* 6, 716-727, 1967.
8. Agrawal H.C., Glisson S.N., Himwich W.A.: Changes in monoamines of rat brain during postnatal ontogeny. *Biochem. Biophys. Acta* 130, 511-513, 1966.
9. Aguayo A.J., Terry L.C., Bray G.M.: Spontaneous loss of axons in sympathetic unmyelinated nerve fibres of the rat during development. *Brain Res.* 54, 360-364, 1973.
10. Ahmed M.M.: A note on the neuroglia in normal and tricresylphosphate (TCP) poisoned hen. *Acta Anat. (Basel)* 77, 120-130, 1970.
11. Ahmed M.M.: Synaptic morphology in the spinal cord of normal and tricresylphosphate (TCP) poisoned hen. *Acta Neuropath. (Berl.)* 17, 302-309, 1971.
12. Ahmed M.M.: The ultrastructure of tricresylphosphate poisoning in primates. I. Studies on axonal alternations in the spinal cord. *Arch. Histol. Japon.* 35, 283-288, 1973a.



13. Ahmed M.M.: Fine structure of neurons in the spinal ganglion of Slow Loris (*Nycticebus coucang coucang*). *Arch. Histol. Japon.* 36, 143-152, 1973b.
14. Ahmed M.M.: Changes in the ultrastructure of satellite cells of Slow Loris in tricresylphosphate poisoning. *Acta Neuropath. (Berl.)* 37, 173-175, 1977.
15. Ahmed M.M., Glees P.: Ultrastructural changes in central nerve fiber of the hen. *Exp. Neurol.* 22, 695-701, 1968.
16. Ahmed M.M., Glees P.: Neurotoxicity of tri-cresylphosphate (TCP) in Slow Loris (*Nycticebus coucang coucang*). *Acta Neuropath.* 19, 94-98, 1971.
17. Ahmed M.M., Glees P.: Mitochondrial degeneration after organic phosphate poisoning in prosimian primates. *Cell Tiss. Res.* 175, 459-465, 1975.
18. Akaike A., Ikeda S., Brookes N., Pascuzzo G., Rickett D.L., Albuquerque E.X.: The nature of the interaction of pyridostigmine with the nicotine receptor-ionic channel complex. II. Patch Clamp Studies. *Molec. Pharmacol.* 25, 102-112, 1984.
19. Albanese A., Butcher L.L.: Locus coeruleus somata contain both acetylcholin esterase and norepinephrine: direct histochemical demonstration on the same tissue section. *Neurosci. Lett* 14, 101-104, 1979.
20. Albuquerque E.X., Akaike A., Shaw K.P., Rickett D.L.: The interaction of anticholinesterase agents with the acetylcholine receptor-ionic channel complex. *Fund. Appl. Toxicol.* 4, S27-S33, 1984.
21. Aldridge W.N., Reiner E.: *Frontiers of biology*. North Holland Publ. Co. Amsterdam, 1972.
22. Aldskogius H.: Fine structural changes in nerve cell bodies of the adult rabbit dorsal motor vagal nucleus during axon reaction. *Neuropath. and Appl. Neurobiol.* 4, 323-341, 1978.
23. Ali F.S., Hasan M., Tario M.: Levels of dopamine, norepinephrine and 5-hydroxytryptamine in different regions of rat brain and spinal cord following chronic administration of organophosphate pesticide Dichlorvos. *Indian J. Exp. Biol.* 17, 424-426, 1979.
24. Altman J., Das G.D.: Postnatal neurogenesis in the guinea pig. *Nature (Lond.)*, 214, 1098-1101, 1967.



25. Altman J., Das G.D.: Post-natal changes in the concentration and distribution of cholinesterase in the cerebellar cortex of rats. *Exptl. Neurol.* 28, 11-34, 1970.
26. Anglister L., Rogozinski S., Silman I.: Detection of hydroxyproline in preparations of acetylcholinesterase from the electric organ of the electric eel. *FEBS Lett.* 69, 129-136, 1976.
27. Anglister L., Silman I.: Molecular structure of elongated forms of electric eel acetylcholinesterase. *J. Molec. Biol.* 125, 293-311, 1978.
28. Anglister L., Tarrab-Hazdel R., Fuchs A., Silman I.: Immunological cross reactivity between electric eel acetylcholinesterase and rat-tail-tendon collagen. *Eur. J. Biochem.* 94, 25-29, 1979.
29. Antunes-Madeira M.C., Madeira V.M.C.: Interaction of insecticides with lipid membranes. *Biochem. Biophys. Acta* 550, 384-392, 1979.
30. Aprison M.H., Himwich H.E.: Relationship between age and cholinesterase activity in several rabbit brain areas. *Am. J. Physiol.* 179, 502-506, 1954.
31. Arterberry J.D., Durham W.E., Elliott J.W., Wolfe H.R.: Exposure to parathion. *Arch. Environ. Hlth.* 3, 476-485, 1961.
32. Atack C., Bass N.H., Lundborg P.: Mechanisms for the elimination of 5-hydroxyindoleacetic acid from brain and cerebrospinal fluid of the rat. *Brain Res.* 77, 111-120, 1974.
33. Atack C., Lindqvist M.: Conjoint native and orthophtaldialdehyde-condensate assays for the fluorimetric determination of 5-hydroxyindoles in brain. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 279, 267-284, 1973.
34. Baker P.C., Hoff K.M., Smith M.D.: The maturation of 5-hydroxyphenyl decarboxylase in regions of the mouse brain. *Brain Res.* 58, 147-155, 1973.
35. Baker P.C., Hoff K.M., Smith M.D.: The maturation of monoamine oxidase and 5-hydroxyindoleacetic acid in regions of mouse brain. *Brain Res.* 65, 255-264, 1974.
36. Baker T., Lowndes H.E., Johnson M.K., Sandberg I.C.: The effect of phenylmethanesulfonyl fluoride on delayed organophosphorus neuropathy. *Arch. Toxicol.* 46, 305-311, 1980.



37. Banlae M., Meininger V.: Postnatal development and cell death in the sciatic motor nucleus of the mouse. *Exp. Brain Res.* 50, 107-116, 1983.
38. Barnes J.M.: Psychiatric sequelae of chronic exposure to organophosphorus insecticides. *Lancet* 2, 102-103, 1961.
39. Barnes J.M., Denz F.A.: Experimental demyelination with organophosphorus compounds. *J. Pathol. Bacteriol.* 65, 594-605, 1953.
40. Bartel C., Gouranton J., Menault F., Chatel M.: The intranuclear filamentous inclusions of a human glioma. Their relation with nuclear bodies. *Eur. J. Cell Biol.* 25, 36-45, 1981.
41. Bass N.H., Lundborg P.: Postnatal development of mechanisms for the elimination of organic acids from the brain and cerebrospinal fluid system of the rat. Rapid efflux (3H) paraaminohippuric acid following intrathecal infusion. *Brain Res.* 56, 285-298, 1973.
42. Bennett D.S., Giarman N.J.: Schedule of appearance of serotonin (5-hydroxytryptamine) and associate enzymes in the developing rat brain. *J. Neurochem.* 12, 911-918, 1965.
43. Bennett J.P., Snyder S.H.: Serotonin and lysergic acid diethylamine binding in rat brain membranes. Relationship to postsynaptic serotonin receptors. *Mol. Pharmacol.* 12, 373-389, 1976.
44. Bensted J.P.M., Dobbing J., Morgan R.S., Reid R.T.W., Payling W., Wright G.: Neurological development and myelination in the spinal cord of the chick embryo. *J. Embryol. Exp. Morph.* 5, 428-437, 1957.
45. Bidstrup P.L.: Psychiatric sequelae of chronic exposure to organophosphorus insecticides. *Lancet* 2, 103, 1961.
46. Bidstrup P.L., Bonnel J.A., Backett A.G.: Paralysis following poisoning by a new organic phosphorus insecticide (mipafox) report on two cases. *Br. Med. J.* 1, 1068-1072, 1953.
47. Bignami G., Rosic N., Michalek H., Milosevic M., Gatti G.L.: Behavioral toxicity of anticholinesterase agents: methodological, neurochemical and neuropsychological aspects. In: *Behavioral Toxicology*. Eds. Weiss B., Laties V.G. Plenum Publ. Co. New York., 1975, pp. 155-215.
48. Bischoff A.: Ultrastructure of tri-ortho-cresylphosphate poisoning in the chicken. II. Studies on spinal cord alteration. *Acta Neuropath. (Berl.)* 15, 142-155, 1970.



49. Bisso G.M., Meneguez A., Michalek H.: Developmental factors affecting brain acetylcholinesterase inhibition and recovery in DFP-treated rats. *Dev. Neurosci.* 5, 508-519, 1982.
50. Bisso G.M., Nemesio R., Michalek H.: Early post-natal changes in the pattern of molecular forms of acetylcholinesterase in the rat brain. In: *Multidisciplinary approach to brain development*. Eds.: Di Benedetta C., Balazs R., Gombos G., Porcellati G., Elsevier, North Holland Biomedical Press, Amsterdam, New York, Oxford, 1980.
51. Blaber L.C., Creasey N.H.: The mode of recovery of cholinesterase activity in vivo after organophosphorus poisoning. *Biochem. J.* 77, 597-604, 1960.
52. Blackspad T., White L.E., Walberg F.: Early stages of terminal axonal degeneration in the Fascia dentata. *Ultrastruct. Res.*, 12, 236, 1965.
53. Blatchford D., Holzbauer M., Grahame-Smith D.G., Youdim M.B.H.: Ontogenesis of enzyme systems deaminating different monoamines. *Brit. J. Pharmacol.* 57, 279-293, 1976.
54. Bogdański D.F., Weissbach H., Udenfriend S.: The distribution of serotonin, 5-hydroxytryptophan decarboxylase and monoamine oxidase in brain. *J. Neurochem.* 1, 272-278, 1957.
55. Bolam J.P., Ingham C.A., Smith A.D.: The section-Golgi-impregnation procedure. 3. Combination of Golgi-impregnation with enzyme histochemistry and electron microscopy to characterize acetylcholinesterase - containing neurons in the rat neostriatum. *Neurosci.* 12, 687-709, 1984.
56. Bon S., Massoulie J.: Molecular forms of electrophorus acetylcholinesterase: the catalytic subunits: fragmentation, intra- and intersubunit disulfide bonds. *FEBS Lett.* 71, 273-278, 1976.
57. Bouldin T.W., Covanagh J.B.: Organophosphorus neuropathy. I. A teased fiber study of the spatiotemporal spread of axonal degeneration. *Am. J. Pathol.* 94, 241-252, 1979a.
58. Bouldin T.W., Covanagh J.B.: Organophosphorus neuropathy. II. A fine structural study of the early stages of axonal degeneration. *Am. J. Pathol.* 94, 253-270, 1979b.



59. Bourgain A., Bourgain S., Benda P., Glowinski J., Hamon M.: Characteristics of tryptophan accumulation by glial cells. *Brain Res.* 66, 253-263, 1974a.
60. Bourgain S., Faivre-Bauman A., Benda P., Glowinski J., Hamon M.: Plasma tryptophan and 5HT metabolism in the CNS of the new born rat. *J. Neurochem.* 23, 319-327, 1974b.
61. Bradley W.G., Williams M.H.: Axoplasmic flow in axonal neuropathies. I. Axoplasmic flow in cat with toxic neuropathies. *Brain* 96, 235-246, 1973.
62. Brodeur J., Du Bois K.P.: Comparison of acute toxicity of anticholinesterase insecticides to weanling and adult male rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 114, 509-511, 1963.
63. Budreau C.H., Singh R.P.: Transplacental passage of dementon in CF-1 mice. *Arch. Environ. Health* 26, 161-163, 1973.
64. Burton W.B.: Synthesis of 2,2-dichlorovinyl dimethyl phosphate labeled with  $^{14}\text{C}$ ,  $^{36}\text{Cl}$ ,  $^{32}\text{P}$ . *J. Agr. Food Chem.* 19, 869-871, 1971.
65. Butcher L.L., Woolf N.J.: Monoaminergic-cholinergic relationships and the chemical communication matrix of the substantia nigra and neostriatum. *Brain Res. Bull.* 9, 475-492, 1982.
66. Campbell B.A., Lytle L.D., Fibiger H.C.: Ontogeny of adrenergic arousal and cholinergic inhibitory mechanisms in the rat. *Science* 166, 635-637, 1969.
67. Campbell B.A., Spear N.E.: The ontogeny of memory. *Psychological Rev.* 79, 215-236, 1972.
68. Carlsson A., Davies J.N., Kehr W., Lindqvist M., Atack C.V.: Simultaneous measurements of tyrosine and tryptophan hydroxylase activities in brain in vivo using an inhibitor of the aromatic amino acid decarboxylase. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 275, 153-168, 1972.
69. Caroldi S., Lotti M.: Delayed neurotoxicity caused by a single massive dose of Dichlorvos to adult hens. *Toxicol. Lett.* 8, 157-159, 1981.
70. Caroldi S., Lotti M.: Neurotoxic esterase in peripheral nerve: assay, inhibition and rate of resynthesis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 62, 498-501, 1982.



71. Carpenter H.W., Jenden D.J., Shulman N.R., Turenan J.R.: Toxicology of a triaryl phosphate oil (1) Experimental toxicology. Arch. Ind. Hlth. 20, 234-252, 1959.
72. Carson V.G., Jenden D.J.: Total brain choline changes during the development of tolerance to DFP. Proc. Soc. Neurosci. 3, 238, 1973.
73. Cavanagh J.B.: Peripheral neuropathy caused by toxic agents. CRC Crit. Rev. Toxicol. 2. 365-417, 1973.
74. Cehovic G., Dettbarn W.D., Welsch F.: Paraoxon: effects on rat brain cholinesterase and on growth hormone and prolactin of pituitary. Science 175, 1256-1258, 1972.
75. Chedwick L.E.: Actions on insects and other invertebrates. In: Cholinesterase and Anticholinesterase Agents. Ed. Koelle G.B. Handbuch der Experimentellen Pharmakologie. Vol. 15, Springer-Verlag, Berlin 1963, pp. 741-798.
76. Chippendale T.J., Cotman C.V., Kozar M.D., Lynch G.S.: Analysis of AChE synthesis and transport in the rat hippocampus: recovery of AChE activity in the septum and hippocampus after administration of DFP. Brain Res. 81, 485-496, 1974.
77. Chippendale T.J., Zawalkow G.A., Russell R.W., Overstreet D.H.: Tolerance to low acetylcholinesterase levels: modification of behavior without acute behavioral change. Psychopharmacol. 26, 127-139, 1972.
78. Chubb I.W., Hodgson A.J., White G.H.: Acetylcholinesterase hydrolyzes substance P. Neurosci. 5, 2065-2072, 1980.
79. Clark D.F., Lenz D.E.: Characterization of the molecular forms of acetylcholinesterase in discrete areas of the rat brain. Fed. Proc. 42, 2024, 1983.
80. Clermont, De.Ph.: Note sur la préparation de quelques éthers (Séance du lundi 14 août). C.R. Acad. Sci. 39, 338-340, 1854.
81. Clothier B., Johnson M.K.: Reactivation and aging of neurotoxic esterase inhibited by variety of organophosphorus esters. Biochem. J. 185, 739-747, 1980.
82. Collingham B.A., Parkinson D.: In: Monoamine Oxidase: Structure, Functions and Altered Functions. Eds. Singer T., Von Koff R., Murphy D. Academic Press, 1979, pp. 81-86.



83. Colcolough M.H., Hack M.H., Helmy F.M., Vaughn G.E., Veith D.C.: Some histochemical, biochemical and morphological observations relating to lipofuscin and mitochondria. *Acta Histochem.* (Jena) 43, 98-109, 1972.
84. Colpaert F.C., Janssen P.A.J.: The head-twitch response to intraperitoneal injection of 5-hydroxytryptophan in the rat: Antagonist effects of purported 5-hydroxytryptamine antagonists and of pirenperone, an LSD antagonist. *Neuropharmacol.* 22, 993-1000, 1983.
85. Costa E., Neff N.H.: Estimation of turnover rates to study the metabolic regulation of the steady-state level of neuronal monoamines. In: *Handbook of Neurochemistry*. Ed. A. Lajtha, Plenum Press, New York, 1970, pp.45-61.
86. Cragg B.G.: What is the signal for chromatolysis? *Brain Res.* 23, 1-21, 1970.
87. Crone H.D.: Can allosteric effectors of acetylcholinesterase control the rate of ageing of the phosphorylated enzyme? *Biochem. Pharmacol.* 23, 460-463, 1974.
88. Curzon G.: Tryptophan, brain 5HT and behaviour: how are they related. In: *Biochemical and Medical Aspects of Tryptophan Metabolism*. Eds. O. Hayaishi, Y. Ishimura, R. Kido. Elsevier-North-Holland Biochemical Press, 1980, pp. 267-279.
89. Curzon G., Kantamaneni B.D., Kricklebank M.D.: A comparison of an improved o-phthalaldehyde fluorometric method and high pressure liquid chromatography in the determination of brain 5-hydroxyindoles of rats treated with L-tryptophan and p-chlorophenylalanine. *Br. J. Pharmacol.* 73, 555-561, 1981.
90. Curzon G., Knott P.J.: Environmental, toxicological and related aspects of tryptophan metabolism with particular reference to the central nervous system. *CRC Critical Rev. Toxicol.* 6, 145-187, 1977.
91. Daszuta A., Gaudin-Chazal G., Faudon M., Barrit M.C., Ternaux J.P.: Endogenous levels of tryptophan, serotonin and 5-hydroxyindoleacetic acid in the developing brain of the cat. *Neurosci. Lett.* 11, 187-192, 1979.
92. David S., Nathaniel E.J.: Intranuclear inclusions in the developing neurons of the rat cuneate nuclei. *Cell Tiss. Res.* 193, 525-532, 1978.
93. Davis J.N.: Adaptation of brain monoamine synthesis to hypoxia in the rat. *J. Appl. Physiol.* 39, 215-220, 1975.



94. Davis G.A., Agranoff B.W.: Metabolic behaviour of isozymes of acetylcholinesterase. *Nature*, Lond. 220, 227-280, 1968.
95. Davis J., Carlsson A.: Effect of hypoxia on tyrosine and tryptophan hydroxylation in unanesthetized rat brain. *J. Neurochem.* 20, 913-915, 1973a.
96. Davis J., Carlsson A.: The effect of hypoxia on monoamine synthesis levels and metabolism in rat brain. *J. Neurochem.* 21, 783-790, 1973b.
97. Davis J.N., Carlsson A., MacMillan V., Siesjö B.K.: Brain tryptophan hydroxylation: dependence on arterial oxygen tension. *Science* 182, 72-74, 1973.
98. Davis C.S., Richardson R.J.: Organophosphorus compounds. In: *Experimental and Clinical Neurotoxicology*. Eds. P.S. Spencer and H.H. Schaunberg. Baltimore: Williams and Wilkins, 1980, pp. 527-544.
99. Davison A.N.: Myelination as a vulnerable period in brain development. *Brit. Med. Bull.* 22, 40-44, 1966.
100. Davison A.N., Dobbing J.: The developing brain. In: *Applied Neurochemistry*. Blackwell, Oxford 1968, pp. 253-286.
101. Dąbska M., Iwanowski L., Kozłowski P.: The effect of transplacental intoxication with dichlorvos on the development of cerebral cortex in newborn rabbits. *Neuropat. Pol.* 17, 571-576, 1979.
102. Dąbska M., Iwanowski L., Maślińska D., Ostenda M.: Blood-brain barrier in young rabbit brain after dichlorvos intoxication. *Neuropat. Pol.* 22, 129-137, 1984.
103. Dąbska M., Maślińska D.: Effect of dichlorvos (DDVP) intoxication of rabbit brain. *Neuropat. Pol.* 20, 77-84, 1982a.
104. Dąbska M., Maślińska D.: Development of neuronal junctions in different phylogenic regions of rabbit's cerebral cortex. *Zwierzęta Lab.* 19, 131-137, 1982b.
105. Dąbska M., Maślińska D., Olszewska K.: Zmiany w korze mózgu młodych królików po przewlekłym zatruciu dichlorfosem. *Zwierzęta Lab.* 18, 47-51, 1981.
106. Dąbska M., Maślińska D., Rakowska I., Rutczyński M.: Ocena wpływu zatrucia dichlorfosem królików i szczurów w czasie ciąży na stan i rozwój potomstwa. *Bromat. Chem. Toksykol.* 11, 355-357, 1978.



107. Damska M., Zgorzalewicz B.: Morphological and biochemical maturation of myelin sheaths in some structures of the rabbit cerebral hemispheres. *Neuropat. Pol.* 21, 27-33, 1983.
108. Degushi T., Barchas J.: Regional distribution and developmental change of tryptophan hydroxylase activity in rat brain. *J. Neurochem.* 19, 927-929, 1972.
109. Dettbarn W.D.: Pesticide induced muscle necrosis: mechanisms and prevention. *Fund. Appl. Toxicol.* 4, S18-S26, 1984.
110. Dési J.: Neurotoxicological investigation of pesticides in animal experiments. *Neurobehavioral Toxicology and Teratology* 5, 503-515, 1983.
111. Dicowsky L., Morello A.: Glutathione-dependent degradation of 2,2-dichlorovinyl dimethyl phosphate (DDVP) by the rat. *Life Sci.* 10, 1031-1037, 1971.
112. Diekerson J.W.T., Dobbing J.: Prenatal and postnatal growth and development of the central nervous system of the pig. *Proc. Roy. Soc. B.* 166, 384-395, 1967.
113. Dill J.R., Smith P.W.: Central nervous system effects of chronic exposure to organophosphate insecticides. *Aerospace Med.* 35, 475-478, 1964.
114. Durham W.F., Wolfe H.R., Quinby G.E.: Organophosphorus insecticides and mental alertness. Studies in exposed workers and in poisoning cases. *Arch. Environ. Hlth.* 10, 55-66, 1965.
115. Dobbing J.: Vulnerable periods in developing brain. In: *Applied Neurochemistry.* Blackwell, Oxford 1968, pp.287-316.
116. Dobbing J., Sands J.: Timing of neuroblast multiplication in developing human brain. *Nature, Lond.* 226, 639-640, 1970a.
117. Dobbing J., Sands J.: Growth and development of the brain and spinal cord of the guinea pig. *Brain Res.* 17, 115-123, 1970b.
118. Domenech C.E., de Domenech E.E.M., Balegno H.F., de Mendoza D., Farias R.N.: Pesticide action and membrane fluidity: allosteric behavior of rat erythrocyte membrane-bound acetylcholinesterase in the presence of organophosphorus compounds. *FEBS Lett.* 74, 243, 1977.



119. de Domenech E.E.M., Domenech C.E., Balegno H.F., de Mendoza D., Farias R.N.: Pesticide action: different response of erythrocyte membrane acetylcholinesterase to inhibition by organophosphorus compounds under varied dietary conditions. *Pesticide Biochem. Physiol.* 14, 1-4, 1980.
120. Dross K.: Effects of diisopropylfluorophosphate on the metabolism of choline and phosphatidylcholine in rat brain. *J. Neurochem.* 24, 701-706, 1975.
121. Dross K., Kewitz H.: Konzentration von acetylcholin, cholin und glycerylophosphorylcholin im gehirn wahrend der narkose und bei der DFP-vergiftung. *Naunyn-Schmeidebergs Arch. Pharmak. exp. Path.* 260, 107-108, 1968.
122. Dudai Y., Silman I.: The molecular weight and subunit structure of acetylcholinesterase preparations from the electric organ of the electric eel. *Bioche. Biophys. Res. Commun.* 59, 117-124, 1979.
123. Dudek B.K.: Brain and leucocyte neurotoxic esterase as biomonitors of organophosphorus delayed neurotoxicity. Ph. D. Thesis. Ann. Arbor. MI: University of Michigan, 1979.
124. Dudek B.R., Richardson R.J.: Evidence for the existence of neurotoxic esterase in neural and lymphatic tissue of the adult hen. *Biochem. Pharmacol.* 31, 1117-1121, 1982.
125. Duffy F.H., Burchfiel J.L., Bartels P.H., Gaon M., Sim Van M.: Long-term effects of an organophosphate upon the human electroencephalogram. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 47, 161-176, 1979.
126. Dun N.J., Karczmar A.G.: Pharmacology of synaptic ganglionic transmission and second messengers. In: *Vertebrate Autonomic and Enteric Ganglia: Anatomy, Electrophysiology and Neuropharmacology.* Eds. Karczmar A.G., Kotetsu K., Nishi S. Karger, Basel, 1984.
127. Durham W.F., Gaines T.B., Hayes W.J.: Paralytic and related effects of certain organic phosphorus compounds. *Arch. Indust. Health* 13, 326-330, 1956.
128. Eayrs J.T., Goodhead B.: Postnatal development of the cerebral cortex in the rat. *J. Anat. Lond.* 93, 385-402, 1959.
129. Edery H., Porath G., Zahavy J.: Passage of 2-hydroxyimino-methyl-N methylpyridinium methane-sulfonate to the fetus and cerebral spaces. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 9, 341-346, 1966.



130. Ehlert F.J., Kokka N., Fairhurst A.S.: Altered (<sup>3</sup>H) quinuclidinylbenzilate binding in the striatum of rats following chronic cholinesterase inhibition with diisopropylfluorophosphate. *Mol. Pharmac.* 17, 24-30, 1980.
131. Elliott H.W., Bokums J.A.: Effect of pralidoxime on electrical activity of the cat brain. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. New York* 129, 443-446, 1968.
132. Ellman G.L., Courtney K.D., Andrevs V., Featerstone R.M.: A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmac.* 7, 88-95, 1961.
133. Englund G.: Pesticides. In: *Pathology of the nervous system*. Ed. J. Minckler. McGraw-Hill Book Comp., A Blakiston Publ. New York, St. Louis, San Francisco, London, Sydney, Toronto, pp. 1691-1694, 1972.
134. Erdo S.L., Kiss B., Rosdy B.: Effect of salbutamol on the cerebral levels, uptake and turnover of serotonin. *Eur. J. Pharmacol.* 78, 357-361, 1982.
135. Escande C., Bousquet B., Dreux C.: Dosage automatique spectrofluorimétrique du tryptophane plasmatique libre et total. *Path. Biol.* 26, 453-457, 1978.
136. Etienne P., Young S.N., Sourkes T.L.: Inhibition by albumin of tryptophan uptake by brain. *Nature* 262, 144-145, 1976.
137. Eto M.: *Organophosphorus Pesticides: Organic and Biological Chemistry*, CRC Press, Cleveland, Ohio, 1974.
138. Fernando J.C.R., Hoskins B., Ho I.K.: Effect of striata dopamine metabolism and differential motor behavioral tolerance following chronic cholinesterase inhibition with Diisopropylfluorophosphate. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 20, 951-957, 1984.
139. Fernstrom J.D.: Diet-induced changes in plasma amino acid pattern: effects on the brain uptake of large neutral amino acids and on brain serotonin synthesis. *J. Neurol. Transmission. Suppl.* 15, 55-67, 1979.
140. Fernstrom J.D.: Acute effects of tryptophan and single meals on serotonin synthesis in the rat brain. In: *Serotonin in Biological Psychiatry*. Eds. B.T. Ho, J.C. Schoolar, E. Usdin. New York, Raven Press, 1982, pp.85-106.
141. Fernstrom J.D., Faller D.U., Shabshelowitz H.: Acute reduction of brain serotonin and 5-HIAA following food consumption: correlation with the ratio of serum tryptophan to the sum of competing neutral amino acids. *J. Neurol. Trasm.* 36, 113-121, 1975.



142. Fernstrom J.D., Wurtman R.J.: Brain serotonin content: increase following ingestion of carbohydrate diet. *Science* 174, 1023-1025, 1971.
143. Fernstrom J.D., Wurtman R.J.: Brain serotonin content: physiological regulation by plasma neutral amino acids. *Science* 178, 414-416, 1972.
144. Fernstrom J.D., Wurtman R.J.: Nutrition and the brain. *Scientific American* 230, 84-91; 1974.
145. Fest C., Schmidt K.J.: The chemistry of organophosphorus pesticides. Berlin, Heidelberg, New York, Springer 1973.
146. Field E.J., Peat A.: Intranuclear inclusions in neurons and glia: a study in the ageing mouse. *Gerontologia* 17, 129-138, 1971.
147. Fish S.A.: Organophosphorus cholinesterase inhibitors and fetal development. *Am. J. Obstetrics Gynecol.* 96, 1148-1154, 1966.
148. Fleischer J.H., Harris L.W.: Dealkylation as a mechanism for aging of cholinesterase after poisoning with pinacolyl methylphosphonofluoridate. *Biochem. Pharmacol.* 14, 641-650, 1965.
149. Fleischer J.H., Harris L.W., Miller G.R., Thomas N.C., Cliff W.J.: Antagonism of sarin poisoning in rats and guinea pigs by atropine, oximes and mecamlamine. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 16, 40-47, 1970.
150. Fonnum F., Frizell M., Sjöstrand J.: Transport turnover and distribution of choline acetyltransferase and acetylcholinesterase in the vagus and hypoglossal nerves of the rabbit. *J. Neurochem.* 21, 1109-1120, 1973.
151. Fowler C.J., Callingham B.A., Mantle T.J., Tipton K.F.: Monoamine oxidase A and B: a useful concept? *Biochem. Pharmacol.* 17, 97-101, 1978.
152. Fowler C.J., Oreland L., Marcusson J., Winblad B.: Titration of human brain monoamine oxidase A and B by clorgyline and l-deprenyl. *Arch. Pharmacol.* 311, 263-272, 1980.
153. Fowler C.J., Tipton K.F.: Deamination of 5-hydroxytryptamine by both forms of monoamine oxidase in the rat brain. *J. Neurochem.* 38, 733-736, 1982.



154. Franz J.R., Hull E.M., Snyder A.M., Roth J.A.: The effect of maternal progesterone on brain monoamine oxidase activity of neonatal rats. *Brain Res.* 158, 397-406, 1978.
155. Freed V.H., Matin M.A., Fang S.C., Kar P.P.: Role of striatal dopamine in delayed neurotoxic effects of organophosphorus compounds. *Eur. J. Pharmacol.* 35, 229-332, 1976.
156. Friede R.L.: *Topographic brain chemistry.* Academic Press, New York, London 1966.
157. Frizell M., Sjöstrand J.: Transport of proteins, glycoproteins and cholinergic enzymes in regenerating hypoglossal neurons. *J. Neurochem.* 22, 845-850, 1974.
158. Fuxe K., Hökfelt T., Ungerstedt U.: Morphological and functional aspects of central monoamine neurons. *Int. Rev. Neurobiol.* 13, 93-126, 1970.
159. Fuxe K., Jonsson G.: Further mapping of central 5-hydroxytryptamine neurons: studies with the neurotoxic dihydroxytryptamines. *Advances in Biochemical Psychopharmacology*, vol. 10, Raven Press, New York 1974, pp. 1-12.
160. Gerattini S., Consolo S., Ladinski H.: Neuronal links in the CNS: focus on dopaminergic and serotonergic regulation of striatal cholinergic neurons. *Pol. J. Pharmacol. Pharm.* 32, 155-164, 1980.
161. Gershon S., Show F.H.: Psychiatric sequelae of chronic exposure to organophosphorus insecticides. *Lancet* 1, 1371-1374, 1961.
162. Gessa G.L., Tagliamonte A.: Serum free tryptophan: control of brain concentrations of tryptophan and of synthesis of 5-hydroxytryptamine. In: *Aromatic amino acids in the brain.* Ciba Found. Symp. Eds. G.E. Wolstenholme, D.W. Fitzsimons. Amsterdam, London, New York. Elsevier, Excerpta Medica, North Holland 1974, 22, pp. 207-216.
163. Girgis M., Wang S.: *A new stereotaxic atlas of the rabbit brain.* Warren H. Green. Inc. St. Louis 1980.
164. Glees P.: Maturation and aging of vertebrate neurons. In: *Metabolic compartmentation and neurotransmission.* Eds. S. Berl, D.D. Clarke, D. Scheider. New York, Plenum 1975.



165. Glees P., Hasan M., Spoenri P.E.: Mitochondrial genesis of lipofuscin. Evidence based on electron microscopic studies of the brain, neural tissue culture and heart. *J. Physiol. (Lond.)* 239, 87P, 1974.
166. Glees P., Janzik H.H.: Chemically (TCP) induced fiber degeneration in the central nervous system, with reference to clinical and neuropharmacological aspects. *Progr. Brain Res.* 14, 97-121, 1965.
167. Glees P., Miller K.: The finer structure of synapses and neurons, a review of recent electron microscopical studies. *Paraplegia* 2, 77-95, 1964.
168. Glisson S.N., Karczmar A.G., Barnes L.: Effects of diisopropylphosphofluoridate on acetylcholine, cholinesterase and catecholamines of several parts of rabbit brain. *Neuropharmacol.* 13, 623-631, 1974.
169. Golz H.H.: Psychiatric sequelae of chronic exposure to organophosphorus insecticides. *Lancet* 2, 369-370, 1961.
170. Gopinath G., Glees P.: Mitochondrial genesis of lipofuscin in the mesencephalic nucleus of the Vth nerve of aged rats. *Acta Anat. (Basel)* 89, 14-20, 1974.
171. Grahame-Smith D.G.: Does the total turnover of brain 5-HT reflect the functional activity of 5-HT in brain? In: *Serotonin and Behavior*. Eds. J. Barchas, E. Usdin, Academic Press, New York, London 1973, pp. 5-7.
172. Grassi J., Vigny M., Massoulie J.: Molecular forms of acetylcholinesterase in bovine caudate nucleus and superior cervical ganglion solubility properties and hydrophobic character. *J. Neurochem.* 38, 457-469, 1982.
173. Graybiel A.M., Ragsdale C.W., Yonoeka E.S., Elde R.P.: An immunohistochemical study of enkephalins and other neuropeptides in the striatum of the cat with evidence that the opiate peptides are arranged to form mosaic patterns in register with the striosomal compartments visible by acetylcholinesterase staining. *Neuroscience* 6, 377-397, 1981.
174. Green H., Sawyer J.L.: Demonstration, characterization and assay procedure of tryptophan hydroxylase in the rat brain. *Analyt. Biochem.* 15, 53-64, 1966.
175. Greenawalt J.W., Schnaitman C.: An appraisal of the use of monoamine oxidase as an enzyme marker for the outer membrane of rat liver mitochondria. *J. Cell Biol.* 46, 173-179, 1970.



176. Greenfield S.A., Cheramy A., Glowinski J.: Evoked release of proteins from central neurons in vivo. *J. Neurochem.* 40, 1048-1057, 1983a.
177. Greenfield S.A., Chubb I.W., Grunewald R.A., Henderson Z., May J., Portnoy S., Weston J., Wright M.C.: A non-cholinergic function for acetylcholinesterase in the substantia nigra: behavioural evidence. *Exp. Brain Res.* 54, 513-520, 1984.
178. Greenfield S.A., Grunewald R.A., Foley P., Shaw S.G.: Origin of various enzymes released from the substantia nigra and caudate nucleus: effects of 6-hydroxydopamine lesions of the nigro-striatal pathway. *J. Comp. Neurol.* 214, 87-92, 1983b.
179. Greenfield S.A., Stein J.F., Hodgson A.J., Chubb I.W.: Depression of nigral pars compacta cell discharge by exogenous acetylcholinesterase. *Neuroscience* 6, 2287-2295, 1981.
180. Greenfield S.A., Weston J.: Acetylcholinesterase release from rat nigro-striatal cells following infusion of haloperidol into the substantia nigra. *J. Physiol. (Lond.)* 351, 23P, 1984.
181. Grob D.: Anticholinesterase intoxication in man and its treatment. In: *Cholinesterases and Anticholinesterase Agents*. Ed. G.B. Koelle. *Handbuch d.exp. Pharmakol., Ergänzungs-wk.* 15, Springer-Verlag, Berlin 1963, pp. 989-1027.
182. Grob D., Garlick W.L., Harvey A.McG.: The toxic effects in man of the anticholinesterase insecticide parathion (p-nitrophenyl diethyl thionophosphate). *Bull. Johns Hopkins Hosp.* 87, 106-129, 1950.
183. Hansen L.G.: Biotransformation of organophosphorus compounds relative to delayed neurotoxicity. *Neurotoxicol.* 4, 97-111, 1983.
184. Hammon M., Bourgoïn S.: Ontogenesis of tryptophan transport in the rat brain. *J. Neurol. Transmission, Suppl.* 15, 93-105, 1979.
185. Hammon M., Bourgoïn S., Morot-Gaudry Y., Hery F., Glowinski J.: Role of active transport of tryptophan in the control of 5-hydroxytryptamine biosynthesis. *Advances in Biochemical Psychopharmacology*, vol. 11, 1974, pp. 153-162.



186. Hammon M., Glowinski J.: Regulation of serotonin synthesis. *Life Sci.* 15, 1533-1548, 1974.
187. Harden K., Wolfe B., Sporn J.R., Perkins J.P., Molinoff P.: Ontogeny of beta-adrenergic receptors in rat cerebral cortex. *Brain Res.* 125, 99-108, 1977a.
188. Harden K., Wolfe B., Sporn J., Poulus B., Molinoff P.: Effect of 6-hydroxydopamine on the development of the beta adrenergic receptor/adenylate cyclase system in rat cerebral cortex. *J. Pharmac. Exp. Ther.* 203, 132-143, 1977b.
189. Harel S., Watanabe K., Linke I., Schain R.J.: Growth and development of the rabbit brain. *Biol. Neonate* 21, 381-399, 1972.
190. Hasan M., Glees P.: Genesis and possible dissolution of neuronal lipofuscin. *Gerontologia* 18, 217-236, 1972.
191. Hattori T., McGeer P.L.: Synaptogenesis in the corpus striatum of the infant rat. *Exp. Neurol.* 38, 70-79, 1973.
192. Hayes W.J.: *Toxicology of Pesticides*. Williams and Wilkins, Co. Baltimore, Md. 1975.
193. Hedner T.: Central monoamine metabolism and neonatal oxygen deprivation. *Acta Physiol. Scand. Suppl.* 460, 1-34, 1978.
194. Hedner T., Lundborg P.: The effect of hypoxia on monoamine synthesis in brains of developing rats. *Biol. Neonate* 31, 122-126, 1977.
195. Hedner T., Lundborg P.: Serotonin metabolism in neonatal brain during anoxia and recovery. *Acta Physiol. Scand.* 109, 163-168, 1980a.
196. Hedner T., Lundborg P.: Serotonergic development in the postnatal rat brain. *J. Neurol. Transmission* 49, 257-279, 1980b.
197. Hedner T., Lundborg P., Engel J.: The effect of hypoxia on monoamine synthesis in brains of developing rats. II. Different length of exposure. *Biol. Neonate* 32, 229-236, 1977.
198. Hedner T., Lundborg P., Engel J.: The effect of hypoxia on monoamine synthesis in brains of developing rats. III. Different O<sub>2</sub>-levels. *Biol. Neonate* 34, 55-60, 1978.



199. Hedner T., Lundborg P., Engel J.: Brain biochemical and behavioral changes in 4 weeks old rats after neonatal oxygen deprivation. *Biochem. Behav.* 10, 647-650, 1979.
200. Henry I.A.: The effects of axotomy on the development of the rat superior cervical ganglion. *Brain Res.* 90, 235-244, 1975a.
201. Henry I.A.: The response of adrenergic neurons to axotomy and nerve growth factor. *Brain Res.* 94, 87-97, 1975b.
202. Hern J.E.C.: Some effects of experimental organophosphorus intoxication in primates. DM Thesis, University of Oxford, 1971.
203. Hern M., Glees P.: Genesis and possible dissolution of neuronal lipofuscin. *Gerontologia* 18, 217-236, 1972.
204. Herman Z.S.: The cholinergic system of the brain and its interactions with other aminergic systems. *Pol. J. Pharmacol. Pharm.* 31, 373-380, 1979.
205. Hess A.: Reactions of mammalian fetal spinal cord, spinal ganglia and brain to injury. *J. Exp. Zool.* 132, 349-389, 1956.
206. Hess A.: The experimental embryology of the foetal nervous system. *Biol. Rev.* 32, 231-260, 1957.
207. Hery F., Bourgoïn S., Hamm M., Ternaux J.P., Glowinski J.: Control of the release of newly synthesized <sup>3</sup>H-5-hydroxytryptamine by medicine and muscarinic receptors in rat hypothalamic slices. *Arch. Pharmacol.* 296, 91-97, 1977.
208. Hierons R., Johnson M.K.: Clinical and toxicological investigations of a case of delayed neuropathy in man after acute poisoning by an organophosphorus pesticide. *Arch. Toxicol.* 40, 279-284, 1978.
209. Hisatomi K., Niiyama Y.: Effects of postnatal under-nutrition on the catecholamine and serotonin contents of suckling rat brain. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 26, 279-292, 1980.
210. Hobbiger F.: Pharmacology of anticholinesterase drugs. In: *Neuromuscular Junction*. Ed. E. Zaimis. *Handbuch der Experimentellen Pharmakologie*. Vol. 42. Springer-Verlag, Berlin, 1976, pp. 487-581.



211. Hobbiger F., Vojvodic V.: The reactivating and antidotal actions of N,N'-trimethylenebis(pyridinum-4-aldoxime) (TMB-4) and N,N'-oxydimethylenebis(pyridinum-4-aldoxime) (toxogenin) with particular reference to their effect on phosphorylated acetylcholinesterase in brain. *Biochem. Pharmacol.* 15, 1677-1690, 1966.
212. Hodgson E., Casida J.E.: Mammalian enzymes involved in the degradation of 2,2-dichlorovinyl dimethyl phosphate. *J. Agr. Food Chem.* 10, 208-214, 1962.
213. Hoff K.M., Baker P.C., Buda R.: Free tryptophan levels in regions of the maturing mouse brain. *Brain Res.* 73, 376-379, 1974.
214. Hoff K.M., Baker P.C., Buda R.E.: Precursor and end product effects upon indoleamine maturation in mouse brain. *Biol. Neonate* 29, 360-367, 1976.
215. Hoff K.M., Baker P.C., Buda R.E.: Effects of parachlorophenylalanine on indoleamines in maturing mouse brain. *Gen. Pharmacol.* 8, 213-215, 1977.
216. Hokin M.R., Hokin L.E.: The role of phosphatidic acid and phosphoinositide in transmembrane transport elicited by acetylcholine and other humoral agents. *Int. Rev. Neurobiol.* 2, 99-136, 1960.
217. Hokin-Neaverson M.: Metabolism and role of phosphatidylinositol in acetylcholine-stimulated membrane function. *Adv. Exp. Med. Biol.* 83, 429-446, 1977.
218. Hollingsworth R.M.: Dealkylation of organophosphorus esters by mouse liver enzymes in vitro and in vivo. *J. Agr. Food Chem.* 17, 987-996, 1969.
219. Holmstedt B.: Structure-activity relationships of the organophosphorus anticholinesterase agents. In: *Cholinesterases and Anticholinesterase Agents*. Ed. G.B. Koelle. *Handbuch der Experimentellen Pharmakologie*. Vol. 15. Springer-Verlag, Berlin 1963, pp. 428-485.
220. Holmstedt B.: Pharmacology of organophosphorus cholinesterase inhibitors. *Pharmacol. Rev.* 11, 567-688, 1959.
221. Holmstedt B.: Les effets centraux des substances cholinomimetiques et cholinolytiques. *Actualites Pharmacologiques* 23, 175-198, 1970.
222. Holmstedt B., Krook L., Rooney J.R.: The pathology of experimental cholinesterase-inhibitor poisoning. *Acta Pharmac. Toxicol.* 13, 337-344, 1957.



223. Hollunger E.G., Nicklasson B.H.: The release and molecular state of mammalian brain acetylcholinesterase. *J. Neurochem.* 20, 821-836, 1973.
224. Homor G., Kasa P.: Acetylcholinesterase resynthesis after DFP poisoning. Histochemical and Biochemical study. *Acta Biochem. Bd.* 62 S, 293-301, 1978.
225. Hopkins A.: Toxic neuropathy due to industrial agents. In: *Peripheral Neuropathy*. Eds. P.J. Dyck, P.K. Thomas, E.H. Lambert. Philadelphia: W.B. Saunders 1975, pp. 1207-1226.
226. Horris L.W., Fleisher J.H., Clark J.H., Cliff W.J.: Dealkylation and loss of capacity for reactivation of cholinesterase inhibited by sarin. *Science* 154, 404-410, 1966.
227. Hovanes J.W., Broomfield C.A., Steinberg G.M., Lanks K.W., Lieske C.N.: Spontaneous reactivation of acetylcholinesterase following organophosphate inhibition. I. An analysis of anomalous reactivation kinetics. *Biochem. et Biophys. Acta* 483, 312-319, 1977.
228. Hovanes J.W., Lieske C.N.: Spontaneous reactivation of acetylcholinesterase inhibited with para-substituted phenyl methylphosphorochloridates. *Biochemistry* 11, 1051-1056, 1972.
229. Howd R.A., Nelson M.F., Lytle L.D.: L-tryptophan and rat fetal brain serotonin. *Life Sci.* 17, 803-812, 1975.
230. Huang R.H., Faulkner R.: The role of phospholipid in the multiple functional forms of brain monoamine oxidase. *J. Biol. Chem.* 256, 9211-9215, 1981.
231. Hüther G., Luppá H., Ott T.: The multiple forms of brain acetylcholinesterase. II. A suggestion of their functional importance. *Histochemistry* 55, 55-62, 1978.
232. Hutson D.H., Hoadley E.C.: The comparative metabolism of (<sup>14</sup>C-vinyl) Dichlorvos in animals and man. *Arch. Toxikol.* 30, 9-18, 1972.
233. Hutson D.H., Hoadley E.C., Pickering B.A.: The metabolic fate of (1-<sup>14</sup>C)-Dichlorvos in the rat after oral and inhalation exposure. *Xenobiotica* 1, 593, 1971.
234. Jacobson M.: *Developmental Neurobiology*. Holt. Rhinehart and Winston, Chicago III, 1970, pp. 180-187.



235. Jacobs B.L.: An animal model for studying central serotonergic synapses. *Life Sci.* 19, 777-785, 1976.
236. James K.A.C., Austin L.: The effect of DFP on axonal transport of protein in chicken sciatic nerve. *Brain Res.* 18, 192-194, 1970.
237. Jedrzejowska H., Rowinska-Marcinska K., Hoppe B.: Neuro-pathy due to phytosol (Agritox) report of a case. *Acta neuropath. (Berl.)* 49, 163-168, 1980.
238. Johnson M.K.: The primary biochemical lesion leading to the delayed neurotoxic effects of some organophosphorus esters. *J. Neurochem.* 23, 785-789, 1974.
239. Johnson M.K.: The delayed neuropathy caused by some organophosphorus esters: mechanism and challenge. *CRC Critical Reviews in Toxicology* 3, 289-316, 1975.
240. Johnson M.K.: Delayed neurotoxicity induced by organophosphorus compounds-areas of understanding and ignorance. *Dev. Toxicol. Environ. Sci.* 8, 27-38, 1980.
241. Johnson M.K.: The target for initiation of delayed neurotoxicity by organophosphorus esters: biochemical studies and toxicological applications. *Rev. Biochem. Toxicol.* 4, 141-212, 1982.
242. Johnson M.K., Lauwerys R.: Protection by some carbamates against the delayed neurotoxic effect of di-iso-propylphosphofluoridate. *Nature* 222, 1066-1068, 1969.
243. Johnston J.R.: Some observations upon a new inhibitor of monoamine oxidase in brain tissue. *Biochem. Pharmac.* 17, 1285-1297, 1968.
244. Jonsson G., Hallman H.: Changes in beta-receptor binding sites in rat brain after neonatal 6-hydroxydopamine treatment. *Neurosci. Lett.* 9, 27-32, 1978.
245. Jonsson G., Hallman H., Mefford I., Adams R.N.: The use of liquid chromatography with electrochemical detection for the determination of adrenaline and other biogenic amines. In: *Central Adrenaline Neurons*. Eds. K. Fuxe, M. Goldstein, B. Hökfelt, T. Hökfelt. Pergamon Press, Oxford 1980, pp. 59-71.
246. Jonsson G., Kasamatsu T.: Maturation of monoamine neurotransmitters and receptors in cat occipital cortex during postnatal critical period. *Exp. Brain Res.* 50, 449-458, 1983.



247. Jourdikian F., Tabakoff B., Alivisators S.G.A.: Ontogeny of multiple forms of monoamine oxidase in mouse brain. *Brain Res.* 93, 301-308, 1975.
248. Jouvét M.: Biogenic amines and the states of sleep. *Science* 163, 32-41, 1969.
249. Jouvét M.: The role of monoamines and acetylcholine in the sleep-working cycle. In: *Ergebnisse der Physiologie*. Ed. R.H. Adrian. Springer-Verlag, Berlin 1972, pp. 163-307.
250. Jurand A.: Malformations of the central nervous system induced by neurotropic drugs in mouse embryos. *Devel. Growth Differ.* 22, 61-70, 1980.
251. Kadir H.A., Knowles C.O.: Inhibition of rat brain monoamine oxidase by insecticides, acaricides and related compounds. *Gen. Pharmac.* 12, 239-247, 1981.
252. Karczmar A.G.: Pharmacologic, toxicologic and therapeutic properties of anticholinesterase agents. In: *Physiological Pharmacology*. Eds. W.S. Root, F.G. Hofman. Academic Press, Vol. 3, New York 1967, pp. 163-322.
253. Karczmar A.G.: History of the research with anticholinesterase agents. In: *International Encyclopedia of Pharmacology and Therapeutics*. Pergamon Press, Oxford, New York, Toronto, Sydney, Braunschweig 1970, pp. 1-44.
254. Karczmar A.G.: Acute and long lasting central actions of organophosphorus agents. *Fund. Appl. Toxicol.* 4, S1-S17, 1984.
255. Karki N.J., Kuntzman R., Brodie B.B.: Norepinephrine and serotonin levels at various stages of ontogenetic development. *Fed. Proc.* 19, 282, 1960.
256. Karki N.J., Kuntzman R., Brodie B.B.: Storage, synthesis and metabolism of monoamines in the developing brain. *J. Neurochem.* 9, 53-58, 1962.
257. Karnovsky M.J.: A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 27, 137, 1965.
258. Karnovsky M.J., Roots L.: A "direct coloring" thiocholine method for cholinesterases. *J. Histochem. Cytochem.* 12, 219-221, 1964.



259. Kewitz H., Pleul O., Mann E.: Pre- and postnatal development and drug induced alterations of free and bound acetylcholine in rat brain. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 298, 140-155, 1977.
260. Khera K.S., Clegg D.J.: Perinatal toxicity of pesticides. *Canad. Med. Assoc. J.* 100, 167-172, 1969.
261. Kimbrough R.D., Gaines T.B./ Effect of organic phosphorus compounds and alkylating agents on the rat fetus. *Archs Environ. Health* 16, 805-808, 1968.
262. Kinemuchi H., Kawaguchi T., Arai Y., Tajima H., Oreland L., Kamiyo K.: 5-Hydroxytryptamine: A substrate for rat liver mitochondrial monoamine oxidase A and B. *Japan J. Pharmacol.* 32, 954-957, 1982.
263. Kinemuchi H., Wakui Y., Kamiyo K.: Substrate selectivity of type A and type B monoamine oxidase in rat brain. *J. Neurochem.* 35, 108-114, 1980.
264. Kinemuchi H., Wakui Y., Toyoshima Y., Hayashi N., Kamiyo K.: Beta-phenylethylamine (PEA), a concentration dependent preferential substrate for multiple forms of MAO. In: *Monoamine Oxidase: Structure, Function and Altered Functions*. Eds. T.P. Singer, R.W. Von Koff, D.L. Murphy. Academic Press, New York 1979, pp. 461-472.
265. Klatzo J., Wisniewski H., Streicher E.: Experimental production of neurofibrillary degeneration. I. Light microscopic observations. *J. Neuropath. Exp. Neurol.* 24, 187-199, 1965.
266. Knoll J., Magyar K.: Some puzzling pharmacological effects of monoamine oxidase inhibitors. *Adv. Biochem. Psychopharmacol.* 5, 393-408, 1972.
267. Knott P.J., Joseph M.H., Curzon G.: Effects of food deprivation and immobilization on tryptophan and other amino acids in the rat brain. *J. Neurochem.* 20, 249-251, 1973.
268. Koelle G.B.: Anticholinesterase agents. In: *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. Eds. L.S. Goodman, A. Gilman. MacMillan Publ. Co., Inc. New York, Toronto, London 1975, pp. 445-466.
269. Koller W.C., Klawans H.L.: Organophosphorus intoxication. In: *Intoxications of the Nervous System. Part II*. Eds. P.J. Winken, G.W. Bruyn. *Handbook of clinical neurology*, Vol. 37, Elsevier, Amsterdam, New York, Shannon 1979, pp. 541-562.



270. Korpi E.F., Oja S.S.: Tryptophan influx into rat brain slices in different buffers and in the presence of other amino acids and albumin. *J. Neurochem.* 30, 925-927, 1978.
271. Korsak R.J., Sato M.M.: Effects of chronic organophosphate pesticide exposure on the central nervous system. *Clinical Toxicol.* 11, 83-96, 1977.
272. Kostowski W.: Brain serotonergic and catecholaminergic system. Facts and hypothesis. In: *Current Developments in Psychopharmacology*. Ed. W.B. Essman, L. Valzelli. Spectrum Publ. New York 1975, pp. 39-68.
273. Kostowski W.: 5-hydroxytryptamina. W: *Psychofarmakologia*. Red. W. Kostowski, S. Pużynski. PZWL 1980, str. 82-97.
274. Kozaczenco J.: Wpływ niektórych związków fosforoorganicznych na przebieg ciąży i śmiertelność okołoporodową płodów. *Ginekologia Polska, Supl.* 1/68, 5-164, 1968.
275. Kozar M.D., Overstreet D.H., Chippendale T.C., Russel R.W.: Changes in acetylcholinesterase activity in three major brain areas and related changes in behaviour following acute treatment with diisopropylfluorophosphate. *Neuropharmacol.* 15, 291-299, 1976.
276. Kraml M.: A rapid microfluorimetric determination of monoamine oxidase. *Biochem. Pharmac.* 14, 1684-1686, 1968.
277. Kroh H.: Intranuclear inclusions in mouse neurons. *Neuropat. Pol.* 22, 139-156, 1984.
278. Kroh H., Cervos-Navarro J.: Transformation of oligodendroglia: a para- or preneoplastic effect of ethylnitrosourea on mouse brain. *Acta Neuropath. (Berl.)* 59, 309-315, 1983.
279. Kuhn C., Butler S., Schanberg S.M.: Selective depression of serum growth hormone during maternal deprivation in rats. *Science (Wash. D.C.)* 201, 1034-1036, 1978.
280. Kuhn C.M., Schanberg S.M.: Maturation of central nervous system control of growth hormone secretion in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 217, 152-156, 1981.
281. Laskowski M.B., Detthorn W.D.: Presynaptic effects of neuromuscular cholinesterase inhibition. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 194, 351-361, 1975.



282. Lauder J.M.: Hormonal and humoral influences on brain development. *Psychoneuroendocrinology* 8, 121-154, 1983.
283. Lauder J.M., Bloom F.E.: Ontogeny of monoamine neurons in the locus coeruleus, raphe nuclei and substantia nigra of the rat. I. Cell differentiation. *J. Comp. Neurol.* 155, 469-481, 1974.
284. Lauder J.M., Bloom F.E.: Ontogeny of monoamine neurons in the locus coeruleus, raphe nuclei and substantia nigra of the rat. II. Synaptogenesis. *J. Comp. Neurol.* 163, 251-264, 1975.
285. Lauder J.M., Krebs H.: Effect of p-chlorophenylalanine on time of neuronal origin during embryogenesis in the rat. *Brain Res.* 107, 638-644, 1976.
286. Lauder J.M., Krebs H.: Serotonin as a differentiation signal in early neurogenesis. *Devel. Neurosci.* 1, 15-30, 1978a.
287. Lauder J.M., Krebs H.: Serotonin and early neurogenesis. In: *Maturation of Neurotransmission*. Eds. A. Vernadakis, E. Giacobini, G. Filogamo. Karger, Basel 1978b, pp. 171-180.
288. Lauder J., Krebs H., Wallace J., Petrusz P.: Serotonin as a developmental signal: relationships between 5HT neurons and dividing cells in developing rat brain. *Anat. Rec.* 199, 150A, 1981.
289. Lauder J.M., Wallace J.A., Krebs H., Petrusz P., McCarthy K.: In vivo and in vitro development of serotonergic neurons. *Brain Res. Bull.* 9, 605-625, 1982.
290. Lawley P.D., Shah S.A., Orr D.J.: Methylation of nucleic acids by 2,2-dichlorovinyl dimethyl phosphate (Dichlorvos, DDVP). *Chem. Biol. Interact.* 8, 171-182, 1974.
291. Lieberman A.R.: Some factors affecting retrograde neuronal responses to axonal lesions. In: *Essays on the Nervous System*. Eds. R. Bellairs, E.G. Gray. Clarendon Press, Oxford 1974, pp. 71-105.
292. Lieske C.N., Clark J.H., Meyer H.G., Lowe J.R.: Spontaneous and induced reactivation of eel acetylcholinesterase inhibited by three organophosphinates. *Pesticide Biochem. Physiol.* 13, 205-212, 1980.



293. Loeffler J.E., De Vies D.M., Joung R., Page A.C.: Metabolic fate of inhaled dichlorvos in pigs. *Toxicol Appl. Pharmacol.* 19, 378-381, 1971.
294. Lofroth G.: Alkylation of DNA by Dichlorvos. *Naturwissenschaften* 57, 393-394, 1970.
295. Loizou L.A.: The development of monoamine-containing neurons in the brain of the albino rat. *J. Anat. (Lond.)* 104, 588, 1969.
296. Loizou L.A.: The postnatal ontogeny of monoamine-containing neurons in the central nervous system of the albino rat. *Brain Res.* 40, 395-418, 1972.
297. Lotti M., Becker C.E., Aminoff M.J.: Occupational exposure to the cotton defoliants DEF and Merphos: a rational approach to monitoring organophosphorus-induced neurotoxicity. *J. Occup. Med.* 25, 517-522, 1983.
298. Lotti M., Becker C.E., Aminoff M.J.: Organophosphate polyneuropathy: pathogenesis and prevention. *Neurology* 34, 658-662, 1984.
299. Lotti M., Johnson M.K.: Repeated small doses of a neurotoxic organophosphate: monitoring of neurotoxic esterase in brain and spinal cord. *Arch. Toxicol.* 45, 263-271, 1980.
300. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275, 1951.
301. Lu F.C., Jessup D.C., Lavalley A.: Toxicity of pesticides in young versus adult rats. *Fd. Cosmet. Toxicol.* 3, 591-596, 1965.
302. Lucki I., Nobler M.S., Farazer A.: Different actions of serotonin antagonists on two behavioral models of serotonin receptor activation in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 228, 133-139, 1984.
303. Mantle T.J., Garret N.J., Tipton K.F.: The development of monoamine oxidase in rat liver and brain. *FEBS Lett.* 64, 227-230, 1976.
304. Marby P.L., Campbell B.A.: Ontogeny of serotonergic inhibition of behavioral arousal in the rat. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 86, 193-201, 1974.



305. Marchand A., Chapouthier G., Massoulie J.: Developmental aspects of acetylcholinesterase activity in chick brain. *FEBS Lett.* 78, 233-236, 1977.
306. Marsh D., Grassi J., Vigny M., Massoulie J.: An immunological study of rat acetylcholinesterase: comparison with acetylcholinesterase from other vertebrates. *J. Neurochem.* 43, 204-213, 1984.
307. Marshall P.E., Mathers L.H.: Postnatal maturation of neurons in the rabbit visual cortex. *Soc. Neurosci.* 7, 330, 1977.
308. Maslinska D.: Brain concentration of monoamines modified by organophosphorus agent-dichlorvos. *Neurosci. Lett.* (Suppl. 14) S237, 1983a.
309. Maślińska D.: Modified metabolism of serotonin by organophosphorus compound in brain of young rabbits. *XXX Congress of International Union of Physiological Sciences.* Vancouver, 13-19 July 1986.
310. Maślińska D.: Effect of organophosphorus compound on tryptophan level in brains of suckling rabbits. *European Developmental Biology Congress Southampton*, Sept. 2-7, 1984. United Kingdom. Abstr. p. 230.
311. Maślińska D., Dąbska M., Maśliński S.: Dichlorvos penetration through rabbit placenta. *Neuropat. Pol.* 17, 237-241, 1979.
312. Maślińska D., Rewekant M.: Changes in developing brain of rabbit induced by organophosphorus inhibitor of cholinesterases Dichlorvos. IV. Total and free tryptophan in plasma and in brain regions. *IX Int. Congr. of Neuropath.* Vienna, Sept. 5-10, 1982. Abstr. II-13.
313. Maślińska D., Rewekant M.: The effect of organophosphorus compound on nonestrified fatty acids and free tryptophan in plasma. *8th Congr. Pol. Pharmacol. Soc.* Warsaw, Sept. 26-28, 1983 a.
314. Maślińska D., Rewekant M.: Udział wolnych kwasów tłuszczowych w regulacji stezenia tryptofanu w mozgu po podaniu Dichlorfosu. *V Krajowa Konf. Naukowo-Dydakt. Patofizjologow*, Krakow, 3-4.06.1983. Abstr. p. 51 b.
315. Maślińska D., Strosznajder J., Zalewska T., Orlewski P.: Phospholipid-protein ratio in brain of suckling rabbits treated with an organophosphorus compound. *Int. J. Tiss. Reac.* 7, 317-322, 1984.



316. Maślińska D., Thomas E.: Enzyme-histochemical studies of "retrograde" reaction in motor neurons of immature rats. *Acta Neuropath.* (Berl.) 33, 317-323, 1975.
317. Maślińska D., Tubylewicz J.: Ultrastructural changes in brain of immature rabbits treated with vincristine. Ninth Congress of the Polish Pharmacological Society. Lublin, Sept. 4-5, 1986.
318. Maślińska D., Zalewska Z.: Activity of some mitochondrial enzymes in the progeny of rabbits treated with dichlorvos in the gestation period. *Folia Histochem. Cytochem.* 16, 139-146, 1978a.
319. Maślińska D., Zalewska Z.: Effect of dichlorvos, administered to the pregnant rabbits, on the cholinesterases activity in the progeny. *Folia Histochem. Cytochem.* 16, 335-341, 1978b.
320. Massoulie J., Bon S.: The molecular forms of cholinesterase and acetylcholinesterase in vertebrates. *Ann. Rev. Neurosci.* 5, 57-106, 1982.
321. Massoulie J., Bon S., Lazar M., Grassi J., Marsh D., Meflah K., Toutant J.P., Vallette F., Vigny M.: The polymorphism of cholinesterases: classification of molecular forms. Interactions and solubilization characteristics, metabolic relationships and regulations. In: *Cholinesterases: Fundamental and Applied Aspects, Proceedings of the 2nd Intern. Meeting on Cholinesterases.* Eds. M. Bnin, T. Kiauta, E.A. Barnard. W. de Gruyter Co., Berlin-New York 1984, pp. 73-97.
322. Mathers L.H.: Ontogenesis of receptive fields in the rabbit striate cortex. *Exp. Brain Res.* 19, 20-35, 1974.
323. Mathers L.H.: Postnatal maturation of neurons in the rabbit superior colliculus. *J. Comp. Neurol.* 173, 439-456, 1977.
324. Mathers L.H., Mercer K.L., Marshall P.E.: Synaptic development in the rabbit superior colliculus and visual cortex. *Exp. Brain Res.* 33, 353-369, 1978.
325. McCaman R.E., Aprison M.H.: The synthetic and catabolic enzyme systems for acetylcholine and serotonin in several discrete areas of the developing rabbit brain. *Progr. Brain Res.* 9, 220-233, 1964.
326. McMenamy R.H.: Binding of indole analogues to human serum albumin. Effects of fatty acids. *J. Biol. Chem.* 24, 4235-4243, 1965.



327. Mendoza C.E., Shields J.B.: Effect on esterases and comparison of  $I_{50}$  and  $LD_{50}$  values of malathion in suckling rats. *Bull. Environ. Contamin. Toxicol.* 17, 9-15, 1977.
328. Meneguz A., Bisso G.M., Michalek H.: Regional differences in brain soluble acetylcholinesterase and its molecular forms after acute poisoning by isofluorophate in rats. *Clin. Toxicol.* 18, 1443-1451, 1981.
329. Meyerson B.J.: Central nervous monoamines and hormone induced estrus behaviour in the spayed rat. *Acta Physiol. Scand.* 63, Suppl. 241, 1-32, 1964.
330. Michalek H., Bisso G.M., Meneguz A.: Comparative studies on rat brain soluble acetylcholinesterase and its molecular forms during intoxication by DFP and paraoxon. In: *Cholinergic Mechanisms*. Eds. G. Papen, H. Ladinsky. Plenum Publ. Co., 1981, pp. 847-851b.
331. Michalek H., Meneguz A., Bisso G.M.: Molecular forms of rat brain acetylcholinesterase in DFP intoxication and subsequent recovery. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.* 3, 303-312, 1981a.
332. Michalek H., Meneguz A., Bisso G.M.: Mechanisms of recovery of brain acetylcholinesterase in rats during chronic intoxication by isofluorophate. *Arch. Toxicol. Suppl.* 5, 116-119, 1982.
333. Michalek H., Meneguz A., Bisso G.M., Carro-Ciamp G., Gatti G.L., Bignami G.: Neurochemical changes associated with the behavioral toxicity of organophosphate compounds. In: *Advances in Pharmacology and Therapeutics V.G. Toxicology*. Ed. Y. Cohen, Oxford, Pergamon 1979, pp. 187-201.
334. Michalek H., Pintor A., Fortuna S., Bisso G.M.: Brain acetylcholinesterase and its molecular forms in a precocial murid, *acomys cahirinus*, and rat during post-natal development. *Acta Biochem. Pol.* 31, 149-160, 1984.
335. Michalek H., Stavinoha W.B.: Differential dose-dependent inhibition of acetylcholine and butyrylcholine hydrolysis in rat brain by Dichlorvos: potentiation of Dichlorvos effects by chlorpromazine. *Clin. Toxicol.* 18, 258-261, 1977.
336. Michalek H., Stavinoha W.B.: Effect of chlorpromazine pretreatment on the inhibition of total cholinesterases and butyrylcholinesterase in brain of rats poisoned by physostigmine or dichlorvos. *Toxicology* 9, 205-218, 1978.



337. Michell R.H.: Inositol phospholipids and cell surface receptor function. *Biochem. Biophys. Acta* 81-147, 1975.
338. Michell R.H., Jafferyk S.S., Jones L.M.: The possible involvement of phosphatidylinositol breakdown in the mechanism of stimulus-response coupling at receptors which control cell-surface gates. In: *Function and Biosynthesis of Phospholipids*. Eds. N.G. Bazan, R.R. Brenner, N.M. Giusto. Plenum Press, New York 1977, pp. 447-464.
339. Miller M., Leahy J.P., Stern W.C., Morgane P.J., Resnick O.: Tryptophan availability: relation to elevated brain serotonin in developmentally protein-malnourished rats. *Exp. Neurol.* 57, 142-157, 1977.
340. Milosevic M.P.: Acetylcholine content in the brain rats treated with paraoxon and abidoxime. *British J. Pharmacol.* 39, 732-737, 1970.
341. Modak A.T., Stavinoha W.B., Weintraub S.T.: Dichlorvos and the cholinergic system: Effects on cholinesterase and acetylcholine and choline contents of rat tissues. *Arch. Int. Pharmacodyn.* 217, 293-299, 1975.
342. Moller S.E., Kirk L., Fremming K.H.: Plasma amino acids as an index for subgroups in manic depressive psychosis: correlation to effect of tryptophan. *Psychopharmacology* 49, 205-213, 1976.
343. De Montis M.G., Olianias M.C., Mulas G., Tagliamonte A.: Evidence that only free serum tryptophan exchanges with the brain. *Pharmacol. Res. Comm.* 9, 215-220, 1977.
344. Moorcroft W.H.: Ontogeny of forebrain inhibition of behavioral arousal in the rat. *Brain Res.* 35, 513-522, 1971.
345. Moorcroft W.H., Lytle L.D., Campbell B.A.: Ontogeny of starvation-induced behavioral arousal in the rat. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 75, 59-67, 1971.
346. Morgan J.P., Penovich P.: Jamaica ginger paralysis: forty-seven-year follow-up. *Arch. Neurol.* 35, 530-532, 1978.
347. Morgane P., Stern W.C.: Chemical anatomy of brain circuits in relation to sleep and wakefulness. In: *Advances in Sleep Research* 1, 1-430, 1974.



348. Muller F., Dumez Y., Massoulie J.: Molecular forms and solubility of acetylcholinesterase during the embryonic development of rat and human brain. *Brain Res.* 331, 295-302, 1985.
349. Murphy D.L.: Substrate-selective monoamine oxidase-inhibitor tissue, species and functional differences. *Biochem. Pharmac.* 27, 1889-1893, 1978.
350. Mutsumura F., Madhukar B.V.: Exposure to insecticides. *Pharmac. Ther.* 9, 27-49, 1985.
351. Myers R.E.: Two patterns of perinatal brain damage and their conditions of occurrence. *Am. J. Obstet. Gynec.* 112, 246-276, 1972.
352. Navarro-Welch C., McCauley R.B.: An evaluation of phospholipids as regulators of monoamine oxidase A and monoamine oxidase B activities. *J. Biol. Chem.* 257, 13645-13649, 1982.
353. Neal R.A.: Microsomal metabolism of parathion. *Fed. Proc.* 25, 687, 1966.
354. Neal R.A.: Studies of the enzymic mechanism of the metabolism of diethyl 4-nitrophenyl phosphorothionate (paration) by rat liver microsomes. *Biochem. J.* 105, 289-297, 1967.
355. Neff N.H., Spano P.F., Groppetti A., Wang C.T., Costa E.: A simple procedure for calculating the synthesis rate of norepinephrine, dopamine and serotonin in rat brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 176, 701-710, 1971.
356. Nelson D.L., Herbet A., Glowinski J., Hannon M.: (<sup>3</sup>H) Harmaline as a specific ligand of MAO A-II. Measurement of the turnover rates of MAO A during ontogenesis in the rat brain. *J. Neurochem.* 32, 1829-1836, 1979.
357. Niemierko S., Skangiel-Kramska J.: Activity of the soluble and membrane-bound acetylcholinesterase of the rabbit brain during development. *Bull. Acad. Pol. Sci.* 24, 445-448, 1976.
358. O'Brien R.D.: Mode of action of insecticides. *Ann. Rev. Entomol.* 11, 369-402, 1967.
359. Oliński R., Walter Z., Wiaderkiewicz R., Lukasova E., Palecek E.: Changes in DNA properties due to treatment with the pesticides Malation and DDVP. *Radiat. Environ. Biophys.* 18, 65-72, 1980.



360. Olson L., Seiger A.: Early prenatal ontogeny of central monoamine neurons in the rat: fluorescence histochemical observations. *Z. Anat. Entwickl.-Gesch.* 137, 301-316, 1972.
361. Osterloh J., Lotti M., Pond S.M.: Toxicologic studies in a fatal overdose of 2,4-D, MCP, and chlorpyrifos. *J. Anal. Toxicol.* 7, 125-129, 1983.
362. Overstreet D.H., Kozar M.D., Lynch G.S.: Reduced hypothermic effects of cholinomimetic agents following chronic anticholinesterase treatment. *Neuropharmacology* 12, 1017-1023, 1973.
363. Overstreet D.H., Russell R.W., Helps S.C., Rungl P., Prescott A.M.: Sex differences following pharmacological manipulation of the cholinergic system by DFP and pilocarpine. *Psychopharmacology* 61, 49-58, 1979.
364. Page A.C., Loeffler J.E., Hendrickson H.R., Huston C.K., De Vries D.M.: Metabolic fate of Dichlorvos in Swine. *Arch. Toxikol.* 30, 19-27, 1972.
365. Page A.C., De Vries D.M., Young R., Loeffler J.E.: Metabolic fate of ingested dichlorvos in swine. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 19, 378, 1971.
366. Palen K., Thörneby L., Emanuelsson H.: Effects of serotonin antagonists on chick embryogenesis. *Wilhelm Roux's Arch. Dev. Biol.* 187, 89-103, 1979.
367. Pardridge W.M.: The role of blood-brain barrier transport of tryptophan and other neutral amino acids in the regulation of substrate-limited pathways of brain amino acid metabolism. *J. Neurol. Transmission Suppl.* 15, 43-54, 1979.
368. Peters A., Palay S.L., Webster H.F.: The fine structure of the nervous system: The neurons and supporting cells. W.B. Saunders Co., Philadelphia, London, Toronto 1976.
369. Perez-Cruet J., Chase T.N., Murphy D.L.: Dietary regulation of brain tryptophan metabolism by plasma ratio of free tryptophan and neutral amino acids in humans. *Nature* 248, 693-695, 1974.
370. Peroutka S.J., Lebovitz R.M., Snyder S.H.: Two distinct central serotonin receptors with different physiological functions. *Science* 212, 827-828, 1981.
371. Pleasure D.E., Mishler K.C., Engel W.K.: Axonal transport of proteins in experimental neuropathies. *Science* 166, 524-525, 1969.



372. Potter J.C., Boyer A.C., Marxmiller R.L., Young R., Loeffler J.E.: Radioisotope residues and residues of Dichlorvos and its metabolites in pregnant sows and their progeny dosed with Dichlorvos-<sup>14</sup>C or Dichlorvos-<sup>36</sup>Cl formulated as PVC pellets. *J. Agr. Food Chem.* 21, 734-738, 1973.
373. Potter J.C., Loeffler J.E., Collins R.D., Young R., Page A.C.: Carbon-14 balance and residues of Dichlorvos and its metabolites in pigs dosed with Dichlorvos-<sup>14</sup>C. *J. Agr. Food Chem.* 21, 163-166, 1973.
374. Pratt O.E.: Kinetics of tryptophan transport across the blood-brain barrier. *J. Neurol. Transmission, Suppl.* 15, 29-42, 1979.
375. Prentice D.E., Roberts N.L.: Acute delayed neurotoxicity in hens dosed with tri-ortho-cresyl phosphate (TOCP): correlation between clinical ataxia and neuropathological findings. *Neurotoxicity* 4, 271-283, 1983.
376. Prineas J.: The pathogenesis of dying back polyneuropathies. Part I. An ultrastructural study of experimental tri ortho cresylphosphate intoxication in the cat. *J. Neuropath. Exp. Neurol.* 26, 571-597, 1969.
377. Prioux-Guyonneau M., Coudray-Lucas C., Coq H.M., Cohen Y., Wepierre J.: Modification of rat brain 5-hydroxy-tryptamine metabolism by sublethal doses of organophosphate agents. *Acta Pharmacol. Toxicol.* 51, 278-284, 1982.
378. Raine C.S., Field E.J.: Nuclear structures in nerve cells in multiple sclerosis. *Brain Res.* 10, 266-268, 1968.
379. Reichert B.L., Abou-Donia M.B.: Inhibition of fast axoplasmic transport by delayed neurotoxic organophosphorus esters: a possible mode of action. *Mol. Pharmacol.* 17, 56-60, 1980.
380. Reid W.D., Volicer L., Smookler H., Beaven M.A., Brodie B.B.: Brain amines and temperature regulation. *Pharmacology* 1, 329-344, 1968.
381. Resnick O., Morgane P.J.: Ontogeny of the levels of serotonin in various parts of the brain in severely protein malnourished rats. *Brain Res.* 303, 163-170, 1984.



382. Rewekant M., Orlewski P., Maslinska D.: Relation between competitive amino acids and tryptophan in plasma of rabbits treated with organophosphorus compound. 8th Congr. Pol. Pharmacol. Soc. Warsaw, Sept. 26-28, 1983. Abstr. 131.
383. Rieger F., Chetelat K., Nicolet M., Kamal L., Pouillet M.: Presence of tailed asymmetric forms of acetylcholinesterase in the central nervous system of vertebrates. FEBS Lett. 121, 169-174, 1980.
384. Rieger F., Faivre-Bauman A., Benda P., Vigny M.: Molecular forms of acetylcholinesterase: their de novo synthesis in mouse neuroblastoma cells. J. Neurochem. 27, 1059-1063, 1976.
385. Rieger F., Vigny M.: Solubilization and physicochemical characterization of rat brain acetylcholinesterase: development and maturation of its molecular forms. J. Neurochem. 27, 121-129, 1976.
386. Robinson S.E.: Interaction of the median raphe nucleus and hypothalamic serotonin with cholinergic agents and pressor responses in the rat. J. Pharmacol. Exp. Ther. 223, 662-668, 1982.
387. Roboz Einstein R., Dalal K.B., Csejtey J.: Biochemical maturation of the central nervous system. II. Protein and proteolytic enzyme changes. Brain Res. 18, 35-49, 1970.
388. Roizin L., Schade J.P.: Pathogenesis of X-irradiation effects in the monkey cerebral cortex. Brain Res. 7, 87-109, 1968.
389. Ronnevi L.O., Conradi S.: Ultrastructural evidence for spontaneous elimination of synaptic terminals on spinal motoneurons in the kitten. Brain Res. 80, 335-339, 1974.
390. Rosenberry T.L., Barnett P., Mays C.: The collagen-like subunits of acetylcholinesterase from the eel *Electrophorus electricus*. Neurochem. Int. 2, 135-148, 1980.
391. Rosenberry T.L., Richardson J.M.: Structure of 18S and 14S acetylcholinesterase. Identification of collagen-like subunits that are linked by disulfide bonds to catalytic subunits. Biochemistry 16, 3550-3558, 1977.
392. Roth J.A.: Multiple forms of monoamine oxidase and their interaction with tricyclic psychomimetic drugs. Gen. Pharmac. 7, 381-386, 1976.



393. Roth J.A., Gillis C.N.: Multiple forms of amine oxidase in perfused rabbit lung. *J. Pharmac. Exp. Ther.* 194, 537-544, 1975.
394. Rotundo R.L.: Fundamental and Applied Aspects. In: *Cholinesterases*. Eds. M. Bnin, E.A. Bamard, D. Sket. Walter de Gruyter and Co., Berlin, New York 1984, pp. 203-216.
395. Rowntree D.W., Nevin S., Wilson A.: Effects of diisopropyl fluorophosphonate in shizophrenia and manic depressive psychosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.* 13, 47-62, 1950.
396. Russell R.W., Carson V.G., Booth R.A., Jenden D.J.: Mechanism of tolerance to the anticholinesterase DFP. Acetylcholine levels and dynamics in the rat brain. *Neuropharmacol.* 20, 1197-1201, 1981.
397. Russell R.W., Overstreet D.H., Cotman C.W., Carson V.G., Churchill L., Dolglisch F.W., Vasquez B.J.: Experimental tests of hypotheses about neurochemical mechanisms underlying behavioral tolerance to anticholinesterase diisopropylfluorophosphate. *J. Pharmac. Exp. Ther.* 192, 73-85, 1975.
398. Russell R.W., Overstreet D.H., Netherton R.A.: Sex-linked and other genetic factors in the development of tolerance to the anticholinesterase, DFP. *Neuropharmacol.* 22, 75-81, 1983.
399. Saliman S.A., Linder R., Farmer J., Curley A.: Species susceptibility to delayed toxic neuropathy in relation to in vivo inhibition of neurotoxic esterase by neurotoxic organophosphorus esters. *J. Toxicol. Environ. Health* 9, 189-197, 1982.
400. Sarna G.S., Hutson P.H., Tricklebank M.D., Curzon G.: Determination of brain 5-hydroxytryptamine turnover in freely moving rats using repeated sampling of cerebrospinal fluid. *J. Neurochem.* 40, 383-388, 1983.
401. Seite R., Leonett J., Luciani-Vuillet J., Vio M.: Cyclic AMP and ultrastructural organizations of the nerve cell nucleus: stimulation of nuclear microtubules and microfilaments assembly in sympathetic neurons. *Brain Res.* 124, 41-51, 1977.
402. Senanayake N.: Tri-cresyl phosphate neuropathy in Sri Lanka: a clinical and neurophysiological study with a three year follow up. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 44, 775-780, 1981.



403. Senanayake N., Jeyaratnam J.: Toxic polyneuropathy due to gingili oil contaminated with tri-cresyl phosphate affecting adolescent girls in Sri Lanka. *Lancet* 1, 88-89, 1981.
404. Senanayake N., Johnson M.K.: Acute polyneuropathy after poisoning by a new organophosphate insecticide. *N. Engl. J. Med.* 306, 155-157, 1981.
405. Schiller G.D.: Reduced binding of (<sup>3</sup>H) quinuclidinyl benzilate associated with chronically low acetylcholinesterase activity. *Life Sci.* 24, 1159-1164, 1979.
406. Schmidt M.J., Sanders-Buch E.: Tryptophan hydroxylase activity in developing rat brain. *J. Neurochem.* 18, 2549-2551, 1971.
407. Schoene K., Steinhanses J., Wertmann A.: Aging of soman-inhibited acetylcholinesterase pH-rate profiles and temperature dependence in absence and in presence of effectors. *Biochem. Biophys. Acta* 616, 384-388, 1980.
408. Schrader G.: Die Entwicklung neuer Insektizide auf Grundlage von Organischer Fluor- und Phosphorverbindungen. Monographie No 162 Verlag Chemie, Weinheim 1952.
409. Schultz D.R., Marxmiller R.L., Koos B.A.: Residue determination of dichlorvos and related metabolites in animal and flueds. *J. Agr. Food Chem.* 19, 1238-1243, 1971.
410. Silver A.: The biology of cholinesterases. North-Holland Publ. Co., Amsterdam, Oxford, American Elsevier Publ. Co. Inc. New York 1974, pp. 379-386.
411. Simon N., Volicer L.: Neonatal asphyxia in the rat: Greater vulnerability of males and persistent effects on brain monoamine synthesis. *J. Neurochem.* 26, 893-900, 1976.
412. Sivam S.P., Norris J.C., Lim D.K., Hoskins B., Ho I.K.: Influence of acute and chronic cholinesterase inhibition with diisopropylfluorophosphate on muscarinic, dopamine and GABA receptors in the rat striatum. *J. Neurochem.* 40, 1414-1422, 1983.
413. Smith M.J., Lillie R.D.: The histopathology of tri-ortho-cresyl phosphate poisoning; etiology of so-called ginger paralysis. *Arch. Neurol. Psychiat.* 26, 976-992, 1931.



414. Smith T.E., Usdin E.: Formation of nonreactivable isopropylmethylphosphonofluoridate - inhibited acetylcholinesterase. *Biochemistry* 5, 2914-2929, 1966.
415. Smythe G.A., Brandstater J.F., Lazarus L.: Serotonergic control of rat growth hormone secretion. *Neuroendocrinology* 17, 245-267, 1975.
416. Snyder D.H.: Two distinct central serotonin receptors with different physiological functions. *Science* 212/4496, 827, 1981.
417. Somogyi P., Chubb I.W.: The recovery of acetylcholinesterase activity in the superior cervical ganglion of the rat following its inhibition by diisopropylphosphorylfluoridate: a biochemical and cytochemical study. *Neuroscience* 1, 413-421, 1976.
418. Sourkes T.L.: Kinetics of tryptophan into the brain. *J. Neurol. Transmission, Suppl.* 15, 107-114, 1979.
419. Spoerri P.E., Glees P.: Ultrastructural reactions of spinal ganglia to tri-ortho-cresyl-phosphate: effects of neurotoxicity. *Cell Tiss. Res.* 199, 409-414, 1979.
420. Spoerri P.E., Glees P.: Ultrastructural changes in neurons and neuroglia of the avian telencephalon (Hyperstriatum Accessorium) following tri-ortho-cresyl-phosphate intoxication. *Cell Tiss. Res.* 206, 203-210, 1980.
421. Spyker J.M., Avery D.L.: Neurobehavioral effects of prenatal exposure to the organophosphate diazinon in mice. *J. Toxicol. Environ. Health* 3, 989-1002, 1977.
422. Spyker Cranmer J., Avery D.L.: Postnatal endocrine dysfunction resulting from prenatal exposure to carbofuran, diazinon or chlordane. *J. Environ. Pathol. Toxicol.* 2, 357-369, 1978.
423. Srinivasan R., Karczmar A.G., Bernsohn J.: Rat brain acetylcholinesterase and its isoenzymes after intracerebral administration of DFP. *Biochem. Pharmacol.* 25, 2739-2745, 1976.
424. Stavinoha W.B., Rieger J.A., Ryan L.C., Smith P.W.: Effects of chronic poisoning by an organophosphorus cholinesterase inhibitor on acetylcholine and norepinephrine content of the brain. In: *Organic Pesticides in the Environment Advances in Chemistry Series. No 60*, American Chemical Society, Washington 1966, pp. 79-88.



425. Stecher P.G., Windholz M., Leahy D.S.: Dichlorvos. Eds. The Merck Index, Merck and Co. Inc. Rahway, New York, USA 1968, pp. 322.
426. Steinbusch H.W.M.: Distribution of serotonin-immunoreactivity in the central nervous system of the rat cell bodies and terminals. *Neurosci.* 6, 557-618, 1981.
427. Stern W.C., Miller M., Forbes W.B., Morgane P.J., Resnick O.: Ontogeny of the levels of biogenic amines in various parts of the brain and in peripheral tissue in normal and protein malnourished rats. *Exp. Neurol.* 49, 314-326, 1975.
428. Sterri S.H.: Effect of imidazoles and pH on aging of phosphorylated acetylcholinesterase. *Biochem. Pharmacol.* 26, 656-658, 1977.
429. Stuart M., Lazarus L., Smythe G.A., Moore S., Sara V.: Biogenic amine control of growth hormone secretion in the fetal and neonatal rat. *Neuroendocrinology* 22, 337-342, 1976.
430. Sulinski A., Bicz W.: The effect of intoxication of pregnant rats with Ronnel on cholinesterases activity in the progeny during postnatal development. *Neuropat. Pol.* 17, 577-584, 1979.
431. Sulinski A., Zalewska Z., Sosnowska K., Bicz W.: Effect of pregnant rats intoxication with Trichlorophan on the activities of some brain enzymes in the progeny during postnatal development. *Neuropat. Pol.* 17, 135-143, 1979.
432. Sun M., Chang Z., Shau M., Huang R., Chou T.: The mechanism of aging of phosphorylated acetylcholinesterase. *Eur. J. Biochem.* 100, 527-530, 1979.
433. Suzuki O., Katsumata Y., Oya M., Asano M.: Multiple forms of monoamine oxidase in developing chick brain. *Dev. Neurosci.* 1, 172-176, 1978.
434. Suzuki O., Yagi K.: Multiple forms of monoamine oxidase in the human cerebral cortices at different ages. In: *Maturation of Neurotransmission*. Eds. Varnadakis, Giacobini and Filogamo. Karger, Basel 1978, pp. 100-107.
435. Swank R.L., Prados M.: Avian thiamine deficiency. II. Pathologic changes in the brain and cranial nerves (especially the vestibular) and their relation to the clinical behaviour. *Arch. Neurol. Psychiat.* 47, 97-131, 1942.



436. Tagliamonte A., Tagliamonte P., Gessa G.L., Brodie B.B.: Compulsive sexual activity induced by p-chlorophenylalanine in normal and pinealectomized male rats. *Science* 166, 1433-1435, 1969.
437. Talens G., Woolley D.: Effects of parathion administration during gestation in the rat on development of the young. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* 16, 141-145, 1973.
438. Tani E., Ametani T., Ishijima Y., Higashi N., Fujihara E.: Intranuclear paracrystalline fibrillar arrays in human glioma cells. *Cancer Res.* 31, 1210-1217, 1971.
439. Taylor P.: Anticholinesterase agents. In: *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. Eds. A. Goodman Gilman, L.S. Goodman, A. Gilman. MacMillan Publ. Co., New York, Toronto, London 1980, pp. 100-119.
440. Thorpe E., Wilson A.R., Dix K.M., Blair D.: Teratological studies with Dichlorvos vapour in rabbits and rats. *Arch. Toxicol.* 30, 29-38, 1972.
441. Tipton K.F.: The sub-mitochondrial localization of monoamine oxidase in rat liver and brain. *Biochem. Biophys. Acta* 135, 910-920, 1967.
442. Tipton K.F., Fowler C.J., Houslay M.D.: Specificities of the two forms of monoamine oxidase. In: *Monoamine Oxidase - Basic and Clinical Frontiers*. Eds. Kamiyo, Usdin, Nagatsu. *Excerpta Medica*, Amsterdam 1982, pp. 87-99.
443. Tissari A.H.: Serotonergic mechanisms in ontogenesis. In: *Fetal Pharmacology*. Ed. L. Boreus. Raven Press, New York 1973, pp. 237-257.
444. Tissari A.H.: Pharmacological and ultrastructural maturation of serotonergic synapses during ontogeny. *Med. Biol.* 53, 1-14, 1975.
445. Tissari A.H., Pekkarinen E.H.: 5-Hydroxyindoleacetic acid in the developing brain. *Acta Physiol. Scand.* 68 Suppl. 277, 201, 1966.
446. Tozer T.N., Neff N.H., Brodie B.B.: Application of steady-state kinetics to the synthesis rate and turnover time of serotonin in the brain of normal and reserpine-treated rats.
447. Tubylewicz J., Maślińska D.: Ultrastructural changes in CNS of young rabbits caused by vincristine penetrated through the blood-brain barrier. *Arch. Biol.* 1986, p. 126. VIIth Int. Symp. on Morphol. Sci., Brussels, Sept. 7-13.1986.



448. Tyce G.M., Flock E.V., Owen C.A.: Tryptophan metabolism in the brain of the developing rat. In: The Developing Brain. Eds. W.A. Himwich, H.E. Himwich. Progress in Brain Res., Amsterdam 1964, 9, 198-203.
449. Uchida S., Takeyasu K., Matsuda T., Hiroshi V.: Changes in muscarinic acetylcholine receptors of mice by chronic administrations of diisopropylfluorophosphate and papaverine. Life Sci. 24, 1805-1812, 1979.
450. Uphouse L.L., Bondy S.C.: The maturation of cortical serotonin binding sites. Dev. Brain Res. 1, 415-417, 1981.
451. Usdin E.: Reactions of cholinesterase with substrates inhibitors and reactivators. In: Anticholinesterase Agents. Vol. 1. International Encyclopedia of Pharmacology and Therapeutics, Sect. 13. Ed. A.G. Karczmar. Pergamon Press Ltd, Oxford 1970, pp. 47-354.
452. Uzbekov M.G., Murphy J., Rose S.P.R.: Ontogenesis of serotonin "receptors" in different regions of rat brain. Brain Res. 168, 195-199, 1979.
453. Van Neuten J.M., Janssen P.A.J., Van Beek J., Xhonneux R., Verbeuren T.J., Vanhoutte P.M.: Vascular effects of ketanserin (R 41 468) a novel antagonist of 5HT<sub>2</sub> serotonergic receptors. J. Pharmacol. Exp. Ther. 218, 217-230, 1981.
454. Vannuci R.C., Duffy T.E.: Carbohydrate metabolism in fetal and neonatal rat brain during anoxia and recovery. Am. J. Physiol. 230, 1269-1275, 1976.
455. Vasilescu C.: Triorthocresyl phosphate neuropathy. Arch. Neurol. 36, 455-456, 1979.
456. Le Vay S., Meier C., Glees P.: Effects of tri-ortho-cresyl-phosphate on spinal ganglia and peripheral nerves of chicken. Acta Neuropath. (Berl.) 17, 103-113, 1971.
457. La Velle A., La Velle F.W.: Neuronal swelling and chromatolysis as influenced by the state of cell development. Am. J. Anat. 102, 219-241, 1958a.
458. La Velle A., La Velle F.W.: The nucleolar apparatus and neuronal reactivity to injury during development. J. Exp. Zool., 137, 285-315, 1958b.
459. Veronesi B.: A rodent model of organophosphorus-induced delayed neuropathy: distribution of central (spinal cord) and peripheral nerve damage. Neuropath. Appl. Neurobiol. 10, 357-368, 1984.



460. Verzeano M., Mahnke J.H.: Serotonin and thalamic synchronization. *Physiol. Behav.* 9, 649-653, 1972.
461. Vijayan V.K., Brownson R.H.: Polyacrylamide gel electrophoresis of rat brain acetylcholinesterase: Isoenzymes of normal rat brain. *J. Neurochem.* 23, 47-51, 1974.
462. Vijayan V.K., Brownson R.H.: Polyacrylamide gel electrophoresis of rat brain acetylcholinesterase: isoenzyme changes following parathion poisoning. *J. Neurochem.* 24, 105-111, 1975.
463. Vizi E.S., Harsing L.G., Jr., Zsilla G.: Evidence of the modulatory role of serotonin in acetylcholine release from striatal interneurons. *Brain Res.* 212, 89-99, 1981.
464. Vogin E.E., Carson S.: Teratology studies with Dichlorvos in rabbits. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 19, 377-378, 1971.
465. Wade P.D., Timiras P.S.: A regional study of the molecular forms of acetylcholinesterase in the brain of developing and adult rats. *Dev. Neurosci.* 3, 101-108, 1980.
466. Wallace J.A.: Monoamines in the early chick embryo: demonstration of serotonin synthesis and the regional distribution of serotonin-concentrating cells during morphogenesis. *Am. J. Anat.* 165, 261-276, 1982.
467. Wallace J.A., Lauder J.M.: Development of the serotonergic system in the rat embryo. *Brain Res. Bull.* 10, 459-479, 1983.
468. Weil O.S., Mc Colister D.D.: Safety evaluation of chemicals. *J. Agr. Food Chem.* 11, 486-497, 1963.
469. Weiss B.L., Aghajanian G.K.: Activation of brain serotonin metabolism by heat. Role of midbrain raphe neurones. *Brain Res.* 26, 37-48, 1971.
470. Weiss G.M., Pysh J.J.: Evidence for loss of Purkinje cell dendrites during late development: a morphometric Golgi analysis in the mouse. *Brain Res.* 154, 219-230, 1978.
471. Welsch F., Dettbarn W.D.: Inhibition of cholinesterase of rat diaphragm muscle by organophosphates and spontaneous recovery of enzyme activity in vitro. *Biochem. Pharmacol.* 21, 1039-1049, 1972.



472. Wender M., Kozik M.: Studies of the histoenzymatic architecture of the Ammon's horn region in the developing rabbit brain. *Acza Anat.* 75, 248-262, 1970.
473. Wennerberg R., Löfroth G.: Formation of 7-methyl-guanine by Dichlorvos in bacteria and mice. *Chem. Biol. Interact.* 8, 339-348, 1974.
474. Wills J.H.: Toxicity of anticholinesterases and treatment of poisoning. In: *Anticholinesterase Agents. International Encyclopedia of Pharmacology and Therapeutics.* Ed. A. Karczmar. Section 13, vol. 1, Pergamon, Oxford 1970, pp. 355-469.
475. Wilson I.B., Ginsburg S.: A powerful reactivator of alkyl phosphate-inhibited acetylcholinesterase. *Biochem. Biophys. Acta* 18, 168-170, 1955.
476. Winick M.: Maturation and brain development. *J. Pediat.* 74, 667-679, 1969.
477. Winick M., Noble A.: Quantitative changes in DNA, RNA and protein during prenatal and postnatal growth in the rat. *Develop. Biol.* 12, 451-466, 1965.
478. Wiśniewski H., Karczewski W., Wiśniewska K.: Neurofibrillary degeneration of nerve cells after intracerebral injection of aluminium cream. *Acta Neuropath.* 6, 211-219, 1966.
479. Wiśniewski H., Narkiewicz O., Wiśniewska K.: Topography and dynamics of neurofibrillar degeneration in aluminium encephalopathy. *Acta Neuropath.* 9, 127-133, 1967.
480. Wiśniewski H., Terry R.D.: Experimental colchicine encephalopathy. I. Induction of neurofibrillary degeneration. *Lab. Invest.* 17, 577-587, 1967.
481. Wooder M.F., Wright A.S., King L.J.: In vivo alkylation studies with dichlorvos at practical use concentrations. *Chem. Biol. Interaction* 19, 25-46, 1977.
482. Wurtman R.J.: When - and why - should nutritional state control neurotransmitter synthesis? *J. Neurol. Transmission, Suppl.* 15, 69-79, 1979.



483. Wurtman J.J., Wurtman R.J.: Fenfluramine and fluoxetine spare protein consumption while suppressing caloric intake by rats. *Science* 198, 1178-1180, 1977.
484. Xintaras C., Burg J.R., Tanaka S.: Occupational exposure to leptophos and others chemicals. US Dept. of Health Education and Welfare (NIOSH) Publication Government Printing Office 1978, pp. 78-136.
485. Yaksh T.L., Filbert M.G., Harris L.W., Yamamura H.J.: Acetylcholinesterase turnover in brain, cerebrospinal fluid and plasma. *J. Neurochem.* 25, 853-860, 1975.
486. Yang H-Y.T., Neff H.N.: The monoamine oxidase of brain: selective inhibition with drugs and the consequences for the metabolism of the biogenic amines. *J. Pharmac. Exp. Ther.* 189, 733-740, 1974.
487. Yap C.Y., Taylor D.A.: Involvement of 5-HT<sub>2</sub> receptors in the wet-dog shake behaviour induced by 5-hydroxytryptophan in the rat. *Neuropharmacol.* 22, 801-804, 1983.
488. Zalewska Z., Rakowska I., Matraszek G., Sitkiewicz D.: Effect of dichlorvos on some enzymes activities of the rat brain during post-natal development. *Neuropat. Pol.* 15, 255-262, 1977.
489. Zelman I.B! : Patomorfologia mozgu szczura w doswiadczalnym zatruciu fosforoorganicznym pestycydem, Dichlorfosem (DDVP). *Neuropat. Pol.* 15, 515-522, 1977.
490. Zelman I.B., Majdecki T.: Zmiany ultrastrukturalne w mozgach szczurow po zatruciu fosforoorganicznym insektycydem dichlorfosem (DDVP). *Neuropat. Pol.* 17, 443-453, 1979.



