

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΟΙΚΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΣΤΑΣΙΑΣ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΧΡΗΣΗ ΒΙΟΣΗΜΑΝΤΩΝ ΤΩΝ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ *COTURNIX*
***COTURNIX JAPONICA* (ΟΡΤΥΚΙ) ΚΑΙ**
***ONCHORHYNCHUS MYKISS* (ΠΕΣΤΡΟΦΑ)**
ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΟΙΚΟΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΚΩΝ
ΕΠΙΠΤΩΣΕΩΝ ΤΟΥ ΜΕΤΗΑΜΙΔΟΡΗΟΣ

ΜΑΝΟΥΣΟΣ ΦΟΥΝΤΟΥΛΑΚΗΣ



Αθήνα, Ιανουάριος 2010

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΟΙΚΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΣΤΑΣΙΑΣ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΧΡΗΣΗ ΒΙΟΣΗΜΑΝΤΩΝ ΤΩΝ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ *COTURNIX*
***COTURNIX JAPONICA* (ΟΡΤΥΚΙ) ΚΑΙ**
***ONCHORHYNCHUS MYKISS* (ΠΕΣΤΡΟΦΑ)**
ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΟΙΚΟΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΚΩΝ
ΕΠΙΠΤΩΣΕΩΝ ΤΟΥ ΜΕΤΗΑΜΙΔΟΡΗΟΣ

ΜΑΝΟΥΣΟΣ ΦΟΥΝΤΟΥΛΑΚΗΣ

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

Αράπης Γεράσιμος, Καθηγητής
Αυγουλάς Χρήστος, Καθηγητής
Χρυσάγη Μαρία, Καθηγήτρια

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Αράπης Γεράσιμος, Καθηγητής
Αυγουλάς Χρήστος, Καθηγητής
Βασιλείου Γεώργιος, Καθηγητής
Μαρκόγλου Αναστάσιος, Επίκουρος Καθηγητής
Μενεγάτος Ιωάννης, Καθηγητής
Μπαλάσκας Χρήστος, Επίκουρος Καθηγητής
Χρυσάγη Μαρία, Καθηγήτρια

Αθήνα, Ιανουάριος 2010

*Στη Βίκυ, τον Νικόλα, τον
Θοδωρή και τον Μάξιμο*

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θέλω να εκφράσω τις ευχαριστίες μου προς τον επιβλέποντα Καθηγητή κ. Γεράσιμο Αράπη για την ανάθεση αυτού του πρωτότυπου και ενδιαφέροντος θέματος, το οποίο αποτελεί καινούργιο αντικείμενο για το Εργαστήριό και ερέθισμα για περαιτέρω έρευνα, καθώς και για την άψογη συνεργασία, τις χρήσιμες συμβουλές και τη διόρθωση των κειμένων.

Επίσης θέλω να ευχαριστήσω την Καθηγήτρια κα. Μαρία Χρυσάγη για την πρόθυμη συνεργασία της σε όλα τα θέματα που προέκυψαν και για την επιμελή διόρθωση των κειμένων καθώς και τον Καθηγητή κ. Αυγουλά Χρήστο για τις χρήσιμες συμβουλές του και τη διόρθωση των κειμένων.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα το προσωπικό των διαπιστευμένων εργαστηρίων, Ecotoxicological Laboratory, Fácáncert και Laboratory of hydrobiology, Százhalombatta, της Ουγγαρίας για την πολύτιμη βοήθεια και την πρόθυμη συνεργασία τους για τη διενέργεια του πειραματισμού εργαστηρίου με τους βιοδείκτες καθώς και τη συλλογή ιστών. Τα εργαστήρια αυτά έκλεισαν με την είσοδο της Ουγγαρίας στην ΕΕ. Θα ήθελα να ευχαριστήσω τους διευθυντές και το προσωπικό των εργαστηρίων Ανατομίας και Φυσιολογίας Ζώων και Γεωργικής Φαρμακολογίας για τη διάθεση επιστημονικών οργάνων και υλικών και τη συνεργασία τους για την εκπόνηση μέρος του πειραματισμού. Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την κα Παναγιώτα Μαλάτου από το Εργ. Υπολειμμάτων Γεωργ. Φαρμάκων του Μπενακείου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου για την πολύτιμη συμμετοχή της στην ανάλυση υπολειμμάτων του σιτηρεσίου των ορτυκιών.

Θα ήθελα, σε αυτό το σημείο, να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Χρήστο Μπαλάσκα για τη βοήθεια που μου παρείχε, καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της πτυχιακής μου μελέτης και τη διόρθωση των κειμένων. Η συνεισφορά του, τόσο σε στοιχεία, όσο και σε ψυχολογική στήριξη ήταν αμέριστη.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω το προσωπικό του Εργαστηρίου Οικολογίας και Επιστήμης Περιβάλλοντος και Φυσιολογίας και Μορφολογίας φυτών για τη συνεργασία τους και το συναδελφικό πνεύμα, καθώς και όλους όσοι με οποιοδήποτε τρόπο συνέβαλαν στην ολοκλήρωση αυτής της μελέτης.

Ευχαριστώ από καρδιάς την οικογένειά μου για την υποστήριξη και την υπομονή τους. Είναι όλοι τους ευλογημένο δώρο του Θεού.

Η παρούσα διατριβή χρηματοδοτήθηκε στα πλαίσια του προγράμματος «Περιβάλλον – Πυθαγόρας II – Ενίσχυση Ερευνητικών Ομάδων στο Γ.Π.Α».

Λίστα Συντομεύσεων

Συντομ.	Ελληνικά	Αγγλικά
ΔΑ	Μεταβολή της απορρόφησης	Change in absorbance
Σ.Β.	Σωματικό βάρος	Body weight
ΦΠ	Φυτοπροστατευτικό προϊόν	Plant Protection Product
ACh	Ακετυλχολίνη	Acetylcholine
AChE	Ακετυλχολινεστεράση	Acetylcholinesterase
ADME	Απορρόφηση, κατανομή, μεταβολισμός και απέκκριση	Absorption, Distribution, Metabolism, Elimination
ART	Διάρκεια του χρόνου έκλειψης των κλινικών συμπτωμάτων	Acute recovery time
a.s.	Δραστική ουσία	Active substance
ASCh	Ιωδιούχος ακετυλοθειοχολίνη	Acetylthiocholine iodide
AV	Συντελεστής αποφυγής (1 = όχι αποφυγή, 0 = πλήρης αποφυγή)	Avoidance factor
	Χρόνος καθυστέρησης της αποφυγής της πρόσληψης τροφής	Avoidance delay time
AVD	Δόση ορίου αποφυγής της πρόσληψης τροφής	Avoidance threshold
AVT	πρόσληψης τροφής	
bw	Σωματικό βάρος	Body weight
BuChE	Βουτυρυλχολινεστεράση	Butyrylcholinesterase
BuSCh	Ιωδιούχος βουτυρυλθειοχολίνη	Butyrylthiocholine iodide
C	Συγκέντρωση της δραστικής στην τροφή [mg/kg]	Concentration
C₀	Αρχική συγκέντρωση της δραστικής στην τροφή μετά από εφαρμογή	Concentration on time 0
		Carboxyl
CaE	Καρβοξυεστεράση	esterase
ChE	Χολινεστεράση	Cholinesterase
DEE	Ημερήσια ενεργειακή κατανάλωση	Daily energy expenditure
DEP	Διάρκεια της περιόδου έκθεσης	Duration of the exposure period
EC₅₀	Συγκέντρωση με 50% επίδραση	Effective Concentration 50%
EC_X	Συγκέντρωση με X% επίδραση	Effective Concentration X%
EH	Χρώση ηωσίνης - αιματοξυλίνης	Eosin-Haematoxylin
ETE	Εκτιμώμενη θεωρητική έκθεση	Estimated Theoretical Exposure
FAC₅₀	Μέση συγκέντρωση αποφυγής	Median food avoidance concentration
FIR	Ρυθμός λήψης τροφής (γραμ. νωπού βάρους ανά ημέρα)	Food Intake Rate
FPM	Ρυθμός λήψης τροφής ανά λεπτό (kg/min)	Feeding rate per minute
FR	Ποσοστό μείωσης τροφής	Feeding rate
f_{twa}	Συντελεστής μέσης χρονικής διάσπασης της δραστικής ουσίας	Time weighted average factor

GAP	Ορθή Γεωργική πρακτική (ΟΓΠ)	Good Agricultural practice
GD	Κατευθυντήρια Οδηγία	Guidance Document
ha	Εκτάριο	Hectare
k	Ρυθμός διεργασιών ADME	Rate constant
LC₅₀	Συγκέντρωση με 50% θνησιμότητα	Lethal Concentration 50%
LD₅₀	Δόση με 50% θνησιμότητα	Lethal Dose 50%
LOEC	Χαμηλότερη συγκέντρωση που παρατηρήθηκε επίδραση	Lowest Observed Effect Concentration
LOEL	Επίπεδο συγκέντρωσης που παρατηρήθηκε επίδραση	Lowest Observed Effect Level
MAF	Συντελεστής πολλαπλών εφαρμογών	Multiple Application Factor
NOAEC	Συγκέντρωση που δεν παρατηρήθηκε επίδραση	No Observed Adverse Effect Concentration
NOAEL	Επίπεδο που δεν παρατηρήθηκε σημαντική επίδραση	No Observed Adverse Effect Level
NOEC	Συγκέντρωση που δεν παρατηρήθηκε επίδραση	No Observed Effect Concentration
NOEL	Επίπεδο που δεν παρατηρήθηκε επίδραση	No Observed Effect Level
OP	Οργανοφωσφορικό	Organophosphate
PD	Ποσοστό του τύπου της τροφής στη δίαιτα (τιμές μεταξύ 0 και 1. Ένας τύπος ή περισσότεροι τύποι τροφής)	Proportion of Diet
PEC	Προβλεπόμενη περιβαλλοντική συγκέντρωση	Predicted Environmental Concentration
P_{ow}	Συντελεστής κατανομής μεταξύ <i>n</i> -οκτανόλης και νερού	Octanol–water partition coefficient
PrSCh	Ιωδιούχος προπιονυλθειοχολίνη	Propionylthiocholine iodide
PT	Ποσοστό της τροφής που λαμβάνεται στην περιοχή που έχει γίνει η εφαρμογή (τιμές μεταξύ 0 και 1)	Proportion of Time
RF	Συντελεστή αποφυγής της πρόσληψης τροφής	Repellency factor
RUD	Υπόλειμμα ανά μονάδα δόσης εφαρμογής [mg as /kg]	Residues per Unit Dose
SD	Τυπική απόκλιση	Standard Deviation
TER	Λόγος της τοξικότητας προς την έκθεση	Theoretical estimated ratio

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1 Ρύπανση περιβάλλοντος.....	1
1.2 Περιβαλλοντική παρακολούθηση-Οικοτοξικολογία.....	5
1.2.1 Πρόβλεψη ρύπανσης από τους ξеноβιοτικούς παράγοντες.....	6
1.2.2 Επιδράσεις χημικών ρύπων σε έμβιους οργανισμούς και οικοσυστήματα	8
1.2.3 Εισαγωγή στις Έννοιες Τοξικολογίας και της Οικοτοξικολογίας	9
1.2.3.1 Εκτίμηση της τοξικότητας των ρύπων	10
1.2.3.2 Τοξικότητα.....	12
1.2.3.3. Οικολογικά επίπεδα πειραματισμού	14
1.2.3.4. Πειραματικά επίπεδα πειραματισμού.....	15
1.2.3.5 Ο ρόλος της χρήσης των βιοσημαντών και βιοδεικτών	16
1.2.3.6 Διασπορά και διάχυση ρύπων στο περιβάλλον	17
1.2.3.6.1 Τρόποι έκθεσης από τη χρήση ΦΠ στα πτηνά.....	18
1.2.3.7 Έμμεσες επιπτώσεις στα πτηνά από τη χρήση ΦΠ στα πτηνά	21
1.3 Βιοδείκτες	23
1.3.1 Περιβαλλοντικοί δείκτες.....	26
1.3.1.1 Η σημασία και οι ιδιότητες των δεικτών	26
1.3.1.2 Τα πτηνά ως βιοδείκτες της κατάστασης του περιβάλλοντος	27
1.3.1.3 Οι ιχθύες ως βιοδείκτες της κατάστασης του περιβάλλοντος.....	28
1.3.1.4 Βιοδείκτες και πειραματικός σχεδιασμός	29
1.4 Βιοσημαντές.....	30
1.4.1 Βιοσημαντές έκθεσης	32
1.4.2 Βιοσημαντές επίδρασης	33
1.4.3 Βιοσημαντές ευαισθησίας.....	33
1.4.4 Βιοσημαντές φυσιολογίας	34
1.4.5 Βιοσημαντές συμπεριφοράς.....	34
1.4.6 Εγκυρότητα των βιοσημαντών.....	35
1.4.7 Βιοσημαντές και εκτίμηση της επικινδυνότητας	36
1.5 Εκτίμηση του περιβαλλοντικού κινδύνου	38
1.5.1 Περιβαλλοντική εκτίμηση για τα ΦΠ	39
1.5.1.1 Υπολογισμός του λόγου της τοξικότητας/έκθεσης.....	39
1.5.1.2 Αβεβαιότητα.....	39

1.5.1.3	Λήψη αποφάσεων	40
1.5.1.4	Περιβαλλοντική εκτίμηση από τη χρήση ΦΠ στα πτηνά	41
1.5.1.4.1	Σενάρια έκθεσης για την εκτίμηση επικινδυνότητας 1ου επιπέδου	42
1.5.1.4.2	Σενάρια έκθεσης για την εκτίμηση επικινδυνότητας 2ου επιπέδου	43
1.6	Τα πτηνά	45
1.6.1	Γεωργία και πτηνά	45
1.6.1.1	Πληθυσμιακή κατάσταση των πτηνών του αγρού στην Ευρώπη	46
1.6.1.2	Πτηνά του αγρού και ΦΠ.....	51
1.6.2	Το ιαπωνικό ορτύκι (<i>Coturnix coturnix japonica</i>).....	53
1.6.2.1	Περιγραφή-Ενδιαίτηματα-Βιολογία	53
1.6.3	Στοιχεία ανατομίας των πτηνών	56
1.6.3.1	Αίμα	56
1.6.3.2	Νευρικό σύστημα.....	57
1.6.3.2.1	Εγκέφαλος	58
1.6.3.2.2	Νωτιαίος Μυελός	61
1.6.3.2.3	Αυτόνομο Νευρικό Σύστημα	61
1.6.3.2.4	Παρασυμπαθητικό Νευρικό Σύστημα	62
1.6.3.2.5	Συμπαθητικό Νευρικό Σύστημα	63
1.6.3.2.6	Εντερικό νευρικό σύστημα	63
1.6.3.3	Πεπτικό σύστημα.....	67
1.7	Οι ιχθύες.....	73
1.7.1	Ρύπανση των Υδάτινων Συστημάτων	73
1.7.2	Η ιριδοειδής πέστροφα (<i>Oncorhynchus mykiss</i> Waldbauds).....	75
1.7.3	Ανατομία των ιχθύων	78
1.7.3.1	Νευρικό σύστημα.....	78
1.7.3.1.1	Εγκέφαλος	78
1.7.3.2	Πεπτικό σύστημα.....	80
1.8	Νευρικός ιστός.....	81
1.8.1	Νευρικό κύτταρο	81
1.8.2	Γλοία	83
1.8.3	Αγωγή της νευρικής ώσης	84
1.8.4	Συνάψεις.....	86

1.8.5	Νευροδιαβιβαστές.....	87
1.8.6	ACh.....	87
1.8.7	Εστεράσες.....	89
1.8.7.1	AChE.....	92
1.8.7.2	BuChE.....	96
1.8.8	Εντομοκτόνα.....	98
1.8.8.1	OPs.....	99
1.8.8.1.1	Δομή των OPs.....	101
1.8.8.1.2	Βιοχημικός μηχανισμός δράσης των OPs.....	104
1.8.8.1.3	Συμπτώματα τοξικότητας από OPs.....	107
1.8.8.1.4	Methamidophos.....	109
1.9	Μεταβολισμός και το μοντέλο επιβάρυνσης του οργανισμού (Body burden model).....	110
1.10	Σκοπός της μελέτης.....	115
2.	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	116
2.1	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΣΜΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ.....	116
2.1.1	Αξιολόγηση τοξικότητας στο ορτύκι.....	116
2.1.1.1	Δοκιμές οξείας τοξικότητας από το στόμα.....	116
2.1.1.2	Δοκιμές υποξείας τοξικότητας (διατροφής).....	117
2.1.1.3	Δοκιμές αποφυγής τροφής “no-choice test”.....	117
2.1.1.4	Δοκιμές αποφυγής τροφής “two-choice test”.....	118
2.1.1.5	Δοκιμές αποφυγής τροφής ημι-αγρού “pen test”.....	119
2.1.2	Αξιολόγηση τοξικότητας στην πέστροφα.....	120
2.1.2.1	Δοκιμές οξείας τοξικότητας.....	120
2.1.2.2	Δοκιμές παρατεταμένης (prolonged) τοξικότητας.....	120
2.2	ΥΛΙΚΑ.....	121
2.2.1	Χημικές ενώσεις.....	121
2.2.1.1	Δραστικές ουσίες.....	121
2.2.1.2	Χημικές ενώσεις για τον βιοχημικό πειραματισμό.....	121
2.2.1.3	Χημικές ενώσεις για τον ιστοχημικό πειραματισμό.....	121
2.2.1.4	Διαλύτες, χημικές ενώσεις και συσκευές για την ανάλυση υπολειμμάτων της διατροφής στη δοκιμή υποξείας τοξικότητας σε ορτύκι.....	122
2.3	ΜΕΘΟΔΟΙ.....	123
2.3.1	Αξιολόγηση τοξικότητας στο ορτύκι.....	123

2.3.1.1	Δοκιμές οξείας τοξικότητα από το στόμα	123
2.3.1.2	Δοκιμές υποξείας τοξικότητας (διατροφής)	128
2.3.1.2.1	Ανάλυση υπολειμμάτων διαίτης στη δοκιμή υποξείας τοξικότητας	126
2.3.1.3	Δοκιμές αποφυγής τροφής “no-choice test”	126
2.3.1.4	Δοκιμές αποφυγής τροφής “two-choice test”	129
2.3.1.5	Δοκιμές αποφυγής τροφής ημι-αγρού “pen test”	133
2.3.2	Αξιολόγηση τοξικότητας στην πέστροφα.....	134
2.3.2.1	Δοκιμές οξείας τοξικότητας.....	134
2.3.2.2	Δοκιμές παρατεταμένης (prolonged) τοξικότητας.....	137
2.3.3	Λήψη ιστοτεμαχίων και προετοιμασία ανάλυσης	139
2.3.4	Βιοχημική μέθοδος μέτρησης της δραστηριότητας των εστερασών.....	140
2.3.5.1	Παραλαβή, μονιμοποίηση και τομή ιστοτεμαχίων	142
2.3.5.2	Επικάλυψη αντικειμενοφόρων πλακών με πολυμερισμένη L-λυσίνη .	143
2.3.5.3	Χρώση ηωσίνης - αιματοξυλίνης.....	143
2.3.5.4	Ιστοχημική χρώση για την ChE.....	145
2.3.6	Μοντέλο επιβάρυνσης του οργανισμού (Body burden model)	148
2.3.6.1	Πρόσληψη, αποφυγή τροφής, ρυθμός απορρόφησης, κατανομής, μεταβολισμού και απέκκρισης και αναστρεψιμότητα των επιπτώσεων στην εκτίμηση της επικινδυνότητας για την οξεία τοξικότητα σε πτηνά	148
2.3.6.1.1	Γενική προσέγγιση	148
2.3.6.2	Παραμετροποίηση	153
2.3.6.2.1	Ρυθμός πρόσληψης της τροφής	153
2.3.6.2.2	Ρυθμός απορρόφησης.....	153
2.3.6.2.3	Ρυθμός μεταβολισμού	153
2.3.6.2.4	Ρυθμός απέκκρισης	154
2.3.6.2.5	LD ₅₀	154
2.3.6.2.6	AVD	154
2.3.6.2.7	AVT.....	155
2.3.7	Στατιστική επεξεργασία	156
3.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	157
3.1	Ορτύκι.....	157
3.1.1	Δοκιμές οξείας τοξικότητα από το στόμα.....	157
3.1.1.1	Μακροσκοπικές παρατηρήσεις.....	157

3.1.1.1.1	Θνησιμότητα	157
3.1.1.1.2	Κλινικά συμπτώματα	158
3.1.1.1.3	Πρόσληψη τροφής	160
3.1.1.1.4	Σωματικό βάρος.....	161
3.1.1.1.5	Μακροσκοπική παρατήρηση των ιστών	162
3.1.1.2	Βιοχημικά αποτελέσματα	162
3.1.1.2.1	Πλάσμα αίματος.....	162
3.1.1.2.2	Εγκέφαλος	165
3.1.1.2.2	Ήπαρ.....	167
3.1.1.3	Ιστοχημικές χρώσεις	169
3.1.1.3.1	Εγκέφαλος	169
3.1.1.3.1.1	Χρώση Ηωσίνης – Αιματοξυλίνης	169
3.1.1.3.1.2	Ιστοχημική ανίχνευση για την AChE	172
3.1.1.3.1.3	Χρώση για την BuChE.....	176
3.1.1.3.1.4	Χρώση εστερασών που υδρολύουν την PrSCh	177
3.1.1.3.2	Δωδεκαδάκτυλο	179
3.1.1.3.2.1	Χρώση Ηωσίνης – Αιματοξυλίνης	179
3.1.1.3.2.2	Ιστοχημική ανίχνευση για την AChE	180
3.1.1.3.2.3	Χρώση για την BuChE.....	183
3.1.1.3.2.4	Χρώση ChEs που υδρολύουν την PrSCh	184
3.1.1.3.3	Ήπαρ.....	186
3.1.1.3.3.1	Χρώση Ηωσίνης – Αιματοξυλίνης	186
3.1.1.3.3.2	Ιστοχημική ανίχνευση για την AChE	187
3.1.1.3.3.3	Χρώση για την BuChE.....	190
3.1.1.3.3.4	Χρώση ChEs που υδρολύουν την PrSCh	191
3.1.2	Δοκιμές υποξείας τοξικότητας	193
3.1.2.1	Μακροσκοπικές παρατηρήσεις.....	193
3.1.2.1.1	Θνησιμότητα.....	193
3.1.2.1.2	Κλινικά συμπτώματα	194
3.1.2.1.3	Πρόσληψη τροφής	195
3.1.2.1.4	Σωματικό βάρος.....	196
3.1.2.1.5	Μακροσκοπική παρατήρηση των ιστών	197
3.1.2.2	Βιοχημικά αποτελέσματα	198
3.1.2.2.1	Πλάσμα αίματος.....	198

3.1.2.2.2 Εγκέφαλος	200
3.1.2.2.3 Ήπαρ.....	200
3.1.2.3 Ιστοχημικές χρώσεις	205
3.1.2.3.1 Εγκέφαλος	205
3.1.2.3.1.1 Χρώση Ηωσίνης – Αιματοξυλίνης	205
3.1.2.3.1.2 Ιστοχημική ανίχνευση για την AChE	208
3.1.2.3.1.3 Χρώση για την BuChE.....	212
3.1.2.3.1.4 Χρώση ChEs που υδρολύουν την PrSCh210	
3.1.2.3.2 Δωδεκαδάκτυλο	215
3.1.2.3.2.1 Χρώση Ηωσίνης – Αιματοξυλίνης	215
3.1.2.3.2.2 Ιστοχημική ανίχνευση για την AChE	217
3.1.2.3.2.3 Χρώση για την BuChE.....	220
3.1.2.3.2.4 Χρώση ChEs που υδρολύουν την PrSCh	221
3.1.2.3.3 Ήπαρ.....	222
3.1.2.3.3.1 Χρώση Ηωσίνης – Αιματοξυλίνης	222
3.1.2.3.3.2 Ιστοχημική ανίχνευση για την AChE	223
3.1.2.3.3.3 Χρώση για την BuChE.....	226
3.1.2.3.3.4 Χρώση ChEs που υδρολύουν την PrSCh	227
3.1.2.4 Ανάλυση της τροφής.....	229
3.1.3 Δοκιμές αποφυγής “no-choice test”	230
3.1.3.1 Συντελεστής αποφυγής (RF)	230
3.1.4 Δοκιμές αποφυγής “two-choice test”	238
3.1.4.1 Μακροσκοπικές παρατηρήσεις.....	238
3.1.4.1.1 Θνησιμότητα	238
3.1.4.1.2 Κλινικά συμπτώματα	238
3.1.4.1.3 Πρόσληψη τροφής	239
3.1.4.1.4 Σωματικό βάρος.....	241
3.1.4.1.5 Συντελεστής αποφυγής (RF).....	241
3.1.5 Δοκιμές αποφυγής ημι-αγρού “pen test”	248
3.1.5.1 Μακροσκοπικές παρατηρήσεις.....	248
3.1.5.1.1 Θνησιμότητα	248
3.1.5.1.2 Κλινικά συμπτώματα	248
3.1.5.1.3 Πρόσληψη τροφής	248
3.1.5.1.4 Σωματικό βάρος.....	250

3.1.5.1.5 Συντελεστής αποφυγής (RF).....	251
3.1.5.2 Βιοχημικά αποτελέσματα	256
3.1.5.3 Ιστοχημικές χρώσεις	256
3.1.6 Μοντέλο επιβάρυνσης του οργανισμού (Body burden model)	257
3.1.6.1 ADME (απορρόφηση, κατανομή, μεταβολισμός και απέκκριση)...	257
3.1.6.1.1 Απορρόφηση, κατανομή και απέκκριση	257
3.1.6.1.1.1 Επίμυες	258
3.1.6.1.1.2 Αίγες	260
3.1.6.1.1.3 Όρνιθες	261
3.1.6.1.1.4 Θηλάζουσες αγελάδες	262
3.1.6.1.2 Μεταβολισμός	262
3.1.6.1.3 Δερμική απορρόφηση	265
3.1.6.1.3.1 Πίθηκοι	265
3.1.6.1.3.2 Άνθρωπος	266
3.1.6.2 Εκτίμηση της επικινδυνότητας για τα πτηνά σύμφωνα με το μοντέλο επιβάρυνσης του οργανισμού (body burden model).....	267
3.1.6.2.1 Παράμετροι της μεθόδου	270
3.1.6.2.1.1 Επιλογή ειδών και εκτίμηση του ρυθμού πρόσληψης τροφής.....	270
3.1.6.2.1.2 Εκτίμηση των υπολειμμάτων του methamidophos σε έντομα και σπόρους.....	271
3.1.6.2.1.3 Εκτίμηση της τοξικότητας	271
3.1.6.2.1.4 Εκτίμηση της δόσης ορίου αποφυγής (AVT).....	272
3.1.6.2.1.5 Εκτίμηση του χρόνου καθυστέρησης της αποφυγής (AVD).....	273
3.1.6.2.1.6 Εκτίμηση χρόνου έκλειψης των κλινικών συμπτωμάτων (ART)	273
3.1.6.2.1.7 Εκτίμηση του k για την εξάλειψη του methamidophos από τις διεργασίες ADME (απορρόφηση, κατανομή, μεταβολισμός και απέκκριση).....	273
3.1.6.2.1.8 Επανεκτίμηση της δόσης ορίου αποφυγής (AVT).....	277
3.1.6.3 Αξιολόγηση.....	279
3.1.6.4 Λήψη απόφασης	281
3.2 Πέστροφα	283
3.2.1 Δοκιμές οξείας τοξικότητας.....	283

3.2.1.1	Μακροσκοπικές παρατηρήσεις.....	283
3.2.1.1.1	Θνησιμότητα	283
3.2.1.1.2	Κλινικά συμπτώματα	284
3.2.1.1.3	Μακροσκοπική παρατήρηση των ιστών	285
3.2.1.2	Βιοχημικά αποτελέσματα	286
3.2.1.2.1	Εγκέφαλος	286
3.2.1.2.2	Ήπαρ.....	288
3.2.1.3	Ιστοχημικές χρώσεις	290
3.2.1.3.1	Εγκέφαλος	290
3.2.1.3.1.1	Χρώση Ηωσίνης – Αιματοξυλίνης	290
3.2.1.3.1.2	Ιστοχημικήανίχνευση για την AChE	293
3.2.1.3.1.3	Χρώση για την BuChE.....	297
3.2.1.3.1.4	Χρώση ChEs που υδρολύουν την PrSCh	298
3.2.1.3.2	Ήπαρ.....	300
3.2.1.3.2.1	Χρώση Ηωσίνης – Αιματοξυλίνης	300
3.2.1.3.2.2	Ιστοχημικήανίχνευση για την AChE	301
3.2.1.3.2.3	Χρώση για την BuChE.....	304
3.2.1.3.2.4	Χρώση ChEs που υδρολύουν την PrSCh	305
3.2.2	Δοκιμές παρατεταμένης (prolonged) τοξικότητας σε πέστροφες.....	306
3.2.2.1	Μακροσκοπικές παρατηρήσεις.....	306
3.2.2.1.1	Θνησιμότητα	306
3.2.2.1.2	Κλινικά συμπτώματα	307
3.2.2.1.3	Μακροσκοπική παρατήρηση των ιστών	309
3.2.2.2	Βιοχημικά αποτελέσματα	310
3.2.2.2.1	Εγκέφαλος	310
3.2.2.2.2	Ήπαρ.....	312
3.2.2.3	Ιστοχημικές χρώσεις	313
3.2.2.3.1	Εγκέφαλος	313
3.2.2.3.1.1	Χρώση Ηωσίνης – Αιματοξυλίνης	313
3.2.2.3.1.2	Ιστοχημικήανίχνευση για την AChE	316
3.2.2.3.1.3	Χρώση για την BuChE.....	320
3.2.2.3.1.4	Χρώση ChEs που υδρολύουν την PrSCh	321
3.2.2.3.2	Ήπαρ.....	323
3.2.2.3.2.1	Χρώση Ηωσίνης – Αιματοξυλίνης	323

3.2.2.3.2.2	<i>Ιστοχημική ανίχνευση για την AChE</i>	323
3.2.2.3.2.3	<i>Χρώση για την BuChE</i>	325
3.2.2.3.2.4	<i>Χρώση ChEs που υδρολύουν την PrSCh</i>	325
4.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	326
4.1	ΠΤΗΝΑ	326
4.1.1	Μακροσκοπικές παρατηρήσεις	328
4.1.2	Βιοχημικές-ιστοχημικές παρατηρήσεις	340
4.1.3	Αποφυγή πρόληψης της τροφής	359
4.1.4	Μοντέλο επιβάρυνσης του οργανισμού (Body burden model)	367
4.2	ΙΧΘΥΣ	373
4.2.1	Μακροσκοπικές παρατηρήσεις	374
4.2.1	Βιοχημικές-ιστοχημικές παρατηρήσεις	378
4.3	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	394
5.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	396
	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι	450
	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ	456
	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ	459

**ΧΡΗΣΗ ΒΙΟΣΗΜΑΝΤΩΝ ΤΩΝ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ *COTURNIX*
COTURNIX JAPONICA (ΟΡΤΥΚΙ) ΚΑΙ *ONCHORHYNCHUS*
MYKISS (ΠΕΣΤΡΟΦΑ) ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ
ΟΙΚΟΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΠΤΩΣΕΩΝ ΤΟΥ
ΜΕΤΗΑΜΙΔΟΡΦΟΣ**

ΜΑΝΟΥΣΟΣ ΦΟΥΝΤΟΥΛΑΚΗΣ

**Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής, Εργαστήριο Οικολογίας και Προστασίας
Περιβάλλοντος, Ιερά Οδός 75, Αθήνα, 118 55,
email: ceep4fom@noc.aua.gr, manousosf@yahoo.gr**

Περίληψη

Στην παρούσα μελέτη εκθέσαμε δύο βιοδείκτες, το Ιαπωνικό ορτύκι (*Coturnix coturnix japonica*) και την ιριδίζουσα πέστροφα (*Oncorhynchus mykiss*), στο οργανοφωσφορικό methamidophos σε δοκιμές οξείας και διατροφικής τοξικότητας και οξείας και παρατεταμένης τοξικότητας, αντίστοιχα. Καταγράφηκαν η θνησιμότητα καθώς και υπο-θανατηφόρες επιδράσεις σύμφωνα με διεθνώς αποδεκτά πρωτόκολλα πειραματισμού. Επιπλέον, εκτιμήθηκαν βιοχημικά και ιστοχημικά οι χολινεστεράσες, ακετυλοχολινεστεράση και βουτυρυλχολινεστεράση, και με χρώση ηωσίνης-αιματοξυλίνης, στους ιστούς, εγκέφαλο και ήπαρ και στα δύο είδη και δωδεκαδάκτυλο καθώς και πλάσμα στο ορτύκι, με διάφορα υποστρώματα και παρεμποδιστές.

Στις δοκιμές οξείας και διατροφικής τοξικότητας στα πτηνά υπολογίστηκαν τα LD50/LC50. Οι υπο-θανατηφόρες επιδράσεις περιελάμβαναν τρέμουλο, έλλειψη συντονισμού και αδυναμία κάτω άκρων. Η θνησιμότητα στην οξεία δοκιμή παρατηρήθηκε κυρίως κατά τις πρώτες 1-2 h μετά την εφαρμογή, ενώ στην δοκιμή διαίτης κατά τις ημέρες 4-5 (πιθανώς και λόγω ασιτίας) όπου παρατηρήθηκε και αποφυγή της λήψης τροφής, αναλόγως σε όλες τις συγκεντρώσεις methamidophos. Η βιοχημική ανάλυση στους ιστούς έδειξε ισχυρή δόσοεξαρτώμενη παρεμπόδιση των χολινεστερασών. Η ιστοχημεία των ιστών προσέφερε σημαντικά στοιχεία σε σχέση με τη θνησιμότητα και τις υπο-θανατηφόρες επιδράσεις στους βιο-δείκτες και, επιπλέον, υποστήριξε τις βιοχημικές παρατηρήσεις. Η εκτίμηση επικινδυνότητας με βάση το μοντέλο επιβάρυνσης του οργανισμού στα πτηνά από την εφαρμογή του methamidophos, με πραγματικά δεδομένα για την Ελληνική ορνιθοπανίδα σε αγροτικές καλλιέργειες, έδειξε υψηλό κίνδυνο.

Στην ιριδίζουσα πέστροφα στην οξεία και παρατεταμένη δοκιμή υπολογίστηκαν οι τιμές EC50. Στην οξεία δοκιμή, παρατηρήθηκε θνησιμότητα κυρίως τις ημέρες 3-4. Στην παρατεταμένη δοκιμή, η θνησιμότητα παρατηρήθηκε καθ' όλη τη διάρκεια του πειραματισμού. Οι υπο-θανατηφόρες επιδράσεις κυμάνθηκαν από σποραδικούς σπασμούς και απώλεια συντονισμού μέχρι την απάθεια και στις δύο δοκιμές. Τα αποτελέσματα της βιοχημείας και ιστοχημείας των χολινεστερασών στους ιστούς της πέστροφας ήταν παρόμοια με εκείνα στο ορτύκι.

Συμπερασματικά η χρήση της βιοχημείας και ιστοχημείας του βιοσημαντή χολινεστεράση, μπορεί να βελτιώσει σημαντικά την ερμηνεία των δεδομένων που προκύπτουν από δοκιμές σε βιοδείκτες για τις επιπτώσεις του methamidophos.

Λέξεις κλειδιά: Ακετυλχολινεστεράση, Οργανοφωσφορικό, Βιοσημαντής, Βιοδείκτης, Τοξικότητα.

Abstract

We exposed two bio-indicators, the Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) and the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in the organophosphate methamidophos using acute and dietary tests and acute and prolonged tests, respectively. Mortality and sub-lethal effects were recorded in accordance to internationally accepted guidelines. In addition, the cholinesterases, acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase, were estimated biochemically and histochemically, including eosin- and haematoxylin staining, in brain and liver tissues of both species and in the duodenum as well as the plasma of the quail, with various substrates and inhibitors.

In the avian acute and dietary tests the LD₅₀/LC₅₀ values were estimated. Sub-lethal effects included tremor, loss of coordination and lower limb weakness. Mortalities for the acute test occurred mainly in the first 1-2 hours following application, while for the dietary test occurred on days 4-5 (probably and due to starvation) where avoidance was observed at all tested concentrations with a dose response relation. Biochemical analysis in the tissues indicated a strong cholinesterase dose-related inhibition. Histochemistry of the tissues offered significant data with respect to mortality and sub-lethal effects of the bio-indicators and in addition supported the biochemical observations. Risk assessment with the Body Burden model based on real data from the Hellenic avian agricultural species indicates high risk to birds.

As for the rainbow trout from the acute and prolonged exposure the EC₅₀ values were estimated. In the acute test, mortalities were observed mainly in days 3-4. In the prolonged test, mortalities occurred throughout the testing period. Sub-lethal effects ranged from sporadic spasms and loss of coordination to apathy in both types of tests. Cholinesterase biochemistry and histochemistry of the rainbow trout tissue results were similar to those observed for the quail.

We conclude that the use of biochemistry and histochemistry of the biomarker, cholinesterase, may significantly improve the interpretation of the data obtained by the tests with bio-indicators employed to assess the effects of methamidophos.

Keywords: Acetylcholinesterase, Organophosphate, Biomarker, Bio-indicator, Methamidophos.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ρύπανση περιβάλλοντος

Από την εποχή που ο πρωτόγονος άνθρωπος άρχισε να χρησιμοποιεί γεωργικά εργαλεία για την καλλιέργεια της γης, τη συστηματική εκτροφή ζώων για τις ανάγκες της διατροφής του, να παρεμβαίνει στην ροή ποταμών για αρδευτικούς λόγους και να κόβει δένδρα για την κατασκευή πρόχειρων καταλυμάτων, ξεκινάει η εποχή της ανθρωπογενούς επέμβασης στη φύση. Αλλά οι αλλαγές αυτές ήταν περιορισμένης κλίμακας, προκαλώντας εξαιρετικά μικρές και τοπικές διαταραχές της φυσικής ισορροπίας (Walker, 1997).

Η γεωργία με τη μορφή που βρίσκεται σήμερα εμφανίστηκε στην Ευρώπη πριν από περίπου 7000 χρόνια. Η αποψίλωση των δασών που είχαν καλύψει το μεγαλύτερο μέρος της κεντρικής και βόρειας Ευρώπης από το τέλος της τελευταίας Περιόδου των Παγετώνων και η αντικατάστασή τους από τη γεωργία, αντιπροσωπεύει μια από τις βαθύτερες ανθρωπογενείς αλλαγές στους βιότοπους της άγριας φύσης. Στους ιστορικούς χρόνους, αυτή η αλλαγή οδήγησε σε μια αύξηση στην ποικιλομορφία της χλωρίδας και της πανίδας στην Ευρώπη (Donald et al. 2002).

Είναι γνωστό ότι ο άνθρωπος πάντα βίωνε κάποιες αλλαγές, “υποβαθμίσεις”, στο περιβάλλον του και στην υπόλοιπη φύση. Μετά την Αγροτική επανάσταση (9000 π.Χ.) άρχισαν να εμφανίζονται τα πρώτα προβλήματα του περιβάλλοντος, ενώ μετά την Βιομηχανική επανάσταση (1750 μ.Χ.) τα περιβαλλοντικά προβλήματα έγιναν πιο έντονα χωρίς να πάρουν βέβαια τις σημερινές τους διαστάσεις. Μετά τους δύο παγκοσμίους πολέμους κυρίως τις δεκαετίες του '40 και του '50 τα πράγματα άλλαξαν και πραγματοποιήθηκε μια αλματώδης οικονομική, τεχνολογική και βιομηχανική ανάπτυξη συχνά χωρίς σύνεση και προγραμματισμό. Η ανάπτυξη αυτή μοιραία οδήγησε σε υποβάθμιση του περιβάλλοντος η οποία αρχικά εκδηλώθηκε με τη μείωση ή την εξαφάνιση ορισμένων πληθυσμών ευπαθών ειδών φυτών και ζώων και στη συνέχεια σε καταστροφή της δομής και της λειτουργίας των οικοσυστημάτων από τα οποία εξαρτάται άμεσα ή έμμεσα η επιβίωση του ανθρώπου.

Από το 1960 άρχισε η αφύπνιση κατοίκων των αναπτυγμένων χωρών για την κατάσταση του περιβάλλοντος και τα τελευταία 40 χρόνια έχουν ληφθεί σημαντικά

μέτρα σε διεθνές και εθνικό επίπεδο για τον περιορισμό της ρύπανσης, την προστασία των πλουτοπαραγωγικών πηγών και της ανάπτυξης ήπιων μεθόδων αγροτικής καλλιέργειας και ανανεώσιμων πηγών ενέργειας. Παρόλα αυτά, η περιβαλλοντική ρύπανση συνεχίζεται με ανησυχητικό ρυθμό και οι πρώτες σοβαρές επιπτώσεις έχουν ήδη επισημανθεί (Walker, 1997).

Τα αίτια της οικολογικής κρίσης είναι:

- Η καλπάζουσα αύξηση του πληθυσμού της γης
- Η αστικοποίηση
- Η εξάντληση νέων τόπων του πλανήτη για μεταναστεύσεις και εποίκηση
- Η άνιση κατανομή του πλούτου της γης
- Η αντικατάσταση της παραδοσιακής οικονομίας και εκμετάλλευσης του πλούτου από την σύγχρονη τεχνολογία και την οικονομία του κέρδους.
- Η διεύρυνση του χάσματος μεταξύ τεχνολογικής ικανότητας και οικολογικής γνώσης.
- Η θρησκευτικοφιλοσοφική θεώρηση του ανθρώπου σε σχέση με την φύση (Καρανδεινός, 1995).

Η ρύπανση του περιβάλλοντος, όρος που χρησιμοποιείται πολύ σήμερα, συμπεριλαμβάνει όλες τις τοξικές χημικές ουσίες που απελευθερώνονται στο οικοσύστημα καθώς και ουσίες που μπορεί να μην επικίνδυνες για τους οργανισμούς αλλά που έχουν αρνητική επίδραση στο περιβάλλον. Ο ορισμός περιλαμβάνει στην πραγματικότητα όλα τα αποτελέσματα των ενεργειών του ανθρώπου που καταστρέφουν το οικοσύστημα. Εκτός από τους τεχνητούς ρύπους στον όρο συμπεριλαμβάνονται και όλοι οι τοξικοί παράγοντες που υπάρχουν στη φύση και η έντασή τους αυξάνεται από τις δραστηριότητες του ανθρώπου. Στην τελευταία αυτή κατηγορία μπορεί να συμπεριληφθούν οι μυκοτοξίνες, διάφορες τοξίνες των βακτηρίων που χρησιμοποιούνται στην βιομηχανία τροφίμων, η μικροβιολογική μόλυνση του νερού κλπ.

Η ρύπανση του περιβάλλοντος από το σύγχρονο τρόπο ζωής και τη σύγχρονη τεχνολογία οφείλεται στη διαρκή παραγωγή ενέργειας, τη δραστηριότητα της χημικής βιομηχανίας και την αγροτική δραστηριότητα.

Τα μεγαλύτερα προβλήματα που σχετίζονται με τον βιομηχανοποιημένο πολιτισμό μας πηγάζουν από το γεγονός ότι η φυσική ενέργεια που διαχέεται στο περιβάλλον διαταράχθηκε κυρίως από τον σύγχρονο ανθρώπινο πολιτισμό που έσπασε

τον κύκλο των στοιχείων παράγοντας αυξανόμενες ποσότητες από μη αποδομήσιμα και γι' αυτό μη ανακυκλώσιμα υλικά. Το φαινόμενο της ρύπανσης ορίζεται κυρίως από την επιταχυνόμενη αστικοποίηση και την άναρχη βιομηχανοποίηση. Η αύξηση της ρύπανσης στο οικοσύστημα είναι ποσοτική και ποιοτική. Η χρήση της μοντέρνας οργανικής χημείας επιτρέπει ετήσια εμπορία αρκετών εκατοντάδων από νέες ουσίες, συχνά πολύ τοξικές στους ζώντες οργανισμούς, που παράγονται σε μεγάλη κλίμακα χιλιάδων τόνων κάθε χρόνο, πολλές φορές πριν να ολοκληρωθούν μελέτες για την εκτίμηση της επικινδυνότητας τοξικολογικών ή οικολογικών δεδομένων.

Τρία κυρίως είναι τα αίτια ρύπανσης του οικοσυστήματος από τον σύγχρονο πολιτισμό:

- Η παραγωγή ενέργειας,
- η δραστηριότητα της χημικής βιομηχανίας, και
- η αγροτική δραστηριότητα.

Ως ρύπανση ανθρωπογενούς προέλευσης ορίζεται κάθε άμεση ή έμμεση εισαγωγή ουσιών, η οποία έχει βλαπτική επίδραση στους ζωντανούς οργανισμούς, είναι επικίνδυνη για την ανθρώπινη υγεία ή παρεμποδίζει τη χρήση των υδάτων ή αλλοιώνει την ποιότητα του νερού ή του ατμοσφαιρικού αέρα ή υποβαθμίζει τις δυνατότητες χρησιμοποίησής τους για ψυχαγωγικούς σκοπούς. Οι κυριότερες πηγές ρύπανσης του οικοσυστήματος είναι τα βιομηχανικά και αστικά λύματα και οι γεωργικές καλλιέργειες.

Η σύγχρονη γεωργία παρασύρεται ολοένα και περισσότερο στην αλόγιστη χρήση ανόργανων ή οργανικών χημικών ουσιών. Έτσι, η γεωργία κατέληξε να αποτελεί την μεγαλύτερη πηγή ρύπανσης των υδάτινων οικοσυστημάτων (Vinten et al. 1991).

Στον τομέα της σύγχρονης γεωργικής παραγωγής οι αιτίες που συμβάλλουν την ρύπανση είναι:

Λιπάσματα: Η υψηλότερη γεωργική παραγωγή οφείλεται στην ευρεία χρήση χημικών λιπασμάτων (νιτρικά, φωσφορικά και καλιούχα). Στην Ελλάδα η κατανάλωση χημικών λιπασμάτων, στο διάστημα 1958-78, αυξήθηκε κατά 4,3 φορές (αζωτούχα με 5, φωσφορικά με 3,3 και καλιούχα με 5). Για λόγους κόστους παραγωγής τα λιπάσματα και κυρίως τα υπερφωσφορικά δεν είναι καθαρά, αλλά περιέχουν ίχνη από τοξικά μέταλλα. Οι ουσίες αυτές είναι λίγο κινητές στο έδαφος και γι' αυτό συσσωρεύονται στους επιφανειακούς ορίζοντες, ιδιαίτερα στα στρώματα που βρίσκονται οι ρίζες. Επίσης τα νιτρικά αυξάνουν στους υδροφόρους ορίζοντες οδηγώντας σε υποβάθμιση της ποιότητας των νερών. Σε τέτοια συστήματα υπάρχει ο κίνδυνος που λέγεται

«ευτροφισμός» και επηρεάζει την τελική διάσπαση του οικολογικού κύκλου του νερού.

Φυτοπροστατευτικά προϊόντα (ΦΠ): Κατά ανάλογο τρόπο η χρήση ΦΠ έχει αυξηθεί όχι μόνο στις αναπτυγμένες αλλά και στις αναπτυσσόμενες χώρες. Οι κυριότερες κατηγορίες που απαντώνται ως ρύποι στα νερά είναι τα οργανοχλωριωμένα ΦΠ, τα οργανοφωσφορικά (organophosphates, OPs), τα καρβαμιδικά, τα πυρεθροειδή κλπ. Σημαντικές ποσότητες ΦΠ απαντώνται και σε υπόγεια νερά. Το γεγονός ότι η χρήση των ΦΠ στις γεωργικές καλλιέργειες τα τελευταία χρόνια έχει αυξηθεί κατακόρυφα εγκυμονεί κινδύνους για πιθανή ρύπανση του περιβάλλοντος. Η επίδραση των ΦΠ στο οικοσύστημα εξαρτάται από τις ιδιότητες του υπολείμματος, τη διαλυτότητα των ενώσεων τους, την αντοχή στις διασπάσεις και την τοξικότητά τους (Κουϊμτζής κ.ά, 1993).

Χρήση κτηνιατρικών φαρμάκων: Τα αντιβιοτικά, οι σουλφοναμίδες αλλά και οι αυξητικού παράγοντες που χρησιμοποιούνται στη ζωική παραγωγή μπορεί να οδηγήσουν σε ρύπανση της τροφικής αλυσίδας (Walker et al. 1996). Η πενικιλίνη G, αμπικιλίνη, μεθυκυλλίνη, δικλωξακυλλίνη καθώς και άλλες πενικιλίνες διαπιστώθηκε ότι διέρχονται τον πλακούντα των θηλαστικών και συνδέονται με την πρόκληση δυσπλασιών του εμβρύου (Mirkin et al. 1976).

1.2 Περιβαλλοντική παρακολούθηση-Οικοτοξικολογία

Οι πιέσεις που ασκούνται στο περιβάλλον και οι κίνδυνοι που απορρέουν από αυτές ήταν πάντα αναπόσπαστο μέρος της κοινωνίας. Τα οικοσυστήματα που καλύπτουν όλες τις σύγχρονες ανθρώπινες δραστηριότητες έχουν τροποποιηθεί ριζικά ή αλλοιωθεί εντελώς, τόσο εις βάρος όσο και σε όφελος της υγείας του ανθρώπου και της κοινωνίας. Εάν δεν γίνουν αντιληπτές οι σχέσεις ανθρώπου και περιβάλλοντος δεν θα γίνουν κατανοητές οι σχέσεις κινδύνου-οφέλους.

Η έννοια του οικοσυστήματος εμπεριέχει ορισμένο αριθμό ειδών πανίδας και χλωρίδας και το αβιοτικό περιβάλλον. Ακόμη και το πιο απλό οικοσύστημα περιέχει μεγάλο αριθμό ειδών και πολλές αλληλεπιδράσεις που καθιστούν τις προβλέψεις για επιδράσεις τοξικών ρύπων αρκετά δύσκολες. Η βιοποικιλότητα προσφέρει αρκετή σταθερότητα στα οικοσυστήματα, δυναμική εξέλιξης και αντιμετώπισης των διαταραχών (ρύπανση) που τείνουν να διαταράξουν την ισορροπία του (Metcalf et al. 1971).

Οι οικοτοξικολογικές έρευνες έχουν εξελιχθεί τεχνολογικά και επιστημονικά και πολλές μεθοδολογίες έχουν τυποποιηθεί ώστε τα αποτελέσματα να είναι συγκρίσιμα και επαναλήψιμα. Η αυστηρή περιβαλλοντική νομοθεσία των τελευταίων χρόνων, η αφύπνιση του περιβαλλοντικού κινήματος των πολιτών, η επιβολή οικονομικών κινήτρων για καθαρότερες βιομηχανικές εγκαταστάσεις, η επιβολή προστίμων σε περιπτώσεις ρύπανσης και οι νέες τεχνολογίες αντιρρύπανσης, έχουν προωθήσει την έρευνα στην περιβαλλοντική τοξικολογία και οικοτοξικολογία για να τεκμηριωθούν οι επιβλαβείς δράσεις των ρύπων στα οικοσυστήματα. Οι εμφανείς επιπτώσεις της ανθρωπογενούς δραστηριότητας στο περιβάλλον, στην ποιότητα ζωής και στην υγεία του ανθρώπου έδωσαν την αφορμή για τη διάθεση σημαντικών οικονομικών κινήτρων για έρευνα στους τομείς των τοξικών χημικών ουσιών, την εκτίμηση της επικινδυνότητας και του οικολογικού κινδύνου σε ευαίσθητα οικοσυστήματα.

Οι κυριότεροι τομείς οικοτοξικολογικών ερευνών περιλαμβάνουν τις παρακάτω

ενότητες :

- **Οικοτοξικολογικές έρευνες σε υδρόβιους οργανισμούς:** οι υδρόβιοι οργανισμοί δέχονται πρώτοι την επίδραση των διαφόρων χημικών ρύπων με την έκλυση ή απόρριψη χημικών γεωργικών ουσιών (ΦΠ, λιπασμάτων) και βιομηχανικών τοξικών αποβλήτων που καταλήγουν σε υδατικούς αποδέκτες (Adams, 1995).
- **Οικοτοξικολογικές έρευνες σε είδη άγριας πανίδας και χλωρίδας:** τα είδη αυτά αποτελούν ευαίσθητους αποδέκτες χημικών ρύπων. Πολλές χημικές ουσίες και απόβλητα επηρεάζουν άμεσα τους πληθυσμούς τους και πολλά είδη πουλιών, αμφίβιων και θηλαστικών έχουν φτάσει στα όρια εξαφάνισης (Hoffman, 1992).
- **Οικοτοξικολογικές έρευνες για διάφορα ιζήματα:** αρκετά είδη εξαρτώνται από την ποιότητα των ιζημάτων σε υδατικά συστήματα (Burton, 1995).
- **Οικοτοξικολογικές έρευνες εδάφους:** το έδαφος παίζει σημαντικό ρόλο στην αποσύνθεση της οργανικής ύλης, στην ποιότητα τροφής των φυτών και στους διατροφικούς κύκλους (Beyer and Linder, 1995).
- **Οικοτοξικολογική έρευνα με δείκτες γεωλογικού τοπίου (landscapes):** αλλαγές στο τοπίο μιας περιοχής αποτελούν ενδιαφέροντες δείκτες για οικοτοξικολογικές μελέτες. Τα νέα συστήματα GIS (Geographic Information Systems) και χρήση ηλεκτρονικών υπολογιστών για την δημιουργία μοντέλων γεωγραφικών προσομοιώσεων με H/Y (Computer Simulation Models), μπορούν να δώσουν χρήσιμα περιβαλλοντικά αποτελέσματα (Klaine and Lewis, 1995).

1.2.1 Πρόβλεψη ρύπανσης από τους ξеноβιοτικούς παράγοντες

Η «Περιβαλλοντική παρακολούθηση» αναφέρεται στην εκτίμηση της ποιότητας ή της κατάστασης του περιβάλλοντος από τη μέτρηση επιλεγμένων παραμέτρων σε τακτική βάση. Κατά τις προηγούμενες δεκαετίες η περιβαλλοντική παρακολούθηση προγραμμάτων επικεντρώθηκε στην μέτρηση των φυσικών και χημικών μεταβλητών και μόνο περιστασιακά ενσωματώθηκαν και βιολογικές μεταβλητές.

Η παρακολούθηση διαφόρων χημικών ουσιών περιλαμβάνει την τακτική και συχνή μέτρηση τους στο νερό, το έδαφος, τα ιζήματα και τον αέρα σε μια καθορισμένη χρονική περίοδο, π.χ. ένα έτος. Πρόσφατα, στα περιβαλλοντικά προγράμματα παρακολούθησης, εκτός από τις χημικές μετρήσεις, περιλαμβάνεται ο καθορισμός των επιπέδων των προσμείξεων σε ζώντες οργανισμούς, καθώς και η αξιολόγηση των επιδράσεων διαφόρων αντιδράσεων/παραμέτρων των βιολογικών/ οικολογικών

συστημάτων. Σήμερα, χρονικές και χωρικές αλλαγές σε επιλεγμένα βιολογικά συστήματα/παράμετρους μπορούν και χρησιμοποιούνται για να αντανakλούν τις αλλαγές της ποιότητας του περιβάλλοντος, μια προσέγγιση που ονομάζεται "βιοπαρακολούθηση". Η βιοπαρακολούθηση είναι ένα υποσύνολο της παρακολούθησης του περιβάλλοντος και συγκεκριμένα αναφέρεται στη χρήση ζωντανών οργανισμών στις διαδικασίες παρακολούθησης. Η βιοπαρακολούθηση μπορεί να λάβει πολλές μορφές - από την αξιολόγηση των χημικών υπολειμμάτων σε ιστούς των ζωντανών οργανισμών, μέσω του προσδιορισμού συγκεκριμένων βιολογικών παραμέτρων.

Θεωρητικά, μπορούν να αναπτυχθούν σε οργανισμούς άλλες μορφές/τύποι βιοπαρακολούθησης με βάση τις αλλαγές σε διάφορα βιοχημικά, φυσιολογικά, μορφολογικά ή χαρακτηριστικά συμπεριφοράς, μέχρι και χαρακτηριστικά που αποδίδουν παραδοσιακές οικολογικές ιδιότητες, όπως η αφθονία και η βιοποικιλότητα (Lam and Wu, 2003).

Είναι δύσκολη η πρόβλεψη, με αξιόπιστο βαθμό ακρίβειας, των επιδράσεων των ρυπαντών στους οργανισμούς, μετρώντας απλά συγκεντρώσεις ενός χημικού στοιχείου του αβιοτικού περιβάλλοντος. Παράγοντες που επηρεάζουν την βιοδιαθεσιμότητα των χημικών στοιχείων στους οργανισμούς συμπεριλαμβάνουν την διακύμανση της θερμοκρασίας σε σχέση με άλλους ρυπαντές, το έδαφος και τους τύπους ιζήματος, τη βροχή, το pH και την αλατότητα. Εάν χρησιμοποιούμε βιοτικά συστήματα παρακολούθησης των επιπέδων συγκέντρωσης των χημικών ουσιών υπάρχουν σημαντικές δυσκολίες στο να γνωρίζουμε τις επιδράσεις των χημικών ουσιών στον οργανισμό. Αυτή η διαδικασία είναι περισσότερο δύσκολη από την παρουσία μιγμάτων και τις αξιοσημείωτες διαφορές στις αντιδράσεις μεταξύ των ειδών. Η βιολογική παρακολούθηση *in situ* κατορθώνει να αντιμετωπίζει αυτά τα προβλήματα με το να αναλύει ποικίλες παραμέτρους των φυσικών πληθυσμών αντανakλώντας την κατάσταση στον αγρό απ' ότι από τις καθορισμένες συνθήκες στις μελέτες εργαστηρίου.

Υπάρχουν τέσσερις προσεγγίσεις βιολογικής παρακολούθησης *in situ* της ρύπανσης. Οι τέσσερις αυτές προσεγγίσεις συμπεριλαμβάνουν:

1. Παρακολούθηση της επίδρασης της ρύπανσης στην παρουσία ή στην απουσία ειδών από μία βιοθέση και την αλλαγή της σύνθεσης των ειδών, διαφορετικά γνωστή ως «επιδράσεις κοινότητας».
2. Μέτρηση της συγκέντρωσης των ρύπων σε δείκτη ή σε «χαρακτηριστικό» είδος.

3. Μέτρηση των επιδράσεων των ρύπων στους οργανισμούς και συσχέτιση με τις συγκεντρώσεις των ρύπων σε αυτούς τους οργανισμούς και άλλους βιοτικούς ή αβιοτικούς δείκτες.
4. Αποκάλυψη γενικά διαφορετικών φυλών των ειδών που έχουν αναπτύξει ανθεκτικότητα ως απάντηση στην πίεση επιλογής από τη ρύπανση (Walker et al. 1996).

1.2.2 Επιδράσεις χημικών ρύπων σε έμβιους οργανισμούς και οικοσυστήματα

Οι ζωντανοί οργανισμοί σε ένα οικοσύστημα μπορούν να εκδηλώσουν διαφορετικές ευαισθησίες στις τοξικές χημικές ουσίες λόγω των πολυσύνθετων αλληλεπιδράσεων μεταξύ έμβιων και αβιοτικών παραμέτρων του περιβάλλοντος.

Οι επιζήμιες επιπτώσεις των ρύπων στην οικολογική ακεραιότητα είναι πολύπλοκες, συχνά λεπτές, και μπορεί να γίνουν αντιληπτές μόνο όταν θα υπάρξουν ενδείξεις του κινδύνου. Ωστόσο, η αποτελεσματική αξιολόγηση του κινδύνου και της πρόβλεψης των μελλοντικών επιπτώσεων απαιτεί μια ικανότητα ερμηνείας και ενσωμάτωσης πολύπλοκων περιβαλλοντικών πληροφοριών που μέχρι σήμερα είναι σχεδόν ανύπαρκτη. Μια πρακτική λύση στο πρόβλημα αυτό βρίσκεται σε μια «συνολική» προσέγγιση για την ανάπτυξη συστημάτων έγκαιρης προειδοποίησης για την αξιολόγηση του κινδύνου της λειτουργίας και της υγείας των οικοσυστημάτων, τα οποία ενσωματώνουν αποτελεσματικά φυσικές, χημικές και βιολογικές διαδικασίες. Για να επιτευχθεί αυτό, χρειαζόμαστε μια ενοποιητική μέθοδο που αντλεί από τη χρήση των φυσικών και χημικών περιβαλλοντικών δεδομένων σε συνδυασμό με διαγνωστικούς και προγνωστικούς παράγοντες, για την ανίχνευση των «σημάτων κινδύνου» και την αξιολόγηση της «κατάστασης της υγείας». Τα υδάτινα και χερσαία οικοσυστήματα είναι ευαίσθητα στην έκθεση σε τοξικούς παράγοντες. Διάφοροι ρύποι, είτε μεμονωμένα είτε σε συνδυασμό, μπορεί να έχουν υπο-θανατηφόρο δράση σε κυτταρικό, οργανικό και ατομικό επίπεδο. Η πρόκληση είναι να ενσωματωθούν μεμονωμένες επιδράσεις σε μια σειρά από εργαλεία και δείκτες για την ανίχνευση και την παρακολούθηση της υποβάθμισης της υγείας ενός συγκεκριμένου οργανισμού (Moore and Allen, 2003).

Οι μελέτες με χημικούς ρύπους στο περιβάλλον έδειξαν ότι υπάρχουν όρια κάτω από τα οποία συμβαίνουν υπο-θανατηφόρες δράσεις ή άλλες επιδράσεις στους

οργανισμούς. Οι κρίσιμες συγκεντρώσεις για κάθε χημικό ρύπο διαφέρουν από είδος σε είδος οργανισμού και εξαρτώνται άμεσα από τις παραμέτρους του περιβάλλοντος και τον τρόπο έκθεσης.

Η τοξικολογική δράση των χημικών ρύπων μπορεί να μεταβληθεί σημαντικά όταν υπάρχει μίγμα χημικών ουσιών στο περιβάλλον, λόγω των προσθετικών, συνεργικών και ανταγωνιστικών δράσεων.

1.2.3 Εισαγωγή στις Έννοιες Τοξικολογίας και της Οικοτοξικολογίας

Η περιβαλλοντική ρύπανση και η έκθεση σε τοξικές και επικίνδυνες χημικές ουσίες, φυσικούς παράγοντες, (π.χ. ακτινοβολία) και παθογόνους οργανισμούς είναι γνωστό ότι μπορούν να προκαλέσουν φθορές, νοσηρότητα και θνησιμότητα στα βιολογικά συστήματα. Οι επιστημονικοί τομείς που αναπτύχθηκαν τις τελευταίες δεκαετίες για την έρευνα των ποικίλων τοξικών επιδράσεων, κυρίως χημικών ουσιών, καλύπτονται κάτω από τον όρο της επιστήμης της Τοξικολογίας, με ιδιαίτερη έμφαση στα τοξικολογικά προβλήματα του ανθρώπου.

Ο πατέρας της τοξικολογίας θεωρείται ο Παράκελσος (1493-1541) (Εικ. 1.2-1), στον οποίο οφείλεται η βασική αρχή της τοξικολογίας «όλες οι ουσίες είναι δηλητήρια και η δόση διαφοροποιεί την τοξική δράση». Θεωρητικά λοιπόν όλες οι ουσίες, φυσικές ή συνθετικές ή παραγόμενες από καύση ή άλλη φυσική ή τεχνολογική διεργασία, μπορούν να παρέμβουν στις φυσιολογικές διεργασίες μεταβολισμού ζωντανών οργανισμών και να προκαλέσουν βλάβες ή το θάνατο, ανάλογα με την έκθεση, τη χρονική διάρκεια και τον τρόπο εισόδου στον οργανισμό.



Εικ. 1.2-1: Παράκελσος 1493-1541 (Δ7)

Ο τρόπος έκθεσης ενός οργανισμού σε μία χημική ουσία και η συγκέντρωση ή η ποσότητα της ουσίας, αποτελούν τις δύο πιο χαρακτηριστικές παραμέτρους που πρέπει να λαμβάνονται υπόψη για τη διερεύνηση της τοξικολογικής της δράσης (Βαλαβανίδης, 1999).

Οι εφαρμογές των βασικών αρχών της Τοξικολογίας και των πειραματικών μεθοδολογιών που μελετούσαν τις επιβλαβείς επιδράσεις των χημικών ρύπων, αλλά με έμφαση την περιβαλλοντική ρύπανση δημιούργησαν τις επιστήμες της Περιβαλλοντικής Τοξικολογίας και Οικοτοξικολογίας (Βαλαβανίδης, 1999).

Η **Οικοτοξικολογία** εμφανίσθηκε το 1969 ως μία φυσική προέκταση της τοξικολογίας. Έχει ως αντικείμενο την μελέτη των ρύπων μέσα στα διάφορα οικοσυστήματα συμπεριλαμβανομένων και εκείνων όπου λείπει η ανθρώπινη παρουσία.

Οι στόχοι της οικοτοξικολογίας είναι:

- 1) η διευκρίνιση των ιδιοτήτων και κατανόηση των μηχανισμών της ρύπανσης των διαφόρων οικοσυστημάτων και της βιόσφαιρας από τις σημαντικότερες κατηγορίες τοξικών ρύπων.
- 2) η μελέτη της μεταφοράς τους, όπως και της βιομετατροπής τους, μέσα στα οικοσυστήματα.
- 3) η ανάλυση των συνεπειών τους στις βιοκοινωνίες και, επίσης, οι ανωμαλίες που προκαλούν στις βασικές οικολογικές διαδικασίες, και συγκεκριμένα σ' αυτές που εξασφαλίζουν την βιολογική παραγωγικότητα των οικοσυστημάτων και της βιόσφαιρας γενικότερα (Αράπης, 1998).

1.2.3.1 Εκτίμηση της τοξικότητας των ρύπων

Μεγάλη ώθηση στην ανάπτυξη των τοξικολογικών μελετών έδωσε η ραγδαία ανάπτυξη της γεωργίας, στα μέσα του περασμένου αιώνα και η αύξηση της χρήσης όλου και περισσότερο χημικών ΦΠ στις καλλιέργειες.

Η διαταραχή του περιβάλλοντος και η επιβάρυνσή του από ρυπογόνους παράγοντες καθιστά επιβεβλημένη την παρακολούθηση, καταγραφή και αξιολόγηση των:

- δυνητικά επιβλαβών στοιχείων ή ενώσεων στο περιβάλλον,

- εκπομπών των ρύπων στο περιβάλλον (αέρα, έδαφος, νερά), της διασποράς τους και των τελικών συγκεντρώσεων στους τόπους απόθεσης και στους διάφορους αποδέκτες,
- επιδράσεων της ποιότητας του περιβάλλοντος στα φυτά, τα ζώα, τον άνθρωπο, τα οικοσυστήματα για την εξακρίβωση πιθανής σχέσης αιτίας και αποτελέσματος, και
- άλλων οικολογικών αλλοιώσεων από διάφορες καταπονήσεις, όπως ο κατακερματισμός φυσικών οικοσυστημάτων λόγω της κατασκευής μεγάλης ή μικρότερης κλίμακας τεχνικών έργων (Ζιώγας και Μάρκογλου, 2007).

Δοκιμές τοξικότητας

Οι δοκιμές τοξικότητας στόχο έχουν την εκτίμηση του βαθμού ευαισθησίας (ή αντοχής) των διαφόρων ζωικών ή φυτικών ειδών στον έναν ή τον άλλο τοξικό ρύπο (Αράπης, 1998).

Ο καθορισμός του τοξικού δυναμικού ενός ρύπου γίνεται με την εκτίμηση διαφόρων παραμέτρων που χαρακτηρίζουν την δράση του ρύπου σε διάφορα επίπεδα οργάνωσης κυρίως όμως σε επίπεδο πληθυσμού. Ακόμα και η κυριότερη συνέπεια της τοξικότητας, η θνησιμότητα, εκτιμάται με ένα ποσοστό (ή συντελεστή θνησιμότητας) ο οποίος όμως δεν πρέπει να έχει χαρακτήρα ατομικό αλλά αντίθετα να εκφράζει κατά γενικό κανόνα τον πληθυσμό. Ο καθορισμός λοιπόν αυτός είναι ένα οικολογικό κριτήριο.

Οικοτοξικολογικοί παράμετροι

Διάφοροι οικοτοξικολογικοί παράμετροι που λαμβάνονται υπόψη είναι :

α) Όσον αφορά την οδό της έκθεσης των οργανισμών σε τοξικούς παράγοντες:

i) Πεπτική (από του στόματος), **ii)** Επιδερμική, **iii)** Αναπνευστική οδός.

β) Όσον αφορά τον χρόνο έκθεσης για την εκδήλωση της τοξικότητας:

- Οξύς (acute): Οι συνέπειες εκδηλώνονται μετά από άμεση έκθεση στον τοξικό παράγοντα.
- Υποξύς (short term): Οι συνέπειες εκδηλώνονται μετά από έκθεση μικρής διάρκειας.
- Χρόνιος (long term): Οι συνέπειες εκδηλώνονται μετά από χρόνια έκθεση.

γ) Όσον αφορά το εύρος των οργανισμών η επίδραση της τοξικότητας εξετάζεται σε:

i) χερσαίους, συμπεριλαμβανομένων και των οργανισμών εδάφους και **ii)** υδρόβιους οργανισμούς, και σε διάφορα επίπεδα οργάνωσης από το μοριακό μέχρι το οικοσύστημα.

Κατά την εκτέλεση του πειραματισμού πρέπει να ακολουθούνται, εφόσον υπάρχουν, κοινώς αποδεκτά πειραματικά πρωτόκολλα ώστε να πληρούνται οι εξής όροι:

- Ομοιογένεια μεταχειρίσεων και συνθηκών πειραματισμού.
- Χρήση τεχνικών που εξασφαλίζουν ίδιες συνθήκες καθ' όλη την διάρκεια του πειράματος.
- Χρήση των κατάλληλων στατιστικών μεθόδων για την ανάλυση και επεξεργασία των αποτελεσμάτων.

1.2.3.2 Τοξικότητα

Ως “τοξικότητα” (toxicity) ή τοξική επίδραση (harmful effect), όρος που προτιμάται στην οικοτοξικολογία, ορίζεται η ενδογενής ιδιότητα μιας χημικής ένωσης να προκαλεί βλάβες στον άνθρωπο καθώς και σε άλλους οργανισμούς μη στόχους, αλλά και στη λειτουργία των οικοσυστημάτων σε συγκεκριμένες συνθήκες (Ζιώγας και Μάρκογλου, 2007).

Ανάλογα με τη εργοστασιακή φάση ανάπτυξης της χημικής ένωσης διενεργείται ένα ευρύ φάσμα τοξικολογικών μελετών. Αυτές γίνονται για την απόκτηση πληροφοριών για τυχόν επιβλαβείς επιδράσεις σε οργανισμούς λόγω έκθεσης στην ουσία αυτή ή σε προϊόντα μεταβολισμού της.

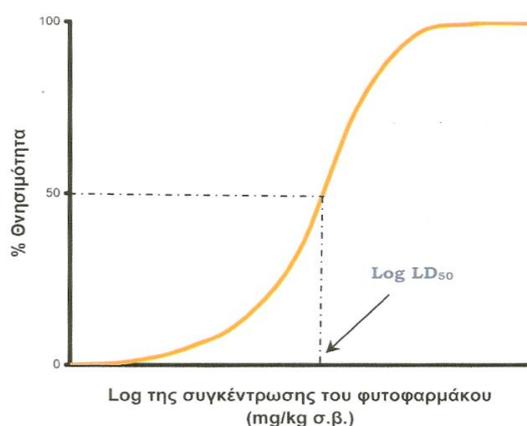
Για τον καθορισμό της τοξικότητας μετά από συγκεκριμένο χρόνο, είναι αναγκαίος ο καθορισμός της επίδρασης που παρατηρείται, στον παράγοντα τον οποίο θέλουμε να αξιολογήσουμε (π.χ. ένζυμο, ιστός, οργανισμός, τάξη, τροφικό επίπεδο), σε συνάρτηση με αυξανόμενες δόσεις ή συγκεντρώσεις τοξικής ουσίας και εκφράζεται με τα σύμβολα:

- Lethal Dose (LD_x),
- Lethal Concentration (LC_x),
- Effective Concentration (EC_x),

- Inhibited Concentration (IC_x),
- Effective Rate (ER_x),
- No/Lowest Observed Effect Concentration/Level (NOEC/L-LOEC/L),
- No Observed Adverse Effect Concentration/Level (NOAEC/L).

(π.χ. LD_{50} , LC_{50} , LD_{90} , EC_{50} , IC_{50} , ER_{50}). Για τον καθορισμό της τοξικότητας μετά από συγκεκριμένη δόση ή συγκέντρωση της τοξικής ουσίας, είναι αναγκαίος ο καθορισμός της επίδρασης που παρατηρείται σε συνάρτηση με το χρόνο και εκφράζεται με τα σύμβολα LT_x , (π.χ. LT_{50} , LT_{90}). Η παράμετρος x στα παραπάνω σύμβολα υποδηλώνει το % ποσοστό ($x=50$, 50%) των παραγόντων που θέλουμε να αξιολογήσουμε και που έχουν δεχθεί επίδραση από τον τοξικό παράγοντα, στο τέλος του πειραματισμού.

Το αποτέλεσμα λοιπόν του πειραματισμού με οργανισμούς περιβάλλοντος αποδίδονται με τις ανωτέρω εκφράσεις και αποτελούν τα τελικά δεδομένα που αξιολογούμε. Ειδικότερα όμως, για την εκτίμηση της επικινδυνότητας, ως μέτρο της οξείας και υποξείας τοξικότητας ορίστηκε η “μέση θανατηφόρος δόση/συγκέντρωση” (Lethal Dose/Concentration, LD_{50}/LC_{50}), η δόση/συγκέντρωση δηλαδή στην οποία θανατώνεται το 50% των οργανισμών που ήρθαν σε επαφή με τον τοξικό παράγοντα (Εικ. 1.2-2) Μέτρο της χρόνιας τοξικότητας ορίστηκε η “μεγαλύτερη δόση/συγκέντρωση” (NOEC/L, NOEAEC/L) της τοξικής ουσίας από αυτές που δοκιμάστηκαν, στην οποία δεν υπάρχει καμία επίδραση, από αυτές που καταγράφηκαν στον πειραματισμό, στον οργανισμό.



Εικ. 1.2-2: Γραφική παράσταση της συσχέτισης της θνησιμότητας των πειραματόζωων και της συγκέντρωσης του ΦΠ (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2007).

1.2.3.3. Οικολογικά επίπεδα πειραματισμού

Το βασικό ερώτημα που τίθεται είναι πως θα εκτιμηθούν οι βιολογικές επιδράσεις μετά την «έκθεση» οργανισμών σε ένα τοξικό παράγοντα σε επίπεδο οικοσυστήματος.

Το ευκολότερο θα ήταν να γίνει πειραματισμός κατευθείαν π.χ. σε ένα χερσαίο οικοσύστημα και μετά να καταμετρηθούν όλες οι επιπτώσεις σε όλους τους οργανισμούς που θα εκτεθούν σε αυτή την τοξική ουσία. Βασικά μειονεκτήματα όμως κάνουν αδύνατη την άμεση προσέγγιση στο ανώτερο δυνατό επίπεδο πειραματισμού κυρίως λόγω:

- έλλειψης επιστημονικής γνώσης για όλα τα οικοσυστήματα,
- μεγάλης παραλλακτικότητας μεταξύ οικοσυστημάτων, τύπου και χρόνου έκθεσης στον τοξικό παράγοντα,
- έλλειψης αξιόπιστων μεθόδων πειραματισμού για την εξασφάλιση συγκρίσιμων αποτελεσμάτων όσον αφορά την επίδραση του τοξικού παράγοντα στον/ους οργανισμούς. Και αυτό λόγω της μεγάλης αβεβαιότητας που υπάρχει μεταξύ των διαφόρων οικοσυστημάτων, χρονικών περιόδων, βιοτικών και αβιοτικών παραγόντων,
- μεγάλου οικονομικού κόστους για την μέτρηση όλων των επιδράσεων των οργανισμών περιβάλλοντος,
- ηθικών ζητημάτων για τον πειραματισμό σε άγριους πληθυσμούς (Αράπης, 1998).

Δεδομένου ότι αυτή η προσέγγιση θα πρέπει να είναι αντιπροσωπευτική για κάθε τύπο περιβάλλοντος σε οποιαδήποτε χρονική στιγμή, δεν είναι δυνατόν σε αυτό το επίπεδο να γίνει περιβαλλοντική πρόβλεψη. Ο σωστότερος όρος είναι περιβαλλοντική εκτίμηση στο χειρότερο δυνατό σενάριο έκθεσης στον τοξικό παράγοντα. Ως χειρότερο σενάριο μπορεί να θεωρηθεί ότι ο οργανισμός είναι στο πιο ευπαθές στάδιο, εκτίθεται αποκλειστικά στον τοξικό παράγοντα του οποίου η συγκέντρωση είναι η μεγαλύτερη δυνατή και δεν διασπάται.

Αν συμβαίνουν όλα τα παραπάνω, (η πιθανότητα να συμβεί στην πραγματικότητα είναι ελάχιστη), και παρ' όλα αυτά η επίδραση είναι χαμηλή τότε και σε κάθε περίπτωση εφαρμογής του τοξικού παράγοντα η επίδραση θα είναι επίσης χαμηλή.

Γι' αυτό, σε μια συνολική θεώρηση του προβλήματος, απαιτείται μια σταδιακή προσέγγιση.

Αρχικά μπορούμε να πειραματιστούμε σε κάποιο επίπεδο διαφορετικό από αυτό του οικοσυστήματος και να βρούμε μετά την οικολογική συσχέτιση, να γεφυρώσουμε τα αποτελέσματα και να συμπεράνουμε για το οικοσύστημα.

Η πιο προσφιλή προσέγγιση λοιπόν είναι να γίνει πειραματισμός σε διάφορα τροφικά επίπεδα από τα ανώτερα έμβια όντα, πτηνά και θηλαστικά μέχρι τους οργανισμούς ιζήματος στο υδάτινο περιβάλλον. Παράλληλα θα εκτιμηθούν και όλες οι σχέσεις που μπορεί να συνδέουν αυτά τα τροφικά επίπεδα σε σχέση με την έκθεσή τους σε αυτό τον τοξικό παράγοντα. Αν εξασφαλιστεί χαμηλή επικινδυνότητα για κάθε τροφικό επίπεδο τότε μπορούμε ασφαλώς να συμπεράνουμε ότι η τοξική ουσία που δοκιμάζουμε είναι «χαμηλού» κινδύνου. Σε αντίθετη περίπτωση χαρακτηρίζεται ως «υψηλού» κινδύνου.

1.2.3.4. Πειραματικά επίπεδα πειραματισμού

Παράλληλα με τον διαχωρισμό από οξεία έως και χρόνια τοξικότητα ο πειραματισμός με τους *βιοδείκτες* (bioindicators) μπορεί να γίνει και σε διάφορα επίπεδα πειραματισμού και συγκεκριμένα είναι δυνατόν να γίνει πειραματισμός με τον ίδιο βιοδείκτη στο εργαστήριο ή σε ανώτερο επίπεδο (π.χ. θερμοκήπιο, κλειστό χώρο-πειραματισμός ημι-αγρού) ή και σε κανονικές συνθήκες αγρού.

Είναι λογικό λοιπόν κατά την περιβαλλοντική εκτίμηση με την χρήση βιοδεικτών για την επίδραση στους άγριους πληθυσμούς, όσο «απομακρυσμένος» είναι ο πειραματισμός από τις πραγματικές συνθήκες τόσο η αβεβαιότητα της αξιοπιστίας και της εγκυρότητας μεταξύ των καταγεγραμμένων επιδράσεων και αυτών που αναμένεται να παρατηρηθούν σε πραγματικές συνθήκες, μεγαλώνει.

1.2.3.5 Ο ρόλος της χρήσης των βιοσημαντών και βιοδεικτών

Υπάρχουν πολλά δεδομένα που αφορούν τη συμπεριφορά και τις επιπτώσεις χημικών ουσιών σε φυσικές, χημικές και βιολογικές διεργασίες στα διάφορα οικοσυστήματα. Αυτό που λείπει σήμερα είναι ένα ολοκληρωμένο ολιστικό επεξηγηματικό πλαίσιο για την αξιολόγηση των πολύπλοκων περιβαλλοντικών πληροφοριών και την πρόβλεψη βλαβερών βιολογικών επιπτώσεων στο οικοσύστημα.

Ενώ αναγνωρίζεται η πραγματική ανησυχία που αφορά σαφώς τις αλλαγές που υπεισέρχονται σε επίπεδα βιολογικής οργάνωσης σε πληθυσμό/κοινότητα/οικοσύστημα, είναι γενικά πολύ περίπλοκες γεγονός που αναδεικνύει την χρησιμότητα της ανάπτυξης εργαλείων για τον έγκαιρο εντοπισμό και την πρόβλεψη των συνεπειών των περιβαλλοντικών πιέσεων (Depledge et al. 1993).

Σήματα κινδύνου σε μοριακό, κυτταρικό και φυσιολογικό επίπεδο οργάνωσης θα πρέπει να είναι σε θέση να παρέχουν «έγκαιρη προειδοποίηση» με προγνωστικούς βιοσημαντές (μοριακών, κυτταρικών, φυσιολογίας και συμπεριφοράς) της επικείμενης παθολογίας και βλάβης στην υγεία των οργανισμών (Hinton and Lauren, 1990; McCarthy and Shugart, 1990; Depledge et al. 1993; Livingstone et al. 2000; Galloway et al. 2002).

Η διάγνωση των «σημάτων κινδύνου» θα προκύψει μόνο από την κατανόηση της μηχανιστικής βάσης των κυτταρικών, της φυσιολογίας και συμπεριφοράς των διαδικασιών που επηρεάζουν την αφομοίωση, βιομετατροπή, μοριακή βλάβη και ζημιά των κυττάρων και οδηγούν σε δυσλειτουργία των συστημάτων προστασίας και της εκδήλωσης συμπεριφοράς αποφυγής και, τελικά, σε εκφυλιστικές αλλαγές και μειωμένη επιβίωση και αναπαραγωγή (Hinton and Lauren, 1990; Moore, 1990; Depledge et al. 1993; Moore et al. 1994; Galloway et al. 2002). Για να είναι λοιπόν πλήρως λειτουργική αυτή η θεώρηση απαιτείται μια ολοκληρωμένη και πολυεπίπεδη προσέγγιση. Τα εργαλεία για την εφαρμογή της είναι πλέον όλο και περισσότερο διαθέσιμα.

Υπάρχουν πολλοί διαφορετικοί βιολογικοί δείκτες που εμφανίζονται σε πολλά διαφορετικά επίπεδα οργάνωσης, από το υποκυτταρικό επίπεδο μέχρι το επίπεδο ενός ολόκληρου οργανισμού. Στο πλαίσιο αυτό, γίνεται διάκριση μεταξύ των επιδράσεων των «βιοσημαντών» (δηλαδή μοριακών, βιοχημικών και φυσιολογικών αλλαγών) από «βιοδεικτών», η οποία διεξάγεται σε επίπεδο ατόμου, πληθυσμού και κοινότητας.

Σε γενικές γραμμές όμως, τα δεδομένα που συλλέγονται σε χαμηλότερα επίπεδα βιολογικής οργάνωσης (π.χ. μοριακές και βιοχημικές αντιδράσεις) είναι πιο συγκεκριμένα, ευαίσθητα, αντιδρούν άμεσα, αναπαραγώγιμα και πιο εύκολο να προσδιοριστούν, αλλά πιο δύσκολο να σχετιστούν με οικολογικές μεταβολές. Από την άλλη πλευρά, τα δεδομένα που συλλέγονται σε υψηλότερα επίπεδα βιολογικής οργάνωσης (π.χ. αντιδράσεις πληθυσμού ή κοινότητας) είναι άμεσα ενδεικτικά της υγείας των οικοσυστημάτων και ως εκ τούτου έχουν πολύ μεγαλύτερη σημασία για την περιβαλλοντική διαχείριση και οι αντιδράσεις τείνουν να είναι λιγότερο αναστρέψιμες και πιο επιζήμιες. Ωστόσο, είναι πιο δύσκολο να προσδιοριστούν, καθώς είναι λιγότερο συγκεκριμένα και είναι δηλωτικά μόνο σε προχωρημένο στάδιο όταν οι περιβαλλοντικές ζημιές έχουν ήδη συμβεί (Connell et al. 1999).

Για την ανίχνευση λοιπόν των «σημάτων κινδύνου» και την αξιολόγηση της «κατάστασης της υγείας» του περιβάλλοντος προτείνεται η συλλογή περιβαλλοντικών δεδομένων σε συνδυασμό με διαγνωστικούς και προγνωστικούς βιοδείκτες και βιοσημαντές. Οι βιοδείκτες και βιοσημαντές, ως ένας κλάδος της βιολογίας συστημάτων, είναι ειδικοί στην ερμηνεία των αντιδράσεων των οργανισμών τόσο σε φυσική όσο και σε ανθρωπογενή πίεση.

1.2.3.6 Διασπορά και διάχυση ρύπων στο περιβάλλον

Οι χημικές ουσίες όταν απελευθερωθούν στο φυσικό περιβάλλον υπόκεινται σε διασπορά στην ατμόσφαιρα, τα υδάτινα συστήματα, το έδαφος ή το ίζημα ανάλογα και με τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες. Οι χημικοί ρύποι μέσω διασκορπισμού, διάχυσης, διείσδυσης και βιοσυσσώρευσης σε ζωντανούς οργανισμούς δημιουργούν προβλήματα περιβαλλοντικής τοξικολογίας που απαιτούν συστηματική ανάλυση. Συγχρόνως υπάρχουν διάφορες διεργασίες όπως η βιοαποικοδόμηση, ιζηματοποίηση, οξειδωτική, αερόβια ή αναερόβια διάσπαση ή εξαέρωση που κάνουν πιο σύνθετη την εικόνα της οικοτοξικολογικής τους δράσης. Εάν ληφθούν υπόψη και οι τοξικολογικές επιπτώσεις σε υποοργανικό επίπεδο, επίπεδο οργανισμού, κοινοτήτων και οικοσυστημάτων, τότε κατανοούμε την πολυπλοκότητα των οικοτοξικολογικών ερευνών (De Henau, 1998).

Η διασπορά των χημικών ρύπων στο φυσικό περιβάλλον είναι μία φάση για την οποία υπάρχουν μεθοδολογικές προσεγγίσεις, τόσο για τους υπολογισμούς των συγκεντρώσεων πέρα από την πηγή ρύπανσης, όσο και τη μεταφορά τους σε μεγάλες αποστάσεις. Οι δύο διαδικασίες στις οποίες ενδιαφέρεται η οικοτοξικολογική έρευνα

είναι η βιοσυσσωρευση μέσω της τροφικής αλυσίδας ή στους διάφορους ιστούς και όργανα των οργανισμών, καθώς και η βιοαποικοδόμηση ή διάσπαση με την επίδραση του φυσικού περιβάλλοντος (McKay, 1998; Van Straalen, 2003).

Παράλληλα λοιπόν με την εύρεση της τοξικότητας της ουσίας σε διάφορους βιοδείκτες θα πρέπει να αξιολογηθεί και η δυνατότητα της να φθάνει στο χόμα, στα υπόγεια και επιφανειακά νερά αλλά και στον αέρα υπό τους προτεινόμενους όρους χρησιμοποίησης της. Ο τρόπος, η ποσότητα με την οποία θα κατανεμηθεί η ουσία στον χώρο και στον χρόνο θα καθορίσει και τον βαθμό έκθεσης οργανισμών περιβάλλοντος που διαβιούν στα χερσαία ή στα υδάτινα οικοσυστήματα. Με αυτόν τον τρόπο θα υπολογιστεί, με διάφορα μοντέλα, το ποσοστό και η διαδρομή της υποβάθμισης και της κινητικότητας της καθώς και η αλλαγή στη συνολική συγκέντρωση (βιοδιαθέσιμη και μη) της ενεργού ουσίας και των σχετικών μεταβολιτών. Έτσι μπορούμε να υπολογίσουμε την τύχη και συμπεριφορά της τοξικής ουσίας στον χώρο και στον χρόνο (Προβλεπόμενη περιβαλλοντική συγκέντρωση, Predicted Environmental Concentration, PEC).

Παράλληλα, εφόσον είναι εφικτό, υπολογίζεται και η οδός της έκθεσης των χημικών ουσιών στους οργανισμούς η οποία είναι: **i)** πεπτική (από το στόμα), **ii)** επιδερμική, **iii)** αναπνευστική οδός καθώς και η πιθανή ικανότητα ή όχι της ουσίας να βιοσυγκεντρώνεται και συνεπώς να βιομεγεθύνεται στην τροφική αλυσίδα.

1.2.3.6.1 Τρόποι έκθεσης από τη χρήση ΦΠ στα πτηνά

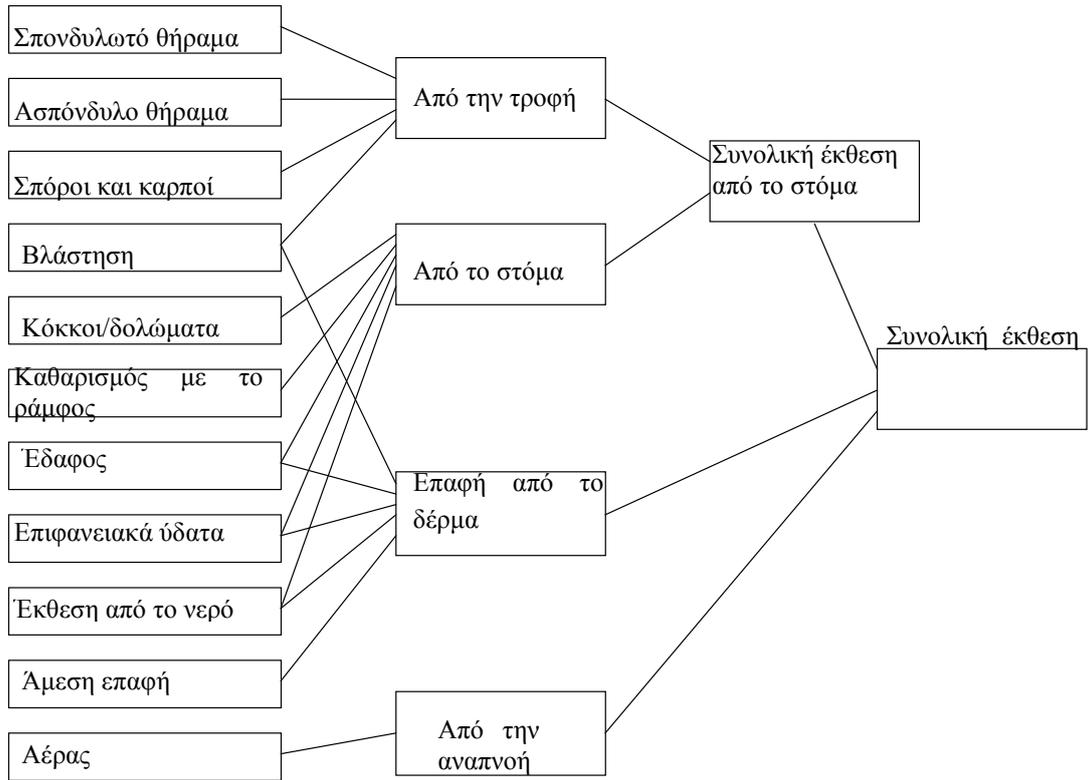
Η επίπτωση των ΦΠ στην άγρια ζωή και ειδικότερα στα πτηνά είναι ένα θέμα που μελετάται όλο και περισσότερο. Η κυριότερη οδός έκθεσης των πτηνών που μελετάται εκτενώς είναι η απευθείας έκθεση από το **στόμα** μέσω της πρόσληψης ρυπασμένης τροφής ή νερού.

Πολλά εντομοκτόνα και ιδιαίτερα τα OPs, απορροφούνται και από το **δέρμα**. Μάλιστα το δέρμα των πτηνών, που είναι πολύ πιο λεπτό από το δέρμα των θηλαστικών, είναι και πιο ευαίσθητο και επιδεκτικό στη ρύπανση από αυτά τα ΦΠ. Αναφέρεται ότι η απορρόφηση του parathion σε περιοχές λεπτού δέρματος των πτηνών είναι 12 φορές μεγαλύτερη σε σχέση με την απορρόφηση από το ανθρώπινο δέρμα. Κάποια OPs εντομοκτόνα ήταν πολύ πιο τοξικά όταν απορροφήθηκαν από τα πόδια του πτηνού παρά από το στόμα. Μάλιστα φάνηκε ότι οι θανατηφόρες δόσεις (lethal dose) για κάποια είδη πτηνών του δάσους απορροφήθηκαν όταν τα πτηνά κούρνιασαν σε

βλάστηση ρυπασμένη με OPs (Driver et al. 1990).

Η **εισπνοή** είναι ένας ακόμα πιθανός τρόπος έκθεσης στα OPs εντομοκτόνα αν και δεν είναι τόσο σημαντική όσο οι άλλες. Όμως τα OPs εντομοκτόνα, όπως το methyl parathion, υφίστανται φωτοχημικές αντιδράσεις στον αέρα μετά από εφαρμογή στον αγρό και δίνουν παραπροϊόντα τα οποία είναι πιο τοξικά από την αρχική ουσία. Για την κατανόηση του κινδύνου από αυτά τα ΦΠ χρειάζεται περισσότερη έρευνα.

Η έκθεση των πτηνών στα εντομοκτόνα μέσω του καθαρισμού των φτερών με το ράμφος τους είναι μια ακόμη πολύ σημαντική οδός. Μπορεί να αποτελέσει μια σημαντική πηγή ρύπανσης που εκθέτει το πτηνό σε μεγάλες και επαναλαμβανόμενες δόσεις ΦΠ που βρίσκεται στα φτερά του μέσω της επαφής του με ρυπασμένη βλάστηση ή μολυσμένο έδαφος. Επιπλέον η επίδραση των υπολειμμάτων του φαρμάκου μπορούν να ενισχυθούν από την διαλυτότητα τους στο λίπος που προέρχεται από τους αδένες του δέρματος. Στην Εικόνα 1.2-3 φαίνονται όλοι οι πιθανοί τρόποι έκθεσης για ένα πτηνό στα ΦΠ. Παρατηρείται ότι το πτηνό θα εκτεθεί μέσω της τροφής του (σπονδυλωτά, ασπόνδυλα, σπόροι και φρούτα, βλάστηση), του δέρματος του (έδαφος, επιφανειακό νερό, νερό στον αγρό, άμεση επαφή), της αναπνοής του (ρυπασμένος αέρας) καθώς και μέσω άλλων οδών όπου το πτηνό θα πάρει το φάρμακο από το στόμα χωρίς όμως την στιγμή εκείνη να τρέφεται (καθαρισμός φτερώματος, έδαφος, επιφανειακό νερό, νερό στον αγρό κ.α).



Εικ. 1.2-3: Πιθανοί τρόποι έκθεσης για ένα πτηνό στα ΦΠ (SANCO, 2002).

1.2.3.7 Έμμεσες επιπτώσεις στα πτηνά από τη χρήση ΦΠ στα πτηνά

Τα ΦΠ έχουν την ικανότητα να προκαλούν μειώσεις στους πληθυσμούς των πτηνών των αγροτικών οικοσυστημάτων επιδρώντας αρνητικά πάνω στα **αποθέματα τροφής τους**. Αυτό συμβαίνει γιατί οι οργανισμοί που αποτελούν την τροφή των πτηνών είναι είτε ασπόνδυλα είδη, είτε σπόροι φυτών που αποτελούν τους άμεσους στόχους των ΦΠ είτε γιατί οι οργανισμοί μη-στόχοι που είναι επίσης μια πηγή τροφής για τα πτηνά, μειώνονται μετά από τις εφαρμογές των εντομοκτόνων. Καθώς αυτές οι διαδικασίες δεν περιλαμβάνουν την άμεση δηλητηρίαση των πτηνών από την τοξικότητα των δραστικών ουσιών ή των μεταβολιτών τους έχουν ονομαστεί **έμμεσες επιπτώσεις** (indirect effects) (Newton, 1995; Burn, 2000).

Φαίνεται ότι υπάρχουν **τρεις πιθανές οδοί εμφάνισης έμμεσων επιπτώσεων** στα πτηνά από τη χρήση ΦΠ (κυρίως εντομοκτόνων και ζιζανιοκτόνων):

- (i) Τα εντομοκτόνα μπορούν να μειώσουν ή και να εξαλείψουν τους πληθυσμούς των αρθρόποδων που αποτελούν αποθέματα τροφής για τα πτηνά. Τα αρθρόποδα αυτά χρησιμοποιούνται από τα ίδια τα ενήλικα άτομα, αλλά και στο τάισμα των νεοσσών κατά τη διάρκεια της αναπαραγωγικής περιόδου. Έτσι η έλλειψή τους μπορεί να μειώσει τη γονιμότητα και την παραγωγή νέων απογόνων (Έμμεση επίδραση τύπου **I**, Type **I** effect).
- (ii) Τα ζιζανιοκτόνα μπορούν να μειώσουν ή και να εξαλείψουν τα αυτοφυή φυτά που είναι ξενιστές για τα αρθρόποδα, την κύρια τροφή των πτηνών κατά την αναπαραγωγική περίοδο και έτσι να μειώνεται και πάλι η γονιμότητα των πτηνών (Έμμεση επίδραση τύπου **II**, Type **II** effect).
- (iii) Τα ζιζανιοκτόνα μπορούν επίσης να μειώσουν ή να εξαφανίσουν είδη φυτών που αποτελούν, μέσω του φυλλώματός τους και των σπόρων τους, πολύτιμη πηγή τροφής για τα φυτοφάγα και τα σποροφάγα είδη αντίστοιχα. Έτσι μειώνουν τους πληθυσμούς των πτηνών που βασίζονται σε αυτές τις πηγές τροφής (Έμμεση επίδραση τύπου **III**, Type **III** effect).

Αυτές οι έμμεσες επιδράσεις μπορεί να δρουν και προσθετικά επειδή κάποια είδη πτηνών μπορεί να υπόκεινται σε περισσότερους από ένα τύπο έμμεσων επιπτώσεων, δηλαδή να τρέφονται σε ένα στάδιο του βιολογικού τους κύκλου με έντομα και σε ένα άλλο στάδιο με φυτά και σπόρους. Ένα παράδειγμα είναι οι σπερμοφάγοι σπουργίτες οι οποίοι βασίζονται στα αρθρόποδα το καλοκαίρι για να θρέψουν τα μικρά τους.

Το μόνο είδος για το οποίο έχει γίνει σχετική μελέτη των επιπτώσεων αυτών είναι η καμπίσια πέρδικα (*Perdix perdix*) ένα είδος που είναι σε σοβαρή μείωση στη Βρετανία (Moreby and Potts, 1985). Η θνησιμότητα των νεοσσών της καμπίσιας πέρδικας φάνηκε πως ήταν μεγαλύτερη τις πρώτες δέκα ημέρες της ζωής τους όταν η διατροφή τους βασιζόταν στην κατανάλωση συγκεκριμένων ειδών αρθροπόδων. Παράλληλα, παρατηρήθηκε, η δυνατότητα του εντομοκτόνου demeton-s-methyl να μειώνει τους πληθυσμούς των αρθροπόδων που λαμβάνονται ως τροφή από τα μικρά της πέρδικας και η αρνητική επίδραση στην επιβίωση των νεοσσών (έμμεση επίδραση τύπου I) (Moreby and Potts, 1985).

Τα συμπεράσματα από τη μελέτη με τη καμπίσια πέρδικα συνδυαζόμενα με τη παρατήρηση της μείωσης μεγάλων πληθυσμών πτηνών αγροτικών οικοσυστημάτων στη Βρετανία (Fuller et al. 1995) ώθησε την JNCC (Joint Nature Conservation Committee) να συντάξει μια αναφορά για την ύπαρξη των έμμεσων επιπτώσεων από τα εντομοκτόνα στους πληθυσμούς όλων των ειδών πτηνών των αγροτικών οικοσυστημάτων (Campbell et al. 1997). Η αναφορά έδειξε μείωση στους πληθυσμούς 22 ειδών πτηνών του αγρού και στη διαθεσιμότητα της τροφής τους. Κάποιες από αυτές τις μειώσεις συνδέονταν με τη χρήση των ΦΠ. Επίσης έδειξε περιοδικούς συσχετισμούς μεταξύ της αύξησης στην εφαρμογή των ΦΠ και των περιόδων που παρατηρήθηκε έντονη μείωση πολλών ειδών πτηνών. Προτάθηκε ότι η μείωση τουλάχιστον 11 ειδών πτηνών του αγρού σύμφωνα και με τα συμπεράσματα για την καμπίσια πέρδικα, οφείλεται τουλάχιστον κατά ένα μέρος, στις έμμεσες επιδράσεις από τα ΦΠ.

1.3 Βιοδείκτες

Η βιοκαταγραφή ως μέθοδος παρακολούθησης και μελέτης των ποικίλων διαταραχών και αλλοιώσεων στο περιβάλλον από τις δραστηριότητες κυρίως του ανθρώπου, παρουσιάζει μεγάλη ανάπτυξη τις τελευταίες δεκαετίες. Οι βιοδείκτες είναι τα μέσα για την καταγραφή των αλλαγών του περιβάλλοντος σε διάφορα επίπεδα βιολογικής οργάνωσης και την εκτίμηση της ρύπανσης του περιβάλλοντος με τον καθορισμό τιμών επιλεγμένων βιολογικών παραμέτρων που είναι γνωστό ότι ποικίλλουν ανάλογα με τις τοξικές επιδράσεις των ρύπων.

Οι δείκτες αυτοί βασίστηκαν στην αφθονία, παρουσία ή απουσία διαφόρων ειδών, δηλαδή στη συχνότητα κατανομής ειδών σε μια κοινότητα.

Η έννοια του βιοδείκτη έχει τις ρίζες της σε πολύ παλαιότερες περιόδους, μαρτυρία για αυτό είναι το ακόλουθο απόσπασμα: «κάθε φυτό είναι το μέσο μέτρησης των συνθηκών κάτω από τις οποίες αυτό αναπτύσσεται. Έτσι είναι ένας δείκτης του εδάφους και του κλίματος και κατ' επέκταση ένας δείκτης της συμπεριφοράς των άλλων φυτών και ζώων στην ίδια περιοχή» (Καρανδεινού, 2000).

Στο περιβάλλον στο οποίο ζούμε και που πολλές φορές είναι διαταραγμένο, είναι επιβεβλημένη η παρακολούθηση, καταγραφή και αξιολόγηση των ακόλουθων:

- των δυνητικά επιβλαβών στοιχείων ή ενώσεων στο περιβάλλον,
- των εκπομπών των ρύπων στο περιβάλλον (αέρα, έδαφος, νερά), της διασποράς τους και των τελικών συγκεντρώσεων στους τόπους απόθεσης και στους διάφορους αποδέκτες,
- των επιδράσεων της ποιότητας του περιβάλλοντος στα φυτά, τα ζώα, τον άνθρωπο, τα οικοσυστήματα για την εξακρίβωση πιθανής σχέσης αιτίας και αποτελέσματος,
- και η καταγραφή και αξιολόγηση και άλλων οικολογικών αλλοιώσεων από διάφορες καταπονήσεις, όπως ο κατακερματισμός φυσικών οικοσυστημάτων λόγω της κατασκευής μεγάλης ή μικρότερης κλίμακας τεχνικών έργων, που βέβαια είναι απαραίτητη.

Καταγράφοντας την αλλαγή στις κατανομές στην φύση είναι δυνατόν να απεικονίσουμε τις περιβαλλοντικές αλλαγές. Βέβαια όλες οι αλλαγές στην κατανομή των φυτών ή των ζώων δεν οφείλονται στις επιδράσεις θανατηφόρων τιμών

περιβαλλοντικών παραμέτρων. Μερικές οφείλονται στις επιδράσεις μη θανατηφόρων τιμών και άλλες προέρχονται από τις οικολογικές μεταβολές που συμβαίνουν σε μια κοινωνία ή και μεταξύ κοινωνιών. Για αυτό στα προγράμματα βιοκαταγραφής μεγάλης κλίμακας με την χρήση ανώτερων φυτών και ζώων όπως και με τη χρήση των κοινωνιών τους και ευαίσθητων οικοσυστημάτων, απαιτείται πολύ καλή γνώση της οικολογικής συμπεριφοράς και των απαιτήσεων των βιοδεικτών.

Η παρακολούθηση και καταγραφή της ρύπανσης του περιβάλλοντος επιτυγχάνεται με τους εξής τρόπους:

- Τη λήψη άμεσων μετρήσεων και ποσοτικών πληροφοριών για τη ρύπανση του περιβάλλοντος με καταγραφικά όργανα και φυσικοχημικές μεθόδους.
- Την λήψη ποιοτικών και ποσοτικών πληροφοριών με τη χρήση βιοδεικτών.

Ορισμένα είδη οργανισμών σε ένα οικοσύστημα διατηρούν κεντρικό ρόλο για την κατάσταση που επικρατεί και τις ισορροπίες με το αβιοτικό περιβάλλον. Η παρακολούθηση των συγκεκριμένων ειδών αυτών μπορεί να ληφθεί ως αντιπροσωπευτική και για το σύνολο των ειδών και με βάση αυτά μπορεί να προσδιορισθεί ο βαθμός ρύπανσης του φυσικού περιβάλλοντος. Τα μέσα για την καταγραφή των αλλαγών του περιβάλλοντος σε διάφορα επίπεδα βιολογικής οργάνωσης είναι οι βιοδείκτες.

Οι βιοδείκτες χρησιμοποιούνται σε μελέτες ώστε να:

- α) Παρέχουν στους ερευνητές ποιοτικές και ποσοτικές πληροφορίες για τα δυνητικά και επιβλαβή στοιχεία ή ενώσεις στο περιβάλλον.
- β) Βοηθούν στην αξιολόγηση των αθροιστικών επιπτώσεων των ρύπων στους οργανισμούς και στα οικοσυστήματα.
- γ) Συμβάλλουν στην άμεση ή έμμεση αξιολόγηση των βιολογικών επιπτώσεων των ρύπων (επιδράσεις στη δομή και λειτουργία των οργανισμών, συμπεριλαμβανομένης της συμπεριφοράς).
- δ) Βοηθούν στην αξιολόγηση των επιπτώσεων της ρύπανσης σε δεδομένη περιοχή ή οικοσύστημα σε σχέση με τις λοιπές συνθήκες του συγκεκριμένου περιβάλλοντος.
- ε) Παρέχουν τη δυνατότητα εκτίμησης απόλυτων τιμών συγκεντρώσεων των ρύπων μετά από βαθμονόμηση του βιοδείκτη με την παράλληλη χρήση καταγραφικού οργάνου ή άλλων αναλυτικών μεθόδων (Καρανδεινού, 2000).

Οι βιοδείκτες διακρίνονται στους λεγόμενους Θετικούς Βιοδείκτες και Αρνητικούς Βιοδείκτες:

Ως **θετικοί** βιοδείκτες χαρακτηρίζονται εκείνοι οι οργανισμοί που παρέχουν την πληροφορία για την αλλοίωση ή την αποκατάσταση του περιβάλλοντος με την παρουσία τους, την κατανομή τους, την αφθονία τους ή την επανεμφάνισή τους, π.χ. η έντονη ανάπτυξη ορισμένων ειδών κυανοφυκών μας πληροφορεί για το επίπεδο ευτροφισμού των λιμνών.

Ως **αρνητικοί** βιοδείκτες χαρακτηρίζονται εκείνοι οι οργανισμοί που μας πληροφορούν για διάφορους περιβαλλοντικούς παράγοντες με την απουσία τους σε ένα συγκεκριμένο περιβάλλον ή οικοσύστημα ή με την εξάλειψη τους από αυτό, π.χ. η εξάλειψη ειδών λειχήνων σε ένα ημιφυσικό ή αστικό οικοσύστημα όπου υπάρχουν υψηλές συγκεντρώσεις SO₂ (Καρανδεινού, 2000).

Επίσης οι βιοδείκτες διακρίνονται και ανάλογα με τον τρόπο χρήσης τους σε δύο κατηγορίες:

Τους **Φυσικούς ή Παθητικούς** βιοδείκτες όταν η ανίχνευση και η καταγραφή γίνεται στο φυσικό τους περιβάλλον και αυτό μας επιτρέπει την παρακολούθηση της ποιότητας του περιβάλλοντος για μεγάλες χρονικές περιόδους.

Τους **Ενεργούς ή Πειραματικούς** βιοδείκτες όταν τους εγκαθιστούμε σε δίκτυο σταθμών βιοκαταγραφής ή τους μετεγκαθιστούμε από το φυσικό τους περιβάλλον σε ένα δίκτυο σταθμών σε ένα διαταραγμένο περιβάλλον. Η βιοκαταγραφή στην περίπτωση αυτή διαρκεί μικρές χρονικές περιόδους (4-12 μήνες) ανάλογα με το είδος του βιοδείκτη και τον τύπο της πληροφορίας που πρόκειται να αποκομίσουμε από την χρήση του (Καρανδεινού, 2000; Ζιώγας και Μάρκογλου, 2007).

Επίσης ως βιοδείκτες θεωρούνται και αυτοί που χρησιμοποιούνται σε τυποποιημένες εργαστηριακές διαδικασίες, όπως σε εργαστηριακές οικοτοξικολογικές έρευνες.

Συγκεκριμένα για την βιολογική παρακολούθηση και τη μέτρηση της συγκέντρωσης των ρύπων με κάποιο βιοδείκτη, σύμφωνα με τους Walker et al. (1996) και Kyritsis and Hadjibiros (2002) ακολουθούνται τα ακόλουθα κριτήρια για την

επιλογή τους:

1. Να μπορούν να έχουν έκθεση στους ρυπαντές.
2. Να είναι ευαίσθητα στη συγκεκριμένη έκθεση.
3. Είδη για τα οποία μία επίδραση θα προκαλέσει σημαντική ζημιά.
4. Να αντιπροσωπεύουν τυπικά χαρακτηριστικά ενός μεγάλου αριθμού άλλων ειδών στην κοινότητα.
5. Να έχουν οικολογική σημασία.
6. Να είναι σε αφθονία ώστε να επιτρέπονται μεγάλα μεγέθη δειγμάτων για τη συλλογή στοιχείων.
7. Η οικολογία τους και η συμπεριφορά τους να παρέχει εύκολο προσδιορισμό των επιδράσεων.
8. Να ανταποκρίνονται στις αλλαγές του βαθμού ρύπανσης.
9. Να υπάρχει παγκόσμια εμπειρία και συσσωρευμένη επιστημονική γνώση.
10. Η οικονομικότητά τους να μπορεί να οδηγήσει σε αποτελεσματικότητα των πειραματισμών.
11. Να μπορούν να ξεπεραστούν τεχνικές δυσκολίες πειραματισμού.
12. Να υπάρχει δυνατότητα αναπαραγωγής δεδομένων.

1.3.1 Περιβαλλοντικοί δείκτες

1.3.1.1 Η σημασία και οι ιδιότητες των δεικτών

Από τη διάσκεψη του Ρίο ντε Τζανέιρο, το 1992, γεννήθηκε η ανάγκη να δημιουργηθούν βιοδείκτες που να επιτρέπουν μια ποσοτική και ποιοτική περιβαλλοντική εκτίμηση. Οι δείκτες της βιοποικιλότητας είναι μια ομάδα ειδών όπου οι τάσεις των πληθυσμών τους, όταν εξετάζονται συνολικά, αντικατοπτρίζουν η μέση συμπεριφορά των συνιστούντων ειδών, αλλά επίσης αποκαλύπτουν τις τάσεις και άλλων κατηγοριών ειδών και έτσι δρουν σαν αντιπρόσωποι της υγείας ολόκληρου του οικοσυστήματος. Οι δείκτες προορίζονται να ποσοτικοποιήσουν και να συνδέσουν σύνθετα φαινόμενα κατά τρόπο απλό. Σκοπός τους είναι να βοηθήσουν τους ιθύνοντες στα κέντρα λήψεως αποφάσεων να διατυπώσουν σωστή πολιτική και έπειτα να την αναθεωρούν και να την εξελίσσουν ανάλογα με τις αλλαγές στο δείκτη. Οι Gregory et al. (2005) υποστήριξαν ότι οι δείκτες μπορούν να θεωρηθούν σαν γέφυρα μεταξύ της

επιστήμης και της πολιτικής.

1.3.1.2 Τα πτηνά ως βιοδείκτες της κατάστασης του περιβάλλοντος

Οι κοινωνίες των πτηνών θεωρούνται οι πιο σημαντικοί και αξιόπιστοι βιοδείκτες βιοποικιλότητας. Οι μειώσεις στους πληθυσμούς πολλών ειδών πτηνών αντικατοπτρίζουν την καταστροφή, υποβάθμιση ή και την αλλαγή της κατάστασης των βιοτόπων τους και δηλώνουν το κατά πόσο ο χώρος όπου ζουν μπορεί να λειτουργήσει οικολογικά και να στηρίζει την επιβίωση τους.

Γιατί τα πτηνά είναι καλοί βιοδείκτες:

Τα πτηνά έχουν χρησιμοποιηθεί ως βιοδείκτες για πολλούς λόγους συμπεριλαμβανομένων των παρακάτω:

- Η οικολογία τους είναι επαρκώς κατανοητή.
- Καλύπτουν διαφορετικά επίπεδα της οικολογικής πυραμίδας σε κάθε περιβάλλον.
- Εντοπίζονται εύκολα, γεγονός που επιτρέπει ταχεία συλλογή δεδομένων, όχι μόνο για τη παρουσία ή απουσία τους αλλά και για το μέγεθος των πληθυσμών τους.
- Βρίσκονται ψηλά στην τροφική αλυσίδα και μπορούν έτσι να είναι ιδιαίτερα κατάλληλα ως όργανα ελέγχου οποιουδήποτε σήματος που συσσωρεύεται κατά μήκος όλης της τροφικής αλυσίδας.
- Καταλαμβάνουν έναν μεγάλο αριθμό οικοσυστημάτων, έχουν πολυποίκιλους βιολογικούς κύκλους και είναι ευρέως διαδεδομένα σε όλες τις χώρες και περιοχές του πλανήτη.
- Ο αριθμός των ειδών είναι σχετικά διαχειρίσιμος (περίπου 10.000 είδη παγκοσμίως) γι' αυτό και επιτρέπει την εις βάθος ανάλυση.
- Είναι ευαίσθητα σε πολλά είδη περιβαλλοντικής διαταραχής και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να μετρηθούν πιθανές βλαβερές αλλαγές στο περιβάλλον.
- Υπάρχουν καλά ιστορικά και σύγχρονα στοιχεία όσον αφορά τις αλλαγές των πληθυσμών πτηνών.
- Έχουν ιδιαίτερη απήχηση και συμβολική αξία σε πολλά ακροατήρια, από τους απλούς πολίτες έως τα κέντρα λήψεως αποφάσεων (Gregory et al. 2005).

Τα πτηνά έχουν αποδείξει την χρησιμότητα τους ως περιβαλλοντικοί δείκτες (Bock and Jones, 2004). Τα πτηνά χρησιμοποιούνται πλέον ως δείκτες για την παρακολούθηση της ποιότητας του περιβάλλοντος όπως ο δείκτης βιοποικιλότητας των άγριων πτηνών της Ευρώπης (Πανευρωπαϊκό Σχέδιο Παρακολούθησης των Κοινών Ειδών Πτηνών, Pan-European Common Bird Monitoring Scheme), ο δείκτης των πτηνών του αγρού (Farmland Bird Indicator, FBI) οι οποίοι παρακολουθούνται στην Ευρώπη από διάφορα Κράτη Μέλη, μεταξύ των οποίων και η Ελλάδα. Η Βορειοαμερικανική Ένωση για να αναπαραγόμενα είδη πτηνών (Bird Breeding Survey, BBS) λειτουργεί περίπου 40 χρόνια και καταγράφει τις πληθυσμιακές τάσεις σχεδόν 400 ειδών πτηνών της ηπείρου αυτής.

Διάφορα είδη πτηνών έχει αποδειχτεί ότι αποτελούν πολύ σημαντικούς βιοδείκτες της ρύπανσης χερσαίων οικοσυστημάτων από βαρέα μέταλλα. Τα είδη αυτά μπορεί να είναι αρπακτικά πτηνά ή και θαλασσοπούλια αλλά και στρουθιόμορφα (passerine birds) όπως ο καλόγερος (*Parus major*) και η γαλαζοπαπαδίτσα (*Parus caeruleus*) τα οποία αποτελούν βιοδείκτες τοπικής ρύπανσης (point-source contamination). Το πιο σημαντικό ατού των δύο αυτών ειδών ως βιοδείκτες είναι η πανταχού παρουσία τους, η οποία επιτρέπει την δειγματοληψία από σχεδόν οποιαδήποτε δασική περιοχή στην Ευρώπη (Eens et al. 1999).

1.3.1.3 Οι ιχθύες ως βιοδείκτες της κατάστασης του περιβάλλοντος

Ένας από τους πιο κοινούς και χρήσιμους βιοδείκτες είναι τα ψάρια, επειδή ζουν σε ωκεανούς, λίμνες και ποτάμια. Πολλά από αυτά που αναφέρθηκαν ανωτέρω για τα πτηνά ισχύουν και για τα ψάρια. Έτσι τα ψάρια είναι σπουδαίοι βιοδείκτες, διότι σε αντίθεση με τους βατράχους, περνούν όλη τη ζωή τους στο νερό και είναι συνεχώς μέσα σε αυτό συσχετιζόμενα με τις χημικές, φυσικές και βιολογικές παραμέτρους των νερών. Τα περισσότερα από τα είδη έχουν μεγάλο βιολογικό κύκλο (περίπου 2-10 χρόνια) και μπορούν να παρακολουθηθούν σε μακροχρόνιες επιδράσεις. Παράλληλα ζουν σε μεγάλες εκτάσεις, επηρεάζονται λιγότερο από τοπικές επιδράσεις αλλά μπορούν να μελετηθούν συγκριτικά τόσο σε στενό όσο και σε εκτατικό επίπεδο. Είναι επίσης, ορατά και εύκολο να πιαστούν και να εντοπιστούν. Επίσης, τα διαφορετικά είδη έχουν διαφορετικές ανοχές στη ρύπανση, αλλά τα περισσότερα από αυτά μπορούν να ανακτήσουν από την επίδραση. Η μοναδική τους θέση στη τροφική αλυσίδα τα κάνει να δέχονται τις επιδράσεις όχι μόνο στο δικό τους τροφικό επίπεδο αλλά και με

οργανισμούς που είναι σε χαμηλότερες βαθμίδες που αποτελούν πηγή τροφής για αυτά. Λόγω του μεγάλου μεγέθους τους οι όποιες αλλαγές που οφείλονται σε περιβαλλοντική επίδραση έχουν πολλά χαρακτηριστικά, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την εκτίμηση της περιβαλλοντικής επίδρασης. Οι αλλαγές αυτές ποικίλουν από αναπαραγωγικούς, σωματομετρικούς, βιοχημικούς, ιστολογικούς δείκτες, ακόμα και σε μοριακό επίπεδο (Hao, 1996).

Μολονότι μελέτες με ψάρια ως οικολογικοί δείκτες άρχισαν από τις αρχές του 20^{ου} αιώνα (Simon, 1999), ο Karr (1981) πρότεινε τον πρώτο βιολογικό δείκτη που βασίζεται σε ψάρια, Index of Biotic Integrity (IBI). Τα ψάρια λοιπόν έχουν χρησιμοποιηθεί ως οικολογικοί δείκτες για περισσότερο από 20 χρόνια κυρίως στη Βόρεια Αμερική, λιγότερο στη Μεσόγειο. Η πρόσφατη Οδηγία για να νερά (Water Framework Directive, 2000/60/EC) περιλαμβάνει τα ψάρια ως μία από τις βιολογικές παραμέτρους, μαζί με τα υδρόβια φυτά και τα βενθικά ασπόνδυλα, για την εκτίμηση και την παρακολούθηση των νερών και την ποιότητα των ενδιαιτημάτων.

1.3.1.4 Βιοδείκτες και πειραματικός σχεδιασμός

Στα πτηνά, ο πειραματισμός που σχεδιάστηκε για τον υπολογισμό της τοξικότητας και της συμπεριφορά αποφυγής της τροφής του methamidophos διενεργήθηκε με βιοδείκτη το ιαπωνικό ορτύκι (*Coturnix coturnix japonica*). Το ιαπωνικό ορτύκι προτείνεται ως το κυριότερο από τα είδη βιοδείκτες στα πρωτόκολλα πειραματισμού οξείας και υποξείας τοξικότητας με τοξικές ουσίες (OECD No 223; OECD No 205; US EPA, 1996) που μπορούν να χρησιμοποιηθούν, και είναι τυπικός αντιπρόσωπος για τα είδη πτηνών που θα βρίσκονται σε πιθανό κίνδυνο μετά την εμπορική εφαρμογή της δραστικής ουσίας.

Ανάλογα στα ψάρια, ο πειραματισμός που σχεδιάστηκε για τον υπολογισμό της τοξικότητας του methamidophos διενεργήθηκε με βιοδείκτη την πέστροφα (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). Η πέστροφα προτείνεται ως το κυριότερο από τα είδη βιοδείκτες στα πρωτόκολλα πειραματισμού οξείας και παρατεταμένης τοξικότητας με τοξικές ουσίες (OECD No 203, OECD No 204) που μπορούν να χρησιμοποιηθούν, και είναι τυπικός αντιπρόσωπος για τα είδη ψαριών που θα βρίσκονται σε πιθανό κίνδυνο μετά την εμπορική εφαρμογή της δραστικής ουσίας.

1.4 Βιοσημαντές

Οι βιοσημαντές «biomarkers», εκφράζουν μοριακές και κυτταρικές αλλοιώσεις ενώ συνδέονται με την έκθεση σε τοξικές ουσίες ή σε φυσικούς παράγοντες. Οι βιοσημαντές περιλαμβάνουν μια σειρά από μετρήσεις που εκφράζουν την έκθεση, την επίδραση και/ή την ευαισθησία των οργανισμών. Η ανάπτυξη και η επικύρωση πιθανών βιοσημαντών είναι μια μακροπρόθεσμη προσπάθεια που προχώρησε από τη βασική έρευνα σε πιλοτικές μελέτες σε διάφορες επιδημιολογικές εφαρμογές, σε ανθρώπους (DeCaprio, 1997).

Πρόσθετα, απαιτούνται νέες τεχνικές για τη βελτίωση των εργαστηριακών εφαρμογών, για την πρόβλεψη τοξικότητας *in situ* και την αναγνώριση πληθυσμών και κοινοτήτων που πλήττονται σοβαρά από την έκθεσή τους σε ξενοβιοτικούς παράγοντες. Μία σημαντική προσέγγιση περιλαμβάνει τη χρήση των βιοσημαντών (McCarthy and Shugart, 1990; Cairns and McCormick, 1992; Depledge, 1992; Peakall and Shugart, 1992; Fossi and Leonzio, 1993). Το Εθνικό Ερευνητικό Συμβούλιο (National Research Center, NRC 1989) ορίζει ως βιοσημαντές "... διακυμάνσεις που προκαλούνται από ξενοβιοτικούς παράγοντες σε κυτταρικές ή βιοχημικές διεργασίες ή στοιχεία, δομές, ή λειτουργίες, μετρήσιμες σε ένα βιολογικό σύστημα ή σε δείγματα". Τέτοιες διακυμάνσεις μπορούν να δείξουν το μέγεθος της απάντησης του οργανισμού σε ρύπους καθώς και τη σχέση μεταξύ της χημική ουσίας και της οικολογική επίδρασης. Ο αρχικός ορισμός που προτάθηκε για τους βιοσημαντές είναι ότι «βιοσημαντές είναι βιοχημικές, φυσιολογικές και ιστολογικές αλλαγές καθώς και παρεκκλίσεις σε οργανισμούς που χρησιμοποιούνται είτε για την έκθεση των χημικών είτε των επακόλουθων επιδράσεων», ενώ ο Depledge (1993) για πρόσθετες χρήσεις των βιοσημαντών πρότεινε ως ορισμό ότι ένας οικοτοξικολογικός βιοσημαντής είναι: «Μια διακύμανση βιοχημική, κυτταρική, φυσιολογίας ή συμπεριφοράς που μπορεί να μετρηθεί σε ιστό ή σε δείγματα σωματικών υγρών ή σε επίπεδο του οργανισμού παρέχοντας στοιχεία της έκθεσης και/ή των αποτελεσμάτων σε έναν ή περισσότερους χημικούς ρύπους (και/ή ακτινοβολίες)».

Για λόγους σαφήνειας, θα πρέπει να περιορίσουμε τον όρο «βιοσημαντή» σε υπο-οργανικές αλλαγές, όπως αυτές που συμβαίνουν σε κυτταρικό, βιοχημικό, μοριακό, ή φυσιολογικό επίπεδο, που μπορεί να μετρηθεί σε κύτταρα, σωματικά υγρά και ιστούς ή όργανα, εντός του οργανισμού και είναι ενδεικτικές της έκθεσης των ξενοβιοτικών και/ή επίδρασης. Στο πλαίσιο αυτό, γίνεται διάκριση μεταξύ της απόκρισης των «βιοσημαντών» (δηλαδή μοριακών, βιοχημικών και φυσιολογικών αλλαγών) από των

«βιοδεικτών» (αλλαγών οι οποίες διεξάγεται σε επίπεδο ατόμου, πληθυσμού και κοινότητας).

Την τελευταία δεκαετία διενεργείται εκτεταμένη έρευνα με βιοσημαντές και αρχίζει η πρακτική εφαρμογή τους για την εκτίμηση της επικινδυνότητας και της διαχείρισης του περιβάλλοντος ή την επίδραση των ξενοβιοτικών ουσιών στον άνθρωπο από την έκθεση σε αυτές (Rhomborg, 1993). Μια σχεδόν απεριόριστη ποικιλία βιοσημαντών είναι θεωρητικά διαθέσιμη για αξιολόγηση, και μόνο ένα μικρό μέρος αυτών έχει αναγνωρισθεί και ερευνηθεί μέχρι σήμερα. Η πρόσφατη αύξηση του ενδιαφέροντος στον τομέα οδηγείται από την τεχνική πρόοδο των τεχνικών της αναλυτικής μοριακής γενετικής και από την αναγνώριση ότι η «κλασική» τοξικολογία και επιδημιολογία δεν μπορεί από μόνη της να λύσει κρίσιμα ερωτήματα σχετικά με τα αίτια που οδηγούν σε περιβαλλοντικά προβλήματα.

Η αύξηση της χρήσης βιοσημαντών για την αξιολόγηση του κινδύνου από την ρύπανση προσέλκυσε την προσοχή διεθνών νομοθετικών οργανισμών (Giesy et al. 1988; McCarthy and Shugart, 1990). Εντούτοις, πριν να μπορέσουν οι βιοσημαντές να χρησιμοποιηθούν συστηματικά, πρέπει να σχεδιαστεί μια σαφή στρατηγική για την εφαρμογή τους και ένας έλεγχος για την εγκυρότητά τους. Στις ΗΠΑ το 1987, το NRC του U.S. National Academy of Science (NAS) εξέδωσε έκθεση στην οποία εξετάζεται η σημερινή κατάσταση της επιστήμης της χρήσης βιοσημαντών στην περιβαλλοντική έρευνα και εκτίμηση της επικινδυνότητας. Μετά την έκθεση του 1987 από το NRC, οι ρυθμιστικοί Οργανισμοί στις ΗΠΑ έγιναν πιο ενεργοί στην έρευνα βιοσημαντών ενώ η έννοια τους ενσωματώθηκε στις κατευθυντήριες γραμμές του EPA το 1992 για εκτίμηση της έκθεσης. Αν και οι βιοσημαντές δεν έχουν ενσωματωθεί ακόμα επίσημα στην εκτίμηση της επικινδυνότητας για το περιβάλλον, η συμβολή πρόσφατων επιστημονικών εξελίξεων δείχνουν, ότι οι βιοσημαντές θα εξελιχθούν σε σημαντικά στοιχεία αυτής της διαδικασίας.

Οι βιοσημαντές χωρίζονται σε 3 είδη:

Οι βιοσημαντές έκθεσης που χρησιμοποιούνται για τη μέτρηση της πραγματικής απορροφημένης δόσης και την έκταση της ύπαρξης ξενοβιοτικών παραγόντων (ή των μεταβολιτών τους) προς την περιοχή-στόχο (βιολογικά αποτελεσματική δόση).

Οι βιοσημαντές επίδρασης που μετρούν τις άμεσες βιοχημικές ή κυτταρικές επιδράσεις σε στόχους, σε δομικές ή λειτουργικές αλλαγές σε κυττάρων ή ιστούς που έχουν πληγεί, ή σε πραγματικές κλινικές ενδείξεις.

Οι βιοσημαντές ευαισθησίας που αναδεικνύουν άτομα με γενετική (ή όχι)

προδιάθεση και την τοξικότητα που συνδέεται με τους ξενοβιοτικούς παράγοντες. Οι Depledge et al. (1995) πρότεινε πρόσθετα και τους βιοσημαντές φυσιολογίας και βιοσημαντές συμπεριφοράς. Όλες αυτές οι μετρήσεις έχουν τη δυνατότητα να βελτιώσουν την ακρίβεια, την αξιοπιστία, την επιστημονική βάση για την ποσοτική αξιολόγηση του κινδύνου.

1.4.1 Βιοσημαντές έκθεσης

Όπως παρουσιάζεται στην αρχική έκθεση της NRC, οι βιοσημαντές της έκθεσης αναφέρονται στο ποσοστό της απορροφημένης ποσότητας των ξενοβιοτικών, δηλαδή, της ποσότητας του υλικού που έχει περάσει με επιτυχία φυσιολογικούς φραγμούς για την είσοδο τους στον οργανισμό. Ως εκ τούτου, αντανακλούν την βιοδιαθεσιμότητα και επηρεάζονται από πολλούς παράγοντες, όπως η οδός έκθεσης, φυσιολογικά χαρακτηριστικά του υποδοχέα και τα ίδια τα χημικά χαρακτηριστικά των ξενοβιοτικών παραγόντων χωρίς όμως οι αλλαγές στην δραστηριότητά τους να μπορούν να συνδεθούν με την υγεία των οργανισμών. Αν και τεχνικά θεωρείται ως "βιοπαρακολούθηση", απλή μέτρηση των επιπέδων των ξενοβιοτικών σε βιολογικά υλικά (αίμα, ιστοί, ούρα) παρέχει δεδομένα από την εσωτερική δόση τους.

Ως παράδειγμα τα OPs, που προκαλούν παρεμπόδιση της ακετυλχολινεστεράσης (acetylcholinesterase, AChE), έχουν χρησιμοποιηθεί ως βιοσημαντές έκθεσης για τα OPs. Αν και αυτά τα ένζυμα δεν παρέχουν πληροφορίες για τις εμπλεκόμενες χημικές ουσίες, παρέχουν ένα χρήσιμο δείκτη της έκθεσης, και αναφέρουν ότι οι εν λόγω οργανισμοί επηρεάζονται από την παρουσία αυτών των χημικών ουσιών. Σε πτηνά, η παρεμπόδιση της δραστηριότητας της AChE του εγκεφάλου μπορεί να παρέχει έναν δείκτη για τη δυναμική των OPs και καρβαμιδικών εντομοκτόνων από άλλα ΦΠ. Η παρεμπόδιση της βουτυρυλχολινεστεράσης (butyrylcholinesterase, BuChE) στον ορό του αίματος είναι επίσης πολύ χρήσιμη δοκιμασία που δεν οδηγεί σε θνησιμότητα των πτηνών, ενώ δεν σχετίζεται και με την παρεμπόδιση της AChE του εγκεφάλου. Οι συγκεντρώσεις τους στο αίμα απέχουν από το να είναι σταθερές (Thompson and Walker, 1993). Επιπλέον υπάρχει συχνά σημαντική διακύμανση μεταξύ ατόμων του ίδιου είδους ενώ υπάρχει επίσης και πρόβλημα χρονικής διακύμανσης. Σε πτηνά, για παράδειγμα, έχουν αναφερθεί περιπτώσεις ημερήσιας διακύμανσης της καρβοξυεστεράσης στον ορό (carboxylesterases, CaE) (Thompson et al. 1988), καθώς και της BuChE (Thompson

and Walker, 1993). Η μεταλλοθιονίνες επίσης μπορούν επίσης να θεωρηθούν ως βιοσημαντές έκθεσης (De Coen et al. 2000).

Αυτές οι πληροφορίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ένα είδος «συστήματος έγκαιρης προειδοποίησης», το οποίο μπορεί να ωθήσει σε περαιτέρω μελέτες για τον προσδιορισμό των χημικών ουσιών, τις πηγές τους και τα πιθανά μέτρα άμβλυνσης του κινδύνου που μπορεί να χρειαστούν για τη διόρθωση της κατάστασης.

1.4.2 Βιοσημαντές επίδρασης

Οι βιοσημαντές επίδρασης ορίζονται ως *κάθε αλλαγή που ποιοτικά ή ποσοτικά προβλέπει τη διαταραχή στην υγεία ή σε ενδεχόμενη διαταραχή που προκύπτει από την έκθεση*. Καθώς αυτές οι αλλαγές γίνονται πιο διαρκείς και/ή σοβαρές, ο βιοσημαντής γίνεται πιο σημαντικός για την πρόβλεψη της επίδρασης. Αν και αυτές είναι από τη φύση και τον ορισμό τους πιο προβλέψιμες της τελικής τοξικότητας, τείνουν να είναι λιγότερο ξεκάθαρες όταν σχετίζονται με την έκθεση σε συγκεκριμένες χημικές ουσίες. Έτσι, ένας βιοσημαντής επίδρασης μπορεί να είναι ιδιαίτερα προβλέψιμος όσον αφορά την τοξικότητα του ήπατος, αλλά αυτή μπορεί να συσχετιστεί με έναν αριθμό από διαφορετικές χημικές εκθέσεις. Παραδείγματα βιοσημαντών επίδρασης σε πρόωρες βιολογικές επιδράσεις περιλαμβάνουν ανταλλαγή χρωματιδίων (Sister Chromatid Exchange SCE), μονόκλωνη θραύση του DNA (Single-Strand Breakage, SSB), χρωματοσωμική ανωμαλία (Chromosomal Aberration, CA), την ενζυμική επαγωγή και παρεμπόδιση ενζύμων. Οι μεταλλαξιογόνες εκδηλώσεις μπορούν επίσης να θεωρηθούν ως βιοσημαντές επίδρασης όπως και ο ενεργειακός μεταβολισμός, η αλλαγή στη αναλογία του DNA/RNA, η σύνθεση των πρωτεϊνών (De Coen et al. 2000).

1.4.3 Βιοσημαντές ευαισθησίας

Σε αντίθεση με τους βιοσημαντές που εξετάστηκαν ανωτέρω, οι βιοσημαντές ευαισθησίας δεν αντιπροσωπεύουν τα στάδια της σχέσης δόσης-αποτελέσματος, αλλά μάλλον είναι καταστάσεις που αυξάνουν το ποσοστό της μετάβασης σε ένα ή περισσότερα στάδια. Για παράδειγμα, οι διαφορές στα δεδομένα του συμπλόκου Hb μεταξύ ατόμων με παρόμοια έκθεση σε ένα ξενοβιοτικό μπορεί να αποδοθούν σε διαφορές στη δραστηριότητα της βιοενεργοποίησης του ενζύμου. Εναλλακτικά, μειωμένη ενζυμική δραστηριότητα επισκευής του DNA μπορεί να οδηγήσει σε

αυξημένα ποσοστά μετάλλαξης και ενίσχυση της δημιουργίας όγκων. Οι δραστηριότητες συστημάτων ενζύμων, όπως το κυτόχρωμα P-450 (cytochrome P-450, CYP), της γλουταθειόνης-S-τρανσφεράσης (glutathione-S-transferase, GST), και N-ακετυλοτρανσφεράσης (N-acetyltransferase, NAT) αντιπροσωπεύουν σημαντικούς τύπους βιοσημαντών ευαισθησίας. Ο γενετικός πολυμορφισμός στην ενζυματική δραστηριότητα είναι κοινή βάση που εξηγεί τις ατομικές διαφορές στην τοξικότητα. Το φαινόμενο αυτό περιπλέκει τη χρήση των βιοσημαντών έκθεσης και επίδρασης σε διάφορες μελέτες ωστόσο, η εκτίμηση αυτών των πολυμορφισμών μπορεί εν τέλει να οδηγήσει σε στρατηγικές παρεμβάσεις προκειμένου να τροποποιηθεί ο κίνδυνος της επίδρασης σε ευαίσθητα άτομα (DeCarpio, 1997).

1.4.4 Βιοσημαντές φυσιολογίας

Μετρώντας την ενέργεια που «περισεύει» υποθέτουμε ότι όλη αυτή η ενέργεια θα χρησιμοποιηθεί για την ανάπτυξη και την αναπαραγωγή των οργανισμών. Ωστόσο, τα αποδεικτικά στοιχεία που υποστηρίζουν αυτόν τον ισχυρισμό είναι ανύπαρκτα. Μια ποικιλία από άλλες μεταβλητές, που μπορούν να μετρηθούν για την ανίχνευση φυσιολογικών δυσλειτουργιών, εξετάστηκαν από τους Mayer et al. (1992). Αυτές περιλαμβάνουν δαπάνη αδενυλικής ενέργειας, θερμοδομετρία σε όλο το σώμα, αναλογία οξυγόνου προς αζώτου, τα κορτικοστεροειδή/κατεχολαμίνες, το ρυθμό αύξησης και δείκτες της κατάστασης των οργανισμών.

1.4.5 Βιοσημαντές συμπεριφοράς

Οι πρόσφατες τεχνολογικές εξελίξεις επιτρέπουν να καθοριστούν τώρα χαρακτηριστικές αλλαγές στη συμπεριφορά που συνδέονται με την έκθεση στον ρύπο. Για παράδειγμα, η κατανομή του χρόνου που δαπανάται στην κίνηση με διαφορετικές ταχύτητες, διανυθείσα απόσταση, συχνότητα και γωνία στροφής μπορεί όλα να μετρηθεί ταυτόχρονα με τη χρήση συστήματος παρακολούθησης με βίντεο κάμερα που συνδέεται με υπολογιστή εφοδιασμένο με κατάλληλο λογισμικό. Ένα τέτοιο σύστημα αναπτύχθηκε από τους Baatrup and Bailey (1993) με τη χρήση επίγειων ασπόνδυλων (αράχνες), και που πρόσφατα τροποποιήθηκε για να επιτρέψει την παρακολούθηση της συμπεριφοράς της κίνησης αμφίποδων, ισόποδων και δεκάποδων μαλακόστρακων, και γαστερόποδων μαλακίων. Βρίσκονται πειράματα σε εξέλιξη, για τον προσδιορισμό της

ευαισθησίας και της εξειδίκευσης των αλλαγών συμπεριφοράς μετά την έκθεση μετάλλων και της εξέτασης του χρονοδιαγράμματος των επιδράσεων. Αυτό το τελευταίο σημείο είναι ιδιαίτερης σημασίας, δεδομένου ότι συχνά θεωρείται, αν και δεν έχει ακόμη αποδειχθεί, ότι οι βιοχημικές επιδράσεις από την έκθεση του ρύπου προηγούνται των επιδράσεων σε υψηλότερα επίπεδα οργάνωσης (επίπεδα φυσιολογίας και συμπεριφοράς) με σημαντικά χρονικά διαστήματα.

1.4.6 Εγκυρότητα των βιοσημαντών

Στην ιδανική περίπτωση, ένας βιοσημαντής θα πρέπει να είναι βιολογικά συναφής, ευαίσθητος, και συγκεκριμένος. Επιπλέον, θα πρέπει να είναι εύκολα προσιτός, χαμηλού κόστους και τεχνικά εφικτός. Αυτός ο συνδυασμός των απαιτήσεων σπάνια επιτυγχάνεται, και μερικές παραδοχές είναι αναπόφευκτες για την απόκτηση εγκαίρως χρήσιμων δεδομένων του βιοσημαντή. Η διαδικασία εγκυρότητας για ένα βιοσημαντή συνίσταται στον προσδιορισμό της σχέσης με τις μετρούμενες βιολογικές παραμέτρους (DeCarpio, 1997). Για τους βιοσημαντές έκθεσης, δεν είναι τόσο κρίσιμη προϋπόθεση η επίδραση όσο η πρόβλεψη της σχέσης έκθεσης-αντίδρασης. Το αντίθετο ισχύει για τους βιοσημαντές επίδρασης. Η ευαισθησία αντικατοπτρίζει το επίπεδο της έκθεσης που μπορεί να ανιχνευθεί με τη βοήθεια των βιοσημαντών. Εξαιρετικά ευαίσθητοι βιοσημαντές είναι αναγκαίο να ποσοτικοποιούν χαμηλά επίπεδα περιβαλλοντικής έκθεσης. Εξειδίκευση είναι η πιθανότητα ότι ο βιοσημαντής να είναι ενδεικτικός της πραγματικής έκθεσης των ξενοβιοτικών. Με την εξαίρεση των περιστασιακών βιοψίας των ιστών, τα δείγματα για χρήση σε μελέτες βιοσημαντών έκθεσης συνίστανται γενικά σε αίμα, ούρα, γάλα, ή άλλα συναφή βιολογικά μέσα. Τέλος, το κόστος και η τεχνική, είναι σημαντικά ζητήματα επιλογής των κατάλληλων βιοσημαντών για εφαρμοσμένες μελέτες.

Μια συγκριτικά νέα προσέγγιση για την παρακολούθηση της ρύπανσης, φαίνεται από τη χρήση στα δίθυρα μαλάκια (bivalve mollusks). Τα δίθυρα έχουν χρησιμοποιηθεί σε πολλά μέρη του κόσμου, για την βιοπαρακολούθηση, λόγω της ευρείας γεωγραφικής τους κατανομής, συγκριτικά χαμηλή δραστηριότητα του κυτοχρώματος P450 και την ικανότητά τους να δεσμεύουν κάποια μέταλλα και λιπόφιλους ρύπους, όπως υδρογονάνθρακες πετρελαίου (petroleum hydrocarbons, PHCs), χλωριωμένα ΦΠ (chlorinated pesticides, CPs), πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες (polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs) και πολυχλωριωμένα

διφαινύλια (polychlorinated biphenyls, PCBs). Προγράμματα όπως το US National Oceanic and Atmospheric Administration's National Status and Trends (NOAA National Status and Trends), το οποίο ξεκίνησε στις αρχές της δεκαετίας του 1980 (Sericano et al. 1995) αποτελούν καλά παραδείγματα της χρησιμότητας αυτής της προσέγγισης σε ρυπογόνες ουσίες. Με διαφορά ο πιο δημοφιλής οργανισμός που χρησιμοποιείται έχει το μύδι (mussel) - και ως εκ τούτου επινοήθηκε, ο όρος "Musselwatch". Έχει αναπτυχθεί ένα ευρύ φάσμα ιστο-κυτταρολογικών αλλοιώσεις σε ψάρια και δίθυρα για την παρακολούθηση των επιπτώσεων της ρύπανσης. Για παράδειγμα, από εκτενείς μελέτες στις ΗΠΑ (NOAA National Status and Trends) και την Ευρώπη (International Council for the Exploration of the Sea, ICES, and the North Sea Task Force Monitoring Master Plan, NSTF Master Plan) έχουν δημιουργηθεί αιτιώδεις σχέσεις μεταξύ της παθολογίας των ψαριών και τα των επιπέδων ρύπανσης στο θαλάσσιο περιβάλλον. Πρόσφατα, σε έρευνες βιοπαρακολούθησης στη Μεσόγειο Θάλασσα (πρόγραμμα των Ηνωμένων Εθνών για το περιβάλλον) συνιστάται η χρήση ορισμένων κυτταρικών επιδράσεων σε μαλάκια και ψάρια, με κυτταρικούς βιοσημαντές για την εκτίμηση των επιπτώσεων της ρύπανσης σε παράκτια περιβάλλοντα.

1.4.7 Βιοσημαντές και εκτίμηση της επικινδυνότητας

Η εφαρμογή των βιοσημαντών σε ποιοτικές και ποσοτικές πτυχές της αξιολόγησης εκτίμησης της επικινδυνότητας αναμένεται για πάνω από μια δεκαετία, δεδομένου ότι ο Hattis (1986) πρώτος πρότεινε τη χρήση τους στη διαδικασία αυτή. Όπως διατυπώνεται στο αρχικό πρότυπο της NAS, η εκτίμηση του κινδύνου περιλαμβάνει τέσσερα συστατικά στοιχεία, το προσδιορισμό της επικινδυνότητας, εκτίμηση έκθεσης, αξιολόγηση δόσης-αντίδρασης, και χαρακτηρισμό του κινδύνου (DeCaprio, 1997). Ο προσδιορισμός του κινδύνου περιλαμβάνει τον ποιοτικό προσδιορισμό ότι ένας συγκεκριμένος ξеноβιοτικός παράγοντας έχει τη δυνατότητα να προκαλέσει βλάβη (κίνδυνο) σε επίπεδα που συναντώνται στο περιβάλλον. Αφού οι βιοσημαντές μετρούν συνεχώς, προσφέρουν ενδείξεις νωρίτερα και με πιο ευαίσθητη ανίχνευση της τοξικότητας σε βιοδείκτες. Ακόμα πιο σημαντικά, ευαίσθητοι βιοσημαντές έκθεσης ή επίδρασης μπορεί να χρησιμοποιηθούν σε ανθρώπινους πληθυσμούς με υποψία περιβαλλοντικής έκθεσης σε χημικές ουσίες για την εκτίμηση διάφορων δεικτών επίδρασης. Οι βιοσημαντές επίσης, αναμένεται να ρίξουν φως σε ποιοτικές πτυχές της φάσης προσδιορισμού του κινδύνου. Πληροφορίες σχετικά με

τους μοριακούς μηχανισμούς δράσης και σχέσεων δομής/δραστικότητας μπορεί να είναι ανεκτίμητες για να αναδείξουν την επικινδυνότητα από τις τοξικές επιδράσεις που ανιχνεύονται σε είδη βιοδείκτες (DeCaprio, 1997).

Οι χρήσεις των βιοσημαντών στο τμήμα της αξιολόγησης της έκθεσης στην εκτίμηση της επικινδυνότητας είναι πολλές και προφανείς, και οι σημερινές ερευνητικές προσπάθειες οδηγούν στην ανάπτυξη αυτών των εφαρμογών. Οι ερωτήσεις που ενδεχομένως αντιμετωπίζονται στην παρούσα φάση περιλαμβάνουν την ανίχνευση ή μη της έκθεσης, ποια είναι η σχέση μεταξύ των συγκεντρώσεων που εφαρμόστηκαν και της εσωτερικής συγκέντρωσης της χημικής ουσίας, το μέρος των δόσης που φθάνει στους ιστούς-στόχους, την εμμονή των ξеноβιοτικών εντός του οργανισμού, καθώς και ποια είναι τα χρονικά χαρακτηριστικά της εσωτερικής έκθεσης (DeCaprio, 1997). Η ανάπτυξη των βιοσημαντών έκθεσης (ή επίδρασης), μπορεί να επιτρέψει κάποια μέρα άμεση σύνδεση της έκθεσης και της επίδρασης, υπερβαίνοντας έτσι το πρόβλημα της καθυστέρησης στην επιδημιολογία και την εκτίμηση της επικινδυνότητας.

Με την ενσωμάτωση των βιοσημαντών μπορεί να βελτιωθούν πολλές πτυχές της αξιολόγησης. Ένα από τα πιο σημαντικά ζητήματα περιλαμβάνει την επέκταση των δεδομένων από τα ζώα στον άνθρωπο. Μεταξύ των ειδών οι διακυμάνσεις αφορούν συνήθως διαφορές στον μεταβολισμό, τη φυσιολογία, τα ανατομικά χαρακτηριστικά και τη μοριακή δομή του υποδοχέα. Δεδομένου ότι πολλοί βιοσημαντές, άμεσα ή έμμεσα μετρούν τέτοιες παραμέτρους, μπορούν να παρέχουν πληροφορίες σχετικά με αυτές τις παρατηρούμενες διαφορές. Για παράδειγμα, ένας βιοσημαντής παρέχει πληροφορίες σχετικά με όλες τις τοξικοκινητικές διεργασίες που συμβαίνουν από την εξωτερική έκθεση των ξеноβιοτικών (ή μεταβολιτών) μέχρι την περιοχή-στόχο. Χρησιμοποιώντας αυτό το μέτρο και όχι την εξωτερική δόση στα μοντέλα δράσης-επίδρασης "εξομαλύνονται" αποτελεσματικά τα δεδομένα, επιτρέποντας σε περισσότερες και άμεσες συγκρίσεις μεταξύ των ειδών. Η προσέγγιση αυτή εξαλείφει την ανάγκη αυξημένων παραγόντων αβεβαιότητας για επέκταση συμπερασμάτων μεταξύ των ειδών.

1.5 Εκτίμηση του περιβαλλοντικού κινδύνου

Η ποσοτική εκτίμηση των επιπτώσεων χημικών ουσιών και παρασκευασμάτων στο περιβάλλον και τα οικοσυστήματα καλείται Εκτίμηση Περιβαλλοντικού και Οικολογικού Κινδύνου (Assessment of environmental and ecological risk).

Η εκτίμηση κινδύνου είναι ένα εργαλείο διαχείρισης που χρησιμοποιείται για να λαμβάνονται κρίσιμες αποφάσεις κατά την εμπορία και τη χρήση νέων χημικών υλικών, παρασκευασμάτων, συσκευασιών κλπ., για τα οποία υπάρχουν ή δεν υπάρχουν τοξικολογικά και οικοτοξικολογικά δεδομένα περιβαλλοντικών επιπτώσεων. Η περιβαλλοντική τοξικολογία προσπαθεί να λύσει ειδικά επιστημονικά προβλήματα, ιδιαίτερα για τις επιβλαβείς επιδράσεις χημικών ουσιών-ρύπων σε οργανισμούς και οικοσυστήματα (Βαλαβανίδης, 1999).

Οι αρχές που αναπτύσσονται σε αυτό το παράρτημα στοχεύουν να εξασφαλίσουν ότι οι αξιολογήσεις και αποφάσεις όσον αφορά την χρήση τοξικών ουσιών, θα μας βοηθήσουν να εξάγουμε συμπεράσματα με απώτερο στόχο την προστασία του περιβάλλοντος.

Η περιβαλλοντική εκτίμηση που διενεργείται μετά την περάτωση της αξιολόγησης με σκοπό τη λήψη αποφάσεων, πρέπει να εξασφαλίσει ότι τα υποβληθέντα στοιχεία είναι αποδεκτά από άποψη ποσότητας, ποιότητας, συνέπειας και αξιοπιστίας και επαρκή για να επιτρέψουν την ολοκλήρωση μιας κατάλληλης αξιολόγησης.

Η επικινδυνότητα λοιπόν για τους οργανισμούς προέρχεται από τις χημικές ουσίες και σχετίζεται με την τοξικότητα τους καθώς και το βαθμό στον οποίο ο οργανισμός έχει εκτεθεί σε συγκεκριμένο χρονικό διάστημα.

1.5.1 Περιβαλλοντική εκτίμηση για τα ΦΠ

1.5.1.1 Υπολογισμός του λόγου της τοξικότητας/έκθεσης

Η αξιολόγηση των επιδράσεων στο περιβάλλον είναι ένα αναπόσπαστο τμήμα της διαδικασίας της ανάπτυξης και της έγκρισης ΦΠ και βιοκτόνων. Αυτή η αξιολόγηση πρέπει να έχει ως σκοπό να προσδιορίσει τους πιθανούς κινδύνους και να επιτρέψει έτσι την ποσοτικοποίηση των δυσμενών αποτελεσμάτων στο περιβάλλον. Η φύση και η ποσότητα των στοιχείων που απαιτούνται για την εκτίμηση της επικινδυνότητας εξαρτώνται από τις ιδιότητες και τη χρήση κάθε ουσίας. Μια σταδιακή προσέγγιση επιτρέπει μια αποδοτική επιλογή των δοκιμών αναγκαία για κάθε μεμονωμένη ανάλυση κινδύνου.

Από τον πειραματισμό τοξικότητας με τους βιοδείκτες (π.χ. τιμές LD₅₀) και την αντίστοιχη έκθεση που αντιστοιχεί από την εφαρμογή του ΦΠ στον αγρό (υπολογισμός χειρότερης περίπτωσης, τιμές PEC) υπολογίζουμε τον λόγο της οξείας, βραχυπρόθεσμης και, όπου είναι απαραίτητο, μακροπρόθεσμης τοξικότητας/έκθεσης (toxicity-exposure ratio, TER). Αν έχουμε πειραματιστεί με περισσότερους από έναν βιοδείκτες για κάθε τροφικό επίπεδο συνήθως διαλέγουμε την μικρότερη τιμή (πιο τοξική επίδραση).

1.5.1.2 Αβεβαιότητα

Για τη εκτίμηση της επικινδυνότητας που θέλουμε να αναλύσουμε, δεδομένου ότι δεν γίνεται πειραματισμός σε πραγματικές συνθήκες, έχουν γίνει κάποιες παραδοχές όπως π.χ. ο πειραματισμός με ένα τουλάχιστον βιοδείκτη σε κάποιο τροφικό επίπεδο αντί για τους άγριους πληθυσμούς, πειραματισμός στο εργαστήριο με σταθερές συνθήκες αντί στην πραγματικότητα τις διαφορετικές συνθήκες τοπίου, κλίματος και σχέσεων μεταξύ των ειδών κλπ. Όταν λοιπόν τα αποτελέσματα που έχουμε από την θεωρητική προσέγγιση θέλουμε να τα ανάγουμε σε πραγματικές συνθήκες θα πρέπει να εκτιμήσουμε μία τιμή *αβεβαιότητας* μεταξύ των επιδράσεων που έχουν παρατηρηθεί (τιμές π.χ. LD₅₀), και αυτών που θα συμβούν σε πραγματικές συνθήκες εξασφαλίζοντας την χειρότερη περίπτωση έκθεσης.

Η *αβεβαιότητα* λοιπόν, μπορεί να κατηγοριοποιηθεί ως κατωτέρω:

- 1) Μεταξύ βιοδείκτη και πραγματικού άγριου πληθυσμού.
- 2) Μεταξύ εργαστηρίου, ημι-πραγματικών και πραγματικών συνθηκών
- 3) Μεταξύ πειραματισμού με έναν ή περισσότερους βιοδείκτες στο ίδιο τροφικό επίπεδο.
- 4) Μεταξύ οξείας τοξικότητας και χρόνιας τοξικότητας.
- 5) Και τέλος με κριτήριο την αξιοπιστία πειραματισμού

Η τιμή της *αβεβαιότητας* λοιπόν μπορεί να καθοριστεί ως κατωτέρω από υψηλότερες σε χαμηλότερες τιμές:

Κριτήριο	Υψηλή τιμή	Χαμηλή τιμή
Είδος πειραματισμός	Σε βιοδείκτη	Σε άγριο πληθυσμό
Τύπος πειραματισμού	Εργαστηρίου	Άγρου
Αριθμός βιοδεικτών	Ένας	Περισσότεροι
Τοξικότητα	Οξεία	Χρόνια
Αξιοπιστία πειραματισμού	Χαμηλή	Υψηλή
Οργανισμοί στην τροφική αλυσίδα	Χαμηλότεροι	Υψηλότεροι

Σε κάθε περίπτωση λοιπόν, ανάλογα με το ποιο τροφικό επίπεδο θέλουμε να εξετάσουμε, με τα δεδομένα του πειραματισμού που έχουμε αποφασίσει να διεξάγουμε και ανάλογα με το αν θέλουμε να εκτιμήσουμε βραχυχρόνια ή μακροχρόνια αποτελέσματα, ορίζουμε μια τιμή αβεβαιότητας την οποία ονομάζουμε «τιμή κριτηρίου» (trigger value). Η τιμή αυτή καθορίζει το πόσο πιο αυστηροί οφείλουμε να γίνουμε για να εκτιμήσουμε την επίδραση της τοξικής ουσίας στους άγριους πληθυσμούς.

1.5.1.3 Λήψη αποφάσεων

Για την λήψη αποφάσεων σχετικά με την εκτίμηση της επικινδυνότητας μιας τοξικής ουσίας στο περιβάλλον:

- Υπολογίζουμε την τοξικότητα της ουσίας υπό δοκιμή με τη χρήση βιοδεικτών. Έτσι γνωρίζουμε ποια ποσότητα της τοξικής ουσίας προκαλεί

θάνατο, παρενέργειες ή δεν προκαλεί καμία ορατή επίδραση (τιμές π.χ. LD₅₀).

- Υπολογίζουμε την τύχη και συμπεριφορά της τοξικής ουσίας στο περιβάλλον (στο χώρο και στο χρόνο) γνωρίζοντας πάντα ποια θα είναι η χρήση της σε πραγματικές συνθήκες. Έτσι γνωρίζουμε πόση από την ποσότητα της τοξικής ουσίας θα εκθέσει τον οργανισμό (π.χ. τιμές PEC).
- Υπολογίζουμε το λόγο της τοξικότητας/έκθεσης (τιμές π.χ. LD₅₀/PEC).
- Καθορίζουμε την αποδεκτή αβεβαιότητα («τιμή κριτηρίου») (π.χ. για την οξεία τοξικότητα στα πτηνά, EFSA 2009).
- Συγκρίνουμε τον λόγο της τοξικότητας/έκθεσης με την «τιμή κριτηρίου».

Εάν η τιμή του λόγου της τοξικότητας/έκθεσης είναι μεγαλύτερη από την μονάδα σημαίνει ότι η έκθεση στην τοξική ουσία σε πραγματικές συνθήκες για τον συγκεκριμένο βιοδείκτη (παρανομαστής) είναι μικρότερη από την έκθεση που θα προκαλούσε σημαντικές επιδράσεις για την βιωσιμότητα του (αριθμητής). Ο κίνδυνος έτσι για τον βιοδείκτη θεωρείται μικρός. Το αντίθετο ισχύει αν η τιμή του λόγου της τοξικότητας/έκθεσης είναι μικρότερη από την μονάδα.

Στην περίπτωση τώρα που η τιμή του λόγου της τοξικότητας/έκθεσης είναι μεγαλύτερη (ή μικρότερη) όχι από μονάδα αλλά από την «τιμή κριτηρίου» μπορούμε να συμπεράνουμε για τον άγριο πληθυσμό πλέον, και για το τροφικό επίπεδο που είναι και ο βιοδείκτης. Σε περίπτωση επικινδυνότητας (η τιμή του λόγου της τοξικότητας/έκθεσης < από την «τιμή κριτηρίου») απαιτείται περαιτέρω πειραματισμός σε πιο πραγματικές συνθήκες ώστε να μειωθεί ο βαθμός της αβεβαιότητας και τα συμπεράσματα να είναι πιο κοντά στην πραγματικότητα. Μπορεί επίσης να ληφθούν αποφάσεις διαχείρισης του κινδύνου (risk mitigation measures) ώστε να υπάρχουν στα εν λόγω σκευάσματα ενδείξεις ή απαγορεύσεις για συγκεκριμένες περιπτώσεις (π.χ. αν αποδειχθεί ότι υπάρχει πρόβλημα στις μέλισσες μπορεί να μπει η ένδειξη «μην ψεκάζεται όταν η καλλιέργεια είναι σε ανθοφορία»).

1.5.1.4 Περιβαλλοντική εκτίμηση από τη χρήση ΦΠ στα πτηνά

Στα πτηνά, για τον καθορισμό του κινδύνου, εξετάζεται ο τρόπος έκθεσης τους, καθώς και η τοξικότητα των ΦΠ σε αυτά (οξεία, μεσοχρόνια, χρόνια).

1.5.1.4.1 Σενάρια έκθεσης για την εκτίμηση επικινδυνότητας 1ου επιπέδου

Το κύριο σενάριο και οι διαδικασίες όπως ορίζονται από το σχήμα της κατευθυντήριας οδηγίας SANCO (2002), για την εκτίμηση της επικινδυνότητας καλύπτει κυρίως την έκθεση μέσω της τροφής, η οποία θεωρείται ως ο πιο σημαντικός τρόπος έκθεσης των πτηνών στα ΦΠ. Η έκθεση αυτή εκφράζεται σαν ημερήσια δόση τόσο για την οξεία όσο, για την μέσο-χρόνια και μακροχρόνια έκθεση των πτηνών.

Γενικά η εκτίμηση της ημερήσιας λήψης μιας δραστικής ουσίας δίνεται από την ακόλουθη εξίσωση:

ETE = (FIR / bw) * C * AV * PT * PD (mg/kg bw/d) όπου:

ETE: Estimated Theoretical Exposure (Εκτιμώμενη θεωρητική έκθεση)

FIR: Food intake rate (ρυθμός λήψης τροφής των διαφόρων ειδών) (gr of fresh weight per day)

bw: Body weight (σωματικό βάρος σε gr)

C: Concentration (συγκέντρωση της δραστικής ουσίας στην τροφή (mg/kg))

AV: Avoidance factor [βαθμός αποφυγής της τροφής (1= όχι αποφυγή, 0=πλήρης αποφυγή)]

PT: Proportion of Time [ποσοστό της τροφής που λαμβάνει στην περιοχή που έχει γίνει η εφαρμογή (τιμές μεταξύ 0 και 1)]

PD: Proportion of Diet [ποσοστό του τύπου της τροφής κατά την πρόσληψη της τροφής (τιμές μεταξύ 0 και 1, ένας τύπος ή περισσότεροι τύποι τροφής)]

Στην περίπτωση πολλαπλών εφαρμογών η συγκέντρωση C εκφράζεται ως:

C = C₀ * MAF * f_{twa}, όπου:

C₀: αρχική συγκέντρωση μετά από μία εφαρμογή

MAF: Multiple application factor (συντελεστής πολλαπλών εφαρμογών - η συγκέντρωση αμέσως μετά την τελευταία εφαρμογή σε σχέση με μια εφαρμογή).

f_{twa}: Time-weighted-average factor (συντελεστής μέσης χρονικής διάσπασης της δραστικής ουσίας)

$$f_{twa} = (1 - e^{-kt})/kt$$

$$k = \ln 2 / DT50$$

t: χρόνος

Για την εκτίμηση επικινδυνότητας 1ου επιπέδου γίνεται αποδεκτό ότι:

- Η ρυπασμένη τροφή δεν αποφεύγεται.
- Τα πτηνά ικανοποιούν όλη την ανάγκη τους σε φαγητό στην περιοχή που έχει γίνει εφαρμογή με κάποια δραστική ουσία.
- Τα πτηνά τρέφονται από ένα τύπο διαίτας (π.χ. 100% εντομοφάγα).

Οι παράγοντες AV, PT and PD είναι ίσο με 1 και μπορούν να παραλειφθούν.

Για την εκτίμηση επικινδυνότητας 1ου επιπέδου ο ρυθμός λήψης τροφής (FIR) των διαφόρων εστιακών ειδών έχει προκαθορισμένες τιμές.

Ρυθμός λήψης τροφής (FIR)

Τα δεδομένα προκύπτουν από μια εκτενή βιβλιογραφική επισκόπηση των Crocker et. al. (2002), και ο FIR είναι βασισμένος στις ημερήσιες ενεργειακές δαπάνες για τα άγρια πτηνά, το ενεργειακό περιεχόμενο και την περιεκτικότητα σε υγρασία.

Συγκέντρωση (C)

Οι εκτιμήσεις εδώ μετατρέπονται για δόση εφαρμογής 1 kg a.s./ha (δραστικής ουσίας ανά εκτάριο) (υπόλειμμα ανά μονάδα δόσης εφαρμογής - residue per unit dose - RUD) και οι τιμές αυτές ορίζονται από πίνακες και πρέπει να πολλαπλασιαστούν με την πραγματική δόση εφαρμογής της δραστικής ουσίας στον αγρό.

1.5.1.4.2 Σενάρια έκθεσης για την εκτίμηση επικινδυνότητας 2ου επιπέδου

Η κατευθυντήρια οδηγία της Ε.Ε για την εκτίμηση επικινδυνότητας των ΦΠ στα πτηνά και τα θηλαστικά (SANCO, 2002) δίνει σαφείς κατευθύνσεις για την εκτίμηση επικινδυνότητας 1ου επιπέδου.

Στη περίπτωση όμως που η εκτίμηση επικινδυνότητας 1^{ου} επιπέδου δώσει αποτελέσματα υψηλής επικινδυνότητας απαιτείται μια εκτίμηση επικινδυνότητας ανωτέρου επιπέδου. Για την επανεκτίμηση του κινδύνου (refinement of risk), μια από τις πολλές προσεγγίσεις είναι να λάβει χώρα μια πιο ρεαλιστική αξιολόγηση χρησιμοποιώντας δεδομένα από είδη πτηνών που είναι χαρακτηριστικά του τύπου της καλλιέργειας στην οποία εφαρμόζεται το εκάστοτε ΦΠ έτσι ώστε να παραχθούν πιο πραγματικά δεδομένα έκθεσης των πτηνών. Τα χαρακτηριστικά είδη πτηνών ή αλλιώς εστιακά είδη («focal species») είναι αυτά που κυρίως απαντώνται σε μια δεδομένη

καλλιέργεια ανάλογα με τον τύπο διαίτης που αντιπροσωπεύουν. Για την πλειοψηφία όμως των καλλιεργειών στην Ευρωπαϊκή Ένωση, δεν υπάρχουν επαρκή δεδομένα για τα είδη των πτηνών που ζουν και βρίσκουν την τροφή τους μέσα και γύρω από τις καλλιέργειες αυτές.

1.6 Τα πτηνά

1.6.1 Γεωργία και πτηνά

Η γεωργία εξελίχθηκε στο μεγαλύτερο «χρήστη του εδάφους και των υδάτων» και επέφερε τεράστιες αλλαγές στο τοπίο και τα οικοσυστήματα. Οι αλλαγές αυτές είχαν ως αποτέλεσμα πολλά είδη της άγριας ζωής να χάσουν τους βιότοπους τους και να εξαφανιστούν. Ωστόσο, εξίσου πολλά είδη κατάφεραν να προσαρμοστούν και να εξαρτώνται πλέον από την ύπαρξη και τη διατήρηση αυτών των ανθρωπογενών τοπίων. Μια κατηγορία τέτοιων ειδών που προσαρμόστηκαν είναι τα πτηνά, των οποίων αρκετά είδη έχουν τόσο πολύ ενταχθεί πλέον στο αγροτικό τοπίο και τις δομές του που αποκαλούνται και ως «πτηνά του αγρού». Πολλά από αυτά συμπληρώνουν ολόκληρο το βιολογικό τους κύκλο σε αυτές τις περιοχές ή ένα μέρος του βιολογικού τους κύκλου όπως τα μεταναστευτικά πτηνά. Σύμφωνα με την Ελληνική Ορνιθολογική Εταιρεία, ένα παράδειγμα τέτοιων πτηνών είναι οι κεφαλάδες (*Lanius* sp.) των οποίων ο φυσικός βιότοπος ήταν τα δάση με ξέφωτα που δημιουργούνται από φυσικές αιτίες όπως οι φωτιές και οι ισχυροί άνεμοι. Η απόδοση των περιοχών αυτών στην γεωργία οδήγησε στην δημιουργία ανοικτών καλλιεργούμενων εκτάσεων με φυτοφράκτες και συστάδες δένδρων γύρω από τους αγρούς. Οι χώροι αυτοί επειδή μοιάζουν με τους παλιούς φυσικούς βιότοπους των ειδών αυτών προσέλκυσαν τους κεφαλάδες οι οποίοι πλέον φωλιάζουν σε φυτοφράκτες ή δέντρα και τρέφονται στις χαμηλές καλλιέργειες (Δ14).

Τα αγροτικά οικοσυστήματα της Ευρώπης λόγω της ετερογένειας που παρουσιάζουν αλλά και λόγω των μεγάλων εκτάσεων που καλύπτουν συγκεντρώνουν το μεγαλύτερο αριθμό ειδών πτηνών (173 είδη) σε σχέση με οποιοδήποτε άλλο τύπο οικοσυστήματος. Ο αριθμός αυτός αντιστοιχεί περίπου στο 1/3 των ειδών της ορνιθοπανίδας της Ευρώπης (Tucker and Dixon, 1997). Σύμφωνα με την Ελληνική Ορνιθολογική Εταιρεία, τα περισσότερα είδη πτηνών έχουν καταγραφεί σε αροτραίες καλλιέργειες (122 είδη) και στεπικά οικοσυστήματα (80 είδη), ενώ οι ορυζώνες (42 είδη) και τα ορεινά λιβάδια (36 είδη) συγκεντρώνουν τα λιγότερα είδη (Δ14).

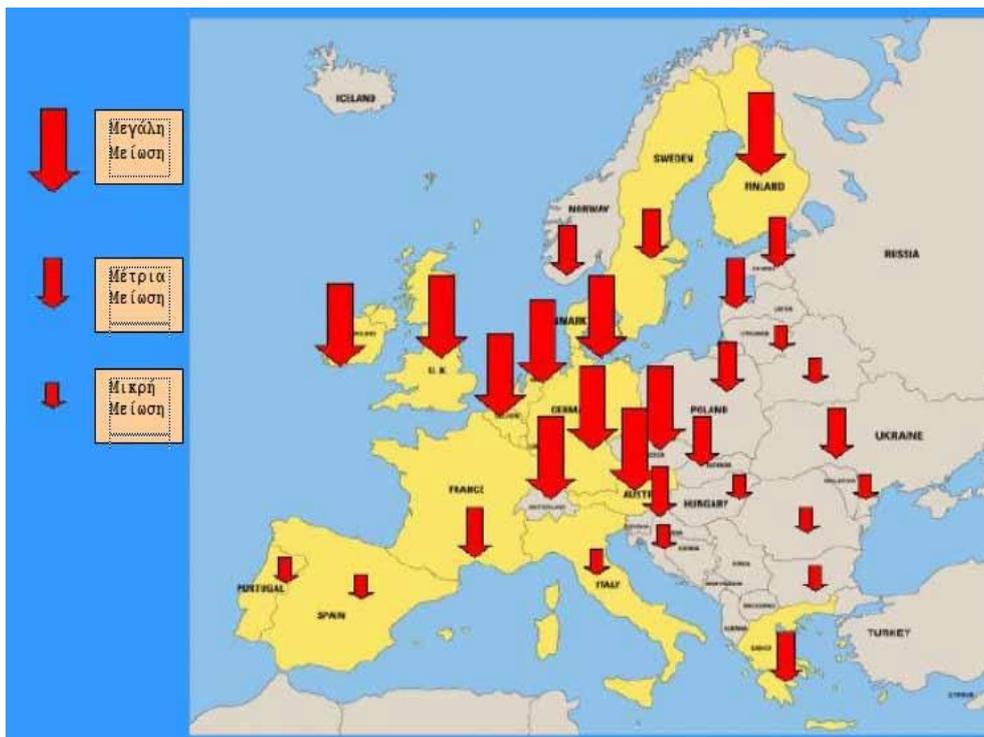
Σπουδαίο ρόλο όμως στην ποικιλότητα των ειδών πτηνών των αγροτικών οικοσυστημάτων παίζει και ο βαθμός εντατικοποίησης των γεωργικών πρακτικών. Σε εντατικές αροτραίες καλλιέργειες και σε μονοκαλλιέργειες σιτηρών παρατηρείται μικρός αριθμός από είδη όπως η κουρούνα (*Corvus corone cornix*) και το ψαρόνι

(*Sturnus vulgaris*) ενώ σε λιγότερο εντατικές καλλιέργειες με ανοιξιότακτη σπορά όπου εφαρμόζεται και αγρανάπαυση, παρατηρούνται πολύ περισσότερα είδη όπως η σταρήθρα (*Alauda arvensis*), το βραχοκιρκίνεζο (*Falco tinnunculus*), ο κατσουλέρης (*Galerida cristata*), το καμποτσίγλονο (*Miliaria calandra*) κ.α (Δ14).

1.6.1.1 Πληθυσμιακή κατάσταση των πτηνών του αγρού στην Ευρώπη

Παρά το ότι μερικά είδη πτηνών έχουν ωφεληθεί από την αντικατάσταση φυσικών οικοσυστημάτων από γεωργικά, στις μέρες μας οι πληθυσμοί ενός μεγάλου αριθμού πτηνών των αγροτικών περιοχών στην Ευρώπη παρουσιάζουν δραματική μείωση.

Στο παρακάτω σχήμα (Εικ. 1.6-1) φαίνεται η μείωση αυτή των πτηνών του αγρού όπως καταγράφηκε για την περίοδο 1970-1990.



Εικ. 1.6-1: Βαθμός μείωσης των πτηνών του αγρού στις χώρες της Ευρώπης κατά την περίοδο 1970-1990 (Δ14).

Από την εικόνα 1.6-1 φαίνεται ότι οι χώρες της Βορειοδυτικής Ευρώπης παρουσιάζουν μεγαλύτερες μειώσεις σε σχέση με τις χώρες της Μεσογείου αλλά και της Κεντρικής και Ανατολικής Ευρώπης. Μάλιστα οι χώρες της Ευρώπης μπορούν να χωριστούν σε 3 κύριες ομάδες, σύμφωνα με το βαθμό εντατικοποίησης της γεωργίας

και τη μείωση των πληθυσμών των πτηνών του αγρού. Η πρώτη ομάδα περιλαμβάνει τις δυτικές χώρες που λόγω της μεγάλης ανάπτυξης και εντατικοποίησης έως και βιομηχανοποίηση της γεωργίας παρουσιάζουν και τις μεγαλύτερες μειώσεις των πληθυσμών των πτηνών του αγρού. Η δεύτερη ομάδα περιλαμβάνει τις κεντρικές, ανατολικές και νότιες χώρες όπως η Ισπανία, η Πορτογαλία και η Ελλάδα όπου η μικρότερη εντατικοποίηση και η εκτατική γεωργία συνοδεύεται με μικρότερη μείωση των πληθυσμών των πτηνών ενώ η τρίτη ομάδα περιλαμβάνει τις Σκανδιναβικές χώρες όπου επικρατεί μια ενδιάμεση κατάσταση. Παρακάτω φαίνονται οι πληθυσμιακές μεταβολές ορισμένων ειδών πτηνών για το σύνολο των χωρών της Ευρώπης όπως προέκυψαν από δεδομένα του Πανευρωπαϊκού Προγράμματος Παρακολούθησης των Κοινών Ειδών Πτηνών (Pan-European Common Bird Monitoring Scheme) (Πίνακας 1.6-1).

Πίνακας 1.6-1: Πληθυσμιακές μεταβολές (%) 20 ειδών της ορνιθοπανίδας των αγροτικών οικοσυστημάτων στην Ευρώπη (Δ1)

Είδη πτηνών	Αλλαγή του πληθυσμού από το 1980-2002 στην Ευρώπη των 15 (%)	Αλλαγή του πληθυσμού από το 1982-2002 στην Ευρώπη των 15 (%)
Βραχοκιρκίνεζο	-14,7	-12,9
Καλημάνα	-63,5	-88,0
Τρυγόνι	-60,6	-57,5
Κουκουβάγια	-58,1	-38,2
Σταρήθρα	-39,7	-29,9
Σταυλοχελίδονο	-24,5	-12,6
Κιτρινοσουσουράδα	-34,1	-48,1
Καστανολαίμης	-14,6	-25,0
Θαμνοτσιροβάκος	25,0	26,1
Αετομάχος	57,1	175,6
Κουρούνα	19,4	14,4
Ψαρόνι	-48,7	-46,4
Φλώρος	15,7	10,8
Καρδερίνα	5,3	91,6

Φανέτο	-52,1	-34,0
Χρυσοτσιγλονο	-39,3	-43,3
Καλαμοτσιγλονο	-20,0	-12,5
Τσιφτάς	-66,2	-69,9

Πολλά από τα είδη πτηνών του αγρού στην Ελλάδα παρουσιάζουν τάσεις μείωσης την τελευταία δεκαετία. Ορισμένα από αυτά τα είδη είναι τα εξής: το τρυγόνι, η γαλιάντρα, η μικρογαλιάντρα, το σταυλοχελίδονο, οι κεφαλάδες, ο φλώρος, το φανέτο και ο τσιφτάς.

Εκτός από τα πτηνά έχει καταγραφεί μια πτώση στον πληθυσμό και άλλων κατηγοριών ειδών που βρίσκονται στα γεωργικά τοπία. Πολλά ζιζάνια έχουν μειωθεί στις πρόσφατες δεκαετίες και καταχωρούνται τώρα στα Red Data Books της Ευρώπης. Αυτή η μείωση των ζιζανίων σχετίζεται με τη μείωση των εξαρτώμενων από αυτά ειδών όπως είναι τα φυτοφάγα έντομα και κάποια είδη εδαφόβιων σκαθαριών τα οποία έχουν μειωθεί σε μερικές περιπτώσεις κατά 95% μέσα σε μια περίοδο 3 δεκαετιών. Ως τμήμα της τροφικής αλυσίδας, αυτή η πτώση επηρεάζει τα είδη που εξαρτώνται από αυτά όπως η καμπίσια πέρδικα (*Perdix perdix*). Πριν από το 1970, η πιο δραματική πτώση στα είδη και τις κοινότητες αφορούσε πιο εξειδικευμένα είδη όσον αφορά την τροφή και το βιότοπο τους. Παρόλα αυτά ακόμα και οι πληθυσμοί μη εξειδικευμένων ειδών όπως η σταρήθρα (*Alauda arvensis*) ή ο τσιφτάς (*Miliaria calandra*) έχουν μειωθεί (Tucker and Heath, 1994).

Μια παλαιότερη ανάλυση των στοιχείων για την τάση των πληθυσμών των πτηνών την περίοδο 1970-1990 που πραγματοποιήσαν οι Donald et al. (2002), στόχευε να αποδείξει τις επιδράσεις σε κλίμακα ηπείρου της εντατικοποίησης της γεωργίας στους πληθυσμούς των πτηνών του αγρού. Αργότερα οι Donald et al. (2006), ανέλυσαν στοιχεία που αφορούσαν την περίοδο 1990-2000 και αποσκοπούσαν στο να απαντήσουν στο ερώτημα αν αυτή η τάση συνεχίζεται μέσα στο χρόνο και το χώρο.

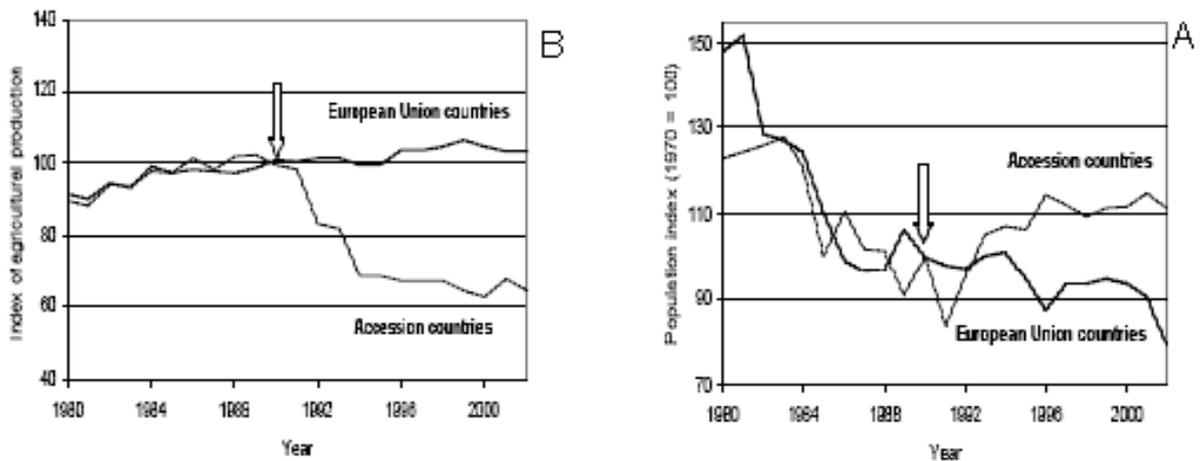
Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι παλαιότερες μειώσεις των πληθυσμών των πτηνών του αγρού σε όλη την Ευρώπη για την περίοδο 1970-1990 συνεχίζονται και για την περίοδο μεταξύ 1990 και 2000. Παρομοίως η τάση μακροχρόνιας μείωσης δεν διαπιστώθηκε στα είδη πτηνών άλλων τύπων βιοτόπων, γεγονός που δείχνει ότι οι μειώσεις στους πληθυσμούς των πτηνών του αγρού οφείλονται σε ειδικούς παράγοντες που αφορούν τον συγκεκριμένο βιότοπο (αγροτικό οικοσύστημα) και δεν αποτελούν μέρος μιας γενικότερης μείωσης των πληθυσμών των πτηνών σε ολόκληρη την

Ευρωπαϊκή ήπειρο. Η έντονη συσχέτιση μεταξύ των τάσεων μείωσης των πληθυσμών των πτηνών του αγρού με συγκεκριμένους δείκτες αγροτικής εντατικοποίησης και η έλλειψη μιας τέτοιας συσχέτισης με τους σταθερούς πληθυσμούς των άλλων κατηγοριών πτηνών δείχνουν ότι η εντατικοποίηση της γεωργίας είναι μια πιθανή αιτία της κατάστασης αυτής.

Ως πιθανά κύρια αίτια για την μείωση των πληθυσμών των πτηνών του αγρού στην Κεντρική και Βόρεια Ευρώπη έχουν προταθεί τα εξής (Δ2):

- 1) Η απώλεια των αυτοφυών φυτών που αποτελούν τροφή για τα πτηνά λόγω της εκτεταμένης χρήσης ζιζανιοκτόνων.
- 2) Η μείωση της ανοιξιάτικης καλλιέργειας. Η αλλαγή από την ανοιξιάτικη σπορά των σιτηρών στη φθινοπωρινή σπορά και η επακόλουθη απώλεια στα χειμωνιάτικα υπολείμματα της καλαμιάς (winter stubble) μετά το όργωμα.
- 3) Η εντατική χρήση των εντομοκτόνων, που μειώνει τους πληθυσμούς των ασπόνδυλων τα οποία αποτελούν τροφή για τα πτηνά.
- 4) Η μετατροπή του λιβαδιού σε καλλιεργήσιμο έδαφος και η επακόλουθη μείωση στους πληθυσμούς των εδαφιαίων ασπόνδυλων.
- 5) Η μείωση της διαθεσιμότητας των χώρων φωλιάσματος εξαιτίας της αφαίρεσης των φυτοφρακτών, δέντρων, θάμνων και φυσικής βλάστησης.
- 6) Η πτώχευση της γενικότερης βιοποικιλότητας των αγροτικών οικοσυστημάτων της Ευρώπης.
- 7) Η αύξηση των καλλιεργειών σιτηρών υψηλών εισροών (high-input cereal farming) εις βάρος των συστημάτων χαμηλότερων εισροών.
- 8) Η μείωση της ποικιλότητας βιοτόπων και αύξηση στο μέγεθος του αγρού σαν αποτέλεσμα των προηγούμενων αλλαγών και της αυξανόμενης εκμηχάνισης.

Στις χώρες που βρίσκονται προς ένταξη στην Ε.Ε. (κυρίως χώρες της ανατολικής Ευρώπης) τα πτηνά των αγρών δείχνουν από το 1990 σημάδια ανάκαμψης λόγω πολιτικών ανακατατάξεων που οδήγησαν στη μείωση της εντατικοποίησης της γεωργίας. Δεν υπήρξε παρόμοια ανάκαμψη πληθυσμού των πτηνών του αγρού στις χώρες τις ενταγμένες στην Ε.Ε. εξαιτίας της συνέχισης της εντατικοποίησης των καλλιεργειών. Τα στοιχεία αυτά φαίνονται στα παρακάτω διαγράμματα (Εικ. 1.6-2).



Εικ. 1.6-2: A: Επανάκαμψη των πληθυσμών των πτηνών του αγρού στις υπό ένταξη στην Ε.Ε χώρες το έτος 1990 και μετά σε σχέση με τις ήδη ενταγμένες, **B:** Μείωση της εντατικοποίησης της γεωργίας στις χώρες αυτές σε σχέση με τις ήδη ενταγμένες (Δ15).

Παρακάτω παρατίθενται δύο παραδείγματα χαρακτηριστικών πτηνών του αγρού που έχουν υποστεί μεγάλες μειώσεις στους πληθυσμούς τους τα τελευταία 20 χρόνια στην Αγγλία.

Ο δεντροσπουργίτης (*Passer montanus*), είναι το είδος που έχει υποστεί την πιο δραματική μείωση των πληθυσμών του στην Αγγλία, της τάξεως του 95%. Κύρια αιτία είναι η μείωση των αποθεμάτων σπόρων μέσω της καταστροφής των φυτών που τους παράγουν, συνήθως εξαιτίας της χρήσης ζιζανιοκτόνων. Αυτό έχει οδηγήσει σε μια πιθανή αύξηση στη θνησιμότητα των ώριμων ατόμων (Δ2).

Άλλο ένα είδος που αντιμετωπίζει μεγάλες δυσκολίες επιβίωσης στην Αγγλία είναι ο τσιφτάς ή καμποτσίγλονο (*Miliaria calandra*). Οι πληθυσμοί του έχουν μειωθεί κατά 85% λόγω σημαντικής μείωσης των αγρών κριθαριού που σπέρνονται την άνοιξη. Τα ενήλικα άτομα έχουν υποστεί απώλειες λόγω της μείωσης των υπολειμμάτων της καλλιέργειας των σιτηρών και της χρήσης των ζιζανιοκτόνων. Θεωρείται δε ότι η θνησιμότητα των ενήλικων ατόμων στους χειμωνιάτικους μήνες είναι η κύρια αιτία για τη μείωση αυτή (Δ2).

Η μείωση του πληθυσμού της καμπίσιας πέρδικας (*Perdix perdix*) φαίνεται πως συνδέεται με την αυξανόμενη θνησιμότητα νεοσσών ως αποτέλεσμα των μειώσεων των σημαντικότερων ασπόνδυλων θηραμάτων τους (Donald et al. 2002).

Τελικά απ' ότι φαίνεται η γεωργική εντατικοποίηση έχει πολλαπλή επιβλαβή επίδραση στους πληθυσμούς πτηνών σε πανευρωπαϊκή κλίμακα και πρέπει να θεωρηθεί ως απειλή για τη βιοποικιλότητα, συγκρινόμενη ακόμα και με την αλλαγή του

κλίματος και την ρύπανση του περιβάλλοντος σε ότι αφορά την δυνατότητά της να επιδρά σε τεράστιες περιοχές όπως για παράδειγμα σε επίπεδο ηπείρου (Donald et al. 2002).

1.6.1.2 Πτηνά του αγρού και ΦΠ

Τις τρεις τελευταίες δεκαετίες ένας μεγάλος αριθμός πτηνών του αγρού έχει αρχίσει να μειώνεται σε όλη την Ευρώπη εξαιτίας της εντατικής χρήσης ΦΠ.

Τα ΦΠ εκτός από τα είδη των παρασίτων-εχθρών μπορεί να έχουν επιπτώσεις και σε πολλούς οργανισμούς μη-στόχους. Σε ότι αφορά τα πτηνά, οι επιπτώσεις μπορούν να είναι άμεσες ή έμμεσες. Άμεσες είναι αυτές που οφείλονται στην πρόσληψη τροφής ή νερού ρυπασμένου με το ΦΠ και οδηγούν στο θάνατο ή σε αναπαραγωγικές ανωμαλίες του πτηνού. Οι έμμεσες επιπτώσεις αφορούν την μείωση ή και εξάλειψη των πηγών τροφής του πτηνού όπως για παράδειγμα την μείωση των ζιζανίων-πηγών τροφής για τα φυτοφάγα ή σποροφάγα πτηνά από την εφαρμογή ζιζανιοκτόνων ή των εντόμων-πηγών τροφής για τα εντομοφάγα πτηνά από την χρήση εντομοκτόνων (Barnett et al. 2004).

Παρόλη την έλλειψη στοιχείων για την άμεση επίδραση των ΦΠ στα πτηνά όπως στην περίπτωση των οργανοχλωριωμένων τις δεκαετίες του 1960 και του 1970, υπάρχουν πολλές ενδείξεις για την ύπαρξη έμμεσων επιδράσεων μέσω της ελάττωσης των αποθεμάτων τροφής. Μια έμμεση συνέπεια της επίδρασης των ΦΠ στους πληθυσμούς των ασπόνδυλων, που αποτελούν τροφή για τους νεοσσούς, και στο μέγεθος του αναπαραγόμενου πληθυσμού έχει ερευνηθεί στα πλαίσια μιας μελέτης για την καμπίσια πέρδικα (*Perdix perdix*) (Rands, 1985).

Σε μια άλλη έρευνα που έλαβε χώρα στην Αγγλία (Morris et al. 2005) επιλέχτηκε το χρυσοτσίχλονο (*Emberiza citrinella*) για να διερευνηθούν οι έμμεσες επιδράσεις των ΦΠ που εφαρμόζονται σε αρόσιμη αγροτική γη, στο μέγεθος του πληθυσμού και στην αναπαραγωγική και τροφική συμπεριφορά του είδους αυτού μια και αυτό αποτελεί ένα από τα πιο κοινά πτηνά του αγρού στην Αγγλία. Όλα αυτά μελετήθηκαν και ως προς τις αποκλίσεις στην διαθεσιμότητα των ασπόνδυλων οργανισμών που αποτελούν την τροφή του είδους αυτού. Βρέθηκε ότι η μείωση του πληθυσμού του άρχισε να συμβαίνει από τη δεκαετία του 1980 και μετά όταν άρχισε να αυξάνεται αλματωδώς η χρήση εντομοκτόνων στις καλλιέργειες. Το γεγονός αυτό μείωσε κατά μεγάλο ποσοστό την τροφή του που αποτελείτο από διάφορες τάξεις

αρθρόποδων όπως υμενόπτερα, προνύμφες λεπιδοπτέρων, αραχνοειδή και ορθόπτερα. Τα αποτελέσματα έδειξαν αρνητική σχέση της χρήσης των εντομοκτόνων με την επιβίωση των νεοσσών του συγκεκριμένου είδους. Ιδιαίτερα οι επιπτώσεις ήταν μεγαλύτερες κατά την περίοδο της αναπαραγωγής του είδους.

Ο τσιφτάς (*Miliaria calandra*), όπως αναφέρθηκε και πιο πάνω, παρουσιάζει μείωση των πληθυσμών του στην Βόρεια Ευρώπη από τη δεκαετία του 1960 και μετά, εξαιτίας της εντατικοποίησης της γεωργίας (Tucker and Heath, 1994). Ειδικότερα η μείωση αυτή φαίνεται να οφείλεται στην αυξημένη θνησιμότητα κατά την χειμερινή περίοδο, λόγω της μείωσης της διαθέσιμης τροφής και στη μειωμένη αναπαραγωγή λόγω της αυξημένης χρήσης ΦΠ (Stoate et al. 2000).

Ορισμένα από τα ΦΠ - κυρίως τα οργανοχλωριωμένα εντομοκτόνα - διατηρούνται για χρόνια. Η συγκέντρωσή τους από τρισεκατομμυριοστά που είναι στο νερό μπορεί να βιομεγενθυθεί 10^5 - 10^7 φορές στους ιστούς των ψαριών, πουλιών, θηλαστικών και ασπόνδυλων και να φθάσει σε εκατομμυριοστά (ppm) με επακόλουθο την εμφάνιση διαφόρων τοξικών εκδηλώσεων.

Από διαθέσιμα στοιχεία φαίνεται μία σημαντική αύξηση του αριθμού δηλητηριάσεων στα παραγωγικά ζώα (βοοειδή, αιγοπρόβατα) και στα πτηνά κυρίως από καρβαμικά.

Τα οργανοχλωριωμένα εντομοκτόνα αποτελούν μία από τις πλέον επικίνδυνες ομάδες ΦΠ για το οικοσύστημα. Τα προϊόντα αυτά προκαλούν σοβαρές τοξικές βλάβες στους χερσαίους αλλά και υδρόβιους οργανισμούς, όπως ανικανότητα αναπαραγωγής, υψηλή εμβρυική θνησιμότητα, παραμορφώσεις, τερατογενέσεις κ.λ.π.

1.6.2 Το ιαπωνικό ορτύκι (*Coturnix coturnix japonica*)

Θα παρουσιαστούν στοιχεία του ιαπωνικού ορτυκιού ως ο βιοδείκτης των πτηνών που χρησιμοποιήθηκε στον πειραματισμό.

Ομοταξία: Aves (Πτηνά)

Υπέρταξη: Carinate ή Neognathe

Τάξη: Galliformes (ορνιθόμορφα)

Οικογένεια: Phasianidae (φασιανίδες)

Το ορτύκι ανήκει στα ορνιθόμορφα πουλιά, στην οικογένεια των φασιανίδων, και στην υποοικογένεια των περδικίνων. Λέμε ορτύκι το κοινό, διότι υπάρχουν και άλλα δύο είδη, που δεν συναντάμε στην χώρα μας, το τριδάκτυλο ορτύκι (*Turnix sylvatica*) που σήμερα ζει στην Ισπανία, Πορτογαλία και το ορτύκι της Virginia (*Ortyx virginiana*) που ζει στην Αμερική.

Οι αρχαίοι Έλληνες αιχμαλώτιζαν τα ορτύκια με διάφορους τρόπους, χωρίς ιδιαίτερη δυσκολία. Μύθοι και θρύλοι πλάστηκαν γι' αυτό το μικρό αλλά ξεχωριστό πουλί. Ακόμη και ο πατέρας των Θεών Δίας, συνδέεται με το ορτύκι ...ερωτικά, όταν αυτό δεν ήταν πουλί, αλλά μία πανέμορφη νύμφη, η Ορτυγία. Η Ορτυγία δυστρόπησε στις ερωτικές ορέξεις του Δία και για να του ξεφύγει, μεταμορφώθηκε σε πουλί (ορτύκι) και πέταξε πάνω από το Αιγαίο. Ο Δίας την κυνήγησε, κι όταν αυτή κουράστηκε έπεσε και πνίγηκε. Στην ίδια θέση υψώθηκε μετά από λίγο ένα νησί, η Ορτυγία, η σημερινή Δήλος.

Στην χώρα μας έρχεται από την Αφρική τον Απρίλιο. Το ορτύκι έχει την τάση να κινείται βόρεια, από μια ανάγκη δεμένη με το ένστικτο, αλλά και τη βιολογία του. Όλες οι βαλκανικές χώρες φιλοξενούν ορτύκια από τη άνοιξη μέχρι και τις αρχές του φθινοπώρου, όπως και πολλές περιοχές της Πατρίδα μας (Δ3).

1.6.2.1 Περιγραφή-Ενδιαίτηματα-Βιολογία

Μέγεθος: 17-20 cm, Βάρος: 200-250 gr. Άνοιγμα φτερούγων: 32-35 cm.

Ο χρωματισμός του είναι φαιός με κιτρινωπές και καφέ ραβδώσεις. Ο φυλετικός διμορφισμός του δεν είναι ιδιαίτερα έντονος, αλλά η διάκριση των δυο φύλων γίνεται

σχετικά εύκολα από την ύπαρξη μιας σκουρόχρωμης (μαυριδεράς) βούλας στο λαιμό του αρσενικού κάτω ακριβώς από το ράμφος που λείπει στο θηλυκό. Επίσης το στήθος του αρσενικού έχει έντονο καστανό χρώμα ενώ στο θηλυκό είναι ξανθωπό με μικρά μαύρα στίγματα και ραβδώσεις. Την περίοδο της αναπαραγωγής στα ενήλικα αρσενικά διογκώνεται ένας αδένας που υπάρχει στην αμάρα ενώ στα θηλυκά είναι απών ή υποπλασμένος.

Τα πόδια του είναι κοντά και τα μετατόρσια του έχουν χρώμα καφέ κίτρινο σκούρο. Το φτέρωμα του σώματος του είναι διακοσμημένο με πινελιές άσπρες, που σπάζουν την μονοτονία των αποχρώσεων του καφέ και του κίτρινου. Η ουρά είναι μικρή, ενώ το κεφάλι του μοιάζει με εκείνο του νεοσσού κοτόπουλου (Εικ. 1.6-3).



Εικ. 1.6-3: Ορτύκι (*Coturnix coturnix japonica*, Φουντουλάκης Μ.).

Το ορτύκι συχνάζει κυρίως σε περιοχές με χαμηλή βλάστηση, σε χώρους ανοικτούς με λίγο χορτάρι, ιδιαίτερη προτίμηση στις καλλιεργημένες εκτάσεις με βρώμη, σίκαλη, σιτάρι, σουσάμι, τριφύλλι και στα μποςτάνια. Είναι είδος μονογαμικό, αλλά ορισμένες φορές συμπεριφέρεται σαν πολυγαμικό και κυρίως σε συνθήκες τεχνητής εκτροφής. Ωριμο αναπαραγωγικά καθίσταται σε ηλικία 6-8 μηνών. Η εποχή αναπαραγωγής αρχίζει με την άφιξη του στην Ευρώπη (μέσα Μάρτη) και λήγει τον Αύγουστο. Την άνοιξη μέχρι τα μέσα του καλοκαιριού, το ορτύκι ζευγαρώνει, στο έδαφος όπου κάνει και την φωλιά του. Την φωλιά την κατασκευάζει το θηλυκό σε κοιλότητες του εδάφους (3-8cm βάθος) και συνήθως στις άκρες των γεωργικών

καλλιεργειών με προτίμηση σε αυτές του σιταριού του τριφυλλιού του μποστανιού κ.α. Γεννά 2-3 φορές το χρόνο από 8-18 αυγά, κιτρινωπού χρώματος με κηλίδες που ποικίλουν από καφετιές, κιτρινοπράσινες έως κοκκινόμαυρες. Η επώαση διαρκεί 16-18 ημέρες και αρχίζει αμέσως μετά την γέννηση του τελευταίου αυγού. Οι νεοσσοί κινούνται αμέσως και κάνουν τα πρώτα πετάγματα σε ηλικία 10 ημερών. Σε ηλικία 40-45 ημερών, έχουν ολοκληρώσει την σωματική τους διάπλαση και είναι ικανά να αποδημήσουν. Το ορτύκι σε ελεγχόμενες συνθήκες εκτροφής (διατροφή, θερμοκρασία, φωτοπεριοδισμό) μπορεί να αρχίσει την ωοτοκία σε ηλικία 40 ημερών και να αποδώσει στη διάρκεια ενός έτους 250-280 αυγά, αριθμό ρεκόρ για όλα τα είδη των πτηνών. Στο φυσικό περιβάλλον το ορτύκι ζει συνήθως 8 χρόνια, ενώ στην αιχμαλωσία 12-13 χρόνια.

Πατρίδα του μπορεί να θεωρηθεί η Β. Αφρική. Είναι μεταναστευτικό είδος, διαχειμάζει στην Αφρική και την Δ. Ασία και αναπαράγεται στην Κ. και Ν. Ευρώπη (Βαλκανική χερσόνησο). Στη χώρα μας και ιδίως στη Βόρεια Ελλάδα, ένας σημαντικός αριθμός μένει για να αναπαραχθεί, ενώ ένα μέρος αυτού του πληθυσμού μένει και το χειμώνα. Από έρευνες που έγιναν σε γειτονικές χώρες (Βουλγαρία, Σερβία) διαπιστώθηκε ότι ένα μεγάλο ποσοστό από τα άτομα που αναπαράγονται σε ένα τόπο, επιλέγουν τον ίδιο τόπο για αναπαραγωγή τις επόμενες χρονιές. Οι εχθροί του πολλοί, όλα τα αρπακτικά, τα κορακοειδή, τα φίδια, οι σκαντζόχοιροι κ.λ.π.

Τις πολύ ζεστές μέρες του καλοκαιριού, το ορτύκι προτιμά τα δροσερά εδάφη, αλλά όχι και τα πολύ υγρά. Βρίσκει καταφύγιο στις αθέριστες ακόμη καλαμποκιές και βγαίνει στους αγρούς όταν δροσίσει για να φάει. Είναι είδος παμφάγο, το 90% της τροφής του αποτελείται από φυτικής προέλευσης είδη και το 10% από ζωικής. Η σύνθεση της τροφής του μεταβάλλεται σε σχέση με την εποχή του έτους. Την άνοιξη καταναλώνει σε μεγάλο ποσοστό έντομα (προνύμφες, νύμφες, τέλεια έντομα) και πράσινη τροφή, σύνθεση κατάλληλη για τις απαιτήσεις της αναπαραγωγής. Το καλοκαίρι αυξάνει την κατανάλωση σε σπόρους που είναι σε σχετική αφθονία (δημητριακά, αγρωστώδη κ.α.) και ταυτόχρονα εφοδιάζεται με περισσότερα αμυλώδη για τον σχηματισμό λίπους, που του είναι απαραίτητο για το ταξίδι του γυρισμού. Την τροφή του την βρίσκει στο έδαφος (πεσμένοι σπόροι κ.λ.π.) (Δ4).

1.6.3 Στοιχεία ανατομίας των πτηνών

Θα παρουσιαστούν στοιχεία της ανατομικής των πτηνών με στόχο την κατανόηση του πειραματισμού. Οι διαφοροποιήσεις – ιδιαιτερότητες των πτηνών επισημαίνονται με στόχο την κατανόηση της δομής και στο ορτύκι.

1.6.3.1 Αίμα

Το **αίμα** είναι ένα ιδιόμορφο και αρκετά εξειδικευμένο είδος ερευστικού ιστού, που αποτελείται από έμμορφα συστατικά, τα αιμοκύτταρα (ερυθρά αιμοσφαίρια, λευκά αιμοσφαίρια, αιμοπετάλια), τα οποία αιωρούνται μέσα στη ρευστή μεσοκυττάρια ουσία, το πλάσμα. Το αίμα κυκλοφορεί μέσα σε ένα κλειστό σύστημα αγγείων μεταφέροντας θρεπτικές ουσίες, άχρηστα προϊόντα μεταβολισμού, ορμόνες, γ-σφαιρίνες, ηλεκτρολύτες, οξυγόνο ενωμένο με την αιμοσφαιρίνη των ερυθρών αιμοσφαιρίων και CO₂. Το αίμα, ακόμη, ρυθμίζει τη θερμοκρασία του σώματος και μετέχει στη ρύθμιση της οσμωτικής και οξεοβασικής ισορροπίας των υγρών του οργανισμού. Τα λευκά αιμοσφαίρια μεταναστεύουν στον παριαγγειακό συνδετικό ιστό και μετέχουν στην κυτταρική και χημική ανοσία του οργανισμού, ενώ τα αιμοπετάλια παίζουν ενεργό ρόλο στην πήξη του αίματος (Μιχαήλ, 1997; Σμοκοβίτης, 1999).

Το **πλάσμα** του αίματος (55% του όγκου του αίματος) αποτελείται από νερό κατά 90%, πρωτεΐνες (ινωδογόνο, λευκοματίνες, σφαιρίνες), λιπίδια (ουδέτερα λίπη, λεκιθίνες, χοληστερόλη κλπ.), γλυκόζη, μη πρωτεϊνικές αζωτούχες ουσίες (αμινοξέα, ουρία, ουρικό οξύ, κρεατινίνη κ.λ.π., μεταλλικά άλατα, ιχνοστοιχεία και αέρια (O₂, CO₂, N₂). Από το πλάσμα του αίματος προέρχεται το υγρό των ιστών (Μιχαήλ, 1997; Σμοκοβίτης, 1999). Με το υγρό των ιστών μεταφέρονται στα κύτταρα θρεπτικά συστατικά και οξυγόνο, ενώ απομακρύνονται από αυτά άχρηστα προϊόντα του μεταβολισμού για να αποβληθούν ή χημικές ουσίες για να δράσουν μακριά από αυτά. Το υγρό των ιστών παροχετεύεται από τη μεσοκυττάρια ουσία με τα φλεβικά και τα λεμφοφόρα τριχοειδή στο αγγειακό δίκτυο.

Ο **ορός** είναι το υποκίτρινο υγρό, που απομένει μετά την πήξη του αίματος και από το οποίο λείπουν το ινωδογόνο και οι παράγοντες πήξεως.

Τα ερυθρά αιμοσφαίρια ή ερυθροκύτταρα σε ώριμη κατάσταση είναι εμπύρνα

στα πτηνά σε αντίθεση με τα θηλαστικά. Έχουν δισκοειδή μορφή στα πτηνά και εμφανίζουν μεγάλη ελαστικότητα. Ο αριθμός των ερυθροκυττάρων ποικίλει στα διάφορα ζώα ενώ στην όρνιθα είναι $2-3 \times 10^6/\text{mm}^3$ αίματος (Sisson et al. 1975; Μιχαήλ, 1997; Σμοκοβίτης, 1999; Frandson et al. 2003; Μάγρας και Αντωνόπουλος, 2004).

1.6.3.2 Νευρικό σύστημα

Το νευρικό σύστημα (nervous system) είναι το μέσο με το οποίο επιτυγχάνεται η συνεργασία διαφόρων οργάνων μεταξύ τους και το μέσο με το οποίο εξασφαλίζεται η επικοινωνία οργανισμού – περιβάλλοντος.

Το νευρικό σύστημα διακρίνεται στο εγκεφαλονωτιαίο νευρικό σύστημα και στο αυτόνομο νευρικό σύστημα.

Το εγκεφαλονωτιαίο νευρικό σύστημα ελέγχει εκείνες τις λειτουργίες του οργανισμού, που υπόκεινται στη βούληση. Διακρίνεται σε Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (Εγκέφαλος, Νωτιαίος Μυελός) και σε Περιφερικό Νευρικό Σύστημα (Νεύρα και Γάγγλια) (Μιχαήλ, 1996).

Το Αυτόνομο Νευρικό Σύστημα ελέγχει τις λειτουργίες, εκείνες, οι οποίες δεν υπόκεινται στη βούληση, όπως δηλαδή, οι κινήσεις των λείων μυών του στομάχου, της μήτρας κ.ά., του καρδιακού μυός, την έκκριση αδένων, κλπ. Διακρίνεται σε Συμπαθητικό, Παρασυμπαθητικό και σε Εντερικό Νευρικό Σύστημα (Langley, 1921).

1.6.3.2.1 Εγκέφαλος

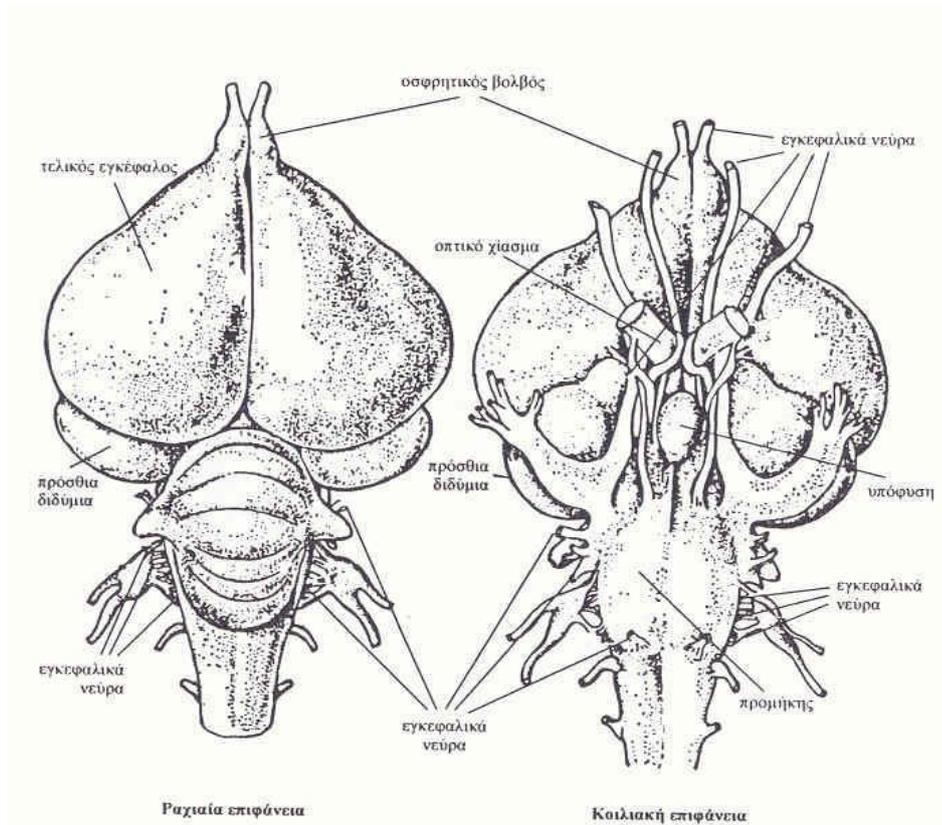
Ο εγκέφαλος αποτελείται από το *στέλεχος* (brainstem), την *παρεγκεφαλίδα* (cerebellum) και τα *εγκεφαλικά ημισφαίρια* (cerebral hemispheres).

Το στέλεχος συνδέεται με το νωτιαίο μυελό και ουσιαστικά ο νωτιαίος μυελός αποτελεί συνέχεια του στελέχους. Διακρίνεται, από εμπρός προς τα πίσω: α) από τον *προμήκη μυελό* (medulla oblongata), όπου εδρεύουν διάφορα αντανακλαστικά κέντρα που ελέγχουν και επηρεάζουν λειτουργίες του οργανισμού, β) από τη *γέφυρα* (pons) και τα *εγκεφαλικά στελέχη* (cerebral peduncles), από όπου διέρχονται κινητικές και αισθητικές οδοί, γ) από το *τετράδυμο πέταλο* (quadrigeminal), το οποίο διαιρείται σε τέσσερα λοφίδια, τα *διδύμια*, τα δύο πρόσθια εκ των οποίων σχετίζονται με την οπτική και τα δύο οπίσθια με την ακουστική οδό, δ) το *θάλαμο* (thalamus), ένα κομβικό σημείο για τις περισσότερες αισθητικές οδούς (οπτική, ακουστική, γευστική, σωματοαισθητική) και ε) τον *υποθάλαμο* (hypothalamus), ο φυσιολογικός ρόλος του οποίου είναι πολύπλευρος (Μιχαήλ, 1997).

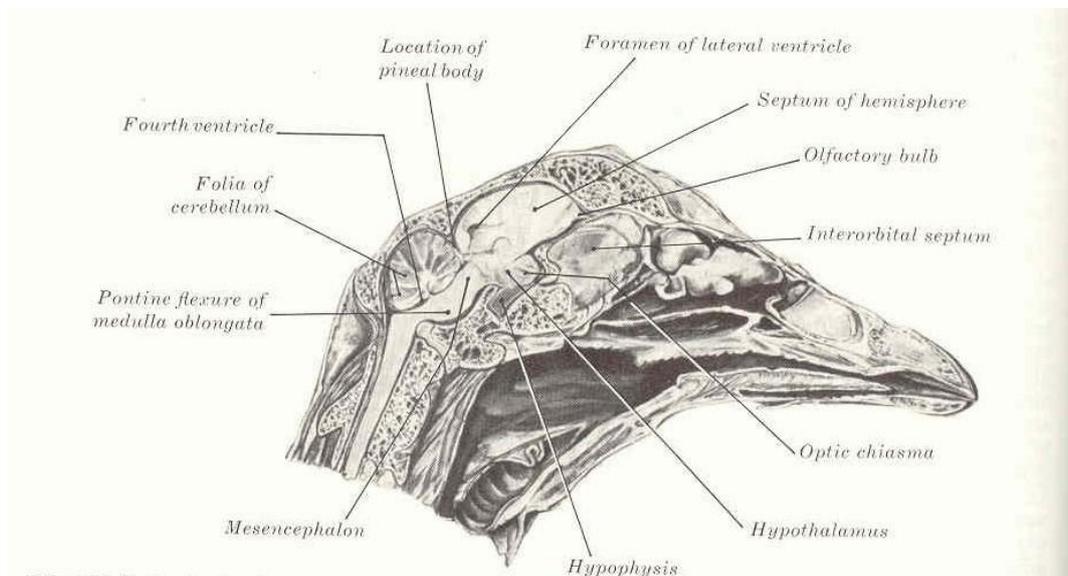
Τα πτηνά έχουν αναπτυγμένο μεσεγκέφαλο και παρεγκεφαλίδα.

Η *παρεγκεφαλίδα* αποτελείται από το μέσο τμήμα (σκώληκα) και δύο πλάγια ημισφαίρια. Σε περίπτωση βλάβης ενός εκ των ημισφαιρίων, προκαλούνται ανωμαλίες στην κίνηση του σώματος, ενώ το ζώο στρέφει το κεφάλι και τη σπονδυλική του στήλη προς την πλευρά του ανέπαφου ημισφαιρίου (Μιχαήλ, 1997).

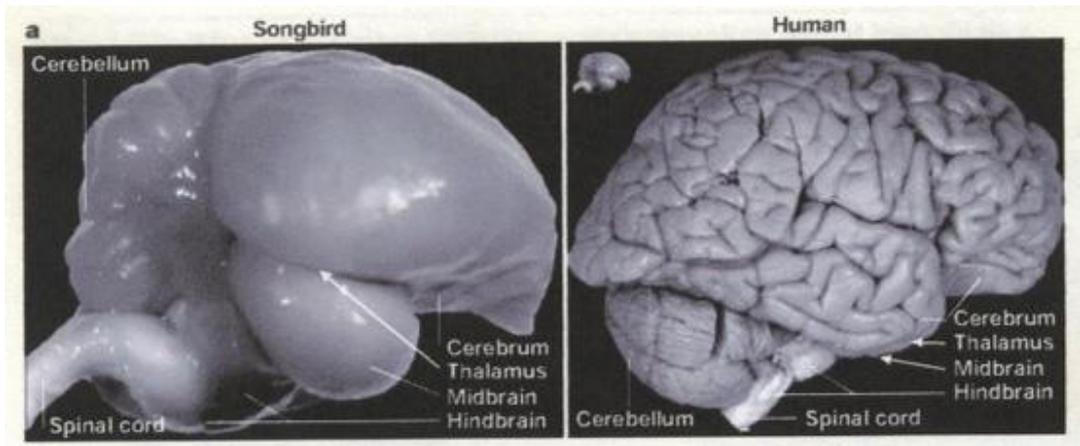
Τα *ημισφαίρια* του εγκεφάλου, αποτελούνται από τη *φαιά ουσία*, η οποία βρίσκεται περιφερικά (φλοιός), και από τη *λευκή ουσία*. Στην επιφάνεια των ημισφαιρίων, διακρίνονται *αύλακες*, μεταξύ των οποίων, παρατηρούνται σιγμοειδείς περιοχές, οι οποίες ονομάζονται *έλικες* (Μιχαήλ, 1997) (Εικ. 1.6-4 έως 1.6-8).



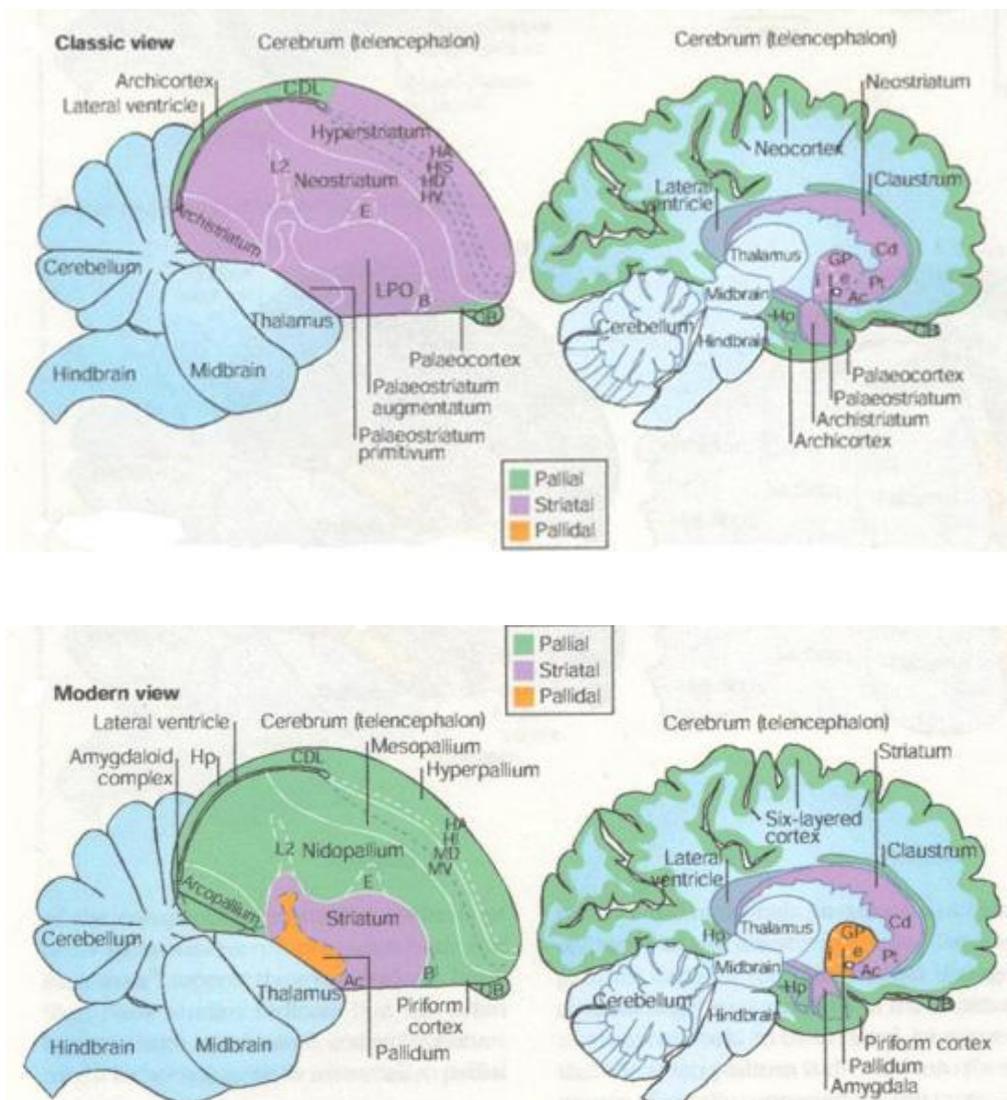
Εικ. 1.6-4: Εγκέφαλος πτηνών (Μάγρας, 1996).



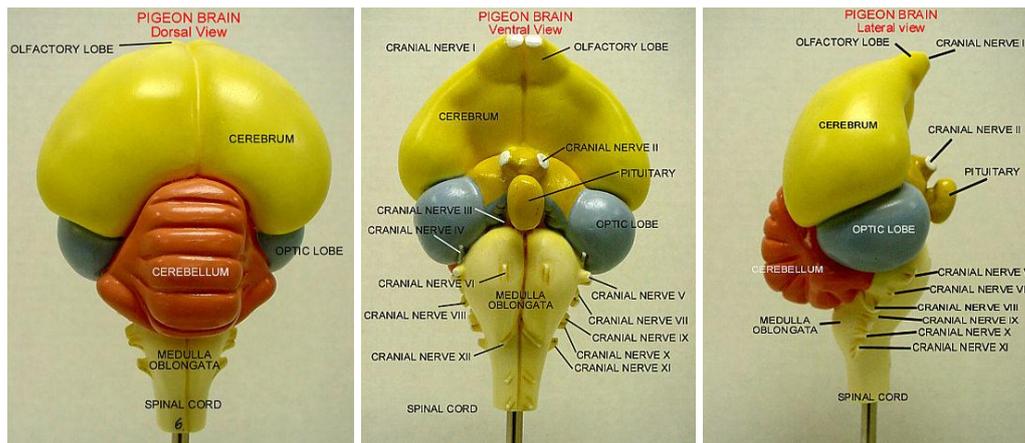
Εικ. 1.6-5: Εγκέφαλος πτηνών (Sisson et al. 1975).



Εικ. 1.6-6: Εγκέφαλος, *Taeniopygia guttata* (Zebra Finch) και ανθρώπου σε ίδια κλίμακα (Jarvis et al. 2005).



Εικ. 1.6-7: Σχέση τμημάτων εγκεφάλου πτηνών και θηλαστικών (Jarvis et al. 2005).



Εικ. 1.6-8: Πρόπλασμα εγκεφάλου πτηνών (περιστέρι) (Δ8).

1.6.3.2.2 Νωτιαίος Μυελός

Ο νωτιαίος μυελός (spinal cord) είναι αγωγός νευρικών ώσεων από τον εγκέφαλο προς τα νεύρα και αντίστροφα, και κέντρο αντανακλαστικών φαινομένων. Είναι κυλινδρικός, βρίσκεται μέσα στο σπονδυλικό σωλήνα, διασχίζεται από τον κεντρικό σωλήνα και περιβάλλεται από τις μήνιγγες (Μιχαήλ, 1997). Απολήγει με το μυελικό κώνο και συνεχίζει με το λεπτό τελικό νημάτιο. Παρουσιάζει 5 μοίρες, αντίστοιχες της σπονδυλικής στήλης (αυχενική, θωρακική, οσφυϊκή, ιερή και κοκκυγική) από τις οποίες εκφύονται οι αντίστοιχες συζυγίες νωτιαίων νεύρων (Μιχαήλ, 1997).

1.6.3.2.3 Αυτόνομο Νευρικό Σύστημα

Το Αυτόνομο Νευρικό Σύστημα ελέγχει τις λειτουργίες του οργανισμού που δεν υπόκεινται στη βούληση. Το Αυτόνομο Νευρικό Σύστημα, ωστόσο, δεν είναι εντελώς “αυτόνομο”, αλλά επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από το Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (Σμοκοβίτης, 1999).

Οι νευρικές ίνες του Αυτόνομου Νευρικού Συστήματος, ξεκινούν από κέντρα του στελέχους του εγκεφάλου ή του νωτιαίου μυελού και καταλήγουν σε γάγγλια του Αυτόνομου Νευρικού Συστήματος. Από εκεί ξεκινούν άλλες νευρικές ίνες οι οποίες απολήγουν στα όργανα, τη λειτουργία των οποίων ρυθμίζει το Αυτόνομο Νευρικό Σύστημα. Οι νευρικές ίνες οι οποίες ξεκινούν από τα κέντρα του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος ως τα γάγγλια του Αυτόνομου Νευρικού Συστήματος, λέγονται

προγαγγλιακές ίνες (preganglionic fibers), ενώ από τα γάγγλια ως τα όργανα, μεταγαγγλιακές ίνες (postganglionic fibers) (Σμοκοβίτης, 1999).

Το Αυτόνομο Νευρικό Σύστημα διακρίνεται στο *Παρασυμπαθητικό*, στο *Συμπαθητικό* και στο *Εντερικό* Νευρικό Σύστημα (Langley, 1921). Το Παρασυμπαθητικό και Συμπαθητικό Νευρικό Σύστημα, εμφανίζουν “ανταγωνιστική” δράση και αντίθετες επιδράσεις στη λειτουργικότητα ενός οργάνου. Ωστόσο, στην πράξη, τα δυο αυτά συστήματα συνεργάζονται αρμονικά, και η ανταγωνιστική τους δράση θα εκδηλωθεί μόνο αν υπάρξει ταυτόχρονη διέγερση και των δύο συστημάτων.

1.6.3.2.4 Παρασυμπαθητικό Νευρικό Σύστημα

Το *Παρασυμπαθητικό Νευρικό Σύστημα* (parasympathetic nervous system) αποτελείται από δύο μέρη, το κεφαλικό (cranial) και το ιερό (sacral) παρασυμπαθητικό. Στο πρώτο, οι πυρήνες των προγαγγλιακών ινών εντοπίζονται στο στέλεχος του εγκεφάλου, ενώ του δευτέρου, στο νωτιαίο μυελό της ιερής μοίρας. Οι προγαγγλιακές ίνες του κεφαλικού, συναντούν τις μεταγαγγλιακές ίνες σε παρασυμπαθητικά γάγγλια οι οποίες και απολήγουν σε περιοχές της κεφαλής (οφθαλμός, δακρυϊκός αδένας, κ.ά.). Άλλες ακολουθούν την πορεία του *πνευμονογαστρικού νεύρου* (vagus nerve), το οποίο αποτελεί και την κύρια οδό του Παρασυμπαθητικού Νευρικού Συστήματος, κι έτσι νευρώνονται τα περισσότερα όργανα της θωρακικής και κοιλιακής κοιλότητας (τραχεία, βρόγχοι, καρδιά, λεπτό έντερο, ήπαρ, πάγκρεας κ.ά.). Οι προγαγγλιακές ίνες του ιερού παρασυμπαθητικού, ακολουθούν την πορεία των ιερών νεύρων, αποσπώνται στη συνέχεια από αυτά και σχηματίζουν τα *πυελικά νεύρα*, τα οποία καταλήγουν σε παρασυμπαθητικά γάγγλια, για να καταλήξουν (οι μεταγαγγλιακές ίνες) σε όργανα της πυελικής κοιλότητας (απευθυσμένο, ουροδόχο κύστη, γεννητικά όργανα (Σμοκοβίτης, 1999).

Οι μεταγαγγλιακές ίνες διανύουν πολύ μικρή απόσταση από τα γάγγλια μέχρι το όργανο στο οποίο καταλήγουν. Πολλές φορές τα γάγγλια βρίσκονται επί της μεμβράνης των οργάνων που νευρώνουν ή / και η μεταγαγγλιακή ίνα, μέσα στο τοίχωμα των οργάνων (Σμοκοβίτης, 1999).

Διέγερση του παρασυμπαθητικού προκαλεί μείωση του αριθμού των καρδιακών παλμών, μείωση της δύναμης σύσπασης του μυοκαρδίου, μείωση αρτηριακής πίεσης του αίματος, αύξηση κινητικότητας τοιχώματος του γαστρεντερικού σωλήνα και της ουροδόχου κύστης, χάλαση σφιγκτήρων γαστρεντερικού σωλήνα και ουροδόχου

κύστης, στένωση βρόγχων, μείωση μεταβολισμού, υπογλυκαιμία, κλπ (Σμοκοβίτης, 1999).

1.6.3.2.5 Συμπαθητικό Νευρικό Σύστημα

Τα κέντρα του *Συμπαθητικού Νευρικού Συστήματος* (sympathetic nervous system) βρίσκονται στη θωρακοσφυϊκή μοίρα του νωτιαίου μυελού. Παράλληλα της σπονδυλικής στήλης, εντοπίζεται μια σειρά από γάγγλια, που συνιστούν το *συμπαθητικό στέλεχος*. Στα γάγγλια αυτά συνάπτονται ή διέρχονται – οπότε και συνάπτονται σε πιο περιφερικά συμπαθητικά γάγγλια – οι προγαγγλιακές ίνες, ενώ οι μεταγαγγλιακές ίνες καταλήγουν στα διάφορα όργανα. Το συμπαθητικό στέλεχος, καίτοι εκτείνεται σε όλο το μήκος της σπονδυλικής στήλης, οι προγαγγλιακές ίνες που φτάνουν σε αυτό προέρχονται από τη θωρακική και το πρώτο μέρος της οσφυϊκής μοίρας του νωτιαίου μυελού (Σμοκοβίτης, 1999).

Διέγερση του συμπαθητικού προκαλεί αύξηση του αριθμού των καρδιακών παλμών, αύξηση της δύναμης σύσπασης του μυοκαρδίου, αύξηση αρτηριακής πίεσης του αίματος, χάλαση τοιχώματος του γαστρεντερικού σωλήνα και της ουροδόχου κύστης, σύσπαση σφιγκτήρων γαστρεντερικού σωλήνα και ουροδόχου κύστης, μείωση έκκρισης αδένων του στομάχου, διάταση βρόγχων, αύξηση μεταβολισμού, υπεργλυκαιμία, αύξηση χρόνου πήξης του αίματος, κλπ. (Σμοκοβίτης, 1999).

1.6.3.2.6 Εντερικό νευρικό σύστημα

Η κινητικότητα του εντέρου αποσκοπεί στην ανάμειξη του περιεχομένου του με το εντερικό υγρό, καθώς επίσης με τα πεπτικά υγρά, το παγκρεατικό υγρό και τη χολή. Το εντερικό νευρικό σύστημα, διατρέχει τον πεπτικό σωλήνα από τον οισοφάγο έως την αμάρα των πτηνών και αποτελείται από το *μυεντερικό πλέγμα* ή *πλέγμα του Auerbach* (Auerbach's plexus) και το *υποβλενογόνιο πλέγμα* ή *πλέγμα του Meissner* (Meissner's plexus; Furness and Costa, 1987). Στα θηλαστικά, το μυεντερικό πλέγμα εντοπίζεται ανάμεσα στον κατά μήκος και στον κυκλικά προσανατολισμένο μυϊκό χιτώνα, ενώ στα πτηνά, εντοπίζεται μεταξύ της εξωτερικής κατά μήκος και της εξωτερικής κυκλικά προσανατολισμένης μυϊκής στιβάδας (Εικ. 1.6-9). Το υποβλενογόνιο πλέγμα, στα θηλαστικά, εκτείνεται στα όρια της κυκλικά προσανατολισμένης μυϊκής στιβάδας και του υποβλενογόνιου χιτώνα, ενώ στα πτηνά

εκτείνεται ανάμεσα στην εσωτερική κυκλικά και στην εσωτερική κατά μήκος προσανατολισμένη μυϊκή στιβάδα (Furness and Costa, 1987; Balaskas et al. 1995b).

Τα εντερικά πλέγματα εμφανίζονται σαν δίκτυα γιατί τα γάγγλια αλληλοσυνδέονται με νεύρα. Τα γάγγλια αποτελούνται από νευρώνες και κύτταρα γλοίας. Τα γαγγλιακά κύτταρα είναι πυκνά τοποθετημένα, χωρίς μεσοκυττάρους χώρους, μια δομή που θυμίζει τη δομή του εγκεφάλου. Κάθε γάγγλιο μπορεί να περιέχει από 2 έως και 1000 νευρώνες, που διακρίνονται ανατομικά στους τύπους Dogiel I, II, III και ηλεκτροφυσιολογικά σε S & AH (Furness and Costa, 1987; Taylor and Bywater, 1988). Τα κύτταρα γλοίας που απαντώνται στο εντερικό νευρικό σύστημα, μοιάζουν με αστροκύτταρα και περιβάλλουν νευρώνες, δημιουργώντας ένα περίβλημα στο γάγγλιο. Η διαφοροποίηση των κυττάρων σε νευρώνες και εντερική γλοία, συμβαίνει σχετικά αργά, κατά το εμβρυικό στάδιο. Εκφράζουν, όμως, αρκετά νωρίς, πρωτεΐνες, χαρακτηριστικές του εκάστοτε φαινοτύπου. Οι νευρικές ίνες που “φεύγουν” από τα γάγγλια καταλήγουν στο τοίχωμα του γαστρεντερικού σωλήνα.

Balaskas et al. 1995a,b) έχουν εντοπιστεί σε εντερικά νευρικά κύτταρα νεοσσού. Ομοίως, τα εντερικά νευρικά κύτταρα των θηλαστικών, εκφράζουν μια πληθώρα μεταβιβαστών οι οποίοι, συνήθως, απαντώνται πλέον του ενός, στο ίδιο κύτταρο, κάνοντας, έτσι, την κωδικοποίηση, πολύπλοκη (Furness et al. 1995; Sang and Young, 1996). Πέραν του ενός νευροδιαβιβαστές, συναντώνται και σε νευρικά κύτταρα του εντερικού νευρικού συστήματος, ενηλίκων πτηνών (Balaskas et al. 1995a).

2. Η κυτταρική μορφολογία (δίπολο, μονόπολο, κλπ) η οποία απεικονίζεται ασημί με εμπάπτιση (impregnation) ή με χρωστική κυανού του μεθυλενίου.

3. Η λεπτή υφή των κυττάρων.

4. Η ηλεκτροφυσιολογική συμπεριφορά των κυττάρων.

5. Η προβολή – εμφάνιση των κυττάρων, μετά τη χρήση ενδοκυτταρικών ανιχνευτών.

Οι εντερικοί νευρώνες διακρίνονται σε:

- Κινητικούς: Απολήγουν και ρυθμίζουν την απορρόφηση και την έκκριση των επιθηλιακών κυττάρων, την κινητικότητα των μυϊκών στιβάδων και τη ροή αίματος στο εντερικό τοίχωμα.

- Αισθητικούς: Μεταφέρουν πληροφορίες από το βλεννογόνο, τα αγγεία και τους μυς.

- Συνδετικούς: Εξασφαλίζουν την επικοινωνία μεταξύ νευρώνων στο ίδιο γάγγλιο, στο ίδιο πλέγμα και μεταξύ των δύο πλεγμάτων (Furness and Costa, 1987).

Προγαγγλιονικά παρασυμπαθητικά νεύρα απολήγουν στο μυεντερικό πλέγμα και προκαλούν διέγερση και αναστολή, ενώ παράλληλα, μεταγαγγλιονικά συμπαθητικά νεύρα απολήγουν στο υποβλεννογόνο πλέγμα και τις μυϊκές στιβάδες και προκαλούν αναστολή (Furness and Costa, 1987).

Στα πτηνά υπάρχουν ορισμένες σημαντικές διαφορές σε σχέση με τα κατοικίδια θηλαστικά.

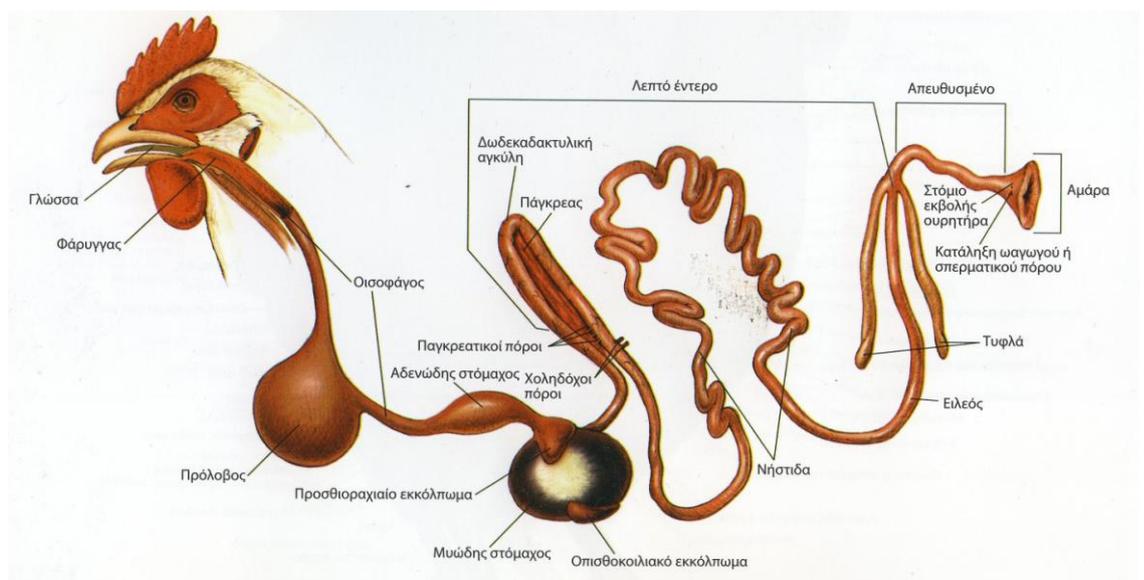
Όλα τα νωτιαία νεύρα εκφύονται κάθετα από το νωτιαίο μυελό. Ίππουρις δεν σχηματίζεται. Στο οσφυοϊερό όγκωμα του νωτιαίου μυελού ο κεντρικός σωλήνας διευρύνεται και σχηματίζει τον οσφυοϊερό κόλπο. Ο νωτιαίος μυελός κατά την είσοδό του από το ινιακό τρήμα στον κρανιακό βόθρο κάμπτεται κοιλιακώς και μεταβαίνει στον προμήκη μυελό. Ο προμήκης μυελός έχει μορφή αρκετά σφαιρική. Η γέφυρα και το τραπεζοειδές σώμα, καθώς και το μέσο παρεγκεφαλικό σκέλος δε διακρίνονται σαφώς. Τα πρόσθια διδύμια είναι πολύ ανεπτυγμένα, ενώ τα οπίσθια διδύμια δεν είναι

ευδιάκριτα. Οι οσφρητικοί βολβοί είναι μικροί και αιχμηροί. Η επιφάνεια του φλοιού των εγκεφαλικών ημισφαιρίων είναι λεία. Οι δύο πλάγιες κοιλίες είναι πολύ ευρείες προς τα πίσω, έτσι ώστε το πάχος του φλοιού, που αποτελεί το εξωτερικό τοίχωμά τους, να είναι πολύ περιορισμένο (Μάγρας και Αντωνόπουλος, 2004).

1.6.3.3 Πεπτικό σύστημα

Το πεπτικό σύστημα είναι υπεύθυνο για τη λήψη της τροφής, την πέψη των θρεπτικών ουσιών της και την απορρόφηση των προϊόντων της πέψης. Το πεπτικό σύστημα αποτελείται από τον πεπτικό σωλήνα και τους προσαρτημένους σε αυτόν αδένες όπως το ήπαρ και το πάγκρεας.

Το πεπτικό σύστημα των πτηνών αποτελείται από τον στοματοφάρυγγα, τον οισοφάγο, τον στόμαχο, τον εντερικό σωλήνα, την αμάρα και τους αδένες (Εικ. 1.6-10).



Εικ. 1.6-10: Πεπτικό σύστημα πτηνού (Μπαλάσκας και Μενεγάτος, 2008).

Το εσωτερικό του στόματος και το εσωτερικό του φάρυγγα αποτελεί μία σχεδόν κοινή κοιλότητα, τον στοματοφάρυγγα, επειδή λείπουν οι γλωσσοϋπερώιες καμάρες και η μαλακή υπερώα. Η δε σκληρή υπερώα εμφανίζει σχισμή (λυκόστομα) με αποτέλεσμα η όρνιθα να μην μπορεί να ρουφήξει υγρά, κι έτσι για να καταπιεί νερό ανεβάζει το κεφάλι.

Ο οισοφάγος πριν φτάσει στο θώρακα διευρύνεται και σχηματίζει ένα σακοειδές κόλπωμα, τον πρόλοβο, στον οποίο, εναποθηκεύεται και διαβρέχεται η τροφή και

γίνεται έτσι η προεργασία της πέψης. Ο πρόλοβος είναι δίλοβος στα περιστεροειδή. Τα περιστεροειδή κατά την αναπαραγωγική περίοδο σχηματίζουν στον πρόλοβο μία γαλακτώδη μάζα με την οποία τρέφουν τα νεογνά. Η ποσότητα και η έκκριση αυτού του γαλακτώδους υγρού ρυθμίζεται από την προλακτίνη. Πριν ανακαλυφθεί η μέθοδος μέτρησης των ορμονών με RIA, η προλακτίνη μετριόταν από τη μεταβολή που προκαλούσε στο βάρος του πρόλοβου των περιστεριών η υπό μέτρηση ουσία που περιείχε προλακτίνη.

Ο οισοφάγος συνεχίζει χωρίς εμφανή όρια με τον στόμαχο, που αποτελείται από ένα πρόσθιο τμήμα, τον αδενώδη στόμαχο και από ένα οπίσθιο τμήμα το μυώδη στόμαχο, ενώ μεταξύ αυτών υπάρχει ένα διάμεσο διάστημα. Ο πρώτος έχει σχήμα ωοειδές σάκου και είναι πλούσιος σε αδένες που εκκρίνουν γαστρικό υγρό. Οι τροφές πάνε στον δεύτερο για λιοτρίβιση τροφών (αυτό γίνεται τόσο στα σαρκοφάγα όσο και στα φυτοφάγα πτηνά) χάρη στα ισχυρά μυώδη τοιχώματα (μικρά λιθαράκια που υπάρχουν στην κοιλότητα του) και στον κερατοποιηθέντα βλεννογόνο. Στα αρπακτικά, σε αυτό το τμήμα αποθηκεύονται τα άπεπτα τμήματα της λείας (τρίχες, κόκκαλα, φτερά κλπ.). Αυτά στη συνέχεια γίνονται σβώλοι και αποβάλλονται από το στόμα. Πολλοί σπόροι που τρώνε τα πουλιά (π.χ., τα περιστέρια και ορνιθοειδής πτηνά) με μικρά κομμάτια αμμοχάλικου ενισχύουν την άλεση των τροφών (Λαζαρίδου, 1992; Μάγρας και Αντωνόπουλος, 2004).

Το λεπτό έντερο αποτελείται από το δωδεκαδάκτυλο, τη νηστίδα, τον ειλεό, και από το παχύ έντερο τα δύο τυφλά και το απευθυσμένο. Στο τέλος του δωδεκαδάκτυλου εκχύνεται το παγκρεατικό υγρό και η χολή από ίδιους πόρους. Στον εντερικό σωλήνα γίνεται το κυριότερο μέρος της πέψης.

Το δωδεκαδάκτυλο αποτελείται από μία ανιούσα και μία κατιούσα μοίρα, οι οποίες σχηματίζουν τη δωδεκαδακτυλική αγκύλη, που περιβάλλει το πάγκρεας.

Ο εντερικός βλεννογόμος εμφανίζει κυκλικές πτυχές και δακτυλιοειδείς προεκβολές, τις εντερικές λάχνες, οι οποίες αυξάνουν την απορροφητική επιφάνεια του οργάνου (Εικ. 1.6-11). Το επιθήλιο του βλεννογόνου του λεπτού εντέρου είναι μονόστιβο κυλινδρικό και αποτελείται από τα κυλινδρικά ή απορροφητικά κύτταρα και από τα εκκριτικά κύτταρα που παράγουν βλέννη ή εκκρίνουν ορμόνες. Μεταξύ των εντερικών λαχνών εκβάλλουν οι αδένες του εντέρου, οι οποίοι εκκρίνουν το εντερικό υγρό. Η εκκριτική δραστηριότητα των αδένων του εντέρου διεγείρεται από μηχανικά ερεθίσματα, όπως είναι η διάταση του τοιχώματος του εντέρου, και από τις γαστρεντερικές ορμόνες που είναι η χοληκυστοκίνη, η σεκρετίνη και το

αγγειοκινητικό πολυπεπίδιο του εντέρου. Το έκκριμα των αδένων του εντέρου, είναι αλκαλικό και εξουδετερώνει τον όξινο χυμό του στομάχου, περιέχει ένζυμα για την πέψη των θρεπτικών ουσιών της τροφής και προστατεύει το επιθήλιο του εντέρου (Λαζαρίδου, 1992; Μάγρας και Αντωνόπουλος, 2004).



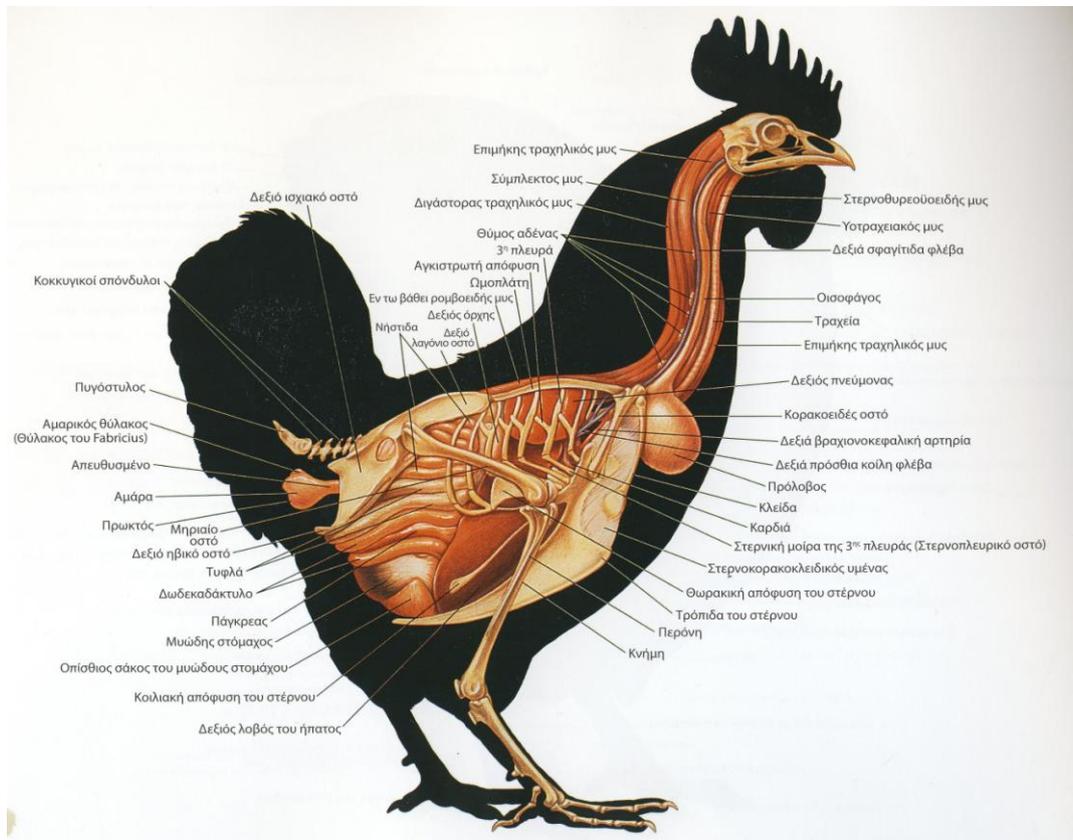
Εικ. 1.6-11: Εγκάρσια τομή εντερικών λαχνών του *Nothura maculosa* (Spotted tinamou). Λάχνη (EP), επιμήκως προσανατολισμένος μυϊκός χιτώνας (MI) κυκλικώς προσανατολισμένος μυϊκός χιτώνας (Mc), βλεννογόνος μυϊκός χιτώνας (muscularis mucosae; MM) (Chikilian and de Speroni, 1996).

Αμέσως μετά το λεπτό έντερο σχηματίζονται δύο τυφλά, τα κοιλικά τυφλά. Η μεγάλη ανάγκη για συνεχή τροφοδότηση ενέργειας έχει ως αποτέλεσμα τη γρήγορη πέψη, ώστε τα άπεπτα προϊόντα να αποβάλλονται γρήγορα και να μη βαραίνουν το ζώο κατά την πτήση, πράγμα που θα σήμαινε απώλεια ενέργειας. Πολύ υψηλό επίπεδο μεταβολισμού έχουν τα στρουθιόμορφα, το κολίμπρι και οι σταχτάρες. Τα περιττώματα του πεπτικού και του ουροποιητικού συστήματος αποβάλλονται διαμέσου μιας κοινής κοιλότητας που λέγεται αμάρα (Λαζαρίδου, 1992).

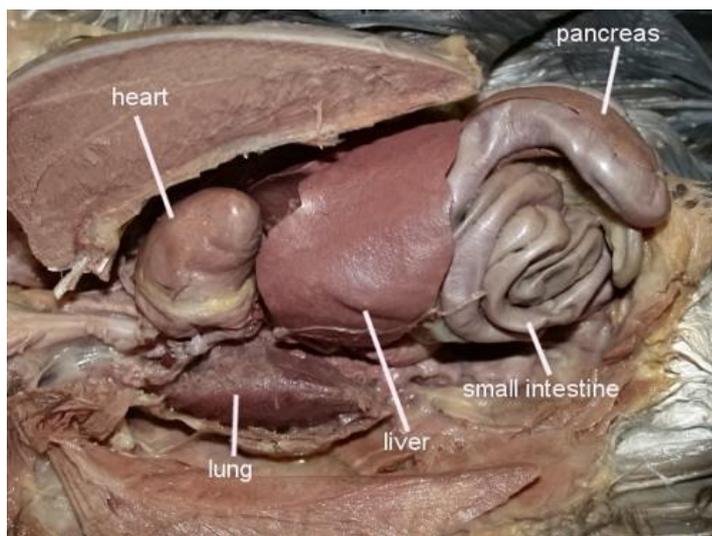
Το **ήπαρ** είναι ο μεγαλύτερος και σημαντικότερος αδένας του σώματος του ζώου. Παράγει τη χολή και συμμετέχει σε πάρα πολλές λειτουργίες, όπως π.χ. στην αποθήκευση αίματος, βιταμινών και σιδήρου, στην παραγωγή ερυθροκυττάρων κατά την εμβρυϊκή ζωή, στη σύνθεση παραγόντων πήξης του αίματος, ουρίας, ηπαρίνης και στην απομάκρυνση φαρμάκων, τοξικών ουσιών, ασβεστίου κλπ.

Το ήπαρ καλύπτει την καρδιά από τα δύο πλάγια και παρουσιάζει δύο λοβούς,

τον αριστερό και τον δεξιό. Η οπίσθια κοίλη φλέβα περνάει μέσα από τα δεξιά λοβό. Στην οπίσθια επιφάνεια του ήπατος βρίσκεται η χοληδόχος κύστη (Λαζαρίδου, 1992; Μάργας και Αντωνόπουλος, 2004) (Εικ. 1.6-12, 13).

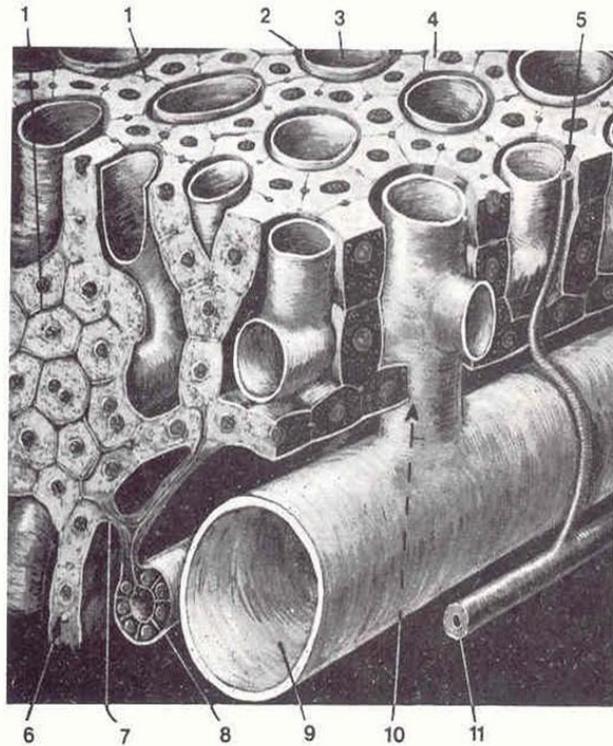


Εικ. 1.6-12: Ηπαρ σε σχέση με τοπογραφία άλλων σπλάχνων *in situ*, σκελετού και τραχηλικών μυών πετεινού (Μπαλάσκα και Μενεγάτος, 2008).



Εικ. 1.6-13: Ηπαρ και άλλα όργανα περιστεριού (Δ13). Σημειωτέον ότι το περιστέρι δεν έχει χοληδόχο κύστη.

Η πυλαία φλέβα είναι το λειτουργικό αγγείο του ήπατος, το οποίο φέρνει αίμα από τον στόμαχο, τον σπλήνα, το πάγκρεας και το έντερο. Με το αίμα της πυλαίας φλέβας περνούν υποχρεωτικά μέσα από το ήπαρ όλες οι θρεπτικές ουσίες, που απορροφούνται από το έντερο και στο ήπαρ, είτε αποθηκεύονται, είτε χρησιμοποιούνται για τη σύνθεση άλλων ουσιών. Το αίμα, που φθάνει στο ήπαρ με την πυλαία φλέβα ή με την ηπατική αρτηρία (τροφικό αγγείο), εγκαταλείπει το όργανο με τις ηπατικές φλέβες, οι οποίες εκβάλλουν στην οπίσθια κοίλη ή φλέβα (Εικ. 1.6-14).

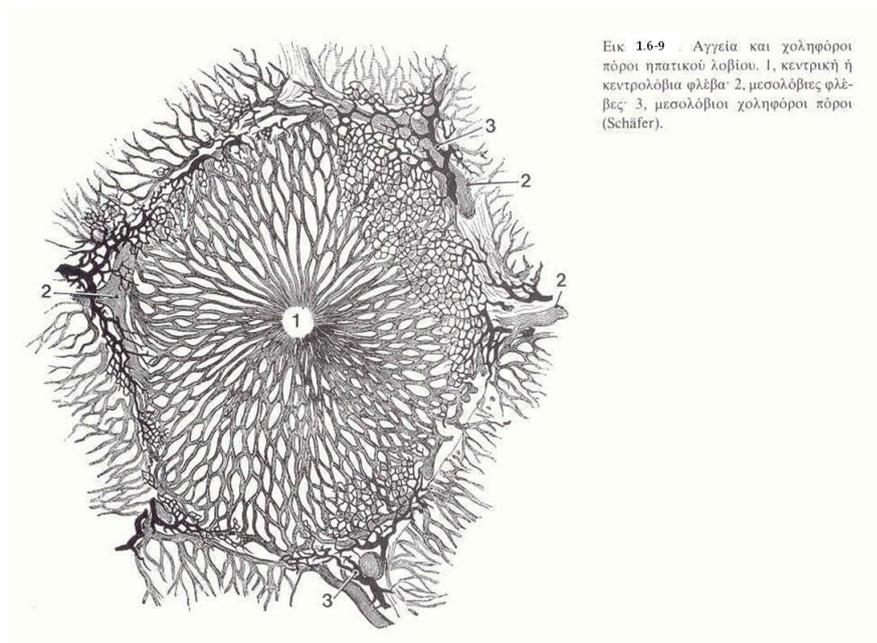


Εικ. 1.6-8 Στερεογραφική παράσταση της υφής του ήπατος. 1, χοληφόρα σωληνάρια· 2, περιτριχοειδής χώρος του Disse· 3, κολπώδη τριχοειδή· 4, ηπατικά κύτταρα· 5, ενδολόβιο τριχοειδές της ηπατικής αρτηρίας· 6, αφοριστικό πέταλο του ηπατικού λοβίου· 7, πόροι του Hering· 8, μεσολόβιος χοληφόρος πόρος· 9, μεσολόβιος κλάδος πυλαίας φλέβας· 10, προσαγωγό φλέβιο ηπατικού λοβίου· 11, μεσολόβιος κλάδος ηπατικής αρτηρίας. (H. Elias και J.C. Sherrick).

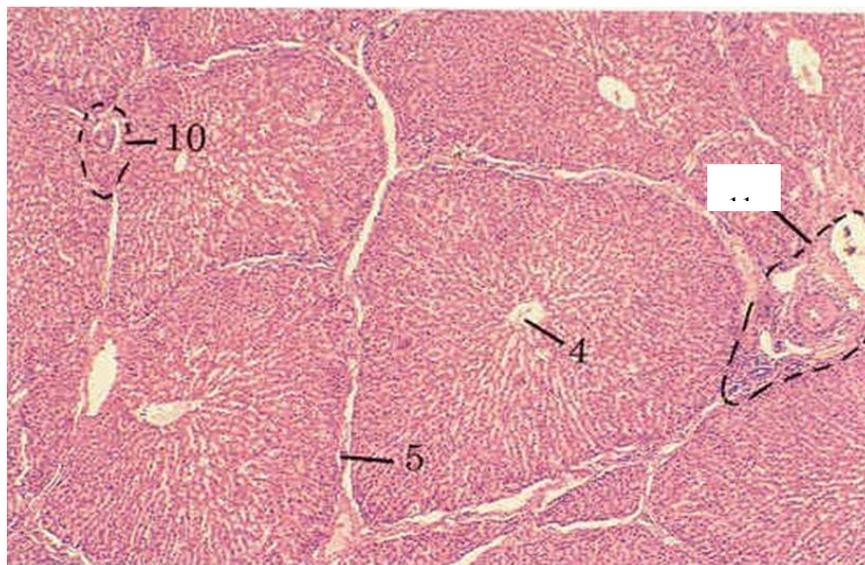
Εικ. 1.6-14: Στερεογραφική παράσταση της υφής του ήπατος (Μιχαήλ, 1996)

Από άποψη λεπτής κατασκευής το ήπαρ, διαιρείται με το μεσολόβιο συνδετικό ιστό σε ηπατικά λόβια, τα οποία έχουν εξαγωνικό σχήμα και αποτελούν την ανατομική μονάδα του οργάνου. Μέσα στο ηπατικό λόβιο εισέρχονται κλάδοι της πυλαίας φλέβας και αναλύονται σε κολπώδη τριχοειδή. Τα κολπώδη τριχοειδή σχηματίζουν ένα τρισδιάστατο δίκτυο μεταξύ των ηπατικών κυττάρων του λοβίου και τελικά αθροίζονται στο κέντρο του σε ένα κοινό φλεβικό στέλεχος την κεντρολόβια φλέβα. Οι κεντρολόβιες φλέβες αποτελούν την αρχή των ηπατικών φλεβών. Τα ηπατικά κύτταρα αποτελούν την έδρα των πολύπλοκων λειτουργιών του ήπατος και παράγουν τη χολή, η οποία διοχετεύεται στα χοληφόρα σωληνάρια. Τα χοληφόρα σωληνάρια σχηματίζουν ένα δεύτερο τρισδιάστατο δίκτυο μέσα στο ηπατικό λόβιο, που όμως δεν έρχεται σε

επαφή με το δίκτυο των κολπωδών τριχοειδών. Από τα χοληφόρα σωληνάρια θα προέλθουν μεγαλύτερα σωληνάρια και από αυτά ο χοληδόχος πόρος, που εκβάλλει στο δωδεκαδάκτυλο (Sisson et al. 1975; Λαζαρίδου, 1992; Frandson et al. 2003; Μάγρας και Αντωνόπουλος, 2004) (Εικ. 16-15, 16).



Εικ. 1.6-15: Ηπατικό λόβιο (Μιχαήλ, 1996)



Εικ. 1.6-16: Ηπατικά λόβια. 4, κεντρολόβιος φλέβα, 5, συνδετικός ιστός, 10, ηπατική φλέβα, 11, σύνολο ηπατικών αγγείων (αρτηρίες φλέβες και χοληφόρα αγγεία) (Bacha and Bacha, 2000).

1.7 Οι ιχθύες

Οι υδρόβιοι οργανισμοί των υδάτινων συστημάτων παρουσιάζουν εξαιρετική ποικιλία και περιλαμβάνουν κατηγορίες από μονοκύτταρους μικροοργανισμούς μέχρι τεράστια κητώδη είδη.

Οι πολυάριθμοι υδρόβιοι οργανισμοί και οι βιογεωχημικοί κύκλοι των υδάτινων συστημάτων καθιστούν τα υδάτινα αποθέματα ακρογωνιαίο παράγοντα ζωής και βιοποικιλότητας των οικοσυστημάτων στον πλανήτη μας. Από αυτή την άποψη η ρύπανση των υδάτινων πόρων και των υδάτινων εκτάσεων μπορεί να επηρεάσει άμεσα την εξέλιξη των βιολογικών συστημάτων (πανίδα και χλωρίδα) και έμμεσα τον ανθρώπινο πολιτισμό που στηρίζεται στην αξιοποίηση και χρήση του νερού για την επιβίωσή του.

1.7.1 Ρύπανση των Υδάτινων Συστημάτων

Σήμερα η ρύπανση των υδάτινων συστημάτων είναι πρωταρχικής σημασίας και η πρόληψη της ρύπανσης των νερών κατέχει πρώτη θέση στις προτεραιότητες διεθνών και εθνικών φορέων προστασίας του περιβάλλοντος (Σκούλλος, 1987; Clark, 1997; Φυτιάνος, 2003).

Οι κυριότερες μορφές ρύπανσης των υδάτινων συστημάτων είναι αποτέλεσμα των βιομηχανικών και αστικών αποβλήτων, των βαρέων μετάλλων και μεταλλοειδών, των αλογονωμένων και πολυαλογονωμένων ουσιών, των ΦΠ και των λιπασμάτων, της νιτρορύπανσης, των πετρελαιοειδών, των ραδιενεργών υλικών, των ουσιών που δρουν ως ενδοκρινικοί διαταράκτες, των αποβλήτων μεταλλευτικών εκμεταλλεύσεων και μεγάλο αριθμό επικίνδυνων υλικών που παρασέρνονται από τα ποτάμια και τους χείμαρρους καταλήγοντας στη θάλασσα (Κουϊμτζής κ.ά, 2002).

Η απαγόρευση χλωριωμένων ουσιών λόγω των επιπτώσεων στους βιολογικούς οργανισμούς έχει ξεκινήσει από το 1972 με την απαγόρευση του **DDT** στις ΗΠΑ και μετά σε άλλες χώρες (παρά τη σημαντική συμβολή στην καταπολέμηση επιδημιών), των **PCBs** από το 1979 (ΗΠΑ) και την αφύπνιση για τις επιπτώσεις των διοξινών μετά την έκρηξη στο Seveso (Μιλάνο, 1976). Τελικά, με τη σύμβαση της Στοκχόλμης τέθηκαν οι βάσεις για τον περιορισμό και την απαγόρευση των παρακάτω ουσιών: το εντομοκτόνο εδάφους **Aldrin**, το διαδεδομένο εντομοκτόνο **Chlordane**, ρύθμιση των αποθεμάτων DDT που χρησιμοποιούνται σε μερικές χώρες για την καταστολή των εξάρσεων ελονοσίας, το εντομοκτόνο **Dieldrin**, περιορισμό των **διοξινών**

(Polychlorinated dibenzo-para-dioxins) που παράγονται ως παραπροϊόντα σύνθεσης άλλων χημικών ουσιών αλλά κυρίως στα καυσαέρια καύσης ορυκτών καυσίμων, βιομάζας κλπ, τα **πολυχλωριωμένα φουράνια** (Polychlorinated dibenzofurans, PCBFs) προϊόντα καύσης αποβλήτων, καυσαέρια οχημάτων, κλπ, το εντομοκτόνο και τρωκτικοκτόνο **Endrin**, το μυκητοκτόνο **εξαχλωροβενζόλιο** (Hexachlorobenzene, HCB) και παραπροϊόν παρασκευής **τετραχλωράνθρακα** κ.λπ, το εντομοκτόνο εδάφους **Heptachlor**, το εντομοκτόνο **Mirex**, τα πολυχλωριωμένα διφαινύλια (διηλεκτρικά υγρά σε συμπυκνωτές) και το εντομοκτόνο **Toxaphene** (Ritter et al. 1995).

Η ρύπανση του εδάφους και των υδάτινων συστημάτων από ΦΠ έχουν γίνει στόχος πολυάριθμων ερευνών και συντονισμένων προγραμμάτων σε όλες τις αναπτυγμένες χώρες. Παρόμοιες έρευνες έχουν επικεντρωθεί σε ιστούς και όργανα ζώων και φυτών για να μελετηθεί η διείσδυση των ενεργών συστατικών των ΦΠ και τους μηχανισμούς βλαβών στα έμβια ζώα. Τα περισσότερα ΦΠ αναστέλλουν ενζυμικές λειτουργίες, προκαλούν οξειδωτικό stress ή βλάβες στο πρωτεϊνικό υπόστρωμα των ενζύμων και στο DNA (Simonich and Hites, 1995).

Η εξαιρετικά αργή βιοαποικοδόμηση των ΦΠ και η διατήρησή τους επί μακρόν στα περιβαλλοντικά διαμερίσματα δημιούργησε εκτεταμένη διασυννοριακή ρύπανση (θάλασσες, λιμναία και ποτάμια συστήματα), ενώ και υψηλές συγκεντρώσεις σε όργανα και ιστούς ζώων βρέθηκαν στους πόλους και σε απομακρυσμένες περιοχές. Η βασικότερη αιτία είναι η μαζική χρήση πολυχλωριωμένων εντομοκτόνων (Wania and Mackay, 1996).

Οι συγκεντρώσεις, ιδιαίτερα των χλωριωμένων και πολυχλωριωμένων οργανικών ουσιών, που συσσωρεύονται στους λιπώδεις ιστούς των ζώων επιφέρουν σημαντικές βλάβες στην υγεία τους, ιδιαίτερα μέσω εμπλοκής με ενζυμικούς μεταβολισμούς, αλλά και βλάβες στο αναπαραγωγικό και το ανοσοποιητικό σύστημα (Fujiyama, 1981).

Οι οργανοχλωριωμένες ουσίες, λόγω του ότι παραμένουν σε υδρόβιους οργανισμούς για μεγάλο χρονικό διάστημα, αποτελούν βιοδείκτες ρύπανσης και διασυννοριακής μεταφοράς ρύπων ανά την υφήλιο. Τα τελευταία χρόνια έχουν δημιουργηθεί δίκτυα παρακολούθησης σε παράκτιες περιοχές που επικεντρώνονται στις οργανοχλωριωμένες ενώσεις σε διάφορα όργανα των υδρόβιων οργανισμών, αλλά και σε απομακρυσμένες περιοχές, όπως η Αρκτική, στις οποίες η ρύπανση μεταφέρεται με τον άνεμο από την εκτεταμένη χρήση ζιζανιοκτόνων και εντομοκτόνων στις γεωργικές καλλιέργειες (Aguilar et al. 2002).

Τα ΦΠ είναι κατηγορία περιβαλλοντικών ρύπων που βρίσκονται σε υψηλές συγκεντρώσεις στα νερά πολλών ποτάμιων, λιμναίων και παράκτιων περιοχών, ως αποτέλεσμα της έκπλυσης υπολειμμάτων από τις γεωργικές εκμεταλλεύσεις. Σημαντικές ποσότητες ΦΠ απαντούν και σε υπόγεια νερά, που σε ορισμένες περιοχές χρησιμοποιούνται για συστήματα υδροδότησης (Sheets, 1980; Nimmo, 1985).

Τα ΦΠ έπαιξαν σημαντικό ρόλο στην αύξηση της γεωργικής παραγωγής των τελευταίων δεκαετιών. Παρά τις διαφωνίες που έχουν προκύψει για τη ρύπανση του περιβάλλοντος και των τροφίμων από ΦΠ, δεν έχει γίνει δυνατή η αντικατάστασή τους. Τα τελευταία χρόνια έχουν δημιουργηθεί τρεις τάσεις: η τμηματική αντικατάσταση και απαγόρευση των πιο τοξικών και μη βιοδιασπώμενων ΦΠ, η εισαγωγή νέων βιοδιασπώμενων ΦΠ και χαμηλότερης τοξικότητας και η διαμόρφωση τεχνικών ολικής διαχείρισης παρασίτων και ζιζανίων με την IPM με ανάμεικτες τεχνικές, αγρανάπαυση, ανθεκτικότερα είδη, δολωματικά εντομοκτόνα, βιολογικές πρακτικές (Integrated Pesticide Management, IPM). Παρόλα αυτά η ρύπανση του περιβάλλοντος, ιδιαίτερα των υδάτινων συστημάτων, από ΦΠ παραμένει ένα σοβαρό πρόβλημα της περιβαλλοντικής τοξικολογίας (U.S. EPA, 1988).

Σημαντικός αριθμός ινστιτούτων περιβαλλοντικών μελετών και ερευνητών έχουν επικεντρωθεί στην παρακολούθηση της περιβαλλοντικής ρύπανσης από ΦΠ και μεταβολιτών τους σε διάφορες περιοχές και υδάτινα συστήματα, τη μελέτη της τοξικής δράσης των ΦΠ και της επίδρασης στα έμβια όντα, της βιοσυσσώρευσης μέσω της τροφικής αλυσίδας, καθώς και των προβλημάτων οικοτοξικολογίας σε ευαίσθητους βιολογικούς οργανισμούς και οικοσυστήματα (Nimmo and McEwen, 1999).

1.7.2 Η ιριδοειδής πέστροφα (*Oncorhynchus mykiss* Waldbauds)

Θα παρουσιαστούν στοιχεία της ιριδοειδούς πέστροφας ως ο βιοδείκτης των ψαριών που χρησιμοποιήθηκε στον πειραματισμό.

Ομοταξία: Οστειχθύες (Osteichthyes)

Υποομοταξία: Actinopterygii

Τάξη: Acipenseriformes

Υπόταξη: Salmonoidei

Οικογένεια: Salmonidae

Η οικογένεια των σαλμονιδών είναι μια από τις σπουδαιότερες οικογένειες των ψαριών του γλυκού νερού. Η σπουδαιότητά τους οφείλεται τόσο στην προτίμησή τους

από τους ερασιτέχνες ψαράδες, όσο και στη μεγάλη εμπορικότητα που παρουσιάζουν λόγω της χρησιμότητάς τους σαν τροφή στον άνθρωπο. Τα είδη της οικογένειας αυτής είναι ενδημικά του βορείου ημισφαιρίου. Εντούτοις μερικά είδη έχουν εισαχθεί μ' επιτυχία στο νότιο ημισφαίριο, όπου παρουσίασαν ικανοποιητικό εγκλιματισμό και και ανάπτυξη. Υπάρχουν 7 συνολικά είδη στα ευρωπαϊκά νερά, από τα οποία 4 έχουν εισαχθεί από τη Β. Αμερική. Περιλαμβάνει ψάρια μέσου μέχρι μεγάλου μεγέθους, με πλήρη κάλυψη του σώματός τους από μικρά κυκλικά λέπια και ευδιάκριτη πλευρική γραμμή (Νεοφύτου, 1997).

Τα είδη αυτά είναι σαρκοφάγα και η ωοτοκία τους λαμβάνει χώρα το χειμώνα. Τ' αυγά μετά την ωρίμανσή τους πέφτουν στην υπογάστριο κοιλότητα. Το γεγονός αυτό καθιστά εύκολη τόσο τη λήψη των αυγών όσο και την τεχνητή γονιμοποίησή τους.

Όλη η οικογένεια σχετίζεται με υδάτινους βιότοπους δροσερούς, διαυγείς, πλούσιους σε οξυγόνο (πλησίον του σημείου κορεσμού) και με χαλικώδη πυθμένα. Επίσης περιλαμβάνει τόσο ψάρια μεταναστευτικά (ανάδρομα) όσο και μη μεταναστευτικά τα οποία ζουν στις λίμνες και τα ποτάμια (ποταμόδρομα).

Η ιριδοειδής πέστροφα εισήχθη από τη Β. Αμερική σε πάρα πολλές χώρες και είναι αυτή που εκτρέφεται στα ενυδρεία. Το σχήμα του σώματός της μοιάζει με αυτό της ευρωπαϊκής πέστροφας. Το κεφάλι συνήθως είναι μικρό σε σχέση με το μέγεθός του, αλλά μπορεί να ποικίλει με το στάδιο ωριμότητας και το φύλο (Νεοφύτου, 1997).

Η ανάπτυξη της ιριδίζουσας πέστροφας είναι ταχεία εφόσον τρέφεται με κατάλληλη τροφή. Τον πρώτο χρόνο το μήκος της φτάνει κάτω από τις ευρωπαϊκές συνθήκες εκτροφής 10-15 cm, ενώ στη χώρα μας με μεγάλη διάρκεια περιόδου ανάπτυξης τα 17-22 cm. Το σύνηθες μήκος της στη φύση είναι 25-35 έως 70 cm.

Το είδος αυτό είναι ψάρι με λαμπερούς και άφθονους χρωματισμούς. Ο χρωματισμός του προς τη ραχιαία περιοχή είναι σκούρος κυανοπράσινος ή γκριζοπράσινος. Οι πλευρές έχουν ωχρό χρωματισμό με έντονη ροδόχροη ή πορφυροειδή ιριδίζουσα λωρίδα, η οποία υπάρχει κατά μήκος κάθε πλευράς από την κεφαλή μέχρι την ουρά. Η κοιλιακή περιοχή είναι φωτεινότερη και συνήθως ασημένια. Το κεφάλι, η ραχιαία περιοχή, οι πλευρές, το ραχιαίο, πλάγιο και ουραίο πτερύγιο καλύπτονται από μικρές σκούρες κηλίδες. Τα πλευρικά και κοιλιακά πτερύγια έχουν έντονο φωτεινό καστανόγκριζο ή ροδοχρίζοντα χρωματισμό (Νεοφύτου, 1997) (Εικ. 1.7-1, 2).



Εικ. 1.7-1: Ιριδοειδής πέστροφα (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, Φουντουλάκης Μ.).



Εικ. 1.7-2: Ιριδοειδής πέστροφα (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum; Robin, 1989).

1.7.3 Ανατομία των ιχθύων

Θα παρουσιαστούν στοιχεία της ανατομικής των ψαριών με στόχο την κατανόηση του πειραματισμού. Οι διαφοροποιήσεις – ιδιαιτερότητες των ψαριών επισημαίνονται με στόχο την κατανόηση της δομής και στο ορτύκι.

1.7.3.1 Νευρικό σύστημα

1.7.3.1.1 Εγκέφαλος

Τα ψάρια έχουν αρκετά μικρό εγκέφαλο αναλογικά με το μέγεθος του σώματός τους και συγκρινόμενα με άλλα σπονδυλωτά, τυπικά το 1/15 της μάζας εγκεφάλου ενός πουλιού ή θηλαστικού με το ίδιο μέγεθος. Η δομή του εγκεφάλου αποκαλύπτει μία σειρά από λοβούς ή περιοχές. Κάθε περιοχή ή λοβός τείνει να έχει ένα καθορισμένο λειτουργικό ρόλο, μολονότι σε μερικές περιοχές του εγκεφάλου ενσωματώνονται αρκετά αισθητικά συστήματα (Εικ. 1.7-3, 4) (Sasai and De Robertis, 1997).

Στο πρόσθιο μέρος υπάρχει ένα ζεύγος οσφρητικών λοβών, ένα δομικό ζευγάρι που δέχονται και επεξεργάζονται σήματα από τους ρώθωνες δια μέσου των δυο οσφρητικών νεύρων. Οι οσφρητικοί λοβοί απολήγουν στον τελεγκέφαλο (telechephalon), και υπάρχουν νευρικές συνδέσεις με το μέσο εγκέφαλο (midbrain) και μερικές απευθείας με τον υποθάλαμο. Οι οσφρητικοί λοβοί είναι πολύ μεγάλοι στα ψάρια τα οποία κυρίως κυνηγούν με την οσμή. Εποπρόσθετα, θεωρείται ότι μία από τις λειτουργίες τους είναι η αισθητική υποδοχή της διέγερσης από φερομόνες φύλου που στην συνέχεια επεξεργάζονται οι ιχθύς στον τελεγκέφαλο ν. Υπάρχουν όμως αποδείξεις ότι στον τελεγκέφαλο ελέγχονται και άλλες λειτουργίες όπως η αναπαραγωγή, η μάθηση και η μνήμη. Βλάβη του τελεγκέφαλου συνήθως επιδρά σε μείωση της ικανότητας των ψαριών να μάθουν συγκεκριμένες αποστολές. Σε μερικές περιπτώσεις ίσως απωλέσουν την ικανότητα να εκτελέσουν αποστολές που έχουν ήδη μάθει (Sasai and De Robertis, 1997).

Ο διεγκέφαλος (diencephalon) είναι η περιοχή του εγκεφάλου που περιλαμβάνει τον επιθάλαμο, τον θάλαμο και τον υποθάλαμο και εκτελεί ένα αριθμό λειτουργιών που σχετίζονται με τις ορμόνες και την ομοιοστασία (Sasai and De Robertis, 1997). Στον επιθάλαμο γίνεται ο έλεγχος της έκκρισης της μελατονίνης (melatonin), ορμόνης απαραίτητης για τη ρύθμιση του κύκλου ημέρας:νύκτας, ανάλογα με το είδος του

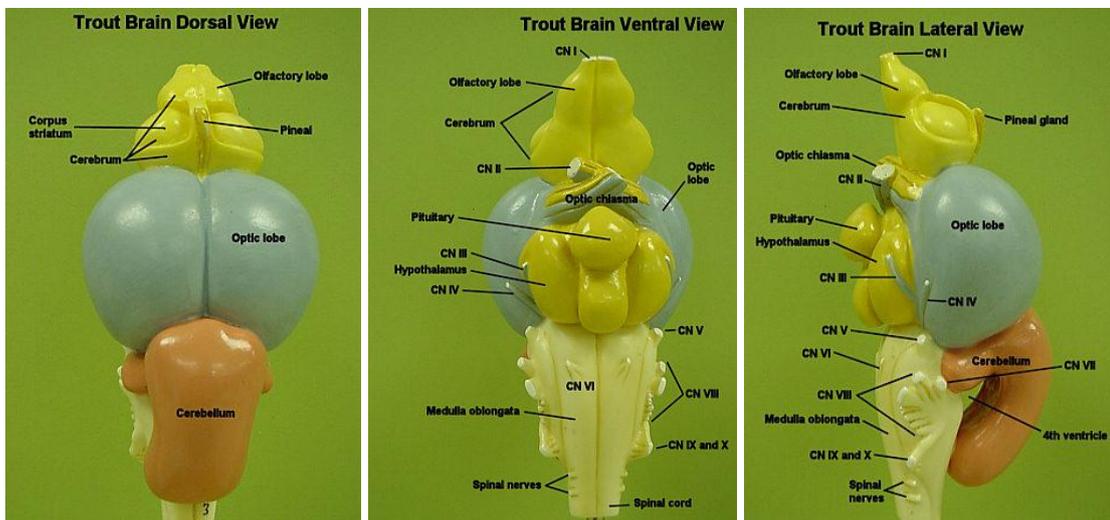
ψαριού. Οποιαδήποτε επίδραση στην έκκριση της επηρεάζει τον κύκλο ημέρας:νύκτας επηρεάζοντας ακόμα και την αναπαραγωγή και εκτροφή. Στο υποθάλαμο ενσωματώνεται η δράση του αυτόνομου νευρικού συστήματος.

Ο μεσεγκέφαλος ή μέσος εγκέφαλος (mesencephalon or midbrain) περιέχει τους δυο οπτικούς λοβούς. Αυτοί είναι μεγαλύτεροι σε είδη που κυνηγούν με την όραση (Sasai and De Robertis, 1997).

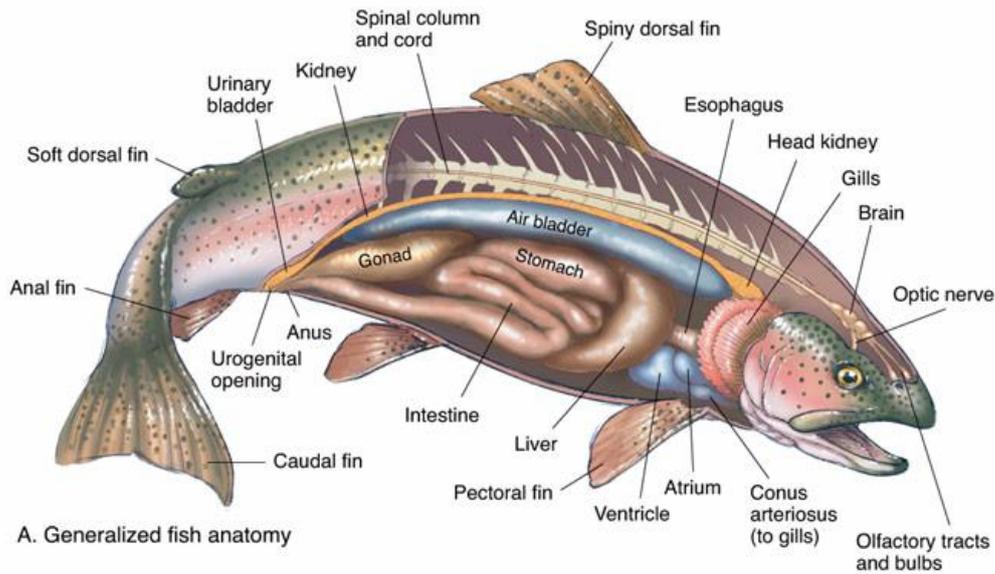
Η παρεγκεφαλίδα δέχεται ερεθίσματα που σχετίζονται με αλλαγές στην συμπεριφορά στην κολύμβηση. Έτσι αυτή η περιοχή του εγκεφάλου λαμβάνει ερεθίσματα άμεσα ή έμμεσα από όλα τα αισθητήρια συστήματα. Ανατομικά έχει την πιο ποικιλόμορφη δομή στον εγκέφαλο, είναι πολύ μεγάλη, και καταλαμβάνει το μεγαλύτερο μέρος του εγκεφάλου (Sasai and De Robertis, 1997). Αφαίρεση της παρεγκεφαλίδας επιδρά στην ικανότητα των ψαριών να έχουν ισοροπημένη κίνηση.

Η προμήκης μυελός (medulla oblongata) είναι η περιοχή του εγκεφάλου που βρίσκεται πιο κοντά με το νωτιαίο μυελό ενώ είναι δύσκολο να διακριθεί από αυτόν.

Στο συμπαθητικό νευρικό σύστημα οι συνάψεις στα γάγγλια είναι χολινεργικές αλλά οι μεταγαγγλιακοί νευρώνες είναι κατεχολαμινεργικοί (νοραδρεναλίνη και αδρεναλίνη) (Jobling, 1995).



Εικ. 1.7-3: Πρόπλασμα εγκεφάλου πέστροφας (Δ9)



Εικ. 1.7-4: Ανατομία ψαριών (Δ10)

1.7.3.2 Πεπτικό σύστημα

Περιγράφεται μόνο το ήπαρ γιατί αυτό ενδιαφέρει από άποψη τοξικολογικών δοκιμών.

Ήπαρ

Το ήπαρ είναι ένας μεγάλος αδένας που σε ορισμένα είδη μπορεί να φτάσει το 20% του σωματικού τους βάρους και βρίσκεται είτε πάνω είτε γύρω από το στομάχι (Εικ. 1.7-4). Συνήθως είναι δίλοβο αλλά μπορεί να είναι και μονόλοβο όπως στο σολομό, ή και τρίλοβο όπως στο σκουμπρί. Η λειτουργικότητά του περιλαμβάνει την έκκριση χολής, την αποθήκευση γλυκογόνου και πολλές άλλες βιοχημικές λειτουργίες (Νεοφύτου, 1997).

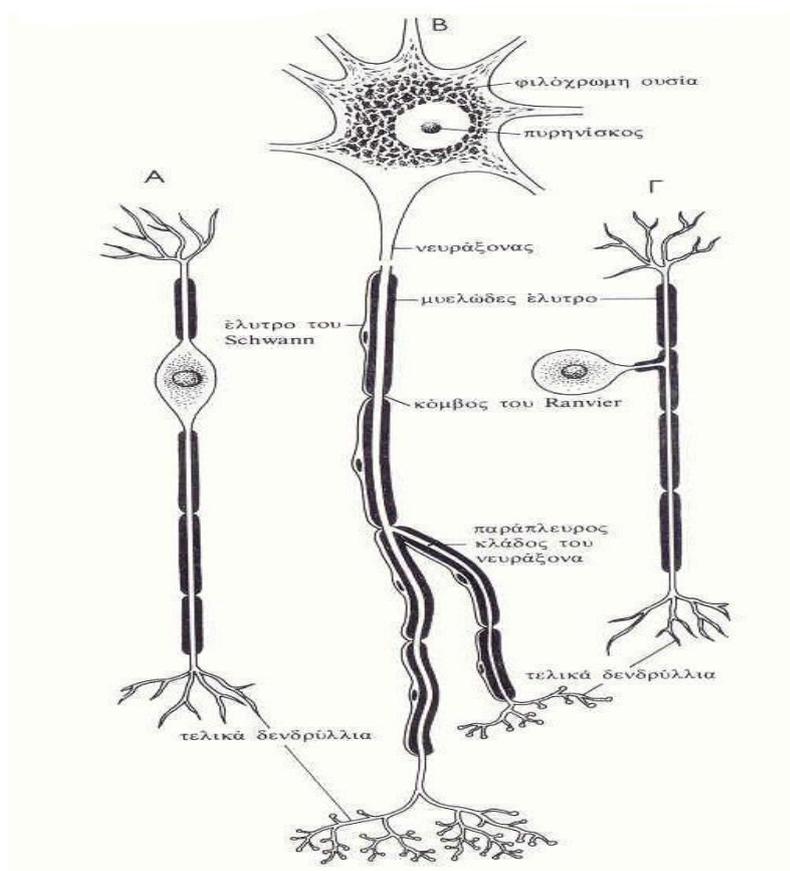
1.8 Νευρικό ιστός

Θα παρουσιαστούν στοιχεία του νευρικού ιστού ως με στόχο την κατανόηση του πειραματισμού αφού αποτελούν το στόχο των OPs.

Ο νευρικός ιστός (nervous tissue) αποτελείται από: α) τα νευρικά κύτταρα (ή νευρώνες) και β) τη γλοία (νευρογλοιακά κύτταρα ή νευρογλοία). Τα νευρικά κύτταρα χρησιμεύουν για την πρόσληψη, την αγωγή και τη μεταβίβαση των διεγέρσεων. Η λειτουργία τους εξαρτάται από δύο ουσιώδεις ιδιότητες του πρωτοπλάσματος του νευρικού κυττάρου: τη διεγερσιμότητα και την αγωγιμότητα. Τα κύτταρα γλοίας παρεμβάλλονται ανάμεσα στα νευρικά κύτταρα (Μιχαήλ, 1996).

1.8.1 Νευρικό κύτταρο

Το νευρικό κύτταρο ή νευρώνας (Εικ. 1.8-1, nerve cell ή neuron), είναι ειδικευμένο μορφολογικά και φυσιολογικά για την αγωγή νευρικών ώσεων. Τη διαβίβαση, δηλαδή, “πληροφοριών” από την περιφέρεια προς το κέντρο και “εντολών” από το κέντρο προς την περιφέρεια (Σμοκοβίτης, 1999).



Εικ. 1.8-1: Νευρικό κύτταρο (Μιχαήλ 1996).

Το νευρικό κύτταρο αποτελείται από 3 σαφώς διακριτά τμήματα, καθένα εκ των οποίων επιτελεί διαφορετικές δραστηριότητες. Τα τμήματα του νευρικού κυττάρου είναι: α) το *σώμα* (soma) του κυττάρου, β) οι *δενδρίτες* (dendrites), βραχείες, συνήθως, αποφυάδες του σώματος του νευρικού κυττάρου, που διακλαδίζονται όλο και σε μικρότερους κλάδους, και γ) ο *νευράξονας* ή *νευρίτης* (axon), η πιο επιμήκης αποφυάδα του νευρικού κυττάρου, με ποικίλο μήκος και πάχος, κύρια λειτουργία του οποίου είναι η αγωγή των νευρικών ώσεων. Η διάμετρος του άξονα μικραίνει προοδευτικά ενώ κατά μήκος του, εκφύονται τα *παράπλευρα “κλωνία”*, με τα οποία επικοινωνεί με γειτονικά νευρικά κύτταρα. Ο νευρίτης διακλαδίζεται στα *τελικά* ή *αξονικά δενδρόλλια* (telodendria) και αυτά με τη σειρά τους απολήγουν σε μικρές διογκώσεις, τα *τελικά κομβία* (terminal buttons), με τα οποία τα νευρικά κύτταρα επικοινωνούν μεταξύ τους (Σμοκοβίτης, 1999) (Εικ. 1.8-1).

Ο νευρίτης με ένα ή δύο έλυτρα, που τον περιβάλλουν, αποτελεί μια νευρική ίνα (nerve fiber). Οι νευρικές ίνες του περιφερικού νευρικού συστήματος περιβάλλονται από το *έλυτρο του Schwann*. Ίνες που έχουν και δεύτερο έλυτρο, εσωτερικά το πρώτου, (μυελώδες έλυτρο), λέγονται *εμμύελες* και οι υπόλοιπες *αμύελες*. Τα έλυτρα αυτά διακόπτονται κατά τόπους, σε σημεία που αποκαλούνται *κόμβοι του Ranvier* (nodes of Ranvier). Έτσι ο νευρίτης είναι σε αυτά τα σημεία μερικώς ακάλυπτος (Σμοκοβίτης, 1999).

Ο πυρήνας των νευρικών κυττάρων είναι μεγάλος και υποστρόγγυλος. Εντοπίζεται, κυρίως, στο κέντρο του σώματος του κυττάρου. Ο πυρηνίσκος είναι επίσης μεγάλος και, στους μεγάλους νευρώνες, ευδιάκριτος (Σμοκοβίτης, 1999).

Σε ιστολογικά παρασκευάσματα, το κυτταρόπλασμα παρουσιάζει ένα χαρακτηριστικά βασίφιλο συστατικό, που ονομάζεται *φιλόχρωμη ουσία* ή *ουσία του Nissl* ή *σωμάτια του Nissl* (chromophilic substance, Nissl substance, Nissl bodies). Ο τρόπος κατανομής της φιλόχρωμης ουσίας αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα για τους διάφορους τύπους νευρώνων ενώ πιθανολογείται ότι σχετίζεται με την πρωτεϊνοσυνθετική ικανότητά τους (Μιχαήλ, 1996).

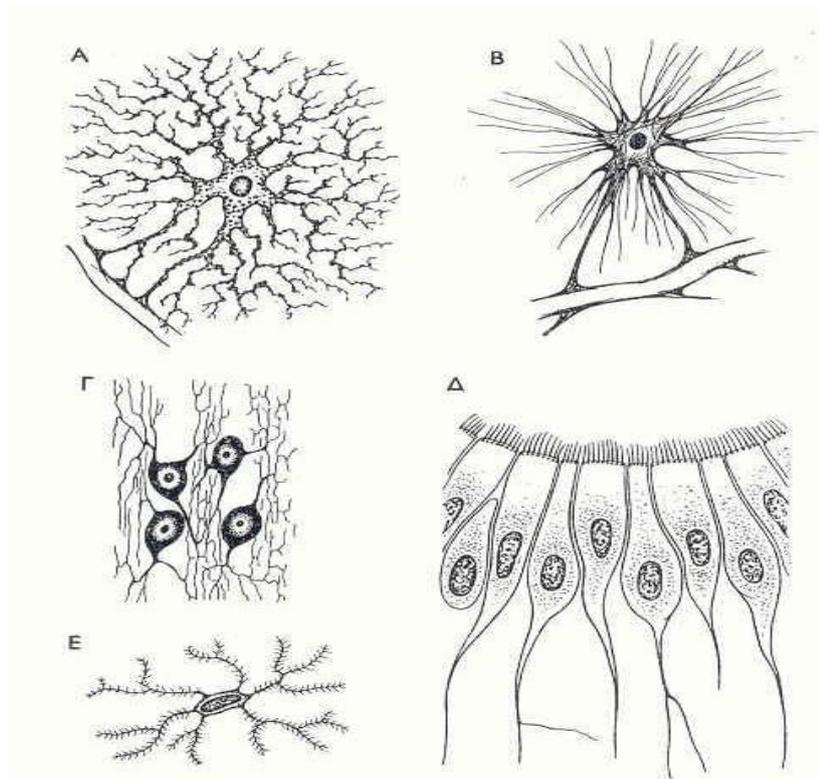
Η φιλόχρωμη ουσία αλλοιώνεται σε παθολογικές καταστάσεις ή, εξαιτίας κάποιου τραυματισμού, εξαφανίζεται μόλις το νευρικό κύτταρο τραυματισθεί. Αυτή η διαδικασία αποκαλείται *χρωματολύση* (chromatolysis) και επιφέρει αλλαγές στο σχήμα και τη δομή του νευρικού κυττάρου (το νευρικό κύτταρο γίνεται σφαιρικό) ενώ προκαλεί και μια περιφερική μετατόπιση του πυρήνα του κυττάρου (Dellmann, 1971).

1.8.2 Γλοία

Η γλοία ή νευρογλοία (glia, neuroglia) αποτελείται από διάφορους τύπους κυττάρων (neuroglial cells). Τα κύτταρα αυτά παρεμβάλλονται μεταξύ των νευρικών κυττάρων. Δεν εντοπίζονται, όμως, στις συνάψεις.

Στο κεντρικό νευρικό σύστημα, απαντώνται τα *αστροκύτταρα* (astrocytes), τα *ολιγόδενδρα* κύτταρα (oligodendrocytes), η *μικρογλοία* (microglia, microglial cells) και τα *επενδυματικά κύτταρα* (ependymal cells) (Εικ. 1.8-2). Στο περιφερικό νευρικό σύστημα συναντώνται τα *κύτταρα του Schwann* και τα *δορυφόρα κύτταρα* (satellite cells). Στο εντερικό νευρικό σύστημα, τέλος, διακρίνεται μία μόνο κατηγορία νευρογλοιακών κυττάρων, τα *κύτταρα της εντερικής γλοίας* (enteric glial cells).

Τα κύτταρα γλοίας, γενικότερα, παρέχουν υποστήριξη και προστασία στους νευρώνες. Οι πιο σημαντικές λειτουργίες της νευρογλοίας είναι να περιβάλλει τους νευρώνες και να τους συγκρατεί στη θέση τους, να παρέχει θρεπτικά στοιχεία και οξυγόνο στα νευρικά κύτταρα, να παράγει, να εκκρίνει και να μεταβιβάζει ουσίες, να απομονώνει τα νευρικά κύτταρα μεταξύ τους, να παρέχει άμυνα αλλά και να απομακρύνει νεκρά νευρικά κύτταρα.



Εικ. 1.8-2: Κύτταρα γλοίας (Μιχαήλ, 1996). Α: Πλασμώδες αστροκύτταρο, Β: Ινώδες αστροκύτταρο, Γ: Ολιγόδενδρα κύτταρα, Δ: Επενδυματικά κύτταρα, Ε: Μικρονευρογλοιακό κύτταρο.

1.8.3 Αγωγή της νευρικής ώσης

Η νευρική διέγερση γίνεται προς ορισμένη κατεύθυνση. Στις αισθητικές οδούς η διέγερση μεταδίδεται από την περιφέρεια προς το κέντρο (κεντρομόλος), ενώ στις κινητικές οδούς η διέγερση προχωρεί αντίθετα, δηλαδή από το κέντρο προς την περιφέρεια (φυγόκεντρος). Στην πρώτη περίπτωση τα ερεθίσματα (οπτικά, θερμικά, πόνου κ.α.) μεταφέρονται στον εγκέφαλο. Στη δεύτερη περίπτωση ο εγκέφαλος μεταδίδει τα ερεθίσματα στους μυς για να συσπαστούν, ή σε ένα όργανο εκκρίσεως (αδένας) για να λειτουργήσει (Τρακατέλλης, 1984; Λαζαρίδου, 1992; Frandson et al. 2003; Μάγρας και Αντωνόπουλος, 2004).

Τα νευρικά κύτταρα επικοινωνούν μεταξύ τους. Τα σημεία επικοινωνίας ονομάζονται συνάψεις (synapses). Το νευρικό ερέθισμα μεταβιβάζεται μέσω του νευράξονα υπό μορφή ηλεκτρικού κύματος και φτάνει μέχρι τα τελικά κλωνία του νευρώνα. Από εκεί για να μεταβιβαστεί στο επόμενο νευρικό κύτταρο υποχρεώνεται να περάσει το συναπτικό διάκενο. Αυτό πραγματοποιείται με την ελευθέρωση, στα άκρα των κλωνίων, μιας χημικής ουσίας που παίζει το ρόλο του νευροδιαβιβαστή. Οι νευροδιαβιβαστές είναι μόρια χαμηλού μοριακού βάρους που μεταφέρονται, συνήθως, σε ειδικά κυστίδια, τα συναπτικά κυστίδια, και απελευθερώνονται στις απολήξεις του νευράξονα (τελικά κλωνία ή κομβία) σε απάντηση ηλεκτρικών διεγέρσεων (Τρακατέλλης, 1984; Λαζαρίδου, 1992; Frandson et al. 2003; Μάγρας και Αντωνόπουλος, 2004).

Σε κατάσταση ηρεμίας, η μεμβράνη που περιβάλλει τη νευρική ίνα, όπως και η μεμβράνη κάθε κυττάρου, είναι εσωτερικά φορτισμένη αρνητικά και εξωτερικά φορτισμένη θετικά (κατάσταση *πόλωσης*). Αυτό οφείλεται στην ιδιότητα της διαπερατότητας της μεμβράνης, που με μηχανισμούς μεταφοράς, δημιουργεί διαφορές στη συγκέντρωση ορισμένων ιόντων στις δύο πλευρές της μεμβράνης. Συγκεκριμένα, η συγκέντρωση ιόντων νατρίου στο εσωτερικό της νευρικής ίνας είναι πολύ μικρότερη σε σύγκριση με τη συγκέντρωση ιόντων νατρίου στο εξωτερικό της νευρικής ίνας. Το αντίθετο συμβαίνει για τα ιόντα καλίου (Σμοκοβίτης, 1999).

Με ένα μηχανισμό ενεργητικής μεταφοράς η κυτταρική μεμβράνη μπορεί να “αντλήσει” Na^+ από το εσωτερικό προς το εξωτερικό του κυττάρου και K^+ προς την αντίθετη κατεύθυνση. Η μεμβράνη του νευρικού κυττάρου είναι διαπερατή στα K^+ και Na^+ και προς τις δυο κατευθύνσεις με το μηχανισμό της διάχυσης. Αυτό ονομάζεται “αντλία” νατρίου – καλίου ή απλώς “αντλία” νατρίου (sodium and potassium pumps,

sodium pump). Για κάθε 2 – 5 Na^+ που “αντλούνται” από το εσωτερικό του κυττάρου προς τα έξω, ένα μόνο K^+ “αντλείται” από έξω προς τα μέσα. Έτσι, μεγαλύτερος αριθμός θετικών ιόντων είναι συγκεντρωμένος στην εξωτερική επιφάνεια της μεμβράνης. Ταυτόχρονα, τα περισσότερα ανιόντα, που δεν διέρχονται τη μεμβράνη και απαντούν στο εσωτερικό του κυττάρου, δημιουργούν μια ηλεκτραρνητική υπεροχή. Συνέπεια όλων αυτών είναι η ηλεκτραρνητική φόρτιση της μεμβράνης στην εσωτερική της επιφάνεια. Αυτό καλείται *δυναμικό μεμβράνης* (Σμοκοβίτης, 1999).

Η μεμβράνη του νευρικού κυττάρου σε κατάσταση ηρεμίας είναι 50-100 φορές πιο διαπερατή στα K^+ παρά στα Na^+ . Αν, ωστόσο, διεγερθεί σε ένα σημείο, τότε γίνεται τόσο διαπερατή στο σημείο αυτό, ώστε και Na^+ μπορούν να διέλθουν με ευκολία τη μεμβράνη από το εξωτερικό προς το εσωτερικό της νευρικής ίνας. Έτσι, Na^+ εισέρχονται γρήγορα στο εσωτερικό της νευρικής ίνας και η μεμβράνη τοπικά γίνεται προς στιγμήν ηλεκτροθετική εσωτερικά και ηλεκτραρνητική εξωτερικά (*εκπόλωση* – depolarization). Με τον τρόπο αυτό προκαλείται ροή ηλεκτρικού ρεύματος από την περιοχή που διεγέρθηκε προς τη γειτονική περιοχή (αγωγή νευρικής ώσης). Η περιοχή εκπόλωσης επεκτείνεται, όπως και η περιοχή αυξημένης διαπερατότητας της μεμβράνης. Αυτό εξασφαλίζει την *αγωγή της νευρικής ώσης* (Σμοκοβίτης, 1999).

Η μεγάλη συγκέντρωση Na^+ , στο εσωτερικό της νευρικής ίνας (στο σημείο όπου διεγέρθηκε) συντελεί, τώρα, στο να γίνει η μεμβράνη και πάλι δύσκολα διαπερατή στα Na^+ . Τα K^+ , όμως, που μπορούν να διέλθουν τη μεμβράνη ευκολότερα, κινούνται από το εσωτερικό της ίνας προς την εξωτερική επιφάνεια της μεμβράνης. Έτσι, η μεμβράνη γίνεται και πάλι ηλεκτραρνητική εσωτερικά και ηλεκτροθετική εξωτερικά (*αναπόλωση* - repolarization). Η αναπόλωση αρχίζει από εκεί όπου είχε αρχίσει η εκπόλωση. Οι μεταβολές αυτές γίνονται σε κλάσματα δευτερολέπτου και αποτελούν το *δυναμικό ενέργειας* (action potential) που είναι υπεύθυνο για την αγωγή της νευρικής ώσης κατά μήκος της νευρικής ίνας (Σμοκοβίτης, 1999).

Σημαντικό ρόλο λοιπόν στη φυσιολογική λειτουργία του νευρικού συστήματος παίζουν και οι διάλυτοι ιόντων νατρίου (Na^+), καλίου (K^+), ασβεστίου (Ca^{+2}) και χλωρίου (Cl^-), που βρίσκονται στις μεμβράνες των τελικών κλωνίων του νευράξονα ή του μετασυναπτικού δενδρίτη και που αποτελούν θέσεις δράσης παρεμποδιστών του νευρικού συστήματος. Με το άνοιγμα και κλείσιμο των διαύλων αυτών επιτυγχάνεται η ρύθμιση της κατανομής των ιόντων στις δύο πλευρές της μεμβράνης, με την οποία δημιουργείται ένα ηλεκτρικό δυναμικό στο οποίο βασίζεται η μετάδοση των νευρικών σημάτων (Τρακατέλλης, 1984; Λαζαρίδου, 1992; Frandson et al. 2003; Μάγρας και

Αντωνόπουλος, 2004).

1.8.4 Συνάψεις

Όπως αναφέρθηκε, τα νευρικά κύτταρα επικοινωνούν μεταξύ τους μέσω των συνάψεων. Τα τελικά δενδρύλλια ενός νευρίτη συνάπτονται με τους δενδρίτες ή το σώμα ενός άλλου νευρικού κυττάρου μέσω των τελικών κομβίων. Με τον τρόπο αυτό εξασφαλίζεται η αγωγή της νευρικής ώσης. Ένα νευρικό κύτταρο μπορεί να συνάπτεται με περισσότερα του ενός νευρικά κύτταρα.

Το τελικό κομβίο δεν έρχεται σε άμεση επαφή με το δενδρίτη ή το σώμα του άλλου κυττάρου (μετασυναπτικό κύτταρο). Ανάμεσά τους, μεσολαβεί μια μικρή απόσταση περίπου 100-500Å, η *συναπτική σχισμή* (synaptic cleft), η οποία γεφυρώνεται χημικά. Στο τελικό κομβίο υπάρχουν πολυπληθή κυστίδια (vesicles), που περιέχουν ένα χημικό μεταβιβαστή ή και περισσότερους (Burnstock, 1976). Τα κυστίδια των διεγερτικών προσυναπτικών ιών περιέχουν διεγερτικό χημικό μεταβιβαστή (π.χ. ακετυλχολίνη, acetylcholine, ACh) ενώ τα κυστίδια των ανασταλτικών προσυναπτικών ιών περιέχουν ανασταλτικό χημικό μεταβιβαστή (π.χ. γ-αμινοβουτυρικό οξύ). Οι χημικοί αυτοί νευροδιαβιβαστές ελευθερώνονται, όταν η νευρική ώση φτάσει στα τελικά κομβία, διαχέονται και δρουν πάνω σε συγκεκριμένα σημεία του μετασυναπτικού κυττάρου, τους *υποδοχείς* (receptors), που μπορεί να είναι *διεγερτικοί* (excitatory) ή *ανασταλτικοί* (inhibitory). Σε πολλές περιοχές του εγκεφάλου των θηλαστικών η επικοινωνία μεταξύ νευρικών κυττάρων δεν γίνεται με την ελευθέρωση χημικών μεταβιβαστών. Πρόκειται για καθαρά ηλεκτρική σύναψη (Σμοκοβίτης, 1999). Στις ηλεκτρικές συνάψεις (electrical synapses), η μεταβίβαση της νευρικής ώσης είναι δυνατή και προς τις δύο κατευθύνσεις, ενώ στις χημικές συνάψεις η μεταβίβαση της ώσης γίνεται αυστηρά και μόνο προς μια κατεύθυνση (προσυναπτική τελική απόληξη προς μετασυναπτικό νευρικό κύτταρο) (Τρακατέλλης, 1984).

1.8.5 Νευροδιαβιβαστές

Οι νευροδιαβιβαστές μεταβιβάζουν ένα ερέθισμα από το ένα νευρικό κύτταρο στο άλλο ή από ένα νευρικό κύτταρο σε ένα μυϊκό κύτταρο. Οι γνωστότεροι νευροδιαβιβαστές είναι η ACh, η επινεφρίνη (αδρεναλίνη), η νοραδρελίνη, το γ-αμινοβουτυρικό οξύ (γνωστό και ως GABA) που αναστέλει τη μεταφορά πληροφοριών, η ντοπαμίνη και η σεροτονίνη που εμπλέκονται στα ευαίσθητα μηνύματα της σκέψης και της γνώσης, το L-γλουταμινικό οξύ, η γλυκίνη και η ισταμίνη. Στην περίπτωση που ο νευροδιαβιβαστής είναι η ACh, οι συνάψεις ονομάζονται χολινεργικές (Τρακατέλλης, 1984; Λαζαρίδου, 1992; Frandson et al. 2003; Μάγρας και Αντωνόπουλος, 2004).

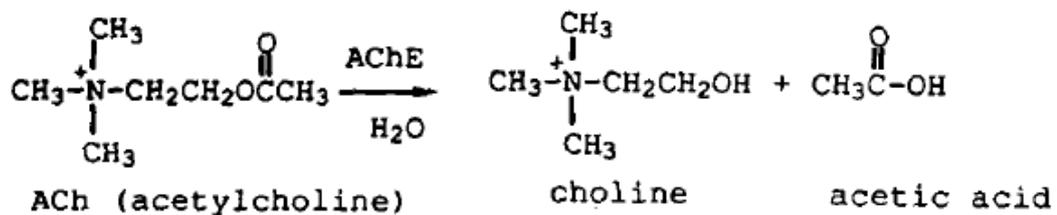
Ανάλογα με το είδος του χημικού μεταβιβαστή, οι νευρικές ίνες του αυτόνομου νευρικού συστήματος διακρίνονται σε *χολινεργικές* (απελευθερώνεται ACh) και *αδρενεργικές* (απελευθερώνεται νοραδρεναλίνη). Στην κατηγορία των χολινεργικών νευρικών ινών ανήκουν όλες οι προγαγγλιακές νευρικές ίνες του παρασυμπαθητικού και συμπαθητικού νευρικού συστήματος, οι μεταγαγγλιακές ίνες του παρασυμπαθητικού καθώς και ορισμένες μεταγαγγλιακές νευρικές ίνες του συμπαθητικού νευρικού συστήματος οι οποίες απολήγουν σε αιμοφόρα αγγεία σκελετικών μυών και σε άλλους ιστούς. Αδρενεργικές χαρακτηρίζονται όλες οι υπόλοιπες μεταγαγγλιακές ίνες του συμπαθητικού νευρικού συστήματος.

1.8.6 ACh

Η ACh ήταν ο πρώτος νευροδιαβιβαστής ο οποίος ανιχνεύθηκε στο νευρικό σύστημα από τον Dale, το 1937 (Dale, 1937a, b). Αργότερα αποδείχθηκε ότι η απελευθέρωση της ACh προκαλούταν από ηλεκτρικές διεγέρσεις σε λωρίδες επιμήκους μυός σε ινδικά χοιρίδια, ενώ ACh δεν απελευθερωνόταν στον αντίστοιχο μυ, από τον οποίο είχε αφαιρεθεί μηχανικά το μυεντερικό πλέγμα (Τρακατέλλης, 1984).

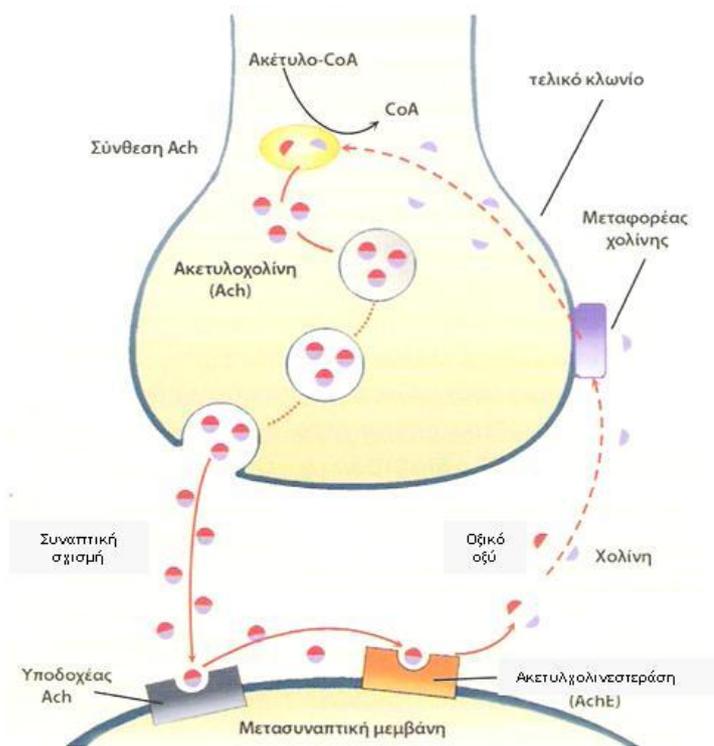
Η ACh, ως νευροδιαβιβαστής, συντίθεται στις νευρικές απολήξεις, πιθανότατα και στο σώμα των νευρικών κυττάρων, από χολίνη και οξικό οξύ, υπό την επίδραση του ενζύμου χολινακετυλάση και αποθηκεύεται στα προσυναπτικά κυστίδια των τελικών κομβίων. Μόλις μια νευρική ώση φτάσει στις νευρικές απολήξεις (μετά την τελική εκπόλωση), η ACh απελευθερώνεται στη συναπτική σχισμή. Παρατηρείται, ωστόσο, μια συνεχής έκλυση ACh σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις, ανεξάρτητα νευρικής ώσης. Απελευθέρωση όμως, ACh, σε βιολογικά δραστικά επίπεδα, γίνεται μόνο συνεργεία της

νευρικής ώσης. Αυτό προκαλεί αύξηση της διαπερατότητας της κυτταρικής μεμβράνης στα ιόντα ασβεστίου, τα οποία συμμετέχουν στο μηχανισμό απελευθέρωσης της ACh (Σμοκοβίτης 1999). Τα μόρια της ACh με την απελευθέρωση τους στο συναπτικό διάκενο, μεταφέρονται σε ειδικούς υποδοχείς του μετασυναπτικού δενδρίτη του επόμενου νευρικού κυττάρου. Η ACh προσδένεται στο μετασυναπτικό κύτταρο στους νικοτινικούς και μουσκαρινικούς υποδοχείς, ενεργοποιώντας έτσι το μετασυναπτικό κύτταρο να δραστηριοποιηθεί. Τα μόρια της ACh αλληλεπιδρούν με τους μετασυναπτικούς χολινεργικούς υποδοχείς για να τροποποιήσουν την κυτταρικές λειτουργίες του μετασυναπτικού κυττάρου, είτε τροποποιώντας το ιοντικό του περιβάλλον καθ' όλο το μήκος της μεμβράνης του μετασυναπτικού κυττάρου είτε μέσω της ενεργοποίησης των ενδοκυτταρικών δευτερογενών μεταβιβαστών (Pope et al. 2005). Μετά τη μεταβίβαση λοιπόν του νευρικού ερεθίσματος ακολουθεί η αποδόμηση (υδρόλυση) της ACh σε χολίνη και οξικό οξύ, με τη δράση του ενζύμου AChE, το οποίο ελέγχει την ποσότητα της ACh στο συναπτικό διάκενο (Εικ. 1.8-3).



Εικ. 1.8-3: Υδρόλυση της ACh με την AChE.

Έτσι, η σύναψη αποφορτίζεται και είναι σε θέση να μεταβιβάσει δεύτερο νευρικό μήνυμα, κ.ο.κ. Τα μόρια της χολίνης επιστρέφουν στους νευράξονες για το σχηματισμό νέων μορίων ACh και τη μεταβίβαση νέων νευρικών διεγέρσεων. Αυτές οι αντιδράσεις είναι στιγμιαίες, διαρκούν για κλάσμα του δευτερολέπτου και γίνονται συνεχώς σε φυσιολογικές καταστάσεις (Εικ. 1.8-4) (Τρακατέλλης, 1984; Λαζαρίδου, 1992; Frandson et al. 2003; Μάγρας και Αντωνόπουλος, 2004).



Εικ. 1.8-4: Σχηματική απεικόνιση του κύκλου της ACh σε μια χολινεργική σύναψη (Ζιώγας και Μαρκόγλου 2007).

Κάθε αίτιο που προκαλεί αναστολή της δράσης της χολινεστεράσης (ChE) ή δεσμεύει τους μετασυναπτικούς υποδοχείς της ACh, έχει ως αποτέλεσμα την υπερβολική παρουσία ACh, με συνέπεια το διαρκή ερεθισμό, και λόγω των συνεχών ηλεκτρικών φορτίσεων, ακολουθεί παράλυση του νευρικού κέντρου των εντόμων (Τρακατέλλης, 1984; Λαζαρίδου, 1992; Frandson et al. 2003; Μάγρας και Αντωνόπουλος, 2004).

1.8.7 Εστεράσες

Οι εστεράσες (esterases) είναι ευρέως διαδεδομένες υδρολάσες που εξαρτώνται άμεσα από τη σερίνη (Cohen and Oosterbaan, 1963) και οι οποίες εντοπίζονται σε πολλούς ιστούς, συμπεριλαμβανομένου και του πλάσματος του αίματος.

Ο όρος A-εστεράσες αναφερόταν αρχικά σε ένα ένζυμο, ή αργότερα σε αρκετά ένζυμα, στον ορό που μεταβολίζει καρβοξυλικούς εστέρες και δεν είναι ιδιαίτερα ευαίσθητο στην παρεμπόδιση από οργανοφωσφορικές ενώσεις (σε αντίθεση με τις B-εστεράσες, οι οποίες παρεμποδίζονται από OPs). Αργότερα η δραστηριότητα αυτή φαίνεται να συνδέεται με την αποτοξίνωση του παραοxon, με αποτέλεσμα η χρήση του

όρου Α-εστεράσες να προσδιορίζει ένζυμα που υδρολύουν OPs. Από την αρχική ανακάλυψη της Α-εστεράσης, πολλά ένζυμα έχουν εντοπιστεί, τα οποία μπορούν να υδρολύουν ορισμένα OPs, και ως εκ τούτου έχουν αναφερθεί ως Α-εστεράσες, έστω κι αν σήμερα δεν είναι γνωστό αν υδρολύουν επίσης καρβοξυλικούς εστέρες. Επί του παρόντος, υπάρχει μεγάλη σύγχυση σχετικά με την ονοματολογία των Α-εστερασών. Αυτά τα ένζυμα έχουν αναφερθεί με πολλά διαφορετικά ονόματα, συμπεριλαμβανομένων των παραοξονάση (paraoxonase), υδρολάση της αρυλεστεράσης (aryl-ester hydrolase), αρυλεστεράση (arylesterase), υδρολάση του OP (organophosphate hydrolase), υδρολάση των σκευασμάτων OP (organophosphorus compound hydrolase), και ανυδρολάση του οργανοφωσφορικού οξέος (organophosphorus acid anhydrolase). Στα θηλαστικά, Α-εστεράσες έχουν εντοπιστεί σε διάφορους ιστούς, με την υψηλότερη δραστηριότητα να βρίσκεται στο αίμα και το ήπαρ. Είναι πλέον γνωστό ότι το ήπαρ συνθέτει Α-εστεράσε) και τις εκκρίνει στο αίμα. Αν και Α-εστεράσες και Β-εστεράσες αλληλεπιδρούν, κινητικά, με το παραοxon με παρόμοιο τρόπο, τα μοριακά γεγονότα που συμβαίνουν στις ενεργές θέσεις τους κατά τη διάρκεια της κατάλυσης είναι πιθανότατα πολύ διαφορετικά. Το ενεργό κέντρο των Β-εστερασών όπως της AChE έχει χαρακτηριστεί επαρκώς και περιέχει μια σερίνη υπόλειμμα που φωσφορυλιώνεται από παραοxon στο υδροξύλιο. Αντίθετα, η ενεργή θέση των Α-εστερασών δεν έχει μελετηθεί εκτενώς, αλλά πιθανόν δεν περιέχει κατάλοιπα σερίνης που συμμετέχουν στην υδρόλυση του παραοxon. Επιπλέον, οι Α-εστεράσες απαιτούν ένα δισθενές κατιόν όπως το ασβέστιο για να δραστηριοποιηθούν, σε αντίθεση με τις Β-εστεράσες (Sultatos, 2005). Α-εστεράσες δεν υπάρχουν στους ιστούς των ψαριών (Wallace and Dargan, 1987). Τα πουλιά δεν έχουν ή έχουν πολύ χαμηλή δραστηριότητα Α-εστερασών όπως και τα περισσότερα από τα έντομα. Μάλιστα ενώ έχουν σημαντικό βαθμό δραστηριότητας Β-εστερασών, δεν συμβαίνει το ίδιο για τις Α-εστεράσες (Jokanovi, 2001).

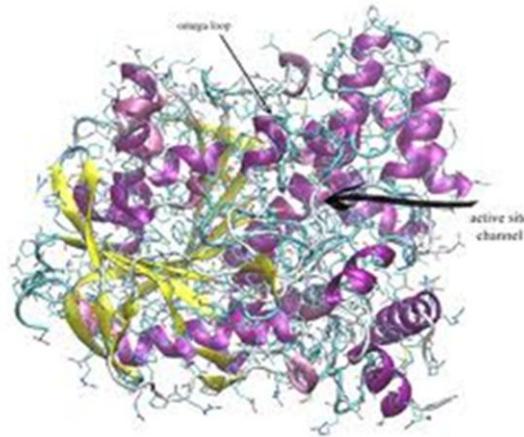
Οι Β-εστεράσες είναι η ομάδα των ενζύμων που μπορεί να παρεμποδιστεί από OPs. Αυτή η ομάδα των ενζύμων περιλαμβάνει τις AChE (EC 3.1.1.7), BuChE (EC 3.1.1.8), CaE, την εστεράση στόχο της νευροπάθειας (Neuropathy Target Esterase, NTE), τη χυμοθρυψίνη, τη θρυψίνη και κάποια άλλα ένζυμα. Ένα κοινό χαρακτηριστικό αυτών των ενζύμων είναι ότι έχουν ομάδα υδροξυλίου σερίνης στο ενεργό κέντρο που τους επιτρέπει να αντιδρούν με τα OPs (Jokanovi, 2001; Wilson, 2005).

Οι Β-εστεράσες διακρίνονται, ανάλογα με τη διαφοροποίηση ως προς την

εξειδίκευση που παρουσιάζουν στο υπόστρωμα επί του οποίου επενεργούν (Principato et al. 1983), τη συμπεριφορά τους σε πλεόνασμα υποστρώματος και την δεκτικότητα / ευαισθησία σε παρεμποδιστές (Silver, 1974; Principato et al. 1984).

Οι ChEs είναι ευρέως διαδεδομένες στο σώμα των οργανισμών.

Οι AChEs και οι BuChEs είναι εξειδικευμένοι καρβοξυλικοί εστέρες-υδρολάσες που υδρολύουν εστέρες της χολίνης (Wilson, 2005) (Εικ. 1.8-5).



Εικ. 1.8-5: Τρισδιάστατη σχηματική απεικόνιση της AChE ($\Delta 11$).

Τα σπονδυλωτά, ειδικότερα, διαθέτουν δύο ChEs, που αντιστοιχούν σε δύο διαφορετικές γονίδια, την AChE και BuChE. Η δυαδικότητα της AChE και BuChE είναι συγκεκριμένη για τα σπονδυλωτά και πιθανότατα προέρχεται από το διπλασιασμό κατά την αναπαραγωγική ενός γονιδίου ChE, σε έναν πρόγονο. Σε γενικές γραμμές, η διχοτομία μεταξύ AChE και BuChE στα υψηλότερα σπονδυλωτά είναι πολύ σαφής. Ωστόσο, μία ενδιάμεση δραστικότητα ChE έχει αναφερθεί να είναι παρούσα, μαζί με AChE σε μύες ορισμένων ψαριών (Brodbeck et al. 1973; Yassine et al. 1991). Αυτή η δραστικότητα μπορεί να αντανακλά μια ασυνήθιστη ιδιαιτερότητα των BuChE σε αυτά τα είδη. Η AChE και BuChE είναι επίσης λιγότερο διαφορετικές στο *Torpedo californica*, ένα ελασμοβράγχιο, από ό, τι στα υψηλότερα σπονδυλωτά: σε αυτό το είδος η BuChE υδρολύει την ACh γρηγορότερα από προπιονυλθειοχολίνη (propionylthiocholine, PrSCh) ή βουτυρυλθειοχολίνη (butyrylthiocholine, BuSCh) (Toutant et al. 1985). Ένα κυστόστομα, το *Petromyzon marmus*, φαίνεται να έχει μία ChE, την AChE (Pezzementi et al. 1989).

Οι AChEs και οι BuChEs έχουν πολλαπλούς μοριακούς τύπους και περίπλοκη εξελικτική πορεία. Μερικές από τις μορφές μετακινούνται από περιοχή σε περιοχή εντός των κυττάρων, ενώ άλλες εκκρίνονται στα σωματικά υγρά.

Δεν υπάρχει καμία συσχέτιση μεταξύ της κατανομής των δύο ενζύμων (AChE και BuChE) σε διάφορους ιστούς (Edwards and Brimijoin, 1982).

1.8.7.1 AChE

Οι AChEs βρίσκονται στις νευρικές ίνες, συνάψεις, νευρομυϊκές συνάψεις και στα κυτταρικά σώματα των νευρώνων του Κ.Ν.Σ. αλλά και σε σκελετικούς μύες. Στον εγκέφαλο του επίμου, η AChE είναι ευρέως διαδεδομένη τόσο σε χολινεργικές όσο και μη χολινεργικές δομές (Mesulam and Geula, 1988; Geula and Mesulam, 1994). Η ανάπτυξη των νευρώνων που εκφράζουν AChE και των διεργασιών (Kristt, 1979; Robertson et al. 1985; Jeune and Jourdan, 1991; Geula et al. 1995).

Η AChE, υπό φυσιολογικές συνθήκες, υδρολύει ταχύτατα την ACh σε οξικό οξύ και χολίνη (Rosenberry, 1975). Έτσι η συναπτική σχισμή δεν κατακλύζεται από ACh, και το σήμα δεν αυξάνεται ούτε σε ισχύ ούτε σε διάρκεια. Στο τέλος η ACh αποσυντίθεται στη συναπτική σχισμή, στα εξ ων συνετέθη, από την ChE. Είναι ένα ένζυμο που εντοπίζεται συνήθως προσαρτημένο στην κυτταρική μεμβράνη. Η δράση της AChE σχετίζεται άμεσα με τη νευρική ώση και το νευροδιαβιβαστή (Talesa et al. 1990). Η AChE έχει τον γρηγορότερο ρυθμό αντίδρασης από όλα τα ένζυμα του οργανισμού μας, αποσυνθέτοντας κάθε μόριο σε περίπου 80 msec.

Σε κυταρικές καλλιέργειες φαίνεται ότι η AChE μπορεί να διευκολύνει κάπως την επέκταση των νευρικών κυττάρων. Ωστόσο μύς μπορεί να επιβιώσουν ακόμη και αν το γονίδιο της AChE κατασταλεί πλήρως, αν και παρουσιάζουν μειωμένη θερμορύθμιση, καθυστέρηση της ανάπτυξης και σοβαρή νευρική περιφερική αδυναμία, χωρίς όμως ανιχνεύσιμες μορφολογικές ανωμαλίες στον εγκέφαλο τους (Sun et al. 2007; Rice, 2007). Αυτό αποδεικνύει ότι AChE δεν απαιτείται στην πραγματικότητα για την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος και τη δημιουργία των νευρωνικών συνδέσεων.

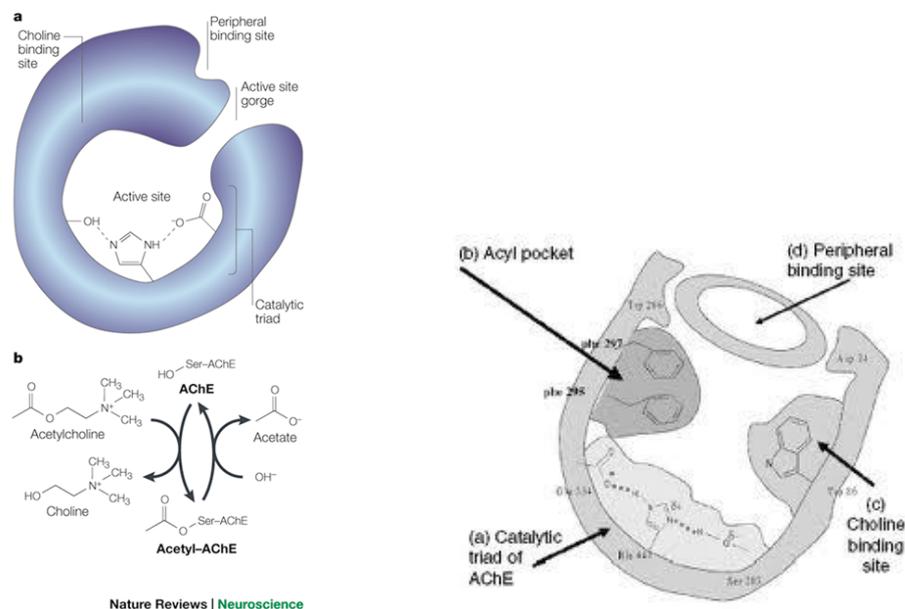
Οι AChEs βρίσκονται επίσης στα ερυθροκύτταρα των θηλαστικών, στον ορό του αίματος μερικών πτηνών και θηλαστικών, και στα αιμοπετάλια του αίματος των τρωκτικών (επίμυς και μύς), και των μηρυκαστικών (αιγοπρόβατα). Η δραστηριότητα ChE του ορού του αμερικανικού βραχοκιρκίνεζου, ενός μικρού γερακιού, αποτελείται σχεδόν εξ ολοκλήρου από AChE ενώ η ChE του ορού του επίμου είναι υψηλή σε δραστηριότητες AChE και BuChE (Wilson, 2005).

Οι προτιμήσεις της AChE και της BuChE, όσον αφορά το υπόστρωμα,

ποικίλουν ανάλογα με τα είδη. Οι AChEs και BuChEs αντιδρούν διαφορετικά σε αυξανόμενη συγκέντρωση του υποστρώματος. Οι AChEs παρεμποδίζονται από περίσσεια υποστρώματος (συντά πάνω από 2 mM) (Wilson, 2005).

Η AChE υδρολύει εστέρες της χολίνης, πολύ γρηγορότερα την ACh από άλλους εστέρες (όπως την PrSCh) ενώ δεν αντιδρά με την BuSCh.

Κανονικά έχει λιπίδια προσαρτημένα στις πρωτεϊνικές αλυσίδες, τα οποία προσκολλούν το ένζυμο πάνω στις κυτταρικές μεμβράνες. Το ενεργό μέρος βρέθηκε μέσα σε ένα βαθύ θύλακα, αρκετά μεγάλο για την ACh. Στη βάση του θύλακα βρίσκεται μια τριάδα από τρία αμινοξέα: σερίνη-ιστιδίνη-γλουταμινικό οξύ (Εικ.1.8-6).



Εικ. 1.8-6: Σχηματική απεικόνιση της AChE (Δ11).

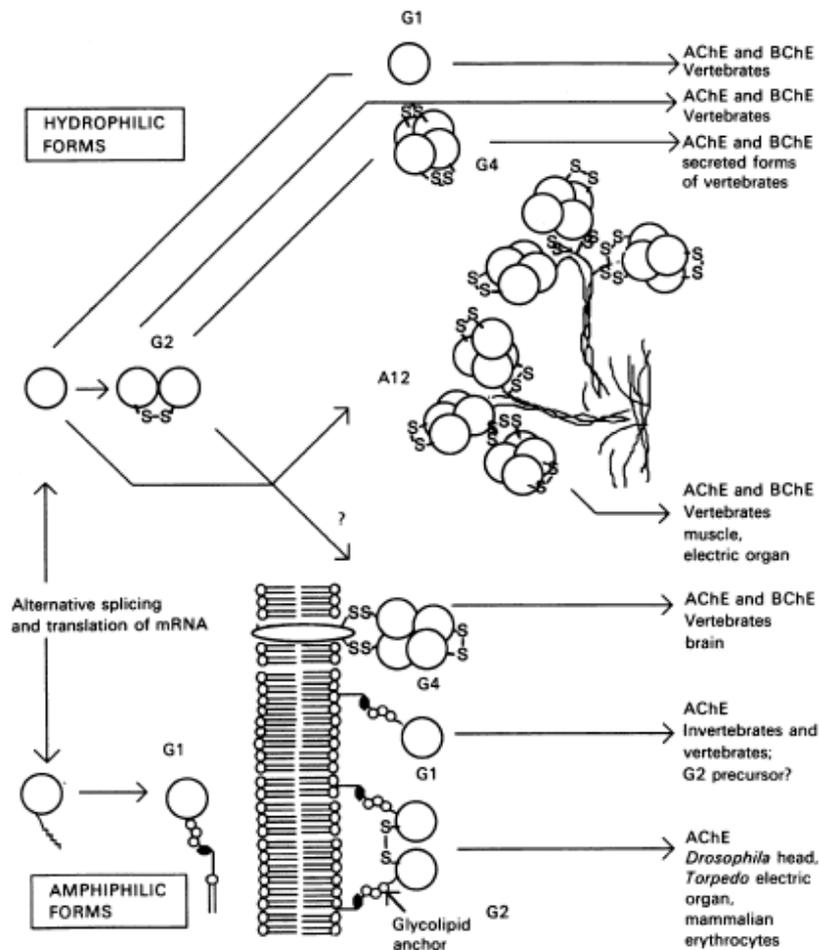
Ένα από τα χαρακτηριστικά που διακρίνουν την AChE από τη BuChE είναι η αναστολή της από περίσσεια υποστρώματος. Η αναστολή της AChE επιτυγχάνεται επίσης, με το 1,5-δισ (4-αλλυλιδιμεθυλαμινο-προπυλ) πενταν-3-ον διβρωμίδιο (BW284c51) (Çokuğraş, 2003) και με τη νεοστιγμίνη (neostigmine, Norel et al. 1992).

Οι ChE είναι μονομερή ή ολιγομερή της γλυκοπρωτεΐνης, των οποίων η μοριακή βάρη είναι γενικά σε εύρος 70-80 kDa. Μια υψηλότερη τιμή (100 έως 110 kDa), ωστόσο, διαπιστώθηκε στην περίπτωση της AChE της όρνιθας (Rotundo, 1984). Μερικές μοριακές μορφές περιέχουν επίσης μη καταλυτικές υπομονάδες αγκύστρωσης: κολλαγενικές υπομονάδες Q ή υδρόφοβες υπομονάδες P (Massoulié et al. 1992).

Οι AChEs αποτελούνται από ασύμμετρες (A) και σφαιρικές (G) μορφές. Οι ασύμμετρες μορφές τείνουν να εντοπίζονται στις συνάψεις και στις κινητικές τελικές

πλάκες, έχουν γλυκοζυλιωμένες κεφαλές που ενώνονται με σουλφυδρυλικές ομάδες που περιέχουν τις δραστικές τοποθεσίες, και τις ουρές κολλαγόνου που ενώνουν τα ένζυμα με τις επιφάνειες των κυττάρων. Οι ασύμμετρες μορφές περιλαμβάνουν ένα με τρία τετραμερή των υπομονάδων ενώ η πιο σύνθετη μορφή, A12, έχει 12 υπομονάδες (Chattonnet and Lockridge, 1989). Οι σφαιρικές μορφές έχουν έλλειψη ουρών κολλαγόνου. Είναι κατασκευασμένες από τις καταλυτικές υπομονάδες (Wilson, 2005). Οι σφαιρικές μορφές G1, G2 και G4 περιλαμβάνουν μία, δύο ή τέσσερις υπομονάδες. Οι μορφές αυτές λαμβάνονται άμεσα με ρυθμιστικά διαλύματα με χαμηλή ιονική δύναμη ή δεσμεύονται ισχυρά στις μεμβράνες και απαιτείται απορρυπαντικό για τη διαλυτοποίησή τους. Οι τύποι με επίμηκες σχήμα (ασύμμετρο) δεν αλληλεπιδρούν με τα απορρυπαντικά, αλλά διαλυτοποιούνται σε buffers με υψηλή συγκέντρωση άλατος (Chattonnet and Lockridge, 1989).

Οι υπομονάδες των AChE και BuChE συντίθενται εντός των κυττάρων (π.χ., των νεύρων, των μυών, του ήπατος, και μερικών μεγακαρυοκυττάρων), ή γλυκοζυλιώνονται εντός της συσκευής Golgi, και εκκρίνονται. Οι μορφές του κολλαγόνου ως ουρά επισυνάπτονται στην επιφάνεια των κυττάρων σε συγκεκριμένα σημεία δέσμευσης. Οι σφαιρικές μορφές διαχέονται στα σωματικά υγρά ή προσκολλώνται σε επιφάνειες κυττάρων με ιοντικούς δεσμούς (Εικ.1.8-7) (Wilson, 2005).



Εικ. 1.8-7: Σχηματικό μοντέλο του μοριακού πολυμορφισμού της AChE και BuChE. Οι υδροφιλικές μορφές είναι οι G1, G2 και G4. Η ασύμμετρη A12 μορφή έχει 3 υδροφιλικές G4 κεφαλές ενωμένες με ουρά κολλαγόνου με δισουλφιδικούς δεσμούς (Chattonnet and Lockridge 1989).

Η δραστικότητα του ενζύμου της AChE είναι ένα ευαίσθητο και ιδιαίτερα ασφαλές ως προς τις ενδείξεις του, εργαλείο, το οποίο χρησιμοποιείται για τη μέτρηση και την εξακρίβωση του βαθμού της έκθεσης ενός οργανισμού σε αναστολείς της AChE, όπως είναι τα OPs (Payne et al. 1996; Petroianu et al. 2003). Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (World Health Organization, WHO) έχει θεσπίσει τη βιοπαρακολούθηση της AChE, σαν ένα προστατευτικό μέτρο κατά της υπέρμετρης έκθεσης οργανισμών μη - στόχων, σε OPs (Romani et al. 2005). Οι μετρήσεις των επιπέδων παρεμπόδισης της AChE είναι ενδεικτικοί για την περιοχή όπου γίνεται η δειγματοληψία (Kirby et al. 2000), τη θερμοκρασία και την εποχή (Dellali et al. 2001), καθώς και το είδος του οργανισμού που μελετάται, η ηλικία και το φύλο του (Lionetto et al. 2003; Kim et al. 2004).

1.8.7.2 BuChE

Η BuChE, όπως αναφέρθηκε ήδη, συγκαταλέγεται στις “ψευδοεστεράσες” ή “μη εξειδικευμένες” εστεράσες. Ο χαρακτηρισμός αυτός οφείλεται στο ότι η BuChE υδρολύει ένα ευρύ σύνολο εστέρων της χολίνης, όπως την ακετυλοθειοχολίνη (acetylthiocholine, ASCh) (Silver, 1974; Darvesh et al. 1998; Fulton and Key, 2001; Valbonesi et al. 2003) ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις παρατηρήθηκε να υδρολύει και PrSCh, σε περιορισμένη, όμως, έκταση (Darvesh et al. 1998). Ωστόσο, η BuChE φαίνεται ότι “προτιμά” να δρα επί της BuSCh (Giacobini, 2004; Gagnaire et al. 2008). Η δράση της BuChE, εντοπίζεται στον ορό του αίματος, στον εγκέφαλο και στους μυς (Soreq et al. 1989). Η BuSCh, και γενικότερα η ομάδα των ψευδοεστερασών, είναι ένζυμα διαλυτά στον ορό του αίματος, κάτι το οποίο, ίσως εξηγεί και την ευρεία εξειδίκευσή τους επί των διάφορων εστέρων χολίνης.

Οι BuChEs επίσης είναι ιδιαίτερα διαδεδομένες. Βρίσκονται σε συνάψεις, σε τελικές κινητικές πλάκες, και σε μυϊκά κύτταρα μαζί με AChE ιδιαίτερα σε νεαρότερα στάδια σε θηλαστικά (Wilson, 2005). Η συνολική κατανομή των BuChE θετικών κυττάρων στον εγκέφαλο του επίμου έχει αναφερθεί σε ένα μικρό αριθμό ερευνών (Tago et al. 1992; Darvesh et al. 1992; Krupnik and Paterson, 1993). Υπάρχουν σημαντικά λιγότερες πληροφορίες για την ύπαρξη BuChE θετικών κυττάρων στους αναπτυσσόμενους νευρώνες. Έρευνες έχουν περιορίσει την ανάπτυξη των BuChE σε λίγες δομές, σε ορισμένες πτυχές, όπως το θάλαμο και τα ραχιαία (αισθητικά) νωτιαία γάγγλια της ρίζας (Robertson et al. 1991; Krupnik and Paterson, 1993; Koenigsberger et al. 1998). Οι BuChEs έχει προταθεί να συμμετέχουν σε τέτοιες αναπτυξιακές διαδικασίες όπως το πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση νευρώνων (Layer and Sporns, 1987; Alber et al. 1994).

Η δραστηριότητα της BuChE εκφράζεται επίσης και σε άλλους ιστούς κυρίως συντίθεται στο ήπαρ όπου συντίθεται και εκκρίνεται στο πλάσμα. Η BuChE, αλλά όχι η AChE, εκφράζεται στη χοριακή λάχνη των ανθρώπινων εμβρύων (Zakut et al. 1991). Ωστόσο, η BuChE είναι ελλιπής, ή παντελώς απύσα, σε ορισμένους ανθρώπους, χωρίς καμία προφανή φυσιολογική συνέπεια. Αυτό δείχνει ότι AChE και BuChE αντιστοιχούν σε χωριστά γονίδια.

Οι BuChEs είναι λιγότερο ευαίσθητες σε παρεμπόδιση από αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος (Wilson, 2005).

Ο φυσιολογικός ρόλος των “ψευδοεστερασών”, και ιδίως της BuChE, φαίνεται

να σχετίζεται περισσότερο με διαδικασίες αποτοξίνωσης, μεταβολισμού των λιπιδίων, νευρογένεσης και πολλαπλασιασμού των κυττάρων (Mack and Robitzki, 2000), αλλά να διαδραματίζει προστατευτικό ρόλο σε περίπτωση έκθεσης σε OPs και καρβαμιδικά (Sturm et al. 2000).

Αναστολή της BuChE προκαλείται από το ισο-τετρα μονο-ισοπροπυλ πυροφωσφα – τετραμίδιο ή, κοινώς, iso-OMPA (Norel et al. 1992; Çokuğraş, 2003).

Η απεικόνιση των AChE και BuChE με χρωστικές αντιστοιχεί σε διακριτές δομές στον εγκέφαλο του ενήλικου επίμου, αν και αρκετοί πληθυσμοί νευρώνων περιέχουν δραστηριότητα και για τις δύο ChEs (Robertson and Mostamand, 1988; Tago et al. 1992). Μεταξύ των διαφόρων πληθυσμών των θετικών νευρώνων για AChE στο φλοιό του εγκεφάλου σε επίμυς, έχει εντοπιστεί ένα μεγάλος πληθυσμός από ομοιόμορφα κατανεμημένους πολυμορφικούς νευρώνες (Geula et al. 1995). Ομοίως οι BuChE θετικοί νευρώνες στα νεαρά άτομα είναι επίσης πολυμορφικοί και σχετικά ομοιόμορφα κατανεμημένοι σε όλο το φλοιό (Geula and Nagykerly, 2006). Αυτό δημιουργεί την πιθανότητα, σε αυτούς τους νευρώνες να συνυπάρχουν BuChE και AChE (Geula and Nagykerly, 2006). Ωστόσο, ενώ οι AChE-θετικοί πολυμορφικοί νευρώνες είναι σχετικά μικροί σε μέγεθος (Geula et al. 1995), οι BuChE θετικοί νευρώνες είναι σχετικά μεγάλοι, δείχνοντας ότι οι δύο ChEs είναι πιθανόν να είναι παρούσες σε διαφορετικούς πληθυσμούς στους νευρώνες του φλοιού (Geula and Nagykerly, 2006).

Η παρουσία του BuChE σε υποτιθέμενους χολινεργικούς νευρώνες, δείχνει ότι αυτό το ένζυμο μπορεί να συμμετέχει, μαζί με την AChE, κατά την υδρόλυση της ACh (Giacobini, 2000; Mesulam et al. 2002). Παροδική έκφραση AChE σε πυραμιδικούς νευρώνες στον φλοιό του εγκεφάλου επίμων κατά τη διάρκεια της μεταγεννητικής ανάπτυξης έχει τεκμηριωθεί (Geula et al. 1993; Geula et al. 1995). Έτσι, ενώ η AChE είναι πιθανόν να επηρεάζει την ανάπτυξη των νευρώνων στο ΚΝΣ (Silver, 1971; Layer et al. 1993; Geula et al. 1995), η παροδική δραστηριότητα της BuChE μπορεί να διαδραματίσει έναν ακόμη σημαντικότερο ρόλο σε αυτή τη διαδικασία, λόγω της ευρύτερης κατανομής της.

1.8.8 Εντομοκτόνα

Η συστηματοποιημένη αντιμετώπιση των παρασίτων, ζωικών ή φυτικών, που προκαλούν βλάβες στη γεωργία και στην κτηνοτροφία, υπαγορεύει σήμερα τη χρησιμοποίηση πλήθους χημικών ουσιών.

Στην Ελλάδα, με τη ραγδαία ανάπτυξη της γεωργίας και την εφαρμογή οργανωμένων καλλιεργειών και θερμοκηπίων, η χρήση των ΦΠ είναι πολύ διαδεδομένη και πολλές φορές αλόγιστη. Τα εντομοκτόνα αποτελούν μία από τις μεγαλύτερες κατηγορίες των ΦΠ και έχουν την ιδιότητα να καταπολεμούν κάθε ανεπιθύμητο ζωικό οργανισμό.

Αν και τα εντομοκτόνα έχουν επιφέρει πραγματικά τεράστια οφέλη στη δημόσια υγεία και στην παγκόσμια οικονομία, εν τούτοις η χρήση τους έχει προκαλέσει πολλά προβλήματα, όπως είναι η ρύπανση των τροφίμων με τα υπολείμματά τους, η ανάπτυξη αντοχής εκ μέρους των παρασίτων, και κυρίως η ακούσια καταστροφή ωφέλιμων εντόμων. Παρ' όλα αυτά, δεν υπάρχει αμφιβολία ότι τα πλεονεκτήματα από τη χρήση των εντομοκτόνων αντισταθμίζουν τις βλάβες που προκαλούν στους ζωικούς οργανισμούς και στο περιβάλλον (Banaszak, 2002).

Η χρήση των εντομοκτόνων- ΦΠ ανά τον κόσμο είναι σήμερα ευρύτατη. Στην Ελλάδα η χρήση των εντομοκτόνων είναι αυξημένη και ο αριθμός των δραστικών ουσιών που κυκλοφορούν σήμερα είναι 64 (Δ5).

Ιδιαίτερη δραματική αύξηση στην παρασκευή και χρήση συνθετικών εντομοκτόνων τόσο στις αναπτυγμένες όσο και στις υπό ανάπτυξη χώρες παρατηρήθηκε στο χρονικό διάστημα 1940-1980. Μολονότι η χρήση των εντομοκτόνων είχε πολλά οφέλη τόσο για τη δημόσια υγεία π.χ. στην περίπτωση της ελονοσίας, όσο και για την οικονομία, λόγω της ανάπτυξης της γεωργίας, επέφερε συγχρόνως και σοβαρές επιπτώσεις κυρίως στο περιβάλλον. Ο λόγος αυτός οδήγησε στην απαγόρευση της χρήσης του DDT καθώς και άλλων οργανοχλωριωμένων εντομοκτόνων (Al-Saleh, 1995), ενώ παράλληλα προτάθηκε και ενισχύθηκε η χρήση ως εντομοκτόνων των OPs και καρβαμιδικών εστέρων. Οι ουσίες αυτές έχουν την ιδιότητα να αποδομούνται πιο εύκολα στο περιβάλλον και έτσι έχουν μικρότερη ικανότητα συσσώρευσης στο οικοσύστημα. Ωστόσο οι ενώσεις αυτές εμφανίζουν μεγαλύτερη τοξικότητα μετά από παρατεταμένη έκθεση των ζωντανών οργανισμών σε αυτές (Pope, 1998). Επίσης δεν δείχνουν εξειδίκευση ως προς το στόχο τους με αποτέλεσμα πέρα από τα έντομα και τα παράσιτα να τίθεται σε κίνδυνο ένας μεγάλος αριθμός από

ζωικούς οργανισμούς (Basack et al. 1998).

Τα συνηθέστερα εντομοκτόνα είναι οι παρεμποδιστές της ChE, που χρησιμοποιούνται ως εντομοκτόνα ή ακαρεοκτόνα επαφής ή ως διασυστηματικά, και περιλαμβάνουν τους οργανοφωσφορικούς και τους καρβαμιδικούς εστέρες.

Η έκθεση ζωικών οργανισμών που δεν αποτελούν τον επιθυμητό στόχο στα OPs και καρβαμιδικά στο περιβάλλον και σε δόσεις που δεν προκαλούν θάνατο (υποθανατηφόρες δόσεις), είναι δυνατόν να επιφέρουν μια σειρά από δυσάρεστες επιπτώσεις και κλινικά συμπτώματα όπως είναι η υποθερμία, η ανορεξία, νευρικά συμπτώματα, διαταραχές των ορμονικών επιπέδων και της αναπαραγωγικής συμπεριφοράς (Gue et al. 1997). Κεντρική θέση στις τοξικές αυτές δράσεις έχουν οι επιπτώσεις στο νευρικό σύστημα.

Το «ιδανικό» εντομοκτόνο θα ήταν εκείνο που θα είχε υψηλή τοξικότητα για το δεδομένο παράσιτο, αλλά συγχρόνως θα ήταν ασφαλές για τις άλλες μορφές ζωής με τις οποίες θα ερχόταν σε επαφή. Δυστυχώς ένα τέτοιου είδους εκλεκτικό εντομοκτόνο δεν υπάρχει. Η εκλεκτική χρήση των εντομοκτόνων δεν είναι απλή. Στις περισσότερες περιπτώσεις απαιτείται γνώση όχι μόνο του παράσιτου-στόχου, αλλά και των δευτερευόντων παρασίτων και των ωφέλιμων ειδών. Έτσι οι ερευνητές κατευθύνουν τις προσπάθειές τους προς τη σύνθεση και τη χρήση περισσότερο ασφαλών εντομοκτόνων για τη γεωργία.

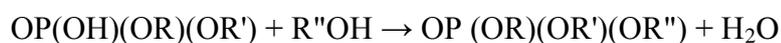
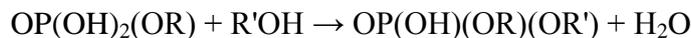
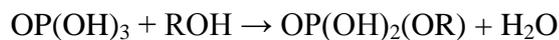
1.8.8.1 OPs

Τα OPs είναι μια γενικότερη ονομασία για τους εστέρες του πεντασθενούς φωσφορικού οξέος. Οργανοφωσφορικές ενώσεις αποτελούν τα βιοχημικά μόρια DNA και RNA, καθώς επίσης, και πολλά άλλα συνένζυμα, απαραίτητα για τη ζωή, ενώ στην κατηγορία αυτή ανήκουν και πάρα πολλά εντομοκτόνα και ζιζανιοκτόνα (Τρακατέλλης, 1984).

Τα OPs είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη ομάδα των ΦΠ σε όλο τον κόσμο (Chambers et al. 2002) και καταλήγουν στο θαλάσσιο περιβάλλον τόσο από ατμοσφαιρική έκθεση όσο με διάφορες διαδρομές με το νερό, τόσο από διάσπαρτες πηγές στη γεωργία με την απορροή όσο και από βιομηχανικές σημειακές πηγές (UNEP, 1991). Η δημοτικότητα αυτών των ενώσεων, οφείλεται στο ότι δεν έχουν εμμονή στο περιβάλλον και χαμηλή βιοσυσσώρευση στους ζώντες οργανισμούς (Racke, 1992). Στο περιβάλλον, υποβάλλονται σε μια ποικιλία από μεταβολικές διεργασίες, όπως η

υδρόλυση, η φωτόλυση και η μικροβιακή αποικοδόμηση. Ο χρόνος ημίσειας ζωής τους είναι συνήθως της τάξης των μερικών ωρών, ημερών ή εβδομάδων. Στους οργανισμούς υπάρχουν πολλές οδοί αποδόμησης μέσω των οποίων γρήγορα υποβαθμίζονται οι OPs ενώσεις (Chambers and Levi, 1992) και η χημική ανίχνευσή τους είναι ένα δύσκολο έργο. Αυτά τα δύο μεγάλα πλεονεκτήματα των OPs ενώσεων αντισταθμίζονται από την υψηλή οξεία τοξικότητα (Chambers, 1992; Thompson and Walker, 1994).

Η τόσο διαδεδομένη παρουσία των OPs οφείλεται στην ευκολία με την οποία σχηματίζουν δεσμούς με οργανικές ομάδες. Το φωσφορικό οξύ (H_3PO_4) έχει στο μόριό του 3 πρωτόνια, τα οποία μπορούν να δημιουργήσουν εστέρες. Έτσι, το φωσφορικό οξύ μπορεί να δημιουργήσει τριεστέρες, τη στιγμή που τα καρβοξυλικά οξέα, σχηματίζουν μονοεστέρες (Εικ. 1.8-8). Η εστεροποίηση προϋποθέτει τη σύνδεση της οργανικής ομάδας με το άτομο του φωσφόρου, με δεσμούς οξυγόνου. Οι πρόδρομοι τέτοιων εστέρων είναι οι αλκοόλες. Η ομάδα των αλκοολών περιλαμβάνει πολλές χιλιάδες φυσικών και συνθετικών μιγμάτων, ευρέως διαδεδομένα και πολύ συχνά απαντημένα (Τρακατέλλης, 1984).



Εικ. 1.8-8: Σχηματισμός μορίου τριεστέρα από φωσφορικό οξύ

Οι εντομοκτόνες ιδιότητες των OPs παρατηρήθηκαν για πρώτη φορά στη Γερμανία κατά τη χρησιμοποίηση των πολύ τοξικών OPs αερίων όπως τα Sarin, Soman και Tabun κατά τη διάρκεια του Β΄ Παγκοσμίου Πολέμου. Ωστόσο η χρήση τους σήμερα είναι ευρεία. Έτσι, χρησιμοποιούνται για οικιακή χρήση στην κτηνιατρική και την ιατρική, στη γεωργία για την προστασία των φυτών από έντομα και παράσιτα.

Οι περισσότεροι OPs εστέρες είναι υγρά ελαιώδους συστάσεως, λιποδιαλυτοί με χαρακτηριστική οσμή. Ελάχιστοι από αυτούς είναι υδατοδιαλυτοί. Τα OPs παράγωγα δρουν στα έντομα κυρίως ως εντομοκτόνα επαφής αλλά και στομάχου, ενώ κάποια είναι κυρίως στομάχου και προσφέρονται για την παρασκευή δηλητηριωδών δολωμάτων. Μερικά είναι διασυστηματικά (ενδοθεραπευτικά) και άλλα μικτής δράσης (επαφής και διασυστηματικά). Γενικά είναι εντομοκτόνα πολυδύναμα, με ευρύ εντομοτοξικό φάσμα ενεργείας και με ποικίλουσα τοξικότητα για τα θερμόαιμα, κυμαινόμενη από τα πολύ τοξικά στα λιγότερο τοξικά (Πελεκάσης, 1984).

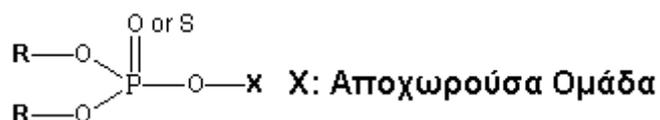
Οι ζωντανοί οργανισμοί είναι δυνατόν να εκτεθούν σε OPs μέσω του αναπνευστικού συστήματος λόγω της μεγάλης πτητικότητάς τους. Απορροφούνται εύκολα από το δέρμα, επειδή είναι λιπόφιλες ουσίες (Sultatos, 1994). Η λιπόφιλη φύση τους καθιστά εύκολη την κυκλοφορία τους μέσα στο σώμα, καθώς και την είσοδό τους στο νευρικό σύστημα. Τόσο η φαρμακολογική χρήση τους ως εντομοκτόνα όσο και το μεγαλύτερο μέρος της τοξικότητάς τους στα ζώα και στον άνθρωπο οφείλονται σε επιδράσεις των ουσιών αυτών στο νευρικό σύστημα.

Τα OPs ασκούν ποικίλες νευροτοξικές δράσεις, αλλά η πιο συχνή από αυτές συνδέεται με τη συσσώρευση ACh στις απολήξεις των μεταγαγγλιακών ινών του παρασυμπαθητικού συστήματος στα γάγγλια του αυτονόμου νευρικού συστήματος καθώς και στις νευρομυϊκές συνάψεις.

Εξαιτίας της παρεμπόδισης της AChEs από OPs, η περίσσεια της ACh στους μουσκαρινικούς υποδοχείς έχει σαν συνέπεια κλινικά συμπτώματα που εμφανίζονται ως θολότητα της όρασης, δακρύρροια, σιαλόρροια, εμετό, ακράτεια ούρων και κοπράνων, βραδυκαρδία, πτώση της αρτηριακής πίεσης, βρογχόσπασμο, αυξημένες βρογχικές εκκρίσεις και δύσπνοια. Στους νικοτινικούς υποδοχείς που εντοπίζονται στις νευρομυϊκές συνάψεις των σκελετικών μυών, η περίσσεια της ACh οδηγεί σε μυϊκό τρέμο και σπασμούς, που συχνά συνοδεύονται από μυϊκή αδυναμία (Abou-Donia, 1992). Τέλος στον εγκέφαλο και στο νωτιαίο μυελό, η συγκέντρωση της ACh μπορεί να προκαλέσει συναισθηματική αστάθεια, αταξία, αδυναμία ή ακόμα να οδηγήσει σε κώμα (Mearns et al. 1994). Ο θάνατος που είναι δυνατόν να προκληθεί από τα OPs οφείλεται είτε σε κεντρική είτε σε περιφερειακή αναπνευστική παράλυση (Abou-Donia, 1992). Τα OPs μπορούν να παρεμποδίσουν όχι μόνο την AChE του νευρικού συστήματος, αλλά επίσης και ένα μεγάλο αριθμό από άλλες εστεράσες όπως είναι η BuChE που βρίσκεται στο πλάσμα του αίματος. Σε αντίθεση με την παρεμπόδιση της AChE που μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση σημαντικών συμπτωμάτων νευροτοξίκωσης, η παρεμπόδιση της BuChE και των CaE από τα OPs δεν συνδέεται συνήθως με την εμφάνιση κλινικών συμπτωμάτων (Ehrlich, 1998).

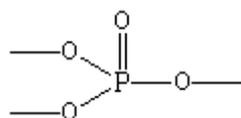
1.8.8.1.1 Δομή των OPs

Όπως αναφέρθηκε και ανωτέρω, τα OPs είναι οργανικές χημικές ουσίες που προέρχονται από το φωσφορικό οξύ. Οι χημικές αυτές ουσίες έχουν στο μόριό τους, τόσα άτομα φωσφόρου όσα και άνθρακα, τα οποία συνδέονται μεταξύ τους απευθείας ή μέσω άλλων ατόμων, όπως είναι το οξυγόνο. Ανάλογα με το αν ο αριθμός των δεσμών μέσω οξυγόνου είναι 3, 2, ή 1, οι ενώσεις αυτές ονομάζονται αντίστοιχα φωσφορικά, φωσφονικά και φωσφινικά. Ο δεσμός μεταξύ των ατόμων του φωσφόρου και του άνθρακα μπορεί επίσης να γίνει μέσω ατόμων αζώτου ή θείου. Από τις 4 ομάδες που συνδέονται με το άτομο του φωσφόρου, οι 3 συνδέονται με απλούς και η μία με διπλό δεσμό. Ο διπλός αυτός δεσμός των OPs μπορεί να είναι είτε με ένα άτομο οξυγόνου είτε με ένα άτομο θείου (Εικ. 1.8-9) (Ehrich, 1998).

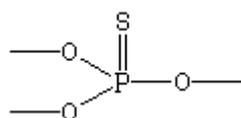


Εικ. 1.8-9: Δομή OPs

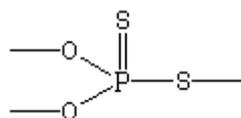
Οι κύριες χημικές δομές των OPs διαχωρίζονται σε 6 κύριες κατηγορίες (Εικ. 1.8-10) (Τρακατέλλης, 1984):



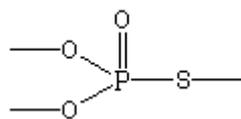
Φωσφορική ρίζα (Phosphate)



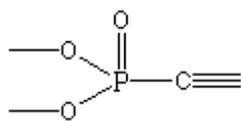
Φωσφοροθειϊκή ρίζα (Phosphorothioate)



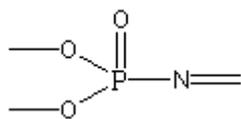
Φωσφοροδιθειϊκή ρίζα (Phosphorodithioate)



Φωσφοροθειολική ρίζα (Phosphorothiolate)



Φωσφονική ρίζα (Phosphonate)



Φωσφοραμίδια (Phosphoramidate)

Εικ. 1.8-10: Οι κύριες χημικές δομές των OPs.

Τα OPs που χρησιμοποιούνται στη γεωργία τείνουν να κατασκευαστεί στη σχετικά σταθερή μορφή POS. Είναι λιγότερο τοξικά από τα OPs με την ομάδα POO (oxon) (Wilson, 2005).

Τρεις σημαντικές χημικές αντιδράσεις που αποτελούν τη βάση της παρεμπόδισης των ChEs είναι η υδρόλυση, η αποθείωση και η αλκυλίωση.

- Υδρόλυση: Ο ρυθμός της υδρόλυσης είναι συνάρτηση του όξινων ομάδων και των αλκοολών, του pH και της θερμοκρασίας. Συνήθως ο ρυθμός αυτός αυξάνει με την αύξηση του pH, της θερμοκρασίας, και του υπεριώδους φωτός.
- Αποθείωση: Μια σημαντική οξείδωση είναι η μετατροπή της ομάδας POS των φωσφοροθειϊκών ριζών σε POO, τη μορφή oxon, αυξάνοντας την ένταση της παρεμπόδισης της ChE.
- Αλκυλίωση: Αλκυλο υποκατάστατα, ειδικές μεθοξυ ομάδες, μπορούν να ενεργούν ως παράγοντες αλκυλίωσης. Είναι σε θέση να μεταβάλλουν τα νουκλεϊνικά οξέα, με αποτέλεσμα ορισμένα OPs να θεωρούνται ως μεταλλαξιγόνα (Wilson, 2005).

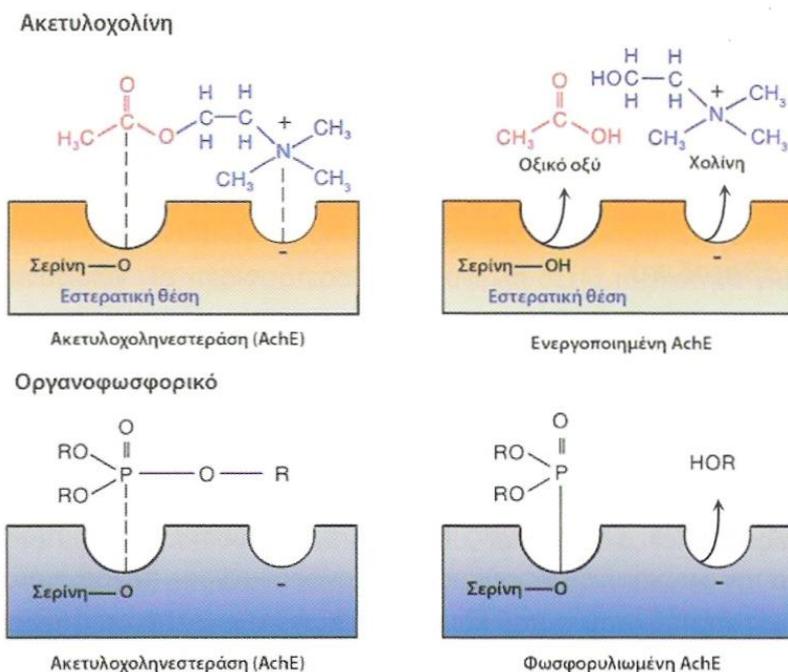
1.8.8.1.2 Βιοχημικός μηχανισμός δράσης των OPs

Τα OPs δρουν ως παρεμποδιστές της αναγέννησης της AChE. Η αναστολή της AChE διαταράσσει τη δυναμική αλληλεπίδραση που υπάρχει μεταξύ της σύνθεσης, της απελευθέρωσης και της αποδόμησης της ACh.

Τα OPs εντομοκτόνα δρουν στις χολινεργικές συνάψεις, δηλαδή στις συνάψεις που νευροδιαβιβαστής είναι η ACh και ο βιοχημικός μηχανισμός δράσης τους, είναι η μη αναστρέψιμη παρεμπόδιση του ενζύμου AChE (Sisson et al. 1975; Λαζαρίδου, 1992; Frandson et al. 2003; Μάγρας και Αντωνόπουλος, 2004).

Σε κατάσταση φυσιολογικής λειτουργίας η συγκέντρωση της ACh στο συναπτικό διάκενο ελέγχεται άμεσα από την AChE, η οποία μετά τη μεταβίβαση του νευρικού σήματος, υδρολύει την ACh σε οξικό οξύ και χολίνη που είναι φυσιολογικά αδρανής και έτσι η σύναψη αποφορτίζεται. Η τοξικότητα των OPs σχετίζεται με τη μετατροπή της AChE στην πρόδρομη, ανενεργή μορφή της. Έχει υπολογισθεί ότι περίπου 300.000 μόρια ACh υδρολύονται από ένα μόριο ενζύμου σε ένα λεπτό στους 37 °C (Λαζαρίδου, 1992; Frandson et al. 2003; Μάγρας και Αντωνόπουλος, 2004).

Όταν όμως εισέλθει στον οργανισμό του στόχου κάποιος οργανοφωσφορικός εστέρας τότε γίνεται φωσφορυλίωση της ChE, με προσκόλληση στη σερίνη της εστερατικής θέσης του ενζύμου (Εικ. 1.8-11). Η φωσφορική ομάδα παραμένει προσκολλημένη στο ένζυμο παρεμποδίζοντας τη λειτουργία του για πολλές ημέρες, με αποτέλεσμα την υπέρμετρη συσσώρευση της ACh. Παρατηρήθηκε, ότι ο βαθμός παρεμπόδισης των ChEs επηρεάζεται άμεσα και από το χρόνο έκθεσής τους στα OPs (Venkateswara et al. 2003).



Εικ. 1.8-11: Σχηματική απεικόνιση της υδρόλυσης της ACh από την AChE και τους μηχανισμούς δράσης των OPs (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2007).

Ο μηχανισμός δράσης των OPs διενεργείται σε 4 βασικά στάδια (Εικ 1.8-12):

1. Αναστολή – φωσφορυλίωση

Τα OPs συνδέονται με το ενεργό άκρο της σερίνης της AChE, σχηματίζοντας το “ενδιάμεσο” ένζυμο – αναστολέα. Η αποχωρούσα ομάδα συνδέεται στο θετικό υδρογόνο της Ιστιδίνης 447 και εγκαταλείπει τη φωσφορική ομάδα, αφήνοντας το ένζυμο φωσφορυλιωμένο (Goodman et al. 1996).

2. Επανεργοποίηση – αποφωσφορυλίωση

Η επανεργοποίηση μπορεί να συμβεί όταν από ένα μόριο νερού δωθεί ένα άτομο υδρογόνο στο μόριο της σερίνης και ένα υδροξύλιο στη φωσφορική ρίζα, σχηματίζοντας ξανά ένα ενεργό ένζυμο. Η ταχύτητα αυτής της διαδικασίας εξαρτάται από τη φύση της αλκυλικής ομάδας ($\text{CH}_3 > \text{C}_2\text{H}_5 > \text{C}_3\text{H}_7$, dichlorvos $>$ paraoxon). Μια διαδικασία, ιδιαιτέρως αργή, η οποία μπορεί να διαρκέσει ώρες, ακόμα και ημέρες (Goodman et al. 1996).

Η επανεργοποίηση του ενζύμου δύναται να επιταχυνθεί με την προσθήκη φαρμακευτικών σκευασμάτων, τα οποία προάγουν τη διάλυση του φωσφορυλιωμένου ενζύμου. Η κύρια χρησιμοποιούμενη φαρμακευτική ουσία για αυτό είναι η

Πραλιδοξίμη (Pralidoxime, συντ. 2-PAM), (Escartin and Porte, 1996) η οποία αναπτύσσει ένα σύμπλοκο με τη φωσφορυλική ομάδα. Το σύμπλοκο αυτό διασπάται από το τμήμα της σερίνης, αφήνοντας το αναγεννημένο ένζυμο (Goodman et al. 1996).

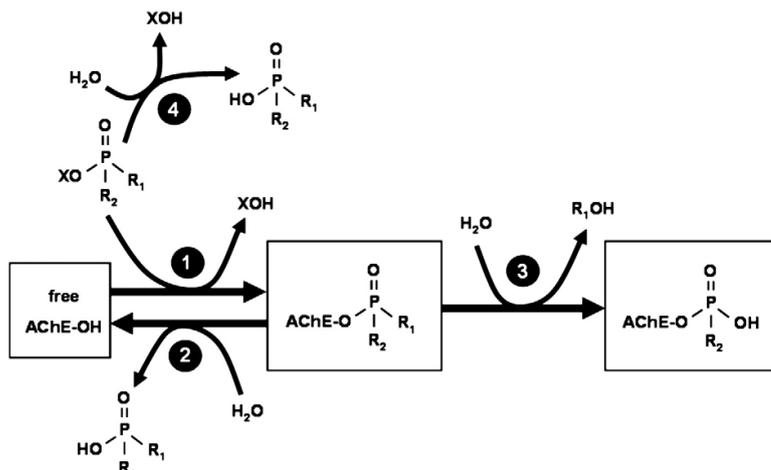
3. Γήρανση

Στο στάδιο της γήρανσης συμβαίνει απομάκρυνση της μιας αλκυλικής ομάδας. Η διαδικασία αυτή φυσιολογικά συμβαίνει ταχύτερα συγκριτικά με την αυτόματη υδρόλυση. Το τελικό προϊόν εμφανίζει ανθεκτικότητα στην επανεργοποίηση, ακόμα και με τη χρήση της πραλιδοξίμης. Η ταχύτητα της γήρανσης, όπως και στην επανεργοποίηση, εξαρτάται από τη φύση της αλκυλικής ομάδας. Ωστόσο, όσο διαρκεί η γήρανση, είναι σχεδόν αδύνατη η επανεργοποίηση (Goodman et al. 1996).

4. Αναγέννηση / Αποκατάσταση

Εάν το ένζυμο δεν υποστεί επανεργοποίηση, θα πρέπει να συντεθεί ένα καινούργιο ένζυμο, έτσι ώστε να εξακολουθεί να προκαλεί αναστολή στο σήμα της ACh. Αυτό μπορεί να διαρκέσει έως και μήνες.

Τα συμπτώματα από τη δηλητηρίαση, δύνανται να αποκατασταθούν γρήγορα, μόνο αν ένα κλάσμα της AChE χρειάζεται να επανασυνδεθεί. Στα ερυθροκύτταρα, τα νέα ένζυμα δεν συνθέτονται καθ' όλη τη διάρκεια ζωής του κυττάρου. Επομένως σε αυτά, η δραστηριότητα της AChE μετά από δηλητηρίαση, περιορίζεται μέχρι τα κύτταρα να αποκατασταθούν πλήρως (Goodman et al. 1996).



Εικ. 1.8-12: Μηχανισμός δράσης των OPs. 1. Αναστολή – φωσφορυλίωση 2. Επανεργοποίηση 3. Γήρανση 4. Υδρόλυση των OPs από A-εστεράσες (Bosgra et al. 2009).

1.8.8.1.3 Συμπτώματα τοξικότητας από OPs

Μια από τις πιο αναγνωρίσιμες μορφές οξείας τοξικότητας που έπεται της έκθεσης του οργανισμού σε παρεμποδιστές εστερασών, είναι η δυσλειτουργία του ΑΝΣ, που χαρακτηρίζεται από εκτεταμένη έκκριση των αδένων στα οποία καταλήγουν οι παρασυμπαθητικές ίνες (Escobichon, 2001). Υπερβολική διέγερση των αδένων, οδηγεί σε αυξημένη έκκριση στους βρόγχους, στους δακρυϊκούς αδένες, στους σιελογόνους αδένες, στους ιδρωτοποιούς αδένες, στο πεπτικό σύστημα και στο πάγκρεας. Οι λείοι μύες του ουροποιητικού συστήματος, επίσης, παρουσιάζουν αυξημένη σύσπαση με αποτέλεσμα να προκαλείται συχνοουρία (Taylor, 2001). Το αρκτικόλεξο “SLUD”, που αντιπροσωπεύει τη σιαλόρροια (salivation), τη δακρύρροια (lacrimation), τη διούρηση (urination) και την αφόδευση (defecation), χρησιμοποιείται συχνά για να περιγράψει τα φαινόμενα αυτά της τοξικότητας.

Η απώλεια του ελέγχου στις νευρομυϊκές συνάψεις οδηγεί σε ακόμα ένα κλασσικό σύμπτωμα έκθεσης σε παρεμποδιστές των εστερασών, τις ακούσιες κινήσεις. Σε περιπτώσεις εκτενούς παρεμπόδισης της AChE, τα μόρια της ACh μπορούν να συνδεθούν με πολλαπλούς νικοτινικούς υποδοχείς, γεγονός που μπορεί, τελικά, να οδηγήσει και σε παράλυση του μυός (Taylor, 2001).

Πολύ έντονα αλλά και πολύπλοκα μπορεί να είναι τα συμπτώματα στην καρδιά (Stemler et al. 1990; Yamamoto et al. 1996; Karalliedde, 1999). Παρατηρήθηκε βραδυκαρδία, εξαιτίας αρνητικών χρονοτροπικών επιδράσεων από μουσκαρινικούς υποδοχείς του πνευμονογαστρικού νεύρου. Άλλες κοινές ενδείξεις τοξίκωσης αποτελούν επιληπτικές κρίσεις και μυϊκοί σπασμοί, υποθερμία, αυξημένη διεγερσιμότητα, δύσπνοια (Boudinot et al. 2005), σε συνδυασμό με αυξημένες εκκρίσεις του αναπνευστικού σωλήνα, παράλυση των μυών της αναπνοής, και κατάπτωση των κέντρων ελέγχου του αναπνευστικού στη γέφυρα και στον προμήκη μυελό, που θεωρούνται τα κύρια αίτια της πρόκλησης θανάτου του οργανισμού μετά από έκθεση σε θανατηφόρες δόσεις. Η αιτία του θανάτου στα ψάρια δεν είναι τόσο σαφώς καθορισμένη.

Ωστόσο, υπάρχουν κάποια στοιχεία που υποδηλώνουν ότι οι νευρολογικές επιπτώσεις από OPs δεν οφείλονται μόνο στην χολινεργική υπερδραστητικότητα ή σε επιληπτικές κρίσεις. Δευτερεύοντος μπορεί να αλλάξουν τα επίπεδα άλλων νευροδιαβιβαστών και να επιδεινωθεί η χολινεργική δραστηριότητα. Οι El Etri et al. (1992) παρατήρησαν μείωση των επιπέδων της νορεπινεφρίνης (norepinephrine) σε

επίμυς που είχαν επιληπτικές κρίσεις μετά από χορήγηση του OP Soman. Λίγα OPs μεταξύ των οποίων και το methamidophos, προκαλούν το σύνδρομο της καθυστερημένης πολυνευροπάθειας (organophosphate-induced delayed (poly)-neuropathy, OPIDN) η οποία συνδέεται με εκτεταμένη και μακροχρόνια βλάβη στο ΚΝΣ και ΠΝΣ συνήθως 1-3 εβδομάδες μετά από έκθεση σε OPs (Wilson, 2005).

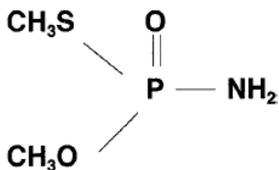
Η έκθεση σε παρεμποδιστές της ACh, μέσω του αέρα προκαλεί μύση της κόρης των οφθαλμών, λόγω δυσλειτουργίας του σφιγκτήρα της ίριδας μυός (Rengstorff, 1994; Moser, 1995). Επιπρόσθετα, η επίδραση επί του βλεφαριδικού μυός του οφθαλμού μπορεί επίσης, να προκαλέσει εκροή του υδατοειδούς υγρού (Soli et al. 1980; Benschop et al. 1998).

Οι οργανισμοί συχνά παρουσιάζουν διαφορετική συμπεριφορά και όχι τα ίδια συμπτώματα στην έκθεσή τους σε OPs. Ιδιαίτερα σημαντική φαίνεται να είναι η διάσταση που παρατηρείται σε διαφορετικές ερευνητικές δραστηριότητες σχετικά με το ρυθμό κατανάλωσης τροφής (Banas and Sprague, 1986; Pavlov et al. 1992; Da Silva et al. 1993; McLoughlin et al. 2000; Roex et al. 2002) την παραγωγή αυγών (Bresch et al. 1986, Roex 2000, Roex et al. 2002) αλλά και στη θνησιμότητα που παρατηρείται στα ψάρια μετά από έκθεσή τους σε OPs (Van der Wel and Welling, 1989; Zinkl et al. 1991; Legierse, 1998; Roex et al. 2002).

Αν και δεν είναι τόσο σαφές όσο στα θηλαστικά, τα OPs στα πτηνά έδειξαν παρόμοια τοξικότητα. Ωστόσο, φαίνεται να υπάρχει μεγαλύτερη διαφοροποίηση μεταξύ των ειδών. Μπορεί να υπάρχει μεγαλύτερη ποικιλία στη φυσιολογία ανάμεσα στα είδη πτηνών από τα θηλαστικά που μπορεί να είναι υπεύθυνη για αυτές τις διαφορές. Διατροφικές ελλείψεις, χαμηλή περιεκτικότητα σε αποθέματα λίπους, κακή κατάσταση της φυσιολογίας τους, καθώς και υψηλές ενεργειακές ανάγκες για μετανάστευση, μπορεί να αυξήσουν την ευπάθεια σε αυτές τις ενώσεις. Διάφορα χαρακτηριστικά της συμπεριφοράς τους μπορεί επίσης να αυξήσουν τη πιθανότητα έκθεσης σε OPs.

Υπάρχει μεγάλη διακύμανση στην τοξικότητα των φωσφοροθειικών ριζών και φωσφορικών ριζών για τα υδρόβια είδη, όπως η ιριδίζουσα πέστροφα, η οποία θεωρείται ότι είναι αρκετά ευαίσθητο είδος. Εντούτοις, στα πιο ανθεκτικά είδη, χρυσόψαρα (*Pimephales promelas*), και γατόψαρο, αποδείχθηκε παρόμοια τοξικότητα στις φωσφοροθειικές ρίζες. Η σύγκριση των δεδομένων τοξικότητας των υδρόβιων ειδών με εκείνες των θηλαστικών και πτηνών δεν οδήγησαν σε τυχόν συσχετίσεις (Chambers and Carr, 1995).

1.8.8.1.4 Methamidophos



Εικ. 1.8-13: Χημική δομή του methamidophos (O,S-dimethyl phosphoamidothiolate)

Το methamidophos είναι ένα διασυστηματικό εντομοκτόνο και ακαρεοκτόνο επαφής και στομάχου. Πρωτοεμφανίστηκε το 1969 με τα εμπορικά ονόματα Monitor και Tamaron (Εικ.1.8-14).

Η δράση του είναι εντομοτοξική ενάντια σε μυζητικά έντομα (αφίδες, θρίπες), μασητικά έντομα (φυλλοφάγες κάμπιες) και ακάρεα σε πολλές καλλιέργειες (Παράρτημα ΙΙΙ) (Ζιώγας και Μάρκογλου, 2007).

Το methamidophos σχηματίζεται και από το μεταβολισμό ενός άλλου OP του acephate του οποίου η τοξικότητα οφείλεται σε αυτό το μεταβολισμό (Farag et al. 2000).



Εικ. 1.8-14: Συσκευασία με την οποία κυκλοφορεί στο εμπόριο (Δ12)

1.9 Μεταβολισμός και το μοντέλο επιβάρυνσης του οργανισμού (Body burden model)

Ο ρυθμός απορρόφησης, κατανομής, μεταβολισμού και απέκκρισης (Absorption, Distribution, Metabolism, Elimination, ADME) των ουσιών στο γαστρεντερικό σωλήνα των πτηνών και θηλαστικών επηρεάζει την τοξικότητα των χημικών ουσιών.

Οι μελέτες ADME μπορούν να παρέχουν πληροφορίες σχετικά με:

- Στοιχεία σχετικά με τα ποσοστά απορρόφησης στο γαστρεντερικό σωλήνα.
- Στοιχεία για το μεταβολισμό (κινητική/ρυθμός σχηματισμού).
- Στοιχεία για τα ποσοστά απέκκρισης.
- Στοιχεία σχετικά με τις πιθανές ενέργειες ενεργοποίησης/απενεργοποίησης.

Από τη σύγκριση των δεδομένων έκθεσης από το στόμα και μέσω της τροφής, και τις μεγάλες διαφορές που υπάρχουν μεταξύ τους, μπορεί να υποδεικνύεται ο σημαντικός ρόλος του μεταβολισμού στην έκφραση της εγγενούς τοξικότητας μιας ουσίας.

Τα δεδομένα του μεταβολισμού μπορεί να συμπεριλάβουν και την αποφυγή της λήψης της τροφής ως παράγοντα αναθεώρησης της εκτίμησης της επικινδυνότητας.

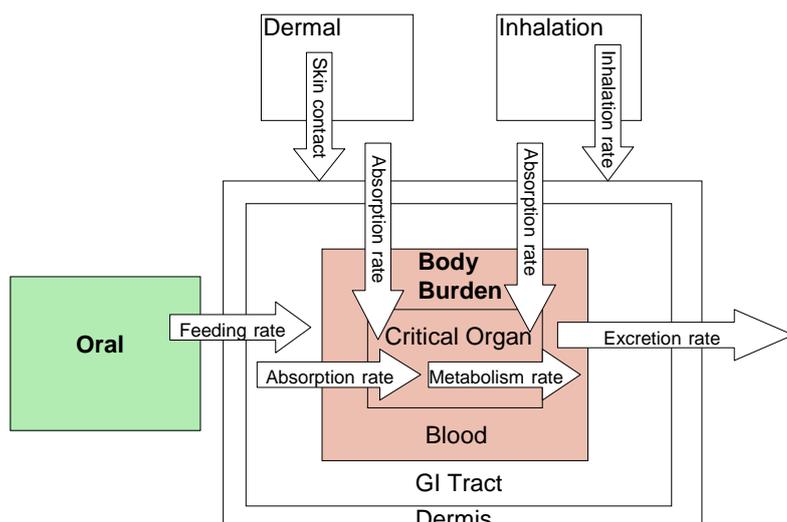
Υπάρχει ευρεία συμφωνία μεταξύ των ερευνητών ότι η αποφυγή της λήψης της τροφής είναι ένας σημαντικός παράγοντας, που συχνά συμβαίνει στον αγρό, και ως εκ τούτου, θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη κατά την αξιολόγηση της επικινδυνότητας. Τα δεδομένα των ADME μελετών και η σύγκριση των αποτελεσμάτων του πειραματισμού από τη χορήγηση των δραστικών ουσιών από στόματος και μέσω της τροφής, μπορούν να παρέχουν ένα μέσο για να ληφθεί υπόψη η αποφυγή της λήψης τροφής, όσον αφορά την εκτίμηση της επικινδυνότητας.

Αρκετές δημοσιεύσεις έγιναν τα τελευταία χρόνια, παρουσιάζοντας μοντέλα, που επέτρεψαν τη χρήση της απορρόφησης, του μεταβολισμού και της απέκκρισης στην εκτίμηση της αξιολόγησης της επικινδυνότητας για τα πτηνά και τα θηλαστικά (EFSA, 2005).

Το μοντέλο επιβάρυνσης του οργανισμού (-ων) παρέχει ένα εργαλείο:

- Για την μελέτη των πιθανών διεργασιών ενεργοποίησης ή απενεργοποίησης και τελικά εξάλειψης μιας ουσίας μέσα στον οργανισμό κατά την αξιολόγηση της επικινδυνότητας.
- Για τη μελέτη της επίδρασης του ρυθμού απορρόφησης μιας ουσίας στο γαστρεντερικό σωλήνα και την εκδήλωση της αποφυγής της λήψης τροφής (avoidance) και της επικινδυνότητας που διατρέχουν τα χερσαία σπονδυλωτά.
- Για να χρησιμοποιηθεί η εμπειρία που αποκτήθηκε από τη φαρμακευτική έρευνα στην αξιολόγηση της επικινδυνότητας για τον άνθρωπο.
- Για την αξιολόγηση της βιοσυσώρευσης της ουσίας ή/και των μεταβολιτών του.
- Για να συμπεριληφθούν και άλλες οδοί έκθεσης (δερματική/αναπνευστική), στην εκτίμηση του επικινδυνότητας. Ωστόσο, σήμερα δεν υπάρχουν παραδείγματα για αυτή τη χρήσης τους στην άγρια ζωή.

Το μοντέλο επιβάρυνσης του οργανισμού παρέχει μια μηχανιστική προσέγγιση που έχει χρησιμοποιηθεί ελάχιστα στην εκτίμηση της επικινδυνότητας της άγριας ζωής, παρά την εκτεταμένη χρήση της στη φαρμακευτική έρευνα. Κατ' αρχήν λαμβάνει υπόψη την κινητική της απορρόφησης, του μεταβολισμού και της απέκκρισης καθώς και την κατανομή της χημικής ουσίας. Μέσα από την κατανόηση της κινητικής και της ποσότητας της έκθεσης υπάρχει η δυνατότητα να εκτιμηθεί η επιβάρυνση του οργανισμού, ακόμη και η κρίσιμη επιβάρυνση οργάνων, για τις συνδυασμένες οδούς έκθεσης. Οι επιβαρύνσεις αυτές μπορούν να συγκριθούν με τα όρια θνησιμότητας και υπο-θανατηφόρων επιδράσεων των επιβαρύνσεων τους σώματος, όπως η εκδήλωση της αποφυγής της λήψης τροφής. Με αυτό τον τρόπο μπορεί να μοντελοποιηθούν τα χρονοδιαγράμματα της έκθεσης και της επίδρασης και να αξιολογηθούν οι επιπτώσεις της αποφυγής της λήψης τροφής και της θνησιμότητας (Εικ. 1.9-1).



Εικ. 1.9-1: Ένα εννοιολογικό μοντέλο για την μοντελοποίηση της επιβάρυνσης του σώματος

Το μοντέλο επιβάρυνσης του οργανισμού έχει τη δυνατότητα να διερευνήσει ορισμένες από τις μεγαλύτερες προκλήσεις στους τομείς της αξιολόγησης της επικινδυνότητας για την άγρια ζωή που δεν αντιμετωπίζεται επαρκώς με τις σημερινές μεθόδους. Σε αυτές περιλαμβάνονται:

1. Η σχετική συνεισφορά από το στόμα, το δέρμα και την εισπνοή στην έκθεση.
2. Ο κίνδυνος από τις ουσίες που απορροφώνται και αποβάλλονται σε ώρες και όχι σε ημέρες.
3. Ο ρόλος της αποφυγής της τροφής στον περιορισμό της έκθεσης σε επίπεδα χαμηλότερα από τα θανατηφόρα.
4. Ο κίνδυνος μέσω της βιοσυσσώρευσης.

Η παραμετροποίηση είναι μία πρόκληση και σπάνια είναι διαθέσιμη για την κάλυψη του συνόλου των δυνατοτήτων των μοντέλων BB. Ωστόσο, τα BB μοντέλα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη διαμόρφωση του προβλήματος και μέσω της ανάλυσης της ευαισθησίας να καθοριστούν οι σημαντικοί παράμετροι. Μπορεί να είναι αναγκαίο να αξιολογηθεί μόνο μέρος του μοντέλου. Για παράδειγμα, για να κατανοηθεί

ο ρόλος της αποφυγής της τροφής μπορεί μόνο να είναι αναγκαίο να αξιολογηθεί η οδός της έκθεσης από το στόμα. Σε αυτή την περίπτωση, μπορεί μόνο να είναι αναγκαίο να αποδειχθεί ότι η ουσία απορροφάται γρήγορα και αποβάλλεται. Το μοντέλο BB προβλέπει ότι ο κίνδυνος είναι μικρός είτε όταν η απορρόφηση είναι ταχεία, δημιουργώντας άμεση απόκριση της αποφυγής της λήψης τροφής, είτε όταν είναι αργή, επιτρέποντας την απέκκριση να διατηρεί την επιβάρυνση του οργανισμού κάτω από το θανατηφόρο όριο. Ενδιάμεσα ποσοστά απορρόφησης μπορεί να οδηγήσουν σε μεγαλύτερο κίνδυνο (Powley et al. 2007).

Στην EFSA (2009) χρησιμοποιούνται αναλυτικές εξισώσεις στο μοντέλο για τον υπολογισμό της μέγιστης επιβάρυνσης του οργανισμού (οξεία δόση) και ο χρόνος για την επίτευξη του LD₅₀ (ή εναλλακτικά η καθορισμένη τοξικολογική ένδειξη). Εισαγόμενα δεδομένα είναι ο ρυθμός σίτισης, το τοξικό όριο (π.χ. LD₅₀), η δόση ορίου αποφυγής της πρόσληψης διατροφής (Avoidance Delay Time, AVT), ο χρόνος καθυστέρησης της αποφυγής της πρόσληψης τροφής (Avoidance Threshold, AVD) και το ποσοστό αποβολής (χρόνος απέκκρισης ημίσειας ζωής). Η AVT είναι η χαμηλότερη έκθεση (δηλ., επιβάρυνση του οργανισμού) που έχει ως αποτέλεσμα τη διακοπή της σίτισης (όχι από μία τοπική επίδραση που προκαλείται από τον ερεθισμό, τη γεύση ή την οσμή). Η δόση χρησιμοποιείται για να δείξει το συνολικό ποσό της καταναλωθείσας δραστικής ουσίας σε συνάρτηση με το χρόνο (αγνοώντας την αποβολή), αλλά σε άλλες περιπτώσεις χρησιμοποιείται για να δείξει την επιβάρυνση του οργανισμού. Αν ως "δόση" χρησιμοποιείται για να δείξει το συνολικό ποσό που καταναλώνεται τότε ο AVD είναι ο χρόνος που απαιτεί η επιβάρυνση του οργανισμού για την επίτευξη του AVT αφού η "δόση" έχει φθάσει την AVT. Είναι, επίσης, ο χρόνος που απαιτείται για να αδειάσει το έντερο και, επομένως, η επιβάρυνση του οργανισμού να φθάσει ένα ανώτατο όριο αφού έχει φτάσει την AVT.

Η κινητική της ADME υποτίθεται ότι είναι συνάρτηση πρώτης τάξης. Αρχικά ο ρυθμός πρόσληψης είναι μεγαλύτερος από το ποσοστό αποβολής έτσι η επιβάρυνση του οργανισμού θα αυξηθεί μέσα στο χρόνο. Ωστόσο, δεδομένου ότι αυξάνει ο ρυθμός αποβολής όσο αυξάνεται η επιβάρυνση του οργανισμού, αυτή φθάνει ένα ανώτατο όριο, είτε όταν το ποσοστό αποβολής είναι ίσο με το ποσοστό πρόσληψης ή όταν το ζώο σταματά να τρώει επειδή έχει ξεπεραστεί η AVT. Στην περίπτωση της υπέρβασης της AVT, η σίτιση επανέρχεται αμέσως μόλις η επιβάρυνση του οργανισμού πέσει κάτω από το AVT. Ωστόσο, εάν η επιβάρυνση του οργανισμού υπερβαίνει το τοξικό όριο, το ζώο πεθαίνει.

Η απόκριση της αποφυγής της λήψης τροφής είναι γνωστή για χημικές ουσίες με υψηλή οξεία τοξικότητα, ιδίως όταν τοποθετούνται στην τροφή, όπως οι σπόροι. Αυτή είναι μια αντίδραση που είναι γνωστό ότι περιορίζει τα περιστατικά στον τομέα αυτό. Στο μοντέλο επιβάρυνσης του οργανισμού υπάρχει ένα όριο αποφυγής όπου σταματάει η λήψη της τροφής. Αυτή η επιβάρυνση του οργανισμού που υπολογίζεται είναι ένα ποσοστό της θανατηφόρου επιβάρυνσης του οργανισμού (που προέρχεται από την LD_{50}). Η αποφυγή είναι πιο αποτελεσματική εάν το όριο είναι ένα μικρό ποσοστό της LD_{50} και η επίδραση είναι αναστρέψιμη. Η αντίδραση της αποφυγής αποτυγχάνει όταν η ποσότητα της ξενβιοτικής ουσίας στο σιτηρέσιο φτάσει τη θανατηφόρα δόση πριν η αντίδραση αποφυγής έχει το χρόνο να εμποδίσει την περαιτέρω έκθεση.

1.10 Σκοπός της μελέτης

Σκοπός της μελέτης ήταν να διερευνηθούν οι επιπτώσεις της χορήγησης OPs, και ειδικότερα του methamidophos, σε διάφορους ιστούς (εγκέφαλος, δωδεκαδάκτυλο και ήπαρ) και στο πλάσμα, δύο σημαντικών βιοδεικτών, όπως το ορτύκι και η πέστροφα, με βάση διεθνώς θεσπισμένα πρωτόκολλα.

Ειδικότερα να μελετηθεί η επίδραση του methamidophos στην βιοχημική και ιστοχημική έκφραση των ChEs στους ιστούς που αναλύθηκαν, με δεδομένη τη λειτουργική αναστολή τους, ύστερα από τη χορήγηση OPs. Η συσχέτιση της ιστοχημικής έκφρασης της BuChE με αυτή της AChE στον εγκέφαλο εμβρύων ορτυκιού (Layer, 1991), σε συνδυασμό με την ικανότητα της BuChE να υδρολύει και την ACh (Silver, 1974; Darvesh et al. 1998; Fulton and Key, 2001; Valbonesi et al. 2003), προκάλεσαν το ενδιαφέρον ώστε να διερευνηθεί και η βιοχημική και ιστοχημική έκφραση της BuChE με διάφορα υποστρώματα και παρεμποδιστές στους δύο βιοδείκτες και σε όλους τους ιστούς που αναλύθηκαν.

Πρόσθετα στα πτηνά να μελετηθεί η συμπεριφορά τους μετά από τον ψεκασμό του methamidophos με βάση τα αποτελέσματα εκτεταμένου πειραματισμού σε εργαστηριακές συνθήκες και συνθήκες «ημι-αγρού», αλλά και εκτίμηση της επικινδυνότητας στον αγρό σε πραγματικές συνθήκες ειδικότερα για την Ελλάδα.

Τονίζεται, ότι για πρώτη φορά μελετάται η επίδραση μιας χημικής ουσίας ολιστικά από το εργαστηριακό επίπεδο μέχρι τις επιπτώσεις στον αγρό σε τόσο εκτεταμένο πειραματισμό. Επίσης μελετάται για πρώτη φορά η επίδραση κάποιας χημικής ουσίας σε ιστούς βιοδεικτών, σε διάφορες ηλικίες αλλά και με συνδυασμό βιοχημικών και ιστοχημικών μεθόδων. Ειδικότερα για τις ChEs έγινε διερεύνηση της έκφρασής τους με κάθε δυνατό συνδυασμό υποστρωμάτων και παρεμποδιστών τόσο στις βιοχημικές όσο και στις ιστοχημικές αναλύσεις. Ιστοχημικά για πρώτη φορά διερευνάται και το εντερικό νευρικό σύστημα που, πιθανώς, επηρεάζεται αφού ο γαστρο-εντερικός σωλήνας αποτελεί την εισόδο του methamidophos από τη λήψη μέσω του στόματος στον οργανισμό. Τελικά για πρώτη φορά παρουσιάζεται εκτίμηση της επίδρασης του methamidophos σε συνθήκες που αντιπροσωπεύουν την Ελληνική ορνιθοπανίδα σε αγροτικές καλλιέργειες, με συγκεκριμένο μοντέλο που αναπτύσσεται σύμφωνα με τα αποτελέσματα του πειραματισμού.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΣΜΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ

2.1.1 Αξιολόγηση τοξικότητας στο ορτύκι

2.1.1.1 Δοκιμές οξείας τοξικότητας από το στόμα

Ο πειραματισμός σχεδιάστηκε για τον υπολογισμό της οξείας τοξικότητας (LD_{50}) από το στόμα του methamidophos στο ιαπωνικό ορτύκι (*Coturnix coturnix japonica*). Η μελέτη διεξήχθη σύμφωνα με τις αρχές του OECD guidelines draft 223, October 2002, Avian Acute Oral Toxicity Test και του United States Environmental Protection Agency Ecological Effects Guidelines, OPPTS 850.2100, Avian acute oral toxicity test, dated April 1996.

Για τους σκοπούς του πειραματισμού, χρησιμοποιήθηκαν ως αντιπροσωπευτικοί βιοδείκτες για τους χερσαίους οργανισμούς όπως το ορτύκι (*Coturnix coturnix japonica*) Τα ορτύκια, ταΐζονται *ad libitum* ενώ πριν τη χορήγηση της δόσης του τοξικού παράγοντα τα πτηνά ακολουθούν το ίδιο σιτηρέσιο και για την περίοδο εγκλιματισμού 2 εβδομάδων πριν την έναρξη του πειραματισμού με εξαίρεση την περίοδο νηστείας 15 ωρών πριν τη χορήγηση των δόσεων. Τα ορτύκια είναι ενήλικα (όχι μικρότερα των 126 εβδομάδων) και τοποθετούνται σε κλωβούς των 5-10 ατόμων.

Η θερμοκρασία του θαλάμου πρέπει να κυμαίνεται από 15 – 27° C και η διάρκεια φωτισμού ήταν 8 ώρες φως – 16 ώρες σκοτάδι.

Στα ορτύκια χορηγείται ποσότητα διαλύματος του τοξικού παράγοντα σε διάφορες δόσεις σε 5 δόσεις το ελάχιστο. Η διάρκεια του πειραματισμού είναι 14 ημέρες. Μετά τη χορήγηση της δόσης, τα ορτύκια βρίσκονται υπό παρατήρηση όπου καταγράφεται η θνησιμότητα, κλινικά συμπτώματα, τα σωματικά βάρη, η καθημερινή κατανάλωση της τροφής. Τελικά υπολογίζεται το LD_{50} που αντιστοιχεί στην δόση του τοξικού παράγοντα που προκαλεί 50% θνησιμότητα. Επίσης υπολογίζεται το NOEC και LOEC που αντιστοιχούν στην δόση που δεν προκαλεί θνησιμότητα και η χαμηλότερη συγκέντρωση που προκαλεί θνησιμότητα, αντίστοιχα.

2.1.1.2 Δοκιμές υποξείας τοξικότητας (διατροφής)

Ο πειραματισμός σχεδιάστηκε για τον υπολογισμό της υποξείας τοξικότητας (LC₅₀) του methamidophos στο ιαπωνικό ορτύκι (*Coturnix coturnix japonica*). Η μελέτη διεξήχθη σύμφωνα με τις αρχές του OECD guideline No 205 draft Guideline for Testing of Chemicals, "Avian Dietary Toxicity Test".

Τα ορτύκια διατηρούνται σε συνθήκες ανάλογες όπως περιγράφηκαν και στον πειραματισμό οξείας τοξικότητας από το στόμα. Τα ορτύκια είναι νεαρά, ηλικίας μέχρι 14 ημερών ή >14 ημέρες. Στα ορτύκια χορηγείται σιτηρέσιο συντήρησης που περιέχει τον τοξικό παράγοντα σε διάφορες συγκεντρώσεις, κατ' ελάχιστον 5, για 5 συνεχείς ημέρες. Την 6η ημέρα χορηγείται καθαρό σιτηρέσιο απαλλαγμένο από το methamidophos για 3 συνεχείς ημέρες (ως την ημέρα 8) οπότε και ολοκληρώνεται το πείραμα. Πρόσθετα θα πρέπει να γίνει και ανάλυση υπολειμμάτων του σιτηρεσίου ώστε να είναι στο όριο των $\pm 20\%$ απόκλισης των ονομαστικών συγκεντρώσεων.

Οι παρατηρήσεις και οι τελικοί υπολογισμοί είναι ανάλογοι της δοκιμής οξείας τοξικότητας από το στόμα.

2.1.1.3 Δοκιμές αποφυγής τροφής "no-choice test"

Ο πειραματισμός ήταν αυτός που πραγματοποιήθηκε για τον υπολογισμό της υποξείας τοξικότητας (LC₅₀) και τροποποιήθηκε στον υπολογισμό την αντίδρασης αποφυγής της πρόσληψης τροφής "no-choice test" του methamidophos στο ιαπωνικό ορτύκι. Η αντίδραση αποφυγής οδηγεί στη μείωση της προσληφθείσας τροφής και έτσι επηρεάζει τη δυσμενή δράση του methamidophos. Όσον αφορά τον υπολογισμό για την αντίδραση αποφυγής για τα ορτύκια, ακολουθήθηκε το draft Guideline for Testing of Chemicals, "Avian Repellency Test", draft new guideline.

Παράλληλα με τις καταγραφές που έγιναν για τον υπολογισμό της υποξείας τοξικότητας γίνεται και ανάλυση του πειραματισμού για την εκτίμηση της συμπεριφοράς αποφυγής της τροφής "no-choice test".

Υπολογίζεται ο συντελεστής αποφυγής (RF) με την σύγκριση του ρυθμού πρόσληψης τροφής «Food Intake Rates (FIR)» από το σιτηρέσιο των διάφορων συγκεντρώσεων του τοξικού παράγοντα και το καθαρό σιτηρέσιο κατά την περίοδο της έκθεσης. Το FIR αναφέρεται στην ημερήσια κατανάλωση τροφής ανά ημέρα ανά κιλό σωματικού βάρους (mg/kg).

Συγκεκριμένα:

$$RF = \frac{\text{FIR από το ρυπασμένο σιτηρέσιο}}{\text{FIR από το καθαρό σιτηρέσιο}}$$

Το RF υπολογίζεται για την κάθε συγκέντρωση. Αφού ο πειραματισμός γίνεται σε διάφορες συγκεντρώσεις, είναι δυνατόν να γίνει υπολογισμός της χαμηλότερης συγκέντρωσης που δεν εκδηλώνεται η συμπεριφορά αποφυγής της πρόσληψης τροφής (NOEC ή NoRC). Το NOEC ή NoRC καθορίζεται ως το RF των υψηλότερης συγκέντρωσης που δεν έχει στατιστικά σημαντική διαφορά με τον μάρτυρα.

Οι τιμές που παίρνει ο RF κυμαίνονται από το 0 έως το 1. RF=0 σημαίνει πλήρης αποφυγή της λήψης τροφής ενώ RF=1 σημαίνει ότι δεν υπάρχει αποφυγή. Από τον συντελεστή αποφυγής της πρόσληψης τροφής μπορεί να υπολογιστεί και το ποσοστό της μείωσης της λήψης τροφής (π.χ. RF = 0.2 σημαίνει μείωση της λήψης τροφής κατά 80% (FR)).

$$FR (\%) = 100 \% - (RF \times 100\%).$$

2.1.1.4 Δοκιμές αποφυγής τροφής “two-choice test”

Ο πειραματισμός προσαρμόστηκε για τον υπολογισμό της αντίδρασης αποφυγής της πρόσληψης τροφής “two-choice test”, του methamidophos στο ιαπωνικό ορτύκι (*Coturnix coturnix japonica*). Όσον αφορά τον υπολογισμό για την αντίδραση αποφυγής για τα ορτύκια, ακολουθήθηκε το draft Guideline for Testing of Chemicals, "Avian Repellency Test", draft new guideline.

Τα ορτύκια διατηρούνται σε συνθήκες ανάλογες όπως περιγράφηκαν και στον πειραματισμό της υποξείας τοξικότητας. Τα ορτύκια τοποθετούνται σε κλωβούς, καθώς και αυτόματες ταΐστρες (2 ανά κλωβό) και ποτίστρες.

Η εκτίμηση της αποφυγής της πρόσληψης τροφής με συγκεκριμένη συγκέντρωσης σε ξενοβιοτική ουσία είναι δυνατή με το να τοποθετηθεί 1 ταΐστρα με σιτηρέσιο απαλλαγμένο από την ουσία αυτή και 1 ταΐστρα με ρυπασμένο σιτηρέσιο, ανά κλωβό. Η διάρκεια του έκθεσης είναι 1 ημέρα. Από την επόμενη χορηγείται καθαρό σιτηρέσιο για 3 συνεχείς ημέρες.

Ο πειραματισμός έχει σχεδιαστεί για τον υπολογισμό ενός συντελεστή που ποσοτικοποιεί την αποφυγή της τροφής. Από την καθημερινή κατανάλωση της τροφής στο μάρτυρα και σε κάθε επέμβαση και στις 2 ταΐστρες ανά κλωβό υπολογίζεται ο

συντελεστής αποφυγής της πρόσληψης τροφής.

Ο συντελεστής αποφυγής της πρόσληψης τροφής (RF) υπολογίζεται ανάλογα με τις δοκιμές αποφυγής τροφής “no-choice test” αλλά με τις 2 ταΐστρες η εξίσωση υπολογισμού είναι ως εξής:

$$RF = \frac{\text{FIR από το ρυπασμένο σιτηρέσιο}}{\text{Συνολικό FIR από το καθαρό σιτηρέσιο και το ρυπασμένο} \times 1/2}$$

Το RF υπολογίζεται για την κάθε συγκέντρωση ξεχωριστά, καθώς και το NOEC (ή NoRC). Οι τιμές που παίρνει ο RF κυμαίνονται από το 0 έως το 2. RF=0 σημαίνει πλήρης αποφυγή της λήψης τροφής ενώ RF=1 σημαίνει ότι δεν υπάρχει αποφυγή. Το RF παίρνει την τιμή 2 όταν υπάρχει πλήρης προτίμηση του σιτηρεσίου με methamidophos.

Επίσης υπολογίζεται και η μέση συγκέντρωση αποφυγής (median food avoidance concentration) (FAC₅₀). Το FAC₅₀ ορίζεται ως η μέγιστη συγκέντρωση που αναμένεται να δώσει ίδια κατανάλωση του ρυπασμένου και του καθαρού σιτηρεσίου σε πτηνά που έχουν ελεύθερη πρόσβαση και στις δύο ταΐστρες.

2.1.1.5 Δοκιμές αποφυγής τροφής ημι-αγρού “pen test”

Ο πειραματισμός σχεδιάστηκε για τον υπολογισμό της αντίδρασης αποφυγής της πρόσληψης τροφής “two-choice test”, του methamidophos στο ιαπωνικό ορτύκι τροποποιημένο για να αποδειχθεί εάν υπάρχει κίνδυνος σε συνθήκες ημι-αγρού. Όσον αφορά τον υπολογισμό την αντίδραση αποφυγής για τα ορτύκια, ακολουθήθηκε το draft Guideline for Testing of Chemicals, "Avian Repellency Test", draft new guideline και το draft Guidance Document on Testing Avian Avoidance Behaviour (pen test).

Τα ορτύκια διατηρούνται σε εξωτερικές συνθήκες περιβάλλοντος. Τα ορτύκια τοποθετήθηκαν σε κλουβιά τουλάχιστον 4m² και ύψους 2m. Η διάρκεια του έκθεσης είναι 1 ημέρα. Από την επόμενη χορηγείται καθαρό σιτηρέσιο για 3 συνεχείς ημέρες. Η έκθεση αναφέρεται σε λήψη σπόρων ενώ ο αριθμός των επαναλήψεων είναι τουλάχιστον 2.

2.1.2 Αξιολόγηση τοξικότητας στην πέστροφα

2.1.2.1 Δοκιμές οξείας τοξικότητας

Ο πειραματισμός σχεδιάστηκε για τον υπολογισμό της οξείας τοξικότητας (96h LC₅₀) του methamidophos στην πέστροφα (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). Η μελέτη διεξήχθη σύμφωνα με τις αρχές του OECD, Fish, Acute Toxicity Test 203 (Paris 1992), και διεξήχθη σε στατικές συνθήκες όπου το υδατικό διάλυμα των συγκεντρώσεων δεν ανανεωνόταν. Το προτεινόμενο μήκος της πέστροφας πρέπει να είναι $5,0 \pm 1$ cm. Η διάρκεια του πειραματισμού οξείας τοξικότητας στην πέστροφα διαρκεί 4 ημέρες. Σε κάθε επέμβαση χρησιμοποιούνται τουλάχιστον 7 ψάρια. Ο αριθμός των επεμβάσεων είναι τουλάχιστον 5.

Η συγκέντρωση του O₂ πρέπει να είναι τουλάχιστον 60 %, η θερμοκρασία 13-17°C, το pH 6,0-8,5 και η διάρκεια φωτισμού ήταν 12-16 h φως.

Η θνησιμότητα και τα κλινικά συμπτώματα καταγράφονται μετά από κάθε παρατήρηση. Τελικά υπολογίζεται το LC₅₀ τα NOEC και LOEC.

2.1.2.2 Δοκιμές παρατεταμένης (prolonged) τοξικότητας

Ο πειραματισμός σχεδιάστηκε για τον υπολογισμό της παρατεταμένης τοξικότητας 14 ημερών του methamidophos στην πέστροφα (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) με την δυνατότητα επέκτασης μίας ή δύο εβδομάδων. Η μελέτη διεξήχθη σύμφωνα με τις αρχές του OECD, Fish, Prolonged Toxicity Test: 204 (1984). Οι συνθήκες πειραματισμού είναι ανάλογες της οξείας τοξικότητας.

Τα ψάρια τρέφονται καθημερινά ενώ τα περιττώματα απομακρύνονται κάθε ημέρα.

Η θνησιμότητα και τα κλινικά συμπτώματα καταγράφονται μετά από κάθε παρατήρηση. Τελικά υπολογίζονται τα NOEC και LOEC.

2.2 ΥΛΙΚΑ

2.2.1 Χημικές ενώσεις

Οι χημικές ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η δραστική ουσία, οι χημικές ενώσεις για τον βιοχημικό πειραματισμό και οι χημικές ενώσεις για τον ιστοχημικό πειραματισμό. Αναλυτικά αναφέρονται παρακάτω.

2.2.1.1 Δραστικές ουσίες

Χημικό όνομα κατά IUPAC: O,S-dimethyl phosphoramidothioate

Κοινό όνομα: Methamidophos tech.

Καθαρότητα: 98.2%

Παρασκευαστής: Bayer CorpScience

Batch number: 2377 (M01585)

2.2.1.2 Χημικές ενώσεις για τον βιοχημικό πειραματισμό

- 1) Tris-HCl (T-3253 Sigma).
- 2) Triton X-100 (T8787 Sigma).
- 3) 5,5' dithio-bis 2-(nitrobenzoic acid) (DTNB, D8130 Sigma).
- 4) Acetylthiocholine iodide (ASCh, A5751 Sigma).
- 5) S-butyrylthiocholine iodide (BuSCh, B3253 Sigma).
- 6) Propionylthiocholine iodide (PrSCh, P2880 Sigma).
- 7) Bovine serum albumin (BSA, ICN 160069 Sigma).
- 8) Eserine (E8375 Sigma).
- 9) 1,5-bis (4-allyldimethylammoniumphenyl) pentan-3-one dibromide (BW284C51, A9013 Sigma).
- 10) Tetraisopropyl pyrophosphoramidate (iso-OMPA, T1505 Sigma).

2.2.1.3 Χημικές ενώσεις για τον ιστοχημικό πειραματισμό

- 1) Paraformaldehyde (P6148 Sigma).
- 2) Phosphate-Buffered Saline (PBS, 79382 Fluka).
- 3) Sucrose.
- 4) Sodium azide.
- 5) Tissue-Tek (Tissue freezing medium, JUNG).
- 6) Isopentane (AC126470010 Acros).

- 7) Poly-L-lysine (P8920 Sigma).
- 8) Harris haematoxylin.
- 9) Eosin Y.
- 10) Depex (18243 Serva).
- 11) Hyaluronidase (H 3506 Sigma).
- 12) Acetate buffer (παρασκευάστηκε στο Εργαστήριο Ανατομίας και Φυσιολογίας Ζώων με την προσθήκη Triton X-100).
- 13) Sodium citrate.
- 14) Copper sulphate.
- 15) Potassium ferricyanide.

2.2.1.4 Διαλύτες, χημικές ενώσεις και συσκευές για την ανάλυση υπολειμμάτων της διατροφής στη δοκιμή υποξείας τοξικότητας σε ορτύκι

- 1) Ακετόνη, καθαρότητας pesticide residues grade.
- 2) Άνυδρο θειικό νάτριο (Na_2SO_4).
- 3) Ήλιο (He), καθαρότητας χρωματογραφίας ECD (99,999%).
- 4) Άζωτο (N_2), καθαρότητας χρωματογραφίας ECD (99,999%).
- 5) Συνθετικός αέρας, ελεύθερος υδρογονανθράκων.
- 6) Υδρογόνο (H_2), καθαρότητας χρωματογραφίας ECD (99,999%).

Συσκευές και βοηθητικά μέσα

- 1) Υδατόλουτρο θερμοκρασιών ως τουλάχιστον 70°C.
- 2) Συσκευή υπερήχων.
- 3) Αεριοχρωματογράφος τριχοειδών στηλών με 2 εγχυτές, έναν τύπου splitless και έναν τύπου cold-on-column, ανιχνευτής NPD και κατάλληλο σύστημα επεξεργασίας αποτελεσμάτων (Chromcard της Fisons).
- 4) Τριχοειδείς στήλες DB-608, 30m X 0,53 mm και πάχος υμένα 0,83 μm .

2.3 ΜΕΘΟΔΟΙ

Η έκθεση του ορτυκιού και της πέστροφας στο methamidophos έγινε με βάση συγκεκριμένα διεθνή πρωτόκολλα, στα Ecotoxicological Laboratory, Fácáncert και Laboratory of hydrobiology, Százhalombatta, της Ουγγαρίας. Ο πειραματισμός με τους προαναφερθέντες βιοδείκτες έγινε βάσει των αρχών της Ορθής Εργαστηριακής Πρακτικής (ΟΕΠ-Good Laboratory Practice, GLP) αφού και τα δύο εργαστήρια είναι πιστοποιημένα ΟΕΠ. Ο πειραματισμός πραγματοποιήθηκε επί δύο χρόνια. Η προμήθεια της πέστροφας και των ορτυκίων αλλά και η εκτροφή ορτυκίων έγινε στην Ουγγαρία.

2.3.1 Αξιολόγηση τοξικότητας στο ορτύκι

2.3.1.1 Δοκιμές οξείας τοξικότητας από το στόμα

Η μελέτη που περιγράφεται έγινε με τις αρχές της Ορθής Εργαστηριακής Πρακτικής (OECD Principles on Good Laboratory Practice (as revised in 1997), OECD ENV/MC/CHEM(98)17 και GLP regulations of Hungary 9/2001 (III.30) EuM-FVM.

Τα ορτύκια (ηλικίας 3,5 μηνών) εκτράφηκαν στο Ecotoxicological Laboratory στο Fácáncert της Ουγγαρίας και χρησιμοποιήθηκαν για δοκιμές οξείας τοξικότητας. Τα ορτύκια ήταν άρρενα, εκτός του μάρτυρα που ήταν άρρενα και θήλεα. Το φύλο των πτηνών δεν μπορούσε να προσδιοριστεί με ακρίβεια λόγω μη διαφοροποίησης χρωματισμού σε αυτή την ηλικία. Προσδιορίστηκε κατά τη διάρκεια και στο τέλος του πειραματισμού με την λήψη των ιστοτεμαχίων. Το σωματικό τους βάρος ήταν από 120-180 gr.

Τα ορτύκια, πριν την έκθεση στο methamidophos, ταΐζονταν με σιτηρέσιο εμπορίου, το οποίο κάλυπτε τις ανάγκες συντήρησης των πτηνών (Πίνακας 2.3-3). Η περίοδο νηστείας ήταν 16 ώρες πριν τη χορήγηση των δόσεων.

Η σχετική υγρασία του θαλάμου κυμαινόταν μεταξύ 30 – 75 %, η θερμοκρασία από 18 – 22° C και η διάρκεια φωτισμού ήταν 8 ώρες φως – 16 ώρες σκοτάδι.

Τα ορτύκια σημάνθηκαν με ατομικά ταμπελάκια σε ένα από τα κάτω άκρα. Τα πτηνά ζυγίστηκαν ατομικά πριν την έναρξη του πειραματισμού και στη συνέχεια έγινε ο καταμερισμός τους σε ομάδες με ένα τυχαιοποιημένο σχέδιο, με σκοπό όλες οι επεμβάσεις να έχουν ανάλογο μέσο σωματικό βάρος και όμοιες κατανομές.

Μια εβδομάδα πριν από την έκθεση στο methamidophos, για την επίτευξη

εγκλιματισμού, τα ορτύκια τοποθετήθηκαν σε κλωβούς διαστάσεων 51 x 103 x 37 cm, με πάτωμα, σε ομάδες των 10 πτηνών /ομάδα επέμβασης (8 πτηνά / κλωβό για την ομάδα μάρτυρα), χωρισμένα σε 2 κλωβούς, και αυτόματες τάιστρες και ποτίστρες. Μετά από 2 ημέρες, για την μεσαία και τις 2 μεγαλύτερες δόσεις όπως αυτές καταγράφονται στην επόμενη παράγραφο, σε 5 πτηνά επαναλήφθηκε ο πειραματισμός ώστε να συλλεχθούν δείγματα, 0,5 και 1 ώρα μετά την χορήγηση του methamidophos (Εικ. 2.3-1).



Εικ. 2.3-1: Πειραματισμός για τον υπολογισμό της οξείας τοξικότητας (LD_{50}) από το στόμα του methamidophos στο ιαπωνικό ορτύκι (Φουντουλάκης Μ.)

Στα ορτύκια χορηγήθηκε ποσότητα διαλύματος methamidophos σε νερό ως μέσο διάλυσης, άπαξ, με σύριγγα μιας χρήσεως και καθετήρα, για επίτευξη των δόσεων 1, 2,2, 5, 11,2 και 25 mg/kg ζώντος βάρους (bw) ενώ στον μάρτυρα χορηγήθηκε μόνο νερό. Δινόταν ιδιαίτερη προσοχή, ώστε να επιβεβαιωθεί ότι τα πτηνά είχαν καταπιεί όλη τη δόση πριν επιστρέψουν στα κελιά τους.

Μετά τη χορήγηση της δόσης, τα ορτύκια βρίσκονταν υπό συχνή παρατήρηση και ειδικότερα κατά την διάρκεια της ημέρας 0, η παρακολούθηση έγινε στην 1^η μισή ώρα και 1 ώρα μετά την χορήγηση της δόσης και σε τακτά διαστήματα για τις πρώτες 12 ώρες.

Τα σωματικά βάρη μετρήθηκαν τις ημέρες 0 (πριν την χορήγηση της δόσης), 3, 7 και 14. Η κατανάλωση της τροφής μετρήθηκε καθημερινά, στο μάρτυρα και σε κάθε

επέμβαση. Οι ταΐστρες και το περιεχόμενό τους ζυγίζονταν στις 08:00 καθημερινά και ξαναγεμίζονταν με νέο μετρημένο φαγητό. Η κατανάλωση της τροφής υπολογίζονταν ως η διαφορά ανάμεσα στις τιμές που καταγράφονταν και από την κατανάλωση τροφής ξεχωριστά ανά κλωβό υπολογίζονταν η μέση κατανάλωση τροφής (gr/πτηνό/ημέρα).

Καταγράφονταν η θνησιμότητα και τα κλινικά συμπτώματα των πτηνών σε διάφορους χρόνους από την έκθεση. Τελικά υπολογίστηκε το LD₅₀ της θνησιμότητας σε 10 πτηνά/κλωβό (8 για τον μάρτυρα) το NOEC και LOEC.

Ιστοτεμάχια από τους προς μελέτη ιστούς παρελήφθησαν κατά τις ημέρες 0 (2h, 3h, 4h), 1, 3 και 14 του πειράματος, όπως αναλύεται παρακάτω (κοίτα στο 2.3.3) (Πίνακες 2.3-1, 2).

Πίνακας 2.3-1: Δειγματοληψία ορτυκίων (δοκιμή οξείας τοξικότητας, αρχικός πειραματισμός)

Methamidophos (mg/kg bw)	Ημέρες μετά τη χορήγηση								
	0 0h	0 0.5h	0 1h	0 2h	0 3h	0 4h	1	3	14
0	8 ¹	-	-	-	-	-	2A	2A	4A
1	10	-	-	-	-	-	2A	2A	4A (2A)
2,2	10	-	-	-	-	-	2A	2A	4A (2A)
5	10	-	-	-	2D (2D)	1D	-	2A	3A
11,2	10	-	-	6D (2D)	-	-	1D (1D)	-	-
25	10	-	-	6D (4D)	-	-	-	-	-

¹ Αρχικός αριθμός ορτυκίων
A=Ζώντα ορτύκια
D=Νεκρά ορτύκια
Αριθμός ορτυκίων που **δε** λήφθησαν ως δείγματα σε ()

Πίνακας 2.3-2: Δειγματοληψία ορτυκίων, (δοκιμή οξείας τοξικότητας, επαναληπτικός πειραματισμός)

Methamidophos mg/kg bw	Ημέρες μετά τη χορήγηση		
	0 0h	0 0.5h	0 1h
5	5 ¹	2A	3A
11,2	5	2A	2A, 1D
25	5	-	3A (2A)

¹ Αρχικός αριθμός ορτυκίων
A=Ζώντα ορτύκια
D=Νεκρά ορτύκια
Αριθμός ορτυκίων που **δε** λήφθησαν ως δείγματα σε ()

Κατά τη δειγματοληψία των ορτυκίων (Πίνακες 2.3-1, 2), ιστοί από τους οποίους παρελήφθησαν ως δείγματα ήταν ο εγκέφαλος, το ήπαρ, το δωδεκαδάκτυλο, καθώς και το πλάσμα του αίματος αλλά μόνο από τα ζώντα άτομα (Εικ. 2.3-2). Καταγράφηκε επίσης το βάρος του εγκεφάλου και του ήπατος και έγινε μακροσκοπική εξέταση για πιθανές βλάβες των ιστών καθώς και για την ύπαρξη τροφής στον πρόλοβο.



Εικ. 2.3-2: Χώρος για τη συλλογή ιστών ιαπωνικού ορτυκιού (Φουντουλάκης Μ.)

Πίνακας 2.3-3: Βασικό σιτηρέσιο ανάπτυξης ορτυκιού (Παρασκευαστής: Szekszárd Mg. Joint-Stock Company)

Συστατικά	Περιεκτικότητα (%)
Βασικό μείγμα (Σιτηρέσιο συντήρησης) †	80.2
Σογιάλευρο	14.2
Ιχθυάλευρο	5.5
Ανθρακικό ασβέστιο	0.1

† η σύνθεση παρουσιάζεται στον επόμενο Πίνακα.

Αναλυθέν συστατικό	*Σύνθεση βασικού μείγματος (από τον Παρασκευαστή) (%)	Σύνθεση βασικού μείγματος (μετρημένο από το Εργαστήριο) % (w/w)
Ξηρά ουσία	86.78 %	87.8
Ακατέργαστη πρωτεΐνη	17.86 %	24.2
Ακατέργαστο λίπος	2.99 %	3.9
Ακατέργαστες κυτταρίνες	3.16 %	3.0
Τέφρα	2.48 %	6.6
Σακχαρόζη	3.60 %	-
Καθ' υπολογισμό μεταβολιστέα ενέργεια της τροφής διορθωμένη ως προς τις αζωτούχες ουσίες	11.90 MJ/kg	-
Λυσίνη	1.02 %	-
Μεθιονίνη	0.37 %	-
Μεθ. + Κυστίνη	0.70 %	-
Ασβέστιο	0.92 %	1.00
Φώσφορος	0.59 %	0.52
Νάτρο	0.15 %	0.11
Χλωριούχο Νάτριο (υπολογισμένο)	-	0.28
Βιταμίνη Α	13.575 NE/kg	-
Βιταμίνη D3	2.455 NE/kg	-
Βιταμίνη Ε	33.50 mg/kg	-

2.3.1.2 Δοκιμές υποξείας τοξικότητας (διατροφής)

Η μελέτη που περιγράφεται έγινε με τις αρχές της Ορθής Εργαστηριακής Πρακτικής (OECD Principles on Good Laboratory Practice (as revised in 1997), OECD ENV/MC/CHEM(98)17 και GLP regulations of Hungary 9/2001 (III.30) EuM-FVM.

Τα ορτύκια (νεαρά, ηλικίας 6 εβδομάδων) αγοράστηκαν, από πτηνοτροφείο εκτροφής ορτυκιών στο Fácáncert της Ουγγαρίας και χρησιμοποιήθηκαν για δοκιμές υποξείας τοξικότητας και αποφυγής λήψης τροφής. Τα ορτύκια ήταν άρρενα και θήλεα. Το σωματικό τους βάρος ήταν 100-170 gr.

Τα ορτύκια προετοιμάσθηκαν και διατηρήθηκαν σε συνθήκες ανάλογες όπως περιγράφηκαν και στον πειραματισμό οξείας τοξικότητας από το στόμα. Διενεργήθηκαν συνολικά 2 παράλληλα πειράματα στα οποία χορηγήθηκε το ίδιο σιτηρέσιο. Τα ορτύκια τοποθετήθηκαν σε κλωβούς σε ομάδες των 7 και 9 πτηνών/κλωβό, για το 1^ο και 2^ο πείραμα αντίστοιχα καθώς και αυτόματες ταΐστρες και ποτίστρες.

Στα ορτύκια χορηγήθηκε το σιτηρέσιο συντήρησης (Πίνακας 2.3-3) που περιείχε methamidophos σε συγκεντρώσεις 20, 39,4, 77,5, 152,4 και 300 mg/kg τροφής.

Στο 1^ο πείραμα δεν λήφθηκαν ως δείγματα ζωντανά ορτύκια με σκοπό τον καθορισμό του LC₅₀. Συλλογή των δειγμάτων από το 1^ο πείραμα έγινε από τα νεκρά πτηνά μόνο για τις ημέρες χορήγησης του methamidophos και από τα ζώντα για τις ημέρες που χορηγήθηκε καθαρό σιτηρέσιο σε όλες τις επεμβάσεις. Από το 2^ο πείραμα έγινε συλλογή δειγμάτων από τα πτηνά όλες τις ημέρες χορήγησης του methamidophos.



Εικ. 2.3-3: Προετοιμασία των διαφόρων συγκεντρώσεων methamidophos (Φουντουλάκης Μ.)

Δείγματα από τις διάφορες επεμβάσεις ελήφθησαν την ημέρα 0 και την ημέρα 5 για να επαληθευτεί η συγκέντρωση που εφαρμόστηκε και να εξασφαλιστεί η σταθερότητα και η ομογένεια της δραστικής ουσίας στην τροφή των πτηνών. Τα δείγματα ψήχθηκαν και μεταφέρθηκαν στο Εργαστήριο Υπολειμμάτων του Μπενακείου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου (ΜΦΙ) για ανάλυση.

Μετά την έκθεση στο methamidophos, τα ορτύκια βρίσκονταν υπό συχνή παρατήρηση κατά την διάρκεια των 8 ημερών για την καταγραφή συμπτωμάτων. Ειδικότερα κατά την διάρκεια της ημέρας 0 η παρακολούθηση ήταν συνεχής κάθε 1 ώρα μετά την έκθεση στο methamidophos. Τις υπόλοιπες ημέρες διενεργήθηκαν παρατηρήσεις τις πρωινές ώρες ανά 1 ώρα επί 6 φορές.

Τα σωματικά βάρη μετρήθηκαν την ημέρα 0 και 5. Η κατανάλωση της τροφής μετριόταν καθημερινά. Οι ταΐστρες και το περιεχόμενό τους ζυγίζονταν στις 08:00 καθημερινά και ξαναγεμίζονταν με νέο μετρημένο φαγητό, ώστε η κατανάλωση της τροφής να υπολογίζονταν ως η διαφορά ανάμεσα στις τιμές που καταγράφονταν. Τελικά υπολογίζονταν η μέση κατανάλωση τροφής (gr/πτηνό/ημέρα) από την κατανάλωση τροφής ξεχωριστά ανά κλωβό.

Καταγράφηκαν η θνησιμότητα και τα κλινικά συμπτώματα των πτηνών σε κάθε παρατήρηση. Τελικά υπολογίστηκε το LC₅₀ που αντιστοιχεί στην συγκέντρωση του methamidophos που προκαλεί 50% θνησιμότητα. Επίσης υπολογίστηκε το NOEC και το LOEC που αντιστοιχούν στην συγκέντρωση του methamidophos που δεν προκαλεί θνησιμότητα και η χαμηλότερη συγκέντρωση που προκαλεί θνησιμότητα στα 7 πτηνά, αντίστοιχα. Ιστοτεμάχια από τους προς μελέτη ιστούς παρελήφθησαν όλες τις ημέρες του πειραματισμού, όπως αναλύεται παρακάτω (κοίτα 2.3.3) (Πίνακας 2.2-4).

Πίνακας 2.3-4: Δειγματοληψία ορτυκίων (δοκιμή υποξείας τοξικότητας, 1^ο/2^ο πείραμα)

Methamidophos (mg/kg)	Ημέρες χορήγησης και μετά τη χορήγηση							
	0	1	2	3	4	5	+1 ¹	+3
0	1A	2A	3A	-	-	2A	1A	[2A]
20	1A	2A	3A	-	-	2A	1A	[2A]
39,4	1A	2A	3A	-	-	2A	1A	[2A]
77,5	1A	2A	3A	-	-	2D	1A	[2A]
152,4	1A	2A	3A	-	2D	1A[2D]	1A	[2A]
300	1A	2A	3A	-	3D [1D]	[1D]	1A	[2A]

A=Ζώντα ορτύκια

D=Νεκρά ορτύκια

¹ Ημέρες σιτηρεσίου απαλλαγμένου από το methamidophos

Αριθμός ορτυκίων που λήφθησαν ως δείγματα από το 1^ο πείραμα σε []

Κατά τη δειγματοληψία των ορτυκιών (Πίνακας 2.3-4), ιστοί από τους οποίους παρελήφθησαν ως δείγματα ήταν ο εγκέφαλος, το ήπαρ, το δωδεκαδάκτυλο, καθώς και το πλάσμα του αίματος αλλά μόνο από τα ζώντα άτομα. Καταγράφηκε επίσης το βάρος του εγκεφάλου και του ήπατος και έγινε μακροσκοπική εξέταση για πιθανές βλάβες των ιστών καθώς και για την ύπαρξη τροφής στον πρόλοβο.

2.3.1.2.1 Ανάλυση υπολειμμάτων τροφής στη δοκιμή υποξείας τοξικότητας

Η μέθοδος περιγράφει την ανάλυση της τροφής των πτηνών στο πείραμα υποξείας τοξικότητας για την ανίχνευση και τον προσδιορισμό υπολειμμάτων με ευαίσθητο για το methamidophos ανιχνευτή αζώτου-φωσφόρου (NPD). Η μέθοδος διεξήχθη σύμφωνα με την Commission of the European Union, Doc No SANCO/3103/2000 και είναι επικυρωμένοι στο Εργαστήριο Υπολειμμάτων του ΜΦΙ.

Διαλύματα προτύπων υλικών αναφοράς (reference standards solutions).

Τα διαλύματα των προτύπων υλικών αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν α) για την ποσοτικοποίηση των αναλυτών που ανιχνεύονται στα δείγματα και β) για τη βαθμονόμηση των αναλυτικών συσκευών.

Τα διαλύματα προτύπων για την ποσοτικοποίηση των αναλυτών παρασκευάζονταν κάθε φορά που απαιτούνταν ποσοτικοποίηση ενός αναλύτη. Οι συγκεντρώσεις των προτύπων υλικών στα διαλύματα που παρασκευάστηκαν καθορίστηκαν από τη μετρούμενη συγκέντρωση του αναλύτη, π.χ. για το κάθε δείγμα σιτηρεσίου με methamidophos. Προκειμένου να αναιρεθεί η πιθανή επίδραση του υποστρώματος τα διαλύματα των προτύπων υλικών αναφοράς παρασκευάστηκαν ως εξής: Εξατμίστηκαν 500 μL εκχυλίσματος μάρτυρα με ρεύμα N₂ μέχρι ξηρού και προστέθηκαν 500 μL διαλύματος σε ακετόνη του προτύπου στην επιθυμητή συγκέντρωση.

Εκχύλιση: 10 gr δείγματος ζυγίστηκαν και τοποθετήθηκαν σε σφαιρική φιάλη των 250 ml όπου προστέθηκαν 100 ml δείγματος ακετόνης. Η φιάλη πωματίστηκε και παράμεινε τουλάχιστον 24 ώρες κλειστή, για να πραγματοποιηθεί η στατική εκχύλιση ενώ στο χρόνο αυτό αναδεύονταν κατά διαστήματα για να βοηθηθεί η στατική εκχύλιση. Το εκχύλισμα διηθήθηκε μέσω πτυχωτού ηθμού που περιείχε περίπου 40 γρ. άνυδρο

θεικό νάτριο σε ογκομετρικό κύλινδρο των 50 ml μέχρι συμπλήρωσης όγκου 20 ml. Το διήθημα μεταφέρθηκε σε φιαλίδιο των 40 ml, σφραγίστηκε με πώμα από Teflon (PTFE) και τοποθετήθηκε στην κατάψυξη.

Ανάλυση μάρτυρα: Τα δείγματα μάρτυρα χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο ποιότητας της μεθόδου όπως αναγράφεται παρακάτω.

Αεριογραφία: Κοινό θερμοκρασιακό πρόγραμμα: από 50°C με ρυθμό (1 min), στους 180°C με ρυθμό ανόδου 30°C/min και παραμονή εκεί για 20 min. Εγχεόταν από 1 μl του τελικού εκλούσματος στο χρωματογραφικό σύστημα του NPD.

Έλεγχος μεθόδου: έγινε με φόρτιση μάρτυρα με αναλύτες της μεθόδου. Το εμβολιασμένο δείγμα που προέκυψε ονομάστηκε δείγμα QC (Quality Control) και με παρόμοια επεξεργασία προσδιορίστηκε η συγκέντρωση, και υπολογίστηκε η ανάκτηση.

Έγιναν 5 QC δείγματα σε επίπεδο 50 mg/kg (50 μg/gr). Φορτίστηκαν 10 gr δείγματος σε 1 ml προτύπου διαλύματος 50 μg/ml ενώ το φορτισμένο δείγμα συγκρίθηκε για μέτρηση με 5 μg/ml προτύπου (λόγω της εξίσωσης (1) της μεθόδου δηλ. $m=10/C$). Επίσης έγιναν 5 QC δείγματα σε επίπεδο 20 mg/kg (20 μg/gr). Φορτίστηκαν 10 gr δείγματος σε 1 ml προτύπου διαλύματος 20 μg/ml ενώ το φορτισμένο δείγμα συγκρίθηκε για μέτρηση με 2 μg/ml προτύπου.

Ακολουθήθηκε η ίδια μέθοδο ανάλυσης όπως και για τα δείγματα προκειμένου να ελεγχθεί η ανάκτηση και η επαναληψιμότητα της μεθόδου για το methamidophos.

Υπολογισμός: Η περιεκτικότητα του δείγματος methamidophos που ταυτοποιήθηκε υπολογίστηκε από την εξίσωση:

$$C=10 \times m \text{ (1)}$$

Όπου **C**: η συγκέντρωση σε mg/kg (ppm) του ΦΠ στο δείγμα και **m**: η ποσότητα (ng) του methamidophos, όπως υπολογίστηκε στο εκχύλισμα από τη σύγκριση με διαλύματα της προτύπου ουσίας.

Απ' ευθείας σύγκριση της επιφάνειας της χρωματογραφικής κορυφής του δείγματος με την επιφάνεια της χρωματογραφικής κορυφής ενός μόνο προτύπου διαλύματος γίνεται όταν οι επιφάνειες κορυφής δείγματος και προτύπου δε διαφέρουν μεταξύ τους περισσότερο από 50% για περιπτώσεις μη υπερβάσεων ή περισσότερο από 10% για περιπτώσεις υπερβάσεων. Όταν η συγκέντρωση του αναλύτη στο δείγμα είναι <0,1 mg/kg, τότε το αποτέλεσμα δίνεται με ένα σημαντικό ψηφίο. Όταν είναι από 0,1 ως 10 mg/kg δίνεται με δύο σημαντικά ψηφία και όταν είναι >10 mg/kg δίνεται με τρία σημαντικά ψηφία.

Γενικά τα αποτελέσματα δε διορθώνονται ως προς την ανάκτηση. Για

περιπτώσεις όμως ενώσεων που έχουν ανάκτηση <60% αλλά με ικανοποιητική πιστότητα < $\pm 20\%$ γίνεται σχετική διόρθωση πολλαπλασιάζοντας το αποτέλεσμα που προκύπτει από την εξίσωση (1) με κατάλληλο συντελεστή λόγω ανάκτησης. Ο συντελεστής λαμβάνεται από τα στοιχεία επικύρωσης.

2.3.1.3 Δοκιμές αποφυγής τροφής “no-choice test”

Η μελέτη που περιγράφεται έγινε με τις αρχές της Ορθής Εργαστηριακής Πρακτικής (OECD Principles on Good Laboratory Practice (as revised in 1997), OECD ENV/MC/CHEM(98)17 και GLP regulations of Hungary 9/2001 (III.30) EuM-FVM.

Στο “no-choice test” στα ορτύκια χορηγήθηκε το σιτηρέσιο συντήρησης *ad libitum*, που περιείχε methamidophos σε συγκεντρώσεις 20, 39,4, 77,5, 152,4 και 300 mg/kg τροφής ή απαλλαγμένο από methamidophos (μάρτυρας) με 1 ταΐστρα ανά κλωβό για όλη την περίοδο της έκθεσής τους.

2.3.1.4 Δοκιμές αποφυγής τροφής “two-choice test”

Η μελέτη που περιγράφεται έγινε με τις αρχές της Ορθής Εργαστηριακής Πρακτικής (OECD Principles on Good Laboratory Practice (as revised in 1997), OECD ENV/MC/CHEM(98)17 και GLP regulations of Hungary 9/2001 (III.30) EuM-FVM.

Τα ορτύκια ήταν από την παρτίδα των πτηνών που χρησιμοποιήθηκαν και για τον υπολογισμό της υποξείας τοξικότητας (LC₅₀).

Τα ορτύκια τοποθετήθηκαν σε κλωβούς σε ομάδες των 6 πτηνών/κλωβό, καθώς και αυτόματες ταΐστρες (2 ανά κλωβό) και ποτίστρες (Εικ. 2.3-4).



Εικ. 2.3-4: Δοκιμή αποφυγής τροφής “two-choice test” του methamidophos στο ιαπωνικό ορτύκι

Στα ορτύκια λοιπόν χορηγήθηκε το βασικό σιτηρέσιο ανάπτυξης που περιείχε methamidophos σε συγκεντρώσεις 20, 39,4, 77,5, 152,4 και 300 mg/kg τροφής ή απαλλαγμένο από methamidophos (μάρτυρας) για 3 συνεχείς ημέρες. Σε αυτό το σημείο το πρωτόκολλο τροποποιήθηκε αφού αναφέρει ότι η έκθεση είναι για 1 ημέρα. Επίσης για να αυξηθεί η όρεξη των πτηνών στις 17:00 καθημερινά απομακρύνονταν όλες οι ταΐστρες οι οποίες επανατοποθετούνταν στις 09:30 την επόμενη ημέρα. Την ημέρα 6 ολοκληρώθηκε ο πειραματισμός μετά τη χορήγηση καθαρού σιτηρεσίου για 3 συνεχείς ημέρες.

Μετά την έκθεση στο methamidophos, τα ορτύκια βρίσκονταν υπό συχνή παρατήρηση κατά την διάρκεια 6 ημερών για την καταγραφή συμπτωμάτων. Ειδικότερα κατά την διάρκεια της ημέρας 0 η παρακολούθηση έγινε συνεχής για 1 ώρα μετά την έκθεση στο methamidophos. Συνολικά γινόντουσαν 6 παρατηρήσεις ημερησίως ανά 1 ώρα περίπου κυρίως τις πρωινές ώρες.

Τα σωματικά βάρη μετρήθηκαν την ημέρα 0, 1 και 5.

2.3.1.5 Δοκιμές αποφυγής τροφής ημι-αγρού “pen test”

Τα ορτύκια ήταν από την ομάδα των πτηνών που χρησιμοποιήθηκαν και για τον υπολογισμό της υποξείας τοξικότητας (LC_{50}).

Τα ορτύκια, σε εξωτερικές συνθήκες περιβάλλοντος, τοποθετήθηκαν σε κλουβιά (4 x 2 x 2,5 m) σε ομάδες των 2 πτηνών/κλουβί, καθώς και αυτόματες ταΐστρες (2 ανά κλωβό) και ποτίστρες (Εικ. 2.3-5).



Εικ. 2.3-5: Δοκιμή αποφυγής τροφής ημι-αγρού “pen test” του methamidophos στο ιαπωνικό ορτύκι (Φουντουλάκης Μ.)

Ο υπολογισμός της αποφυγής της πρόσληψης τροφής με συγκεκριμένη

συγκέντρωση σε δραστική ουσία είναι δυνατός με το να τοποθετηθεί 1 ταΐστρα με σιτηρέσιο απαλλαγμένο από methamidophos και 1 ταΐστρα με σιτηρέσιο που περιέχει methamidophos, ανά κλωβό σε απόσταση ενός μέτρου περίπου. Στα ορτύκια χορηγήθηκε το βασικό σιτηρέσιο ανάπτυξης που περιείχε methamidophos σε συγκεντρώσεις 77,5 και 152,4 mg/kg τροφής ή απαλλαγμένο από methamidophos (μάρτυρας) για 3 συνεχείς ημέρες οπότε και ολοκληρώθηκε το πείραμα. Σε αυτό το σημείο το πρωτόκολλο τροποποιήθηκε αφού αναφέρει ότι η έκθεση είναι για 1 ημέρα χωρίς την χορήγηση καθαρού σιτηρεσίου απαλλαγμένο από το methamidophos για 3 συνεχείς ημέρες. Ο αριθμός των επαναλήψεων τόσο για τον μάρτυρα όσο και για τις συγκεντρώσεις ήταν 2.

Ο πειραματισμός έχει σχεδιαστεί για τον υπολογισμό ενός συντελεστή που ποσοτικοποιεί την αποφυγή της τροφής. Η κατανάλωση της τροφής μετρήθηκε στο μάρτυρα και σε κάθε επέμβαση, καθημερινά και στις 2 ταΐστρες ανά κλωβί και υπολογίστηκε ο συντελεστής αποφυγής της πρόσληψης τροφής.

Μετά την έκθεση στο methamidophos, τα ορτύκια βρίσκονταν υπό συχνή παρατήρηση κατά την διάρκεια 3 ημερών για την καταγραφή συμπτωμάτων. Ειδικότερα κατά την διάρκεια της ημέρας 0 η παρακολούθηση ήταν συνεχής για 1 ώρα μετά την έκθεση στο methamidophos. Συνολικά γινόντουσαν 3 παρατηρήσεις ημερησίως.

Τα σωματικά βάρη μετρήθηκαν στην αρχή και στο τέλος του πειραματισμού.

Ο συντελεστής αποφυγής της πρόσληψης τροφής (RF) και FAC₅₀ υπολογίζονται ανάλογα με τις δοκιμές αποφυγής τροφής “two-choice test”.

2.3.2 Αξιολόγηση τοξικότητας στην πέστροφα

2.3.2.1 Δοκιμές οξείας τοξικότητας

Η μελέτη που περιγράφεται έγινε με τις αρχές της Ορθής Εργαστηριακής Πρακτικής (OECD Principles on Good Laboratory Practice 1998 Paris και GLP regulations of Hungary 9/2001 (III.30) EuM-FVM).

Για την πέστροφα η προμήθεια έγινε από εμπορικό προμηθευτή (Piscicultura Ltd., Tapolca, Ουγγαρία) και ήταν γόνιοι. Τα ψάρια εγκλιματίστηκαν σε ενυδρείο που περιείχε νερό από τον Δούναβη, φιλτραρισμένο για 12 ημέρες πριν από την έναρξη του

πειραματισμού. Κατά την διάρκεια του εγκλιματισμού τα ψάρια τρέφονταν ημερησίως με σιτηρέσιο συντήρησης εμπορίου σε pellets (Haltár Kft, Szarvas, Hungary).

Παρέκκλιση από το πρωτόκολλο: το προτεινόμενο μήκος της πέστροφας πρέπει να είναι $5,0 \pm 1$ cm. Σε αυτή την περίπτωση χρησιμοποιήθηκαν λίγο μεγαλύτερα ψάρια μήκους 10-12 cm, χωρίς να αναμένεται να επηρεαστεί το αποτέλεσμα λόγω της οξείας δράσης του methamidophos στα ψάρια.

Οι πέστροφες δεν τράφηκαν την ημέρα που προηγήθηκε της έκθεσης στο methamidophos. Το μήκος των ψαριών ήταν $11,2 \pm 1,44$ cm (\pm SD) ενώ το βάρος ήταν $25,12 \pm 8,51$ gr (n=67). Σε κάθε επέμβαση χρησιμοποιήθηκαν τουλάχιστον 7 ψάρια σε 2 ενυδρεία (4/3 ψάρια στο καθένα) των 25 lt κατασκευασμένα από αδρανή υλικά (8 ψάρια στην ομάδα του μάρτυρα και 60,8 mg/lt) (Εικ. 2.3-6).



Εικ. 2.3-6: Δοκιμή οξείας τοξικότητας του methamidophos σε πέστροφα (Φουντουλάκης Μ.)

Η συγκέντρωση του O_2 ήταν 60-80 %, η θερμοκρασία $16,5-16,7^\circ C$, το pH 7,6-8,1 και η διάρκεια φωτισμού ήταν 16 ώρες φως – 8 ώρες σκοτάδι.

Προστέθηκαν ποσότητες διαλύματος στο νερό που ήταν οι πέστροφες, για τελικές συγκεντρώσεις: μάρτυρας και 5 δόσεις του methamidophos και συγκεκριμένα 18, 27, 40,5, 60,8 και 91,1 mg/lt νερού. Δεν έγινε αναλυτική μέτρηση στα διάφορα υδατικά διαλύματα του methamidophos, έτσι τα αποτελέσματα βασίζονται στις ονομαστικές συγκεντρώσεις.

Μετά την έκθεση στο methamidophos, οι πέστροφες βρίσκονταν υπό συχνή παρατήρηση κατά την διάρκεια των 4 ημερών. Η θνησιμότητα και τα δευτερογενή

συμπτώματα καταγράφηκαν μετά από 3, 6, 24, 48, 72 και 96 ώρες.

Δειγματοληψία ψαριών πραγματοποιήθηκε την ημέρα 0, 1, 3 (για τα ζώντα άτομα στο ένα από τα δύο ενυδρεία, ώστε το άλλο να χρησιμοποιηθεί για την στατιστική επεξεργασία) και σε όλα τα ψάρια που παρέμειναν στο τέλος του πειραματισμού (ημέρα 4) (Πίνακας 2.3-5).

Πίνακας 2.3-5: Δειγματοληψία πέστροφας (δοκιμή οξείας τοξικότητας)

Methamidophos (mg/l)	Ημέρες έκθεσης					
	0	0 (+6 h)	1	2	3	4
0	8 ¹	-	2A	-	2A	2A (2A)
18,0	7	-	2A	-	2A	1A, 1D (1A)
27,0	7	-	2A	-	2A	2A (1A)
40,5	7	-	2A	-	2A, (1D)	1A, 1D
60,8	8	-	2A	-	1A, 1D ²	3D (1A, 1D)
91,1	7	-	2A, 1D	-	3D	1D

¹ Αρχικός αριθμός πέστροφων

² Λίγο πριν πεθάνουν

A=Ζώντες πέστροφες

D=Νεκρές πέστροφες

Αριθμός πέστροφων που δε λήφθησαν ως δείγματα σε ()

Ιστοτεμάχια από τους προς μελέτη ιστούς παρελήφθησαν από άτομα όλων των επεμβάσεων, όπως αναλύεται παρακάτω (κοίτα στο 2.3.3). Ιστοί από τους οποίους παρελήφθησαν δείγματα ήταν ο εγκέφαλος και το ήπαρ. Καταγράφηκε επίσης το βάρος του εγκεφάλου και του ήπατος ενώ έγινε και μικροσκοπική εξέταση για πιθανές βλάβες των ιστών. Στη συνέχεια οι ιστοί διατηρήθηκαν σε ξηρό πάγο και στη συνέχεια σε -80°C για περαιτέρω ανάλυση.

Κατά την διάρκεια του πειραματισμού ελέγχονταν συχνά το pH, η σκληρότητα, το οξύγονο και η θερμοκρασία των υδατικών διαλυμάτων.

2.3.2.2 Δοκιμές παρατεταμένης (prolonged) τοξικότητας

Ο πειραματισμός διεξήχθη σε ημι-στατικές (semi static) συνθήκες όπου το υδατικό διάλυμα των συγκεντρώσεων ανανεωνόταν κάθε 4-5 ημέρες. Η μελέτη που περιγράφεται έγινε με τις αρχές της Ορθής Εργαστηριακής Πρακτικής (OECD Principles on Good Laboratory Practice 1998 Paris και GLP regulations of Hungary 9/2001 (III.30) EuM-FVM.

Η προμήθεια και η συντήρηση των ψαριών είναι ανάλογη της οξείας τοξικότητας. Κατά την έναρξη του πειραματισμού τα ψάρια ήταν ηλικίας 8 εβδομάδων. Το μήκος των ψαριών ήταν $6,4 \pm 0,66$ cm (\pm SD), το βάρος ήταν $4,9 \pm 1,27$ (n=92). Για κάθε επέμβαση χρησιμοποιήθηκαν τουλάχιστον 17 ψάρια (από 18 στις 2 μεγαλύτερες συγκεντρώσεις των 20,7 και 40,0 mg/l) σε ενυδρεία των 25 lt κατασκευασμένα από αδρανή υλικά. Κατά τη διάρκεια του πειραματισμού και συγκεκριμένα στην πρώτη ανανέωση των υδατικών διαλυμάτων, 5-6 ψάρια από τις μεγαλύτερες δόσεις απομακρύνθηκαν από τα ενυδρεία και τοποθετήθηκαν πλέον σε καθαρό νερό, ώστε να διαπιστωθεί αν υπάρχει δυνατότητα ανάκαμψης.

Τα ψάρια τρέφονταν κάθε ημέρα ή κάθε δύο ημέρες με ζωντανή τροφή (σκουλήκια Tubiflex) ενώ τα περιττώματα απομακρύνονταν σχεδόν κάθε ημέρα.

Η συγκέντρωση του O₂ ήταν 60-90 %, η θερμοκρασία 16,5-16,7°C και η διάρκεια φωτισμού ήταν 16 ώρες φως – 8 ώρες σκοτάδι.

Προστέθηκαν ποσότητες διαλύματος στο νερό που ήταν οι πέστροφες, για τελικές συγκεντρώσεις: μάρτυρας και 6 δόσεις του methamidophos και συγκεκριμένα 1,5, 2,9, 5,6, 10,8, 20,7 και 40,0 mg/l νερού. Δεν έγινε αναλυτική μέτρηση στα διάφορα υδατικά διαλύματα του methamidophos, έτσι τα αποτελέσματα υπολογίζονται από τις ονομαστικές συγκεντρώσεις. Η διάρκεια του πειραματισμού παρατεταμένης τοξικότητας σε πέστροφες με το methamidophos ήταν 18 ημέρες. Πρόσθετα για τις 3 μεγαλύτερες συγκεντρώσεις των 10,8, 20,7 και 40,0 mg a.s./l μερικά άτομα, αφού εκτέθηκαν στο methamidophos για 4 ημέρες, τοποθετήθηκαν σε ξεχωριστά ενυδρεία με νερό απαλλαγμένο από τη δραστική ουσία για τις υπόλοιπες 14 ημέρες.

Μετά την έκθεση στο methamidophos, τα ψάρια βρίσκονταν υπό συχνή παρατήρηση κατά την διάρκεια 18 ημερών. Η θνησιμότητα και τα κλινικά συμπτώματα καταγράφονταν καθημερινά.

Δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε την ημέρα 0-3, σε όλα τα νεκρά ψάρια και σε

όλα τα ψάρια που παρέμειναν στο τέλος του πειραματισμού (Πίνακας 2.3-6).

Πίνακας 2.3-6: Δειγματοληψία πέστροφας (δοκιμή παρατεταμένης τοξικότητας)

Methamidophos (mg/l)	Ημέρες έκθεσης					
	0 ¹	1	2	3	4-17	17-18
0	17	4A	2A	4A	-	4A (3A)
1,5	17	1A	2A	3A	-	2A (9A)
2,9	17	2A	1A	3A	-	2A (9A)
5,6	17	2A	1A	3A	-	2A, 1D (7A, 1D)
10,8	12	2A	1A	3A	-	2A,1D (2A, 1D)
20,7	12	2A	1D	1A (3D)	(2D)	1A 1D (1D)
40	13	1A, 1D (1D)	3D	1A (2D)	(3D)	1A
Πειραματισμός ανάκαμψης	0					14
10,8	5				-	2A (3A)
20,7	6				2D	2A 1D (1D)
40	5				-	2A (3D)

¹ Αρχικός αριθμός πέστροφων

A=Ζώντες πέστροφες

D=Νεκρές πέστροφες

Αριθμός πέστροφων που **δε** λήφθησαν ως δείγματα σε ()

Ιστοτεμάχια από τους προς μελέτη ιστούς παρελήφθησαν από ψάρια όλων των επεμβάσεων, όπως αναλύεται παρακάτω (κοίτα στο 2.3.3). Ιστοί από τους οποίους παρελήφθησαν δείγματα ήταν ο εγκέφαλος και το ήπαρ. Καταγράφηκε επίσης το βάρος του ήπατος και έγινε μακροσκοπική εξέταση για πιθανές βλάβες των ιστών. Στη συνέχεια οι ιστοί διατηρήθηκαν σε ξηρό πάγο και στη συνέχεια σε -80°C για περαιτέρω ανάλυση.

Κατά την διάρκεια του πειραματισμού και κατά την ανανέωση των υδατικών διαλυμάτων ελέγχονταν συχνά το pH, η σκληρότητα, το οξυγόνο και η θερμοκρασία των υδατικών διαλυμάτων.

2.3.3 Λήψη ιστοτεμαχίων και προετοιμασία ανάλυσης

Για τους σκοπούς των βιοχημικών και ιστοχημικών αναλύσεων χρησιμοποιήθηκαν τα ορτύκια και οι πέστροφες από τις δειγματοληψίες του πειραματισμού που προηγήθηκε (οξείας από το στόμα και υποξείας για το ορτύκι και οξεία και παρατεταμένης τοξικότητας για την πέστροφα) όπως περιγράφεται ανωτέρω.

Μετά την ευθανασία των πτηνών ή ψαριών (αυχενική τομή για τα πτηνά και απότομο κτύπημα σε σταθερή επιφάνεια για τα ψάρια) γινόταν η παραλαβή των ιστών και αίματος, για βιοχημικές και ιστοχημικές αναλύσεις. Τα ιστοτεμάχια που αναλύθηκαν στην παρούσα εργασία, προέρχονται από τον εγκέφαλο και το ήπαρ για το ορτύκι και για την πέστροφα, αλλά και το δωδεκαδάκτυλο του ορτυκιού (μελέτη εντερικού νευρικού συστήματος). Το αίμα συλλέχτηκε σε ηπαρινισμένα σωληνάρια για την παραλαβή του πλάσματος. Οι ιστοί αφού απομακρύνθηκαν τοποθετήθηκαν σε σωληνάρια στην αρχή σε ξηρό πάγο και μετά από μερικές ημέρες σε θάλαμο βαθειάς κατάψυξης σε θερμοκρασία -80°C μέχρι την εξέτασή τους (βιοχημική και ιστοχημική).

Πλάσμα. Για την ενζυμική ανάλυση, το αίμα που συλλέχθηκε φυγοκεντρήθηκε στα 4000 gr για 5 min. Το υπερκείμενο πλάσμα συλλέχτηκε και αποθηκεύτηκε σε θάλαμο βαθειάς κατάψυξης σε θερμοκρασία -80°C .

Εγκέφαλος, ήπαρ. α. Για την ενζυμική ανάλυση, ιστοτεμάχια του εγκεφάλου και του ήπατος ζυγίστηκαν και ομογενοποιήθηκαν σε Tris-HCl (pH 7.6, T-3253 Sigma). Για την παραλαβή της AChE που είναι συνδεδεμένη σε κυτταρικές μεμβράνες προστέθηκε ένα μη ιονικό απορρυπαντικό το Triton X-100 (3% v/v σε αποσταγμένο νερό, T8787 Sigma). Ακολούθησε ανάδευση με συσκευή Vortex. Οι ομογενοποιημένοι ιστοί μεταφέρθηκαν σε σωληνάρια Eppendorf και φυγοκεντρήθηκαν σε 9000 gr για 30 min σε 4°C . Το υπερκείμενο συλλέχτηκε και χρησιμοποιήθηκε για άμεση μέτρηση ή αποθηκεύτηκε σε θάλαμο βαθειάς κατάψυξης σε θερμοκρασία -80°C .

β. Για την ιστοχημική ανάλυση, ιστοτεμάχια του εγκεφάλου και του ήπατος μονιμοποιήθηκαν και στη συνέχεια έγινε τομή και χρώση τους όπως αναλύεται παρακάτω (δείτε 2.3.5.1-4).

Δωδεκαδάκτυλο. Για την ιστοχημική εξέταση, σε ιστοτεμάχια του δωδεκαδακτύλου αφού μονιμοποιήθηκαν, έγινε τομή και χρώση τους όπως αναλύεται παρακάτω (δείτε 2.3.5.1-4).

2.3.4 Βιοχημική μέθοδος μέτρησης της δραστηριότητας των εστερασών

Το πλάσμα και τα υπερκείμενα της φυγοκέντρωσης από τον εγκέφαλο και το ήπαρ αναλύθηκαν για την δραστηριότητα σε ChE μετά από έκθεση σε διάφορες δόσεις του methamidophos *in vivo*.

Οι αναλύσεις έγιναν σε κελία πλάκας πολυστυρενίου (96-well microtitre plates), και οι επώσεις έγιναν στους 25-30°C (Ellman et al. 1961) χρησιμοποιώντας κατάλληλο όγκο ομογενοποιημένου ιστού ή ορού και διάφορες αλκυλθειοχολίνες ως επιλεγμένα υποστρώματα για τις εστεράσες, την AChE και την BuChE.

Ως επιλεγμένο υπόστρωμα για την AChE χρησιμοποιείται η ιωδιούχος ακετυλοθειοχολίνη [(acetylthiocholine iodide, ASCh, A5751 Sigma)]. Η ASCh διασπάται από την AChE σε θειοχολίνη (thiocholine) και οξικό οξύ. Η θειοχολίνη στη συνέχεια αντιδρά με ένα χρωστικό παράγοντα τον 5,5'-διθειο-δισ (2-νιτροβενζοϊκό οξύ) γνωστό ως DTNB και δίνει κίτρινο χρώμα. Η ποσότητα του κίτρινου χρώματος είναι αποτέλεσμα της δραστηριότητας της AChE και μπορεί να μετρηθεί με φασματοφωτόμετρο στα 405 nm. Στις συγκεκριμένες δοκιμές χρησιμοποιήθηκαν εκτός από την ASCh και άλλες αλκυλθειοχολίνες.

Σε μία τυπική ανάλυση 0,250 ml από το διάλυμα αντίδρασης [30 ml από φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα (0,1 M, pH 7.6), 1 ml του DTNB (D8130 Sigma) 10 mM ως χρωστικός παράγοντας και 0,200 ml από διάφορα υποστρώματα αλκυλθειοχολινών 0.075 M {ASCh ή ιωδιούχο βουτυρυλθειοχολίνη [S-butyrylthiocholine iodide (BuSCh, B3253 Sigma)] ή ιωδιούχο προπιονυλθειοχολίνη [propionylthiocholine iodide (PrSCh, P2880 Sigma)]} προστέθηκαν σε κάθε κελί. Στη συνέχεια μετρήθηκε η αλλαγή της απορρόφησης (ΔA) ανά λεπτό στα 405 nm για 5 λεπτά (με καταγραφή τιμής ανά 20") σε θερμοκρασία 25-30°C χρησιμοποιώντας microplate reader (Model M2E Molecular Devices). Το διάλυμα αντίδρασης (buffer + DTNB + υπόστρωμα) χρησιμοποιήθηκε για την μηδενική μέτρηση.

Τελικά κατασκευάστηκε το διάγραμμα της απορρόφησης από το αποτέλεσμα της μέτρησης συναρτήσει του χρόνου. Στην συνέχεια ορίστηκε η εξίσωση της ευθείας $y=ax+b$ του διαγράμματος. Η δραστηριότητα της εστεράσης στο δείγμα εκφράστηκε με την κλίση της ευθείας $a [A]$.

Παράλληλα με την μέτρηση των εστερασών στα φυγοκεντρημένο δείγματα έγινε και η μέτρηση των πρωτεϊνών των δειγμάτων σύμφωνα με τη μέθοδο Bradford (Bradford 1976), προσαρμοσμένη για microplate, στα 595 nm. Για την μέτρηση των

πρωτεϊνών του δείγματος χρησιμοποιήθηκε το Protein Assay Kit. Σε κελία πλάκας πολυστυρενίου τοποθετήθηκαν 10 μl από το δείγμα και 250 μl δλμ. για ανάλυση πρωτεΐνης (Protein Assay solution από Total Protein Kit, Sigma) δίνοντας μπλε χρώμα. Οι πλάκες πολυστυρενίου τοποθετήθηκαν σε φασματοφωτόμετρο και μετρήθηκαν στα 595 nm. Ως πρότυπο χρησιμοποιήθηκε εμπορική πρωτεΐνη [βόειος αλβουμίνη ορού, bovine serum albumin (BSA, ICN 160069 Sigma)]. Η απορρόφηση διαφόρων συγκεντρώσεων από την BSA με το Protein Assay Kit καταγράφηκε σε ένα διάγραμμα. Στην συνέχεια φτιάχθηκε η πρότυπη ευθεία και υπολογίστηκε η εξίσωση της ευθείας $y=ax+b$ του διαγράμματος. Η τιμή απορρόφησης του κάθε δείγματος μέσω αυτής της εξίσωσης μετατράπηκε σε τιμή πρωτεΐνης.

Η τελική τιμή των εστερασών ανά ποσότητα πρωτεΐνης του δείγματος είναι το πηλίκο της τιμής της AChE προς την τιμή της αντίστοιχης πρωτεΐνης. Η σύγκριση της τιμής αυτής με τον μάρτυρα θα χρησιμοποιηθεί για την % παρεμπόδισης της AChE και σε περαιτέρω στατιστική ανάλυση.

$$\text{Παρεμπόδιση (I) AChE\%} = \frac{\text{μάρτυρας} - \text{δείγμα}}{\text{μάρτυρας}} \times 100 \%$$

Μελετήθηκε λοιπόν η ενζυματική δραστηριότητα με την παρουσία διάφορων υποστρωμάτων αλκυλθειοχολινών ξεχωριστά και με εκλεκτικούς παρεμποδιστές. Στα σπονδυλωτά η εσερίνη (eserine, E8375 Sigma), η BW284C51 (A9013 Sigma) και το tetraisopropyl pyrophosphoramidate, (*iso*-OMPA, T1505 Sigma) είναι εκλεκτικά για τις ChE, AChE και BuChE, αντίστοιχα. Οι ομογενοποιημένοι ιστοί αρχικά επώαστηκαν με παρεμποδιστές (για το καθένα τελική συγκέντρωση 10^{-4} M) για 3 min πριν την προσθήκη του υποστρώματος. Οι AChE αναλύθηκαν με ASCh ως υπόστρωμα, μετά την αφαίρεση της δραστηριότητας του BuChE, με την επώαση των δειγμάτων με *iso*-OMPA. Δεν χρησιμοποιήθηκαν παρεμποδιστές στον πειραματισμό παρατεταμένης τοξικότητας σε ψάρια λόγω της μικρής ποσότητας των δειγμάτων. Επίσης, δεν χρησιμοποιήθηκαν παρεμποδιστές στον πειραματισμό υποξείας τοξικότητας σε ορτόκια, στο πλάσμα και στο ήπαρ. Τέλος χρησιμοποιήθηκε *iso*-OMPA και όχι BuChE στον εγκέφαλο, λόγω της μικρής ποσότητας των δειγμάτων.

Η ειδική δραστηριότητα (selective Reactivity, Rs) των ChEs εκφράστηκε ως μmol υδρολυμένου υποστρώματος $\text{min}^{-1} \text{mg prot}^{-1}$ και ως ποσοστό της μέσης

δραστικότητας σε σύγκριση με το μάρτυρα.

$$\text{Ειδική δραστικότητα (Rs)} = \frac{[A] \times [\text{Ολικός όγκος στο κελί. (}\mu\text{l)}] \times 10^6 \text{ (mol σε } \mu\text{mol)}}{13600 \times [\text{Όγκος δείγματος (}\mu\text{l)}] \times \text{Συγκ. Πρωτ. (mg/ml)}}$$

2.3.5.1 Παραλαβή, μονιμοποίηση και τομή ιστοτεμαχίων

Για τους σκοπούς του πειράματος τα ιστοτεμάχια που αναλύονται στην παρούσα εργασία, προέρχονται από τον εγκέφαλο, το ήπαρ και το δωδεκαδάκτυλο (μελέτη εντερικού νευρικού συστήματος) για το ορτύκι και για την πέστροφα από τον εγκέφαλο και το ήπαρ.

Τα ιστοτεμάχια μετά την παραλαβή τους, τοποθετήθηκαν σε διάλυμα παραφορμαλδεΰδης 4% σε φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα (Phosphate Buffer Saline – PBS, Fluka, Buchs, Switzerland) 0,1M και pH 7,4, με όγκο 20 φορές τουλάχιστον του όγκου του ιστοτεμαχίου και σε θερμοκρασία δωματίου για μία ώρα. Στη συνέχεια, τα ιστοτεμάχια τοποθετήθηκαν σε διάλυμα φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος 2 φορές, για 30 λεπτά κάθε φορά, σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να εκπλυθεί ο μονιμοποιητικός παράγοντας. Τελικά τα ιστοτεμάχια εμβαπτίσθηκαν σε διάλυμα σακχαρόζης 7% και NaN_3 0,1% σε φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα (PBS) και αμέσως μετά αποθηκεύτηκαν στους 4 °C.

Τμήμα του μονιμοποιηθέντος ιστοτεμαχίου τοποθετήθηκε αρχικά, με τον απαιτούμενο κάθε φορά προσανατολισμό, ώστε να επιτευχθούν τομές (4-5 για κάθε ιστό από την κορυφή προς την βάση της τομής) στον εγκέφαλο και το ήπαρ καθώς και στο μέσο της αγκύλης του δωδεκαδάκτυλου του ορτυκίου, σε τεμάχιο φελλού (διαστάσεων περίπου 1 x 1 cm). Αφού το ιστοτεμάχιο καλύφθηκε με κρυοπροστατευτικό μέσο (Tissue – Tek, Germany), εμβαπτίστηκε σε διάλυμα ισοπεντανίου, το οποίο με τη φιάλη του είχε προηγουμένως τοποθετηθεί σε υγρό άζωτο. Το ισοπεντάνιο λειτουργεί ως κρυοπροστατευτικός παράγοντας στην εμβάπτιση στο υγρό άζωτο. Στη συνέχεια, το ιστοτεμάχιο με το φορέα – φελλό τοποθετήθηκε σε ειδική υποδοχή του κρυοτόμου (Leica CM1500), στην οποία είχε προηγουμένως προστεθεί κρυοπροστατευτικό μέσο, επικαλυπτόμενου εκ νέου και συνολικά με κρυοπροστατευτικό μέσο. Οι τομές του ιστοτεμαχίου πάχους 10-30 μm , παρελήφθησαν κατά σειρά σε αντικειμενοφόρες πλάκες, επικαλυμμένες με πολυμερισμένη L-λυσίνη, και στη συνέχεια αποθηκεύτηκαν στους 4 °C (Εικ. 2.3-7).



Εικ. 2.3-7: Τομή ιστοτεμαχίων σε κρυοτόμο (Φουντουλάκης Μ.)

2.3.5.2 Επικάλυψη αντικειμενοφόρων πλακών με πολυμερισμένη L-λυσίνη

Οι αντικειμενοφόρες πλάκες που χρησιμοποιήθηκαν προς επικάλυψη, τοποθετήθηκαν σε διάλυμα όξινης αλκοόλης (70% αιθανόλη και 1% HCl, 1N). Μετά από σύντομη ανάδευση τους μέσα στο διάλυμα, παρέμειναν σε αυτό για 90 λεπτά. Στη συνέχεια ξεπλύθηκαν με νερό βρύσης για 90 λεπτά. Μετά την έκπλυσή και ανάδευση για λίγο σε απεσταγμένο νερό, οι αντικειμενοφόρες πλάκες εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα πολυμερισμένης L-λυσίνης για 10 δευτερόλεπτα και τοποθετήθηκαν σε κλίβανο στους 37° C, για περίπου 24 ώρες. Εν συνεχεία χρησιμοποιήθηκαν για την παραλαβή των τομών των ιστοτεμαχίων με κρυοτόμο. Η επικάλυψη των αντικειμενοφόρων πλακών με πολυμερισμένη L-λυσίνη εξασφαλίζει την καλή προσκόλληση των τομών των ιστοτεμαχίων σε αυτές και ελαττώνει σημαντικά τις απώλειες κατά τους χειρισμούς, που οι τεχνικές της ιστοχημείας δύνανται να προκαλέσουν.

2.3.5.3 Χρώση ηωσίνης - αιματοξυλίνης

Για τον έλεγχο της ιστολογικής κατάστασης των δειγμάτων, η αιματοξυλίνη Harris βάφει τους πυρήνες των κυττάρων με μπλε χρώμα, ενώ η ηωσίνη βάφει το κυτταρόπλασμα των κυττάρων με πορτοκαλί έως ροδόχροο χρώμα. Η διήθηση των χρωστικών με χάρτινο φίλτρο είναι επιβεβλημένη πριν από κάθε χρήση. Η χρώση των τομών πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη μεθοδολογία που περιγράφηκε αρχικά από τον Harris (1900). Πιο συγκεκριμένα, οι αντικειμενοφόρες πλάκες με τις τομές προς χρώση, τοποθετημένες σε Adam's racks παρέμειναν για περίπου 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια εμβαπτίστηκαν σε φωσφορικό ρυθμιστικό

διάλυμα 0,1 M και pH 7,4 για 3 περίπου λεπτά.

Αρχικά οι αντικειμενοφόρες πλάκες εμβαπτίστηκαν και παρέμειναν στην αιματοξυλίνη Harris για 2 λεπτά, με ανάδευση κάθε 10 περίπου δευτερόλεπτα. Ξεπλύθηκαν με νερό βρύσης και αμέσως μετά εμβαπτίστηκαν στην ηωσίνη για επίσης 2 λεπτά, με την ίδια περιοδικότητα στην ανάδευση. Ακολούθησε και πάλι ξέπλυμα των αντικειμενοφόρων πλακών με νερό βρύσης, αυτή τη φορά μικρότερης διάρκειας και έντασης για να επιτευχθεί πιο ζωηρός πορτοκαλόχρους χρωματισμός κατά τη χρώση των τομών.

Οι αντικειμενοφόρες πλάκες τοποθετήθηκαν σε υδατικά διαλύματα αιθυλικής αλκοόλης ανιούσας σειράς (2 x 50%, 70%, 90%, 2 x 100%, και τελικά 2 x ξυλένιο), έτσι ώστε να επιτευχθεί η αφυδάτωση των τομών. Στη συνέχεια οι αντικειμενοφόρες πλάκες παρέμειναν στον απαγωγό για να στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου και τελικώς επικαλύφθηκαν με Depex (18243, Serva, Heidelberg, Germany) και καλυπτρίδες (Εικ. 2.3-8).



Εικ. 2.3-8: Χρώση ηωσίνης – αιματοξυλίνης (Φουντουλάκης Μ.)

Η παρατήρηση των τομών έγινε σε οπτικό μικροσκόπιο τύπου OLYMPUS1011, εφοδιασμένο με μικρομετρική κλίμακα. Οι τομές που επρόκειτο να χρησιμοποιηθούν αργότερα για ιστοχημεία, αξιολογήθηκαν με βάση την καταλληλότητά τους από ιστολογική άποψη (Εικ. 2.3-9).



Εικ. 2.3-9: Παρατήρηση τομών σε οπτικό μικροσκόπιο (Φουντουλάκης Μ.)

2.3.5.4 Ιστοχημική χρώση για την ChE

Η ιστοχημική χρώση διενεργήθηκε χρησιμοποιώντας την τροποποιημένη μέθοδο του Karnovsky and Roots (1964), όπως προτάθηκε από τον Baker et al. (1986).

Για την ιστοχημεία των εστερασών που εκφράζονται με τη ACh οι κρυτομές των ιστοτεμαχίων τοποθετήθηκαν σε PBS 0,1M με υαλουρονιδάση (0.33 mg ανά 100 ml; H3506, SIGMA) και 10^{-4} M iso-OMPA. Η υαλουρονιδάση αυξάνει τη διαπερατότητα των ιστών (Baker et al. 1986).

Για την ιστοχημεία των εστερασών που εκφράζονται με τη BuSCh και PrSCh οι κρυτομές των ιστοτεμαχίων τοποθετήθηκαν μόνο σε διάλυμα υαλουρονιδάσης. Πρόσθετα ως θετικός μάρτυρας της ιστοχημείας της PrSCh κρυτομές των ιστοτεμαχίων τοποθετήθηκαν σε διάλυμα υαλουρονιδάσης και 10^{-4} M iso-OMPA και 10^{-4} M BW284C51.

Στη συνέχεια ξεπλύθηκαν με PBS για 30 min και ακολούθησε χρώση για εστεράσες με τη χρήση πιπέτας και την προσθήκη δύο ομάδων διαλυμάτων:

Διάλυμα Α: Οξικό ρυθμιστικό διάλυμα 0,1M pH5 με 1,5% Triton X-100 (65ml),
Κιτρικό νάτριο 0,15mM (10ml),
Θειικός χαλκός 30mM (10ml),
Σιδηροκυανιούχο κάλιο 5mM (10ml).

Διάλυμα Β: 10^{-4} M iso-OMPA και ACh (50mg) (για την ιστοχημεία των εστερασών που εκφράζονται με τη ACh)

ή BuSCh (50mg) (για την ιστοχημεία των εστερασών που εκφράζονται με τη BuSCh)

ή PrSCh (50mg) (για την ιστοχημεία των εστερασών που εκφράζονται με τη PrSCh)

ή 10^{-4} M iso-OMPA και 10^{-4} M BW284C51 και PrSCh (50mg) (ως θετικός μάρτυρας της ιστοχημείας της PrSCh),

προστίθενται στο προηγούμενο διάλυμα A.

Μετά από 3 ώρες περίπου τα δείγματα ξεπλύθηκαν με απεσταγμένο νερό για 1 ώρα και μονιμοποιήθηκαν με διάλυμα 4% παραφορμαλδεΐδης σε PBS 0,1M pH7,5. Με τη χρήση διαλύματος 70% γλυκερόλης σε φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα 0,1M καλύπτονται από καλυπτρίδες.

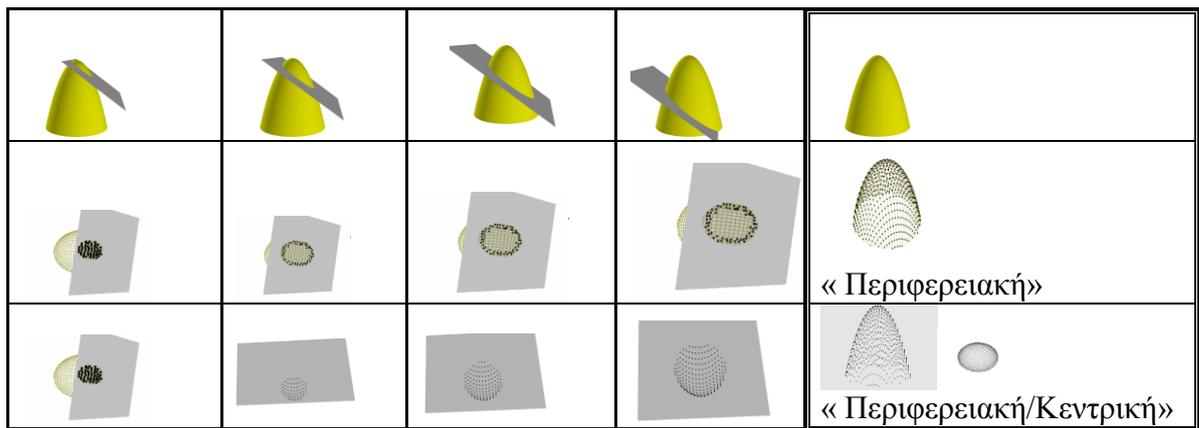
Για την παρατήρηση και φωτογράφιση των τομών χρησιμοποιήθηκε οπτικό μικροσκόπιο τύπου OLYMPUS 1011. Η φωτογράφιση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σε οπτικό μικροσκόπιο (OLYMPUS BX50), χρησιμοποιώντας λογισμικό για ανάλυση εικόνας (Image-Pro Plus ver.3.1 για Windows '95. MEDIA CYBERNETICS, USA).

Με σκοπό να εκφραστούν ποσοτικά χαρακτηριστικά της ιστοχημείας των εστερασών χρησιμοποιήθηκε κλίμακα: κάθε κρυστομή χαρακτηρίστηκε από 3 τιμές, οι οποίες παρουσιάζονται ατομικά και ως γινόμενο. Οι 3 τιμές που αναφέρονται ως 1) ένταση της χρώσης (από 0=όχι χρώση έως 5= πολύ σκοτεινή), 2) σχετικός πληθυσμός χρωσμένων κυττάρων (από 0=όχι χρώση έως 5= μεγάλος αριθμό χρωσμένων κυττάρων) και 3) κατανομή των χρωσμένων κυττάρων στην ιστολογική τομή (από 0=όχι χρώση έως 3= 100% της επιφάνειας της τομής έχει χρώση). Πρόκειται ουσιαστικά για ημι-ποσοτικοποίηση γιατί δεν έχουν μετρηθεί όλα τα κύτταρα αλλά έχουν εκτιμηθεί οι ανωτέρω παράμετροι από τις ιστολογικές χρώσεις. Για ευκολία όμως θα χρησιμοποιείται ο όρος «ποσοτικοποίηση».

Επειδή τα ιστοτεμάχια των μονιμοποιημένων ιστών που λήφθηκαν για τομές και χρώση ήταν από την περιφέρεια προς το κέντρο του ιστού και οι 4-5 τομές που επετεύχθησαν για κάθε ιστό ήταν από την κορυφή προς την βάση της τομής, οι παρατηρήσεις μπορούν να αποδώσουν την δομή σε 3 διαστάσεις, στο χώρο της χρώσης των εστερασών (Πίνακας 2.3-7). Έτσι τα ιστοτεμάχια χαρακτηρίζονται ανάλογα με την χωροταξική κατανομή των χρωσμένων κυττάρων στο όργανο όπως προκύπτει από τις

τομές συνολικά ως: 1) Στενή περιφερειακή ζώνη 2) Περιφερειακή ζώνη 3) Περιφερειακή/Κεντρική που ισοδυναμεί με χρώση παντού στον ιστό 4) Κεντρική περιοχή χωρίς χρώση στην περιφέρεια και 5) Τοπικά διάσπαρτη (Πίνακας 2.3-8). Η κατανομή στο χώρο δεν ισχύει για τον δωδεκαδάκτυλο των ιαπωνικών ορτυκίων όπου οι τομές λήφθησαν από το μέσον του ιστού.

Πίνακας 2.3-7: Παραδείγματα τομών μονιμοποιημένων ιστών, χρώσης των εστερασών και χωροταξικής κατανομής σε 3 διαστάσεις των χρωσμένων κυττάρων



Πίνακας 2.3-8: Χαρακτηρισμός και συμβολισμός της χωροταξικής κατανομής σε 3 διαστάσεις των χρωσμένων κυττάρων ως προς τις εστεράσες σε μονιμοποιημένους ιστούς

Στενή περιφερειακή	Περιφερειακή	Περιφερειακή/Κεντρική	Κεντρική	Τοπικά
○	⊙	●	⊙	Τοπ

2.3.6 Μοντέλο επιβάρυνσης του οργανισμού (Body burden model)

2.3.6.1 Πρόσληψη, αποφυγή τροφής, ρυθμός απορρόφησης, κατανομής, μεταβολισμού και απέκκρισης και αναστρεψιμότητα των επιπτώσεων στην εκτίμηση της επικινδυνότητας για την οξεία τοξικότητα σε πτηνά

Οι μελέτες τοξικότητας σε πτηνά που πραγματοποιήθηκαν και αναπτύσσονται στο σημείο 3.1 δείχνουν:

- Ανάκτηση των επιπτώσεων γεγονός που καιστά την διαδικασία ADME σημαντική.
- Μειωμένη πρόσληψη τροφής σε όλες τις μελέτες, γεγονός που συμβάλει σε μείωση της έκθεσης.
- Κλινικά συμπτώματα που καταγράφονται σε πτηνά περίπου λίγη ώρα μετά την έκθεση.

Πρέπει να λαμβάνονται υπόψη τα στοιχεία αυτά κατά την αξιολόγηση της έκθεσης και του κινδύνου, όπως και ο ρυθμός διατροφής των μικρών πτηνών. Η προτεινόμενη διαδικασία καθορίζεται για πρώτη φορά ως γενική προσέγγιση για τον έλεγχο της αποφυγής της πρόσληψης τροφής στη γνωμάτευση του PPR Panel (Scientific Panel on Plant health, Plant protection products and their Residues) για το pirimicarb (EFSA, 2005).

2.3.6.1.1 Γενική προσέγγιση

Η προσέγγιση αναπτύχθηκε σε τρεις φάσεις. Αρχικά εξετάστηκε η επίδραση της αποφυγής της πρόσληψης τροφής (μειωμένη κατανάλωσης τροφής) για την οξεία έκθεση και την επικινδυνότητα, στη συνέχεια προστέθηκε η επίδραση της διαδικασίας ADME και η ανάκτηση από την τοξικότητα, και τέλος κάποιοι επιπλέον υπολογισμοί που απαιτήθηκαν για να ελεγχθεί ότι η διατροφή που συνάγεται από την εκτίμηση, είναι ρεαλιστική.

Για τις τοξικές ουσίες με έντονα οξεία τοξική δράση, όπως τα OPs και τα καρβαμιδικά υπάρχουν πολυάριθμες αποδείξεις ότι η κύρια επίδραση κατά την πρόσληψη της τροφής δεν μεσολαβεί από την έναρξη της έκθεσης, αλλά λαμβάνει

χώρα στο σημείο όπου η προσληφθείσα δόση φθάνει ένα επίπεδο που προκαλεί τη διακοπή της διατροφής (το όριο της αποφυγής της πρόσληψης τροφής). Το κατώτατο αυτό όριο είναι χαμηλότερο από τη θανατηφόρα δόση και, κατά συνέπεια, αναμένεται ότι θα εμποδίσει το ζώο να φθάσει στην θανατηφόρα δόση. Ωστόσο, υπάρχει μια καθυστέρηση μεταξύ του χρόνου που η δόση φτάνει το κατώτατο όριο και της πραγματικής παύσης της διατροφής, λόγω του χρόνου που απαιτείται για την προσληφθείσα ποσότητα methamidophos να απορροφηθεί από το έντερο και να φτάσει στα διάφορα όργανα των πτηνών. Ως εκ τούτου, το πτηνό μπορεί να φθάσει τη θανατηφόρο δόση, εάν η πρόσθετη πρόσληψη της τροφής κατά τη διάρκεια της καθυστέρησης φτάσει τη συνολική δόση πάνω από το θανατηφόρο επίπεδο. Εκφράζοντας τα ανωτέρω σε μαθηματική μορφή, η συνολική οξεία δόση κατά τη στιγμή που το πτηνό σταματά να διατρέφεται δίνεται από τον τύπο:

$$Acute\ Dose = AVT + \frac{(AVD \times FPM \times C)}{bw}$$

Εξίσωση 1

όπου:

AVT = δόση ορίου αποφυγής της πρόσληψης τροφής (avoidance threshold dose mg/kg bw)

AVD = χρόνος καθυστέρησης της αποφυγής της πρόσληψης τροφής (min) από το να επιτευχθεί η AVT μέχρι τη διακοπή της σίτισης.

FPM = ρυθμός λήψης τροφής ανά λεπτό (kg/min)

C = συγκέντρωση του methamidophos στην τροφή (mg/kg)

bw = σωματικό βάρος (kg)

Αν η οξεία δόση όπως εκτιμάται από την εξίσωση 1 υπερβαίνει το LD₅₀, τότε είναι αναμενόμενη θνησιμότητα των πτηνών σε ποσοστό άνω του 50%. Εναλλακτικά, η οξεία δόση μπορεί να συγκριθεί και με άλλες παραμέτρους (π.χ. LD₁₀ ή το NOEL) σε περίπτωση που είναι επιθυμητό να αξιολογηθεί η εμφάνιση χαμηλότερων ποσοστών θνησιμότητας ή μη θανατηφόρες επιπτώσεις.

Η εξίσωση 1, ωστόσο δεν περιλαμβάνει την επίδραση της διαδικασίας ADME και την αντιστρεψιμότητα των επιπτώσεων, η οποία είναι σημαντική στην περίπτωση του methamidophos. Ο τρόπος δράσης (anti-ChE) από κοινού με τις κλινικές ενδείξεις από τις διαθέσιμες μελέτες σε πτηνά και θηλαστικά δείχνουν ότι η διεργασία ADME είναι πιθανό να είναι συνάρτηση πρώτης τάξης, και συνεπώς μπορούν να

χαρακτηρίζονται από μια εκθετική φθίνουσα συνάρτηση, με σταθερό το συντελεστή που αντιπροσωπεύει τη συνδυαστική επίδραση. Για να ληφθούν υπόψη οι εν λόγω διεργασίες, κάθε μέρος της συνολικής δόσης στην εξίσωση 1 (η δόση του ορίου της αποφυγής της πρόσληψης τροφής καθώς και η επιπρόσθετη δόση που προσλαμβάνεται κατά την περίοδο της καθυστέρησης της επίδρασης της αποφυγής), μειώνεται κατά ένα ποσό που εξαρτάται από το ρυθμό της διαδικασίας ADME και της διάρκειας της περιόδου καθυστέρησης της αποφυγής. Αυτό μπορεί να ενσωματωθεί στην αξιολόγηση με την προσαρμογή της εξίσωσης 1 στην εξίσωση 2 ως ακολούθως:

$$Acute Dose = AVT \times e^{-k \times AVD} + \frac{(FPM \times C)}{(bw \times k)} \times (1 - e^{-k \times AVD})$$

Εξίσωση 2

Όπου k (ρυθμός διεργασιών ADME) = ln (2)/(χρόνος ζωής του συνδυασμού των διαδικασιών ADME).

Είναι σημαντικό να σκεφτούμε τι διαθέσιμα στοιχεία υπάρχουν για την εκτίμηση των παραμέτρων στην εξίσωση 2. Αν και οι τυποποιημένες τοξικολογικές και ADME μελέτες δεν έχουν σχεδιαστεί για τη μέτρηση των AVT και AVD, περιέχουν επαρκείς πληροφορίες για την εκτίμησή τους. Το C του methamidophos και το σωματικό βάρος μπορεί να εκτιμηθούν κατά τον ίδιο τρόπο όπως και στην τυπική αξιολόγηση της έκθεσης των πτηνών (SANCO, 2002). Το FPM, όπως περιγράφεται στην εξίσωση 1, είναι διαφορετικό από το FIR που χρησιμοποιείται συνήθως στην αξιολόγηση (δείτε 1.5.1.4.1). Το FIR είναι η συνολική ημερήσια απαίτηση λήψης τροφής, ενώ οι εξισώσεις 1 και 2 λαμβάνουν υπόψη μόνο την αρχική πρόσληψη τροφής με methamidophos και έτσι το FPM πρέπει να είναι ο ρυθμός πρόσληψης της τροφής σε kg/min κατά τη διάρκεια των πρώτων λεπτών λήψης της τροφής. Στοιχεία σχετικά με το ρυθμό πρόσληψης της τροφής στη φύση είναι διαθέσιμα για έναν μικρό αριθμό ειδών, αν και αυτές οι μελέτες πολύ σπάνια αναφέρονται σε ρυπασμένα τρόφιμα και συχνά όχι με το είδος των τροφίμων που παρουσιάζουν ενδιαφέρον, δίνουν όμως επαρκή δεδομένα ώστε να εκτιμηθεί κατά προσέγγιση το ανώτερο και κατώτερο όριο για την FPM. Και πάλι αυτό αποδεικνύεται και αναλύεται για την περίπτωση του methamidophos.

Από τις μελέτες ADME μπορεί να γίνει μια εκτίμηση του k, αλλά αυτές γενικά διεξάγονται με θηλαστικά, και η επέκταση του k από τα θηλαστικά στα πτηνά είναι αβέβαιη. Σε ορισμένες δραστικές ουσίες διεξάγονται μελέτες μεταβολισμού σε κοτόπουλα, αλλά η σχέση μεταξύ των διαδικασιών ADME του κοτόπουλου και άλλων

ειδών πτηνών είναι επίσης αβέβαιη. Σύμφωνα με την EFSA (2005) προσδιορίστηκαν ως εκ τούτου δύο ακόμη μέθοδοι για την κατά προσέγγιση εκτίμηση του k , χρησιμοποιώντας πληροφορίες από τις μελέτες τοξικότητας που διενεργήθηκαν στα πτηνά. Η πρώτη προσέγγιση κάνει χρήση πληροφοριών από την μελέτη της οξείας (LD_{50}) τοξικότητας των πτηνών από το στόμα. Υποτίθεται ότι κατά τη διάρκεια του χρόνου έκλειψης των κλινικών συμπτωμάτων (Acute Recovery Time, ART) σε πτηνά, που παρατηρείται στη δόση με τη χαμηλότερη επίδραση (LOEL), οι διεργασίες ADME μειώνουν αυτή την επίδραση στο επίπεδο όπου πλέον δεν παρατηρείται (NOEL). Βάσει των υποθέσεων αυτών, το k μπορεί να εκτιμηθεί ως εξής:

$$k = \frac{\ln\left(\frac{NOEL}{LOEL}\right)}{ART}$$

Εξίσωση 3

Η δεύτερη προσέγγιση για τον υπολογισμό k στα πτηνά χρησιμοποιεί το NOEL για τα κλινικά συμπτώματα στη μελέτη διατροφής (LC_{50}), τη LOEL για τα κλινικά συμπτώματα από τη μελέτη οξείας τοξικότητας (LD_{50}) στο ίδιο είδος, και τη διάρκεια της περιόδου έκθεσης (Duration of the Exposure Period, DEP) στην μελέτη διατροφής. Υποτίθεται ότι τα πτηνά στη μελέτη διατροφής έχουν επιβιώσει με μια μέση ημερήσια δόση ίση με το NOEL για χρονικό διάστημα DEP χωρίς την επίτευξη εσωτερικής ισοδύναμη δόσης που θα έδινε τα πρώτα κλινικά συμπτώματα στην οξεία τοξικότητα (LOEL). Σε αυτές τις παραδοχές, το ποσοστό σταθερά k μπορεί να εκτιμηθεί με την ακόλουθη εξίσωση:

$$LOEL = \frac{NOEL}{k} \times (1 - e^{-k \cdot DEP})$$

Εξίσωση 4

Δυστυχώς η εξίσωση 4, δεν μπορεί να αναδιαμορφωθεί για να δώσει μια ακριβή τιμή για το k , γι' αυτό είναι απαραίτητος ο επαναληπτικός υπολογισμός. Αυτό γίνεται με τον υπολογισμό της εξίσωσης 4 επανειλημμένα για να βρεθεί η τιμή του k που δίνει η παρατηρούμενη τιμή LOEL.

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι, αν η τιμή του k είναι αρκετά υψηλή, τότε ο ρυθμός των διεργασιών ADME στη δόση LD_{50} ($LD_{50} \times k$) μπορεί να υπερβαίνει το ποσοστό της δόσης από την κατάποση ($FPM \times C/bw$). Σε τέτοιες περιπτώσεις, δεν είναι δυνατόν για το πτηνό να φθάσει τη τιμή της LD_{50} , ακόμη και αν δεν υπάρχει απόκριση

αποφυγής της πρόσληψης τροφής. Είναι χρήσιμο να ελεγχθεί αυτό, καθώς μπορεί να αποφευχθεί η ανάγκη για την εκτίμηση των άλλων παραμέτρων στην εξίσωση 2 (AVD, AVT).

Αν προκύπτει ότι το πτηνό μπορεί να φτάσει τη θανατηφόρο δόση παρά τις όποιες επιπτώσεις της ADME και της αποφυγής της πρόσληψης τροφής, είναι σημαντικό να ελεγχθεί ο ρεαλισμός της συνολικής πρόσληψης της τροφής που απαιτείται για την επίτευξη της θανατηφόρου δόσης (λαμβάνοντας υπόψη τις επιπτώσεις της διαδικασίας ADME). Ο συνολικός χρόνος από την έναρξη της διατροφής μέχρι το πτηνό να φθάσει η τιμή της LD₅₀ μπορεί να υπολογισθεί ως εξής:

$$\text{Time to reach } LD_{50} = -\frac{1}{k} \times \ln \left(1 - \frac{LD_{50} \times k \times bw}{FPM \times C} \right)$$

Εξίσωση 5

Το αποτέλεσμα της εξίσωσης 5 μπορεί στη συνέχεια να πολλαπλασιαστεί με το ρυθμό πρόσληψης της τροφής ώστε να εκτιμηθεί η συνολική ποσότητα της τροφής που απαιτείται για την επίτευξη του LD₅₀. Σε περίπτωση που τα στοιχεία από τον αγρό δείχνουν ότι τα πτηνά είναι μάλλον απίθανο να τρέφονται συνεχώς για την περίοδο που υπολογίζεται από την εξίσωση 5, ή αν το ποσό της τροφής που καταναλώνονται σε αυτό το χρόνο υπερβαίνει κατά πολύ την αναμενόμενη ημερήσια πρόσληψη, τότε θα μπορούσε να συναχθεί το συμπέρασμα ότι οι εν λόγω έκθεση ήταν απίθανο να επιτευχθεί στον αγρό.

Όλες οι παράμετροι των εξισώσεων 1-5 είναι αβέβαιες, σε διάφορο βαθμό, και είναι σημαντικό να διερευνηθεί η επίπτωση αυτής της αβεβαιότητας σχετικά με την εκτίμηση της επικινδυνότητας. Ένας απλός τρόπος για να γίνει αυτό είναι με την επανάληψη των υπολογισμών αρκετές φορές με διάφορες υποθέσεις (π.χ. αυστηρά και περισσότερο ευνοϊκά σενάρια) για κάθε παράμετρο. Εάν στη χειρότερη περίπτωση τα αποτελέσματα είναι αρκετά κάτω από τη θανατηφόρο έκθεση, τότε θα μπορούσε να συναχθεί το συμπέρασμα ότι δεν υπάρχει σοβαρός κίνδυνος για τα πτηνά. Εάν ακόμη και οι πιο ευνοϊκές παραδοχές δείχνουν ότι θα συμβούν συχνά θανατηφόρες εκθέσεις των πτηνών, τότε ενδέχεται να καταλήξουμε στο συμπέρασμα ότι ο κίνδυνος δεν είναι αποδεκτός. Σε ενδιάμεσες περιπτώσεις, όπου στη χειρότερη περίπτωση τα αποτελέσματα δείχνουν θνησιμότητα, αλλά οι ευνοϊκές παραδοχές οδηγούν σε εκθέσεις πολύ κάτω από το LD₅₀, αιτούνται επιπλέον στοιχεία σχετικά με τις παραμέτρους της εξίσωσης 2 για την αξιολόγηση του κινδύνου με μεγαλύτερη βεβαιότητα.

2.3.6.2 Παραμετροποίηση

Οι παράμετροι που απαιτούνται για την εκτίμηση της έκθεσης από το στόμα και των επιδράσεων του methamidophos είναι η διατροφή, η απορρόφηση, ο μεταβολισμός, τα ποσοστά αποβολής, το LD₅₀ και το όριο της αποφυγής της πρόσληψης τροφής.

2.3.6.2.1 Ρυθμός πρόσληψης της τροφής

Ο ρυθμός διατροφής (gr σιτηρεσίου/kg bw/min) μπορεί να υπολογιστεί από στοιχεία που μπορούν να συλλεχθούν άμεσα κατά τη διάρκεια του πειραματισμού ή στον αγρό. Τα δεδομένα αυτά είναι σε μεγάλο βαθμό δυσεύρετα. Εκτιμήσεις για την κατανάλωση της τροφής/min μπορεί να γίνει χρησιμοποιώντας τις εκτιμήσεις της ημερήσιας ενεργειακής κατανάλωσης (Daily Energy Expenditure, DEE) (Crocker et al. 2002), αλλά απαιτούν παραδοχές σχετικές με τον τρόπο χορήγησης της τροφής, όπως ότι τα ζώα διατρέφονται περιοδικά ή συνεχώς κατά τη διάρκεια της ημέρας. Ο ρυθμός της πρόσληψης της τροφής χρησιμοποιείται στη συνέχεια για να υπολογιστεί ο ρυθμός λήψης του methamidophos χρησιμοποιώντας την εξίσωση έκθεσης με το FIR/bw * C.

2.3.6.2.2 Ρυθμός απορρόφησης

Ο ρυθμός απορρόφησης εκφράζεται ως mg methamidophos/kg bw/min. Για την απορρόφηση από το στόμα, αυτός είναι το ποσοστό μεταφοράς του methamidophos από το γαστρεντερικό σωλήνα (έντερο) στο κυκλοφορικό σύστημα (αίμα). Αυτό υποτίθεται ότι ακολουθεί εκθετική φθίνουσα συνάρτηση 1^{ης} τάξης (first order). Η απορρόφηση μπορεί να είναι ατελής (ένα ποσοστό μπορεί να μην απορροφηθεί), αλλά χωρίς αυτά τα στοιχεία θεωρείται ότι η απορρόφηση είναι 100%. Ο ρυθμός απορρόφησης μπορεί να υπολογιστεί από μελέτες ADME που χρησιμοποιούν την περιοχή κάτω από την καμπύλη (area under the curve, AUC), μετά από έκθεση από το στόμα ή/και ενδοφλέβια, όπου η ενδοφλέβια δόση αντιπροσωπεύει την άμεση και 100% απορρόφηση.

2.3.6.2.3 Ρυθμός μεταβολισμού

Ο ρυθμός μεταβολισμού εκφράζεται ως mg methamidophos/kg bw/min. Για όλες τις οδούς έκθεσης, το ποσοστό αυτό αντικατοπτρίζει την απώλεια της μητρικής ουσίας methamidophos στο σώμα των πτηνών.

2.3.6.2.4 Ρυθμός απέκκρισης

Ο ρυθμός απέκκρισης εκφράζεται ως mg methamidophos/kg bw/min. Για όλες τις οδούς έκθεσης, το ποσοστό αυτό αντικατοπτρίζει την εξάλειψη του methamidophos ή των μεταβολιτών. Τα ραδιενεργά κατάλοιπα στα ούρα αντικατοπτρίζουν την απέκκριση της απορροφημένης δόσης, ενώ τα υπολείμματα στα κόπρανα την εξάλειψη της μη απορροφημένης δόσης. Στα πτηνά, σε αντίθεση με τα θηλαστικά, δεν είναι πρακτικό να διαχωριστούν αυτά τα δύο, έτσι η απέκκριση αντικατοπτρίζει τη συνολική εξάλειψη της δόσης.

2.3.6.2.5 LD₅₀

Το LD₅₀ (mg methamidophos/kg bw) αντιπροσωπεύει το μέσο θανατηφόρο όριο μετά από στιγμιαία δόση από το στόμα. Αυτή η τιμή μπορεί να αντικατασταθεί με το γεωμετρικό μέσο ή το HD₅ (δόση που καλύπτει το 95% των τιμών LD₅₀ όταν υπάρχουν πολλές τιμές) στο μοντέλο, σε περίπτωση πολλών δεδομένων από ανάλογο πειραματισμό έκθεσης από το στόμα, ώστε να εκπροσωπείται καλύτερα η τοξικότητα της κοινότητας των εκτεθειμένων πτηνών ή θηλαστικών. Το μοντέλο υπολογίζει μία μέση θανατηφόρο επιβάρυνση του οργανισμού για τη στιγμιαία δόση χρησιμοποιώντας το ίδιο ποσοστό απορρόφησης που χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση της επιβάρυνσης του οργανισμού μέσω της έκθεσης στο ύπαιθρο. Εάν οι μέσες θανατηφόρες επιβαρύνσεις υπερβάλλουν την τιμή LD₅₀ υποθέτουμε ότι το 50% του πληθυσμού θα πεθάνει.

2.3.6.2.6 AVD

Ο χρόνος καθυστέρησης της αποφυγής της πρόσληψης τροφής είναι μια παράμετρος εισαγωγής στο μοντέλο και χρησιμοποιείται για να αντικαταστήσει την ανάγκη ενός ποσοστού απορρόφησης. Υποθέτουμε ότι το AVD υπολογίζεται από τα πρώτα εμφανή κλινικά συμπτώματα σε μελέτες οξείας στοματικής LD₅₀, αν υποτεθεί ότι τα ζώα που υποφέρουν από εμφανείς κλινικά συμπτώματα είναι πιθανό, επίσης, να σταματήσουν τη διατροφή. Αυτό είναι πιθανώς μια συντηρητική παραδοχή, διότι το όριο αποφυγής της πρόσληψης τροφής είναι πιθανό να είναι κατώτερο από εκείνο των κλινικών συμπτωμάτων. Η μελέτη της οξείας τοξικότητας από το στόμα LD₅₀ δεν είχε σχεδιαστεί για τη μέτρηση του AVD και υπάρχει κάποια αβεβαιότητα όσον αφορά την παράμετρο αυτή αλλά στον συγκεκριμένο πειραματισμό με το methamidophos, ήταν εφικτό να υπολογιστεί με τη συνεχή παρατήρηση.

2.3.6.2.7 AVT

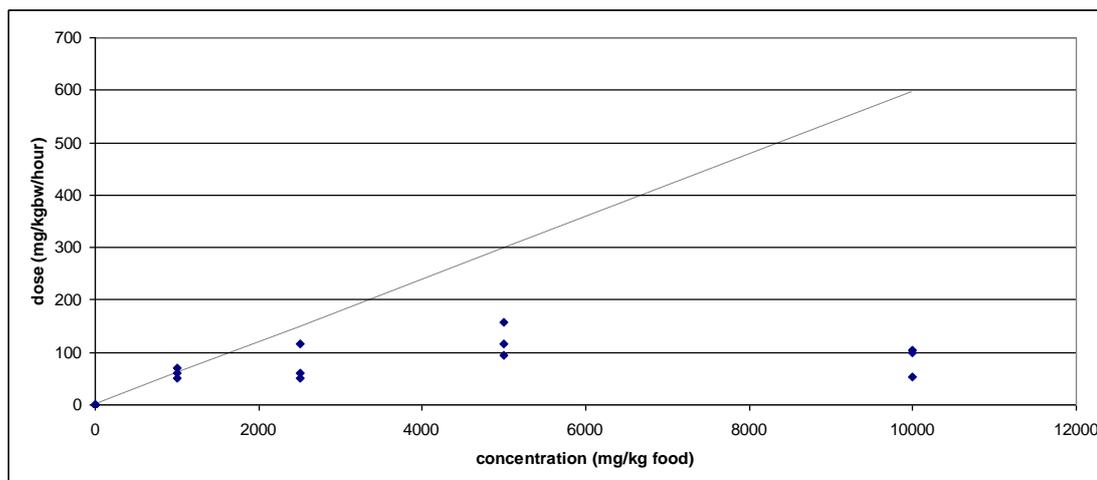
Η τιμή AVT μπορούν να υπολογιστεί είτε από τον δοκιμή οξείας τοξικότητας από το στόμα και υποξείας τοξικότητας.

Στον πειραματισμό οξείας τοξικότητας από το στόμα (LD_{50}), η AVT μπορεί να εκτιμηθεί από τα επίπεδα των δόσεων στα οποία η κατανάλωση τροφής μειώνεται σε υπο-θανατηφόρες δόσεις (μεταξύ της LOEL και NOEL για την κατανάλωση της τροφής). Η προσέγγιση αυτή, σε αντίθεση με τον πειραματισμό διατροφής, συνδέει την επίδραση με τη συστηματική τοξικότητα. Η οξεία από του στόματος LD_{50} δεν είχε σχεδιαστεί για τη μέτρηση του AVT ώστε να υπάρχει σχετική αβεβαιότητα όσον αφορά την παράμετρο αυτή αλλά στον συγκεκριμένο πειραματισμό με το methamidophos, με τη συνεχή παρατήρηση ήταν εφικτό να υπολογιστεί. Η χορήγηση οξείας δόσης από το στόμα σε ένα πτηνό δεν είναι το ίδιο με τη συνολική επιβάρυνση του οργανισμού, επειδή το methamidophos εξαλείφεται πριν επιτευχθεί η AVT, έτσι η AVT θα είναι πάντα μικρότερη από την LD_{50} . Σε περιπτώσεις αργής απορρόφησης και γρήγορης αποβολής μπορεί να είναι σημαντικά χαμηλότερη. Επιπλέον, η επίδραση της χορήγησης από το στόμα μπορεί να επηρεάσει τη διατροφική συμπεριφορά για κάποιο χρονικό διάστημα μετά τη χορήγηση της δόσης.

Όσον αφορά τις διατροφικές μελέτες η δόση μπορεί να υπολογιστεί από την κατανάλωση της τροφής και τη συγκέντρωση του methamidophos ($FIR / bw * C$). Η προσληφθείσα δόση φθάνει συνήθως ένα όριο (plateau) καθώς προσεγγίζεται το κατώτατο όριο αποφυγής. Η AVT είναι η ασύμπτωτη για αυτή την καμπύλη. Το μοντέλο μετατρέπει τη δόση AVT σε επιβάρυνση του οργανισμού χρησιμοποιώντας τον ίδιο ρυθμό απορρόφησης και απέκκρισης που χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση της επιβάρυνσης του οργανισμού μετά από έκθεση στον αγρό. Ένα πλεονέκτημα αυτής της παραμέτρου είναι ότι μπορεί να επιτευχθεί χωρίς να χρειάζεται η θνησιμότητα των πτηνών, με το να είναι διαθέσιμο καθαρό σιτηρέσιο αργότερα μέσα στην ημέρα κατά τη διάρκεια του πειραματισμού. Η προσέγγιση αυτή προϋποθέτει ότι η αποτροπή λήψης της τροφής οφείλεται σε έκθεση σε επίπεδα υπο-θανατηφόρα και όχι σε πρωτογενή απόθεση λόγω γεύσης ή οσμής. Γενικά, είναι αναμενόμενο ότι η πρωτογενής απόθεση θα είναι άμεση ή και μειούμενη καθώς το πτηνό πεινάει όλο και πιο πολύ (Εικ. 2.3-10).

Η AVT μπορεί να συγκριθεί με την LD_{50} . Αν η AVT είναι ένα μικρό ποσοστό του LD_{50} τότε υπάρχει μεγάλη πιθανότητα ότι η αποφυγή της πρόσληψης τροφής θα εμποδίσει τη θνησιμότητας στον αγρό. Αν η AVT βρίσκεται κοντά στο LD_{50} ο ρόλος της αποφυγής της πρόσληψης τροφής θα είναι πιο αβέβαιος. Η σημαντικότητα του AVT

θα ελεγχθεί ποσοτικά στο μοντέλο επιβάρυνσης του οργανισμού.



Εικ. 2.3-10: Τυπικό παράδειγμα σε πειραματισμό διατροφής που δείχνουν την προβλεπόμενη προσληφθείσα δόση (διακεκομμένη γραμμή) και την πραγματική δόση που προσλήφθηκε από 3 πουλιά που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε συγκέντρωση. Το κατώτατο όριο της αποφυγής της πρόσληψης τροφής σε αυτή τη μελέτη εκτιμάται ότι είναι 160 mg a.s./kg bw/h.

Υπάρχουν δύο κύριες υποθέσεις για τον καθορισμό του AVT. Το AVT θεωρείται ότι είναι ένα σταθερό ποσοστό της LD_{50} για κάθε χημική ουσία και η αποφυγή πρόσληψης της τροφής είναι μέσω της τοξικότητας και όχι της γεύσης ή της οσμής. Η επιβεβαίωση της τοξικότητας προέρχεται από την καθυστερημένη λειτουργία της αποφυγής πρόσληψης της τροφής, και όχι την άμεση όπως θα αναμενόταν αν η οσμή ή γεύση είχαν αποθητική συμπεριφορά, αλλά και από τα αποτελέσματα των δοκιμών αποφυγής “no-choice test” και “two-choice test”.

2.3.7 Στατιστική επεξεργασία

Για τη διαπίστωση στατιστικώς σημαντικών διαφορών εφαρμόστηκε ανάλυση της διακύμανσης, one-way analyses (ANOVA) και ακολούθως το τεστ Dunnett.

Για τον υπολογισμό της δόσης που προκαλεί μεταβολή x% (LD_x) η στατιστική εκτίμηση των αποτελεσμάτων έγινε με το μοντέλο probit. Το λογιστικό πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το SPSS v. 13.0. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως ο μέσος όρος \pm την τυπική απόκλιση (SD). Το επίπεδο σημαντικότητας ορίζεται ως $p < 0,05$.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα του πειραματισμού περιλαμβάνουν α) μακροσκοπικές παρατηρήσεις και μετρήσεις (θνησιμότητα, κλινικά συμπτώματα, μεταβολή του ρυθμού πρόσληψης της τροφής, μεταβολή του σωματικού βάρους καθώς και ιστολογικές εξετάσεις) σε οργανισμούς, β) υπολογισμό βιοχημικής *in vitro* δραστηριότητας σε ιστούς και γ) ανίχνευση με χρώση ηωσίνης – αιματοξυλίνης και ενζυμικές χαρακτηρισμούς σε ιστούς.

3.1 Ορτύκι

3.1.1 Δοκιμές οξείας τοξικότητας από το στόμα

3.1.1.1 Μακροσκοπικές παρατηρήσεις

3.1.1.1.1 Θνησιμότητα

Στον μάρτυρα και στις 2 χαμηλότερες δόσεις με methamidophos (1 και 2,2 mg/kg bw) δεν υπήρχαν νεκρά πτηνά, η χορήγηση όμως methamidophos σε 5 mg/kg bw προκάλεσε τον θάνατο των 50% των ορτυκίων (40% σε 3 h και 10% σε 4,5 h μετά την έκθεση, ενώ στις δόσεις 11,2 και 25 mg/kg bw προκάλεσε τον θάνατο όλων των ορτυκίων σε 1-2 h μετά την έκθεση (εκτός από 2 πτηνά που πέθαναν 1 d μετά, για την δόση των 11,2 mg/kg bw).

Όσον αφορά στην θνησιμότητα το NOEL=2,2 mg/kg bw (EC₁₀=3,7 mg/kg bw), το LOEL=5 mg/kg bw ενώ το LD₅₀=5 mg/kg bw μετά από 14 d από την έκθεση.

Στον Πίνακα 3.1-1 παρατίθεται η αθροιστική θνησιμότητα στα ορτύκια.

Πίνακας 3.1-1: Αθροιστική θνησιμότητα σε ιαπωνικό ορνίθι (*Coturnix coturnix japonica*) μετά από έκθεση σε διάφορες δόσεις methamidophos (mg/kg bw). Η οξεία τοξικότητα από το στόμα ελέγχθηκε σε εργαστηριακές συνθήκες (n=10 άτομα/ομάδα επέμβασης, ομάδα μάρτυρα=8 άτομα)

Methami- dophos (mg/kg bw)	Αριθμός νεκρών ατόμων															
	Ημέρες μετά τη χορήγηση															
	0†	0‡	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2,2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
11,2	0	8	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
25	0	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

† = μέχρι 0,5 h μετά την χορήγηση της δόσης

‡ = περίπου 1 έως 2 h μετά την χορήγηση για τις υψηλότερες δόσεις και 4,5 h για την μεσαία δόση.

3.1.1.1.2 Κλινικά συμπτώματα

Στον μάρτυρα και στη χαμηλότερη δόση των 1 mg/kg bw στα πτηνά δεν υπήρχαν εμφανή κλινικά συμπτώματα καθ' όλη τη διάρκεια του πειραματισμού.

Στη δόση των 2,2 mg/kg bw 2 h περίπου μετά την έκθεση, παρατηρήθηκαν ήπια κλινικά συμπτώματα σε 2 πτηνά χαρακτηριζόμενα από «αταξία» και 1 d μετά, ελαφρά κλινικά συμπτώματα σε 1 πτηνό, χαρακτηριζόμενα από «ανακατωμένο πτέρωμα». Στη δόση των 5 mg/kg bw, 1 h μετά την εφαρμογή της δόσης παρατηρήθηκαν ήπια κλινικά συμπτώματα όπως αταξία, μειωμένη αντίδραση σε εξωτερικά ερεθίσματα, μυικό τρόμο, σιελόρροια, που 2 h μετά είχαν γίνει σοβαρά, ενώ την επόμενη ημέρα το πρωί παρατηρήθηκαν ήπια κλινικά συμπτώματα όπως ανακατωμένο πτέρωμα, μόνο σε 2 πτηνά. Όλα τα πτηνά που επέζησαν έδειχναν υγιή 14,5 h μετά την εφαρμογής της δόσης και για τις επόμενες ημέρες.

Στις 2 υψηλότερες δόσεις των 11,2 και 25 mg/kg bw, 0,5 h μετά την έκθεση έως λίγο πριν το θάνατο τους, παρατηρήθηκαν σοβαρά κλινικά συμπτώματα όπως αταξία, μυικό τρόμο, αδυναμία στα πόδια, αδυναμία χρησιμοποίησης των πτερύγων και απάθεια, αντίστοιχα (Εικ. 3.1-1).

Όσον αφορά στα κλινικά συμπτώματα το NOEL=5 mg/kg bw μετά από 14 d πειραματισμού, ενώ τα NOEL, LOEL είναι 1 και 2,2 mg/kg bw, αντίστοιχα για την καταγραφή τους.



Εικ. 3.1-1: Οξεία τοξικότητα – 5 mg/kg bw, ημέρα 0: Παρατηρείται αδυναμία στα άκρα και δυσκολία στο βάδισμα (Φουντουλάκης Μ.).

Τα κλινικά συμπτώματα, για τον πειραματισμό της οξείας τοξικότητας στο ορτύκι, παρατίθενται στον Πίνακα 3.1-2.

Πίνακας 3.1-2: Κλινικά συμπτώματα σε ιαπωνικό ορτύκι (*Coturnix coturnix japonica*) μετά από έκθεση σε διάφορες δόσεις methamidophos (mg/kg bw). Η οξεία τοξικότητα από το στόμα ελέγχθηκε σε εργαστηριακές συνθήκες (n=10 άτομα/ομάδα επέμβασης, ομάδα μάρτυρα=8 άτομα)

Methamidophos (mg/kg bw)	Αριθμός ατόμων με κλινικά συμπτώματα ¹						
	Ημέρες μετά τη χορήγηση						
	0	0	0	0	0	1	2...14
	0,5	1h	2h	4h	>4h		
0	δ.π.	δ.π.	δ.π.	δ.π.	δ.π.	δ.π.	δ.π.
1	δ.π.	δ.π.	δ.π.	δ.π.	δ.π.	δ.π.	δ.π.
2,2	δ.π.	δ.π.	δ.π.	A2a ^{2,3}	A2a	F1a	δ.π.
5	δ.π.	A10a R10a S10a T10a	A10c R10c S10c T10c	A10c R10c S10c T10c	A6c R6c S6c T6c	F2a	δ.π.
11,2	A10a T10a	A10c T10c L10c W10c	A2c T2c L2c W2c	A2c T2c L2c W2c	A2c T2c L2c W2c	x	x
25	A10a L10a	N10c	x	x	x	x	x

¹ Είδος κλινικών συμπτωμάτων:

F = ανακατωμένο πτέρωμα (ruffled feathers),

W = αδυναμία χρησιμοποίησης των πτερύγων (can't use wings),

S = σιελόρροια (salivation),

A = αταξία (difficulties in walking-ataxia),
L = αδυναμία στα πόδια (leg weakness),
R = μειωμένη αντίδραση σε εξωτερικά ερεθίσματα (reduce reaction to external stimuli),
T= μυικός τρέμος (tremor),
N= απάθεια (apathy)

² **Αριθμός δίπλα στο είδος των κλινικών συμπτωμάτων:** αριθμός ατόμων με κλινικά συμπτώματα (π.χ. F 2 = 2 άτομα χαρακτηρισμένα ως “ανακατωμένο πτέρωμα”)

δ.π. = δεν παρατηρήθηκαν κλινικά συμπτώματα

³ **Βαθμός έντασης των κλινικών συμπτωμάτων:** a= ήπια ή για μικρή περίοδο, b=μέτρια, c= σοβαρά κλινικά ² συμπτώματα

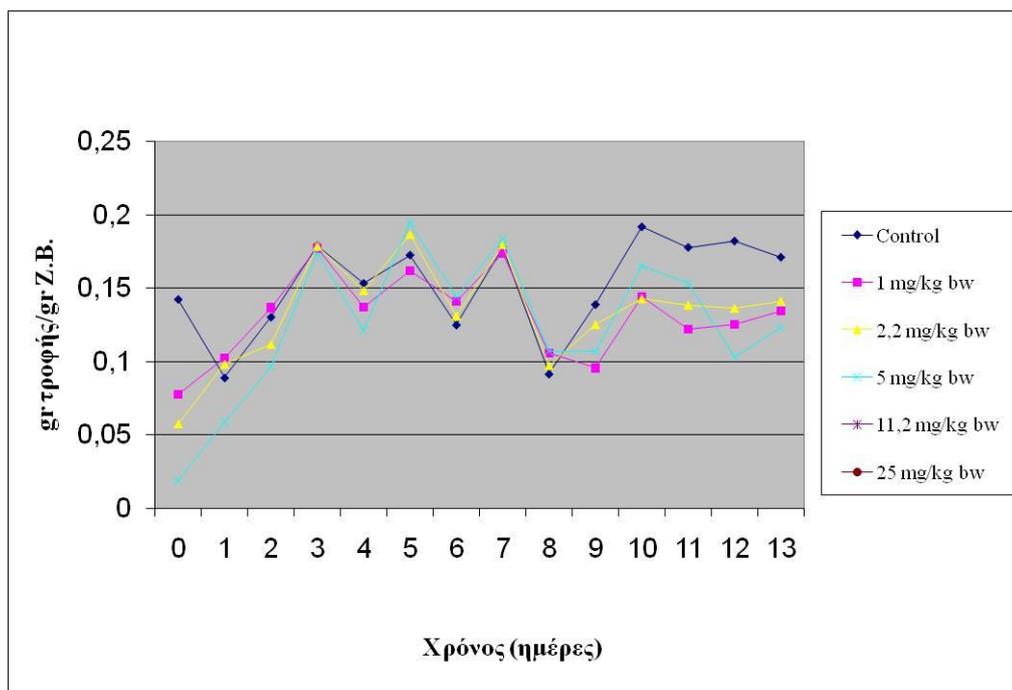
x = δεν υπάρχουν ζώντα άτομα

3.1.1.1.3 Πρόσληψη τροφής

Μόνο την ημέρα 0, για κάθε επέμβαση με methamidophos, ο ρυθμός πρόσληψης τροφής (gr τροφής/gr bw/d) ήταν αντιστρόφως ανάλογος σε σχέση με τον μάρτυρα (μικρότερος όσο αύξανε η δόση του methamidophos), ενώ από την επόμενη ημέρα για όλες τις δόσεις ήταν ανάλογος με τον μάρτυρα, για τις ημέρες 0-7. Για τις ημέρες 8-14 ενώ ο ρυθμός πρόσληψης τροφής ήταν ανάλογος για τις όλες επεμβάσεις με methamidophos, στον μάρτυρα ήταν λίγο μεγαλύτερος (Γράφημα 3.1-1).

Για την εκτίμηση της κατανάλωσης της τροφής, τα πτηνά που βρέθηκαν νεκρά στους κλωβούς τους την ημέρα της παρατήρησης δεν συμπεριλαμβάνονται στους αντίστοιχους υπολογισμούς. Έτσι η μέση κατανάλωση τροφής (gr τροφής/gr bw/d) υπολογίστηκε από την κατανάλωση της τροφής των ζώντων πτηνών/κλωβό/ημέρα.

Στις 2 μεγαλύτερες δόσεις των 11,2 και 25 mg/kg bw, δεν ήταν δυνατό να εκτιμηθεί ο ρυθμός πρόσληψης τροφής/πτηνό/d εφόσον όλα σχεδόν τα άτομα είχαν πεθάνει λίγη ώρα μετά την έκθεση.



Γράφημα 3.1-1: Ρυθμός πρόσληψης τροφής (FIR) σε ιαπωνικό ορτύκι (*Coturnix coturnix japonica*) μετά από έκθεση σε διάφορες δόσεις methamidophos (mg/kg bw). Η οξεία τοξικότητα από το στόμα ελέγχθηκε σε εργαστηριακές συνθήκες (n=10 άτομα/ομάδα επέμβασης, ομάδα μάρτυρα=8 άτομα)

3.1.1.1.4 Σωματικό βάρος

Το μέσο σωματικό βάρος για τις δόσεις των 1, 2,2 και 5 mg/kg bw αυξήθηκε, από την ημέρα 0 μέχρι την ημέρα 14, και με σημαντική διαφορά σε σύγκριση με τον μάρτυρα (Πίνακας 3.1-3). Η αύξηση του σωματικού βάρους παρατηρήθηκε για όλες τις επεμβάσεις με methamidophos τις ημέρες 0-7 ενώ τις ημέρες 8-14 σχεδόν σταθεροποιήθηκε. Όσα άτομα βρέθηκαν νεκρά στους κλωβούς την ημέρα της παρατήρησης, δεν συμπεριλαμβάνονται στους υπολογισμούς.

Πίνακας 3.1-3: Ποσοστό μεταβολής του σωματικού βάρους¹ σε ιαπωνικό ορτύκι (*Coturnix coturnix japonica*) μετά από έκθεση σε διάφορες δόσεις methamidophos (mg/kg bw). Η οξεία τοξικότητα από το στόμα ελέγχθηκε σε εργαστηριακές συνθήκες (n=10 άτομα/ομάδα επέμβασης, ομάδα μάρτυρα=8 άτομα)

Methamidophos (mg/kg bw)	Ποσοστό μεταβολής του σωματικού βάρους (%) ¹		
	Ημέρες μετά τη χορήγηση		
	0-7	8-14	0-14
0	18,7 ± 3,4 ²	6,4 ± 7,3	25,2 ± 3,9
1	5,8 ± 1,6	-0,3 ± 1,4	5,5 ± 2,4
2,2	8,2 ± 3,2	-0,7 ± 1,0	7,5 ± 2,9
5	7,7 ± 2,0	3,5 ± 3,5	11,2 ± 4,6
11,2	x	x	x
25	x	x	x

¹ Τα πτηνά που βρέθηκαν νεκρά στους κλωβούς δεν συμπεριλαμβάνονται στους υπολογισμούς

² Τα αποτελέσματα εκφράζονται MO ± SD.

x = δεν υπάρχουν ζώντα άτομα

3.1.1.1.5 Μακροσκοπική παρατήρηση των ιστών

Στα ζώντα άτομα δεν υπήρχαν εμφανή τοξικά συμπτώματα. Σε μερικά μόνο από τα άτομα που είχαν πεθάνει και μόνο για την μεγαλύτερη δόση των 25 mg/kg bw, διαπιστώθηκε αιμορραγία στον εγκέφαλο.

Για τον μάρτυρα και για τις δόσεις των 1, 2,2, 5 και 11,2 mg/kg bw, ο πρόλοβος των πτηνών σε μερικά πτηνά είχε μόνο σίελο, ενώ σε άλλα είχε τροφή. Συγκεκριμένα το 50% των πτηνών στο μάρτυρα και στη δόση 1 mg/kg bw είχε πολύ τροφή, το 20% των πτηνών στη δόση 2,2 mg/kg bw είχε λίγη και πολύ τροφή, το 40% στη δόση 5 mg/kg bw είχε λίγη και πολύ τροφή και το 20% των πτηνών στη δόση 11,2 mg/kg bw είχε λίγη τροφή. Στη δόση των 25 mg/kg bw ο πρόλοβος δεν είχε φαγητό παρά μόνο εκκρίσεις.

3.1.1.2 Βιοχημικά αποτελέσματα

3.1.1.2.1 Πλάσμα αίματος

Η δραστικότητα των εστερασών όταν χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα το ASCh ή το BuSCh δεν παρεμποδίστηκε από το BW284C51. Σε αντίθεση η δραστικότητα τους παρεμποδίστηκε κατά 98 και 99% από τα iso-OMPA και eserine, αντίστοιχα. Από όλα τα ανωτέρω αποδεικνύεται ότι το ένζυμο είναι BuChE. Ανάλογα αποτελέσματα είχαμε και όταν χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα το PrSCh (δεν παρεμποδίστηκε από το BW284C51 και κατά 99 και 100% από τα iso-OMPA και eserine, αντίστοιχα), δείχνοντας ότι το ένζυμο BuChE υδρολύει επίσης το PrSCh στο πλάσμα.

Η δραστικότητα των εστερασών στο πλάσμα του αίματος ήταν ανάλογη όταν χρησιμοποιήθηκαν ως υποστρώματα τα ASCh, BuSCh και PrSCh ενώ στον μάρτυρα, η δραστικότητα των εστερασών, την ημέρα 1, ήταν ($29,2 \pm 2,7$ SD, $35,6 \pm 2,5$ SD και $33,2 \pm 1,7$ SD $\mu\text{mol}/\text{min mg}$ πρωτεΐνης, αντίστοιχα) (Πίνακες 3.1-4/5).

Η δραστικότητα της BuChE, με υπόστρωμα BuSCh, διέφερε σημαντικά ανάλογα με τη δόση του methamidophos και το χρόνο επίδρασης (Πίνακας 3.1-4). Για τις δόσεις των 1, 2,2 και 5 mg/kg bw του methamidophos, η δραστικότητα του BuChE, 0,5 h έως την ημέρα 1 μετά την έκθεση παρεμποδίστηκε σε ποσοστό 55, 18 και 100%, αντίστοιχα αλλά από την ημέρα 3 και μετά, η παρεμπόδιση είχε αναστραφεί αφού η δραστικότητα της BuChE αυξήθηκε 31, 109 και 785%, αντίστοιχα. Η αύξηση αυτή παρέμεινε μέχρι το τέλος

του πειραματισμού, κατά 65, 206 και 79%, αντίστοιχα. Ανάλογα αποτελέσματα πήραμε και για τις 2 υψηλότερες δόσεις των 11,2 και 25 mg/kg bw, όπου όλα σχεδόν τα ορτύκια πέθαναν μέσα σε 1-2 h, το methamidophos παρεμπόδισε, σχεδόν 100% την δραστικότητα της BuChE (Πίνακας 3.1-4).

Η δραστικότητα της BuChE, με υπόστρωμα το PrSCh, έδειξε παρόμοια συμπεριφορά και έδωσε ανάλογα αποτελέσματα, με αυτά του BuSCh, γεγονός που αυξάνει την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων του πειραματισμού (Πίνακας 3.1-5).

Πίνακας 3.1-4: Βιοχημική *in vitro* δραστικότητα των BuChEs, με υπόστρωμα BuSCh, σε πλάσμα αίματος ιαπωνικού ορνυκίου (*Coturnix coturnix japonica*) μετά από έκθεση σε διάφορες δόσεις methamidophos (mg/kg bw). Η κάθε τιμή είναι ο ΜΟ μετρήσεων από 2-5 ορνύκια (ΜΟ ± SD). Η οξεία τοξικότητα από το στόμα ελέγχθηκε σε εργαστηριακές συνθήκες (n=10 άτομα/ομάδα επέμβασης, ομάδα μάρτυρα=8 άτομα)

Methamidophos (mg/kg bw)	Δραστικότητα των BuChE ¹							
	Ημέρες μετά τη χορήγηση							
	0 (+0,5/+1 h μετά τη χορήγηση)	1		3		14		
0	-	35,6 ± 2,5	(0)	42,7 ± 32,8	(0)	36,8 ± 8,5	(0)	
1	-	15,9 ± 5,1	(55)	55,9 ± 29,5	(-31)	60,9 ± 21,4	(-65)	
2,2	-	29,0 ± 8,3	(18)	89,1 ± 0,9	(-109)	112,7 ± 32,1	(-206)	
5	-/-1,2 ± 3,1 ²	(100)	-	377,6 ± 81,2	(-785)	65,7 ± 12,4	(-79)	
11,2	0,2/-0,1 ± 0,1	(100)	0,4	(99)	x	x		
25	0,7/0,5 ± 0,3	(99)	x		x	x		

¹ μmol/min.mg πρωτεΐνης.

² Τα δεδομένα εκφράζονται ως ΜΟ ± SD. Η % παρεμπόδιση σε σύγκριση με τον μάρτυρα καταγράφεται μέσα στην παρένθεση ().

- Δεν έγινε δειγματοληψία

x Όλα τα άτομα είναι νεκρά

Πίνακας 3.1-5: Βιοχημική *in vitro* δραστικότητα των ChEs, με υπόστρωμα PrSCh, σε πλάσμα αίματος ιαπωνικού ορνυκίου (*Coturnix coturnix japonica*) μετά από έκθεση σε διάφορες δόσεις methamidophos (mg/kg bw). Η κάθε τιμή είναι ο ΜΟ μετρήσεων από 2-5 ορνύκια (ΜΟ ± SD). Η οξεία τοξικότητα από το στόμα ελέγχθηκε σε εργαστηριακές συνθήκες (n=10 άτομα/ομάδα επέμβασης, ομάδα μάρτυρα=8 άτομα)

Methamidophos (mg/kg bw)	Δραστικότητα των BuChEs ¹							
	Ημέρες μετά τη χορήγηση							
	0 (+0,5/+1 h μετά τη χορήγηση)	1		3		14		
0	-	33,2 ± 1,7	(0)	41,9 ± 31,8	(0)	34,8 ± 11,4	(0)	
1	-	17,6 ± 3,5	(47)	59,7 ± 18,5	(-42)	55,0 ± 7,3	(-58)	
2,2	-	25,9 ± 10,1	(22)	81,1 ± 11,6	(-93)	84,1 ± 29,7	(-142)	
5	-/-0,4 ± 1,4 ²	(100)	-	357,0 ± 111,2	(-751)	60,2 ± 22,8	(-73)	
11,2	-0,1/0,7 ± 0,7	(100)	1,3	(96)	x	x		
25	-0,7/-1,5 ± 1,8	(100)	x		x	x		

¹ μmol/min.mg πρωτεΐνης.

² Τα δεδομένα εκφράζονται ως ΜΟ ± SD. Η % παρεμπόδιση σε σύγκριση με τον μάρτυρα καταγράφεται μέσα στην παρένθεση ().

- Δεν έγινε δειγματοληψία

x

Όλα

τα

άτομα

είναι

νεκρά

3.1.1.2.2 Εγκέφαλος

Η δραστηριότητα των εστερασών, στην περίπτωση του ASCh, με τη χρήση των παρεμποδιστών iso-OMPA, BW284C51 και eserine, έδωσε 8, 86 και 94% παρεμπόδιση, αντίστοιχα, γεγονός που αποδεικνύει ότι το ένζυμο είναι AChE και ίχνη από BuChE. Όταν χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα το BuSCh με την χρήση των παρεμποδιστών BW284C51, iso-OMPA και eserine και λόγω των χαμηλών τιμών δραστηριότητας, τα αποτελέσματα έδειξαν επίδραση, 1, 39 και 62% παρεμπόδιση, αντίστοιχα, δείχνοντας ότι το ένζυμο είναι ίχνη από BuChE. Τελικά όταν χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα το PrSCh, η προσθήκη των παρεμποδιστών iso-OMPA, BW284C51 και eserine δίνει παρεμπόδιση κατά 9, 82 και 96%, αντίστοιχα, υποδεικνύοντας εδώ είναι ότι το ένζυμο είναι πρωταρχικά AChE που υδρολύει το PrSCh στον εγκέφαλο. Στον εγκέφαλο λοιπόν οι παρεμποδιστές iso-OMPA και BW284C51 με το PrSCh λειτούργησαν αντίστροφα από το πλάσμα (κοίτα 3.1.1.2.1).

Η δραστηριότητα των εστερασών στον εγκέφαλο, στον μάρτυρα, ήταν υψηλή όταν χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα το ASCh ή το PrSCh ενώ όταν χρησιμοποιήθηκε το BuSCh αντιθέτως, η δραστηριότητα των εστερασών ήταν χαμηλή. Στον μάρτυρα, οι τιμές δραστηριότητας των εστερασών για τα υποστρώματα ASCh (μετά την αφαίρεση του BuChE), PrSCh και BuSCh, την ημέρα 1, ήταν $374,1 \pm 108,9$ SD, $415,3 \pm 204,9$ SD και $29,0 \pm 13,18$ SD $\mu\text{mol}/\text{min mg}$ πρωτεΐνης, αντίστοιχα (Πίνακες 3.1-6/7).

Η δραστηριότητα της AChE στον εγκέφαλο διέφερε σημαντικά (με υπόστρωμα ASCh μετά την αφαίρεση του BuChE), όταν η δόση και ο χρόνος επίδρασης του methamidophos αυξανόταν. Για όλες τις δόσεις, το methamidophos παρεμπόδισε την δραστηριότητα της AChE κατά 53-66%, από 1 h μέχρι την ημέρα 1 μετά την έκθεση, ενώ σε 11,2 και 25 mg/kg bw 0,5 h μετά την έκθεση, η παρεμπόδιση ήταν 63 και 85%, αντίστοιχα για τα ζώντα ορτύκια ενώ για τα νεκρά ορτύκια, σε 5, 11,2, και 25 mg/kg bw, 1 h μετά, η παρεμπόδιση κυμάνθηκε σε ανάλογα ή υψηλότερα επίπεδα 62, 72 και 90%, αντίστοιχα. Την ημέρα 3, για τα ζώντα άτομα των δόσεων 1, 2,2 και 5 mg/kg bw η δραστηριότητα της AChE παρεμποδίστηκε κατά 39-44%, ενώ μέχρι την ημέρα 14 η παρεμπόδιση μειώθηκε ακόμη περισσότερο, πιο αργά όσο μεγαλύτερη ήταν η δόση, 1, 16 και 26%, αντίστοιχα (Πίνακες 3.1-6).

Η δραστηριότητα της ChE, με υπόστρωμα το PrSCh, έδειξε παρόμοια συμπεριφορά και έδωσε ανάλογα αποτελέσματα με την περίπτωση του υποστρώματος ASCh, μέχρι και την ημέρα 1. Για τις ημέρες 3 και 14 η δραστηριότητα μειώθηκε λίγο, χωρίς να ανακάμψει όμως για όλες τις δόσεις (Πίνακας 3.1-7).

Πίνακας 3.1-6: Βιοχημική *in vitro* δραστηριότητα της AChE, σε εγκέφαλο ιαπωνικού ορτυκιού (*Coturnix coturnix japonica*) μετά από έκθεση σε διάφορες δόσεις methamidophos (mg/kg bw). Η κάθε τιμή είναι ο MO μετρήσεων από 2-3 ορτύκια (MO ± SD). Η οξεία τοξικότητα από το στόμα ελέγχθηκε σε εργαστηριακές συνθήκες (n=10 άτομα/ομάδα επέμβασης, ομάδα μάρτυρα=8 άτομα)

Methamidophos (mg/kg bw)	Δραστηριότητα της AChE ¹							
	Ημέρες μετά τη χορήγηση							
	0 (+0,5/+1 h μετά τη χορήγηση)	1		3		14		
0	-	374,1 ± 108,9	(0)	373,4 ± 126,3	(0)	266,2 ± 53,4	(0)	
1	-	177,6 ± 52,2	(53)	209,3 ± 13,4	(44)	263,5 ± 29,7	(1)	
2,2	-	197,1 ± 25,9	(47)	193,9 ± 14,8	(48)	223,8 ± 20,2	(16)	
5	-/170,2 ± 42,2 ²	(54 [62])	-	229,3 ± 7,5	(39)	197,5 ± 91,0	(26)	
11,2	137,8/126,2 ± 11,3	(66 [72])	126,3	(66)	x	x		
25	55,2/167,3 ± 58,2	(55 [90])	x		x	x		

¹ μmol/min.mg πρωτεΐνης.

² Τα δεδομένα εκφράζονται ως MO ± SD. Η % παρεμπόδιση σε σύγκριση με τον μάρτυρα για τα ζώντα άτομα καταγράφεται μέσα στην παρένθεση () ενώ για τα νεκρά μέσα σε αγκύλες [].

- Δεν έγινε δειγματοληψία

x Όλα τα άτομα είναι νεκρά

Πίνακας 3.1-7: Βιοχημική *in vitro* δραστηριότητα των ChEs, με υπόστρωμα PrSCh, σε εγκέφαλο ιαπωνικού ορτυκιού (*Coturnix coturnix japonica*) μετά από έκθεση σε διάφορες δόσεις methamidophos (mg/kg bw). Η κάθε τιμή είναι ο MO μετρήσεων από 2-3 ορτύκια (MO ± SD). Η οξεία τοξικότητα από το στόμα ελέγχθηκε σε εργαστηριακές συνθήκες (n=10 άτομα/ομάδα επέμβασης, ομάδα μάρτυρα=8 άτομα)

Methamidophos (mg/kg bw)	Δραστηριότητα των ChEs ¹							
	Ημέρες μετά τη χορήγηση							
	0 (+0,5/+1 h μετά τη χορήγηση)	1		3		14		
0	-	415,3 ± 204,9	(0)	373,2 ± 246,0	(0)	313,6 ± 70,5	(0)	
1	-	221,3 ± 149,3	(47)	166,0 ± 6,0	(56)	199,8 ± 53,0	(36)	
2,2	-	154,7 ± 40,4	(63)	159,4 ± 54,7	(57)	221,1 ± 95,4	(30)	
5	-/145,3 ± 23,0 ²	(65 [73])	-	129,4 ± 79,3	(65)	167,2 ± 37,4	(47)	
11,2	62,2/106,9 ± 44,1	(74 [67])	86,9	(79)	x	x		
25	52,2/154,4 ± 69,3	(63 [90])	x		x	x		

¹ μmol/min.mg πρωτεΐνης.

² Τα δεδομένα εκφράζονται ως MO ± SD. Η % παρεμπόδιση σε σύγκριση με τον μάρτυρα για τα ζώντα άτομα καταγράφεται μέσα στην παρένθεση () ενώ για τα νεκρά μέσα σε αγκύλες [].

- Δεν έγινε δειγματοληψία

x

Όλα

τα

άτομα

είναι

νεκρά

3.1.1.2.3 Ήπαρ

Η δραστηριότητα των εστερασών όταν χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα το ASCh με την χρήση των παρεμποδιστών iso-OMPA και eserine, λόγω των χαμηλών τιμών δραστηριότητας, τα αποτελέσματα έδωσαν 56 και 63% παρεμπόδιση, αντίστοιχα, γεγονός που δείχνει ότι το ένζυμο είναι κυρίως η BuChE και πιθανόν ίχνη της AChE. Ανάλογα όταν χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα BuSCh, δείχνει ότι το ένζυμο είναι BuChE. Τέλος όταν χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα το PrSCh δείχνει ότι το ένζυμο είναι BuChE, ενώ τα αποτελέσματα με τον παρεμποδιστή BW284C51 είναι ανάλογα με το πλάσμα (καμία επίδραση).

Η δραστηριότητα των εστερασών στο ήπαρ, στον μάρτυρα, ήταν χαμηλή όταν κατά την βιοχημική ανάλυση ως υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκαν τα ASCh, BuSCh και PrSCh ενώ την ημέρα 1, ήταν $33,9 \pm 25,3$ SD, $27,6 \pm 22,9$ SD και $24,8 \pm 18,8$ SD $\mu\text{mol}/\text{min mg}$ πρωτεΐνης, αντίστοιχα) (Πίνακες 3.1-8/9).

Η δραστηριότητα της BuChE, με υπόστρωμα το BuSCh, διέφερε σημαντικά μόνο για την μεγαλύτερη δόση μέχρι την ημέρα 1. Σε όλες τις δόσεις, το methamidophos παρεμπόδισε κατά 34-71% την δραστηριότητα της BuChE στο συκώτι μέχρι την ημέρα 1 μετά την έκθεση ενώ την ημέρα 3, αντιστράφηκε και αυξήθηκε 5-49% για τα ζώοντα ορτύκια. Τέλος την ημέρα 14, για τις χαμηλότερες δόσεις (1 και 2,2 mg/kg bw) η δραστηριότητα της BuChE παρέμεινε αυξημένη 59-60%, ενώ για την μεσαία δόση των 5 mg/kg bw η παρεμπόδιση ήταν μικρή, 10% (Πίνακας 3.1-8).

Η δραστηριότητα των ChEs, με υπόστρωμα το PrSCh, έδειξε παρόμοια συμπεριφορά δίνοντας μικρότερες τιμές από το BuSCh, μέχρι και την ημέρα 1. Μάλιστα από την ημέρα 3 μέχρι το τέλος του πειραματισμού, στη μικρότερη δόση των 1 mg/kg bw, η δραστηριότητα αυξήθηκε σταδιακά 35-72% σε σύγκριση με τον μάρτυρα. Στις υπόλοιπες 2 δόσεις των 2,2 και 5 mg/kg bw, για την ημέρα 3 η δραστηριότητα αυξήθηκε 3 και 58% σε σύγκριση με τον μάρτυρα, αντίστοιχα ενώ για την ημέρα 14 η δραστηριότητα μειώθηκε λίγο (15%), μόνο για την μεσαία δόση των 5 mg/kg bw (Πίνακας 3.1-9).

Πίνακας 3.1-8: Βιοχημική *in vitro* δραστηριότητα των BuChEs, με υπόστρωμα BuSCh, σε ήπαρ ιαπωνικού ορνυκιού (*Coturnix coturnix japonica*) μετά από έκθεση σε διάφορες δόσεις methamidophos (mg/kg bw). Η κάθε τιμή είναι ο MO μετρήσεων από 2-3 ορνύκια (MO ± SD). Η οξεία τοξικότητα από το στόμα ελέγχθηκε σε εργαστηριακές συνθήκες (n=10 άτομα/ομάδα επέμβασης, ομάδα μάρτυρα=8 άτομα)

Methamidophos (mg/kg bw)	Δραστηριότητα των BuChE ¹																				
	Ημέρες μετά τη χορήγηση																				
	0 (+0,5/+1 h μετά τη χορήγηση)			1			3			14											
0	-			27,6	±	22,9	(0)	25,7	±	18,7	(0)	26,4	±	28,0	(0)
1	-			18,2	±	10,5	(34)	38,2	±	1,7	(-49)	42,3	±	29,4	(-60)
2,2	-			17,1	±	7,5	(38)	26,9	±	15,8	(-5)	42,2	±	27,6	(-59)
5	-/11,3	±	2,6 ²	(59)	-			27,9	±	10,4	(-9)	23,7	±	7,0	(10)
11,2	11,4/11,0	±	5,2	(60)	7,9	(71)	x					x					
25	7,4/9,2	±	1,3	(67)	x			x					x						

¹ μmol/min.mg πρωτεΐνης.

² Τα δεδομένα εκφράζονται ως MO ± SD. Η % παρεμπόδιση σε σύγκριση με τον μάρτυρα για τα ζώντα άτομα καταγράφεται μέσα στην παρένθεση ().

- Δεν έγινε δειγματοληψία

x Όλα τα άτομα είναι νεκρά

Πίνακας 3.1-9: Βιοχημική *in vitro* δραστηριότητα των ChEs, με υπόστρωμα PrSCh, σε ήπαρ ιαπωνικού ορνυκιού (*Coturnix coturnix japonica*) μετά από έκθεση σε διάφορες δόσεις methamidophos (mg/kg bw). Η κάθε τιμή είναι ο MO μετρήσεων από 2-3 ορνύκια (MO ± SD). Η οξεία τοξικότητα από το στόμα ελέγχθηκε σε εργαστηριακές συνθήκες (n=10 άτομα/ομάδα επέμβασης, ομάδα μάρτυρα=8 άτομα)

Methamidophos (mg/kg bw)	Δραστηριότητα των ChEs ¹																				
	Ημέρες μετά τη χορήγηση																				
	0 (+0,5/+1 h μετά τη χορήγηση)			1			3			14											
0	-			24,8	±	18,8	(0)	29,8	±	19,1	(0)	40,8	±	22,1	(0)
1	-			33,4	±	19,8	(-35)	45,7	±	0,5	(-54)	69,9	±	50,4	(-72)
2,2	-			18,4	±	6,0	(26)	30,7	±	13,6	(-3)	40,5	±	21,6	(1)
5	-/20,4	±	11,4 ²	(18)	-			47,1	±	6,2	(-58)	34,6	±	11,8	(15)
11,2	14,9/14,0	±	3,0	(43)	21,9	(12)	x					x					
25	13,5/13,6	±	2,4	(45)	x			x					x						

¹ μmol/min.mg πρωτεΐνης.

² Τα δεδομένα εκφράζονται ως MO ± SD. Η % παρεμπόδιση σε σύγκριση με τον μάρτυρα για τα ζώντα άτομα καταγράφεται μέσα στην παρένθεση ().

- Δεν έγινε δειγματοληψία

x Όλα τα άτομα είναι νεκρά

3.1.1.3 Ιστοχημικές χρώσεις

3.1.1.3.1 Εγκέφαλος

3.1.1.3.1.1 Χρώση Ηωσίνης – Αιματοζυλίνης

Η επίδραση του methamidophos στον εγκέφαλο του ιαπωνικού ορτυκιού διέφερε μεταξύ του μάρτυρα και όλων των δόσεων methamidophos για την περίοδο των 14 ημερών, υποδεικνύοντας διαταραχή της ιστικής αρχιτεκτονικής ανάλογη με τη δόση και το χρόνο.

Για τις χαμηλότερες δόσεις των 1 και 2,2 mg/kg bw, παρατηρήθηκε εκφυλισμός τόσο του πυρήνα, του κυτταροπλάσματος και της κυτταροπλασματικής μεμβράνης (πιθανά διαφορετικά στάδια της διαδικασίας του κυτταρικού θανάτου), καρνομεγαλία αλλά και κύτταρα σε διαφορετικά στάδια μίτωσης. Τα αποπτωτικά κύτταρα ήταν ορατά είτε σε ομάδες, σε πολύ μικρές εστιακές περιοχές είτε σε εκτεταμένες ζώνες ενώ η σπογγειόμορφη αλλοίωση, ως αποτέλεσμα της απόπτωσης, γινόταν πιο διακριτή όσο περνούσε ο χρόνος. Σε κάποιες περιπτώσεις παρατηρήθηκε αποκατάσταση (αναγέννηση) του ιστού με την εμφάνιση νέων κυττάρων και νεύρων. Η διατάραξη της ιστικής αρχιτεκτονικής ήταν λιγότερο εκτεταμένη στον εγκεφαλικό φλοιό σε σχέση με το εσωτερικό του εγκεφάλου (Εικ.3.1-2).

Για τη μεσαία δόση των 5 mg/kg bw οι ιστολογικές αλλοιώσεις που παρατηρήθηκαν ήταν εντονότερες σε σύγκριση με εκείνες που παρατηρήθηκαν στις χαμηλότερες δόσεις. Και πάλι ήταν ορατοί στον εγκεφαλικό ιστό, πυκνωτικοί (αποπτωτικοί) πυρήνες σε ομάδες κυττάρων, υπερμεγέθεις πυρήνες (καρνομεγαλία) και πυρήνες σε μίτωση ενώ η σπογγειόμορφη αρχιτεκτονική, λόγω της απόπτωσης, συνοδευόταν συχνά και από ασθενέστερη χρώση, ενώ σε κάποιες περιπτώσεις ήταν ορατά νέα (μικρότερα σε μέγεθος) κύτταρα και δέσμες νευριτών με φυσιολογική μορφολογία σε ομάδες που περιφερειακά εμφάνιζαν απώλεια της κυτταρικής αρχιτεκτονικής.

Για τις υψηλότερες δόσεις των 11,2 και 25 mg/kg bw, όπου όλα τα ορτύκια πέθαναν, ο εγκεφαλικός ιστός που παρελήφθη άμεσα μετά το θάνατο παρουσίαζε εντονότερες νεκρωτικές εστίες (Εικ.3.1-2).

Εικ. 3.1-2: Τομές κρουστού, από εγκέφαλο, ήπαρ και δωδεκαδάκτυλο ορτυκιού από το πείραμα οξείας τοξικότητας με methamidophos. Χρώση ηωσίνης / αιματοξυλίνης.

a1. Εγκέφαλος, 2,2 mg/kg bw, ημέρα 14: Παρατηρείται διαφοροποίηση της κυτταροπλασματικής χρώσης σε διάσπαρτα κύτταρα, όπως αποκάλυψε η ασθενέστερη χρώση (βέλη),

a2. Εγκέφαλος, 2,2 mg/kg bw, ημέρα 14: Παρατηρούνται καρυομεγαλία (υψηλότερο βέλος) και πυρήνες σε μίτωση (χαμηλότερο βέλος).

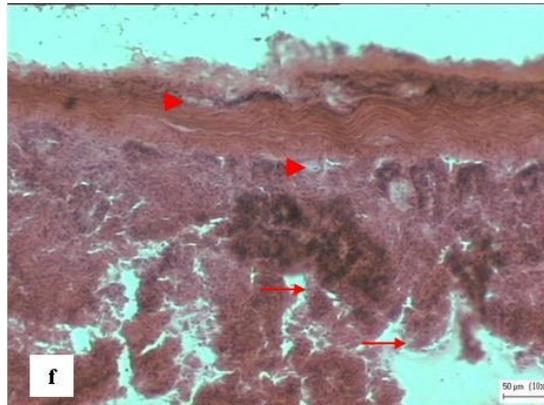
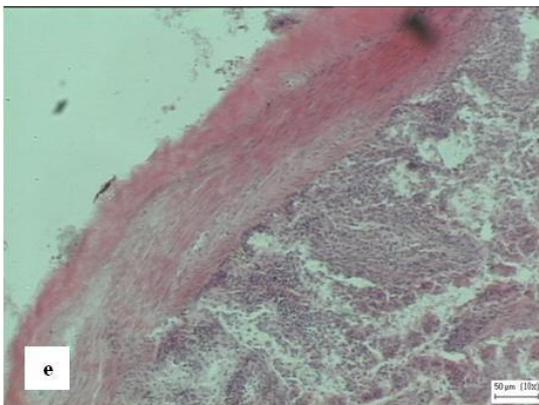
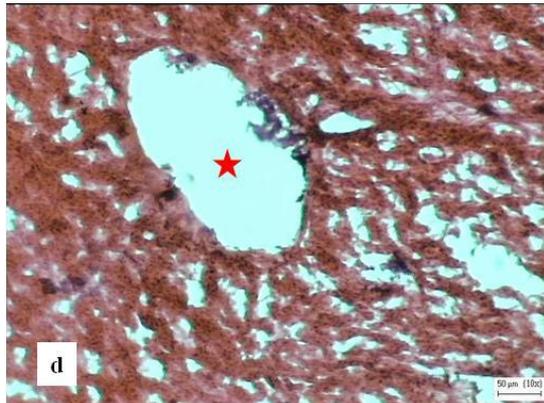
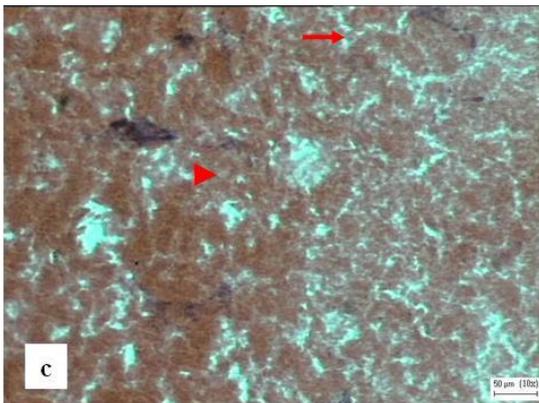
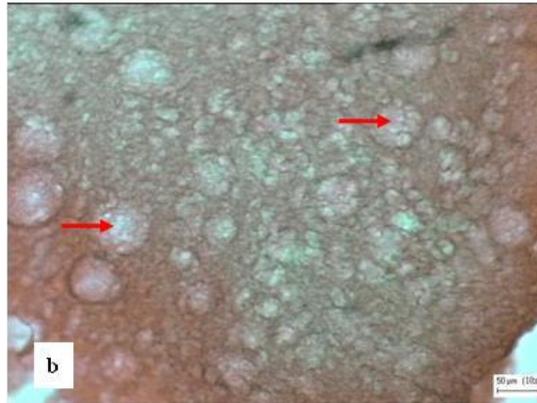
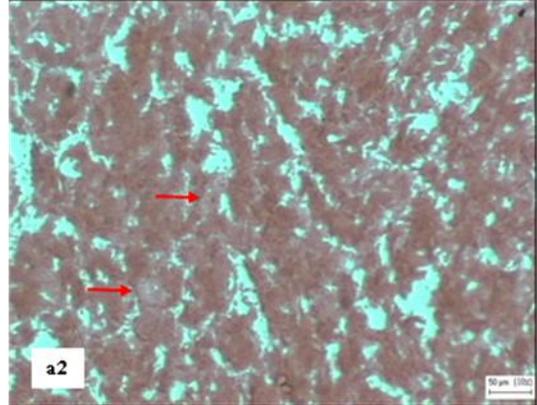
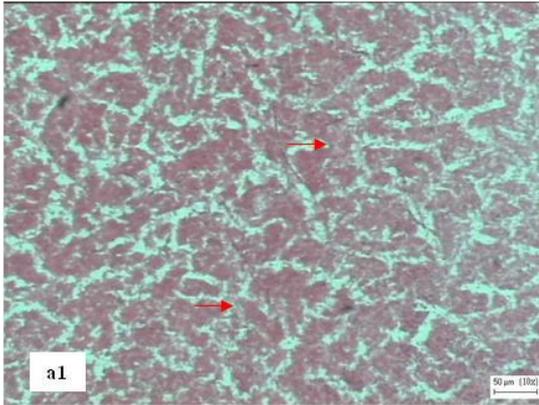
b. Εγκέφαλος, 25 mg/kg bw, ημέρα 0: Παρατηρούνται εκτεταμένα διάκενα και διαφοροποίηση της έντασης χρώσης (βέλη).

c. Ήπαρ, 2,2 mg/kg bw, ημέρα 3: Παρατηρούνται, σε μερικές περιπτώσεις, καρυομεγαλία (βέλος) και αποπτωτικά κύτταρα (κεφαλή βέλους).

d. Ήπαρ, 25mg/kg bw, ημέρα 0: Παρατηρούνται αλλοιώσεις στην ιστική αρχιτεκτονική του ηπατικού λόβιου που οφείλονται στη συρρίκνωση του ηπατικού παρεγχύματος (αστερίσκος).

e. Δωδεκαδάκτυλο, 2,2 mg/kg bw, ημέρα 1: Δεν παρατηρούνται αλλοιώσεις στην μορφολογία του τοιχώματος του δωδεκαδάκτυλου.

f. Δωδεκαδάκτυλο, 11,2 mg/kg bw, ημέρα 0: Παρατηρείται διαταραχή της ιστικής αρχιτεκτονικής με αλλοιώσεις στον βλεννογόνο, διακοπή της συνέχειας των επιθηλιακών κυττάρων (βέλη). Προσθέτως οι αλλοιώσεις στις μυεντερικές και υποβλεννογόνιες στοιβάδες ήταν ορατές, τα εντερικά γάγγλια δεν ήταν διακριτά με τη χρώση ηωσίνης / αιματοξυλίνης (κεφαλές βελών).



3.1.1.3.1.2 Ιστοχημική ανίχνευση για την AChE

Η μεταχείριση για ανίχνευση για την AChE, είχε ως αποτέλεσμα τη χρώση των ιστών από ανοικτό έως σκούρο καφέ, στο κυτταρόπλασμα και τις αποφυάδες (δενδρίτες και νευρίτες) των νευρικών κυττάρων, αλλά όχι των πυρήνων, τη χρώση δεσμών νευρικών απολήξεων και μεγαλύτερων νεύρων.

Η συνδυασμένη χρήση της ASCh με τον παρεμποδιστή iso-OMPA έδωσε κύτταρα με έντονα θετική χρώση για την AChE, με τη χρωστική να παρουσιάζει κοκκώδη υφή κυρίως στο κυτταρόπλασμα, συχνά πολύ κοντά στην κυτταροπλασματική μεμβράνη αλλά και στις κυτταρικές και πυρηνικές μεμβράνες. Στο μάρτυρα και σε όλες τις δόσεις, παρατηρήθηκαν έντονα χρωσμένα κύτταρα τόσο στο φλοιό όσο και εσωτερικά στον εγκέφαλο του ορτυκιού, αλλά η ένταση της χρώσης μειωνόταν ελαφρώς όσο αυξανόταν η δόση και ο χρόνος από την ώρα εφαρμογής του methamidophos.

Μεταξύ των δόσεων παρατηρείται ποσοτική διαφοροποίηση της χρώσης (ένταση - σχετικός πληθυσμός – επιφανειακή κατανομή). Για τις χαμηλότερες και την μεσαία δόση, ο ποσοτικός χαρακτηρισμός των χρωσμένων AChEs, νεύρων και νευρικών ινών ήταν μειωμένος (18,1 - 33,5%) σε σύγκριση με τον μάρτυρα. Ανάλογα αποτελέσματα έδωσε και η υψηλότερη δόση των 25 mg/kg bw (μείωση κατά 28,5%), ενώ η αμέσως χαμηλότερη δόση των 11,2 mg/kg bw έδωσε αποτελέσματα ανάλογα του μάρτυρα. Η μείωση οφειλόταν αποκλειστικά στην αντίστοιχη διαφοροποίηση της έντασης της χρώσης στα κύτταρα και όχι στο σχετικό πληθυσμό ή την επιφανειακή κατανομή των κυττάρων (Πίνακας 3.1-10). Αξιοσημείωτη ήταν η παρουσία λίγων νευρικών δικτύων, σε όλες τις δόσεις μέχρι την ημέρα 1, αντιθέτως όμως την ημέρα 14 όμως, για τα ζώντα ορτύκια, κυρίως για τις δόσεις των 2,2 και 5 mg/kg bw, σε ορισμένες περιπτώσεις η παρουσία νευρικών δικτύων και νευρώνων ήταν πάρα πολύ έντονη, περισσότερο και από το μάρτυρα (Εικ. 3.1-3).

Η χωροταξική κατανομή της χρώσης του ιστού, χαρακτηρίστηκε ως «Περιφερειακή/Κεντρική» τόσο για τον μάρτυρα όσο και για τις δόσεις του methamidophos, ανεξαρτήτως του χρόνου λήψης των δειγμάτων (Πίνακας 3.1-10).

Πίνακας 3.1-10: Ιστοχημική ανίχνευση για την AChE σε εγκέφαλο ιαπωνικών ορνυκιών (*Coturnix coturnix japonica*) μετά από χρώση κατά Baker et al. (1986), όπως τροποποιήθηκε από τους Karnovsky and Roots (1964). Έγινε ιστολογική αξιολόγηση με κριτήρια έντασης χρώσης, σχετικού πληθυσμού χρωσμένων κυττάρων και επιφανειακής κατανομής της χρώσης καθώς και χωροταξικής κατανομής μετά από έκθεση σε διάφορες δόσεις methamidophos (mg/kg bw). Η κάθε τιμή είναι ο ΜΟ μετρήσεων από 5-8 ορνύκια (ΜΟ ± SD). Η οξεία τοξικότητα από το στόμα ελέγχθηκε σε εργαστηριακές συνθήκες (n=10 άτομα/ομάδα επέμβασης, ομάδα μάρτυρα=8 άτομα)

Methamidophos (mg/kg bw)	Ποσοτική έκφραση της AChE (Τιμές χρώσης) ¹			Γινόμενο (=ένταση X πληθυσμού κυττ. X επιφ. κατανομή) της ποσοτικής έκφρασης της AChE (Τιμές χρώσης) ²	Χωροταξική κατανομή		
	Ένταση χρώσης (1-5)	Σχετικός πληθυσμός χρωσμένων κυττάρων (1-5)	Επιφαν. κατανομή χρώσης (1-3)		Ημέρες δειγματοληψίας		
					1	3	14
0	4,17	5,00	3,00	60,0 ± 7,5	●	●	●
1	3,64	4,46	2,75	44,8 ± 7,6 (-25,3)	●	●	●
2,2	3,64	3,88	2,69	39,9 ± 18,2 (-33,5)	●	●	●
5	3,70	4,56	2,90	49,1 ± 24,8 (-18,1)	●	●	●
11,2	4,14	5,00	2,93	60,6 ± 11,2 (1)	●	x	x
25	3,50	4,75	3,00	42,9 ± 21,7 (-28,5)	●	x	x

¹ Τα δεδομένα εκφράζονται ως ΜΟ των τομών κάθε ιστού

² Τα δεδομένα εκφράζονται ως ΜΟ των τομών κάθε ιστού ± SD. Η % διαφοροποίηση της ποσοτικής έκφρασης της χρώσης σε σύγκριση με τον μάρτυρα καταγράφεται μέσα στην παρένθεση ()

x Όλα τα άτομα είναι νεκρά

Εικ. 3.1-3: Τομές κρουοτόμου, από εγκέφαλο ορτυκιού από το πείραμα οξείας τοξικότητας με methamidophos. Ιστοχημικές χρώσεις εστερασών.

a. Ιστοχημική χρώση για την AChE, 11,2 mg/kg bw, ημέρα 1: Παρατηρείται εκτεταμένη χρώση σε όλη την επιφάνεια της τομής.

b. Ιστοχημική χρώση για την AChE, μεγέθυνση x 40. Η χρωστική στο νευρικό κύτταρο παρουσιάζει κοκκώδη υφή κυρίως στο κυτταρόπλασμα, κοντά στην κυτταροπλασματική μεμβράνη αλλά και στις κυτταρικές και πυρηνικές μεμβράνες.

c. Ιστοχημική χρώση για την AChE, 5 mg/kg bw, ημέρα 14: Παρατηρείται έντονη παρουσία νευρικών δικτύων και νευρώνων.

d. Ιστοχημική χρώση για την BuChE, μάρτυρας, ημέρα 3: Παρατηρείται χρώση στο φλοιό του εγκεφάλου.

e. Ιστοχημική χρώση για την BuChE, μεγέθυνση x 40. Η χρωστική στο νευρικό κύτταρο παρουσιάζει κοκκώδη υφή κυρίως στο κυτταρόπλασμα, κοντά στην κυτταροπλασματική μεμβράνη.

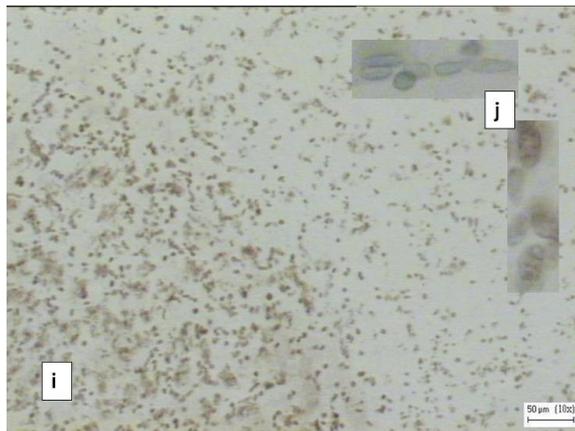
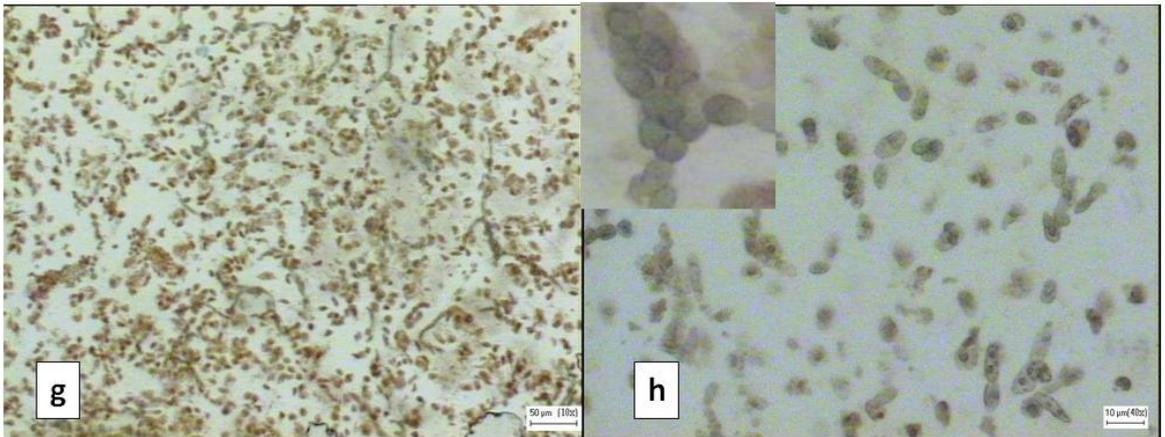
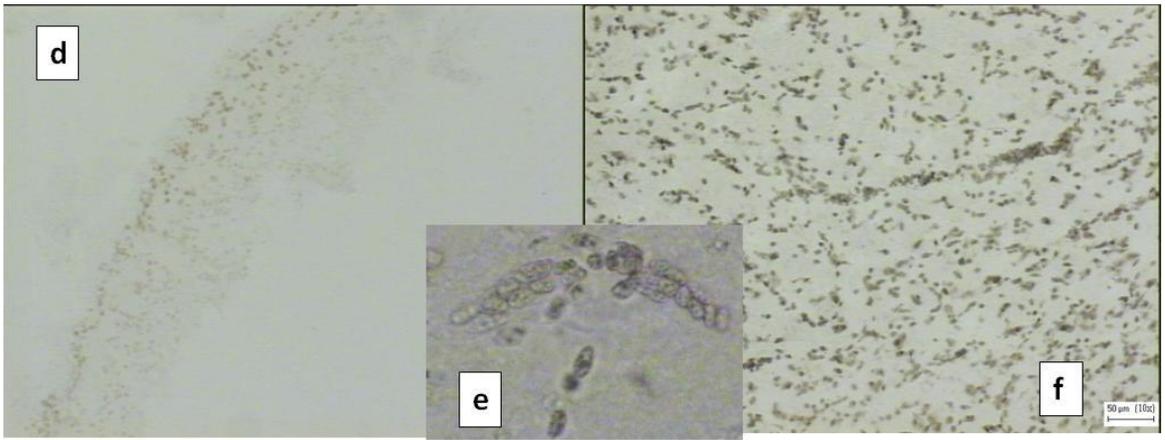
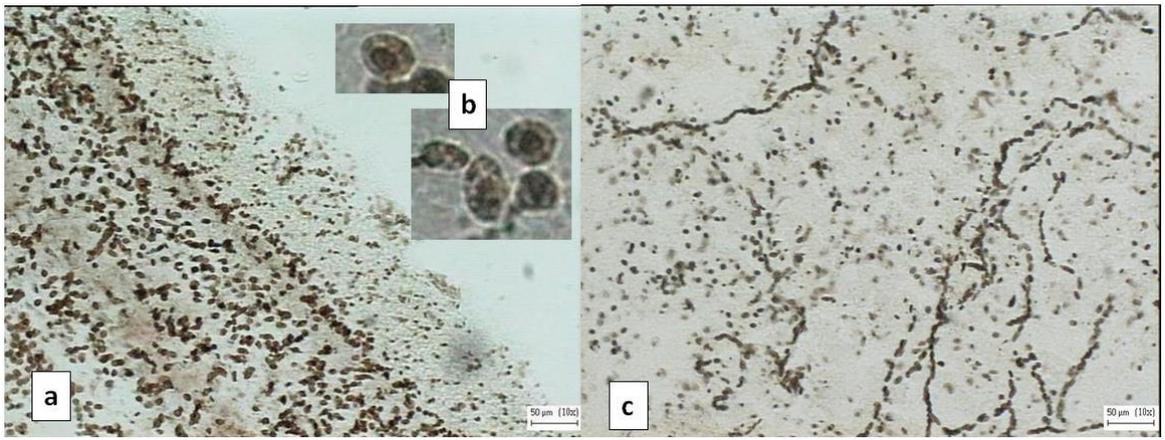
f. Ιστοχημική χρώση για την BuChE, 1 mg/kg bw, ημέρα 14: Σε αντίθεση με την **e.** παρατηρείται χρώση σε όλη την επιφάνεια της τομής.

g. Ιστοχημική χρώση για ChEs που υδρολύουν την PrSCh, 25 mg/kg bw, ημέρα 0: Παρατηρείται εκτεταμένη χρώση σε όλη την επιφάνεια της τομής.

h. Ιστοχημική χρώση για ChEs που υδρολύουν την PrSCh, μεγέθυνση x 40. Παρατηρείται χρώση στα ερυθρά αιμοσφαίρια (μικρή φωτογραφία), ενώ η χρωστική στο νευρικό κύτταρο είναι ανάλογη της BuChE.

i. Ιστοχημική χρώση για ChEs που υδρολύουν την PrSCh με παρεμποδιστές, 1 mg/kg bw, ημέρα 1: Δεν παρατηρείται διαφοροποίηση από την **h.**

j. Ιστοχημική χρώση για ChEs που υδρολύουν την PrSCh με παρεμποδιστές, μεγέθυνση x 40. Παρατηρείται χρώση στα ερυθρά αιμοσφαίρια, ενώ η χρωστική στο νευρικό κύτταρο είναι ανάλογη της BuChE.



3.1.1.3.1.3 Χρώση για την BuChE

Η χρώση για την BuChE στο κύτταρο εμφανιζόταν στον πυρήνα και στο κυτταρόπλασμα σε κοκκώδη υφή, συχνά πιο έντονη από της AChE, συσχετιζόμενη με τις κυτταροπλασματικές μεμβράνες, ενώ αντίθετα από την AChE δεν χρωματίστηκαν οι αποφυάδες (δενδρίτες και νευρίτες) των νευρικών κυττάρων, αλλά και τα νεύρα.

Στον μάρτυρα η χρώση, ήταν ορατή περιφερειακά του ιστού σε ζώνες, όπου τα κύτταρα παρουσιάζουν μικρής ή μέτριας έντασης, κυρίως πυρηνική χρώση. Η συνολική ποσοτική έκφραση της χρώσης ήταν χαμηλή και υπολογίστηκε στο 8% της αντίστοιχης για την AChE. Για τις χαμηλότερες και τη μεσαία δόση, η χρώση για την BuChE δεν είχε διακριτή διαφορά από τον μάρτυρα, ανεξαρτήτως ημέρας δειγματοληψίας, αντίθετα όμως για τις υψηλότερες δόσεις methamidophos παρατηρήθηκε σημαντικά μειωμένη χρώση ως και ανύπαρκτη παρουσία θετικών κυττάρων σε σύγκριση με τον μάρτυρα. Δεν πραγματοποιήθηκε ανάλυση λόγω των πολύ χαμηλών τιμών έκφρασης της χρώσης και τις σχετικά, για αυτές τις τιμές, μεγάλες τιμές τυπικής απόκλισης (\pm SD) (Πίνακας 3.1-11) (Εικ. 3.1-3).

Η χωροταξική κατανομή της χρώσης του ιστού, για τον μάρτυρα χαρακτηρίστηκε ως «Στενή περιφερειακή» ανεξαρτήτως χρόνου δειγματοληψίας. Η χρώση λοιπόν για την BuChE εκφράζεται στον φλοιό του εγκεφάλου του ορτυκιού. Για τις χαμηλότερες δόσεις του methamidophos, η χωροταξική κατανομή της χρώσης του ιστού την ημέρα 1 χαρακτηρίστηκε ως «Στενή περιφερειακή» ενώ επεκτείνεται για τις ημέρες 3, 14 ως «Περιφερειακή» ή «Περιφερειακή/Κεντρική» και «Τοπικά» χρώση. Για τη μεσαία δόση, χωροταξική κατανομή της χρώσης του ιστού διαφοροποιείται από την ημέρα 1 και χαρακτηρίστηκε ως «Περιφερειακή» και «Τοπικά», για την ημέρα 3 ως «Περιφερειακή/Κεντρική», και για την ημέρα 14 ως «Τοπικά» χρώση. Για τις υψηλότερες δόσεις, η χωροταξική κατανομή της χρώσης του ιστού χαρακτηρίστηκε με «Τοπικά» χρώση για την ημέρα 0/1 (Πίνακας 3.1-11).

Πίνακας 3.1-11: Ιστοχημική ανίχνευση για την BuChE σε εγκέφαλο ιαπωνικών ορτυκίων (*Coturnix coturnix japonica*) μετά από χρώση κατά Baker et al. (1986), όπως τροποποιήθηκε από τους Karnovsky and Roots (1964). Έγινε ιστολογική αξιολόγηση με κριτήρια έντασης χρώσης, σχετικού πληθυσμού χρωσμένων κυττάρων και επιφανειακής κατανομής της χρώσης καθώς και χωροταξικής κατανομής μετά από έκθεση σε διάφορες δόσεις methamidophos (mg/kg bw). Η κάθε τιμή είναι ο MO μετρήσεων από 6-8 ορτύκια (MO \pm SD). Η οξεία τοξικότητα από το στόμα ελέγχθηκε σε εργαστηριακές συνθήκες (n=10 άτομα/ομάδα επέμβασης, ομάδα μάρτυρα=8 άτομα)

Methamidophos (mg/kg bw)	Ποσοτική έκφραση της BuChE (Τιμές χρώσης) ¹			Γινόμενο (=ένταση X πληθυσμού κυττ. X επιφ. κατανομή) της ποσοτικής έκφρασης της BuChE (Τιμές χρώσης) ²	Χωροταξική κατανομή				
	Ένταση χρώσης (1-5)	Σχετικός πληθυσμός χρωσμένων κυττάρων (1-5)	Επιφαν. κατανομή χρώσης (1-3)		Ημέρες δειγματοληψίας				
					1	3	14		
0	1,60	3,00	1,05	5,2	\pm 2,6		○	○	○
1	1,55	2,75	1,33	5,9	\pm 4,1	()	○	●	●
2,2	1,97	2,17	0,86	4,8	\pm 7,7	()	○	●	●
5	1,69	1,71	1,08	4,0	\pm 4,2	()	Top ○	●	Top ●
11,2	0,44	1,50	0,46	1,3	\pm 2,4	()	Top ○	x	x
25	0,50	1,38	0,60	1,3	\pm 1,7	()	Top ○	x	x

¹ Τα δεδομένα εκφράζονται ως MO των τομών κάθε ιστού

² Τα δεδομένα εκφράζονται ως MO των τομών κάθε ιστού \pm SD

x Όλα τα άτομα είναι νεκρά

3.1.1.3.1.4 Χρώση ChEs που υδρολύουν την PrSCh

Η χρώση για ChEs που υδρολύουν την PrSCh δεν περιοριζόταν μόνο στα νευρικά κύτταρα όπως με την ASCh και BuSCh αλλά επιπρόσθετα, και στα ερυθρά αιμοσφαίρια και σε τμήματα των τοιχωμάτων των αιμοφόρων αγγείων ενώ ήταν ανάλογη της BuChE αλλά όχι τόσο κοκκώδης. Ειδικότερα στα ερυθρά αιμοσφαίρια εμφανίζονταν στο κυτταρόπλασμα και στην κυτταρική μεμβράνη.

Η συνολική ποσοτική έκφραση της χρώσης στον μάρτυρα, υπολογίστηκε στο 77% της αντίστοιχης για την AChE. Δεν παρατηρήθηκε ουσιαστική διαφοροποίηση της χρώσης (ένταση - σχετικός πληθυσμός - επιφανειακή κατανομή) στις τομές του εγκεφάλου, ανεξαρτήτως της δόσης και ημέρας δειγματοληψίας. Στις επεμβάσεις του methamidophos, όπως και στο μάρτυρα, παρατηρήθηκαν έντονα χρωσμένα κύτταρα τόσο στο φλοιό όσο και εσωτερικά στον εγκέφαλο του ορτυκιού αλλά η ένταση της χρώσης αυξανόταν ελαφρώς όσο αυξανόταν η δόση και ο χρόνος από την ώρα εφαρμογής της επέμβασης. Για όλες τις δόσεις ο ποσοτικός χαρακτηρισμός της χρώσης ήταν αυξημένος, από 8,6-20,7% σε σύγκριση με τον μάρτυρα και οφείλεται αποκλειστικά στην αντίστοιχη διαφοροποίηση της έντασης της χρώσης και όχι στο σχετικό πληθυσμό ή την επιφανειακή κατανομή των κυττάρων (Πίνακας 3.1-12) (Εικ.

3.1-3).

Για τις τομές στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν επιπροσθέτως και οι δύο παρεμποδιστές των AChE και BuChE (BW284C51 και iso-OMPA), τα αποτελέσματα παρέμειναν βασικά τα ίδια, αλλά με λιγότερη, μη ειδική, χρώση του υποστρώματος και λιγότερα ερυθρά αιμοσφαίρια (Εικ. 3.1-3).

Η χωροταξική κατανομή της χρώσης του ιστού, χαρακτηρίστηκε ως «Περιφερειακή/Κεντρική» τόσο για τον μάρτυρα όσο και για τις επεμβάσεις του methamidophos, ανεξαρτήτως χρόνου δειγματοληψίας (Πίνακας 3.1-12).

Πίνακας 3.1-12: Ιστοχημική ανίχνευση για ChEs που υδρολύουν την PrSCh σε εγκέφαλο ιαπωνικών ορνυκίων (*Coturnix coturnix japonica*) μετά από χρώση κατά Baker et al. (1986), όπως τροποποιήθηκε από τους Karnovsky and Roots (1964). Έγινε ιστολογική αξιολόγηση με κριτήρια έντασης χρώσης, σχετικού πληθυσμού χρωσμένων κυττάρων και επιφανειακής κατανομής της χρώσης καθώς και χωροταξικής κατανομής μετά από έκθεση σε διάφορες δόσεις methamidophos (mg/kg bw). Η κάθε τιμή είναι ο MO μετρήσεων από 6-9 ορνύκια (MO \pm SD). Η οξεία τοξικότητα από το στόμα ελέγχθηκε σε εργαστηριακές συνθήκες (n=10 άτομα/ομάδα επέμβασης, ομάδα μάρτυρα=8 άτομα)

Methamidophos (mg/kg bw)	Ποσοτική έκφραση ChE που υδρολύουν την PrSCh (Τιμές χρώσης) ¹			Γινόμενο (=ένταση X πληθυσμού κυττ. X επιφ. κατανομή) της ποσοτικής έκφρασης ChE που υδρολύουν την PrSCh (Τιμές χρώσης) ²	Χωροταξική κατανομή		
	Ένταση χρώσης (1-5)	Σχετικός πληθυσμός χρωσμένων κυττάρων (1-5)	Επιφαν. κατανομή χρώσης (1-3)		Ημέρες δειγματοληψίας		
					1	3	14
0	3,50	4,50	2,92	46,2 \pm 11,6	●	●	●
1	4,03	4,61	2,93	55,8 \pm 16,5 (20,7)	●	●	●
2,2	3,86	4,36	2,96	50,2 \pm 12,7 (8,6)	●	●	●
5	4,17	4,61	2,93	54,9 \pm 9,5 (18,9)	●	●	●
11,2	4,04	4,60	2,96	55,4 \pm 10,7 (19,8)	●	x	x
25	4,43	4,53	3,00	55,3 \pm 8,9 (19,7)	●	x	x

¹ Τα δεδομένα εκφράζονται ως MO των τομών κάθε ιστού

² Τα δεδομένα εκφράζονται ως MO των τομών κάθε ιστού \pm SD. Η % διαφοροποίηση της ποσοτικής έκφρασης της χρώσης σε σύγκριση με τον μάρτυρα καταγράφεται μέσα στην παρένθεση ()
x Όλα τα άτομα είναι νεκρά

3.1.1.3.2 Δωδεκαδάκτυλο

3.1.1.3.2.1 Χρώση Ηωσίνης – Αιματοζυλίνης

Η επίδραση του methamidophos στο δωδεκαδάκτυλο του ιαπωνικού ορτυκιού διέφερε μεταξύ του μάρτυρα και των επεμβάσεων με methamidophos για την περίοδο των 14 d, υποδεικνύοντας διαταραχή της ιστικής αρχιτεκτονικής αναλόγως της δόσης και του χρόνου.

Στις χαμηλότερες δόσεις δεν παρατηρήθηκαν σοβαρές αλλοιώσεις στην μορφολογία του τοιχώματος του δωδεκαδάκτυλου, σε σύγκριση με το μάρτυρα, με εξαίρεση κάποιες αλλοιώσεις στα επιθηλιακά κύτταρα του βλεννογόνου.

Οι αλλοιώσεις στα επιθηλιακά κύτταρα έγιναν εντονότερες στη μεσαία δόση (5 mg/kg bw), και περιελάμβαναν κυρίως διακοπή της συνέχειας του βλεννογόνου. Στις υψηλότερες δόσεις εφαρμογής, η επίδραση του methamidophos στην κυτταρική αρχιτεκτονική ήταν έντονη αφού παρατηρήθηκαν αποπτωτικά επιθηλιακά κύτταρα στο βλεννογόνο, παρουσιάζοντας σημαντικές εστίες όπου η βασική μεμβράνη καλυπτόταν όχι από φυσιολογικά κύτταρα αλλά από κυτταρικά υπολείμματα νεκρών κυττάρων. Συχνά ο βλεννογόνος δεν αποτελούσε φυσική συνέχεια του εντερικού τοιχώματος, είχε αποκολληθεί ενώ ο υποκείμενος μυϊκός χιτώνας παρουσίαζε συρρίκνωση. Παρατηρήθηκαν επίσης πυκνωτικοί πυρήνες στα εντερικά γάγγλια (Εικ. 3.1-2).

3.1.1.3.2.2 Ιστοχημική ανίχνευση για την AChE

Η χρώση για την AChE παρατηρήθηκε στο κυτταρόπλασμα των εντερικών νευρικών κυττάρων, όχι όμως και στον πυρήνα, αλλά και τις νευρικές απολήξεις στα εντερικά πλέγματα. Η χρώση στο κύτταρο εμφανιζόταν σε έντονα κοκκώδη μορφή στο κυτταρόπλασμα συσχετιζόμενη με τις κυτταροπλασματικές μεμβράνες κυρίως στα γάγγλια (μυεντερικό και υποβλεννογόνιο πλέγμα) και στις λάχνες του εντερικού πλέγματος. Η συνολική έκφραση της χρώσης ήταν πολύ χαμηλή και υπολογίστηκε στο 2,5-3,1% της αντίστοιχης που υπολογίστηκε για την BuChE και την ChE που υδρολύει την PrSCh, όπως παρουσιάζεται κατωτέρω.

Η χρώση για τις χαμηλότερες και τη μεσαία δόση είχε χαμηλότερη έκφραση για AChE σε σχέση με τον μάρτυρα, ανεξαρτήτως της δόσης και ημέρας δειγματοληψίας ενώ σε πολλές τομές μόλις που παρατηρήθηκε ή δεν παρατηρήθηκε καθόλου χρώση. Για τις υψηλότερες δόσεις η χρώση κατέδειξε ανάλογα αποτελέσματα με τον μάρτυρα. Δεν πραγματοποιήθηκε ανάλυση λόγω των πολύ χαμηλών τιμών έκφρασης της χρώσης (Πίνακας 3.1-13) (Εικ. 3.1-4).

Πίνακας 3.1-13: Ιστοχημική ανίχνευση AChE σε δωδεκαδάκτυλο ιαπωνικών ορτυκιών (*Coturnix coturnix japonica*) μετά από χρώση κατά Baker et al. (1986), όπως τροποποιήθηκε από τους Karnovsky and Roots (1964). Έγινε ιστολογική αξιολόγηση με κριτήρια έντασης χρώσης, σχετικού πληθυσμού χρωσμένων κυττάρων και επιφανειακής κατανομής της χρώσης καθώς και χωροταξικής κατανομής μετά από έκθεση σε διάφορες δόσεις methamidophos (mg/kg bw). Η κάθε τιμή είναι ο MO μετρήσεων από 5-7 ορτύκια (MO \pm SD). Η οξεία τοξικότητα από το στόμα ελέγχθηκε σε εργαστηριακές συνθήκες (n=10 άτομα/κλωβό, μάρτυρας=8 άτομα/κλωβό)

Methamidophos (mg/kg bw)	Ποσοτική έκφραση της AChE (Τιμές χρώσης) ¹			Γινόμενο (=ένταση X πληθυσμού κυττ. X επιφ. κατανομή) της ποσοτικής έκφρασης της AChE (Τιμές χρώσης) ²	Χωροταξική κατανομή Ημέρες δειγματοληψίας		
	Ένταση χρώσης (1-5)	Σχετικός πληθυσμός χρωσμένων κυττάρων (1-5)	Επιφαν. κατανομή χρώσης (1-3)		1	3	14
0	1,33	2,00	0,40	1,5 \pm 2,2			
1	2,00	0,85	0,03	0,05 \pm 0,05 ()			
2,2	0,67	0,67	0,04	0,3 \pm 0,7 ()			∅
5	1,58	0,62	0,39	0,4 \pm 0,8 ()			
11,2	1,17	1,00	0,62	1,2 \pm 1,9 ()			
25	1,14	1,00	1,43	2,9 \pm 2,4 ()			

¹ Τα δεδομένα εκφράζονται ως MO των τομών κάθε ιστού

² Τα δεδομένα εκφράζονται ως MO των τομών κάθε ιστού \pm SD

x Όλα τα άτομα είναι νεκρά

∅ Δεν υπάρχει χωροταξική κατανομή, οι τομές λήφθησαν από το μέσον του ιστού.

Εικ. 3.1-4: Τομές κρουτόμου, από δωδεκαδάκτυλο ορτυκιού από το πείραμα οξείας τοξικότητας με methamidophos. Ιστοχημικές χρώσεις εστερασών.

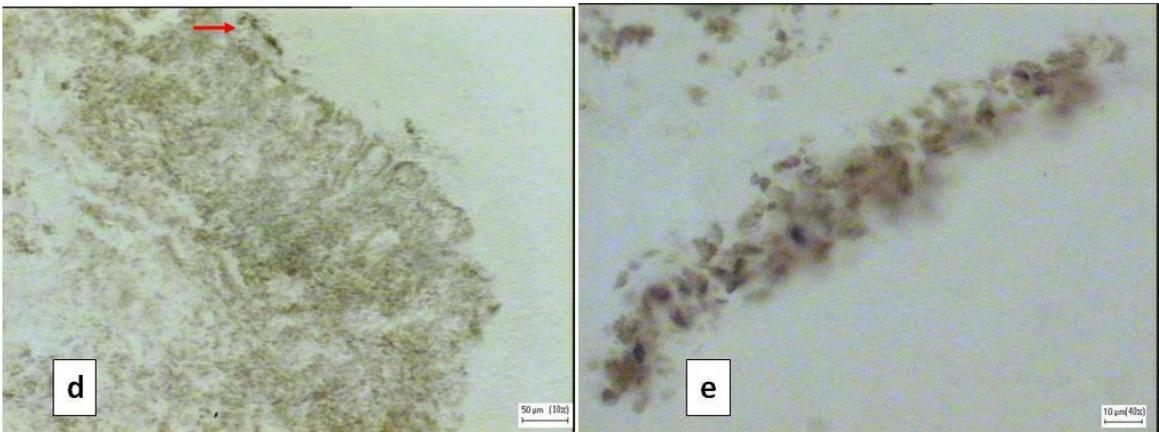
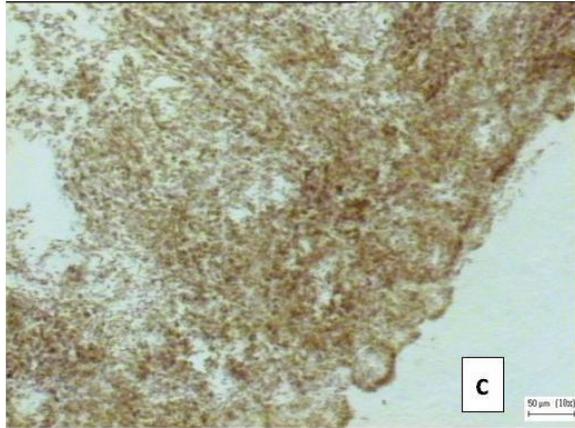
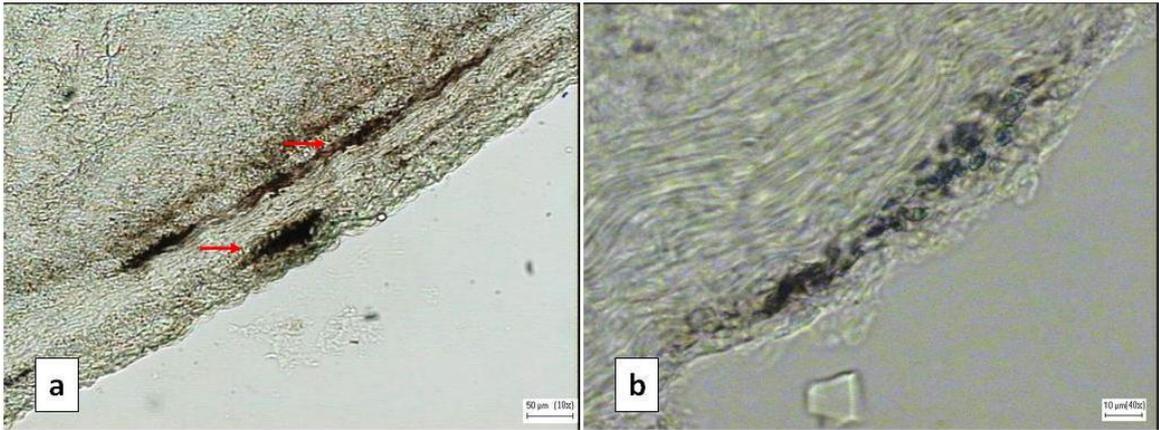
a. Ιστοχημική χρώση για την AChE, 11,2 mg/kg bw, ημέρα 0: Παρατηρείται χρώση στα μυεντερικά (βέλος) και υποβλεννογόνια (κεφαλή βέλους) γάγγλια, ανάλογης του μάρτυρα.

b. Ιστοχημική χρώση για την AChE, μεγέθυνση x 40. Μυεντερικό γάγγλιο.

c. Ιστοχημική χρώση για την BuChE, 2,2 mg/kg bw, ημέρα 3: Παρατηρείται χρώση παντού εκτός από τα γάγγλια, τα νεύρα και τους μυϊκούς χιτώνες του εντερικού πλέγματος.

d. Ιστοχημική χρώση για ChEs που υδρολύουν την PrSCh, 2,2 mg/kg bw, ημέρα 3: Παρατηρείται χρώση παντού ανάλογη της BuChE αλλά σε αντίθεση με αυτή και κυττάρων γαγγλίων (βέλος).

e. Ιστοχημική χρώση για ChEs που υδρολύουν την PrSCh, μεγέθυνση x 40. Υποβλεννογόνιο γάγγλιο.



3.1.1.3.2.3 Χρώση για την BuChE

Στην χρώση για την BuChE διακρίνονταν πολλά θετικά κύτταρα τα οποία ήταν ορατά παντού, σχηματίζοντας χαρακτηριστικές καστανές ζώνες (π.χ. αγγεία αίματος, επιθηλιακά κύτταρα, συνδετικός ιστός, αδένες) εκτός από τα γάγγλια, τα νεύρα και τους μυϊκούς χιτώνες του εντερικού πλέγματος. Η χρώση στο κύτταρο ήταν κοκκώδης και εμφανιζόταν στο κυτταρόπλασμα και τις κυτταρικές μεμβράνες (Εικ. 3.1-4).

Η χρώση για την BuChE στις χαμηλότερες δόσεις είχε ανάλογη έκφραση σε σχέση με τον μάρτυρα, κατά ΜΟ ανεξαρτήτως ημέρας δειγματοληψίας και δόσης ενώ μόνο για την χαμηλότερη δόση των 1 mg/kg bw την 3^η ημέρα η ποσοτική εκτίμηση της χρώσης μειώθηκε, ενώ στα δείγματα που λήφθηκαν την ημέρα 14, η ποσοτική εκτίμηση της χρώσης είχε φτάσει αντιθέτως στο ανώτατο όριο μέτρησης. Η μείωση της χρώσης αρχικά και η αύξηση αργότερα οφείλεται αποκλειστικά στον αντίστοιχο σχετικό πληθυσμό των χρωσμένων κυττάρων. Για τη μεσαία και την αμέσως υψηλότερη δόση (5 και 11,2 mg/kg bw), η χρώση είχε μειωμένη έκφραση κατά 24,3 και 53,5%, αντίστοιχα, σε σύγκριση με τον μάρτυρα ενώ ειδικότερα στην δόση των 5 mg/kg bw, υπήρχε η τάση να αυξάνει ελαφρά την 3^η ημέρα και να ατονεί ελαφρά πάλι κατά το τέλος. Για την υψηλότερη δόση των 25 mg/kg bw, η ποσοτική εκτίμηση της χρώσης είναι μειωμένη κατά 76,8% (Πίνακας 3.1-14).

Πίνακας 3.1-14: Ιστοχημική ανίχνευση BuChE σε δωδεκαδάκτυλο ιαπωνικών ορτυκιών (*Coturnix coturnix japonica*) μετά από χρώση κατά Baker et al. (1986), όπως τροποποιήθηκε από τους Karnovsky and Roots (1964). Έγινε ιστολογική αξιολόγηση με κριτήρια έντασης χρώσης, σχετικού πληθυσμού χρωσμένων κυττάρων και επιφανειακής κατανομής της χρώσης καθώς και χωροταξικής κατανομής μετά από έκθεση σε διάφορες δόσεις methamidophos (mg/kg bw). Η κάθε τιμή είναι ο ΜΟ μετρήσεων από 5-8 ορτύκια (ΜΟ ± SD). Η οξεία τοξικότητα από το στόμα ελέγχθηκε σε εργαστηριακές συνθήκες (n=10 άτομα/ομάδα επέμβασης, ομάδα μάρτυρα=8 άτομα)

Methamidophos (mg/kg bw)	Ποσοτική έκφραση της BuChE (Τιμές χρώσης) ¹			Γινόμενο (=ένταση X πληθυσμού κυττ. X επιφ. κατανομή) της ποσοτικής έκφρασης της BuChE (Τιμές χρώσης) ²	Χωροταξική κατανομή		
	Ένταση χρώσης (1-5)	Σχετικός πληθυσμός χρωσμένων κυττάρων (1-5)	Επιφαν. κατανομή χρώσης (1-3)		Ημέρες δειγματοληψίας		
					1	3	14
0	3,88	4,38	2,88	48,0 ± 6,36			
1	4,17	3,75	3,00	49,5 ± 28,3 (3,1)			
2,2	4,14	4,29	2,43	46,6 ± 17,6 (-2,9)			∅
5	3,28	3,75	2,46	36,4 ± 25,8 (-24,3)			
11,2	2,30	3,30	2,44	22,3 ± 20,1 (-53,5)			
25	1,83	2,14	1,83	11,1 ± 10,7 (-76,8)			

¹ Τα δεδομένα εκφράζονται ως ΜΟ των τομών κάθε ιστού

² Τα δεδομένα εκφράζονται ως ΜΟ των τομών κάθε ιστού ± SD. Η % διαφοροποίηση της ποσοτικής έκφρασης της χρώσης σε σύγκριση με τον μάρτυρα καταγράφεται μέσα στην παρένθεση ()

x Όλα τα άτομα είναι νεκρά

∅ Δεν υπάρχει χωροταξική κατανομή, οι τομές λήφθηκαν από το μέσον του ιστού.

3.1.1.3.2.4 Χρώση ChEs που υδρολύουν την PrSCh

Στη χρώση για ChEs που υδρολύουν την PrSCh διακρίνονταν πολλά θετικά κύτταρα τα οποία ήταν ορατά παντού, ανάλογα με της BuChE, συμπεριλαμβανομένων όμως των γάγγλιων και των νεύρων, εκτός από τους μυϊκούς χιτώνες του εντερικού πλέγματος. Η χρώση στο κύτταρο ήταν πιο κοκκώδη από της BuChE, στο κυτταρόπλασμα και τις κυτταρικές μεμβράνες ενώ διατάσσονταν σειρά, χωρίς απαραίτητα τα θετικώς χρωσμένα κύτταρα να βρίσκονται σε επαφή. Η συνολική έκφραση της χρώσης με αυτό το υπόστρωμα, είναι η υψηλότερη για τον δωδεκαδάκτυλο και υπολογίστηκε στο 119,7% της αντίστοιχης που υπολογίστηκε για την BuChE (Εικ. 3.1-5).

Η χρώση για ChE που υδρολύουν την PrSCh στις χαμηλότερες δόσεις του methamidophos είχε ανάλογη έκφραση σε σχέση με τον μάρτυρα, κατά ΜΟ, ανεξαρτήτως της δόσης και ημέρας δειγματοληψίας. Για τη μεσαία και τις υψηλότερες δόσεις, την ημέρα 1, η χρώση έχει μειωμένη έκφραση σε σύγκριση με τον μάρτυρα, κατά 29,8, 55,2 και 79,1 %, αντίστοιχα (Πίνακας 3.1-15). Στην δόση των 5 mg/kg bw, την ημέρα 3 και 14, η έκφραση της χρώσης είχε φτάσει στα ίδια επίπεδα με του μάρτυρα.

Για τις τομές στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν και οι δύο παρεμποδιστές (BW284C51 και iso-OMPA), ως θετικός μάρτυρας της ιστοχημείας της PrSCh, δεν παρατηρήθηκε καθόλου χρώση.

Πίνακας 3.1-15: Ιστοχημική ανίχνευση ChE που υδρολύουν την PrSCh σε δωδεκαδάκτυλο ιαπωνικών ορτυκιών (*Coturnix coturnix japonica*) μετά από χρώση κατά Baker et al. (1986), όπως τροποποιήθηκε από τους Karnovsky and Roots (1964). Έγινε ιστολογική αξιολόγηση με κριτήρια έντασης χρώσης, σχετικού πληθυσμού χρωσμένων κυττάρων και επιφανειακής κατανομής της χρώσης καθώς και χωροταξικής κατανομής μετά από έκθεση σε διάφορες δόσεις methamidophos (mg/kg bw). Η κάθε τιμή είναι ο MO μετρήσεων από 5-7 ορτύκια (MO \pm SD). Η οξεία τοξικότητα από το στόμα ελέγχθηκε σε εργαστηριακές συνθήκες (n=10 άτομα/ομάδα επέμβασης, ομάδα μάρτυρα=8 άτομα)

Methamidophos (mg/kg bw)	Ποσοτική έκφραση ChE που υδρολύουν την PrSCh (Τιμές χρώσης) ¹			Γινόμενο (=ένταση X πληθυσμού κυττ. X επιφ. κατανομή) της ποσοτικής έκφρασης ChE που υδρολύουν την PrSCh (Τιμές χρώσης) ²	Χωροταξική κατανομή		
	Ένταση χρώσης (1-5)	Σχετικός πληθυσμός χρωσμένων κυττάρων (1-5)	Επιφαν. κατανομή χρώσης (1-3)		Ημέρες δειγματοληψίας		
					1	3	14
0	4,00	4,80	3,00	57,5 \pm 8,4			
1	4,20	4,30	3,00	54,5 \pm 15,1 (-5,2)			
2,2	4,41	4,62	3,00	61,9 \pm 8,1 (7,8)			∅
5	3,20	4,04	3,00	40,3 \pm 19,9 (-29,8)			
11,2	2,36	3,90	2,70	25,7 \pm 12,9 (-55,2)			
25	1,71	2,07	2,32	12,0 \pm 9,1 (-79,1)			

¹ Τα δεδομένα εκφράζονται ως MO των τομών κάθε ιστού

² Τα δεδομένα εκφράζονται ως MO των τομών κάθε ιστού \pm SD. Η % διαφοροποίηση της ποσοτικής έκφρασης της χρώσης σε σύγκριση με τον μάρτυρα καταγράφεται μέσα στην παρένθεση ()

x Όλα τα άτομα είναι νεκρά

∅ Δεν υπάρχει χωροταξική κατανομή, οι τομές λήφθηκαν από το μέσον του ιστού.

3.1.1.3.3 Ήπαρ

3.1.1.3.3.1 Χρώση Ηωσίνης – Αιματοζυλίνης

Η επίδραση του methamidophos στο ήπαρ του ιαπωνικού ορτυκιού διέφερε μεταξύ του μάρτυρα και των επεμβάσεων για την περίοδο των 14 d, υποδεικνύοντας διαταραχή της ιστικής αρχιτεκτονικής αναλόγως της δόσης και του χρόνου.

Στις χαμηλότερες δόσεις εφαρμογής, παρατηρήθηκαν σε σχέση με τον μάρτυρα, περιορισμένες αλλοιώσεις στα ηπατικά λόβια που συνίστανται από ζώνες μεταχρωμασίας, καρνομεγαλία περιορισμένης έκτασης και σε μερικές περιπτώσεις αποπτωτικά κύτταρα, χωρίς να απουσιάζουν και περιπτώσεις αναγέννησης του ιστού ως εστίες μιτώσεων ή παρουσίας ζευγών θυγατρικών κυττάρων (Εικ. 3.1-2).

Στη μεσαία δόση (5 mg/kg bw) παρατηρήθηκαν εντονότερες αλλοιώσεις στα ηπατικά λόβια σε σχέση με τις χαμηλότερες δόσεις όπως σπογγειόμορφες αλλοιώσεις, που δεν αποδίδονται στο αγγειακό σύστημα, σε συνδυασμό με κύτταρα που φέρουν υπερμεγέθεις ή αποπτωτικούς πυρήνες αλλά και κύτταρα με διαφοροποιημένη χρώση εντός του κυτταροπλάσματος και ενδείξεις αποσύνθεσης (κυτταροπλασματική συρρίκνωση). Σε αντίθεση με τις χαμηλότερες δόσεις η αναγέννηση του ηπατικού παρεγχύματος δεν ήταν συστηματική, ενώ σε μερικές περιπτώσεις παρατηρήθηκε εστιακά αλλοίωση της κυτταρικής αρχιτεκτονικής με τη μορφή της αύξησης των αιμοφόρων και χοληφόρων αγγείων.

Στις υψηλότερες δόσεις methamidophos η μορφολογία του ηπατικού παρεγχύματος δεν διέφερε από της μεσαίας δόσης παρά μόνο στο ότι ήταν πιο εκτεταμένη η συρρίκνωση του κυτταροπλάσματος των ηπατικών κυττάρων που δεν ήταν πάντοτε αποπτωτικά που οφείλεται στη συρρίκνωση του ηπατικού παρεγχύματος (Εικ. 3.1-2).

3.1.1.3.3.2 Ιστοχημική ανίχνευση για την AChE

Η χρώση για την AChE παρατηρήθηκε σε ελάχιστες περιπτώσεις σε όλες τις μεταχειρίσεις σε κοκκώδη μορφή συσχετιζόμενη με τις κυτταρικές μεμβράνες των ηπατικών κυττάρων. Δεν πραγματοποιήθηκε περαιτέρω ανάλυση αφού η συνολική ποσοτική έκφραση της χρώσης ήταν πάρα πολύ χαμηλή και στις περισσότερες περιπτώσεις μηδενική (Πίνακας 3.1-16) (Εικ. 3.1-5).

Η χωροταξική κατανομή της χρώσης του ιστού, χαρακτηρίστηκε ως «Περιφερειακή/Κεντρική» στις λίγες περιπτώσεις που υπήρξε καταγραφή εκτός από την δόση του 1 mg/kg bw που χαρακτηρίστηκε ως «Κεντρική» χρώση (Πίνακας 3.1-16).

Πίνακας 3.1-16: Ιστοχημική ανίχνευση για την AChE σε ήπαρ ιαπωνικών ορνυκίων (*Coturnix coturnix japonica*) μετά από χρώση κατά Baker et al. (1986), όπως τροποποιήθηκε από τους Karnovsky and Roots (1964). Έγινε ιστολογική αξιολόγηση με κριτήρια έντασης χρώσης, σχετικού πληθυσμού χρωσμένων κυττάρων και επιφανειακής κατανομής της χρώσης καθώς και χωροταξικής κατανομής μετά από έκθεση σε διάφορες δόσεις methamidophos (mg/kg bw). Η οξεία τοξικότητα από το στόμα ελέγχθηκε σε εργαστηριακές συνθήκες (n=10 άτομα/ομάδα επέμβασης, ομάδα μάρτυρα=8 άτομα)

Methamidophos (mg/kg bw)	Ποσοτική έκφραση της AChE (Τιμές χρώσης) ¹			Γινόμενο (=ένταση X πληθυσμού κυττ. X επιφ. κατανομή) της ποσοτικής έκφρασης της AChE (Τιμές χρώσης) ²	Χωροταξική κατανομή		
	Ένταση χρώσης (1-5)	Σχετικός πληθυσμός χρωσμένων κυττάρων (1-5)	Επιφαν. κατανομή χρώσης (1-3)		Ημέρες δειγματοληψίας		
					1	3	14
0						●	
1						○	
2,2					●		
5					●		
11,2					●	x	
25					●	x	

¹ Τα δεδομένα εκφράζονται ως MO των τομών κάθε ιστού

² Τα δεδομένα εκφράζονται ως MO των τομών κάθε ιστού ± SD. Η % διαφοροποίηση της ποσοτικής έκφρασης της χρώσης σε σύγκριση με τον μάρτυρα καταγράφεται μέσα στην παρένθεση ()

x Όλα τα άτομα είναι νεκρά

Εικ. 3.1-5: Τομές κρυοτόμου, από ήπαρ ορτυκιού από το πείραμα οξείας τοξικότητας με methamidophos. Ιστοχημικές χρώσεις εστερασών.

a. Ιστοχημική χρώση για την AChE, 1 mg/kg bw, ημέρα 14: Παρατηρούνται θετικά ως προς την AChE κύτταρα διάσπαρτα στην επιφάνεια της τομής.

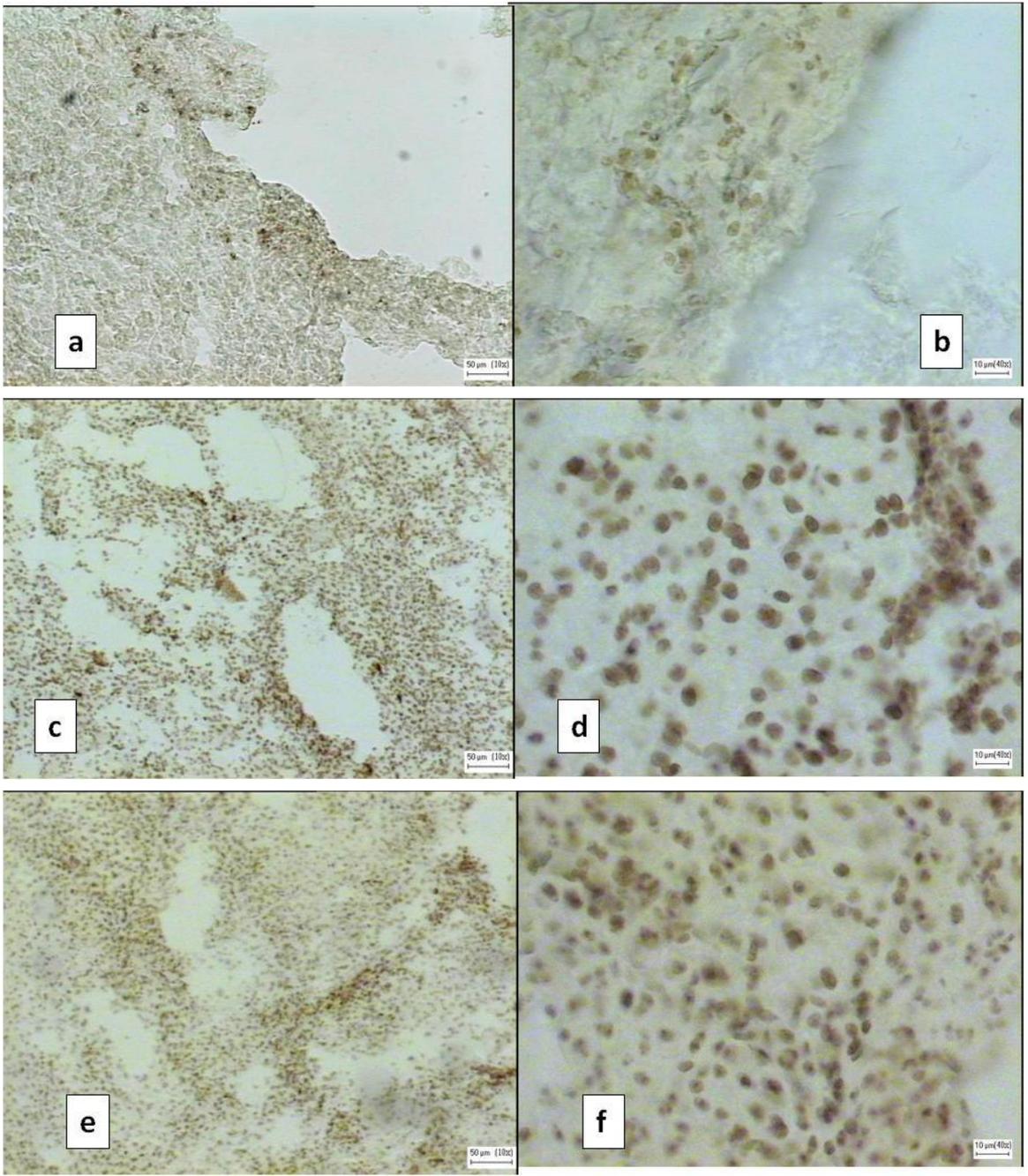
b. Ιστοχημική χρώση για την AChE, μεγέθυνση x 40. Παρατηρείται χρώση σε κοκκώδη μορφή συσχετιζόμενη με τις κυτταρικές μεμβράνες των ηπατικών κυττάρων.

c. Ιστοχημική χρώση για την BuChE, μάρτυρας, ημέρα 3: Παρατηρείται εκτεταμένη χρώση σημαντικά περισσότερη από της AChE (**a.**).

d. Ιστοχημική χρώση για την BuChE, μεγέθυνση x 40. Η χρώση στο κύτταρο εμφανίζονταν κυρίως στις κυτταροπλασματικές μεμβράνες και σε μικρότερο βαθμό στο κυτταρόπλασμα.

e. Ιστοχημική χρώση για ChEs που υδρολύουν την PrSCh, 1 mg/kg bw, ημέρα 14: Παρατηρείται εκτεταμένη χρώση σε όλη την επιφάνεια της τομής ανάλογη της BuChE (**c.**).

f. Ιστοχημική χρώση για ChEs που υδρολύουν την PrSCh, μεγέθυνση x 40. Δεν παρατηρείται διαφοροποίηση από την BuChE (**d.**).



3.1.1.3.3 Χρώση για την BuChE

Στην χρώση για την BuChE διακρίνονταν πολλά θετικά κύτταρα τα οποία ήταν ορατά παντού, τόσο στα ηπατικά κύτταρα όσο και στο αγγειακό σύστημα. Η χρώση στο κύτταρο εμφανίζονταν κυρίως στις κυτταροπλασματικές μεμβράνες και σε μικρότερο βαθμό στο κυτταρόπλασμα (Εικ. 3.1-5).

Η χρώση για την BuChE στην χαμηλότερη δόση είχε ανάλογη έκφραση σε σχέση με τον μάρτυρα, ανεξαρτήτως ημέρας δειγματοληψίας. Για τις υπόλοιπες δόσεις των 2,2, 5, 11,2 και 25 mg/kg bw, η χρώση είχε μειωμένη έκφραση κατά 18,5, 16,1, 21,5 και 38,1%, αντίστοιχα, σε σύγκριση με τον μάρτυρα (Πίνακας 3.1-17).

Η χωροταξική κατανομή της χρώσης του ιστού, χαρακτηρίστηκε ως «Περιφερειακή/Κεντρική» τόσο για τον μάρτυρα όσο και για τις επεμβάσεις με methamidophos, ανεξαρτήτως χρόνου δειγματοληψίας (Πίνακας 3.1-17).

Πίνακας 3.1-17: Ιστοχημική ανίχνευση για την BuChE σε ήπαρ ιαπωνικών ορτυκίων (*Coturnix coturnix japonica*) μετά από χρώση κατά Baker et al. (1986), όπως τροποποιήθηκε από τους Karnovsky and Roots (1964). Έγινε ιστολογική αξιολόγηση με κριτήρια έντασης χρώσης, σχετικού πληθυσμού χρωσμένων κυττάρων και επιφανειακής κατανομής της χρώσης καθώς και χωροταξικής κατανομής μετά από έκθεση σε διάφορες δόσεις methamidophos (mg/kg bw). Η κάθε τιμή είναι ο MO μετρήσεων από 3-8 ορτύκια (MO \pm SD). Η οξεία τοξικότητα από το στόμα ελέγχθηκε σε εργαστηριακές συνθήκες (n=10 άτομα/ομάδα επέμβασης, ομάδα μάρτυρα=8 άτομα)

Methamidophos (mg/kg bw)	Ποσοτική έκφραση της BuChE (Τιμές χρώσης) ¹			Γινόμενο (=ένταση X πληθυσμού κυττ. X επιφ. κατανομή) της ποσοτικής έκφρασης της BuChE (Τιμές χρώσης) ²	Χωροταξική κατανομή		
	Ένταση χρώσης (1-5)	Σχετικός πληθυσμός χρωσμένων κυττάρων (1-5)	Επιφαν. κατανομή χρώσης (1-3)		Ημέρες δειγματοληψίας		
					1	3	14
0	4,73	4,33	3,00	62,6 \pm 21,4	●	●	●
1	4,40	4,60	3,00	61,2 \pm 15,1 (-2,2)	●	●	●
2,2	4,00	4,33	3,00	51,0 \pm 9,8 (-18,5)	●	●	●
5	3,67	4,83	3,00	52,5 \pm 15,0 (-16,1)	●	●	●
11,2	3,60	4,54	2,96	49,1 \pm 18,4 (-21,5)	●	x	x
25	3,50	3,58	3,00	38,8 \pm 15,3 (-38,1)	●	x	x

¹ Τα δεδομένα εκφράζονται ως MO των τομών κάθε ιστού

² Τα δεδομένα εκφράζονται ως MO των τομών κάθε ιστού \pm SD. Η % διαφοροποίηση της ποσοτικής έκφρασης της χρώσης σε σύγκριση με τον μάρτυρα καταγράφεται μέσα στην παρένθεση ()

x Όλα τα άτομα είναι νεκρά

3.1.1.3.3.4 Χρώση ChEs που υδρολύουν την PrSCh

Στην χρώση για ChEs που υδρολύουν την PrSCh διακρίνονταν πολλά θετικά κύτταρα τα οποία ήταν ορατά παντού, τόσο στα ηπατικά κύτταρα όσο και στο αγγειακό σύστημα. Η χρώση στο κύτταρο εμφανίζονταν κυρίως στις κυτταροπλασματικές μεμβράνες και σε μικρότερο βαθμό στο κυτταρόπλασμα, πιο κοκκώδες σε σύγκριση με την BuChE (Εικ. 3.1-5).

Η χρώση για ChEs για όλες τις δόσεις είχε μειωμένες τιμές ποσοτικής εκτίμησης, σε σχέση με τον μάρτυρα, ανεξαρτήτως ημέρας δειγματοληψίας με αποτελέσματα που ήταν ανάλογα της χρώσης για την BuChE (Πίνακας 3.1-17). Η συνολική ποσοτική έκφραση της χρώσης με αυτό το υπόστρωμα υπολογίστηκε στο 80,9% της αντίστοιχης που υπολογίστηκε για την BuChE.

Για τις δόσεις των 1, 2,2, 5, 11,2 και 25 mg/kg bw, η χρώση έχει μειωμένη έκφραση κατά 12,3, 22,0, 24,2, 17,3, και 22,1%, αντίστοιχα, σε σύγκριση με τον μάρτυρα (Πίνακας 3.1-18).

Η χωροταξική κατανομή της χρώσης του ιστού, χαρακτηρίστηκε ως «Περιφερειακή/Κεντρική» τόσο για τον μάρτυρα όσο και για τις επεμβάσεις με methamidophos, ανεξαρτήτως χρόνου δειγματοληψίας (Πίνακας 3.1-18).

Για τις τομές στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν και οι δύο παρεμποδιστές (BW284C51 και iso-OMPA), ως θετικός μάρτυρας της ιστοχημείας της PrSCh, η χρώση δεν ήταν πια διακριτή.

Πίνακας 3.1-18: Ιστοχημική ανίχνευση για ChEs που υδρολύουν την PrSCh σε ήπαρ ιαπωνικών ορνυκίων (*Coturnix coturnix japonica*) μετά από χρώση κατά Baker et al. (1986), όπως τροποποιήθηκε από τους Karnovsky and Roots (1964). Έγινε ιστολογική αξιολόγηση με κριτήρια έντασης χρώσης, σχετικού πληθυσμού χρωσμένων κυττάρων και επιφανειακής κατανομής της χρώσης καθώς και χωροταξικής κατανομής μετά από έκθεση σε διάφορες δόσεις methamidophos (mg/kg bw). Η κάθε τιμή είναι ο ΜΟ μετρήσεων από 2-7 ορνυκία (ΜΟ ± SD). Η οξεία τοξικότητα από το στόμα ελέγχθηκε σε εργαστηριακές συνθήκες (n=10 άτομα/ομάδα επέμβασης, ομάδα μάρτυρα=8 άτομα)

Methamidophos (mg/kg bw)	Ποσοτική έκφραση ChE που υδρολύουν την PrSCh (Τιμές χρώσης) ¹			Γινόμενο (=ένταση X πληθυσμού κυττ. X επιφ. κατανομή) της ποσοτικής έκφρασης ChE που υδρολύουν την PrSCh (Τιμές χρώσης) ²	Χωροταξική κατανομή		
	Ένταση χρώσης (1-5)	Σχετικός πληθυσμός χρωσμένων κυττάρων (1-5)	Επιφαν. κατανομή χρώσης (1-3)		Ημέρες δειγματοληψίας		
					1	3	14
0	4,50	3,75	3,00	50,6 ± 23,8	●	●	●
1	3,56	4,14	3,00	44,4 ± 10,4 (-12,3)	●	●	●
2,2	3,00	4,47	3,00	39,5 ± 10,2 (-22,0)	●	●	●
5	3,57	3,40	3,00	38,4 ± 25,6 (-24,2)	●	●	●
11,2	3,19	4,27	3,00	41,8 ± 18,6 (-17,3)	●	x	x
25	3,42	3,70	2,94	39,4 ± 17,2 (-22,1)	●	x	x

¹ Τα δεδομένα εκφράζονται ως ΜΟ των τομών κάθε ιστού

² Τα δεδομένα εκφράζονται ως ΜΟ των τομών κάθε ιστού ± SD. Η % διαφοροποίηση της ποσοτικής έκφρασης της χρώσης σε σύγκριση με τον μάρτυρα καταγράφεται μέσα στην παρένθεση ()

x Όλα τα άτομα είναι νεκρά

3.1.2 Δοκιμές υποξείας τοξικότητας

3.1.2.1 Μακροσκοπικές παρατηρήσεις

3.1.2.1.1 Θνησιμότητα

Στον μάρτυρα και στις 2 χαμηλότερες συγκεντρώσεις methamidophos δεν υπήρχαν νεκρά πτηνά. Νεκρά πτηνά καταγράφηκαν την ημέρα 5 για την μεσαία συγκέντρωση και την ημέρα 4 για τις 2 υψηλότερες συγκεντρώσεις. Με την εναλλαγή του σιτηρεσίου απαλλαγμένου από το methamidophos δεν παρατηρήθηκε περαιτέρω αύξηση της θνησιμότητας. Όσον αφορά την θνησιμότητα το NOEL, LOEL και το LD₅₀ ήταν 39,4, 77,5 και >300 mg/kg τροφής μετά από 8 ημέρες πειραματισμού, αντίστοιχα.

Στον Πίνακα 3.1-19 παρατίθεται η αθροιστική θνησιμότητα στα ορτύκια.

Πίνακας 3.1-19: Αθροιστική θνησιμότητα σε ιαπωνικό ορτύκι (*Coturnix coturnix japonica*) μετά από έκθεση σε διάφορες συγκεντρώσεις methamidophos (mg/kg τροφής). Η υποξεία τοξικότητα ελέγχθηκε σε εργαστηριακές συνθήκες (n=7 άτομα/ομάδα επέμβασης)

Methamidophos (mg/kg τροφής)	Αριθμός νεκρών ατόμων								
	Ημέρες χορήγησης και μετά τη χορήγηση								
	0	1	2	3	4	5	+1 ¹	+2	+3
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0	0	0	0
39,4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
77,5	0	0	0	0	0	2	2	2	2
152,4	0	0	0	0	2	2	2	2	2
300	0	0	0	0	3	3	3	3	3

¹ Ημέρες σιτηρεσίου απαλλαγμένου από το methamidophos

3.1.2.1.2 Κλινικά συμπτώματα

Στον μάρτυρα τα πτηνά έδειχναν υγιή ενώ δεν υπήρχαν εμφανή κλινικά συμπτώματα. Στη χαμηλότερη συγκέντρωση των 20 mg/kg τροφής, παρατηρήθηκαν ελαφρά κλινικά συμπτώματα σε 7 πτηνά την ημέρα 1 και 2 χαρακτηριζόμενα από «μειωμένη κινητικότητα». Τα πτηνά έδειχναν υγιή τις επόμενες ημέρες.

Στη συγκέντρωση των 39,4 mg/kg τροφής, παρατηρήθηκαν ελαφρά κλινικά συμπτώματα σε 7 πτηνά τις ημέρες 1, 2 και 5 χαρακτηριζόμενα ως «μειωμένη κινητικότητα» ενώ την ημέρα 3 δεν καταγράφηκαν κλινικά συμπτώματα. Την ημέρα 4 καταγράφηκαν ελαφρά κλινικά συμπτώματα σε 7 πτηνά χαρακτηριζόμενα από «μειωμένη αντίδραση σε εξωτερικά ερεθίσματα». Τα πτηνά έδειχναν υγιή τις επόμενες ημέρες με την χορήγηση καθαρού σιτηρεσίου.

Στη μεσαία συγκέντρωση των 77,5 mg/kg τροφής, παρατηρήθηκαν ήπια έως σοβαρά κλινικά συμπτώματα σε 5-7 πτηνά, 2 έως 6 h μετά την χορήγηση του σιτηρεσίου μέχρι και την ημέρα 5 χαρακτηριζόμενα ως «μειωμένη κινητικότητα». Επίσης παρατηρήθηκαν ήπια κλινικά συμπτώματα σε 3 πτηνά την ημέρα 1 χαρακτηριζόμενα ως «μειωμένη αντίδραση σε εξωτερικά ερεθίσματα», μέτρια κλινικά συμπτώματα σε 5-7 πτηνά τις ημέρες 4, 5 χαρακτηριζόμενα ως «αδυναμία στα πόδια». Τα πτηνά έδειχναν υγιή τις επόμενες ημέρες με την χορήγηση καθαρού σιτηρεσίου.

Στις υψηλότερες συγκεντρώσεις των 152,4 και 300 mg/kg τροφής, παρατηρήθηκαν ήπια έως σοβαρά κλινικά συμπτώματα σε 4-7 πτηνά 1,5 έως 2 h μετά την χορήγηση του σιτηρεσίου μέχρι και την ημέρα 5 χαρακτηριζόμενα ως «μειωμένη κινητικότητα». Επίσης παρατηρήθηκαν ήπια κλινικά συμπτώματα σε 7 πτηνά την ημέρα 1 χαρακτηριζόμενα ως «μειωμένη αντίδραση σε εξωτερικά ερεθίσματα», ήπια έως σοβαρά κλινικά συμπτώματα σε 1-7 πτηνά τις ημέρες 2 έως και 5 χαρακτηριζόμενα ως «αδυναμία στα πόδια». Ειδικά για την μεγαλύτερη συγκέντρωση καταγράφηκαν ήπια κλινικά συμπτώματα σε 2 πτηνά την ημέρα 3 χαρακτηριζόμενα ως «μυικός τρόμος». Τα πτηνά έδειχναν υγιή τις επόμενες ημέρες με την χορήγηση καθαρού σιτηρεσίου.

Όσον αφορά τα κλινικά συμπτώματα μετά από 8 d πειραματισμού το LOEL=20 mg/kg τροφής.

Τα κλινικά συμπτώματα, για τον πειραματισμό της υποξείας τοξικότητας στο ορτύκι, παρατίθενται στον Πίνακα 3.1-20.

Πίνακας 3.1-20: Κλινικά συμπτώματα σε ιαπωνικό ορτύκι (*Coturnix coturnix japonica*) μετά από έκθεση σε διάφορες συγκεντρώσεις methamidophos (mg/kg τροφής). Η υποξεία τοξικότητα ελέγχθηκε σε εργαστηριακές συνθήκες (n=7 άτομα/ομάδα επέμβασης)

Methamidophos (mg/kg τροφής)	Αριθμός ατόμων με κλινικά συμπτώματα ²										
	Ημέρες χορήγησης και μετά τη χορήγηση										
	0†	0‡	0¶	1	2	3	4	5	+1 ¹	+2	+3
0	δ.π.	δ.π.	δ.π.	δ.π.	δ.π.	δ.π.	δ.π.	δ.π.	δ.π.	δ.π.	δ.π.
20	δ.π.	δ.π.	δ.π.	C7a ^{3,4}	C7a	δ.π.	δ.π.	δ.π.	δ.π.	δ.π.	δ.π.
39,4	δ.π.	δ.π.	δ.π.	C7a	C7a	δ.π.	R7a	C7a	δ.π.	δ.π.	δ.π.
77,5	δ.π.	δ.π.	C7a	C7a R3a	C7a	C7b	C4b C3c L7b	C2b C3c L5b	δ.π.	δ.π.	δ.π.
152,4	δ.π.	C7a	C7a	C7a R7a	C7b L1a	C7c L7b	C5c L5c	C5c L5c	δ.π.	δ.π.	δ.π.
300	δ.π.	C7a	C7b	C7b R7a	C7c L1b	C7c L7c T2a	C4c L4c	C4c L4c	δ.π.	δ.π.	δ.π.

¹ Ημέρες σιτηρεσίου *απαλλαγμένου* από το methamidophos

† = λίγο ώρα μετά την χορήγηση του σιτηρεσίου

‡ = περίπου 1,5 έως 2 h μετά την χορήγηση του σιτηρεσίου

¶ = περίπου 2 έως 6 h μετά την χορήγηση του σιτηρεσίου

² **Είδος κλινικών συμπτωμάτων:**

L = αδυναμία στα πόδια (leg weakness),

R = μειωμένη αντίδραση σε εξωτερικά ερεθίσματα (reduce reaction to external stimuli),

T= μυϊκό τρόμος (tremor),

C= μειωμένη κινητικότητα (reduced activity)

³ **Αριθμός δίπλα στο είδος των κλινικών συμπτωμάτων:** αριθμός ατόμων με κλινικά συμπτώματα (π.χ. C 2 = 2 άτομα χαρακτηρισμένα ως “μειωμένη κινητικότητα”)

δ.π. = δεν παρατηρήθηκαν κλινικά συμπτώματα

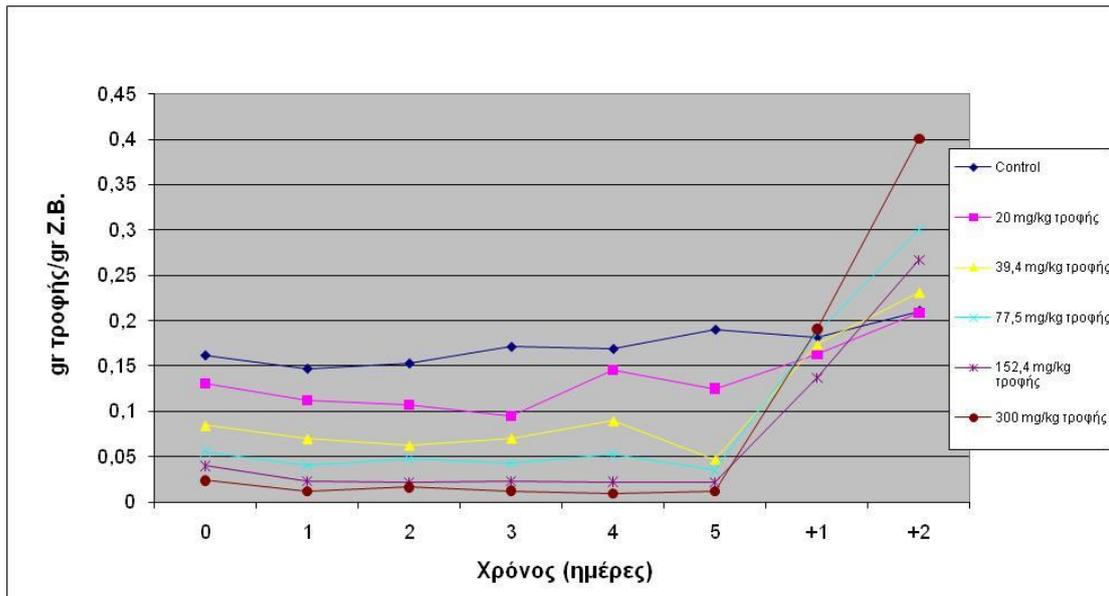
⁴ **Βαθμός έντασης των κλινικών συμπτωμάτων:** a= ήπια ή για μικρή περίοδο, b=μέτρια, c= σοβαρά κλινικά συμπτώματα

3.1.2.1.3 Πρόσληψη τροφής

Όλα τα πτηνά με την έναρξη του πειραματισμού έτρωγαν για 1 h περίπου συνεχώς μέχρι να σταματήσουν. Ο ρυθμός πρόσληψης τροφής (gr τροφής/gr bw) κατά την διάρκεια των πρώτων 5 d παρατήρησης ήταν αντιστρόφως ανάλογος, μικρότερος όσο αύξανε η συγκέντρωση του methamidophos, για όλες τις επεμβάσεις από την ημέρα 0-5. Από την επόμενη ημέρα, με την χορήγηση καθαρού σιτηρεσίου, ο ρυθμός πρόσληψης τροφής από τα άτομα που είχαν δεχθεί methamidophos αυξήθηκε αναλογικά περισσότερο από τον μάρτυρα. Για την εκτίμηση της κατανάλωσης της τροφής, τα πτηνά που βρέθηκαν νεκρά στους κλωβούς τους την ημέρα της

παρατήρησης, δεν συμπεριλαμβάνονται στους αντίστοιχους υπολογισμούς. Έτσι η μέση κατανάλωση τροφής (gr τροφής/gr bw/d) υπολογίστηκε από την κατανάλωση της τροφής των ζώντων πτηνών/κλωβό/ημέρα.

Ο ρυθμός πρόσληψης τροφής, για τον πειραματισμό της υποξείας τοξικότητας στο ορτύκι, παρατίθενται στο Γράφημα 3.1-2.



Γράφημα 3.1-2: Ρυθμός πρόσληψης τροφής (FIR) σε ιαπωνικό ορτύκι (*Coturnix coturnix japonica*) μετά από έκθεση σε διάφορες συγκεντρώσεις methamidophos (mg/kg τροφής). Η υποξεία τοξικότητα ελέγχθηκε σε εργαστηριακές συνθήκες (n=7 άτομα/ομάδα επέμβασης)

3.1.2.1.4 Σωματικό βάρος

Το μέσο σωματικό βάρος για τον μάρτυρα αυξήθηκε πολύ λίγο (2%). Για τις διάφορες συγκεντρώσεις το μέσο σωματικό βάρος μειώθηκε από 7 έως 36,9%, από την ημέρα 0 μέχρι την ημέρα 5. Όσα άτομα βρέθηκαν νεκρά στους κλωβούς τους την ημέρα της παρατήρησης δεν συμπεριλαμβάνονται στους υπολογισμούς του σωματικού βάρους. Ενδεικτικά στα νεκρά άτομα για τη μεσαία και τις υψηλότερες συγκεντρώσεις το μέσο σωματικό βάρος μειώθηκε από 32,8 έως 43,0%.

Το ποσοστό μεταβολής του σωματικού βάρους, για τον πειραματισμό της υποξείας τοξικότητας στο ορτύκι, παρατίθενται στον Πίνακα 3.1-21.

Πίνακας 3.1-21: Ποσοστό μεταβολής του σωματικού βάρους σε ιαπωνικό ορτύκι (*Coturnix coturnix japonica*) μετά από έκθεση σε διάφορες συγκεντρώσεις methamidophos (mg/kg τροφής). Η υποξεία τοξικότητα ελέγχθηκε σε εργαστηριακές συνθήκες (n=7 άτομα/ομάδα επέμβασης)

Methamidophos (mg/kg τροφής)	Ποσοστό μεταβολής του σωματικού βάρους (%)	
	Ημέρες χορήγησης και μετά τη χορήγηση	
	0-5 (ζώντα)	0-5 (νεκρά)
0	2,0 ± 6,3 ¹	
20	-7,0 ± 4,1	
39,4	-10,5 ± 4,0	
77,5	-18,5 ± 4,9	-32,8 ± 5,2
152,4	-36,9 ± 10,6	-42,6 ± 3,9
300	-26,5 ± 6,0	-43,0 ± 13,4

¹ Τα αποτελέσματα εκφράζονται MO ± SD.

3.1.2.1.5 Μακροσκοπική παρατήρηση των ιστών

Όλα τα πτηνά που ελήφθησαν ως δείγματα εξετάστηκαν μακροσκοπικά για πιθανές βλάβες στο εσωτερικό τους, κατά τη διάρκεια της αφαίρεσης ιστών, για τους ιστούς αυτούς αλλά και ως γενική εικόνα του ορτυκιού. Στα ζώντα άτομα δεν υπήρχαν εμφανή τοξικά συμπτώματα.

Για όλες τις συγκεντρώσεις ο πρόλοβος των πτηνών δεν είχε φαγητό παρά μόνο σιέλο (εκτός από 2 περιπτώσεις στην συγκέντρωση των 152,4 mg/kg τροφής και 1 περίπτωση στην συγκέντρωση των 20 mg/kg τροφής όπου ο πρόλοβος είχε πολύ λίγη τροφή).

3.1.2.2 Βιοχημικά αποτελέσματα

Στους Πίνακες 3.1-22 έως 3.1-29 παρουσιάζονται τα βιοχημικά αποτελέσματα της δραστικότητας των ChEs και της παρεμπόδισης τους στο πλάσμα του αίματος, τον εγκέφαλο και το ήπαρ των ιαπωνικών ορτυκίων μετά από έκθεσή τους σε διάφορες επεμβάσεις με methamidophos.

3.1.2.2.1 Πλάσμα αίματος

Η δραστικότητα των εστερασών στο πλάσμα του αίματος, στον μάρτυρα, ήταν υψηλή όταν χρησιμοποιήθηκαν ως υπόστρωμα τα ASCh ή BuSCh ή PrSCh. Στον μάρτυρα, πολύ χαμηλή δραστικότητα, στα όρια ανίχνευσης της μεθόδου, καταγράφηκε την ημέρα 1 όταν το υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το ASCh μετά την αφαίρεση του BuChE ($6,4 \pm 5,0$ SD $\mu\text{mol}/\text{min mg}$ πρωτεΐνης). Αντίθετα καταγράφηκαν υψηλές τιμές δραστικότητας των εστερασών για τα άλλα 2 υποστρώματα ($361,8 \pm 203,1$ SD (BuSCh) και $854,0 \pm 336,7$ SD (PrSCh) $\mu\text{mol}/\text{min mg}$ πρωτεΐνης) (Πίνακες 3.1-22/3).

Η δραστικότητα της BuChE, με υπόστρωμα το BuSCh, διέφερε σημαντικά ανάλογα και το χρόνο επίδρασης αλλά ανεξαρτήτως συγκέντρωσης του methamidophos. Για όλες τις συγκεντρώσεις του methamidophos, η δραστικότητα του BuChE από την ημέρα 0 έως την ημέρα 5 μετά την εφαρμογή παρεμποδίστηκε σε ποσοστό 86-100%. Από την επόμενη ημέρα (+1), με την εφαρμογή καθαρού σιτηρεσίου, η παρεμπόδιση μειώθηκε λίγο, 69-77% ενώ την ημέρα (+3) η δραστικότητα της BuChE αυξήθηκε 12-55% για όλες τις συγκεντρώσεις (Πίνακας 3.1-22).

Η δραστικότητα των ChEs, με υπόστρωμα το PrSCh, έδειξε παρόμοια συμπεριφορά και έδωσε ανάλογα αποτελέσματα, με αυτά του BuSCh, γεγονός που αυξάνει την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων του πειραματισμού (Πίνακας 3.1-23).

Πίνακας 3.1-22: Βιοχημική *in vitro* δραστηριότητα της BuChE, με υπόστρωμα BuSCh, σε πλάσμα αίματος ιαπωνικού ορνυκιού (*Coturnix coturnix japonica*) μετά από έκθεση σε διάφορες συγκεντρώσεις methamidophos (mg/kg τροφής). Η κάθε τιμή είναι ο ΜΟ μετρήσεων από 1-3 ορνύκια (ΜΟ ± SD). Η υποξεία τοξικότητα ελέγχθηκε σε εργαστηριακές συνθήκες (n=16 άτομα/ομάδα επέμβασης)

Methamidophos (mg/kg τροφής)	Δραστηριότητα των BuChE ¹					
	Ημέρες χορήγησης και μετά τη χορήγηση					
	0	1	2	5	+1	+3
0	877,8	361,8 ± 203,1 ²	326,5 ± 153,9	292,4	305,5	201,6 ± 78,5
20	37,9 (96)	8,3 ± 10,3 (98)	11,4 ± 9,4 (97)	5,7 ± 7,8 (98)	73,1 (76)	267,0 ± 6,9 (-32)
39,4	-0,7 (100)	5,8 ± 4,3 (98)	8,9 ± 9,1 (97)	8,0 (97)	96,0 (69)	243,1 (-21)
77,5	118,6 (86)	3,6 ± 4,1 (99)	4,9 ± 4,4 (98)	1,5 ± 0,8 (99)	70,9 (77)	269,6 ± 1,8 (-34)
152,4	2,2 (100)	1,0 ± 3,6 (100)	9,5 ± 10,7 (97)	-0,8 (100)	79,5 (74)	312,3 ± 213,7 (-55)
300	0,6 (100)	0,5 ± 6,2 (100)	0,9 ± 0,8 (100)			225,8 ± 38,7 (-12)

¹ μmol/min.mg πρωτεΐνης.

² Τα δεδομένα εκφράζονται ως ΜΟ ± SD. Η % παρεμπόδιση σε σύγκριση με τον μάρτυρα καταγράφεται μέσα στην παρένθεση ().

Πίνακας 3.1-23: Βιοχημική *in vitro* δραστηριότητα των ChEs, με υπόστρωμα PrSCh, σε πλάσμα αίματος ιαπωνικού ορνυκιού (*Coturnix coturnix japonica*) μετά από έκθεση σε διάφορες συγκεντρώσεις methamidophos (mg/kg τροφής). Η κάθε τιμή είναι ο ΜΟ μετρήσεων από 1-3 ορνύκια (ΜΟ ± SD). Η υποξεία τοξικότητα ελέγχθηκε σε εργαστηριακές συνθήκες (n=16 άτομα/ομάδα επέμβασης)

Methamidophos (mg/kg τροφής)	Δραστηριότητα των ChEs ¹					
	Ημέρες χορήγησης και μετά τη χορήγηση					
	0	1	2	5	+1	+3
0	1083,1	854,0 ± 336,7 ²	950,9 ± 372,6	581,6	952,4	599,5 ± 267,5
20	74,6 (93)	29,2 ± 29,4 (97)	61,3 ± 39,2 (94)	30,4 ± 36,5 (95)	190,1 (80)	599,3 ± 60,6 (0)
39,4	3,8 (100)	7,3 ± 10,6 (99)	37,3 ± 29,3 (96)	37,3 (94)	13,8 (99)	664,0 (-11)
77,5	305,5 (72)	36,2 ± 18,9 (96)	14,3 ± 11,5 (98)	43,2 ± 37,4 (93)	220,3 (77)	527,2 ± 199,7 (12)
152,4	1,6 (100)	23,7 ± 27,5 (97)	37,7 ± 30,3 (96)	33,3 (94)	191,1 (80)	672,1 ± 304,1 (-12)
300	10,2 (99)	20,9 ± 8,4 (98)	11,5 ± 1,5 (99)			753,9 ± 91,3 (-26)

¹ μmol/min.mg πρωτεΐνης.

² Τα δεδομένα εκφράζονται ως ΜΟ ± SD. Η % παρεμπόδιση σε σύγκριση με τον μάρτυρα καταγράφεται μέσα στην παρένθεση ().

3.1.2.2.2 Εγκέφαλος

Η δραστικότητα των εστερασών στον εγκέφαλο του μάρτυρα, ήταν υψηλή όταν χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα το ASCh ή το PrSCh. Όταν χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα το BuSCh αντίθετως, η δραστικότητα των εστερασών ήταν χαμηλότερη. Στον μάρτυρα, οι υψηλότερες τιμές δραστικότητας των εστερασών για τα υποστρώματα ASCh (μετά την αφαίρεση του BuChE) ή PrSCh, την ημέρα 1, ήταν $819,8 \pm 197,2$ SD (ASCh), $1031,0 \pm 200,5$ SD (PrSCh) $\mu\text{mol}/\text{min mg}$ πρωτεΐνης. Χαμηλότερη δραστικότητα καταγράφηκε όταν το υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το BuSCh ($147,1 \pm 44,2$ SD $\mu\text{mol}/\text{min mg}$ πρωτεΐνης) (Πίνακες 3.1-24/25/26).

Η δραστικότητα της AChE διέφερε σημαντικά (με υπόστρωμα το ASCh μετά την αφαίρεση του BuChE), όταν η συγκέντρωση του methamidophos και ο χρόνος της επίδρασης αυξανόταν (Πίνακας 3.1-24). Την ημέρα 0, για τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις των 20 και 39,4 mg/kg τροφής, το methamidophos αύξησε την δραστικότητα της AChE, 118 και 63%, αντίστοιχα, σε σχέση με τον μάρτυρα ενώ για τις 2 αμέσως μεγαλύτερες συγκεντρώσεις των 77,5 και 152 mg/kg τροφής, το methamidophos διατήρησε ή παρεμπόδισε τη δραστικότητα ελαφρά, 29 και 3%, αντίστοιχα, σε σχέση με τον μάρτυρα. Αντίθετα για την μεγαλύτερη συγκέντρωση των 300 mg/kg τροφής το methamidophos παρεμπόδισε την δραστικότητα της AChE, 42%. Μετά την ημέρα 1 έως την 5, η δραστικότητα της AChE παρεμποδίστηκε σημαντικά για όλες τις συγκεντρώσεις, λιγότερο για την χαμηλότερη συγκέντρωση (20 mg/kg τροφής), και κυμαινόταν από 34-83% για τα ζώντα ορτύκια. Την επόμενη ημέρα (+1) με την χορήγηση καθαρού σιτηρεσίου, σε όλες τις συγκεντρώσεις, η παρεμπόδιση δεν διαφοροποιήθηκε (63-87%) ενώ την ημέρα (+3) η δραστικότητα της μειώθηκε ελαφρά, παρεμπόδιση 33-74%. Για τα νεκρά ορτύκια, στις μεσαίες και υψηλότερες δόσεις την ημέρα 5, η παρεμπόδιση της δραστικότητας της AChE στον εγκέφαλο κυμάνθηκε σε ανάλογα επίπεδα (51-78%) (Πίνακες 3.1-24).

Η δραστικότητα της ChE, με υπόστρωμα το BuSCh και PrSCh, έδειξε παρόμοια συμπεριφορά και έδωσε ανάλογα αποτελέσματα με την περίπτωση του υποστρώματος ASCh με μικρές διαφοροποιήσεις την ημέρα 0 (Πίνακες 3.1-25/6).

Πίνακας 3.1-24: Βιοχημική *in vitro* δραστικότητα της AChE, σε εγκέφαλο ιαπωνικού ορτυκιού (*Coturnix coturnix japonica*) μετά από έκθεση σε διάφορες συγκεντρώσεις methamidophos (mg/kg τροφής). Η κάθε τιμή είναι ο MO μετρήσεων από 1-3 ορτύκια (MO ± SD). Η υποξεία τοξικότητα ελέγχθηκε σε εργαστηριακές συνθήκες (n=16 άτομα/ομάδα επέμβασης)

Methamidophos (mg/kg τροφής)	Δραστικότητα της AChE ¹					
	Ημέρες χορήγησης και μετά τη χορήγηση					
	0	1	2	5	+1	+3
0	247,7	819,8 ± 197,2 ²	594,0 ± 35,9	482,2	582,9	563,4 ± 285,5
20	540,0 (-118)	419,3 ± 202,6 (49)	185,1 ± 160,3 (69)	320,6 ± 209,9 (34)	172,5 (70)	377,0 ± 139,5 (33)
39,4	402,7 (-63)	236,3 ± 81,0 (71)	170,7 ± 93,4 (71)	81,1 ± 36,0 (83)		260,3 ± 61,2 (54)
77,5	175,0 (29)	298,8 (64)	99,1 ± 85,9 (83)	104,4 ± 27,9 (78[78])	216,2 (63)	272,0 ± 125,3 (52)
152,4	240,2 (3)	177,6 ± 112,4 (78)	223,2 ± 26,4 (62)	196,3 (59[51])	74,8 (87)	149,1 ± 183,8 (74)
300	144,7 (42)	219,7 ± 75,2 (73)	205,9 ± 74,5 (65)	158,1 [67]	112,2 (81)	248,5 ± 99,7 (56)

¹ μmol/min.mg πρωτεΐνης.

² Τα δεδομένα εκφράζονται ως MO ± SD. Η % παρεμπόδιση σε σύγκριση με τον μάρτυρα για τα ζώντα άτομα καταγράφεται μέσα στην παρένθεση () ενώ για τα νεκρά μέσα σε αγκύλες [].

Πίνακας 3.1-25: Βιοχημική *in vitro* δραστικότητα της BuChE, με υπόστρωμα BuSCh, σε εγκέφαλο ιαπωνικού ορτυκιού (*Coturnix coturnix japonica*) μετά από έκθεση σε διάφορες συγκεντρώσεις methamidophos (mg/kg τροφής). Η κάθε τιμή είναι ο MO μετρήσεων από 1-3 ορτύκια (MO ± SD). Η υποξεία τοξικότητα ελέγχθηκε σε εργαστηριακές συνθήκες (n=16 άτομα/ομάδα επέμβασης)

Methamidophos (mg/kg τροφής)	Δραστικότητα της BuChE ¹					
	Ημέρες χορήγησης και μετά τη χορήγηση					
	0	1	2	5	+1	+3
0	58,0	167,1 ± 44,2 ²	149,1 ± 17,2	149,8	165,2	180,5
20	230,0 (-296)	59,6 ± 25,4 (64)	23,3 ± 23,0 (84)	76,7 ± 56,0 (49)	39,7 (76)	47,4 ± 18,1 (74)
39,4	85,7 (-48)	-5,6 (103)	73,0 ± 26,9 (51)	32,5 ± 56,6 (78)		54,0 ± 20,8 (70)
77,5	27,7 (52)	80,5 (52)	13,9 ± 20,2 (91)	22,7 ± 7,1 (85[93])	80,9 (51)	66,6 ± 19,2 (63)
152,4	24,8 (57)	12,4 ± 5,9 (93)	48,6 ± 22,5 (67)	-3,3 (102[47])		48,3 ± 71,0 (73)
300	47,3 (19)	80,3 ± 24,8 (52)	42,8 ± 36,1 (71)	19,5 [87]	8,0 (95)	75,5 ± 17,9 (58)

¹ μmol/min.mg πρωτεΐνης.

² Τα δεδομένα εκφράζονται ως MO ± SD. Η % παρεμπόδιση σε σύγκριση με τον μάρτυρα για τα ζώντα άτομα καταγράφεται μέσα στην παρένθεση () ενώ για τα νεκρά μέσα σε αγκύλες [].

Πίνακας 3.1-26: Βιοχημική *in vitro* δραστικότητα των ChEs, με υπόστρωμα PrSCh, σε εγκέφαλο ιαπωνικού ορτυκιού (*Coturnix coturnix japonica*) μετά από έκθεση σε διάφορες συγκεντρώσεις methamidophos (mg/kg τροφής). Η κάθε τιμή είναι ο MO μετρήσεων από 1-3 ορτύκια (MO ± SD). Η υποξεία τοξικότητα ελέγχθηκε σε εργαστηριακές συνθήκες (n=16 άτομα/ομάδα επέμβασης)

Methamidophos (mg/kg τροφής)	Δραστικότητα της ChE ¹					
	Ημέρες χορήγησης και μετά τη χορήγηση					
	0	1	2	5	+1	+3
0	590,4	1031,0 ± 200,5 ²	775,7 ± 65,3	583,4	733,8	569,0 ± 115,8
20	643,3 (-9)	529,6 ± 236,6 (49)	231,2 ± 171,6 (70)	419,1 ± 247,6 (28)	232,3 (68)	411,1 ± 101,7 (28)
39,4	455,9 (23)	247,2 ± 81,9 (76)	269,4 ± 81,2 (65)	137,1 ± 27,7 (76)		320,0 ± 71,4 (44)
77,5	194,9 (67)	359,6 (65)	182,3 ± 16,2 (76)	151,1 ± 19,6 (74[76])	336,4 (54)	338,0 ± 136,2 (41)
152,4	206,8 (65)	154,2 ± 27,0 (85)	288,1 ± 39,7 (63)	221,3 (62[55])	120,9 (84)	183,0 ± 204,2 (68)
300	281,1 (52)	289,3 ± 60,0 (72)	252,8 ± 96,8 (67)	194,7 [67]	166,8 (77)	324,2 ± 92,1 (43)

¹ μmol/min.mg πρωτεΐνης.

² Τα δεδομένα εκφράζονται ως MO ± SD. Η % παρεμπόδιση σε σύγκριση με τον μάρτυρα για τα ζώντα άτομα καταγράφεται μέσα στην παρένθεση () ενώ για τα νεκρά μέσα σε αγκύλες [] .

3.1.2.2.3 Ήπαρ

Η δραστηριότητα των εστερασών στο ήπαρ, στον μάρτυρα, ήταν χαμηλότερη από τους άλλους ιστούς που περιγράφηκαν ανωτέρω όταν κατά την βιοχημική ανάλυση ως υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκαν τα ASCh ή BuSCh ή PrSCh. Στον μάρτυρα, πολύ χαμηλή δραστηριότητα, στα όρια ανίχνευσης της μεθόδου, καταγράφηκε την ημέρα 1 όταν το υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το ASCh μετά την αφαίρεση του BuChE ($4,0 \pm 2,3$ SD $\mu\text{mol}/\text{min mg}$ πρωτεΐνης). Αντίθετα καταγράφηκαν υψηλότερες τιμές δραστηριότητας των εστερασών για τα άλλα 2 υποστρώματα ($46,5 \pm 21,0$ SD (BuSCh) και $143,4 \pm 2,5$ SD (PrSCh) $\mu\text{mol}/\text{min mg}$ πρωτεΐνης) (Πίνακες 3.1-28/29).

Η δραστηριότητα της BuChE, με υπόστρωμα το BuSCh, διέφερε σημαντικά ανάλογα και το χρόνο επίδρασης αλλά ανεξαρτήτως συγκέντρωσης του methamidophos (Πίνακας 3.1-27). Για όλες τις συγκεντρώσεις του methamidophos, η δραστηριότητα του BuChE από την ημέρα 0 έως την ημέρα 5 μετά την εφαρμογή παρεμποδίστηκε σε ποσοστό 24-82%. Από την επόμενη ημέρα (+1), με την εφαρμογή καθαρού σιτηρεσίου, η παρεμπόδιση παρέμεινε στα ίδια επίπεδα, 59-73% ενώ την ημέρα (+3) η δραστηριότητα της BuChE παρεμποδίστηκε λίγο ή ήταν σε ανάλογα επίπεδα με τον μάρτυρα (-6 - 29%) για όλες τις συγκεντρώσεις, για τα ζώντα ορτύκια. Για τα νεκρά ορτύκια στις μεσαίες και υψηλότερες δόσεις την ημέρα 5, η παρεμπόδιση της δραστηριότητας της BuChE κυμάνθηκε σε ανάλογα επίπεδα (39-58%) (Πίνακας 3.1-27).

Η δραστηριότητα των ChEs, με υπόστρωμα το PrSCh, έδειξε παρόμοια συμπεριφορά (Πίνακας 3.1-28). και έδωσε ανάλογα αποτελέσματα, με αυτά του BuSCh (Πίνακες 3.1-27).

Πίνακας 3.1-27: Βιοχημική *in vitro* δραστικότητα των BuChE, με υπόστρωμα BuSCh, σε ήπαρ ιαπωνικού ορτυκιού (*Coturnix coturnix japonica*) μετά από έκθεση σε διάφορες συγκεντρώσεις methamidophos (mg/kg τροφής). Η κάθε τιμή είναι ο MO μετρήσεων από 1-3 ορτύκια (MO ± SD). Η υποξεία τοξικότητα ελέγχθηκε σε εργαστηριακές συνθήκες (n=16 άτομα/ομάδα επέμβασης)

Methamidophos (mg/kg τροφής)	Δραστικότητα των BuChE ¹					
	Ημέρες χορήγησης και μετά τη χορήγηση					
	0	1	2	5	+1	+3
0	70,5	46,5 ± 20,4 ²	45,0 ± 21,0	33,7	55,4	37,1 ± 4,2
20	28,1 (60)	18,3 ± 5,6 (61)	10,8 ± 2,5 (76)	16,8 ± 2,5 (50)	17,4 (69)	26,3 ± 3,7 (29)
39,4	12,7 (82)	15,3 ± 2,2 (67)	10,5 ± 2,7 (77)	9,6 ± 5,4 (71)	21,0 (62)	29,7 ± 6,2 (20)
77,5	19,3 (73)	13,3 ± 2,6 (71)	11,8 ± 3,9 (74)	14,8 ± 1,2 (56[55])	22,9 (59)	35,7 ± 8,7 (4)
152,4	13,0 (82)	10,9 ± 0,1 (77)	14,3 ± 0,9 (68)	25,5 (24[39])	18,6 (67)	39,5 ± 15,5 (-6)
300	15,6 (78)	12,5 ± 2,1 (73)	13,9 ± 5,4 (69)	14,1 [58]	15,0 (73)	28,7 ± 15,6 (23)

¹ μmol/min.mg πρωτεΐνης.

² Τα δεδομένα εκφράζονται ως MO ± SD. Η % παρεμπόδιση σε σύγκριση με τον μάρτυρα για τα ζώντα άτομα καταγράφεται μέσα στην παρένθεση () ενώ για τα νεκρά μέσα σε αγκύλες []

Πίνακας 3.1-28: Βιοχημική *in vitro* δραστικότητα των ChEs, με υπόστρωμα PrSCh, σε ήπαρ ιαπωνικού ορτυκιού (*Coturnix coturnix japonica*) μετά από έκθεση σε διάφορες συγκεντρώσεις methamidophos (mg/kg τροφής). Η κάθε τιμή είναι ο MO μετρήσεων από 1-3 ορτύκια (MO ± SD). Η υποξεία τοξικότητα ελέγχθηκε σε εργαστηριακές συνθήκες (n=16 άτομα/ομάδα επέμβασης)

Methamidophos (mg/kg τροφής)	Δραστικότητα των ChEs ¹					
	Ημέρες χορήγησης και μετά τη χορήγηση					
	0	1	2	5	+1	+3
0	116,1	143,4 ± 2,5 ²	211,0 ± 86,5	106,5	172,5	83,9 ± 6,4
20	87,7 (24)	65,4 ± 43,0 (54)	33,2 ± 15,8 (84)	58,5 ± 40,1 (45)	42,8 (75)	101,4 ± 40,1 (-21)
39,4	44,8 (61)	45,3 ± 16,5 (68)	45,2 ± 11,7 (79)	39,3 ± 16,6 (63)	60,1 (65)	74,5 ± 14,2 (11)
77,5	33,7 (71)	44,0 ± 19,4 (69)	38,2 ± 10,5 (82)	33,2 ± 0,8 (69[64])	60,7 (65)	71,8 ± 9,9 (14)
152,4	35,8 (69)	23,6 ± 5,1 (84)	45,9 ± 19,3 (78)	70,9 (33[50])	53,9 (69)	65,0 ± 34,2 (22)
300	56,7 (51)	35,3 ± 2,5 (75)	28,7 ± 4,0 (86)	52,9 [50]	44,2 (74)	67,7 ± 14,6 (19)

¹ μmol/min.mg πρωτεΐνης.

² Τα δεδομένα εκφράζονται ως MO ± SD. Η % παρεμπόδιση σε σύγκριση με τον μάρτυρα για τα ζώντα άτομα καταγράφεται μέσα στην παρένθεση () ενώ για τα νεκρά μέσα σε αγκύλες []

3.1.2.3 Ιστοχημικές χρώσεις

3.1.2.3.1 Εγκέφαλος

3.1.2.3.1.1 Χρώση Ηωσίνης – Αιματοξυλίνης

Η επίδραση του methamidophos στον εγκέφαλο του ιαπωνικού ορτυκιού διέφερε μεταξύ του μάρτυρα και των επεμβάσεων για την περίοδο των 8 d, υποδεικνύοντας διαταραχή της ιστικής αρχιτεκτονικής ανάλογη με τη συγκέντρωση και το χρόνο.

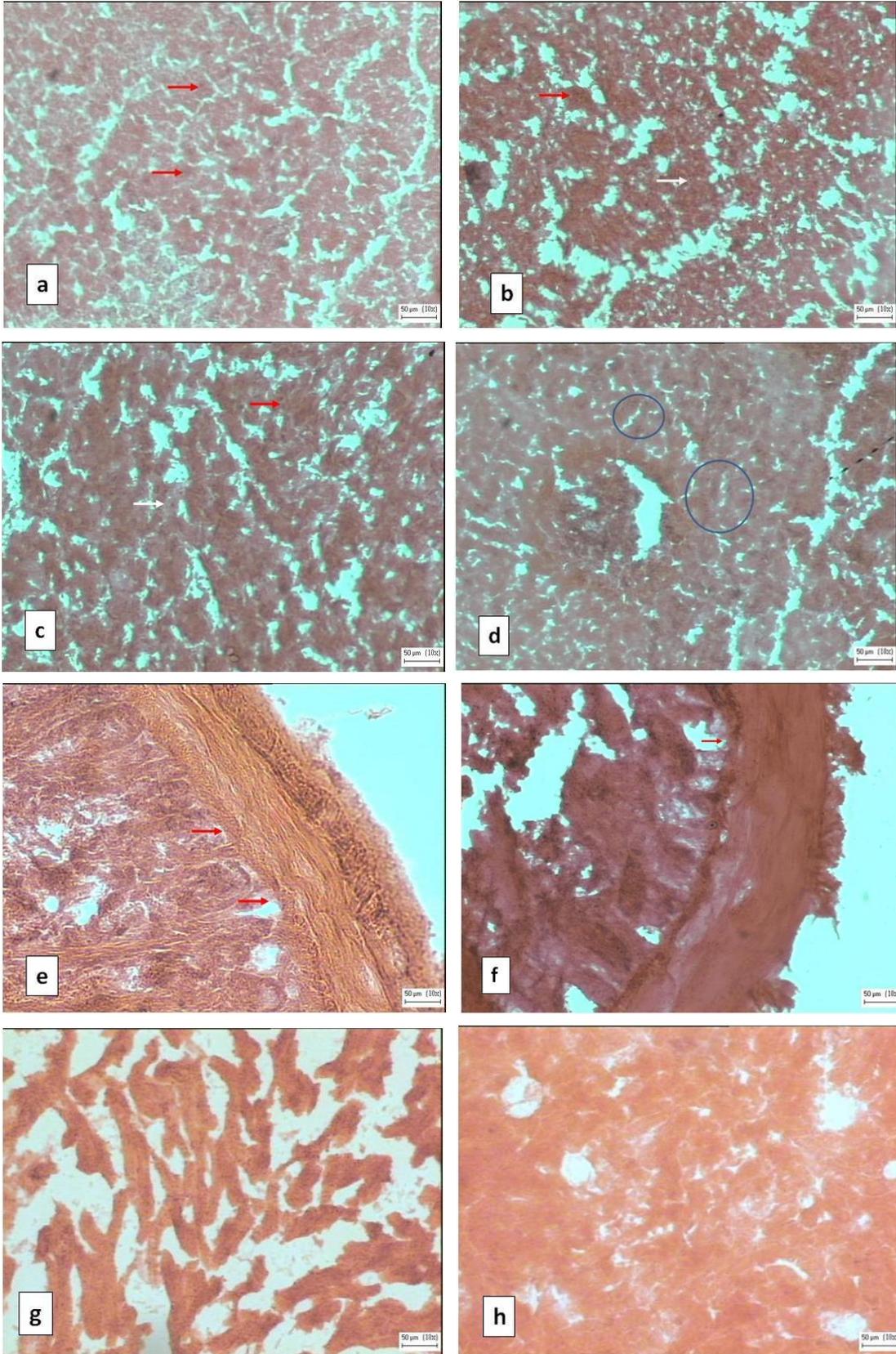
Για τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις των 20 και 39,4 mg/kg τροφής και κατά τη διάρκεια των 5 d της έκθεσής τους σε σιτηρέσιο που περιείχε methamidophos, παρατηρήθηκαν εστίες όπου τα κύτταρα απουσίαζαν, ιδιαίτερα στο φλοιό, και που δεν σχετίζονται με αγγεία. Παρατηρήθηκε η παρουσία πολλών κυττάρων με αποπτωτικούς ή υπερμεγέθεις πυρήνες αλλά και κύτταρα σε διαφορετικά στάδια της μίτωσης. Με την χορήγηση σιτηρεσίου απαλλαγμένου από το methamidophos για ακόμα 3 d, η μορφολογία του ιστού δεν διαφοροποιήθηκε ενώ σε κάποιες περιπτώσεις όμως ήταν ορατή η αποκατάσταση του ιστού (Εικ. 3.1-6).

Για τη μεσαία συγκέντρωση των 77,5 mg/kg τροφής και κατά τη διάρκεια των 5 d της συνεχής έκθεσής τους, έχουμε παρόμοια μορφολογία, σε σχέση με τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις, αλλά παρατηρήθηκαν περισσότερα κύτταρα σε ομάδες με πυκνωτικούς (αποπτωτικούς) πυρήνες ή υπερμεγέθεις πυρήνες (καρυομεγαλία) ή μεγάλα κύτταρα (κυτταρομεγαλία) και κύτταρα με πυρήνες σε διάφορα στάδια μιτωτικής διαίρεσης ενώ η σπογγειόμορφη αρχιτεκτονική (λόγω της απόπτωσης) συνοδευόταν συχνά και από ασθενέστερη χρώση. Με την χορήγηση καθαρού σιτηρεσίου, η μορφολογία του ιστού δεν διαφοροποιήθηκε.

Για τις υψηλότερες συγκεντρώσεις των 152,4 και 300 mg/kg και κατά τη διάρκεια των 5 d της συνεχής έκθεσής τους, στον εγκεφαλικό ιστό που παρελήφθη άμεσα μετά το θάνατο είχαμε παρόμοια μορφολογία, σε σχέση με τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις, αλλά παρατηρήθηκε αύξηση των σπογγειόμορφων αλλοιώσεων σε συνδυασμό με εστιακή διαφοροποίηση της χρώσης. Με την χορήγηση καθαρού σιτηρεσίου, η μορφολογία του ιστού δεν διαφοροποιήθηκε.

Εικ. 3.1-6: Τομές κρυστόμου, από εγκέφαλο, ήπαρ και δωδεκαδάκτυλο ορτυκιού από το πείραμα υποξείας τοξικότητας με methamidophos. Χρώση ηωσίνης / αιματοξυλίνης.

- a.** Εγκέφαλος, 77,5 mg/kg τροφής, ημέρα 1: Παρατηρείται ελαφρά διαταραχή της κυτταρικής ομοιογένειας καθώς και καρνομεγαλία (βέλη).
- b.** Εγκέφαλος, 15,4 mg/kg τροφής, ημέρα 2: Παρατηρείται σπογγειόμορφη απεικόνιση του ιστού. Επίσης παρατηρούνται καρνομεγαλία (κόκκινο βέλος) και πυρήνες σε μίτωση (άσπρο βέλος).
- c.** Εγκέφαλος, 39,4 mg/kg τροφής, ημέρα 2: Παρατηρείται κυτταρομεγαλία (άσπρο βέλος) και πυρήνες σε μίτωση (κόκκινο βέλος).
- d.** Εγκέφαλος, 39,4 mg/kg τροφής, ημέρα post+2: Οι κύκλοι περικελείουν περιοχές με αυξημένη μίτωση με στόχο την αποκατάσταση του ιστού.
- e.** Δωδεκαδάκτυλο, 300 mg/kg τροφής, ημέρα 1: Παρατηρούνται αλλοιώσεις στο βλεννογόνο (βέλη).
- f.** Δωδεκαδάκτυλο, 300 mg/kg τροφής, ημέρα 5: Παρατηρείται αλλοίωση στο βλεννογόνο (βέλος).
- g.** Ήπαρ, 77,5 mg/kg τροφής, ημέρα 1: Παρατηρείται συρρίκνωση των ηπατικών λόβιων με σημαντική αλλοίωση της ιστικής αρχιτεκτονικής.
- h.** Ήπαρ, 77,5 mg/kg τροφής, ημέρα 5: Παρατηρούνται περιορισμένες αλλοιώσεις στα ηπατικά λόβια.



3.1.2.3.1.2 Ιστοχημική ανίχνευση για την AChE

Η μεταχείριση για ανίχνευση για την AChE, είχε ως αποτέλεσμα τη χρώση των ιστών από ανοικτό έως σκούρο καφέ, στο κυτταρόπλασμα και τις αποφυάδες (δενδρίτες και νευρίτες), των νευρικών κυττάρων, αλλά όχι των πυρήνων, τη χρώση δεσμών νευρικών απολήξεων και μεγαλύτερων νεύρων.

Η χρήση της ASCh με τον παρεμποδιστή iso-OMPA έδωσε κύτταρα με έντονη θετική χρώση για την AChE, σε κοκκώδη υφή κυρίως στο κυτταρόπλασμα, συχνά πολύ κοντά στην κυτταροπλασματική μεμβράνη αλλά και στις κυτταρικές και πυρηνικές μεμβράνες. Στον μάρτυρα, παρατηρήθηκαν έντονα χρωσμένα κύτταρα στο φλοιό (περιφερειακή χρώση), και σε λίγες περιπτώσεις εσωτερικά στον εγκέφαλο του ορτυκιού, αλλά πολύ χαμηλότερης έντασης (Εικ. 3.1-7).

Μεταξύ των δόσεων παρατηρείται διαφοροποίηση της ποσοτικής αξιολόγησης της χρώσης (ένταση - σχετικό πληθυσμό - επιφανειακή κατανομή). Μεταξύ των ιστών που εξετάστηκαν σε διάφορες συγκεντρώσεις, δεν παρατηρήθηκε ποσοτική διαφοροποίηση στη χρώση. Ο ποσοτικός χαρακτηρισμός των χρωσμένων σε AChE νεύρων και νευρικών ινών ήταν πολύ αυξημένος από 95,4 έως 204.1% σε σύγκριση με τον μάρτυρα. Η αύξηση της ποσοτικής αξιολόγησης της χρώσης οφείλεται κυρίως στην αύξηση της επιφανειακής κάλυψης και λιγότερο της έντασης χρώσης και του σχετικού πληθυσμού των χρωσμένων κυττάρων (Πίνακας 3.1-29) (Εικ. 3.1-7).

Για τον μάρτυρα και τη χαμηλότερη συγκέντρωση των 20 mg/kg τροφής, η κατανομή της χρώσης χαρακτηρίστηκε κυρίως ως «Στενή περιφερειακή» ή «Περιφερειακή» ή ως «Περιφερειακή/Κεντρική» με το κεντρικό τμήμα να είναι χαμηλής έντασης για τις ημέρες 0-2. Για τις υπόλοιπες ημέρες της έκθεσης χαρακτηρίστηκε ως «Στενή περιφερειακή». Με την χορήγηση καθαρού σιτηρεσίου η κατανομή της χρώσης χαρακτηρίστηκε κυρίως ως «Στενή περιφερειακή» ή λιγότερο ως «Περιφερειακή».

Για τη χαμηλότερη συγκέντρωση των 39,4 mg/kg τροφής, η κατανομή της χρώσης χαρακτηρίστηκε κυρίως ως «Περιφερειακή» ή ως «Περιφερειακή/Κεντρική» για τις ημέρες 0-2 με το κεντρικό τμήμα να είναι χαμηλής έντασης για όλες τις υπόλοιπες ημέρες της έκθεσης και ως «Περιφερειακή» για τις υπόλοιπες ημέρες έκθεσης και με την χορήγηση καθαρού σιτηρεσίου.

Για τη μεσαία συγκέντρωση των 77,5 mg/kg τροφής, η κατανομή της χρώσης

χαρακτηρίστηκε κυρίως ως «Στενή Περιφερειακή» για τις ημέρες 0-2 και ως «Περιφερειακή/Κεντρική» για τις υπόλοιπες ημέρες της έκθεσης και με την χορήγηση καθαρού σιτηρεσίου. Σε άλλο δείγμα με την χορήγηση καθαρού σιτηρεσίου η κατανομή της χρώσης χαρακτηρίστηκε ως «Περιφερειακή».

Για τη μεσαία και την υψηλότερη συγκέντρωση των 152,4 mg/kg τροφής, η κατανομή της χρώσης χαρακτηρίστηκε κυρίως για τις ημέρες 0-2 ως «Περιφερειακή» ή ως «Περιφερειακή/Κεντρική». Για τις υπόλοιπες ημέρες της έκθεσης χαρακτηρίστηκε ως «Περιφερειακή/Κεντρική». Με την χορήγηση καθαρού σιτηρεσίου η κατανομή της χρώσης χαρακτηρίστηκε κυρίως ως «Περιφερειακή» πολλές φορές με το κεντρικό τμήμα να είναι χαμηλής έντασης.

Για την υψηλότερη συγκέντρωση των 300 mg/kg τροφής, η κατανομή της χρώσης χαρακτηρίστηκε ως «Περιφερειακή/Κεντρική» για τις ημέρες 0-2 και ως «Περιφερειακή» ή ως «Περιφερειακή/Κεντρική» για τις υπόλοιπες ημέρες της έκθεσης και με την χορήγηση καθαρού σιτηρεσίου (Πίνακας 3.1-29).

Πίνακας 3.1-29: Ιστοχημική ανίχνευση για την AChE σε εγκέφαλο ιαπωνικών ορνυκίων (*Coturnix coturnix japonica*) μετά από χρώση κατά Baker et al. (1986), όπως τροποποιήθηκε από τους Karnovsky and Roots (1964). Έγινε ιστολογική αξιολόγηση με κριτήρια έντασης χρώσης, σχετικού πληθυσμού χρωσμένων κυττάρων και επιφανειακής κατανομής της χρώσης καθώς και χωροταξικής κατανομής μετά από έκθεση σε διάφορες συγκεντρώσεις methamidophos (mg/kg τροφής). Η κάθε τιμή είναι ο ΜΟ μετρήσεων από 9-13 ορνύκια (ΜΟ ± SD). Η υποξεία τοξικότητα ελέγχθηκε σε εργαστηριακές συνθήκες (n=16 άτομα/ομάδα επέμβασης)

Methamidophos (mg/kg τροφής)	Ποσοτική έκφραση της AChE (Τιμές χρώσης) ¹			Γινόμενο (ένταση X πληθυσμού κατανομή) της έκφρασης της AChE (Τιμές χρώσης) ²	Χωροταξική κατανομή X επιφ. ποσοτικής	Χωροταξική κατανομή		
	Ένταση χρώσης (1-5)	Σχετικός πληθυσμός χρωσμένων κυττάρων (1-5)	Επιφαν. κατανομή χρώσης (1-3)			Ημέρες δειγματοληψίας	1	5
0								
20	2,61	3,80	1,91	18,3 ± 10,0				
39,4	2,70	4,16	2,55	31,5 ± 17,1 (71,7)				
77,5	2,90	4,50	2,27	31,1 ± 13,6 (69,5)				
152,4	2,67	4,05	2,76	30,0 ± 12,9 (63,8)				
300	3,44	4,35	2,80	41,3 ± 14,1 (125,4)				
	2,89	4,40	2,40	33,3 ± 19,1 (81,7)				

¹ Τα δεδομένα εκφράζονται ως ΜΟ των τομών κάθε ιστού

² Τα δεδομένα εκφράζονται ως ΜΟ των τομών κάθε ιστού ± SD. Η % διαφοροποίηση της ποσοτικής έκφρασης της χρώσης σε σύγκριση με τον μάρτυρα καταγράφεται μέσα στην παρένθεση ()

x Όλα τα άτομα είναι νεκρά

Εικ. 3.1-7: Τομές κρουτόμου, από εγκέφαλο ορτυκιού από το πείραμα υποξείας τοξικότητας με methamidophos. Ιστοχημικές χρώσεις εστερασών.

a. Ιστοχημική χρώση για την AChE, μάρτυρας: Παρατηρείται χρώση στο φλοιό του εγκεφάλου.

b. Ιστοχημική χρώση για την AChE, μεγέθυνση x 40. Η χρωστική στο νευρικό κύτταρο παρουσιάζει κοκκώδη υφή κυρίως στο κυτταρόπλασμα, κοντά στην κυτταροπλασματική μεμβράνη αλλά και στις κυτταρικές και πυρηνικές μεμβράνες.

c. Ιστοχημική χρώση για την AChE, 152,4 mg/kg τροφής, ημέρα 4: Παρατηρείται εκτεταμένη χρώση σε όλη την επιφάνεια των τομών.

d. Ιστοχημική χρώση για την BuChE, μάρτυρας: Παρατηρείται εκτεταμένη χρώση σε όλη την επιφάνεια των τομών σε αντίθεση με το πείραμα οξείας τοξικότητας (Εικ. 3.1-4d).

e. Ιστοχημική χρώση για την BuChE, μεγέθυνση x 40. Η χρωστική στο νευρικό κύτταρο παρουσιάζει κοκκώδη υφή συσχετιζόμενη με τις κυτταροπλασματικές μεμβράνες.

f. Ιστοχημική χρώση για την BuChE, 152,4 mg/kg τροφής, ημέρα 0: Σε αντίθεση με την **d.** η ένταση της χρώσης είναι σημαντικά μικρότερη.

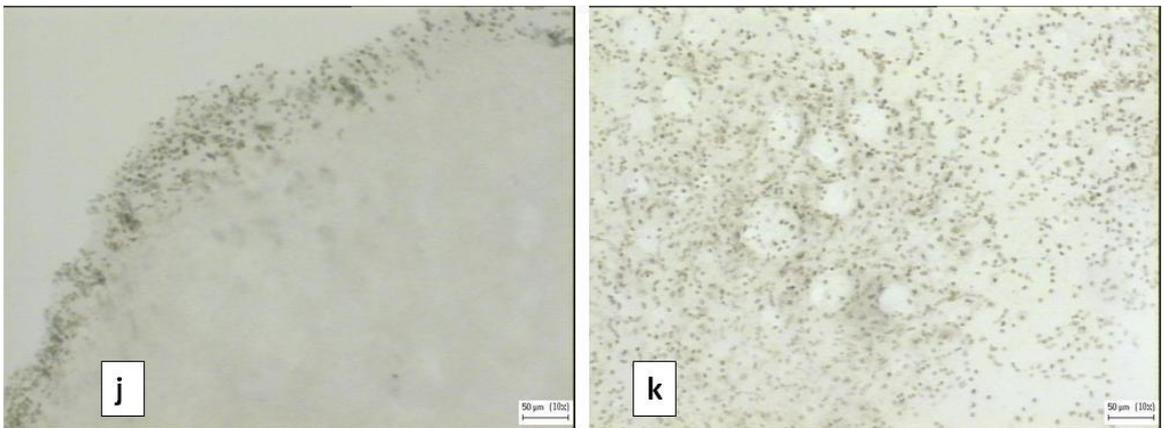
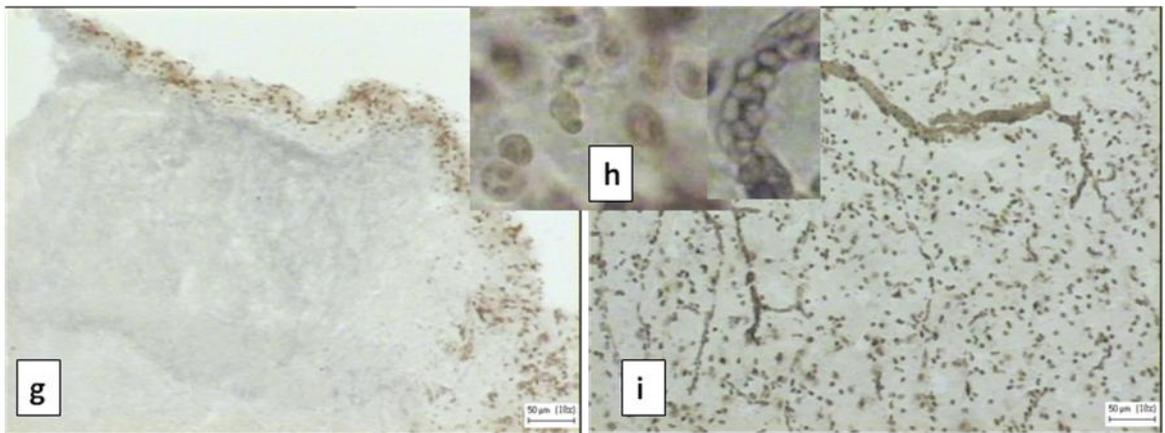
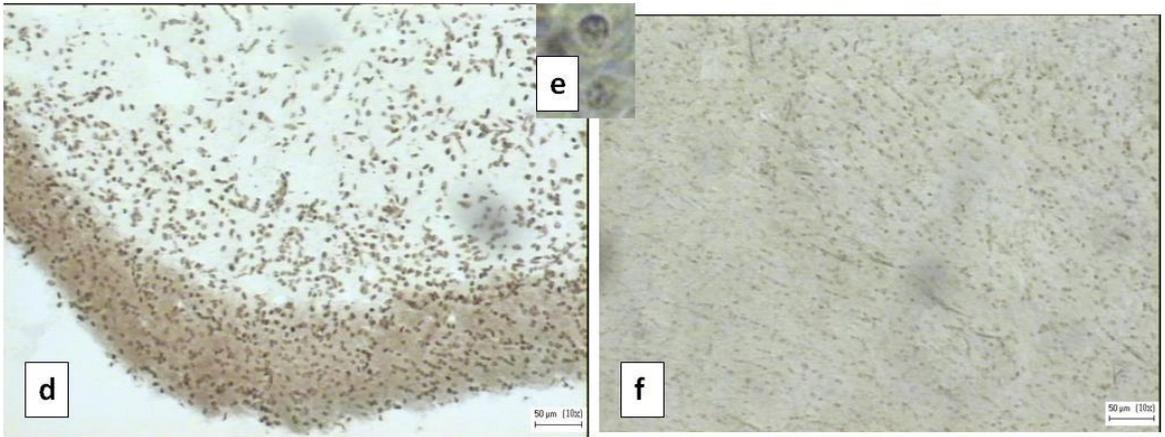
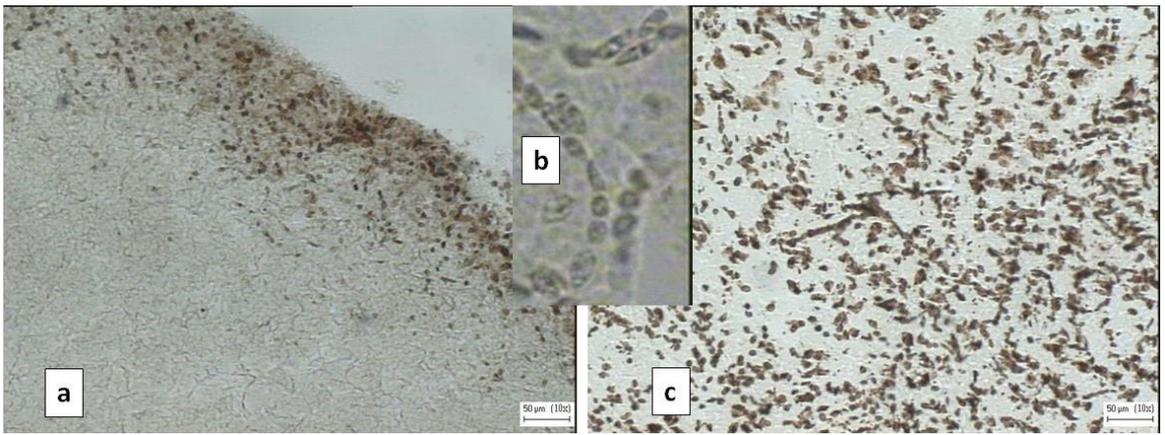
g. Ιστοχημική χρώση για ChEs που υδρολύουν την PrSCh, μάρτυρας: Παρατηρείται χρώση στο φλοιό του εγκεφάλου ανάλογα της AChE (**a.**).

h. Ιστοχημική χρώση για ChEs που υδρολύουν την PrSCh, μεγέθυνση x 40. Παρατηρείται χρώση στα ερυθρά αιμοσφαίρια, ενώ η χρωστική στο νευρικό κύτταρο είναι ανάλογη της BuChE.

i. Ιστοχημική χρώση για ChEs που υδρολύουν την PrSCh, 152,4 mg/kg τροφής, ημέρα 2: Παρατηρείται εκτεταμένη χρώση σε όλη την επιφάνεια των τομών.

j. Ιστοχημική χρώση για ChEs που υδρολύουν την PrSCh με παρεμποδιστές, μάρτυρας: Δεν παρατηρείται διαφοροποίηση από την **g.**

k. Ιστοχημική χρώση για ChEs που υδρολύουν την PrSCh με παρεμποδιστές, 300 mg/kg τροφής, ημέρα 5. Δεν παρατηρείται διαφοροποίηση από την **i.**



3.1.2.3.1.3 Χρώση για την BuChE

Η χρώση για την BuChE στο κύτταρο εμφανίζονταν στον πυρήνα και στο κυτταρόπλασμα σε κοκκώδη υφή, συχνά πιο έντονη από της AChE και συσχετιζόμενη με τις κυτταροπλασματικές μεμβράνες, όχι όμως για τις αποφυάδες (δενδρίτες και νευρίτες) των νευρικών κυττάρων, αλλά και τα νεύρα (Εικ. 3.1-7).

Παρατηρείται ουσιαστική διαφοροποίηση της χρώσης (ένταση - σχετικός πληθυσμός – επιφανειακή κατανομή) στις τομές του εγκεφάλου, μεταξύ των συγκεντρώσεων και του μάρτυρα. Στον μάρτυρα η χρώση για την BuChE, ήταν ορατή σε όλη την επιφάνεια του ιστού, όπου στην περίπτωση μεγάλου σχετικού πληθυσμού χρωσμένων κυττάρων παρουσιάζουν μέτριας έντασης κυρίως πυρηνική χρώση.

Η συνολική ποσοτική έκφραση της χρώσης ήταν πολύ υψηλότερη της αντίστοιχης για την AChE. Μεταξύ των συγκεντρώσεων, δεν παρατηρείται ποσοτική διαφοροποίηση της χρώσης. Ο ποσοτικός χαρακτηρισμός των χρωσμένων σε BuChE κυττάρων ήταν μειωμένος 45,3 έως 61,9% σε σύγκριση με τον μάρτυρα. Η ποσοτική μείωση της χρώσης οφείλεται κυρίως στην μείωση της έντασης και λιγότερο στην επιφανειακή κάλυψη της χρώσης (Πίνακας 3.1-30) (Εικ. 3.1-7).

Η χωροταξική κατανομή της χρώσης του ιστού στον μάρτυρα και σε όλες τις επεμβάσεις με methamidophos, χαρακτηρίστηκε κυρίως ως «Περιφερειακή/Κεντρική» για όλες τις ημέρες. Επιπροσθέτως για τη συγκέντρωση των 20 και 39,4 mg/kg τροφής, η κατανομή της χρώσης χαρακτηρίστηκε και μερικές φορές επιπροσθέτως ως «Τοπικά» για τις πρώτες ημέρες, για τη συγκέντρωση των 77,5 mg/kg τροφής ως «Κεντρική» για τις τελευταίες ημέρες, ενώ με την χορήγηση καθαρού σιτηρεσίου για τη συγκέντρωση των 20 mg/kg τροφής η κατανομή της χρώσης χαρακτηρίστηκε και ως «Στενή περιφερειακή». Επιπροσθέτως σε μερικές περιπτώσεις για την υψηλότερη συγκέντρωση των 300 mg/kg τροφής, δεν υπήρξε χρώση για τις πρώτες ημέρες της έκθεσης (Πίνακας 3.1-30).

Πίνακας 3.1-30: Ιστοχημική ανίχνευση για την BuChE σε εγκέφαλο ιαπωνικών ορτυκίων (*Coturnix coturnix japonica*) μετά από χρώση κατά Baker et al. (1986), όπως τροποποιήθηκε από τους Karnovsky and Roots (1964). Έγινε ιστολογική αξιολόγηση με κριτήρια έντασης χρώσης, σχετικού πληθυσμού χρωσμένων κυττάρων και επιφανειακής κατανομής της χρώσης καθώς και χωροταξικής κατανομής μετά από έκθεση σε διάφορες συγκεντρώσεις methamidophos (mg/kg τροφής). Η κάθε τιμή είναι ο MO μετρήσεων από 7-12 ορτύκια (MO \pm SD). Η υποξεία τοξικότητα ελέγχθηκε σε εργαστηριακές συνθήκες (n=16 άτομα/ομάδα επέμβασης)

Methamidophos (mg/kg τροφής)	Ποσοτική έκφραση της BuChE (Τιμές χρώσης) ¹			Γινόμενο (=ένταση X πληθυσμού κυττ. X επιφ. κατανομή) της ποσοτικής έκφρασης της BuChE (Τιμές χρώσης) ²	Χωροταξική κατανομή		
	Ένταση χρώσης (1-5)	Σχετικός πληθυσμός χρωσμένων κυττάρων (1-5)	Επιφαν. κατανομή χρώσης (1-3)		Ημέρες δειγματοληψίας		
					1	5	8
0	3,03	4,33	2,95	40,7 \pm 7,5	●	●	●
20	2,19	4,01	1,88	20,2 \pm 13,2 (-50,2)	●	●	○
39,4	1,92	4,21	2,54	22,0 \pm 9,5 (-46,0)	●	●	●
77,5	1,91	4,20	2,61	22,2 \pm 12,5 (-45,3)	●	●	●
152,4	2,15	3,89	2,56	21,4 \pm 9,8 (-47,4)	●	●	●
300	1,34	3,70	2,32	15,5 \pm 10,6 (-61,9)	○	●	●

¹ Τα δεδομένα εκφράζονται ως MO των τομών κάθε ιστού

² Τα δεδομένα εκφράζονται ως MO των τομών κάθε ιστού \pm SD. Η % διαφοροποίηση της ποσοτικής έκφρασης της χρώσης σε σύγκριση με τον μάρτυρα καταγράφεται μέσα στην παρένθεση ()

3.1.2.3.1.4 Χρώση ChEs που υδρολύουν την PrSCh

Η χρώση για ChEs που υδρολύουν την PrSCh δεν περιορίζονταν μόνο στα νευρικά κύτταρα αλλά επιπρόσθετα, και στα ερυθρά αιμοσφαίρια και σε τμήματα των τοιχωμάτων των αιμοφόρων αγγείων ενώ ήταν ανάλογη της BuChE αλλά όχι τόσο κοκκώδης. Επίσης ήταν εμφανής η ύπαρξη κυττάρων σε διάφορα στάδια μίτωσης. Ειδικότερα στα ερυθρά αιμοσφαίρια εμφανίζεται η χρώση στο κυτταρόπλασμα και στην κυτταρική μεμβράνη (Εικ. 3.1-7).

Η συνολική ποσοτική έκφραση της χρώσης, υπολογίστηκε στο 136,5% της αντίστοιχης για την AChE και το 61,6% της αντίστοιχης για την BuChE. Δεν παρατηρήθηκε ουσιαστική διαφοροποίηση της χρώσης (ένταση - σχετικός πληθυσμός - επιφανειακή κατανομή) στις τομές του εγκεφάλου, ανεξαρτήτως συγκέντρωσης και ημέρας δειγματοληψίας.

Στον μάρτυρα, έντονα χρωσμένα κύτταρα ήταν ορατά στις τομές αποκλειστικά στο φλοιό (περιφερειακή χρώση). Για όλες τις συγκεντρώσεις ο ποσοτικός χαρακτηρισμός της χρώσης έχει αυξηθεί, από 4,9-41,9% σε σύγκριση με τον μάρτυρα. Η αύξηση της χρώσης οφειλόταν αποκλειστικά στην αντίστοιχη διαφοροποίηση της επιφανειακής κατανομής των κυττάρων ενώ παρατηρήθηκε ελαφριά μείωση της

έντασης της χρώσης (Πίνακας 3.1-31).

Για τις τομές στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν επιπροσθέτως και οι δύο παρεμποδιστές των AChE και BuChE (BW284C51 και iso-OMPA), τα αποτελέσματα παραμένουν βασικά τα ίδια, αλλά με λιγότερη, μη ειδική, χρώση του υποστρώματος, ενώ η χρώση στα κύτταρα ήταν εμφανής περισσότερο στους πυρήνες (Εικ. 3.1-7).

Η χωροταξική κατανομή της χρώσης του ιστού στον μάρτυρα, χαρακτηρίστηκε αποκλειστικά ως «Στενή Περιφερειακή».

Για τη χαμηλότερη συγκέντρωση (20 mg/kg τροφής), η κατανομή της χρώσης χαρακτηρίστηκε από «Στενή Περιφερειακή» έως «Περιφερειακή/Κεντρική» για όλες τις ημέρες της έκθεσης και με την χορήγηση καθαρού σιτηρεσίου.

Για τη συγκέντρωση των 39,4 mg/kg τροφής, η κατανομή της χρώσης χαρακτηρίστηκε από «Στενή Περιφερειακή» έως «Περιφερειακή/Κεντρική» για τις πρώτες τις ημέρες της έκθεσης ενώ για τις τελευταίες χαρακτηρίστηκε ως «Περιφερειακή/Κεντρική». Με την χορήγηση καθαρού σιτηρεσίου η κατανομή της χρώσης χαρακτηρίστηκε κυρίως ως «Στενή Περιφερειακή» και «Περιφερειακή».

Για τη μεσαία συγκέντρωση (77,5 mg/kg τροφής), η κατανομή της χρώσης χαρακτηρίστηκε κυρίως από «Περιφερειακή» έως «Περιφερειακή/Κεντρική» για όλες τις ημέρες της έκθεσης και με την χορήγηση καθαρού σιτηρεσίου όπου επιπροσθέτως χαρακτηρίστηκε και «Στενή Περιφερειακή».

Για τις υψηλότερες συγκεντρώσεις των 152,4 και 300 mg/kg τροφής, η κατανομή της χρώσης χαρακτηρίστηκε κυρίως ως «Περιφερειακή/Κεντρική» για τις ημέρες της έκθεσης και της χορήγησης καθαρού σιτηρεσίου όπου επιπροσθέτως για την συγκέντρωση των 152,4 mg/kg τροφής χαρακτηρίστηκε και ως «Στενή Περιφερειακή» (Πίνακας 3.1-31).

Πίνακας 3.1-31: Ιστοχημική ανίχνευση για ChEs που υδρολύουν την PrSCh σε εγκέφαλο ιαπωνικών ορνυκίων (*Coturnix coturnix japonica*) μετά από χρώση κατά Baker et al. (1986), όπως τροποποιήθηκε από τους Karnovsky and Roots (1964). Έγινε ιστολογική αξιολόγηση με κριτήρια έντασης χρώσης, σχετικού πληθυσμού χρωσμένων κυττάρων και επιφανειακής κατανομής της χρώσης καθώς και χωροταξικής κατανομής μετά από έκθεση σε διάφορες συγκεντρώσεις methamidophos (mg/kg τροφής). Η κάθε τιμή είναι ο MO μετρήσεων από 8-12 ορνύκια (MO \pm SD). Η υποξεία τοξικότητα ελέγχθηκε σε εργαστηριακές συνθήκες (n=16 άτομα/ομάδα επέμβασης)

Methamidophos (mg/kg τροφής)	Ποσοτική έκφραση ChE που υδρολύουν την PrSCh (Τιμές χρώσης) ¹			Γινόμενο (=ένταση X πληθυσμού κυττ. X επιφ. κατανομή) της ποσοτικής έκφρασης ChE που υδρολύουν την PrSCh (Τιμές χρώσης) ²	Χωροταξική κατανομή		
	Ένταση χρώσης (1-5)	Σχετικός πληθυσμός χρωσμένων κυττάρων (1-5)	Επιφαν. κατανομή χρώσης (1-3)		Ημέρες δειγματοληψίας		
					1	5	8
0	3,97	4,25	1,43	25,0 \pm 18,0			
20	3,06	4,48	2,31	33,2 \pm 10,5 (32,7)			
39,4	3,40	4,37	1,68	26,2 \pm 10,9 (4,9)			
77,5	3,08	4,46	2,01	27,2 \pm 8,6 (8,5)			
152,4	3,24	4,29	2,11	30,5 \pm 15,5 (21,9)			
300	3,01	4,46	2,58	35,5 \pm 16,1 (41,9)			

¹ Τα δεδομένα εκφράζονται ως MO των τομών κάθε ιστού

² Τα δεδομένα εκφράζονται ως MO των τομών κάθε ιστού \pm SD. Η % διαφοροποίηση της ποσοτικής έκφρασης της χρώσης σε σύγκριση με τον μάρτυρα καταγράφεται μέσα στην παρένθεση ()

3.1.2.3.2 Δωδεκαδάκτυλο

3.1.2.3.2.1 Χρώση Ηωσίνης – Αιματοζυλίνης

Η επίδραση του methamidophos στο δωδεκαδάκτυλο του ιαπωνικού ορτυκιού διέφερε μεταξύ του μάρτυρα και των επεμβάσεων για την περίοδο των 8 d, υποδεικνύοντας διαταραχή της ιστικής αρχιτεκτονικής ανάλογη με την αύξηση της συγκέντρωσης και του χρόνου.

Σε σύγκριση με το μάρτυρα δεν παρατηρήθηκαν σοβαρές αλλοιώσεις στην μορφολογία του τοιχώματος του δωδεκαδάκτυλου στις χαμηλότερες συγκεντρώσεις για τις 5 d της έκθεσης, με εξαίρεση κάποιες αλλοιώσεις στο βλεννογόνο (διαταραχή της συνέχειας χωρίς διήθηση στη βασική μεμβράνη) στη συγκέντρωση των 39,4 mg/kg τροφής. Με την χορήγηση καθαρού σιτηρεσίου, η μορφολογία του ιστού δεν διαφοροποιείται από τον μάρτυρα και είναι φυσιολογική.

Στη μεσαία συγκέντρωση των 77,5 mg/kg τροφής, η διακοπή της συνέχειας του βλεννογόνου (απουσία κυττάρων) ήταν περισσότερο εμφανής. Με την χορήγηση καθαρού σιτηρεσίου οι αλλοιώσεις στον βλεννογόνο αποκαταστάθηκε. Σημαντική ήταν η παρατήρηση αυξημένης διήθησης μακροφάγων στο χόριο των εντερικών λαχνών στις χαμηλότερες συγκεντρώσεις που σταδιακά περιοριζόταν όταν η συγκέντρωση του methamidophos αυξανόταν.

Στις υψηλότερες συγκεντρώσεις εφαρμογής για τις 5 d της έκθεσης, οι αλλοιώσεις στον βλεννογόνο ήταν εντονότερες, ορατές σαν πιο εκτεταμένη απουσία επιθηλιακών κυττάρων όχι μόνο στις εντερικές λάχνες αλλά και στο επίπεδο των κρυπών. Σε αρκετές περιπτώσεις η «απογυμνωμένη» βασική μεμβράνη ήταν ιδιαίτερος εμφανής ενώ με τη χορήγηση καθαρού σιτηρεσίου οι αλλοιώσεις δεν αποκαταστάθηκαν (Εικ. 3.1-6).

3.1.2.3.2.2 Ιστοχημική ανίχνευση για την AChE

Η χρώση για την AChE παρατηρήθηκε στο κυτταρόπλασμα των εντερικών νευρικών κυττάρων, όχι όμως και στον πυρήνα, αλλά και τις νευρικές απολήξεις στα εντερικά πλέγματα. Η χρώση στο κύτταρο εμφανιζόταν σε έντονα κοκκώδη μορφή στο κυτταρόπλασμα συσχετιζόμενη με τις κυτταροπλασματικές μεμβράνες κυρίως στα γάγγλια (μυεντερικό και υποβλεννογόνιο πλέγμα) και στις λάχνες του εντερικού πλέγματος. Η συνολική έκφραση της χρώσης είναι πολύ χαμηλή και υπολογίστηκε σε 15,4 και 9,2% της αντίστοιχης που υπολογίστηκε για την BuChE και την ChE που υδρολύει την PrSCh, όπως παρουσιάζεται κατωτέρω (Εικ 3.1-8).

Η χρώση για τη χαμηλότερη συγκέντρωση είχε ανάλογη έκφραση για AChE σε σχέση με τον μάρτυρα, ανεξαρτήτως συγκέντρωσης και ημέρας δειγματοληψίας. Για τις υπόλοιπες συγκεντρώσεις η χρώση κατέδειξε υψηλότερες τιμές από τον μάρτυρα που οφείλεται κυρίως στην αύξηση της έντασης της χρώσης (Πίνακας 3.1-32).

Πίνακας 3.1-32: Ιστοχημική ανίχνευση για την AChE σε δωδεκαδάκτυλο ιαπωνικών ορνυκίων (*Coturnix coturnix japonica*) μετά από χρώση κατά Baker et al. (1986), όπως τροποποιήθηκε από τους Karnovsky and Roots (1964). Έγινε ιστολογική αξιολόγηση με κριτήρια έντασης χρώσης, σχετικού πληθυσμού χρωσμένων κυττάρων και επιφανειακής κατανομής της χρώσης καθώς και χωροταξικής κατανομής μετά από έκθεση σε διάφορες συγκεντρώσεις methamidophos (mg/kg τροφής). Η κάθε τιμή είναι ο MO μετρήσεων από 5-9 ορνύκια (MO \pm SD). Η υποξεία τοξικότητα ελέγχθηκε σε εργαστηριακές συνθήκες (n=16 άτομα/ομάδα επέμβασης)

Methamidophos (mg/kg τροφής)	Ποσοτική έκφραση της AChE (Τιμές χρώσης)			Γινόμενο (=ένταση X πληθυσμού κυττ. X επιφ. κατανομή) της ποσοτικής έκφρασης της AChE (Τιμές χρώσης) ²	Χωροταξική κατανομή		
	Ένταση χρώσης (1-5)	Σχετικός πληθυσμός χρωσμένων κυττάρων (1-5)	Επιφαν. κατανομή χρώσης (1-3)		Ημέρες δειγματοληψίας		
					1	5	8
0							
20	1,92	1,33	1,52	4,1	\pm	4,5	
39,4	1,42	0,25	0,79	3,3	\pm	3,5	()
77,5	2,15	1,71	1,56	8,9	\pm	10,8	()
152,4	2,93	1,46	1,43	10,8	\pm	10,9	()
300	2,50	2,20	2,40	16,3	\pm	12,3	()
	2,79	1,59	1,52	9,2	\pm	8,0	()

¹ Τα δεδομένα εκφράζονται ως MO των τομών κάθε ιστού

² Τα δεδομένα εκφράζονται ως MO των τομών κάθε ιστού \pm SD

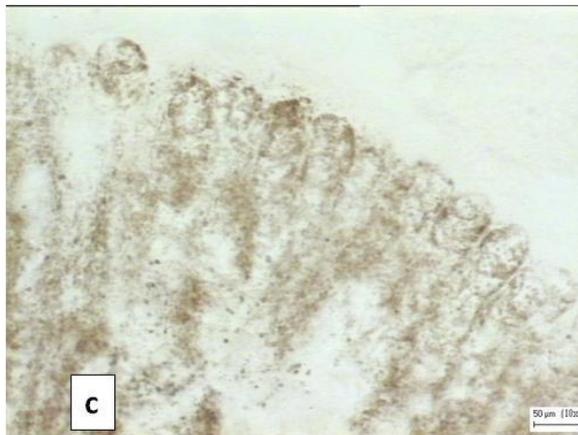
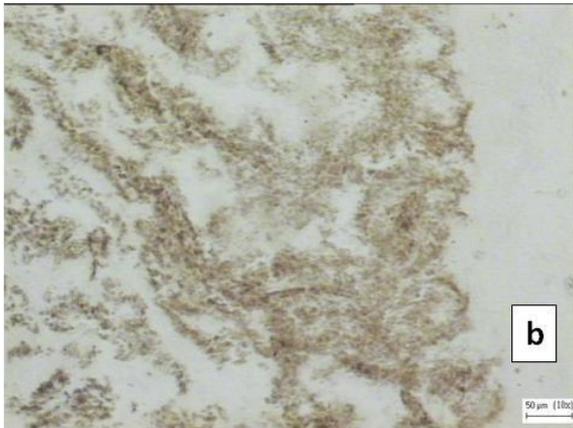
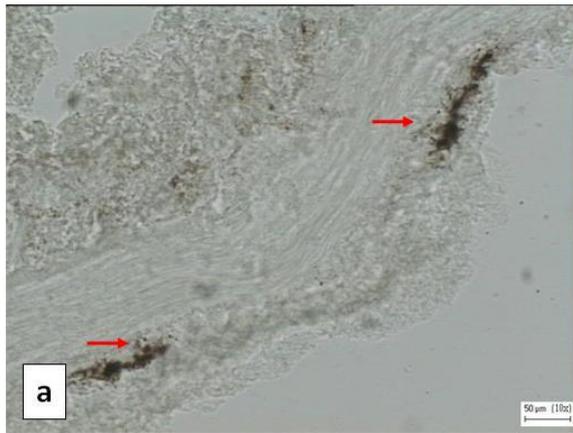
∅ Δεν υπάρχει χωροταξική κατανομή, οι τομές λήφθηκαν από το μέσον του ιστού.

Εικ. 3.1-8: Τομές κρουτομού, από δωδεκαδάκτυλο ορτυκιού από το πείραμα υποξείας τοξικότητας με methamidophos. Ιστοχημικές χρώσεις εστερασών.

a. Ιστοχημική χρώση για την AChE, 77,5 mg/kg τροφής, ημέρα 5 (νεκρό πτηνό): Παρατηρείται χρώση σε υποβλεννογόνια γάγγλια (βέλη), ανάλογη του μάρτυρα.

b. Ιστοχημική χρώση για την BuChE, 39,4 mg/kg τροφής, ημέρα post +2: Παρατηρείται χρώση παντού εκτός από τα γάγγλια, τα νεύρα και τους μυϊκούς χιτώνες του εντερικού πλέγματος.

c. Ιστοχημική χρώση για ChEs που υδρολύουν την PrSCh, 152,4 mg/kg τροφής, ημέρα 5: Παρατηρείται χρώση παντού ανάλογη της BuChE αλλά σε αντίθεση με αυτή και κυττάρων γαγγλίων.



3.1.2.3.2.3 Χρώση για την BuChE

Στην χρώση για την BuChE διακρίνονταν πολλά θετικά κύτταρα τα οποία ήταν ορατά παντού, σχηματίζοντας χαρακτηριστικές καστανές ζώνες (π.χ. αγγεία αίματος, επιθηλιακά κύτταρα, συνδετικός ιστός, αδένες) εκτός από τα γάγγλια, τα νεύρα και τους μυϊκούς χιτώνες του εντερικού πλέγματος. Η χρώση στο κύτταρο ήταν κοκκώδης, πιο πολύ από την AChE, και εμφανίζονταν στο κυτταρόπλασμα και τις κυτταρικές μεμβράνες (Εικ. 3.1-8).

Η χρώση για την BuChE σε όλες τις συγκεντρώσεις είχε ανάλογη ή αυξημένη έκφραση 4,3-41,3% σε σχέση με τον μάρτυρα, κατά ΜΟ ενώ από την ημέρα 6, με την χορήγηση καθαρού σιτηρεσίου, κυρίως για τη μεσαία και τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις η ένταση της χρώσης είναι αυξημένη. Η αύξηση της χρώσης οφείλεται κυρίως στην αύξηση της επιφανειακής κάλυψης της χρώσης (Πίνακας 3.1-33).

Πίνακας 3.1-33: Ιστοχημική ανίχνευση για την BuChE σε δωδεκαδάκτυλο ιαπωνικών ορνυκίων (*Coturnix coturnix japonica*) μετά από χρώση κατά Baker et al. (1986), όπως τροποποιήθηκε από τους Karnovsky and Roots (1964). Έγινε ιστολογική αξιολόγηση με κριτήρια έντασης χρώσης, σχετικού πληθυσμού χρωσμένων κυττάρων και επιφανειακής κατανομής της χρώσης καθώς και χωροταξικής κατανομής μετά από έκθεση σε διάφορες συγκεντρώσεις methamidophos (mg/kg τροφής). Η κάθε τιμή είναι ο ΜΟ μετρήσεων από 5-10 ορνύκια (ΜΟ ± SD). Η υποξεία τοξικότητα ελέγχθηκε σε εργαστηριακές συνθήκες (n=16 άτομα/ομάδα επέμβασης)

Methamidophos (mg/kg τροφής)	Ποσοτική έκφραση της BuChE (Τιμές χρώσης) ¹			Γινόμενο (=ένταση X πληθυσμού κυττ. X επιφ. κατανομή) της ποσοτικής έκφρασης της BuChE (Τιμές χρώσης) ²	Χωροταξική κατανομή		
	Ένταση χρώσης (1-5)	Σχετικός πληθυσμός χρωσμένων κυττάρων (1-5)	Επιφαν. κατανομή χρώσης (1-3)		Ημέρες δειγματοληψίας		
					1	5	8
0	3,65	3,55	2,00	26,6 ± 13,4			
20	3,43	3,19	2,83	30,0 ± 18,7 (12,8)			
39,4	3,28	3,36	2,83	33,2 ± 17,9 (24,5)			∅
77,5	3,11	3,22	2,56	27,8 ± 18,7 (4,3)			
152,4	3,88	3,70	2,40	37,6 ± 22,7 (41,3)			
300	2,79	3,29	2,71	29,2 ± 20,6 (9,8)			

¹ Τα δεδομένα εκφράζονται ως ΜΟ των τομών κάθε ιστού

² Τα δεδομένα εκφράζονται ως ΜΟ των τομών κάθε ιστού ± SD. Η % διαφοροποίηση της ποσοτικής έκφρασης της χρώσης σε σύγκριση με τον μάρτυρα καταγράφεται μέσα στην παρένθεση ()
∅ Δεν υπάρχει χωροταξική κατανομή, οι τομές λήφθηκαν από το μέσον του ιστού.

3.1.2.3.2.4 Χρώση ChEs που υδρολύουν την PrSCh

Στην χρώση για ChEs που υδρολύουν την PrSCh διακρίνονται πολλά θετικά κύτταρα τα οποία είναι ορατά παντού, ανάλογα με της BuChE, συμπεριλαμβανομένων όμως των γάγγλιων και των νεύρων, εκτός από τους μυϊκούς χιτώνες του εντερικού πλέγματος. Η χρώση στο κύτταρο ήταν πιο κοκκώδη από της BuChE, στο κυτταρόπλασμα και τις κυτταρικές μεμβράνες ενώ διατάσσονταν σειρά, χωρίς απαραίτητα τα θετικώς χρωσμένα κύτταρα να βρίσκονται σε επαφή. Η συνολική έκφραση της χρώσης με αυτό το υπόστρωμα, είναι η υψηλότερη για τον δωδεκαδάκτυλο και υπολογίστηκε στο 167,2% της αντίστοιχης που υπολογίστηκε για την BuChE (Εικ. 3.1-8).

Η χρώση για ChEs που υδρολύουν την PrSCh σε όλες τις συγκεντρώσεις είχε μειωμένη έκφραση (11,8-30,3%) σε σχέση με τον μάρτυρα, κατά MO ανεξαρτήτως ημέρας δειγματοληψίας. Η μείωση της χρώσης οφείλονταν κυρίως στην μείωση του σχετικού πληθυσμού των χρωσμένων κυττάρων (Πίνακας 3.1-34).

Για τις τομές στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν και οι δύο παρεμποδιστές (BW284C51 και iso-OMPA), ως θετικός μάρτυρας της ιστοχημείας της PrSCh, δεν παρατηρήθηκε καθόλου χρώση.

Πίνακας 3.1-34: Ιστοχημική ανίχνευση για ChE που υδρολύουν την PrSCh σε δωδεκαδάκτυλο ιαπωνικών ορνυκίων (*Coturnix coturnix japonica*) μετά από χρώση κατά Baker et al. (1986), όπως τροποποιήθηκε από τους Karnovsky and Roots (1964). Έγινε ιστολογική αξιολόγηση με κριτήρια έντασης χρώσης, σχετικού πληθυσμού χρωσμένων κυττάρων και επιφανειακής κατανομής της χρώσης καθώς και χωροταξικής κατανομής μετά από έκθεση σε διάφορες συγκεντρώσεις methamidophos (mg/kg τροφής). Η κάθε τιμή είναι ο MO μετρήσεων από 5-10 ορνύκια (MO ± SD). Η υποξεία τοξικότητα ελέγχθηκε σε εργαστηριακές συνθήκες (n=16 άτομα/ομάδα επέμβασης)

Methamidophos (mg/kg τροφής)	Ποσοτική έκφραση ChE που υδρολύουν την PrSCh (Τιμές χρώσης) ¹			Γινόμενο (=ένταση X πληθυσμού κυττ. X επιφ. κατανομή) της ποσοτικής έκφρασης ChE που υδρολύουν την PrSCh (Τιμές χρώσης) ²	Χωροταξική κατανομή		
	Ένταση χρώσης (1-5)	Σχετικός πληθυσμός χρωσμένων κυττάρων (1-5)	Επιφαν. κατανομή χρώσης (1-3)		Ημέρες δειγματοληψίας		
					1	5	8
0	3,50	4,17	3,00	44,5 ± 15,4			
20	3,33	3,83	3,00	39,3 ± 15,0 (-11,8)			
39,4	3,25	3,75	3,00	36,4 ± 10,1 (-18,3)			
77,5	3,27	3,82	2,64	31,0 ± 13,7 (-30,3)			
152,4	3,55	3,82	2,68	38,8 ± 19,2 (-12,9)			
300	3,38	3,80	3,00	31,4 ± 16,8 (-29,4)			∅

¹ Τα δεδομένα εκφράζονται ως MO των τομών κάθε ιστού

² Τα δεδομένα εκφράζονται ως MO των τομών κάθε ιστού ± SD. Η % διαφοροποίηση της ποσοτικής έκφρασης της χρώσης σε σύγκριση με τον μάρτυρα καταγράφεται μέσα στην παρένθεση ()

∅ Δεν υπάρχει χωροταξική κατανομή, οι τομές λήφθησαν από το μέσον του ιστού.

3.1.2.3.3 Ήπαρ

3.1.2.3.3.1 Χρώση Ηωσίνης – Αιματοζυλίνης

Η επίδραση του methamidophos στον ήπαρ του ιαπωνικού ορτυκιού διέφερε στον μάρτυρα και τις επεμβάσεις για την περίοδο των 8 d, υποδεικνύοντας διαταραχή της ιστικής αρχιτεκτονικής αναλόγως της συγκέντρωσης και του χρόνου.

Στις χαμηλότερες συγκεντρώσεις των 20 και 39,4 mg/kg τροφής και κατά τη διάρκεια των 5 d της έκθεσής τους, παρατηρήθηκαν περιορισμένες αλλοιώσεις στα ηπατικά λόβια που προσδιορίζονται κυρίως σε ελαφριά συρρίκνωση του κυτταροπλάσματος ή σε κάποιες περιπτώσεις παρουσία υπερμεγεθών πυρήνων στα ηπατικά κύτταρα περιφερικά της κεντρολόβιας φλέβας. Με την χορήγηση καθαρού σιτηρεσίου, παρατηρήθηκε τοπικά αποκατάσταση της ιστικής αρχιτεκτονική χωρίς να απουσιάζουν οι εστιακές αλλοιώσεις που περιγράφονται ανωτέρω.

Στη μεσαία συγκέντρωση των 77,5 mg/kg τροφής, κατά τη διάρκεια των 5 d της έκθεσής τους, η διαταραχή της ιστικής αρχιτεκτονικής ήταν εντονότατη με εκτεταμένες σπογγειόμορφες αλλοιώσεις και ανομοιογενή ηπατικά λόβια χωρίς να διαφοροποιηθεί σημαντικά με την χορήγηση καθαρού σιτηρεσίου με εξαίρεση την παρουσία διάσπαρτων φαγοκυτταρικών εγκλείστων στα ηπατικά κύτταρα.

Οι παρατηρήσεις που έγιναν για τη μεσαία συγκέντρωση ισχύουν και για τις υψηλότερες συγκεντρώσεις των 152,4 και 300 mg/kg τροφής όπου η διαταραχή της αρχιτεκτονικής του ήπατος ήταν δραματική αφού παρατηρήθηκαν εστίες έντονης μιτωτικής (αναγεννητικής) δραστηριότητας του ηπατικού παρεγχύματος. Η μορφολογία αυτή δεν διαφοροποιήθηκε σημαντικά με την χορήγηση καθαρού σιτηρεσίου με εξαίρεση την παρουσία εκτεταμένων φαγοκυτταρικών εγκλείστων στα ηπατικά κύτταρα (Εικ. 3.1-6).

3.1.2.3.3.2 Ιστοχημική ανίχνευση για την AChE

Η χρώση για την AChE παρατηρήθηκε σε σπάνιες περιπτώσεις σε όλες τις μεταχειρίσεις μερικές φορές σε κοκκώδη μορφή συσχετιζόμενη με τις κυτταρικές μεμβράνες των ηπατικών κυττάρων. Δεν πραγματοποιήθηκε περαιτέρω ανάλυση αφού η συνολική ποσοτική έκφραση της χρώσης ήταν πάρα πολύ χαμηλή και στις περισσότερες περιπτώσεις μηδενική (Πίνακας 3.1-35) (Εικ. 3.1-9).

Πίνακας 3.1-35: Ιστοχημική ανίχνευση για την AChE σε ήπαρ ιαπωνικών ορνυκίων (*Coturnix coturnix japonica*) μετά από χρώση κατά Baker et al. (1986), όπως τροποποιήθηκε από τους Karnovsky and Roots (1964). Έγινε ιστολογική αξιολόγηση με κριτήρια έντασης χρώσης, σχετικού πληθυσμού χρωσμένων κυττάρων και επιφανειακής κατανομής της χρώσης καθώς και χωροταξικής κατανομής μετά από έκθεση σε διάφορες συγκεντρώσεις methamidophos (mg/kg τροφής). Η κάθε τιμή είναι ο MO μετρήσεων από 4-12 ορνύκια (MO \pm SD). Η υποξεία τοξικότητα ελέγχθηκε σε εργαστηριακές συνθήκες (n=16 άτομα/ομάδα επέμβασης)

Methamidophos (mg/kg τροφής)	Ποσοτική έκφραση της AChE (Τιμές χρώσης) ¹			Γινόμενο (=ένταση X πληθυσμού κυττ. X επιφ. κατανομή) της ποσοτικής έκφρασης της AChE (Τιμές χρώσης) ²	Χωροταξική κατανομή Ημέρες δειγματοληψίας		
	Ένταση χρώσης (1-5)	Σχετικός πληθυσμός χρωσμένων κυττάρων (1-5)	Επιφαν. κατανομή χρώσης (1-3)		1	5	8
0	0,00	0,00	0,00	0,0 \pm			
20	0,11	0,06	0,33	0,2 \pm 0,5 ()			
39,4	0,14	0,01	0,43	0,04 \pm 0,1 ()			
77,5	0,20	0,25	0,57	0,7 \pm 1,7 ()			
152,4	0,09	0,09	0,27	0,2 \pm 0,8 ()			
300	0,00	0,00	0,00	0,0 \pm ()			

¹ Τα δεδομένα εκφράζονται ως MO των τομών κάθε ιστού

² Τα δεδομένα εκφράζονται ως MO των τομών κάθε ιστού \pm SD.

Εικ. 3.1-9: Τομές κρυοτόμου, από ήπαρ ορτυκιού από το πείραμα υποξείας τοξικότητας με methamidophos. Ιστοχημικές χρώσεις εστερασών.

a. Ιστοχημική χρώση για την AChE, 152,4 mg/kg τροφής, ημέρα 14: Παρατηρούνται θετικά ως προς την AChE κύτταρα διάσπαρτα στην επιφάνεια της τομής.

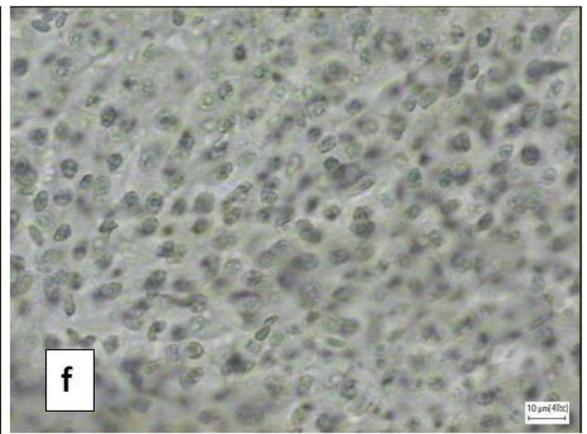
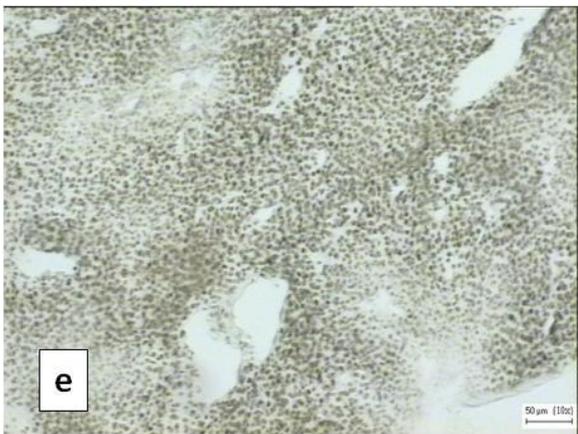
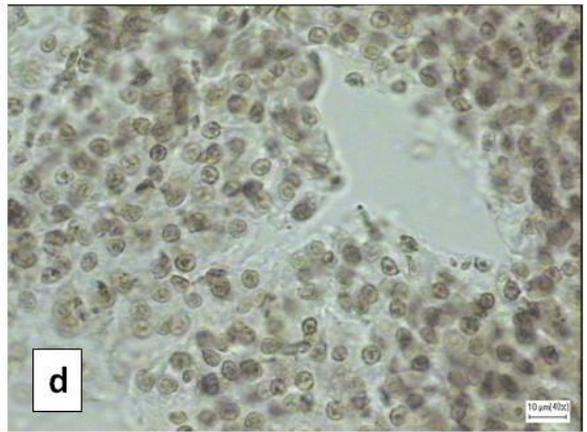
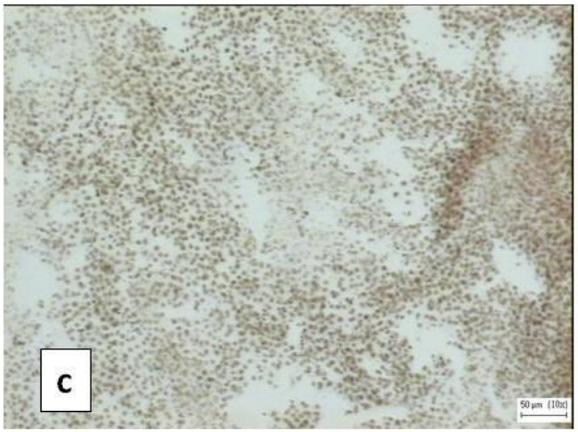
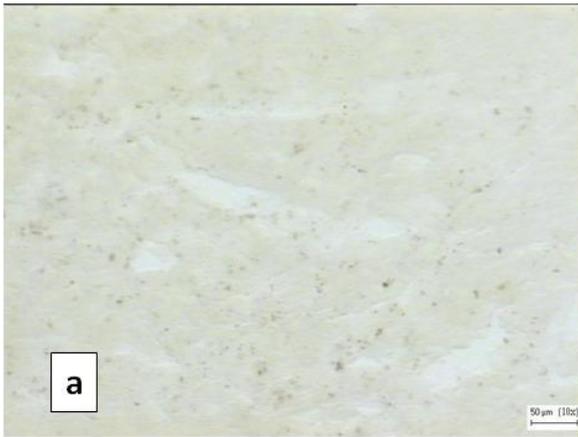
b. Ιστοχημική χρώση για την AChE, μεγέθυνση x 40. Παρατηρείται χρώση σε κοκκώδη μορφή συσχετιζόμενη με τις κυτταρικές μεμβράνες των ηπατικών κυττάρων.

c. Ιστοχημική χρώση για την BuChE, 20 mg/kg τροφής, ημέρα 0: Παρατηρείται εκτεταμένη χρώση σημαντικά περισσότερη από της AChE (**a.**).

d. Ιστοχημική χρώση για την BuChE, μεγέθυνση x 40. Η χρώση στο κύτταρο εμφανίζονταν κυρίως στις κυτταροπλασματικές μεμβράνες και σε μικρότερο βαθμό στο κυτταρόπλασμα.

e. Ιστοχημική χρώση για ChEs που υδρολύουν την PrSCh, 20 mg/kg τροφής, ημέρα 0: Παρατηρείται εκτεταμένη χρώση σε όλη την επιφάνεια της τομής ανάλογη της BuChE (**c.**).

f. Ιστοχημική χρώση για ChEs που υδρολύουν την PrSCh, μεγέθυνση x 40. Δεν παρατηρείται διαφοροποίηση από την BuChE (**d.**).



3.1.2.3.3.3 Χρώση για την BuChE

Στην χρώση για την BuChE διακρίνονταν πολλά θετικά κύτταρα τα οποία ήταν ορατά παντού, τόσο στα ηπατικά κύτταρα όσο και στο αγγειακό σύστημα. Η χρώση στο κύτταρο, πιο πολύ κοκκώδη στα αγγεία, εμφανίζονταν κυρίως στις κυτταροπλασματικές μεμβράνες και σε μικρότερο βαθμό στο κυτταρόπλασμα (Εικ. 3.1-9).

Η χρώση για την BuChE στην χαμηλότερη συγκέντρωση των 20 mg/kg τροφής, είχε ελαφρώς αυξημένη έκφραση, 19,8% σε σχέση με τον μάρτυρα, αντίθετα όμως για τη συγκέντρωση των 39,4 mg/kg τροφής, η χρώση είχε ελαφρώς μειωμένη έκφραση, 23,1% σε σχέση με τον μάρτυρα, ανεξαρτήτως ημέρας δειγματοληψίας. Για τις υπόλοιπες συγκεντρώσεις των 77,5, 152,4 και 300 mg/kg τροφής, η χρώση ήταν μειωμένη κατά 58,6-63,2%, σε σύγκριση με τον μάρτυρα. Για την συγκέντρωση των 152,4 mg/kg τροφής, η μείωση της χρώσης είναι έντονη από την ημέρα 4 μέχρι το τέλος του πειραματισμού (Πίνακας 3.1-36) (Εικ. 3.1-9).

Η χωροταξική κατανομή της χρώσης του ιστού για τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις όπως και για τον μάρτυρα, χαρακτηρίστηκε ως «Περιφερειακή/Κεντρική», ανεξαρτήτως χρόνου δειγματοληψίας ενώ για τη μεσαία συγκέντρωση, τις πρώτες ημέρες και με τη χορήγηση του καθαρού σιτηρεσίου, χαρακτηρίστηκε ως «Περιφερειακή/Κεντρική», ενώ για ημέρες 4-5 επίσης και ως «Στενή Περιφερειακή». Για τις υψηλότερες συγκεντρώσεις, φαίνεται κυρίως να λείπει η χρώση από πολλά επίπεδα των ιστών, την ημέρα 4 και 5 για την συγκέντρωση των 152,4 mg/kg τροφής, ενώ για τα 300 mg/kg τροφής, από την 1^η ημέρα. Σε λίγες περιπτώσεις, και στις 2 συγκεντρώσεις, η χωροταξική κατανομή της χρώσης του ιστού χαρακτηρίστηκε ως «Περιφερειακή/Κεντρική» (Πίνακας 3.1-36).

Πίνακας 3.1-36: Ιστοχημική ανίχνευση για την BuChE σε ήπαρ ιαπωνικών ορνυκίων (*Coturnix coturnix japonica*) μετά από χρώση κατά Baker et al. (1986), όπως τροποποιήθηκε από τους Karnovsky and Roots (1964). Έγινε ιστολογική αξιολόγηση με κριτήρια έντασης χρώσης, σχετικού πληθυσμού χρωσμένων κυττάρων και επιφανειακής κατανομής της χρώσης καθώς και χωροταξικής κατανομής μετά από έκθεση σε διάφορες συγκεντρώσεις methamidophos (mg/kg τροφής). Η κάθε τιμή είναι ο ΜΟ μετρήσεων από 5-9 ορνύκια (ΜΟ ± SD). Η υποξεία τοξικότητα ελέγχθηκε σε εργαστηριακές συνθήκες (n=16 άτομα/ομάδα επέμβασης)

Methamidophos (mg/kg τροφής)	Ποσοτική έκφραση της BuChE (Τιμές χρώσης) ¹			Γινόμενο (=ένταση X πληθυσμού κυττ. X επιφ. κατανομή) της ποσοτικής έκφρασης της BuChE (Τιμές χρώσης) ²	Χωροταξική κατανομή		
	Ένταση χρώσης (1-5)	Σχετικός πληθυσμός χρωσμένων κυττάρων (1-5)	Επιφαν. κατανομή χρώσης (1-3)		Ημέρες δειγματοληψίας		
					1	5	8
0	3,00	4,35	2,95	35,6 ± 13,4	●	●	●
20	3,22	4,48	2,86	42,6 ± 17,5 (19,8)	●	●	●
39,4	2,48	4,15	2,63	27,4 ± 14,8 (-23,1)	●	●	●
77,5	2,75	2,94	1,75	13,1 ± 12,1 (-63,2)	●	○	●
152,4	2,53	2,64	1,65	13,4 ± 14,8 (-62,2)	●	○	●
300	1,69	2,64	1,28	14,7 ± 15,3 (-58,6)	○	○	●

¹ Τα δεδομένα εκφράζονται ως ΜΟ των τομών κάθε ιστού

² Τα δεδομένα εκφράζονται ως ΜΟ των τομών κάθε ιστού ± SD. Η % διαφοροποίηση της ποσοτικής έκφρασης της χρώσης σε σύγκριση με τον μάρτυρα καταγράφεται μέσα στην παρένθεση ()

3.1.2.3.3.4 Χρώση ChEs που υδρολύουν την PrSCh

Στην χρώση για ChEs που υδρολύουν την PrSCh διακρίνονταν πολλά θετικά κύτταρα τα οποία ήταν ορατά παντού, τόσο στα ηπατικά κύτταρα όσο και στο αγγειακό σύστημα. Η χρώση στο κύτταρο εμφανίζονταν κυρίως στις κυτταροπλασματικές μεμβράνες και σε μικρότερο βαθμό στο κυτταρόπλασμα, με χρώση ανάλογη με την BuChE (Εικ. 3.1-9).

Η χρώση για ChEs που υδρολύουν την PrSCh για όλες τις συγκεντρώσεις είχε μειωμένη έκφραση, σε σχέση με τον μάρτυρα με αποτελέσματα ανάλογα της χρώσης για την BuChE (Πίνακας 3.1-36), 37,2-86,6% σε σύγκριση με τον μάρτυρα, γεγονός που αυξάνει την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων (Πίνακας 3.1-37). Η μειωμένη έκφραση για τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις παρατηρήθηκε κυρίως τις πρώτες ημέρες ενώ για τις υπόλοιπες ανεξαρτήτως ημέρας δειγματοληψίας.

Η χωροταξική κατανομή της χρώσης του ιστού, χαρακτηρίστηκε ως «Περιφερειακή/Κεντρική» για τον μάρτυρα, ανεξαρτήτως χρόνου δειγματοληψίας ενώ για τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις, για τις πρώτες ημέρες φαίνεται κυρίως να λείπει η χρώση ενώ σε μερικά δείγματα όπως και για τις υπόλοιπες ημέρες μέχρι το τέλος του πειραματισμού, η χωροταξική κατανομή της χρώσης του ιστού, χαρακτηρίστηκε ως «Περιφερειακή/Κεντρική». Για τη μεσαία και τις υψηλότερες συγκεντρώσεις, φαίνεται κυρίως να λείπει η χρώση από όλα τα επίπεδα των ιστών για όλες τις ημέρες μέχρι το

τέλος του πειραματισμού. Σε λίγα δείγματα, τις πρώτες ημέρες, η χωροταξική κατανομή της χρώσης του ιστού χαρακτηρίστηκε ως «Περιφερειακή/Κεντρική» ή ως «Περιφερειακή» (Πίνακας 3.1-37).

Για τις τομές στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν και οι δύο παρεμποδιστές (BW284C51 και iso-OMPA), ως θετικός μάρτυρας της ιστοχημείας της PrSCh, η χρώση δεν ήταν πια διακριτή.

Πίνακας 3.1-37: Ιστοχημική ανίχνευση για ChEs που υδρολύουν την PrSCh σε ήπαρ ιαπωνικών ορνυκίων (*Coturnix coturnix japonica*) μετά από χρώση κατά Baker et al. (1986), όπως τροποποιήθηκε από τους Karnovsky and Roots (1964). Έγινε ιστολογική αξιολόγηση με κριτήρια έντασης χρώσης, σχετικού πληθυσμού χρωσμένων κυττάρων και επιφανειακής κατανομής της χρώσης καθώς και χωροταξικής κατανομής μετά από έκθεση σε διάφορες συγκεντρώσεις methamidophos (mg/kg τροφής). Η κάθε τιμή είναι ο MO μετρήσεων από 3-11 ορνύκια (MO ± SD). Η υποξεία τοξικότητα ελέγχθηκε σε εργαστηριακές συνθήκες (n=16 άτομα/ομάδα επέμβασης)

Methamidophos (mg/kg τροφής)	Ποσοτική έκφραση ChE που υδρολύουν την PrSCh (Τιμές χρώσης) ¹			Γινόμενο (=ένταση X πληθυσμού κυττ. X επιφ. κατανομή) της ποσοτικής έκφρασης ChE που υδρολύουν την PrSCh (Τιμές χρώσης) ²	Χωροταξική κατανομή		
	Ένταση χρώσης (1-5)	Σχετικός πληθυσμός χρωσμένων κυττάρων (1-5)	Επιφαν. κατανομή χρώσης (1-3)		Ημέρες δειγματοληψίας		
					1	5	8
0				39,0 ± 24,0	●	●	●
20	3,67	3,83	2,67	24,5 ± 22,7 (-37,2)	●	●	●
39,4	2,45	2,63	1,73	14,7 ± 24,1 (-62,4)	●	●	x
77,5	2,00	3,28	1,13	5,2 ± 2,4 (-86,6)	●	●	●
152,4	1,22	1,06	0,34	18,4 ± 26,8 (-52,9)	●	●	●
300	1,64	1,71	1,25	5,7 ± 19,5 (-85,4)	●	○	○
	1,67	1,83	0,32		●	○	○

¹ Τα δεδομένα εκφράζονται ως MO των τομών κάθε ιστού

² Τα δεδομένα εκφράζονται ως MO των τομών κάθε ιστού ± SD. Η % διαφοροποίηση της ποσοτικής έκφρασης της χρώσης σε σύγκριση με τον μάρτυρα καταγράφεται μέσα στην παρένθεση ()

x Δεν υπάρχουν τομές

3.1.2.4 Ανάλυση της τροφής

Τα αποτελέσματα των μελετών που πραγματοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της ομοιογένειας, τον ποσοτικό προσδιορισμό και την σταθερότητα του methamidophos στο σιτηρέσιο των πτηνών, παρατίθενται στο Παράρτημα II.

Οι συγκεντρώσεις του methamidophos 20, 39,4, 77,5, 152,4 και 300 mg/kg τροφής ελέγχθηκαν και αναλύθηκαν στο σιτηρέσιο των πτηνών. Οι μετρήσεις έδωσαν 114,91, 123,18, 116,16, 109,58 και 80,86%, αντίστοιχα των ονομαστικών συγκεντρώσεων και ως εκ τούτου μέσα στα όρια που απαιτούνται ($\pm 20\%$ των ονομαστικών τιμών) (Πίνακας 3.1-38).

Ο έλεγχος της ομοιογένειας και της σταθερότητας, στην ανάλυση της διατροφής του σιτηρεσίου έδειξε ότι το methamidophos ήταν ομοιόμορφα κατανεμημένο και σταθερό για το χρονικό διάστημα του πειραματισμού.

Πίνακας 3.1-38: Ανάλυση σιτηρεσίου σε ιαπωνικό ορτύκι (*Coturnix coturnix japonica*) μετά από έκθεση σε διάφορες συγκεντρώσεις methamidophos (mg/kg τροφής). Η υποξεία τοξικότητα ελέγχθηκε σε εργαστηριακές συνθήκες (n=16 άτομα/ομάδα επέμβασης)

Methamidophos ονομαστική συγκέντρωση (mg/kg τροφής)	ΜΟ Ανάκτησης μεθόδου (%) \pm SD	Συντελεστής ανάκτησης μεθόδου	Methamidophos (%) συγκέντρωση της ονομαστικής
20	57,46 \pm 4,29	2,0	114,91
39,4	61,59 \pm 4,77	2,0	123,18
77,5	58,08 \pm 0,4	2,0	116,16
152,4	54,79 \pm 15,0	2,0	109,58
300	40,43 \pm 1,19	2,0	80,86

3.1.3 Δοκιμές αποφυγής “no-choice test”

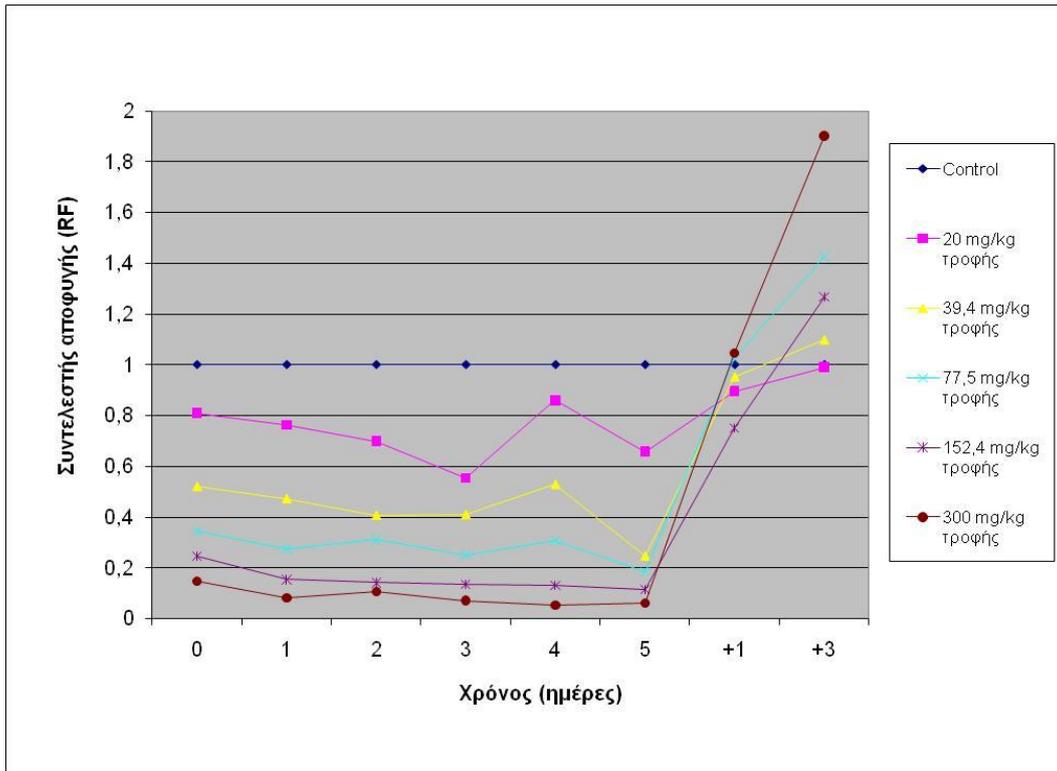
Παράλληλα με τις καταγραφές που έγιναν για τον υπολογισμό της υποξείας τοξικότητας σε ορτύκι έγινε και εκτίμηση της συμπεριφοράς αποφυγής της πρόσληψης τροφής “no-choice test” με methamidophos.

3.1.3.1 Συντελεστής αποφυγής (RF)

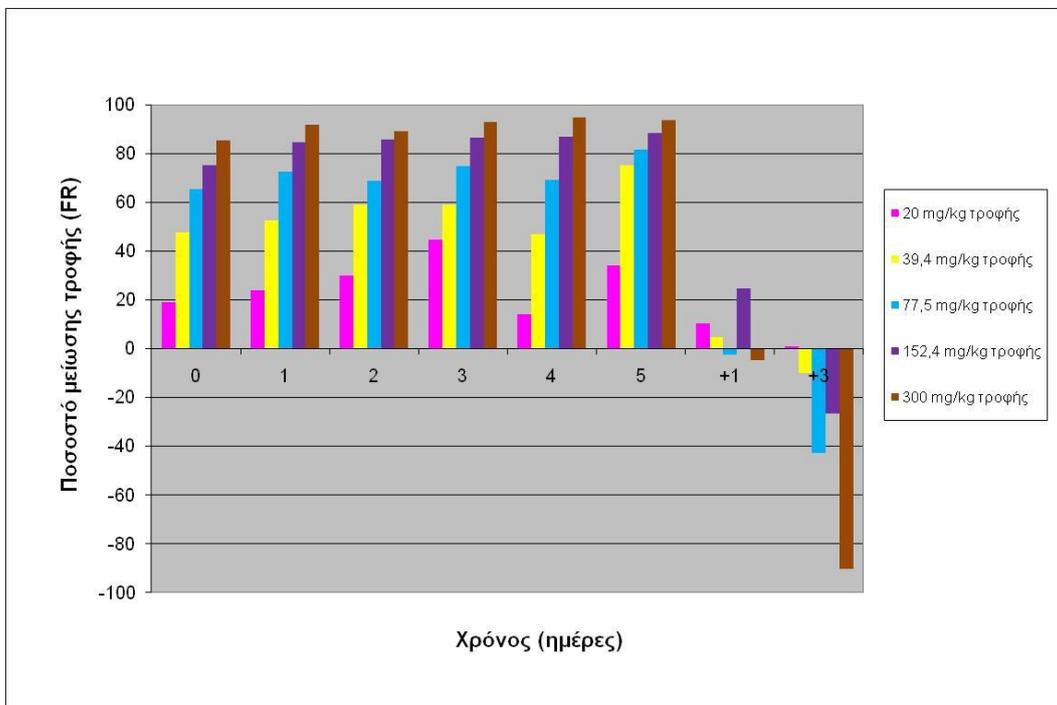
Ο συντελεστής αποφυγής (RF) υπολογίζεται από τον ρυθμό πρόσληψης τροφής ως αποτελέσματα της υποξείας τοξικότητας σε ορτύκι αλλά και του ποσοστού μείωσης της τροφής ανά συγκέντρωση.

Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης δείχνουν ισχυρή αποφυγή (συντελεστή αποφυγής κοντά στο 0) αρχίζοντας τουλάχιστον από την συγκέντρωση των 20 mg/kg τροφής. Η αποφυγή αυτή συνεχίστηκε σε ανάλογο βαθμό και για τις 5 d της έκθεσης τους σε τροφή που περιείχε methamidophos. Με την εναλλαγή της διατροφής τους σε καθαρό σιτηρέσιο για 3 d ο συντελεστής αποφυγής αυξήθηκε σημαντικά, αντιστρόφως ανάλογα της συγκέντρωσης, περισσότερο από το 1 που αντιστοιχεί στον μάρτυρα. (Γραφήματα 3.1-3/4). Το $RF_{50}=52,8$ mg/kg τροφ. ($R^2=0,95$), ενώ το $RF_{90}=8,04$ mg/kg τροφ. (αντιστοιχεί με το NOEC).

Ανάλογα υπολογίστηκε και το ποσοστό της μείωσης της τροφής (FR) (Γράφημα 3.1-4).

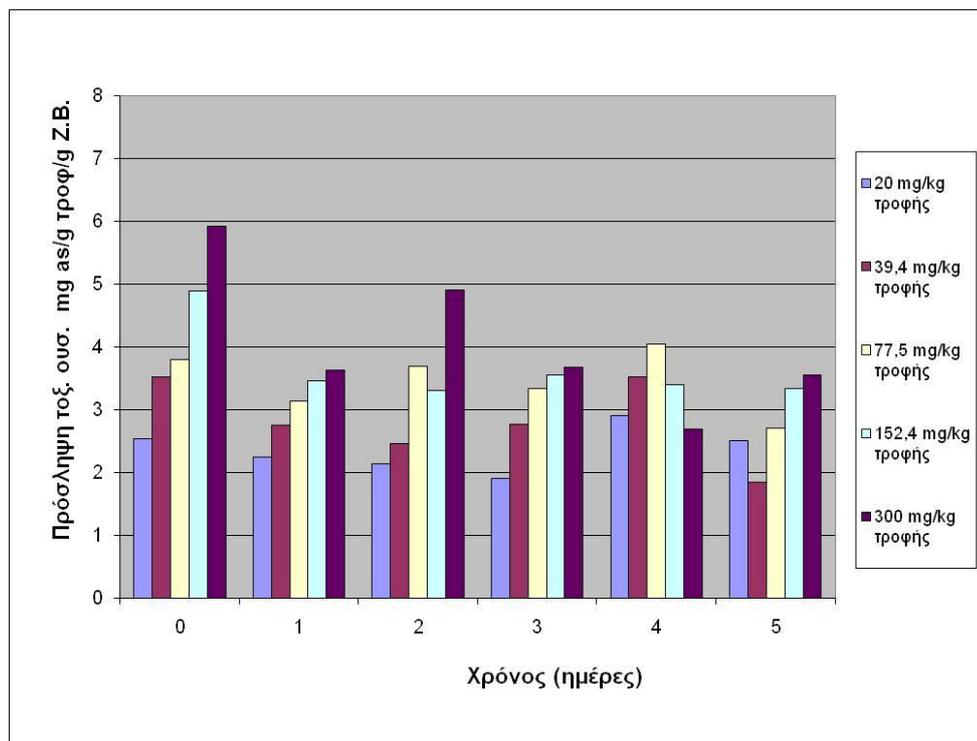


Γράφημα 3.1-3: Συντελεστής αποφυγής τροφής (RF) σε ιαπωνικό ορνίθι (*Coturnix coturnix japonica*) μετά από έκθεση σε διάφορες συγκεντρώσεις methamidophos (no-choice test). Η υποξεία τοξικότητα ελέγχθηκε σε εργαστηριακές συνθήκες (n=16 άτομα/ομάδα επέμβασης)



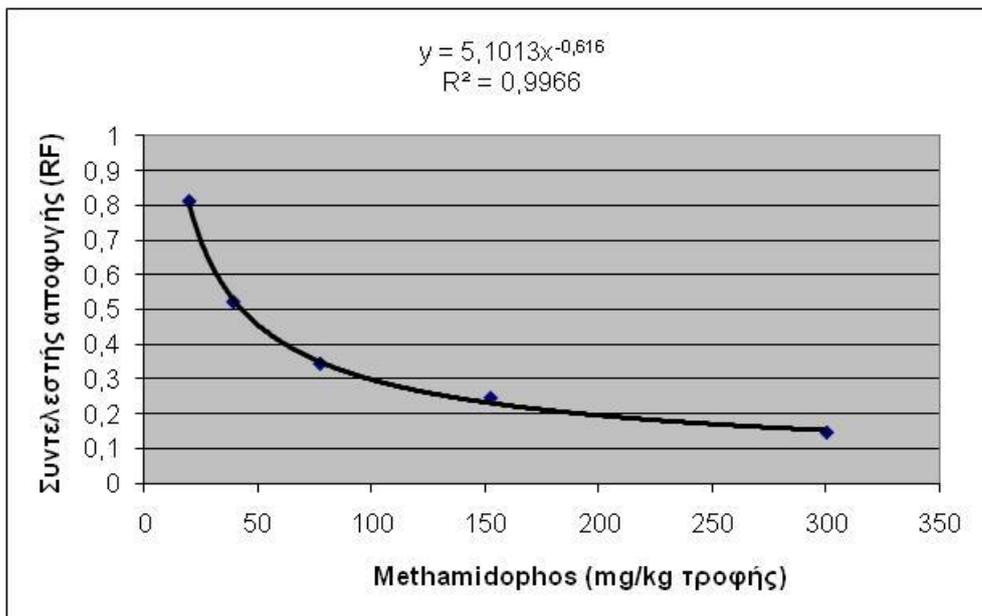
Γράφημα 3.1-4: Ποσοστό μείωσης τροφής (FR) σε ιαπωνικό ορνίθι (*Coturnix coturnix japonica*) μετά από έκθεση σε διάφορες συγκεντρώσεις methamidophos (no-choice test). Η υποξεία τοξικότητα ελέγχθηκε σε εργαστηριακές συνθήκες (n=16 άτομα/ομάδα επέμβασης)

Με βάση τα αποτελέσματα αυτά υπολογίστηκε και η προσληφθείσα ποσότητα methamidophos από τα ορτύκια για την κάθε συγκέντρωση (Γράφημα 3.1-5). Είναι ενδεικτική για την ημέρα 0 η αναλογική αύξηση της προσληφθείσας τοξικής ουσίας methamidophos με εύρος x 2,5, μεταξύ της μικρότερης και μεγαλύτερης συγκέντρωσης. Για την ημέρα 1-5 η προσληφθείσα ουσία methamidophos είναι σαφώς μικρότερη για τις δύο μεγαλύτερες και στα ίδια επίπεδα για υπόλοιπες συγκεντρώσεις. Η εύρος της μικρότερης και μεγαλύτερης συγκέντρωσης είναι μικρότερο από x 2.

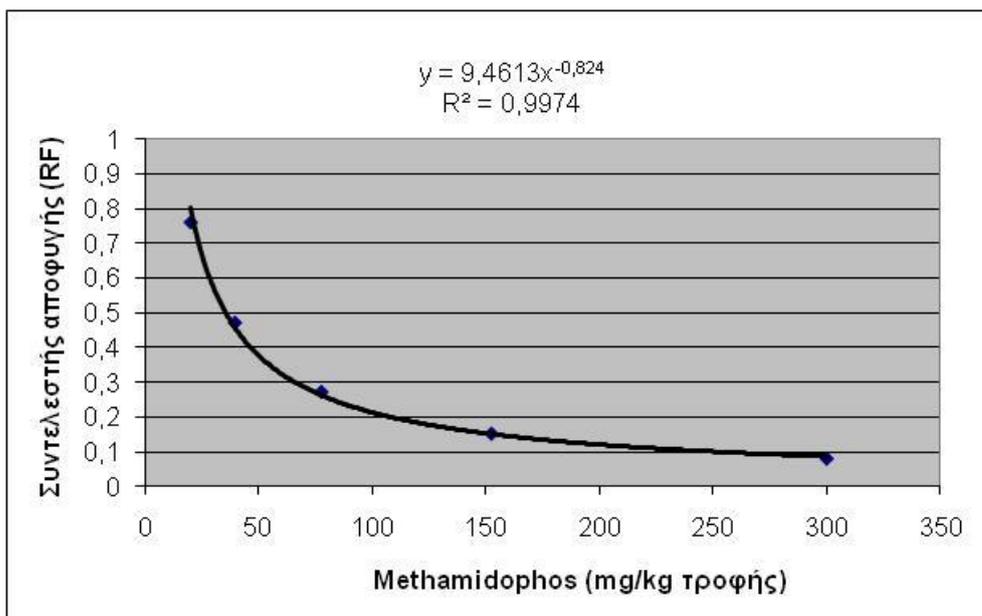


Γράφημα 3.1-5: Πρόσληψη methamidophos (mg as/gr τροφής/gr bw) σε ιαπωνικό ορτύκι (*Coturnix japonica*) μετά από έκθεση σε διάφορες συγκεντρώσεις methamidophos (no-choice test). Η υποξεία τοξικότητα ελέγχθηκε σε εργαστηριακές συνθήκες (n=16 άτομα/ομάδα επέμβασης)

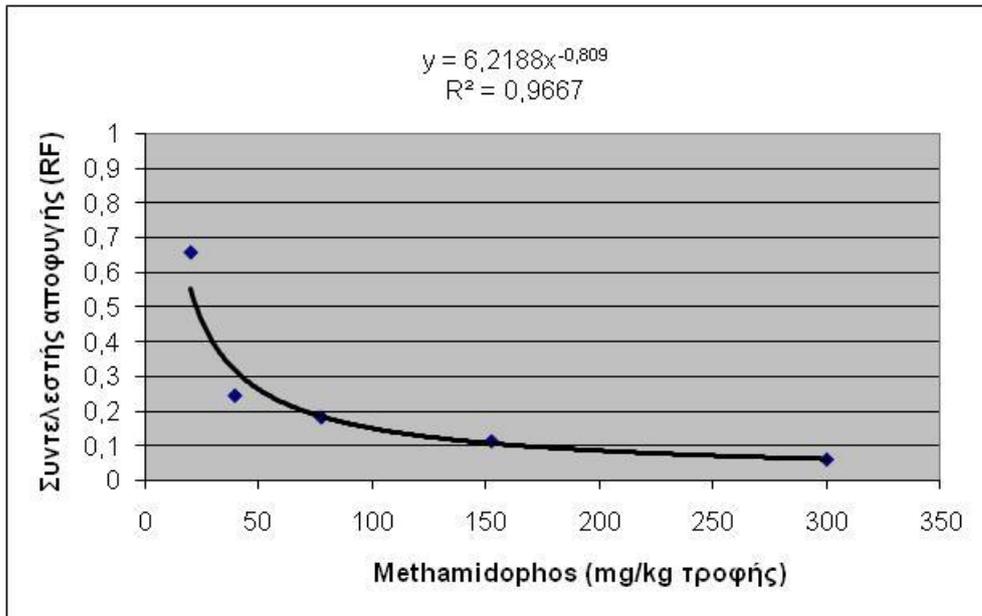
Έγινε και ανάλυση παλινδρόμησης για την σχέση μεταξύ των συγκεντρώσεων του methamidophos στην τροφή (C) και του συντελεστή αποφυγής (RF) για τις ημέρες 0, 1 και 5 (Γραφήματα 3.1-6/7/8). Σε όλες τις περιπτώσεις το R^2 έχει πολύ υψηλές τιμές (>0,97). Για την ημέρα 0 η παλινδρόμηση είναι $\Psi=5,1013 \times X^{-0,616}$ με τα δεδομένα να ταιριάζουν σχεδόν απόλυτα ($R^2=0,99$) (Γράφημα 3.1-6). Για την ημέρα 1 η παλινδρόμηση είναι $\Psi=9,4613 \times X^{-0,824}$ με τα δεδομένα να ταιριάζουν σχεδόν απόλυτα ($R^2=0,99$) (Γράφημα 3.1-7). Τέλος για την ημέρα 5 η παλινδρόμηση είναι $\Psi=6,2188 \times X^{-0,809}$ με τα δεδομένα να ταιριάζουν σχεδόν απόλυτα ($R^2=0,97$) (Γράφημα 3.1-8).



Γράφημα 3.1-6: Σχέση μεταξύ των ονομαστικών συγκεντρώσεων του methamidophos στην τροφή και του συντελεστή αποφυγής (RF) για την ημέρα 0, σε ιαπωνικό ορτύκι (*Coturnix coturnix japonica*) μετά από έκθεση σε διάφορες συγκεντρώσεις methamidophos (no-choice test). Η υποξεία τοξικότητα ελέγχθηκε σε εργαστηριακές συνθήκες (n=16 άτομα/ομάδα επέμβασης)

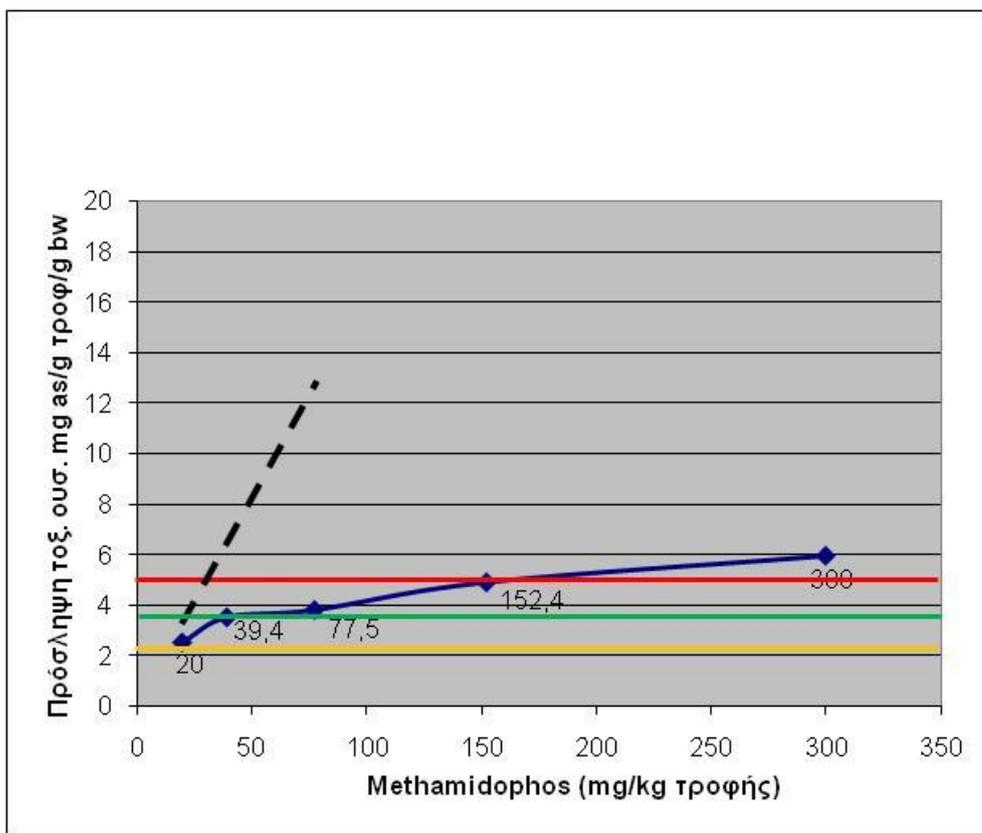


Γράφημα 3.1-7: Σχέση μεταξύ των ονομαστικών συγκεντρώσεων του methamidophos στην τροφή και του συντελεστή αποφυγής (RF) για την ημέρα 1, σε ιαπωνικό ορτύκι (*Coturnix coturnix japonica*) μετά από έκθεση σε διάφορες συγκεντρώσεις methamidophos (no-choice test). Η υποξεία τοξικότητα ελέγχθηκε σε εργαστηριακές συνθήκες (n=16 άτομα/ομάδα επέμβασης)

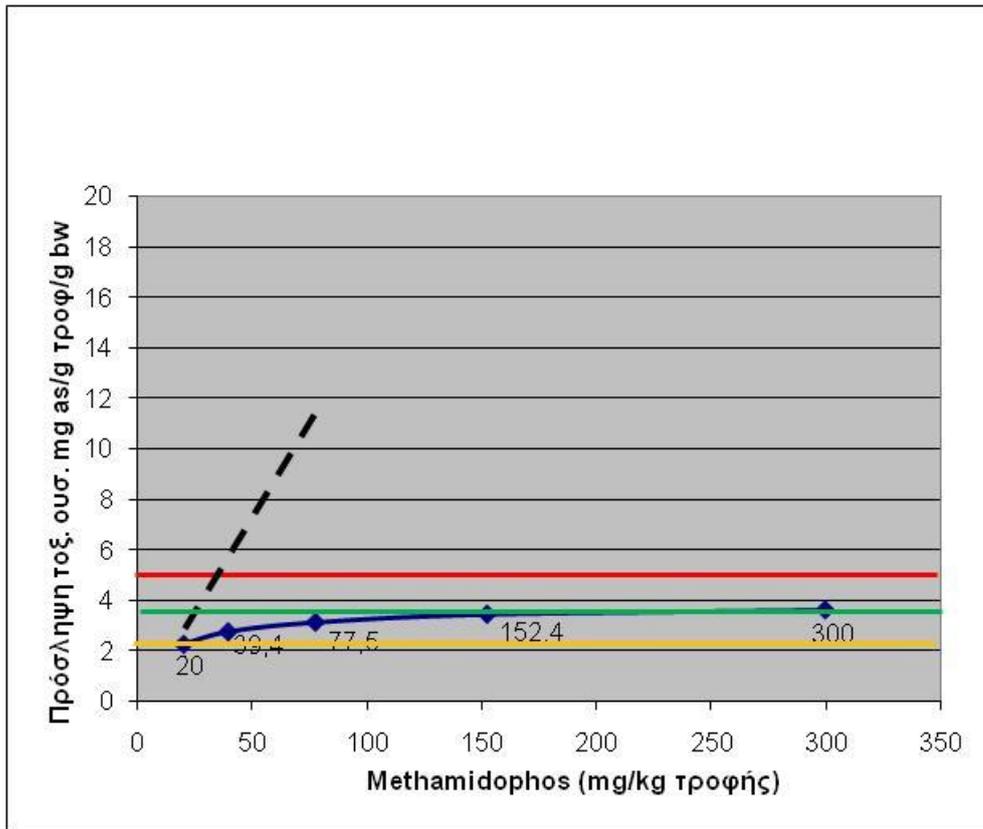


Γράφημα 3.1-8: Σχέση μεταξύ των ονομαστικών συγκεντρώσεων του methamidophos στην τροφή και του συντελεστή αποφυγής (RF) για την ημέρα 5, σε ιαπωνικό ορτύκι (*Coturnix coturnix japonica*) μετά από έκθεση σε διάφορες συγκεντρώσεις methamidophos (no-choice test). Η υποξεία τοξικότητα ελέγχθηκε σε εργαστηριακές συνθήκες (n=16 άτομα/ομάδα επέμβασης)

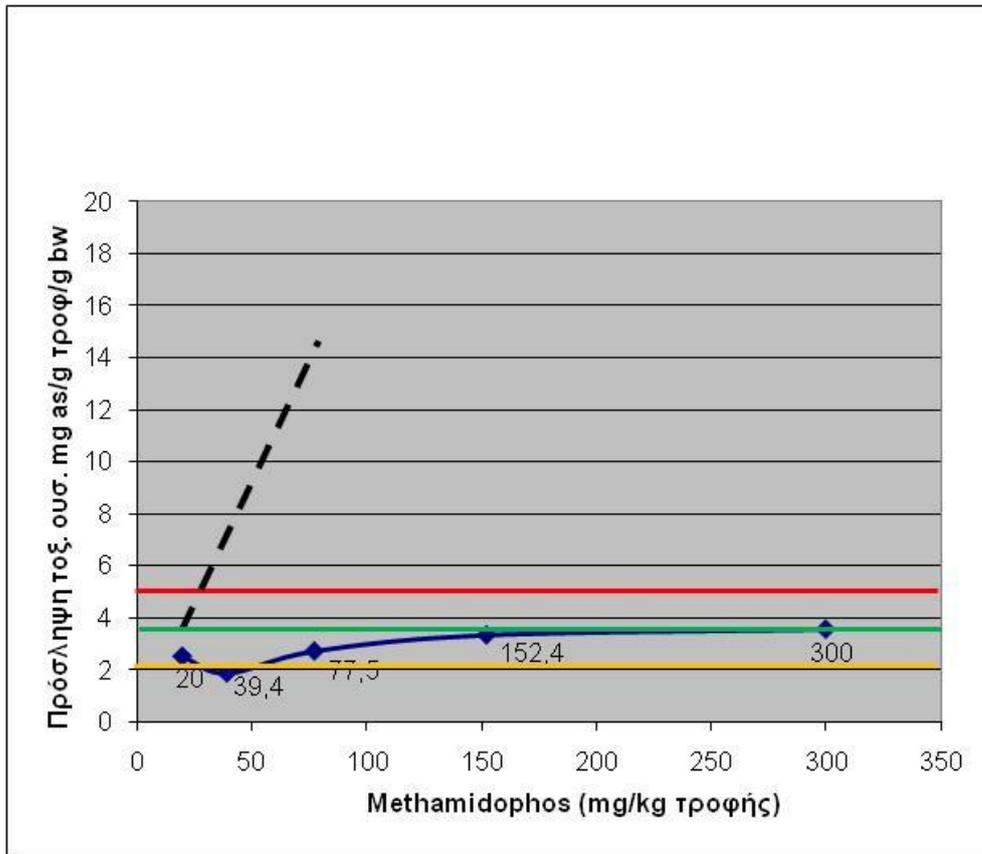
Παράλληλα τα αποτελέσματα χρησιμοποιήθηκαν για την δημιουργία της γραφικής παράστασης της μέσης προσληφθείσας ουσίας methamidophos (mg as/gr τροφής/gr bw) για κάθε συγκέντρωση για τα ίδια χρονικά διαστήματα (ημέρες 0, 1 και 5) (Γραφήματα 3.1-9/10/11). Η γραφική παράσταση επίσης δείχνει την σύγκριση της θεωρητικής προσληφθείσας τοξικής ουσίας methamidophos (διακεκομμένη γραμμή) εάν δεν υπήρχε αποφυγή, το LOEL που υπολογίστηκε για τη θνησιμότητα (η χαμηλότερη συγκέντρωση που καταγράφηκε θνησιμότητα, κόκκινη γραμμή), το EC₁₀ για την θνησιμότητα (που αντιστοιχεί στο NOEL την υψηλότερη συγκέντρωση που καταγράφεται θνησιμότητα, πράσινη γραμμή) καθώς και το LOEL για τα κλινικά συμπτώματα (η χαμηλότερη συγκέντρωση που καταγράφηκαν κλινικά συμπτώματα, πορτοκαλί γραμμή). Οι γραφικές αυτές παραστάσεις μας επιτρέπουν να βγάλουμε πρόσθετα συμπεράσματα για τους πιθανούς μηχανισμούς που υπογραμμίζουν αυτά τα αποτελέσματα. Έτσι στα Γραφήματα 3.1-9/10/11 φαίνεται ότι την ημέρα 0 η προσληφθείσα ουσία methamidophos είναι μεγαλύτερη από το LOEL για την θνησιμότητα για τις 2 μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ενώ για την ημέρα 1 και 5 όλες οι συγκεντρώσεις σχημάτισαν ένα πλατό στο όριο που δεν παρατηρείται θνησιμότητα. Σε όλες όμως τις περιπτώσεις η προσληφθείσα ουσία methamidophos είναι μεγαλύτερη από το LOEL για τις κλινικές ενδείξεις σε όλες της συγκεντρώσεις του πειραματισμού γεγονός που αποδεικνύεται και από τις μακροσκοπικές παρατηρήσεις.



Γράφημα 3.1-9: Σχέση μεταξύ του προσληφθέντος και των ονομαστικών συγκεντρώσεων του methamidophos στην τροφή για την ημέρα 0, σε ιαπωνικό ορτύκι (*Coturnix coturnix japonica*) μετά από έκθεση σε διάφορες συγκεντρώσεις methamidophos (no-choice test). Με διακεκομμένη γραμμή η θεωρητική προσληφθείσα τοξική ουσία, με κόκκινη γραμμή το LOEL για τη θνησιμότητα, με πράσινη γραμμή το EC₁₀ (NOEL) για την θνησιμότητα, με πορτοκαλί γραμμή το LOEL για τα κλινικά συμπτώματα. Η υποξεία τοξικότητα ελέγχθηκε σε εργαστηριακές συνθήκες (n=16 άτομα/ομάδα επέμβασης)



Γράφημα 3.1-10: Σχέση μεταξύ του προσληφθέντος και των ονομαστικών συγκεντρώσεων του methamidophos στην τροφή για την ημέρα 1, σε ιαπωνικό ορτύκι (*Coturnix coturnix japonica*) μετά από έκθεση σε διάφορες συγκεντρώσεις methamidophos (no-choice test). Με διακεκομμένη γραμμή η θεωρητική προσληφθείσα τοξική ουσία, με κόκκινη γραμμή το LOEL για τη θνησιμότητα, με πράσινη γραμμή το EC₁₀ (NOEL) για την θνησιμότητα, με πορτοκαλί γραμμή το LOEL για τα κλινικά συμπτώματα. Η υποξεία τοξικότητα ελέγχθηκε σε εργαστηριακές συνθήκες (n=16 άτομα/ομάδα επέμβασης)



Γράφημα 3.1-11: Σχέση μεταξύ του προσληφθέντος και των ονομαστικών συγκεντρώσεων του methamidophos στην τροφή για την ημέρα 5, σε ιαπωνικό ορτύκι (*Coturnix coturnix japonica*) μετά από έκθεση σε διάφορες συγκεντρώσεις methamidophos (no-choice test). Με διακεκομμένη γραμμή η θεωρητική προσληφθείσα τοξική ουσία, με κόκκινη γραμμή το LOEL για τη θνησιμότητα, με πράσινη γραμμή το EC₁₀ (NOEL) για την θνησιμότητα, με πορτοκαλί γραμμή το LOEL για τα κλινικά συμπτώματα. Η υποξεία τοξικότητα ελέγχθηκε σε εργαστηριακές συνθήκες (n=16 άτομα/ομάδα επέμβασης)

3.1.4 Δοκιμές αποφυγής “two-choice test”

3.1.4.1 Μακροσκοπικές παρατηρήσεις

3.1.4.1.1 Θνησιμότητα

Στον μάρτυρα και σε όλες τις συγκεντρώσεις δεν υπήρχαν νεκρά πτηνά. Όσον αφορά την θνησιμότητα το NOEL=300 mg/kg τροφής ενώ το LD₅₀>300 mg/kg τροφής μετά από 6 d πειραματισμού.

3.1.4.1.2 Κλινικά συμπτώματα

Στον μάρτυρα και σε όλες τις συγκεντρώσεις, εκτός της υψηλότερης, τα πτηνά έδειχναν υγιή ενώ δεν υπήρχαν εμφανής κλινικά συμπτώματα.

Στην υψηλότερη συγκέντρωση των 300 mg/kg τροφής, παρατηρήθηκαν ελαφρά έως μέτρια κλινικά συμπτώματα και στα 6 πτηνά 1,5 έως 2 h μετά την χορήγηση του σιτηρεσίου μέχρι και την ημέρα 3 χαρακτηριζόμενα ως «μειωμένη κινητικότητα». Επίσης παρατηρήθηκαν ελαφρά κλινικά συμπτώματα σε 1 άτομο την ημέρα 3 χαρακτηριζόμενα ως «αδυναμία στα πόδια». Τα πτηνά έδειχναν υγιή τις επόμενες ημέρες με την χορήγηση καθαρού σιτηρεσίου.

Όσον αφορά τα κλινικά συμπτώματα το NOEL=152,4 mg/kg τροφής μετά από 6 d πειραματισμού.

Τα κλινικά συμπτώματα, για τον πειραματισμό της υποξείας τοξικότητας στο ορτύκι, παρατίθενται στον Πίνακα 3.1-39.

Πίνακας 3.1-39: Κλινικά συμπτώματα σε ιαπωνικό ορτύκι (*Coturnix coturnix japonica*) μετά από έκθεση σε διάφορες συγκεντρώσεις methamidophos (mg/kg τροφής). Η υποξεία τοξικότητα (two-choice test) ελέγχθηκε σε εργαστηριακές συνθήκες (n=6 άτομα/ομάδα επέμβασης)

Methamidophos (mg/kg τροφής)	Αριθμός ατόμων με κλινικά συμπτώματα ²								
	Ημέρες χορήγησης και μετά τη χορήγηση								
	0 [†]	0 [‡]	0 [¶]	1	2	3	+1 ¹	+2	+3
0	δ.π.	δ.π.	δ.π.	δ.π.	δ.π.	δ.π.	δ.π.	δ.π.	δ.π.
20	δ.π.	δ.π.	δ.π.	δ.π.	δ.π.	δ.π.	δ.π.	δ.π.	δ.π.
39,4	δ.π.	δ.π.	δ.π.	δ.π.	δ.π.	δ.π.	δ.π.	δ.π.	δ.π.
77,5	δ.π.	δ.π.	δ.π.	δ.π.	δ.π.	δ.π.	δ.π.	δ.π.	δ.π.
152,4	δ.π.	δ.π.	δ.π.	δ.π.	δ.π.	δ.π.	δ.π.	δ.π.	δ.π.
300	δ.π.	C6a	C6a	C6b	C6b	C6b L1a	δ.π.	δ.π.	δ.π.

¹ Ημέρες σιτηρεσίου απαλλαγμένου από το methamidophos

[†] = λίγη ώρα μετά την χορήγηση του σιτηρεσίου

[‡] = περίπου 1,5 έως 2 h μετά την χορήγηση του σιτηρεσίου

[¶] = περίπου 2 έως 6 h μετά την χορήγηση του σιτηρεσίου

² **Είδος κλινικών συμπτωμάτων:**

L = αδυναμία στα πόδια (leg weakness),

C= μειωμένη κινητικότητα (reduced activity)

³ **Αριθμός δίπλα στο είδος των κλινικών συμπτωμάτων:** αριθμός ατόμων με κλινικά συμπτώματα (π.χ. C 2 = 2 άτομα χαρακτηρισμένα ως “μειωμένη κινητικότητα”)

δ.π. = δεν παρατηρήθηκαν κλινικά συμπτώματα

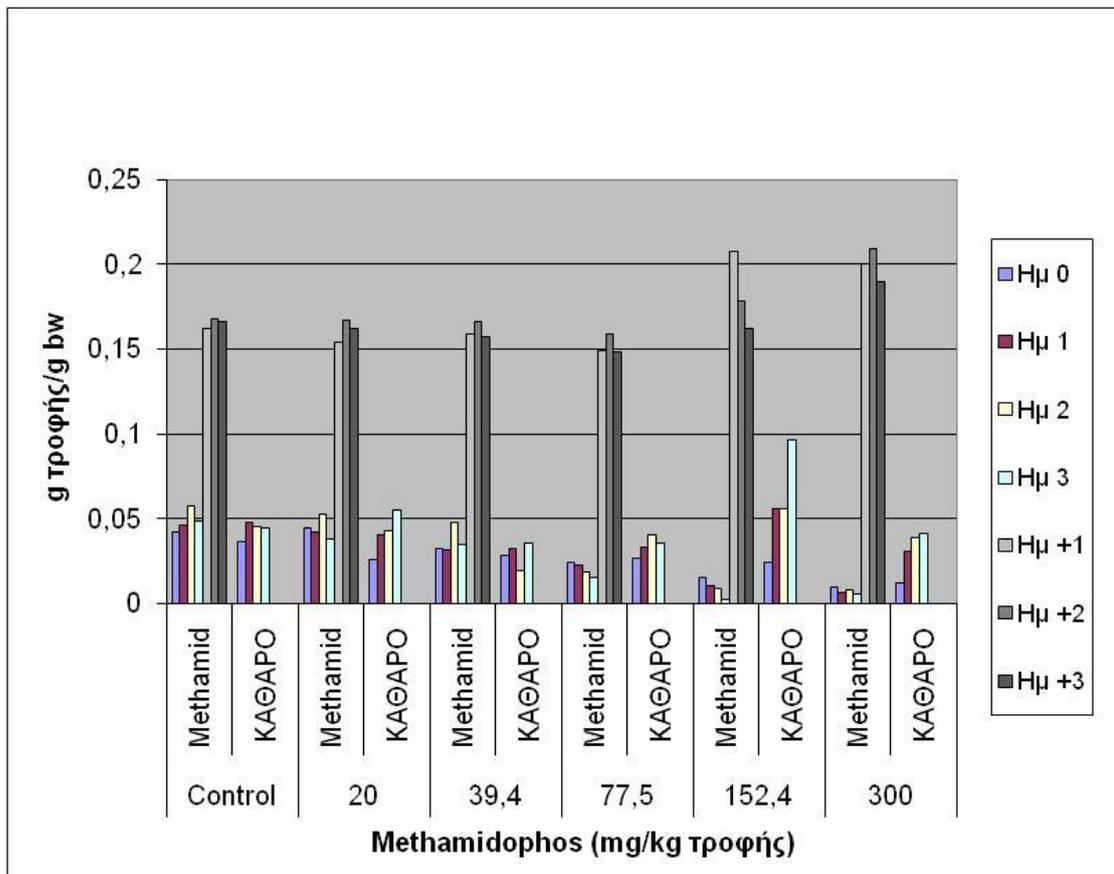
⁴ **Βαθμός έντασης των κλινικών συμπτωμάτων:** a= ήπια ή για μικρή περίοδο, b=μέτρια, c= σοβαρά κλινικά συμπτώματα

3.1.4.1.3 Πρόσληψη τροφής

Ο ρυθμός πρόσληψης τροφής (gr τροφής/gr bw) κατά την διάρκεια των πρώτων 3 d παρατήρησης ήταν ανάλογος και για τις δύο ταΐστρες για τον μάρτυρα και τις δύο χαμηλότερες συγκεντρώσεις των 20 και 39,4 mg/kg τροφής. Για την μεσαία συγκέντρωση των 77,5 mg/kg τροφής υπήρξε μία ελαφρά προτίμηση, και για τις 3 d, προς το καθαρό σιτηρέσιο ενώ το φαινόμενο είναι ξεκάθαρο για τις 2 υψηλότερες συγκεντρώσεις των 152,4 και 300 mg/kg τροφής. Με την χορήγηση καθαρού σιτηρεσίου, για ακόμα 3 d, ο ρυθμός πρόσληψης τροφής για τις επεμβάσεις αυξήθηκε σημαντικά κατά 25% περίπου για τις δύο μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ενώ στις υπόλοιπες συγκεντρώσεις ήταν ανάλογες του μάρτυρα.

Πρέπει να σημειωθεί επίσης ότι ακόμα και στον μάρτυρα τις 3 τελευταίες ημέρες του πειραματισμού (με την χορήγηση καθαρού σιτηρεσίου στα πτηνά σε όλες τις επεμβάσεις και στις 2 ταΐστρες) ο ρυθμός πρόσληψης τροφής αυξήθηκε κατά 30% περίπου σε σύγκριση με την ίδια περίοδο των 3 πρώτων ημερών (με την χορήγηση από 2 ταΐστρες καθαρού και ρυπασμένου σιτηρεσίου στα πτηνά σε όλες τις επεμβάσεις methamidophos). Η παρουσία του methamidophos φαίνεται ότι απωθεί τα πτηνά (πιθανόν λόγω οσμής) αλλά αυτή δεν είναι αρκετή ώστε να μην προσλάβουν τη συγκέντρωση που μπορεί να δώσει κλινικά συμπτώματα.

Ο ρυθμός πρόσληψης τροφής, για τον πειραματισμό της υποξείας τοξικότητας στο ορτύκι (two-choice test), παρατίθενται στο Γράφημα 3.1-12.



Γράφημα 3.1-12: Ρυθμός πρόσληψης τροφής (FIR) σε ιαπωνικό ορτύκι (*Coturnix coturnix japonica*) μετά από έκθεση σε διάφορες συγκεντρώσεις methamidophos (mg/kg τροφής). Η υποξεία (two-choice test) τοξικότητα ελέγχθηκε σε εργαστηριακές συνθήκες (n=6 άτομα/ομάδα επέμβασης)

3.1.4.1.4 Σωματικό βάρος

Το μέσο σωματικό βάρος για τον μάρτυρα αυξήθηκε πολύ λίγο (2,2%). Για τις διάφορες συγκεντρώσεις το μέσο σωματικό βάρος δεν διαφοροποιήθηκε ουσιαστικά, από -4,2 έως 2,7%, από την ημέρα 0 μέχρι την ημέρα (+2).

Το ποσοστό μεταβολής του σωματικού βάρους, για τον πειραματισμό της υποξείας τοξικότητας στο ορτύκι (two-choice test), παρατίθενται στον Πίνακα 3.1-40.

Πίνακας 3.1-40: Ποσοστό μεταβολής του σωματικού βάρους σε ιαπωνικό ορτύκι (*Coturnix coturnix japonica*) μετά από έκθεση σε διάφορες συγκεντρώσεις methamidophos (mg/kg τροφής). Η υποξεία τοξικότητα (two-choice test) ελέγχθηκε σε εργαστηριακές συνθήκες (n=6 άτομα/ομάδα επέμβασης)

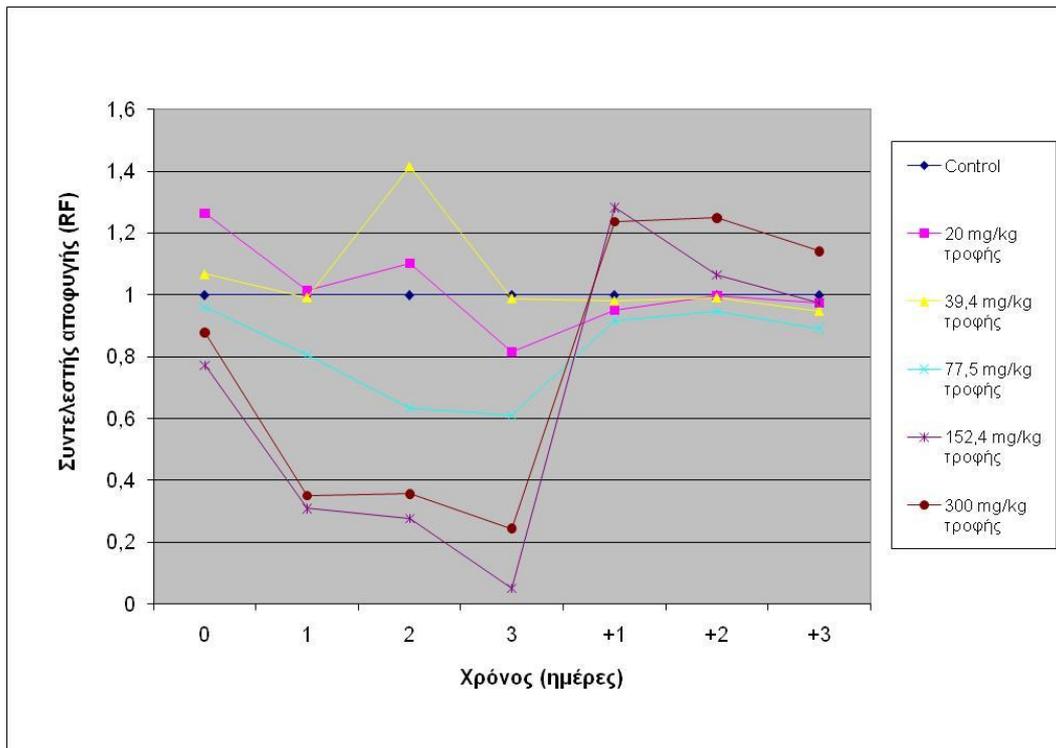
Methamidophos (mg/kg τροφής)	Ποσοστό μεταβολής του σωματικού βάρους (%)		
	Ημέρες παρατήρησης		
	0 - (+2)		
0	2,2	±	2,8 ¹
20	2,7	±	8,5
39,4	-0,3	±	1,8
77,5	-3,7	±	1,4
152,4	1,9	±	6,4
300	-4,2	±	4,5

¹ Τα αποτελέσματα εκφράζονται MO ± SD.

3.1.4.1.5 Συντελεστής αποφυγής (RF)

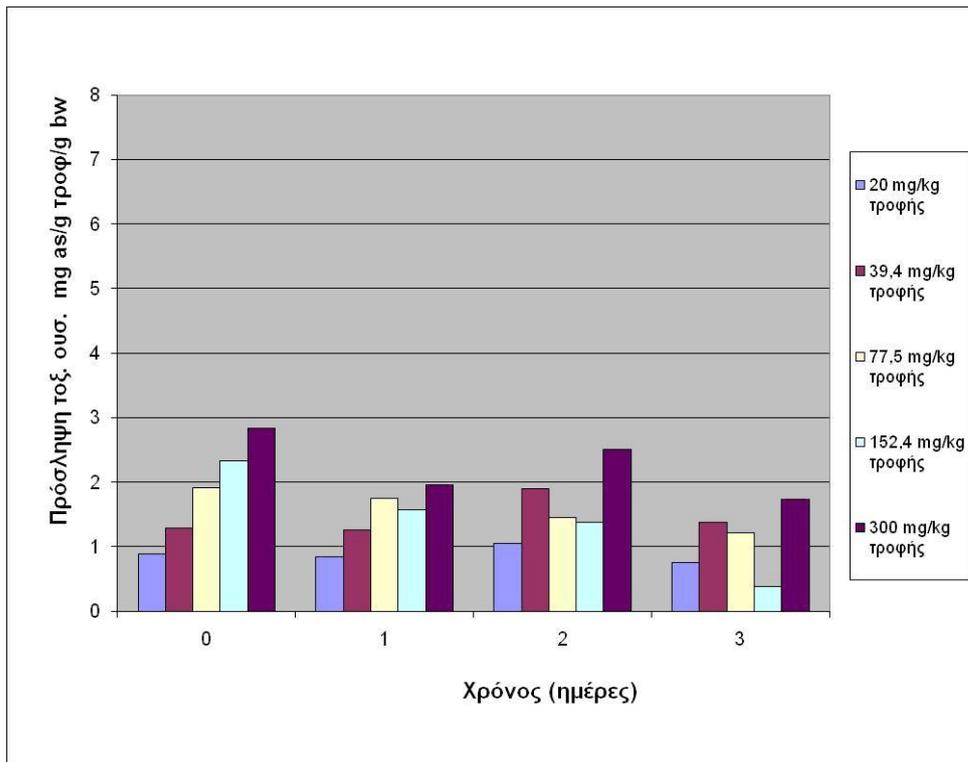
Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης δείχνουν ισχυρή αποφυγή (συντελεστή αποφυγής κοντά στο 0) αρχίζοντας τουλάχιστον από την συγκέντρωση των 77,5 mg/kg τροφής. Η αποφυγή αυτή συνεχίστηκε σε εντονότερο βαθμό κάθε ημέρα και για τις 3 d της έκθεσης τους σε τροφή που περιείχε methamidophos. Με την εναλλαγή της διατροφής τους σε καθαρό σιτηρέσιο για 3 d ο συντελεστής αποφυγής αυξήθηκε σημαντικά, αντιστρόφως ανάλογα της συγκέντρωσης, κυρίως για τις 2 υψηλότερες συγκεντρώσεις περισσότερο από την τιμή 1 που αντιστοιχεί στον μάρτυρα. (Γράφημα 3.1-13). Το $RF_{50}=157,7$ mg/kg τροφής ($R^2=0.86$), ενώ το $RF_{90}=52,3$ mg/kg τροφής (αντιστοιχεί με το $NOEC=39,4$ mg/kg τροφής).

Το $FAC_{50}=39,4$ mg/kg τροφής, ως η συγκέντρωση που δίνει την ίδια ποσότητα πρόσληψης τροφής τόσο της ρυπασμένης όσο και της καθαρής από methamidophos.



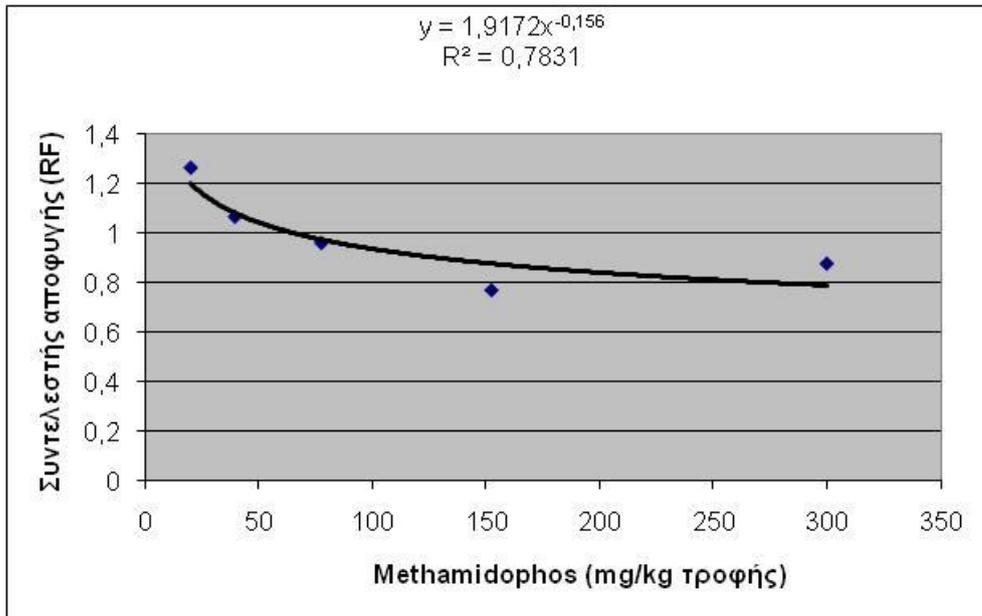
Γράφημα 3.1-13: Συντελεστής αποφυγής τροφής (RF) σε ιαπωνικό ορτύκι (*Coturnix coturnix japonica*) μετά από έκθεση σε διάφορες συγκεντρώσεις methamidophos (mg/kg τροφής). Η υποξεία τοξικότητα (two-choice test) ελέγχθηκε σε εργαστηριακές συνθήκες (n=6 άτομα/ομάδα επέμβασης)

Με βάση τα αποτελέσματα αυτά υπολογίστηκε και η προσληφθείσα ποσότητα methamidophos από τα ορτύκια για την κάθε συγκέντρωση. Είναι ενδεικτική για την ημέρα 0 η αναλογική αύξηση της προσληφθείσας ουσίας methamidophos με εύρος διαφοράς x 3, μεταξύ της μικρότερης και μεγαλύτερης συγκέντρωσης. Για τις ημέρες 1-3, η προσληφθείσα ουσία methamidophos είναι σαφώς μικρότερη για τις δύο μεγαλύτερες και στα ίδια επίπεδα για υπόλοιπες συγκεντρώσεις. Το εύρος διαφοράς μεταξύ της μικρότερης και μεγαλύτερης συγκέντρωσης είναι περίπου x 2 (Γράφημα 3.1-14).

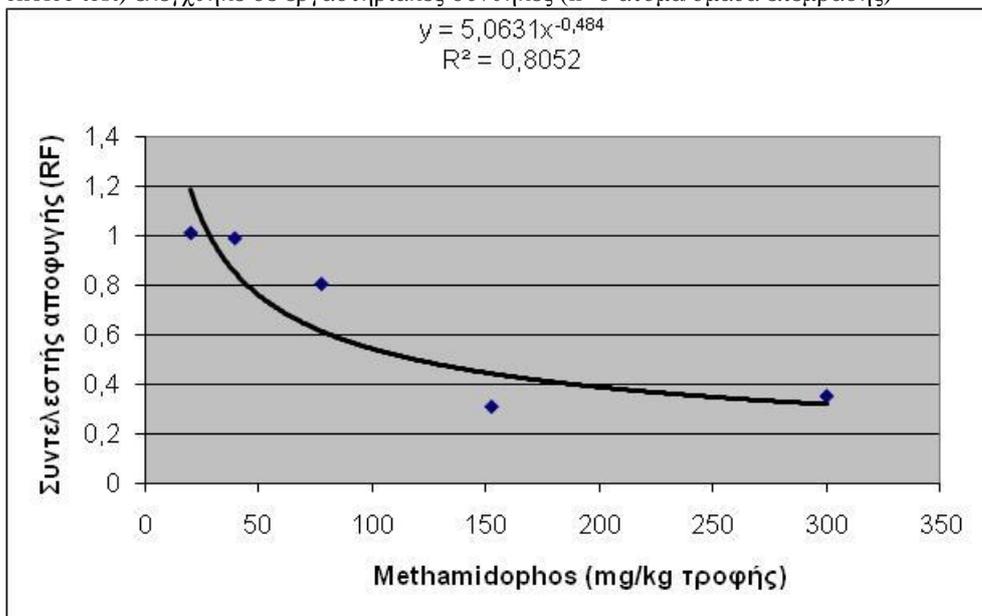


Γράφημα 3.1-14: Πρόσληψη methamidophos (mg as/gr τροφής/gr bw) σε ιαπωνικό ορτύκι (*Coturnix coturnix japonica*) μετά από έκθεση σε διάφορες συγκεντρώσεις methamidophos (mg/kg τροφής). Η υποξεία τοξικότητα (two-choice test) ελέγχθηκε σε εργαστηριακές συνθήκες (n=6 άτομα/ ομάδα επέμβασης)

Επιπροσθέτως δημιουργήθηκε η παλινδρόμηση για την σχέση μεταξύ των συγκεντρώσεων του methamidophos (C) στην τροφή και του συντελεστή αποφυγής (RF) για τις ημέρες 0 και 1 (Γραφήματα 3.1-15/6). Σε όλες τις περιπτώσεις το R^2 έχει σχετικά καλές τιμές (>0,78). Για την ημέρα 0 η παλινδρόμηση είναι $\Psi=1,91172 \times X^{-0,156}$ με τα δεδομένα να ταιριάζουν αρκετά ($R^2=0,78$) (Γράφημα 3.1-15). Για την ημέρα 1 η εξίσωση παλινδρόμησης είναι $\Psi=5,0631 \times X^{-0,484}$ με τα δεδομένα να ταιριάζουν αρκετά ($R^2=0,8$) (Γράφημα 3.1-16).



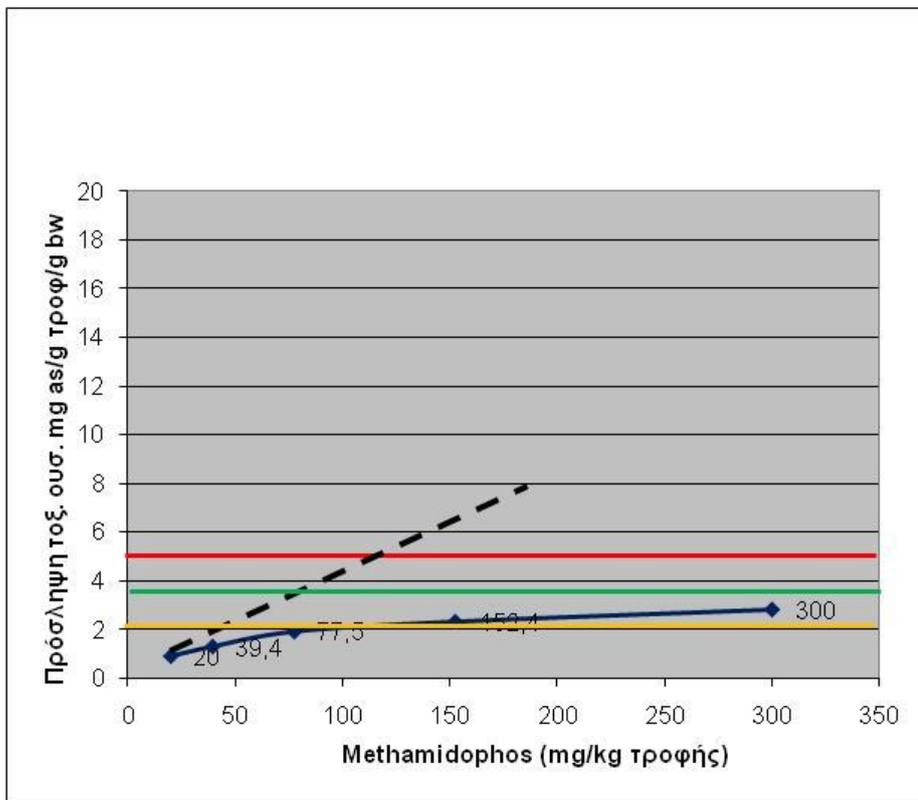
Γράφημα 3.1-15: Σχέση μεταξύ των ονομαστικών συγκεντρώσεων του methamidophos στην τροφή και του συντελεστή αποφυγής (RF) για την ημέρα 0, σε ιαπωνικό ορτύκι (*Coturnix coturnix japonica*) μετά από έκθεση σε διάφορες συγκεντρώσεις methamidophos (mg/kg τροφής). Η υποξεία τοξικότητα (two-choice test) ελέγχθηκε σε εργαστηριακές συνθήκες (n=6 άτομα/ομάδα επέμβασης)



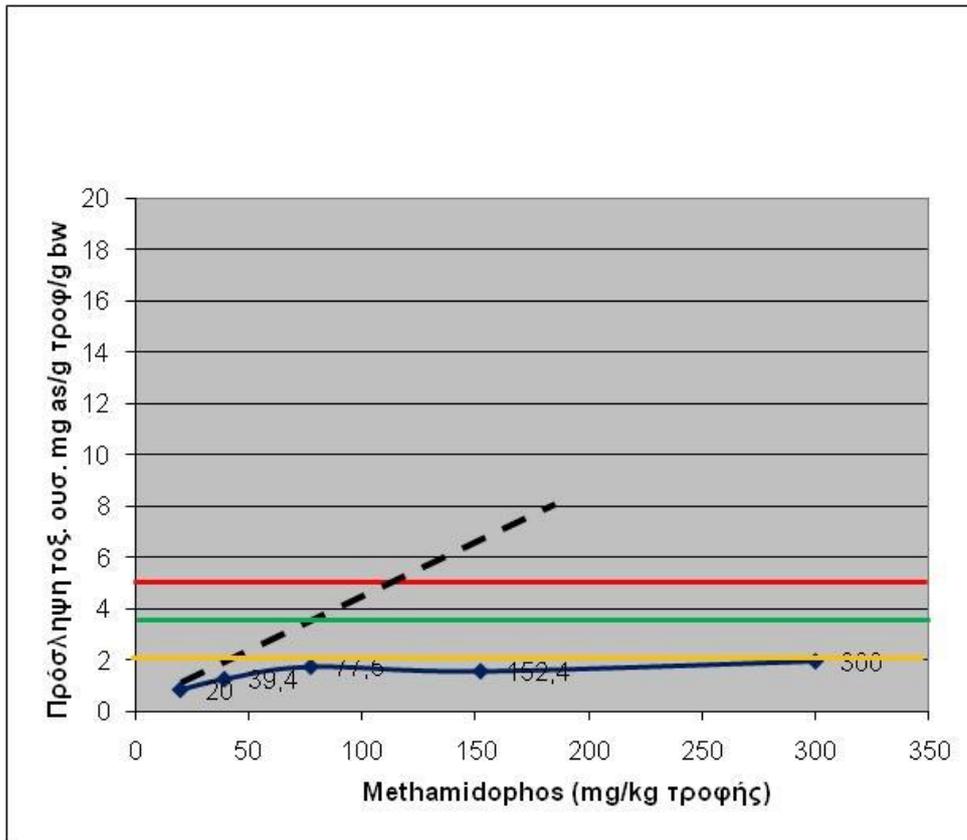
Γράφημα 3.1-16: Σχέση μεταξύ των ονομαστικών συγκεντρώσεων του methamidophos στην τροφή και του συντελεστή αποφυγής (RF) για την ημέρα 1, σε ιαπωνικό ορτύκι (*Coturnix coturnix japonica*) μετά από έκθεση σε διάφορες συγκεντρώσεις methamidophos (mg/kg τροφής). Η υποξεία τοξικότητα (two-choice test) ελέγχθηκε σε εργαστηριακές συνθήκες (n=6 άτομα/ομάδα επέμβασης)

Παράλληλα τα ίδια αποτελέσματα χρησιμοποιήθηκαν για την δημιουργία της γραφικής παράστασης της μέσης προσληφθείσας τοξικής ουσίας (mg as/gr τροφής/gr bw) methamidophos για κάθε συγκέντρωση για τις ημέρες 0, 1 και 3) (Γραφήματα 3.1-17/18/19). Η γραφική παράσταση επίσης δείχνει την σύγκριση της θεωρητικής προσληφθείσας τοξικής ουσίας methamidophos (διακεκομμένη γραμμή) εάν δεν υπήρχε αποφυγή, το LOEL που υπολογίστηκε για τη θνησιμότητα (η χαμηλότερη συγκέντρωση

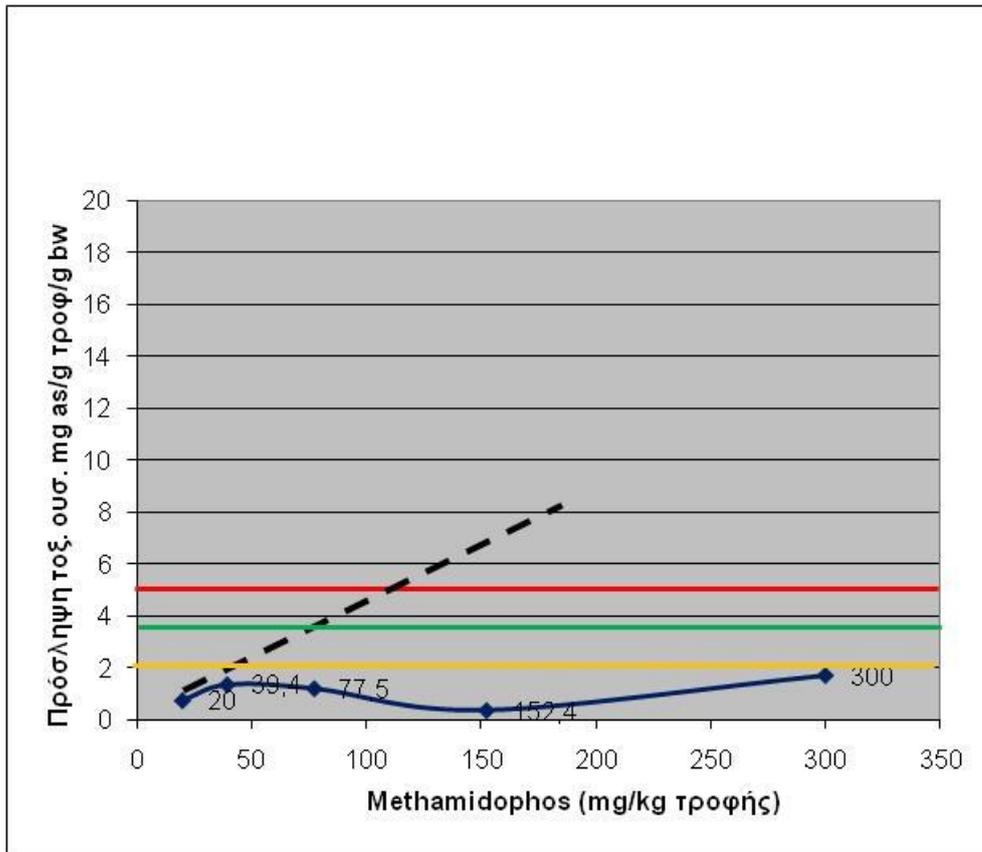
που καταγράφηκε θνησιμότητα, κόκκινη γραμμή), το EC₁₀ για την θνησιμότητα (που αντιστοιχεί στο NOEL την υψηλότερη συγκέντρωση που καταγράφεται θνησιμότητα, πράσινη γραμμή) καθώς και το LOEL για τα κλινικά συμπτώματα (η χαμηλότερη συγκέντρωση που καταγράφηκαν κλινικά συμπτώματα, πορτοκαλί γραμμή). Οι γραφικές αυτές παραστάσεις μας επιτρέπουν να βγάλουμε πρόσθετα συμπεράσματα για τους πιθανούς μηχανισμούς που υπογραμμίζουν αυτά τα αποτελέσματα. Έτσι στα Γραφήματα 3.1-17/18/19 φαίνεται ότι την ημέρα 0 η προσληφθείσα ουσία methamidophos είναι μεγαλύτερη από το LOEL για τα κλινικά συμπτώματα για τις 2 μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ενώ για την ημέρα 1 και 3 όλες οι συγκεντρώσεις σχημάτισαν ένα πλατό στο όριο που δεν παρατηρούνται κλινικά συμπτώματα, κυρίως για την συγκέντρωση των 300 mg/kg τροφής που είναι στο όριο αυτό.



Γράφημα 3.1-17: Σχέση μεταξύ του προσληφθέντος και των ονομαστικών συγκεντρώσεων του methamidophos στην τροφή για την ημέρα 0, σε ιαπωνικό ορνίθι (*Coturnix coturnix japonica*) μετά από έκθεση σε διάφορες συγκεντρώσεις methamidophos (mg/kg τροφής). Με διακεκομμένη γραμμή η θεωρητική προσληφθείσα τοξική ουσία, με κόκκινη γραμμή το LOEL για τη θνησιμότητα, με πράσινη γραμμή το EC₁₀ (NOEL) για την θνησιμότητα, με πορτοκαλί γραμμή το LOEL για τα κλινικά συμπτώματα. Η υποξεία τοξικότητα (two-choice test) ελέγχθηκε σε εργαστηριακές συνθήκες (n=6 άτομα/ομάδα επέμβασης)



Γράφημα 3.1-18: Σχέση μεταξύ του προσληφθέντος και των ονομαστικών συγκεντρώσεων του methamidophos στην τροφή για την ημέρα 1, σε ιαπωνικό ορτύκι (*Coturnix coturnix japonica*) μετά από έκθεση σε διάφορες συγκεντρώσεις methamidophos (mg/kg τροφής). Με διακεκομμένη γραμμή η θεωρητική προσληφθείσα τοξική ουσία, με κόκκινη γραμμή το LOEL για τη θνησιμότητα, με πράσινη γραμμή το EC₁₀ (NOEL) για την θνησιμότητα, με πορτοκαλί γραμμή το LOEL για τα κλινικά συμπτώματα. Η υποξεία τοξικότητα (two-choice test) ελέγχθηκε σε εργαστηριακές συνθήκες (n=6 άτομα/ομάδα επέμβασης)



Γράφημα 3.1-19: Σχέση μεταξύ του προσληφθέντος και των ονομαστικών συγκεντρώσεων του methamidophos στην τροφή για την ημέρα 3, σε ιαπωνικό ορτύκι (*Coturnix coturnix japonica*) μετά από έκθεση σε διάφορες συγκεντρώσεις methamidophos (mg/kg τροφής). Με διακεκομμένη γραμμή η θεωρητική προσληφθείσα τοξική ουσία, με κόκκινη γραμμή το LOEL για τη θνησιμότητα, με πράσινη γραμμή το EC₁₀ (NOEL) για την θνησιμότητα, με πορτοκαλί γραμμή το LOEL για τα κλινικά συμπτώματα. Η υποξεία τοξικότητα (two-choice test) ελέγχθηκε σε εργαστηριακές συνθήκες (n=6 άτομα/ομάδα επέμβασης)

3.1.5 Δοκιμές αποφυγής ημι-αγρού “pen test”

3.1.5.1 Μακροσκοπικές παρατηρήσεις

3.1.5.1.1 Θνησιμότητα

Η μοναδική θνησιμότητα (1 ορτύκι) που καταγράφηκε από τα 2 πτηνά/κλωβό που χρησιμοποιήθηκαν κατά την έναρξη του πειραματισμού, ήταν την ημέρα 3 της έκθεσης για την συγκέντρωση των 152,4 mg/kg τροφής.

Στον μάρτυρα και σε όλες τις συγκεντρώσεις δεν υπήρχαν νεκρά πτηνά. Όσον αφορά την θνησιμότητα το NOEL=77,5 mg/kg τροφής ενώ το LD₅₀>152,4 mg/kg τροφής μετά από 3 d πειραματισμού.

3.1.5.1.2 Κλινικά συμπτώματα

Στον μάρτυρα και σε όλες τις συγκεντρώσεις, τα πτηνά έδειχναν υγιή ενώ δεν υπήρχαν εμφανή κλινικά συμπτώματα. Λόγω του μεγάλου χώρου που είχαν για να κινηθούν αλλά και των καιρικών συνθηκών, ήταν δύσκολη η παρατήρησή τους. Άλλοτε λιάζονταν και ήταν ενεργά και άλλοτε κρυβόταν πίσω από ξύλα ή προστατευμένες περιοχές.

3.1.5.1.3 Πρόσληψη τροφής

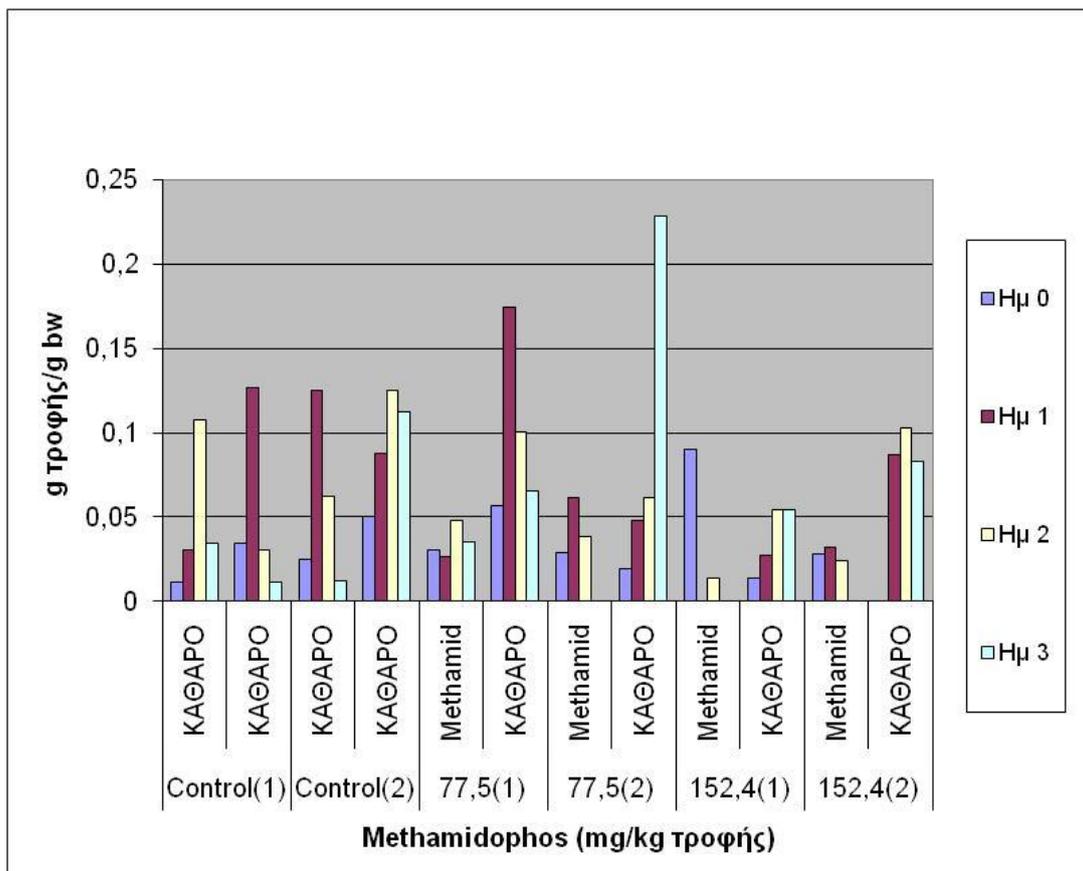
Ο ρυθμός πρόσληψης τροφής (gr τροφής/gr bw) κατά την διάρκεια των 3 d παρατήρησης για τον μάρτυρα δεν ήταν πάντα ανάλογος για τις 2 ταΐστρες και στις 2 επαναλήψεις. Τα ορτύκια πλησίαζαν την ταΐστρα που ήθελαν διαφοροποιώντας τη συνολική ημερήσια ποσότητα που προσλάμβαναν.

Για την συγκέντρωση των 77,5 mg/kg τροφής για την 1^η επανάληψη υπήρξε μία ελαφρά προτίμηση και για τις 3 d προς το καθαρό σιτηρέσιο. Στη 2^η επανάληψη για την ημέρα 0 και 1 τα ορτύκια φαίνεται να μην ξεχωρίζουν την ταΐστρα από την οποία τρέφονται. Για τις επόμενες 2 d (ημέρα 2, 3) υπήρξε προτίμηση και για προς το καθαρό σιτηρέσιο και ιδίως την ημέρα 3, τα ορτύκια τρέφονται αποκλειστικά από την ταΐστρα

με το καθαρό σιτηρέσιο. Χαρακτηριστική είναι και εδώ η διάφορη συνολική ημερήσια ποσότητα που προσλαμβάνουν.

Για την συγκέντρωση των 152,4 mg/kg τροφής, υπήρξε σαφής προτίμηση προς το καθαρό σιτηρέσιο και για τις 3 d του πειραματισμού. Ειδικότερα για την 1^η επανάληψη για την ημέρα 0 τα ορτύκια φαίνεται να μην ξεχωρίζουν την ταΐστρα από την οποία τρέφονται και να προτιμούν σιτηρέσιο που έχει methamidophos. Για τις επόμενες 3 d (ημέρα 1-3) υπήρξε προτίμηση προς το καθαρό σιτηρέσιο και ιδίως την ημέρα 1, 3, τα ορτύκια τρέφονται αποκλειστικά από την ταΐστρα με το καθαρό σιτηρέσιο. Στη 2^η επανάληψη τα ορτύκια φαίνεται να μην ξεχωρίζουν την ταΐστρα από την οποία τρέφονται και να προτιμούν αποκλειστικά το σιτηρέσιο που έχει methamidophos. Για όλες τις άλλες ημέρες υπήρξε προτίμηση προς το καθαρό σιτηρέσιο και ιδίως την ημέρα 3, τα ορτύκια τρέφονται αποκλειστικά από την ταΐστρα με το καθαρό σιτηρέσιο. Εδώ η συνολική ημερήσια ποσότητα που προσλαμβάνουν είναι στις περισσότερες περιπτώσεις η ίδια.

Ο ρυθμός πρόσληψης τροφής, για τον πειραματισμό της υποξείας τοξικότητας στο ορτύκι (pen test), παρατίθενται στο Γράφημα 3.1-20.



Γράφημα 3.1-20: Ρυθμός πρόσληψης τροφής (FIR) σε ιαπωνικό ορτύκι (*Coturnix coturnix japonica*) μετά από έκθεση σε διάφορες συγκεντρώσεις methamidophos (mg/kg τροφής). Η υποξεία τοξικότητα (pen test) ελέγχθηκε σε συνθήκες ημι-αγρού (n=2 άτομα/ομάδα επέμβασης)

3.1.5.1.4 Σωματικό βάρος

Το μέσο σωματικό βάρος για τον μάρτυρα μειώθηκε πολύ λίγο (3,3%). Για τις συγκεντρώσεις των 77,5 και 152,4 mg/kg τροφής, το μέσο σωματικό βάρος μειώθηκε αναλογικά, 9,9 και 19,0%, αντίστοιχα μόνο για τις 3 d της έκθεσης. Για το νεκρό πτηνό το σωματικό του βάρος είχε μειωθεί κατά 33%.

Το ποσοστό μεταβολής του σωματικού βάρους, για τον πειραματισμό της υποξείας τοξικότητας στο ορτύκι (pen test), παρατίθενται στον Πίνακα 3.1-41.

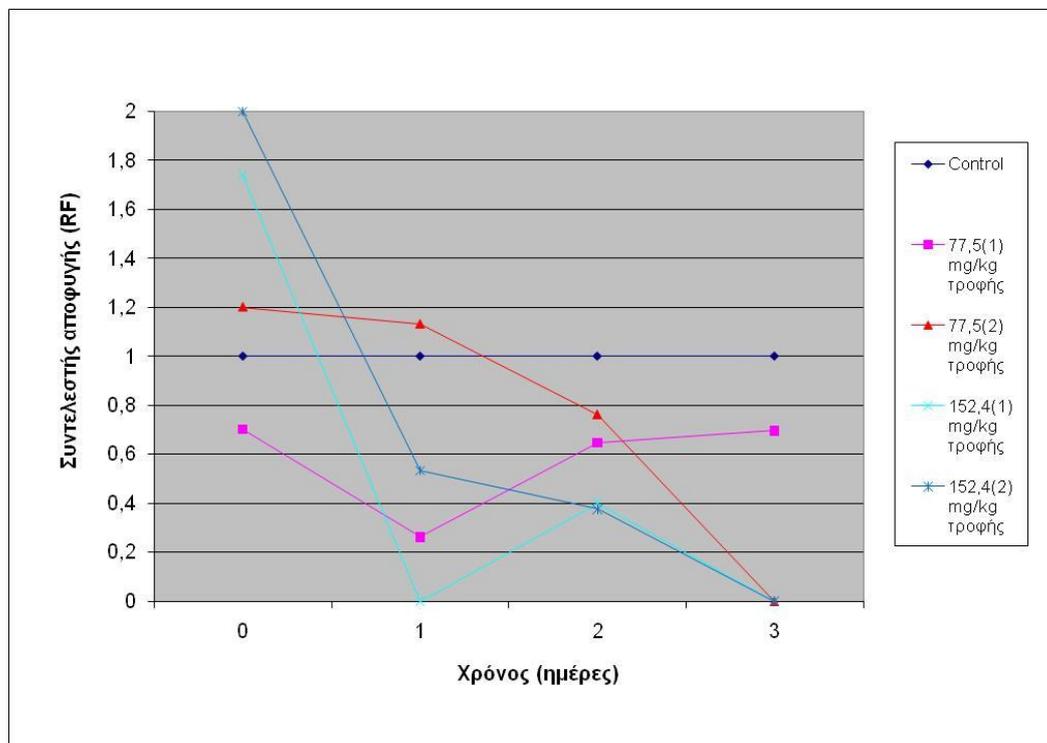
Πίνακας 3.1-41: Ποσοστό μεταβολής του σωματικού βάρους σε ιαπωνικό ορτύκι (*Coturnix coturnix japonica*) μετά από έκθεση σε διάφορες συγκεντρώσεις methamidophos (mg/kg τροφής). Η υποξεία τοξικότητα (pen test) ελέγχθηκε σε συνθήκες ημι-αγρού (n=2 άτομα/ομάδα επέμβασης)

Methamidophos (mg/kg τροφής)	Ποσοστό μεταβολής του σωματικού βάρους (%)	
	Ημέρες παρατήρησης	
	0 - 3	
0	-3,3	± 7,5 ¹
77,5	-9,9	± 3,2
152,4	-19,0	± 13,0

¹ Τα αποτελέσματα εκφράζονται MO ± SD.

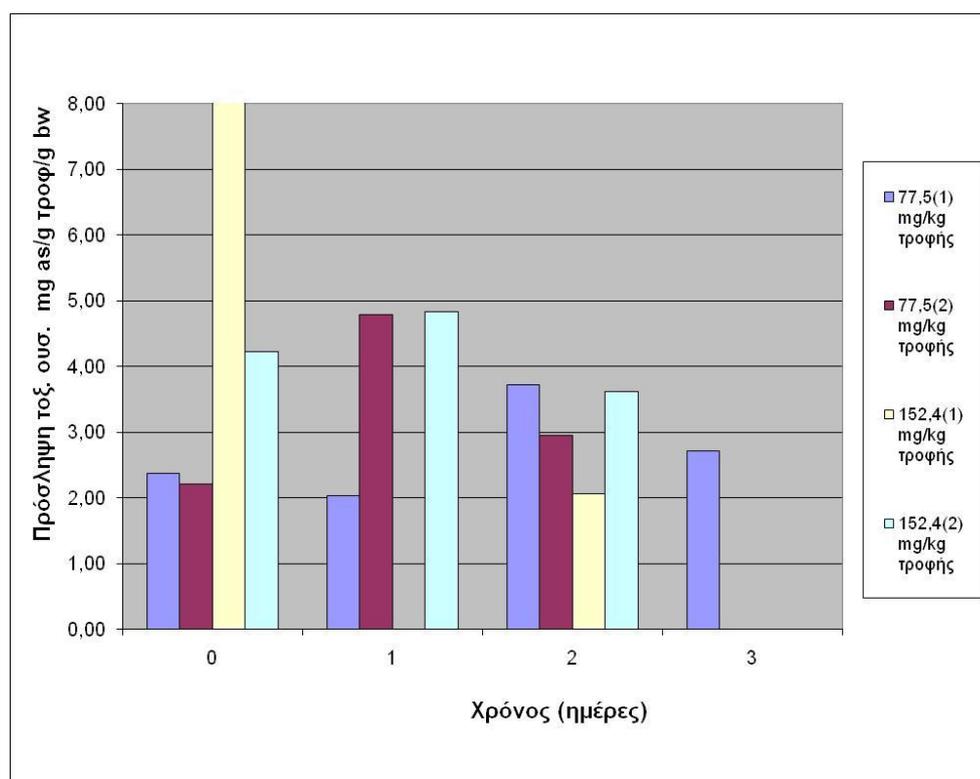
3.1.5.1.5 Συντελεστής αποφυγής (RF)

Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης δείχνουν αποφυγή (συντελεστή αποφυγής RF<1) αρχίζοντας από την συγκέντρωση των 77,5 mg/kg τροφής ενώ η ένταση της αποφυγής ήταν πολύ υψηλή για τη συγκέντρωση των 152,4 mg/kg τροφής. Την ημέρα 0, είναι εμφανές η μη επιλεκτική επιλογή του σιτηρεσίου, σε μία περίπτωση μάλιστα τα ορτύκια τρέφονται αποκλειστικά από σιτηρέσιο που έχει methamidophos. Η αποφυγή αυτή συνεχίστηκε σε εντονότερο βαθμό κάθε ημέρα και για τις 3 d του πειραματισμού. Την ημέρα 3 στις 3 από τις 4 περιπτώσεις τα ορτύκια έφαγαν αποκλειστικά από το καθαρό σιτηρέσιο (Γράφημα 3.1-21).



Γράφημα 3.1-21: Συντελεστής αποφυγής τροφής (RF) σε ιαπωνικό ορτύκι (*Coturnix coturnix japonica*) μετά από έκθεση σε διάφορες συγκεντρώσεις methamidophos (mg/kg τροφής). Η υποξεία τοξικότητα (pen test) ελέγχθηκε σε συνθήκες ημι-αγρού (n=2 άτομα/ομάδα επέμβασης)

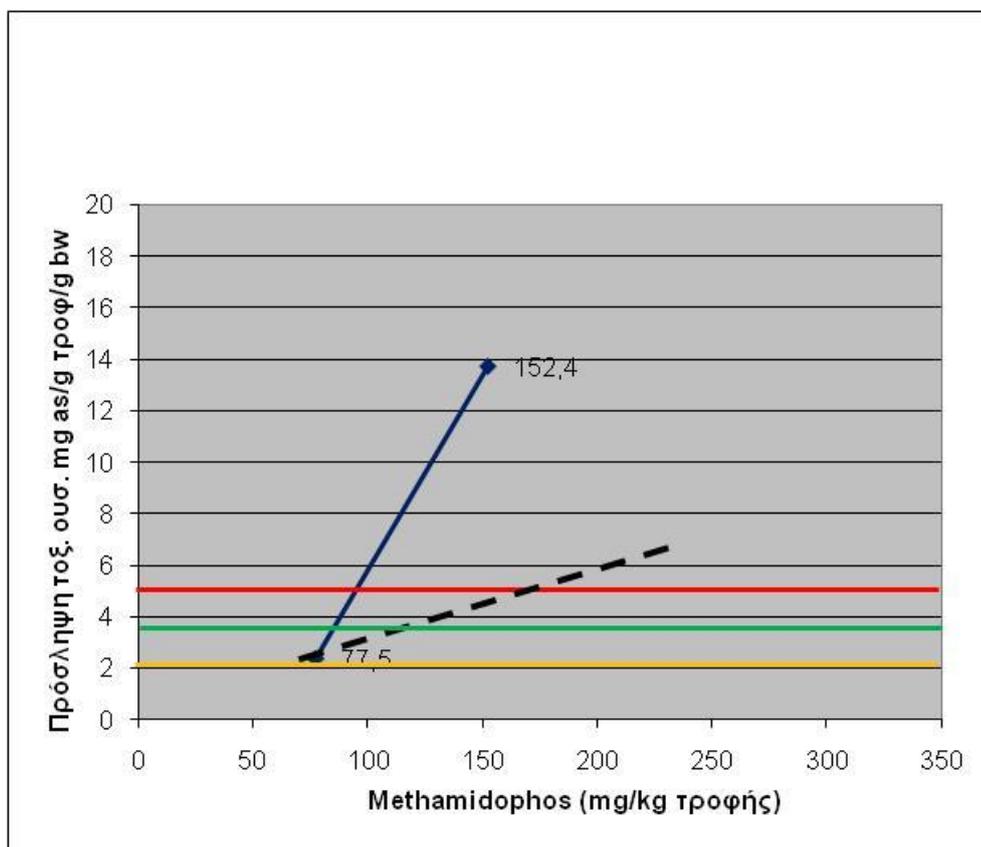
Με βάση τα αποτελέσματα αυτά υπολογίστηκε και η προσληφθείσα ποσότητα methamidophos από τα ορτύκια για την κάθε συγκέντρωση. Είναι ενδεικτική για την ημέρα 0 η σημαντική αύξηση της προσληφθείσας ουσίας methamidophos για την συγκέντρωση των 152,4 mg/kg τροφής που στην 1^η επανάληψη έφτασε σε πολύ υψηλά ενώ την ημέρα 1 μηδενίστηκε. Τις ημέρες 1-3 η προσληφθείσα τοξική ουσία μειώνεται και την ημέρα 3, στις 3 από τις 4 περιπτώσεις μηδενίζεται (Γράφημα 3.1-22).



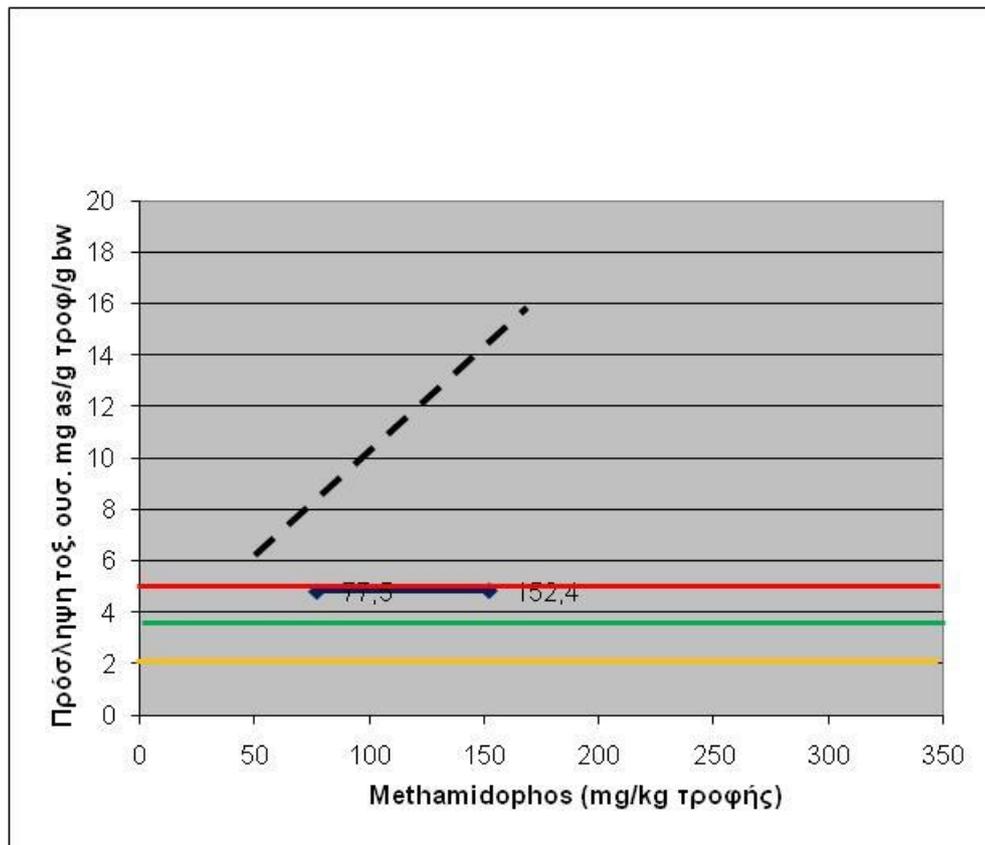
Γράφημα 3.1-22: Πρόσληψη methamidophos (mg as/gr τροφής/gr bw) σε ιαπωνικό ορτύκι (*Coturnix coturnix japonica*) μετά από έκθεση σε διάφορες συγκεντρώσεις methamidophos (mg/kg τροφής). Η υποξεία τοξικότητα (pen test) ελέγχθηκε σε συνθήκες ημι-αγρού (n=2 άτομα/ομάδα επέμβασης)

Επιπροσθέτως δημιουργήθηκε η γραφική παράσταση της μέγιστης, ανάμεσα στις 2 επαναλήψεις, μέσης προσληφθείσας τοξικής ουσίας (mg as/gr τροφής/gr bw) methamidophos για κάθε συγκέντρωση για τις ημέρες 0-3 (Γραφήματα 3.1-/23/24/25/26). Η γραφική παράσταση επίσης δείχνει την σύγκριση της θεωρητικής προσληφθείσας τοξικής ουσίας methamidophos (διακεκομμένη γραμμή) εάν δεν υπήρχε αποφυγή, το LOEL που υπολογίστηκε για τη θνησιμότητα (η χαμηλότερη συγκέντρωση που καταγράφηκε θνησιμότητα, κόκκινη γραμμή), το EC₁₀ για την θνησιμότητα (που αντιστοιχεί στο NOEL την υψηλότερη συγκέντρωση που καταγράφεται θνησιμότητα, πράσινη γραμμή) καθώς και το LOEL για τα κλινικά συμπτώματα (η χαμηλότερη

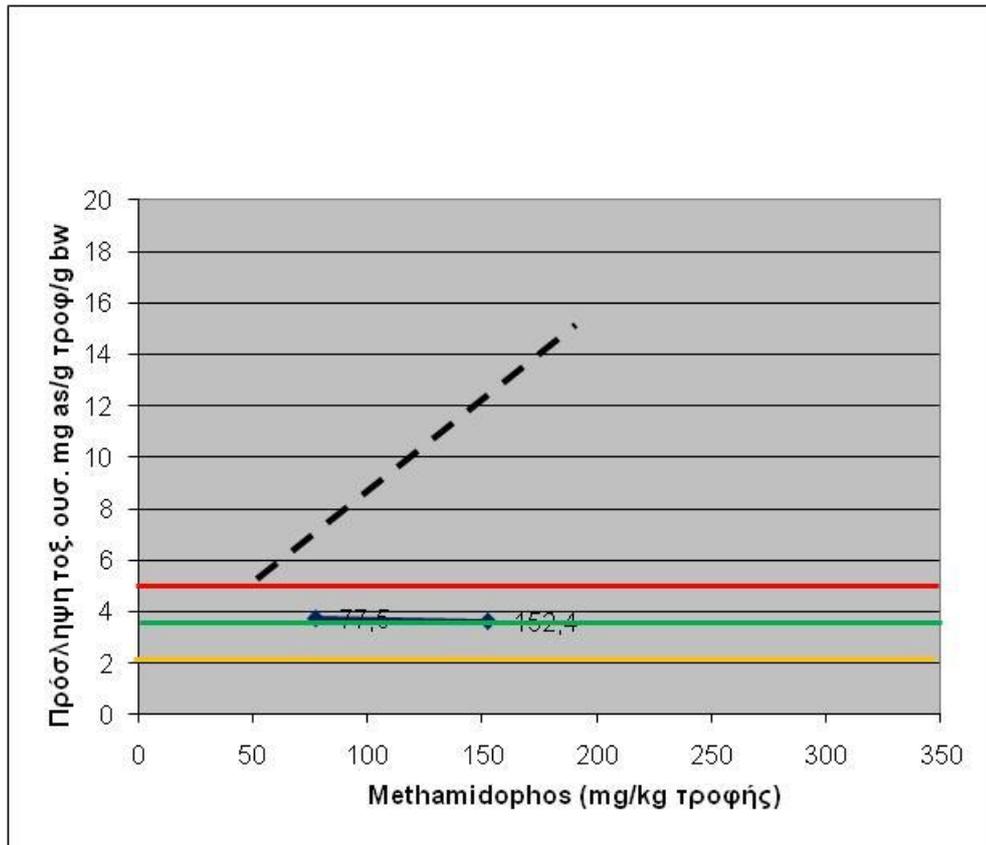
συγκέντρωση που καταγράφηκαν κλινικά συμπτώματα, πορτοκαλί γραμμή). Οι γραφικές αυτές παραστάσεις μας επιτρέπουν να βγάλουμε πρόσθετα συμπεράσματα για τους πιθανούς μηχανισμούς που υπογραμμίζουν αυτά τα αποτελέσματα. Έτσι στα Γραφήματα 3.1-22/23/24/25 φαίνεται για όλες τις ημέρες η προσληφθείσα ουσία methamidophos για την συγκέντρωση των 77,5 mg/kg τροφής είναι ανάμεσα στα όρια του LOEL για τα κλινικά συμπτώματα και για του LOEL για τη θνησιμότητα. Για την συγκέντρωση των 152,4 mg/kg τροφ. για την ημέρα 0 η προσληφθείσα τοξική ουσία είναι περίπου x3 του ορίου LOEL για τη θνησιμότητα. Τις επόμενες ημέρες η προσληφθείσα ουσία methamidophos μειώνεται μέχρι την ημέρα 3 όπου μηδενίζεται και για τις 2 επαναλήψεις.



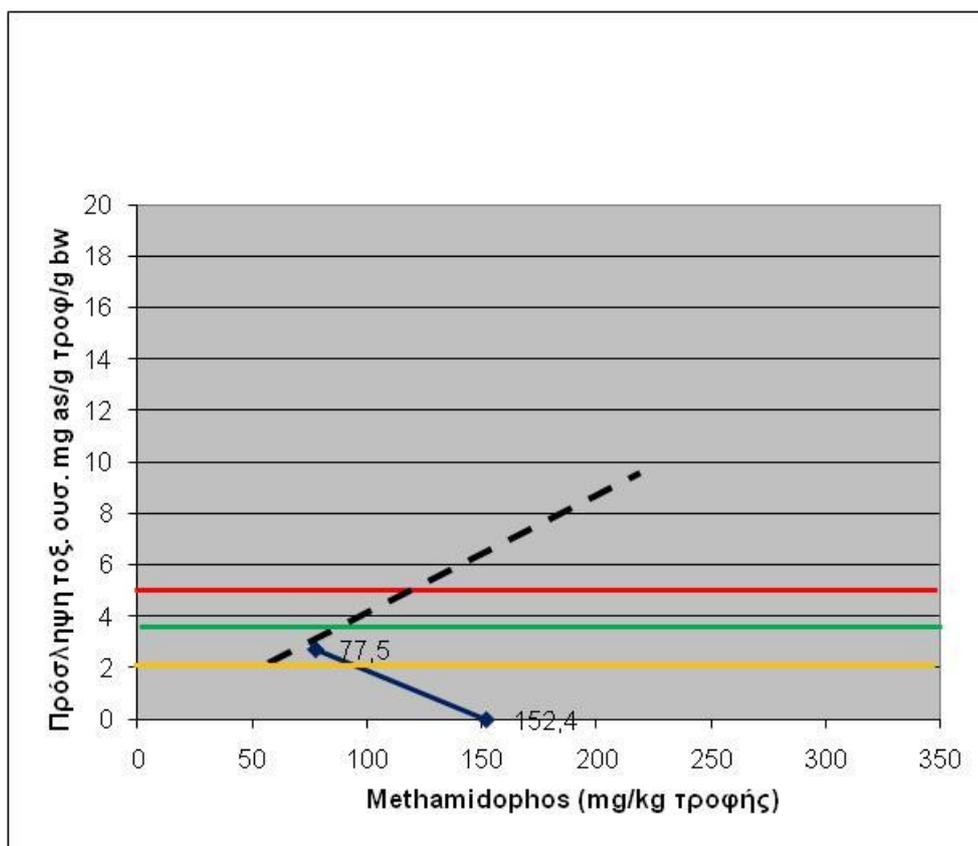
Γράφημα 3.1-23: Σχέση μεταξύ του προσληφθέντος και των ονομαστικών συγκεντρώσεων του methamidophos στην τροφή για την ημέρα 0, σε ιαπωνικό ορτύκι (*Coturnix coturnix japonica*) μετά από έκθεση σε διάφορες συγκεντρώσεις methamidophos (mg/kg τροφής). Με διακεκομμένη γραμμή η θεωρητική προσληφθείσα τοξική ουσία, με κόκκινη γραμμή το LOEL για τη θνησιμότητα, με πράσινη γραμμή το EC₁₀ (NOEL) για την θνησιμότητα, με πορτοκαλί γραμμή το LOEL για τα κλινικά συμπτώματα. Η υποξεία τοξικότητα (pen test) ελέγχθηκε σε συνθήκες ημι-αγρού (n=2 άτομα/ομάδα επέμβασης)



Γράφημα 3.1-24: Σχέση μεταξύ του προσληφθέντος και των ονομαστικών συγκεντρώσεων του methamidophos στην τροφή για την ημέρα 1, σε ιαπωνικό ορτύκι (*Coturnix coturnix japonica*) μετά από έκθεση σε διάφορες συγκεντρώσεις methamidophos (mg/kg τροφής). Με διακεκομμένη γραμμή η θεωρητική προσληφθείσα τοξική ουσία, με κόκκινη γραμμή το LOEL για τη θνησιμότητα, με πράσινη γραμμή το EC₁₀ (NOEL) για την θνησιμότητα, με πορτοκαλί γραμμή το LOEL για τα κλινικά συμπτώματα. Η υποξεία τοξικότητα (pen test) ελέγχθηκε σε συνθήκες ημι-αγρού (n=2 άτομα/ομάδα επέμβασης)



Γράφημα 3.1-25: Σχέση μεταξύ του προσληφθέντος και των ονομαστικών συγκεντρώσεων του methamidophos στην τροφή για την ημέρα 2, σε ιαπωνικό ορτύκι (*Coturnix coturnix japonica*) μετά από έκθεση σε διάφορες συγκεντρώσεις methamidophos (mg/kg τροφής). Με διακεκομμένη γραμμή η θεωρητική προσληφθείσα τοξική ουσία, με κόκκινη γραμμή το LOEL για τη θνησιμότητα, με πράσινη γραμμή το EC₁₀ (NOEL) για την θνησιμότητα, με πορτοκαλί γραμμή το LOEL για τα κλινικά συμπτώματα. Η υποξεία τοξικότητα (pen test) ελέγχθηκε σε συνθήκες ημι-αγρού (n=2 άτομα/ομάδα επέμβασης)



Γράφημα 3.1-26: Σχέση μεταξύ του προσληφθέντος και των ονομαστικών συγκεντρώσεων του methamidophos στην τροφή για την ημέρα 3, σε ιαπωνικό ορτύκι (*Coturnix coturnix japonica*) μετά από έκθεση σε διάφορες συγκεντρώσεις methamidophos (mg/kg τροφής). Με διακεκομμένη γραμμή η θεωρητική προσληφθείσα τοξική ουσία, με κόκκινη γραμμή το LOEL για τη θνησιμότητα, με πράσινη γραμμή το EC₁₀ (NOEL) για την θνησιμότητα, με πορτοκαλί γραμμή το LOEL για τα κλινικά συμπτώματα. Η υποξεία τοξικότητα (pen test) ελέγχθηκε σε συνθήκες ημι-αγρού (n=2 άτομα/ ομάδα επέμβασης)

3.1.5.2 Βιοχημικά αποτελέσματα

Για το μοναδικό νεκρό πτηνό της 1^η επανάληψης της συγκέντρωσης των 152,4 mg/kg τροφής η δραστηκότητα της AChE στον εγκέφαλο είχε παρεμποδιστεί κατά 64% και των εστερασών, όταν χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα το PrSCh, κατά 75%.

Για το ήπαρ η δραστηκότητα της BuChE είχε παρεμποδιστεί 68% και των εστερασών, όταν χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα το PrSCh, κατά 99%.

3.1.5.3 Ιστοχημικές χρώσεις

Για το νεκρό πτηνό, στον εγκέφαλο, για τη χρώση Ηωσίνης – Αιματοξυλίνης παρατηρήθηκε εστιακά καρνομεγαλία. Για τις χρώσεις της AChE, BuChE και των ChEs που υδρολύουν την PrSCh παρατηρήθηκε 75% αύξηση, 76% παρεμπόδιση και 85% παρεμπόδιση για την συνολική ποσοτική έκφραση της χρώσης, αντίστοιχα.

3.1.6 Μοντέλο επιβάρυνσης του οργανισμού (Body burden model)

3.1.6.1 ADME (απορρόφηση, κατανομή, μεταβολισμός και απέκκριση)

Παρακάτω παρουσιάζονται διάφορες βιβλιογραφικές μελέτες σχετικά με την απορρόφηση, την κατανομή και την απέκκριση του methamidophos σε επίμυες, μυς, αίγες και όρνιθες που διεξήχθησαν με ραδιοσημασμένα [S-methyl-¹⁴C] - και [³²P]-υλικά.

3.1.6.1.1 Απορρόφηση, κατανομή και απέκκριση

Σύμφωνα με τους Spassova et al. (2000) εφαρμογή το methamidophos (5 mg/kg) σε επίμυες, 15 και 60 min μετά τη δόση διανεμήθηκε στο αίμα, το ήπαρ, τον εγκέφαλο και τα επινεφρίδια, γεγονός που μπορεί να ευθύνεται για τις μεταγενέστερες επιπτώσεις στη λειτουργία των εν λόγω ιστών. Μετά την εφαρμογή, τα επίπεδα του methamidophos μειώθηκαν σταδιακά με το χρόνο στο αίμα, το ήπαρ και τα επινεφρίδια και αυξήθηκαν στον εγκέφαλο. Το $t_{1/2} = 21 \text{ min}$ ($R^2=0,8$) ή $k=0,034 \text{ min}^{-1}$ στο αίμα και $t_{1/2} = 20 \text{ min}$ ($R^2=0,78$) ή $k=0,033 \text{ min}^{-1}$ στο ήπαρ. Ο μηχανισμός με τον οποίο το methamidophos εισέρχονται στον εγκέφαλο και συσσωρεύονται με το χρόνο είναι ακόμα άγνωστος. Το methamidophos έχει υδρόφιλους και υδρόφοβους τομείς που μπορούν να διαχυθούν μέσω του αιματοεγκεφαλικού φραγμού (blood brain barrier), καθώς εύκολα διαχέεται μέσω των κυτταρικών μεμβρανών (Singh et al. 1998). Η διάχυση δεν μπορεί να είναι η μόνη διαδικασία καθώς μπορεί να υπάρχει επίσης ενεργός μηχανισμός μεταφοράς, δεδομένου ότι τα εντομοκτόνα συσσωρεύονται παρά τη μεταβολή της συγκέντρωσης τους.

Η προοδευτική μείωση των επιπέδων τόσο του acephate όσο και του methamidophos σε ήπαρ μύος αναφέρθηκε επίσης από τους Mahajna et al. (1997). Σύμφωνα με τους Mahajna et al. (1997) το methamidophos (5 mg/kg,) δεν παράγει ανιχνεύσιμα επίπεδα στο ήπαρ (<1 ppm, <20% της εφαρμογής) 4 h μετά τη χορήγηση, με αποτέλεσμα το $k=0,0067 \text{ min}^{-1}$.

Μια έκθεση των Υπολείμματα των φυτοφαρμάκων στα τρόφιμα (FAO/WHO, 2002) αναφέρει μία σειρά από αποτελέσματα ως εξής:

3.1.6.1.1.1 Επίμυες

Μελέτες σχετικά με την απορρόφηση, την κατανομή και την απέκκριση του methamidophos σε επίμυες διεξήχθησαν με ραδιοσημασμένα [S-methyl-¹⁴C]- και [³²P]-υλικά. Σε μία μελέτη, [S- methyl-¹⁴C]-methamidophos (καθαρότητα >99,5%) χορηγήθηκε από το στόμα σε θηλυκούς επίμυες, σε 0,18 mg ανά επίμυ (0,5 μCi), και στην άλλη μελέτη ραδιοσημασμένο [³²P]-methamidophos (καθαρότητα >99,5%) χορηγήθηκε από το στόμα σε 0,21 mg ανά επίμυ (2,7 μCi) σε αρσενικούς και θηλυκούς επίμυες. Και τα δύο ραδιοσημασμένα υλικά methamidophos απορροφήθηκαν, κατανεμήθηκαν, μεταβολίστηκαν και εκκρίθηκαν γρήγορα. Η ραδιενέργεια κατανέμεται ομοιόμορφα σε όλο το σώμα. Δύο φάσεις θα μπορούσαν να διακριθούν στο ρυθμό απέκκρισης: μια περίοδο ταχείας απέκκρισης, που διαρκεί 1-3 d, κατά την οποία αποβλήθηκε >50% της χορηγηθείσας δόσης, και μια δεύτερη περίοδο κατά την οποία 1-2% της δόσης αποβαλλόταν καθημερινά. Η δόση που παράμεινε στα ζώα μετά την πρώτη φάση του ταχέως μεταβολισμού και της απέκκρισης αποτελούνταν από ίχνη methamidophos, των μεταβολιτών του και συστατικά του σώματος της ραδιοσήμανσης. Η μείωση του ¹⁴CO₂ εντός των πρώτων 6 h κάλυπτε το 32% της ανακτηθείσας ραδιενέργειας, με 6% της δόσης στα ούρα. Σε 5 d, μόνο το 50% της χορηγηθείσας δόσης ανακτήθηκε (39% ως ¹⁴CO₂ και το υπόλοιπο κυρίως στα ούρα). Περίπου το 70% των ανακτημένων ³²P παρατηρήθηκε στα ούρα εντός 24 h. Στα περιττώματα περιέχονται μικρές ποσότητες που εκκρίνονται σε διάστημα 28 d (Crossley and Tutass, 1969). Ως χειρότερη περίπτωση το 50% της χορηγηθείσας δόσης αποβάλλεται μετά από 3 d, που αντιστοιχεί σε $k=0,00016 \text{ min}^{-1}$.

Η ιστολογική κατανομή και η απέκκριση της ουσίας [S-methyl-¹⁴C]-methamidophos σε θηλυκούς επίμυες μελετήθηκε μετά από ενδοφλέβια έγχυση τοξικής αλλά όχι θανατηφόρας δόσης (8 mg/kg bw) methamidophos. Η ραδιοσήμανση διανεμήθηκε ταχέως σε όλους τους ιστούς σε περίπου ίσες συγκεντρώσεις. Τα μέγιστα επίπεδα στους ιστούς επιτεύχθηκαν μέσα σε 1-10 min, με εξαίρεση το κεντρικό και περιφερικό νευρικό σύστημα, όπου η μέγιστη συγκέντρωση (40 nmol/gr) βρέθηκε μετά από 20-60 min και που αντιστοιχεί στην κορύφωση των συμπτωμάτων τοξικότητας.

Μέσα σε 24 h από τη χορήγηση, το 47% της ραδιενέργειας ανακτήθηκε στα ούρα και το 34% ως $^{14}\text{CO}_2$, με <5% στα περιττώματα σε διάστημα 7 d (Gray et al. 1982) που αντιστοιχεί σε $k=0,0011 \text{ min}^{-1}$.

Σε αρσενικούς επίμυες δόθηκε θειική ατροπίνη στα 100 mg/kg, ενδοπεριτοναϊκά, 10-15 min πριν από την ενδοφλέβια χορήγηση methamidophos (καθαρότητας 74%) σε προπυλενογλυκόλη σε δόση 10 mg/kg bw. Λήφθηκαν δείγματα αίματος σε διάφορα χρονικά διαστήματα μετά τη δοσολογία (10 έως 600 min), και αναλύθηκαν οι συγκεντρώσεις του methamidophos στο πλάσμα. Εκτιμήθηκε η φαρμακοκινητική με χρόνο ημίσειας ζωής ($t_{1/2}$) 1,5 h, όγκο κατανομής (VD) 0,81 l/kg bw. Η εκκαθάριση (clearance, C1) ήταν 5,8 ml/min/kg bw, και ο ρυθμός αποβολής (k_{el}) ήταν 0,45/h (0.0075 min^{-1}). Ο όγκος κατανομής 0,81 L/kg, που δείχνει ότι το methamidophos δεν δεσμεύεται έντονα στους ιστούς (Eigenberg et al. 1983).

Συμπερασματικά σημασμένα [S-methyl- ^{14}C]- και [^{32}P]-methamidophos που χορηγήθηκε από το στόμα, ενδοφλεβίως ή ενδοπεριτοναϊκά σε επίμυες απορροφήθηκε και κατανεμήθηκε γρήγορα, 50-77% της χορηγούμενης δόσης αποβάλλεται μέσα στις πρώτες 1-3 d μετά την εφαρμογή. Τα ούρα και το CO_2 ήταν τα κύρια μέσα αποβολής των ^{14}C -σημασμένων υλικών και τα ούρα και τα περιττώματα των σημασμένων ^{32}P methamidophos. Ορισμένη ραδιενέργεια ενσωματώθηκε στο σώμα με τη μορφή θραυσμάτων ^{14}C και τελικά απομακρύνθηκε.

Όταν [S-methyl- ^{14}C] methamidophos (ειδικής ραδιενέργειας, 182 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$) χορηγήθηκε από το στόμα σε δόση των 8 mg/kg bw την ημέρα 18 της κυοφορίας επίμυων, απορροφήθηκε γρήγορα και κατανεμήθηκε εντός 1 h σε διάφορους ιστούς, συμπεριλαμβανομένου του πλακούντα και του εμβρύου, και αποβλήθηκε μέσα σε 48 h και από τα δύο φράγματα και τα έμβρυα. Σε μια παρόμοια μελέτη, επίμυες σε θηλασμό 10 min και 0,5, 1, 3, 6, 12, 24 και 48 h μετά τη δόση, και τα ούρα, περιττώματα, αέρας, το αίμα, επιλεγμένοι ιστοί και έμβρυα αναλύθηκαν για ραδιενέργεια. Σε γενικές γραμμές, η κατανομή της ραδιενέργειας ήταν γρήγορη, οι συγκεντρώσεις στους περισσότερους ιστούς κορυφώθηκε μέσα σε 1 h. Λιγότερη ραδιενέργεια βρέθηκε στο νευρικό σύστημα από ό, τι στους περισσότερους άλλους ιστούς. Οι συγκεντρώσεις του methamidophos στα κουτάβια έδειξε ότι ήταν παρούσα στο γάλα (Salama, 1990).

[S-methyl- ^{14}C] methamidophos (ραδιοχημικής καθαρότητας >99%, ειδικής ραδιενέργειας, 26 mCi/mmol/l), χορηγήθηκε από το στόμα σε δόση 1 mg/kg bw σε οκτώ άρρενες επίμυες. Ούρα, περιττώματα και CO_2 συλλέχθηκαν, καθώς η ραδιενέργεια προσδιορίστηκε στις εκκρίσεις και σε όργανα 24 h μετά τη χορήγηση. Η

νεφρική και πνευμονική απέκκριση ήταν γρήγορη, καθώς σχεδόν το 50% της χορηγηθείσας ραδιενέργειας αποβλήθηκε στα ούρα και στον αέρα εντός 24 h το οποίο αντιστοιχεί σε $k=0,00048 \text{ min}^{-1}$. Περίπου το ένα τρίτο της χορηγηθείσας ραδιενέργειας αποβλήθηκε με τα ούρα, ενώ αμελητέα ποσά αποβάλλονται με τα περιττώματα. Το υπόλοιπο της ραδιενέργειας στο σώμα, εκτός από το γαστρεντερικό σωλήνα, ανήλθε περίπου σε 17% της χορηγηθείσας δόσης. Το υψηλότερο ισοδύναμο σε συγκεντρώσεις ραδιενέργειας μετρήθηκε στο ήπαρ, ενώ οι νεφροί και οι πνεύμονες αντανάκλουν τις βασικές οδούς απέκκρισης (Klein, 1997).

Σε έκθεση του FAO (2003) για το methamidophos αναφέρει εκθέσεις με μελέτες μεταβολισμού ζώων για το methamidophos σε θηλάζουσες αίγες και ωοτόκες όρνιθες ως ακολούθως:

3.1.6.1.1.2 Αίγες

Παρακάτω αναλύεται ο μεταβολισμός ^{14}C -methamidophos σε θηλάζουσες αίγες σε τρεις μελέτες.

Στην πρώτη μελέτη, οι Crossley and Lee (1972) μελέτησαν την τύχη του [S-methyl- ^{14}C] methamidophos σε θηλάζοντες αίγες (περίπου 19 kg bw). Στις αίγες χορηγήθηκε από το στόμα methamidophos με κάψουλα επί 7 συνεχείς ημέρες (ισοδύναμο με 2 ppm στη διατροφή). Αναλύσεις έγιναν 11 d μετά την τελική δόση. Περίπου το 26% χορηγούμενης δόσης αποβλήθηκε κατά τη διάρκεια της μελέτης (18% στα ούρα, 4,7% στα περιττώματα, 3,2% στο γάλα).

Κατάλοιπα ^{14}C παρατηρήθηκαν σε ιστούς των αιγών 11 d μετά την τελική δόση ήταν παρόμοια για όλους τους ιστούς που αναλύθηκαν (0,16 έως 0,22 ppm). Στο γάλα ανιχνεύθηκε methamidophos περίπου 0,002 mg/kg κατά τη διάρκεια της περιόδου χορήγησης, αλλά καθόλου κατά την περίοδο αποκατάστασης.

Ο Tucker (1976) χορήγησε [S-methyl- ^{14}C] methamidophos σε μια αίγα γαλακτοπαραγωγής (50 kg bw) σε 4 mg/d, για 7 d. Η δόση αυτή ισοδυναμεί με διατροφή περίπου 2,1 ppm και χορηγήθηκε σε 3 χωριστές ημερήσιες δόσεις για 2 συνεχόμενες ημέρες, το πρωί, το μεσημέρι και το βράδυ. Το γάλα, συγκεντρώθηκε το πρωί και το βράδυ. Η αίγα σφάχτηκε 3 h μετά την τελευταία δόση. Κανένας από τους ιστούς δεν περιείχε δεσμευμένα ή συζευγμένα υπολείμματα methamidophos. Κατά τη διάρκεια της μελέτης, τα υπολείμματα methamidophos στο γάλα από το πρωινό

άρμεγμα ήταν όλα <LOD, ενώ το βράδυ έφτασε το ανώτατο όριο των 0,01 mg/kg την ημέρα 5 από την έναρξη της δοσολογίας ενώ ήταν 0,008 mg/kg την ημέρα 9.

Στην τρίτη και πιο ολοκληρωμένη μελέτη, οι Baker and Bautista (1997) σε αίγα γαλακτοπαραγωγής (38 kg bw, μέση τιμή 2,7 τροφή kg/d) χορηγήθηκε [S-methyl-¹⁴C] methamidophos από το στόμα με κάψουλα για 3 συνεχόμενες ημέρες (από μισό πρωί και βράδυ) με 0,7 mg/kg bw/d, που ισοδυναμεί με διατροφή 11,5 ppm. Δείγματα συλλέχθηκαν 18 h μετά την τελευταία δόση.

Τα ραδιενεργά υπολείμματα ήταν υψηλότερα στο ήπαρ και ακολουθείται από το γάλα, τους νεφρούς, τους μυς και το λίπος. Το methamidophos δεν ανιχνεύθηκε σε ιστούς και μόνο σε χαμηλά επίπεδα εντοπίστηκαν στο γάλα. Η πλειοψηφία των ¹⁴C συνδέθηκε με πρωτεΐνες και αμινοξέα, και ιδίως μεθειονίνης (ήπαρ, νεφρά, μύες), λακτόζη (γάλα) και τριγλυκερίδια (λίπος).

3.1.6.1.1.3 Όρνιθες

Ο μεταβολισμός του ¹⁴C-methamidophos αναφέρθηκε σε 2 μελέτες με φωτόκες όρνιθες. Στην πρώτη μελέτη, σε φωτόκες όρνιθες (16 πουλιά) χορηγήθηκε από το στόμα με μία μόνο δόση ¹⁴C-methamidophos σε δόση 1 mg/kg bw (Ackerman and Wilkes, 1974). Δείγματα ιστών συλλέχθηκαν σε 6, 24, 48 και 96 h μετά τη χορήγηση. Τα αυγά συλλέγονταν κάθε μέρα. Ραδιοσημασμένο υλικό που εμφανίστηκε στους ιστούς (σπλαχνικό λίπος, το δέρμα, τους μυς του στήθους, τους μυς του μηρού, το στομάχι, την καρδιά, τους νεφρούς, το ήπαρ) και στα αυγά μειώθηκε σταδιακά με το χρόνο. Τα ραδιενεργά υπολείμματα ήταν υψηλότερα στο ήπαρ και τους νεφρούς σε όλα τα χρονικά διαστήματα το $t_{1/2}=36$ h (2160 min) ($R^2=0,96$), $k=0,00032$ min⁻¹ στο ήπαρ, $t_{1/2} = 45$ h (2700 min) ($R^2=0,87$), $k=0,00025$ min⁻¹ στους νεφρούς. Χαμηλά επίπεδα του ¹⁴C <0,05 mg/kg ¹⁴C, παρατηρήθηκαν σε αυγά που συλλέχθηκαν 0-12 h μετά τη χορήγηση της δόσης.

Οι Hatton et al. (1997) χορήγησαν σε όρνιθες από το στόμα [S-methyl-¹⁴C] methamidophos με κάψουλα 2 φορές την ημέρα για 3 συνεχόμενες ημέρες με 0,8 mg methamidophos/kg bw/d, που ισοδυναμεί με διατροφή 10 ppm.

Το ήπαρ (1 ppm) και ο κρόκος του αυγού (0,75 ppm, 48h) είχαν το υψηλότερο υπολειμμάτων ¹⁴C. Για το ήπαρ, λαμβάνοντας υπόψη τις 3 συνεχείς ημέρες, το $k=0.003$ min⁻¹. Το methamidophos ήταν μια σχετικά μικρή συνιστώσα του TRR, με την πλειοψηφία των ¹⁴C να συνδέονται με φυσικά προϊόντα: λιπίδια και πρωτεΐνες και

αμινοξέα.

Ωοτόκες όρνιθες εκτέθηκαν με methamidophos 2, 6 και 20 ppm στη διατροφή για 28 d (Ackerman et al. 1975). Λόγω της χαμηλής περιεκτικότητας σε υπολείμματα στους ιστούς των πτηνών στα 20 ppm στη διατροφή, δεν πραγματοποιήθηκε ανάλυση των ιστών σε χαμηλότερες δόσεις. Τα υψηλότερα επίπεδα υπολειμμάτων παρατηρήθηκαν στα αυγά (0.103 ppm). Από τους ιστούς τα υψηλότερα υπολείμματα methamidophos ήταν στους μύες (0.040 ppm), την καρδιά, το στομάχι και το δέρμα ενώ χαμηλά επίπεδα ανιχνεύθηκαν στο λίπος και στο ήπαρ (0,002, 0,003 ppm, αντίστοιχα).

3.1.6.1.1.4 Θηλάζουσες αγελάδες

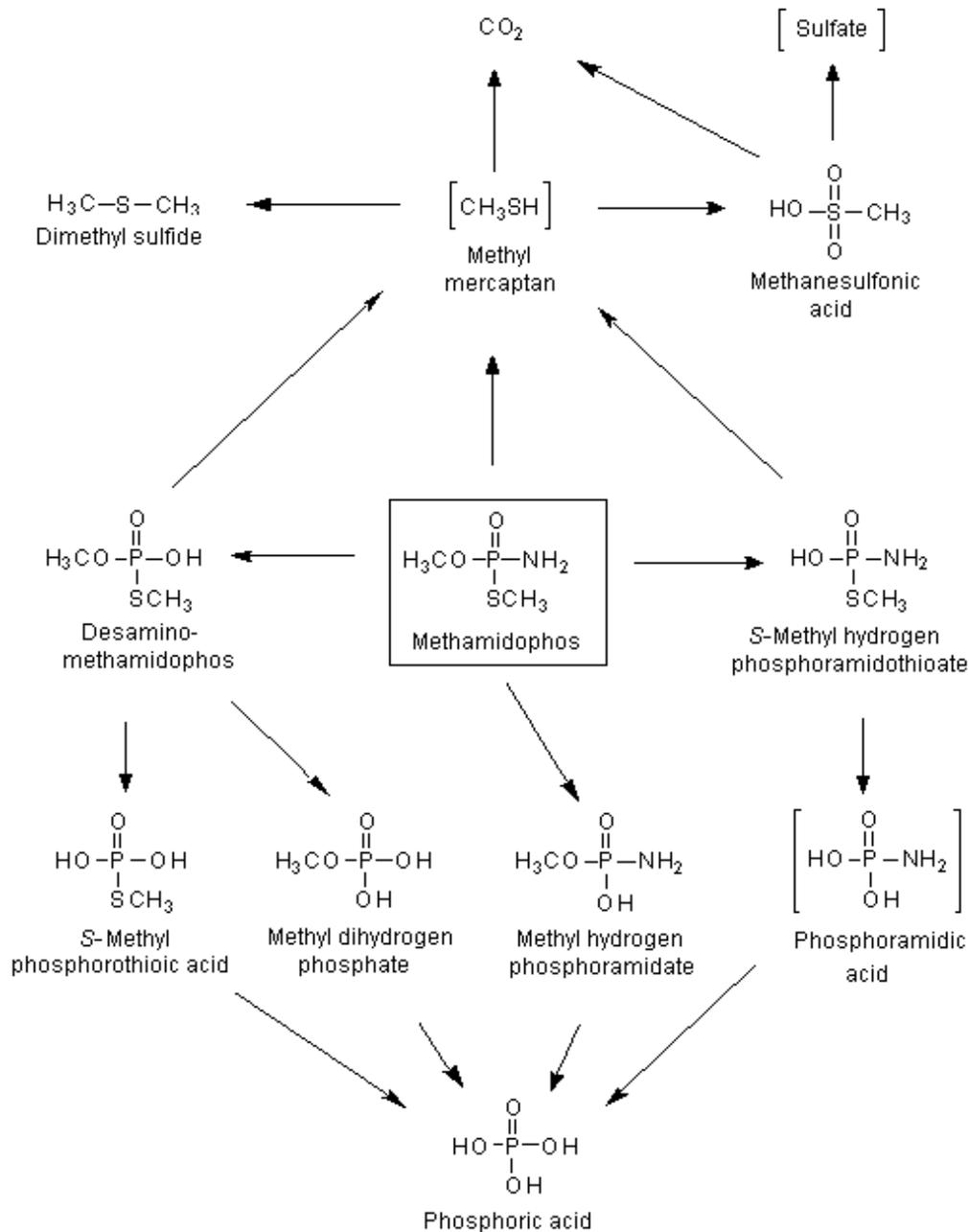
Σε θηλάζουσες αγελάδες γαλακτοπαραγωγής (4-5 ετών, 400-565 kg bw) χορηγήθηκε methamidophos και metribuzin, 2 φορές ημερησίως για 28 d, σε χάπι με ποσοστά 0,006/0,3, 0,03/0,09 και 0,15/0,03 mg/kg bw/d, που αντιστοιχεί σε ονομαστικές τιμές σίτισης των 0,2, 1,0 και 5,0 ppm methamidophos (Anonymous, 1972a και 1972b). Δείγματα ιστών συλλέχθηκαν μετά από 28 h από τη χορήγηση της δόσης για ανάλυση. Τα υπολείμματα στους ιστούς ήταν όλοι <LOQ στο τέλος της περιόδου χορήγησης. Χαμηλά επίπεδα του methamidophos ανιχνεύθηκαν στο γάλα, αλλά μόνο στα 5,0 ppm. Για να συμπληρωθεί η παραπάνω μελέτη και να ληφθούν πληροφορίες σχετικά με τα υπολείμματα στο ήπαρ, χορηγήθηκε methamidophos και metribuzin σε μόσχους (313-368 kg bw) από το στόμα με χάπι, σε 0,3/0,09 ή 0,6/0,3 mg/kg bw για 30-32 d, που αντιστοιχεί σε ονομαστικές τιμές διατροφής των 10 και 20 ppm methamidophos, αντίστοιχα (Anonymous, 1975). Υπολείμματα του methamidophos στο ήπαρ ήταν <0.01 και <0,01 για την δόση των 10 ppm, <0,01 και 0,03 mg/kg για την ομάδα των 20 ppm.

3.1.6.1.2 Μεταβολισμός

Μια έκθεση του FAO/WHO (2002) αναφέρει τα εξής:

Ο μεταβολισμός του methamidophos σε επίμυες μελετήθηκε με [S-methyl-¹⁴C] - και ³²P-σημασμένα υλικά. Σε μία μελέτη, [S- methyl-¹⁴C] methamidophos (καθαρότητας >99,5%) χορηγήθηκε από το στόμα σε θηλυκές επίμυες σε δόση 0,18 mg ανά επίμυ (0,5 μCi), και στην άλλη μελέτη, [³²P] methamidophos (καθαρότητας >99,5%) χορηγήθηκε από το στόμα σε 0,21 mg ανά ζώο (2,7 μCi) σε αρσενικούς και

θηλυκούς επίμυες. Ο μεταβολισμός αποδείχθηκε ότι είναι βάση της υδρόλυσης με βάση την ταυτότητα των ραδιενεργών μεταβολιτών που απομονώθηκαν στα ούρα, τα περιττώματα και τους ιστούς. Η διάσπαση φάνηκε ότι οφειλόταν σε ρήξη του δεσμού P-N για να σχηματιστεί *O,S*-dimethyl phosphorothioate και αμμωνία (Εικ. 3.1-10). Επέρχεται απομεθυλίωση, πρώτα στο P-S, και στη συνέχεια στον δεσμό P-O, για να σχηματιστεί methyl dihydrogen phosphate και στη συνέχεια, φωσφορικό οξύ (Crossley and Tutass, 1969).

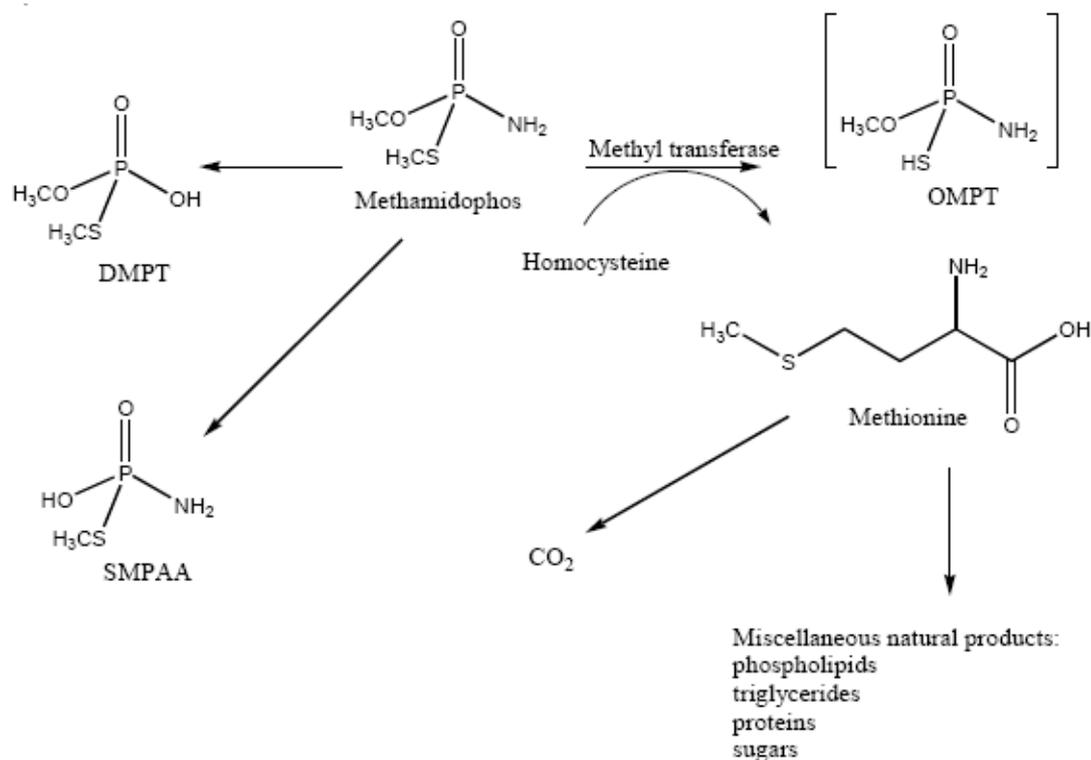


Εικ. 3.1-10: Προτεινόμενος μεταβολισμός του methamidophos σε επίμυες [Υποθετικοί μεταβολίτες σε αγκύλες]

Το methamidophos υποβαθμίστηκε λόγω αποαμίνωσης ή/και απομεθυλίωσης σε επίμυες. Το πρώτο βήμα ήταν η διάσπαση των δεσμών P-O, P-N ή P-S, ακολουθούμενη από απομεθυλίωση. Τα κύρια προϊόντα αποικοδόμησης που βρέθηκαν, εκτός από την αμετάβλητη ουσία methamidophos, ήταν methyl dihydrogen phosphate, S-methyl phosphorothioic acid, methyl hydrogen phosphoramidate, S-methyl hydrogen phosphoramidothioate, και το φωσφορικό οξύ. Η ύπαρξη πτητικών μεταβολιτών, εκτός του CO₂ σε συγκεντρώσεις πάνω από το όριο ανίχνευσης των 5 μg ανά ζώο δεν ήταν εφικτό να καθοριστούν σαφώς ωστόσο, θεωρήθηκε ότι είναι πολύ πιθανό ο σχηματισμός τους.

Σε έκθεση του FAO (2003) για το methamidophos αναφέρει τις εκθέσεις μεταβολισμού ζώων μετά από μελέτες σε θηλάζουσες αίγες και ωοτόκες όρνιθες.

Σε θηλάζοντα αίγες και τις ωοτόκες όρνιθες, το methamidophos υποβάλλεται σε υδρόλυση σε μορφή DMPT και SMPAA. Επιπλέον, το methamidophos μπορεί να εμπλέκεται σε αντιδράσεις, όπως η μεταφορά μεθυλίου από τη ρίζα S-methyl, για να σχηματιστεί μεθειονίνη, και επακόλουθα μετατρέπεται σε χολίνη και φωσφολιπίδια συμπεριλαμβανομένου και της phosphatidylcholine. Οξείδωση των μικρών κλασμάτων άνθρακα που προκύπτουν από υδρόλυση εστέρα/θειεστέρα για το methamidophos ή/και μεθειονίνης μπορεί να οδηγήσει σε παραγωγή CO₂ και την ενσωμάτωση των ¹⁴C σε φυσικά προϊόντα, όπως πρωτεΐνες/αμινοξέα, τριγλυκερίδια και λακτόζη (Εικ. 3.1-11).



Εικ. 3.1-11: Προτεινόμενες διαδρομές για το μεταβολισμό του methamidophos σε ζώα (αιγοπρόβατα που θηλάζουν και φωτόκεες όρνιθες).

3.1.6.1.3 Δερμική απορρόφηση

Σύμφωνα με το EFSA Journal (2004a) παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από μελέτες για την απορρόφηση από το δέρμα σε επίμυες, πιθήκους και ανθρώπους *in vivo*.

3.1.6.1.3.1 Πίθηκοι

[S-methyl-¹⁴C]-methamidophos χορηγήθηκε ενδοφλεβίως (*i.v.*) σε 4 αρσενικούς πιθήκους σε δόση των 239 ± 2 μg και $27,7 \pm 0,3$ μCi σε 1 ml φυσιολογικού ορού 0,9%. Ούρα και περιττώματα συλλέχθηκαν και ελήφθησαν δείγματα αίματος σε διάφορα χρονικά σημεία μέχρι 120 h μετά τη χορήγηση αφού η ραδιενέργεια στα ούρα μειώθηκε σημαντικά στις 96-120 h.

Την ημέρα 15 μετά την χορήγηση 0,1 ml *i.v.* σκευάσματος methamidophos (600 SL), ανάλογη δόση, (μέση δόση ανά πίθηκο 239 ± 2 μg και $27,7 \pm 0,2$ μCi) εφαρμόστηκε σε επιφάνεια δέρματος $4 \times 6 \text{ cm}^2$ ($10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), για 8 h.

Για την *i.v.* δόση, κατά μέσο όρο το 11,35% της χορηγούμενης ραδιενέργειας ανακτήθηκε στα ούρα, το περισσότερο να εκκρίνεται κατά τη διάρκεια των πρώτων 4 ωρών. Η ραδιενέργεια στα περιττώματα αντιπροσώπευαν κατά μέσο όρο το 0,51%. Η μέση ανάκτηση (ούρα, περιττώματα, μπισκότα ζωοτροφών, *i.v.* καθετήρες) ήταν 11,94%, η οποία μετά από 120 h (7200 min) αντιπροσωπεύει $k = 0,00029 \text{ min}^{-1}$.

Συμπερασματικά, η μέση απορρόφηση από το δέρμα του methamidophos σε πιθήκους, όταν υπολογίζεται με βάση τις ραδιενεργές απεκκρίσεις στα ούρα, μετά από εφαρμογή από το δέρμα, σε σύγκριση με τα ποσά που εκκρίνεται από την *i.v.* χορήγηση της ίδιας δόσης, εκτιμάται σε 10,4% (Fuller, 2000).

3.1.6.1.3.2 Άνθρωπος

Για τη διερεύνηση της δερματικής απορρόφησης και αποβολής του [S-methyl-¹⁴C] methamidophos από σκεύασμα (600 SL) σε υγιείς άνδρες εθελοντές, 100 μl, που περιέχουν 71 μg a.s. και 13,7 μCi εφαρμόστηκαν σε ανέπαφη περιοχή του δέρματος $4 \times 6 \text{ cm}^2$ (3 μg/cm^2 περιοχή του δέρματος) για μια περίοδο 8 ωρών. Η συγκέντρωση δοκιμής είναι στο εύρος της αναμενόμενης συγκέντρωσης στον αγρό μετά από ψεκασμό metamidophos (600 SL, περίπου 1 mg/l).

Υποθέτοντας ότι η έκκριση στα ούρα στον άνθρωπο μετά από *i.v.* ένεση θα είναι η ίδια με τους πιθήκους (δηλαδή δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές στο μεταβολισμό μεταξύ των 2 ειδών, Smith et al. 1977; Miyamoto et al. 1988), η απορρόφηση από το δέρμα του ανθρώπου, εθελοντών που έλαβαν ενιαία δερματική δόση των 3 μg/cm^2 του [S-methyl-¹⁴C] methamidophos από σκεύασμα [600 SL], υπολογίζεται σε 4,8%.

Συμπερασματικά, σύμφωνα με την EFSA (2004a), τα αποτελέσματα από τις μελέτες για την απορρόφηση από το δέρμα σε πιθήκους και ανθρώπους *in vivo*, θα μπορούσαν να χρησιμεύσουν ως βάση για τον υπολογισμό της έκτασης απορρόφησης από το δέρμα στους ανθρώπους. Αυτό έδωσε μία καλύτερη εκτίμηση απορρόφησης από το δέρμα του διαλυμένου παρασκευάσματος της τάξης του 5%. Η βασική παραδοχή είναι ότι η διάθεση του methamidophos στους πιθήκους είναι παρόμοια με εκείνη στους ανθρώπους. Η τιμή περίπου 5% είναι σύμφωνη με την τιμή του 10% υπολογίζεται από τη μελέτη στους πιθήκους και το γεγονός ότι τα δεδομένα από μια σειρά ενώσεων που δείχνουν 2-3 φορές υψηλότερη απορρόφηση από το δέρμα στους πιθήκους από ό, τι σε ανθρώπους.

Επιπλέον σύμφωνα με έκθεση του FAO/WHO (2002) αναφέρει ότι η πτητικότητα [¹⁴C] methamidophos σε δέρμα επίμου δεν ήταν αισθητή μέχρι 24 h μετά την εφαρμογή methamidophos (Testman, 2000).

3.1.6.2 Εκτίμηση της επικινδυνότητας για τα πτηνά σύμφωνα με το μοντέλο επιβάρυνσης του οργανισμού (body burden model)

Λόγω των τοξικοκινητικών και τοξικοδυναμικών ιδιοτήτων του methamidophos, ακολουθήθηκε η διαδικασία που προτάθηκε σύμφωνα με το EFSA (2005). Η προσέγγιση αυτή λαμβάνει υπόψη τον αναμενόμενο ρυθμό κατανάλωσης τροφής των άγριων ζώων, τα τοξικοκινητικά και τοξικοδυναμικά χαρακτηριστικά των OPs και τη μείωση της έκθεσης που οφείλεται στην αποφυγή της ρυπασμένης τροφής κατά την εκτίμηση της επικινδυνότητας στα πτηνά. Πριν μία χημική ουσία ασκήσει τοξικολογική επίδραση σε ιστούς και όργανα, πρέπει να ληφθεί από τον οργανισμό. Η απορρόφηση μετά από την έκθεση από το στόμα είναι συνήθως μέσω των βλεννογόνων επιφανειών του πεπτικού σωλήνα (εντερική απορρόφηση). Η χημική ουσία κατανέμεται στη συνέχεια σε ιστούς και όργανα, συνήθως σε διαφορετικό βαθμό φτάνοντας τελικά στο σημείο επίδρασης μέσω της κυκλοφορίας του αίματος. Κατά την αξιολόγηση της επικινδυνότητας των OPs είναι δυνατόν να εξεταστεί η τύχη μιας ένωσης εντός ενός οργανισμού και διαδικασίες όπως η απορρόφηση, κατανομή, μεταβολισμός και απέκκριση (ADME) είναι χρήσιμες παράμετροι στην καλύτερη προσέγγιση της εκτίμησης της έκθεσης. Η προσέγγιση αυτή συγκρίνει το ρυθμό απορρόφησης, κατανομής, μεταβολισμού και απέκκρισης (διεργασίες ADME) με το ρυθμό λήψης της τροφής. Επιπλέον, υπολογίζεται ο χρόνος σίτισης και η απαραίτητη ποσότητα τροφής για κατάποση, προκειμένου να επιτευχθεί ο θανατηφόρος LD₅₀ δόση και συγκρίνεται με τη συμπεριφορά του επιλεγέντος «εστιακού» είδους.

Η αξιολόγηση πραγματοποιείται για τα σενάρια εφαρμογής σε πατάτα, ντομάτα, αραβόσιτο, καπνό, ζαχαρότευτλα και οπωρώνες (μηλοειδή, ροδάκινα) σύμφωνα με τα δεδομένα για την έγκριση του methamidophos σε Ευρωπαϊκό επίπεδο (Οδ. 91/414/EEC για τα ΦΠ). Η εκτίμηση της επικινδυνότητας σύμφωνα με την EFSA (2005) και για τα διάφορα σενάρια της καλλιέργειας σύμφωνα με SANCO (2002) λαμβάνει υπόψη δεδομένα τα υπολείμματα, τη δόση εφαρμογής στον αγρό και το ρυθμό λήψης της τροφής ανά min του «εστιακού» είδους (focal species). Η δόση εφαρμογής για τις πατάτες είναι 0,63 kg a.s/ha, για τις ντομάτες 1,2 kg a.s/ha, για τον αραβόσιτο 0,8 kg

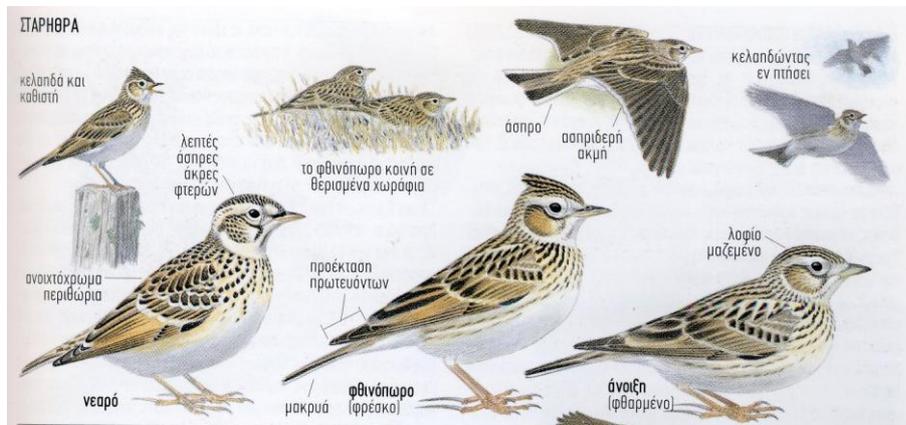
a.s/ha, για τον καπνό 0,75 kg a.s/ha, για τα ζαχαρότευτλα 0,5 kg a.s/ha και για τους οπωρώνες 1,2 kg a.s/ha.

Λόγω της μικρότερης δόσης εφαρμογής στα ζαχαρότευτλα, στις πατάτες, στον καπνό και στον αραβόσιτο, η εκτίμηση της επικινδυνότητας για την οξεία τοξικότητα θεωρείται ότι καλύπτονται από η εκτίμηση της επικινδυνότητας για τις ντομάτες.

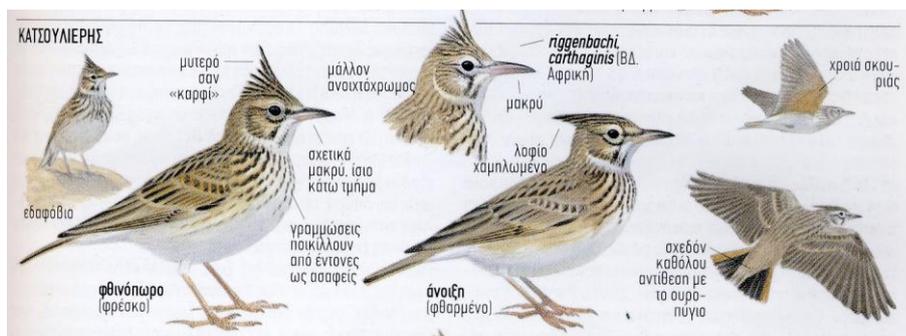
Στη γνωμοδότηση της EFSA (2005) εφαρμόστηκε η μέθοδος στο pirimicarb στα σιτηρά και με «εστιακό» είδος τη σταρήθρα (*Alauda arvensis*, παμφάγο) (Εικ. 3.1-12).

Δύο είδη κορυδαλλών υπάρχουν σε αροτραίες καλλιέργειες στην Ελλάδα, το πιο διαδεδομένο ο κατσουλιέρης (*Galerida cristata*) και η σταρήθρα, η οποία δεν συναντάται σε μεγάλους πληθυσμούς στην Ελλάδα (Handrinos and Akriotis, 1997; Cramp, 1998) (Εικ. 3.1-13). Για τους λόγους που αναφέρονται παρακάτω, η σταρήθρα μπορεί να θεωρείται ως συντηρητικά αντιπροσωπευτική για την εκτίμηση του κινδύνου. Με μέσο σωματικό βάρος 37gr η σταρήθρα (Dunning, 2002) είναι ελαφρώς μικρότερη από τον κατσουλιέρη με μέσο σωματικό βάρος 41,5 gr (ssp. *meridionalis*) (Abs, 1963). Ως γενική παραδοχή, το είδος αυτό χαρακτηρίζεται από χαμηλή σωματικό βάρος σε αυτή την κατηγορία πτηνών και θεωρείται ότι διατρέχει μεγαλύτερο κίνδυνο από την πρόσληψη υπολειμμάτων από τη χρήση ΦΠ στις καλλιέργειες επειδή έχουν υψηλότερο ρυθμό πρόσληψη τροφής ανά σωματικό βάρος σε σύγκριση με είδη που έχουν υψηλότερο σωματικό βάρος. Δεδομένου ότι η σύνθεση της τροφής (Abs, 1963; Green, 1978; Cramp, 1998) όπως και άλλες παραμέτρους συμπεριφοράς (π.χ. το ποσοστό της διαίτας που λαμβάνεται στην περιοχή εφαρμογής) είναι συγκρίσιμα για τα δύο αυτά είδη, συνάγεται το συμπέρασμα ότι η εκτίμηση της επικινδυνότητας για τη σταρήθρα αντιπροσωπεύει μια συντηρητική χειρότερη περίπτωση. Εάν η αξιολόγηση της επικινδυνότητας διεξαγόταν με βάση τον κατσουλιέρη, θα μπορούσε η αξιολόγηση να μην καλύπτει τα μικρότερα παμφάγα είδη. Από την άλλη πλευρά, η αξιολόγηση της επικινδυνότητας για τη σταρήθρα καλύπτει και τα μεγαλύτερα παμφάγα είδη. Η κιτρινοσουσουράδα (*Motacilla flava*) έχει επιλεγεί ως «εστιακό» είδος, καθώς είναι ένα από τα κυρίαρχα είδη που παρατηρήθηκαν σε αροτραίες καλλιέργειες στην Ελλάδα (Kaniastas et al. 2009) και αναμένεται να εκτεθεί κατά τη διάρκεια εφαρμογής του methamidophos (Εικ. 3.1-14). Για την ακόλουθη εκτίμηση, υποθέτουμε ότι η κιτρινοσουσουράδα τρέφεται αποκλειστικά με έντομα. Ο μαυροτσιροβάκος (*Sylvia melanocephala*) έχει επιλεγεί ως εντομοφάγο «εστιακό» είδος στους οπωρώνες (Εικ. 3.1-15). Για την ακόλουθη εκτίμηση, υποθέτουμε ότι ο μαυροτσιροβάκος τρέφεται αποκλειστικά με έντομα. Αυτό κρίνεται σκόπιμο, καθώς τα επίπεδα των υπολειμμάτων

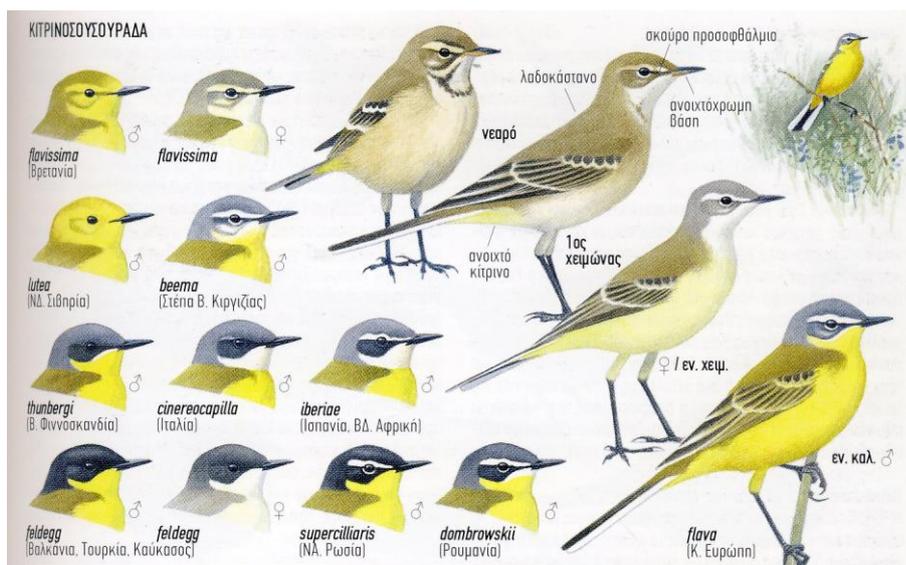
στα έντομα και της βλάστησης του εδάφους σε οπωρώνες βρίσκονται στην ίδια τάξη μεγέθους.



Εικ. 3.1-12: Σταρήθρα (Mullanery et al. 1999)



Εικ. 3.1-13: Κατσουλιέρης (Mullanery et al. 1999)



Εικ. 3.1-14: Κιτρινοςουσουράδα (Mullanery et al. 1999)



Εικ. 3.1-15: Μαυροτσιροβάκος (Mullanery et al. 1999)

3.1.6.2.1 Παράμετροι της μεθόδου

3.1.6.2.1.1 Επιλογή ειδών και εκτίμηση του ρυθμού πρόσληψης τροφής

Ο Davies (1977) διαπίστωσε ότι η κιτρινοσουσουράδα στην Οξφόρδη στο Ηνωμένο Βασίλειο καταναλώνει 9 έντομα ανά min (συνήθως 3-10 mm) κατά τη σίτιση μεμονωμένα σε στερεή κοπριά, αλλά 29-36 έντομα ανά min (συνήθως 2-3 mm) κατά τη σίτιση σε σμήνη στις πισίνες. Ωστόσο, οι προσλήψεις των εντόμων αντιστράφηκαν όταν εκφράστηκαν σε ενέργεια: 285 J/min και 196 J/min αντίστοιχα. Ο ρυθμός πρόσληψης ενέργειας της κιτρινοσουσουράδας που τρέφονται με έντομα σε κοπριά (285 J/min) αντιστοιχεί περίπου σε 0,044 gr/min, ενώ για αυτές που τρέφονται με έντομα σε πισίνες (196 J/min) ισοδυναμεί με 0,030 gr/min. Οι κιτρινοσουσουράδες είναι πιθανό ότι θα μπορούσαν να φθάσουν σε παρόμοια ποσοστά διατροφής σε περίπτωση που τα έντομα ήταν άφθονα. Έχουν επίσης καταγραφεί να τρέφονται από νεκρά έντομα όταν βρίσκονται σε μεγάλες πυκνότητες (Dittberner, 1984), η οποία ενδέχεται να προκύψουν μετά την εφαρμογή του methamidophos. Ο Green (1978) παρέχει λεπτομερείς πληροφορίες σχετικά με το ρυθμό σίτισης της σταρήθρας σε αγρούς σιτηρών σε υψηλότερες πυκνότητες από την κιτρινοσουσουράδα (Mason and Macdonald, 2000). Ο ρυθμός πρόσληψης υπολογίζεται για τη σταρήθρα με φάσμα υψηλότερο και χαμηλότερο από αυτόν που προαναφέρθηκαν για την κιτρινοσουσουράδα, αλλά σχετίζονται με τη διατροφή σε σπορές δημητριακών και σε καλαμιές από σπόρο που έχει χυθεί ή σε σπόρους (0,18 gr/min) ή σπόρους ζιζανίων σε οργωμένα χωράφια (0,019 gr/min) και όχι έντομα. Είναι κατανοητό ότι οι σταρήθρες θα μπορούσαν να καταναλώνουν έντομα με τον ίδιο ρυθμό όπως και στους σπόρους δημητριακών, αν ήταν αρκετά σε μεγάλο πληθυσμό. Οι υψηλές και χαμηλές εκτιμήσεις

θα χρησιμοποιηθούν ως ευνοϊκή και χειρότερη περίπτωση για την αξιολόγηση, αντίστοιχα. Το σωματικό βάρος (bw) στη σταρήθρα είναι 37gr (μέση τιμή από Dunning, 1992).

Δεδομένου ότι δεν υπάρχουν πληροφορίες σχετικά με το ρυθμό διατροφής ανά min του μαυρουτσιροβάκου, χρησιμοποιείτε η αντίστοιχη τιμή από τις κιτρινοσουσουράδες, όπως αναφέρεται και στην EFSA (2005) σχετικά με το pirimicarb. Αυτό θεωρείται ότι συνιστά ως χειρότερη περίπτωση, δεδομένου ότι ο μαυροτσιροβάκος έχει χαμηλότερο σωματικό βάρος και συνεπώς θα έχει χαμηλότερο ρυθμό λήψης της τροφής ανά min.

3.1.6.2.1.2 Εκτίμηση των υπολειμμάτων του methamidophos σε έντομα και σπόρους

Σύμφωνα με το Appendix A της νέας οδηγίας για τα πτηνά και θηλαστικά (EFSA, 2009) χρησιμοποιείτε το υπόλειμμα για τα έντομα και τους σπόρους (RUD), ως η χειρότερη περίπτωση για τα σχετικά σενάρια, λαμβάνοντας υπόψη ποσότητα εφαρμογής ίση με 1 kg meth./ha. Για την κιτρινοσουσουράδα το RUD [50% αρθρόποδα εδάφους, 50% αρθρόποδα φυλλώματος (με απευθείας ψεκασμό)] είναι ίσο με 26,8. Για σταρήθρα το RUD των σπόρων είναι ίσο με 20,2. Για το μαυροτσιροβάκο το RUD (100% έντομα φυλλώματος) είναι ίσο με 46,8. Σύμφωνα με την Ορθή Γεωργική Πρακτική (GAP) το ποσό της εφαρμογής, τόσο για το σενάριο της «ντομάτας» και του «οπωρώνα» είναι ίσο με 1,2 kg meth./ha και έχει ως αποτέλεσμα τη συγκέντρωση στους σπόρους 24,24 mg meth./kg, για την κιτρινοσουσουράδα στα έντομα 32,16 mg meth./kg και 56,16 mg meth./kg για τον μαυροτσιροβάκο.

3.1.6.2.1.3 Εκτίμηση της τοξικότητας

Η τοξικότητα ενός φυτοφαρμάκου συνήθως κυμαίνεται σε μία ή περισσότερες τάξεις μεγέθους μεταξύ των διαφόρων ειδών των πτηνών (Luttik and Aldenberg, 1997), έτσι υπάρχει η δυνατότητα για τα πτηνά που θα εκτεθούν στον αγρό να μπορεί να είναι περισσότερο (ή λιγότερο) ευαίσθητα από τα είδη που δοκιμάζονται στο εργαστήριο. Στην πρώτη βαθμίδα αξιολόγησης θεωρείται ότι περιλαμβάνεται ένα παράγοντα αβεβαιότητας ίσο με 10, ο οποίος χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της επικινδυνότητας των πτηνών στον αγρό όταν τα τοξικολογικά δεδομένα προέρχονται από εργαστηριακό πειραματισμό (Παράρτημα VI της 91/414/EEC). Διενεργήθηκαν

λοιπόν οι υπολογισμοί υποθέτοντας για το «εστιακό» είδος ότι η μέση δόση κινδύνου (HD) είναι ίση με **0,5 mg / kg bw**, και προκύπτει από τη διαίρεση του LD₅₀ με το 10.

3.1.6.2.1.4 Εκτίμηση της δόσης ορίου αποφυγής (AVT)

Εκτιμήσαμε τη δόση ορίου αποφυγής (AVT) από την εξέταση του επιπέδου δόσης στο οποίο η κατανάλωση της τροφής είναι μειωμένη κατά την μελέτη οξείας τοξικότητας, παρά την μελέτη διατροφής όπου η εκτίμηση του AVT είναι δύσκολη λόγω των επιπτώσεων των διαδικασιών ADME. Στην μελέτη οξείας τοξικότητας από το στόμα με τα ορτύκια, τα NOEL και LOEL για την μείωση της κατανάλωσης της τροφής ήταν <1 mg/kg bw και 1 mg/kg bw, αντίστοιχα. Στην απουσία μιας υπολογιζόμενης NOEL στη μελέτη οξείας τοξικότητας σε ορτύκι χρησιμοποιείται το LOEL του 1 mg/kg bw ως χειρότερη περίπτωση. Γεγονός που υποδηλώνει ότι η AVT για τα ορτύκια είναι το 20% της LD₅₀ (5 mg/kg bw για το ίδιο είδος), υποθέτουμε ότι ο AVT θα μειώνεται ή θα αυξάνεται ανάλογα σε άλλα είδη με χαμηλότερο ή υψηλότερο LD₅₀. Ως εκ τούτου, ο υπολογισμός μας υποστηρίζει την **AVT των 0,1 mg/kg bw** (20% του HD).

Από τη μελέτη διατροφής (one choice test) και τις καταγραφές από την λήψη της τροφής των πτηνών, καταναλώνουν κατά μέσο όρο από 2 έως 2,5 mg meth./kg bw, για τις μικρότερες συγκεντρώσεις που δοκιμάστηκαν και 3,5 mg meth./kg bw, για τις υψηλότερες συγκεντρώσεις, σχεδόν το ίδιο κάθε ημέρα κατά τη διάρκεια των 5 d της έκθεσης. Μόνο για την ημέρα 0 αμέσως μετά την περίοδο της νηστείας το AVT κυμαινόταν από 2,5 έως 5,9 mg meth./kg bw ανάλογα με τις συγκεντρώσεις που δοκιμάστηκαν. Από τη μελέτη αποφυγής (“two choice test”) το AVT = 1 mg meth./kg bw για τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις και 1,5 - 2 mg meth./kg bw για τις υψηλότερες αυτά, κάθε μέρα για 3 d, εκτός από την 1η d όπου έφθασε το 2,82 mg meth./kg bw για τη μέγιστη δόση των 300 mg/kg bw.

Ως εκ τούτου, ο υπολογισμός μας υποστηρίζει ότι η AVT είναι 0,59 mg/kg bw (AVT=5,9 mg/kg bw, συντελεστής αβεβαιότητας=10), ως τη χειρότερη περίπτωση. Η τιμή αυτή μπορεί να αναθεωρηθεί περαιτέρω, λαμβάνοντας υπόψη τις διαδικασίες ADME (βλέπε 3.1.6.2.1.8).

3.1.6.2.1.5 Εκτίμηση του χρόνου καθυστέρησης της αποφυγής (AVD)

Ο χρόνος καθυστέρησης αποφυγής AVD εκτιμήθηκε ως ο χρόνος της πρώτης εμφάνισης κλινικών συμπτωμάτων σε μελέτες οξείας τοξικότητας, υπό την προϋπόθεση ότι τα πτηνά που εμφανίζουν κλινικά συμπτώματα είναι πιθανό, επίσης, να σταματήσουν τη διατροφή. Η πρώτη καταγραφή κλινικών συμπτωμάτων σε μελέτες οξείας τοξικότητας σε ορτύκια έγινε 0,5 h μετά τη χορήγηση του methamidophos. Στις διατροφική μελέτη καταγράψαμε επίσης, διακοπή της σίτισης 1 h μετά την έναρξη της έκθεσης για την ημέρα 0, μετά την περίοδο νηστείας, και τα πρώτα κλινικά συμπτώματα εμφανίστηκαν 0,5 h αργότερα. Μπορούμε επομένως να θεωρήσουμε AVD = 30 min από την μελέτη οξείας και υποξείας τοξικότητας, ως ο χρόνος από την επίτευξη του AVT μέχρι την παύση της σίτισης.

3.1.6.2.1.6 Εκτίμηση χρόνου έκλειψης των κλινικών συμπτωμάτων (ART)

Η ART ορίζεται ως ο χρόνος που απαιτείται για την έκλειψη των κλινικών συμπτωμάτων σε πτηνά που παρατηρείται η χαμηλότερη επίδραση (LOEL). Οι διεργασίες ADME μειώνουν την συγκέντρωση που επιδρά στον οργανισμό, σε επίπεδο όπου δεν παρατηρείται επίδραση (NOEL). Η πρώτη προσέγγιση κάνει χρήση πληροφοριών από την οξεία LD₅₀ μελέτη από το στόμα στα πτηνά. Στη μελέτη με τα ορτύκια, τα κλινικά συμπτώματα στα 2,2 mg/kg bw (LOEL) εξαφανίστηκαν μετά από 14,5 h (870 min), ART = 870 min.

3.1.6.2.1.7 Εκτίμηση του k για την εξάλειψη του methamidophos από τις διεργασίες ADME (απορρόφηση, κατανομή, μεταβολισμός και απέκκριση)

Όπως περιγράφεται στη γνωμοδότηση της EFSA (2005), η τιμή k περιγράφει το ρυθμό των διεργασιών ADME σε πτηνά. Για το methamidphos, οι τιμές k προέρχονται όλες από τέσσερις προσεγγίσεις που προτείνονται στη γνωμοδότηση:

- (1) υπολογισμός από την οξεία τοξικότητα από το στόμα (LD₅₀) με βάση την εξίσωση 3,
- (2) από την οξεία τοξικότητα από το στόμα και την υποξεία τοξικότητα με βάση την εξίσωση 4,
- (3) υπολογισμός από τις μελέτες μεταβολισμού (ADME) με τη μέτρηση της

ραδιενεργής σήμανσης σε θηλαστικά,

(4) υπολογισμός που προέρχεται απευθείας από τη μελέτη μεταβολισμού σε διάφορους ιστούς στα θηλαστικά.

Οι καθορισμένες μελέτες ADME μπορεί να δώσουν μια εκτίμηση του k, αλλά γενικώς διεξάγονται σε θηλαστικά, και η επέκταση του k από τα θηλαστικά στα πτηνά είναι αβέβαιη. Η γνωμοδότηση της EFSA (2005) περιγράφει δύο ακόμη μεθόδους για τη κατά προσέγγιση εκτίμηση του k, χρησιμοποιώντας πληροφορίες από τις καθορισμένες μελέτες τοξικότητας σε πτηνά (προσεγγίσεις (1), (2)).

Οι ακόλουθες εξισώσεις χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό των τιμών k, την οξεία δόση και το χρόνο για να φθάσει η τιμή της LD₅₀:

Εξίσωση 3 σύμφωνα με την EFSA (2005) για τον υπολογισμό του k:

$$k = \frac{\ln\left(\frac{LOEL}{NOEL}\right)}{ART}$$

με ART = χρόνος αποκατάστασης της οξεία τοξικότητα [min]

Εξίσωση 4 σύμφωνα με την EFSA (2005) για τον υπολογισμό του k:

$$LOEL = \frac{NOEL}{k} * (1 - e^{-k*DEP})$$

με DEP = διάρκεια της περιόδου έκθεσης [min]

Εξίσωση 2 σύμφωνα με την EFSA (2005) για τον υπολογισμό της οξείας δόσης:

$$AcuteDose = AVT * e^{-k*AVD} + \frac{(FPM * C)}{(bw * k)} * (1 - e^{-k*AVD})$$

με AVT= δόση ορίου αποφυγής της πρόσληψης διατροφής [mg/kg bw], AVD= χρόνος καθυστέρησης αποφυγής της πρόσληψης τροφής [min], FPM=ρυθμός λήψης τροφής ανά min [gr/min] και C=συγκέντρωση του methamidophos στην τροφή [mg/kg].

Η AVT υπολογίστηκε ως εξής:

$$\text{Χειρότερη περίπτωση: } AVT = \left(\frac{LOEL_{foodconsumption}}{LD_{50}}\right) * HD_5$$

Καλύτερη περίπτωση: $AVT = \left(\frac{NOEL_{foodconsumption}}{LD_{50}} \right) * HD_5$

Εξίσωση 5 σύμφωνα με την EFSA (2005) για τον υπολογισμό του χρόνου για την επίτευξη του LD_{50} :

$$\text{Time to reach } LD_{50} = -\frac{1}{k} * \ln\left(1 - \frac{LD_{50} * k * bw}{FPM * C}\right)$$

Η προσέγγιση (1) βασίζεται στην εξίσωση 3.

NOEL=1 mg/kg bw (κλινικά συμπτώματα οξείας τοξικότητας)

LOEL=2,2 mg/kg bw (κλινικά συμπτώματα οξείας τοξικότητας)

ART=14,5 h = 870 min.

Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να υπολογιστεί $k(1) = 0,0009 \text{ min}^{-1}$

Η προσέγγιση (2) βασίζεται στην εξίσωση 4.

Από τα δεδομένα των μελετών οξείας και υποξείας τοξικότητας σε ορτύκια προκύπτει:

NOEL (κλινικά συμπτώματα από μελέτη διατροφής): δεν έχει εκτιμηθεί. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί η χαμηλότερη συγκέντρωση.

LOEL (κλινικά συμπτώματα από μελέτη διατροφής) = 20 mg/kg τροφής (=ημερήσια δόση (Daily Dietary Dose, DDD) = 2,39 mg/kg bw/d)

LOEL (κλινικά συμπτώματα από μελέτη οξείας τοξικότητας) = 2,2 mg/kg bw

Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να υπολογιστεί $t_{1/2}=845 \text{ min}$, $k(2)=0,00082 \text{ min}^{-1}$.

Η προσέγγιση (3) βασίζεται σε στοιχεία από τη βιβλιογραφία για τον επίμυ. Δεν παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τις αίγες ή τις αγελάδες καθώς δεν θεωρούνται σχετικές με την εν λόγω ανάλυση:

Σύμφωνα με τους Crossley and Tutass (1969) από την απορρόφηση, κατανομή και απέκκριση του methamidophos σε επίμυες, ως χειρότερη περίπτωση, υπολογίζεται $k_1(3)=0,00016 \text{ min}^{-1}$.

Σύμφωνα με τους Gray et al. (1982) από την ενδοφλέβια ένεση σε θηλυκούς επίμυες και το ραδιοσημασμένο υλικό που ανακτήθηκε στα ούρα και το $^{14}\text{CO}_2$ υπολογίζεται $k_2(3)= 0,0011 \text{ min}^{-1}$.

Σύμφωνα με τον Klein (1997) από την χορήγηση από το στόμα σε επίμυες το

ραδιοσημασμένο υλικό που ανακτήθηκε στα ούρα και το $^{14}\text{CO}_2$ υπολογίζεται $k_3(3)=0,00048 \text{ min}^{-1}$.

Η προσέγγιση (4) βασίζεται σε στοιχεία από τη βιβλιογραφία για μύες, επίμυες και όρνιθες. Δεν παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από αίγες ή πιθήκους καθώς δεν θεωρούνται σχετικές με την εν λόγω ανάλυση:

Σύμφωνα με τους Spassova et al. (2000) μετά από χορήγηση methamidophos σε επίμυες, αυτό διαπιστώθηκε στο αίμα, το ήπαρ, τον εγκέφαλο και τα επινεφρίδια. Ο εκτιμώμενος $t_{1/2}=20 \text{ min}$ ($R^2 = 0,8$), $k_1(4)=0,034 \text{ min}^{-1}$ στο αίμα και $t_{1/2}=20 \text{ min}$ ($R^2=0,78$), $k_1(4)=0,033 \text{ min}^{-1}$ στο ήπαρ.

Σύμφωνα με τους Mahajna et al. (1997) χορήγηση methamidophos σε μύες δεν παράγει ανιχνεύσιμα επίπεδα 4 h μετά τη χορήγηση, με αποτέλεσμα να υπολογίζεται το $k_2(4)=0,0067 \text{ min}^{-1}$ στο ήπαρ.

Σύμφωνα με τους Eigenberg et al. (1983) σε ενδοφλέβια χορήγηση του methamidophos σε επίμυες, τα αποτελέσματα στο πλάσμα ήταν $k_3(4)=0,0075 \text{ min}^{-1}$. Σύμφωνα με τους Ackerman and Wilkes (1974) methamidophos χορηγήθηκε από το στόμα σε όρνιθες ωοπαραγωγής. Τα ραδιενεργά υπολείμματα ήταν υψηλότερα στο ήπαρ και τους νεφρούς σε όλα τα χρονικά διαστήματα που αντιστοιχεί σε $t_{1/2}=36 \text{ h}$ (2160 min) ($R^2=0,96$), $k_4(4)=0,00032 \text{ min}^{-1}$ στο ήπαρ και $t_{1/2}=45 \text{ h}$ (2700 min) ($R^2=0,87$), $k_4(4)=0,00025 \text{ min}^{-1}$ στους νεφρούς.

Σύμφωνα με τους Hatton et al. (1997) methamidophos χορηγήθηκε από το στόμα σε όρνιθες για 3 συνεχόμενες ημέρες. Τα ραδιενεργά υπολείμματα ήταν υψηλότερα στο ήπαρ και τον κρόκο αυγού, ενώ αντιστοιχεί σε $k_4(4)=0,003 \text{ min}^{-1}$ στο ήπαρ.

Όλα τα ανωτέρω δείχνουν την αβεβαιότητα που προκύπτει από τα αποτελέσματα των τεσσάρων προσεγγίσεων για την εκτίμηση του k , αν και η επιλογή της χειρότερης περίπτωσης είναι πιθανώς πολύ συντηρητική.

Από όλες τις προηγούμενες τιμές k , μπορούμε να συμπεράνουμε για $k=0,0075 \text{ min}^{-1}$ (Eigenberg et al. 1983) ως την ευνοϊκότερη περίπτωση και $k=0,00016 \text{ min}^{-1}$, ως τη χειρότερη περίπτωση (Crossley and Tutass, 1969).

3.1.6.2.1.8 Επανεκτίμηση της δόσης ορίου αποφυγής (AVT)

Λαμβάνοντας υπόψη τις διεργασίες ADME στα πτηνά είναι δυνατή η προσαρμογή της AVT (χειρότερη περίπτωση, μεγαλύτερη συγκέντρωση methamidophos από τις διατροφικές μελέτες,) που βασίζεται στη χειρότερη περίπτωση $k=0,00016 \text{ min}^{-1}$.

Η εξίσωση για τη μετατροπή του ppm (mg/kg τροφής) τιμές σε mg/kg bw/d είναι:

$$\text{DDD (mg/kg bw/d)} = \text{C (mg/kg τροφής)} \times \text{κατανάλωση τροφής/bw.}$$

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, λαμβάνοντας υπόψη την υψηλότερη συγκέντρωση, ως τη χειρότερη περίπτωση δόσης AVT (300 ppm) και την ημερήσια κατανάλωση τροφής 2,8 gr/πτηνό/d (12,7% του μάρτυρα), είναι πολύ πιθανό ότι αντιπροσωπεύει την αναφερθείσα συνεχιζόμενη σίτιση διάρκειας 1 h μέχρι τη διακοπή της σίτισης (AVD = 60 min), (ρυθμός λήψης τροφής=0,0466 gr/min για τα ορτύκια). Η εξίσωση που περιγράφει τη διαδικασία ADME μπορεί να δοθεί ως ακολούθως:

$$\text{AVT (mg/kg bw/d)} = \eta \text{ υψηλότερη C (mg/kg τροφής)} \times [\text{κατανάλωση τροφής} (e^{-k \cdot \text{AVD}})]/\text{bw.}$$

Η επανεκτιμημένη AVT από τη μελέτη διατροφής (ημέρα 0) για τα ορτύκια είναι ίση με 5,87. Ως εκ τούτου, ο υπολογισμός περαιτέρω θα μπορούσε να γίνει και με **AVT=0,587** mg/kg bw (AVT = 5,87 mg/kg bw, συντελεστής αβεβαιότητας=10), ως χειρότερη περίπτωση.

Στον Πίνακα 3.1-42 παρατίθενται όλοι οι παράμετροι όπως αναλύθηκαν ανωτέρω και θα χρησιμοποιηθούν για την αξιολόγηση τη επικινδυνότητας στα πτηνά σύμφωνα με το μοντέλο της επιβάρυνσης του οργανισμού.

Πίνακας 3.1-42: Παράμετροι που χρησιμοποιήθηκαν σύμφωνα με την EFSA (2005)

Παράμετρος	Συντομογραφία [Μονάδα]	Τιμή	Υπόθεση	Πηγή
Σενάριο “ντομάτα”				
Υπόλειμμα ανά μονάδα (σταρήθρα)	ανά δόσης RUD σπόροι [mg a.s./kg]	20,2	-	App A (EFSA 2009)

Παράμετρος	Συντομογραφία [Μονάδα]	Τιμή	Υπόθεση	Πηγή
Υπόλειμμα ανά μονάδα δόσης (κιτρινοσουσουράδα)	RUD έντομα [mg a.s./kg]	26,8	-	App A (EFSA 2009)
Δόση εφαρμογής	[kg a.s./ha]	1,2 0,5	max min	Σύμφωνα με την GAP (ΟΓΠ)
Συγκέντρωση στους σπόρους	C [mg a.s./kg]	24,24 10,1	max min	υπολογίζεται από RUD x δόση εφαρμογής
Συγκέντρωση στα έντομα	C [mg a.s./kg]	32,16 16,08	max min	υπολογίζεται από RUD x δόση εφαρμογής
Σωματικό βάρος, σταρήθρα	bw [g]	37	-	Dunning (2002)
Σωματικό βάρος, κιτρινοσουσουράδα	bw [gr]	17,6	-	App A (EFSA, 2009)
Ρυθμός πρόσληψης τροφής ανά d (σπόροι), σταρήθρα	FIR [gr/day]	7,9	-	υπολογίζεται σύμφωνα με το App G (EFSA, 2009)
Ρυθμός πρόσληψης τροφής ανά d, κιτρινοσουσουράδα	FIR [gr/day]	13,9	-	App A (EFSA, 2009)
Ρυθμός αρχικής πρόσληψης τροφής ανά min, σταρήθρα	FPM [gr/min]	0,18 0,019	Χειρότερη Ευνοϊκή	EFSA (2005)
Ρυθμός αρχικής πρόσληψης τροφής ανά min, κιτρινοσουσουράδα	FPM [gr/min]	0,044 0,030	Χειρότερη Ευνοϊκή	EFSA (2005)
Σενάριο “οπωρώνες”				
Υπόλειμμα ανά μονάδα δόσης (μαυροτσιροβάκος)	RUD έντομα [mg a.s./kg]	46,8	-	App A (EFSA, 2009)
Δόση εφαρμογής	[kg a.s./ha]	1,2	-	Σύμφωνα με την GAP (ΟΓΠ)
Συγκέντρωση σε μικρά έντομα	C [mg a.s./kg]	56,16	-	υπολογίζεται από RUD x δόση εφαρμογής
Σωματικό βάρος, μαυροτσιροβάκος	bw [gr]	12,5	-	BWP (2006)
Ρυθμός πρόσληψης τροφής ανά d, μαυροτσιροβάκος	FIR [gr/day]	11,03	-	υπολογίζεται σύμφωνα με το App G (EFSA, 2009)
Ρυθμός αρχικής πρόσληψης τροφής ανά min, μαυροτσιροβάκος	FPM [gr/min]	0,044 0,030	Χειρότερη Ευνοϊκή	EFSA (2005)
Λεδομένα από την μελέτη οξείας τοξικότητας σχετικά και για τα δύο σενάρια				
Μέση επικίνδυνη δόση	HD [mg a.s./kg bw]	0,5	Χειρότερη	Προέρχεται από τη μελέτη οξείας τοξικότητας LD ₅₀ εφαρμόζοντας ένα συντελεστή αβεβαιότητας 10 σύμφωνα με το Annex VI της (91/414/EEC))
Χαμηλότερη δόση με παρατηρούμενη επίδραση (κατανάλωση τροφίμων)	LOEL cons [mg a.s./kg bw]	1	Χειρότερη	Ορτύκι, μελέτη οξείας τοξικότητας
Χαμηλότερη δόση με παρατηρούμενη επίδραση (κλινικά συμπτώματα)	LOEL cli [mg a.s./kg bw]	2,2	-	Ορτύκι, μελέτη οξείας τοξικότητας

Παράμετρος	Συντομογραφία [Μονάδα]	Τιμή	Υπόθεση	Πηγή
Χαμηλότερη δόση χωρίς παρατηρούμενη επίδραση (κλινικά συμπτώματα)	NOEL cli [mg a.s./kg bw]	1	-	Ορτύκι, μελέτη οξείας τοξικότητας
Χαμηλότερη δόση που δεν παρατηρείται επίδραση (κλινικά συμπτώματα)	NOEL cli [mg a.s./kg bw]	2,39	-	Ορτύκι, μελέτη υποξείας τοξικότητας
Δόση ορίου αποφυγής	AVT [mg a.s./kg bw]	0,1	Ευνοϊκή	Ορτύκι, μελέτη οξείας τοξικότητας
		0,587	Χειρότερη	Ορτύκι, μελέτη υποξείας τοξικότητας
Χρόνος καθυστέρησης αποφυγής	AVD [min]	30	-	Ορτύκι, μελέτη οξείας και υποξείας τοξικότητας
Χρόνος έκλειψης κλινικών συμπτωμάτων	ART [min]	870	-	Ορτύκι, μελέτη οξείας τοξικότητας
k (διεργασίες ADME)	k [1/min]	k(1)= 0,0009 k(2)= 0,00082 k₁(3)=0,00016 (χειρότερη) k ₂ (3)=0,0011 k ₃ (3)=0,00048 k ₁ (4)=0,033/34 k ₂ (4)=0,0067 k₃(4)= 0,0075 (ευνοϊκή) k ₄ (4)=0,00025/32 k ₅ (4)=0,003		Εξίσωση 3 Εξίσωση 4 Crossley & Tutass (1969), επίμυς Gray et al. (1982), επίμυς Klein (1997), επίμυς Spassova et al. (2000), επίμυς Mahajna et al. (1997), μυς Eigenberg et al. (1983), επίμυς Ackerman and Wilkes (1974), όρνιθα Hatton et al. (1997), όρνιθα
Οξεία δόση				Εξίσωση 2

3.1.6.3 Αξιολόγηση

Το πρώτο βήμα για την αξιολόγηση, σύμφωνα με την EFSA (2005) περιλαμβάνει τη σύγκριση του ρυθμού των διεργασιών απορρόφησης, κατανομής, μεταβολισμού και απέκκρισης (ADME) στο πτηνό με βάση τις διαφορετικές τιμές k και του ρυθμού λήψης της δόσης προτείνοντας διάφορα σενάρια (ευνοϊκό και χειρότερο). Ο ρυθμός λήψης της δόσης ορίζεται ως η ποσότητα του methamidophos που λαμβάνει το πτηνό ανά min και kg bw.

Τα αποτελέσματα για τη χαμηλότερη δόση εφαρμογής για το σενάριο της "ντομάτας" (εφαρμογή στα ζαχαρότευτλα) παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.1-43 ενώ για την υψηλότερη δόση εφαρμογής ποσοστό για τα σενάρια της "ντομάτας" και του «οπωρώνα» παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.1-44.

Σε όλες τις περιπτώσεις για όλες τις δόσεις εφαρμογής, για όλα τα είδη πτηνών,

ο ρυθμός των διεργασιών ADME είναι χαμηλότερος από το ρυθμό της δόσης κατάποσης (Πίνακες 3.1-43/4). Έτσι, είναι δυνατό να αυξηθεί η δόση του methamidophos στο πτηνό, αυξάνοντας και τον κίνδυνο. Σε όλες τις περιπτώσεις υπολογίστηκαν, ο χρόνος διατροφής, το ποσό της διατροφής που είναι αναγκαίο για την επίτευξη των AVT/LD₅₀ και το %FIR (Πίνακες 3.1-43/4).

Η οξεία δόση όπως ορίζεται στην EFSA (2005) είναι το ποσό της δραστικής, που έχει ληφθεί από το πτηνό κατά τη στιγμή που σταματά τη διατροφή, λόγω της αποφυγής. Η εξίσωση 2 χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της οξείας δόσης ώστε να υπολογιστεί η επίδραση της αποφυγής στις διαδικασίες ADME.

Για όλα τα σενάρια των τιμών της οξείας δόσης βρίσκονται πάνω από το HD των 0,5 mg meth./kg bw (εκτός από το ευνοϊκό σενάριο για τη σταρήθρα στη χαμηλότερη δόση εφαρμογής) (Πίνακας 3.1-43) δείχνοντας υψηλό κίνδυνο οξείας τοξικότητας. Στο σενάριο της χειρότερης περίπτωσης, η υπολογιζόμενη οξεία τιμή της δόσης, είναι πολύ πάνω από το HD, για όλα τα σενάρια (Πίνακας 3.1-44).

Πίνακας 3.1-43: Εκτίμηση της επικινδυνότητας για τα πτηνά, για τη χαμηλότερη δόση εφαρμογής του σεναρίου «ντομάτα» σύμφωνα με την EFSA (2005)

Βιβλιογραφική αναφορά του k	Σενάρια	Τιμή k [1/min]	Οξεία δόση [mg a.s./kg bw] †	Ρυθμός διεργασιών ADME στο HD [mg a.s./kg bw/min] ‡	Ρυθμός δόσης κατάποσης [mg a.s./kg bw/min] ¶	Χρόνος διατροφής για την επίτευξη του LD ₅₀ (Χρόνος επίτευξης AVT) [min]	Ποσότητα τροφής επίτευξης του LD ₅₀ (Ποσότητα τροφής επίτευξης AVT) [gr]	LD ₅₀ %FIR (AVT %FIR)
Κιτρινοσουσουράδα (σενάριο “ντομάτα”)								
Eigenberg et al. (1983)	Ευνοϊκό	0,0075	0,81	0,00375	0,027	19,6 (3,7)	0,58 (0,11)	4,23 (0,8)
Crossley & Tutass (1969)	Χειρότερο	0,00016	1,78	0,00008	0,04	12,45 (14,6)	0,54 (0,64)	3,94 (4,63)
Σταρήθρα (σενάριο “ντομάτα”)								
Eigenberg et al. (1983)	Ευνοϊκό	0,0075	0,22	0,00375	0,005	171 (20,8)	3,25 (0,4)	41,17 (5,01)
Crossley & Tutass (1969)	Χειρότερο	0,00016	2,05	0,00008	0,049	10,18 (11,9)	1,83 (2,15)	23,2 (27,2)

† Σύμφωνα με την εξίσωση 2

‡ Ρυθμός διαδικασιών ADME στο HD = HD * k

¶ Ρυθμός δόσης κατάποσης = (FPM*C)/bw

Πίνακας 3.1-44: Εκτίμηση της επικινδυνότητας για τα πτηνά, για τη υψηλότερη δόση εφαρμογής των σεναρίων «ντομάτα» και «οπωρώνες» σύμφωνα με την EFSA (2005)

Βιβλιογραφική αναφορά του k	Σενάρια	Τιμή k [1/min]	Οξεία δόση [mg a.s./kg bw] †	Ρυθμός διεργασιών ADME στο HD [mg a.s./kg bw/min] ‡	Ρυθμός δόσης κατάποσης [mg a.s./kg bw/min] ¶	Χρόνος διατροφής για την επίτευξη του LD ₅₀ (Χρόνος επίτευξης AVT) [min]	Ποσότητα τροφής επίτευξης του LD ₅₀ (Ποσότητα τροφής επίτευξης AVT) [gr]	LD ₅₀ %FIR (AVT %FIR)
Κιτρινοσουσούραδα (σενάριο “ντομάτα”)								
Eigenberg et al. (1983)	Ευνοϊκό	0,0075	1,55	0,00375	0,055	9,44 (1,83)	0,28 (0,05)	2,04 (0,4)
Crossley & Tutass (1969)	Χειρότερο	0,00016	2,99	0,00008	0,08	6,22 (7,3)	0,27 (0,32)	1,97 (2,31)
Σταρήθρα (σενάριο “ντομάτα”)								
Eigenberg et al. (1983)	Ευνοϊκό	0,0075	0,41	0,00375	0,012	47,8 (8,28)	0,9 (0,15)	11,5 (2)
Crossley & Tutass (1969)	Χειρότερο	0,00016	4,11	0,00008	0,11	4,24 (4,97)	0,76 (0,89)	9,66 (11,35)
Μαυροτσιροβάκος (σενάριο “οπωρώνες”)								
Eigenberg et al. (1983)	Ευνοϊκό	0,0075	3,7	0,00375	0,13	3,76 (0,74)	0,11 (0,02)	1,02 (0,2)
Crossley & Tutass (1969)	Χειρότερο	0,00016	6,5	0,00008	0,197	2,52 (2,97)	0,11 (0,13)	1,01 (1,18)

† Σύμφωνα με την εξίσωση 2

‡ Ρυθμός διαδικασιών ADME στο HD = HD * k

¶ Ρυθμός δόσης κατάποσης = (FPM*C)/bw

3.1.6.4 Λήψη απόφασης

1) Εάν ο ρυθμός ADME > ρυθμό της κατάποσης της δόσης, δεν υπάρχει άμεσος κίνδυνος για τα πτηνά. Σε περίπτωση είναι αναγκαία περαιτέρω επεξεργασία.

2) Εάν η οξεία δόση < HD, δεν υπάρχει άμεσος κίνδυνος για τα πτηνά. Σε περίπτωση κινδύνου χρειάζεται περαιτέρω έλεγχος.

3) Σε περίπτωση που τα στοιχεία δείχνουν ότι τα πτηνά στον αγρό είναι απίθανο να τροφοδοτούνται συνεχώς για την περίοδο που υπολογίζεται από την εξίσωση 5 (χρόνος για την επίτευξη του LD₅₀), ή εάν ο χρόνος επίτευξης του LD₅₀ > χρόνο διακοπής της λήψης τροφής, δεν υπάρχει άμεσος κίνδυνος για τα πτηνά.

4) Σε περίπτωση που το ποσό της τροφής που καταναλώνεται σε αυτό το διάστημα υπερβαίνει την αναμενόμενη ημερήσια πρόσληψη (%FIR > 100), τότε θα μπορούσε να συναχθεί το συμπέρασμα ότι μια τέτοια έκθεση ήταν μάλλον απίθανο να επιτευχθεί στον αγρό.

Οι Πίνακες 3.1-45/6 που ακολουθούν συνοψίζουν την λήψη απόφασης για τα επιλεγμένα «εστιακά» είδη.

Πίνακας 3.1-45: Λήψη απόφασης για τα πτηνά, για τη χαμηλότερη δόση εφαρμογής του σεναρίου «ντομάτα» σύμφωνα με την EFSA (2005)

Σενάρια	1)	2)	3)	4)	Παρατηρήσεις
Κιτρινοσουσουράδα (σενάριο “ντομάτα”)					
Ευνοϊκό	Υψηλός κίνδυνος	Υψηλός κίνδυνος	Υψηλός κίνδυνος	Υψηλός κίνδυνος	
Χειρότερο	Υψηλός κίνδυνος	Υψηλός κίνδυνος	Υψηλός κίνδυνος	Υψηλός κίνδυνος	
Σταρήθρα (σενάριο “ντομάτα”)					
Ευνοϊκό	Υψηλός κίνδυνος	Χαμηλός κίνδυνος	171>60 (AVD). Χαμηλός κίνδυνος	Χαμηλός κίνδυνος	Φαίνεται αρκετά απίθανο σε συνθήκες αγρού το σενάριο της συνεχούς λήψης τροφής για 171 min (χρόνος επίτευξη LD ₅₀), ή της διατροφής 3,25gr σπόρων (ποσότητα διατροφής), ή της κάλυψης του 41,17 % της ημερήσιας δόσης (%FIR)
Χειρότερο	Υψηλό κίνδυνος	Υψηλός κίνδυνος	Υψηλός κίνδυνος	Υψηλός κίνδυνος	

Πίνακας 3.1-46: Λήψη απόφασης για τα πτηνά, για τη υψηλότερη δόση εφαρμογής των σεναρίων «ντομάτα» και «οπωρώνες» σύμφωνα με την EFSA (2005)

Σενάρια	1)	2)	3)	4)	Παρατηρήσεις
Κιτρινοσουσουράδα (σενάριο “ντομάτα”)					
Ευνοϊκό	Υψηλός κίνδυνος	Υψηλός κίνδυνος	Υψηλός κίνδυνος	Υψηλός κίνδυνος	
Χειρότερο	Υψηλός κίνδυνος	Υψηλός κίνδυνος	Υψηλός κίνδυνος	Υψηλός κίνδυνος	
Σταρήθρα (σενάριο “ντομάτα”)					
Ευνοϊκό	Υψηλός κίνδυνος	Χαμηλός κίνδυνος	47,8>30 (AVD) Χαμηλός κίνδυνος	Υψηλός κίνδυνος	Φαίνεται πιθανόν σε συνθήκες αγρού το σενάριο της συνεχούς λήψης τροφής για 39,52 min (χρόνος επίτευξης LD ₅₀), ή της διατροφής 0,9gr σπόρων (ποσότητα διατροφής), ή της κάλυψης του 11,5 % της ημερήσιας δόσης (%FIR)
Χειρότερο	Υψηλός κίνδυνος	Υψηλός κίνδυνος	Υψηλός κίνδυνος	Υψηλός κίνδυνος	
Μαυροτσιροβάκος (σενάριο “οπωρώνες”)					
Ευνοϊκό	Υψηλός κίνδυνος	Υψηλός κίνδυνος	Υψηλός κίνδυνος	Υψηλός κίνδυνος	
Χειρότερο	Υψηλός κίνδυνος	Υψηλός κίνδυνος	Υψηλός κίνδυνος	Υψηλός κίνδυνος	

3.2 Πέστροφα

3.2.1 Δοκιμές οξείας τοξικότητας

3.2.1.1 Μακροσκοπικές παρατηρήσεις

Τα ψάρια ελέγχθηκαν 3, 6, 24, 48, 72 και 96 h μετά την έναρξη του πειραματισμού για τον προσδιορισμό της θνησιμότητας, των κλινικών συμπτωμάτων όσο και της μακροσκοπικής παρατήρησης τους.

3.2.1.1.1 Θνησιμότητα

Στον μάρτυρα και στις μία από τις 2 χαμηλότερες συγκεντρώσεις (27 mg/l) δεν υπήρχαν νεκρά ψάρια αλλά στις συγκεντρώσεις των 18, 40,5, 60,8 και 91,1 mg/l, από τα 7 ψάρια πέθαναν 1, 4, 2, 6 και 7, αντίστοιχα. Τα περισσότερα ψάρια πέθαναν 96 h μετά την έναρξη του πειραματισμού.

Όσον αφορά την θνησιμότητα το LOEC=18 mg/lt ενώ το LC₅₀=48,02 mg/lit (R²=0,884) μετά από 4 d έκθεσης.

Στον Πίνακα 3.2-1 παρατίθεται η αθροιστική θνησιμότητα στα ψάρια.

Πίνακας 3.2-1: Αθροιστική θνησιμότητα σε πέστροφα (*Oncorhynchus mykiss*) μετά από έκθεση σε διάφορες συγκεντρώσεις methamidophos (mg/l). Η οξεία τοξικότητα ελέγχθηκε σε εργαστηριακές συνθήκες (n=7 άτομα/ομάδα επέμβασης, ομάδα μάρτυρα, 60,8 mg/lit=8 άτομα)

Methami- dophos (mg/lit)	Αριθμός νεκρών ατόμων					
	Ημέρες μετά τη χορήγηση					
	0 (+3 h)	0 (+6 h)	1	2	3	4
0	0	0	0	0	0	0
18,0	0	0	0	0	0	1
27,0	0	0	0	0	0	0
40,5	0	0	0	0	1	2
60,8	0	0	0	0	1	5
91,1	0	0	1	1	4	7

3.2.1.1.2 Κλινικά συμπτώματα

Σε όλες τις συγκεντρώσεις, τα κλινικά συμπτώματα που καταγράφηκαν ήταν «σπασμωδική κίνηση», «παραμονή στον πυθμένα του ενυδρείου», «αντίδραση σε εξωτερικό ερέθισμα» ενώ η ένταση τους είναι ανάλογη των συγκεντρώσεων και του χρονικού διαστήματος της έκθεσης, μέχρι το πέρας του πειραματισμού, την ημέρα 4 (Εικ. 3.2-1).

Στον μάρτυρα τα ψάρια έδειχναν υγιή, ενώ δεν υπήρχαν εμφανή κλινικά συμπτώματα. Στη συγκέντρωση των 18 mg/l, τα κλινικά συμπτώματα παρατηρήθηκαν από την ημέρα 2 με αυξανόμενη ένταση, την ημέρα 4 ήταν πολύ σοβαρά, ενώ στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις των 27 και 40,5 mg/l παρατηρήθηκαν από την ημέρα 1 και έκτοτε ήταν αυξανόμενης έντασης. Η σπασμωδική κίνηση έκανε πολλά από τα ψάρια να έχουν το σχήμα S ή του κύκλου, ενώ δεν μπορούσαν να κρατήσουν της ισορροπία τους. Στη συγκέντρωση των 60,8 mg/l τα κλινικά συμπτώματα παρατηρήθηκαν από την ημέρα 1 με αυξανόμενη ένταση, με πολλά από τα ψάρια να μην μπορούν να κρατήσουν την ισορροπία τους ενώ την ημέρα 4 ήταν πολύ σοβαρά, με ενδείξεις ανάλογες μόλις πριν από το θάνατο τους. Στη συγκέντρωση των 91,1 mg/l από την ημέρα 0, τα ψάρια ήταν νευρικά, με έντονη αναπνευστική λειτουργία, ενώ τα πρώτα κλινικά συμπτώματα παρατηρήθηκαν από την ημέρα 1 ενώ πολλά από τα ψάρια δεν μπορούσαν να κρατήσουν ισορροπία την τους. Την ημέρα 3 όλα τα κλινικά συμπτώματα ήταν πολύ σοβαρά με ενδείξεις όπως καταγράφηκαν μόλις πριν από το θάνατο τους, ενώ την ημέρα 4 δεν υπήρχαν ζώντα ψάρια.

Όσον αφορά στα κλινικά συμπτώματα το LOEC=18 mg/l, μετά από 4 d πειραματισμού.

Τα κλινικά συμπτώματα, για τον πειραματισμό της οξείας τοξικότητας σε πέστροφα, παρατίθενται στον Πίνακα 3.2-2.



Εικ. 3.2-1: Οξεία τοξικότητα. Παραμονή στον πυθμένα της δεξαμενής με την αύξηση της συγκέντρωσης του methamidophos (Φουντουλάκης Μ.).

Πίνακας 3.2-2: Κλινικά συμπτώματα σε πέστροφα (*Oncorhynchus mykiss*) μετά από έκθεση σε διάφορες συγκεντρώσεις methamidophos (mg/l). Η οξεία τοξικότητα ελέγχθηκε σε εργαστηριακές συνθήκες (n=7 άτομα/ομάδα επέμβασης, ομάδα μάρτυρα, 60,8 mg/l=8 άτομα)

Methamidophos (mg/l)	Κλινικά συμπτώματα	Ένταση κλινικών συμπτωμάτων					
		Ημέρες μετά τη χορήγηση					
		0 (+3 h)	0 (+6 h)	1	2	3	4
0	Σπασμοδική κίνηση, Παραμένουν στον πυθμένα του ενυδρείου, Αντίδραση σε εξωτερικό ερέθισμα	-	-	-	-	-	-
18,0	Σπασμοδική κίνηση, Παραμένουν στον πυθμένα του ενυδρείου, Αντίδραση σε εξωτερικό ερέθισμα	-	-	-	-	++	+++
27,0	Σπασμοδική κίνηση, Παραμένουν στον πυθμένα του ενυδρείου, Αντίδραση σε εξωτερικό ερέθισμα	-	-	+	+	++	+++
40,5	Σπασμοδική κίνηση, Παραμένουν στον πυθμένα του ενυδρείου, Αντίδραση σε εξωτερικό ερέθισμα	-	-	Ήρεμα -	++	+++	+++
60,8	Σπασμοδική κίνηση, Παραμένουν στον πυθμένα του ενυδρείου, Αντίδραση σε εξωτερικό ερέθισμα	-	-	Αργή κίνηση	++	+++	+++
91,1	Σπασμοδική κίνηση, Παραμένουν στον πυθμένα του ενυδρείου, Αντίδραση σε εξωτερικό ερέθισμα	Νευρικά κατά την εφαρμογή της συγκέντρ.	-	Ήρεμα -	++	+++	+++
			-	Αργή κίνηση	Απάθεια	Απάθεια	X

-/+/++/+++ = ύπαρξη και βαθμός έντασης κλινικών συμπτωμάτων
x = δεν υπάρχουν ζώντα άτομα

3.2.1.1.3 Μακροσκοπική παρατήρηση των ιστών

Όλα τα ψάρια που ελήφθησαν ως δείγματα, εξετάστηκαν μακροσκοπικά για πιθανές βλάβες στο εσωτερικό τους, κατά τη διάρκεια της αφαίρεσης ιστών, για τους ιστούς αυτούς αλλά και ως γενική εικόνα της πέστροφας.

Στα ζώντα άτομα δεν υπήρχαν εμφανή τοξικά συμπτώματα.

3.2.1.2 Βιοχημικά αποτελέσματα

3.2.1.2.1 Εγκέφαλος

Η δραστηριότητα των εστερασών όταν χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα το ASCh ήταν υψηλή ενώ με την χρήση των παρεμποδιστών iso-OMPA, BW284C51 και eserine, έδωσε 7,6, 92,2 και 95% παρεμπόδιση, αντίστοιχα, γεγονός που αποδεικνύει ότι το ένζυμο είναι AChE και πιθανώς ίχνη από BuChE. Όταν χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα το BuSCh οι τιμές δραστηριότητας ήταν πολύ χαμηλές, στα όρια ανίχνευσης της μεθόδου, ενώ με την χρήση των παρεμποδιστών BW284C51 και eserine, ήταν 70 και 80% παρεμπόδιση, αντίστοιχα, με ενδείξεις ότι το ένζυμο είναι ίχνη από BuChE, χωρίς όμως από μόνο του να δίνει ασφαλή συμπεράσματα. Τελικά όταν χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα το PrSCh οι τιμές δραστηριότητας ήταν πολύ χαμηλές, στα όρια ανίχνευσης της μεθόδου, σε αντίθεση με το ορτύκι, γεγονός που υποδεικνύει ότι στην πέστροφα το ένζυμο AChE δεν υδρολύει το PrSCh στον εγκέφαλο. Η προσθήκη των παρεμποδιστών iso-OMPA, BW284C51 και eserine έδωσε 31, 55 και 85% παρεμπόδιση, δίνοντας ενδείξεις ότι το ένζυμο είναι ίχνη από BuChE και AChE.

Στον μάρτυρα, οι υψηλότερες τιμές δραστηριότητας των εστερασών για το υπόστρωμα ASCh (μετά την αφαίρεση του BuChE), την ημέρα 1, ήταν $561,2 \pm 181,0$ SD, $\mu\text{mol}/\text{min mg}$ πρωτεΐνης (Πίνακας 3.2-3), ενώ πολύ χαμηλή δραστηριότητα καταγράφηκε όταν το υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το BuSCh και PrSCh, $20,2 \pm 15,4$ SD και $3,7 \pm 21,0$ SD $\mu\text{mol}/\text{min mg}$ πρωτεΐνης, αντίστοιχα.

Η δραστηριότητα της AChE διέφερε σημαντικά (με υπόστρωμα το ASCh μετά την αφαίρεση του BuChE), όταν η συγκέντρωση του methamidophos και ο χρόνος έκθεσης αυξανόταν. Για όλες τις συγκεντρώσεις, εκτός της χαμηλότερης, το methamidophos παρεμπόδισε, 13-31%, την δραστηριότητα της AChE, μέχρι την ημέρα 1 μετά την έκθεση ενώ για την χαμηλότερη συγκέντρωση αντιθέτως παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση 78% της δραστηριότητας. Την ημέρα 3 και 4 όμως, καθώς η έκθεση συνεχιζόταν, για τις χαμηλότερες και τη μεσαία συγκέντρωση, η παρεμπόδιση της δραστηριότητας της AChE μεγάλωσε από 24-54% στα ζώντα ψάρια (Πίνακας 3.2-3). Στα νεκρά ψάρια, στη χαμηλότερη (18 mg/l) και στις 2 υψηλότερες συγκεντρώσεις (60,8 και 91,1 mg/l), η παρεμπόδιση της δραστηριότητας της AChE στον εγκέφαλο κυμάνθηκε σε υψηλότερα επίπεδα, 53, 72 και 73%, αντίστοιχα (Πίνακας 3.2-3).

Πίνακας 3.2-3: Βιοχημική *in vitro* δραστηριότητα της AChE, σε εγκέφαλο πέστροφας (*Oncorhynchus mykiss*) μετά από έκθεση σε διάφορες συγκεντρώσεις methamidophos (mg/l). Η κάθε τιμή είναι ο MO μετρήσεων από 1-2 ψάρια (MO ± SD). Η οξεία τοξικότητα ελέγχθηκε σε εργαστηριακές συνθήκες (n=7 άτομα/ομάδα επέμβασης, ομάδα μάρτυρα, 60,8 mg/l=8 άτομα)

Methamidophos (mg/l)	Δραστηριότητα της AChE ¹								
	Ημέρες μετά τη χορήγηση								
	1			3			4		
0	561,2	±	181,0 ²	578,3	±	199,0	914,5	±	141,7
18	997,3	±	248,7 (-78)	472,9	±	114,9 (18)	697,0		(24 [53])
27	483,6	±	98,4 (14)	609,9	±	21,7 (-5)	502,5	±	198,2 (45)
40,5	486,7	±	50,3 (13)	245,3	±	52,5 (58)	423,2	±	99,2 (54)
60,8	395,5	±	6,5 (30)	372,7	±	67,2 (36)	252,9	±	20,7 [72]
91,1	387,9	±	76,5 (31 [44])	233,8	±	44,8 [60]	249,2		[73]

¹ μmol/min.mg πρωτεΐνης.

² Τα δεδομένα εκφράζονται ως MO ± SD. Η % παρεμπόδιση σε σύγκριση με τον μάρτυρα για τα ζώντα άτομα καταγράφεται μέσα στην παρένθεση () ενώ για τα νεκρά μέσα σε αγκύλες [].

3.2.1.2.2 Ήπαρ

Η δραστηριότητα των εστερασών στο ήπαρ ήταν χαμηλή όταν χρησιμοποιήθηκαν ως υπόστρωμα τα ASCh ή BuSCh ή PrSCh. Όλες οι τιμές δραστηριότητας των εστερασών ήταν σε ανάλογα επίπεδα. στα όρια ανίχνευσης της μεθόδου ενώ λόγω των πολύ μικρών δειγμάτων και των βιοχημικών αποτελεσμάτων δεν χρησιμοποιήθηκαν παρεμποδιστές.

Η δραστηριότητα των εστερασών στο ήπαρ, στον μάρτυρα, ήταν χαμηλή όταν κατά την βιοχημική ανάλυση ως υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκαν τα ASCh, BuSCh και PrSCh ενώ την ημέρα 1, ήταν $8,1 \pm 3,1$ SD, $5,4 \pm 1,6$ SD και $1,5 \pm 0,63$ SD $\mu\text{mol}/\text{min mg}$ πρωτεΐνης, αντίστοιχα (Πίνακας 3.2-4).

Ενδεικτικά μόνο, για τις όλες τις συγκεντρώσεις, το methamidophos παρεμπόδισε 47-65% την δραστηριότητα της BuChE στο συκώτι μέχρι την ημέρα 1 μετά την εφαρμογή της. Την ημέρα 4, η δραστηριότητα της BuChE ήταν από 39-70% στα ζώντα ψάρια. Στα νεκρά ψάρια, στη χαμηλότερη συγκέντρωση (18 mg/l) και στις 2 υψηλότερες συγκεντρώσεις (60,8 και 91,1 mg/l), η παρεμπόδιση της δραστηριότητας της BuChE στον εγκέφαλο κυμάνθηκε σε υψηλότερα επίπεδα, 78, 70 και 73%, αντίστοιχα (Πίνακας 3.2-4).

Πίνακας 3.2-4: Βιοχημική *in vitro* δραστικότητα των BuChE, με υπόστρωμα BuSCh, σε ήπαρ πέστροφας (*Oncorhynchus mykiss*) μετά από έκθεση σε διάφορες συγκεντρώσεις methamidophos (mg/l). Η κάθε τιμή είναι ο MO μετρήσεων από 1-2 ψάρια (MO ± SD). Η οξεία τοξικότητα ελέγχθηκε σε εργαστηριακές συνθήκες (n=7 άτομα/ομάδα επέμβασης, ομάδα μάρτυρα, 60,8 mg/l=8 άτομα)

Methamidophos (mg/l)	Δραστικότητα της BuChE ¹					
	Ημέρες μετά τη χορήγηση					
	1		3		4	
0	5,4 ±	1,6 ²	6,1 ±	1,1	5,1 ±	3,2
18	2,8 ±	0,1 (47)	2,8 ±	0,2 (54)	1,5 -	(70 [78])
27	1,9 ±	0,8 (64)	2,7 ±	2,5 (56)	2,8 ±	2,0 (44)
40,5	2,9 ±	0,3 (47)	5,7 ±	3,1 (6)	3,1 ±	0,2 (39)
60,8	1,9 ±	0,1 (65)	4,2 ±	1,5 (31)	1,5 ±	[70]
91,1	2,5 ±	0,3 (53 [70])	2,9 ±	0,9 [52]	1,4	[73]

¹ μmol/min.mg πρωτεΐνης.

² Τα δεδομένα εκφράζονται ως MO ± SD. Η % παρεμπόδιση σε σύγκριση με τον μάρτυρα για τα ζώντα άτομα καταγράφεται μέσα στην παρένθεση () ενώ για τα νεκρά μέσα σε αγκύλες [].

3.2.1.3 Ιστοχημικές χρώσεις

3.2.1.3.1 Εγκέφαλος

3.2.1.3.1.1 Χρώση Ηωσίνης – Αιματοξυλίνης

Η επίδραση του methamidophos στον εγκέφαλο της πέστροφας διέφερε μεταξύ του μάρτυρα και των επεμβάσεων για την περίοδο των 4 d, υποδεικνύοντας διαταραχή της ιστικής αρχιτεκτονικής αναλόγως της συγκέντρωσης και του χρόνου έκθεσης.

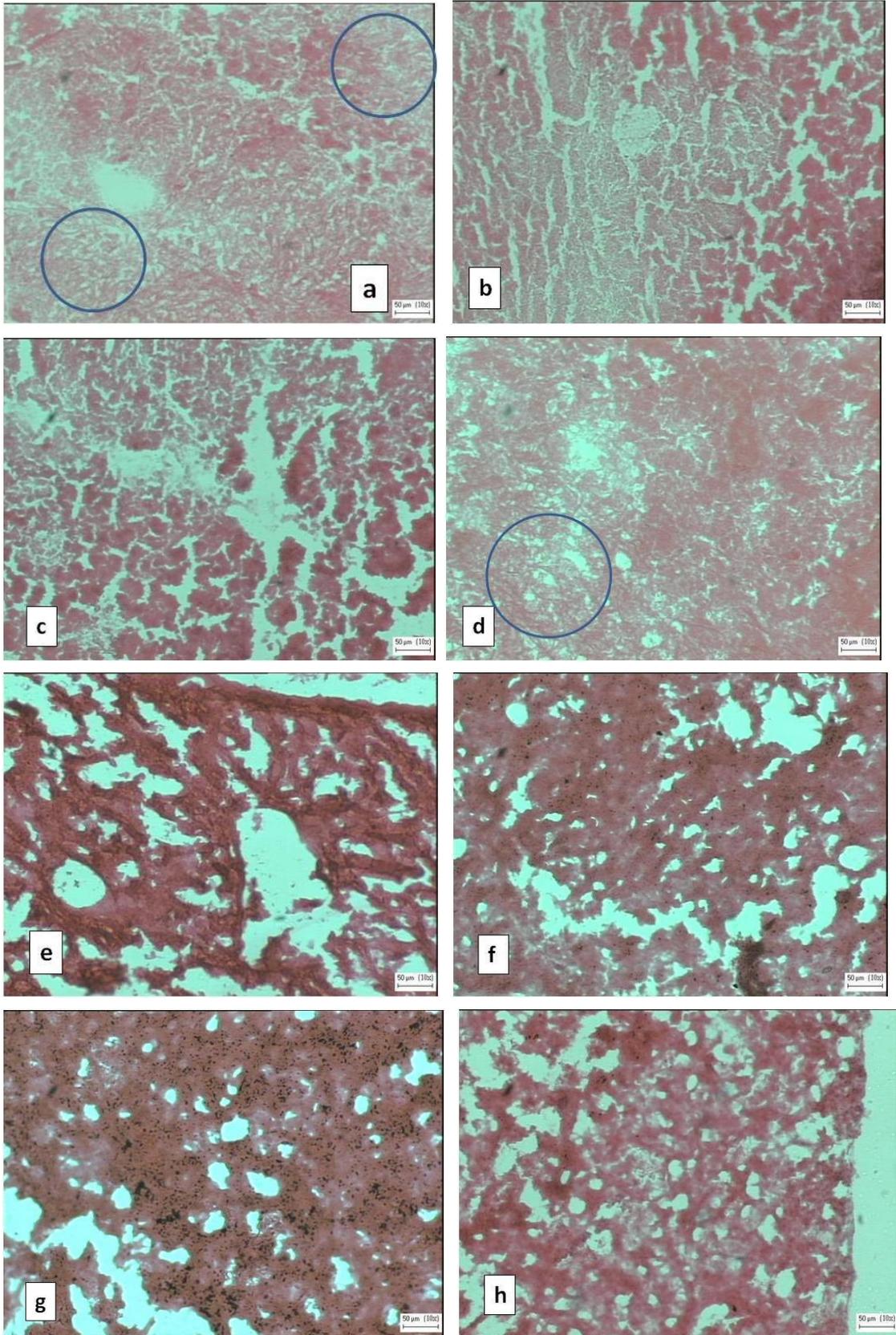
Για τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις των 18 και 27 mg/l, παρατηρήθηκε εκφυλισμός της κυτταρικής δομής σε επίπεδο πυρήνα, κυτταροπλάσματος (πιθανά διαφορετικά στάδια της διαδικασίας του κυτταρικού θανάτου), αλλά και καρνομεγαλία ενώ τα αποπτωτικά κύτταρα ήταν ορατά είτε σε ομάδες σε πολύ μικρές εστιακές περιοχές είτε και σε εκτεταμένες ζώνες. Σε κάποιες περιπτώσεις παρατηρήθηκε η αποκατάσταση (αναγέννηση) του ιστού. Η διατάραξη της ιστικής αρχιτεκτονικής ήταν λιγότερο εκτεταμένη στον εγκεφαλικό φλοιό σε σχέση με το εσωτερικό του εγκεφάλου.

Για τη μεσαία συγκέντρωση των 40,5 mg/l οι ιστολογικές αλλοιώσεις που παρατηρήθηκαν ήταν εντονότερες σε σύγκριση με εκείνες που παρατηρήθηκαν στις χαμηλότερες συγκεντρώσεις. Και πάλι ήταν ορατοί στον εγκεφαλικό ιστό, πυκνωτικοί (αποπτωτικοί) πυρήνες σε ομάδες κυττάρων και υπερμεγέθεις πυρήνες (καρνομεγαλία) ενώ η σπογγειόμορφη αρχιτεκτονική (λόγω της απόπτωσης) συνοδευόταν συχνά και από εστιακή διαφοροποίηση της χρώσης.

Για τις υψηλότερες συγκεντρώσεις των 60,8 και 91,1 mg/l, όπου όλες σχεδόν οι πέστροφες πέθαναν, ο εγκεφαλικός ιστός που παρελήφθη άμεσα μετά το θάνατο παρουσίαζε εντονότερες νεκρωτικές εστίες, συστηματική σπογγειόμορφη μορφολογία, πυκνωτικούς (αποπτωτικούς) πυρήνες και εστιακές διαφοροποιήσεις στη χρώση (Εικ. 3.2-2).

Εικ. 3.2-2: Τομές κρυστόμου, από εγκέφαλο και ήπαρ πέστροφας από το πείραμα οξείας τοξικότητας με methamidophos. Χρώση ηωσίνης / αιματοξυλίνης.

- a.** Εγκέφαλος, 91,1 mg/l, ημέρα 4: Παρατηρούνται αποπτωτικά κύτταρα (πάνω δεξιά) και εκτεταμένες αλλοιώσεις (κάτω δεξιά).
- b.** Εγκέφαλος, 27 mg/l, ημέρα 1: Παρατηρείται διαφοροποίηση της χρώσης (ασθενής στις περιοχές με απόπτωση). Είναι ενδεικτική η απώλεια της κυτταρικής μάζας (κάτω δεξιά).
- c.** Εγκέφαλος, 18 mg/l, ημέρα 1: Παρατηρείται σπογγειόμορφη αρχιτεκτονική (λόγω της απόπτωσης).
- d.** Εγκέφαλος, 18 mg/l, ημέρα 4: Παρατηρείται αποκατάσταση του ιστού (κύκλος).
- e.** Ήπαρ, 40,5 mg/l, ημέρα 4: Παρατηρούνται νεκρωτικές εστίες και απώλεια της ομοιογένειας.
- f.** Ήπαρ, 77,5 mg/l τροφής, ημέρα 5: Παρατηρούνται πυκνωτικοί (αποπτωτικοί) πυρήνες (σκούρες κηλίδες).
- g.** Ήπαρ, 91,1 mg/l, ημέρα 4: Παρατηρείται έντονη κυτταροφαγία (μαύρες περιοχές).
- h.** Ήπαρ, 18 mg/l, ημέρα 4: Παρατηρείται σπογγειόμορφη αρχιτεκτονική.



3.2.1.3.1.2 Ιστοχημική ανίχνευση για την AChE

Η μεταχείριση για ανίχνευση για την AChE, είχε ως αποτέλεσμα τη χρώση των ιστών από ανοικτό έως σκούρο καφέ, στο κυτταρόπλασμα και τις αποφυάδες (δενδρίτες και νευρίτες) των νευρικών κυττάρων, αλλά όχι των πυρήνων, τη χρώση δεσμών νευρικών απολήξεων και μεγαλύτερων νεύρων.

Η συνδυασμένη χρήση της ASCh με τον παρεμποδιστή iso-OMPA έδωσε κύτταρα με έντονη θετική χρώση για την AChE, με τη χρωστική να παρουσιάζει κοκκώδη υφή κυρίως στο κυτταρόπλασμα, συχνά πολύ κοντά στην κυτταροπλασματική μεμβράνη αλλά και στις κυτταρικές και πυρηνικές μεμβράνες, όχι όμως στο πυρηνόπλασμα. Στο μάρτυρα και στις επεμβάσεις, παρατηρήθηκαν έντονα χρωσμένα κύτταρα τόσο στο φλοιό όσο και εσωτερικά στον εγκέφαλο του ορτυκιού, αλλά η ένταση της χρώσης μειωνόταν ελαφρώς ανεξαρτήτως συγκέντρωσης και ημέρας δειγματοληψίας (Εικ. 3.2-3).

Μεταξύ των συγκεντρώσεων δεν παρατηρήθηκε διαφοροποίηση της ποσοτικής αξιολόγησης της χρώσης (ένταση - σχετικός πληθυσμός - επιφανειακή κατανομή). Για όλες τις συγκεντρώσεις ο ποσοτικός χαρακτηρισμός των χρωσμένων σε AChE νεύρων και νευρικών ινών ήταν μειωμένος (17,2 έως 43,0%) σε σύγκριση με τον μάρτυρα (Πίνακας 3.2-5) (Εικ. 3.2-3).

Η χωροταξική κατανομή της χρώσης του ιστού, χαρακτηρίστηκε ως «Περιφερειακή/Κεντρική» τόσο για τον μάρτυρα όσο και για τις επεμβάσεις με methamidophos, ανεξαρτήτως του χρόνου λήψης των δειγμάτων (Πίνακας 3.2-5).

Πίνακας 3.2-5: Ιστοχημική ανίχνευση για την AChE σε εγκέφαλο πέστροφας (*Oncorhynchus mykiss*) μετά από χρώση κατά Baker et al. (1986), όπως τροποποιήθηκε από τους Karnovsky and Roots (1964). Έγινε ιστολογική αξιολόγηση με κριτήρια έντασης χρώσης, σχετικού πληθυσμού χρωσμένων κυττάρων και επιφανειακής κατανομής της χρώσης καθώς και χωροταξικής κατανομής μετά από έκθεση σε διάφορες συγκεντρώσεις methamidophos (mg/l). Η κάθε τιμή είναι ο MO μετρήσεων από 4-7 ψάρια (MO \pm SD). Η οξεία τοξικότητα ελέγχθηκε σε εργαστηριακές συνθήκες (n=7 άτομα/ομάδα επέμβασης, ομάδα μάρτυρα, 60,8 mg/l=8 άτομα)

Methamidophos (mg/l)	Ποσοτική έκφραση της AChE (Τιμές χρώσης)			Γινόμενο (=ένταση X πληθυσμού κυττ. X επιφ. κατανομή) της ποσοτικής έκφρασης της AChE (Τιμές χρώσης) ²	Χωροταξική κατανομή		
	Ένταση χρώσης (1-5)	Σχετικός πληθυσμός χρωσμένων κυττάρων (1-5)	Επιφαν. κατανομή χρώσης (1-3)		Ημέρες δειγματοληψίας		
					1	3	4
0	3,94	4,13	2,94	47,8 \pm 3,3	●	●	●
18	3,25	3,85	2,67	33,7 \pm 13,8 (-29,5)	●	●	●
27	3,41	4,04	2,70	39,6 \pm 16,7 (-17,2)	●	●	●
40,5	3,42	3,92	2,79	36,8 \pm 9,4 (-23,0)	●	●	●
60,8	2,56	4,03	2,44	27,2 \pm 17,7 (-43,0)	●	●	●
91,1	3,10	3,55	2,85	33,6 \pm 20,0 (-29,8)	●	●	●

¹ Τα δεδομένα εκφράζονται ως MO των τομών κάθε ιστού

² Τα δεδομένα εκφράζονται ως MO των τομών κάθε ιστού \pm SD. Η % διαφοροποίηση της ποσοτικής έκφρασης της χρώσης σε σύγκριση με τον μάρτυρα καταγράφεται μέσα στην παρένθεση ()

Εικ. 3.2-3: Τομές κρουτόμου, από εγκέφαλο πέστροφας από το πείραμα οξείας τοξικότητας με methamidophos. Ιστοχημικές χρώσεις εστερασών.

a. Ιστοχημική χρώση για την AChE, 27 mg/lit, ημέρα 1: Παρατηρείται εκτεταμένη χρώση σε όλη την επιφάνεια της τομής.

b. Ιστοχημική χρώση για την AChE, μεγέθυνση x 40. Η χρωστική στο νευρικό κύτταρο παρουσιάζει κοκκώδη υφή κυρίως στο κυτταρόπλασμα, κοντά στην κυτταροπλασματική μεμβράνη αλλά και στις κυτταρικές και πυρηνικές μεμβράνες.

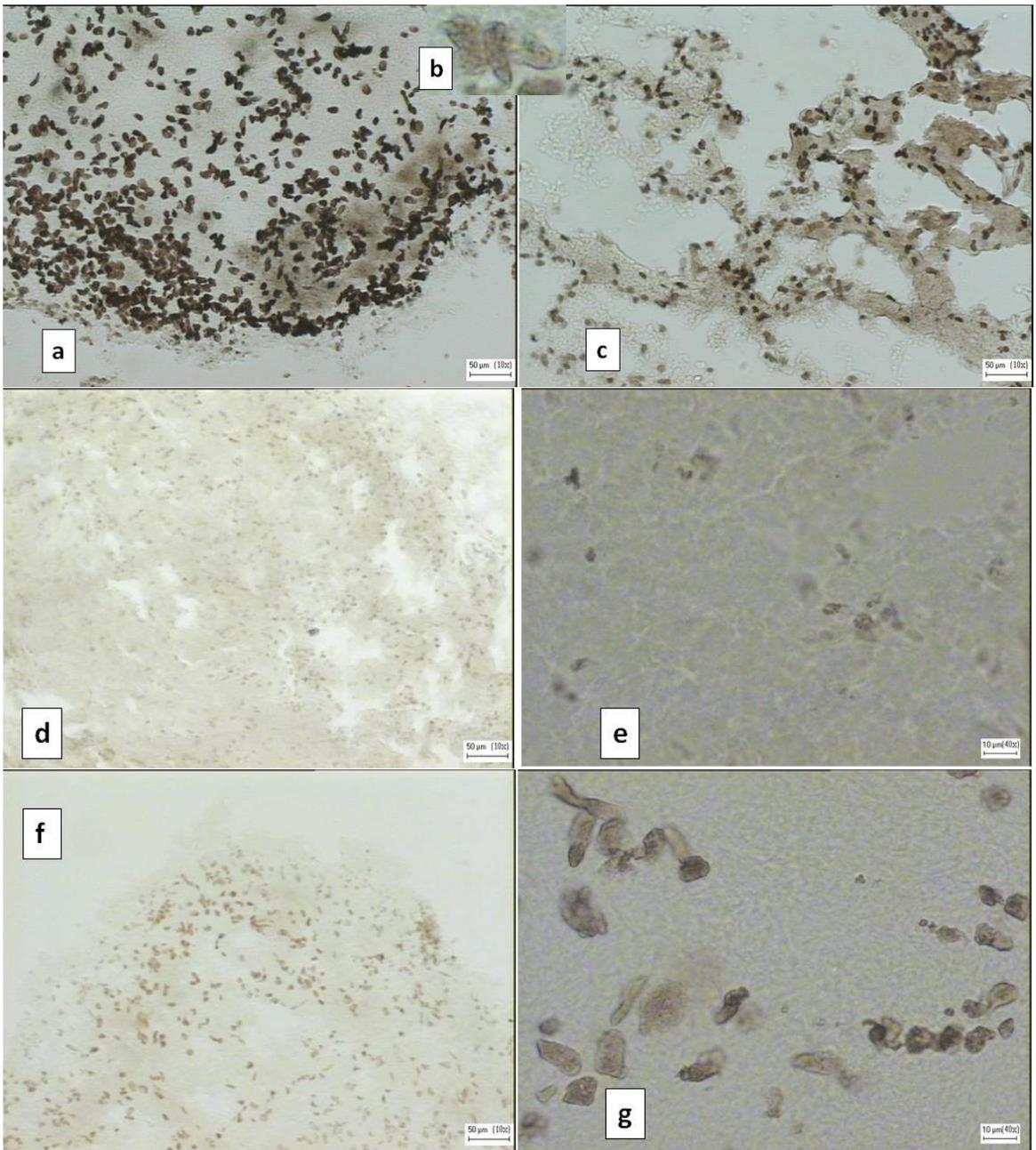
c. Ιστοχημική χρώση για την AChE, 18 mg/lit, ημέρα 4 (νεκρή πέστροφα): Παρατηρείται εκτεταμένη χρώση σε όλη την επιφάνεια της τομής ανάμεσα στα μεγάλα διάκενα.

d. Ιστοχημική χρώση για την BuChE, 40,5 mg/lit, ημέρα 4: Παρατηρείται χρώση μικρής ποσοτικής έκφρασης.

e. Ιστοχημική χρώση για την BuChE, μεγέθυνση x 40. Η χρωστική στο νευρικό κύτταρο παρουσιάζει κοκκώδη υφή κυρίως στο κυτταρόπλασμα, κοντά στην κυτταροπλασματική μεμβράνη αλλά και στις κυτταρικές και πυρηνικές μεμβράνες. Δεν χρωματίστηκαν οι αποφυάδες (δενδρίτες και νευρίτες) των νευρικών κυττάρων, αλλά και τα νεύρα.

f. Ιστοχημική χρώση για ChEs που υδρολύουν την PrSCh, 60,8 mg/lit, ημέρα 1: Παρατηρείται χρώση στην επιφάνεια της τομής.

g. Ιστοχημική χρώση για ChEs που υδρολύουν την PrSCh, μεγέθυνση x 40. Παρατηρείται χρώση στο νευρικό κύτταρο είναι ανάλογη της AChE (**c.**).



3.2.1.3.1.3 Χρώση για την BuChE

Η χρώση για την BuChE στο κύτταρο εμφανίστηκε στον πυρήνα και στο κυτταρόπλασμα σε κοκκώδη υφή, συχνά πιο έντονη από της AChE, συσχετιζόμενη με τις κυτταροπλασματικές μεμβράνες, ενώ παρατηρήθηκε και στις κυτταρικές και πυρηνικές μεμβράνες αλλά όχι στο πυρηνόπλασμα ενώ δεν χρωματίστηκαν οι αποφυάδες (δενδρίτες και νευρίτες) των νευρικών κυττάρων, αλλά και τα νεύρα (Εικ. 3.2-3).

Η συνολική ποσοτική έκφραση της χρώσης ήταν χαμηλή και υπολογίστηκε στο 7,9% της AChE. Για όλες τις συγκεντρώσεις, εκτός της υψηλότερης, η χρώση για την BuChE δεν είχε διακριτή διαφορά σε σχέση με τον μάρτυρα, ανεξαρτήτως συγκέντρωσης και ημέρας δειγματοληψίας ενώ για την υψηλότερη συγκέντρωση η χρώση κατέδειξε σημαντικά μειωμένη παρουσία θετικών κυττάρων στον εγκέφαλο των ψαριών σε σύγκριση με τον μάρτυρα. Δεν πραγματοποιήθηκε ανάλυση λόγω των πολύ χαμηλών τιμών έκφρασης της χρώσης και τις σχετικά, για αυτές τις τιμές, μεγάλες τιμές τυπικής απόκλισης (\pm SD) (Πίνακας 3.2-6) (Εικ. 3.2-3).

Στις τομές κυρίως δεν υπήρχε χρώση ενώ η κατανομή της χρώσης, στις λίγες φορές που καταγράφηκε, χαρακτηρίστηκε ως «Περιφερειακή/Κεντρική».

Πίνακας 3.2-6: Ιστοχημική ανίχνευση για την BuChE σε εγκέφαλο πέστροφας (*Oncorhynchus mykiss*) μετά από χρώση κατά Baker et al. (1986), όπως τροποποιήθηκε από τους Karnovsky and Roots (1964). Έγινε ιστολογική αξιολόγηση με κριτήρια έντασης χρώσης, σχετικού πληθυσμού χρωσμένων κυττάρων και επιφανειακής κατανομής της χρώσης καθώς και χωροταξικής κατανομής μετά από έκθεση σε διάφορες συγκεντρώσεις methamidophos (mg/l). Η κάθε τιμή είναι ο MO μετρήσεων από 4-7 ψάρια (MO \pm SD). Η οξεία τοξικότητα ελέγχθηκε σε εργαστηριακές συνθήκες (n=7 άτομα/ομάδα επέμβασης, ομάδα μάρτυρα, 60,8 mg/l=8 άτομα)

Methamidophos (mg/l)	Ποσοτική έκφραση της BuChE (Τιμές χρώσης)			Γινόμενο (=ένταση X πληθυσμού κυττ. X επιφ. κατανομή) της ποσοτικής έκφρασης της BuChE (Τιμές χρώσης) ²	Χωροταξική κατανομή Ημέρες δειγματοληψίας		
	Ένταση χρώσης (1-5)	Σχετικός πληθυσμός χρωσμένων κυττάρων (1-5)	Επιφαν. κατανομή χρώσης (1-3)		1	3	4
0	1,17	1,70	1,09	3,8 ± 5,4			
18	0,80	0,70	0,73	2,8 ± 5,4 ()			
27	0,54	1,56	1,71	3,5 ± 3,6 ()			
40,5	1,15	1,20	0,63	3,0 ± 6,0 ()			
60,8	0,65	1,29	1,27	3,0 ± 3,9 ()			
91,1	0,50	0,63	0,81	0,4 ± 0,6 ()			

¹ Τα δεδομένα εκφράζονται ως MO των τομών κάθε ιστού

² Τα δεδομένα εκφράζονται ως MO των τομών κάθε ιστού \pm SD

3.2.1.3.1.4 Χρώση ChEs που υδρολύουν την PrSCh

Η χρώση για ChEs που υδρολύουν την PrSCh δεν περιορίζονταν μόνο στα νευρικά κύτταρα αλλά επιπρόσθετα, και στα ερυθρά αιμοσφαίρια. Η χρώση στα νευρικά κύτταρα έμοιαζε με της AChE αλλά δεν ήταν τόσο κοκκώδης και παρατηρήθηκε στις κυτταρικές και πυρηνικές μεμβράνες αλλά όχι στο πυρηνόπλασμα, ενώ στα ερυθρά αιμοσφαίρια εμφανίζονταν στο κυτταρόπλασμα και στην κυτταρική μεμβράνη (Εικ. 3.2-3).

Η συνολική ποσοτική έκφραση της χρώσης, υπολογίστηκε στο 16% της αντίστοιχης για την AChE. Δεν παρατηρήθηκε ουσιαστική διαφοροποίηση της χρώσης (ένταση - σχετικός πληθυσμός - επιφανειακή κατανομή) στις τομές του εγκεφάλου, ανεξαρτήτως συγκέντρωσης και ημέρας δειγματοληψίας, εκτός για της υψηλότερης όπου η χρώση κατέδειξε σημαντικά μειωμένη παρουσία θετικών κυττάρων στον εγκέφαλο της πέστροφας σε σύγκριση με τον μάρτυρα. Δεν πραγματοποιήθηκε ανάλυση λόγω των πολύ χαμηλών τιμών έκφρασης της χρώσης και τις σχετικά, για αυτές τις τιμές, μεγάλες τιμές τυπικής απόκλισης (\pm SD) (Πίνακας 3.2-7) (Εικ. 3.2-3).

Για τις τομές στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν επιπροσθέτως και οι δύο παρεμποδιστές των AChE και BuChE (BW284C51 και iso-OMPA), η χρώση δεν υπήρξε πια εκτός από λίγη που παρατηρήθηκε στο μάρτυρα.

Στις διάφορες τομές κυρίως δεν υπήρχε χρώση ενώ η χωροταξική κατανομή της χρώσης του ιστού, στις λίγες φορές που καταγράφηκε, χαρακτηρίστηκε ως «Τοπικά» (Πίνακας 3.2-7).

Πίνακας 3.2-7: Ιστοχημική ανίχνευση για ChEs που υδρολύουν την PrSCh σε εγκέφαλο πέστροφας (*Oncorhynchus mykiss*) μετά από χρώση κατά Baker et al. (1986), όπως τροποποιήθηκε από τους Karnovsky and Roots (1964). Έγινε ιστολογική αξιολόγηση με κριτήρια έντασης χρώσης, σχετικού πληθυσμού χρωσμένων κυττάρων και επιφανειακής κατανομής της χρώσης καθώς και χωροταξικής κατανομής μετά από έκθεση σε διάφορες συγκεντρώσεις methamidophos (mg/l). Η κάθε τιμή είναι ο MO μετρήσεων από 3-7 ψάρια (MO \pm SD). Η οξεία τοξικότητα ελέγχθηκε σε εργαστηριακές συνθήκες (n=7 άτομα/ομάδα επέμβασης, ομάδα μάρτυρα, 60,8 mg/l=8 άτομα)

Methamidophos (mg/l)	Ποσοτική έκφραση ChE που υδρολύουν την PrSCh (Τιμές χρώσης) ¹			Γινόμενο (=ένταση X πληθυσμού κυττ. X επιφ. κατανομή) της ποσοτικής έκφρασης ChE που υδρολύουν την PrSCh (Τιμές χρώσης) ²	Χωροταξική κατανομή		
	Ένταση χρώσης (1-5)	Σχετικός πληθυσμός χρωσμένων κυττάρων (1-5)	Επιφαν. κατανομή χρώσης (1-3)		Ημέρες δειγματοληψίας		
					1	3	4
0	2,25	2,95	1,13	7,6 \pm 6,5	Τοπ	Τοπ	Τοπ
18	1,58	2,05	1,47	7,6 \pm 11,1 ()	Τοπ	Τοπ	Τοπ
27	2,33	2,67	0,48	5,4 \pm 7,2 ()	Τοπ	Τοπ	Τοπ
40,5	1,90	2,33	1,50	7,8 \pm 6,9 ()	Τοπ	Τοπ	Τοπ
60,8	0,58	0,92	0,75	0,9 \pm 0,9 ()	Τοπ	Τοπ	Τοπ
91,1	1,53	3,00	0,75	2,3 \pm 0,1 ()	Τοπ	Τοπ	Τοπ

¹ Τα δεδομένα εκφράζονται ως MO των τομών κάθε ιστού

² Τα δεδομένα εκφράζονται ως MO των τομών κάθε ιστού \pm SD. Η % διαφοροποίηση της ποσοτικής έκφρασης της χρώσης σε σύγκριση με τον μάρτυρα καταγράφεται μέσα στην παρένθεση ()

3.2.1.3.2 Ήπαρ

3.2.1.3.2.1 Χρώση Ηωσίνης – Αιματοζυλίνης

Η επίδραση του methamidophos στο ήπαρ της πέστροφας διέφερε μεταξύ του μάρτυρα και των επεμβάσεων για την περίοδο των 4 d, υποδεικνύοντας διαταραχή της κυτταρικής αρχιτεκτονικής αναλόγως της συγκέντρωσης και του χρόνου έκθεσης.

Στις χαμηλότερες συγκεντρώσεις εφαρμογής των 18 και 27 mg/lit, παρατηρήθηκαν αλλοιώσεις της μορφολογίας στο ηπατικό παρέγχυμα αφού παρατηρήθηκαν κύτταρα με υπερμεγέθεις ή πυκνωτικούς πυρήνες, αλλά και πυρήνες σε διαδικασία κυτταρικής διαίρεσης ενώ τα αποπτωτικά κύτταρα (συχνά διακριτά και από το συρρικνωμένο κυτταρόπλασμα) βρίσκονταν είτε σε ομάδες, σε πολύ μικρές εστιακές περιοχές είτε σε εκτεταμένες ζώνες.

Στη μεσαία συγκέντρωση των 40,5 mg/lit, παρατηρήθηκαν εντονότερες αλλοιώσεις στα ηπατικά λόβια, σε σχέση με τις χαμηλότερες, όπως εκτεταμένη σπογγιομορφία που δεν αποδίδεται στο αγγειακό σύστημα και εντονότερη καρνομεγαλία, συχνά κοντά σε αγγεία, σε σχέση με τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις καθώς και πυκνωτικοί (αποπτωτικοί) πυρήνες και συρρικνωμένο κυτταρόπλασμα.

Στις υψηλότερες συγκεντρώσεις των 60,8 και 91,1 mg/lit, οι αλλοιώσεις που παρατηρήθηκαν ήταν ακόμη εντονότερες σε σχέση με τις χαμηλότερες αφού η συρρίκνωση του κυτταροπλάσματος των ηπατικών κυττάρων ήταν πολύ έντονη και συνδυάζονταν με εστιακές νεκρωτικές εστίες στο ηπατικό παρέγχυμα (Εικ 3.2-2).

3.2.1.3.2.2 Ιστοχημική ανίχνευση για την AChE

Η χρώση για την AChE ήταν περιορισμένη σε όλες τις μεταχειρίσεις, σε κοκκώδη μορφή, συσχετιζόμενη με τις κυτταρικές μεμβράνες και τους πυρήνες των ηπατικών κυττάρων. Δεν πραγματοποιήθηκε περαιτέρω ανάλυση λόγω των πολύ χαμηλών τιμών έκφρασης της χρώσης και τις σχετικά, για αυτές τις τιμές, μεγάλες τιμές τυπικής απόκλισης (\pm SD) (Πίνακας 3.2-8) (Εικ. 3.2-4).

Για όλες τις συγκεντρώσεις, εκτός της 60,8 mg/l, η χρώση για την AChE δεν είχε διακριτή διαφορά σε σχέση με τον μάρτυρα, ανεξαρτήτως και ημέρας δειγματοληψίας.

Η χωροταξική κατανομή της χρώσης του ιστού, χαρακτηρίστηκε ως «Περιφερειακή/Κεντρική» ανεξαρτήτως συγκέντρωσης και ημέρας δειγματοληψίας (Πίνακας 3.2-8).

Πίνακας 3.2-8: Ιστοχημική ανίχνευση για την AChE σε ήπαρ πέστροφας (*Oncorhynchus mykiss*) μετά από χρώση κατά Baker et al. (1986), όπως τροποποιήθηκε από τους Karnovsky and Roots (1964). Έγινε ιστολογική αξιολόγηση με κριτήρια έντασης χρώσης, σχετικού πληθυσμού χρωσμένων κυττάρων και επιφανειακής κατανομής της χρώσης καθώς και χωροταξικής κατανομής μετά από έκθεση σε διάφορες συγκεντρώσεις methamidophos (mg/l). Η κάθε τιμή είναι ο MO μετρήσεων από 4-7 ψάρια (MO \pm SD). Η οξεία τοξικότητα ελέγχθηκε σε εργαστηριακές συνθήκες (n=7 άτομα/ομάδα επέμβασης, ομάδα μάρτυρα, 60,8 mg/l=8 άτομα)

Methamidophos (mg/l)	Ποσοτική έκφραση της AChE (Τιμές χρώσης) ¹			Γινόμενο (=ένταση X πληθυσμού κυττ. X επιφ. κατανομή) της ποσοτικής έκφρασης της AChE (Τιμές χρώσης) ²	Χωροταξική κατανομή				
	Ένταση χρώσης (1-5)	Σχετικός πληθυσμός χρωσμένων κυττάρων (1-5)	Επιφαν. κατανομή χρώσης (1-3)		Ημέρες δειγματοληψίας				
					1	3	4		
0	1,55	3,46	2,30	12,4	\pm	6,2	●	●	●
18	1,34	3,17	2,08	8,6	\pm	4,2	()	
27	1,31	2,94	2,60	11,3	\pm	9,4	()	
40,5	1,07	3,34	2,66	9,7	\pm	4,7	()	
60,8	0,94	2,63	1,87	4,5	\pm	1,0	()	
91,1	1,21	3,13	2,25	9,0	\pm	6,4	()	

¹ Τα δεδομένα εκφράζονται ως MO των τομών κάθε ιστού

² Τα δεδομένα εκφράζονται ως MO των τομών κάθε ιστού \pm SD. Η % διαφοροποίηση της ποσοτικής έκφρασης της χρώσης σε σύγκριση με τον μάρτυρα καταγράφεται μέσα στην παρένθεση ()

Εικ. 3.2-4: Τομές κρουτοτόμου, από ήπαρ πέστροφας από το πείραμα οξείας τοξικότητας με methamidophos. Ιστοχημικές χρώσεις εστερασών.

a. Ιστοχημική χρώση για την AChE, μάρτυρας: Παρατηρούνται θετικά ως προς την AChE κύτταρα σε στην επιφάνεια της τομής.

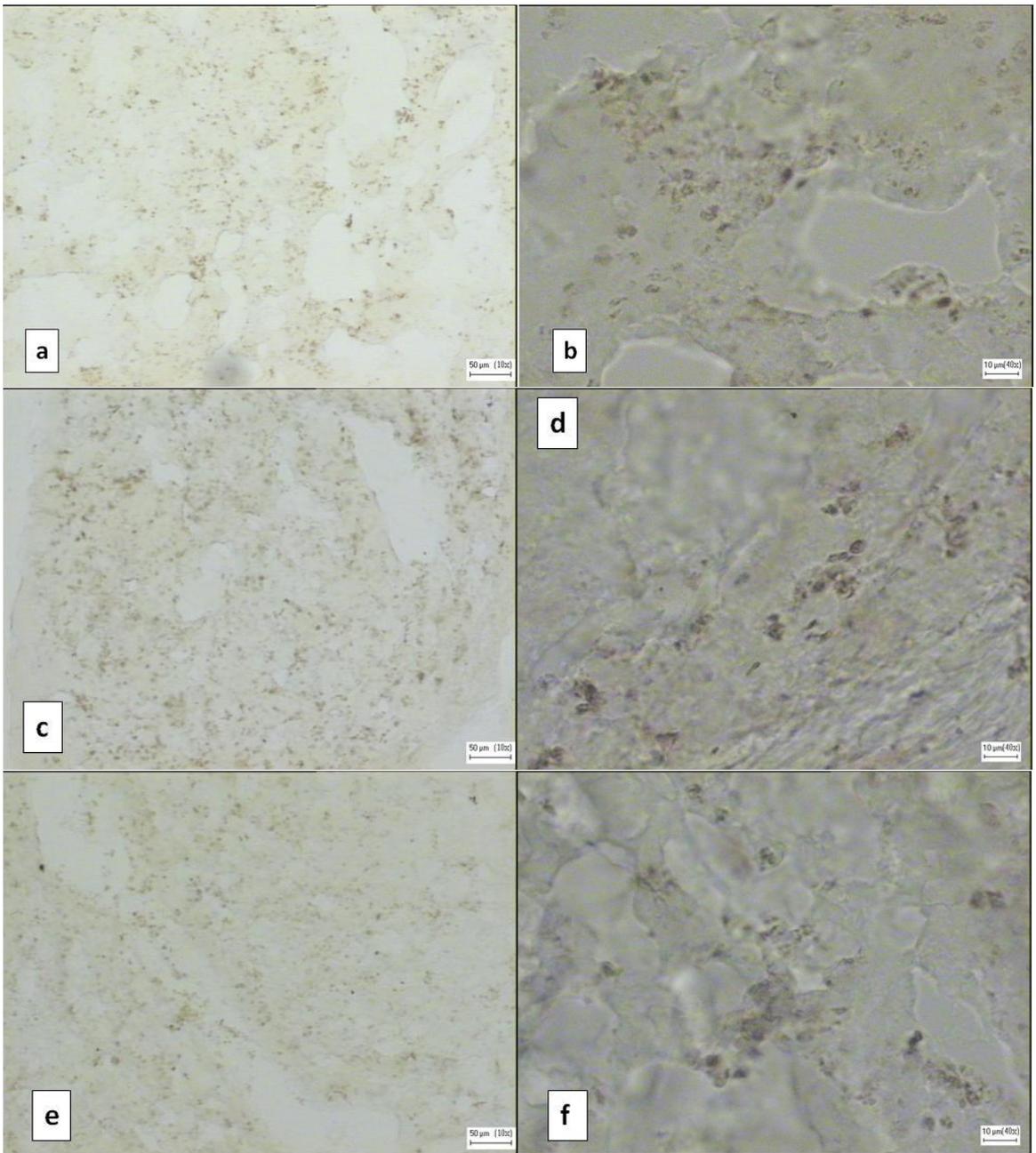
b. Ιστοχημική χρώση για την AChE, μεγέθυνση x 40. Παρατηρείται χρώση σε κοκκώδη μορφή συσχετιζόμενη με τις κυτταρικές μεμβράνες και τους πυρήνες των ηπατικών κυττάρων.

c. Ιστοχημική χρώση για την BuChE, 40,5 mg/lit, ημέρα 4: Παρατηρείται περιορισμένη χρώση στην επιφάνεια της τομής.

d. Ιστοχημική χρώση για την BuChE, μεγέθυνση x 40. Η χρώση στο κύτταρο είναι σε κοκκώδη μορφή, συσχετιζόμενη με τις κυτταρικές μεμβράνες και τους πυρήνες των ηπατικών κυττάρων.

e. Ιστοχημική χρώση για ChEs που υδρολύουν την PrSCh, μάρτυρας: Παρατηρείται περιορισμένη χρώση στην επιφάνεια της τομής ανάλογη της BuChE (**c.**).

f. Ιστοχημική χρώση για ChEs που υδρολύουν την PrSCh, μεγέθυνση x 40. Δεν παρατηρείται διαφοροποίηση από την BuChE (**d.**).



3.2.1.3.2.3 Χρώση για την BuChE

Η χρώση για την BuChE ήταν περιορισμένη σε όλες τις μεταχειρίσεις, σε κοκκώδη μορφή, συσχετιζόμενη με τις κυτταρικές μεμβράνες και τους πυρήνες των ηπατικών κυττάρων. Δεν πραγματοποιήθηκε περαιτέρω ανάλυση λόγω των πολύ χαμηλών τιμών έκφρασης της χρώσης και τις σχετικά, για αυτές τις τιμές, μεγάλες τιμές τυπικής απόκλισης (\pm SD) (Πίνακας 3.2-9) (Εικ. 3.2-4).

Για όλες τις συγκεντρώσεις, η χρώση για την BuChE δεν είχε διακριτή διαφορά σε σχέση με τον μάρτυρα, ανεξαρτήτως και ημέρας δειγματοληψίας .

Στις διάφορες τομές κυρίως δεν υπήρχε χρώση ενώ η χωροταξική κατανομή της χρώσης του ιστού, στις λίγες φορές που καταγράφηκε, χαρακτηρίστηκε ως «Τοπικά» (Πίνακας 3.2-9).

Πίνακας 3.2-9: Ιστοχημική ανίχνευση για την BuChE σε ήπαρ πέστροφας (*Oncorhynchus mykiss*) μετά από χρώση κατά Baker et al. (1986), όπως τροποποιήθηκε από τους Karnovsky and Roots (1964). Έγινε ιστολογική αξιολόγηση με κριτήρια έντασης χρώσης, σχετικού πληθυσμού χρωσμένων κυττάρων και επιφανειακής κατανομής της χρώσης καθώς και χωροταξικής κατανομής μετά από έκθεση σε διάφορες συγκεντρώσεις methamidophos (mg/l). Η κάθε τιμή είναι ο MO μετρήσεων από 4-7 ψάρια (MO \pm SD). Η οξεία τοξικότητα ελέγχθηκε σε εργαστηριακές συνθήκες (n=7 άτομα/ομάδα επέμβασης, ομάδα μάρτυρα, 60,8 mg/l=8 άτομα)

Methamidophos (mg/l)	Ποσοτική έκφραση της BuChE (Τιμές χρώσης) ¹			Γινόμενο (=ένταση X πληθυσμού κυττ. X επιφ. κατανομή) της ποσοτικής έκφρασης της BuChE (Τιμές χρώσης) ²	Χωροταξική κατανομή				
	Ένταση χρώσης (1-5)	Σχετικός πληθυσμός χρωσμένων κυττάρων (1-5)	Επιφαν. κατανομή χρώσης (1-3)		Ημέρες δειγματοληψίας				
					1	3	4		
0	0,57	0,91	0,79	4,63	\pm	9,9			
18	0,10	0,40	0,10	0,08	\pm	0,2	()	
27	0,75	0,25	0,63	0,02	\pm	0,1	()	
40,5	0,79	1,50	0,75	0,94	\pm	0,9	()	
60,8	1,63	0,75	0,25	0,15	\pm	0,2	()	
91,1	1,19	2,00	1,63	3,06	\pm	5,9	()	

¹ Τα δεδομένα εκφράζονται ως MO των τομών κάθε ιστού

² Τα δεδομένα εκφράζονται ως MO των τομών κάθε ιστού \pm SD. Η % διαφοροποίηση της ποσοτικής έκφρασης της χρώσης σε σύγκριση με τον μάρτυρα καταγράφεται μέσα στην παρένθεση ()

3.2.1.3.2.4 Χρώση ChEs που υδρολύουν την PrSCh

Η χρώση για ChEs που υδρολύουν την PrSCh ήταν περιορισμένη σε όλες τις μεταχειρίσεις, ανάλογη της BuSCh. Δεν πραγματοποιήθηκε περαιτέρω ανάλυση λόγω των πολύ χαμηλών τιμών ποσοτικής έκφρασης της χρώσης και τις σχετικά, για αυτές τις τιμές, μεγάλες τιμές τυπικής απόκλισης (\pm SD) (Πίνακας 3.2-10).

Για όλες τις συγκεντρώσεις, εκτός της υψηλότερης, η χρώση για των ChEs που υδρολύουν την PrSCh δεν είχε διακριτή διαφορά σε σχέση με τον μάρτυρα, ανεξαρτήτως συγκέντρωσης και ημέρας δειγματοληψίας (Εικ. 3.2-4).

Για τις τομές στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν επιπροσθέτως και οι δύο παρεμποδιστές των AChE και BuChE (BW284C51 και iso-OMPA), τα αποτελέσματα παρέμειναν τα ίδια, αλλά με λιγότερη, μη ειδική, χρώση του υποστρώματος.

Στις διάφορες τομές κυρίως δεν υπήρχε χρώση ενώ η χωροταξική κατανομή της χρώσης του ιστού, στις λίγες φορές που καταγράφηκε, χαρακτηρίστηκε ως «Περιφερειακή/Κεντρική» (Πίνακας 3.2-10).

Πίνακας 3.2-10: Ιστοχημική ανίχνευση για ChEs που υδρολύουν την PrSCh σε ήπαρ πέστροφας (*Oncorhynchus mykiss*) μετά από χρώση κατά Baker et al. (1986), όπως τροποποιήθηκε από τους Karnovsky and Roots (1964). Έγινε ιστολογική αξιολόγηση με κριτήρια έντασης χρώσης, σχετικού πληθυσμού χρωσμένων κυττάρων και επιφανειακής κατανομής της χρώσης καθώς και χωροταξικής κατανομής μετά από έκθεση σε διάφορες συγκεντρώσεις methamidophos (mg/l). Η κάθε τιμή είναι ο MO μετρήσεων από 4-7 ψάρια/ (MO \pm SD). Η οξεία τοξικότητα ελέγχθηκε σε εργαστηριακές συνθήκες (n=7 άτομα/ομάδα επέμβασης, ομάδα μάρτυρα, 60,8 mg/l=8 άτομα)

Methamidophos (mg/l)	Ποσοτική έκφραση ChE που υδρολύουν την PrSCh (Τιμές χρώσης) ¹			Γινόμενο (=ένταση X πληθυσμού κυττ. X επιφ. κατανομή) της ποσοτικής έκφρασης ChE που υδρολύουν την PrSCh (Τιμές χρώσης) ²	Χωροταξική κατανομή				
	Ένταση χρώσης (1-5)	Σχετικός πληθυσμός χρωσμένων κυττάρων (1-5)	Επιφαν. κατανομή χρώσης (1-3)		Ημέρες δειγματοληψίας				
					1	3	4		
0	0,33	0,83	0,58	1,6	\pm	3,4			
18	0,13	0,42	0,42	0,8	\pm	2,0	()	
27	0,00	0,00	0,00	0,0			()	
40,5	0,17	0,71	0,47	0,9	\pm	2,4	()	
60,8	0,00	0,00	0,00	0,0			()	
91,1	0,00	0,00	0,00	0,0			()	

¹ Τα δεδομένα εκφράζονται ως MO των τομών κάθε ιστού

² Τα δεδομένα εκφράζονται ως MO των τομών κάθε ιστού \pm SD. Η % διαφοροποίηση της ποσοτικής έκφρασης της χρώσης σε σύγκριση με τον μάρτυρα καταγράφεται μέσα στην παρένθεση ()

3.2.2 Δοκιμές παρατεταμένης (prolonged) τοξικότητας σε πέστροφες

3.2.2.1 Μακροσκοπικές παρατηρήσεις

Τα ψάρια ελέγχονταν καθημερινά μετά την έναρξη του πειραματισμού τόσο για τον προσδιορισμό της θνησιμότητας, και των κλινικών συμπτωμάτων.

3.2.2.1.1 Θνησιμότητα

Στον μάρτυρα και στις 2 χαμηλότερες συγκεντρώσεις (1,5 και 2,9 mg/l) δεν υπήρχαν νεκρά ψάρια αλλά στις συγκεντρώσεις των 5,6, 10,8 20,7 και 40 mg/l, πέθαναν 2 (11,7%), 2 (16,6%), 8 (66,6%) και 10 (76,9%) ψάρια, αντίστοιχα. Η θνησιμότητα που παρατηρήθηκε ήταν ανάλογη της αύξησης της συγκέντρωσης όσο και της διάρκειας έκθεσης ενώ στην υψηλότερη συγκέντρωση, θνησιμότητα παρατηρήθηκε από την ημέρα 1 της έναρξης του πειραματισμού.

Στο δεύτερο τμήμα του πειραματισμού, όπου για τις 3 μεγαλύτερες συγκεντρώσεις των 10,8, 20,7 και 40 mg/l, 5-6 ψάρια μεταφέρθηκαν σε καθαρό νερό από την ημέρα 4 μέχρι το τέλος του πειραματισμού την ημέρα 18, η αθροιστική θνησιμότητα ήταν 0 (0%), 4 (66,6%) και 3 (60%), αντίστοιχα.

Όσον αφορά την θνησιμότητα το $EC_{50}=16,8$ mg/l (12,4-24,6, $R^2=0.908$), $LOEC=5,6$ mg/l και το $NOEC=2,9$ mg/l μετά από 18 d πειραματισμού.

Στον Πίνακα 3.2-11 παρατίθεται η αθροιστική θνησιμότητα στα ψάρια.

Πίνακας 3.2-11: Αθροιστική θνησιμότητα σε πέστροφα (*Oncorhynchus mykiss*) μετά από έκθεση σε διάφορες συγκεντρώσεις methamidophos (mg/l). Η παρατεταμένη τοξικότητα ελέγχθηκε σε εργαστηριακές συνθήκες (n=17 άτομα/ομάδα επέμβασης, ομάδα 20,7 και 40,0 mg/l=18 άτομα)

Methami- dophos (mg/l)	Αριθμός νεκρών ατόμων											
	Ημέρες μετά τη χορήγηση											
	0-	0+	1	2	3	4	7	9	14	16	17	18
0	17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1,5	17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2,9	17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5,6	17	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	2
10,8	12	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	2
20,7	12	0	0	1	4	5	6	6	6	6	6	8
40	13	0	2	5	7	8	8	9	10	10	10	10
Πειραματισμός ανάκαμψης	0-	0+										
10,8	5					0	0	0	0	0	0	0
20,7	6					0	1	1	1	1	2	4
40	5					0	0	0	0	0	0	3

0- Συνολικός αριθμός ψαριών πριν την έναρξη του πειραματισμού. (Από τα 17 άτομα/ομάδα επέμβασης την 4^η ημέρα 5-6 άτομα τοποθετήθηκαν σε διαφορετικά ενυδρεία με καθαρό νερό μέχρι το πέρας του πειραματισμού για τον έλεγχο της πιθανότητας ανάκαμψης)

0+ Συνολικός αριθμός ψαριών αμέσως μετά την έναρξη του πειραματισμού

3.2.2.1.2 Κλινικά συμπτώματα

Σε όλες τις συγκεντρώσεις τα ορατά κλινικά συμπτώματα που καταγράφηκαν ήταν «σπασμοδική ή αργή κίνηση», «έλλειψη ισορροπίας» και «έλλειψη διάθεσης για να τραφούν» ενώ η ένταση τους ήταν ανάλογη των συγκεντρώσεων και του χρονικού διαστήματος της έκθεσης, μέχρι το πέρας του πειραματισμού, την ημέρα 18.

Στον μάρτυρα και στη χαμηλότερη συγκέντρωση των 1,5 mg/l, τα ψάρια έδειχναν υγιή ενώ δεν υπήρχαν εμφανής κλινικά συμπτώματα. Στη συγκέντρωση των 2,9 mg/l παρατηρήθηκε μικρή έλλειψη διάθεσης για να τραφούν, τις τελευταίες ημέρες του πειραματισμού ενώ στη συγκέντρωση των 5,6 mg/l όλα τα κλινικά συμπτώματα, εκτός της αργής κίνησης που παρατηρήθηκαν τις τελευταίες ημέρες, παρατηρήθηκαν από την ημέρα 2 και έκτοτε ήταν αυξανόμενης έντασης. Στο τέλος του πειραματισμού τα συμπτώματα της έλλειψης ισορροπίας (τα ψάρια καθόντουσαν πλάγια) και της διακοπής της τροφής ήταν πολύ σοβαρά. Στις συγκεντρώσεις των 10,8, 20,7 και 40 mg/l τα κλινικά συμπτώματα παρατηρήθηκαν από την ημέρα 1 (μικρής ή μέτριας έντασης για την συγκέντρωση των 40mg/l), αλλά από την ημέρα 2 ο βαθμός έντασης

ήταν, στις περισσότερες των περιπτώσεων, μεγάλος μέχρι το τέλος του πειραματισμού. Τα ψάρια ήταν σε πολύ βαριά κλινική κατάσταση (Εικ. 3.2-6).

Στο δεύτερο τμήμα του πειραματισμού, όπου για τις 3 μεγαλύτερες συγκεντρώσεις των 10,8, 20,7 και 40 mg/lit 5-6 ψάρια μεταφέρθηκαν σε καθαρό νερό την ημέρα 4, τα κλινικά συμπτώματα ήταν χαμηλότερη έντασης αφού η αποκατάσταση της ισορροπίας ήταν άμεση ενώ η κίνηση των ψαριών βελτιώθηκε σε μεγάλο βαθμό από την ημέρα 9 και η έλλειψη διάθεσής τους να διατραφούν παρέμεινε σε μεγάλη ένταση μέχρι το πέρας του πειραματισμού.

Όσον αφορά τα κλινικά συμπτώματα λοιπόν το LOEC=2,9 mg/lit και το NOEC=1,5 mg/lit, μετά από 18 d πειραματισμού.

Τα κλινικά συμπτώματα, για τον πειραματισμό της παρατεταμένης τοξικότητας σε πέστροφα, παρατίθενται στον Πίνακα 3.2-12.



Εικ. 3.2-6: Οξεία τοξικότητα – 40,5 mg/lit, ημέρα 4: Περιορισμένη κινητικότητα, παραμονή στον πυθμένα της δεξαμενής (Φουντουλάκης Μ.).

Πίνακας 3.2-12: Κλινικά συμπτώματα σε πέστροφα (*Oncorhynchus mykiss*) μετά από έκθεση σε διάφορες συγκεντρώσεις methamidophos (mg/l). Η παρατεταμένη τοξικότητα ελέγχθηκε σε εργαστηριακές συνθήκες (n=17 άτομα/ομάδα επέμβασης, ομάδα 20,7 και 40,0 mg/l=18 άτομα)

Methamidophos (mg/l)	Κλινικά συμπτώματα	Ένταση κλινικών συμπτωμάτων							
		Ημέρες μετά τη χορήγηση							
		1	2-3	4-6	7-8	9-10	11-12	14-15	16-18
0	Σπασμωδική ή αργή κίνηση, Έλλειψη ισορροπίας Έλλειψη διάθεσης για να τραφούν	-	-	-	-	-	-	-	-
1,5	Σπασμωδική ή αργή κίνηση, Έλλειψη ισορροπίας Έλλειψη διάθεσης για να τραφούν	-	-	-	-	-	-	-	-
2,9	Σπασμωδική ή αργή κίνηση, Έλλειψη ισορροπίας Έλλειψη διάθεσης για να τραφούν	-	-	-	-	-	-	-	-
5,6	Σπασμωδική ή αργή κίνηση, Έλλειψη ισορροπίας Έλλειψη διάθεσης για να τραφούν	-	-	-	-	-	-	-	+
10,8	Σπασμωδική ή αργή κίνηση, Έλλειψη ισορροπίας Έλλειψη διάθεσης για να τραφούν	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
20,7	Σπασμωδική ή αργή κίνηση, Έλλειψη ισορροπίας Έλλειψη διάθεσης για να τραφούν	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
40	Σπασμωδική ή αργή κίνηση, Έλλειψη ισορροπίας Έλλειψη διάθεσης για να τραφούν	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++
Πειραματισμός ανάκαμψης (την ημέρα 4 μερικές πέστροφες μεταφέρθηκαν σε καθαρό νερό)									
10,8	Σπασμωδική ή αργή κίνηση, Έλλειψη ισορροπίας Έλλειψη διάθεσης για να τραφούν	+	+++	+++	+++	-	+	+	+
20,7	Σπασμωδική ή αργή κίνηση, Έλλειψη ισορροπίας Έλλειψη διάθεσης για να τραφούν	+	+++	+++	+++	-	+	+	+
40	Σπασμωδική ή αργή κίνηση, Έλλειψη ισορροπίας Έλλειψη διάθεσης για να τραφούν	++	++	+++	+++	+++	+	+	+

-/+/++/+++ = ύπαρξη και βαθμός έντασης κλινικών συμπτωμάτων

3.2.2.1.3 Μακροσκοπική παρατήρηση των ιστών

Όλα τα ψάρια που ελήφθησαν ως δείγματα, εξετάστηκαν μακροσκοπικά για πιθανές βλάβες στο εσωτερικό τους, κατά τη διάρκεια της αφαίρεσης ιστών, για τους ιστούς αυτούς αλλά και ως γενική εικόνα της πέστροφας.

Στα ζώντα άτομα δεν υπήρχαν εμφανή τοξικά συμπτώματα.

3.2.2.2 Βιοχημικά αποτελέσματα

3.2.2.2.1 Εγκέφαλος

Η δραστικότητα των εστερασών στον εγκέφαλο όταν χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα το ASCh ήταν σχετική υψηλή. Όταν χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα το BuSCh ή το PrSCh αντιθέτως, η δραστικότητα των εστερασών ήταν πολύ χαμηλή.

Στον μάρτυρα, οι υψηλότερες τιμές δραστικότητας των εστερασών για το υπόστρωμα ASCh (μετά την αφαίρεση του BuChE), την ημέρα 1, ήταν $37,5 \pm 17,3$ SD, $\mu\text{mol}/\text{min mg}$ πρωτεΐνης (Πίνακας 3.2-13). Πολύ χαμηλή δραστικότητα, στα όρια ανίχνευσης της μεθόδου, καταγράφηκε όταν το υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το BuSCh και PrSCh, $-0,5 \pm 3,2$ SD και $2,9 \pm 1,2$ SD $\mu\text{mol}/\text{min mg}$ πρωτεΐνης, αντίστοιχα. Η χαμηλή τιμή δραστικότητας με τη χρήση του PrSCh, υποδεικνύει ότι στα ψάρια βασικά το ένζυμο AChE δεν υδρολύει το PrSCh στον εγκέφαλο.

Μέχρι την ημέρα 1 για όλες τις συγκεντρώσεις, εκτός της 2^{ης} χαμηλότερης συγκέντρωσης των 2,9 mg/l, το methamidophos παρεμπόδισε 14-90% την δραστικότητα της AChE στον εγκέφαλο, αυξημένη κυρίως για τις δύο υψηλότερες συγκεντρώσεις μετά την εφαρμογή της συγκέντρωσης. Την ημέρα 2 καθώς η έκθεση συνεχιζόταν, η παρεμπόδιση όχι μόνο αποκαταστάθηκε για τις 3 χαμηλότερες συγκεντρώσεις, η δραστικότητα της AChE αντιθέτως αυξήθηκε κατά 19-207% ενώ για τις 3 υψηλότερες συγκεντρώσεις, η δραστικότητα της AChE παρέμεινε παρεμποδισμένη 37-92%. Την ημέρα 3 συνεχίστηκε η αποκατάσταση της παρεμπόδισης, για τις 2 χαμηλότερες συγκεντρώσεις η δραστικότητα της AChE αυξήθηκε περαιτέρω 138-183%, ενώ για τις υπόλοιπες συγκεντρώσεις δεν παρατηρήθηκε διαφοροποίηση ενώ από το μάρτυρα, εκτός της 20,7 mg/l με παρεμπόδιση 42%. Την ημέρα 18, για τη χαμηλότερη συγκέντρωση η δραστικότητα της AChE παρέμεινε αυξημένη 75%, για τις 3 μεσαίες συγκεντρώσεις δεν παρατηρήθηκε διαφοροποίηση από τον μάρτυρα, ενώ για τις 2 υψηλότερες συγκεντρώσεις η δραστικότητα της AChE η παρεμπόδιση ήταν, 74-115% (Πίνακας 3.2-13).

Για τον πειραματισμό που για τις 3 μεγαλύτερες συγκεντρώσεις των 10,8, 20,7 και 40,0 mg a.s./l μερικά ψάρια, αφού εκτέθηκαν στο methamidophos για 4 d παρέμειναν σε καθαρό από τη δραστική νερό για τις υπόλοιπες 14 d, η δραστικότητα της AChE αυξήθηκε 70-203% (Πίνακας 3.2-14).

Πίνακας 3.2-13: Βιοχημική *in vitro* δραστηριότητα της AChE, σε εγκέφαλο πέστροφας (*Oncorhynchus mykiss*) μετά από έκθεση σε διάφορες συγκεντρώσεις methamidophos (mg/l). Η κάθε τιμή είναι ο MO μετρήσεων από 1-3 ψάρια (4 για τον μάρτυρα) (MO ± SD). Η παρατεταμένη τοξικότητα ελέγχθηκε σε εργαστηριακές συνθήκες (n=17 άτομα/ομάδα επέμβασης, ομάδα 20,7 και 40,0 mg/l=18 άτομα)

Methamidophos (mg/l)	Δραστηριότητα της AChE ¹			
	Ημέρες μετά τη χορήγηση			
	1	2	3	18
0	37,5 ± 37,4 ²	50,7 ± 17,3 ()	25,4 ± 16,6	31,4 ± 29,0
1,5	(37)	60,3 ± 83,0 (-19)	60,6 ± 40,8 (-138)	55,0 ± 63,1 (-75)
2,9	38,4 ± 22,0 (-3)	155,8 (-207)	71,9 ± 64,4 (-183)	32,6 ± 48,5 (-4)
5,6	22,2 ± 34,4 (41)	112,3 (-121)	26,7 ± 24,3 (-5)	34,0 ± 33,3 (-8)
10,8	32,4 ± 24,0 (14)	32,0 (37)	26,2 ± 24,9 (-3)	30,1 (4)
20,7	18,0 ± 12,5 (52)	4,1 [92]	14,7 (42)	8,1 (74 [95])
40	3,7 (90 [55])	11,7 ± 2,4 [77]	25,2 (1)	-4,7 (115)

¹ μmol/min.mg πρωτεΐνης.

² Τα δεδομένα εκφράζονται ως MO ± SD. Η % παρεμπόδιση σε σύγκριση με τον μάρτυρα για τα ζώντα άτομα καταγράφεται μέσα στην παρένθεση () ενώ για τα νεκρά μέσα σε αγκύλες [].

Πίνακας 3.2-14: Βιοχημική *in vitro* δραστηριότητα της AChE, σε εγκέφαλο πέστροφας (*Oncorhynchus mykiss*) μετά από έκθεση σε διάφορες συγκεντρώσεις methamidophos για 4 d και σε καθαρό νερό για 14 d. Η κάθε τιμή είναι ο MO μετρήσεων από 1-2 ψάρια (4 για τον μάρτυρα) (MO ± SD). Παρατεταμένη τοξικότητα ελέγχθηκε σε εργαστηριακές συνθήκες (n=17 άτομα/ομάδα επέμβασης, ομάδα 20,7 και 40,0 mg/l=18 άτομα)

Methamidophos (mg/l)	Δραστηριότητα της AChE ¹			
	Ημέρες μετά τη χορήγηση			
				18
10,8				48,4 ± 21,2 ² (-70)
20,7				86,0 (-203 [-410])
40				77,1 (-171)

¹ μmol/min.mg πρωτεΐνης.

² Τα δεδομένα εκφράζονται ως MO ± SD. Η % παρεμπόδιση σε σύγκριση με τον μάρτυρα για τα ζώντα άτομα καταγράφεται μέσα στην παρένθεση () ενώ για τα νεκρά μέσα σε αγκύλες [].

3.2.2.2.2 Ήπαρ

Η δραστηκότητα των εστερασών στο ήπαρ ήταν χαμηλή όταν χρησιμοποιήθηκαν τα ASCh ή BuSCh ή PrSCh. Όλες οι τιμές δραστηκότητας των εστερασών ήταν σε ανάλογα επίπεδα στα όρια ανίχνευσης της μεθόδου ενώ λόγω των πολύ μικρών δειγμάτων και των βιοχημικών αποτελεσμάτων δεν χρησιμοποιήθηκαν παρεμποδιστές.

Η δραστηκότητα των εστερασών στο ήπαρ, στον μάρτυρα, ήταν χαμηλή όταν κατά την βιοχημική ανάλυση ως υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκαν τα ASCh, BuSCh και PrSCh ενώ την ημέρα 1, ήταν $1,4 \pm 1,0$ SD, $2,1 \pm 0,7$ SD, $0,1 \pm 3,6$ SD $\mu\text{mol}/\text{min mg}$ πρωτεΐνης). Δεν διενεργήθηκε περαιτέρω ανάλυση των αποτελεσμάτων.

3.2.2.3 Ιστοχημικές χρώσεις

3.2.2.3.1 Εγκέφαλος

3.2.2.3.1.1 Χρώση Ηωσίνης – Αιματοξυλίνης

Η επίδραση του methamidophos στον εγκέφαλο της πέστροφας διέφερε μεταξύ του μάρτυρα και των επεμβάσεων για την περίοδο των 18 d, υποδεικνύοντας διαταραχή της κυτταρικής αρχιτεκτονικής αναλόγως της συγκέντρωσης και του χρόνου έκθεσης.

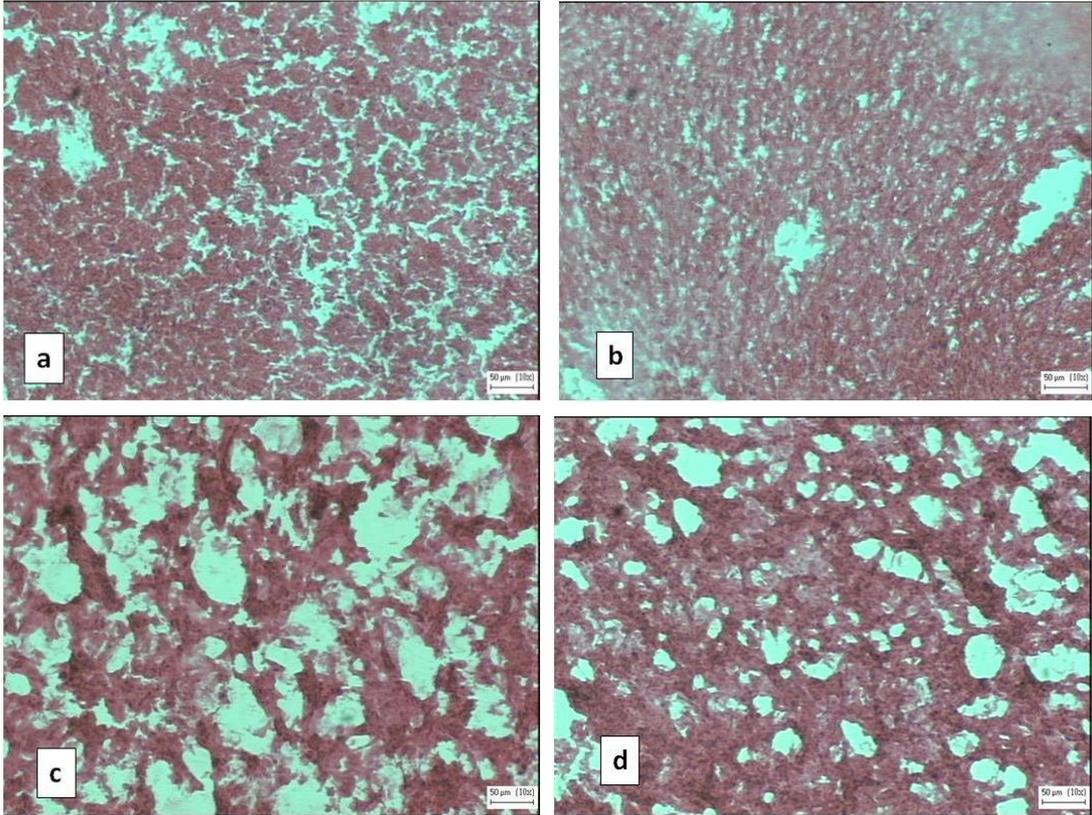
Για τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις των 1,5 και 2,9 mg/l, παρατηρήθηκαν περιορισμένες αλλοιώσεις, κυρίως εμφάνιση μικρών εστιών με αποπτωτικά ή μιτωτικά κύτταρα (Εικ. 3.2-7).

Για τις μεσαίες συγκεντρώσεις των 5,6 και 10,8 mg/l οι ιστολογικές αλλοιώσεις που παρατηρήθηκαν δεν διέφεραν σημαντικά από αυτές των χαμηλότερων συγκεντρώσεων, με εξαίρεση την παρουσία πυκνωτικών πυρήνων στο φλοιό.

Για τις υψηλότερες συγκεντρώσεις των 20,7 και 40 mg/l, οι αλλοιώσεις που παρατηρήθηκαν ήταν έντονες από τις πρώτες ημέρες της έκθεσής τους στο methamidophos αφού παρατηρήθηκαν νεκρωτικές εστίες διάσπαρτες ή εκτεταμένες καθώς και πυκνωτικούς (αποπτωτικοί) πυρήνες σε ομάδες κυττάρων και υπερμεγέθεις πυρήνες (καρυομεγαλία).

Εικ. 3.2-7: Τομές κρυοτόμου, από εγκέφαλο και ήπαρ πέστροφας από το πείραμα παρατεταμένης τοξικότητας με methamidophos. Χρώση ηωσίνης / αιματοξυλίνης.

- a.** Εγκέφαλος, 40 mg/l, ημέρα 2: Παρατηρούνται εστίες νέκρωσης.
- b.** Εγκέφαλος, 10,8 mg/l, ημέρα 1: Παρατηρούνται διάσπαρτες εστιακές αλλοιώσεις.
- c.** Ήπαρ, 40 mg/l, ημέρα 2: Παρατηρείται σημαντική απώλεια της κυτταρικής αρχιτεκτονικής (σπογγειόμορφη).
- d.** Ήπαρ, 1,5 mg/l, ημέρα 2: Παρατηρούνται ελαφρές αλλοιώσεις στο ηπατικό παρέγχυμα.



3.2.2.3.1.2 Ιστοχημική ανίχνευση για την AChE

Η μεταχείριση για ανίχνευση για την AChE, είχε ως αποτέλεσμα τη χρώση των ιστών από ανοικτό έως σκούρο καφέ, στο κυτταρόπλασμα και τις αποφυάδες (δενδρίτες και νευρίτες) των νευρικών κυττάρων αλλά και στους πυρήνες (πυρηνόπλασμα και πυρηνική μεμβράνη), τη χρώση δεσμών νευρικών απολήξεων και μεγαλύτερων νεύρων.

Η συνδυασμένη χρήση της ASCh με τον παρεμποδιστή iso-OMPA έδωσε κύτταρα με έντονη θετική χρώση για την AChE, με τη χρωστική να παρουσιάζει κοκκώδη υφή κυρίως στο κυτταρόπλασμα, συχνά πολύ κοντά αλλά και πάνω στην κυτταροπλασματική μεμβράνη αλλά και στις κυτταρικές και πυρηνικές μεμβράνες αλλά και στο πυρηνόπλασμα, όπως και σε τμήματα των τοιχωμάτων των αιμοφόρων αγγείων όχι όμως και στα ερυθρά αιμοσφαίρια.

Μεταξύ των συγκεντρώσεων παρατηρήθηκε διαφοροποίηση της χρώσης (ένταση - σχετικός πληθυσμός – επιφανειακή κατανομή) στις τομές του εγκεφάλου, ανεξαρτήτως ημέρας δειγματοληψίας. Στις χαμηλότερες συγκεντρώσεις των 1,5 και 2,9 mg/lit, όπως και στο μάρτυρα, δεν παρατηρείται διαφοροποίηση της ποσοτικής αξιολόγησης της χρώσης. Για όλες τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ο ποσοτικός χαρακτηρισμός των χρωσμένων σε AChE νεύρων και νευρικών ινών ήταν αυξημένος από 26,4 έως 98,6% σε σύγκριση με τον μάρτυρα. Σε αντίθεση στο άλλο πείραμα στο οποίο για τις υψηλότερες συγκεντρώσεις των 10,8, 20,7 και 40 mg/lit, στις οποίες η δραστική δεν ανανεώθηκε μετά την 4^η ημέρα, ο ποσοτικός προσδιορισμός μετά από 18 d ήταν 80,5, -13,4 και -47,1%, αντίστοιχα (Πίνακας 3.2-15) (Εικ. 3.2-8).

Η χωροταξική κατανομή της χρώσης του ιστού, για τον μάρτυρα χαρακτηρίστηκε ως «Στενή Περιφερειακή» ενώ για τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις των 1,5 και 2,9 mg/lit χαρακτηρίστηκε κυρίως ως «Περιφερειακή». Για τις υπόλοιπες δόσεις των 5,6, 10,8, 20,7 και 40 mg/lit τις πρώτες ημέρες η χωροταξική κατανομή της χρώσης του ιστού χαρακτηρίστηκε ως «Περιφερειακή» ενώ την 18^η ημέρα όπως και για τις συγκεντρώσεις στις οποίες δεν ανανεώθηκε η δραστική ουσία μετά την 4^η ημέρα η κατανομή της χρώσης χαρακτηρίστηκε ως «Περιφερειακή/Κεντρική» (Πίνακας 3.2-15).

Πίνακας 3.2-15: Ιστοχημική ανίχνευση για την AChE σε εγκέφαλο πέστροφας (*Oncorhynchus mykiss*) μετά από χρώση κατά Baker et al. (1986), όπως τροποποιήθηκε από τους Karnovsky and Roots (1964). Έγινε ιστολογική αξιολόγηση με κριτήρια έντασης χρώσης, σχετικού πληθυσμού χρωσμένων κυττάρων και επιφανειακής κατανομής της χρώσης καθώς και χωροταξικής κατανομής μετά από έκθεση σε διάφορες συγκεντρώσεις methamidophos (mg/l). Η κάθε τιμή είναι ο ΜΟ μετρήσεων από 1-3 (5 για τον μάρτυρα) ψάρια (ΜΟ ± SD). Η παρατεταμένη τοξικότητα ελέγχθηκε σε εργαστηριακές συνθήκες (n=17 άτομα/ομάδα επέμβασης, ομάδα 20,7 και 40,0 mg/l=18 άτομα)

Methamidophos (mg/l)	Ποσοτική έκφραση της AChE (Τιμές χρώσης)			Γινόμενο (=ένταση X πληθυσμού κυττ. X επιφ. κατανομή) της ποσοτικής έκφρασης της AChE (Τιμές χρώσης) ²	Χωροταξική κατανομή		
	Ένταση χρώσης (1-5)	Σχετικός πληθυσμός χρωσμένων κυττάρων (1-5)	Επιφαν. κατανομή χρώσης (1-3)		Ημέρες δειγματοληψίας		
					1	18	4+14
0	2,14	4,00	2,07	16,6 ± 6,5	○	○	∅
1,5	1,83	4,00	2,16	17,1 ± 12,5 (2,9)	●	○	∅
2,9	2,07	4,00	2,23	17,1 ± 6,9 (3,1)	●	●	∅
5,6	2,40	4,17	2,83	30,0 ± 23,9 (80,3)	●	●	∅
10,8	3,00	4,00	2,16	25,9 ± 14,2 (56,1)	●	●	●
	[2,50]	[4,00]	[3,00]	[30,0] ± ([80,5])	●	●	●
20,7	1,75	4,00	3,00	21,0 ± 4,2 (26,4)	●	●	●
	[1,20]	[4,00]	[3,00]	[14,4] ± ([-13,4])	●	●	●
40	2,75	4,00	3,00	33,0 ± 4,2 (98,6)	●	●	●
	[1,00]	[4,00]	[2,20]	[8,8] ± ([-47,1])	●	X	●

¹ Τα δεδομένα εκφράζονται ως ΜΟ των τομών κάθε ιστού

² Τα δεδομένα εκφράζονται ως ΜΟ των τομών κάθε ιστού ± SD. Η % διαφοροποίηση της ποσοτικής έκφρασης της χρώσης σε σύγκριση με τον μάρτυρα καταγράφεται μέσα στην παρένθεση (). Για τις συγκεντρώσεις στις οποίες τα ψάρια τοποθετήθηκαν σε καθαρό νερό, ώστε να διαπιστωθεί αν υπάρχει δυνατότητα ανάκαμψης, τα δεδομένα και η % διαφοροποίηση της ποσοτικής έκφρασης της χρώσης σε σύγκριση με τον μάρτυρα καταγράφεται μέσα σε αγκύλες []

∅ Δεν έγινε πειραματισμός για την επέμβαση.

X Δεν υπάρχουν δεδομένα

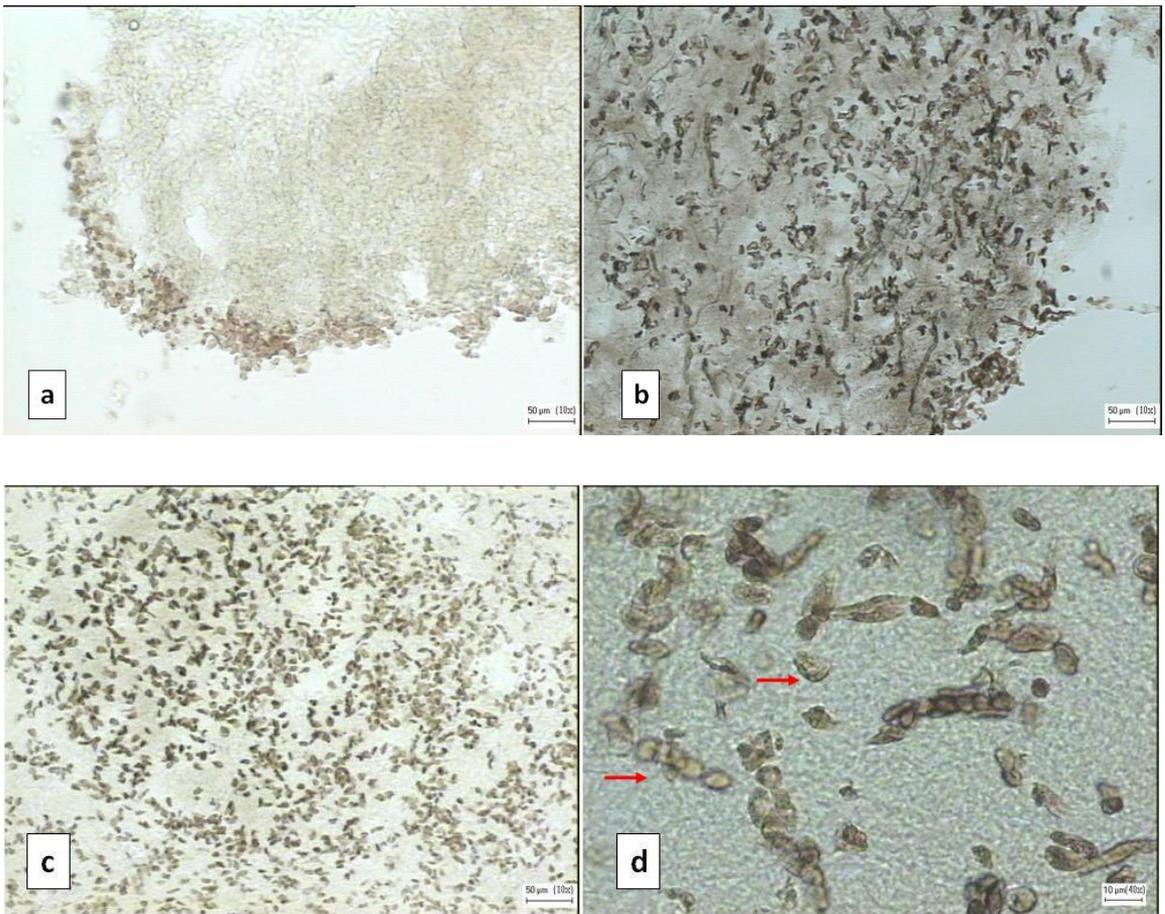
Εικ. 3.2-8: Τομές κρυοτόμου, από εγκέφαλο πέστροφας από το πείραμα παρατεταμένης τοξικότητας με methamidophos. Ιστοχημικές χρώσεις εστερασών.

a. Ιστοχημική χρώση για την AChE, μάρτυρας: Παρατηρείται χρώση στο φλοιό του εγκεφάλου.

b. Ιστοχημική χρώση για την AChE, 5,6 mg/lit, ημέρα 17: Παρατηρείται εκτεταμένη χρώση σε όλη την επιφάνεια της τομής.

d. Ιστοχημική χρώση για ChEs που υδρολύουν την PrSCh, 5,6 mg/lit, ημέρα 3: Παρατηρείται εκτεταμένη χρώση στην επιφάνεια της τομής.

e. Ιστοχημική χρώση για ChEs που υδρολύουν την PrSCh, μεγέθυνση x 40. Παρατηρείται κοκκώδης χρώση στο νευρικό κύτταρο αλλά επιπρόσθετα, και στα ερυθρά αιμοσφαίρια.



3.2.2.3.1.3 Χρώση για την BuChE

Η χρώση για την BuChE στο κύτταρο εμφανίστηκε στον πυρήνα και στο κυτταρόπλασμα σε κοκκώδη υφή, συχνά πιο έντονη από της AChE, συσχετιζόμενη με τις κυτταροπλασματικές μεμβράνες, ενώ παρατηρήθηκε και στις κυτταρικές και πυρηνικές μεμβράνες αλλά και στο πυρηνόπλασμα ενώ δεν χρωματίστηκαν οι αποφυάδες (δενδρίτες και νευρίτες) των νευρικών κυττάρων, αλλά και τα νεύρα.

Η συνολική ποσοτική έκφραση της χρώσης ήταν πάρα πολύ χαμηλή και στις περισσότερες περιπτώσεις μηδενική. Για όλες τις συγκεντρώσεις, η χρώση για την BuChE δεν είχε διακριτή διαφορά σε σχέση με τον μάρτυρα, ανεξαρτήτως συγκέντρωσης και ημέρας δειγματοληψίας (Πίνακας 3.2-16). Δεν πραγματοποιήθηκε περαιτέρω ανάλυση των δεδομένων.

Στις διάφορες τομές κυρίως δεν υπήρχε χρώση ενώ η κατανομή της χρώσης, στις λίγες φορές που καταγράφηκε, δεν έδειξε κάποια συγκεκριμένη τάση (χαρακτηρίστηκε ως «Περιφερειακή/Κεντρική», ως «Κεντρική» και ως «Τοπικά»).

Πίνακας 3.2-16: Ιστοχημική ανίχνευση για την BuChE σε εγκέφαλο πέστροφας (*Oncorhynchus mykiss*) μετά από χρώση κατά Baker et al. (1986), όπως τροποποιήθηκε από τους Karnovsky and Roots (1964). Έγινε ιστολογική αξιολόγηση με κριτήρια έντασης χρώσης, σχετικού πληθυσμού χρωσμένων κυττάρων και επιφανειακής κατανομής της χρώσης καθώς και χωροταξικής κατανομής μετά από έκθεση σε διάφορες συγκεντρώσεις methamidophos (mg/l). Η κάθε τιμή είναι ο MO μετρήσεων από 1-3 (5 για τον μάρτυρα) ψάρια (MO \pm SD). Η παρατεταμένη τοξικότητα ελέγχθηκε σε εργαστηριακές συνθήκες (n=17 άτομα/ομάδα επέμβασης, ομάδα 20,7 και 40,0 mg/l=18 άτομα)

Methamidophos (mg/l)	Ποσοτική έκφραση της BuChE (Τιμές χρώσης) ¹			Γινόμενο (=ένταση X πληθυσμού κυττ. X επιφ. κατανομή) της ποσοτικής έκφρασης της BuChE (Τιμές χρώσης) ²	Χωροταξική κατανομή				
	Ένταση χρώσης (1-5)	Σχετικός πληθυσμός χρωσμένων κυττάρων (1-5)	Επιφαν. κατανομή χρώσης (1-3)		Ημέρες δειγματοληψίας				
					1	18	4+14		
0	0,40	1,20	0,72	2,6	\pm	4,9			
1,5	0,00	0,00	0,00	0,0	\pm	()			
2,9	0,17	1,00	0,33	0,5	\pm	0,9 ()			
5,6	0,33 0,00	1,00 0,00	0,17 0,00	0,5 0,0	\pm	0,9 ()			
10,8	[1,50] 0,00	[4,00] 0,00	[3,00] 0,00	[18,0] 0,0	\pm	()			
20,7	[0,00] 0,00	[0,00] 0,00	[0,00] 0,00	[0,0] 0,0	\pm	()			
40	[0,00]	[0,00]	[0,00]	[0,0]	\pm	()			

¹ Τα δεδομένα εκφράζονται ως MO των τομών κάθε ιστού

² Τα δεδομένα εκφράζονται ως MO των τομών κάθε ιστού \pm SD. Η % διαφοροποίηση της ποσοτικής έκφρασης της χρώσης σε σύγκριση με τον μάρτυρα καταγράφεται μέσα στην παρένθεση (). Για τις συγκεντρώσεις στις οποίες τα ψάρια τοποθετήθηκαν σε καθαρό νερό, ώστε να διαπιστωθεί αν υπάρχει δυνατότητα ανάκαμψης, τα δεδομένα και η % διαφοροποίηση της ποσοτικής έκφρασης της χρώσης σε σύγκριση με τον μάρτυρα καταγράφεται μέσα σε αγκύλες []

3.2.2.3.1.4 Χρώση ChEs που υδρολύουν την PrSCh

Η χρώση για ChEs που υδρολύουν την PrSCh δεν περιορίζονταν μόνο στα νευρικά κύτταρα αλλά επιπρόσθετα, και στα ερυθρά αιμοσφαίρια. Η χρώση στα νευρικά κύτταρα ήταν κοκκώδης ενώ στα ερυθρά αιμοσφαίρια εμφανίζεται πιο έντονη στο κυτταρόπλασμα αλλά και στην κυτταρική μεμβράνη και παρατηρήθηκε και στις κυτταρικές και πυρηνικές μεμβράνες αλλά όχι στο πυρηνόπλασμα (Εικ. 3.2-8).

Η συνολική ποσοτική έκφραση της χρώσης ήταν πολύ πιο έντονη από την AChE. Μεταξύ των επεμβάσεων με methamidophos δεν παρατηρήθηκε ουσιαστική διαφοροποίηση της χρώσης (ένταση - σχετικός πληθυσμός - επιφανειακή κατανομή) στις τομές του εγκεφάλου, αρκετά μειωμένη από τον μάρτυρα (14,9-46,1%), ανεξαρτήτως ημέρας δειγματοληψίας, εκτός για την υψηλότερη συγκέντρωση που κατέδειξε σημαντικά μειωμένη παρουσία θετικών κυττάρων στον εγκέφαλο των ψαριών σε σύγκριση με τον μάρτυρα κατά 71,8% (Εικ. 3.2-8).

Για το πείραμα που οι συγκεντρώσεις των 10,8, 20,7 και 40 mg/lit, στις οποίες η δραστική δεν ανανεώθηκε μετά την 4^η ημέρα, ο ποσοτικός προσδιορισμός την 18^η ημέρα ήταν μειωμένος κατά 58,5, 12,1 και 11,8%, αντίστοιχα (Πίνακας 3.2-17).

Σε όλες τις συγκεντρώσεις η χωροταξική κατανομή της χρώσης του ιστού, χαρακτηρίστηκε ως «Περιφερειακή/Κεντρική».

Για τις τομές στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν επιπροσθέτως και οι δύο παρεμποδιστές των AChE και BuChE (BW284C51 και iso-OMPA), η χρώση στις περισσότερες των περιπτώσεων δεν υπήρξε ή είναι μόλις που διακρίθηκε.

Πίνακας 3.2-17: Ιστοχημική ανίχνευση για ChEs που υδρολύουν την PrSCh σε εγκέφαλο πέστροφας (*Oncorhynchus mykiss*) μετά από χρώση κατά Baker et al. (1986), όπως τροποποιήθηκε από τους Karnovsky and Roots (1964). Έγινε ιστολογική αξιολόγηση με κριτήρια έντασης χρώσης, σχετικού πληθυσμού χρωσμένων κυττάρων και επιφανειακής κατανομής της χρώσης καθώς και χωροταξικής κατανομής μετά από έκθεση σε διάφορες συγκεντρώσεις methamidophos (mg/l). Η κάθε τιμή είναι ο MO μετρήσεων από 1-3 (4 για τον μάρτυρα) ψάρια (MO \pm SD). Η παρατεταμένη τοξικότητα ελέγχθηκε σε εργαστηριακές συνθήκες (n=17 άτομα/ομάδα επέμβασης, ομάδα 20,7 και 40,0 mg/l=18 άτομα)

Methamidophos (mg/l)	Ποσοτική έκφραση της ChE που υδρολύουν την PrSCh (Τιμές χρώσης) ¹			Γινόμενο (=ένταση X πληθυσμού κυττ. X επιφ. κατανομή) της ποσοτικής έκφρασης της ChE που υδρολύουν την PrSCh (Τιμές χρώσης) ²	Χωροταξική κατανομή				
	Ένταση χρώσης (1-5)	Σχετικός πληθυσμός χρωσμένων κυττάρων (1-5)	Επιφαν. κατανομή χρώσης (1-3)		Ημέρες δειγματοληψίας				
					1	18	4+14		
0	4,50	4,55	3,00	61,4	\pm 1,4		●	●	∅
1,5	4,20	4,50	2,77	46,9	\pm 11,4	(-23,7)	●	●	∅
2,9	4,00	4,50	3,00	52,3	\pm 9,5	(-14,9)	●	●	∅
5,6	3,50	4,50	2,33	33,1	\pm 16,1	(-46,1)	●	●	●
	3,50	4,50	3,00	47,3		-23,1			
10,8	[3,50]	[4,20]	[3,00]	[25,5]	\pm	([-58,5])	●	●	●
	3,50	4,50	3,00	41,6	8,0	-32,2			
20,7	[4,00]	[4,50]	[3,00]	[54,0]	\pm	([-12,1])	●	●	●
	2,50	3,50	2,00	17,4	9,8	-71,8	Τοπ		
40	[4,30]	[4,50]	[2,80]	[54,2]	\pm	(-11,8)	●	●	●

¹ Τα δεδομένα εκφράζονται ως MO των τομών κάθε ιστού

² Τα δεδομένα εκφράζονται ως MO των τομών κάθε ιστού \pm SD. Η % διαφοροποίηση της ποσοτικής έκφρασης της χρώσης σε σύγκριση με τον μάρτυρα καταγράφεται μέσα στην παρένθεση (). Για τις συγκεντρώσεις στις οποίες τα ψάρια τοποθετήθηκαν σε καθαρό νερό, ώστε να διαπιστωθεί αν υπάρχει δυνατότητα ανάκαμψης, τα δεδομένα και η % διαφοροποίηση της ποσοτικής έκφρασης της χρώσης σε σύγκριση με τον μάρτυρα καταγράφεται μέσα σε αγκύλες []
 ∅ Δεν έγινε πειραματισμός για την επέμβαση.

3.2.2.3.2 Ήπαρ

3.2.2.3.2.1 Χρώση Ηωσίνης – Αιματοζυλίνης

Η επίδραση του methamidophos στο ήπαρ της πέστροφας διέφερε μεταξύ του μάρτυρα και των επεμβάσεων για την περίοδο των 18 d, υποδεικνύοντας διαταραχή της κυτταρικής αρχιτεκτονικής ανάλογη με τη συγκέντρωση και το χρόνο έκθεσης.

Στις χαμηλότερες συγκεντρώσεις εφαρμογής των 1,5 και 2,9 mg/lit, παρατηρήθηκαν ελαφρές αλλοιώσεις στο ηπατικό παρέγχυμα ενώ σε μερικές περιπτώσεις παρατηρήθηκαν εστίες ή ζώνες με διαφοροποίηση της χρώσης. Την ημέρα 18 κατά τόπους διατηρήθηκαν οι ανωτέρω αλλοιώσεις, ενώ μερικές φορές παρατηρήθηκαν εστίες μιτωτικής δράσης.

Στις μεσαίες και υψηλότερες συγκεντρώσεις παρατηρήθηκαν ανάλογες αλλοιώσεις σχέση με τις χαμηλότερες αλλά με μεγαλύτερη ένταση, αλλά και ανάλογες της συγκέντρωσης, με αποτέλεσμα στις υψηλότερες συγκεντρώσεις η απώλεια της κυτταρικής αρχιτεκτονικής να ήταν ιδιαίτερος ορατή (Εικ. 3.2-7).

3.2.2.3.2.2 Ιστοχημική ανίχνευση για την AChE

Η χρώση για την AChE ήταν εκτεταμένη σε όλες τις μεταχειρίσεις, σε κοκκώδη μορφή συσχετιζόμενη με τις κυτταρικές μεμβράνες και τους πυρήνες των ηπατικών κυττάρων.

Για τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις των 1,5, 2,9 και 5,6 mg/lit, η χρώση για την AChE δεν είχε διακριτή διαφορά σε σχέση με τον μάρτυρα (-1,8 έως 13%), ενώ για τις υψηλότερες συγκεντρώσεις, ήταν μειωμένη σε σχέση με τον μάρτυρα (30,5-61%), ανεξαρτήτως ημέρας δειγματοληψίας. (Εικ. 2.3-9).

Στο πείραμα που οι υψηλότερες συγκεντρώσεις των 10,8, 20,7 και 40 mg/lit, στις οποίες η δραστική δεν ανανεώθηκε μετά την 4^η ημέρα, ο ποσοτικός προσδιορισμός την 18^η ημέρα ήταν 8,3 62,7 και -39,1%, αντίστοιχα.

Η χωροταξική κατανομή της χρώσης του ιστού, χαρακτηρίστηκε ως «Περιφερειακή/Κεντρική» ανεξαρτήτως συγκέντρωσης και ημέρας δειγματοληψίας (Πίνακας 3.2-18).

Πίνακας 3.2-18: Ιστοχημική ανίχνευση για την AChE σε ήπαρ πέστροφας (*Oncorhynchus mykiss*) μετά από χρώση κατά Baker et al. (1986), όπως τροποποιήθηκε από τους Karnovsky and Roots (1964). Έγινε ιστολογική αξιολόγηση με κριτήρια έντασης χρώσης, σχετικού πληθυσμού χρωσμένων κυττάρων και επιφανειακής κατανομής της χρώσης καθώς και χωροταξικής κατανομής μετά από έκθεση σε διάφορες συγκεντρώσεις methamidophos (mg/l). Η κάθε τιμή είναι ο ΜΟ μετρήσεων από 1-9 ψάρια (13 για τον μάρτυρα) (ΜΟ ± SD). Η παρατεταμένη τοξικότητα ελέγχθηκε σε εργαστηριακές συνθήκες (n=17 άτομα/ομάδα επέμβασης, ομάδα 20,7 και 40,0 mg/l=18 άτομα)

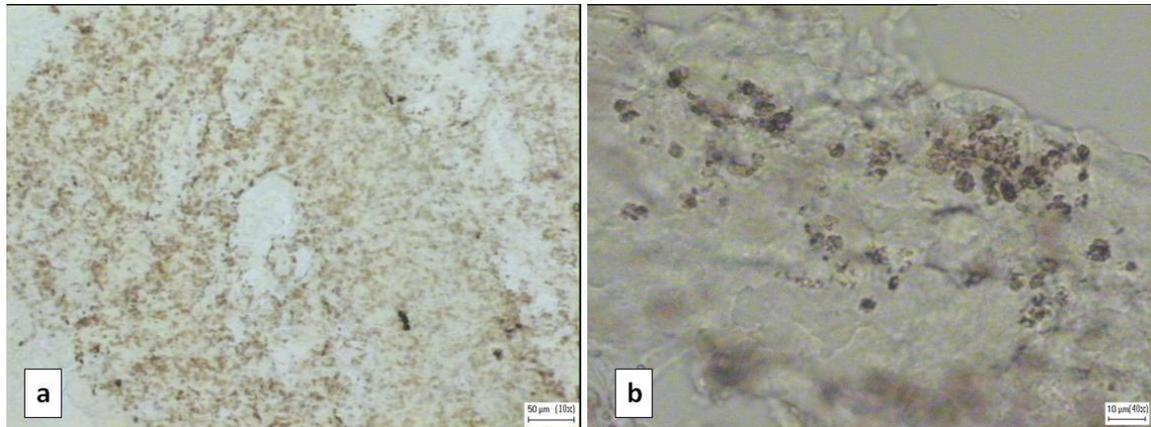
Methamidophos (mg/l)	Ποσοτική έκφραση της AChE (Τιμές χρώσης)			Γινόμενο (=ένταση X πληθυσμού κυττ. X επιφ. κατανομή) της ποσοτικής έκφρασης της AChE (Τιμές χρώσης) ²	Χωροταξική κατανομή		
	Ένταση χρώσης (1-5)	Σχετικός πληθυσμός χρωσμένων κυττάρων (1-5)	Επιφαν. κατανομή χρώσης (1-3)		Ημέρες δειγματοληψίας		
					1	18	4+14
0	1,85	4,00	1,91	15,8 ± 12,5	●	●	∅
1,5	1,63	4,20	2,18	15,9 ± 10,0 (0,6)	●	●	∅
2,9	1,51	4,07	2,49	15,5 ± 6,3 (-1,8)	●	●	∅
5,6	1,88	4,20	2,14	17,8 ± 12,0 (13,0)	●	●	∅
10,8	1,06	3,36	1,60	6,8 ± 6,8 (-57,2)	●	●	●
	[2,13]	[3,75]	[2,04]	[17,1] ± 13,4 ([8,3])	●	●	●
20,7	1,08	3,38	2,15	11,0 ± 6,6 (-30,5)	●	●	●
	[2,50]	[4,50]	[2,40]	[25,7] ± 1,9 ([62,7])	●	●	●
40	1,93	3,48	1,10	6,2 ± 9,2 (-61,0)	●	●	●
	[1,20]	[4,00]	[2,00]	[9,6] ± ([-39,1])	●	X	●

¹ Τα δεδομένα εκφράζονται ως ΜΟ των τομών κάθε ιστού

² Τα δεδομένα εκφράζονται ως ΜΟ των τομών κάθε ιστού ± SD. Η % διαφοροποίηση της ποσοτικής έκφρασης της χρώσης σε σύγκριση με τον μάρτυρα καταγράφεται μέσα στην παρένθεση (). Για τις συγκεντρώσεις στις οποίες τα ψάρια τοποθετήθηκαν σε καθαρό νερό, ώστε να διαπιστωθεί αν υπάρχει δυνατότητα ανάκαμψης, τα δεδομένα και η % διαφοροποίηση της ποσοτικής έκφρασης της χρώσης σε σύγκριση με τον μάρτυρα καταγράφεται μέσα σε αγκύλες []

∅ Δεν έγινε πειραματισμός για την επέμβαση.

X Δεν υπάρχουν δεδομένα



Εικ. 3.2-8: Τομές κρουτόμου, από εγκέφαλο πέστροφας από το πείραμα παρατεταμένης τοξικότητας με methamidophos. Ιστοχημικές χρώσεις εστερασών.

a. Ιστοχημική χρώση για την AChE, μάρτυρας: Παρατηρείται χρώση στο φλοιό του εγκεφάλου.

b. Ιστοχημική χρώση για την AChE, μεγέθυνση x 40: Παρατηρείται εκτεταμένη χρώση σε όλη την επιφάνεια της τομής.

3.2.2.3.2.3 Χρώση για την BuChE

Η χρώση για την BuChE ήταν πολύ περιορισμένη σε όλες τις μεταχειρίσεις, σε κοκκώδη μορφή, συσχετιζόμενη με τις κυτταρικές μεμβράνες των ηπατικών κυττάρων όχι όμως και τους πυρήνες.

Η συνολική έκφραση της χρώσης ήταν πάρα πολύ χαμηλή κυρίως μηδενική εκτός από ελάχιστες περιπτώσεις, έτσι σε όλες τις συγκεντρώσεις δεν είχε διακριτή διαφορά σε σχέση με τον μάρτυρα, ανεξαρτήτως ημέρας δειγματοληψίας.

Δεν υπήρξε χαρακτηρισμός για την χωροταξική κατανομή της χρώσης του ιστού.

3.2.2.3.2.4 Χρώση ChEs που υδρολύουν την PrSCh

Η χρώση για ChEs που υδρολύουν την PrSCh ήταν πολύ περιορισμένη σε όλες τις μεταχειρίσεις, ανάλογη της BuSCh.

Η συνολική έκφραση της χρώσης ήταν πάρα πολύ χαμηλή κυρίως μηδενική, έτσι σε όλες τις συγκεντρώσεις δεν είχε διακριτή διαφορά σε σχέση με τον μάρτυρα, ανεξαρτήτως ημέρας δειγματοληψίας.

Δεν υπήρξε χαρακτηρισμός για την χωροταξική κατανομή της χρώσης του ιστού.

Ανάλογα αποτελέσματα είχαμε όταν χρησιμοποιήθηκαν επιπροσθέτως και οι δύο παρεμποδιστές των AChE και BuChE (BW284C51 και iso-OMPA).

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

4.1 ΠΤΗΝΑ

Οι παρούσες μελέτες πραγματοποιήθηκαν για να διερευνηθεί η επίδραση του methamidophos σε νεαρά και ενήλικα ορτύκια, και ειδικότερα η συμπεριφορά, τα κλινικά συμπτώματα και η θνησιμότητα. Ακολουθήθηκαν διεθνώς αποδεκτές μέθοδοι πειραματισμού στα πτηνά με το methamidophos: οξεία έκθεση από το στόμα 14 d, έκθεση μέσω της διατροφής 8 d (5 ημερών έκθεσης και 3 ημερών με καθαρό σιτηρέσιο), αποφυγή των πτηνών σε επίπεδο εργαστηρίου («no-choice» και «two-choice test») και ημι-αγρού («pen test»). Επίσης για να εκτιμηθεί η επικινδυνότητα των πτηνών σε πραγματικές συνθήκες στον αγρό πραγματοποιήθηκε τοξικοκινητική μελέτη. Φαίνεται ότι το πτηνό αυτό είναι ένα από τα πιο ευαίσθητα είδη πτηνών που έχει αξιολογηθεί εκτενώς (Hudson et al. 1984; Rexrode, 1984, Smith, 1987; Johnson et al. 2001).

Πρόσθετα πραγματοποιήθηκαν βιοχημικές και ιστοχημικές αναλύσεις ιστών (εγκεφάλου, ήπαρ και δωδεκαδακτύλου), καθώς και του πλάσματος του αίματος προκειμένου να εκτιμηθούν οι τοξικές επιδράσεις.

Η συνολική προσέγγιση είναι πρωτότυπη, όχι μόνο όσον αφορά τα συγκεκριμένα εργαστηριακά αποτελέσματα με το ορτύκι (πειραματισμός σε πολλά στάδια, ηλικίες, επίπεδα πειραματισμού, βιοχημεία ChEs σε συνδυασμό με ιστοχημεία Ηωσίνης – Αιματοξυλίνης και ChEs) αλλά και συνολικά, γεφυρώνοντας τα μακροσκοπικά με τα βιοχημικά και ιστοχημικά αποτελέσματα, για την εκτίμηση της επικινδυνότητας σε πραγματικές συνθήκες στην Ελλάδα (τοξικοκινητική εκτίμηση).

Ο πειραματισμός της οξείας και υποξείας τοξικότητας περιλαμβάνει πληθώρα παραμέτρων που πρέπει να αξιολογηθούν σε μακροσκοπικό επίπεδο ενώ με την παρούσα μελέτη έγινε διεύρυνση του πρωτοκόλλου συμπεριλαμβάνοντας διερεύνηση σε επίπεδο ιστών-στόχων και κυττάρου (με βιοχημεία και ιστοχημεία), ώστε να διερευνηθεί ολοκληρωμένα η εμφάνιση των επιπτώσεων στα πτηνά μετά από την έκθεσή τους στο methamidophos.

Έχουν γίνει διάφορες μελέτες τοξικότητας σε διάφορα είδη πτηνών (Tucker and Haegele, 1971; Schafer et al. 1983; Balcomb et al. 1984). Η βιοχημική και ιστολογική

αξιολόγηση είναι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται συνήθως για τον εντοπισμό των επιδράσεων σε ιστούς που συνδέονται με την έκθεση χημικής ουσίας (Travlos et al. 1996). Ο εγκέφαλος και το ήπαρ, δύο από τους ιστούς για τους οποίους έχει τεκμηριωθεί στο παρελθόν ότι αποτελούν στόχους OPs, αναλύθηκαν βιοχημικά και ιστοχημικά. Το δωδεκαδάκτυλο αναλύθηκε ιστοχημικά ενώ οι ChEs του πλάσματος αναλύθηκαν βιοχημικά. Η παρεμπόδιση της δραστηριότητας της AChE στον εγκέφαλο και το πλάσμα έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως ως βιοσημαντής της τοξικότητας OPs σε ένα ευρύ φάσμα οργανισμών (Ecobichon and Comeau, 1973; Russell and Donald, 1982; Kozlovskaya and Mayer, 1984; Baker, 1985; Bocquene' et al. 1990; Day and Scott, 1990; Thompson, 1991; Fossi et al. 1992; Thompson and Walker, 1994; Burn and Leighton, 1996; Sánchez et al. 1997; Soler et al. 1998; Storm et al. 2000) και ειδικότερα, στον εγκέφαλο πτηνών (Zinkl et al. 1977; Hamilton et al. 1981; Busby et al. 1987; Rainwater et al. 1995; Vyas et al. 1996; Parker and Goldstein, 2000) και στο αίμα (ερυθροκύτταρα, πλάσμα ή ορό) (Thompson and Walker, 1994; Rainwater et al. 1995; Parker and Goldstein, 2000; Storm et al. 2000; Sogorb et al. 2007; Barata et al. 2010). Το ήπαρ είναι ο κύριος ιστός μεταβολισμού ξενοβιοτικών παραγόντων και αποτελεί σημαντικό όργανο-στόχο για διάφορες χημικές ουσίες, αφού αποτελεί το βιοχημικό εργαστήριο του οργανισμού στο οποίο μέσω της πυλαίας κυκλοφορίας απολήγουν σχεδόν όλες οι ουσίες που φθάνουν στο έντερο, πλην της πλειοψηφίας των λιπαρών οξέων. Η επίδραση της τοξικότητας στο ήπαρ αποτελεί ένα σημαντικό δείκτη αξιολόγησης (Gopinath et al. 1987; Afifi et al. 1991; Sharma et al. 2005; Yehia et al. 2007; Sayim, 2007).

Στις περισσότερες περιπτώσεις ο κύριος κίνδυνος της τοξικότητας των OPs, τουλάχιστον για τα χερσαία σπονδυλωτά, θεωρείται ότι προκύπτει μέσω της λήψης της τροφής. Το δωδεκαδάκτυλο των πτηνών διαδραματίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην πέψη και την απορρόφηση, κι επιπλέον, περιέχει ένα εκτεταμένο δίκτυο νευρικών πλεγμάτων, όπου είναι γνωστό ότι εκφράζονται οι ChEs (Larini, 1979). Κατά τη λήψη της τροφής τα εντομοφάγα πτηνά εκτιμάται ότι μπορεί να εκτεθούν περισσότερο στα εντομοκτόνα από όσο θα αναμενόταν λόγω του ότι η τροφή τους, το έντομο-θήραμα, που έχει εκτεθεί σε αντι-χολινεργικές (αντι-ChEs) ουσίες μπορεί να έχει καταστεί πιο ευάλωτο λόγω της έκθεσής του στα εντομοκτόνα. Οι Galindo et al. (1985) διαπίστωσαν μετά από εφαρμογή methyl parathion σε ορτύκια, ότι αυτά ήταν πιο ευαίσθητα σε θήρευση από γάτα. Οι Hunt et al. (1992) διαπίστωσαν ότι αμερικάνικα κρικινέζια (*Falco sparverius*) πιάνουν κατά προτίμηση σπιτοσπουργίτια που έχουν

εκτεθεί σε fenthion. Τα άγρια πτηνά μπορεί επίσης να εκτεθούν στα εντομοκτόνα μέσω του πόσιμου νερού, συνήθως από νερό που έχει καταλήξει σε λακκούβες μετά από καταιγίδα (Hill, 1992).

4.1.1 Μακροσκοπικές παρατηρήσεις

Στα ενήλικα ορτύκια, στην μελέτη οξείας τοξικότητας, η θνησιμότητα τους ήταν ανάλογη της δόσης του methamidophos και ειδικότερα στις υψηλότερες δόσεις συντελείται σε πάρα πολύ σύντομο χρονικό διάστημα (1-2 h μετά την έκθεση). Τα κλινικά συμπτώματα των ορτυκιών (αταξία, ανακατωμένο πτέρωμα, μειωμένη αντίδραση σε εξωτερικά ερεθίσματα, μυϊκό τρόμο, σιελόρροια) διαφέρουν από ήπια σε σοβαρά, ακόμη και 0,5 έως 1 h μετά τη χορήγηση του methamidophos, αφού μπορεί τελικά να οδηγήσουν σε θάνατο. Όσα πτηνά επιβίωσαν ανέκαμψαν των κλινικών συμπτωμάτων από την ημέρα 1 μέχρι το τέλος του πειραματισμού. Αυτός ο σύντομος χρόνος ανταπόκρισης δεν αποτελεί έκπληξη δεδομένου ότι το methamidophos είναι ένας άμεσος παρεμποδιστής της AChE αφού δε χρειάζεται μεταβολική ενεργοποίηση όπως έχει περιγραφεί ήδη για πολλά OPs και για τον μεταβολισμό τους σε δραστικότερη οξον μορφή (Pope, 1999).

Σε αντίθεση, στα νεαρά ορτύκια, στην διατροφική μελέτη υποξείας τοξικότητας, η θνησιμότητα παρατηρήθηκε στις υψηλότερες συγκεντρώσεις του methamidophos ενώ, συντελείται μετά από μερικές ημέρες έκθεσης, ειδικότερα τις ημέρες 4 και 5. Τα κλινικά συμπτώματα ήταν ανάλογα της οξείας τοξικότητας, (μειωμένη αντίδραση σε εξωτερικά ερεθίσματα, μυϊκός τρόμος, αδυναμία στα πόδια, μειωμένη κινητικότητα), διέφεραν από ήπια έως σοβαρά, από 1,5-2 h μετά τη έκθεση στο methamidophos για τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις, αργότερα για τις χαμηλότερες, και για όλο το διάστημα της έκθεσης μέχρι την ημέρα 5 (εκτός της χαμηλότερης συγκέντρωσης που παρατηρήθηκαν μόνο τις ημέρες 1 και 2). Τα κλινικά συμπτώματα άργησαν λίγο να εμφανιστούν σε σύγκριση με την οξεία τοξικότητα, αφού στην συγκεκριμένη περίπτωση η έκθεση ήταν μέσω της τροφής (και όχι με την χορήγηση υδατικού διαλύματος με καθετήρα) με συνέπεια την καθυστέρηση της κυκλοφορίας του methamidophos στον οργανισμό των ορτυκιών μέσω των διαδικασιών ADME. Ο χρόνος εμφάνισης των κλινικών συμπτωμάτων ήταν ανάλογος της ποσότητας κατανάλωσης του σιτηρεσίου σε κάθε συγκέντρωση. Τα πτηνά ανέκαμψαν πλήρως από την ημέρα 6, με την χορήγηση καθαρού σιτηρεσίου, φανερά λόγω του γρήγορου

μεταβολισμού του methamidophos στα πτηνά, ανάλογα με τις παρατηρήσεις της οξείας τοξικότητας αλλά και τα βιοχημικά αποτελέσματα, όπως περιγράφεται κατωτέρω.

Οι Hudson et al. (1984) ανέφεραν ότι οι πιο σύντομοι θάνατοι σε δοκιμές τοξικότητας συνέβησαν μέσα σε 1 h για ενώσεις OPs. Σε όλες τις περιπτώσεις, εκτός από τα parathion και methyl parathion στην πάπια, ο ενεργότερος μεταβολίτης τους (μορφή oxon) που παράγεται εντός του ήπατος την πρώτη ώρα θεωρητικά καταλαμβάνει το 50% των θέσεων δέσμευσης στο ήπαρ και του αίματος, γεγονός που υποδηλώνει ότι είναι η παραγωγή του oxon εντός του εγκεφάλου ως ο πλέον σημαντικός καθοριστικός παράγοντας της οξείας τοξικότητας.

Τα τοξικολογικά δεδομένα στη δοκιμή οξείας τοξικότητας για τη θνησιμότητα σε ορτύκι από το methamidophos όπως υπολογίστηκαν ήταν $LD_{50}=5$ mg/kg bw και $NOEL=2,2$ mg/kg bw. Σε δικά μας αδημοσίευτα δεδομένα σε ανάλογο πειραματισμό σε επίμυ (common vole, *Microtus arvalis*) ήταν $25 > LD_{50} > 5$ mg/kg bw και $NOEL=1$ mg/kg bw για το methamidophos. Σε μύες επίσης δεν παρατηρήθηκε θνησιμότητα με μέγιστη δόση 7,5 mg/kg bw methamidophos (Burrue et al. 2000) και 28 mg/kg/d acephate (Frag et al. 2000). Σε μελέτες με acephate το $LD_{50}=866-945$ mg/kg, ενώ για τον ενεργότερο μεταβολίτη του acephate, το methamidophos, το $LD_{50}=13-30$ mg/kg σε θηλαστικά (Crisp and Look, 1982; Singh, 1984; Behera and Bhunya, 1989; Ware, 1989; Pesticide Management Education Program (PMEP), 2008). Δύο υποθέσεις εξηγούν τη διαφορετική τοξικότητα των acephate και methamidophos αφού τα έντομα και τα θηλαστικά μπορούν να μετατρέψουν το acephate σε methamidophos (Tucker, 1976b; Kao and Fukuto, 1977). Η εντομοκτόνο δράση του acephate οφείλεται μόνο στη μετατροπή του σε methamidophos ενώ όσο acephate δεν μετατρέπεται, δεν είναι τοξικό (Magee, 1982). Άλλες μελέτες δείχνουν ότι τα έντομα μετατρέπουν γρήγορα το acephate σε methamidophos που μπορεί να είναι υπεύθυνο για την ανάλογη εντομοκτόνο δράση των δύο ουσιών (Magee, 1982). Στα θηλαστικά από την άλλη πλευρά η μετατροπή του acephate σε methamidophos είναι φτωχή. Η συσσώρευση methamidophos σε θηλαστικά εμποδίζει το ένζυμο CaE που μετατρέπει το acephate σε methamidophos, έτσι όταν η βιοενεργοποίηση του acephate ξεκινάει, αμέσως μετά σταματάει. Η διαφορά του μεταβολισμού του acephate σε έντομα και θηλαστικά ίσως είναι υπεύθυνη για τη διάφορη τοξικότητα του στα θηλαστικά (Mahajna et al. 1997). Η διάφορη τοξικότητα του acephate εξαρτάται και από τη διαφορετική μοριακή δομή των AChE στα θηλαστικά (mAChE) και στα έντομα (iAChE). Μελέτες έδειξαν ότι το acephate και το methamidophos ενώνονται με το ενεργό κέντρο του iAChE, το

methamidophos ενώνεται με το ενεργό κέντρο του mAChE, ενώ το acephate ενώνεται με ένα περιφερειακό αλλοστερικό μέρος του mAChE (Singh, 1986; Singh et al. 1988; Singh, 1990). Η ένωση του acephate με το αλλοστερικό μέρος προστατεύει το mAChE από το methamidophos (*in vivo* και *in vitro*) (Singh, 1985; 1986; 1990). Ανάλογα αποτελέσματα για τον προστατευτικό ρόλο του acephate λόγω μεγαλύτερης συσχέτισης με την AChE από το methamidophos έδωσαν και τα αποτελέσματα του (Singh, 1986) μετά από έκθεση σε επίμυ όπως αναλύεται διεξοδικότερα στα βιοχημικά αποτελέσματα κατωτέρω. Η τοξικότητα σε πτηνά είναι υψηλή και για άλλα OPs. Η οξεία τοξικότητα του chlorpyrifos για τα πτηνά είναι υψηλή ($LD_{50}=13,3$ έως 32 mg/kg bw) σε ορτύκια (Rexrode, 1984; Hudson et al. 1984; Smith, 1987; Johnson et al. 2001). Όσον αφορά το dimethoate σύμφωνα με τον (Brunet et al. 1997) το $LD_{50}=9,9$ mg/kg bw ενώ είναι στην περιοχή που αναφέρεται στη βιβλιογραφία και για άλλα είδη πτηνών, 6,6 και 22,0 mg/kg bw (Schafer, 1972; Bakre and Rajasekaran, 1989). Όλα τα πτηνά σε δόση dimethoate χαμηλότερη από 4,9 mg/kg bw επιβίωσαν, ενώ σε μεγαλύτερη από 28,0 mg/kg bw έχασαν τη ζωή τους εντός 24 h.

Η ευαισθησία των πτηνών, σε σύγκριση με τα θηλαστικά, στα OPs έχει αναφερθεί να σχετίζεται με την παρουσία των «Α εστερασών» στο αίμα των θηλαστικών, οι οποίες είναι σε θέση, καταλυτικά, να υποβαθμίζουν την μεταβολισμένη στο ήπαρ οξον μορφή τους (Walker, 1983). Οι «B Εστεράσες» στα πτηνά μπορεί να έχουν παρόμοιο ρόλο με ένα μη-καταλυτικό μηχανισμό. Η συνδυαστική ικανότητα του οξον με τις AChE, BuChE ή CaE στο ήπαρ και τις AChE ή BuChE στον ορό δεν μπορεί να συσχετίζονται με την τοξικότητα. Φαίνεται όμως να υπάρχει συσχέτιση της ικανότητας των CaE στο ορό να δεσμεύουν το οξον με την τοξικότητα του ΦΠ, ακόμη και όταν λαμβάνονται υπ' όψιν διαφορές που φαίνεται να οφείλονται κυρίως στις διαφορές των ειδών και όχι των ΦΠ. Αυτό απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση, αλλά προτείνεται και από τους Sterri et al. (1985) και Maxwell (1992), ότι τα επίπεδα των οξον που δεσμεύονται από CaE στον ορό των θηλαστικών έχουν σημαντική επίπτωση στην τοξικότητα των σκευασμάτων.

Αρκετοί ερευνητές όπως οι Buckner et al. (1976), Richmond et al. (1976, 1979), Buckner and McLeod (1977), Bart (1979) και Zinkl et al. (1981, 1984) έχουν μελετήσει την επίδραση του acephate σε δασικά πτηνά ενώ στις περισσότερες περιπτώσεις κατέγραψαν μείωση της δραστηριότητας της AChE στον εγκέφαλο. Αλλαγές που καταγράφηκαν σε πληθυσμούς ορισμένων ειδών από ερευνητές δεν μπόρεσαν να συσχετισθούν με την απευθείας έκθεση στο acephate ή με τη μείωση της τροφής

(αριθμού των αρθροπόδων) μετά την εφαρμογή. Οι Richmond et al. (1979), παρόλο που δεν μπόρεσαν να το συσχετίσουν με την βιοποικιλότητα, ανέφεραν ότι η πιθανότητα της επιτυχίας της αναπαραγωγής ήταν χαμηλότερη στις περιοχές που είχαν εκτεθεί στο acephate. Για το diazinon, οι McEwen et al. (1972) παρατήρησαν μείωση του πληθυσμού σε αρκετά είδη πτηνών (*Sturnella neglecta*, *Calcarius ornatus*, *Eremophila alpestris* και *Calamospiza melanocorys*) που βρέθηκαν σε λειμώνες που είχαν εκτεθεί σε χαμηλές συγκεντρώσεις diazinon (0,4-0,6 kg a.s./ha) ενώ οι Zinkl et al. (1977), Stone (1979, 1980), Stone and Knoch (1982), Anderson and Glowa (1985), Stone and Gradoni (1985 και 1987) και EPA (1986) όλοι παρατήρησαν συμπτώματα δηλητηρίασης σε λειμώνες μετά από εφαρμογή diazinon. Στον Καναδά, αναφέρθηκαν νεκρές χήνες (*Branta canadensis*), από diazinon μετά από εφαρμογή σε γήπεδα γκολφ (Frank et al. 1991). Σε άλλες περιπτώσεις, *Anus Americana* και χήνες, βρέθηκαν νεκρές μετά την εφαρμογή diazinon και chlorpyrifos σε γήπεδο γκολφ (Ecological Effects Branch of the US EPA 1981, Kendall et al. 1992). Για το chlorpyrifos, οι Hurlbert et al. (1970) και Hurlbert (1977) βρήκαν νεκρές πάπιες (*Anas platyrhynchos*) σε μικρές λίμνες που είχε εφαρμοστεί chlorpyrifos και οι Brunet and Cyr (1990) κατέγραψαν υψηλό ρυθμό θνησιμότητας μεταξύ των αμερικανικών κοκκινολαίμηδων (*Turdus migratorius*) μετά από έκθεση σε chlorpyrifos για μερικές ώρες. Σύμφωνα με τους Zinkl et al. (1984), συμπτώματα δηλητηρίασης εμφανίστηκαν σε είδη για τα οποία η εδαφική και ζωτική κυριαρχία ορίζεται με την περιοχή έκθεσης στα ΦΠ. Τα πτηνά έχουν διαφορετική ευαισθησία για την ίδια δραστική ουσία π.χ. τα κοκκινο-φερωτά κοτσύφια (*Agelaius phoeniceus*) είναι 10 φορές πιο ευαίσθητα σε μερικά εντομοκτόνα από τους φασιανούς, σε πειραματισμό οξείας τοξικότητας (Hill, 1995). Από το 1980 μέχρι το 2000 διάφορα OPs ήταν μεταξύ των ΦΠ που εμπλέκονται πιο συχνά σε περιστατικά θνησιμότητας σε πτηνά (Fleischli et al. 2004).

Όσον αφορά τα κλινικά συμπτώματα, ισχυρές δόσεις OPs έχει αποδειχθεί ότι καταστέλλουν τις δραστηριότητες πτηνών και θηλαστικών (Bignami et al. 1975; Grue and Shipley, 1981; Shaker et al. 1988; Brunet and Cyr, 1992; Clegg and van Gemert 1999). Δυσλειτουργία των βασικών γαγγλίων του εγκεφάλου μπορεί να παρεμποδίζει λειτουργίες κίνησης (Riker, 1978), όπως για τη διατροφή και τη δραπέτευση από τη θήρευση. Μείωση των επιπέδων της ChE στον ιππόκαμπο μπορεί να διαταράξει τη μνήμη και τον προσανατολισμό στο χώρο (Bingman et al. 1984; Bingman et al. 1985a; Bingman et al. 1985b; Bingman et al. 1988a; Bingman et al. 1988b) και, κατά συνέπεια, μπορεί να επηρεάσει την επιστροφή στη φωλιά, ή τη μετανάστευση. Παρεμπόδιση της

ChE στον υποθάλαμο μπορεί να επηρεάσει την λήψη τροφής και νερού (Kuenzel, 1972), τη ρύθμιση της θερμοκρασίας (Mills and Heath, 1972), και την φυσιολογία της αναπαραγωγής και της συμπεριφοράς, συμπεριλαμβανομένων της ερωτοτροπίας, της σεξουαλικής συμπεριφοράς και την οικοδόμησης της φωλιάς (Collias and Collias, 1984). Κατασταλτικά του ΚΝΣ είναι γνωστό ότι μειώνουν τη βάδιση και συναφείς δραστηριότητες σε νεοσσούς και τρωκτικά σε πειραματισμό αγρού, ενώ διεγερτικά μπορούν να επιδρούν και στην αύξησης δραστηριοτήτων (Frankel et al. 2007).

Σε προηγούμενες μελέτες σχετικά με τις επιπτώσεις σε υπο-θανατηφόρες δόσεις OPs πραγματοποιήθηκαν καταγραφές σε καθημερινές δραστηριότητες όπως το πέταγμα, τη διατροφή και το κελιάδισμα (Banks and Russell, 1967; Grue and Shipley, 1981; Grue, 1982; Fairbrother et al. 1991; Hart, 1993). Κλινικά συμπτώματα σε υπο-θανατηφόρες παρεμποδίσσεις ChEs σε πτηνά περιλαμβάνουν ναυτία, λήθαργο, πτώση φτερών, απώλεια αντανακλαστικών, παράλυση, κόμα (Somers et al. 1991). Έρευνα σχετικά με τη λειτουργία των ChEs σε ευρωπαϊκά ψαρόνια (*Sturnus vulgaris*) σε αιχμαλωσία δείχνει ότι η μείωση δραστηριότητας της AChE μόλις κατά 10-12% μετά από εφαρμογή OPs μπορεί να οδηγήσει σε αλλαγές στη στάση τους, μείωση της αναζήτησης τροφής, μείωση του χρόνου πτήσης και του κελιαδίσματος (Hart, 1993).

Ειδικότερα για τον μεταναστευτικό προσανατολισμό, σε περιστέρια όπως και σε αποδημητικά πτηνά, έχει καταδειχθεί ότι επηρεάζεται αρνητικά σε νευρωνικό επίπεδο όταν μεταβάλλονται τα ερεθίσματα που δέχονται από το μαγνητικό πεδίο (Walcott et al. 1979; Semm and Demaine, 1986; Walcott et al. 1988). Επιπλέον, τα περιστέρια και τα αποδημητικά πτηνά στηρίζονται σε αναγνώριση πεδίου και θέσης με βάση το αζιμούθιο του ηλίου (Walcott et al. 1979). Η παρεμπόδιση των ChEs στα πτηνά που εκτίθενται σε υπο-θανατηφόρες δόσεις του περιβάλλοντος από OPs επηρεάζει, σε κάποιο σημείο, τη νευρολογική λειτουργία που θα μπορούσε να επηρεάσει τον προσανατολισμό και την πλοήγηση κατά την πτήση. Για το acephate, ενήλικα λευκόλαιμα σπουργιτοσίχλινα (*Zonotrichia albicollis*) που εκτίθενται σε 256 mg/kg acephate εμφάνισαν μεταναστευτική δραστηριότητα, αλλά δεν ήταν σε θέση να προσανατολιστούν στη σωστή μεταναστευτική κατεύθυνση (Vyas, 1995). Σύμφωνα με τους Brasel et al. (2007) παρατηρήθηκε αύξηση του χρόνου πτήσης ανάλογα της αύξησης της έκθεσης carbofuran ενώ με το diazinon τα αποτελέσματα έδειξαν ανεπαίσθητες επιπτώσεις στον χρόνο πτήσης σε χαμηλά επίπεδα δόσης. Έτσι όσον αφορά τις συνέπειες για τα αποδημητικά είδη πτηνών, το diazinon σε χαμηλά επίπεδα είναι πιθανό να είναι λιγότερο επιβλαβή για την πλοήγηση των πτηνών από την ισοδύναμη έκθεση σε carbofuran αφού το

diazinon είναι στην κατηγορία των OPs που δεν αναστέλλει τις AChEs έως ότου ενεργοποιηθεί μεταβολικά στη μορφή oxon (Minton and Murray, 1988).

Για το chlopyrifos, οι νευροτοξικές επιδράσεις σε επίμυες περιλαμβάνουν αυτόνομα σημάδια χολινεργικής τοξικότητας, μείωση κινητικής δραστηριότητας (Moser, 1995). Σύμφωνα με τον Moser (2000) το chlopyrifos σε εφάπαξ ή επαναλαμβανόμενη δόση προκάλεσε αλλαγές στη συμπεριφορά, στον αγρό, σε νεαρά κοτόπουλα αφού επέδρασε στην κινητικότητα τους, στις προσπάθειες τους για πήδημα και στη φώνηση. Οι δόσεις του chlopyrifos (2 και 4 mg/kg από το στόμα, που αντιπροσωπεύουν μόνο το 11 και 22%, αντίστοιχα, της τιμής LD₅₀ του chlopyrifos στα νεαρά κοτόπουλα) που προκάλεσαν αυτές τις αλλαγές συμπεριφοράς στα νεαρά κοτόπουλα δεν έδειξαν εμφανείς ενδείξεις χολινεργικής τοξικότητας. Ομοίως νεαροί επίμυες μετά την έκθεση από το στόμα με το chlopyrifos, αναφέρθηκαν να είναι ευαίσθητοι και να εκδηλώσουν αλλαγές συμπεριφοράς λόγω επιπτώσεων στο νευρικό σύστημα (κυρίως κινητικά προβλήματα). Τα ευρήματα αυτά τεκμηριώνονται περαιτέρω από τους Carr et al. (2001) σχετικά με την μείωση της κινητικής δραστηριότητας νεαρών αρσενικών επίμυων μετά την πρόιμη μεταγεννητική έκθεση τους σε chlopyrifos. Σε μέγιστη δόση 28 mg/kg/d acephate παρατηρήθηκαν χολινεργικές ενδείξεις όπως μυικός τρόμος και σιελόρροια σε άρρενες μύες (Farag et al. 2000).

Περιπτώσεις υπερκινητικότητας μετά από χαμηλές δόσεις OPs έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία (Grue et al. 1991; Hart, 1993). Αυτό έχει ήδη παρατηρηθεί με τα ευρωπαϊκά ψαρόνια (*Sturnus vulgaris*) όπου το chlorfenvinphos, προκάλεσε αύξηση της δραστηριότητας του πετάγματος σε 3 mg/kg, αλλά μείωση στα 5 mg/kg. (Fryday et al. 1995). Για το dimethoate, σε υπο-θανατηφόρες δόσεις ως δολώματα σε τρία σποροφάγα πτηνά, μελωδικό σπουργιτοσίχλονο (*Melospiza melodia*), κοινό σπουργιτοσίχλονο (*Passerculus sandwichensis*) και φανέτο (*Carduelis tristis*), μείωσαν τη δραστηριότητά τους μετά την έκθεσή τους από το στόμα στα 5,7, 5,3 και 5,4 mg/kg bw, αντίστοιχα (Brunet and Cyr, 1992). Σε άλλη μελέτη, αναφέρεται ότι δόσεις dimethoate <1,34 mg/kg bw αυξάνουν το επίπεδο δραστηριότητας σε τρία σποροφάγα πτηνά (Brunet and Cyr, 1992). Πτηνά που εκτέθηκαν σε δόσεις dimethoate <0,96 mg/kg bw σχεδόν διπλασίασαν την δραστηριότητά τους (perch-hopping), ενώ σε υψηλότερες δόσεις είχαν ως αποτέλεσμα σε μείωση περίπου το ένα τρίτο του αρχικού επιπέδου δραστηριότητάς τους (Brunet et al. 1997). Σύμφωνα με τους Brunet et al. (1997), παρουσιάζεται έρευνα σε 16 διαφορετικών τύπους συμπτωμάτων συμπεριφοράς, σε διάφορες δόσεις dimethoate έως 1000 mg/kg bw. Η επίδραση στο

επίπεδο δραστηριότητας του κοκκινο-πτερωτού κότσυφα (*Agelaius phoeniceus*) όσον αφορά το dimethoate άρχισαν από το 0,74 mg/kg bw, ενώ τα πρώτα σημάδια επίδρασης (διάρροια) παρατηρήθηκαν σε δόση 1,75 mg/kg bw, πάνω από 2 mg/kg bw τα πτηνά παρουσίασαν κόπωση που οδηγεί σε αναπνευστική δυσχέρεια και σε δόσεις πάνω από 5 mg/kg bw άρχισαν να εμφανίζονται μυϊκή παράλυση και θάνατος ενώ διάφορες επιδράσεις αναφέρθηκαν από 0,74 έως 6,69 mg/kg bw.

Για τις αντι-ChEs έχει τεκμηριωθεί, ότι η έναρξη και η κορύφωση της επίδρασης στη συμπεριφορά σχετίζεται, με σχετική ακρίβεια, με την εμφάνιση και την κορύφωση της παρεμπόδισης των ChEs στον εγκέφαλο, ενώ οι διαταραχές της συμπεριφοράς υποχωρούν με το χρόνο (ώρες, ημέρες) παρά τη συνέχιση της παρεμπόδισης (Moser and Padilla, 1998; Moser, 1999; McDaniel and Moser, 2004). Άλλες δημοσιεύσεις έδειξαν ότι επιδράσεις στην συμπεριφορά από OPs δεν έχουν αναγκαστικά άμεση συσχέτιση με τη παρεμπόδιση των ChEs στον εγκέφαλο, και άλλοι μηχανισμοί δράσης μπορούν να συμμετέχουν στην νευροτοξικότητα ορισμένων OPs (McDaniel and Moser, 2004) αφού έχει δειχθεί ότι επηρεάζονται αρκετά συστήματα νευρικών ώσεων (Chebabo et al. 1999; Dam et al. 1999; Raines et al. 2001; Meyer et al. 2004; Aldridge et al. 2005a,b; Shahroukhi et al. 2007; Slotkin and Seidler, 2007). Επιδράσεις του chlorpyrifos που δεν συνδέονται άμεσα με την παρεμπόδιση της ChE περιλαμβάνουν τη ρύθμιση των μουσκαρινικών υποδοχέων (Moser and Padilla, 1998), τη διαταραχή των κατεχολαμινεργικών οδών (Dam et al. 1999), την αλλοίωση της κυτταρικής αντιγραφής και διαφοροποίησης του εγκεφάλου (Crumpton et al. 2000) καθώς και του οξειδωτικού στρες σε διάφορους ιστούς (Ambali et al. 2007, Verma et al. 2007). Σύμφωνα με τους Pelegriano et al. (2006) άλλη αιτία θνησιμότητας εκτός του οξέως χολινεργικού συνδρόμου από OPs συνήθως είναι ο συνδυασμός υπερβολικών εκκρίσεων, βρογχοσπασμών, καθώς και παράλυσης του αναπνευστικού κέντρου. Δύο άλλα σύνδρομα σχετίζονται επίσης με την επίδραση των OPs, το ενδιάμεσο σύνδρομο και το σύνδρομο της καθυστερημένης νευροπάθειας. Τα συμπτώματα του ενδιάμεσου συνδρόμου σχετίζονται με την αδυναμία των μυών που ενεργοποιούνται από τα κρανιακά νεύρα και παρατηρούνται 24-96 h μετά το οξύ χολινεργικό σύνδρομο. Το σύνδρομο της καθυστερημένης νευροπάθειας (OPIDN) συνδέεται με εκτεταμένη και μακροχρόνια βλάβη στο κεντρικό και περιφερικό νευρικό σύστημα, μια νευροπάθεια που προκαλεί το θάνατο ορισμένων νευρώνων κίνησης και αισθήσεων στον άνθρωπο και σε πειραματόζωα και εκδηλώνεται σε θηλαστικά 1-3 wk σύμφωνα με τους Pelegriano et al. (2006) ή σύμφωνα με τον Wilson (2005) 10 d με μερικές εβδομάδες

μετά από έκθεση σε OPs (Khasawinah et al. 1979; WHO, 1993). Κλινικά συμπτώματα είναι αδυναμία των μυών που ακολουθείται από σπαστικότητα, μη ομαλά αντανακλαστικά (Sprague and Bickford, 1981). Το methamidophos πρόσθετα από τις αντιχολινεργικές επιδράσεις είναι γνωστό ότι προκαλούν το σύνδρομο καθυστέρησης της νευροπάθειας (OPIDN). Μία άλλη Β-εστεράση η neuroathy target esterase (NTE) συνδέεται με το OPIDN ενώ εκτός από το methamidophos και μερικά άλλα OPs όπως το tri-ortho cresyl phosphate (TOCP), leptophos, mipafox, isofenphos και chlorpyrifos, προκαλούν OPIDN. Φαίνεται ότι η NTE έχει ένα ρόλο στο νευρωνικό μεταβολισμό των λιπιδίων (Lotti 1992). Μερικά OPs όπως τα chlorpyrifos και isofenphos χρειάζονται πολύ υψηλές δόσεις για να προκαλέσουν νευροπάθεια. Το TOCP, ένα βιομηχανικό χημικό, ήταν υπεύθυνο για την παράλυση χιλιάδων ανθρώπων κοντά στην αλλαγή του προηγούμενου αιώνα. Παρεμπόδιση περίπου 70% ή περισσότερο στην CaE NTE συνήθως συνδέεται με αυτή την διαταραχή. Συνήθως οι χημικές ουσίες που προκαλούν νευροπάθεια είναι αυτές που είναι καλύτεροι παρεμποδιστές της NTE από της AChE, επιτρέποντας έτσι η δόση να είναι υψηλότερη για να εκδηλωθούν χολινεργικά συμπτώματα ή θάνατος. Τα κοτόπουλα είναι ευαίσθητα σε αυτή την διαταραχή (Wilson, 2005). Οι οξείες επιπτώσεις των OPs στο ΚΝΣ περιλαμβάνουν επιληπτικές κρίσεις και κώμα. Έχουν επίσης περιγραφεί νευρολογικές συνέπειες από OPs, συμπεριλαμβανομένων των νευροψυχικών δυσλειτουργιών, (Rosenstock et al. 1991). Υπάρχουν στοιχεία ότι χρόνια εκτεθημένοι ασθενείς μπορεί να φανερώσουν τέτοιες διαταραχές συμπεριφοράς, όπως η κατάθλιψη και η γνωστική έλλειψη (Levin and Rodnitzky, 1976). Οι Parrón et al. (1996), Beseler et al. (2008) έδειξαν ότι υπάρχει μια αύξηση στον κίνδυνο της αυτοκτονίας μεταξύ αυτών που εκτίθενται σε εντομοκτόνα σε σύγκριση με άλλους με παρόμοια κοινωνικοοικονομικά και δημογραφικά χαρακτηριστικά. Τα OPs κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των θηλαστικών παρουσίασαν νευροχημικές μεταβολές και μεταβολές στην συμπεριφορά (κατάθλιψη) (Aldridge et al. 2003a; Slotkin et al. 2006). Σύμφωνα με τον Lima et al. (2009) παρατηρήθηκε συμπεριφορά κατάθλιψης σε ενήλικους μύες μετά από έκθεση σε 1,2 και 4,4% του LD₅₀ του methamidophos (Pesticide Management Education Program (PMEP), 2008) συμπεριφορά που παρατηρήθηκε και σε έκθεση με malathion σε ενήλικα τρωκτικά (Brocardo et al. 2007).

Η γρήγορη ανάκαμψη από τα κλινικά συμπτώματα στα ορτύκια (στον πειραματισμό οξείας τοξικότητας από τα μέσα της ημέρας 1 και στον πειραματισμό υποξείας τοξικότητας με τη χορήγηση καθαρού σιτηρεσίου την ημέρα 6), αποδεικνύει

τον γρήγορο μεταβολισμό της δραστικής ουσίας στα πτηνά, γεγονός που αποδεικνύεται και από την τοξικοκινητική μελέτη όπως αναλύεται κατωτέρω. Σε ανάλογες μελέτες ο ρυθμός που εμφανίστηκαν και εξαφανίστηκαν τα συμπτώματα της επίδρασης και των επιπτώσεων στα επίπεδα δραστηριότητας των κοκκινο-φτερωτών κοτσυφιών (*Agelaius phoeniceus*) ήταν ανάλογα της δόσης (Brunet et al. 1997), όπως αναφέρθηκε για άλλα OPs σε σπουργίτια (Bakre and Rajasekaran, 1989). Σύμφωνα με τους Brunet et al. (1997) τα μακροσκοπικά συμπτώματα της επίδρασης διήρκεσαν από 100 έως 750 min μετά από επίδραση σε αυξανόμενες δόσεις 1,75-15,0 mg/kg bw dimethoate. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σύμφωνα με τους Hudson et al. (1984), ο οποίος ανέφερε ότι δεν υπάρχουν συμπτώματα σε ζώα 24 h μετά από έκθεση σε υπο-θανατηφόρες δόσεις OPs.

Στην οξεία τοξικότητα, ο ρυθμός πρόσληψης της τροφής για τις πρώτες ημέρες 0-7 διαφοροποιήθηκε μόνο για την ημέρα 0 όπου τα ζώα ορτύκια μετά την αρχική πρόσληψη της τροφής με methamidophos, έδειξαν σαφής τάση αποφυγής της τροφής, αναλόγως της δόσης του methamidophos. Τις υπόλοιπες ημέρες με την εξάλειψη και των κλινικών συμπτωμάτων η λήψη της τροφής είναι ανάλογη του μάρτυρα. Αντίθετα ο ρυθμός πρόσληψης τροφής για τις ημέρες 8-14 ήταν ανάλογη για όλες τις επεμβάσεις με methamidophos αλλά κατά 20% περίπου χαμηλότερος από του μάρτυρα, γεγονός που ίσως οφείλεται στο σύνδρομο της καθυστερημένης νευροπάθειας. Ανάλογα, το σωματικό βάρος στα ζώα πτηνά που τους χορηγήθηκε methamidophos, αυξήθηκε κατά 5,5% έως 11,2%, ενώ στον μάρτυρα, αυξήθηκε κατά 25%, μετά από 14 d. Η αύξηση αυτή του σωματικού βάρους παρατηρήθηκε κυρίως τις ημέρες 0-7 ενώ για τις ημέρες 8-14, παράλληλα με τη μείωση του ρυθμού πρόσληψης της τροφής, δεν παρατηρήθηκε αύξηση του σωματικού βάρους.

Στην υποξεία τοξικότητα ο ρυθμός πρόσληψης της τροφής ήταν αντιστρόφως ανάλογος των συγκεντρώσεων του methamidophos, αφού για τις υψηλότερες δόσεις έφτασε μόνο το 8-15% του μάρτυρα για όλες τις ημέρες της έκθεσης, δείχνοντας σαφής τάση αποφυγής πρόσληψης της τροφής. Με τη χορήγηση καθαρού σιτηρεσίου, ο ρυθμός πρόσληψης τροφής για τις επεμβάσεις αυξήθηκε αναλογικά περισσότερο από τον μάρτυρα. Το σωματικό βάρος για τα ζώα πτηνά που τους χορηγήθηκε methamidophos, μειώθηκε από 7 έως 36,9%, από την ημέρα 0 μέχρι την ημέρα 5, ενώ για τα νεκρά ορτύκια, στη μεσαία και τις υψηλότερες συγκεντρώσεις, το μέσο σωματικό βάρος μειώθηκε από 32,8 έως 43%. Το γεγονός αυτό καταδεικνύει ότι παρ' όλο που τα πτηνά έπασχαν από τροφопενία μέχρι και την ημέρα 5 της έκθεσης στο

methamidophos παρ' όλα αυτά απέφευγαν την πρόσληψη τροφής. Επίσης η τροφοπενία δικαιολογεί και την αναλογικά μεγαλύτερη πρόσληψη τη τροφής την ημέρα 6 με τη χορήγηση καθαρού σιτηρεσίου. Το χαμηλό επίπεδο διατροφής όλες τις ημέρες της έκθεσης δικαιολογεί επίσης την σημαντική μείωση του σωματικού βάρους, τα σοβαρότερα κλινικά συμπτώματα στις υψηλότερες συγκεντρώσεις, αλλά και την θνησιμότητα, ή την επίδραση σε αυτή σε ένα σημαντικό βαθμό, ανεξάρτητα από την επίδραση του methamidophos. Ανάλογα, οι Forsyth and Martin (1993) διαπίστωσαν ότι μετά από εφαρμογή fenitrothion μειώθηκε η λήψη τροφής σε λευκόλαιμο σπουργιτοσίχλονο (*Zonotrichia albicollis*). Ανάλογες παρατηρήσεις για μείωση του σωματικού βάρους έχουν αναφερθεί για τρία σποροφάγα είδη, με dimethoate (Brunet and Cyr, 1992; Brunet et al. 1997) και με άλλα OPs σε πειραματισμό εργαστηρίου (Kalender et al. 2007). Όρνιθες εκτεθειμένες σε chlorpyrifos από το στόμα (10 mg/kg bw) έχασαν το 25% του σωματικού τους βάρους σε σχέση με το μάρτυρα, αλλά ανέκαμψαν στο μεγαλύτερο ποσοστό την 28^η ημέρα μετά την έκθεση (Richardson et al. 1993). Σύμφωνα με τους Farag et al. (2000) εφαρμογή 28 mg/kg/d acephate από το στόμα σε κυοφορούσες μύες οδήγησε σε μείωση του σωματικού βάρους των ενηλίκων ατόμων χωρίς να μειωθεί ο ρυθμός πρόσληψης της τροφής. Η μείωση του σωματικού βάρους οφείλεται στη μείωση του αριθμού και του βάρους των εμβρύων. Σύμφωνα με τους Ogutcu et al. (2008), στα τέλη της 4^{ης} και 7^{ης} wk παρατηρήθηκε μείωση στο σωματικό βάρος μετά από έκθεση dichlorvos σε επίμυες που οφείλεται σε μειωμένη πρόσληψη τροφής.

Στη μελέτη οξείας τοξικότητας, η αιμορραγία στον εγκέφαλο που διαπιστώθηκε στην μακροσκοπική παρατήρηση των ιστών για την μεγαλύτερη δόση των 25 mg/kg bw φαίνεται να συνδέεται με την επίδραση του methamidophos. Σύμφωνα με τους Kubo et al. (2000) η διέγερση του υποθαλάμου του εγκεφάλου προκαλεί αύξηση στην αρτηριακή πίεση με τη βοήθεια χολινεργικών εισροών ενώ σύμφωνα με τους Kubo et al. (2002) το σύστημα αγγειοτασίνης στον πρόσθιο υποθάλαμο είναι υπερδραστήριο σε υπερτασικούς επίμυες, η οποία οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα της απελευθέρωσης ACh. Αυτή η αλυσίδα οδηγεί σε υπέρταση.

Συμπερασματικά, τα στοιχεία αυτά δείχνουν ότι παρόλο που τα οπτικά σημάδια επίδρασης εξαφανίστηκαν μέσα σε λίγες ώρες μετά την εφαρμογή του methamidophos, οι φυσιολογικές επιπτώσεις των δόσεων του methamidophos που εκδηλώνουν κλινικά συμπτώματα σε είδη πτηνών μη στόχους μπορεί να διαρκέσουν αρκετές ημέρες μετά την εφαρμογή του ΦΠ στον αγρό. Ανάλογη συμπεριφορά παρατηρήθηκε σύμφωνα με

τον Hudson et al. (1984), όταν πτηνά εξακολουθούσαν να επηρεάζονται αρκετές ημέρες μετά την έκθεση σε υπο-θανατηφόρες δόσεις OPs, ανεξάρτητα αν παρουσίασαν αύξηση ή μείωση της δραστηριότητας αν και δεν υπήρχαν κλινικά συμπτώματα 24 h μετά την έκθεση τους. Σύμφωνα με τους Brunet and Cyr (1992) οι επιπτώσεις στο επίπεδο δραστηριότητας για τρία σποροφάγα είδη, συνεχίστηκε για περίπου 6-15 d μετά την έκθεση από το στόμα 5,5 mg dimethoate/kg bw. Αυτό είναι στο ίδιο εύρος όπως αναφέρθηκε για πτηνά, σε 12 d μετά την έκθεση από το στόμα 6,69 mg dimethoate/kg bw (Brunet et al. 1997).

Τα OPs είναι υπεύθυνα για επιδράσεις τερατογένεσης, και επιπτώσεις στο ανοσοποιητικό σύστημα, στις ορμόνες, στο αναπαραγωγικό σύστημα, στον αμφιβληστροειδή και το μεταβολισμό των λιπιδίων (Quest et al. 1990). Άλλες μελέτες έδειξαν ότι OPs όπως τα dichlorvos, soman και chlorfenvinphos άλλαξαν τις συγκεντρώσεις των κορτικοστερόνων (corticosterone) που κυκλοφορούν σε επίμυες και μύες (Fletcher et al. 1989). Εφαρμογή methamidophos από το στόμα σε τρωκτικά παρουσίασε σοβαρές επιδράσεις στην ανάπτυξη, συμπεριλαμβανομένου των σημείων εμφύτευσης των εμβρύων, στον ολικό αριθμό νεογνών (ζώντων και νεκρών) και σε αύξηση σε αρκετές ενδείξεις της τερατογένεσης (Hanafy et al. 1986). Άλλες μελέτες με methamidophos έδειξαν ότι προκαλεί γενετικές αλλαγές στα σπερματογόνα κύτταρα και μεταφερόμενες επιδράσεις στους απόγονους μετά από εφαρμογή στους γονείς (Amer and Sayed, 1987). Σύμφωνα με τους Burguel et al. (2000) εφαρμογή methamidophos 0,5-7,5 mg/kg bw σε άρρενες μύες οδήγησε σε δόσοεξαρτώμενη αλλαγή της μορφολογίας του σπέρματος 4 wk μετά την εφαρμογή. Παράλληλα επιδράσεις παρατηρήθηκαν στα έμβρυα (στη δόση των 5 mg/kg bw παρουσίασαν σημαντική αύξηση της διακοπής της αυλάκωσης) και επίδραση στη γονιμότητα των αρρένων αλλά και αύξηση του ποσοστού εκφυλισμού των εμβρύων. Το acephate έχει μεταλλαξιογόνο επίδραση (Fleck and Hollaender, 1982) σε κύτταρα θηλαστικών συμπεριλαμβανομένων του ανθρώπου και των πιθήκων (Carver et al. 1995), καθώς και καρκινογένεση (Garrett et al. 1986; Perocco et al. 1996). Πρόσθετα το acephate προκαλεί εμφάνιση ροζιδίων ανάλογα της δόσης και όγκους σε μύες (International Research, and Development Corporation, 1982) και επίμυες (Behera and Bhunya, 1989). Σύμφωνα με τους Farag et al. (2000) εφαρμογή 28 mg/kg/d από το στόμα acephate σε κυοφορούσες μύες οδήγησε σε χολινεργικά συμπτώματα και αλλαγή βάρους σε ιστούς με NOEC=7 mg/kg/d. Ανάλογα αποτελέσματα δημοσιεύθηκαν και για άλλα OPs (Bhatnagar and Soni, 1988) ενώ άλλα OPs δεν έδειξαν επιπτώσεις στην

ανάπτυξη μετά από έκθεση από το στόματος των γονέων (Stanton et al. 1994). Η αντίδραση της φωσφορυλίωσης στο acephate που είναι υπεύθυνη για την παρεμπόδιση της AChE (Ando, 1982) μπορεί την ίδια στιγμή να συνδέεται με την αλκυλίωση του κυτταρικού DNA, οδηγώντας σε μεταλλάξεις που πιθανόν σχετίζονται με εξωτερικές και σκελετικές δυσμορφίες στα ζώντα έμβρυα. Ανάλογη συμπεριφορά φαίνεται ότι ακολουθεί και το methamidophos (Burrue et al. 2000). Σύμφωνα με τον (Farag et al. 2000) εφαρμογή 14 και 28 mg/kg/d acephate από το στόμα σε άρρενες μύες οδήγησε σε μείωση της κινητικότητας και του αριθμού του σπέρματος μειώνοντας τον δείκτη γονιμότητας και οδηγώντας έτσι σε μείωση του βαθμού εμφύτευσης των εμβρύων και του αριθμού των νεογνών.

Σύμφωνα με τους Brimijoin and Koenigsberger (2005) τα αναπτυσσόμενα ζώα είναι πιο ευαίσθητα από τα ενήλικα άτομα στην οξεία τοξικότητα από χημικούς παράγοντες που παρεμποδίζουν τις ChEs, συμπεριλαμβανομένων των OPs, σε εργαστηριακές συνθήκες. Είναι πιθανόν αυτοί οι παράγοντες να επιδρούν δυσμενώς στην διαδικασία νευρωνικής ανάπτυξης, οδηγώντας σε μόνιμες ελλείψεις στην αρχιτεκτονική του κεντρικού και περιφερικού νευρικού συστήματος. Πρόσφατες παρατηρήσεις δείχνουν ότι η έκθεση OPs μπορεί να επηρεάσει τη σύνθεση του DNA και την επιβίωση των κυττάρων του εγκεφάλου σε νεογέννητους επίμυες. Νέα στοιχεία αποδεικνύουν ότι η AChE ενδέχεται να έχει άμεσο ρόλο στην νευρωνική διαφοροποίηση, ενώ συχνά ανατομικές μελέτες συνδέουν προσωρινές απότομες αλλαγές της έκφρασης της AChE με περιόδους αξονικής αύξησης σε εγκεφάλους αναπτυσσόμενων πτηνών, τρωκτικών και διάφορων πρωτευόντων. Μερικοί εκλεκτικοί παρεμποδιστές της ChE καταστέλλουν αποτελεσματικά τη νευρωνική αύξηση, όπως έχει γίνει σε συστήματα-μοντέλα με διαχωρισμό των κυττάρων του νευροβλαστώματος και σε αισθητικά γάγγλια (sensory ganglia). Είναι πιθανόν ότι ορισμένες χημικές ουσίες παρεμβαίνουν σε σημαντικές λειτουργίες ανάπτυξης της οικογένειας των ενζύμων της ChE.

4.1.2 Βιοχημικές-ιστοχημικές παρατηρήσεις

Στα σπονδυλωτά, τόσο η AChE όσο και η BuChE χρησιμοποιούνται συνήθως ως βιοσημαντές για την εκτίμηση της έκθεσης τους σε ΦΠ. Οι εστεράσες διακρίνονται εύκολα με τη χρήση ειδικού υποστρώματος (Massoulié et al. 1993), ενώ στις μελέτες με το methamidophos χρησιμοποιήσαμε τα υποστρώματα ASCh, BuSCh και PrSCh. Επειδή τα ASCh και PrSCh δεν είναι πλήρως επιλεκτικά, ο έλεγχος με τα διαγνωστικά υποστρώματα, επιβεβαιώθηκε με τους διαγνωστικούς παρεμποδιστές (Silver, 1974). Η παρεμπόδιση της ενζυμικής δραστηριότητας που παρατηρήθηκε κατά την εξέταση των ιστών, μετά την έκθεση *in vivo*, παρέχει μια καθαρή έκφραση της ευαισθησίας του οργανισμού όσον αφορά την λήψη, τον μεταβολισμό και τους μηχανισμούς αποτοξίνωσης.

Η βιοχημεία στον πειραματισμό οξείας και υποξείας τοξικότητας έδειξε σημαντική μείωση της δραστηριότητας των ChEs στο πλάσμα, τον εγκέφαλο και το ήπαρ των ενήλικων και νεαρών ορτυκιών, μετά την έναρξη του πειραματισμού. Τα συνολικά αποτελέσματα δείχνουν ότι ακόμη και σε πολύ χαμηλά επίπεδα έκθεσης, η δραστηριότητα των ChEs μπορεί να μειωθεί σημαντικά. Η ιστοχημεία αναλόγως έδειξε σημαντική διαφοροποίηση της δραστηριότητας των ChEs στον εγκέφαλο, το δωδεκαδάκτυλο και το ήπαρ των ενήλικων και νεαρών ορτυκιών.

Στην μελέτη οξείας τοξικότητας οι παρατηρήσεις από τις ιστοχημικές χρώσεις για τις ChE συμφωνούν σε κάποιο βαθμό με τα βιοχημικά αποτελέσματα. Αυτό μας επιτρέπει να συνδυάσουμε την ποσοτική εκτίμηση της επίδρασης του methamidophos που καταδεικνύεται από τις βιοχημικές μετρήσεις με τον προσδιορισμό στον ιστό-στόχο αυτών των επιδράσεων. Κατά συνέπεια, καθίσταται εφικτός και ο προσδιορισμός του πιθανού μηχανισμού αυτής της επίδρασης. Αντιθέτως στην διατροφική μελέτη τοξικότητας οι παρατηρήσεις από τις ιστοχημικές χρώσεις, σε μεγάλο βαθμό, δεν ήταν σε συμφωνία με τις βιοχημικές μετρήσεις. Οι Bajgar et al. (2007) διαπίστωσε καλή συσχέτιση στα βιοχημικά και ιστοχημικά αποτελέσματα στη δραστηριότητα των AChE μετά από οξεία έκθεση sarin, soman ή VX και την ανάλυση διάφορων τμημάτων του εγκεφάλου σε επίμυες.

Στον εγκέφαλο των ορτυκιών τα αποτελέσματα και από τις δύο μελέτες δείχνουν ότι το methamidophos προκαλεί ιστολογικές αλλοιώσεις, η ένταση και η έκταση των οποίων εξαρτώνται από τη δόση/συγκέντρωση καθώς και από το χρόνο για την οξεία και λιγότερο από την υποξεία τοξικότητα. Αυτές οι αλλοιώσεις

περιλαμβάνουν άτυπη κυτταρική μορφολογία σε επίπεδο πυρήνων (καρυομεγαλία, πυκνωτικοί πυρήνες) ή/και σε επίπεδο κυτταροπλάσματος, κενοτόπια που εμφανίζονται είτε μεμονωμένα, είτε σε μικρές ομάδες κυττάρων (εστιακά), είτε προσδίδουν σε μεγάλα τμήματα του ιστού την εικόνα της διατάραξης της ιστικής αρχιτεκτονικής (σπογγειόμορφος ιστός). Πειραματικές μελέτες σε θηλαστικά έχουν αναφέρει νέκρωση νευρώνων στον υπόκαμφο, στον ενδορινικό (enthorinal) και στον μετωπιαίο φλοιό (frontal) του εγκεφάλου, στο σύμπλεγμα του αμυγδαλοειδούς πυρήνα (amygdaloid complex), στον κερκοφόρο πυρήνα (caudate nuclei) και στο θάλαμο (thalamus), λόγω οξείας τοξικότητας OP (Lemerrier et al. 1983; Petras, 1984; Wall et al. 1987; Baze, 1993; Britt et al. 2000). Τα περισσότερα από τα άτομα σε αυτές τις μελέτες είχαν υποστεί σπασμούς και αναπνευστική ανεπάρκεια. Οι Pelegrino et al. (2006) ανέφεραν μορφολογικές αλλαγές σε συγκεκριμένες περιοχές του εγκεφάλου των επίμυων που έλαβαν 2,5 ή 5,0 mg methamidophos/kg μία φορά την εβδομάδα για 20 wk ενώ η Latuszynska et al. (2003) αναφέρει ελαφρές ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις σε διάφορες περιοχές του εγκεφάλου καθώς και αύξηση της πυκνότητας του κυτταροπλάσματος των νευρικών κυττάρων μετά από χορήγηση chlorpyrifos από δέρματος. Δεδομένου ότι το μοριακό στρώμα αποτελείται βασικά από διακλαδώσεις δενδριτών και αξόνων των νευρώνων, πιστεύεται ότι σε χαμηλές επαναλαμβανόμενες δόσεις, αυτό το OP θα επιφέρει την απώλεια ή ατροφία των διακλαδώσεων των νευρώνων. Επίσης, ιστοπαθολογικές αλλαγές σε εγκέφαλο μακάκων (*Macaca mulatta*) που εκτέθηκαν σε OPs αποτελούνταν από νέκρωση νευρώνων, σπογγείωση, γλοιώση αστροκύτωση και αγγείωση (Britt et al. 2000). Η εγκεφαλική βλάβη είναι ένα χαρακτηριστικό γνώρισμα των νευροπαθειών και των τοξικών καταστάσεων (Jortner, 2000). Ομοίως, σύμφωνα με τους Yehia et al. (2007), σε κουνέλια μετά από έκθεση (βουτηγμένα σε διάλυμα για 10 s) σε diazinon (3 mg/l), παρατηρήθηκαν ιστοπαθολογικές μεταβολές του ήπατος, των νεφρών και του εγκεφάλου. Η εφαρμογή επαναλήφθηκε μετά από 10 d και τα ζώα θυσιάστηκαν μεταξύ 0 και 21 d μετά τη δεύτερη εφαρμογή. Οι εγκεφαλικές βλάβες αποτελούνται από υπερχρωματικούς και πολυμορφικούς πυρήνες με περιπυρηνικά κυτταροπλασματικά κενοτόπια. Επιπλέον, παρατηρήθηκαν περιοχές με πολλαπλασιασμό μικρών κυττάρων και συμφόρηση των αιμοφόρων αγγείων.

Η ιστοχημική ανίχνευση με χρώση για την AChE στον εγκέφαλο έχει χρησιμοποιηθεί σε επίμυες (Lassiter et al. 1998) αλλά και σε άλλους ιστούς (Bigbee et al. 2000) καθώς και για την ιστοχημική ανίχνευση για την BuChE σε εγκέφαλο επίμυων (Geula et al. 1993; Geula et al. 1995; Lassiter et al. 1998; Geula and Nagykerly, 2006).

Στη βιοχημεία στα ενήλικα άτομα, η έκφραση των ChEs στον εγκέφαλο, δικαιολογεί τον χαρακτηρισμό της ως AChE με ίχνη από BuChE, ενώ στην διατροφική μελέτη, στα νεαρά ορτύκια, η έκφραση των ChEs στον εγκέφαλο δικαιολογεί τον χαρακτηρισμό τους ως AChE και BuChE, όπως έχει δημοσιευτεί και σε διάφορα τμήματα του εγκεφάλου σε επίμυ (Gupta, 2004) ακόμα και σε σχέση και με την ηλικία (Lassiter et al. 1998). Για το πλάσμα και το ήπαρ, η ChE χαρακτηρίζεται ως BuChE από κάθε άποψη. Όλα τα υποστρώματα υδρολύονται σχεδόν με τον ίδιο ρυθμό.

Στα νεαρά ορτύκια, στον μάρτυρα, οι τιμές δραστηριότητας των ChEs στον εγκέφαλο για τα υποστρώματα με ASCh (μετά την αφαίρεση της συμμετοχής του BuChE) ή PrSCh, ήταν διπλάσιες των αντίστοιχων της οξείας τοξικότητας ενώ, για το BuChE ήταν σημαντικά υψηλότερες, γεγονός που πιθανόν οφείλεται στο φυσιολογικό ρόλο των BuChE αφού εμπλέκονται στην νευρωνική ανάπτυξη του εγκεφάλου (Burt, 1975; Drews, 1975; Dudai and Yavin, 1978; Kristt, 1979; Kostovic and Rakic, 1984; Robertson et al. 1985; Layer and Sporns, 1987; Robertson, 1987; Jeune and Jourdan, 1991; Alber et al. 1994; Geula et al. 1995; Layer and Willbold, 1995; Greenfield, 1996; Layer, 1996; Small et al. 1996; Mack and Robitzki, 2000; Geula and Nagykerly, 2006). Οι Lassiter et al. (1998) παρατήρησαν, βιοχημικά, ότι ο δείκτης της δραστηριότητας BuChE/AChE μειώνεται καθώς ωριμάζει η περιοχή, στοιχεία που είναι παράλληλα με το μοντέλο ανάπτυξης αυτών των εστερασών στο νευρικό σύστημα των νεαρών ατόμων.

Για να προσδιοριστούν αν υπάρχουν άλλες μη ειδικές εστεράσες, που είναι ικανές να μεταβολίζουν το υπόστρωμα ASCh, χρησιμοποιήθηκε ένας μη επιλεκτικός παρεμποδιστής των ChEs, η eserine. Η ενζυμική δραστηριότητα παρεμποδίστηκε σε πολύ υψηλά ποσοστά που πολλές φορές αγγίζουν το 100%, επιβεβαιώνοντας ότι η δραστηριότητα των εστερασών που καταγράφηκαν οφειλόταν στις ChEs και όχι σε άλλα είδη εστερασών (Eto, 1974; Silver, 1974; Thompson and Walker 1994). Στις μελέτες των βιοσημαντών, η γνώση αυτή είναι πολύ σημαντική δεδομένου ότι οι ιστοί μπορεί να περιέχουν σημαντικές ποσότητες μη ειδικών εστερασών, οι οποίες συμβάλλουν στην μετρήσιμη δραστηριότητα ενώ μπορεί να είναι περισσότερο ή λιγότερο ευαίσθητες από τις ChEs στις αντι-ChEs τοξικές ουσίες (Garcia et al. 2000).

Στον πειραματισμό οξείας τοξικότητας, το ποσοστό της παρεμπόδισης των ChEs στον εγκέφαλο με το ASCh κυμάνθηκε κατά μέσο όρο περίπου 60%, 1 h μετά την έκθεση (λίγο μεγαλύτερη στις μεγαλύτερες δόσεις 0,5 h μετά την έκθεση) σε μια μέση τιμή περίπου 15% για τις ίδιες δόσεις μετά από 14 d. Με το PrSCh οι τιμές

διαφοροποιούνται μετά από 14 d όταν η μέση τιμή της παρεμπόδισης παραμένει σε υψηλά επίπεδα, περίπου 38%. Το μέγιστο της παρεμπόδισης της AChE στον εγκέφαλο σε πτηνά εμφανίζεται γενικά κατά τις πρώτες ώρες μετά την έκθεση σε OP, όπως φαίνεται στα ορτύκια, 4 και 8 h μετά τη χορήγηση dicrotophos (Fleming and Grue, 1981) και chlorpyrifos (Soler-Rodriguez et al. 1998), αντίστοιχα. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν σε *Taeniopygia guttata* 1-3 h μετά την έκθεση τους σε fenitrothion (Holmes and Boag, 1990), καθώς και σε ευρωπαϊκά ψαρόνια (*Sturnus vulgaris*) 6 h μετά τη χορήγηση triazophos (Thompson et al. 1991) και σε νεαρές πάπιες (Fleming, 1981). Σε μελέτη τοξικότητας από το στόματος, παρατηρήθηκε επίσης παρεμπόδιση της δραστηριότητας της ChE σε ορτύκι από εφαρμογή parathion σε διάφορες δόσεις και χρονικά διαστήματα (10,4-46% παρεμπόδιση ChE σε δόσεις 0,5-6 mg/kg, 30 min-24 h μετά την εφαρμογή) (Dieter and Ludke, 1975; Rattner et al. 1987) και σε αζτεκόγλαρο (*Larus atricilla*) 46% παρεμπόδιση ChE σε δόση 5 mg/kg, 18 h μετά την εφαρμογή) (King et al. 1984).

Στη διατροφική μελέτη για όλες τις ChEs τα υψηλά ποσοστά παρεμπόδισης στον εγκέφαλο παρατηρήθηκαν, από την ημέρα 1 και μετά, ενώ από την ημέρα 0 για τη μεγαλύτερη συγκέντρωση. Την ημέρα 0 για τις 2 χαμηλότερες δόσεις, η δραστηριότητα των εστερασών ήταν μεγαλύτερη από τον μάρτυρα. Η επίδραση στην BuChE ήταν ανάλογη με την AChE. Με τη χορήγηση καθαρού σιτηρεσίου ακόμα και 3 ημέρες μετά, η παρεμπόδιση της δραστηριότητας των εστερασών ήταν μεγάλη. Με το PrSCh η παρεμπόδιση της δραστηριότητας ήταν ανάλογη της AChE, εκτός από την ημέρα 1 όπου η δραστηριότητα δεν αυξήθηκε σε σχέση με το μάρτυρα στις χαμηλότερες συγκεντρώσεις ενώ παρεμποδίστηκε περισσότερο στις υψηλότερες. Λόγω της ύπαρξης σημαντικής ποσότητας BuChE πιθανόν, σε αντίθεση με ενήλικα ορτύκια στην οξεία τοξικότητα, οι τιμές δραστηριότητας των εστερασών με PrSCh ήταν υψηλότερες των AChE. Για νεκρά ορτύκια το ποσοστό παρεμπόδισης των εστερασών είναι ανάλογα των ζώντων, με την AChE να είναι παρεμποδισμένη > 50%.

Στη ιστοχημεία οι χρώσεις για την ανίχνευση για ChEs στον εγκέφαλο, στα ενήλικα ορτύκια, αποδεικνύουν σαφώς την ύπαρξη δύο διακριτών ενζύμων, AChE και BuChE ενώ στα νεαρά ορτύκια, η παρουσία της BuChE είναι πολύ έντονη. Και στις δύο μελέτες, στον εγκέφαλο η ιστοχημική ανίχνευση για την AChE, δεν παρατηρήθηκε στους πυρήνες των κυττάρων, ενώ ήταν ορατή στις αποφυάδες (δενδρίτες και νευρίτες) των νευρικών κυττάρων, σε δέσμες νευρικών απολήξεων αλλά και μεγαλύτερων νεύρων. Στα ενήλικα ορτύκια η συνολική χρώση για την AChE σε όλες τις

δόσεις/συγκεντρώσεις methamidophos ήταν χαμηλότερη του μάρτυρα ενώ στα νεαρά ορτύκια σημαντικά υψηλότερη. Η ιστοχημική ανίχνευση για την BuChE στα ενήλικα ορτύκια περιορίστηκε σε λίγα κύτταρα, σημαντικά λιγότερα από την AChE, ενώ σε αντίθεση με την AChE, παρατηρήθηκε χρώση στον πυρήνα των κυττάρων, αλλά όχι στις αποφυάδες (δενδρίτες και νευρίτες) των νευρικών κυττάρων και στα νεύρα. Στα νεαρά ορτύκια, σε αντίθεση με την οξεία τοξικότητα, η χρώση ήταν έντονη κοντά στις κυτταροπλασματικές μεμβράνες αλλά όπως και στην οξεία τοξικότητα, δεν παρατηρήθηκε στις αποφυάδες (δενδρίτες και νευρίτες) των νευρικών κυττάρων και στα νεύρα. Στα ενήλικα ορτύκια η συνολική χρώση για την BuChE ήταν πολύ χαμηλή για να αξιολογηθεί ενώ στα νεαρά ορτύκια σε όλες τις συγκεντρώσεις methamidophos ήταν σημαντικά χαμηλότερη του μάρτυρα.

Διάφορες μελέτες συμφωνούν σχετικά με τη χαμηλή ένταση της κατανομής των BuChE θετικών κυττάρων στον εγκέφαλο του ενήλικου επίμου (Robertson and Mostamand, 1988; Tago et al. 1992; Darvesh et al. 1992). Ανάλογη εικόνα ως προς το πλήθος των χρωσμένων κυττάρων παρατήρησε και ο Lassiter et al. (1998) σε τμήματα του εγκεφάλου σε επίμου. Η συνολική κατανομή των BuChE θετικών κυττάρων στον εγκέφαλο του επίμου έχει αναφερθεί σε ένα αριθμό ερευνών (Tago et al. 1992; Darvesh et al. 1992; Krupnik and Paterson, 1993). Ανάπτυξη της BuChE στην παρεγκεφαλίδα, των γαγγλίων της ραχιαίας ρίζας και του ακουστικού εγκεφαλικού στελέχους αποτέλεσε το αντικείμενο άλλων ερευνών (Robertson et al. 1991; Krupnik and Paterson, 1993; Koenigsberger et al. 1998). Οι Darvesh et al. (1998) έχουν περιγράψει την ύπαρξη εκτεταμένης BuChE θετικών νευρώνων μέσα στον ιππόκαμπο και την αμυγδαλή του ανθρώπινου εγκεφάλου, ενώ ο ιππόκαμπος του εγκεφάλου επίμων βρέθηκε να είναι εντελώς απαλλαγμένος από BuChE στους νευρώνες κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης και στο ενήλικο ζώο (Geula and Nagykerly, 2006). Οι παρατηρήσεις αυτές δείχνουν σημαντικές διαφορές ανάμεσα στα είδη στην παρουσία και η κατανομή των BuChE θετικών νευρώνων, τουλάχιστον μέσα στον φλοιό του εγκεφάλου. Σύμφωνα με τους Lassiter et al. (1998) η ιστοχημική δραστηριότητα της BuChE αυξανόταν μέχρι την ενηλικίωση στους πυρήνες του θαλάμου (thalamic nuclei) ενώ στη παρεγκεφαλίδα μειώθηκε. Σύμφωνα με τους Geula and Nagykerly (2006) στη μεταγεννητική ανάπτυξη της δραστηριότητας της BuChE στον εγκέφαλο των τρωκτικών, στο στάδιο των 30 ημερών μετά τη γέννηση, (P30) επανέρχεται το μοντέλο των ενήλικων όπου έχουμε παροδική παρουσία πολύ χαμηλής έντασης του BuChE σε όλους

τους νευρώνες και με μεγαλύτερη ένταση στους νευρώνες του θαλάμου, υποστηρίζοντας το ρόλο αυτού του ενζύμου στη νευρωνική ανάπτυξη.

Μόνο περιστασιακά AChE θετικοί πυραμιδικοί νευρώνες παρατηρήθηκαν στο φλοιό του εγκεφάλου των ενηλίκων και όλα αυτά με πολύ αχνή χρώση. Επίσης έχει καταδειχθεί η παρουσία δραστηριότητας ChE σε νευρογλοιακά κύτταρα (Wright et al. 1993a; Tago et al. 1992). Σύμφωνα με τους Lassiter et al. (1998) η ιστοχημική δραστηριότητα της AChE αυξανόταν μέχρι την ενηλικίωση. Σύμφωνα με τους Yehia et al. (2007), σε κουνέλια μετά από έκθεση (βουτηγμένα σε διάλυμα για 10 s) σε diazinon (3 mg/l) παρατηρήθηκε αναστολή της δραστηριότητας της AChE στους περισσότερους υπερχρωματικούς νευρώνες και στις περιοχές του πολλαπλασιασμού της κοκκώδους στιβάδας.

Παλαιότερες μελέτες σε σπονδυλωτά με ιστοχημικές χρώσεις έχουν χαρακτηρίσει τις AChE και BuChE σε περιοχές του εγκεφάλου (Mesulam et al. 2002). Καθώς ο εγκέφαλος αναπτύσσεται, από την κυτταρική διαίρεση στην μετανάστευση και τη νευρωνική διαφοροποίηση, ο λόγος BuChE/AChE μειώθηκε σημαντικά, δείχνοντας ότι η δραστηριότητα των BuChE και AChE μπορεί να οφείλεται στην νευρωνική ανάπτυξη (Layer, 1983; Robertson, 1987; Robertson and Mostamand, 1988; Robertson et al. 1989; Liu et al. 1990; Robertson et al. 1991; Okoyama et al. 1996; Lassiter et al. 1998).

Στην πραγματικότητα, σε ορισμένες περιπτώσεις η ιστοχημική χρώση για την BuChE φάνηκε να ανήκει σε νευρογλοιακά κύτταρα, που αναγνωρίζονται από το μέγεθος και τη θέση τους, και συμφωνεί με προηγούμενες δημοσιεύσεις σε εγκέφαλο πτηνών, θηλαστικών, συμπεριλαμβανομένου του ανθρώπινου (Dubovy, 1991; Haninec and Dubovy, 1992; Wright 1993a, b; Mesulam et al. 2002) ενώ στις ίδιες μελέτες, ο εγκέφαλος διαπιστώθηκε ότι είναι η πλουσιότερη πηγή BuChE ακολουθούμενη από τον πνεύμονα και την καρδιά.

Και στις δύο μελέτες η χρώση για ChEs που υδρολύουν την PrSCh προφανώς, δεν περιορίζεται σε νευρώνες, αλλά επιπλέον παρατηρείται και στα ερυθρά αιμοσφαίρια ενώ συχνά επισημαίνονται σε τμήματα των τοιχωμάτων των αιμοφόρων αγγείων. Με τους παρεμποδιστές iso-OMPA και BW284C51 εμφανίζει το ίδιο μοτίβο χρώσης με το PrSCh στα ενήλικα ορτύκια ενώ στα νεαρά ορτύκια η χρώση στους πυρήνες είναι πιο έντονη. Στα ενήλικα και στα νεαρά ορτύκια η συνολική χρώση της ChE που υδρολύουν την PrSCh, σε όλες τις δόσεις/συγκεντρώσεις methamidophos ήταν υψηλότερη του μάρτυρα. Η έλλειψη ποιοτικής διαφοράς με το PrSCh, με και

χωρίς τους παρεμποδιστές, πιθανόν να οφείλεται σε διαφορές στη μοριακή δομή των ChEs στον εγκέφαλο, τη σχετική ευαισθησία τους σε παρεμποδιστές, ή την ιστοχημική έκφραση άλλων εστερασών.

Στην οξεία τοξικότητα και στα ενήλικα άτομα, η χωροταξική κατανομή της χρώσης για την AChE και για τις ChEs που υδρολύουν την PrSCh ήταν εμφανής παντού, ενώ η BuChE παρατηρήθηκε στο φλοιό του εγκεφάλου. Καθώς οι δόσεις αυξάνονται, από τη χαμηλότερη στην μεσαία δόση, η BuChE γεμίζει όλη την επιφάνεια από την περιφέρεια προς το κέντρο του εγκεφάλου. Η χρώση για την ανίχνευση για AChE, και BuChE, που παρατηρήθηκε μετά από την έκθεση με το methamidophos δεν είχε απόλυτα ανάλογη συσχέτιση με τα βιοχημικά αποτελέσματα ενώ αξίζει να επισημανθεί επίσης η έντονη παρουσία ευρύτερα μεμονωμένων νευρικών δικτύων και νευρών με χρώση για την AChE, 14 d μετά την έκθεση σε αντίθεση με τη παρουσία λίγων νευρικών δικτύων, σε όλες τις δόσεις μέχρι την ημέρα 1. Η μείωση στις τιμές των βιοχημικών αποτελεσμάτων της AChE σε σύγκριση με τον μάρτυρα τις πρώτες ημέρες και η αύξηση της παραγωγής νέων AChE (μείωση παρεμπόδισης) έως την ημέρα 14, δεν αποτυπώθηκε απόλυτα στην ιστοχημική χρώση, όπου παρατηρήθηκε συνολική μείωση της ποσοτικής έκφρασης της χρώσης σε σύγκριση με το μάρτυρα, ενώ είναι πιθανόν η χρώση να εκφράζεται τόσο στα ανενεργά από το methamidophos νευρικά κύτταρα όσο και στα ενεργά. Ανάλογα για την BuChE στα νευρικά κύτταρα, η πολύ μικρή δραστηριότητα, όπως αποτυπώνεται τόσο στα βιοχημικά αποτελέσματα όσο και στην ιστοχημική χρώση δεν δίνει αξιοποιήσιμα αποτελέσματα από μόνα τους, εκτός ίσως από το γεγονός της μείωσης της συνολικής ιστοχημικής χρώσης αυξανόμενης της δόσης του methamidophos και της τάσης για κάλυψη όλου του χώρου, με το πέρασμα του χρόνου για τα ζώντα ορτύκια, στα νευρικά κύτταρα με τη παραγωγή νέας BuChE. Η χρώση για την ανίχνευση για ChEs που υδρολύουν την PrSCh, είχε αντίθετη συσχέτιση με τα βιοχημικά αποτελέσματα, με μικρότερη όμως τάση ανάκαμψης, για όλες τις δόσεις. Η συνολική ποσοτική έκφραση της χρώσης στον μάρτυρα, υπολογίστηκε στο 77% της αντίστοιχης για την AChE, ενώ οι δόσεις του methamidophos είχαν αυξημένη ποσοτική έκφραση της χρώσης σε σύγκριση με τον μάρτυρα. Στις δόσεις του methamidophos όμως, με την αντίδραση του οργανισμού και την παραγωγή νέων ChEs, τόσο η ιστοχημική χρώση για την AChE όσο και των ChEs με PrSCh, είναι στο ίδιο επίπεδο σε απόλυτες τιμές, σε σύγκριση όμως με τον μάρτυρα φαίνεται ως παρεμπόδιση στις AChE και ως αύξηση στις ChE με PrSCh. Η παραγωγή

νέων εστερασών μέσα στα νευρικά κύτταρα, με τη επίδραση του methamidophos, εκφράστηκε τόσο βιοχημικά όσο και ιστοχημικά.

Στα νεαρά ορτύκια στη μελέτη διατροφής, η χωροταξική κατανομή της χρώσης, σε αντίθεση με την οξεία τοξικότητα στο μάρτυρα, για την BuChE ήταν εμφανής παντού στον ιστό, ενώ για την AChE και για της ChEs που υδρολύουν την PrSCh ήταν στο φλοιό. Από τις χαμηλότερες στις υψηλότερες συγκεντρώσεις methamidophos, η χρώση αυξανόταν από τις εξωτερικές στοιβάδες προς τις εσωτερικές, ενώ ειδικότερα στις δύο μεγαλύτερες συγκεντρώσεις η χρώση πλέον ήταν εμφανής παντού στον ιστό, εντονότερα για τις ChEs που υδρολύουν την PrSCh. Η ποσοτική εκτίμηση της χρώσης για την AChE στον μάρτυρα, είχε το 1/3 (30,5%) της οξείας τοξικότητας, ενώ σε αντίθεση με αυτήν, η χρώση σε όλες τις συγκεντρώσεις του methamidophos αυξήθηκε σημαντικά παράλληλα με το «γέμισμα» του εσωτερικού των ιστών, χωρίς αυτή η αύξηση να προσεγγίζει τη μείωση των τιμών σε αντίστοιχες δόσεις methamidophos που παρατηρήθηκαν στη οξεία τοξικότητα, αποδεικνύοντας την μεγαλύτερη ύπαρξη του ενζύμου στα ενήλικα άτομα. Η αύξηση της χρώσης, σε όλες τις συγκεντρώσεις του methamidophos, είναι σε αντίθεση με τα βιοχημικά αποτελέσματα στον εγκέφαλο όπως αναλύθηκε ανωτέρω, όπου παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της δραστηριότητας της AChE, πιθανόν γιατί η χρώση εκφράζεται τόσο στα ανενεργά από το methamidophos νευρικά κύτταρα όσο και στα ενεργά.

Ανάλογα για την BuChE, η χρώση που παρατηρήθηκε ήταν πολύ έντονη, σε πλήρη αντίθεση με την ελάχιστη χρώση στην οξεία τοξικότητα, ενώ σε όλες τις συγκεντρώσεις του methamidophos η ποσοτική εκτίμηση της χρώσης μειώθηκε περίπου 50%. Η χρώση για την BuChE λοιπόν έδειξε ανάλογη συμπεριφορά με την AChE στην οξεία τοξικότητα, γεγονός που σχετίζεται με τα βιοχημικά αποτελέσματα και τις αναφορές στη βιβλιογραφία, όπως καταγράφηκαν στην προηγούμενη ενότητα.

Η χρώση για την ανίχνευση για ChEs που υδρολύουν την PrSCh είχε ανάλογες τιμές και συμπεριφορά με την AChE, αλλά αντίθετη συμπεριφορά με την αντίστοιχη χρώση στην οξεία τοξικότητα. Και στις δύο δοκιμές λοιπόν, οξείας και υποξείας τοξικότητας σε ορτύκι, οι ChE που υδρολύουν την PrSCh συμπεριφέρθηκαν ανάλογα με την AChE και όχι την BuChE. Η χρώση για την ανίχνευση για ChEs που υδρολύουν την PrSCh, είχε αντίθετη συσχέτιση με τα βιοχημικά αποτελέσματα όταν παρατηρήθηκε συνολική μείωση της δραστηριότητας των ChEs με την έκθεση των ορτυκίων στο σιτηρέσιο.

Στην οξεία τοξικότητα η συνολική μειωμένη ποσοτική έκφραση της χρώσης στον μάρτυρα (77% της αντίστοιχης για την AChE), οφείλεται κυρίως στην μειωμένη ένταση των χρωσμένων κυττάρων, γεγονός που δείχνει ότι ένα ποσοστό AChE (ενήλικα πτηνά) πιθανόν να μην εκφράζεται ιστοχημικά πλήρως με την PrSCh, ανάλογη με το πειραματισμό υποξείας τοξικότητας (νεαρά πτηνά) όπου ένα ποσοστό BuChE πιθανόν να μην εκφράζεται ιστοχημικά πλήρως με την PrSCh. Η συμπεριφορά όμως αυτή δεν ισχύει, τόσο στα ιστοχημικά αποτελέσματα του δωδεκαδακτύλου, όπως θα αναλυθεί κατωτέρω όπου τα ιστοχημικά αποτελέσματα με PrSCh εκφράζουν πλήρως και ακόμη περισσότερο τη χρώση για την BuChE (ελεύθερες μορφές), όσο και στα βιοχημικά αποτελέσματα (υδατικά διαλύματα) του εγκεφάλου (πειραματισμός οξείας και υποξείας τοξικότητας). Η έλλειψη πλήρους έκφρασης των ChEs με PrSCh πιθανόν να οφείλεται στην ισχυρή παρουσία δεσμευμένων μορφών ChEs στις μεμβράνες των εγκεφαλικών νευρικών κυττάρων. Οι AChE και BuChE υπάρχουν στους περισσότερους ιστούς σε 2 μορφές, ελεύθερη (σφαιρική) και σε μορφές που είναι δεσμευμένες σε κυτταρικές μεμβράνες. Ο βαθμός των ελεύθερων ChEs κυμαίνεται από εντελώς ελεύθερη μορφή στο πλάσμα και την καρδιά στην σχεδόν εξ ολοκλήρου δεσμευμένη σε κυτταρικές μεμβράνες, αδιάλυτη με τη χρήση μόνο κάποιου διαλύματος αντίδρασης χωρίς άλας ή μη ιονικού απορρυπαντικού, όπως στον εγκεφαλικό ιστό. Υπάρχει, ωστόσο, ποικιλία από διαφορετικές μοριακές μορφές που κυμαίνονται από σφαιρικά μονομερή (G1), διμερή (G2), και τετραμερή (G4) σε ασύμμετρες μορφές στις ουρές κολλαγόνου (A4, A8 και A12) στις οποίες τα τετραμερή συνδέονται σε στηρικτικές πρωτεΐνες (Chattonnet και Lockridge, 1989; Massoulié et al. 1999). Σε ζώα που εκτέθηκαν σε ένα παρεμποδιστή της AChE, το diisopropylphosphorofluoridate (Meneguz et al. 1989), το chlorpyrifos (Ricceri et al. 2003), ή το soman (Lintern et al. 1998), παρεμποδίστηκε κυρίως η μορφή G4 του εγκεφάλου. Η BuChE στον ανθρώπινο εγκέφαλο και η υδατοδιαλυτή G4 μορφή της BuChE στο πλάσμα έχουν ολόδια διαδοχή αμινοξέων ενώ το 94% της ύπαρξης της BuChE στο πλάσμα είναι στην υδατοδιαλυτή μορφή G4 με προέλευση που πιστεύεται ότι είναι το ήπαρ (Chattonnet and Lockridge, 1989).

Είναι αποδεδειγμένο ότι ο γαστρεντερικός σωλήνας απορροφά ταχύτατα χημικές ουσίες, εάν η μη ιονισμένη μορφή τους είναι διαλυτή στα λιπίδια. Το έντερο είναι μια άλλη περιοχή για τον μεταβολισμό των εντομοκτόνων (Larini, 1979), και ως εκ τούτου, αυτά μπορούν να επιδράσουν στη δομή, τοπικά, των εντερικών κυττάρων.

Στην μελέτη οξείας και υποξείας τοξικότητα τα αποτελέσματα δείχνουν ότι το methamidophos προκαλεί ιστολογικές αλλοιώσεις στο δωδεκαδάκτυλο των εκτιθέμενων ορτυκίων, αναλόγως των δόσεων/συγκεντρώσεων. Αυτές οι μεταβολές κυμαίνονται, από βλάβες της επιφάνειας του βλεννογόνου μέχρι εκτεταμένη βλάβη του βλεννογόνου και του τοιχώματος του δωδεκαδακτύλου. Στην μελέτη υποξείας τοξικότητας οι βλάβες στο βλεννογόνο φαίνονται να αποκαθίστανται με τη χορήγηση καθαρού σιτηρεσίου αλλά μόνο για τη μεσαία συγκέντρωση.

Στο δωδεκαδάκτυλο και στις δύο μελέτες, η χρώση για την AChE παρατηρήθηκε στους εντερικούς νευρώνες, σημαντικά εντονότερη στη μελέτη διατροφής, και στα δύο μεντερικά και υποβλεννογόνια γάγγλια, οι νευράξωνες και τα νεύρα ήταν κατανομημένα σε όλες τις τομές στο εντερικό τοίχωμα του δωδεκαδακτύλου. Η χρώση για την BuChE είναι έντονη και εκτεταμένη, λιγότερη για την οξεία τοξικότητα, με εξαίρεση τα γάγγλια, τα εσωτερικά νεύρα και στην tunica muscularis. Η χρώση για ChEs με PrSCh ήταν εκτεταμένη ανάλογη των BuChE για την οξεία τοξικότητα, συμπεριλαμβανομένων όμως και των εντερικών νευρώνων. Στη δοκιμή υποξείας τοξικότητας η χρώση για ChEs με PrSCh ήταν σημαντικά εντονότερη από την BuChE και AChE μαζί γεγονός που μας δείχνει ότι πιθανώς να εκφράζει και μη ειδική χρώση. Η χρήση του PrSCh ως υπόστρωμα με iso-OMPA και BW284C51 είχε ως αποτέλεσμα την πλήρη εξάλειψη της χρώσης. Φαίνεται λοιπόν ότι προφανώς το iso-OMPA ανέστειλε πλήρως την έκφραση της BuChE.

Σε προηγούμενες μελέτες παρατηρήθηκε η BuChE σε επιθηλιακά κύτταρα εντέρου του επίμου, κυρίως στις κρύπτες και στις λάχνες, γεγονός που υποδηλώνουν ότι η BuChE μπορεί να εμπλέκεται στο μεταβολισμό των λιπιδίων ή την αναγέννηση των κυττάρων (Hermite et al. 1996). Σύμφωνα με τον Chanda et al. (2010) η παρεμπόδιση της AChE του γαστροεντερικού σωλήνα μετά από έκθεση από αναπνοής στο sarin σε ινδικό χοιρίδιο έδειξε το δωδεκαδάκτυλο ως την περιοχή με τη μεγαλύτερη δραστηριότητα ανάμεσα σε 7, 4 h μετά την έκθεση ενώ μετά από 24 h έδειξε σημαντική παρεμπόδιση.

Στα ενήλικα ορτύκια η συνολική ποσοτική αποτίμηση της ιστοχημικής χρώσης για την BuChE στις δόσεις του methamidophos, είναι χαμηλότερη σε σύγκριση με τον μάρτυρα ανάλογα των δόσεων, εκτός των 2 χαμηλότερων δόσεων που είναι ανάλογες του μάρτυρα, ανεξαρτήτως των ημερών δειγματοληψίας. Η ιστοχημική χρώση για την AChE δεν δίνει αξιοποιήσιμα αποτελέσματα ενώ η χρώση για την ανίχνευση για ChEs που υδρολύουν την PrSCh είχε ανάλογη εικόνα με την BuChE αλλά πιο αυξημένες

τιμές κατά 20% περίπου. Στα νεαρά ορτύκια, η συνολική ποσοτική αποτίμηση της ιστοχημικής χρώσης για την AChE στις συγκεντρώσεις του methamidophos, είναι αυξημένη σε σύγκριση με τον μάρτυρα ανεξάρτητα των συγκεντρώσεων, εκτός της χαμηλότερης συγκέντρωσης που είναι ανάλογη, και των ημερών των δειγματοληψιών. Όσον αφορά την BuChE, σε αντίθεση με την οξεία τοξικότητα, η χρώση αυξήθηκε στις διάφορες συγκεντρώσεις του methamidophos. Η χρώση για την ανίχνευση για ChEs που υδρολύουν την PrSCh δεν είχε ανάλογη εικόνα με την AChE και BuChE αφού έδειξε, σε αντίθεση, μείωση της χρώσης στις διάφορες συγκεντρώσεις του methamidophos κατά MO 25% περίπου. Φαίνεται όμως να εκφράζει το σύνολο της AChE και BuChE, σε αντίθεση με τον μάρτυρα.

Η πλειοψηφία των εντομοκτόνων μεταβολίζονται στο ήπαρ, μέσω ενζύμων των μιτοχονδρίων και μικροσωματίων. Έτσι, το ήπαρ είναι το όργανο που περιέχει σημαντική συγκέντρωση υπολειμμάτων OPs (Bender, 1969; Ansari και Kumar, 1987) και ως συνέπεια αυτής της διαδικασίας πάσχει από διάφορα επίπεδα βλάβης ενώ οι επιδράσεις στο μεταβολισμό των ορτυκίων είναι μεγάλες, τόσο αμέσως μετά, όσο και για κάποιο χρονικό διάστημα μετά την έκθεσή του. Έχει τεκμηριωθεί ότι μία και μόνη έκθεση μιας τοξικής ουσίας οδηγεί σε παρακράτηση της χολής που εκκρίνεται από τα ηπατοκύτταρα μέσα στα κύτταρα, επιδρά στις πρωτεΐνες, τους υδατάνθρακες και στο μεταβολισμό των λιπιδίων.

Τα αποτελέσματά των δύο μελετών δείχνουν ότι το methamidophos προκαλεί ιστολογικές αλλοιώσεις στο ήπαρ αναλόγως των δόσεων/συγκεντρώσεων που έχουν εκτεθεί τα ορτύκια. Στις υψηλότερες δόσεις οι αλλοιώσεις αυτές κυμαίνονται από αλλαγές στην κυτταρική μορφολογία και το θάνατο των κυττάρων μέχρι σοβαρή απόπτωση και σπογγώδη μορφολογία, ενώ ήταν χαρακτηριστική η συρρίκνωση του κυτταροπλάσματος των ηπατικών κυττάρων. Οι ιστολογικές παρατηρήσεις δείχνουν σαφώς ότι το ήπαρ των ορτυκίων υπέφερε πολύ μετά από την έκθεση στο methamidophos ενώ η ηπατική βλάβη σχετίζεται και με λειτουργική αποτυχία, η οποία μπορεί να οδηγήσει αμετάκλητα σε θάνατο. Προηγούμενες μελέτες έχουν επίσης αναφέρει ότι τα OPs προκαλούν ηπατική βλάβη (Afifi et al. 1991; Sharma et al. 2005; Gokcimen et al. 2007; Yehia et al. 2007; Sayim, 2007). Σε συνήθεις τοξικολογικές δοκιμές με ΦΠ, οι ιστομορφολογικές εξετάσεις παρέχουν εξαιρετική απόδειξη της ηπατικής τοξικότητας (Gopinath et al. 1987). Με το DDT παρουσιάστηκαν μεγάλα σταγονίδια του λίπους μέσα στα κύτταρα του ήπατος (Mikhail et al. 1979). Η ικανότητα του ήπατος να προσαρμόζεται και να αναγεννάται είναι τεράστια και αυτό

επίσης τεκμηριώθηκε καλά στη μελέτη, όπως στους τομείς της κυτταρικής ανανέωσης και της αναδόμησης του ήπατος αφού παρατηρήθηκε αναγέννηση στο ήπαρ των ορτυκιών στις μεσαίες δόσεις. Ο πολλαπλασιασμός των ηπατικών κυττάρων, ο κυτταροπλασματικός εκφυλισμός, το κενοδοπιώδες κυτταρόπλασμα και η εστιακή νέκρωση που οδηγεί σε ηπατομεγαλία σε επίμυες που εκτέθηκαν σε DDT, συσχετίστηκαν ως μια αναγεννητική προσπάθεια του ήπατος στα ΦΠ (Kostka et al. 1996; Sayim, 2007). Σύμφωνα με τους Yehia et al. (2007), σε κουνέλια μετά από έκθεση (βουτηγμένα σε διάλυμα για 10 s) σε diazinon (3 mg/l) παρατηρήθηκαν ιστοπαθολογικές μεταβολές του ήπατος. Τα κύτταρα του ήπατος έχασαν την ακτινωτή τους διάταξη, και επιπρόσθετα παρατηρήθηκε κυτταρική διήθηση στον κεντρολόβιο και μεσολόβιο χώρο. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε διαταραχή στην διαδικασία αποτοξίνωσης του ήπατος των τοξικών επιδράσεων των diazinon.

Στη βιοχημεία στα ενήλικα ορτύκια, η δραστηριότητα των ChEs στο ήπαρ, είναι η χαμηλότερη σε σύγκριση με όλους τους ιστούς που εξετάστηκαν. Στο πλάσμα η ChE ανέκαμψε με ταχύτατους ρυθμούς. Ωστόσο, ακόμη και μετά από 3 d, οι τιμές των ChEs στα ορτύκια που είχαν λάβει methamidophos είναι κατά πολύ υψηλότερες από τον μάρτυρα και παρέμειναν υψηλές ακόμη και 14 d μετά. Στα νεαρά ορτύκια για το πλάσμα και το ήπαρ, η δραστηριότητα της BuChE είχε ανάλογη συμπεριφορά με την οξεία τοξικότητα ενώ η δραστηριότητα των ChEs στο ήπαρ, είναι η χαμηλότερη σε σύγκριση με όλους τους ιστούς που εξετάστηκαν. Στο πλάσμα η BuChE είχε σημαντικά μεγαλύτερη δραστηριότητα σε σύγκριση με την οξεία τοξικότητα, η παρεμπόδιση ήταν περίπου 100% όλες τις ημέρες της έκθεσης ενώ με τη χορήγηση καθαρού σιτηρεσίου ανέκαμψε με ταχύτατους ρυθμούς ώστε και μετά από 3 d, οι τιμές των BuChE στα ορτύκια που είχαν εκτεθεί στο methamidophos να είναι υψηλότερες από τον μάρτυρα σε όλες τις συγκεντρώσεις. Στο ήπαρ, ανάλογα της οξείας τοξικότητας, η πορεία της παρεμπόδισης και η ανάκαμψη των τιμών της δραστηριότητας της BuChE ήταν ανάλογη του πλάσματος χωρίς όμως τα ποσοστά της παρεμπόδισης σε σχέση με τον μάρτυρα να λαμβάνουν πολύ μεγάλες τιμές ενώ με την χορήγηση καθαρού σιτηρεσίου την ημέρα 8, η παρεμπόδιση του BuChE παρέμεινε σε χαμηλά επίπεδα ή ανάλογα με τον μάρτυρα.

Η χρήση PrSCh ως υπόστρωμα, και στις δύο μελέτες, έδειξε ανάλογη συμπεριφορά με το BuSCh στο πλάσμα και στο ήπαρ. Στο ήπαρ ειδικότερα οι τιμές δραστηριότητας με PrSCh ήταν πολύ μεγαλύτερες των τιμών της BuChE.

Στην πραγματικότητα, η BuChE είναι πιο ευαίσθητη στις αντι-ChEs τοξικές ουσίες από την AChE σε σπονδυλωτά (Ecobichon and Comeau, 1973). Στο πλάσμα οι

ChEs είναι γενικά πιο ευαίσθητες από την AChE του εγκεφάλου όσον αφορά την παρεμπόδιση σε αυτές τις ουσίες (Thompson et al. 1991) και έχουν ταχείς ρυθμούς ανάκαμψης, μέσα σε λίγες ώρες (Ludke et al. 1975; Fleming, 1981; Holmes and Boag 1990).

Ανάλογα αποτελέσματα με μείωση της δραστηριότητας της AChE παρατηρήθηκε σε πλάσμα αίματος μυών μετά από έκθεση σε methamidophos (Zayed et al. 1984). Σύμφωνα με τον Singh (1986) πρωταρχική εφαρμογή acephate σε επίμυες με ένεση (ενδοπεριτοναϊκή (ip)) (μεταχειρίσεις με acephate, methamidophos και acephate και methamidophos) παρείχε προστασία από την αναστολή της παρεμπόδισης AChE σε ερυθρά αιμοσφαίρια και τον εγκέφαλο και στην ChE του πλάσματος σε επίμυες που εκτέθηκαν και σε acephate και σε methamidophos. Προσθήκη *in vitro* acephate σε AChE πριν ή με methamidophos επίσης παρείχε πλήρης προστασία κατά της παρεμπόδισης της AChE από το methamidophos. Όταν το acephate προστέθηκε στο ένζυμο μετά το methamidophos, η προστατευτική επίδραση του μειώθηκε με την πάροδο του χρόνου μεταξύ των προσθηκών. Δεδομένου ότι acephate έχει μεγαλύτερη συγγένεια από το methamidophos όσον αφορά το ενεργό κέντρο της AChE (Singh, 1985), προτείνεται ότι το acephate παρείχε προστασία με το να ενώνεται με το ενεργό κέντρο της AChE και, ως εκ τούτου, εμποδίζει το methamidophos να δεσμευτεί με το ένζυμο. Σε επίμυες που εκτέθηκαν σε 0,3 mmol methamidophos/kg, η παρεμπόδιση της ενζυμικής δραστηριότητας ήταν 70-90% ενώ σε εφαρμογή methamidophos μετά από acephate η παρεμπόδιση της AChE δραστηριότητας σε εγκέφαλο και σε ερυθροκύτταρα ήταν 2-10% ενώ στο πλάσμα του αίματος η παρεμπόδιση της ενζυμικής δραστηριότητας ήταν 10-20%. Αν και η τοξικότητα στα θηλαστικά του acephate είναι 75 έως 100 φορές λιγότερο από το methamidophos (Singh, 1985), η συνολική τοξικότητα μπορεί να αυξηθεί με το χρόνο λόγω της μετατροπής του acephate στη σχετικά τοξική ουσία methamidophos (Szeto, 1982). Οι Aldridge (1953), Main (1964) και Main and Iverson (1966) προτείνουν ότι η μη παρεμποδιστική επίδραση των OPs οφείλεται στη συγγένεια των εντομοκτόνων με το ενεργό κέντρο του ενζύμου και/ή με το ρυθμό της φωσφορυλίωσης. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι το acephate έχει μεγαλύτερη συγγένεια από το methamidophos με το ενεργό κέντρο της AChE (Singh, 1985).

Οι Henderson et al. (1994) έδειξαν ότι περιστέρια που εκτέθηκαν σε diazinon από το στόμα σε 1,0 mg/kg bw. έδειξαν μείωση της δραστηριότητας της ChE σε πλάσμα κατά 20% μέσα σε 2 h και στη συνέχεια αυξήθηκε σε 60% σε σύγκριση με το μάρτυρα σε 4 h και 75 % εντός των 24 h με ανάκαμψη μέσα σε 8 d. Δόσεις chlorpyrifos (5, 10

και 20 mg/kg, από το στόμα) που αντιπροσωπεύουν το 28%, 55% και 110%, αντίστοιχα, της οξείας (24 h) LD₅₀ (18,14 mg/kg) τοξικότητας, παρεμπόδισαν τις δραστηριότητες των ChEs σημαντικά στον εγκέφαλο, το πλάσμα και το ήπαρ. Ωστόσο, η παρεμπόδιση των ChEs δεν συνδέεται όλες τις φορές με τη σοβαρότητα και την ένταση της επίδρασης των OPs, και αυτό ισχύει ιδιαίτερα σε χαμηλές δόσεις (Clegg and van Gemert, 1999; Worek et al. 2005). Η δραστηριότητα της ChE στο πλάσμα πτηνών που εκτίθενται σε ψεκασμό με diazinon ή acephate ήταν σημαντικά χαμηλότερη από τον μάρτυρα. Αν και δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές σε άλλες μεταβλητές μεταξύ των μεταχειρίσεων είναι αξιοσημείωτο ότι οι τάσεις αύξησης του χρόνου στη φωλιά και μειωμένη παραγωγικότητα που παρατηρήθηκαν μετά από εφαρμογή, ανάλογα με την τάση της παρεμπόδισης της ChE στο πλάσμα. Το υψηλό επίπεδο της παρεμπόδισης της ChE στο πλάσμα δεν αντικατοπτρίζεται στον εγκέφαλο του κοκκινολαίμη (*Erithacus rubecula*) γεγονός που μπορεί να έχει σχέση με το χρόνο σύλληψης των πτηνών (Zinkl et al. 1981; Busby et al. 1981; DeWeese et al. 1983; Niethamer and Baskett, 1983; Custer and Mitchell, 1987). Η έκθεση θα μπορούσε να ήταν ανεπαρκής ώστε να οδηγήσει σε παρεμπόδιση στον εγκέφαλο, με το αίμα να προστατεύει αφού επιδρά στο εντομοκτόνο. Σε πολλές μελέτες χρησιμοποιούν τις AChE, BuChE, CaE στο αίμα ως βιοσημαντές και δεν χρειάζεται να θανατώσουν το ζώο για την βιοπαρακολούθηση της έκθεσης της άγριας πανίδας (πτηνά, ερπετά και άλλα είδη) σε OPs και καρβαμιδικά (Fairbrother et al. 1989; Thompson, 1991; Thompson and Walker, 1994; Sánchez et al. 1997; Fossi et al. 1992; Soler et al. 1998; Sánchez-Hernández and Moreno Sánchez, 2002). Οι B esterases στον ορό είναι γενικά περισσότερο ευαίσθητες απ' ότι στον εγκέφαλο (Thompson et al. 1991) και έχουν γρήγορο ρυθμό ανάκαμψης λίγων ωρών (Fleming, 1981, Ludke 1975, Holmes and Boag 1990). Αυτή η ταχεία ανάκαμψη μαζί με μεγάλες διακυμάνσεις μεταξύ των ατόμων είναι τα κυριότερα μειονεκτήματα των B εστερασών στον ορό για την χρήση τους ως βιοσημαντές χωρίς να χρειαστεί η θανάτωση των πτηνών (Fairbrother et al. 1989; Walker, 1995). Επαναλαμβανόμενες εφαρμογές chlorpyrifos σε δέντρα που περιείχαν φωλιές αμερικανικών κοκκινολαίμηδων (*Turdus migratorius*) δεν παρουσίασαν σημαντική θνησιμότητα ενηλίκων ή νεογέννητων παρά τα χαμηλά επίπεδα της ChE στο πλάσμα (Decarie et al. 1993). Σημαντική παρεμπόδιση παρατηρήθηκε σε AChE σε εγκέφαλο, ήπαρ και ορό αίματος και σε BuChE σε ήπαρ και ορό αίματος μετά από εφαρμογή parathion, methyl parathion, azinphos methyl, malathion, sulfotep, fenitrothion σε κάθε ένα σε ψαρόνι, πάπια, φασιανός και περιστέρι

(Thompson et al. 1995). Η τοξικότητα και άλλα σχετικά στοιχεία για 30 OPs αξιολογήθηκαν ως προς την παρεμπόδιση σε ChEs σε ερυθροκύτταρα μετά από έκθεση από αναπνοή χωρίς να δείξει ανάλογα αποτελέσματα (Storm et al. 2000). Επίμυες εκτέθηκαν ενδοπεριτοναϊκά με acephate και methamidophos (acephate 500 mg/kg, methamidophos 5 mg/kg) ενώ στη συνέχεια συλλέχτηκαν ιστοί σε 15 και 60 min μετά την ένεση (A15 και A60 για acephate και M15 και M60 για methamidophos). Το ενέσιμο acephate ή methamidophos στα ζώα δεν εμφάνισε συμπτώματα δηλητηρίασης 15 min μετά την ένεση, αλλά εμφάνισε μυϊκό τρόμο στα 45 min. Η δραστηριότητα της AChE στο αίμα και στον εγκέφαλο για το A15 και M15 παρουσίασαν 55-75% παρεμπόδιση, ενώ στα A60 και M60 από 80-95% (Spasova et al. 2000). Παρά τις αλλαγές στη συμπεριφορά σε κοτοπουλάκια, με επαναλαμβανόμενες καθημερινές εκχύσεις από το στόμα για 7 d με 2 mg/kg chlorpyrifos, αυτή δεν συνδέθηκε με σημαντική αναστολή της ChE στον εγκέφαλο, το πλάσμα και το ήπαρ όπως στη δόση των 4 mg/kg, χωρίς όμως να αλλάζουν οι παρατηρήσεις στην συμπεριφορά. Το εύρημα αυτό ίσως υποδηλώνει την έλλειψη σημαντικής συσχέτισης μεταξύ της έκτασης της παρεμπόδισης της ChE και της αλλαγής της συμπεριφοράς (Al-Badrany and Mohammad, 2007). Παρόμοια ύφεση της κινητικής δραστηριότητας σε νεαρούς επίμυες μετά από έκθεση σε chlorpyrifos ήταν πιο έντονη μετά την ανάκαμψη των ChEs του εγκεφάλου (Carr et al. 2001) υποδεικνύοντας την ύπαρξη άλλων τοξικών μηχανισμών που θα μπορούσαν να συμμετέχουν στην μεταβολές της συμπεριφοράς. Είναι ενδιαφέρον που η εγκεφαλική δραστηριότητα της AChE δεν συσχετίζεται με τη δόση αφού η έλλειψη συσχέτισης δείχνει ότι οι επιδράσεις μπορεί να ήταν το αποτέλεσμα περιφερειακής διέγερσης. (Fryday et al. 1995).

Στην ιστοχημεία και στις δύο μελέτες στο ήπαρ, η χρώση για την AChE σπανίζει σε λίγα κύτταρα, σε όλες τις δόσεις, σε κοκκώδη μορφή συσχετιζόμενη με τις κυτταρικές μεμβράνες των ηπατικών κυττάρων ενώ η χρώση για την BuChE και των ChEs με PrSCh ήταν έντονη (χαμηλότερη της υποξείας από της οξείας). Η χρώση με PrSCh ως υπόστρωμα μαζί με τους παρεμποδιστές, iso-OMPA και BW284C51, είχε ως αποτέλεσμα την πλήρη εξάλειψη της χρώσης. Φαίνεται λοιπόν ότι προφανώς το iso-OMPA ανέστειλε πλήρως την έκφραση της BuChE. Η χρώση για την ανίχνευση για την BuChE, που παρατηρήθηκε μετά από την έκθεση με το methamidophos δεν είχε ανάλογη συμπεριφορά με τα βιοχημικά αποτελέσματα, με μείωση της χρώσης σε εντονότερο βαθμό στη διατροφική μελέτη.

Στην οξεία τοξικότητα, η μείωση στις τιμές των βιοχημικών αποτελεσμάτων της BuChE σε σύγκριση με τον μάρτυρα την ημέρα 1 και μεγάλη αύξηση της παραγωγής νέων BuChE (αύξηση σε σύγκριση με το μάρτυρα για τις 2 χαμηλότερες δόσεις από τις 3 στις οποίες υπήρχαν ζώντα άτομα) έως την ημέρα 14, δεν αποτυπώθηκε απόλυτα στην ιστοχημική χρώση. Η συνολική ποσοτική αποτίμηση της ιστοχημικής χρώσης για την BuChE στις δόσεις του methamidophos εκτός της χαμηλότερης, είναι χαμηλότερη σε σύγκριση με τον μάρτυρα ανεξαρτήτως των δόσεων και των ημερών των δειγματοληψιών. Αυτό συμβαίνει πιθανόν γιατί δεν απεικονίζει τη συνολική ύπαρξη των εστερασών (π.χ. στους μεσοκυττάρους χώρους) που όμως είναι μετρήσιμη με τις βιοχημικές μεθόδους.

Η συνολική ποσοτική έκφραση της χρώσης με PrSCh στον μάρτυρα, υπολογίστηκε στο 81% της αντίστοιχης για την BuChE, ενώ οι δόσεις του methamidophos είχαν ανάλογα μειωμένη ποσοτική έκφραση της χρώσης σε σύγκριση με τον μάρτυρα. Η συνολική μειωμένη ποσοτική έκφραση της χρώσης οφείλεται κυρίως στην μειωμένη ένταση και στο σχετικό πληθυσμό των χρωσμένων κυττάρων, γεγονός που δείχνει ότι ένα ποσοστό BuChE (μεγάλα πτηνά) πιθανόν να μην εκφράζεται ιστοχημικά πλήρως με την PrSCh. Στον πειραματισμό υποξείας τοξικότητας (μικρά πτηνά) οι δύο αυτές χρώσεις έχουν ανάλογα αποτελέσματα. Ίσως η ηλικία των πτηνών να διαμορφώνει και την σχέση των διάφορων μορφών των εστερασών μέσα στα ηπατικά κύτταρα.

Για την AChE, η πολύ μικρή δραστηριότητα, όπως αποτυπώνεται τόσο στα βιοχημικά αποτελέσματα όσο και στην ιστοχημική χρώση δεν δίνει αξιοποιήσιμα αποτελέσματα από μόνη της ενώ η χρώση για την ανίχνευση για ChEs που υδρολύουν την PrSCh είχε ανάλογη εικόνα με την BuChE όπως περιγράφηκε ανωτέρω με μεγαλύτερη μείωση στη μελέτη διατροφής, δείχνοντας έτσι ότι στα μικρά πτηνά, σε αντίθεση με τα μεγάλα, ιστοχημικά όλη η BuChE εκφράζεται πλήρως με την PrSCh.

Όσον αφορά τη AChE, καταδείχθηκε ότι η ηπατική λειτουργία ρυθμίζεται από τόσο συμπαθητικό και παρασυμπαθητικό νεύρα στην πύλη περιοχή (Akiyoshi et al. 1998). Ισχυρή δραστηριότητα της AChE ήταν επίσης αντιληπτή σε μεσολόβιες αρτηρίες και σε κύτταρα της ινώδους κάψας του Bowman (Luppa et al. 1992).

Η ανάκαμψη της δραστηριότητας του AChE στον εγκέφαλο ήταν βραδύτερη από εκείνη του πλάσματος. Στη οξεία τοξικότητα έφθασε σε παρεμπόδιση 48%, ενώ 2 wk μετά, το επίπεδο του ενζύμου στον εγκέφαλο κυμάνθηκε από ανάλογα επίπεδα με τον μάρτυρα μέχρι και παρεμπόδιση 26%. Η δραστηριότητα AChE σε εγκέφαλο ορτυκιού

έχει αποδειχθεί ότι ανακάμπτει μέσα σε 8 d από οξεία έκθεση με chlorpyrifos (Cairns et al. 1991; Soler-Rodriguez et al. 1998). Σύμφωνα με τους (Garcia-Cabero et al. 1998) chlorpyrifos σε δόση των 13 mg/kg σε ορτύκια οδήγησε σε ισχυρή παρεμπόδιση της AChE εγκεφάλου (76,6%) και ChEs πλάσματος (80,1%) σε 8 h μετά τη χορήγηση. Οι ChEs του πλάσματος ανέκαμψαν με ταχύτετους ρυθμούς ωστόσο, ακόμη και μετά 4 d, οι τιμές των ChEs των ορτυκίων που είχαν λάβει chlorpyrifos ήταν ελαφρώς υψηλότερες από αυτές του μάρτυρα. Η ανάκαμψη της εγκεφαλικής δραστηριότητας της AChE ήταν βραδύτερη από εκείνη του πλάσματος φθάνοντας το 59% του μάρτυρα 2 d μετά τη χορήγηση chlorpyrifos, με αργή ανάκαμψη, φθάνοντας μετά από 11 d το επίπεδο του μάρτυρα. Σύμφωνα με τους Latuszynska et al. (2003) μετά από διαδερμική χορήγηση chlorpyrifos τα επίπεδα των ChEs στο πλάσμα και στον εγκέφαλο ανέκαμψαν 2-3 wk μετά την έκθεση. Η εγκεφαλική δραστηριότητα ChE σε ορτύκια σπάνια μειώνεται περισσότερο από 25% μετά από έκθεση σε terbufos, ακόμη και σε θανατηφόρες δόσεις (Tank et al. 1993).

Στο ήπαρ η πορεία της παρεμπόδισης και η ανάκαμψη των τιμών της δραστηριότητας των ChEs ήταν ανάλογη του πλάσματος χωρίς όμως τα ποσοστά σε σχέση με τον μάρτυρα να λαμβάνουν πολύ μεγάλες τιμές, τόσο της παρεμπόδισης την ημέρα 0 όσο και της αύξησης τις επόμενες ημέρες κυρίως για τις δόσεις των 2,2 και 5 mg/kg bw.

Αν και ενζυμικές δοκιμές σε διάφορες μελέτες υποδεικνύουν ότι τα πτηνά εκκρίνουν OPs μέσα σε λίγες ώρες στα περιττώματα (O'Brien and Yamamoto, 1970), η αργή αποκατάσταση της δραστηριότητας στα επίπεδα του μάρτυρα δεν μπορεί να συγκριθεί κατ' ανάγκη με τη σταδιακή εξαφάνιση του methamidophos στο αίμα. Στην πραγματικότητα, το επίπεδο δραστηριότητας έδειξε να είναι ανάλογο με τη δραστηριότητα της AChE του εγκεφάλου σε τρωκτικά (Bignami et al. 1975) και πτηνά (Bakre and Rajasekaran, 1989). Οι δραστηριότητες των ChEs του εγκεφάλου σε πάπιες, ορτύκια, κουκουβάγιες, ψαρόνια και *Quiscalus quiscula* φάνηκαν να χρειάζονται κατά μέσο όρο 26 d για να ανακάμψουν μετά από την μείωση κατά 55-64%, σε δοκιμές οξείας τοξικότητας από το στόμα με dicrotophos (Fleming and Grue, 1981). Οι Fleming and Grue (1981) ανέφεραν ότι χρειαζόταν πολύ περισσότερος χρόνος τα επίπεδα των ChEs να επιστρέψουν στα κανονικά από ό, τι να εξαλειφτούν τα OPs. Αυτά τα ποσοστά ανάκτησης για τον εγκέφαλο και το πλάσμα είναι σε συμφωνία με αποτελέσματα άλλων μελετών που διεξάχθηκαν με chlorpyrifos στον εγκέφαλο και το πλάσμα του επίμου (2 και 3 wk μετά το τέλος του πειράματος, αντίστοιχα) (Latuszynska et al. 2003).

Η δραστηριότητα των ChEs εξαρτώνται, εκτός από τον τοξικό παράγοντα που χρησιμοποιείται και τη δόση εφαρμογής, και από το είδος του οργανισμού (Hill, 1988; Walker and Thompson 1991), το μέγεθος της μείωσης των ChEs καθώς και του χρόνου που χρειάζονται για να ανακάμψουν, καθώς συσχετίζεται έντονα με το βαθμό της αρχικής μείωσης των ChEs (Fleming, 1981; Fleming and Bradbury, 1981; Fleming and Grue, 1981; Forsyth and Martin, 1993).

Η ανάκαμψη της δραστηριότητας της AChE εμφανίζεται σε ορισμένες περιπτώσεις μέσω της υδρολυτικής απομάκρυνσης της φωσφορυλιωμένης ρίζας που παρεμποδίζεται. Όπως και το ποσοστό των δεσμευμένων σημείων έτσι και το ποσοστό της υδρολυτικής απομάκρυνσης ποικίλλει αναλόγως του σκευάσματος. Ορισμένα φωσφορυλιωμένα πλέγματα AChE χαρακτηρίζονται από διαδικασία που ονομάζεται «γήρανση», στην οποία το ποσοστό της επανεργοποίησης μειώνεται μετά την έκθεση που οφείλεται σε αποαλκυλίωση των φωσφορυλιωμένων-AChE (Ballantyne and Marrs, 1992). Όταν συμβαίνει αυτό, η επανεργοποίηση της φωσφορυλιωμένης AChE δεν είναι δυνατή. *De novo* σύνθεση του ίδιου του ενζύμου AChE, η οποία εκδηλώνεται εντός 12 και 24 h, ανάλογα με την ανατομική τοποθεσία, οδηγεί επίσης στην ανάκαμψη της δραστηριότητας AChE (Chambers, 1992).

Έγιναν αρκετά πειράματα σε μια προσπάθεια να καθοριστεί μια σχέση μεταξύ των κλινικών συμπτωμάτων της τοξικότητας και της δραστηριότητας των AChE (Fairbrother et al. 1991). Δυστυχώς, τα συμπεράσματα ήταν άκρως αντιφατικά. Για παράδειγμα, οι Banks and Russell (1967) ανέφεραν ότι παρεμπόδιση 40-60% της AChE του εγκεφάλου αποτελούσε προϋπόθεση για την ανίχνευση των πρώτων ενδείξεων στην ηθολογική συμπεριφορά λόγω της τοξικότητας, το οποίο είναι πολύ υψηλότερο από εκείνο που προτάθηκε από Hart (1993). Ο Kurtz (1977) δεν μπορούσε να εντοπίσει τη σχέση μεταξύ του ποσοστού της παρεμπόδισης της AChE και των ενδείξεων στη συμπεριφορά που προκαλούνται από το malathion. Αρκετοί ερευνητές, έχουν επισημάνει την ανάγκη για περαιτέρω αναλύσεις ώστε να διαγνωστεί εάν ο θάνατος πραγματικά προκαλείται από OPs (Holmes and Boag, 1990). Ως εκ τούτου, τα κλινικά συμπτώματα λόγω τοξικότητας δεν μπορούν να παρέχουν μία εκτίμηση για την παρεμπόδιση της AChE στον εγκέφαλο ενώ το επίπεδο δραστηριότητας αποτελεί έναν πιο ευαίσθητο δείκτη των μεταβολών της δραστηριότητας της AChE στον εγκέφαλο από τα κλινικά συμπτώματα. Οι Ludke et al. (1975) αναφέρουν ότι δραστηριότητα των ChEs λιγότερο από το 50% του μάρτυρα έχει χρησιμοποιηθεί για να επιβεβαιωθεί η αιτία θανάτου, ωστόσο, τα πτηνά μπορούν να επιβιώσουν ακόμα και όταν τα επίπεδα της

δραστηκότητας των ChEs υπερβαίνουν τη μείωση του 50% και κατά τους Grue et al. (1991) και σε εργαστηριακές συνθήκες. Ο Peakall (1985) για μία εφαρμογή ΦΠ, αλλά για χρόνια παρεμπόδιση κατά 50% επίσης μπορεί να προκαλέσει θάνατο. Το ίδιο αναφέρει και Hill (1988) ότι η θνησιμότητα των πτηνών από την έκθεση σε OP συνδέεται συνήθως με παρεμπόδιση της δραστηκότητας των ChEs του εγκεφάλου πάνω το 80% στον αγρό. Ο Hill (1992) αναφέρει ότι παρεμπόδιση της εγκεφαλικής δραστηκότητας των ChEs του εγκεφάλου, περίπου δύο τυπικών αποκλίσεων κάτω από τον μάρτυρα (παρεμπόδιση περίπου 20%), είναι γενικά αποδεκτή ένδειξη της έκθεσης κατά των ChEs.

Όσον αφορά την έκθεση σε επίπεδα κλινικών συμπτωμάτων, οι Busby et al. (1990) και Grue et al. (1991) προτείνουν ότι υπάρχει ένα κρίσιμο επίπεδο της παρεμπόδισης των ChEs, 40-60% της συνήθους δραστηκότητας των ChEs στον εγκέφαλο, με την οποία εκδηλώνονται διαταραχές της συμπεριφοράς. Ανεπαίσθητες επιδράσεις μπορεί, ωστόσο, να εμφανίζονται σε χαμηλότερα επίπεδα παρεμπόδισης (Greig-Smith et al. 1992). Η παρεμπόδιση των ChEs στον εγκέφαλο υψηλότερα από 50% δεν προκάλεσαν θάνατο σε είδη σαυρών *Gallotia galloti*, αν και ήταν εμφανή τα κλινικά συμπτώματα της τοξικότητας του parathion. Οι Ludke et al. (1975) αξιώνουν ότι μια σημαντική μείωση κατά 20-30% της δραστηκότητας της AChE θεωρείται γενικά ως ένδειξη της έκθεσης OP σε πτηνά ενώ σύμφωνα με τους Wilson (1998; 1999), Kwong (2002) και Worek et al. (2005), παρεμπόδιση των ChEs στο πλάσμα κατά 20-30% δηλώνει συνήθως την έκθεση σε OPs, κατά 50% ή περισσότερο συνδέεται με σοβαρή επίδραση και αρνητικές συνέπειες ενώ παρεμπόδιση των ChEs δεν συνδέεται πάντα με την ύπαρξη σοβαρών ενδείξεων για επιδράσεις OPs και αυτό είναι αληθές για χαμηλές δόσεις OPs (Wilson, 1998; Wilson, 1999; Clegg and van Gemert, 1999; Kwong, 2002; Worek et al. 2005). Στη μελέτη οξείας τοξικότητας σε ορτύκια, η παρεμπόδιση της AChE κατά 62-90%, 1 h μετά τη χορήγηση της δόσης ήταν επαρκής για να προκαλέσει το θάνατο στις περισσότερες των περιπτώσεων, ενώ ορτύκια επέζησαν ακόμη και σε επίπεδα παρεμπόδισης της AChE στον εγκέφαλο μέχρι 66%.

4.1.3 Αποφυγή πρόληψης της τροφής

Τα πτηνά εκτίθενται στον αγρό από τη χρήση ΦΠ. Ένας παράγοντας που μπορεί να μειώσει την δυναμική της τοξικότητας σε αυτές τις περιπτώσεις είναι οι αποθητικές ιδιότητες του methamidophos αφού μπορεί να οδηγήσει τα πτηνά να αποφύγουν ή να μειώσουν την πρόσληψη της ρυπασμένης τροφής.

Για τα πτηνά ο σχεδιασμός των δοκιμών αποφυγής που πραγματοποιήθηκαν αποσκοπούν στον υπολογισμό ενός συντελεστή που ποσοτικοποιεί την αποφυγή με συγκεκριμένο πρωτόκολλο και που μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην εκτίμηση της επικινδυνότητας αλλά και στη γενικότερη διερεύνηση της εκδήλωσης της αποφυγής στα πτηνά σε πειραματισμό ημι-αγρού αλλά και τη χρήση των συμπερασμάτων για την εκτίμηση της επικινδυνότητας με τη χρήση δεδομένων τοξικοκινητικής του methamidophos. Η πρωτότυπη αυτή προσέγγιση γεφυρώνει τα εργαστηριακά δεδομένα με την εκτίμηση της επικινδυνότητας σε πραγματικές συνθήκες σε πτηνά του αγροτικού περιβάλλοντος σε Ελληνικές συνθήκες.

Η αποφυγή είναι η απουσία κλινικών συμπτωμάτων τοξικότητας σε υψηλούς ρυθμούς διατροφής, αποδεικνύοντας ότι είναι ένας σημαντικός μηχανισμός μείωσης του κινδύνου. Εάν η αποφυγή συνοδεύεται από κλινικά συμπτώματα, τότε είναι λιγότερο χρήσιμη.

Αναμένεται ότι, εάν το όριο της συγκέντρωσης του methamidophos για την εκδήλωση της αποφυγής είναι κάτω από τη θανατηφόρο δόση, δεν πρόκειται να υπάρξει θνησιμότητα μετά από έκθεση μέσω της τροφής. Στην πραγματικότητα όμως, μπορεί να προκύψει θνησιμότητα επειδή η εκδήλωση της αποφυγής δεν είναι άμεση (λόγω του χρόνου που απαιτείται για την απορρόφηση από το έντερο και τη κυκλοφορία στο εσωτερικό του σώματος), έτσι ώστε ζώα που διατρέφονται γρήγορα μπορούν να πάρουν τη θανατηφόρα δόση πριν από την έναρξη της αποφυγής. Αυτή είναι η πιθανή εξήγηση για θνησιμότητα που έχει παρατηρηθεί στον αγρό, όπως οι φάσσοι (*Columba palumbus*) που έχουν διατραφεί με σπόρους σιτηρών εκτεθειμένες σε χημικές ουσίες (Hart et al. 1999) και χήνες που τρέφονται σε γήπεδα του γκολφ (Mineau et al. 1994).

Στην φύση τα πτηνά μπορούν να αποφεύγουν την τροφή που είναι εκτεθειμένη με ξενοβιοτικές ουσίες. Υπάρχουν πολλά παραδείγματα άγριων πτηνών που αποφεύγουν τη ρυπασμένη τροφή με χημικές ουσίες των οποίων η αποθητική δράση

έχει επιβεβαιωθεί σε δοκιμές με πτηνά σε αιχμαλωσία (Buchsbbaum et al. 1984; Brower and Fink, 1985; Mason et al. 1989; Crocker and Perry, 1990; Jakubas and Gullion, 1990; Mason, 1990; Mason and Turpin, 1990; Kvittek, 1991; Mason et al. 1991; Rowell-Rahier et al. 1995). Σε πολλά ΦΠ έχει παρατηρηθεί ισχυρή αποφυγή με αιχμαλωτισμένα πτηνά σε πειράματα υποξείας τοξικότητας 5 ημερών (Hill and Camardese, 1986) και σε δοκιμές άλλου τύπου (π.χ. Schafer and Brunton, 1971; Grue, 1982; Schafer et al. 1983; Kononen et al. 1986, 1987; Avery, 1989; Bennett 1989a, b; Avery and Decker, 1991; Avery et al. 1993; Avery et al. 1994a; Avery et al. 1994b). Ακόμα με την πρόσθεση αποθητικών ουσιών σε ΦΠ μπορεί να εκδηλωθεί αποφυγή για τα πτηνά (Mastrota and Mench, 1995). Έτσι λοιπόν φαίνεται λογικό στη φύση, μερικά ΦΠ να απωθούν τα πτηνά, μειώνοντας την τοξικότητα κάτω από τα όρια που αναμένονταν.

Στόχος των δοκιμών αποφυγής «no-choice test» και «two-choice test» ήταν να καθοριστεί αν η αποφυγή της λήψης της τροφής θα περιορίσει τα πουλιά από τη λήψη θανατηφόρας δόσης methamidophos. Καθώς τα πτηνά μπορεί μερικές φορές να τρώνε γρήγορα στον αγρό, η αποτελεσματικότητα της αποφυγής της λήψης της τροφής περιορίζεται, ήταν αναγκαίο να πριν την έναρξη του πειραματισμού τα πτηνά να περάσουν μία περίοδο νηστείας. Κρίσιμες παραμέτρους ήταν η καταγραφή της κατανάλωσης της τροφής και του σωματικού βάρους, ώστε να εκτιμηθεί το ποσοστό πρόσληψης του methamidophos και η συμπεριφορά της αποφυγής.

Στη δοκιμή αποφυγής «two-choice test» στον μάρτυρα και σε όλες τις συγκεντρώσεις δεν παρατηρήθηκε θνησιμότητα ενώ κλινικά συμπτώματα παρατηρήθηκαν μόνο στη μεγαλύτερη συγκέντρωση των 300 mg/kg τροφής σε αντίθεση με τη σημαντική θνησιμότητα που περιγράφηκε στη μεσαία και τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις και τα κλινικά συμπτώματα σε όλες τις συγκεντρώσεις στη δοκιμή αποφυγής «no-choice test». Στη δοκιμή αποφυγής ημι-αγρού «pen test» παρατηρήθηκε θνησιμότητα που οφείλεται στο methamidophos, όπως διαπιστώθηκε από τα βιοχημικά και ιστοχημικά αποτελέσματα, στην συγκέντρωση των 152,4 mg/kg τροφής ενώ τα πτηνά έδειχναν υγιή χωρίς να είναι εμφανή κλινικά συμπτώματα.

Σε όλες τις δοκιμές διαπιστώθηκε ισχυρή αποφυγή ενώ υπολογίστηκε η προσληφθείσα ποσότητα τροφής και methamidophos από τα ορτύκια για την κάθε συγκέντρωση καθώς και ο συντελεστής αποφυγής (RF). Σε όλες τις δοκιμές παρατηρήθηκε μείωση της κατανάλωσης της ρυπασμένης τροφής ενώ δεν υπήρξε μεταβολή του σωματικού βάρους στη δοκιμή επιλογής τροφής «two-choice test» σε

αντίθεση με τη δοκιμή μη επιλογή τροφής «no-choice test», όπως ήδη έχει καταγραφεί ανωτέρω στον πειραματισμό υποξείας τοξικότητας, αλλά και με τη δοκιμή ημι-αγρού «pen test» παρόλο που και αυτή ήταν δοκιμή επιλογής τροφής. Στις δύο δοκιμές εργαστηρίου «no-choice test» και «two-choice test» είναι πολύ χαρακτηριστική η αναλογική μείωση της προσληφθείσας ρυπασμένης τροφής με την αύξηση της συγκέντρωσης του methamidophos στα ίδια επίπεδα όλες τις ημέρες της έκθεσης (σχέση μεταξύ των συγκεντρώσεων του methamidophos στην τροφή και του συντελεστή αποφυγής (RF) με $R^2 > 0,97$ στο «no-choice test» και $R^2 > 0,78$ στο «two-choice test»). Έτσι σε αυτές τις μελέτες αποφυγής παρατηρήθηκε η ύπαρξη μίας δόσης κατώφλι για την έναρξη της αποφυγής διαφορετικό όμως για τις δύο αυτές δοκιμές. Η εκτιμώμενη προσληφθείσα δόση methamidophos για τη δοκιμή «no-choice test» για όλες τις ημέρες πειραματισμού, εκτός της ημέρα 0, όπου το ορτύκι δεν μπορεί να επιλέξει εναλλακτική διατροφή αντιπροσωπεύει το 50% του LD₅₀ (MO 2,5 mg/kg bw), στα όρια του NOEL για τη θνησιμότητα, ενώ για τη δοκιμή επιλογής «two-choice test» αντιπροσωπεύει το 30% του LD₅₀ (MO 1,5 mg/kg bw). Για την ημέρα 0 αμέσως μετά την κυρίως περίοδο νηστείας, τα αντίστοιχα ποσοστά είναι αυξημένα αναλογικά με την αύξηση της συγκέντρωσης κατά MO σε 80% (50-118%) και 40% (18-58%) του LD₅₀, αντίστοιχα γεγονός που αναδεικνύει ότι ο κίνδυνος εξαρτάται κυρίως από την απόκριση των πτηνών κατά την αρχική λήψη της τροφής στον αγρό μετά τον ψεκασμό. Πραγματικά στο πειραματισμό ημι-αγρού «pen test» είναι ενδεικτική για την ημέρα 0 η σημαντική αύξηση της προσληφθείσας τοξικής ουσίας methamidophos (270% του LD₅₀, τα ορτύκια τράφηκαν αποκλειστικά από το ρυπασμένο σιτηρέσιο) παρόλο που για τις επόμενες ημέρες μειώθηκε ώστε την ημέρα 3, στις 3 από τις 4 περιπτώσεις να μηδενίζεται. Τα ορτύκια λοιπόν, όταν ξέρουν έχουν να διαλέξουν, γρήγορα μαθαίνουν που έχει ρυπασμένη τροφή. Αυτό φάνηκε και στο εργαστήριο στη δοκιμή επιλογής, όπου πάνω από τη συγκέντρωση στην οποία τα πτηνά καταναλώνουν ίση ποσότητα ρυπασμένης και μη τροφής (39,4 mg/kg τροφής) και παρόλο οι ταΐστρες άλλαζαν θέση καθημερινά, τα πτηνά μετά την αρχική δοκιμή μάθαιναν πιο εύκολα κάθε ημέρα να αναγνωρίζουν τη ρυπασμένη και να στρέφονται στην καθαρή τροφή.

Τα διαγράμματα πρόσληψης της τροφής μπορούν να δώσουν μια εντύπωση του ρόλου των απωθητικών ιδιοτήτων του methamidophos. Ο χρόνος (σε συνδυασμό με τις αλλαγές στο σωματικό βάρος), στην οποία σημειώθηκε θνησιμότητα (ημέρα 1 έναντι των ημερών 3-5) παρέχει πληροφορίες σχετικά με το αν οι θάνατοι προκλήθηκαν άμεσα από τη χημική ουσία ή είναι το αποτέλεσμα από την ασιτία, ή και από τα δύο. Ο Bennet

(1989a) παρατήρησε σε ανάλογη μελέτη carbofuran ότι το 50% της θνησιμότητας συνέβη την ημέρα 1, συνήθως μέσα στις πρώτες ώρες. Τα πτηνά φάνηκε να κατανάλωσαν θανατηφόρες ποσότητες της χημικής ουσίας πριν τη διαμόρφωση της απωθητικής συμπεριφοράς. Οι Kononen et al. (1986, 1987) μέτρησαν την ημερήσια κατανάλωση τροφής σε ανάλογο πειραματισμό με methiocarb και carbofuran. Πάπιες εμφάνισαν σαφή συμπεριφορά αποφυγής την 1η ημέρα και καθ' όλη τη διάρκεια της περιόδου έκθεσης ενώ τα ορτύκια έδειξαν ότι δεν υφίσταται συμπεριφορά αποφυγής από την πρώτη ημέρα αλλά από τη δεύτερη ημέρα της περιόδου έκθεσης ενώ συνεχίστηκε καθ' όλη τη διάρκεια της. Σε αρκετά από τα πειράματα με ορτύκια κατανάλωσαν κατά την πρώτη ημέρα περισσότερο ρυπασμένη τροφή από καθαρό φαγητό. Θνησιμότητες στη μελέτη «no-choice test» κατά την ημέρα 3 έως 5 σε συνδυασμό με σοβαρή μείωση του σωματικού βάρους ($\geq 20\%$), κατά μέσο όρο είναι το αποτέλεσμα της έλλειψης της τροφής και της επίδρασης του methamidophos.

Αρχικά έγινε η υπόθεση ότι τα πτηνά που εκτίθενται σε διάφορες συγκεντρώσεις methamidophos θα καταναλώνουν την ίδια ποσότητα τροφής σε κάθε επίπεδο έκθεσης χωρίς αυτό να είναι αλήθεια αφού η υπόθεση της ημερήσιας πρόσληψης τροφής είναι αρκετά διαφορετική από τη μετρούμενη. Είναι αξιοσημείωτο ότι παρά το γεγονός ότι η ημερήσια πρόσληψη του methamidophos δεν διαφέρει πολύ μεταξύ των μεταχειρίσεων, υπάρχει μια δοσοεξαρτώμενη απόκριση. Αυτή η μειωμένη κατανάλωση της τροφής τροφίμων μπορεί να προκληθεί από τις απωθητικές ιδιότητες του methamidophos. Από τα διαγράμματα της μέσης προσληφθείσας τοξικής ουσίας methamidophos για κάθε συγκέντρωση είναι φανερή η προσαρμογή του πτηνού ώστε να λαμβάνει τροφή, μετά την ημέρα 0 και την απόκριση της αποφυγής, μέχρι το όριο της μη θνησιμότητας (NOEL) για τη δοκιμή της μη επιλογής («no-choice test»), και μέχρι το όριο των κλινικών συμπτωμάτων για τις δοκιμές επιλογής («two-choice test», «pen test»). Τα πτηνά στον αγρό πολύ συχνά δεν έχουν επιλογή στη περιοχή εφαρμογής της χημικής ουσίας, εκτός από τη λήψη ή τη μη λήψη τροφής (και την αναζήτηση εναλλακτικής περιοχής για σίτιση).

Η ικανότητα των πτηνών για τον εντοπισμό και την αποφυγή τοξικών ενώσεων στη διατροφή τους έχει αποδειχθεί με διάφορα OPs και καρβαμιδικά ενώ σε πολλές μελέτες διατροφής (LC₅₀) παρατηρήθηκε δοσοεξαρτώμενη μείωση της κατανάλωσης τροφής (Kononen et al. 1986, 1987; Bennett 1989a, b).

Σε μία μελέτη διατροφής 5 ημερών Mineau et al. (1994) υποστήριξε ότι για μερικές αντι-CHE ουσίες, αποφυγή που εκδηλώθηκε στο εργαστήριο δεν

πιστοποιήθηκε και στον αγρό. Σε συνδυασμό με άλλες μελέτες (Edwards et al. 1993), methiocarb (Dolbeer et al. 1994), imidacloprid (Avery et al. 1994a) and fonofos (Hart and Clook, 1994) μόνο με το methiocarb που χρησιμοποιήθηκε ως αποθητικό σε φρούτα, υπήρξε ισχυρή ένδειξη αποφυγής η οποία ήταν αποτελεσματική για τη μείωση της επικινδυνότητας των πτηνών στον αγρό. Σύμφωνα με τον OECD (1996), μεγάλος αριθμός από μελέτες αγρού έδειξαν ότι αυτή η χρήση του methiocarb προκάλεσε μικρή θνησιμότητα σε πτηνά, και τα πτηνά λάμβαναν σημαντικά λιγότερη τροφή από τα φυτά που είχαν δεχτεί από αυτά που δεν είχαν δεχτεί αυτή την εφαρμογή. Ακόμα και σε αυτή την περίπτωση η εκδήλωση της αποφυγής για την μείωση της επικινδυνότητας μπορεί να είναι σχετικά μικρή, αφού ο κίνδυνος δεν διαφοροποιείται σημαντικά ακόμα και όταν δεν υπάρχει αποφυγή. Σε μία τουλάχιστον περίπτωση εκδήλωση ισχυρής αποφυγής σε πτηνά σε αιχμαλωσία απέτυχε να προστατέψει άγρια πτηνά. Το diazinon έχει υψηλή οξεία τοξικότητα σε πτηνά, αλλά εκδηλώνεται ισχυρά η αποφυγή σε δοκιμές διατροφής. Σε μικρά pen test όπου канаδέζικη χήνα (*Branta canadensis*) εκτέθηκε σε ρυπασμένο λειμώνα δεν παρατηρήθηκε θνησιμότητα, δείχνοντας έτσι ότι η αποφυγή ήταν αποτελεσματική για τη μείωση του κινδύνου. Παρόλα αυτά έχουν αναφερθεί ένας αριθμός από συμβάντα τοξικότητας συμπεριλαμβανομένου και των υδρόβιων πτηνών, μετά από χρήση diazinon σε λειμώνα και σε μελέτες αγρού. Ένας πιθανός λόγος είναι ότι τα πτηνά που αναφέρθηκαν σε αυτά τα περιστατικά τρέφονται πιο γρήγορα από τα πτηνά σε αιχμαλωσία και έτσι λαμβάνουν θανατηφόρες δόσεις πριν την εκδήλωση της αποφυγής (Mineau et al. 1994). Συχνά οι μη πραγματικές συνθήκες των μελετών στο εργαστήριο (και των pen test) να κάνουν την εκδήλωση της αποφυγής ευκολότερη από αυτή που θα είναι στον αγρό (π.χ. με τη χρήση καλοταϊσμένων πτηνών ή διατροφής υψηλής διαιτητικής αξίας) Υπάρχουν επίσης αμφιβολίες κατά πόσο ο αριθμός των περιστατικών στον αγρό ήταν τόσο υψηλός όσο θα αναμένονταν εάν δεν υπήρχε καθόλου αποφυγή. Από την άλλη πλευρά όπου δεν παρατηρήθηκε θνησιμότητα, άλλοι παράγοντες από την αποφυγή (π.χ. λιγότερα από τα αναμενόμενα υπολείμματα) μπορεί να είναι υπεύθυνοι για την μειωμένη τοξικότητα. Επίσης, η θνησιμότητα μπορεί να υποεκτιμήθηκε λόγω χαμηλής αποτελεσματικότητας της αναζήτησης νεκρών πτηνών στον αγρό ή ελλιπούς καταγραφής των συμβάντων τοξικότητας. Οι Price et al. (1971) έδειξαν επίσης ότι ορτύκια δεν απόφυγαν εκτεθειμένα με chlorpyrifos περιοχή. Όσον αφορά τη χρήση των αγρών σιτηρών από πτηνά που ψεκάστηκαν με chlorpyrifos τα χιονάδα (*Eremophila alpestris*) και *Calcarius mccownii* συνεχίζουν να τους χρησιμοποιούν (McEwen et al. 1986). Σύμφωνα με τους Booth et al. (2005) τα

δεδομένα λήψης τροφής σε μελέτη έκθεσης ορτυκίων με chlorpyrifos σε λειμώνες και σπόρους έδειξαν ότι ενήλικα πτηνά δεν έδειξαν αποστροφή στην τροφή. Σε κάθε περίπτωση, η θνησιμότητα στα ορτύκια έχει λίγο να κάνει με την ποσότητα της ληφθείσας δραστικής ουσίας.

Πολλοί παράγοντες φαίνεται ότι επηρεάζουν το εύρος της αποφυγής στη διατροφή από πτηνά σε αιχμαλωσία συμπεριλαμβάνοντας τα είδη των πτηνών (Schafer and Brunton, 1971; Schafer et al. 1983; Kononen et al. 1986, 1987; Espaillet and Mason, 1990; Mason et al. 1993; Mason and Bonwell, 1993), το φύλλο (Espaillet and Mason, 1990), το μέγεθος της ομάδας (Kononen et al. 1986), κοινωνικές αλληλεπιδράσεις (Mason and Reidinger, 1982), προηγούμενη εμπειρία (Starr et al. 1964; Greig-Smith, 1987), τύπος τροφής και αρχική περίοδος νηστείας (Thompson et al. 1981), το χρώμα της τροφής (Mason and Reidinger, 1983; Greig-Smith and Rowney, 1987), η οσμή του περιβάλλοντος (Jones et al. 2005), ο τύπος της διαθέσιμης καθαρής από τις ξενοβιοτικές ουσίες τροφής (Rogers, 1974), ο αριθμός των διαθέσιμων επιλογών (Bennett, 1989a, b), η περιβαλλοντική θερμοκρασία, και πιθανόν, την παρατηρούμενη επικινδυνότητα από θήρευση (Avery et al. 1994a). Μερικά είδη που τράφηκαν με ρυπασμένες σπόρους μπορεί να μειώσουν την πρόσληψη των χημικών ουσιών με την απομάκρυνση του κελύφους τους (Avery et al. 1994a).

Άλλες μελέτες έδειξαν τον κρίσιμο ρόλο του ρυθμού λήψης της τροφής με περιστέρια (*Columba livia*) που διατράφηκαν με σπόρους σιτηρών με το OP fenofos. Εκεί φάνηκε ότι ο ρυθμός που τα περιστέρια διατρέφονται με αυτούς τους σπόρους αυξήθηκε μετά από αρχική στέρηση (αύξηση της ασιτίας), με τον εγκλιματισμό των πτηνών ώστε να περιοριστούν οι ώρες διατροφής (2 ή 4 ώρες ανά ημέρα), και από τη στέγαση των πτηνών σε ομάδες (λόγω της κοινωνικότητας ή του ανταγωνισμού). Περαιτέρω δεν παρατηρήθηκε θνησιμότητα όταν τα πτηνά στεγάστηκαν ατομικά και χωρίς αρχική στέρησης της τροφής σε αυτές τις μελέτες, αλλά αυξήθηκε σε 80% όταν και οι 3 συνθήκες συνδυάστηκαν (ασιτία, περιορισμός ωρών διατροφής και στέγαση σε ομάδες) (Hart et al. 1999). Καταγραφή με video έδειξε ότι σε μερικές σοβαρές περιπτώσεις, οι πρώτες προσπάθειες για τροφοληψία την ημέρα του πειραματισμού ήταν πολύ γρήγορη (μέσο όρο 37-65 ραμφίσματα/min) και πολύ αργά (μέσο όρο 3-5 min), περιλαμβάνοντας μεγάλο ποσοστό από την συνήθη ημερήσια λήψη τροφής (Pascual et al. 1999b). Η θνησιμότητα εξαρτήθηκε από την αρχική προσληφθείσα δόση και από τη εξέμεση που ακολούθησε (Pascual et al. 1999a). Υπάρχει περιορισμένη πληροφόρηση για άλλα είδη, ενώ μελέτες με καθαρό φαγητό έδειξαν ότι ο ρυθμός

λήψης της τροφής για άλλα είδη συμπεριλαμβανομένου του φασιανού (*Phasianus colchicus*), σπιτοσπουργίτη μπορεί να αυξηθεί σημαντικά με χειρισμούς στον πειραματισμό του ρυθμού λήψης της τροφής, της ασιτίας και του μεγέθους της ομάδας των πτηνών (Fryday et al. 2001; Hart, 2002).

Υπάρχει σχετική αβεβαιότητα λοιπόν για την επέκταση δεδομένων της επίδρασης της αποφυγής από πτηνά σε αιχμαλωσία στα άγρια πτηνά, αναδεικνύοντας την αναγκαιότητα για τη χρήση συνθηκών πιο κοντά με αυτούς που υπάρχουν στον αγρό, παρά χρησιμοποιώντας πειραματισμό σύμφωνα με καθορισμένα πρωτόκολλα. Στις δοκιμές αποφυγής με το methamidophos ενισχύθηκε η ασιτία, έγινε πειραματισμός με ομάδες διαφορετικών ατόμων, σε περιβάλλον εργαστηρίου και ημι-αγρού σε ανοικτό χώρο, επανάληψη για τον έλεγχο της μάθησης, με ταΐστρες που εναλλάσσονταν ή όχι για τον έλεγχο της πηγής της απόκρισης αποφυγής (π.χ. γεύση, οσμή, χημική ουσία).

Η αποφυγή όπως αυτή υπολογίζεται στις μελέτες που διενεργήθηκαν μπορεί να είναι ένας συνδυασμός πολλών διαφορετικών επιδράσεων, συμπεριλαμβανομένων της (α) μείωσης του ρυθμού λήψης τροφής που οφείλεται σε δυσάρεστα χαρακτηριστικά της τροφής με το methamidophos (π.χ. γεύση ή οσμή) και (β) την πλήρη παύση των διατροφής, λόγω της έναρξης της τοξικής επίδρασης. Ωστόσο, για τα OPs όπως το methamidophos ο τύπος (β) της επίδρασης ίσως είναι πιο σημαντικός, με την αποφυγή εμφανίζεται κυρίως με την εκδήλωση των επιπτώσεων σε υπο-θανατηφόρες δόσεις (φυσιολογικές αλλαγές που περιλαμβάνουν την παρεμπόδιση της ChE του εγκεφάλου και που εκδηλώνονται εξωτερικά με την εμφάνιση κλινικών συμπτωμάτων). Στη μελέτη «two-choice» όμως διαπιστώθηκε η πιθανή ύπαρξη και του τύπου (α) της επίδρασης (οσμής) αφού και στον μάρτυρα και σε όλες τις άλλες μεταχειρίσεις, μετά την απομάκρυνση του methamidophos από το χώρο με τη χορήγηση καθαρού σιτηρεσίου, η ποσότητα λήψης της τροφής αυξήθηκε σημαντικά (30%) και για 3 συνεχείς ημέρες μέχρι το τέλος του πειραματισμού. Η συμβολή της επίδρασης της οσμής στην μείωση του κινδύνου είναι αβέβαιη γιατί δεν εμποδίζει τη λήψη του methamidophos σε υπο-θανατηφόρες δόσεις. Αγροί που ψεκάζονται με OPs μυρίζουν δυσάρεστα στους ανθρώπους. Είναι αβέβαιο σε τι βαθμό τα πτηνά μοιράζονται αυτή την αίσθηση. Συμπεριφορά που οφείλεται στην οσμή διαφέρει ευρέως στα πτηνά και τείνει να είναι πιο ανεπτυγμένη σε είδη με μεγάλα όργανα όσφρησης (π.χ. μερικά είδη της θάλασσας και αρπακτικά πτηνά), αλλά στην πραγματικότητα η ευαισθησία στην οσμή διαφέρει (Bang and Wenzel, 1985). Έχει αποδειχτεί ότι τα πτηνά μπορούν να χρησιμοποιήσουν οσφρητικές κινήσεις για να εντοπίσουν τη τροφή, για την πλοήγηση,

την επιλογή υλικών για την κατασκευή της φωλιάς (Roper, 1999). Πρόσθετα το πτηνό προτίμησε γνωστές οσμές (Gentle, 1985). Περιστέρια αποφεύγουν περισσότερο την τροφή με το OP fenofos σε δοχεία κλειστού σχήματος από ανοιχτού, μία διαφορά που αποδόθηκε στην επίδραση των ατμών (Fryday et al. 1998) αλλά η οσμή δεν εμπόδιζε το ίδιο είδος να πάρει θανατηφόρο δόση σε συνθήκες που προάγουν τη γρήγορη τροφοληψία (Hart et al. 1999). Επίσης είναι ξεκάθαρο ότι ούτε η οσμή ή η γεύση είναι αρκετό να αποτρέψει πλήρως τα πτηνά από να τραφούν με methamidophos μετά από εφαρμογή στον αγρό, καθώς μετρήσιμα υπολείμματα methamidophos βρέθηκαν στον δωδεκαδάκτυλο αγριόγαλου (*Centrocercus urophasianus*, Blus et al. 1989) και του φασιανού (*Phasianus colchicus*) (Grove et al. 1998) μέσα και γύρω από αγρούς πατάτας που ψεκάστηκαν με 1,12 kg methamidophos/ha.

Επέκταση δεδομένων σε συνθήκες αγρού, εκτίμηση επικινδυνότητας

Η κύρια ερώτηση είναι πως θα επεκτείνει κανείς τα δεδομένα σε πραγματικές συνθήκες, που θα είναι σχετικές με τη χρήση του methamidophos στον αγρό. Τα πτηνά στα αγροτικά οικοσυστήματα είναι αρκετά μικρότερα από τα ενήλικα ορτύκια σε εργαστηριακές συνθήκες, σε διαφορετικές διατροφικές ανάγκες και συμπεριφορά. Σε όλες τις εργαστηριακές μελέτες, τα πτηνά εγκλιματίστηκαν με συνεχή και απεριόριστη προμήθεια τροφής με πλήρης θρεπτικά στοιχεία, και οι ενεργειακές ανάγκες τους μειώθηκαν με τον έλεγχο των περιβαλλοντικών συνθηκών και της μειωμένης δυνατότητας να κινηθούν. Στον αγρό, υπάρχει μεγάλη διακύμανση στην διαθεσιμότητα της τροφής, το ενεργειακό τους περιεχόμενο είναι συνήθως φτωχότερο, υπάρχουν μεγαλύτερες ενεργειακές ανάγκες λόγω της αύξησης της δραστηριότητάς τους και της μεταβολής της θερμοκρασίας. Επιπρόσθετα ο χρόνος της λήψης της τροφής περιορίζεται από την ανταγωνιστική συμπεριφορά όπως η προστασία της περιοχής τους και η αποφυγή των θηρευτών. Ως αποτέλεσμα λοιπόν τα μικροπούλια στους αγρούς χρειάζονται περισσότερο φαγητό, αλλά έχουν λιγότερο χρόνο για να προσλάβουν, έτσι ο ρυθμός της λήψης της τροφής μπορεί να είναι μεγαλύτερος. Το μοντέλο επιβάρυνσης του οργανισμού (Body burden model) όπως αναλύεται κατωτέρω προσπαθεί να γεφυρώσει τα εργαστηριακά δεδομένα με τις πραγματικές συνθήκες στον αγρό και να εκτιμήσει της επικινδυνότητα του methamidophos μετά από τη χρήση του σε πραγματικές συνθήκες.

4.1.4 Μοντέλο επιβάρυνσης του οργανισμού (Body burden model)

Το συγκεκριμένο μοντέλο εκτίμησε την συμμετοχή των διαδικασιών απορρόφησης, κατανομής, μεταβολισμού και απέκκρισης (ADME) του methamidophos σε πτηνά βάση συγκεκριμένης μεθοδολογίας αξιολόγησης (EFSA, 2005), για την εκτίμηση της επικινδυνότητας από την οξεία τοξικότητα μετά από την εφαρμογή του σε πραγματικές συνθήκες στον αγρό. Το σενάριο του ελέγχου περιλαμβάνει είδη πτηνών που κυριαρχούν στις προτεινόμενες καλλιέργειες με διάφορη διαιτητική συμπεριφορά (εντομοφάγα όπως η κιτρινοσουσουράδα και ο μαυροτσιροβάκος και σποροφάγα-μικτής διατροφής όπως η σταρήθρα).

Σύμφωνα με την EFSA (2005), υπολογίστηκε ο απαραίτητος χρόνος διατροφής με ρυπασμένη τροφή για την επίτευξη του LD₅₀ (= HD), το ποσό της διατροφής που είναι αναγκαίο για να ληφθεί η δόση LD₅₀ και το ανάλογο ποσοστό ημερήσιας πρόσληψης τροφής. Στα εντομοφάγα πτηνά, σε όλες τις περιπτώσεις η κιτρινοσουσουράδα, για το σενάριο «ντομάτα», θα πρέπει να τροφοδοτηθεί μεταξύ 6,2 και 19,6 min λαμβάνοντας μεταξύ της 1,9 και 4,2% της ημερήσιας πρόσληψης τροφής. Ο μαυροτσιροβάκος, για το σενάριο «οπωρώνες», θα πρέπει να τροφοδοτηθεί μεταξύ 2,5 και 3,7 min λαμβάνοντας περίπου το 1% της ημερήσιας πρόσληψης τροφής. Όλα τα προηγούμενα δεδομένα είναι πολύ πιθανό να συμβούν και, κατά συνέπεια, υπάρχει υψηλός κίνδυνος οξείας τοξικότητας και για τα δύο εστιακά είδη. Για τα σποροφάγα πτηνά, στη χειρότερη περίπτωση για όλες τις δόσεις εφαρμογής η σταρήθρα, για το σενάριο «ντομάτα», θα πρέπει να τροφοδοτηθεί μεταξύ 4,2 και 10,2 min λαμβάνοντας μεταξύ 9,6 και 23,2% της ημερήσιας πρόσληψης τροφής. Όλα τα προηγούμενα δεδομένα είναι πολύ πιθανό να συμβούν, επομένως, στο χειρότερο σενάριο υπάρχει υψηλός κίνδυνος οξείας τοξικότητας για τη σταρήθρα. Στο ευνοϊκό σενάριο η σταρήθρα, θα πρέπει να τροφοδοτηθεί μεταξύ 47,8 και 171 min λαμβάνοντας μεταξύ 11,5 και 41,2% της ημερήσιας πρόσληψης τροφής. Για την πρώτη τιμή φαίνεται πιθανό να συμβεί ειδικά σε συνθήκες πίεσης, ενώ η δεύτερη φαίνεται αρκετά απίθανο για τη σταρήθρα να τρέφεται συνεχώς για 171 min, κατά την οποία θα καταναλωθούν 3,25gr σπόρων (41,2% FIR). Συνολικά η περίπτωση σοβαρού κινδύνου δεν μπορεί απόλυτα να αποκλειστεί και για τη σταρήθρα.

Η εκτίμηση επηρεάζεται από διάφορες αβεβαιότητες που πρέπει να ληφθούν υπόψη όπως αυτές συνοψίζονται στον Πίνακα 4.1-1. Οι περισσότερες από τις

καταγεγραμμένες αβεβαιότητες κυρίως μειώνουν τον κίνδυνο εξαιτίας των συντηρητικών παραδοχών που γίνονται στην εκτίμηση της επικινδυνότητας. Εκτός από τα σημεία αυτά υπάρχουν συντηρητικές παραδοχές που έγιναν στους υπολογισμούς και που θα πρέπει επίσης να λαμβάνονται υπόψη στη συνολική αξιολόγηση:

- Ο ρυθμός λήψης τροφής ανά λεπτό που χρησιμοποιούνται στους υπολογισμούς για τον μαυροτσιροβάκο παρουσιάζουν τη χειρότερη περίπτωση αφού έχει χαμηλότερο σωματικό βάρος και ρυθμό τροφής σε σχέση με την κιτρινοσουσουράδα από την οποία λήφθηκε η κατανάλωση τροφής ανά λεπτό.

Πίνακας 4.1-1: Περίληψη αβεβαιοτήτων στο μοντέλο επιβάρυνσης του οργανισμού.

Πηγή αβεβαιότητας	Κατεύθυνση	Μέγεθος
Τα είδη που εκτίθενται περισσότερο στον αγρό θα μπορούσαν να είναι περισσότερο ή λιγότερο ευαίσθητη από την τιμή HD.	+/--	H
Η χρήση του HD λαμβάνει υπόψη τη μεταβολή του LD ₅₀ μεταξύ των ειδών, αλλά όχι τη διακύμανση της ευαισθησίας εντός των ειδών: αν η κλίση της δόσης-επίδρασης είναι χαμηλή, τότε η θνησιμότητα μπορεί να προκύψει πολύ κάτω από το LD ₅₀ .	+	M
Η χρήση του HD αναφέρεται στη θνησιμότητα. Υπο-θανατηφόρες επιπτώσεις που οδηγούν σε προσωρινή εξασθένηση του οργανισμού μπορεί να προκαλέσουν αβεβαιότητα στον αγρό.	+	M
Αβεβαιότητα ως προς την εκτίμηση των AVD, AVT, από μελέτες που δεν είναι σχεδιασμένες για το σκοπό αυτό, συμπεριλαμβανομένης και μεγάλης εξάρτησης από το εύρος της δόσης και το χρόνο των παρατηρήσεων.	--	H
Επέκταση των τιμών AVD, k, FPM και της συνολικής εκτίμησης σε άλλα είδη.	+/-	H?
Η απορρόφηση υποτίθεται ότι είναι στιγμιαία και ολοκληρώνεται μετά από την κατάποση.	-	L
Η FPM υποτίθεται ότι είναι σταθερή, ενώ στην πραγματικότητα είναι πιθανό να μειωθεί με την πάροδο του χρόνου καθώς το ζώο αρχίζει να αισθάνεται τον κορεσμό της τροφής.	--	H
Τα υπολείμματα στα έντομα μπορεί να είναι χαμηλότερα ή υψηλότερα από την τιμή που παρουσιάζονται στη νέα Οδ. για τα πτηνά και θηλαστικά (EFSA, 2009).	+/-	M
Μείωση της έκθεσης που οφείλεται σε εξέμεση.	--	M (όχι για όλα τα είδη)
Ποιοτική αξιολόγηση της συνολικής αξιολόγησης των αβεβαιοτήτων που προσδιορίστηκαν: υψηλή αβεβαιότητα, αλλά κυρίως προς τη μείωση του κινδύνου, καθώς πολλές από τις παραδοχές είναι μέτριες έως έντονα συντηρητικές.	+/--	H

+/- ο κίνδυνος θα μπορούσε να αυξηθεί ή να μειωθεί

H/M/L υψηλή / μεσαία / χαμηλή

Η αξιολόγηση ανωτέρω λαμβάνει υπόψη μόνο την αποφυγή από τη διατροφή με methamidophos. Άλλοι μηχανισμοί μπορεί να συμβάλουν στην επίδραση της αποφυγής, αλλά η συμβολή τους είναι αβέβαιη. Αγροί που ψεκάζονται με OPs έχουν έντονα δυσάρεστη οσμή για τον άνθρωπο. Είναι αβέβαιο σε ποιο βαθμό τα πτηνά και τα άγρια θηλαστικά μοιράζονται αυτή την αίσθηση όπως έχει συζητηθεί ανωτέρω. Τέλος, πτηνά όπως η κιτρινοσουσουράδα που έχουν νεοσσούς στον αγρό είναι απίθανο να τους εγκαταλείψουν για καιρό.

Αξιολόγηση της αποφυγής της τροφής σε μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα

Μετά την έναρξη της επίδρασης της αποφυγής, το βασικό ερώτημα είναι τι θα κάνουν τα πτηνά που επιβιώνουν από την αρχική έκθεση - θα έχουν την ευκαιρία να εγκαταλείψουν τον αγρό, ή να αλλάξουν διατροφή μέσα στον αγρό, ή (με καθυστέρηση) θα συνεχίσουν να τρέφονται με το ίδιο φαγητό;

Μετά την έναρξη της αποφυγής και άλλων υπο-θανατηφόρων επιπτώσεων, τα πτηνά όπως η κιτρινοσουσουράδα που είναι μόνιμοι κάτοικοι ή φωλιάζουν στον αγρό μπορεί να μείνουν στον αγρό μέχρι να ανακτήσουν, αντί να φύγουν από αυτό. Αν φύγουν από τον αγρό, είναι πιθανό να επιστρέψουν αργότερα, ειδικά εάν έχουν αυγά ή νεοσσούς. Το ερώτημα είναι εάν θα επαναλάβουν τη διατροφή τους στον αγρό ή θα το επισκεφτούν μόνο και θα διατραφούν αλλού. Μια πιθανότητα είναι ότι μπορεί περιοδικά να λαμβάνουν τροφή από τον αγρό, όπως συμβαίνει καθημερινά σε πτηνά σε αιχμαλωσία στις διατροφικές μελέτες τοξικότητας. Στην περίπτωση αυτή, τα ζώα θα υποστούν μια σειρά από υπο-θανατηφόρα συμπτώματα. Η έκθεση αυτή θα μπορούσε να μειωθεί όπως και οι επιπτώσεις της εάν τα πτηνά μάθαιναν να αναγνωρίζουν την ύπαρξη μιας χημικής ουσίας γρηγορότερα ή εάν η συγκέντρωση της χημικής ουσίας μειώνεται με το χρόνο. Είναι δύσκολο να εκτιμηθεί με βεβαιότητα ο ρόλος των διάφορων παραγόντων στον προσδιορισμό της μορφής της μακροχρόνιας έκθεσης. Σε μία μελέτη LC₅₀ τα πτηνά που επέζησαν φάνηκαν να επαναλαμβάνουν τη διατροφή μέσα σε λίγες ώρες, όταν παρουσιάζεται καθαρή τροφή (EFSA, 2004b), αλλά δεν μας λέει πόσο γρήγορα θα αναγνωρίσει την παρουσία του methamidophos αν εκτεθούν εκ νέου στη συνέχεια.

Στην δοκιμή «two-choice test», φαίνεται ότι τα πτηνά δεν αναγνωρίζουν την παρουσία του methamidophos έως και τη συγκέντρωση των 77,5 ppm (3.25 mg/kg bw/d) αφού σε όλες τις συγκεντρώσεις για τις 3 d της έκθεσης κατανάλωσαν τόση ποσότητα methamidophos μέχρι στο όριο αποφυγής (χαμηλότερο από τη δοκιμή

αποφυγής «no choice test») από τις ταΐστρες με τη ρυπασμένη τροφή. Αντίθετα στη δοκιμή ημι-αγρού «pen test» μετά την 1^η ημέρα τα πτηνά προτίμησαν το καθαρό σιτηρέσιο μέχρι και την 3^η d με το πέρας του πειραματισμού δείχνοντας ότι τα ορτύκια μετά την επίδραση της τοξικότητας έμαθαν πολύ γρήγορα, ιδιαίτερα στη μεγαλύτερη από τις δύο συγκεντρώσεις methamidophos, ποια από τις ταΐστρες είχε τη ρυπασμένη τροφή.

Άλλα είδη πτηνών

Η πιθανότητα έκθεσης φυτοφάγων ειδών με μεγαλύτερες περιοχές αναζήτησης τροφής όπως οι φάσσες (*Columba palumbus* L.) είναι λιγότερο σαφής, εξαιτίας της έλλειψης πληροφοριών αν και δεν θεωρείται «εστιακό είδος» για αυτές τις καλλιέργειες. Πλήρης αξιολόγηση δεν αναμένεται να δείξει χαμηλή επικινδυνότητα, ιδίως επειδή η τροφή τους είναι πιθανό να περιέχει υψηλότερη αναλογία υπολειμμάτων από εκείνη της κίτρινοσουράδας και της σταρήθρας.

Άλλα χρονικά διαστήματα έκθεσης

Η αξιολόγηση αυτή εστιάστηκε κυρίως στην αρχική οξεία έκθεση, αν και θεωρείται επίσης σύντομος ο ρόλος της αποφυγής και σε πιο μακροχρόνιες εκθέσεις για τα πτηνά. Η αποφυγή της λήψης τροφής θα περιορίσει την έκθεση, αλλά αυτό είναι απίθανο να λειτουργήσει έντονα σε συγκεντρώσεις που σχετίζονται με μακροχρόνιες εκθέσεις.

Άλλες πηγές έκθεσης

Η εκτίμηση αυτή επικεντρώθηκε στην έκθεση ενηλίκων και νεαρών πτηνών από διατροφή.

Μια συνολική αξιολόγηση θα πρέπει να εξετάσει τη δυνητική σημασία και άλλων τρόπων έκθεσης, όπως:

- έκθεση μέσω του πόσιμου ύδατος,
- δερματική έκθεση,
- ψεκάσμος των αυγών και των νεοσσών.

Δεδομένης της υψηλής τοξικότητας της ουσίας methamidophos, ένα μικρό πτηνό (20gr), μπορεί να φτάσει σε θανατηφόρες δόσεις, με την κατανάλωση 0,01 ml

ψεκαστικού διαλύματος (0,75 kg meth./ha με 400 l/ha) από τη βάση φύλλων, ή αν σχηματίσουν προσωρινές λακκούβες στην επιφάνεια του εδάφους. Η σημασία αυτής της διαδρομής που επιτείνεται από μια έκθεση ενός συμβάντος στη Γερμανία, στην οποία βρήκαν το θάνατο πάνω από 100 σπιτοσπουργίτια, κοκκινόσπιζες (*Carduelis cannabina*) και καρδερίνες (*Carduelis carduelis*) ενώ αποδόθηκε σε δηλητηρίαση λόγω λήψης νερού από φύλλα μετά την εφαρμογή methamidophos με 0,36 kg a.s/ha (Hommes et al. 1990). Οι ίδιοι συγγραφείς ανέφεραν παρόμοια περιστατικά για τις ουσίες methomyl, oxydemeton-methyl, mevinphos και dimethoate, καθώς και ένα ακόμη περιστατικό αναφέρθηκε στη συνέχεια που σχετίζεται με το methamidophos, (Εκθέσεις 1998-2003, Δ6).

Μια πρόσφατη ανασκόπηση έχει παρουσιάσει γενικές σχέσεις παλινδρόμησης που προβλέπουν σε μελέτες αγρού, τη θνησιμότητα των πτηνών και τα περιστατικά δηλητηρίασης (Mineau, 2002). Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι τόσο η οξεία όσο και η τοξικότητα από το δέρμα συμβάλλουν σημαντικά στη θνησιμότητα των πτηνών. Η βάση δεδομένων που χρησιμοποιήθηκε είναι διαθέσιμη στο δικτυακό τόπο του εκδότη και περιλαμβάνει 4 περιπτώσεις της ουσίας methamidophos που χρησιμοποιούνται σε καλλιέργειες λάχανων και πατάτας, τα οποία περιλαμβάνουν στοιχεία θνησιμότητας των πτηνών [ένα περιστατικό σχετίζεται με πάνω από 100 ωδικά πτηνά που πίνουν νερό από φύλλα μετά από ψεκασμό σε καλλιέργειες λάχανων με 0,36 kg methamidophos/ha (Hommes et al. 1990)]. Μια σειρά από επεισόδια σε λάχανα με τη συμμετοχή υψηλής θνησιμότητας ψαρονιών (*Sturnus vulgaris*) και ορισμένων άλλων ειδών, με ανιχνεύσιμα επίπεδα υπολειμμάτων για το methamidophos και παρεμπόδιση της AChE μέχρι 76 % (US EPA, χωρίς ημερομηνία), ένα περιστατικό με 2 νεκρούς νεαρούς φασιανούς με > 90% παρεμπόδιση της AChE και υπολείμματα στο έντερο για το methamidophos (Grove et al. 1998), θνησιμότητα και δηλητηρίαση των αγριόγαλων (*Centrocercus urophasianus*) σε πατάτες (έως και 65% παρεμπόδιση της AChE, υπολείμματα στο έντερο για το methamidophos, Blus et al. 1989). Οι εφαρμογές στην πατάτα σύμφωνα με τους συγγραφείς είναι από αέρος με 1,12 kg meth./ha). Επιπλέον, η σχέση παλινδρόμησης προβλέπει θνησιμότητα στο 10% των αγρών που δέχτηκαν εφαρμογή methamidophos με δόσεις γύρω 0,1-0,2 kg methamidophos/ha, και στο 50% των αγρών στους οποίους εφαρμόστηκαν περίπου 0,5-0,8 kg methamidophos/ha (πίνακας 5 Mineau, 2002). Ωστόσο, η σχέση παλινδρόμησης βασίζεται σε μεγάλο βαθμό σε δεδομένα πεδίου της Βόρειας Αμερικής.

Υπο-θανατηφόρες και αναπαραγωγικές επιπτώσεις

Ακόμη και αν ο ρυθμός σίτισης είναι αρκετά χαμηλός όσον αφορά την απόκριση της αποφυγής στα πτηνά από το να φθάσουν σε θανατηφόρα επίπεδα, σε κάποιο βαθμό θα ξεπεραστεί αυτό το όριο και κατά πάσα πιθανότητα θα υποφέρουν από υπο-θανατηφόρα δηλητηρίαση. Επιπλέον, αυτό μπορεί να συμβεί επανειλημμένα, εάν τα ζώα συνεχίζουν να τρέφονται από τον ίδιο αγρό.

Οι πιθανές συνέπειες αυτών των επιπτώσεων μπορεί να εξεταστούν, ιδιαίτερα στο ενδεχόμενο εφάπαξ ή επαναλαμβανόμενων υπο-θανατηφόρων επιπτώσεων (π.χ. λήθαργος, αταξία) σε γονείς θα μπορούσαν να αυξήσουν τον κίνδυνο της θήρευσης, ή να επιδράσουν στη διαδικασία της διατροφής και της επιβίωσης των νεοσσών.

Εκτίμηση για ευρύτερους πληθυσμούς

Η παρούσα ανάλυση επικεντρώνεται κυρίως σε εκτίμηση της έκθεσης των τοπικών πληθυσμών των πτηνών, εντός και γύρω από τους αγρούς που ψεκάστηκαν με methamidophos. Η αξιολόγηση δείχνει ότι για το methamidophos, ο πρωταρχικός καθοριστικός παράγοντας της οξείας επικινδυνότητας είναι η έκθεση κατά τη διάρκεια της άμεσης ή σε μικρό χρονικό διάστημα σίτισης στον αγρό μετά τον ψεκάσμό. Ακόμη και αν ένα ζώο ξοδεύει λίγο χρόνο συνολικά στον αγρό, ο κίνδυνος μπορεί να είναι υψηλός, εφόσον γίνονται επισκέψεις για σίτιση λίγο μετά τον ψεκάσμό.

4.2 ΙΧΘΥΣ

Οι παρούσες μελέτες πραγματοποιήθηκαν για να διερευνηθεί η επίδραση του methamidophos σε νεαρές και ενήλικες πέστροφες, και ειδικότερα η συμπεριφορά, τα κλινικά συμπτώματα και η θνησιμότητα. Ακολουθήθηκαν διεθνώς αποδεκτές μεθόδους πειραματισμού στα πτηνά με το methamidophos (OECD, 2003, 2004): οξεία έκθεση 4 d, παρατεταμένη έκθεση 18 d.

Πρόσθετα πραγματοποιήθηκαν βιοχημικές και ιστοχημικές αναλύσεις ιστών (εγκεφάλου και ήπατος), προκειμένου να εκτιμηθούν οι τοξικές επιδράσεις.

Η συνολική προσέγγιση είναι πρωτότυπη όχι μόνο όσον αφορά τα συγκεκριμένα εργαστηριακά αποτελέσματα (πειραματισμός με την πέστροφα σε πολλά στάδια, ηλικίες, επίπεδα πειραματισμού, βιοχημεία σε συνδυασμό με ιστοχημεία) αλλά και η συνολική προσέγγιση γεφυρώνοντας τα μακροσκοπικά με τα βιοχημικά και ιστοχημικά αποτελέσματα, για την διερεύνηση των τοξικολογικών επιπτώσεων στα ψάρια.

Ανάλογα με τα πτηνά ο πειραματισμός της οξείας και παρατεταμένης τοξικότητας περιλαμβάνει πληθώρα παραμέτρων που πρέπει να αξιολογηθούν σε μακροσκοπικό επίπεδο ενώ με την παρούσα μελέτη έγινε διεύρυνση του πρωτοκόλλου συμπεριλαμβάνοντας διερεύνηση σε επίπεδο ιστών-στόχων και κυττάρου (με βιοχημεία και ιστοχημεία), ώστε να διερευνηθεί ολοκληρωμένα η εμφάνιση των επιπτώσεων στα ψάρια μετά την έκθεσή τους στο methamidophos.

Τα ψάρια έχουν χρησιμοποιηθεί σε διάφορες μελέτες για την αξιολόγηση των τοξικών επιδράσεων των OPs στο βιόκοσμο, στα γλυκά ύδατα και το θαλάσσιο περιβάλλον (Rodrigues and Fanta, 1998; Fanta et al. 2003; Machado and Fanta, 2003; Roex et al. 2003; De Melo et al. 2008) τόσο σε μελέτες οξείας όσο και σε παρατεταμένης τοξικότητας (Schwaiger et al. 1992; Sancho et al. 1997; Varó et al. 2008).

Η βιοχημική και ιστοπαθολογική αξιολόγηση είναι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται συνήθως για τον εντοπισμό των επιδράσεων σε ιστούς που συνδέονται με την έκθεση ξενοβιοτικών παραγόντων. Ο εγκεφαλος και το ήπαρ, δύο από τους ιστούς για τους οποίους έχει τεκμηριωθεί στο παρελθόν ότι αποτελούν στόχοι OPs, αναλύθηκαν βιοχημικά και ιστοχημικά (Bdint et al. 1995; Sancho et al. 1997; Sturm et al. 1999; Liao et al. 2006; Guimarães et al. 2007; Varó et al. 2008).

4.2.1 Μακροσκοπικές παρατηρήσεις

Στις ενήλικες πέστροφες στην μελέτη οξείας τοξικότητας, η θνησιμότητα στην πέστροφα που παρατηρήθηκε ήταν ανάλογη της συγκέντρωσης του methamidophos ενώ συντελέστηκε κυρίως την ημέρα 4 από την έναρξη της έκθεσης. Τα κλινικά συμπτώματα (σπασμωδική κίνηση, παραμονή στον πυθμένα του ενυδρείου, αντίδραση σε εξωτερικό ερέθισμα) που παρατηρήθηκαν από την ημέρα 1, είναι αυξανόμενης έντασης, ανάλογα της συγκέντρωσης και του χρόνου έκθεσης στο methamidophos.

Σε αντίθεση, στις νεαρές πέστροφες στην μελέτη παρατεταμένης τοξικότητας η θνησιμότητα των ορτυκιών παρατηρήθηκε στις μεσαίες και υψηλότερες συγκεντρώσεις του methamidophos κυρίως την ημέρα 4 ενώ τα κλινικά συμπτώματα (σπασμωδική ή αργή κίνηση, έλλειψη ισορροπίας, έλλειψη διάθεσης για να τραφούν), που παρατηρήθηκαν από την ημέρα 1, είναι και αυτά αυξανόμενης έντασης, ανάλογα της συγκέντρωσης και του χρόνου έκθεσης στο methamidophos. Στο δεύτερο μέρος του πειραματισμού, όπου για τις 3 μεγαλύτερες συγκεντρώσεις των 10,8, 20,7 και 40 mg/l, 5-6 ψάρια μεταφέρθηκαν σε καθαρό νερό από την ημέρα 4 και μετά, η αθροιστική θνησιμότητα ήταν μικρότερη από το 1^ο μέρος του πειραματισμού με την συνεχή έκθεση στο methamidophos μέχρι το τέλος του πειραματισμού την ημέρα 18. Τα κλινικά συμπτώματα ήταν χαμηλότερης έντασης αφού η αποκατάσταση της ισορροπίας ήταν άμεση, η κίνηση των ψαριών βελτιώθηκε σε μεγάλο βαθμό ενώ η έλλειψη της διάθεσής τους όμως να διατραφούν παρέμεινε σε μεγάλη ένταση μέχρι το πέρας του πειραματισμού.

Στον πειραματισμό που διενεργήθηκε στην οξεία τοξικότητα το $LC_{50}=43,12$ mg/l και το $NOEC<18$ mg/l ενώ στην παρατεταμένη τοξικότητα το $LC_{50}=16,8$ mg/l και το $NOEC=2,9$ mg/l δείχνοντας υψηλότερη τοξικότητα για τις νεαρές πέστροφες, πιθανόν γιατί ο χρόνος έκθεσης στην παρατεταμένη τοξικότητα είναι τουλάχιστον x 4 φορές περισσότερος από την μελέτη οξείας τοξικότητας στα ενήλικα άτομα.

Και σε άλλες μελέτες προσδιορίστηκαν οι διάφοροι τοξικολογικοί παράμετροι (π.χ. EC_{50}) μετά την εφαρμογή OPs. Σε μελέτες με azinphos methyl σε ψάρια της θάλασσας η μέση θανατηφόρος συγκέντρωση (72-h LC_{50}), όπως έχει αναφερθεί από τους Van Dolah et al. (1997) για τα ενήλικα της *Fundulus heteroclitus* (70 έως 105 μg/l) και των νεαρών *Sciaenops ocellatus* (10-12 μg/l). Όσον αφορά τα πολύ νεαρά στάδια ψαριών, η κατ'εκτίμηση 96-h LC_{50} s για azinphos το methyl για την 29^η d σε *Menidia*

beryllina και μετά 35 d σε *Argyropelecus affinis* ήταν 22,8 και 3,4 µg/l, αντίστοιχα (Hemmer et al. 1992). Μετά την έκθεση τσιπούρας σε πολύ νεαρά στάδια με azinphos methyl το 72-h LC₅₀ = 4,59 µg/l (Arufe et al. 2007) το οποίο είναι χαμηλότερο, γεγονός που υποδηλώνει μία τάση μεγαλύτερης ευαισθησίας των νεαρότερων σταδίων των ψαριών σε αυτό το OP. Σε είδη γλυκού νερού έχει αναφερθεί η 72-h LC₅₀ των 3,36 και 2,31 mg/l για το χρυσόψαρο (*Carassius auratus*) και το *Pimephales promelas*, αντίστοιχα (Adelman and Smith, 1976), υποδεικνύοντας ότι τα είδη αυτά είναι περίπου 500 - 800 φορές λιγότερο ευαίσθητα από τα πολύ νεαρά στάδια της τσιπούρας. Άλλα είδη όπως ο σολωμός (*Salmo salar*) (Mayer and Ellersieck, 1986) και η πέστροφα (Ferrari et al. 2004), έδειξαν ανάλογη ευαισθησία με τα πολύ νεαρά στάδια της τσιπούρας σε πειραματισμό οξείας τοξικότητας με azinphos methyl.

Οι επιδράσεις στη συμπεριφορά με OPs έχουν προσδιορισθεί σε διάφορες μελέτες, ακόμη και σε συγκεντρώσεις που είναι πολύ χαμηλότερες από εκείνες που προκαλούν εμφανή αποτελέσματα. Πολλές φορές η βιβλιογραφία περιγράφει πολλές τοξικές επιπτώσεις δραστικών ουσιών στα ψάρια, ωστόσο, η σημασία της επανάληψης των δοκιμών τοξικότητας με μία από αυτές τις δραστικές ουσίες σε διαφορετικά είδη ψαριών, δίνει ένα εύρος επιπτώσεων κυρίως όταν εξετάζουμε τον προσδιορισμό της θανατηφόρου ή των υπο-θανατηφόρων συγκεντρώσεων. Η συγκέντρωση 0,01 ml/l του Folidol 600 (methyl parathion) ήταν υπο-θανατηφόρος για τα *Rhamdia quelen* και το *Oreochromis niloticus* (Moreira, 1998) πολύ υψηλή σε σύγκριση με την συγκέντρωση 0,00097 ml/l που ήταν υπο-θανατηφόρα για το *Corydoras paleatus* (Fanta et al. 2003) ή 0,000025 ml/l για το *Brachydanio rerio* (Rodrigues and Fanta, 1998). Αυτό σημαίνει ότι διαφορετικά είδη αντιδρούν με διαφορετικούς τρόπους στην ίδια δραστική ουσία με μεγαλύτερη ή μικρότερη ανθεκτικότητα σε αυτή.

Υπο-θανατηφόρες συγκεντρώσεις με αντι-ChEs χημικές ουσίες μπορεί να επηρεάσουν την αναπνοή, την σίτιση, την κολυμβητική ικανότητα, την συμπεριφορά, τις σχέσεις θηράματος-κυνηγού, την ορμονική λειτουργία και την αναπαραγωγή, όλες με σαφείς οικολογικές συνέπειες (Peakall 1992).

Κοινές επιδράσεις σε ψάρια είναι η μείωση στην δραστηριότητα και την κατανάλωση της τροφής κατά την έκθεση σε parathion (Rand, 1977; Banas and Sprague, 1986) με θετική συσχέτιση μεταξύ της παρεμπόδισης της AChE και τις παρατηρούμενες αποκρίσεις συμπεριφοράς. Ωστόσο, άλλες μελέτες έχουν δείξει κατά την έκθεση σε υπο-θανατηφόρες συγκεντρώσεις OPs, αυξημένη δραστηριότητα (Henry and Atchinson, 1984; Kumar and Chapman, 1998) ή κατανάλωση τροφής (Roex et al.

2003) που φαίνεται να μην προκαλείται από την αυξημένη ζήτηση της τροφής ή αύξηση της όρεξης, αλλά πιθανότατα από αύξηση της εν γένει δραστηριότητας των ζώων. Οι Kumar and Chapman (1998), παρατήρησαν μειωμένη πρόσληψη τροφής, αλλά και αυξημένη δραστηριότητα σε *Melanotaenia duboulayi* μετά από έκθεση σε profenofos. Μελέτες έχουν δείξει επίσης ότι η υπερκινητικότητα σχετίζεται με χαμηλές συγκεντρώσεις OPs (Henry and Atchinson, 1984; Kumar and Chapman, 1998; Roex et al. 2003). Σύμφωνα με τους Roex et al. (2003), σε έκθεση parathion μετά από 250 d στο 0,01-1% της τιμής EC₅₀ (1,85 mg/l), προκλήθηκε υπερδραστηριότητα για το *Brachydanio rerio*. Αυτό είναι στα επίπεδα με τις συγκεντρώσεις στις οποίες παρατηρείται η υπερδραστηριότητα στη βιβλιογραφία (Henry and Atchinson, 1984; Kumar and Chapman, 1998). Στην ίδια μελέτη δεν επιβεβαιώθηκε η υποτιθέμενη αύξηση της ενεργειακής ζήτησης όπως συμβαίνει συνήθως στις οξείες τοξικότητες.

Σε άλλες μελέτες σε γενικές γραμμές, ψάρια που έχουν επιπτώσεις από OPs έδειξαν σημάδια μυϊκής παράλυσης, ιδιαίτερα των πτερυγίων και των αναπνευστικών οργάνων, υπερδραστηριότητας, και απώλεια της ισορροπίας. Οι McKim et al. (1987) έδειξαν ότι ψάρια με επιπτώσεις από αντι-ChEs χάνουν την ισορροπία, κολυμπούν σαν σε σπείρα ή τριμπουσόν, υπεραντιδρούν σε ερεθίσματα, έχουν αύξηση του πλάτους της αναπνοής και μπορεί να έχουν σπασμούς. Πιθανολογείται ότι ο θάνατος οφείλεται σε ασφυξία λόγω συνδυασμού παραγόντων, συμπεριλαμβανομένης της παράλυσης των μυών, που παρέχουν κίνηση του νερού μέσα από τα βράγχια, βραδυκαρδία, (Zinkl et al. 1991). Σύμφωνα με τον Sancho et al. (1997) τα συμπτώματα που παρατηρήθηκαν στο *Anguilla anguilla* μετά από έκθεση σε fenitrothion ήταν ακανόνιστο κολύμπι και συσπάσεις που έχουν επίσης παρατηρηθεί στο ίδιο είδος, όταν εκτίθενται σε άλλα OPs (Ferrando et al. 1991; Sancho et al. 1993; Ceron et al. 1996).

Η αναστολή της AChE στα ψάρια μπορεί να είναι επιβλαβής και στην καρδιά. Το αποτέλεσμα της μειωμένης δραστηριότητας της AChE στην καρδιά είναι παρόμοιο με το πνευμονογαστρικό αποτέλεσμα, δηλ. επιβράδυνση του καρδιακού ρυθμού. Αυτό μπορεί να προκαλέσει δυσμενείς επιπτώσεις στο μεταβολικές διαδικασίες που σχετίζονται με το κυκλοφοριακό. Στην περίπτωση αυτή, η αναστολή της καρδιακής λειτουργίας παρεμβαίνει στην πρόσληψη οξυγόνου και την απελευθέρωση του διοξειδίου του άνθρακα στα βράγχια, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε υποξία σε επίπεδο ιστού (Hughes, 1976). Οι εν λόγω επιδράσεις μπορεί να είναι αναστρέψιμες εάν τα κύτταρα λαμβάνουν και πάλι οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά (Asztalos et al. 1988).

Αν και η ευαισθησία ένζυμου-στόχου σε κάποια OPs δεν είναι καλή ένδειξη για

την πρόβλεψη της οξείας τοξικότητας στους επίμυες, στα ψάρια η ευαισθησία του στόχου φαίνεται να είναι πολύ πιο σημαντική για τον προσδιορισμό της οξείας τοξικότητας του parathion και chlorpyrifos ενώ οι μεταβολικοί παράγοντες φαίνεται να είναι πολύ λιγότερο σημαντικοί.

Η AChE του εγκεφάλου στα ψάρια είναι σημαντικά λιγότερο ευαίσθητη στην παρεμπόδιση από το paraoxon από την AChE του εγκεφάλου τρωκτικών (Johnson and Wallace, 1987), το οποίο αντιστοιχεί σε μεγαλύτερη τοξικότητα της ουσίας parathion και paraoxon στα τρωκτικά από τα ψάρια (Murphy et al. 1968; Benke et al. 1974). Η AChE του εγκεφάλου στα ψάρια είναι περισσότερο ευαίσθητη στην παρεμπόδιση στο chlorpyrifos-oxon από το paraoxon, κάτι που ισχύει επίσης για τους επίμυες (Chambers et al. 1999). Ωστόσο, σε αντίθεση με τα θηλαστικά το chlorpyrifos είναι περισσότερο τοξικό στα ψάρια από το parathion. Τα επίπεδα τοξικότητας φαίνεται να αντικατοπτρίζουν την ευαισθησία στο ένζυμο-στόχο. Είναι πιθανό οι μεταβολικοί παράγοντες που παρατηρήθηκαν στα θηλαστικά και επηρεάζουν σημαντικά τα επίπεδα οξείας τοξικότητας να είναι λιγότερο σημαντικοί για τα ψάρια, διότι τα κατώτερα σπονδυλωτά έχουν σημαντικά χαμηλότερη δραστηριότητα των ενζύμων που μεταβολίζουν τους ξενοβιοτικούς παράγοντες (Wallace and Dargan, 1987). Επιπλέον, σε αντίθεση με τον επίμυ, τα χαμηλά επίπεδα από αλιεστεράσες (aliesterases) που υπάρχουν στο γατόψαρο φαίνεται να προσφέρουν μικρή προστασία (Chambers et al. 1995). Οι χαμηλότερες δραστηριότητες αναμένονται να είναι λιγότερο αποτελεσματικές στον μεταβολισμό των OPs, επιτρέποντας έτσι την εγγενής αντίδραση των oxons να κυριαρχούν στον καθορισμό του επιπέδου της οξείας τοξικότητας. Στα θηλαστικά, από την άλλη πλευρά, η υψηλή δραστηριότητα των ενζύμων που μεταβολίζουν τους ξενοβιοτικούς παράγοντες και άλλων προστατευτικών ενζύμων, όπως οι αλιεστεράσες θα έχουν ουσιαστική επίδραση στα επίπεδα κυκλοφορίας του μητρικού μορίου και του ενεργού μεταβολίτη, οδηγώντας έτσι σε ένα πολύ πιο σύνθετη τοξικοκινητική. Σύμφωνα με τον Chambers et al. (1998) η λιποφιλικότητα του phosphorothionate διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην τοξικότητα της ένωσης για τα ψάρια. Γατόψαρα (*Ictalurs punctatus*) εκτέθηκαν *in vivo* σε parathion, chlorpyrifos, και των αντίστοιχων oxons τους σε συγκεντρώσεις που θα απέδιδαν παρεμπόδιση της AChE του εγκεφάλου μεγαλύτερη από 90% χωρίς να επιφέρουν το θάνατο. Η παρεμπόδιση της AChE εγκεφάλου στο γατόψαρο ήταν πιο έμμονη στο chlorpyrifos από το parathion, συσχετιζόμενη με τη μεγαλύτερη βιοδιαθεσιμότητα του chlorpyrifos λόγω της μεγαλύτερης λιποφιλικότητας του (Carr et al. 1995). Επιπλέον από τη στιγμή που τα

λιποφιλικά χαρακτηριστικά του chlorpyrifos μειώνονταν, η τοξικότητα των δύο ενώσεων έτεινε να είναι παρόμοια. Η υψηλότερη τοξικότητα της chlorpyrifosoxon σε σύγκριση με το paraoxon θα μπορούσε να αποδοθεί στην υψηλότερη δραστηριότητα της ως παρεμποδιστής της AChE στο γατόψαρο (Chambers et al. 1995).

4.2.1 Βιοχημικές-ιστοχημικές παρατηρήσεις

Οι ChEs των ψαριών είναι αποδεκτοί και ευαίσθητοι δείκτες των OPs και καρβαμιδικών (Fulton and Key, 2001).

Η βιοχημεία στον πειραματισμό οξείας και παρατεταμένης τοξικότητας έδειξε, σημαντική μείωση της δραστηριότητας των ChEs στον εγκέφαλο και το ήπαρ της πέστροφας, ακόμα και από την ημέρα 1 μετά την έναρξη του πειραματισμού. Τα συνολικά αποτελέσματα δείχνουν ότι ακόμη και σε χαμηλά επίπεδα έκθεσης, η δραστηριότητα των ChEs μπορεί να μειωθεί σημαντικά. Η ιστοχημεία αναλόγως έδειξε διαφοροποίηση της δραστηριότητας των ChEs στον εγκέφαλο και το ήπαρ των ενήλικων και νεαρών ατόμων της πέστροφας.

Χρησιμοποιώντας τις βιοχημικές παρατηρήσεις μπορούμε να εκτιμήσουμε ποσοτικά τις επιδράσεις των OPs και επιπλέον χρησιμοποιώντας την ιστοχημεία των ChEs, να καθορίσουμε την ακριβής ανατομική θέση αυτής της έκφρασης.

Και στις δύο μελέτες τα αποτελέσματα δείχνουν ότι στον εγκέφαλο της πέστροφας προκαλούνται ιστολογικές αλλοιώσεις, αναλόγως των συγκεντρώσεων του methamidophos. Αυτές οι μεταβολές κυμαίνονται από άτυπη κυτταρική μορφολογία (εκφυλισμός της κυτταρικής δομής σε επίπεδο πυρήνα και καρυομεγάλια, εμφάνιση μικρών εστιών με αποπτωτικά ή μιτωτικά κύτταρα) ως στην διατάραξη της ιστικής αρχιτεκτονικής όπως η παρουσίαση εντονότατων διάσπαρτων ή εκτεταμένων νεκρωτικών εστιών και συστηματικής σπογγειόμορφης μορφολογίας. Η ιστοπαθολογική εξέταση του εμβρύου *Orizias latipes* εκτεθειμένο σε diazinon αποκάλυψε μικρές εστίες νεκρωτικών κυττάρων τα οποία διαπιστώνονται στην εσωτερική πυρηνική στιβάδα και σε απομονωμένα πυκνωτικά κύτταρα στο στρώμα του γάγγλιου (Hamm et al. 1998).

Στη βιοχημεία στην οξεία τοξικότητα η δραστηριότητα των ChEs στον εγκέφαλο, με το ASCh είχε υψηλή τιμή ενώ με το BuSCh και το PrSCh χαμηλή αποδεικνύοντας όμως σαφώς ότι η AChE είναι η κυρίαρχη μορφή. Στην παρατεταμένη τοξικότητα η δραστηριότητα της AChE στον εγκέφαλο, ήταν λιγότερο από το 10% της αντίστοιχης

στην οξεία τοξικότητα, ενώ η BuChE ή οι ChEs με το PrSCh είχαν πολύ χαμηλή δραστηριότητα.

Σύμφωνα με τους Sturm et al. (1999), η ChE του εγκεφάλου κατηγοριοποιείται ως AChE με τη χρήση παρεμποδιστών σε διάφορα ψάρια. Στα περισσότερα ψάρια, ο εγκέφαλος περιέχει αποκλειστικά AChE (Kozlovskaya et al. 1993; Sturm et al. 1999; Chuiko, 2000; Arufe et al. 2007) και η δραστηριότητα αυτή μπορεί να διαφέρει 10 φορές μεταξύ των ειδών των ψαριών (Chuiko, 2000).

Η η AChE είναι η κυρίαρχη μορφή στα δύο φύλα και τους ιστούς, η οποία είναι σε συμφωνία με τα αποτελέσματα άλλων μελετών που διεξάγονται σε γλυκά νερά, εκβολές ποταμών και των θαλάσσιων ψαριών, όπως το *Poecilia reticulata* (Garcia et al. 2000), ενώ σύμφωνα με άλλη μελέτη στα ψάρια, η AChE είναι κυρίαρχη στον εγκέφαλο και τους μυς (Habig and Di Giulio, 1991). Σύμφωνα με τον Varó et al. (2008) η δραστηριότητα της ChE στον εγκέφαλο έδειξε ευαισθησία σε BW284C51 ενώ δεν έδειξε ευαισθησία στο iso-OMPA.

Οι Bertrand et al. (2001), εξέτασαν την έκφραση του mRNA της AChE σε αναπτυσσόμενα έμβρυα ψαριών zebra και δεν μπορούσε να βρει καμία mRNA ή AChE ενζυμική δραστηριότητα πριν από το στάδιο 5-σωμιτών. Σύμφωνα με τον Küster (2005) η δραστηριότητα της AChE, πολύ χαμηλή έντασης, υπολογίστηκε μόνο στο στάδιο 6-σωμιτών σε έμβρυα ψαριών *Brachydanio rerio* και με αύξηση της έντασης σε μεγαλύτερα στάδια. Η δραστηριότητα των ChEs αυξήθηκε από την ηλικία των 1-5 ημερών πριν την εκκόλαψη των ωών μέχρι την ημέρα 19 μετά την εκκόλαψη, δείχνοντας ότι υπάρχει θετική σχέση ανάμεσα στο μήκος του σώματος και της δραστηριότητας των ChEs στο σώμα (Küster, 2005). Σύμφωνα με τον τους Arufe et al. (2007) εκτός από τη θετική συσχέτιση μεταξύ της δραστηριότητας ChEs σε ολόκληρο το σώμα και την ηλικία, αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι η εγκεφαλική δραστηριότητα AChE είναι χαμηλότερη σε ηλικιωμένα (μεγαλύτερα) ψάρια από ό, τι σε νεότερα (μικρότερα) ψάρια (Beauvais et al. 2002; Flammarion et al. 2002).

Σύμφωνα με τον Küster (2005), χρησιμοποιώντας τους κατάλληλους παρεμποδιστές το μεγαλύτερο μερίδιο των ChEs σε έμβρυα zebra χαρακτηρίστηκε ως AChE που φαίνεται να έχει τη δυνατότητα να υδρολύει την PrSCh και την BuSCh. Οι Bertrand et al. (2001) δεν βρήκαν γονίδιο για BuChE ή αντίστοιχη ενζυμική δραστηριότητα σε έμβρυα στο *Brachydanio rerio* αλλά θα μπορούσε να αποδεχτεί την ύπαρξη ενός γονιδίου AChE. Οι Garcia et al. (2000) δεν μπόρεσαν να βρουν παρεμπόδιση της επίδρασης στο *Poecilia reticulata*, με ειδικό παρεμπόδιση (DPDA)

ενώ οι Szabo et al. (1992) βρήκαν μια πολύ χαμηλή αναλογία της BuChE/AChE στα ψάρια. Σε αντίθεση, BuChE έχουν βρεθεί σε άλλες ομάδες ψαριών (Magnotti et al. 1994), στο *Gasterosteus aculeatus* (Sturm et al. 1999) και στο ήπαρ και τους μυς του *Oreochromis niloticus* (Rodriguez-Fuentes and Gold-Bouchot, 2004). Ο λόγος για την διάφορη εμφάνιση του BuChE σε διάφορα είδη ψαριών δεν είναι γνωστός αλλά οι Bertrand et al. (2001) υπέθεσαν ότι ο διπλασιασμός του προγονικού γονιδίου που έδωσε τελικά τα AChE και BuChE σε ορισμένα ψάρια (Pezzementi et al. 1998), απωλέσθηκε στη συνέχεια όπως στα κυπρινοειδή.

Ανάλογα με τον πειραματισμό που πραγματοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη, τα ποσοστά υδρόλυσης στο λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*) χρησιμοποιώντας είτε BuSCh ή PrSCh ήταν παρόμοια (Varo et al. 2003) ενώ στην τσιπούρα (*Sparus aurata*), τα ποσοστά υδρόλυσης της BuSCh ήταν τα μισά του PrSCh (Varo et al. 2007).

Και για τις δύο μελέτες στις ενήλικες και νεαρές πέστροφες η χαμηλή τιμή της δραστηριότητας των ChEs με το PrSCh είναι αντίθετη με τα ορτύκια γεγονός που αποδεικνύει ότι στην πέστροφα το ένζυμο AChE βιοχημικά δεν υδρολύει το PrSCh στον εγκέφαλο της ενήλικης και νεαρής πέστροφας.

Ευρήματα για την ύπαρξη μη ειδικής δραστηριότητας είναι σε συμφωνία αφού σύμφωνα με τις παρατηρήσεις των Sturm et al. (1999) βρέθηκε υπολειμματική ενζυμική δραστηριότητα κατά 17,7 έως 24,7%, αν και χρησιμοποίησαν BW284c51, ενώ αυτό είναι συγκρίσιμο και με τα δεδομένα του Küster (2005). Η χρήση PrSCh από τον Küster (2005) σε όλο το ψάρι *Brachydanio rerio* έδειξε ανάλογα αποτελέσματα με το ASCh δείχνοντας ότι η AChE μπορεί να υδρολύει και τα δύο υποστρώματα.

Η ειδική δραστηριότητα της καρβοξυλ-εστεράσης (CaE) μπορεί να είναι μόνο ένα από τα διάφορα ισοένζυμα στο ψάρι *Brachydanio rerio*. Αρκετές μελέτες έδειξαν την ύπαρξη πολλών ισοενζύμων CaEs μεταξύ των ειδών ψαριών (Li and Fan 1996, 1997).

Στην οξεία τοξικότητα η ενζυμική δραστηριότητα με τον μη επιλεκτικό παρεμποδιστή στις ChEs, eserine, παρεμποδίστηκε κατά 95%, επιβεβαιώνοντας ότι η δραστηριότητα των εστερασών που καταγράφηκαν οφειλόταν στις ChEs και όχι σε άλλα είδη εστερασών (Eto, 1974; Silver, 1974; Thompson and Walker, 1994). Από τα στοιχεία του Küster (2005) συμπεραίνεται ότι ενζυμικές δραστηριότητες με AChE οφείλονται σε μη ειδικές εστεράσες που δεν παρεμποδίζονται από υψηλές συγκεντρώσεις eserine, DPDA ή BW284c51. Από την άποψη του χαρακτηρισμού της AChE, ο Silver (1974) αναφέρει ότι μία ενζυματική αντίδραση που εκδηλώνεται παρά

την παρουσία eserine είναι απίθανο να οφείλεται σε ChEs. Ως εκ τούτου, οποιαδήποτε άλλη ενζυματική δραστηριότητα κατά τη χρήση eserine θα πρέπει να οφείλεται σε εστεράσες ανθεκτικές στην eserine. Σύμφωνα με τον Varó et al. (2008) και μετά από έκθεση του dichlorvos στο *Aphanius iberus* η χρήση της eserine παρεμπόδισε σχεδόν πλήρως την δραστικότητα της ChE (δραστικότητα <10-2%) γεγονός που δείχνει ότι η ενζυμική δραστικότητα οφείλεται κυρίως στην ChE και όχι σε άλλα είδη εστερασών ενώ στην ίδια μελέτη στους μυς, η συμμετοχή άλλου τύπου εστερασών στα ψάρια *Micromesistius proutassou*, *Phycis blennoides* and ελασμοβράγχια (elasmobranchs) είναι σημαντική αφού 10-30% της δραστικότητας των ChEs παρέμεινε παρά την προσθήκη eserine (Solé et al. 2008).

Το ποσοστό της παρεμπόδισης των ChEs στον εγκέφαλο με το ASCh κυμάνθηκε κατά μέσο όρο περίπου 20% την ημέρα 1 (εκτός της μικρότερης συγκέντρωσης όπου η δραστικότητα αυξήθηκε κατά 78% σε σύγκριση με τον μάρτυρα) σε μια μέση τιμή περίπου 55% μετά από 4 d.

Στην παρατεταμένη τοξικότητα μετά την εφαρμογή του methamidophos, καταγράφηκε σημαντική μείωση της δραστικότητας των εστερασών στον εγκέφαλο της νεαρής πέστροφας, ακόμα και από την ημέρα 1 για τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις. Αντίθετα στις μικρότερες συγκεντρώσεις παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της AChE τουλάχιστον μέχρι την ημέρα 3 ενώ την ημέρα 18, εκτός από την χαμηλότερη συγκέντρωση που παρέμεινε αυξημένη, η δραστικότητα είχε επιστρέψει στα επίπεδα του μάρτυρα.

Στο δεύτερο μέρος του πειραματισμού, όπου για τις 3 μεγαλύτερες συγκεντρώσεις των 10,8, 20,7 και 40 mg/lit, 5-6 ψάρια μεταφέρθηκαν σε καθαρό νερό από την ημέρα 4 και μετά, την ημέρα 18 η δραστικότητα ήταν αυξημένη σε μεγάλο βαθμό σε σύγκριση με τον μάρτυρα, σε αντίθεση με την μεγάλη παρεμπόδιση που καταγράφηκε στο πρώτο μέρος του πειραματισμού με τη συνεχή έκθεση στο methamidophos.

Είναι εύλογο να αναμένουμε ότι ψάρια με διαφορετικές μορφές ζωής (π.χ. τροφικές στρατηγικές) και μεταβολισμό θα εμφανίσουν διαφορετικές δραστικότητες ChEs, και κατά συνέπεια να εκφράζουν διαφορετική ευαισθησία σε νευροχημικά.

Μελέτες ψαριών δείχνουν ότι υπάρχει μεγαλύτερη μείωση της δραστικότητας AChE μετά από έκθεση σε υψηλότερες συγκεντρώσεις OPs (Jeney and Jeney, 1986, trichlorphon; Morgan et al. 1990, fenitrothion; Hoy et al. 1991, dichlorvos; Da Silva et al. 1993, methylparathion). Η διάρκεια της έκθεσης, ο τύπος του OP καθώς και τα είδη

των ψαριών, μπορούν επίσης να επηρεάσουν το ποσό της μείωσης της δραστηριότητας της AChE (Zinkl et al. 1991). Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι η παρεμπόδιση της AChE που προκαλείται από τα OPs αυξάνει με την αύξηση του χρόνου έκθεσης (Detra and Collins, 1991).

In vivo εφαρμογή methidathion σε ενήλικο κυπρίνο (*Cyprinus carpio* L.) παρεμποδίζει την δραστηριότητα της AChE κατά 90-92% στον εγκέφαλο (Bdint et al. 1995). Η δραστηριότητα της AChE παρεμποδίστηκε στον εγκέφαλο του *Anguilla anguilla* περισσότερο από το 70% μετά από 24 h της έκθεσης σε fenitrothion (Ceron et al. 1996). Η ChE του εγκεφάλου παρεμποδίστηκε 56,7% στα θήλεα και 55,7% στα αρρενα μετά από 96 h έκθεσης του *Aphanius iberus* σε dichlorvos (Varó et al. 2008). *A. anguilla* παρουσίασαν μεγαλύτερη μείωση της δραστηριότητας AChE σε μεγαλύτερους χρόνους έκθεσης και υψηλότερες συγκεντρώσεις fenitrothion. Μια τέτοια σχέση συγκέντρωσης-επίδρασης διαπιστώθηκε για μερικά άλλα OPs (Morgan et al. 1990; Hoy et al. 1991; Da Silva et al. 1993; Ceron et al. 1996). Η έκθεση σε 0,04 ppm fenitrothion έδωσε 64% μείωση της δραστηριότητας της AChE, και με 0,02 ppm έδωσε 44% μείωση σε AChE σε 96 h έκθεσης.

Σύμφωνα με το Straus et al. (1995) το OP εντομοκτόνο S,S,S-tributyl phosphotriothioate (DEF) δεν παρεμπόδισε σημαντικά τις ChEs στον εγκέφαλο και τους μυς με ανάλογα αποτελέσματα και σε δοκιμές *in vitro*. Αμυντικοί μηχανισμοί ή/και ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός του μπορεί να εμποδίζουν το DEF να φτάσει σε αυτούς τους ιστούς, όπως ο ενεργός μεταβολίτης (εξ) τους. Χαμηλά επίπεδα από τα κυτοχρώματα P450 στον εγκέφαλο και τους μυς, θα οδηγήσουν σε χαμηλή ενεργοποίηση των OPs ενώ η αύξηση της παρεμπόδισης με το χρόνο κατά τη διάρκεια μελετών *in vivo* δείχνουν αργό μεταβολισμό. Οι Habig et al. (1986) ανέφεραν καθυστέρηση στην παρεμπόδιση των ChEs στον εγκέφαλο στο *Ictalurs punctatus* (περίπου 58%) και των μυών (περίπου 63%) μετά από πειραματισμό 4-ημερών με το DEF, χωρίς όμως να αναλυθούν τα βράγχια, το ήπαρ και το πλάσμα. Η ταχεία παρεμπόδιση της ηπατικής AChE που παρατήρησε ο Straus et al. (1995) μπορεί να οφείλεται στη στενή εγγύτητα με τα σημεία σε ένα σημαντικό σημεία ενεργού μεταβολισμού.

Η παρεμπόδιση και η ανάκαμψη της δραστηριότητας των ChEs μετά από έκθεση αντι-ChEs μπορεί να διαφέρει μεταξύ ειδών ψαριών και μεταξύ ΦΠ (Fisher, 1991; Richmonds and Dutta, 1992; Ferrari et al. 2004), και είναι γενικά παρατεταμένη και στην περίπτωση των OPs (Ferrari et al. 2007).

Οι παρατηρήσεις του πειραματισμού είναι ανάλογες με τους Ansari and Kumar (1984) αφού χρειάστηκε περίπου 12 d για τη δραστικότητα της AChE στον εγκέφαλο πέστροφας να επιστρέψει σε φυσιολογικά επίπεδα μετά από έκθεση σε methamidophos, και 15 d μετά από έκθεση σε acephate. Όσον αφορά τη δραστικότητα της AChE στον εγκέφαλο σε πέστροφες (*Salvelinus fontinalis*, *Oncorhynchus mykiss*), σολομό (*Oncorhynchus kisutch*), αυτή ανέκαμψε πλήρως 25 d μετά από έκθεση σε malathion (Sanders et al. 1981). Η δραστικότητα της AChE σε *Oreochromis niloticus* δεν είχε ανακάμψει πλήρως 7 d μετά την έκθεση σε dichlorvos (Zinkl et al. 1991).

Σε παρατεταμένη τοξικότητα και σε υπο-θανατηφόρες συγκεντρώσεις τα παράγωγα μεταβολικών διαδικασιών μπορούν να γίνουν ενεργά, όπως η *de novo* σύνθεση της AChE, όπως προτάθηκε (Carr and Chambers, 1996; Abbas and Hayton, 1997; Legierse 1998). Η *in vivo* επαναδραστηριοποίηση της AChE δεν θα έπρεπε να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο, δεδομένου ότι αυτή η επανεργοποίηση είναι πολύ χαμηλή σε σύγκριση με επίμυες και μύες, ή ακόμα και ανιχνεύσιμη (Wallace and Herzberg, 1988; Carr and Chambers, 1996).

Οι Wallace and Herzberg (1988) πρότειναν ότι η *de novo* σύνθεση AChE είναι υπεύθυνη για την ανάκαμψη στην πέστροφα (*Oncorhynchus mykiss*), μετά από έκθεση σε malaoxon και paraoxon αφού βρήκαν ότι μερική επανεργοποίηση εμφανίζεται στο *Pimephales promelus*. Περισσότερες ομοιότητες με την πέστροφα είχε το γατόψαρο (*Ictalurs punctatus*) εμφανίζοντας πολύ αργή και αυθόρμητη επανεργοποίηση (Carr et al. 1995). Άλλες μελέτες που χρησιμοποιούν άλλα OPs έδειξαν ότι η παρεμπόδιση της δραστικότητας του AChE στον εγκέφαλο απαιτεί μια μακρά περίοδο ανάκτησης (Fleming and Grue, 1981; Morgan et al. 1990). Αυτό οφείλεται κυρίως επειδή το ένζυμο αναγεννιέται με σύνθεση *de novo* και όταν τα επίπεδα έχουν μειωθεί, πρέπει να παραχθεί μεγάλο ποσό αυτού του ενζύμου (Fleming and Grue, 1981). Οι Morgan et al. (1990) διαπίστωσαν ότι η εγκεφαλική δραστικότητα της AChE σε σολομό (*Salmo salar*) που έχει εκτεθεί σε χαμηλές συγκεντρώσεις fenitrothion (0,004 ppm) είναι σε θέση να ανακάμψουν σε λιγότερο από 1 wk, αλλά σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 0,08 ppm απαιτούν μία φάση ανάκαμψης τουλάχιστον 6 wk. Σύμφωνα με τους Sancho et al. (1997) χέλια (*Anguilla anguilla*) που εκτέθηκαν σε 0,04 και 0,02 ppm fenitrothion είχαν μειωμένη εγκεφαλική δραστικότητα της AChE κατά 43 και 29%, αντίστοιχα, μετά τη μεταφορά τους σε καθαρό νερό για 8 d.

Άλλες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν με διάφορα είδη ψαριών δείχνουν ότι η αποκατάσταση των ChEs μετά την έκθεσή σε OPs κυμαίνεται από λιγότερο της 1 wk σε

πάνω από 4 wk (Morgan et al. 1990, Boone and Chambers, 1996). Τα αποτελέσματα που εξήχθησαν σύμφωνα με τους Varó et al. (2008) είναι σε συμφωνία με τις εν λόγω μελέτες. Έκθεση *in vivo* σε ευρωπαϊκό χέλι με dichlorvos οδήγησε σε 40% παρεμπόδιση της δραστηριότητας της AChE εγκεφάλου μετά από μεταφορά του σε καθαρό νερό για 96 h (Peña-Llopis et al. 2003). Έχουν αναφερθεί μεγαλύτερες προθεσμίες ανάκτησης με άλλα OPs για τον εγκέφαλο των ψαριών (Morgan et al. 1990; Sancho et al. 1997; Chandrasekara and Pathiratne 2005, Kavitha and Rao 2007).

Στην οξεία τοξικότητα η παρεμπόδιση της AChE, μεγαλύτερη από 52% την ημέρα 3, ήταν επαρκής για να προκαλέσει το θάνατο, ενώ πέστροφες επέζησαν ακόμη και σε επίπεδα παρεμπόδισης της AChE στον εγκέφαλο μέχρι 70%. Στην παρατεταμένη τοξικότητα η παρεμπόδιση της AChE μεγαλύτερη από 55% την ημέρα 1 ήταν επαρκής για να προκαλέσει το θάνατο, ενώ πέστροφες επέζησαν ακόμη και σε επίπεδα παρεμπόδισης της AChE στον εγκέφαλο μέχρι 90%.

Υπάρχει σχετική σύγχυση στη βιβλιογραφία ως προς την έκταση της παρεμπόδισης της AChE που απαιτείται για να προκαλέσει τον θάνατο σε υδρόβιους οργανισμούς. Είναι γενικά αποδεκτό ότι παρεμπόδιση δραστηριότητας 60-70% της AChE στον εγκέφαλο του ψαριού θα έχει ως αποτέλεσμα το θάνατο (Zinkl et al. 1991). Στα ψάρια, οι περισσότερες εκτιμήσεις βρίσκονται στην περιοχή 70 έως 85% μείωση της AChE (Coppage and Matthews, 1974; Richmonds and Dutta, 1992). Σύμφωνα με τους Sancho et al. (1997), σε πειραματισμό 4 ημερών σε χέλια, αυτά ήταν σε θέση να επιβιώσουν σε μείωση κατά 64% στην δραστηριότητα της AChE. Σύμφωνα με τον Arufe et al. (2007) λεκιθοφόρα ιχθύδια τσιπούρας που εκτίθενται σε azinphos methyl σε συγκέντρωση περίπου στην 72-h LC₅₀ για 72 h έδειξαν 70% παρεμπόδιση της δραστηριότητας της AChE σε ολόκληρο το σώμα. Το αποτέλεσμα αυτό είναι σε συμφωνία με αυτή των Zinkl et al. (1991), ο οποίος δήλωσε ότι οι περισσότερες εργαστηριακές μελέτες υποδεικνύουν ότι παρεμπόδιση της δραστηριότητας της AChE εγκεφάλου ψαριών κατά 70-90% εμφανίζεται κατά την LC₅₀. Ομοίως, στον εγκέφαλο η παρεμπόδιση της δραστηριότητας της AChE στο *Leiostomus xanthurus* και το *Lagodon rhomboides* που επέζησε της μέσης θανατηφόρας έκθεσης του azinphos methyl ήταν 96 και 80%, αντίστοιχα (Coppage and Matthews 1974). Η εκτιμώμενη 72-h IC₅₀ για την παρεμπόδιση της δραστηριότητας της AChE των τσιπούρας σε λεκιθοφόρα ιχθύδια από azinphos methyl σύμφωνα με τους Arufe et al. (2007) ήταν 3,04 μg/l, 1,5 φορές χαμηλότερα από το 72-h LC₅₀ (4,59 μg/l) σύμφωνα με την αναθεώρηση της βιβλιογραφίας, η σχέση αυτή είναι μεταβλητή μεταξύ των ειδών. Για παράδειγμα όπως

τόνισαν οι Fulton and Key (2001), το 96-h LC₅₀ για αυτό το εντομοκτόνο στο *Fundulus heteroclitus* ήταν 32,16 µg/l, ενώ το 24-h EC₅₀ για την παρεμπόδιση της AChE του εγκεφάλου ήταν 0,81 µg/l, ως εκ τούτου, η 96-h LC₅₀ ήταν περίπου 40 φορές υψηλότερη από τη 24-h EC₅₀ για την παρεμπόδιση της AChE του εγκεφάλου. Σε άλλη μελέτη, η σχέση μεταξύ της παρεμπόδισης της AChE εγκεφάλου, που προκαλείται από azinphos methyl και της θνησιμότητας ήταν πολύ διαφορετική για τα νεαρά *Sciaenops ocellatus* και τα ενήλικα *Fundulus heteroclitus* (Van Dolah et al. 1997). Έτσι, ενώ στο *Sciaenops ocellatus*, το 96-h LC₅₀ (6,2 µg/l) και η 24-h EC₅₀ για την παρεμπόδιση της AChE του εγκεφάλου (5,2 µg/l) ήταν σχετικά παρόμοια, στο *Fundulus heteroclitus*, το 96-h LC₅₀ ήταν 50 φορές μεγαλύτερο από το 24-h EC₅₀ (1,0 µg/l). Ομοίως, για το χρυσόψαρο, το 96-h IC₅₀ για την παρεμπόδιση της ChE εγκεφάλου ήταν 50 µg/l, περισσότερες από 140 φορές χαμηλότερη από την LC₅₀ του εντομοκτόνου (Ferrari et al. 2004).

Όσον αφορά την ιστοχημική ανίχνευση για την AChE στον εγκέφαλο στην οξεία τοξικότητα στις ενήλικες πέστροφες, αυτή δεν παρατηρήθηκε στους πυρήνες των κυττάρων, όπως παρατηρήθηκε στην παρατεταμένη τοξικότητα στις νεαρές πέστροφες. Παντού όμως ήταν ορατή στις αποφυάδες (δενδρίτες και νευρίτες) των νευρικών κυττάρων, σε δέσμες νευρικών απολήξεων αλλά και μεγαλύτερων νεύρων ενώ η ιστοχημική ανίχνευση για την BuChE περιορίστηκε σε λίγα κύτταρα, σημαντικά λιγότερα από την AChE. Σε αντίθεση με την AChE παρατηρήθηκε χρώση στον πυρήνα των κυττάρων, όχι στο πυρηνόπλασμα, για τα ενήλικα άτομα και στο πυρηνόπλασμα για τα νεαρές πέστροφες), αλλά όχι στις αποφυάδες (δενδρίτες και νευρίτες) των νευρικών κυττάρων και στα νεύρα.

Και στις δύο μελέτες η χρώση για ChEs που υδρολύουν την PrSCh δεν περιορίζεται σε νευρώνες, αλλά επιπλέον παρατηρείται και στα ερυθρά αιμοσφαίρια. Στα ενήλικα άτομα ήταν λίγο περισσότερη από την BuChE αλλά σημαντικά λιγότερη από την AChE, ενώ στις νεαρές πέστροφες ήταν πολύ έντονη περισσότερη από την AChE. Η ποιοτική διαφορά για την PrSCh στα ενήλικα και νεαρά άτομα πιθανόν να οφείλεται σε άλλες εστεράσες που απαντιούνται στα νεαρά στάδια των ψαριών. Σύμφωνα με τον Küster (2005) η δραστηριότητα του CaE ήταν περίπου 40 φορές υψηλότερες από εκείνες της ChE σε πολύ πρώιμα στάδια ανάπτυξης (6-somite στάδιο). Με την προσθήκη των παρεμποδιστών iso-OMPA και BW284C51 στα ενήλικα άτομα η χρώση δεν υπάρχει πια εκτός ή λίγη που παρατηρήθηκε στο μάρτυρα ενώ στα νεαρά δεν εμφανίζεται πια. Στα ενήλικα άτομα η χρώση με το PrSCh και τους παρεμποδιστές

στον μάρτυρα και όχι στις διάφορες συγκεντρώσεις του methamidophos ίσως οφείλεται στη παρεμπόδιση εστερασών που εκφράζονται στον μάρτυρα.

Στα ενήλικα άτομα η χωροταξική κατανομή της χρώσης για την AChE ήταν εμφανής παντού ενώ οι ChEs που υδρολύουν την PrSCh παρατηρήθηκαν τοπικά στους ιστούς. Στα νεαρά άτομα η χωροταξική κατανομή χρώση για την AChE στον μάρτυρα, σε αντίθεση με τα ενήλικα, ήταν εμφανής περιφερειακά στον φλοιό, οι ChEs που υδρολύουν την PrSCh παρατηρήθηκαν παντού στους ιστούς, γεγονός που πιστοποιεί την ύπαρξη άλλων εστερασών που την υδρολύουν, ενώ στις διάφορες συγκεντρώσεις του methamidophos, τόσο στο πρώτο μέρος όσο και στο δεύτερο μέρος του πειραματισμού, η χρώση για την AChE στον μάρτυρα γεμίζει τον χώρο των ιστών.

Η ιστοχημική χρώση για την ανίχνευση για AChE, BuChE και ChEs που υδρολύουν την PrSCh, που παρατηρήθηκαν μετά από την έκθεση με το methamidophos είχε ανάλογη συσχέτιση με τα βιοχημικά αποτελέσματα όσον αφορά τα επίπεδα των τιμών ανάμεσα στις εστεράσες για τα ενήλικα άτομα ενώ δεν είχε πλήρως ανάλογη συσχέτιση για τις νεαρές πέστροφες. Έτσι στα ενήλικα άτομα η μείωση στις τιμές των βιοχημικών αποτελεσμάτων της AChE, λόγω της έκθεσης στο methamidophos, σε σύγκριση με τον μάρτυρα από τις πρώτες ημέρες έως την ημέρα 4, αποτυπώθηκε και στην ιστοχημική χρώση, όπου παρατηρήθηκε συνολική μείωση της ποσοτικής έκφρασης της χρώσης σε σύγκριση με το μάρτυρα, γεγονός που οφείλεται κυρίως στην μειωμένη ένταση και λιγότερο στο σχετικό αριθμό των χρωσμένων κυττάρων και στην επιφανειακή κατανομή της χρώσης.

Στις νεαρές πέστροφες, όσον αφορά την ποσοτική εκτίμηση της χρώσης για την AChE στον μάρτυρα, αυτή ήταν περίπου το 34% των ενήλικων ατόμων, ενώ σε αντίθεση με αυτών, η χρώση σε όλες τις συγκεντρώσεις του methamidophos αυξήθηκε σημαντικά παράλληλα με το «γέμισμα» του εσωτερικού των ιστών, χωρίς αυτή η αύξηση σε απόλυτα νούμερα να προσεγγίζει τις μειωμένες τιμές που παρατηρήθηκαν στη οξεία τοξικότητα, εκτός από τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις, αποδεικνύοντας την μεγαλύτερη ύπαρξη του ενζύμου στα ενήλικα άτομα. Η αύξηση της χρώσης, σε όλες τις συγκεντρώσεις του methamidophos, είναι ανάλογη με τα βιοχημικά αποτελέσματα στον εγκέφαλο στις μικρότερες συγκεντρώσεις, όπου παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της δραστηριότητας της AChE, σε αντίθεση με την σημαντική παρεμπόδιση που παρατηρήθηκε βιοχημικά στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις, πιθανόν, ανάλογα με τα ορτύκια, γιατί η χρώση εκφράζεται τόσο στα ανενεργά από το methamidophos νευρικά κύτταρα όσο και στα ενεργά. Η αύξηση της χρώσης οφείλεται στην αύξηση της

επιφανειακής κατανομής της χρώσης δικαιολογώντας και το γέμισμα που παρατηρείται στην χωροταξικής κατανομής της χρώσης. Στο 2ο μέρος του πειραματισμού αντίθετα παρατηρήθηκε αύξηση της χρώσης στη συγκέντρωση των 10 mg/lit και μείωση της χρώσης στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις που οφείλεται στη σημαντική μείωση στην ένταση της χρώσης, σε πλήρη αντίθεση με τη σημαντική αύξηση της δραστηριότητας στα βιοχημικά αποτελέσματα γεγονός που δείχνει ότι οι νέες παραγόμενες AChE, 14 d μετά το τέλος της έκθεσης από το methamidophos δεν εκφράζονται ιστοχημικά πιθανόν λόγω της μη ύπαρξής τους μέσα στο κύτταρο αλλά στους μεσοκυττάρους χώρους του ιστού. Ανάλογα για την BuChE, η χαμηλή χρώση που παρατηρήθηκε δεν οδηγεί σε κάποια αξιόπιστα αποτελέσματα ανάλογα και με τα βιοχημικά αποτελέσματα γεγονός που επιβεβαιώνει την χαμηλή ύπαρξη αυτού του ενζύμου στον εγκέφαλο της πέστροφας. Η χρώση για την ανίχνευση για ChEs που υδρολύουν την PrSCh είχε μεγαλύτερες τιμές και αντίθετη συμπεριφορά με την AChE. Η μεγαλύτερη τιμή ποσοτικής χρώσης για ChEs που υδρολύουν την PrSCh σε σύγκριση με την AChE οφείλεται κυρίως στην διπλάσια περίπου ένταση της χρώσης των κυττάρων. Χαρακτηριστική είναι η πλήρης αντίθεση με τα ενήλικα άτομα όπου η χρώση ήταν περιορισμένη αλλά και τα βιοχημικά αποτελέσματα όπου δεν παρατηρήθηκε δραστηριότητα. Ίσως η χρώση αυτή να οφείλεται σε μη ειδική χρώση ή χρώση άλλων εστερασών στο εσωτερικό των κυττάρων στα νεαρά μόνο άτομα όπως έχει αναφερθεί ήδη για τις CaE. Στις διάφορες συγκεντρώσεις του methamidophos παρατηρήθηκε μείωση της χρώσης ανάλογα της συγκέντρωσης, αντίθετα από την AChE, σε σημαντικό βαθμό στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις που οφείλεται στην μείωση της έντασης της χρώσης των κυττάρων, πιθανόν από τη μη αναπλήρωση των χρωσμένων εστερασών. Στο 2^ο μέρος του πειραματισμού η μείωση της χρώσης ήταν σε πολύ χαμηλότερο βαθμό λόγω της διακοπής της έκθεσης στο methamidophos από την ημέρα 4 και όχι μάλλον στην παραγωγή νέων AChE όπως συζητήθηκε ανωτέρω.

Στο ήπαρ και οι δύο μελέτες δείχνουν ότι το methamidophos προκαλεί ιστολογικές αλλοιώσεις αναλόγως των συγκεντρώσεων του methamidophos που έχουν εκτεθεί οι πέστροφες. Αυτές οι μεταβολές είναι περιορισμένες στις χαμηλότερες συγκεντρώσεις, άλλες κυμαίνονται από αλλοιώσεις της μορφολογίας στο ηπατικό παρέγχυμα (κύτταρα με υπερμεγέθεις ή πυκνωτικούς πυρήνες, αποπτωτικά κύτταρα σε ομάδες ή σε πολύ μικρές εστιακές περιοχές) ως στην πολύ έντονη συρρίκνωση του κυτταροπλάσματος των ηπατικών κυττάρων. Οι ιστολογικές παρατηρήσεις δείχνουν σαφώς ότι το ήπαρ των ψαριών υπέφερε πολύ μετά από την έκθεση στο

methamidophos. Ανάλογη μελέτη μετά από έκθεση με methidathion και deltamethrin (παρατήρηση με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο) έδειξε τροποποίηση στην υποκυτταρική δομή των κυττάρων του ήπατος (υπερμικροσκοπικές αλλοιώσεις, συμπεριλαμβανομένων συρρίκνωση του πυρήνα αφού μερικοί από αυτούς έγιναν πολυλοβωτοί, ελαφρά διόγκωση των μιτοχονδρίων, μεγάλα σταγονίδια λιπιδίων και αυξημένη ποσότητα χρωστικών της χολής).

Σύμφωνα με τον Au (2004) αρκετοί ιστοπαθολογικοί βιοσημαντές χρησιμοποιούνται στην βιοπαρακολούθηση της θαλάσσιας ρύπανσης με ψάρια. Έκθεση στο methyl parathion είχε σοβαρές μορφολογικές αλλοιώσεις στο ήπαρ των ψαριών *Rhamdia quelen* όπως εστιακές νεκρώσεις και πύκνωση στους πυρήνες, κυτταροπλασματικά κενοτόπια και κοκκιοματοποίηση καθώς και κυτταρική αποδιοργάνωση (Anees, 1978; Silva et al. 1993; Rodrigues and Fanta, 1998; Fanta et al. 2003). Σύμφωνα με τους De Melo et al. (2008) ακόμη και σε υπο-θανατηφόρες συγκεντρώσεις, μπορούσαν να ανιχνευθούν πολλές βλάβες στα κύτταρα του ήπατος ενώ η πιο συχνή αλλοίωση ήταν η αύξηση της πυκνότητας των ηπατοκυττάρων στις πρώτες 96 h. Αυτό μπορεί να σχετίζεται με τους μηχανισμούς που ρυθμίζουν τον πολλαπλασιασμό των ηπατοκυττάρων, ως συνέπεια της σημαντικής επίδρασης της αποδιοργάνωσης και νέκρωσης τους. Σύμφωνα με τον Roberts (1989) η νέκρωση μπορεί να χαρακτηριστεί από πυρηνικές και κυτταροπλασματικές τροποποιήσεις, ακολουθούμενη από την απώλεια των κυτταρικών τοιχωμάτων. Υπάρχει η απελευθέρωση χημικών σημάτων που προκαλούν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων για την αντικατάσταση των νεκρών, ώστε ο ιστός να μην χάσει τη δομική και λειτουργική του κατάσταση. Παράλληλα παρατηρήθηκε και αλλαγή στην πυκνότητα των ηπατοκυττάρων από την μεταβολή της έκκρισης χολής και την ύπαρξη κίτρινο-καφέ κόκκων στο κυτταρόπλασμα. Σε άλλη μελέτη με methyl parathion σε υπο-θανατηφόρες συγκεντρώσεις και σε έκθεση μέσω του νερού ή της τροφής στο ψάρι του γλυκού νερού *Corydoras paleatus*, μεταξύ άλλων ιστών στο ήπαρ παρατηρήθηκε οίδημα, χολόσταση εστιακή νέκρωση, ατροφία, και δημιουργία κενοτοπίων (Fanta et al. 2003).

Στα βιοχημικά αποτελέσματα στις ενήλικες πέστροφες για το ήπαρ, η ChE χαρακτηρίζεται ως BuChE, και ίσως ίχνη AChE, αλλά η τιμή της δραστηριότητας ήταν πολύ χαμηλή. Η χαμηλή τιμή της δραστηριότητας των CEs με το PrSCh, ανάλογη με τον εγκέφαλο της πέστροφας αλλά αντίθετη με τα ορτύκια, αποδεικνύει ότι στην πέστροφα οι ChEs δεν υδρολύουν ή υδρολύουν μερικώς το PrSCh στο ήπαρ. Το ποσοστό της

παρεμπόδισης της BuChE στο ήπαρ ήταν ανάλογο για όλες τις συγκεντρώσεις και ανεξάρτητα του χρόνου αφού κυμάνθηκε κατά μέσο όρο ενδεικτικά, λόγω των πολύ χαμηλών τιμών δραστηριότητας, περίπου 55% την ημέρα 1 σε 60% περίπου μετά από 4 d. Στις νεαρές πέστροφες για το ήπαρ, η δραστηριότητα των εστερασών με όλα τα υποστρώματα ήταν πολύ χαμηλή στα όρια ανίχνευσης της μεθόδου ώστε να μην μπορεί να εξαχθεί κάποιο συμπέρασμα. Στα ψάρια, σύμφωνα με τον Habig and Di Giulio (1991) η BuChE είναι παρούσα ως επί το πλείστον στο ήπαρ και στο πλάσμα. *In vivo* εφαρμογή methidathion σε ενήλικο κυπρίνο (*Cyprinus carpio* L.) παρεμποδίζει την δραστηριότητα της AChE κατά 70-75% στο ήπαρ (Bdint et al. 1995). Οι Straus et al. (1995) παρατήρησε ταχεία παρεμπόδιση της ηπατικής AChE που παρατηρείθηκε μετά από έκθεση σε S,S,S-tributyl phosphotriothioate (DEF) σε *Ictalurus punctatus* που μπορεί να οφείλεται στη στενή εγγύτητα με τα σημεία ενεργού μεταβολισμού.

Από τα ιστοχημικά αποτελέσματα στο ήπαρ τόσο στα ενήλικα άτομα όσο και στα νεαρά η χρώση για την AChE υπήρχε αλλά ήταν περιορισμένη σε όλες τις μεταχειρίσεις σε κοκκώδη μορφή, συσχετιζόμενη με τις κυτταρικές μεμβράνες και τους πυρήνες των ηπατικών κυττάρων ενώ η χωροταξική κατανομή των AChE ήταν παντού για όλες τις επεμβάσεις. Στις ενήλικες πέστροφες η χρώση για BuChE και ChEs με PuSCh με ή χωρίς παρεμποδιστές ήταν πολύ περιορισμένη σε όλες τις μεταχειρίσεις σε κοκκώδη μορφή, συσχετιζόμενη με τις κυτταρικές μεμβράνες και τους πυρήνες των ηπατικών κυττάρων, σε αντίθεση με τα ορτύκια, που η BuChE και ChEs με PuSCh είχαν έντονη χρώση ενώ η χρήση των παρεμποδιστών με την PuSCh είχε ως αποτέλεσμα την εξάλειψή της. Στις νεαρές πέστροφες η χρώση για BuChE και ChEs με PrSCh με ή χωρίς τους παρεμποδιστές iso-OMPA και BW284C51 στον μάρτυρα δεν ήταν διακριτή.

Για τις ενήλικες πέστροφες λοιπόν η χρώση για την ανίχνευση για ChEs με όλα τα υποστρώματα δεν είχε ανάλογη συμπεριφορά με τα βιοχημικά αποτελέσματα για όλες τις εστεράσες αφού η AChE φαίνεται να εκφράστηκε οριακά βιοχημικά και κυρίως ιστοχημικά ενώ η BuChE εκφράστηκε κυρίως βιοχημικά. Στις νεαρές πέστροφες η συμπεριφορά της AChE είναι ανάλογη των ενηλίκων ατόμων αφού εκφράζεται ιστοχημικά σε αντίθεση με την οριακή βιοχημική της έκφραση. Για την BuChE και για τα υποστρώματα BuSCh και PuSCh δεν μπορεί να εξαχθεί κάποιο συμπέρασμα. Η μείωση της χρώσης αναλόγως της συγκέντρωσης οφείλεται σε όλους του παράγοντες μέτρησης (ένταση χρώσης, σχετικό αριθμό χρωσμένων κυττάρων ή επιφανειακή κατανομή χρώσης). Στο 2^ο μέρος του πειραματισμού στις συγκεντρώσεις

των 10,8 και 20,7 mg/lit η χρώση αυξήθηκε σε αντίθεση με το 1^ο μέρος του πειραματισμού λόγω της διακοπής της έκθεσης στο methamidophos, ενώ η μεγαλύτερη συγκέντρωση των 40 mg/lit ήταν μειωμένη ανάλογα με το 1^ο μέρος του πειραματισμού.

Σύμφωνα με μελέτη, μετά από έκθεση στο methidathion, οι σχετικές αναλογίες των μοριακών δομών της AChE στο ήπαρ μεταβλήθηκε σημαντικά: το ποσοστό των G1, αυξημένη κατά 4 φορές, ενώ του G4 μειώθηκε σημαντικά. Οι αλλαγές αυτές είναι συνέπειες της ικανότητας των OPs είτε να τροποποιούν τις ιδιότητες «σύνδεση-αποσύνδεση» της AChE ή να παρεμποδίζουν την *de novo* σύνθεση της AChE. Μικρές, αλλά σημαντικές, διαφορές παρατηρήθηκαν στον εγκέφαλο και την καρδιά. Από τη μία πλευρά, η αύξηση του μονομερούς κλάσματος στο ήπαρ των κυπρίνων που εκτέθηκαν στο methidathion μπορεί να είναι συνέπεια της αποσύνθεσης των βαρύτερων μορφών (Nemcsok et al. 1990). Από την άλλη πλευρά ενώσεις ανάλογες με το methidathion μπορούν να εμποδίσουν επίσης την *de novo* σύνθεση της AChE (Nemcsok et al. 1990). Τα αποτελέσματά του Bdint et al. (1995) βρίσκονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της Volpe et al. (1990) και Busker and Zijlstra (1991). Οι Busker and Zijlstra (1991) ανέφεραν ότι βραχυπρόθεσμη έκθεση (0,5 h) OPs σε επίμυες είχε ως αποτέλεσμα σημαντική παρεμπόδιση της AChE, αλλά ο λόγος των ισομόρφων δεν είχε αλλάξει. Εντούτοις, σε 3 h μετά η G1 ήταν λιγότερο παρεμποδισμένη, γεγονός που δεν φαίνεται να οφείλεται σε επαναδραστηριοποίηση ή επιλεκτική προστασία του G1 λόγω της ενδοκυτταρικής του θέσης, αφού αυτή η διαφορά δεν παρατηρείται βραχυπρόθεσμα ούτε μετά από έκθεση *in vitro*. Πιθανώς, η *de novo* σύνθεση της AChE αρχίζει με τα δομικά στοιχεία της G1 που μπορούν να οδηγήσουν σε σχετική αύξηση της μορφής G1. Εάν αυτό αληθεύει, τότε για μεγάλο χρονικό διάστημα που είναι αναγκαίο για την ανάκτηση της δραστηριότητας της ChE στα ψάρια μετά από έκθεση σε OPs, η σύνθεση δεν μπορεί να απορρέει μόνον από την σχετική σταθερότητα των δεσμών της AChE, αλλά και από την παρεμπόδιση της ανασύνθεσης.

Σύμφωνα με τις μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στα πτηνά και στα ψάρια οι αλλαγές που αφορούν τη δραστηριότητα των ChEs του πλάσματος, του εγκεφάλου, του δωδεκαδακτύλου καθώς και του ήπατος, είναι αναστρέψιμα, ενώ οι ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις εμμένουν περισσότερο, όπως αναφέρθηκε για άλλα σπονδυλωτά που εκτέθηκαν σε OPs (Hamm et al. 1998; Britt et al. 2000; Jortner, 2000; Latuszynska et al. 2003; Yehia et al. 2007).

Θα μπορούσε ο χημικός τύπος του methamidophos να συνδεθεί όσον αφορά την τοξικότητα με τους χημικούς τύπους από άλλα OPs. Το methamidophos ως

μεταβολίτης του acephate ανήκουν μόνα τους ανάμεσα σε 38 OPs στην ιδιαίτερη ομάδα των thiophosphoramidic acid, phosphoryl-type με τη διαφορά ότι το methamidophos χαρακτηρίζεται ως άμεσα ενεργό χωρίς να χρειάζεται μεταβολική διεργασία (Pope, 1999). Μια μελέτη από Sheets et al. (1997) ανέφερε συγκριτική τοξικότητα έξι OPs (sulfopros, tebupirimphos, disulfoton, azinophos-methyl, trichlorfon, και methamidophos) μετά 13 wk διατροφικής έκθεσης σε επίμυες. Αξιολογήθηκαν διάφορα λειτουργικά σημεία τοξικότητας όπως λεπτομερής κλινική εξέταση, λειτουργικές παρατηρήσεις, καθώς και η κινητική δραστηριότητα καθ' όλη τη περίοδο έκθεσης. Η παρεμπόδιση της AChE σε ολόκληρο τον εγκέφαλο, τα ερυθροκύτταρα, και το πλάσμα υπολογίστηκε μετά τη λήξη της περιόδου έκθεσης. Όπως ήταν αναμενόμενο, τα 6 OPs είχαν αξιολογες διαφορές, με NOAELs που κυμαίνονταν από 1 mg/kg/d για disulfoton και το methamidophos και έως 500 mg/kg/d για το trichlorfon. Η παρεμπόδιση της AChE σε διάφορους ιστούς ήταν δόσοεξαρτώμενη και συσχετίζονται περίπου με την επίπτωση της λειτουργικής τοξικότητας σε όλα τα OPs. Οι διαφορές στις τοξικές αντιδράσεις ήταν εμφανής σε όλα τα OPs, ωστόσο, για παράδειγμα, ενώ παρόμοια επίπεδα παρεμπόδισης της AChE παρατηρήθηκαν στην έκθεση με azinphos-methyl ή tebupirimphos σε αρσενικούς επίμυες (παρεμπόδιση της AChE περίπου 77 και 82% στον εγκέφαλο, 85 και 69% στο πλάσμα, και 84 και 95% στα ερυθροκύτταρα για τα tebupirimphos και azinphos-methyl, αντίστοιχα), παρατηρήθηκαν μεταξύ άλλων δεσμιδώσεις μυών, αλλαγές της δύναμης της λαβής των άκρων και της εναέριας ανόρθωσης στο tebupirimphos όχι όμως και στο azinphos-methyl. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι μετρήσεις της AChE έγιναν μόνο σε μία χρονική στιγμή (δηλαδή, μετά το τέλος της περιόδου έκθεσης) και ότι οι διαφορές του ποσοστού της παρεμπόδισης της AChE κατά τη διάρκεια της έκθεσης θα μπορούσε να επηρεάσει την έκφραση τοξικότητας. Τα στοιχεία αυτά αποδεικνύουν ότι, έκθεση σε OPs που τελικά προκαλούν παρόμοια επίπεδα παρεμπόδισης AChE μπορεί να προκαλέσουν διαφορετικό φάσμα συμπτωμάτων τοξικότητας.

Πιο πρόσφατα, το ίδιο εργαστήριο (Camara et al. 1997) διερευνήθηκαν οι νευροχημικές ενέργειες του methamidophos. Το methamidophos παρεμπόδισε την AChE δόσοεξαρτώμενα, σε μυς και εγκέφαλο επίμυων και σε ομογενοποιημένους μυς βάτραχου. Το methamidophos (1-100 μ M) επέδρασε στη νευρομυϊκή διαβίβαση και σε άλλους παραμέτρους που σχετίζονται με αντι-ChE δράση. Σε αντίθεση με ευρήματα με το paraoxon, το methamidophos (0,1 με 100 μ M) δεν είχε επίδραση στη συχνότητα της

GABA ή στην απελευθέρωση του γλουταμινικού (glutamate) σε καλλιεργούμενους νευρώνες υπόκαμπου και περαιτέρω, δεν είχε σημαντικό αποκλεισμό των μετασυναπτικών υποδοχέων για αυτούς τους μεταφορείς, όπως παρατηρείται με το paraoxon. Επιπλέον, το methamidophos εμφανίστηκε να μην έχει καμία επίδραση στην απελευθέρωση ACh στο φρενικό νεύρο (phrenic nerve), στον μυ των επίμυων ή το ισχιακό νεύρο ή τους μυς του βατράχου. Τα στοιχεία δείχνουν ότι το methamidophos δρα κυρίως ως παρεμποδιστής της AChE με λίγα στοιχεία σχετικά με άλλες προσυναπτικές ή μετασυναπτικές δράσεις. Συνολικά, οι μελέτες των Rocha et al. (1996) και Camara et al. (1997) προτείνουν ότι ο μοριακός τύπος δράσης του paraoxon και methamidophos είναι διαφορετικός. Ενώ και τα δρουν άμεσα (χωρίς ενεργό μεταβολισμό, σύμφωνα με τους Mahajna and Casida (1998) το methamidophos μπορεί, να ενεργοποιηθεί σε έναν πιο ισχυρό παρεμποδιστή της AChE *in vivo*), το paraoxon φαίνεται να ενισχύσει την απελευθέρωση νευροδιαβιβαστών σε χαμηλές συγκεντρώσεις και να εμποδίζει ένα αριθμό υποδοχέων σε υψηλότερες συγκεντρώσεις. Αντίθετα, το methamidophos φαίνεται να δρα κυρίως μέσω της παρεμπόδισης της AChE και της επακόλουθης αύξησης των συναπτικών επίπεδων της ACh.

Συμπερασματικά, ο μηχανισμός της τοξικότητας για κάθε ένωση που είναι μια σύνθετη ακολουθία βιοχημικών γεγονότων ξεκινώντας με την αλληλεπίδραση μεταξύ της χημικής ουσίας και του βιολογικού της στόχου με αποκορύφωμα την έκφραση της τοξικότητας. Ουσιαστικά σε όλες τις περιπτώσεις, η αρχική αλληλεπίδραση μεταξύ της χημικής ουσίας και τους κυτταρικού στόχου είναι απαραίτητη αλλά δεν αρκεί για να δικαιολογήσει τις ενδείξεις τοξικότητας που προκαλούν την ανησυχία για την έκθεση στην εν λόγω χημική ουσία. Γι' αυτό με τα OPs είναι η αρχική αλληλεπίδραση με τον μακρομοριακό τους στόχο (ChE) που οδηγεί σε μία διαδοχή γεγονότων ενώ προκύπτουν μία ποικιλία από πιθανές τοξικές επιδράσεις ή χολινεργικές ενδείξεις. Υπάρχει αυξανόμενη πληροφόρηση που δείχνει ότι ορισμένα OPs αλληλεπιδρούν με άλλους συναφείς βιολογικούς στόχους εκτός της ChE. Επιπλέον, η αλληλεπίδραση με αυτές τις πρόσθετες περιοχές μπορούν, υπό ορισμένες προϋποθέσεις, να διαμορφώνουν την εξέλιξη των γεγονότων, που οδηγεί στην εκδήλωση της τοξικότητας μετά από την παρεμπόδιση της ChE. 38 OPs που εξετάστηκαν έχουν διαφορετική χημική σύνθεση, με σημαντικές διαφορές σε φυσικοχημικά χαρακτηριστικά και προφίλ τοξικότητας (Pope, 1999).

Σε ορισμένες περιπτώσεις, διαφορές στις αντι-ChEs μπορεί απλώς να αντανακλούν διαφορές βιομετατροπής, με επακόλουθες διαφορές στην ποσότητα της

αντι-ChE που φθάνει στους ιστούς στόχους. Όταν οι διαφορές στην τοξικότητα μπορεί να αποδειχθούν με την παρουσία παρόμοιων ποσοστών και επιπέδων της παρεμπόδισης της AChE, ωστόσο, φαίνεται απίθανη μια βασική διάταξή τους. Με βάση τις διαθέσιμες πληροφορίες, τα 38 OPs που απαριθμούνται θα μπορούσε να θεωρηθεί ότι έχουν ένα κοινό αποτέλεσμα τοξικότητας από την παρεμπόδιση της ChE, χωρίς ωστόσο αυτές οι τοξικές ουσίες να λειτουργούν όλες αποκλειστικά από τον ίδιο μηχανισμό τοξικότητας. Η επιλεκτική διαφοροποίηση των βιοχημικών γεγονότων από τη φωσφορυλίωση της AChE στην τοξική επίδραση (π.χ., η παρεμπόδιση της σύνθεσης ACh), καθώς και άλλες μη χολινεργικές νευροχημικές διεργασίες από ορισμένα OPs φαίνεται πιθανό να συμβάλλουν στην διαφορά της τοξικότητας αυτών των ουσιών.

4.3 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- Με την παρούσα εργασία έγινε μια πρώτη προσπάθεια να διερευνηθούν οι επιπτώσεις της χορήγησης OPs, και ειδικότερα του methamidophos, σε διάφορους ιστούς (εγκέφαλος, δωδεκαδάκτυλο και ήπαρ) και στο πλάσμα, δύο σημαντικών βιοδεικτών, όπως το ορτύκι και η πέστροφα, με βάση διεθνώς θεσπισμένα πρωτόκολλα. Τονίζεται, ότι για πρώτη φορά μελετάται η επίδραση μιας χημικής ουσίας ολιστικά από το εργαστηριακό επίπεδο μέχρι τις επιπτώσεις στον αγρό σε τόσο εκτεταμένο πειραματισμό. Επίσης μελετάται για πρώτη φορά η επίδραση κάποιας χημικής ουσίας σε ιστούς των βιοδεικτών αυτών, σε διάφορες ηλικίες αλλά και με συνδυασμό βιοχημικών και ιστοχημικών μεθόδων με δεδομένη τη λειτουργική αναστολή ChEs, ύστερα από τη χορήγηση OPs.
- Η εφαρμογή του methamidophos σε ένα εύρος δόσεων/συγκεντρώσεων αναμένεται να προκαλέσει αναλογικά, σοβαρές επιπτώσεις και θνησιμότητα στα πτηνά (ορτύκι) και τα ψάρια (πέστροφα) που δοκιμάστηκαν.
- Η απόκριση αποφυγής της πρόσληψης της τροφής, με βάση τα αποτελέσματα εκτεταμένου πειραματισμού σε εργαστηριακές συνθήκες και συνθήκες «ημι-αγρού», μπορεί να περιορίσει αισθητά την πρόσληψη θανατηφόρας δόσης για τα πτηνά.
- Σύμφωνα με πραγματικά δεδομένα για την Ελληνική ορνιθοπανίδα σε αγροτικές καλλιέργειες και με την προτεινόμενη γεωργική πρακτική, σύμφωνα με συγκεκριμένο μοντέλο που αναπτύσσεται η εκτίμηση της επικινδυνότητας για τα πτηνά από την εφαρμογή του methamidophos έδειξε υψηλό κίνδυνο.
- Οι αλλαγές που παρατηρούνται σε επίπεδο κυττάρου και ιστού-στόχου, όπως διερευνήθηκε, είναι σημαντικές στους ιστούς και στο πλάσμα του αίματος, με την βιοχημεία των ChEs και την ιστοχημεία των ChEs και της EH, καθώς εξηγούν σε μεγάλο βαθμό τις παρατηρούμενες επιδράσεις σε μακροσκοπικό επίπεδο. Για πρώτη φορά διερευνάται στο ορτύκι η χρώση ηωσίνης-αιματοξυλίνης και εστερασών στον εγκέφαλο καθώς και εστερασών (BuChE) στο ήπαρ. Επίσης για πρώτη φορά διερευνάται στην πέστροφα η χρώση εστερασών (BuChE) στον εγκέφαλο αλλά και εστερασών (AChE, BuChE) στο ήπαρ.
- Ειδικότερα για τις χολινεστεράσες (AChE και BuChE) έγινε διερεύνηση της έκφρασής τους με κάθε δυνατό συνδυασμό υποστρωμάτων και παρεμποδιστών τόσο στις βιοχημικές όσο και στις ιστοχημικές αναλύσεις σε ιστούς και στο πλάσμα του αίματος.

Ειδικότερα στις ιστοχημικές αναλύσεις για πρώτη φορά χρησιμοποιήθηκαν το υπόστρωμα PrSCh μόνο του και με παρεμποδιστές. Ιστοχημικά για πρώτη φορά διερευνάται και το εντερικό νευρικό σύστημα που, πιθανώς, επηρεάζεται λόγω της άμεσης γειτνίασης με την οδό εισόδου του OP, που είναι ο γαστρο-εντερικός σωλήνας.

- Σημαντικές είναι και οι διαφορετικές εκφράσεις των ChEs, με βάση την βιοχημεία και την ιστοχημεία, στις διαφορετικές ηλικίες του ορτυκιού και της πέστροφας.
- Για το λόγο αυτό προτείνεται η περαιτέρω χρήση της βιοχημείας και της ιστοχημείας με σκοπό την σημαντική βελτίωση της μεθοδολογίας της ανίχνευσης και εκτίμησης των αποτελεσμάτων πειραματισμού με οργανισμούς βιοδείκτες. Έτσι κατανοείται ο μηχανισμός που προκαλεί τις αλλαγές ή καταγράφονται οι δομικές αλλαγές, παρέχοντας πρόσθετη περιγραφή της σοβαρότητας της επίδρασης.
- Αρκετά δεδομένα χρειάζεται να διερευνηθούν ακόμα στα πτηνά με σκοπό τη διερεύνηση των επιπτώσεων και της απόκρισης της αποφυγής λήψης της τροφής, τόσο σε εργαστηριακό επίπεδο όσο και στο πεδίο. Σε εργαστηριακό επίπεδο θα μπορούσε να διενεργηθεί πειραματισμός: με πρόσθετα είδη πτηνών, μαζί με δραστικές ουσίες που δεν προκαλούν απόκριση αποφυγής, με εκμάθηση των πτηνών να τρώνε σε σύντομο χρονικό διάστημα, με άγρια πτηνά σε αιχμαλωσία, για τον χρόνο εκδήλωσης των συμπτωμάτων και ανάκαμψης με παρακολούθηση με video, για τον βαθμό που επηρεάζει η οσμή του methamidophos τα αποτελέσματα. Στο πεδίο θα μπορούσε να διενεργηθεί πειραματισμός: για να εκτιμηθεί ο ρυθμός λήψης τροφής, με ύπαρξη νεοσσών, με άλλους οδούς έκθεσης, με περισσότερα είδη πτηνών, για τον χρόνο που περνάνε τα πτηνά στην περιοχή που έχουν δεχτεί την εφαρμογή με ραδιοπαρακολούθηση, για την καταγραφή της συμπεριφοράς των πτηνών, για να συγκεντρωθούν διαιτητικά δεδομένα των πτηνών, να υπολογιστούν πραγματικές τιμές υπολειμμάτων του methamidophos σε έντομα, σπόρους, φυτικό υλικό. Ο πειραματισμός αυτός διενεργείται ώστε να αυξηθεί το επίπεδο της βεβαιότητας ή να εξηγηθεί τμήμα της αβεβαιότητας που υπάρχει ανάμεσα στα δεδομένα του εργαστηρίου και των πραγματικών συνθηκών.
- Για τα ψάρια σε εργαστηριακό επίπεδο χρειάζεται να διερευνηθεί το εύρος της τοξικότητας του methamidophos και να γίνει δοκιμή σε πιο μακροχρόνιες εκθέσεις.
- Θέματα ελάττωσης των αρνητικών επιδράσεων σε σπονδυλωτά (animal welfare) πρέπει να επηρεάζουν το σχεδιασμό οποιουδήποτε περαιτέρω πειραματισμού δίνοντας περισσότερη έμφαση στην επέκταση των αποτελεσμάτων που ήδη υπάρχουν.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Abbas R., Hayton L.W., (1997). A Physiologically Based Pharmacokinetic and Pharmacodynamic *Model for Paraoxon in Rainbow Trout. Toxicology and Applied Pharmacology*, 145: 192-201.

Abs M., (1963). Vergleichende Untersuchung an Haubenlerche (*Galerida cristata*) und Theklalerche (*Galerida theklae*). *Bonner Zoologische Beiträge*, 14: 1-128.

Abou-Donia M.B., (1992). Triphenyl phosphate: A type II organophosphorus compound-induced delayed neurotoxic agent. From: Organophosphates: Chemistry, Fate and Effects. (Eds Champers J.E. and Levi P.E.), *Academic Press, San Diego*: 327-351.

Ackerman, M.E., Wilkes L.C., (1974). Total residues in tissues, organs, blood, eggs and feces following oral administration of ¹⁴C-labeled monitor to poultry. Analytical Development Corp., USA. Report No. IM 1159.

Ackerman M.E., Wilkes L.C., Picker J.E., Danhaus R.G., (1975b). Modification of method 1101/31093. A gas chromatographic method for the determination of residues of Monitor in animal tissues and milk. Chemagro Corporation, USA. Report No. 43787.

Adams WJ., (1995). Aquatic toxicology testing methods. In: Hoffman DJ, Rattner BA, Burton GL, Cairns J, eds. *Handbook of Ecotoxicology*. Lewis Publs, Boca Raton, FL: 25-46.

Adelman I.R., Smith L.L. Jr., (1976). Standard Test Fish Development. Part I. Fathead Minnows (*Pimephales promelas*) and Goldfish (*Carassius auratus*) as Standard Fish in Bioassays and their Reaction to Potential Reference Toxicants. *Environmental Protection Agency, Ecological Research Series*. Report EPA-600/3-76-061A.

Afifi N.A., Ramadan A., Abd El-Aziz MI., Saki EE., (1991). Influence of dimethoate on testicular and epididymal organs, testosterone plasma level and their tissue residues in rats. *Dtsch tierärztl Wschr*, 98: 419-423.

Aguilar A., Borrell A., Reijnders PJ., (2002). Geographical and temporal variation in levels of organochlorine contaminants in marine mammals. *Mar Environ Res*, 53: 425-452.

Akiyoshi H., Gonda T., Terada T., (1998). A comparative histochemical and

immuno-histochemical study of aminergic, cholinergic and peptidergic innervation in rat, hamster, guinea pig, dog and human livers. *Liver* 18: 352–359.

Al-Badrany Y.M.A., Mohammad F.K., (2007). Effects of acute and repeated oral exposure to the organophosphate insecticide chlorpyrifos on open-field activity in chicks. *Toxicology Letters*, Volume 174, Issues 1-3, 1 November 2007: 110-116.

Al-Saleh I.A., (1995). Pesticides: A review article. *J. Environment Pathol. Toxicol. Oncol.*, 13: 151-161.

Alber R., Sporns O., Weikert T., Willbold E., Layer PG., (1994). Cholinesterases and peanut agglutinin binding related to cell proliferation and axonal growth in embryonic chick limbs. *Anat Embryol*, 190: 429-438.

Aldridge W.N., (1953). The differentiation of true and pseudo cholinesterases by organo-phosphorus compounds. *Biochem. J.*, 53: 62.

Aldridge J.E., Seidler F.J., Meyer A., Thillai I., Slotkin T.A., (2003a). Serotonergic systems targeted by developmental exposure to chlorpyrifos: effects during different critical periods. *Environ Health Perspect* 2003, 111:1736-43.

Aldridge J.E., Seidler F.J., Slotkin T.A., (2003b). Developmental exposure to chlorpyrifos elicits sexselective alterations of serotonergic synaptic function in adulthood: critical periods and regional selectivity for effects on the serotonin transporter, receptor subtypes, and cell signaling. *Environ Health Perspect* 2004, 112:148–55.

Ambali S., Akanbi D., Igbokwe N., Shittu M., Kawu M., Ayo J., (2007). Evaluation of subchronic chlorpyrifos poisoning on hematological and serum biochemical changes in mice and protective effect of vitamin C, *J. Toxicol. Sci.*, 32: 111-120.

Anderson J. F., Glowa W., (1985). Diazinon poisoning of Brown-headed Cowbirds. *J. Field Ornithol.*, 56: 407-9.

Ando M.K.W., (1982). Inhibitory effect of acephate (N-acetyl O, S-dimethyl thiophosphoramidate) on serum cholinesterase. *J Toxicol Sci* 1982,7:185-92.

Anees M.A., (1978). Hepatic pathology in a fresh-water teleost *Channa punctatus* (Bloch) exposed to sub-lethal and chronic levels of three organophosphorus insecticides, *Bull. Environ. Contamin. Toxicol.*, 19 (5): 524–527.

Amer S.M., Sayed M.A., (1987). Cytogenetic effects of the insecticide methamidophos in mouse bone marrow and cultured mouse spleen cells. *Z. Naturforsch.*, 42c: 21–30.

Anonymous, (1972a). Residues of methamidophos in milk of dairy cattle. Mobay Corporation. 34275.

Anonymous, (1972b). Residues of methamidophos in organs, muscle, and fat of dairy cattle. Mobay Corporation. 34276.

Anonymous, (1975f). Residues of methamidophos in liver of beef cattle. Mobay Corporation (43803).

Ansari B.A., Kumar K., (1984). Malathion toxicity: In vivo inhibition of acetylcholinesterase in the fish *Brachidanyo rerio* (Cyprinidae). *Toxicol. Lett.* 20: 283-287.

Ansari B.A., Kumar K., (1987) Malathion toxicity: pathological changes in the liver of zebrafish, *Brachidanio rerio* (cyprinidae). *Bol Fisiol Anim Univ S Paulo.* 11: 27-34.

Arufe M.I., Arellano M.J., García L., Albendín G., Sarasquete C., (2007). Cholinesterase activity in gilthead seabream (*Sparus aurata*) larvae: Characterization and sensitivity to the organophosphate azinphosmethyl. *Aquatic Toxicology*, Volume 84, Issue 3, 15 October 2007: 328-336

Asztalos B., Nemcdk J., Benedeczky I., Gabriel R., Szabo A., (1988). Comparison of effects of paraquat and methidathion on enzyme activity and tissue necrosis of carp, following exposure to the pesticides singly or in combination. *Environ. Pollut.*, 55: 123-135.

Au D.W.T., (2004). The application of histo-cytopathological biomarkers in marine pollution monitoring: a review. *Marine Pollution Bulletin*, Volume 48, Issues 9-10, May 2004: 817-834.

Avery M.L., (1989). "Experimental evaluation of partial repellent treatment for reducing bird damage to crops." *Journal of Applied Ecology*, Vol. 26: 433-439.

Avery M.L., Decker, D.G., (1991). "Repellency of fungicidal rice seed treatments to redwinged blackbirds." *Journal of Wildlife Management*, Vol. 55: 327-334.

Avery M.L., Cummings J.L., Decker D.G., Johnson J.W., Wise J.C., Howard J.I., (1993). "Field and aviary evaluation of low-level application rates of methiocarb for reducing bird damage to blueberries." *Crop Protection*, Vol. 12: 95-100.

Avery M.L., Decker D.G., Fischer, D.L., 1994a. "Cage and flight pen evaluation of avian repellency and hazard associated with imidacloprid-treated rice seed." *Crop Protection*, Vol. 13: 535-540.

Avery, M.L., Nol, P., and Humphrey, J.S., 1994b. "Responses of three species of

captive fruit-eating birds to phosmet-treated food." *Pesticide Science*, Vol. 41: 49 - 53.

Baatrup E., Bailey M., (1993). Quantitative analysis of spider locomotion employing computer-automated video tracking. *Physiol. and Behav.*, 54: 83-90.

Bacha W.J.Jr., Bacha L.M., (2000), "Color atlas of Veterinary Histology", 2nd Ed Lippincott, Williams and Wilkins.

Bajgar J., Hajek P., Slizova D., Krs O., Fusek J., Kuca K., Jun D., Bartosova L., Blaha V., (2007). Changes of acetylcholinesterase activity in different rat brain areas following intoxication with nerve agents: Biochemical and histochemical study. *Chemico-Biological Interactions*, Volume 165, Issue 1 , 5 January 2007: 14-21.

Baker K.N., (1985). Laboratory and field experiments on the responses by two species of woodland salamanders to malathion-treated substrates. *Arch Environ Contam Toxicol*, 14: 685-691.

Baker DG, McDonald DM, Basbaum CB, Mitchell RA (1986) The architecture of nerves and ganglia of the ferret trachea as revealed by acetyl-cholinesterase histochemistry. *J Comp Neurol* 246, 513-526.

Baker F.C., Bautista A.V., (1997). The metabolism of [14C]methamidophos in the lactating goat. PTRL. USA. Report No. M9971. TMN-0160B.

Bakre P., Rajasekaran M., (1989) Acute toxicity of certain pesticides to house sparrow (*Passer domesticus*). *Geobioscience*, 16: 249-251.

Balaskas C., (1997). "Cellular Development of the Enteric Nervous System in the Chick Embryo" *Thesis submitted for the degree of Doctor of Philosophy (Ph.D.)*, Department of Anatomy and Developmental Biology, University College London, University of London, U.K.

Balaskas C., Saffrey M.J., Burnstock G., (1995a). "Distribution and colocalization of NADPH-diaphorase activity nitric oxide synthase immunoreactivity and VIP immunoreactivity in the newly-hatched chicken gut" *Anat Rec*, 243:10-18.

Balaskas C., Saffrey M.J., Burnstock G., (1995b). "Distribution of NADPH-diaphorase activity in the embryonic chicken gut" *Anat Embryol*, 192:239-245.

Balcomb R., Stevens R., Bowen C., (1984). Toxicity of 16 granular insecticides to wild-caught songbirds. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 33: 302-307.

Ballantyne B., Marrs T.C., (1992). Overview of the biological and clinical aspects of organophosphates and carbamates. In: Ballantyne, B., Marrs, T.C. (Eds.), *Clinical and Experimental Toxicology of Organophosphates and Carbamates*. Butterworth-Heinemann, Oxford. 3-14.

Banas W.P., Sprague J.B., (1986). "Absence of acclimation to parathion by rainbow trout during sublethal exposure". *Water Res*, 20: 1229-11232.

Banaszak J., (2002). In Proceedings of the 6th European Bee Conference, Cardiff, UK, July 1-7, 2002: 109-121.

Banks A., Russell R.W., (1967). Effects of chronic reductions in acetylcholinesterase activity on serial problem-solving behavior. *J Comp Physiol Psychol*, 64: 262-267.

Bang B.G., Wenzel B.M., (1985). Nasal cavity and olfactory system. In: King A.S. & McLelland, J., eds., 1985. Form and function in birds, Vol. 3. Academic Press.

Barata C., Fabregat M.C., Cotin J., Huertas D., Sole´M., L. Quirós, Sanpera C., Jover L., Ruiz X., Grimalt J.O., Pina B., (2010). Blood biomarkers and contaminant levels in feathers and eggs to assess environmental hazards in heron nestlings from impacted sites in Ebro basin (NE Spain). *Environmental Pollution*, 158: 704-710.

Barnett E.A, Fletcher, M.R., Hunter K., Sharp E.A., (2004). Pesticide poisoning of animals: Investigations of suspected incidents in the United Kingdom. A Report of the Environmental Panel of the Advisory Committee on Pesticides .Central Science Laboratory, Department for Environment, Food and Rural Affairs.

Bart J., (1979). Effects of Acephate and Sevin on forest birds. *J. Wildlife Manage*, 43: 544-9.

Basack S.B., Oneto M.L., Fuchs J.S., Wood E.J., Kesten E.M., (1998). "Esterases of *Corbicula fluminea* as Biomarkers of Exposure to Organophosphorus Pesticides". *Bull Environ Contam Toxicol*, 61:569-576.

Baze W.B., (1993). Soman-induced morphological changes: an overview in the non-human primate. *J Appl Toxicol*, 13: 173-177.

Bdint T., Szegletes T., Szegletes Zs., Halasy K., Nemcsbk J., (1995). Biochemical and subcellular changes in carp exposed to the organophosphorus methidathion and the pyrethroid deltamethrin. *Aquatic Toxicology*, 33: 279-295.

Beauvais S.L., Cole K.J., Atchison G.J., Coffey M., (2002). Factors affecting brain cholinesterase activity in bluegill (*Lepomis macrochirus*)., *Water, Air, Soil Pollut.*, 135: 249-264.

Behera B.C., Bhunya S.P., (1989). Studies on the genotoxicity of astafa (acephate), an organophosphate insecticide, in a mammalian in vivo system. *Muta Res* 1989,223: 287-93.

Bender M.E., (1969). Uptake and retention of malathion by the carp. *Fish Cult*,

31: 155-159.

Benke G.M., Cheever K.L., Mirer F.E., Murphy SD., (1974). Comparative toxicity, anticholinesterase action and metabolism of methyl parathion and parathion in sunfish and mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 28: 97-109.

Bennett R.S., (1989a). "Role of dietary choices in the ability of bobwhite to discriminate between insecticide-treated and untreated food." *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 8: 731-738.

Bennett R.S., (1989b). "Factors influencing discrimination between insecticide-treated and untreated food by northern bobwhite." *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, Vol.18: 697-705.

Benschop H.P., Trap H.C., Spruit H.E., Van Der Wiel H.J., Langenberg J.P., De Jong L.P., (1998). "Low level nose-only exposure to the nerve agent soman: toxicokinetics of soman stereoisomers and cholinesterase inhibition in atropinized guinea pigs". *Toxicol Appl Pharmacol*, 153:179-185.

Bertrand C., Chatonnet A., Takke C., Yan Y.L., Postlethwait J., Toutant J.P., Cousin X., (2001). Zebrafish acetylcholinesterase is encoded by a single gene localized on linkage group 7-gene structure and polymorphism; molecular forms and expression pattern during development, *J. Biol. Chem.*, 276: 464-474.

Beseler C.L., Stallones L., Hoppin J.A., Alavanja M.C., Blair A., Keefe T. et al. (2008). Depression and pesticide exposures among private pesticide applicators enrolled in the agricultural health study. *Environ Health Perspect*, 116:1713-9.

Beyer W.N., Linder G., (1995). Making sense of soil ecotoxicology. In: *Handbook of Ecotoxicology*. 104-116.

Bhatnagar P., Soni I., (1988). Evaluation of the teratogenic potential of phosphamidon in mice by gavage. *Toxicol. Lett*, 42:101-7.

Bigbee W.J., Sharma V.K., Chan L.P., Ellen and Bögl O., (2000). Evidence for the direct role of acetylcholinesterase in neurite outgrowth in primary dorsal root ganglion neurons. *Brain Research Volume*, 861, Issue 2, 14 April 2000: 354-362.

Bignami G., Rosic N., Michalek H., Milosevic M., Gatti G.L., (1975). Behavioral toxicity of anticholinesterase agents. In: Weiss B, Laties UG (eds), *Methodological, Neurochemical, and Neuropsychological Aspects*. Plenum Press, New York, 155-215.

Bingman V.P., Ioalg P., Casini G., Bagnoli P., (1984). Homing behavior of pigeons after telencephalic ablations. *Brain Behav. Evol.*, 24:94-108.

Bingman V.P., Ioalk P., Casini G., Bagnoli P., (1985a). Dorsomedial forebrain

ablations and home loft association behavior in homing pigeons. *Brain Behav. Evol.*, 26: 1-9.

Bingman V.P., Ioal P., Casini G., Bagnoli P., (1985b). Home loft affinity behavior of hippocampal ablated pigeons is affected by post-operative treatment. *Monit. Zool. Italia.*, 19:146-147.

Bingman V.P., Ioal P., Casini G., Bagnoli P., (1988a). Hippocampal ablated homing pigeons show a persistent impairment in the time taken to return home. *J. Comp. Physiol.*, 163: 559-563.

Bingman V.P., Ioal P., Casini G., Bagnoli P., (1988b). Unimpaired acquisition of spatial reference memory, but impaired homing performance in hippocampal-ablated pigeons. *Behav. Brain Res.*, 27:179-187.

Bock C.E., Jones Z.F., (2004). Avian habitat evaluation: should counting birds count? *Front. Ecol. Environ.*, 2 (8): 403–410.

Bocquene' G., Galgani F., Truquet P., (1990). Characterization and assay conditions for use of AChE activity from several marine species in pollution monitoring. *Mar Environ Res*, 30: 75-89.

Boone J.S., Chambers J.E., (1996). Time course of inhibition of cholinesterase and aliesterase activities, and nonprotein sulfhydryl levels following exposure to organophosphorus insecticides in Mosquitofish (*Gambusia affinis*), *Fund. Appl. Toxicol.*, 29: 202–207.

Booth M.G., Mortensen R.S., Carter W.M., Schaalje G.Br., (2005). Hazard evaluation for northern bobwhite quail (*Colinus virginianus*) exposed to chlorpyrifos-treated turf and seed. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Volume 60, Issue 2 , February 2005: 176-187.

Bosgra S., van Eijkeren C.H.J., van der Schans J.M., Langenberg P.J., Slob W., (2009). Toxicodynamic analysis of the combined cholinesterase inhibition by paraoxon and methamidophos in human whole blood. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 236: 9–15.

Boudinot E., Taysse L., Daulon S., Chatonnet A., Champagnat J., Foutz A.S., (2005). “Effects of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibition on breathing in mice adapted or not to reduced acetylcholinesterase”. *Pharmacol, Biochem Behav*, 80:53-61.

Bradford M., (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dyebinding. *Anal*

Biochem, 72: 248-254.

Brasel M.J., Collier C.A., Pritsos A.C., (2007). Differential toxic effects of Carbofuran and Diazinon on time of flight in pigeons (*Columba livia*): Potential for pesticide effects on migration. *Toxicology and Applied Pharmacology*, Volume 219, Issues 2-3, March 2007: 241-246.

Brimijoin S., (2005) Can cholinesterase inhibitors affect neural development? *Environ Toxicol and Pharmacol*, 19 (3): 429-432.

Britt Jr J.O., Martin J.L., Okerberg C.V., Dick E.J., (2000). Histopathologic changes in the brain, heart and skeletal muscle of rhesus macaques, ten days after exposure to soman (an organophosphorus nerve agent). *Comp Med*, 50: 133-139.

Brocardo P.S., Assini F., Franco J.L., Pandolfo P., Muller Y.M., Takahashi R.N. et al. (2007). Zinc attenuates malathion-induced depressant-like behavior and confers neuroprotection in the rat brain. *Toxicol Sci*, 97: 140-8.

Brodbeck U., Gentinetta R., Lundin S.J., (1973). Multiple forms of cholinesterase from body muscle of plaice (*Pleuronectes platessa*) and possible role of sialic acid in cholinesterase reaction specificity. *Acta chem. scand.*, 27: 561-572.

Brower L.P., Fink L.S., (1985). "A natural toxic defense system: cardenolides in butterflies vs. birds." Experimental assessments and clinical applications of conditioned food aversions. N.S Braveman, and P. Bronstein eds.,. *Annals of the New York Academy of Sciences*, Vol. 443: 171-188.

Brunet R., Cyr A., (1992). The impact of dimethoate on rhythms of three granivorous bird species. *Agric Ecosys Environ*, 41: 327-336.

Brunet R., Cyr A., (1990). Etude de l'effet du chlorpyrifos sur les niveaux d'acetylcholinest6rase et la mortality chez le Merle d'Amerique (*Turdus migratorius*) en captivit6 in Decarie, R. et DesGranges, J.-L. (red.). (1990). Effets physiologiques et comportementaux du traitement des pelouses au chlorpyrifos sur le Merle d'Amerique (*Turdus migratorius*). GREBE inc. pour Environment Canada et Dow Chemical Inc., Serie de rapports techniques no 105, Service canadien de la faune, r6gion du Qu6bec, 68 pp. + annexes.

Brunet R., Girard C., Cyr A., (1997). Comparative study of the signs of intoxication and changes in activity level of red-winged blackbirds (*Agelaius phoeniceus*) exposed to dimethoate. *Agric Ecosys Environ*, 64: 201-209.

Blus L.J., Staley C.S., Henny C.J., Pendelton G.W., Craig T.H., Craig E.H., Halford D.K., (1989). Effects of organophosphorus insecticides on sage grouse in

southeastern Idaho. *J. Wildl. Manage*, 53: 1139-1146.

Buckner C. H., McLeod B.B., Lidstone R.G., (1976). Environmental impact studies of Spruce Budworm (*Choristoneura fumiferana* Clemens) control programs in New Brunswick in 1976. Chemical Control Research Institute Environmental Management Service, ON., Report CC-X-135.

Buchsbaum R., Valiela I., Swain T., (1984). "The role of phenolic compounds and other plant constituents in feeding by Canada geese in a coastal marsh." *Oecologia*, Vol. 63: 343 - 349.

Buckner C.H., McLeod B.B., (1977). Impact of experimental spruce budworms (*Choristoneura fumiferana* Clemens) suppression trials upon forest dwelling birds in Newfoundland in 1977. Canadian Forestry Service, Department of Fisheries and the Environment, ON., Report FPM-X-9.

Burn J.D., Leighton F.A., (1996). Further studies of brain cholinesterase: cholinergic receptor ratios in the diagnosis of acute lethal poisoning of birds by anticholinesterase pesticides. *J Wildlife Dis*, 32 (2): 216-224.

Burn A., (2000). Pesticides and their effects on lowland farmland birds. In: Aebischer, N.J., Evans, A.D., Grice, P.V. and Vickery, J.A. (eds.). *Ecology and Conservation of Lowland Farmland Birds*: 89-104. British Ornithologists Union, London.

Burnstock G., (1976). "Do some nerve cells release more than one transmitter?" *Neurosci*, 1:239 – 248.

Burt A.M., (1975). Choline acetyltransferase and acetylcholinesterase in the developing spinal cord. *Exp Neurol*, 47: 173-180.

Burton G.A., 1995. Sediment toxicity testing issues and methods. In: *ibid.*:70-103.

Burrueel R.V., Raabe G.O., Overstreet W.J., Wilson W.B., Wiley M.L., (2000). Paternal Effects from Methamidophos Administration in Mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 165: 148-157.

Busby D.G., Pearce P.A., Garrity N.R., (1981). Brain cholinesterase response in songbirds exposed to experimental Fenitrothion spraying in New Brunswick, Canada. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 26: 401-45.

Busby D.G., Holmes S.B., Pearce P.A., Fleming R.A., (1987). The effect of aerial application of Zectran on brain cholinesterase activity in forest songbirds. *Arch Environ Contam Toxicol*, 16: 623-629.

Busby D.G., White L.M., Pearce P.A., (1990). Effects of aerial spraying of

fenitrothion on breeding white-throated sparrows. *J Appl Ecol*, 27: 743-755.

Busker, R.W., Zijlstra J.J., (1991). The molecular forms of acetylcholinesterase in relation to organophosphate toxicity. In: Cholinesterases: Structure, Function, Mechanism, Genetics, and Cell Biology edited by J. Massoulit, F. Bacou, E. Barnard, A. Chatonnet, B.P. Doctor and D.M. Quinn. American Chemical Society, Washington, DC.

Cairns M.A., Maguire C.C., Williams B.A., Bennett J.K., (1991). Brain cholinesterase activity of bobwhite acutely exposed to chlorpyrifos. *Environ. Toxicol. and Chem.*, 10: 657-664.

Cairns J. Jr., McCormick P.V., (1992). Developing an ecosystembased capability for ecological risk assessments. *The Environ. Professional*, 14: 186-196.

Camara A.L., Braga M.F., Rocha E.S., Santos M.D., Cortes W.S., Cintra W.M., Aracava Y., Maelicke A., Albuquerque E.X., (1997). Methamidophos: An anticholinesterase without significant effects on postsynaptic receptors or transmitter release. *Neurotoxicology*, 18:589–602.

Campbell L.H., Avery M.I., Donald,P., Evans A.D., Green R.E., Wilson J.D., (1997). A Review of the indirect effects of pesticides on birds. JNCC Report. No. 227. Joint Nature Conservation Committee, Peterborough.

Carr R.L., Straus D.L., Chambers J.E., (1995). Inhibition and aging of channel catfish brain acetylcholinesterase following exposure to two phosphorothionate insecticides and their active metabolites. *J. Toxicol. Environ. Health*, 45: 101-112.

Carr R.L. Chambers J.E., (1996). Kinetic analysis of the in vivo inhibition, aging, and reactivation of brain acetylcholinesterase from rat and channel catfish by paraoxon and chlorpyrifos-oxon. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 139: 365-373.

Carr R.L., Chambers J.E., (2001). Toxic responses of the nervous system. In: Schlenk DM, Benson WH (eds), Target Organ Toxicity in Marine and Freshwater Teleosts vol. 2, Taylor and Francis, London, 27-95.

Carr R.L., Chambers H.W., Guarisco J.A., Richardson J.R., Tang J., Chambers G.E., (2001). Effects of repeated oral postnatal exposure to chlorpyrifos on open-field activity in juvenile rats, *Toxicol. Sci.*, 59: 260-267.

Carver J.H., Bootman J., Cimono M.C. et al. (1995). Genotoxic Potential of acephate technical: in vitro and in vivo effects. *Toxicology*, 35: 125–42.

Ceron J., Sancho E., Ferrando M.D., Andreu E., (1996). Use of fish eye cholinesterase determination in the evaluation of organophosphate insecticide exposure.

Ecotoxicol. *Environ. Saf.*, 35: 222–225.

Chambers H.W., (1992). Organophosphorus compounds: An overview. In *Organophosphates: Chemistry, Fate, and Effects* (J. E. Chambers and E. P. Levi, Eds.): 3–17. Academic Press, San Diego, CA.

Chambers J.E., Chambers H.W., (1990). Time course of inhibition of acetylcholinesterase and aliesterases following parathion and paraoxon exposures in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 103: 420-429.

Chambers H.W., Levi, P.E., (1992). *Organophosphates: Chemistry, Fate, and Effects*. Academic Press, San Diego, CA.

Chambers E.J., Carr L.R., 1995. Biochemical mechanisms contributing to species differences in insecticidal toxicity. *Toxicology*, 105: 291-304.

Chambers J.E., Boone J.S., Carr R.L., Chambers H.W., Straus D.L., (2002). Biomarkers as predictors of health and ecological risk assessment. *Human Ecological Risk Assessment*, 8: 165–176.

Chanda S., Song J., Rezk P., Sabnekar P., Doctor P.B., Sciuto M.A., Nambiar P.M., (2010). Gastrointestinal acetylcholinesterase activity following endotracheal microinstillation inhalation exposure to sarin in guinea pigs. *Chemico-Biological Interactions* (2010), doi:10.1016/j.cbi.2010.03.011

Chandrasekara H.U., Pathiratne A., (2005). Influence of low concentrations of Trichlorfon on haematological parameters and brain acetylcholinesterase activity in common carp, *Cyprinus carpio* L., *Aquacult. Res.*, 36: 144–149.

Chattonnet A., Lockridge O., (1989). Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. Review article. *Biochem J*, 260: 625-634.

Chebabo S.R., Santos M.D., Albuquerque E.X., (1999). The organophosphate sarin, at low concentrations, inhibits the evoked release of GABA in rat hippocampal slices. *Neurotoxicology*, 20: 871–82.

Chikilian M., de Speroni N. B., (1996). Comparative study of the digestive system of three species of tinamou. I. *Crypturellus tataupa*, *Nothoprocta cinerascens*, and *Nothura maculosa* (Aves: Tinamidae). *Journal of Morphology*, 228: 77-88.

Chuiko G.M., (2000). Comparative study of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in brain and serum of several freshwater fish: specific activities and *in vitro* inhibition by DDVP, an organophosphorus pesticide, *Comput. Biochem. Physiol. C*, 127: 233–242.

Clark R.B., (1997). *Marine Pollution*, 4th ed. Oxford University Press, Oxford.

Clegg D.J., van Gemert M., (1999). Determination of the reference dose for chlorpyrifos: proceedings of an expert panel, *J. Toxicol. Environ. Health, Part B* 2: 211-255.

Collias N.A., Collias E.C., (1984). Nest building and bird behavior. Princeton: Princeton University Press; 1984: 225-244.

Commission of the European Union, Doc No SANCO/3103/2000. Quality control procedures for pesticide residues analysis. Guidelines for residues monitoring in the European Union. Second edition, 1999-2000 και analytical methods for pesticide residues in foodstuffs. Sixth edition. June 1996. Ministry of Public Health. Welfare and Sport. The Netherlands.

Cohen J.A., Oosterbaan R.A., (1963). "The active site of acetylcholinesterase and related esterases and its reactivity towards substrates and inhibitors" Cholinesterase and Anticholinesterase Agents (Edited by KOELLE G.B.), Springer Verlag, Berlin.

Connell D.W., Lam P.K.S., Richardson B.J., Wu R.S.S., (1999). Introduction to Ecotoxicology. Blackwell Science, London.

Çokuğraş A.N., (2003). "Butyrylcholinesterase: Structure and Physiological importance" *Turk J Biochem* 28(2):54-61.

Cramp S., (1998). The complete birds of the western Palearctic (on CD-ROM). Oxford University Press.

Crisp C.E., Look M., (1982). Effect of esterification and side-chain alkylation on alteration of translocation characteristics of methamidophos. *Xenobiotica* **12**, pp. 469–479.

Crocker D.R., Perry S.M., (1990). "Plant chemistry and bird repellents." *Ibis*, Vol. 132: 300 - 308.

Crocker D., Hart A., Gurney J., McCoy C., (2002). Methods for estimating daily food intake of wild birds and mammals. DEFRA report: Project PN0908. http://www.pesticides.gov.uk/uploadedfiles/Web_Assets/PSD/Research_PN0908.pdf

Crossley J., Lee H., (1972). The fate of Orthene in lactating ruminants (goats) – final report. Chevron Chemical Company. Report No.: IM 409. TMN-0390.

Crossley J., Tutass H.O., (1969). Metabolism of Monitor insecticide by rats. Unpublished report from Chevron Chemical Co. Submitted to WHO by Bayer/Tomen.

Crumpton T.L., Seidler F.J., Slotkin T.A., (2000). Developmental neurotoxicity of chlorpyrifos in vivo and in vitro: effects on nuclear transcription factors involved in cell replication and differentiation. *Brain Res.*, 857: 87-98.

Custer T.W., Mitchell C.A., (1987). Exposure to insecticides of brushland wildlife within the lower Rio Grande Valley, Texas, USA. *Environ. Pollut.*, 45: 207-20.

Da Silva H.C., Medina H.S.G., Fanta E., Bacial M., (1993). "Sub-lethal effects of the organophosphate folidol 600(methyl parathion) on *Callichthys callichthys* (Pisces: teleostei)" *Comp Biochem Physiol*, 105C:197-201.

Dale H.H., (1937a). "Acetylcholine as a chemical transmitter of the effects of nerve impulses. I. History of ideas and evidence. Peripheral autonomic actions. Functional nomenclature of nerve fibers" *J Mt Sinai Hosp*, 4: 401-415.

Dale H.H., (1937b). "Acetylcholine as a chemical transmitter of the effects of nerve impulses. II. Chemical transmission at ganglionic synapses and voluntary motor nerve endings, some general considerations" *J Mt Sinai Hosp*, 4: 416-429.

Dam K., Garcia S.J., Seidler F.J., Slotkin T.A., (1999). Neonatal chlorpyrifos exposure alters synaptic development and neuronal activity in cholinergic and catecholaminergic pathways. *Dev Brain Res*, 116: 9–20.

Darvesh S., Smereczynsky A., Hopkins D.A., (1992). Distribution of butyrylcholinesterase in the rat brain, Abstr. - Soc. Neurosci., 18: 1505.

Darvesh S., MacDonald S.E., Losier A.M., Martin E., Hopkins D.A., Armour J.A., (1998). "Cholinesterases in cardiac ganglia and modulation of canine intrinsic cardiac neuronal activity" *J Auton Nerv Syst*, 71(2-3):75-84.

Davies N.B., (1977). Prey selection and social behaviour in wagtails. *J Anim Ecol*, 46: 37-57.

Day K.E., Scott I.M., (1990). Use of acetylcholinesterase activity to detect sublethal toxicity in stream invertebrates exposed to low concentrations of organophosphate insecticides. *Aquatic Toxicol*, 18: 101-114.

DeCaprio P.A., (1997). Biomarkers: Coming of Age for Environmental Health and Risk Assessment. *Environ. Sci. Technol.*, 31 (7): 1837 -1848.

Decarie R., Desgranges J.L., Lepine C., Morneau F., (1993). Impact of insecticides on the American robin (*Turdus migratorius*) in a suburban environment. *Environ. Pollut.*, 80 3: pp. 231–238.

De Coen W.M, Janssen C.R., Giesy J.P., (2000). Biomarker application in ecotoxicology: bridging the gap between toxicology and ecology. Persoone et al. (ed.) *New microbiotests for routine toxicity screening and biomonitoring*, New York: 18.

De Henu H., (1998). Biodegradation. In: Calow P, ed. *Handbook of Ecotoxicology*. Blackwell Science, Oxford: 355-377.

De Melo G.C., Donatti L., Mendes Rudniki C.A., Fanta E., (2008). Hepatic alterations in the fish *Rhamdia quelen* contaminated with Folidol 600. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Volume 71, Issue 3, November 2008: 821-829.

Dellali M., Barelli M.G., Romeo M., Aissa P., (2001). "The use of acetylcholinesterase activity in *Ruditapes decussatus* and *Mytilus galloprovincialis* in the biomonitoring of Bizerta lagoon" *Comp Biochem Physiol Part C: Toxicol Pharmacol*, 130: 227-235.

Dellmann H.D., (1971). "Veterinary Histology, an outline text – atlas" Lea and Febiger Philadelphia.

Depledge M.H., (1992). Conceptual paradigms in marine ecotoxicology. In *Proceedings of the 12th Baltic Marine Biologists Symposium* (E. Bjornstad, L. Hagerman and K. Jensen, eds): 47-52. Olsen and Olsen, Fredensborg, Denmark.

Depledge M.H., Amaral-Mendes J.J., Daniel B., Halbrook R.S., Kloepper-Sams P., Moore M.N., Peakall D.P., (1993). The conceptual basis of the biomarker approach. In: *Biomarkers - research and application in the assessment of environmental health*, (Eds. D.G. Peakall, and L.R. Shugart), pp. 15-29. Springer, Berlin, Heidelberg.

Depledge M.H., Aagaard A., Gyorkos P., (1995). Assessment of Trace Metal Toxicity Using Molecular, Physiological and Behavioural Biomarkers. *Marine Pollution Bulletin*, Vol. 31, No I-3: 19-27.

Detra R.L., Collins W.J., (1991). The relationship of parathion concentration, exposure time, cholinesterase inhibition and symptoms of toxicity in midge larvae (Chironomidae: Diptera). *Environ. Toxicol. Chem.*, 10: 1089-1095.

DeWeese L.R., McEwen L.C., Settini L.A., Deblinger R.D., (1983). Effects on birds of Fenthion aerial application for mosquito control. *J. Econ. Entomol.*, 76: 906-11.

Dieter M.P., Ludke J.L., (1975). Studies on combined effects of organophosphates and heavy metals in birds. I. Plasma and brain cholinesterase in *Coturnix* quail fed methyl mercury and orally dosed with parathion. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 13: 257.

Dittberner H., (1984). *Die Schafstelze, Motacilla flava*. A. Ziemsen Verlag Wittenberg Lutherstadt, 72-131.

Dolbeer R.A., Avery M.L., Tobin M.E., (1994). "Assessment of field hazards to birds from methiocarb applications to fruit crops." *Pesticide Science*, Vol. 40: 147-161.

Donald P.F., Pisano G., Rayment M.D., Pain D.J., (2002). The Common Agricultural Policy, EU enlargement and the conservation of Europe's farmland birds.

Agriculture, Ecosystems and Environment, 89: 167–182.

Donald P.F., Sanderson F.J., Burfield I.J., Van Bommel F.P.J., (2006). Further evidence of continent-wide impacts of agricultural intensification on European farmland birds, 1990–2000. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 116: 189–196.

Dreux U., (1975). Cholinesterase in embryonic development. *Prog Histochem Cytochem*, 7: 1-52.

Driver C., Ligothe W.M., Van Voris P., McVeety D.B., Greenspan J.B., Drown B.D., (1990). Routes of uptake and their relative contribution to the toxicologic response of northern bobwhite (*Colinus virginianus*) to an organophosphate pesticide. *Environmental Toxicology*: 21-33

Dubovy P., (1991) Histochemical study of non-specific cholinesterase in PNS as a tool for the recognition of relationships between axon and Schwann cells. In: *Cholinesterases, Structure, Function, Mechanism, Genetics, and Cell Biology*: 122.

Dudai Y., Yavin E., (1978). Ontogenesis of muscarinic receptors and acetylcholinesterase in differentiating rat cerebral cells in culture. *Brain Res*, 155: 368-373.

Dunning J.B., (1992). *CRC Handbook of avian body masses*. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.

Dunning J.B., (2008). *CRC handbook of avian body masses*. 2nd edition. Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo: CRC Press.

Ecobichon D.J., Comeau A.M., (1973). Pseudocholinesterases of mammalian plasma: physiochemical properties and organophosphate inhibition in eleven species. *Toxicol Appl Pharmacol*, 24: 92-100.

Ecobichon D.J., (2001). "Toxic effects of pesticides." In: C.D. Klaassen, (Ed) Casarett and Doull's *Toxicology* (5th ed.) McGraw Hill, New York: 643.

Edwards J.A., Brimijoin S., (1982). Divergent regulation of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in tissues of the rat. *J. Neurochem.*, 38: 1393-1403.

Edwards P.J., Coulson J.M., McCollin D., (1993). "Safety of a new molluscicide 'Malice' to wildlife." Poster presented at 1st SETAC World Congress, Lisbon, Portugal.

EFSA, (2004a). Opinion of the Scientific Panel on Plant health, Plant protection Products and their Residues on a request from the Commission related to the evaluation of methamidophos in toxicology in the context of Council Directive 91/414/EEC. *The EFSA Journal* (2004), 95: 1-15.

EFSA, (2004b). Opinion of the Scientific Panel on Plant health, Plant protection

products and their Residues on a request from the Commission related to the evaluation of methamidophos in ecotoxicology in the context of Council Directive 91/414/EEC. *The EFSA Journal* (2004), 144: 1-50.

EFSA, (2005). Opinion of the Scientific Panel on Plant health, Plant protection products and their Residues on a request from EFSA related to the evaluation of pirimicarb. *The EFSA Journal* (2005), 240: 1-21.

EFSA, (2009). Guidance of EFSA. Risk Assessment for Birds and Mammals. *The EFSA Journal* (2009), 7(12):143.

Ehrich M., (1998), Organophosphates. From: Encyclopedia of Toxicology. (Eds Wexler P.), Academic Press, New York: 467-470.

Eigenberg D.A., Pazdernik T.L. Doull J., (1983). Haemoperfusion and pharmacokinetic studies with methamidophos in the rat. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 3: 490–501.

Ellman L., Courtney K.D., Andreas Jr. V., Featherstone R.M., (1961). A new rapid colorimetric determination of cholinesterase activity. *Biochem Pharmacol*, 7: 88-95.

El Etri M.M., Nickell W.T., Ennis M., Skau K.A., Shipley M.T., (1992). Brain norepinephrine reductions in soman-intoxicated rats: association with convulsions and AchE inhibition, time course, and relation to other monoamines. *Exp. Neurol.*, 118 (2), 153-163.

EPA, (1986). Diazinon." Intent to cancel registrations of pesticide products containing diazinon; Denial of applications for registration of pesticide products containing diazinon; Conclusion of special review. US Environmental Protection Agency, Washington, D.C.: 77.

Epstein M.L., Sherman D., Gershon M.D., (1980). "Development of serotonergic neurons in the chick duodenum". *Dev Biol*, 77: 22-40.

Epstein M.L., Hudis J., Dahl J., (1983). "The development of peptidergic neurons in the foregut of the chick". *J Neurosci*, 3: 2431-2447.

Epstein M.L., Poulsen K.T., (1991). "Appearance of somatostatin and vasoactive intestinal peptide along the developing chicken gut". *J Comp Neurol*, 311:168-178.

Escartin E., Porte C., (1996). "Acetylcholinesterase Inhibition in the Crayfish *Procambarus clarkii* exposed to Fenitrothion". *Ecotox Environm Saf*, 34:160-164.

Espaillat J.E., Mason J.R., (1990). "Differences in taste preference between red-winged blackbirds and European starlings." *Wilson Bulletin*, Vol. 102: 292 -299.

Eto M., (1974). Organophosphorus Pesticides. Organic and Biological Chemistry.

CRC Press.

Fanta E., Rios F.S., Vianna A.C.C., Romão S., Freiburger S., (2003). Histopathology of the fish *Corydoras paleatus* contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water, and food, *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 54: 119-130.

Fairbrother A., Bennett R.S., Bennett J.K., (1989). Sequential sampling of plasma cholinesterase in mallards (*Anas platyrhynchos*) as indicator of exposure to cholinesterase inhibitors. *Environ. Toxicol. Chem.*, 8: 117-122.

Fairbrother A., Marden B.T., Bennett J.K., Hooper M.J., (1991). Methods used in determination of cholinesterase activity. In: Mineau P (ed), *Cholinesterase Inhibiting Insecticides: Their Impact on Wildlife and the Environment*, vol. 2-Chemicals in Agriculture, Elsevier, New York: 57-58.

FAO, (2003). First draft prepared by Dugald MacLachlan, Australian Government Department of Agriculture, Fisheries and Forestry, Australia, and David Lunn, New Zealand Food Safety Authority, New Zealand.

FAO/WHO, (2002). Pesticide residues in food - 2002 - Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues.
<http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/2002pr10.htm#1.1.2>.

Farag T., Amina Eweidah M.H., El-Okazy A.M., (2000). Reproductive toxicology of acephate in male mice. *Reproductive Toxicology*, 14: 457-462.

Farag T.A., Eweidah M.H., Tayel S.M., El-Sebae A.H., (2000). Developmental toxicity of acephate by gavage in mice. *Reproductive Toxicology*, 14: 241-245.

Ferrando M.D., Sancho E., Andreu E., (1991). Comparative acute toxicities of selected pesticides to *Anguilla anguilla*. *J. Environ. Sci. Health*, B 26: 491-498.

Ferrari A., Venturino A., de D'Angelo A.M.P., (2004). Time course of brain cholinesterase inhibition and recovery following acute and subacute azinphos methyl, parathion and carbaryl exposure in the goldfish (*Carassius auratus*), *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 57: 420-425.

Ferrari A., Venturino A., de D'Angelo A.M.P., (2007). Muscular and brain cholinesterase sensitivities to azinphos methyl and carbaryl in juvenile rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, *Comp. Biochem. Physiol. C*, 146: 308-313.

Fisher S.W., (1991). Changes in the toxicity of the three pesticides as a function of environmental pH and temperature, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 46: 197-202.

Flammarion P., Noury P., Garric J., (2002). The measurement of cholinesterase activities as a biomarker in chub (*Leuciscus cephalus*): the fish length should not be

ignored, *Environ. Poll.*, 120: 325–330.

Fleck R.A., Hollaender A., (1982). Eds. Genetic Toxicology. An agricultural perspective. New York: Plenum.

Fleischli M., Franson J.C., Thomas N., Finley D., Riley W.J., (2004). Avian mortality events in the United States caused by anticholinesterase pesticides: a retrospective summary of national wildlife health center records from 1980 to 2000, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 46: 542–550.

Fleming W.J., (1981). Recovery of brain and plasma cholinesterase activities in ducklings exposed to organophosphorus pesticides. *Arch Environm Contam Toxicol*, 10: 215-229.

Fleming W.J., Bradbury S.P., (1981). Recovery of cholinesterase activity in mallard ducklings administered organophosphorus pesticides. *J Toxicol Environ Health*, 8: 885-897.

Fleming W.J., Grue C.E., (1981). Recovery of cholinesterase activity in five avian species exposed to dicrotophos, an organophosphorus pesticide. *Pest Biochem Physiol*, 16: 129-135.

Fletcher H.P., Noble S., Spratto G.R., (1989). Effect of the acetylcholinesterase inhibitor, soman, on plasma levels of β -endorphin and adrenocorticotropic hormone (ACTH). *Biochem. Pharm.*, 38: 2045–2046.

Forsyth D.J., Martin P.A., (1993). Effects of fenitrothion on survival, behavior, and brain cholinesterase activity of white-throated sparrows (*Zonotrichia albicollis*). *Environ Toxicol Chem*, 12: 91-103.

Fossi M.C., Leonziom C.I., Massi A., Lari L., Casini S., (1992). Serum esterase inhibition in birds: a non-destructive biomarker to assess organophosphorus and carbamate contamination. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 23: 99–104.

Fossi C., Leonzio C., (1993). Nondestructive Biomarkers in Vertebrates. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA.

Frandsen R.D., Lee Wilke W., Fails A.D.(2003). Anatomy and Physiology of Farm Animals. Lippincot Williams and Wilkins.

Frank R., Mineau P., Braun H., Barker I., Kennedy W., Trudeau S., (1991). Deaths of Canada geese following spraying of turf with diazinon, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 46: 852–858.

Frankel P.S., Hoonakker A.J., Danaceau J.P., Hanson G.R., (2007). Mechanism of an exaggerated locomotor response to a low dose challenge of methamphetamine,

Pharmacol. Biochem. Behav., 86: 511–515

Fryday S.L., Chandler-Morris S.A., Hart A.D.M., (1998). Effect of presentation method on the avoidance of fonofos-treated seed by captive birds. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 61: 448-454.

Fryday S., Hart A., Marczylo T., (1995). Effects of sublethal exposure to an organophosphate on the flying performance of captive starlings, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 55: 366–373.

Fryday S.L., Chandler-Morris S.A., Hart A.D.M., (2001). Contract PN0909: Robust tests for the acceptance of bait and treated seed by birds. November 2001. CSL Report No. FL3900. Available for downloading at <http://www.pesticides.gov.uk/approvals.asp?id=1183>

Fujiyama T., (1981). Studies on the Levels of Organochlorine Compounds and Heavy Metals in Marine Organisms. University of Ryukus, Ryukus, Japan.

Fuller R.J., Gregory R.D., Gibbons D.W., Marchant J.H., Wilson J.D., Baillie S.R. Carter N., (1995). Population declines and range contractions among lowland farmland birds in Britain. *Conservation Biology*, 9: 1425-1441.

Fuller B., (2000). A Dermal/Intravenous Crossover Study to Determine the Dermal Absorption of [¹⁴C]-Methamidophos in Male Rhesus Monkeys. Bayer Agriculture Division report No 109812.

Fulton M.H., Key P.B., (2001). “Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects” *Environ Toxicol Chem*, 20:37– 45.

Furness J.B., Costa M.(1987). “The enteric nervous system” Churchill Livingstone, New York.

Furness J.B., Young H.M., Pompolo S., Bornstein J.C., Kunze W.A., McConalogue K., (1995). “Plurichemical transmission and chemical coding of neurons in the digestive tract”. *Gastroenterol*, 108:554-563.

Gagnaire B., Geffard O., Xuereb B., Margoum C., Garric J., (2008). “Cholinesterase activities as potential biomarkers: Characterization in two freshwater snails, *Potamopyrgus antipodarum* (Mollusca, Hydrobiidae, Smith 1889) and *Valvata piscinalis* (Mollusca, Valvatidae, Müller 1774)”. *Chemosphere*, 71:553-560.

Galindo J.C., Kendall R.J., Driver C.J., Lacher Jr. T.E., (1985). The effect of methyl parathion on susceptibility of bobwhite quail (*Colinus virginianus*) to domestic cat predation. *Behav. Neural Biol.*, 43: 21–36

Galloway T.S., Sanger R.C., Smith K.L., Fillmann G., Readman J.W., Ford T.E., Depledge M.H., (2002). Rapid assessment of marine pollution using multiple biomarkers and chemical immunoassays. *Environ.Sci.Technol.*, 36: 2219-2226.

Garcia M.L., Castro B., Ribeiro R., Guilhermino L., (2000). Characterization of cholinesterase from guppy (*Poecilia reticulata*) muscle and its in vitro inhibition by environmental contaminants. *Biomarkers*, 5: 274-285.

Garrett N.E., Stack H.F., Waters M.D., (1986). Evaluation of genetic activity profiles of 65 pesticides. *Mutat Res*, 168: 301–25.

Garcia-Cabero J.P., Miguez-Santiyan M.P., Reja-Sanchez A., Roncero-Cordero V., Soler-rodriguez F., (1998). Recovery of brain acetylcholinesterase and plasma cholinesterase activities in quail (*Coturnix coturnix*) after chlorpyrifos administration and effect of pralidoxime treatment. *Environ Toxicol Chem*, 17: 1835-1844.

Gentle M.J., (1985). Sensory involvement in the control of food-intake in poultry. *Proc. Nutr. Soc.*, 44: 313–321.

Geula C., Mesulam M., (1995). Cholinesterases and the pathology of Alzheimer disease. *Alzheimer Dis. Assoc. Disor.*, 9 (Suppl. 2): 23–28.

Geula C., Mesulam M.M., Tokuno H., Kuo C.C., (1993). Developmentally transient expression of acetylcholinesterase within cortical pyramidal neurons, *Dev. Brain Res.*, 76: 23–31.

Geula C., Mesulam M.M., Kuo C.C., Tokuno H., (1995). Postnatal development of cortical acetylcholinesterase-rich neurons in the rat brain: permanent and transient patterns. *Exp Neurol*, 134: 157-178.

Geula C., Nagykerly N., (2006). Butyrylcholinesterase activity in the rat forebrain and upper brainstem: Postnatal development and adult distribution. *Exp Neurology*, Doi:10.1016/j.expneurol.2006.12.015.

Giacobini E., (2000). Cholinesterase inhibitors: from Calabar bean to Alzheimer therapy. In: E. Giacobini, Editor, *Cholinesterases and Cholinesterase Inhibitors*, Martin Dunitz, London (2000): 181–226.

Giacobini E., (2004). “Cholinesterase inhibitors: new roles and therapeutic alternatives” *Pharmacol Res*, 50(4): 433-440.

Giesy J.P., Versteeg D., Graney R., (1988). A review of selected clinical indicators of stress-induced changes in aquatic organisms. In *Toxic Contaminants and Ecosystem Health; A Great Lakes Focus* (M. S. Evans, ed.): 169-200. John Wiley, NY, USA.

Gokcimen A., Gulle K., Demirin H., Bayram D., Kocak A., Altuntas I., (2007). Effects of diazinon at different doses on rat liver and pancreas tissues. *Pestic Biochem Physiol*, 87: 103-108.

Goodman L.S., Limbird L.E., Milinoff P.B., Ruddon R.W., Gilman A.G., (1996). "Goodman and Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics" McGraw-Hill, Health Professions Division 9th Ed, New York.

Gopinath C., Prentice D.E., Lewis D.J., (1987) Atlas of experimental toxicological pathology, MTP Press Limited, Kluveracademic Publishers group, Lancaster.

Coppage D.L., Matthews E., (1974). Short-term effects of organophosphate pesticides on cholinesterases of estuarine fishes and pink shrimp. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 11: 483–488.

Gray A.J., Thompson C.M., Fukuto T.R., (1982). Distribution and excretion of [¹⁴CH₃S] methamidophos after intravenous administration of a toxic dose and the relationship with anticholinesterase activity. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 18: 28–37.

Green R.E., (1978). Factors affecting the diet of farmland skylarks, *Alauda arvensis*. *Journal of Animal Ecology*, 47: 913-928.

Greenfield S., (1996). Critique: Non-classical actions of cholinesterases: Role in cellular differentiation, tumorigenesis, and Alzheimer's disease. *Neurochem Int*, 28: 485-490.

Greig-Smith P.W., (1987). "Aversions of starlings to unfamiliar, unexpected or unusual flavours and colours in food." *Ethology*, Vol. 7: 155-163.

Greig-Smith P.W., Rowney C.M., (1987). "Effects of colour on the aversions of starlings and house sparrows to five chemical repellents." *Crop Protection*, Vol. 6: 402 - 409.

Greig-Smith P.W., Walker C.H., Thompson H.M., (1992). Ecotoxicological consequences of interactions between avian esterases and organophosphorus compounds. In: Ballantyne B, Marrs TC (eds) Clinical and experimental toxicology of organophosphates and carbamates. Oxford: Butterworth-Heinemann Ltd.: 295-303.

Gregory R.D., Van Strien A., Vorisek P., Meyling A.W.G., Noble D.G., Foppen R.P.B., Gibbons D.W., (2005). Developing indicators for European birds. *Phil. Trans. R. Soc. B.*, 360: 269–288.

Grove R.A., Buhler D.R., Henny C.J., Drew A.D., (1998). Declining ring-necked pheasants in the Klamath Basin, California: I. Insecticide exposure. *Ecotoxicology*, 7:

305-312.

Grue C.E., (1982). Response of common grackles to dietary concentrations of four organophosphate pesticides. *Arch Env Contam Toxicol*, 11: 617-626.

Grue C.E., Hart A.D.M., Mineau P., (1991). Biological consequences of depressed brain cholinesterase activity in wildlife. In: Mineau P (ed) Cholinesterase-inhibiting insecticides, their impact on wildlife and the environment. New York: Elsevier: 152-209.

Grue C.E., Shipley B.K., (1981). Interpreting population estimates of birds following pesticide applications - behavior of male starlings exposed to an organophosphate pesticide. *Stud Avian Biol*, 6: 292-296.

Grue C.E., Gibert P.L., Seeley M.E., (1997). Neurophysiological and behavioral changes in non-target wildlife exposed to organophosphate and carbamate pesticides: Thermoregulation, food consumption, and reproduction. *American Zoologist*, 37: 369-388.

Guimarães A.T.B., de Assis H.C., Silva B.W., (2007). The effect of trichlorfon on acetylcholinesterase activity and histopathology of cultivated fish *Oreochromis niloticus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Volume 68, Issue 1, September 2007: 57-62.

Gupta R.C., (2004). Brain regional heterogeneity and toxicological mechanisms of organophosphates and carbamates. *Toxicol. Mech. Meth.*, 14: 103–143.

Habig C., DiGitrho R.T., Nomeir A.A., Abou-Donia M.B., (1986). Comparative toxicity, cholinergic effects, and tissue levels of S,S,S,-tri-n-butyl phosphorotrithioate (DEF) to channel catfish (*Ictalurus punctatus*) and blue crabs (*Caliinectes sapidus*). *Aquat. Toxicol.*, 9: 193-206.

Habig C., Di Giulio R.T., (1991). Biochemical characteristics of cholinesterases in aquatic organisms. In: P. Mineau, Editor, Cholinesterase-Inhibiting Insecticides. Their Impact on Wildlife and the Environment, Elsevier, Amsterdam: 20–30.

Hamilton G.A., Hunter K., Ruthven A.D., (1981). Inhibition of brain acetylcholinesterase activity in songbirds exposed to fenitrothion during aerial spraying of forests. *Bull Environm Contam Toxicol*, 27: 856-863.

Hamm J.T., Wilson B.W., Hinton D.E., (1998). Organophosphate-induced acetylcholinesterase inhibition and embryonic retinal cell necrosis in vivo in the teleost (*Oryzias latipes*). *Neurotox*, 19:, 853-869.

Hanafy M.S.M., Atta A.H., Hashim M.M.κ (1986). Studies on the teratogenic

effects of Tamaron (an organophosphorus pesticide). *Vet. Med. J.*, 34: 357–363.

Handrinos G., Akriotis T., (1997). *The Birds of Greece*. London: Christopher Helm Publishers.

Haninec P., Dubovy P., (1992). Origin of cells in contact with the growth cones of embryonal peripheral nerves and histochemical detection of nonspecific cholinesterase activity in quail-chick and chick-quail chimeras. *J Neurosci Res*, 31: 301-308.

Hao J.O., (1996). Bioindicators for water quality evaluation-a review. *Journal of the Chinese Institute of Environmental Engineering*, Vol.6 No.1: 1-19.

Harris H.R., (1900). On the rapid conversion of haematoxylin into haematein in staining reactions. *J Appl Microsc*, 3: 377-80.

Hart A.D.M., (1993). Relationship between behavior and the inhibition of acetylcholinesterase in birds exposed to organophosphorus pesticides. *Environ Toxicol Chem*, 12: 321-336.

Hart A.D.M., (2002). Risks to birds and mammals from solid formulations. Report of PN0922. Available for downloading at <http://www.pesticides.gov.uk/approvals.asp?id=1183>

Hart A.D.M., Clook M.A., (1994). "Research-based improvements in the regulation of hazards to wildlife from pesticide seed treatments." Seed treatment: progress and prospects, T. Martin, ed., BCPC Monograph no. 57. BCPC, Farnham, UK: 449-454

Hart A., Fryday S., McKay H., Pascual J., Prosser P., 1999. Understanding risks to birds from pesticide-treated seeds. In: Adams, N. & Slotow, R. (Eds), Proc. 22 Int. Ornithol. Congr. Durban: pp. 1070-1087. Birdlife South Africa, Johannesburg.

Hatton C., McKemie D., Baker F.C., 1997. The metabolism of [¹⁴C]methamidophos in the laying hen. PTRL, USA. Report No.: M9972. TMN-0161C.

Hattis D, 1986. The promise of molecular epidemiology for quantitative risk assessment. *Risk Anal.*, 6: 181-193.

Hemmer M.J., Middaugh D.P., Comparetta V., (1992). Comparative Acute Sensitivity of Larval Topsmelt, *Atherinops affinis*, and Inland Silverside, *Menidia beryllina*, to 11 chemicals, *Environ. Toxicol. Chem.*, 11: 401–408.

Henderson J., Yamamoto J., Fry D., Seiber J., Wilson B., (1994). Oral and dermal toxicity of organophosphate pesticides in the domestic pigeon (*Columba livia*). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 52: 633–640.

- Henry M.G., Atchinson G.J., (1984). Behavioral effects of methylparathion on social groups of bluegill (*Lepomis macrochirus*). *Environ. Toxicol. Chem.*, 3: 399-408.
- Hermite A., Sine J.P., Colas B., (1996). Ultrastructural localization of butyrylcholinesterase in epithelial cells of rat intestine. *Eur J Histochem*, 40: 299-304.
- Hill E.F., (1988). Brain cholinesterase activity of apparently normal wild birds. *J Wildl Dis*, 24: 51-61.
- Hill E.F., (1992). Avian toxicology of anticholinesterases. In: Ballantyne, B., Marrs, T.C. (Eds.), *Clinical and Experimental Toxicology of Organophosphates and Carbamates*. Butterworth-Heinemann, Oxford: 272–294.
- Hill E.F., (1995). Organophosphorus and carbamate pesticides. In: Hoffman, D.J., Rattner, B.A., Burton, Jr., G.A., Cairns, J. (Eds.), *Handbook of Ecotoxicology*. CRC Press, Boca Raton, FL: 243–273.
- Hill E.F., Camardese M.B., (1986). Lethal dietary toxicities of environmental contaminants and pesticides to Coturnix. United States Department of the Interior, Fish and Wildlife Service, Technical Report 2, Washington DC.
- Hinton D.E., Lauren D.J., (1990). Liver structural alterations accompanying chronic toxicity in fishes: potential biomarkers of exposure. In *Biomarkers of Environmental Contamination*, (Eds. J.F. McCarthy and L.K. Shugart): 17-37. Lewis Publishers, Boca Rota, Ann Arbor, London.
- Hoffman D.J., (1992). Wildlife toxicity testing. In : *ibid.*, 1995: 47-69 ; Kendall R.J. Farming with agrochemicals: the response of wildlife. *Environ Sci Technol*, 26: 239-242.
- Holmes S.B., Boag P.T., (1990). Inhibition of brain and plasma cholinesterase activity in zebra finches orally dosed with fenitrothion. *Environ Toxicol Chem*, 9: 323-334.
- Hommel V.M., Buchs W., Joermann G., Siebers J., (1990). Poisoning risk of birds by residues of pesticides in leaf puddles of cole crops. *Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd*, 42: 113-117.
- Hoy T., Horsberg T.E., Wichstrøm R., (1991). Inhibition of acetylcholinesterase in rainbow trout following dichlorvos treatment at different water oxygen levels. *Aquaculture*, 95: 33-40.
- Hudson R.H., Tucker R.K., Haegele M.A., (1984). *Handbook of Toxicity of Pesticides to Wildlife*. US Dept. of Interior, Fish and Wildlife Serv, Resource Publ 153, 90.

Hughes G.M., (1976). Polluted fish respiratory physiology. In: Effects of Pollutants on Aquatic Organisms edited by A.P.M. Lockwood. Cambridge University Press, London: 163-183.

Hurlbert S. H. (1977). Toxicity of chlorpyrifos to mallard ducks. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 17: 105-7.

Hurlbert S.H., Mulla M.S., Keith J.O., Westlake W.E., Dusch M., (1970). Biological effects and persistence of Dursban in fresh water ponds. *J. Econ. Entomol.*, 63: 43-52.

Hunt K.A., Bird D.M., Mineau P., Shutt L., (1992). Selective predation of organophosphate-exposed prey by American kestrels. *Anim. Behav.*, 43: 971–976.

International Research, and Development Corporation. Final Report. Michigan., USA, 1982.

Jakubas W.J., Gullion G.W., (1990). "Coniferyl benzoate in quaking aspen: a ruffed grouse feeding deterrent." *Journal of Chemical Ecology*, Vol. 16: 1077-1087.

Jarvis E.D., Güntürkün O., Bruce L., Csillag A., Karten H., Kuenzel W., Medina L., Paxinos G., Perkel D.J., Shimizu T., Striedter G., Wild M., Ball G.F., Ford J.D., Durand S., Hough G., Husband S., Kubikova L., Lee D., Mello C.V., Powers A., Siang C., Smulders T.V., Wada K., White S.A., Yamamoto K., Yu J., Reiner A., Butler A.B., (2005). Avian brains and a new understanding of vertebrate brain evolution. *Nature Reviews Neuroscience*, 6:151-159.

Jeney, Jeney, (1986). Studies on the effect of trichlorfon on different biochemical and physiological parameters of common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquacult. Hung.*, 5: 79–89.

Jeune H.L., Jourdan F., (1991). Postnatal development of cholinergic markers in the rat olfactory bulb: a histochemical and immunocytochemical study. *J Comp Neurol*, 314: 383-395.

Jobling M., (1995). *Environmental Biology of Fishes*.

Johnson J.A., Wallace K.B., (1987). Species-related differences in the inhibition of brain acetylcholinesterase by paraoxon and malaoxon. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 88: 234-241.

Johnson B.L., Calabrese E.J., Callahan B.G., Pastorok R.A., Chapman P.M., (2001). Chlorpyrifos: ecotoxicological risk assessment for birds and mammals in corn agroecosystems. *Hum. Ecol. Risk Assess.*, 7 3: 473–637.

Jokanovi M., (2001). Biotransformation of organophosphorus compounds

Toxicology, Volume 166, Issue 3, 25 September 2001: 139-160.

Jones K.M.E., Wathes M.C., Webster A.J.F., (2005). Avoidance of atmospheric ammonia by domestic fowl and the effect of early experience. *Applied Animal Behaviour Science*, 90: 293–308.

Jortner B.S., (2000). Mechanisms of toxic injury in the peripheral nervous system: neuropathologic considerations. *Toxicol Pathol*, 28: 54-69.

Kalender S., Kalender Y., Durak D., Ogutcu A., Uzunhisarcikli M., Cevrimli B.S., Yildirim M., (2007). Methyl parathion induced nephrotoxicity in male rats and protective role of vitamins C and E. *Pestic. Biochem. Phys.*, 88 (2): 213–218.

Kaniastas E., Tzakos D., Kostouros N., Foudoulakis M., (2009). Farmland bird communities as focal species: The case of the Kopaida region. 11th ICZEGAR. International Congress on the Zoogeography, Ecology and Evolution of Eastern Mediterranean. Sep 21-25, 2009. Herakleio Crete, Hellas.

Kao T.S., Fukuto T.R., (1977). Metabolism of O,S-dimethylpropionyl- and hexanoylphosphoramidothioate in the housefly and the white mouse. *Pest. Biochem. Physiol.*, 7: 83–95.

Karalliedde L., (1999), “Organophosphorus poisoning and anaesthesia” *Anaesthesia*, 54:1073–1088.

Karnovsky M.J., Roots L., (1964). A direct-coloring thiocholine method for cholinesterases. *J Histochem and Cytochem*, 12: 219-221.

Karr J.R., (1981). Assessment of biotic integrity using fish communities. *Fisheries*, 6: 21-27.

Kavitha P., Rao J.V., (2007). Oxidative stress and locomotor behaviour response as biomarkers for assessing recovery status of mosquito fish, *Gambusia affinis* after lethal effect of an organophosphate pesticide, monocrotophos, *Pestic. Biochem. Physiol.*, 87: 182–188.

Kendall R., Brewer L., Hitchcock R., Mayer J., (1992). American wigeon mortality associated with turf application of diazinon AG500, *Journal of Wildlife Diseases*, 28: 263–267.

Khasawinah A.M.A., March R.B., Fukuto T.R., (1979). Insecticide properties, anticholinesterase activities and metabolism of methamidophos. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 9: 211–221

Kim J-R., Kim H-J., Kwon O-S., (2004). “Acetylcholinesterase and neuropathy target esterase activity in female and male rats exposed to pesticide terbufos” ETAP

(*Env Toxic Pharm*).

King K.A., White D.H., Mitchell C.A., (1984). Nest behavior and reproductive success of laughing gulls sublethally dosed with parathion, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 33: 499.

Kirby M.F., Morris S., Hurst M., Kirby S.J., Neall P., Tylor T., Fagg A., (2000). The Use of Cholinesterase Activity in Flounder (*Platichthys flesus*) Muscle Tissue as a Biomarker of Neurotoxic Contamination in UK Estuaries. *Marine Pollut Bull*, 40:780-791.

Klein O., (1997). Position paper on metabolism of methamidophos in rats. Unpublished report from Bayer AG, dated 19 February 1997, file No. M9942. Submitted to WHO by Bayer/Tomen.

Klaine S.J., Lewis M.A., (1995). Algal and plant toxicity testing. In: *Handbook of Ecotoxicology*: 163-184.

Koenigsberger C., Hammond P., Brimijoin S., (1998). Developmental expression of acetyl- and butyrylcholinesterase in the rat: enzyme and mRNA levels in embryonic dorsal root ganglia. *Brain Res.*, 787: 248–258.

Kononen D.W., Hochstein J.R., Ringer R.K., (1986). A quantitative method for evaluating avian food avoidance behavior. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 5: 823 - 830.

Kononen D.W., Hochstein J.R., Ringer R.K., (1987). Avoidance behaviour of mallards and northern bobwhites exposed to carbofuran-contaminated food and water. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 6: 41 - 50.

Kostka G., Kopec-Szlezak J., Palut D., (1996). Early hepatic changes induced in rats by two hepatocarcinogenic organohalogen pesticides: bromopropylate and DDT. *Carcinog*, 17: 407–412.

Kostovic I., Rakic P., (1984). Development of prestriate visual projections in the monkey and human fetal cerebrum revealed by transient cholinesterase staining. *J Neurosci*, 4: 25-42.

Kozlovskaya V.I., Mayer F.L., (1984). Brain acetylcholinesterase and backbone collagen in fish intoxicated with organophosphate pesticides. *J Great Lakes Res*, 10: 261-266.

Kozlovskaya V.I., Mayer F.L., Menzikova O.V., Chuyko G.M., (1993). Cholinesterases of aquatic animals, *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, 132: 117–142.

Kristt D.A., (1979). Development of neocortical circuitry: histochemical

localization of acetylcholinesterase in relation to the cell layers of the rat somatosensory cortex. *J Comp Neurol*, 186: 1-16.

Krupnik J.A., Paterson E., (1993). Butyrylcholinesterase activity in the developing auditory brainstem, the choroid plexus and the pituitary of the perinatal rat. *Int. J. Dev. Neurosci.*, 11: 731–738.

Kubo T., Hagiwara Y., Sekiya D., Chiba S., Fukumori R., (2000). Cholinergic inputs to rostral ventrolateral medulla pressor neurons from hypothalamus. *Brain Res. Bull.*, 53: 275–282.

Kubo T., Hagiwara Y., Endo S., Fukumori R., (2002). Activation of hypothalamic angiotensin receptors produces pressor responses via cholinergic inputs to the rostral ventrolateral medulla in normotensive and hypertensive rats. *Brain Res.*, 953: 232–245.

Kuenzel W.J. (1972). Dual hypothalamic feeding system in a migratory bird, *Zonotrichia albicollis*. *A.J. Physiol.*, 223: 1138- 1142.

Kumar A., Chapman J.C., (1998). Profenofos toxicity to the eastern rainbow fish (*Melanotaenia duboulayi*). *Environ. Toxicol. Chem.*, 17: 1799–1806.

Kurtz P.J. (1977). Dissociated behavioral and cholinesterase decrements following malathion exposure. *Toxicol Appl Pharmacol*, 42: 589-594.

Küster E., (2005). Cholin- and carboxylesterase activities in developing zebrafish embryos (*Danio rerio*) and their potential use for insecticide hazard assessment. *Aquatic Toxicology*, Volume 75, Issue 1, 5 October 2005: 76-85.

Kvitek, R.G., (1991). Sequestered paralytic shellfish poisoning toxins mediate glaucouswinged gull predation on bivalve prey. *Auk*, Vol. 108: 381 - 392.

Kwong T.C., (2002). Organophosphate pesticides: biochemistry and clinical toxicology, *Ther. Drug Monit.*, 24: 144–149.

Kyritsis E., Hadjibiros K., (2002). Criteria of Indicators selection for the creation of an environmental quality evaluation model. Proceedings of the International Conference “Protection of the Environment VI”: 1497-1504.

Lam K.S., Rudolf P., and W. S.S. (2003). Use of Biomarkers in Environmental Monitoring. STAP Workshop on The Use of Bioindicators, Biomarkers and Analytical Methods for the Analysis of POPs in Developing Countries

Langley J.N., (1921). The Autonomic Nervous System. Cambridge, Cambridge University Press.

Larini L., (1979). Toxicologia dos inseticidas, Sarvier, São Paulo.

Lassiter T.L., Barone S.Jr, Padilla S., (1998). Ontogenetic differences in the

regional and cellular acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activity in the rat brain. *Dev Brain Res*, 105 (1): 109-123.

Latuszynska J., Luty S., Raszewski G., Przebirowska D., Tokarska-Rodak M. (2003). Neurotoxic effect of dermally applied chlopyrifos and cypermethrin. Reversibility of changes. *Ann Agric Environ Med*, 10: 197–201.

Layer P.G., (1983). Comparative localization of acetylcholinesterase and pseudocholinesterase during morphogenesis of the chick brain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 80: 6413-6417.

Layer P.G., (1996). Critique: Non-classical actions of cholinesterases: Role in cellular differentiation, tumorigenesis, and Alzheimer's disease. *Neurochem Int*, 28: 491-495.

Layer P.G., (1991). Cholinesterases during development of the avian nervous system. *Cell Mol Neurobiol*, 11:7-33

Layer P.G., Sporns O., (1987). Spatiotemporal relationship of embryonic cholinesterases with cell proliferation in chicken brain and eye. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 84: 284-288.

Layer P.G., Weikert T., Alber R. (1993). Cholinesterases regulate neurite outgrowth of chick nerve cells in vitro by means of a non-enzymatic mechanism. *Cell Tissue Res*, 273: 219-226.

Layer P.G., Willbold E. (1995). Novel functions of cholinesterases in development, physiology, and disease. *Prog Histochem Cytochem*, 29: 1-94.

Legierse K.C.H.M., (1998). “Differences in sensitivity of aquatic organisms to organophosphorus pesticides” Ph.D. thesis University of Utrecht, Utrecht, Netherlands.

Lemercier G., Carpentier H., Sentenac-Roumanou P., Morlis P., (1983). Histological and histochemical changes in the central nervous system of the rat poisoned by an irreversible anticholinesterase organophosphorus compound. *Acta Neuropathol*, 61: 123-129.

Levin H.S., Rodnitzky R.L., (1976). Behavioral effects of organophosphate in man. *Clin. Toxicol.*, 9 (3): 391–403.

Li Z.S., Young H.M., Furness J.B., (1994). “Nitric oxide synthase in neurons of the gastrointestinal tract of an avian species *Coturnix coturnix*”. *J Anat.*, 184:261-272.

Li S.N., Fan D.F., (1996). Correlation between biochemical parameters and susceptibility of freshwater fish to malathion. *J. Toxicol. Environ. Health*, 48: 413–418.

Li and Fan S.N., Fan D.F., (1997). Activity of esterases from different tissues of

freshwater fish and responses of their isoenzymes to inhibitors, *J. Toxicol. Environ. Health*, 51: 149–157

Liao C.Y., Fu J.J., Shi Jian-B., Zhou Qun-F., Yuan Chun-G., Jiang Gui-B., (2006). Methylmercury accumulation, histopathology effects, and cholinesterase activity alterations in medaka (*Oryzias latipes*) following sublethal exposure to methylmercury chloride. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 22: 225–233.

Lima S.C., Ribeiro-Carvalho A., Filgueiras C. C., Manhaães C. ., Meyer A., Abreu-Villac Y., (2009). Exposure to methamidophos at adulthood elicits depressive-like behavior in mice. *NeuroToxicology*, 30: 471–478.

Lintern M.C., Wetherell J.R., Smith M.E., (1998). Differential recovery of acetylcholinesterase in guinea pig muscle and brain regions after soman treatment. *Hum Exp Toxicol*, 17: 157-162.

Lionetto M.G., Caricato R., Giordano M.E., Pascariello M.F., Marinosci L., Schettino T., (2003). Integrated use of biomarkers (acetylcholinesterase and antioxidant enzymes activities) in *Mytilus galloprovincialis* and *Mullus barbatus* in an Italian coastal marine area. *Marine Pollut Bull*, 46: 324-330.

Liu N.H., Yu B.P., Gallardo K.A., Robertson R.T., (1990). Distribution of non-specific cholinesterase histochemical staining in the dorsal thalamus: A comparative study in rodents. *Brain Res*, 522: 315-321.

Livingstone D. R., Chipman J. K., Lowe D. M., Minier C., Mitchelmore C.L., Moore M.N., Peters L.D., Pipe R.K., (2000). Development of biomarkers to detect the effects of organic pollution on aquatic invertebrates: recent molecular, genotoxic, cellular and immunological studies on the common mussel (*Mytilus edulis* L.) and other mytilids. *Int. J. Environ. Pollut.*, 13 (1-6): 56-91.

Lotti M., (1992). The pathogenesis of organophosphate polyneuropathy. *Crit. Rev. Toxicol.*, 21: 465–487.

Ludke J.L., Hill E.F., Dieter M.P., (1975). Cholinesterase (ChE) response and related mortality among birds fed ChE inhibitors. *Arch Environ Contam Toxicol*, 3: 1-21.

Luppa H., Alabdalla Andra M., J., Weiss J., (1992). Histochemical investigations on the localization of acetylcholinesterase in the kidney of selected vertebrates, *Acta Histochem*, 92: 147–159.

Luttik R., Aldenberg T., (1997). Extrapolation factors for small samples of pesticide toxicity data: special focus on LD50 values for birds and mammals. *Env*

Toxicol Chem, 16: 1785-1788.

Machado M.R., Fanta E., (2003). Effects of the organophosphorous methyl parathion on the branchial epithelium of a freshwater fish *Metynnis roosevelti*, *Braz. Arch. Biol. Technol.*, **46** (3): 361–372.

Mack A, Robitzki A., (2000). The key role of butyrylcholinesterase during neurogenesis and neural disorders: an antisense-5'butyrylcholinesterase-DNA study. *Prog in Neurobiol*, 60 (6): 607-628.

Magee P.S., (1982). Structure-activity relationships in phosphoramidates. In: Coats, J.R., Editor, (1982). *Insecticide Mode of Action*, Academic Press, New York: 101–161.

Magnotti R.A., Zaino J.P., McConnell R.S., (1994). Pesticide-sensitive fish muscle cholinesterases, *Comp. Biochem. Phys., C* 108: 187–194.

Mahajna M., Quistad, G.B., Casida, J.E., (1997). Acephate insecticide toxicity: safety conferred by inhibition of the bioactivating carboxyamidase by the metabolite methamidophos. *Chem. Res. Toxicol.*, 10: 64–69.

Mahajna M., Casida J.E., (1998). Oxidative bioactivation of methamidophos insecticide: Synthesis of N-hydroxymethamidophos (a candidate metabolite) and its proposed alternative reactions involving N $\ddot{O}O$ rearrangement or fragmentation through a metaphosphate analogue. *Chem. Res.Toxicol.*, 11:26–34.

Main A.R., (1964). Affinity and phosphorylation constants for the inhibition of esterases by organophosphates. *Science* (Washington, D.C.), 144: 992-993.

Main A.R., Iverson F., (1966). Measurement of the affinity and phosphorylation constants governing irreversible inhibition of cholinesterase by di-isopropyl phosphorofluoridate. *Biochem. J.*, 100: 525--531.

Mason J.R., (1990). Evaluation of pulegone as an avian repellent. *Journal of Wildlife Management*, Vol 54: 130 - 135.

Mason J.R., Reidinger R.F., (1982). Observational learning of food aversions in redwinged blackbirds (*Agelaius phoeniceus*). *Auk*, Vol. 99: 548 - 554.

Mason J.R., Bullard R.W., Dolbeer .R.A., Woronecki P.P., (1989). Red-winged blackbirds (*Agelaius phoeniceus* L.) feeding response to oil and anthocyanin levels in sunflower meal. *Crop Protection*, Vol. 8, pp. 455 - 460.

Mason J.R., Turpin T., (1990). Cucurbitacin-adulterated diet is avoided by captive European starlings. *Journal of Wildlife Management*, Vol. 54, pp. 672 - 676.

Mason J.R., Neal J., Oliver J.E., Lusby W.R., (1991). Bird repellent properties of

secretions from nymphs of the azalea lace bug. *Ecological Applications*, Vol. 1: 73 - 77.

Mason C.F., Macdonald S.M., (2000). Influence of landscape and land-use on the distribution of breeding birds in farmland in eastern England. *J Zool Lond* 251: 339-348.

Mason J.R., Clark L., Miller T.P., (1993). Evaluation of a pelleted bait containing methyl anthranilate as a bird repellent. *Pesticide Science*, Vol. 39: 299 - 304.

Mason J.R., Bonwell W.R. (1993). "Evaluation of turpentine as a bird-repellent seed treatment." *Crop Protection*, Vol. 12: 453 - 457.

Massoulié J., Sussman J.L., Doctor B.P., Soreq H., Velan B., Cygler M., Rorundo R., Shafferman A., Silman I., Taylor P., (1992). Recommendations for nomenclature in cholinesterases. In: *Multidisciplinary Approaches to Cholinesterase Functions*, pp. 285-288. Eds. A. Shafferman and B. Velan. Plenum Press: New York.

Massoulié J., Anselmet A., Bon S., Krejci E., Legay C., Morel N., Simon S. (1999). The polymorphism of acetylcholinesterase: post-translational processing, quaternary associations and localization. *Chem Biol Interact*, 119-120: 29-42.

Massoulié J., Pezzementi L., Bon S., Krejci E., Valette F.M., (1993). Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Prog Neurobiol*, 41: 31-91.

Mastrota F.N., Mench J.A., (1995). Evaluation of taste repellents with northern bobwhites for deterring ingestion of granular pesticides. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 14: 631 - 638.

Maxwell D.M., (1992). Detoxication of organophosphorus compounds by carboxylesterase. In *Organophosphates: Chemistry, Fate and Effects* (Edited by Chambers J.E.

Mayer F.L., Jr., Ellersieck, M.R., (1986). *Manual of acute toxicity: interpretation and data base for 410 chemicals and 66 species of freshwater animals*. Resource Publication 160. U.S. Department of the Interior, Washington, DC.

Mayer F.L., Versteeg D.J., McKee M. J., Folmar L.C., Graney R.L., McCume D.C. Ratner B.A., (1992). Physiological and nonspecific biomarkers. In *Biomarkers; Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress* (R. J. Huggert, R. A. Kimerle, P. M. Mehrle and H. L. Bergman, eds): 5-85. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA.

McCarthy J.F., Shugart L.R. (1990). *Biomarkers of Environmental Contamination*, (Eds. J.F. McCarthy and L.R. Shugart). Lewis Publishers, Boca Raton, Ann Arbor, London, 457p.

McDaniel L.K., Moser C.V., (2004). Differential profiles of cholinesterase inhibition and neurobehavioral effects in rats exposed to fenamiphos or profenofos. *Neurotox and Teratol*, 26 (3): 407-415.

McEwen L.C., DeWeese L.R., Schlaweiler P., (1986). Bird predation on cutworms (Lepidoptera: Noctuidae) in wheat fields and chlorpyrifos effects on brain cholinesterase activity. *Environ. Entomol.*, 15: 147-51.

Mckay D., (1998). Fate models. In: Calow P, ed. *Handbook of Ecotoxicology*. Blackwell Science, Oxford: 812-831.

McKim J.M., Bradbury S.P., Neimi G.J., (1987). Fish acute toxicity syndromes and their use in the QSAR approach to hazard assessment. *Environ. Health Prespect.*, 71: 171–186.

McLoughlin N., Yin D., Maltby L., Wood R.M. and Yu H., (2000). Evaluation of sensitivity and specificity of two crustacean biochemical biomarkers. *Environ Toxicol Chem*, 19: 2085-2092.

Mearns J., Dunn J., Lees-Haley P.R., (1994). Psychological effects of organophosphate pesticides: A review and call for research by psychologists. *J. Clin. Psychol.*, 50: 286-294.

Meneguz A., Bisso G.M., Michalek H., (1989). Alterations in the distribution of cholinesterase molecular forms in maternal and fetal brain following diisopropyl fluorophosphate treatment of pregnant rats. *Neurochem Res*, 14 (3): 285-291.

Metcalf R.L., Sangha G.K., Kapoor I.P., (1971). Model ecosystem for the evaluation of pesticide biodegradability and ecological magnification. *Environ Sci Technol*.

Mesulam M.-M., Geula C., (1988). Nucleus basalis (Ch4) and cortical cholinergic innervation in the human brain: observations based on the distribution of acetylcholinesterase and choline acetyltransferase. *J. Comp. Neurol.*, 275: 216–240.

Mesulam M.M., Guillozet A., Shaw P., Levey A., Duysen E.G., Lockridge O., (2002). Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine. *Neurosci*, 110 (4): 627-639.

Meyer A., Seidler F.J., Aldridge J.E., Tate C.A., Cousins M.M., Slotkin T.A., (2004). Critical periods for chlorpyrifos-induced developmental neurotoxicity: alterations in adenylyl cyclase signaling in adult rat brain regions after gestational or neonatal exposure. *Environ Health Perspect*, 112: 295–301.

Mikhail T.H., Aggour N., Awadallah R., Boulos M.N., Karima E.A., El-

Dessoukey and A.I., (1979). Acute toxicity of organophosphorus and organochlorine insecticides in laboratory animals. *Z. Ernährungswiss*, 18: 258–268.

Mills S.H., Heath I.E., (1972). Anterior hypothalamic/preoptic lesions impair normal thermoregulation in house sparrows. *Comp. Biochem. Physiol.*, 43A: 125-129.

Mineau P. (2002). Estimating the probability of bird mortality from pesticide sprays on the basis of the field study record. *Env. Toxicol. Chem.*, 21: 1497-1506.

Mineau P., Jobin B., Baril A., (1994). A critique of the avian 5-day dietary test (LC50) as the basis of avian risk assessment. Technical Report Series. No. 215. Environment Canada, Canadian Wildlife Service, Ottawa. 23 pp.

Minton N., Murray V., (1988). A review of organophosphate poisoning. *Med. Toxicol.*, 3: 350–375.

Mirkin Bl., Singh S., (1976). Placental transfer of pharmacologically active molecules, In. “Perinatal pharmacology and therapeutics”, (Edited Ed, Mirkin Bl.), pp. 1-69, Academic Press, New York.

Miyamoto J., Kaneko H., Hutson D. H., Esser H.O., Gorbach S., Dorn, E., (1988). Factors involved in species differences in metabolism, in: *Pesticide Metabolism: Extrapolation from animals to man*, Blackwell Scientific Publications, Oxford: 3-26.

Moore M.N., (1990). Lysosomal cytochemistry in marine environmental monitoring. *Histochem. J.*, 22: 187-191.

Moore M.N., Kohler A., Lowe D.M., Simpson, M.G., (1994). An integrated approach to cellular biomarkers in fish. In: *Non-destructive biomarkers in vertebrates*, (Eds. M.C. Fossi, and C. Leonzio): 171-197. Lewis/CRC, Boca Raton.

Moore N.M., Allen J.I., (2003). *Environmental Prognostics: Biomarkers, Modelling and Explanatory Frameworks for the Harmful Effects of Chemical Pollutants*. STAP Workshop on “The use of Bioindicators, Biomarkers and Analytical Methods for the Analysis of POPs in Developing Countries”.

Moreby S.J. , Potts, G.R., (1985). Insecticides and the survival of gamebird chicks in 1984. *Game Conservancy Annual Review*, 16,47-49.

Moreira L.A., (1998). Efeitos comportamentais e histopatológicos do organofosforado Folidol 600 em *Oreochromis niloticus* L. (Cichlidae). Monografia, Pontificia Universidade Católica do Paraná, Curitiba.

Morgan M.J., Fancey L.L., Kiceniuk J.W., (1990). Response and recovery of brain acetylcholinesterase activity in Atlantic salmon (*Salmo salar*) exposed to fenitrothion. *Can. J. Fish Aquat. Sci.*, 47: 1652–1654.

Morris A.J., Wilson J. D., Whittingham M.J., Bradbury R.B., (2005). *Indirect effects of pesticides on breeding yellowhammer (Emberiza citrinella)*. The Royal Society for the Protection of Birds, RSPB, Department of Zoology, Edward Grey Institute of Field Ornithology. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 106: 1–16.

Moser V.C., (1995). Comparisons of the acute effects of cholinesterase inhibitors using a neurobehavioral screening battery in rats. *Neurotoxicol Teratol*, 17: 617–625.

Moser V.C., Padilla S., (1998). Age- and gender-related differences in the time course of behavioral and biochemical effects produced by oral chlorpyrifos in rats. *Toxicol Appl Pharmacol*, 149 (1): 107-119.

Moser V.C., (1999). Comparison of aldicarb and methamidophos neurotoxicity at different ages in the rat: Behavioral and biochemical parameters. *Toxicol Appl Pharmacol*, 157 (2), 94-106.

Moser V.C., (2000). Dose-response and time-course of neurobehavioral changes following oral chlorpyrifos in rats of different ages, *Neurotoxicolo. Teratol.*, 22: 713–723.

Mullanery K., Svensson L., Zetterstrom D., Grant P., (1999). Τα Πουλιά της Ελλάδας, της Κύπρου και της Ευρώπης. Εκδοση: Ελληνική Ορνιθολογική Εταιρεία.

Murphy SD., Lauwerys R.R., Cheever K.L., (1968). Comparative anticholinesterase action of organophosphorus insecticides in vertebrates. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 12: 22-35.

Nemcsok. J.Z., Rakonczay P.K., Asztalos B., Szabo A., (1990). Effects of methidathion on distribution of molecular forms of acetylcholinesterase in carp, as revealed by density gradient centrifugation. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 37: 140-144.

Newton I., (1995). The contribution of some recent research on birds to ecological understanding. *Journal of Animal Ecology*, 64: 675-696.

Niethammer K.R., Baskett T.S., (1983). Cholinesterase inhibition of birds inhabiting wheat fields treated with methyl parathion and toxaphene. *Arch. Environ. Contain.Toxicol.*, 12: 471-5.

Nimmo D.R., (1985). Pesticides. In: Rand GM, Petrocelli SR, eds. *Fundamentals of Aquatic Toxicology*. Hemisphere, New York: 49-65.

Nimmo D.R., McEwen L.C., (1999). Pesticides. In: Calow P, ed. *Handbook of Ecotoxicology*. Blackwell Science, Oxford, 1999: 619-667.

Norel X., Angrisani M., Labat C., Gorenne I., Rossi F., Brinks C., (1992). Achetylcholine (ACh) degradation in human bronchial preparations (HB): role of

achetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE). *Pharmacol Res*, 26:1.

O'Brien R.D., Yamamoto I., (1970). *Biochemical Toxicology of Insecticides*. Academic Press, New York, 218.

OECD, (1984). 205 - Avian Dietary Toxicity Test. In: *OECD Guidelines for Testing of Chemicals*, 4 April 1984. No. 205 Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

OECD, (1984). 204 - Fish, Prolonged Toxicity Test: 14-day Study. *Guideline for Testing of Chemicals*. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.

OECD, (1992). 203 - Fish, Acute Toxicity Test. *Guideline for Testing of Chemicals* 17.07.92. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.

OECD, (1996). Series on Testing and Assessment No. 5 *REPORT OF THE SETAC/OECD WORKSHOP ON AVIAN TOXICITY TESTING*. OECD/GD(96)166. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.

OECD, (2002). 223 – Avian Acute Oral Toxicity Test. *Draft guidelines for Testing of Chemicals*, October 2002. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.

OECD, (2003). *Draft Guideline for Testing of Chemicals, "Avian Repellency Test"*, draft new guideline, February 2003. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.

OECD, (2003). *Draft Guidance Document on Testing Avian Avoidance Behaviour (pen test)*, February 2003. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.

Ogutcu A., Suludere Z., Kalender Y., (2008). Dichlorvos-induced hepatotoxicity in rats and the protective effects of vitamins C and E. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 26: 355–361.

Okoyama S., Nakayama K., Kudo M., (1996). A possible role of transient AChE expression in the medial geniculate of developing rats. *NeuroReport*, 7: 1067-1071.

Parker M.L., Goldstein M.I., (2000). Differential Toxicities of Organophosphate and Carbamate Insecticides in the Nestling European Starling (*Sturnus vulgaris*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 39: 233–242.

Parrón T., Hernández F.A., Villanueva E., (1996). Increased risk of suicide with exposure to pesticides in an intensive agricultural area: a 12-year retrospective study, *Forensic Sci. Int.*, 79 (1): 53–63.

Pascual J.A., Hart A.D.M., Fryday S.L., (1999a). Incidence of lethal bird poisoning reduced by regurgitation of pesticide-treated food. *Environ Toxicol Chem*, 18: 247-253.

Pascual J.A., Fryday S.L., Hart A.D.M., (1999b). Effects of food restriction on food avoidance and risk of acute poisoning of captive feral pigeons from fonofos-treated seeds. *Arch Env Contam Toxicol*, 37: 115-124.

Pavlov D.D., Chuiko G.M., Gerasimov Y.V., Tonkopyi V.D., (1992). Feeding behaviour and brain acetylcholinesterase activity in bream (*Abramis brama* L.) as affected by DDVP, an organophosphorus insecticide. *Comput Biochem Physiol C*, 103: 563-568.

Payne J.F., Mathieu A., Melvin W., Fancey L.L., (1996). Acetylcholinesterase, an old biomarker with a new future? Field trials in association with two urban rivers and a paper mill in Newfoundland. *Marine Pollut Bull*, 32: 225-231.

Peakall D.B., (1985). Behavioral responses of birds to pesticides and other contaminants. *Residue Rev.*, 96: 45-77

Peakall D., (1992). Animal biomarkers as pollution indicators. London, UK: Chapman and Hall: 19-45.

Peakall D. B., Shugart L.R., (1992). Biomarkers: Research and Application in the Assessment of Environmental Health. Springer, Berlin, Germany.

Pelegriño J.R., Calore E.E., Saldiva P.H.N., Almeida V.F., Peres N.M., Vilela-de-Almeida L., (2006). Morphometric studies of specific brain regions of rats chronically intoxicated with the organophosphate methamidophos. *Ecotoxicol Environ Safe*, 64: 251-255.

Peña-Llopis S., Ferrando M.D., Peña J.B., (2003). Increased recovery of brain acetylcholinesterase activity in dichlorvos-intoxicated European eels *Anguilla anguilla* by bath treatment with *N*-acetylcysteine, *Dis. Aquat. Org.*, 55: 237-245.

Pesticide Management Education Program (PMEP), (2008). Methamidophos (Monitor) Chemical Profile 2008: 4/95.

Perocco P, Del Ciello C, Colacci A, et al., (1996). Cytotoxic activity and transformation of BALB/c 3T3 cells in vitro by the insecticide acephate. *Can Lett*, 106:147-53.

Petras J.M., (1984). Brain Pathology Induced by Organophosphate Poisoning with the Nerve Agent Soman. Medical Defense Bioscience Review, US Army Medical Research Institute of Chemical Defense, Aberdeen Proving Ground, MD: 407-414.

Petroianu G.A., Ewald V., Thyes C., Missler A., Maleck W.H., (2003). Intravenous pyruvic acid application in minipigs partially protects acetylcholine-esteratic but not butyrylcholine-esteratic activity in plasma from inhibition by paraoxon. *J Appl Toxicol*, 23:37-42.

Pezzementi L., Nickson H.C., Dunn R.C., Bradley, R. J., (1989). Molecular forms of acetylcholinesterase from the skeletal muscle of the ammocoete of the lamprey *Petromyzon marinus*. *Comp. Biochem. Physiol*, 92: 385-387.

Pezzementi L., Sutherland D., Sanders M., Soong W., Milner D., McClellan J.S., Sapp M., Coblenz W.B., Rulewicz G., Merritt S., (1998). Structure and Function of Cholinesterases and Related Proteins, Plenum Publishing Corporation, New York: 105-110.

Pope C.N., (1998), Pesticides. From: Encyclopedia of Toxicology. (Eds Wexler P.), Academic Press, New York, 494.

Pope C.N., (1999). Organophosphorus pesticides: Do they all have the same mechanism of toxicity?. *J Toxicol Environ Health*, Part B. Crit Rev 2: 161-181.

Pope C., Karanth S., Liu J., (2005). Pharmacology and toxicology of cholinesterase inhibitors: uses and misuses of a common mechanism of action. *Env Toxic Pharm*, 19:433.

Powley W., Edwards P., Thorbek P., Chapman P., (2007). Refining absorption in Existing Body Burden Models used to Assess Acute Risk to Birds and Mammals. SETAC Conference Poster WE102. Porto.

Price M.A., Radeleff R., Kunz S.E., Everett R.E., (1971). Toxicity of soil applications of Dursban to bobwhite quail. Texas Agricultural Experiment Station Program 3000. July 3.

Principato G.B., Rosi G., Biagioni M., Giovannini E., (1983). Kinetic Studies on the reaction mechanism of the propionylcholinesterase from *Hirudo medicinalis*. *Comp Biochem Physiol* 75C, 1:185-192.

Principato G.B., Rosi G., Bocchini V., Giovannini E., (1984). Propionylcholinesterase from *Helix pomatia* and acetylcholinesterase from *Asterias bispinosa*: a kinetic comparative study. *Comp Biochem Physiol* 77B, 1:221-219.

Quest J.A., Copley M.P., Hamernik K.L., Rinde E., Fisher B., Engler R., Burnam W.L., Fenner-Crisp P.A., (1990). Evaluation of the carcinogenic potential of pesticides. 2. Methidathion. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 12: 117-126.

Rand G.M., (1977). The effect of exposure to a subacute concentration of

parathion on the general locomotor behavior of the goldfish. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 18: 259–266.

Rands M.R.W., (1985). Pesticide use on cereals and the survival of Grey Partridge chicks: a field experiment. *J. Appl. Ecol.*, 22: 49-54.

Racke K.D., (1992). Degradation of organophosphorus insecticides in environmental matrices. In *Organophosphates: Chemistry, Fate, and Effects* (J. E. Chambers and E. P. Levi, Eds.): 47–77. Academic Press, Inc. California.

Rainwater T.R., Leopold V.A., Hooper M.J., Kendall R.J., (1995). Avian exposure to organophosphorus and carbamate pesticides on a coastal South Carolina golf course. *Environ Toxicol Chem*, 14: 2155-2161.

Reece W.O., (2004). *Duke's physiology of domestic animals*. Cornell University Press.

Raines K.W., Seidler F.J., Slotkin T.A., (2001). Alterations in serotonin transporter expression in brain regions of rats exposed neonatally to chlorpyrifos. *Dev Brain Res* 2001, 130:65–72.

Rattner B.A., Becker J.M., Nakatsugawa T., (1987). Enhancement of parathion toxicity to quail by heat and cold exposure, *Pestic. Biochem. Physiol.*, 27: 330.

Rengstorff R.H., (1994). Vision and ocular changes following accidental exposure to organophosphates. *J Appl Toxicol*, 14: 115–118.

Rexrode M., (1984). *Chlorpyrifos Registration Standard*. , US Environmental Protection Agency, Washington, DC.

Rhomberg L., (1993). Use of Biomarkers in Assessing Health and Environmental Impacts of Chemical Pollutants; Travis, C. C., Ed.; Plenum Press: New York,: 31-46.

Ricceri L., Markina N., Valanzano A., Fortuna S., Cometa M.F., Meneguz A., Calamandrei G., (2003). Developmental exposure to chlorpyrifos alters reactivity to environmental and social cues in adolescent mice. *Toxicol Appl Pharmacol*, 191 (3): 189-201.

Rice S.G., Nowak L., Duysen E.G., Lockridge O., Lahiri D.K., Reyes P.F., (2007). Neuropathological and immunochemical studies of brain parenchyma in acetylcholinesterase knockout mice: implications in Alzheimer's disease, *J. Alzheimers Dis.*, 11 (2007): 481–489.

Richardson R.J., Moore T.B., Kayyali U.S., Randall, J.C., (1993). Chlorpyrifos assessment of potential for delayed neurotoxicity by repeated dosing in adult hens with monitoring of brain acetylcholinesterase, brain and lymphocyte neurotoxic esterase.

Fund. Appl. Toxicol., 21 1: 85–96.

Richmond M.L., Henny C.J., DeWeese L.R., Bobal K.A., Floyd R.L., Shultz A.W. & Z., J.G., (1976). Effects of environmental contaminants on wildlife ecology: cooperative safety tests of selected chemicals on nontarget organisms, 1975-1977. US Fish and Wildlife Service, Berkeley, California: 29.

Richmond M.L., Henny C J., Floyd R.L., Mannan R.W., Finch D.M., DeWeese L.R., (1979). Effects of Sevin-4-Oil, Dimilin, and Orthene on forest birds in Northeastern Oregon. Research Paper PSW-148, Pacific Southwest Forest and Range Exp. Stn, Forest Service, US Department of Agriculture, Berkeley, California: 19.

Richmonds C.R., Dutta H.M., (1992). Effect of malathion on the brain acetylcholinesterase activity of bluegill sunfish *Lepomis macrochirus*, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 49: 431–435.

Riker D.K., (1978). Nocturnal locomotor activity of the white-throated sparrow (*Zonotrichia albicollis*): a latent circannual behavior related to central catecholamine metabolism. Doctoral dissertation, Cornell University, 1977. *Dis. Ahstr. Inter. Sci. Eng.*, 38: 3070.

Ritter L., Solomon K.R., Forget J., Sterneroff M., O’Leary C., (1995). An Assessment Report on: DDT-Aldrin- Dieldrin- Chlordane-Heptachlor-Hexachlorobenzene-Mirex-Toxaphene- Polychlorinated Biphenyls-Dioxins and Furans. International Programme on Chemical Safety (IPCS), Inter-Organization Programme for the Sound Management of Chemicals (IOMC), December, 1995.

Roberts R.J., (1989). *Fish Pathology* (second ed.), Braillière Tindall, London.

Robertson R.T. (1987) A morphogenetic role for transiently expressed acetylcholinesterase in developing thalamocortical systems? *Neurosci Lett*, 75: 259-264.

Robertson R.T., Mostamand F., (1988). Development of non-specific cholinesterase-containing neurons in the dorsal thalamus of the rat. *Dev Brain Res*, 41: 43-60.

Robertson R.T., Poon H.K., Mirrafati S.J., Yu J., (1989). Transient patterns of acetylcholinesterase activity in developing thalamus: A comparative study in rodents. *Dev Brain Res*, 48: 309–315.

Robertson R.T., Tijerina A.A., Gallivan M.E., (1985). Transient patterns of acetylcholinesterase activity in visual cortex of the rat: normal development and the effects of neonatal monocular enucleation. *Dev Brain Res*, 21: 203-214.

Robertson R.T., Yu B.P., Liu H.H., Kageyama G.H., (1991). Development of

cholinesterase histochemical staining in cerebellar cortex: Transient expression of nonspecific cholinesterase in Purkinje cells of the nodulus and uvula. *Exp Neurol*, 114: 330-342.

Robin A., (1989). The trout and salmon handbook.

Rocha E.S., Swanson K.L., Aracava Y., Goolsby J.E., Maelicke A., Albuquerque E.X., (1996). Paraoxon: Cholinesterase-independent stimulation of transmitter release and selective block of ligand-gated ion channels in cultured hippocampal neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 278:1175–1187.

Rodrigues E.de. L., Fanta E., (1998). Liver histopathology of the fish *Brachydanio rerio* after acute exposure to sublethal levels of the organophosphate Dimethoate 500, *Rev. Bras. Zool.*, 15 (2): 441–450.

Rodriguez-Fuentes G., Gold-Bouchot G., (2004). Characterization of cholinesterase activity from different tissues of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), *Mar. Environ. Res.*, 58: 505–509.

Roex E.W.M., (2000). Acute versus chronic toxicity of organic chemicals to the zebrafish, *Danio rerio*. Ph.D thesis Vrije Universiteit Amsterdam, Netherlands.

Roex W.M.E., Keijzers R., van Gestel Cornelis A.M., (2003). Acetylcholinesterase inhibition and increased food consumption rate in the zebrafish, *Danio rerio*, after chronic exposure to parathion . *Aquatic Toxicology*, Volume 64, Issue 4 , 10 September 2003: 451-460.

Romani R., Isani G., De Santis A., Giovannini E., Rosi G., (2005). Effects of chlorpyrifos on the catalytic efficiency and expression level of acetylcholinesterases in the bivalve mollusk *Scapharca inaequalvis*. *Environ Toxicol Chem*, 24: 2879–2886.

Rogers J.G., (1974). Responses of caged red-winged blackbirds to two types of repellents. *Journal of Wildlife Management*, Vol. 38: 418-423.

Roper T.J., (1999). Olfaction in birds. *Adv. Stud. Behav.*, 28: 247–332.

Rosenberry T.L., (1975). Acetylcholinesterase. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*. 43: 103–218.

Rosenstock L., Keifer M., Daniell W.E., McMonnell R., Claypoole K., For, (1991). The Pesticide Health Effects Study Group, Chronic central nervous system effects of acute organophosphate pesticide intoxication. *Lancet*, 338: 223–237.

Rothman T.P., Sherman D., Cochard P., Gershon M.D., (1986b). Development of the monoaminergic innervation of the avian gut: transient and permanent expression of phenotypic markers. *Dev Biol*, 116: 357-380.

Rotundo R.L., (1984). Purification and properties of the membranebound form of acetylcholinesterase from chicken brain. Evidence for two distinct polypeptide chains. *J. biol. Chem.*, 259, 13186-13194.

Rowell-Rahier M., Pasteels J.M., Alonsomejia A, Brower L.P., (1995). Relative unpalatability of leaf beetles with either biosynthesised or sequestered chemical defense. *Animal Behaviour*, Vol. 49: 709 - 714.

Russell J.H., Donald R.C. Jr., (1982) Response of the iguanid lizard *Anolis carolinensis* to four organophosphorus pesticides. *Environ Pollut*, 28: 45-52.

Saffrey M.J., Polak J.M., Burnstock G., (1982). Distribution of vasoactive intestinal polypeptide-, substance P-, enkephalin- and neurotensin-like immunoreactive nerves in the chicken gut during development. *Neurosci*, 7: 279-293.

Salama A.K.M., (1990). Toxicological studies on some insecticides. Pharmacokinetics, placental transfer, milk transfer, and metabolism studies of [¹⁴CH₃S]-methamidophos and/or [¹⁴C]-acephate in rat. Dissertation, Alexandria University, Faculty of Agriculture. Submitted to WHO by Bayer/Tomen.

Sancho E., Ferrando M.D., Gamon M., Andreu E., (1993). An approach to the diazinon toxicity in the European eel: Bioaccumulation studies. *Sci. Tot. Environ. Suppl.*, 461–468.

Sancho E., Ferrando M.D., Andreu E., (1997). Response and Recovery of Brain Acetylcholinesterase Activity in the European Eel, *Anguilla anguilla*, Exposed to Fenitrothion. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 38: 205–209.

SANCO, (2002). Guidance Document on Terrestrial Ecotoxicology under Council Directive 91/414/EEC. SANCO/10329/2002 rev 2 final.

Sánchez J.C., Fossi M.C., Focardi S., (1997). Serum “B” esterases as a nondestructive biomarker for monitoring the exposure of reptiles to organophosphorus insecticides. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 37: 45–52.

Sang Q., Young H.M., (1996). Chemical coding of neurons in the myenteric plexus and external muscle of the small and large intestine of the mouse. *Cell Tissue Res*, 284: 39-53.

Sasai Y., De Robertis E. M., 1997. Ectodermal patterning in vertebrate embryos. *Dev. Biol.*, 182: 5-20.

Sayim F., (2007). Dimethoate-induced biochemical and histopathological changes in the liver of rats. *Exp and Toxicol Pathol*, 59 (3-4): 237-243.

Schafer, E.W., (1972). The acute oral toxicity of 369 pesticidal, pharmaceutical

and other chemicals to wild birds. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 21: 315-330.

Schafer E.W., Brunton D.B., (1971). Chemicals as bird repellents: two promising agents. *Journal of Wildlife Management*, Vol. 35: 569 - 572.

Schafer E.W.Jr., Bowles W.A., Hurlbut J., (1983). The acute oral toxicity, repellency, and hazard potential of 998 chemicals to one or more species of wild and domestic birds. *Arch. Environ. Contain. Toxicol.*, 12: 355-82.

Schwaiger J., Bucher F., Ferling H., Kalbfus W., Negele R.D., (1992). A prolonged toxicity study on the effects of sublethal concentrations of bis(tri-n-butyltin)oxide (TBTO): histopathological and histochemical findings in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology*, Volume 23, Issue 1: 31-48.

Semm P., Demaine C., (1986). Neurophysiological properties of magnetic cells in the visual system of the pigeon, *J. Comp. Physiol.*, 159: 619–625.

Sericano J.L., Wade T.L., Jackson T. J., Brooks J.M., Tripp B.W., Farrington J.W., Mee L.D., Readman J.W., Villeneuve J. P., Goldberg E.D., (1995). Trace organic contamination in the American: An overview of the US National status and trends and the international “Mussel Watch” programs. *Mar. Pollut. Bull.*, 31: 4-12, 214-225.

Shahroukhi A., Ghasemi A., Poorabdolhossein F., Asgari A., Khoshbaten A., (2007). The effect of paraoxon on GABA uptake in rat cerebellar synaptosomes. *Med Sci Monit*, 13: 194–199.

Shaker N., Hassan G.A., El-Nouty F.D., Abo-Elezz Z., Abd-A1-lah G.A., (1988). In vivo chronic effect of dimethoate and deltamethrin on rabbits. *J Environ Sci Health Part B Pestic Food Contain Agric Wastes*, 23: 387-400.

Sharma Y., Bashir S., Irshad M., Nag T.C., Dogra T.D., (2005). Dimethoate-induced effects on antioxidant status of liver and brain of rats following subchronic exposure. *Toxicol*, 215: 173-181.

Sheets L.P., Hamilton B.F., Sangha G.K., Thyssen J.H., (1997). Subchronic neurotoxicity screening studies with six organophosphate insecticides: An assessment of behavior and morphology relative to cholinesterase inhibition. *Fundam Appl Toxicol*, 35: 101-119.

Sheets T.J., (1980). Agricultural pollutants. In: Guthrie FE, Perry JJ, eds. *Introduction to Environmental Toxicology*. Elsevier/North Holland, Amsterdam: 24-33.

Silva H.C., Medina H.S.G., Fanta E., Bacila M., (1993). Sub-lethal effects of the organophosphate Folidol 600 (methyl parathion) on *Callichthys callichthys* (Pisces: Teleostei), *Comp. Pharmacol. Toxicol.*, 105C (2): 197–201.

Simon T.P., (1999). Assessing the sustainability and biological integrity of water resources using fish communities. CRC Press, Boca Raton, Florida.

Simonich S.L., Hites R.A., (1995). Global distribution of organochlorine compounds. *Science*, 1995, 269: 1851-1854; Kutz DA, ed. Long-Range Transport of Pesticides. Lewis Publishers, Chelsea, MI, 1990.

Singh A.K., (1984). Improved analysis of acephate and methamidophos in biological samples by selective ion monitoring gas-chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr.* 301: 465–469.

Singh A.K., (1985). Kinetic analysis of inhibition of brain and red blood cell acetylcholinesterase and plasma cholinesterase by acephate and methamidophos. *Toxicol. Appl. Pharm.*, 81: 302–309.

Singh A.K., (1986). Kinetic analysis of acetylcholinesterase inhibition by combination of acephate and methamidophos. *Toxicology*, 42: 143–156.

Singh A.K., (1990). Molecular properties and inhibition kinetics of acetylcholinesterase obtained from rat brain and cockroach ganglion. *Toxicol. Ind. Health.*, 6: 551–570.

Singh A.K., Mishra U., Ashraf M., (1988). Inhibition of cholinesterase by acephate and methamidophos: evidence for the binding of acephate to a modulatory ‘allosteric’ site. *Med. Sci. Res.*, 16: 727–728.

Silver A., (1971). The significance of cholinesterase in the developing nervous system, *Prog. Brain Res.*, 34: 345–355.

Silver A., (1974). The biology of cholinesterases. In: Neuberger A, Tatum EL (eds), *Frontiers of Biology* vol. 36, North-Holland Publishing Company/American Elsevier Publishing Company Inc., Amsterdam/New York.

Singh A.K., White T., Spassova D., Jiang Y., (1998). Physicochemical, molecular-orbital and electronic properties of acephate and methamidophos. *Comp. Biochem. Physiol.*, 119C: 107–117.

Sisson S., Grossman J.D., Getty R., (1975). Sisson and Grossman's the Anatomy of the Domestic Animals. Ed. W. B. Saunders Co.

Slotkin T.A., Tate C.A., Ryde I.T., Levin E.D., Seidler F.J., (2006). Organophosphate insecticides target the serotonergic system in developing rat brain regions: disparate effects of diazinon and parathion at doses spanning the threshold for cholinesterase inhibition. *Environ Health Perspect*, 114: 1542–6.

Slotkin T.A., Seidler F.J., (2007). Comparative developmental neurotoxicity of

organophosphates in vivo: transcriptional responses of pathways for brain cell development, cell signaling, cytotoxicity and neurotransmitter systems. *Brain Res Bull*, 72: 232–74.

Small D.H., Michaelson S., Sberna G., (1996). Non-classical actions of cholinesterases: Role in cellular differentiation, tumorigenesis, and Alzheimer's disease. *Neurochem Int*. 28: 453-483.

Smith G.J., (1987). Pesticide Use and Toxicology in Relation to Wildlife: Organophosphorus and Carbamate Compounds. Resource Publication 170, US Department of the Interior, Fish and Wildlife Service.

Smith R.L., Caldwell J., (1977). Drug metabolism in non human primates, in: Drug Metabolism from Microbe to Man (Parke D.V. and Smith R.L. eds), Taylor and Francis, Ltd, London: 331- 356.

Smith G.J., (1987). Pesticide Use and Toxicology in Relation to Wildlife: Organophosphorus and Carbamate Compounds. Resource Publication 170, US Department of the Interior, Fish and Wildlife Service.

Sogorb A.M., Ganga R., Vilanova E., Soler F., (2007). Plasma phenylacetate and 1-naphthyl acetate hydrolyzing activities of wild birds as possible non-invasive biomarkers of exposure to organophosphorus and carbamate insecticides. *Toxicology Letters*, 168: 278–285

Soler-Rodriguez F., Miguez-Santiyan M.P., Reja-Sanchez A., Roncero-Cordero V., Garcia-Camero J.P., (1998). Recovery of brain acetylcholinesterase and plasma cholinesterase activities in quail (*Coturnix coturnix*) after chlorpyrifos administration and effect of pralidoxime treatment. *Environ Toxicol Chem*, 17: 1835.

Solé M., Lobera G., Aljinovic B., Ríos J., de la Parra L.M. García, Maynou F., Cartes J.E., (2008). Cholinesterases activities and lipid peroxidation levels in muscle from shelf and slope dwelling fish from the NW Mediterranean: Its potential use in pollution monitoring. *Science of the Total Environment*, 402: 306 – 317

Soli N.E., Karlsen R.L., Opsahl M., Fonnum F., (1980). Correlations between acetylcholinesterase activity in guinea-pig iris and pupillary function: a biochemical and pupillographic study. *J Neurochem*, 35:723–728.

Somers J.D., Barrett M.W., Khan A.A., (1991). Simulated field ingestion of carbofuran-contaminated feedstuffs by pheasants. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 47: 521–528.

Soreq H., Seidman S., Dreyfus P.A., Zevin-Sonkin D., Zakut H., (1989).

Expression and Tissue-specific Assembly of Human Butyrylcholine Esterase in Microinjected *Xenopus Zueuis* Oocytes. *J Biol Chem*, 264 18: 10608-10613.

Spasova D., White T., Singh K.A., (2000). Acute effects of acephate and methamidophos on acetylcholinesterase activity, endocrine system and amino acid concentrations in rats. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 126: 79–89.

Sprague G.L., Bickford A.A., (1981). Effect of multiple diisopropylfluorophosphate injections in hens: behavioral and histological investigation. *J. Toxicol. Environ. Health*, 8: 973–988.

Stanton M.E., Mundy W.R., Ward T., Dulchinos V., Barry C.C., (1994). Time dependent effects of acute chlorpyrifos administration spatial delayed alternation and cholinergic neurochemistry in weanling rats. *Neuro Toxicol*, 15: 201– 8.

Starr R.I., Besser J.F, Brunton R.B., (1964). A laboratory method for evaluating chemicals as bird repellents. *Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 12: 342 - 344.

Stemler F.W., Corcoran K.D., Parrish J.H., Hurt H.H., Tezak-Reid T.M., Kaminskis A., Jaeger J.J., (1990). Effects of physostigmine on the cardiopulmonary system of conscious pigs. *Fundam Appl Toxicol*, 14:96–103.

Sterri S.H., Berge G., Fonnum F., (1986). Esterase activity and soman toxicity in developing rat. *Acta Pharmac. Toxic.*, 51: 136-140.

Stoate C., Borrhalho R., Araújo M., (2000). Factors affecting corn bunting *Miliaria calandra* abundance in a Portuguese agricultural landscape. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 77: 219–226.

Stone W.B., (1979). Poisoning of wild birds by organophosphate and carbamate pesticides. *N. Y. Fish and Game J.*, 26: 37-47.

Stone W.B., (1980). Bird deaths caused by pesticides used on turfgrass. N.Y. State Turfgrass Conf. Proc., 4: 58-64.

Stone W.B., Knoch H., (1982). American brant killed on golf courses by diazinon. *N. Y. Fish and Game J.*, 29: 95-6.

Stone W.B., Gradoni P.B., (1985). Recent poisonings of wild birds by diazinon and carbofuran. *Northeastern Environ. Sci.*, 4: 160-4.

Stone W.B., Gradoni P.B., (1987). Poisoning of birds by cholinesterase inhibitor pesticides. New York State Department of Environmental Conservation, Delmar, New York: 16.

Storm E.J., Rozman K.K., Doull J., (2000). Occupational exposure limits for 30 organophosphate pesticides based on inhibition of red blood cell acetylcholinesterase.

Toxicology, 150: 1–29.

Straus L.D., Chambers E.J., (1995). Inhibition of acetylcholinesterase and aliesterases of fingerling channel catfish by chlorpyrifos, parathion, and S,S,S-tributyl phosphorotrithioate (DEF). *Aquatic Toxicology*, 33: 311-324.

Sturm A., de Assis H.C. da S., Hansen P.-D., (1999). Cholinesterases of marine teleost fish: enzymological characterization and potential use in the monitoring of neurotoxic contamination. *Marine Environmental Research*, 47: 389-398.

Sturm A., Wogram J., Segner H., Liess M., (2000). Different sensitivity to organophosphates of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase from three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*): application in biomonitoring, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19 :1607–1615.

Sultatos L.G., (1994). Mammalian toxicology of organophosphorus pesticides. *J. Toxicol. Environ. Health*, 43: 271-289.

Sultatos G.L., (2005). *Encyclopedia of Toxicology*: 52-54.

Sun M., Lee C.J., Shin H.-S., (2007). Reduced nicotinic receptor function in sympathetic ganglia is responsible for the hypothermia in the acetylcholinesterase knockout mouse. *J. Physiol.*, 578: 751–764.

Sundler F., Alumets J., Fahrenkrug J., HEkanson R., Schaffalitzky de Muckadell O.B., (1979). Cellular localization and ontogeny of immunoreactive vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in chicken gut. *Cell Tissue Res*, 196:193-201.

Szabo A., Nemcsok J., Asztalos B., Rakonczay Z., Kasa P., Hieu L.H., (1992). The effect of pesticides on carp (*Cyprinus carpio* L.)-acetylcholinesterase and its biochemical characterization, *Ecotoxicol. Environ. Safety*, 23: 39–45.

Szeto, S.Y., Yee, J., Brown, M.J., Oloffs, P.C., (1982). Simplified method for determining acephate and methamidophos residues in several substrates. *J. Chromat.*, 240: 525-531.

Tago H., Maeda T., McGeer P.L., Kimura H., (1992). Butyrylcholinesterase-rich neurons in rat brain demonstrated by a sensitive histochemical method. *J. Comp. Neurol.*, 325: 301–312.

Talesa V., Contenti S., Mangiabene C., Pascolini R., Rosi G., Principato G.B., (1990). Propionylcholinesterases from *Murex brandaris*: comparison with other invertebrate cholinesterases. *Comp. Biochem. Physiol.* 96C, No. 1: 39-43.

Tank, S.L., Brewer, L.W., Hooper, M.J., Cobb, G.P., Kendall R.J., (1993). Survival and pesticide exposure of northern bobwhites (*Colinus virginianus*) and eastern

cottontails (*Sylvilagus floridanus*) on agricultural fields treated with Counter® 15G. *Environ. Toxicol. Chem.*, **12**: 2113–2120

Taylor G.S., Bywater R.A.R., (1988). Intrinsic control of the gut. *Bail Clin Gastroenterol*, 2:1–22.

Taylor P., (2001). Anticholinesterase agents. In: J.G. Hardman, L.E. Limbird and A.G. Gilman, Editors, Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics (10th ed.) McGraw Hill, New York: 175–191.

Testman R., (2000). Determination of the volatility of ¹⁴C-methamidophos from rat skin. Unpublished report No. BC9245 from Bayer AG, dated 8 August 2000.

Thompson H.M., (1991). Serum “B” esterases as indicators of exposure to pesticides. In: Mineau, P. (Ed.), Cholinesterase-Inhibiting Insecticides. Elsevier Science Publishers, Amsterdam.

Thompson R.D., Grant C.V., Elias D.J., (1981). Factors affecting red-winged blackbird response to methiocarb, an avian repellent. *Pesticide Biochemistry and Physiology*: Vol. 15: 166 - 171.

Thompson H. M., Walker C. H., Hardy A.R., (1988a). Avian esterases as indicators of exposure to insecticides: The factor of diurnal variation. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 41: 4-11.

Thompson H.M., Walker C.H., Hardy A.R., (1991). Changes in activity of avian serum esterases following exposure to organophosphorus insecticides. *Arch Environ Contam Toxicol*, 20: 514-518.

Thompson H.M., Walker C.H., (1993). Serum “B” esterases as indicators of exposure to pesticides. In Proc. Int. Workshop on Nondestructive Biomarkers in Vertebrates: 35-60. Lewis, Boca Raton, FL.

Thompson H.M., Walker C.H., (1994). Blood esterases as indicators of exposure to organophosphorus and carbamate insecticides. In: Fossi MC, Leonzio C (ed) Nondestructive Biomarkers in Vertebrates, Lewis Publishers, Boca Raton, FL, 37-62.

Thompson H.M., Langton S.D., Hart A.D.M., (1995). Prediction of inter-species differences in the toxicity of organophosphorus pesticides to wildlife-a biochemical approach. *Camp. Biorhem. Physiol. Vol. II IC*, No. I: I-I 2.

Tortora G.I., Anagnostakos N.P., (1987). Principles of Anatomy and Physiology. 5th Ed, Harper and Row, New York.

Travlos G.S., Morris R.W., Elwell M.R., Duke A., Rosenblum S., Thompson M.B., (1996). Frequency and relationship of clinical chemistry and liver and kidney

histopathology findings in 13-week toxicity studies in rats. *Toxicology*, 107: 17–29.

Tucker B.V., (1976). Characterization of 14C in tissues and milk from goats fed S-methyl-14C-Orthene or S-methyl-14C-Ortho 9006. Chevron Chemical Company, USA. Report No. M9363.

Tucker B.V., (1976b). Conversion of acephate to monitor by rats, Chevron Chemical Company, Richmond, California, Report.

Tucker R.K., Haegele M.A., (1971). Comparative acute oral toxicity of pesticides to six species of birds. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 20: 57-65.

Tucker G.M., Dixon J., (1997). Agricultural and grassland habitats: 267-325. In Tucker G.M., Evans M.I., Eds. (1997) *Habitats for Birds in Europe: A Conservation Strategy for the Wider Environment*. BirdLife International, Cambridge (UK). (BirdLife Conservation Series No. 6).

Tucker and Heath, 1994. *Birds in Europe: their conservation status*. Cambridge, UK: Birdlife International.

Toutant J.P., Massoulie' J., Bon S., (1985). Polymorphism of pseudocholinesterase in *Torpedo marmorata* tissues: comparative study of the catalytic and molecular properties of this enzyme with acetylcholinesterase. *J. Neurochem.*, 44: 580-592.

US EPA, (1981). Office of Pesticide Programs. Hazard Evaluation Evaluation Division. Pesticide Incident Monitoring System—Summary Reports 1978–81. US Environmental Protection Agency, Washington, DC.

US EPA, Undated. EFED response to comments submitted to the Methamidophos Docket during the 60-day comment period on the EFED Methamidophos RED chapter. Available for downloading at <http://www.epa.gov/oppsrrd1/op/methamidophos.htm>.

U.S. EPA, (1988). *Pesticide Fact Handbook*, Vol. 1 and 2. Noyes Data Corporation. Park Ridge, NJ.

US EPA, (1996). United States Environmental Protection Agency Ecological Effects Guidelines, OPPTS 850.2100, Avian acute oral toxicity test, dated April 1996.

UNEP, (1991). Assessment of the State of Pollution of the Mediterranean Sea by Organophosphorus Compounds. MAP Technical Report Series No. 58. United Nations Environment Programme.

Van der Wel H., Welling W., (1989). Inhibition of acetylcholinesterase in guppies (*Poecilia reticulata*) by chlorpyrifos at sublethal concentrations: methodological aspects. *Ecotoxicol Environ Saf*, 17:205-215.

Van Dolah R.F., Maier P.P., Fulton M.H., Scott G.I., (1997). Comparison of azinphosmethyl toxicity to juvenile red drum (*Sciaenops ocellatus*) and the mummichog (*Fundulus heteroclitus*), *Environ. Toxicol. Chem.*, 16: 1488–1493.

Van Straalen NM., (2003). Ecotoxicology becomes stress ecology. *Environ Sci Technol.*, 37: 325A-330A.

Valbonesi P., Sartor G., Fabbri E., (2003). Characterization of cholinesterase activity in three bivalves inhabiting the North Adriatic sea and their possible use as sentinel organisms for biosurveillance programmes. *Sci Total Environ*, 312:79–88.

Varó I., Navarro J.C., Amat F., Guilhermino L., (2003). Effect of dichlorvos on cholinesterase activity of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*), *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 75: 61-72.

Varó I., Navarro J.C., Amat F., Nunes B., Guilhermino L., (2007). Effects of dichlorvos aquaculture treatments on selected biomarkers of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) fingerlings, *Aquaculture*, 266: 87–96.

Varó I., Amat F., Navarro J.C., (2008). Acute toxicity of dichlorvos to *Aphanius iberus* (Cuvier & Valenciennes, 1846) and its anti-cholinesterase effects on this species. *Aquatic Toxicology*, Volume 88, Issue 1, 2 June 2008: 53-61.

Venkateswara R.J., Surya P.Y., Madhavendra S.S., (2003). Toxic effects of chlorpyrifos on morphology and acetylcholinesterase activity in the earthworm, *Eisenia foetida*. *Ecotox and Envir Saf*, 54: 296-301.

Verma R.S., Mehta A., Srivastava N., (2007). In vitro chlorpyrifos-induced oxidative stress: attenuation by antioxidant vitamins, *Pest. Biochem. Physiol.*, 88: 191–196.

Vinten A.J.A., Howard R.S., Redman M.H., (1991). Measurement of nitrate leaching losses from arable plots under different nitrogen input regimes. *Soil Use Magmt.*, 7: 3-14.

Vyas N.B., Kuenzel W.J., Hill E.F., (1995). Sauer, J.R. Acephate affects migratory orientation of the white-throated sparrow (*Zonotrichia leucophrys*). *Environ. Toxicol. Chem.*, 14: 1961-1965;1995.

Vyas B.N., Kuenzel J.W., Hill F.E., Romo A.G., Komaragiri V.S.M., (1996). Regional Cholinesterase Activity in White-Throated Sparrow Brain is Differentially Affected by Acephate (Orthene). *Camp. Biochem. Physiol. Vol. 113C*, No. 3: 381-386

Walcott C., Gould J., Kirschvink J., (1979). Pigeons have magnets, *Science*, 205: 1027–1029.

Walcott C., Gould J., Lednor A., (1988). Homing of magnetized and demagnetized pigeons. *J. Exp. Biol.*, 134: 27–41.

Walker C.H., (1983). Pesticides and birds-mechanisms of selective toxicity. *Agric. Ecosystems Envir.*, 9: 211-226.

Walker C.H., (1995). Biochemical biomarkers in ecotoxicology-Some recent developments. *Sci. Tot. Environ.*, 171:189–195.

Walker C.H., Thompson H.M., (1991). Phylogenetic distribution of cholinesterases and related esterases. In: Mineau P (ed) Cholinesterase-inhibiting insecticides, their impact on wildlife and the environment. New York: Elsevier: 1-17.

Walker C.H., Hopkin S.P., Sibly R.M., Peakall D.B., (1996). Principles of ecotoxicology. 73 pp.

Walker C.H., Hopkin S.P., Sibly R.M., Peakall D.B., (1997). Principles of Ecotoxicology. Taylor and Francis, London.

Wall H.G., Jaax N.K., Hayward I.J., (1987). Brain Lesions in Rhesus Monkeys after Acute Soman Intoxication. Medical Defense Bioscience Review, US Army Medical Research Institute of Chemical Defense, Aberdeen Proving Ground, MD, 155-162.

Wallace K.B., Dargan J. E., (1987). Intrinsic metabolic clearance of parathion and paraoxon by liver from fish and rodents. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 90: 235–242.

Wallace K.B., Herzberg U., (1988). Reactivation and aging of phosphorylated brain acetylcholinesterase from fish and rodents. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 92: 307–314.

Wania F., Mackay D., (1996). Tracking the distribution of persistent organic pollutants. *Environ Sci Technol*, 1996, 390A-396A.

Ware G.W., (1989). The Pesticide Book (third ed ed.), Thomson Publications, Fresno, CA.

Water Framework Directive, (2000). DIRECTIVE 2000/60/EC OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 23 October 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy.

WHO, (1993). Methamidophos Health and Safety Guide No. 79. World Health Organization, Geneva.

Wilson W.B., (1998). Cholinesterase inhibition. In: P. Wexler, Editor, Encyclopedia of Toxicology vol. 1, Academic Press, San Diego, CA, pp. 326–340.

Wilson W.B., (1999). Clinical enzymology. In: W.F. Loeb and F.W. Quimby,

Editors, *The Clinical Chemistry of Laboratory Animals*, Taylor and Francis, Philadelphia, PA, pp. 399–454.

Wilson W.B., (2005). Cholinesterase Inhibition. *Encyclopedia of Toxicology*, 588-599.

Worek F., Koller M., Thiermenn H., Szinicz L., (2005). Diagnostic aspects of organophosphate poisoning. *Toxicology*, 214: 182–189.

Wright C.I., Geula C., Mesulam M.M., (1993a). Neuroglial cholinesterases in the normal brain and in Alzheimer's disease: relationship to plaques, tangles, and patterns of selective vulnerability. *Ann Neurol*, 34: 373-384.

Wright C.I., Geula C., Mesulam M.M., (1993b). Protease inhibitors and indoleamines selectively inhibit cholinesterases in the histopathologic structures of Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 683-686.

Yamamoto K., Shimizu M., Ohtani H., Hayashi M., Sawada Y., Iga T., (1996). Toxicodynamic analysis of cardiac effects induced by four cholinesterase inhibitors in rats. *J Pharm Pharmacol*, 48:935–939.

Yassine M., Bacou F., Alami-Durante H., (1991). Biochemical characteristics of cholinesterases from Bar tissues. In: *Cholinesterases: Structure, Function, Mechanism, Genetics and Cell Biology*, p. 47. Eds. J. Massoulie', F. Bacou, E. A. Barnard, A. Chatonnet, B. P. Doctor and D. M. Quinn. American Chemical Society: Washington D.C.

Yehia A.H.M., El-Banna G.S., Okab B.A., (2007). Diazinon toxicity affects histophysiological and biochemical parameters in rabbits. *Exp and Toxicol Pathol*, 59 (3-4): 215-225.

Zakut H., Lapidot-Lipson Y., Beers R., Sindell L., Ginzberg D., Soreq H., (1991). Chorionic villus cDNA library displays expression of butyrylcholinesterase: putative genetic disposition for ecological danger. *Prenatal Diagnosis*, 11: 597-607.

Zayed S.M.A.D., Fakhr I.M.I., El-Magraby S., (1984). Some toxicological aspects of methamidophos exposure in mice. *J. Environ. Sci. Health B*, 19(4&5): 467–478.

Zinkl J.G., Henny C.J., DeWeese L.R., (1977). Brain cholinesterase activities of birds from forests sprayed with trichlorfon (Dylox) and carbaryl (Sevin-4-oil). *Bull Environm Contam Toxicol*, 17: 379-386.

Zinkl J.G., Roberts R.B., Shea P.J., Lasmanis J., (1981). Toxicity of acephate and methamidophos to Dark-eyed Juncos. *Arch. Environ. Contain. Toxicol.*, 10: 185-92.

Zinkl J.G., Mack P.D., Mount M.E., (1984). Brain cholinesterase activity and

brain and liver residues in wild birds of a forest sprayed with Acephate, *Environ. Toxicol.Chem.*, 3: 79-88.

Zinkl J.G., Lockhart W.L., Kenny S.A., Ward F.J. (1991). The effects of cholinesterase inhibiting insecticides on fish. In: Mineau, P. (Ed.), *Cholinesterase-Inhibiting Insecticides. Their Impact on Wildlife and the Environment. Chemicals in Agriculture*. Elsevier 2:233-254 Amsterdam, Netherlands.

Αράπης Γ., (1998). Σημειώσεις γεωργικής οικοτοξικολογίας. Γ.Π.Α.

Βαλαβανίδης Αθ., (1999). Βασικές Αρχές Περιβαλλοντικής Χημείας, Οικοτοξικολογίας και Εκτίμησης Οικολογικού Κινδύνου. Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Ζιώγας Β.Ν., Μάρκογλου Α.Ν., (2007), Γεωργική Φαρμακολογία, Βιοχημεία, Φυσιολογία, Μηχανισμοί Δράσης και Χρήσεις των Φυτοπροστατευτικών Προϊόντων, Αθήνα: σελ. 36-39, 303-306, 324, 338-339.

Καρανδεινός Γ.Μ, (1995). Στοιχεία οικολογίας: 7-23.

Καρανδεινού Α., (2000). Βιοδείκτες – Βιομετρητές – Οικολογικοί Δείκτες, Εργαστηριακές σημειώσεις Οικολογίας και Περιβάλλοντος, Μιχάλης Καρανδεινός και Συνεργάτες: 90-95.

Κουϊμτζής Θ., Σαμαράς Κ., Σκλαβούνος Σ., Αλμπάνης Τ., Βουτσά Δ., Ζαχαριάδης Γ., (1993). Αναλυτικοί προσδιορισμοί και χαρακτηρισμός της ποιότητας των επιφανειακών νερών – Περίπτωση Αλιάκμονα. Συνολική έκθεση πεπραγμένων ερευνητικού έργου του Εργαστηρίου Ελέγχου Ρύπανσης Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, Θεσσαλονίκη.

Κουϊμτζής Θ., Φυτιάνος Κ., Σαμαρά Κ., (2002). Ρύπανση του Περιβάλλοντος. Θεσσαλονίκη.

Λαζαρίδου-Δημητριάδου Μ., (1992). Γενική Ζωολογία.. Εκδ. Οικ. Γιαχούδη-Γιαπούλη Ο.Ε.

Μάγρας Ι.Ν., (1996). Ανατομική των Κατοικίδιων Πτηνών. Εκδ. Οικ. Αφοι Κυριακίδη.

Μάγρας Ι.Ν., Αντωνόπουλος Ι.Κ., (2004). Ανατομική των αγροτικών ζώων. Εκδ. Οικ. Αφοι Κυριακίδη, Θεσσαλονίκη.

Μιχαήλ Σ.Γ., (1996). Ιστολογία. Εκδ Οικ Αφοι Κυριακίδη, Θεσσαλονίκη.

Μιχαήλ Σ.Γ., (1997). Συγκριτική ανατομική των κατοικίδιων θηλαστικών. Εκδ. Αφοι Κυριακίδη, Θεσσαλονίκη.

Μπαλάσκας Χ., Μενεγάτος ΙΝ., (2008). Έγχρωμος άτλας ανατομικής των

παραγωγικών ζώων. Εκδ Οικ Σαβάλλα, Αθήνα.

Νεοφύτου Ν.Χ., (1997). ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑ.

Σκούλλος Μ., (1987). Χημική Ωκεανογραφία. Β' Μέρος: Θαλάσσια Ρύπανση.

Σμοκοβίτης Α., (1999). Φυσιολογία. Εκδ Οικ Αφοι Κυριακίδη, Θεσσαλονίκη.

Πελεκάσης Κ., (1984). Μαθήματα Γεωργικής Εντομολογίας, β' τόμος Ειδική Εντομολογία: 57-59.

Τρακατέλλης Αν., (1984). Βιοχημεία. Εκδ. Οίκος Αφοί Κυριακίδη, Θεσσαλονίκη.

Φυτιάνος Κ., (2003). Η Ρύπανση των Θαλασσών. Β' εκδ. University Studio Press, Θεσσαλονίκη.

Δ1, www.ornithologiki.gr

Δ2, www.rspb.org.uk

Δ3, <http://www.mani.org.gr/panida/ortiki/ort.htm>

Δ4, <http://www.alfa-omega.gr/article.asp?AID=1601>

Δ5, www.minagric.gr

Δ6, <http://www.bvl.bund.de/pflanzenschutz/Monitoring.htm>

Δ7, <http://www.nea-acropoli-larisas.gr/arthra/2009-08-31-13-13-22/203-2009-09-18-14-52-09>

Δ8, <http://academic.emporia.edu/sievertl/verstruc/Pbrain.htm>

Δ9, <http://academic.emporia.edu/sievertl/verstruc/troutven.JPG>

Δ10, http://www.google.gr/images?hl=el&rls=com.microsoft:el:IE-ContextMenu&rlz=1I7GPEA_elGR292&q=fish+anatomy,+photo&um=1&ie=UTF-8&source=univ&ei=Q_gITaLDJ8ez8QOK5dT4Dw&sa=X&oi=image_result_group&ct=title&resnum=1&ved=0CCMQsAQwAA&biw=1026&bih=567

Δ11, http://www.google.gr/images?um=1&hl=el&rls=com.microsoft%3Ael%3AIE-ContextMenu&rlz=1I7GPEA_elGR292&biw=1026&bih=567&tbs=isch%3A1&sa=1&q=acetylcholinesterase%2C+photo&aq=f&aqi=&aql=&oq=&gs_rfai=

Δ12, www.bayercropscience.gr

Δ13, http://www.wtamu.edu/~rmatlack/pigeon_dissection/body_cavity.jpg

Δ14, www.ornithologiki.gr

Δ15, www.birdlife.org

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

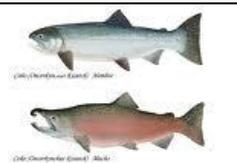
Είδη που αναφέρονται στη μελέτη

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΗ ΟΝΟΜΑΣΙΑ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΚΟΙΝΗ ΟΝΟΜΑΣΙΑ	ΑΓΓΛΙΚΗ ΚΟΙΝΗ ΟΝΟΜΑΣΙΑ	ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΑ†
ΠΤΗΝΑ			
<i>Agelaius phoeniceus</i>	Κοκκινο-φτερωτός κότσυφας	Red-winged blackbird	
<i>Alauda arvensis</i>	Σταρήθρα	Eurasian Skylark	
<i>Anus Americana</i>	-	American Widgeon or Baldpate	
<i>Branta canadensis</i>	Καναδέζικη χήνα	Canada Goose	
<i>Calamospiza melanocorys</i>	-	Lark Bunting	
<i>Calcarius mccownii</i>	-	McCown's longspurs	
<i>Calcarius ornatus</i>	-	Chestnut-collared Longspur	
<i>Carduelis cannabina</i>	Κοκκινόσπιζες	Linnets	

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΗ ΟΝΟΜΑΣΙΑ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΚΟΙΝΗ ΟΝΟΜΑΣΙΑ	ΑΓΓΛΙΚΗ ΚΟΙΝΗ ΟΝΟΜΑΣΙΑ	ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΑ†
<i>Carduelis carduelis</i>	Καρδερίνες	Greenfinches	
<i>Carduelis tristis</i>	Φανέτο	American goldfinche	
<i>Centrocercus urophasianus</i>	Αγριόγαλος	Sage grouse	
<i>Columba livia</i>	Περιστέρι	Feral pigeons	
<i>Columba palumbus</i>	Φάσσα	Wood Pigeon	
<i>Eremophila alpestris</i>	Χιονάδα	Shore Lark, Horned larks	
<i>Erithacus rubecula</i>	Κοκκινολαίμη	European Robin	
<i>Falco sparverius</i>	Αμερικανικό κερκινέζι	American kestrel	
<i>Galerida cristata</i>	Κατσουλέρης	Crested lark	
<i>Larus atricilla</i>	Αζτεκόγλαρο	Laughing Gull	

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΗ ΟΝΟΜΑΣΙΑ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΚΟΙΝΗ ΟΝΟΜΑΣΙΑ	ΑΓΓΛΙΚΗ ΚΟΙΝΗ ΟΝΟΜΑΣΙΑ	ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΑ†
<i>Melospiza melodia</i>	Μελωδικό σπουργιτοσίχλονο	Song sparrow	
<i>Motacilla flava</i>	Κιτρινοσουσουράδα	Yellow wagtail	
<i>Passer domesticus</i>	Σπιτοσπουργίτης	House sparrow	
<i>Passerculus sandwichensis</i>	Κοινό σπουργιτοσίχλονο	Savannah sparrow	
<i>Phasianus colchicus</i>	Φασιανός	Common Pheasant, ring-necked pheasants	
<i>Quiscalus quiscula</i>	-	Common grackles	
<i>Sturnella neglecta</i>	-	Western Meadowlark	
<i>Sturnus vulgaris</i>	Ευρωπαϊκό Ψαρόνι	European starling	
<i>Sylvia melanocephala</i>	Μαυροτσιροβάκος	Sardinian Warbler	

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΗ ΟΝΟΜΑΣΙΑ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΚΟΙΝΗ ΟΝΟΜΑΣΙΑ	ΑΓΓΛΙΚΗ ΚΟΙΝΗ ΟΝΟΜΑΣΙΑ	ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΑ†
<i>Taeniopygia guttata</i>	-	Zebra finche	
<i>Turdus migratorius</i>	Αμερικανικών κοκκινολαίμηδων	American Robin	
<i>Zonotrichia albicollis</i>	Λευκόλαιμο σπουργιτοσίχλονο	White-throated sparrow	
ΘΗΛΑΣΤΙΚΑ			
<i>Macaca mulatta</i>	Μακάκας	Bandar Rhesus Macaque	
ΙΧΘΥΣ			
<i>Anguilla anguilla</i>	Ευρωπαϊκό χέλι	European eel	
<i>Apareiodon affinis</i>	-	Darter characine	
<i>Aphanius iberus</i>	-	Spanish toothcarp	
<i>Brachydanio rerio</i>	-	Zebrafish	
<i>Carassius auratus</i>	Χρυσόψαρο	Goldfish	
<i>Corydoras paleatus</i>	-	Peppered cory	

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΗ ΟΝΟΜΑΣΙΑ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΚΟΙΝΗ ΟΝΟΜΑΣΙΑ	ΑΓΓΛΙΚΗ ΚΟΙΝΗ ΟΝΟΜΑΣΙΑ	ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΑ†
<i>Cyprinus carpio</i>	Κοπρίνος	Common carp	
<i>Dicentrarchus labrax</i>	Λαβράκι	European seabass	
<i>Fundulus heteroclitus</i>	-	Mummichog	
<i>Gasterosteus aculeatus</i>	-	Stickleback	
<i>Ictalurus punctatus</i>	Γατόψαρο	Channel catfish	
<i>Lagodon rhomboides</i>	-	Pinfish	
<i>Leiostomus xanthurus</i>	-	Spot	
<i>Melanotaenia duboulayi</i>	-	Crimson spot rainbowfish	
<i>Menidia beryllina</i>	-	Inland silverside	
<i>Micromesistius poutassou</i>	-	Blue whiting Classe	
<i>Oncorhynchus kisutch</i>	-	Coho salmon	
<i>Oreochromis niloticus</i>	-	Nile tilapia	

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΗ ΟΝΟΜΑΣΙΑ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΚΟΙΝΗ ΟΝΟΜΑΣΙΑ	ΑΓΓΛΙΚΗ ΚΟΙΝΗ ΟΝΟΜΑΣΙΑ	ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΑ†
<i>Orizias latipes</i>	-	Medaka and Japanese killifish	
<i>Phycis blennoides</i>	-	-	
<i>Pimephales promelas</i>	-	Fathead minnow	
<i>Poecilia reticulata</i>	-	Guppy	
<i>Rhamdia quelen</i>	-	Bagre	
<i>Salmo salar</i>	Ατλαντικός σολομός	Atlantic Salmon	
<i>Salvelinus fontinalis</i>	Πέστροφα	Brook Trout	
<i>Sciaenops ocellatus</i>	-	Red Drum	
<i>Sparus aurata</i>	Τσιπούρα	Gilthead seabream	
ΕΠΙΕΤΑ			
<i>Gallotia galloti</i>	-	Tenerife Lizard or Western Canaries Lizard	

† Όλες οι φωτογραφίες είναι προϊόν αναζήτησης από το διαδίκτυο με λέξεις κλειδιά το επιστημονικό όνομα, photo.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ

Αποτελέσματα υπολειμμάτων σιτηρεσίου ορτυκιών σε δοκιμή υποξείας (διατροφικής) τοξικότητας

Προσδιορισμός υπολειμμάτων methamidophos σε ανιχνευτές αζώτου-φωσφόρου

Κωδικός δείγματος	Ονομαστική συγκέντρωση (ppm)	Τιμή δείγματος	Καθορισμένη συγκέντρωση (ppm)	Τιμή καθορισμένης συγκέντρωσης	Μετρηθείσα συγκέντρωση (ppm)	Ανάκτηση (%)
MS20AO (day 0)	20	481200	1,5	587500	12,3	61,43
MS20BO (day 0)	20	457200	1,5	587500	11,7	58,35
MS20A5 (day 5)	20	459490	1,5	587500	11,7	58,37
MS20B5 (day 5)	20	412480	1,0	401490	10,3	51,37
MS39,4A (day 0)	39,4	1033930	2	901550	22,9	58,22
MS39,4B (day 0)	39,4	1153830	2	901550	25,6	64,97
MS77,5A (day 0)	77,5	2098350	3	1405480	44,8	57,79
MS77,5B (day 0)	77,5	2119050	3	1405480	45,2	58,36
MS152,4 A (day 0)	152,4	26284420	10	26366570	99,7	65,41
MS152,4 B (day 0)	152,4	17749250	10	26366570	67,3	44,17
MS300A O (day 0)	300	13991000	5	11088000	126,2	42,06
MS300B O (day 0)	300	13393000	5	11088000	120,8	40,26
MS300A5 (day 5)	300	12478000	5	10345000	120,6	40,21
MS300B5 (day 5)	300	12165000	5	10345000	117,6	39,2

Φόρτιση methamidophos σε ανιχνευτές αζώτου-φωσφόρου

Κωδικός δείγματος	Ονομαστική συγκέντρωση (ng)	Τιμή δείγματος	Τιμή καθορισμένης συγκέντρωσης	Ανάκτηση (%)
Stmet 25b	2,5 (50%)		1562981	
Stmet 5	5 (100%)		3155980	
QC1		1171432		37,47
QC2		1362686		43,59
QC3		1785134		57,11
QC4		1556956		49,81
QC5		1657385		53,02

ΜΟ ανάκτησης QC = $48,2 \pm 7,77$. Συντελεστής ανάκτησης x 2.

Κωδικός δείγματος	Ονομαστική συγκέντρωση (ng)	Τιμή δείγματος	Τιμή καθορισμένης συγκέντρωσης	Ανάκτηση (%)
Stmet 1	1 (50%)		431820	
Stmet 2	2 (100%)		891550	
QC1		531728		61,57
QC2		475698		55,08
QC3		425534		49,27
QC4		539742		62,50
QC5		338532		39,20

ΜΟ ανάκτησης QC = $53,52 \pm 9,63$. Συντελεστής ανάκτησης x 2.

Τελικό ποσοστό ανάκτησης υπολειμμάτων methamidophos σε σιτηρέσιο ορτυκίων

Κωδικός δείγματος	Methamidophos ονομαστική συγκέντρωση (mg/kg τροφής)	ΜΟ Ανάκτησης μεθόδου (%) \pm SD	Συντελεστής ανάκτησης μεθόδου	Methamidophos (%) συγκέντρωση της ονομαστικής
MS20AO (day 0, 5)	20	57,46 \pm 4,29	2,0	114,91
MS39,4A (day 0)	39,4	61,59 \pm 4,77	2,0	123,18
MS77,5A (day 0)	77,5	58,08 \pm 0,4	2,0	116,16
MS152,4 A (day 0)	152,4	54,79 \pm 15,0	2,0	109,58
MS300A O (day 0, 5)	300	40,43 \pm 1,19	2,0	80,86

Οι μετρήσεις ομοιογένειας και της σταθερότητας, στην ανάλυση της διατροφής του σιτηρέσιου έδωσαν 114,91, 123,18, 116,16, 109,58 και 80,86%, αντίστοιχα των ονομαστικών συγκεντρώσεων methamidophos και ως εκ τούτου είναι μέσα στα όρια που απαιτούνται (\pm 20% των ονομαστικών τιμών).

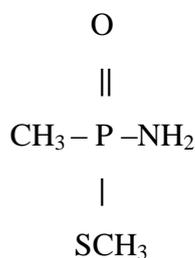
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ

Φυσικοχημικές ιδιότητες, τύχη και συμπεριφορά στο περιβάλλον και έγκριση κυκλοφορίας στην Ελλάδα της δραστικής ουσίας methamidophos

Ομάδα στην οποία ανήκει: Οργανοφωσφορικά

Χημική ονομασία: 0,5-Dimethylphosphora-midothioate

Συντακτικός τύπος:



Φυσικοχημικές ιδιότητες

Μοριακός τύπος: C₂H₈NO₂PS

Μοριακή μάζα: 141,1 g/mol

logPow: -0,8

Διαλυτότητα στο νερό: >200 g/l (στους 20⁰C)

Τύχη στο περιβάλλον

Κατανομή στο έδαφος και τα υπόγεια ύδατα: Στα αερόβια εδάφη, ο χρόνος ημιζωής έχει ως εξής, 1,9 ημέρες στη λάσπη, 4,8 ημέρες στο εύφορο έδαφος, 6,1 ημέρες στην άμμο και 10-12 ημέρες σε αμμοπηλώδη.

Κατανομή στα επιφανειακά ύδατα: Ο χρόνος ημιζωής της χημικής ουσίας στο νερό είναι 309 ημέρες σε pH5.0, 27 ημέρες σε pH7.0 και 3 ημέρες σε pH9.0. Η χημική ουσία θα καταρρεύσει με την παρουσία ηλιακού φωτός και έχει χρόνο ημιζωής 90 ημέρες σε νερό με pH5.0, όταν υπάρχει το φως του ηλίου.

Κατανομή σε βλάστηση: Το methamidophos προσλαμβάνεται μέσω των ριζών και των φύλλων. Σε μελέτες methamidophos με φυτά τομάτας, στον καρπό είχε χρόνο ημιζωής 4,8-5,1 ημέρες ενώ στα φύλλα 5,5-5,9 ημέρες.

(Πηγή: pesticide manual, software)

Έγκριση κυκλοφορίας στην Ελλάδα

Αυτή τη στιγμή δεν κυκλοφορεί στην Ελλάδα. Η προηγούμενη έγκρισή του περιελάμβανε την κάτωθι ετικέτα:

Διαθέσιμες Συσκευασίες	Φιάλη	200	κ.εκ.	(ανά	40)
	Φιάλη	500	κ.εκ.	(ανά	20)
	Φιάλη 1 λτ. (ανά 10)				

Καλλιέργεια	Εχθροί / Στόχοι	Δοσολογία	Χρόνος & ρόπος Εφαρμογής	Τελευταία επέμβαση πριν τη συγκομιδή (ημέρες)
Βαμβάκι	Αφίδες (Aphis gossypii) Αευρώδης (Bemissia tabaci) Πράσινο σκουλήκι (Heliothis armigera) Τετράνυχοι (Tetranychus urticae) Θρίπας (Thrips tabaci) Προντένια (Prodenia litura) Λάφυγμα (Laphygma exigua) Αιγυπτιακό σκουλήκι (Spodoptera litoralis)	250 κ.εκ./στρέμμα		21
Καλαμπόκι	Πράσινο σκουλήκι (Heliothis armigera) Πυραλίδα (Ostrinia nubilalis) Αφίδες (Aphis gossypii) Σποντόπτερα (Spodoptera exigua).	165 κ.εκ./100 λίτρα νερό		60

Καλλωπιστικά	Αφίδες (Aphis sp.) Τετράνυχοι (Tetranychus urticae) Θρίπας (Thrips tabaci) Αλ υρώδης (Trialeurodes vaporariorum)	75-100 κ.εκ./100 λίτρα νερό		
Καπνός	Αφίδες (Myzus persicae) Θρίπας (Thrips tabaci) Αγρότιδες ή Καραφατμέ (Agrotis segetum) Προντένια (Pro enia litura) Πράσινο σκουλήκι (Heliothis armigera) Λάφυγμα (Laphygma exigua).	75-100 κ.εκ./στρέ μμα		21
Λαχανικά (Κουνουπίδι)	Αφίδες (Myzus persicae) Θρίπες, Τετράνυχοι (Tetranychus urticae, T.turkestanti) Αγρότιδες ή Καραφατμέ (Agrotis segetum) Προν ένια (Prodenia litura) Πιερίδα (Pieris brassicae) Σκουλήκι (Heliothis armigera) Λάφυγμα (Laphygma exigua).	100 κ.εκ./100 λίτρα νερό. Με 60 λίτρα νερό/στρέ μμα.		21
Λαχανικά (Λάχανο)	Αφίδες (Myzus persicae) Θρίπες Τετράνυχοι (Tetranychus urticae, T.turkestanti) Αγρότιδες ή Καραφατμέ (Agrotis segetum) Προντένια (Prodenia litura) Πιερίδα (Pieris brassicae) Πράσ νο σκουλήκι (Heliothis armigera) Λάφυγμα (Laphygma exigua).	100 κ.εκ./100 λίτρα νερό. Με 50 λίτρα νερό/στρέ μμα		21
Λαχανικά	Αφίδες (Myzus persicae)	120		21

(Μαρούλι)	Θρίπες, Τετράνυχοι (Tetranychus urticae, T.turkestanii) Αγρότιδες ή Καραφατεμέ (Agrotis segetum) Προντένια (Prodenia litura) Περίδα (Pieris brassicae) Πράσινο Σκουλήκι (Heliothis armigera) Λάφυγμα (Laphygma exigua).	κ.εκ./100 λίτρα νερό.		
Λαχανικά (Τομάτα- Μελιτζάνα)	Αφίδες (Myzus persicae) Θρίπες Τετράνυχοι (Tetranychus urticae, T.turkestanii) Αγρότιδες ή Καραφατεμέ (Agrotis segetum) Προντένια Περίδα Πράσινο σκουλήκι Λάφυγμα	65-100 κ.εκ./100 λίτρα νερό		21
Λαχανικά (Φασόλια με λοβό)	Αφίδες (Myzus persicae) Θρίπες, Τετράνυχοι (Tetranychus urticae, T.turkestanii) Αγρότιδες ή Καραφατεμέ (Agrotis segetum) Προντένια (Prodenia litura) Περίδα (Pieris brassicae) Πράσινο Σκουλήκι (Heliothis armigera) Λάφυγμα (Laphygma exigua).	150 κ.εκ./στρέ μμα.		21
Μηλοειδή (Μηλιά- Αχλαδιά)	Καρπόκαψα (Cydia spp.) Γεωμέτρης (Geometris spp.) Οπλοκάμπη (Hoplocampa spp.) Ψύλλα (Psylla pyri), Τετράνυχοι (Tetranychus sp., Panonychus ulmi), Αφίδες (Aphis sp.)	100-135 κ.εκ./100 λτ νερό		56

Πατάτα	Αφίδες (Myzus persicae) Δορυφόρος (Leptinotarsa decemlineata) Φθοριμαία (Phthorimaea operculella) Προντένια (Prodenia litura) Αλτης (Chaetochnema tibialis)	105 κ.εκ./στρέ μμα		21
Πυρηνόκαρπα (Ροδακινιά, Νεκταρινιά)	Πράσινη αφίδα (Myzus persicae) Τετράνυχοι (Tetranychus sp.)	85-100 κ.εκ./100 λίτρα νερό		56

Μέγιστος αριθμός εφαρμογών καλλιεργητική περίοδο Μηλοειδή 2, Πυρηνόκαρπα 2, Τομάτα & Μελιτζάνα 3, αναλάχανο & Κουνουπίδι 2, Μαρούλι & Φασόλια με λοβό 3, Αραβόσιτος 2, Πατάτες 3, Βαμβάκι 2, Καπνός 2, Καλλωπιστικά 3.

Συνδυαστικότητα Συνδυάζεται με Antracol & Baycor. Δεν συνδυάζεται με το Euragen και αλκαλικά σκευάσματα.

Φυτοτοξικότητα Ορισμένες ποικιλίες καλλωπιστικών φυτών όπως Χρυσάνθεμα, Πελαργόνια, Πρίμουλα, Αλεξανδρινό ή Ποϊνσέτια, Τραδεσκάντια, Senecio sp., αρουσιάζουν ευαισθησία γι αυτό πρέπει να δοκιμάζονται σε μικρή κλίμακα πριν την εφαρμογή.

Σημάνσεις επικινδυνότητας για το χρήστη και περιβάλλον Πολύ τοξικό (T+). Επικίνδυνο για το περιβάλλον (N). Τοξικό όταν εισπνέεται. Πολύ τοξικό σε περίπτωση τοκατάποσης. Πολύ τοξικό σε επαφή με το δέρμα. Πολύ τοξικό για τους υδρόβιους οργανισμούς. Πολύ τοξικό για τις μέλισσες.

(Πηγή: <http://www.agrotypos.gr>)