

Djelovanje tonske stimulacije na imunohematopoezu intoksiciranih miševa

Mrdjen-Hožić, Rafaela

Master's thesis / Diplomski rad

2003

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:172325>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-16**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

RAFAELA MRDJEVIĆ

DIPLOMSKI RAD

ZAGREB, 2003.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

RAFAELA MRDJEN

**Djelovanje tonske stimulacije na
imunohematopoezu intoksiciranih miševa**

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2003.

Prečetao
D. Sprinčan
16.04.03

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

DJELOVANJE TONSKE STIMULACIJE NA IMUNOHEMATOPOEZU INTOKSICIRANIH MIŠEVA

RAFAELA MRDJEN

Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu
Rooseveltove trg 6

Sažetak: Istražili smo utjecaj ritmične tonske stimulacije na promjene tjelesne težine i promatranih hematoloških parametara miševa soja BALB/c intoksiciranih hematotoksičnim otrovom lindanom. S obzirom na vrstu tretmana formirane se četiri grupe pokusnih životinja: kontrola, otrov, zvuk i zvuk+otrov. Miševi u grupama zvuk i zvuk+otrov su tijekom trajanja pokusa u periodu od 19-7 sati bili izloženi ritmičnoj tonskoj stimulaciji od 152 otkucaja u minuti uz standardiziranu frekvenciju od 440 Hz. Miševi u grupama otrov i zvuk+otrov tretirane su subletalnom dozom (LD_{50}) lindana u periodu od 30 dana primajući 1/10 doze svaka 3 dana. Lindan se pokazao kao značajan negativan stresor koji je kod mužjaka utjecao na statistički značajan gubitak tjelesne težine ($p=0,0378^*$, $p<0,05$).

Uočene su značajne razlike glede djelovanja ritmične tonske stimulacije s obzirom na spol. Djelovanje tretmana zvukom na promatrane parametre imunološkog sustava iskazuje se kod mužjaka kao donekle pozitivan stresor; dok kod ženki ima učinak negativnog, ali statistički neznačajnog stresora. Kod mužjaka tretman zvukom djeluje kao jaki pozitivan stresor na tjelesnu težinu uz statističku značajnost ($p=0,0404^*$, $p<0,05$) u smjeru povećanja težine. Primjene kombiniranog tretmana zvukom i otrovom kod mužjaka pokazuje statističku značajnost u dobivanju na težini ($p=0,0023^{**}$, $p<0,01$), broju leukocita ($p=0,0031^{**}$, $p<0,01$) i limfocita ($p=0,0070^{**}$, $p<0,01$) u odnosu na tretman lindanom. To ukazuje na pozitivan učinak ritmične tonske stimulacije na imunohematopoezu ubrzavajući oporavak narušenog imunološkog sustava mužjaka. Proizlazi da su mužjaci BALB/c miševa ukupno senzibilniji od ženki na djelovanje kako pozitivnih tako i negativnih stresora.

(54 str., 19 slika, 33 tablice, 30 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Ključne riječi: BALB/c miševi, zvuk, tonska stimulacija, imunohematopoeza, lindan,

Rad je pohranjen:

Voditelj rada: prof. dr. sc. Oskar Springer

Ocjenjivači:

Rad je prihvaćen dana:

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

DJELOVANJE TONSKE STIMULACIJE NA IMUNOHEMATOPOEZU INTOKSICIRANIH MIŠEVA

RAFAELA MRDJEN

Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu
Rooseveltove trg 6

Sažetak: Istražili smo utjecaj ritmične tonske stimulacije na promjene tjelesne težine i promatranih hematoloških parametara miševa soja BALB/c intoksiciranih hematotoksičnim otrovom lindanom. S obzirom na vrstu tretmana formirane se četiri grupe pokusnih životinja: kontrola, otrov, zvuk i zvuk+otrov. Miševi u grupama zvuk i zvuk+otrov su tijekom trajanja pokusa u periodu od 19-7 sati bili izloženi ritmičnoj tonskoj stimulaciji od 152 otkucaja u minuti uz standardiziranu frekvenciju od 440 Hz. Miševi u grupama otrov i zvuk+otrov tretirane su subletalnom dozom (LD_{50}) lindana u periodu od 30 dana primajući 1/10 doze svaka 3 dana. Lindan se pokazao kao značajan negativan stresor koji je kod mužjaka utjecao na statistički značajan gubitak tjelesne težine ($p=0,0378^*$, $p<0,05$).

Uočene su značajne razlike glede djelovanja ritmične tonske stimulacije s obzirom na spol. Djelovanje tretmana zvukom na promatrane parametre imunološkog sustava iskazuje se kod mužjaka kao donekle pozitivan stresor; dok kod ženki ima učinak negativnog, ali statistički neznačajnog stresora. Kod mužjaka tretman zvukom djeluje kao jaki pozitivan stresor na tjelesnu težinu uz statističku značajnost ($p=0,0404^*$, $p<0,05$) u smjeru povećanja težine. Primjene kombiniranog tretmana zvukom i otrovom kod mužjaka pokazuje statističku značajnost u dobivanju na težini ($p=0,0023^{**}$, $p<0,01$), broju leukocita ($p=0,0031^{**}$, $p<0,01$) i limfocita ($p=0,0070^{**}$, $p<0,01$) u odnosu na tretman lindanom. To ukazuje na pozitivan učinak ritmične tonske stimulacije na imunohematopoezu ubrzavajući oporavak narušenog imunološkog sustava mužjaka. Proizlazi da su mužjaci BALB/c miševa ukupno senzibilniji od ženki na djelovanje kako pozitivnih tako i negativnih stresora.

(54 str., 19 slika, 33 tablice, 30 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Ključne riječi: BALB/c miševi, zvuk, tonska stimulacija, imunohematopoeza, lindan,

Rad je pohranjen:

Voditelj rada: prof. dr. sc. Oskar Springer

Ocjenjivači:

Rad je prihvaćen dana:

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation thesis

EFFECT OF TONAL STIMULATION ON IMMUNOHEMATOPOESIS OF THE INTOXICATED MICE

RAFAELA MRDJEN

University of Zagreb, Faculty of Science
Rooseveltova trg 6

Summary: We have investigated the effect of rhythmic tonal stimulation on changes of body weight and observed hematological parameters of BALB/c mice intoxicated with hematotoxic poison lindan. Based on the type of treatment four groups of animals were formed: Control, Poison, Sound and Sound+Poison. Mice in groups Sound and Sound+poison during the experimental period from 7p.m. – 7.a.m. were exposed to rhythmic tonal stimulation of 152 beats per minute with standardized frequency of 440 Hz. Mice in groups Poison and Sound+Poison have been treated with sublethal dose (LD50) of lindan during the period of 30 days receiving 1/10 of dose every 3 days. Lindan was proven to be significantly negative stressor, as in the males it has influenced the statistically significant body weight loss ($p=0,0378^*$, $p<0,05$).

Significant differences between sexes regarding the influence of the rhythmic tonal stimulation have been observed. Impact of the Sound treatment on the observed parameters pertaining to immune system expresses in males as somewhat positive stressor, while in females it has the effect of negative stressor, although statistically insignificant. In males Sound treatment acts as a strong positive stressor on increase of the body weight with statistical significance ($p=0,0404^*$, $p<0,05$). Combined treatment Sound+Poison in males shows the statistical significance of the increase in body weight ($p=0,0023^{**}$, $p<0,01$), number of leukocytes ($p=0,0031^{**}$, $p<0,01$) and lymphocytes ($p=0,0070^{**}$, $p<0,01$) comparing to the treatment with lindan only. That indicates the positive effects of rhythmic tonal stimulation on immuno-hematopoiesis in speeding up the process of recovery of the disrupted immune system in males. Generally, it may be concluded that males of the BALB/c mice are more sensitive than females on influence of both positive and negative stressors.

(54 pages, 19 Figures, 33 Tables, 30 References, original in Croatian)

Keywords: BALB/c mice, sound, tonal stimulation, immuno-hematopoiesis, lindan,

Thesis is deposited:

Supervisor: prof. dr. sc. Oskar Springer

Reviewers:

Thesis is accepted:

Ovaj diplomski rad izrađen je na Zavodu za animalnu fiziologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu pod vodstvom prof. dr. sc. Oskara Springera.

- Najiskrenije zahvaljujem prof. dr. sc. Oskaru Springeru što mi je omogućio izradu ovog diplomskog rada te razumijevanju i podršci u provedbi rada.
- Iskreno zahvaljujem i djelatnicima Zavoda za animalnu fiziologiju koji su mi svojom nesebičnom pomoći i susretljivošću pomogli pri provedbi ovog rada. Posebno zahvaljujem Gogi, koja je uvijek bila spremna pomoći i čija su vrata uvijek bila otvorena. Hvala Ninu i Mariji bez kojih bi izvedba ovog pokusa bila puno napornija i dugotrajnija.
- Zahvaljujem se Zavodu za ekologiju Škole narodnog zdravlja "Andrija Štampar" koji su mi izašli u susret pri posudbi bukomjera
- Zahvalu dugujem i prof. dr. sc. Mariji Pecina za svesrdnu pomoć pri statističkoj obradi podataka.

Rafaela Mrdjen

SADRŽAJ

1. UVOD	
1.1. Psihoneuroimunologija	1
1.2. Muzikoterapija	3
1.3. Lindan	4
1.4. Hematologija miša	5
1.4.1. Krvne stanice	5
1.4.2. Diferencijalna krvna slika	7
2. OBRAZLOŽENJE TEME	9
3. MATERIJALI I METODE	10
3.1. Pokusne životinje	10
3.1.1. Nomenklatura BALB/c	10
3.1.2. Podaci o soju	10
3.1.3. Obilježavanje pokusnih životinja	11
3.2. Oprema i tehnička pomagala	12
3.2.1. Metronom	12
3.2.2. Temeljni sklop za provedbu pokusa	12
3.3. Plan pokusa	13
3.4. Određivanje tjelesne težine	14
3.5. Uzimanje uzorka krvi	14
3.6. Laboratorijske analize	15
3.6.1. Broj eritrocita i leukocita	15
3.6.2. Diferencijalna krvna slika	17
a- Priprema krvnog razmaza	
b- Bojenje krvnog razmaza ,	
c- Pregled krvnog razmaza	

4. REZULTATI	18
4.1. Statistička obrada podataka	18
4.2. Tjelesna težina pokusnih životinja	18
4.3. Hematološke odrednice pokusnih životinja	26
4.3.1. Eritrociti	26
4.3.2. Leukociti	31
4.3.3. Diferencijalna krvna slika – neutrofili	36
4.3.4. Diferencijalna krvna slika – limfociti	41
5. RASPRAVA	46
6. ZAKLJUČCI	51
7. LITERATURA	52

1. UVOD

1.1. Psihoneuroimunologija

"Psihoneuroimunologija", je po definiciji Ronalda Glasera (5, 6), jednog od prvih istraživača u ovom području, "područje koje se bavi proučavanjem interakcija između centralnog živčanog sustava, endokrinog i imunološkog sustava; te utjecajem ponašanja/stresa na ova međudjelovanja te njihov utjecaj na zdravlje". Ovaj naziv je prvi put upotrijebio Robert Ader, 1974. godine (1). Prvi je pokusima pokazao kako mozak može utjecati na imunološki sustav.

U njegovom klasičnom pokusu uvjetovanja, Ader je združio uvjetovan stimulans (otopinu saharina) s neuvjetovanim stimulansom, lijek zvan Cytotaxan za koji se zna da smanjuje broj T-limfocita u štakora. Kada je imunološki sustav kompromitiran padom broja T-limfocita, ono je objašnjeno kao imunosupresija, te stoga slijedom navedenog, Cytotaxan može biti klasificiran kao neuvjetovani stimulans za imunosupresiju. Nakon nekoliko sparivanja, štakorima je dana otopina saharina (US) ili bez Cytotaxana (NS), te se u krvnom uzorku odredio broj T-limfocita. Rezultat je pokazao pad broja T-limfocita ukazujući na imunosupresiju. Daljnja istraživanja pokazala su kako je već sama percepcija stresora bila dovoljna za promijene u imunološkom sustavu. Obzirom da je ovo istraživanje bilo učinjeno na štakorima, primjena otkrića na ljudima zahtjeva veliki oprez (1).

Dva su glavna puta koji povezuju mozak i imunološki sustav: autonomni živčani sustav koji se sastoji od simpatičke i parasimpatičke komponente, te hipotalamično-hipofizno-adrenalne osi (30). Ovi sustavi su međusobno povezani kemijskim neuroprijenosnicima koje otpuštaju živčane stanice, endokrini organi i imunološke stanice. Živčani sustav djeluje na imunološki sustav direktno i indirektno. Direktno djelovanje se odvija preko uspostavljanja sinapsi živčanih stanica sa bijelim krvnim stanicama u limfnom tkivu, dok se indirektni postiže preko krvlju nošenih neuroprijenosnika i hormona, koji aktiviraju receptore na površini bijelih krvnih stanica (2). Također, utvrđeno je kako imunološki sustav djeluje na živčani sustav putem citokina koje otpuštaju imunološke stanice. Imunološki odgovor se mijenja sukladno stimulaciji ili inhibiciji hipotalamusa (i promijeni u razini neuroprijenosnika) i obrnuto, pokazujući visoki postotak međusobne komunikacije.

Limfociti, makrofazi i granulociti su ključne stanice koje su uključene u imunološkom odgovoru, a imaju receptore za neuroprijenosnike oslobođene iz živčanih vlakna koja stvaraju sinapse u limfoidnim tkivima. Hipotalamus je glavni preobličivač informacije od živčanog sustava u imunološki sustav. Ne samo da su neuronski signali mozga pretvoreni u "izaslaničke molekule" kako bi mogle regulirati tijelo, već imunološki sustav može komunicirati direktno s hipotalamusom putem molekula zvanih imunoprijenosnici. Postoje dvosmjerni krugovi između središnjeg živčanog sustava i imunološkog sustava. Naime, aktivacija imunološkog sustava rezultira u povećanoj mjeri stvaranja neuronskog ATP-a u ventromedijalnoj jezgri hipotalamusa pri najvećoj proizvodnji antitijela. Imunološki sustav je sastavljen od limfoidnog tkiva, a činjenica da su ova tkiva inervirana sa simpatičkim živčanim vlaknima dodatno podržava teoriju da središnji živčani sustav može direktno utjecati na imunološki sustav. Ne samo da živčana vlakna formiraju neuroefektorne spojeve s limfocitima i makrofazima (presudne komponente imunog sustava, bijele krvne stanice), već određeni neuroprijenosnici koje luče ovi živci mogu utjecati na daleke limfocite i makrofage, koji imaju receptore za te neuroprijenosnike. Primjer jednog takvog neuroprijenosnika je noradrenalin, koji se veže na β (beta) adrenergične receptore na limfocitima.

Nema sumnje u postojanje direktne živčane komunikacije između simpatičkih živaca i stanica imunološkog sustava. Kako je prije navedeno, hipotalamično-hipofizno-nadbubrežna okosnica (HPA) je središnja veza između središnjeg živčanog i imunološkog sustava. Povećana ekspresija kortikotropin-oslobađajućeg hormona (CRH) preko hipotalamusa rezultira formiranjem adrenokortikotropnog hormona (ACTH), koji potom signalizira nadbubrežnoj kori da poveća razinu glukokortikoidnog hormona, koji zatim regulira dijelove imunološkog odgovora (5).

1.2. Muzikoterapija

Glazba, univerzalan jezik s mnogo namjena, je bila korištena u zdravstvenoj zaštiti kako bi reducirala stres i uznemirenost. Iako je glazbeni jezik još uvijek sporan, nekoliko studija sugeriraju kako glazba može olakšati redukciju u stresnom odgovoru. Smanjivanje srčanog ritma, veća tolerancija boli i patnje, kožna provodljivost, mišićna aktivnost, subjektivni izvještaji opuštanja, smanjenje tjeskobe i depresije su opisani kod stresnih pacijenata podvrgnutih klasičnoj glazbi (4,15).

Stresna buka može proizvesti protivne efekte na imunološkim parametrima i u čovjeku i životinjskim modelima, a mnogi su od ovih efekata reverzibilni uz farmakološke intervencije. Međutim, još uvijek ne postoji dovoljno informacija o imunološkom odgovoru na ne farmakološke tretmane kao što je na primjer glazba. Da bi osvijetlili ovu drugu interakciju, skupina znanstvenika sa Sveučilišta u Santiagu de Compostela u Španjolskoj (8) su proučavali efekte glazbe na populaciju T stanica, blastogenični odgovor stanica slezene na concanavalin A (Con A) i staničnu aktivnost NK stanica u miševima koji su povrgnuti kroničnom slušnom stresoru. Također je određen plazmatski adrenokortikotropin (ACTH) kako bi se potvrdio utjecaj hipotalamo-hipofizno-nadbubrežne osovine na imunološki odgovor u ovim eksperimentalnim stanjima.

Stres-inducirana tjeskoba i depresija također su povezane sa povećanom smrtnošću i s povećanim prevladavanjem neoplazmičnih bolesti.

S biološkog stajališta su razmotreni efekti glazbe na imunološki sustav i tumore. Glazba je emocionalni oblik komunikacije; emocije su subjektivni izvjestitelji u hormonskim i neurofiziološkim procesima; stoga, hormonske i neurofiziološke promjene su adekvatna sredstva za interpretiranje djelotvornosti različitih oblika glazbe na imunološki odgovor pod stresnim uvjetima. Otkriveno je da glazba smanjuje stresom induciranu hiperaktivnost hipotalamo-hipofizno-adrenalne (HPA) osovine, uključujući izlučivanje ACTH i kortikosteroida, kao i moduliranje izlučivanja noradrenalina, adrenalina, hormona rasta, prolaktina i β -beta endorfina.

Kliničke studije su pokazale kako su imunološki učinci glazbe statistički povezani uz smanjivanje izlučivanja kortikosteroida. To uključuje poraste razine imunoglobina A u slini (IgA) i plazma interleukina 1 (IL 1) koji su u vezi sa značajnim smanjivanjima koncentracije kortizola u slini i plazmi. U eksperimentu sa BALB/c miševima također

je postojao odnos između obnove imunih parametara i značajnog smanjivanja u stresom induciranom porastu razine plazminog ACTH u miševa izvrnutih glazbi (8). Glazba je utjecala na značajno povećanje broja i proliferativnog odgovora T-stanica te je promovirala anti-tumorski odgovor kod glodavaca koji nisu podvrgnuti stresu. Budući nije postojao uzajamni odnos između tih parametara i ACTH razine, to ukazuje kako u ovim efektima trebaju biti uključeni i drugi neurohormoni i neuroprijenosnici (8).

Vrsta glazbe, karakterna obilježja i temperament bi mogli imati široki utjecaj na među individualna varijabilnost u odgovoru na glazbu. Kritično slušanje glazbe i neke interpretacije tehno glazbe (TM) mogu dovesti do porasta koncentracije plazma noradrenalina, adrenalina, hormona rasta, prolaktina, kortizola i β -beta endorfina uz značajne poraste srčanog ritma, sistoličkog krvnog tlaka te značajnih promjena u samoprocijeni emocionalnog stanja.

1.3. Lindan

Lindan ($C_6H_6Cl_6$) je insekticid iz grupe organokloridnih pesticida. Kemijski je stabilan, liposolubiln i gotovo netopiv u vodi. LD_{50} za miša iznosi 10.3 mg/kg tjelesne težine.

Lindan je razmjerno stabilan u okolini. Postojan je u tlu ali je biorazgradiv kad se nađe pod utjecajem vlažnih anaerobnih stanja. U sisavaca postoje mehanizmi za metabolizam lindana i ekskreciju tog pesticida. Lindan se ne kumulira u krvi, ili masti štakora u kojoj je veoma dobro topljiv. Dok je metabolizam lindana u ljudskom tijelu očit, u pasivnoj okolini ovaj pesticid je ekstremno postojan i nestaje u biti samo ishlapljivanjem.

Nakon izloženosti pesticidu u eksperimentalnim životinjama je bila dokumentirana imunosupresija. Promjena staničnog i humoralnog imunološkog odgovora te atrofija limfoidnog i hematopoetskog tkiva su bili izviješteni kao najistaknutije promijene (25, 29).

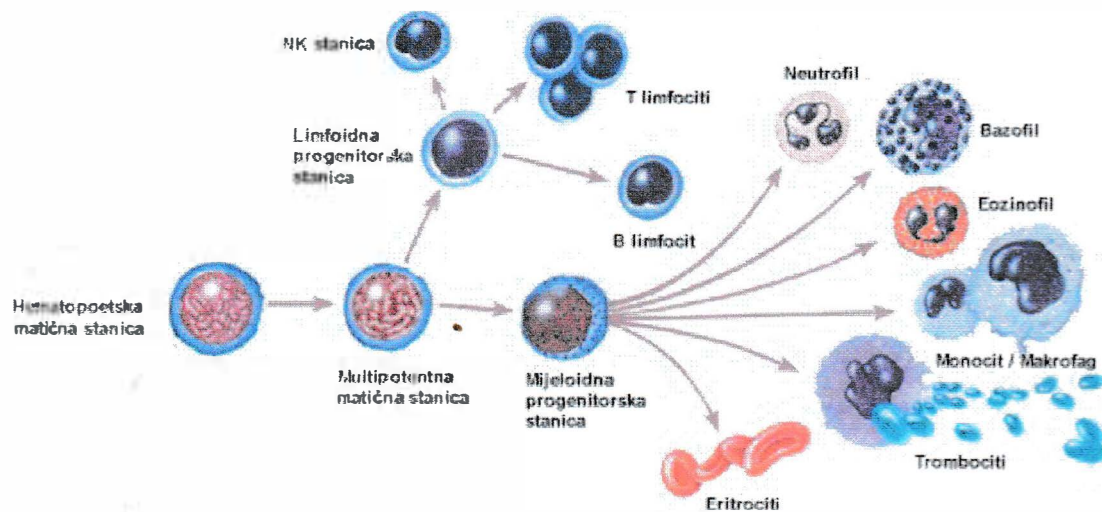
1.4. Hematologija miša

1.4.1. Krvne stanice

NAZIVLJE:

U literaturi koja opisuje krvne stanice prisutni su različiti nazivi koji se koriste za označavanje iste stanice kao npr. neutrofili- neutrofilni granulociti, polimorfonuklearni neutrofili; eozinofili- eozinofilni granulociti, polimorfonuklearni eozinofili; bazofili- bazofilni granulociti, polimorfonuklearni bazofili itd.

Sve krvne stanice koje cirkuliraju u perifernoj krvi potječu iz iste hematopoetske matične stanice. Na slici 1. vidi se njihova proliferacija do zrelih staničnih oblika.



Slika 1. Razvoj krvnih stanica

Tablica 1. Fiziološke vrijednosti krvnih stanica u miša

krvne stanice	vrijednosti
eritrociti	$6-10 \times 10^6 / \text{mm}^3$
leukociti	$5-10 \times 10^3 / \text{mm}^3$
neutrofili	10-60 %
limfociti	35-90 %

Za potrebe ovog pokusa važno je uočiti kako stanice limfocita i neutrofila čine oko 95% populacije stanica leukocitne loze u perifernoj krvi, pa su naša mjerenja i obrada rezultata bila usredotočena na obradu te dvije vrste stanica.

ERITROCITI

Eritrociti ili crvene krvne stanice se razvijaju iz koštane srži iz pluripotentnih hematopoetskih matičnih stanica iz kojih potječu sve stanice u cirkulirajućoj krvi. Jedan dio tih stanica nakon diobe zadržava se u obliku pluripotentnih stanica dok se drugi dio diferencira i tvori druge stanice. Usmjereni matična stanica od koje potječu eritrociti je stanica koja stvara eritrocitne kolonije. Uz primjeren podražaj iz nje nastaju proeritroblasti, a iz njih u još nekoliko koraka retikulociti i naposljetku eritrociti. Dužina života eritrocita iznosi oko 120 dana.

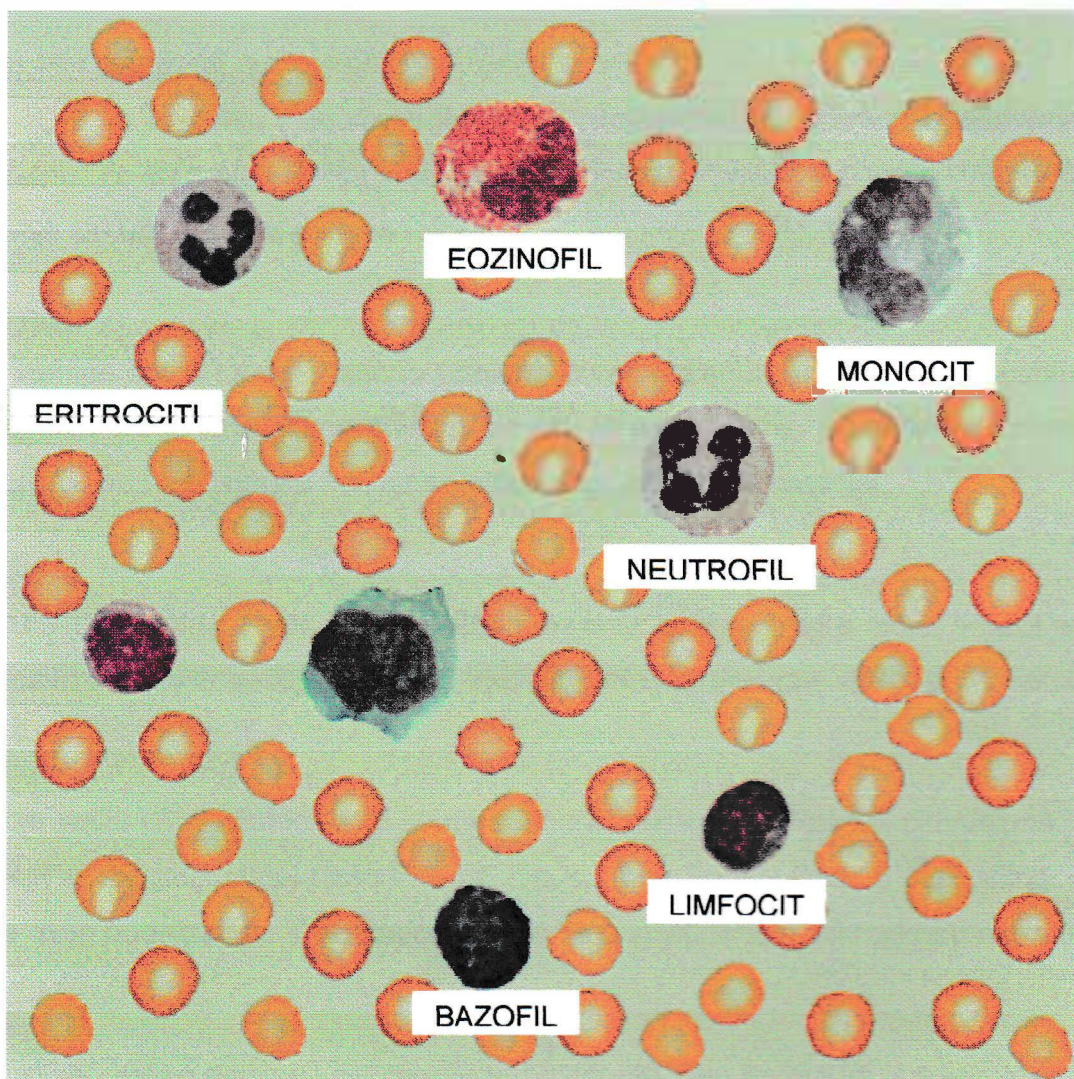
Mišji zreli eritrociti kao eritrociti kod svih sisavaca (izuzev deve) nemaju jezgru. Broj eritrocita u miševa iznosi $6-10 \times 10^6/\text{mm}^3$ (26, 27).

1.4.2. Diferencijalna krvna slika

DKS (diferencijalna krvna slika) podrazumijeva brojanje i postotni prikaz pojedinih loza bijelih krvnih stanica (21).

Tablica 2. Diferencijalna krvna slika miša

limfociti	35 - 90%
monociti	0 - 3%
neutrofili	10 - 60%
eozinofili	0 - 7%
bazofili	0 - 1%



Slika 2. Obojani krvni razmaz

LEUKOCITI

Leukociti ili bijele krvne stanice nastaju dijelom u koštanoj srži, a dijelom u limfatčnom tkivu. Većina leukocita se specifično prenosi krvlju do upalnih područja i tako osiguravaju brzu i snažnu obranu organizma od zaraznih mikroorganizama. Uz stanice koje su usmjerene u stvaranje eritrocita nastaju i dvije glavne leukocitne loze, mijelocitna i limfocitna koje počinju mijeloblastom odnosno limfoblastom. Limfociti i plazma-stanice se uglavnom stvaraju u limfatičkim organima (limfne žlijezde, slezena, timus, krajnici...), dok granulociti i monociti nastaju samo u koštanoj srži gdje se i pohranjuju. Životni vijek leukocita ovisi o vrsti i iznosi od par sati do nekoliko mjeseci.

Njihov broj varira obzirom na utjecaj različitih faktora kao što su primjerice stres, otrovi, hormoni, bolesti, lijekovi itd. Postoji nekoliko tipova leukocita:

Heterofili / Neutrofili

Oni se nazivaju i neutrofili jer im se citoplazmatske granule u sisavaca boje neutralno. To su zrele stanice koje mogu fagocitirati i uništiti bakterije i viruse čak i u krvi koja cirkulira. Kreću se ameboidno.

Eozinofili

Ove stanice imaju karakteristično obojane crvene granule u svojoj citoplazmi. Slabi su fagociti, ali ih krvotvorno tkivo proizvodi u većem broju kod zaraze parazitima. Nakupljaju se i u tkivima u kojima se odigravaju alergijske reakcije.

Bazofili

Granule u citoplazmi im se specifično boje u tamno modru boju. Poput velikih mastocita u krv oslobađaju heparin i važni su u nekim vrstama alergijskih reakcija.

Limfociti

Postoje veliki i mali limfociti koji se međusobno razlikuju po količini citoplazme. Veliki limfociti su bogatiji citoplazmom. Pretežno su smješteni u limfnim čvorovima. Dijele se na dvije podskupine: T i B limfocite koje se u svjetlosnom mikroskopu ne razlikuju.

Monociti

Monociti su velike stanice koje sadrže puno citoplazme. Jezgra im ima karakterističan bubrežasti oblik. To su nezrele stanice koje imaju malu moć suprotstavljanja zaraznim agensima.

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Na osnovu dosadašnjih radova o utjecaja glazbe kao nefarmakološke metode i njenog utjecaja na živi organizam željelo se je na pokusnim životinjama (BALB/c miševi) odrediti utjecaj zvukova/glazbe na promjenu težine i stanje imunohematopoetskog sustava intoksiciranih miševa.

Glazba je sama po sebi jako kompleksna budući obuhvaća niz elemenata: tempo, mjeru, tonalitet, frekvenciju složenih u jednu cjelinu. Obzirom da su dosadašnja istraživanja većinom rađena sa složenim glazbenim kompozicijama teško je bilo precizno odrediti koja sastavnica glazbe djeluje na promatrani sustav. Ipak zna se kako su frekvencija i ritam nedvojbeno najznačajnije sastavnice glazbe. Glede utjecaja frekvencija istraživanja na ljudima pokazuju da izlaganje mozga različitim frekvencijama uzrokuje lučenje različitih neuroprijenosnika (23). Budući je za ispitivanje utjecaja frekvencije na žive organizme potrebna složena i skupa oprema za potrebe ovog pokusa frekvencija je bila standardizirana na 440 Hz (ton a). Nadalje, radovi rađeni sa harmoničnim i disharmoničnim akordima (22) bili su bazirani na promatranju promjena u mozgu tako da nije navedeno koliko i kakav utjecaj imaju na imunološki odgovor organizma. To je bio još jedan poticaj da se ispituju moguće interakcije.

Stoga je u pokusu korišten metronom kao ritmička i tonska osnova stimulacije. Oslonac da se pokuša samo sa ritmom (metronomom) pružile su i spoznaje dr. Lee Salka (18) koji je u svojim radovima pokazao kako nedonoščad bolje napreduje ako sluša ritam koji odgovara ritmu otkucaja ljudskog srca u opuštenom stanju. Na osnovu respiracijskog i srčanog ritma miša uzeta je frekvencija od 152 otkucaja u minuti, kao približno alikvotna vrijednost obaju ritmova koji su od životne važnosti za organizam.

Lindan je korišten kao provjereno sredstvo koje narušava homeostatske parametre imunohematopoetskog sustava (25, 29).

Ovim radom pokušalo se ukazati na utjecaj ritma kao moguću najznačajniju sastavnicu glazbe u uzrokovanju različitih odgovora u životinjskom i ljudskom organizmu. Moguća je primjena odgovarajuće stimulirajuće glazbe kod ljudi kojima je narušen imunohematopoetski sustav radi poboljšanja zdravstvenog stanja na jedan neinvazivan i nefarmakološki način.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Pokusne životinje

U pokusu su korišteni miševi soja BALB/c uzgojeni na Zavodu za animalnu fiziologiju, Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu. Sveukupno je u pokus bilo uključeno 56 životinja od čega 31 mužjak i 25 ženki, starih 2 mjeseca. Životinje su grupirane po spolu u odvojenim kavezima po 8 mužjaka i 6 ženki. Hrana i voda im je bila dostupna "ad libitum".

3.1.1 Nomenklatura BALB/c

Soj nosi porijeklo od H.J. Bagg-a koji je razvio "Bagg albino" 1913. iz zaliha prodavača kućnih ljubimaca iz Američke države Ohio. McDowell ih je uzgojio 1923. Tijekom godina razvijeni su različiti podsojevi.

3.1.2 Podaci o soju

Kod BALB/c soja primijećena je bolja reproducibilnost nego kod većine uzgojenih sojeva sa prosječnim okotom od 5,5 i prihvatljivim životnim vijekom. Oba spola mogu biti agresivna što je posebno naglašeno kod mužjaka nakon parenja. Često se koriste za stvaranje monoklonskih protutijela i kao domaćina za transplantabilne tumore.



Slika 3. BALB/c miš

3.1.3 Obilježavanje pokusnih životinja

Svaka životinja je zbog razlikovanja tijekom pokusa označena rezom na uški u kombinacijama označenim u tablici 2.

Tablica 3. Shema oznaka pokusnih životinja

broj miša	oznaka na uhu
1	L1
2	L2
3	D1
4	D2
5	L1D1
6	0
7	L2D1
8	L1D2

Legenda:

L = lijevo uho

D = desno uho

0,1,2 = broj zareza

3.2. Oprema i tehnička pomagala

U pokusu su korišteni:

- metronom njemačkog proizvođača Wittner QM2 taktell, frekvencije 440 Hz, namješten na 152 otkucaja u minuti
- 24 satna vremenska sklopka
- standardni AC/DC adapter proizvođača Hama
- bukomjer tipa 2205, danskog proizvođača Brüel & Kjael
- vaga proizvođača Sartorius, tip GM 152

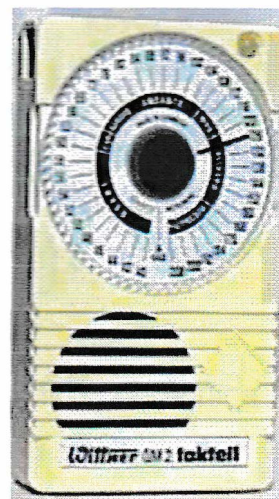
3.2.1. Metronom

Metronom je nastao uslijed potrebe glazbenika za pripisivanjem točnog tempa u glazbi. Mersenne je u njegovom djelu "Harmonie Universelle " koje je objavio 1636., dao vremensku vrijednost trajanju 'polovine note' onoliko koliko traje otkucaj srca. Prvi metronom je izumio Étienne Loulié u 1696. Njegov uređaj je bio povisok; 2 metra visine. Nekoliko mehaničkih poboljšanja je dovelo do osuvremenjivanja i prvog prenosivog metronoma. Poboljšanja su napravili Ditrich Nikolaus Winkel (1780-1826) i Johann Nepomuk Maelzel (1772-1838). Maelzel je imao više poslovnog duha te je napravio metronom koji je bio raspoloživ za širu javnost (28).

Nažalost, mnogi su od ranih metronoma bili slabe kvalitete i često su bili jako neprecizni. Današnji metronomi budući su opremljeni elektroničkim uređajima precizni su i pouzdani.

3.2.2. Temeljni sklop za provedbu pokusa

Za potrebe pokusa korišten je jedan od takvih modernih metronoma (slika 4.) koji je putem univerzalnog AC/DC adaptera i 24-satne vremenske sklopke bio spojen na gradsku strujnu mrežu 220 V / 50 Hz.



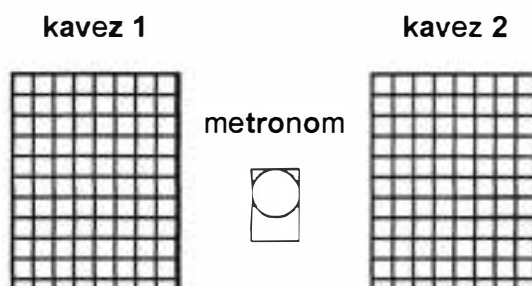
Slika 4. Metronom Wittel QM2

3.3. Plan pokusa

Pokus je isplaniran na način da se omogući praćenje tjelesne težine i promjena imunohematoloških parametara kod miševa intoksiciranih subletalnom dozom lindana u odnosu na intoksicirane miševe koji su dodatno bili tonsko stimulirani slušanjem ritma metronoma.

Kako bi narušili homeostazu imunohematopoetskog sustava miševa korišten je pesticid lindan. Zbog svoje netopljivosti u vodi, a svojstva liposolubilnosti otopljen je u jestivom biljnom ulju tako da je količina otopljenog otrova koje su primale životinje bila 0,1 ml. Obzirom se radi o ulju pokazalo se kako ova količina nema većeg utjecaja na probavni sustav u smislu izazivanja učestale defekacije ili diareje. Nakon anestezije eterom životinje su intoksicirane oralno uz pomoć kanile. Miševi su intoksicirani sa 1/10 LD₅₀ doze tijekom 10 dana u razmacima od po 3 dana od svake primljene doze jer se takav način primjene u prijašnjim pokusima u toksikologiji pokazao kao najefikasniji.

Kako je respiracijski ritam miša 100-200 po minuti, a srčani ritam 300-800 otkucaja po minuti, te uslijed tehničke ograničenosti metronoma, uzeta je vrijednost od 152 otkucaja po minuti kao približna matematička alikvota oba ritma. Metronom je bio postavljen između kaveza sa pokusnim životinjama (slika 5.) tako da je glasnoća unutar kaveza sa životinjama iznosila 43-45 dB. Kontrolne skupine su bile izložene white sound-u glasnoće 40 dB. Glasnoća je mjerena pomoću bukomjera kako bi se standardizirali uvjeti pokusa. Pokusne životinje su bile podvrgnute svakodnevnom slušanju ritma za vrijeme trajanja pokusa u vremenskom razdoblju od 19-7 sati.



Slika 5. Shema postave pokusa

Uzorkovanje i određivanje tjelesne težine te imunohematoloških odrednica izvršeno je u laboratoriju Zavoda za animalnu fiziologiju, PMF-a u Zagrebu.

3.4. Određivanje tjelesne težine

Tjelesna težina se pratila jednom svakog tjedna. Pokusna životinja se uhvati za rep i nježno stavi u plastičnu kadu te očita težina. Za vaganje je korištena elektronska vaga proizvođača Sartorius koja pokazuje vrijednosti na dvije decimale. Tjelesna težina se zabilježi u pripremljene tablice.

3.5. Uzimanje uzorka krvi

U ovom pokusu krv je vađena iz repne vene. Kako bi se olakšala manipulacija sa životinjama koristi se plastični stalak sa utorom kroz koji se provuče rep miša. Na taj način je životinja fiksirana i nema opasnosti od ozljeda (eventualnog ugriza). U slučaju defekacije ili bilo kakvog drugog onečišćenja (krv, urin) lako se sanira i očisti radno mjesto.

Životinja kojoj uzimamo uzorak se prebaci u mali kavez sa steljom i poklopcem te kratko zagrije uz pomoć infracrvene žarulje. Tako je vena lakše dostupna zbog vazodilatacije. Rep se drži jednom rukom, a drugom se rukom u jednom potezu lagano poprečno zareže oštrim, čistim žiletom u području vene. Kada imamo višekratno vađenje krvi prvo zarezivanje se radi pri vrhu repa, a svako slijedeće počinje iznad starog reza prema korijenu repa. Prva kap se uzme na pripremljeno predmetno stakalce i razvuče za krvni razmaz te uzme potrebna količina krvi u eritrocitni i leukocitni melanžer u kojima se odmah razrijedi sa odgovarajućim reagensima.

3.6. Laboratorijske analize

3.6.1. Broj eritrocita i leukocita

Određivanje broja eritrocita i leukocita se vrši u razrijeđenoj krvi pomoću Burker-Türk-ove komore. Krv se razrjeđuje u posebnim pipetama tzv. melanžerima koji se sastoje od kapilarnog graduiranog dijela na kojem su oznake 0,5 i 1, koji završava kuglastim proširenjem ili trbušastim dijelom na kojem je nastavak sa oznakom 101 za eritrocite ili 11 za leukocite. Zapremina trbušastog dijela je 100 puta veći od zapremine kapilarnog dijela melanžera za eritrocite i 10 puta veći za leukocite. U njemu se nalazi i staklena kuglica za miješanje koja može biti crvene ili bijele boje, ovisno o tome radi li se o eritrocitnom ili leukocitnom melanžeru. Na kraći nastavak trbušastog dijela koji nosi oznaku 101 ili 11 ovisno o kojem se melanžeru radi, navuče se gumena cjevčica s nastavkom ili poluautomatski pipetor pomoću kojih se u melanžer uvlači krv i odgovarajuća otopina za razrjeđivanje. Kad radimo sa eritrocitnim melanžerom najprije usišemo krv do oznake 1 i razrijedimo do oznake 101 sa Hayemovom otopinom koja lizira leukocite, a fiksira eritrocite.

Za leukocite usišemo krv do oznake 0,5, a zatim Türkovu otopinu koja hemolizira eritrocite i boja jezgre leukocita što olakšava njihovo brojenje. Melanžer je zatim potrebno dobro protresti rukom i odmah staviti na vibracionu miješalicu kako bi se suspenzija stanica u proširenom dijelu jednoliko promješala.

Prije nanošenja otopine na Burker-Türk-ovu komoricu potrebno je čvrsto prekriti pokrovnicom, a iz melanžera ispustiti par kapi tekućine. To je bitno jer te kapi potječu uglavnom od čiste otopine koja je zaostala u kapilarnom dijelu nakon usisavanja. Burker-Türk-ova komorica je nešto veća i deblja od običnog predmetnog stakla na kojoj se nalaze četiri uzdužna ureza između kojih se nalaze tri polja od kojih je srednje tako izbrušeno da je za 1/10 mm niže od onih sa strane. To je polje poprečno podijeljeno na dva manja polja od kojih svako sadrži po jednu urezanu mrežicu. Površina mrežice od 9 mm² je podijeljena na nekoliko područja horizontalnim i vertikalnim crtama. Na krajevima mrežice nalaze se četiri kvadrata omeđena trostrukim crtama. Svaki od njih je dvostrukim crtama podijeljen u 16 srednjih kvadrata površine 1/25 mm², ti kvadrati služe za brojanje leukocita.

Za brojanje stanica se najčešće koristi srednje povećanje mikroskopa. Eritrociti se broje u središnjem dijelu mrežice u kojem jednostruke crte omeđuju 256 manjih kvadrata površine $1/400 \text{ mm}^2$. Leukociti se broje u četiri ugaona polja komorice, svako površine 1 mm^2 , dok se eritrociti broje u 80 malih kvadrata. Kako bismo dobili tražene rezultate trebamo preračunati broj stanica na volumen od 1 l krvi (17). To radimo na slijedeći način:

- za eritrocite

$$E \times a \times b \times c \times 10^2 = \text{broj eritrocita u litri krvi}$$

- za leukocite

$$L \times a \times b \times c \times 10^6 = \text{broj leukocita u litri krvi}$$

E - prosječan broj eritrocita po jednom kvadratu

a - broj malih kvadrata na površini od 1 mm^2 (400)

b - faktor razrjeđenja (100 ili 200)

c - faktor kojim se komora svodi na 1 mm^3 (10)

L - prosječan broj leukocita na 1 mm^2

3.6.2. Diferencijalna krvna slika

a) Priprema krvnog razmaza

Za pripremu krvnog razmaza koristi se kap svježe krvi koja se uzima na pripremljeno očišćeno predmetno stakalce. Grafitnom olovkom se na jednom užem bridu označi broj životinje i broj vađenja krvi. Umjesto grafitne olovke može se upotrijebiti i dijamantna olovka koja zarezuje oznaku u predmetnicu, ali je jednostavnija upotreba obične grafitne olovke. Bitno je da se oznaka ne obriše uslijed daljnje manipulacije predmetnice kemikalijama. Kap srednje veličine se kapne uz rub predmetnog stakalca. Brušeno staklo pomoću kojeg se pravi razmaz se prsloni užim bridom, pod kutom od 45° na predmetnicu. Staklo se prsloni uz kap krvi koja se uslijed kapilarnosti razlije duž brida stakla. Laganim ravnomjernim pomicanjem brušenog stakla, krv u tankom sloju slijedi brid koji klizi po predmetnom stakalcu. Potrebno je par sati da se staklo dobro osuši kako bi se moglo pristupiti bojenju.

b) Bojenje krvnog razmaza

Predmetnice se stave na mostić od staklenih cijevi koji smjestimo iznad posude za bojenje te se pristupa postupku bojenja koji se sastoji od nekoliko koraka. Shematski to izgleda ovako:

1. prelići predmetnice bojom May Grünwald i pustiti da djeluje 6 minuta
2. isprati destiliranom vodom
3. prelići predmetnice mješavinom destilirane vode i boje Giemsa u omjeru 2:1
4. isprati sa destiliranom vodom
5. sušiti na zraku

c) Pregled krvnog razmaza

Na obojeni i osušeni razmaz se kapne kapljica cedrovog ulja (*Oleum cedri liqui*) i gleda pod imerzionim objektivom. Analizira se 100 stanica iz reda leukocita i to je broj koji nam govori o postotku te vrste leukocita u ukupnom broju svih leukocita u krvi. Da bi se dobio točan broj određenih stanica potrebno je izbrojeni postotak pomnožiti sa ukupnim brojem leukocita u krvi.

4. REZULTATI

4.1. Statistička obrada podataka

Obzirom je cilj pokusa bio uočavanje djelovanja različitih tretmana na oporavak cjelokupnog imunohematopoetskog sustava, oslabljenog djelovanjem subletalne doze lindana, za analizu su uzete razlike krajnjeg i početnog stanja tjelesne težine te krvnih parametara pokusnih životinja.

Statistička analiza je provedena uz primjenu SAS računalnog programa, (SAS Release 8.02) koristeći proceduru općeg linearnog modela - proc glm (20). U analizi varijance tretmani i spol su smatrani fiksnim efektom. Razlike između prosječnih vrijednosti učinaka testirane su Tukeyevim HSD testom (24).

4.2. Težina pokusnih životinja

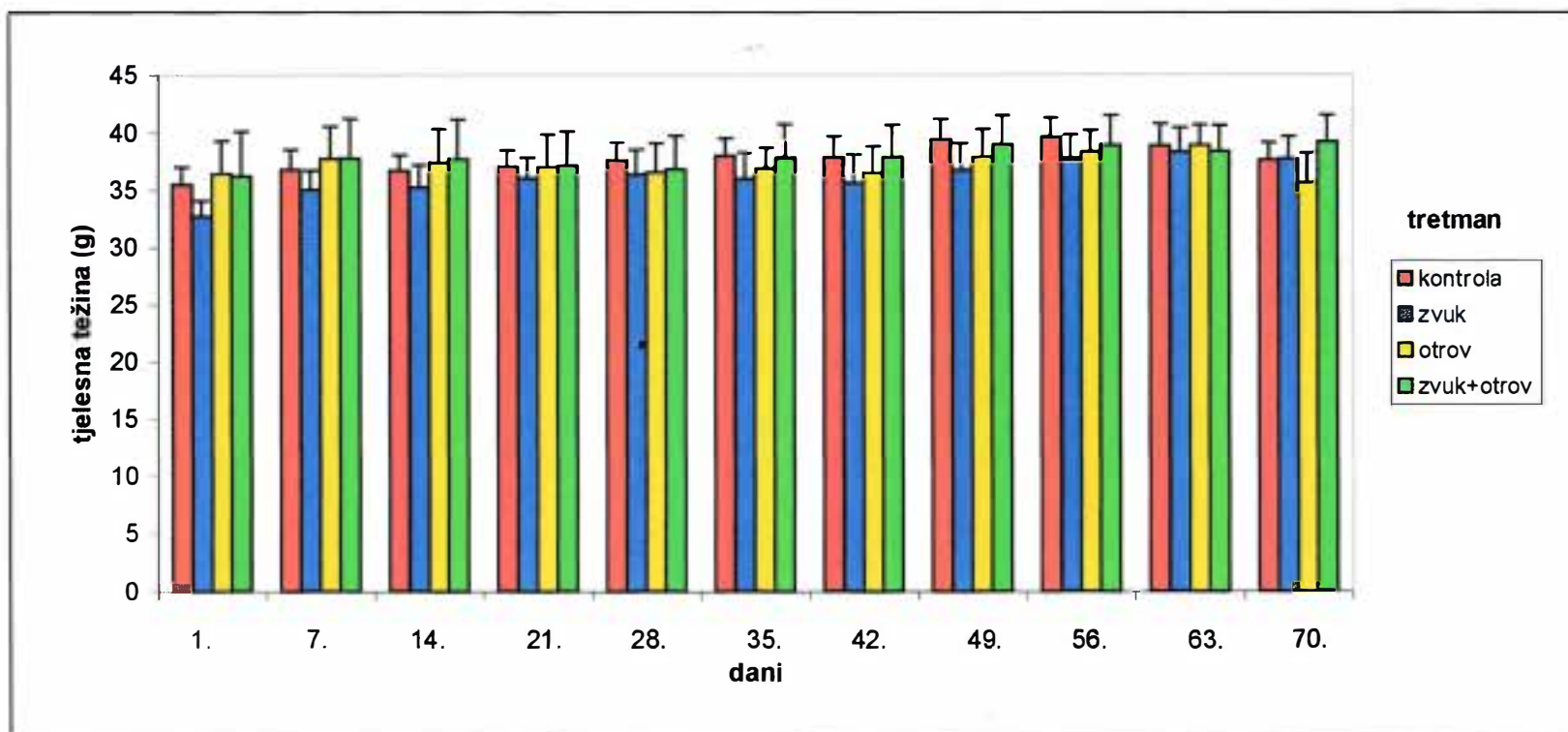
Rezultati promjena tjelesne težine u tablici 4. i pripadajućoj slici 6. prikazuju kretanja kod mužjaka pokusnih životinja tijekom trajanja pokusa, a u tablici 5. i slici 7. kod ženki.

Tablica 4. Srednja vrijednost promjena tjelesne težine (g)⁺⁺ u mužjaka pokusnih skupina miševa⁺

tretman	dani										
	1.	7.	14.	21.	28.	35.	42.	49.	56.	63.	70.
kontrola	35,50 ±1,49	36,78 ±1,71	36,69 ±1,33	37,04 ±1,44	37,59 ±1,55	37,99 ±1,52	37,88 ±1,82	39,38 ±1,76	39,54 ±1,69	38,82 ±1,91	37,62 ±1,47
zvuk	32,75 ±1,33	35,02 ±1,68	35,22 ±1,92	36,01 ±1,84	36,38 ±2,16	35,99 ±2,28	35,61 ±2,47	36,74 ±2,32	37,72 ±2,06	38,31 ±2,11	37,73 ±1,91
otrov	36,39 ±2,90	37,69 ±2,75	37,38 ±2,32	36,98 ±1,90	36,53 ±1,90	36,90 ±1,74	36,50 ±1,65	37,80 ±2,26	38,23 ±2,32	38,90 ±2,19	35,64 ±2,22
zvuk+otrov	36,17 ±3,90	37,77 ±3,43	37,71 ±3,48	37,10 ±2,98	36,77 ±2,95	37,85 ±2,89	37,86 ±2,84	38,88 ±2,53	38,89 ±2,62	38,37 ±2,24	39,15 ±2,36

⁺ n = 7-8 (broj životinja)

⁺⁺ = ± SD (standardna devijacija)



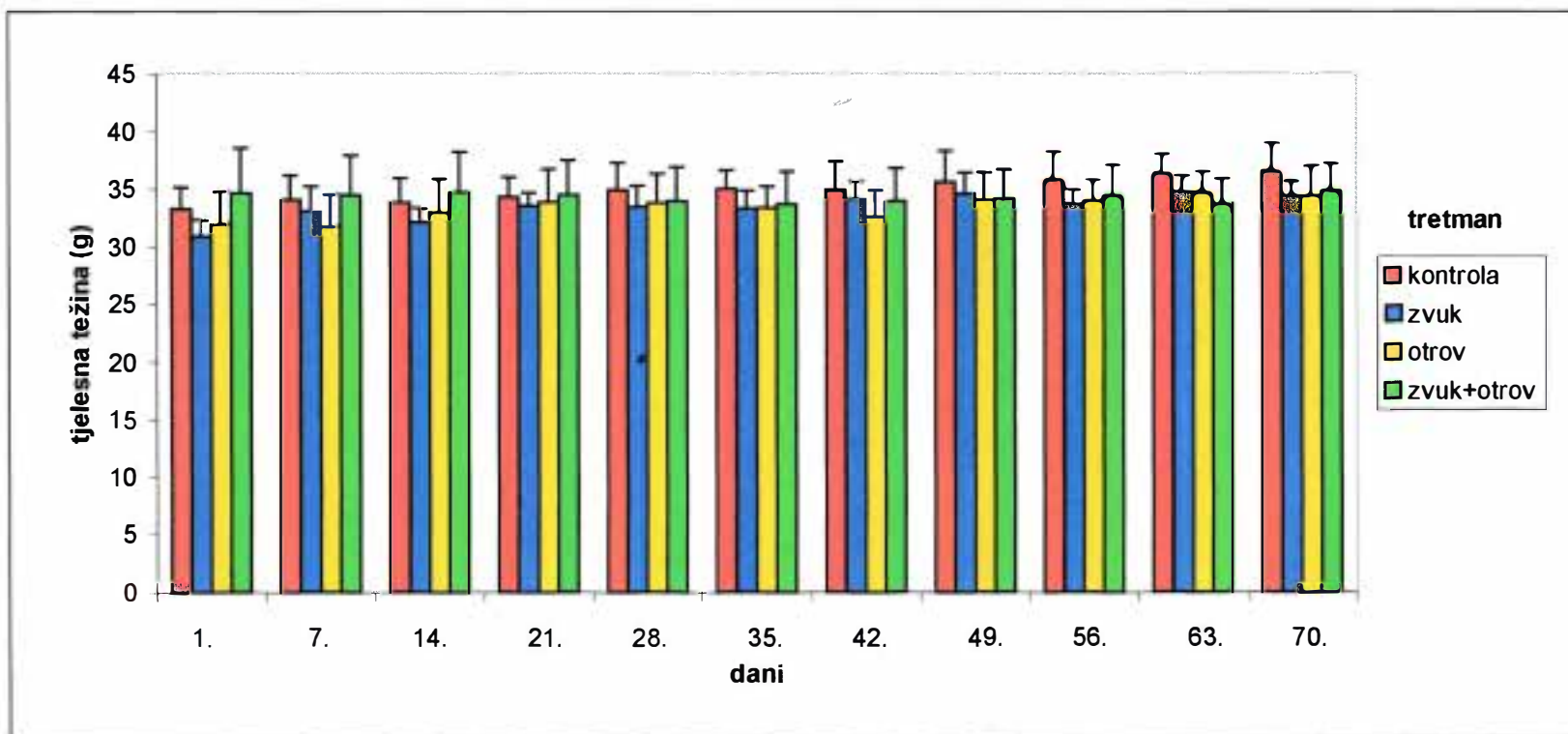
Slika 6. Grafički prikaz promjena vrijednosti tjelesne težine (g) u mužjaka pokusnih skupina miševa

Tablica 5. Srednja vrijednost promjena tjelesne težine (g)^{**} u ženki pokusnih skupina miševa[†]

tretman	dani										
	1.	7.	14.	21.	28.	35.	42.	49.	56.	63.	70.
kontrola	33,31	34,11	33,82	34,33	34,91	35,00	34,97	35,61	35,85	36,31	36,50
	±1,85	±2,10	±2,09	±1,70	±2,37	±1,61	±2,44	±2,66	±2,42	±1,67	±2,49
zvuk	30,94	33,06	32,13	33,59	33,43	33,32	34,17	34,61	33,78	34,74	34,45
	±1,46	±2,16	±1,24	±1,08	±1,85	±1,51	±1,47	±1,80	±1,25	±1,40	±1,24
otrov	32,00	31,77	33,00	33,86	33,77	33,36	32,62	34,03	34,06	34,70	34,43
	±2,86	±2,84	±2,92	±2,87	±2,54	±1,85	±2,32	±2,44	±1,89	±1,79	±2,60
zvuk+otrov	34,65	34,47	34,74	34,48	33,94	33,64	33,95	34,21	34,61	33,70	34,90
	±1,85	±1,74	±2,39	±1,41	±1,17	±1,94	±2,03	±2,29	±1,50	±2,53	±2,67

[†] n = 6-7 (broj životinja)

^{**} = ± SD (standardna devijacija)



Slika 7. Grafički prikaz promjena vrijednosti tjelesne težine (g) u ženki pokusnih skupina miševa

Tjelesna težina je praćena svaki tjedan kroz jutro. Kako bi se uočile promijene u dobivanju na težini u odnosu na primijenjene tretmane za statističku obradu je uzeta razlika u tjelesnoj težini između zadnjeg i prvog vaganja i napravljen je test po Turkey-Krameru.

U tablici 6. su prikazani statistički podaci o ovisnosti tjelesne težine prema pojedinom faktoru te međusobnoj ovisnosti faktora u interakciji. Faktori u ovom slučaju su tretman i spol.

Tablica 6. Značaj ovisnosti tjelesne težine pokusnih životinja obzirom na faktore pokusa

faktori	tjelesna težina
Tretman	<0,0001 ***
Spol	0,8241 ns
T x S	0,0003 ***

ns = razlika nije statistički značajna; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Iz tablice zaključujemo kako je promjena tjelesne težine grupa životinja **značajno** ($p < 0,0001$) ovisna o tretmanu. Promjena tjelesne težine pojedinog tretmana **značajno** je (uz $p = 0,0003$) ovisna o spolu životinja.

Tablica 7. Statistička značajnost promjena razlike u tjelesnoj težini pokusnih životinja obzirom na tretman

tretman	tjelesna težina
otrov : kontrola	0,0344 *
zvuk : kontrola	0,0782 ns
zvuk +otrov : kontrola	0,5567 ns
zvuk : otrov	<0,0001 ***
zvuk +otrov : otrov	0,4425 ns
zvuk +otrov : zvuk	0,0024 **

ns = razlika nije statistički značajna; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Na ovoj tablici uočava se statistički **značajna** (uz $p = 0,0344$) promjena u dobivanju na težini životinja koje su bile tretirane otrovom u odnosu na kontrolu. Pažnju treba obratiti i na **značajne** (uz $p < 0,0001$) međuodnose grupa životinja koje su bile tretirane samo zvukom u odnosu na tretirane samo otrovom, te onu grupu koja je tretirana zvukom i otrovom (uz $p = 0,0024$) naspram grupe tretirane zvukom.

Tablica 8. Statistička značajnost promjena razlike u tjelesnoj težini mužjaka obzirom na tretman

tretman	tjelesna težina
otrov : kontrola	0,0378 *
zvuk : kontrola	0,0404 *
zvuk +otrov : kontrola	0,9796 ns
zvuk : otrov	<0,0001 ***
zvuk +otrov : otrov	0,0023 **
zvuk +otrov : zvuk	0,3284 ns

ns = razlika nije statistički značajna; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Kod mužjaka su **značajno** (uz $p = 0,0378$ i $p = 0,0404$) na promjenu težine utjecali otrov i zvuk, dok grupa tretirana zvukom i otrovom u kombinaciji nije pokazala značajna statistička odstupanja naspram kontrolne grupe, ali je zato pokazala **značajan** (uz $p = 0,0023$) odnos naspram grupe tretirane samo otrovom. Najveći statistički **značaj** (uz $p < 0,0001$) se pokazao u odnosu između grupa zvuk i otrov.

Tablica 9. Promjena razlike u tjelesnoj težini ženki obzirom na tretman

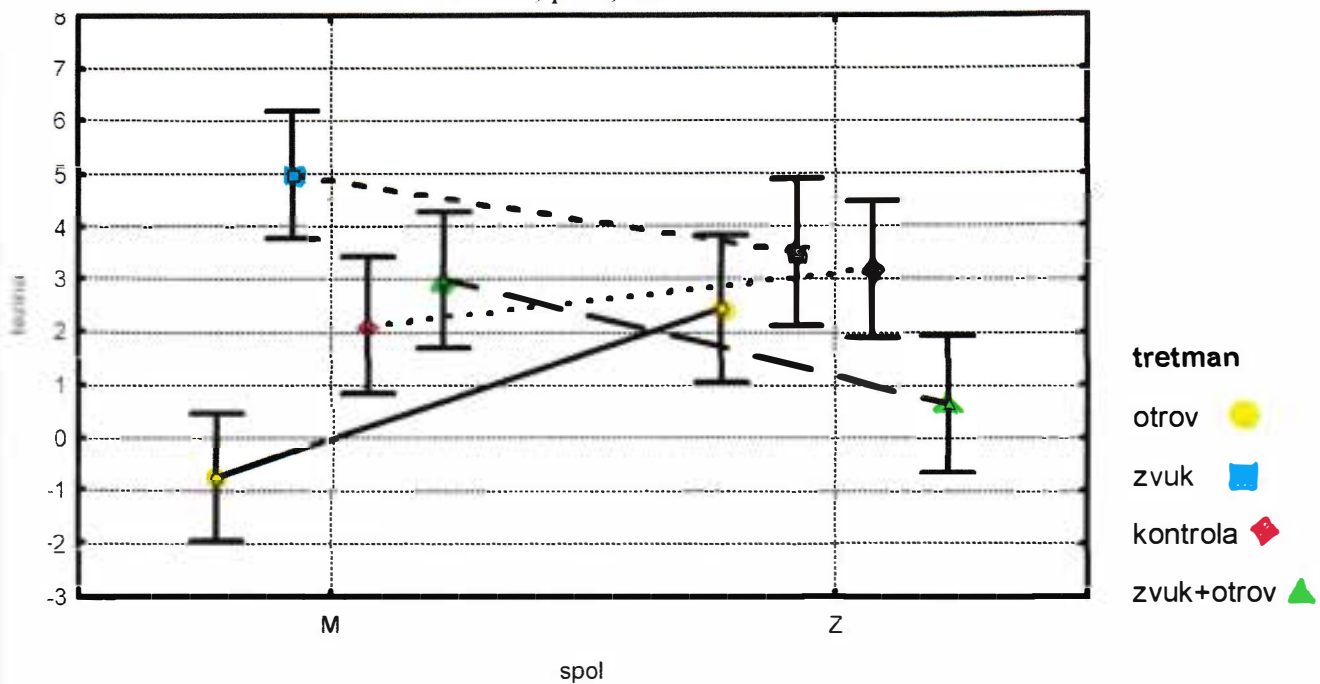
tretman	tjelesna težina
otrov : kontrola	0,9926 ns
zvuk : kontrola	1,0000 ns
zvuk +otrov : kontrola	0,1167 ns
zvuk : otrov	0,9540 ns
zvuk +otrov : otrov	0,5556 ns
zvuk +otrov : zvuk	0,0680 ns

ns = razlika nije statistički značajna; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Kod ženki se jasno vidi kako nema statistički značajnih rezultata.

TJELESNA TEŽINA
OVISNOST TRETMANA O SPOLU

F= 7.5614, p= 0,00031



Slika 8. Usporedni grafikon promjene tjelesne težine u ovisnosti o tretmanu u mužjaka (M) i ženki (Ž) od početka do kraja pokusa (75. dan)

Promjena razlike u tjelesnoj težini na početku i na kraju mjerenja svakog pojedinog tretmana značajno je (uz $p = 0,0003$) ovisna o spolu životinja.

Primjenom zvuka ($p = 0,0404^*$, $p < 0,05$) mužjaci su imali veću razliku u porastu težine od početka do kraja mjerenja nego ženke. Otrov je djelovao na pad težine u mužjaka ($p = 0,0378^*$, $p < 0,05$). Ženke pokazuju najveći pad u težini primjenom kombiniranog tretmana zvukom i otrovom.

4.3. Hematološke odrednice pokusnih životinja

4.3.1. Eritrociti

Uzorak krvi za analizu je vađena iz repne vene pokusnih životinja. Uzimanje uzoraka se napravilo četiri puta tijekom trajanja pokusa. Vremenski period između svakog slijedećeg vađenja je bio dva tjedna odnosno petnaest dana. Dobiveni uzorci izvađene krvi su analizirani odmah nakon uzimanja uzoraka.

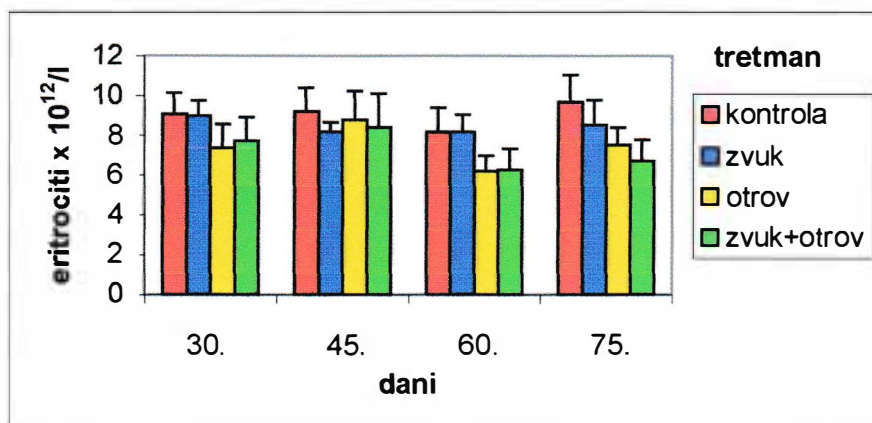
Rezultati promjena broja eritrocita u tablici 10. i pripadajućoj slici 11. prikazuju kretanja kod mužjaka pokusnih životinja tijekom trajanja pokusa, a u tablici 11. i slici 10. kod ženki.

Tablica 10. Srednja vrijednost promjena broja eritrocita ($\times 10^{12}/l$)⁺ u mužjaka pokusnih skupina miševa⁺ 30., 45., 60. i 75. dan od početka pokusa

tretman	broj eritrocita ($\times 10^{12}/l$) u krvi			
	30. dan	45. dan	60. dan	75. dan
kontrola	9,05 $\pm 1,09$	9,20 $\pm 1,19$	8,15 $\pm 1,24$	9,67 $\pm 1,38$
Zvuk	8,95 $\pm 0,78$	8,16 $\pm 0,49$	8,17 $\pm 0,88$	8,50 $\pm 1,27$
otrov	7,36 $\pm 1,19$	8,79 $\pm 1,44$	6,19 $\pm 0,78$	7,53 $\pm 0,84$
Zvuk+otrov	7,71 $\pm 1,19$	8,38 $\pm 1,71$	6,25 $\pm 1,06$	6,71 $\pm 1,07$

⁺ n = 7-8 (broj životinja)

⁺⁺ = \pm SD (standardna devijacija)



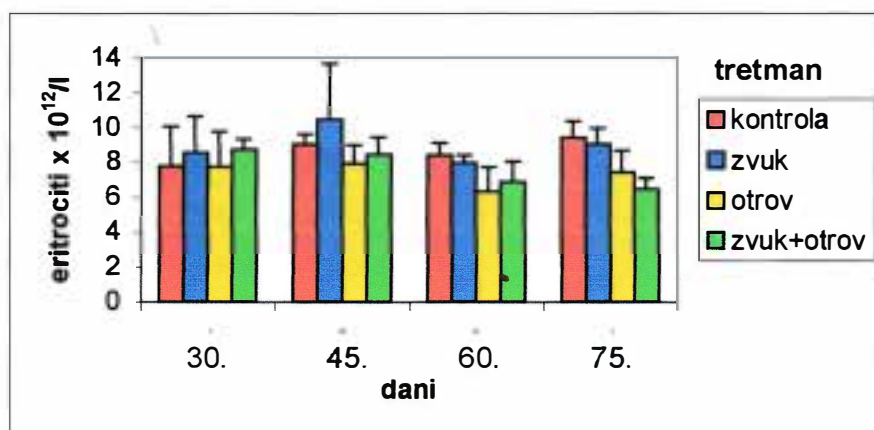
Slika 9. Grafički prikaz promjena broja eritrocita u mužjaka pokusnih skupina miševa 30., 45., 60. i 75. dan od početka pokusa

Tablica 11. Srednja vrijednost promjena broja eritrocita ($\times 10^{12}/l$)⁺⁺ u mužjaka pokusnih skupina miševa⁺ 30., 45., 60. i 75. dan od početka pokusa

tretman	broj eritrocita ($\times 10^{12}/l$) u krvi			
	30. dan	45. dan	60. dan	75. dan
kontrola	7,79 $\pm 2,28$	9,05 $\pm 0,56$	8,43 $\pm 0,69$	9,41 $\pm 0,94$
zvuk	8,56 $\pm 2,10$	10,46 $\pm 3,19$	7,96 $\pm 0,45$	9,04 $\pm 0,92$
otrov	7,75 $\pm 2,04$	7,93 $\pm 1,09$	6,33 $\pm 1,38$	7,43 $\pm 1,25$
zvuk+otrov	8,74 $\pm 0,62$	8,46 $\pm 0,99$	6,88 $\pm 1,18$	6,46 $\pm 0,62$

⁺ n = 6-7 (broj životinja)

⁺⁺ = \pm SD (standardna devijacija)



Slika 10. Grafički prikaz promjena broja eritrocita u ženki pokusnih skupina miševa 30., 45., 60. i 75. dan od početka pokusa

Tablica 12. Statistička značajnost ovisnosti broja eritrocita pokusnih životinja obzirom na faktore pokusa

faktori	eritrociti
Tretman	0,0003 ***
Spol	0,7917 ns
T x S	0,1788 ns

ns = razlika nije statistički značajna; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Iz tablice se može pročitati kako je promjena broja eritrocita kod životinja **značajno (uz $p = 0,0003$)** ovisna samo o tretmanu. Promjena broja eritrocita nije statistički značajna u odnosu na spol niti u odnosu na interakciju oba faktora (tretmana i spola).

Tablica 13. Statistička značajnost promjene broja eritrocita obzirom na tretman bez obzira na spol

tretman	eritrociti
otrov : kontrola	0,1772 ns
zvuk : kontrola	0,2337 ns
zvuk +otrov : kontrola	0,0001 ***
zvuk : otrov	0,9988 ns
zvuk +otrov : otrov	0,0571 ns
Zvuk +otrov : zvuk	0,0397 **

ns = razlika nije statistički značajna; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Statistički **značaj** pokazuje samo grupa tretirana zvukom i otrovom u odnosu prema kontrolnoj skupini (uz $p = 0,0001$) te u odnosu na zvuk (uz $p = 0,0397$).

Tablica 14. Statistička značajnost promjene broja eritrocita u mužjaka obzirom na tretman

tretman	eritrociti
otrov : kontrola	0,9995 ns
zvuk : kontrola	0,8828 ns
zvuk +otrov : kontrola	0,4906 ns
zvuk : otrov	0,9902 ns
zvuk +otrov : otrov	0,7796 ns
zvuk +otrov : zvuk	0,9953 ns

ns = razlika nije statistički značajna; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Broj eritrocita se kod mužjaka nije statistički značajno promijenio bez obzira na tretman.

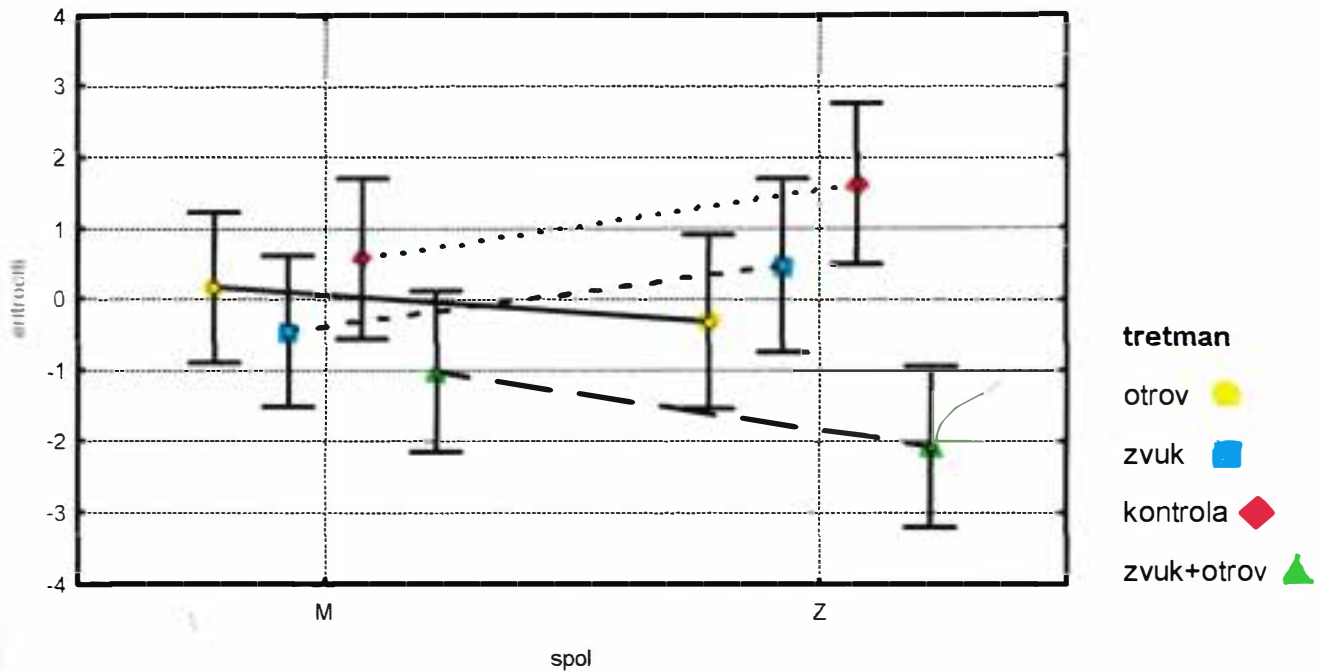
Tablica 15. Statistička značajnost promjene broja eritrocita u ženki obzirom na tretman

tretman	eritrociti
otrov : kontrola	0,2935 ns
zvuk : kontrola	0,8598 ns
zvuk +otrov : kontrola	0,0007 **
zvuk : otrov	0,9824 ns
zvuk +otrov : otrov	0,4166 ns
zvuk +otrov : zvuk	0,0625 ns

ns = razlika nije statistički značajna; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Kao što je iz rezultata statističke obrade podataka vidljivo, jedina statistički značajna (uz $p = 0,0007$) promjena u padu broja eritrocita se očitovala kod grupe tretirane zvukom i otrovom naspram kontrolne grupe.

ERITROCITI
OVISNOST TRETMANA O SPOLU
 $F= 1.7035, p= 0,17880$



Slika 11. Usporedni grafikon promjene broja eritrocita u ovisnosti o tretmanu u mužjaka (M) i ženki (Ž) od početka do kraja pokusa (75. dan)

Promjena razlike u broju eritrocita na početku i na kraju mjerenja svakog pojedinog tretmana **nije značajno** (uz $p = 0,17880$) ovisna o spolu životinja.

Primjenom otrova i zvuka + otrov mužjaci su imali veću razliku u broju eritrocita od početka do kraja mjerenja nego ženke. Zvuk je djelovao na statistički značajan pad ($p = 0,0007^{**}, p < 0,01$) u oporavku broja eritrocita kod ženki.

4.3.2. Leukociti

Uzorci krvi za analizu su vađeni iz repne vene pokusnih životinja. Uzorkovanje se napravilo četiri puta tijekom trajanja pokusa. Vremenski period između svakog slijedećeg vađenja je bio dva tjedna odnosno petnaest dana. Dobiveni uzorci izvađene krvi su analizirani odmah nakon uzimanja uzoraka.

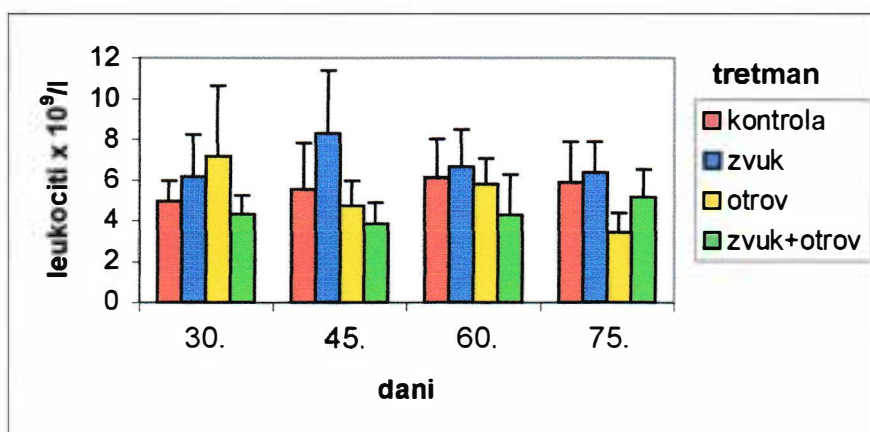
U tablici 16. i slici 12. prikazana su kretanja promjena broja leukocita kod mužjaka pokusnih životinja tijekom trajanja pokusa, a u tablici 17. i slici 13. kod ženki.

Tablica 16. Srednja vrijednost promjena broja leukocita ($\times 10^9/l$)⁺⁺ u mužjaka pokusnih skupina miševa⁺ 30., 45., 60. i 75. dan od početka pokusa

tretman	broj leukocita ($\times 10^9/l$) u krvi			
	30. dan	45. dan	60. dan	75. dan
kontrola	4,96 $\pm 1,00$	5,54 $\pm 2,28$	6,11 $\pm 1,91$	5,88 $\pm 1,99$
Zvuk	6,13 $\pm 2,10$	8,28 $\pm 3,09$	6,66 $\pm 1,80$	6,36 $\pm 1,51$
Otrov	7,16 $\pm 3,46$	4,74 $\pm 1,22$	5,80 $\pm 1,25$	3,45 $\pm 0,92$
zvuk+otrov	4,33 $\pm 0,89$	3,85 $\pm 1,03$	4,30 $\pm 1,97$	5,18 $\pm 1,34$

⁺ n = 7-8 (broj životinja)

⁺⁺ = \pm SD (standardna devijacija)



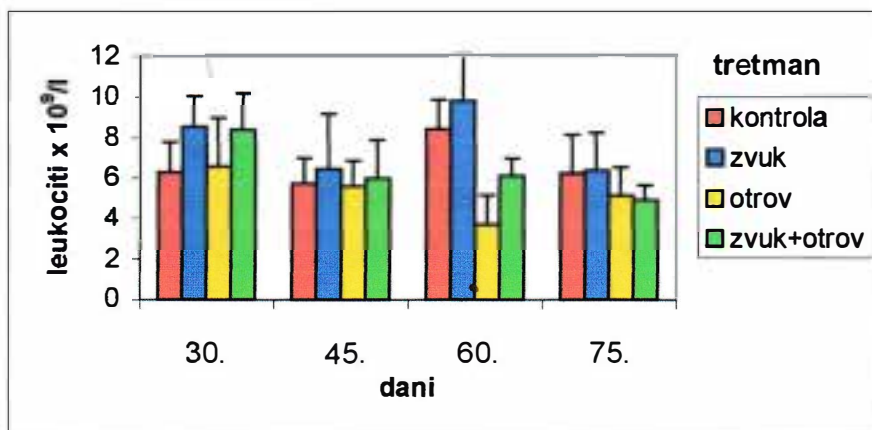
Slika 12. Grafički prikaz promjena broja leukocita u mužjaka pokusnih skupina miševa 30., 45., 60. i 75. dan od početka pokusa

Tablica 17. Srednja vrijednost promjena broja leukocita ($\times 10^9/l$)⁺⁺ u ženki pokusnih skupina miševa⁺ 30., 45., 60. i 75. dan od početka pokusa

tretman	broj leukocita ($\times 10^9/l$) u krvi			
	30. dan	45. dan	60. dan	75. dan
kontrola	6,27 $\pm 1,48$	5,71 $\pm 1,24$	8,38 $\pm 1,46$	6,22 $\pm 1,87$
Zvuk	8,50 $\pm 1,52$	6,43 $\pm 2,71$	9,78 $\pm 2,32$	6,34 $\pm 1,84$
Otrov	6,56 $\pm 2,37$	5,59 $\pm 1,26$	3,69 $\pm 1,46$	5,10 $\pm 1,38$
Zvuk+otrov	8,36 $\pm 1,77$	5,96 $\pm 1,86$	6,07 $\pm 0,87$	4,87 $\pm 0,75$

⁺ n = 7-8 (broj životinja)

⁺⁺ = \pm SD (standardna devijacija)



Slika 13. Grafički prikaz promjena broja leukocita u ženki pokusnih skupina miševa 30., 45., 60. i 75. dan od početka pokusa

Tablica 18. Statistička značajnost ovisnosti broja leukocita pokusnih životinja obzirom na faktore pokusa

faktori	leukociti
Tretman	0,0107 *
Spol	0,0304 *
T x S	0,0035 **

ns = razlika nije statistički značajna; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

U tablici se vidi da je promjena broja leukocita kod životinja **značajno** (uz $p = 0,0107$) ovisna o tretmanu. Promjena broja leukocita primjenom pojedinog tretmana **značajno** je (uz $p = 0,0304$) ovisna o spolu životinja. Interakcija tretmana i spola **značajna** je (uz $p = 0,0035$) za broj leukocita.

Tablica 19. Statistička značajnost promjene broja leukocita obzirom na tretman

tretman	leukociti
otrov : kontrola	0,0050 **
zvuk : kontrola	0,3671 ns
zvuk +otrov : kontrola	0,3361 ns
zvuk : otrov	0,2504 ns
zvuk +otrov : otrov	0,2681 ns
Zvuk +otrov : zvuk	1,0000 ns

ns = razlika nije statistički značajna; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Statistički je **značajan** (uz $p = 0,0050$) samo utjecaj otrova naspram kontrolne grupe.

Tablica 20. Statistička značajnost promjene broja leukocita u mužjaka obzirom na tretman

tretman	leukociti
otrov : kontrola	0,0053 **
zvuk : kontrola	0,9987 ns
zvuk +otrov : kontrola	1,0000 ns
zvuk : otrov	0,0210 *
zvuk +otrov : otrov	0,0031 **
zvuk +otrov : zvuk	0,9938 ns

ns = razlika nije statistički značajna; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Promjena broja leukocita kod mužjaka je **značajna (uz $p = 0,0053$)** u odnosu na grupe tretirane sa otrovom i kontrolne grupe. Statistički **značajnost** pokazuju (uz $p = 0,0210$) odnosi grupa tretiranih zvukom naspram otrova dok grupa zvuk + otrov pokazuje **značajnost (uz $p = 0,0031$)** naspram zvuku.

Tablica 21. Statistička značajnost promjene broja leukocita u ženki obzirom na tretman

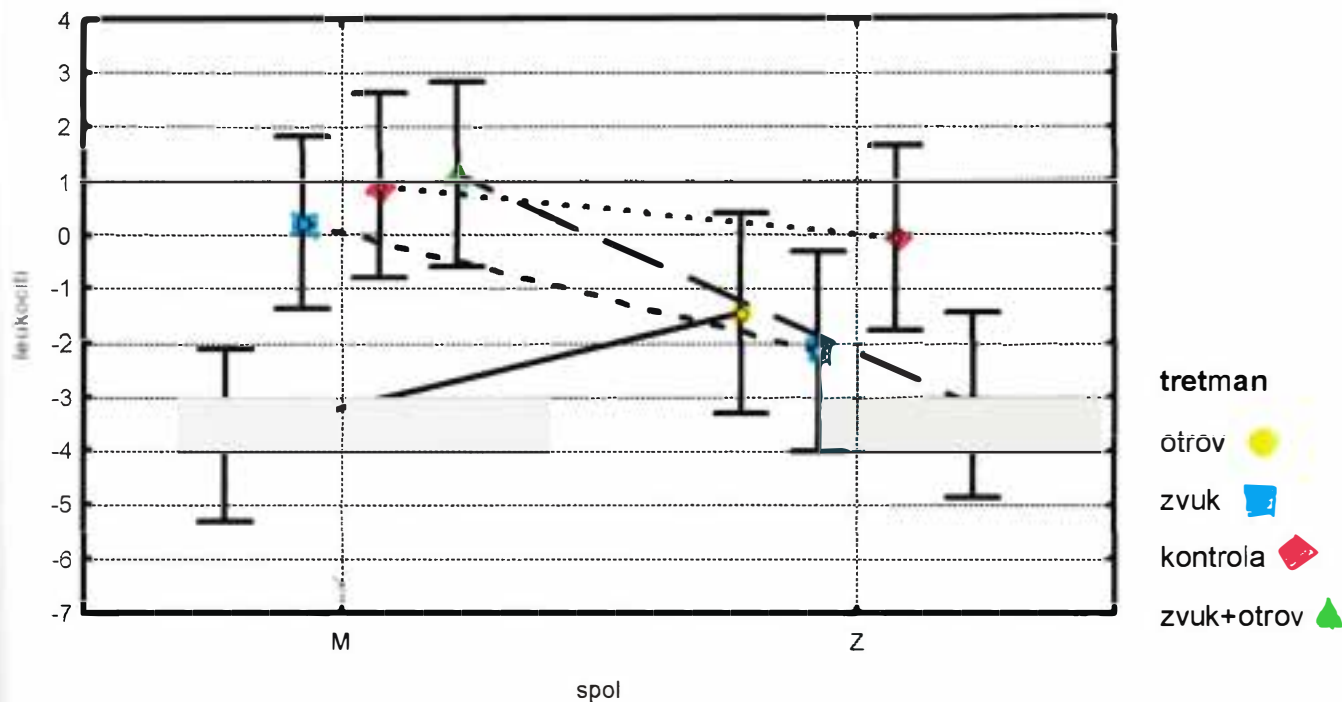
tretman	leukociti
otrov : kontrola	0,9498 ns
zvuk : kontrola	0,6985 ns
zvuk +otrov : kontrola	0,1926 ns
zvuk : otrov	0,9993 ns
zvuk +otrov : otrov	0,8741 ns
zvuk +otrov : zvuk	0,9931 ns

ns = razlika nije statistički značajna; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Broj leukocita se kod ženki nije statistički značajno promijenio bez obzira na tretman.

LEUKOCITI OVISNOST TRETMANA O SPOLU

F= 5.1753, p= 0,00352



Slika 15. Usporedni grafikon promjene broja leukocita u ovisnosti o tretmanu u mužjaka (M) i ženki (Ž) od početka do kraja pokusa (75. dan)

Promjena razlike broja leukocita na početku i na kraju mjerenja pojedinog tretmana **značajno** je (uz $p = 0,0035$) ovisna o spolu. Primjenom zvuka i zvuk + otrova ženke su u prosjeku imale veći pad u broju leukocita. Kod mužjaka skupina tretirana samo otrovom pokazuje statistički značajan pad broja leukocita ($p = 0,0053^{**}$, $p < 0,01$). Kombinirani tretman zvukom i otrovom pokazuje porast broja leukocita u mužjaka ($p = 0,0031^{**}$, $p < 0,01$).

4.3.3 Diferencijalna krvna slika (DKS) - neutrofili

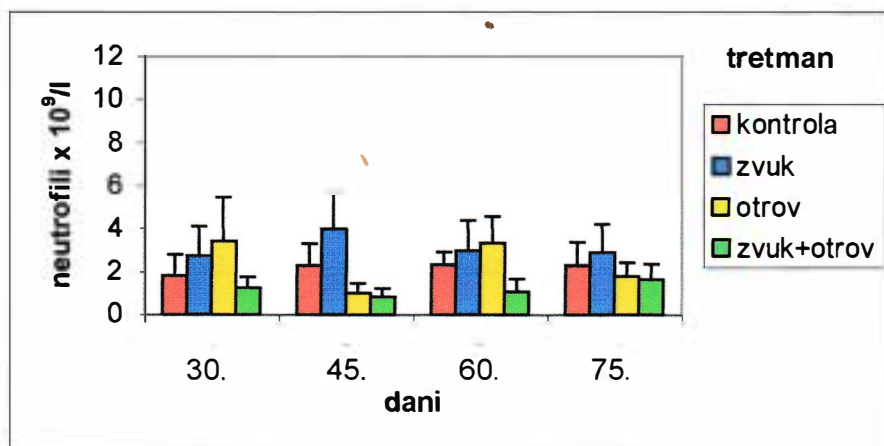
Rezultati promjena broja neutrofila u tablici 22. i pripadajućoj slici 15. prikazuju kretanja kod mužjaka pokusnih životinja tijekom trajanja pokusa, a u tablici 23. i slici 16. kod ženki.

Tablica 22. Srednja vrijednost promjena broja neutrofila ($\times 10^9/l$)⁺⁺ u mužjaka pokusnih skupina miševa⁺ 30., 45., 60. i 75. dan od početka pokusa

tretman	broj neutrofila ($\times 10^9/l$) u krvi			
	30. dan	45. dan	60. dan	75. dan
kontrola	1,81 $\pm 0,97$	2,27 $\pm 1,01$	2,31 $\pm 0,61$	2,29 $\pm 1,07$
zvuk	2,74 $\pm 1,35$	3,99 $\pm 1,69$	2,97 $\pm 1,38$	2,87 $\pm 1,31$
otrov	3,40 $\pm 2,03$	1,02 $\pm 0,42$	3,32 $\pm 1,22$	1,78 $\pm 0,62$
zvuk+otrov	1,25 $\pm 0,49$	0,84 $\pm 0,37$	1,08 $\pm 0,59$	1,65 $\pm 0,71$

⁺ n = 7-8 (broj životinja)

⁺⁺ = \pm SD (standardna devijacija)



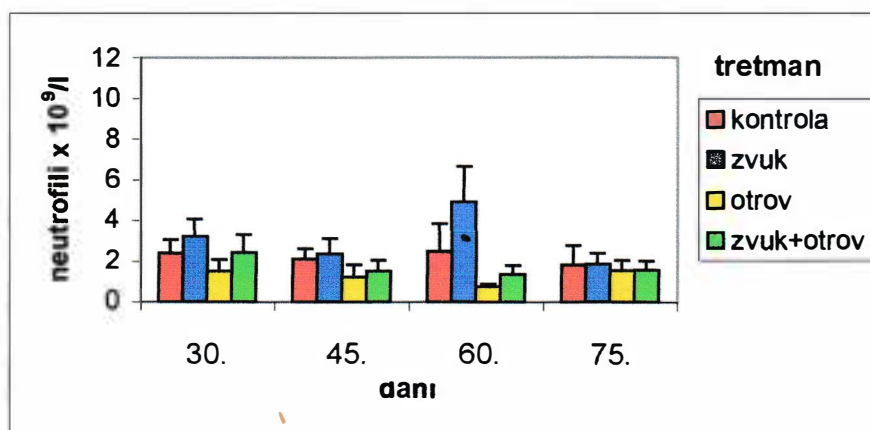
Slika 15. Grafički prikaz promjena broja neutrofila u mužjaka pokusnih skupina miševa 30., 45., 60. i 75. dan od početka pokusa

Tablica 23. Srednja vrijednost promjena broja neutrofila ($\times 10^9/l$)⁺⁺ u ženki pokusnih skupina miševa⁺ 30., 45., 60. i 75. dan od početka pokusa

tretman	broj neutrofila ($\times 10^9/l$) u krvi			
	30. dan	45. dan	60. dan	75. dan
kontrola	2,40 $\pm 0,67$	2,11 $\pm 0,49$	2,50 $\pm 1,33$	1,83 $\pm 0,94$
zvukom	3,22 $\pm 0,83$	2,36 $\pm 0,76$	4,91 $\pm 1,74$	1,85 $\pm 0,54$
otrovom	1,51 $\pm 0,59$	1,24 $\pm 0,58$	0,75 $\pm 0,13$	1,56 $\pm 0,50$
zvukom + otrovom	2,42 $\pm 0,89$	1,51 $\pm 0,53$	1,37 $\pm 0,41$	1,58 $\pm 0,43$

⁺ n = 7-8 (broj životinja)

⁺⁺ = \pm SD (standardna devijacija)



Slika 16. Grafički prikaz promjena broja neutrofila u ženki pokusnih skupina miševa 30., 45., 60. i 75. dan od početka pokusa

Tablica 24. Statistička značajnost ovisnosti broja neutrofila pokusnih životinja obzirom na faktore pokusa

faktori	DKS / neutrofil
Tretman	0,4474 ns
Spol	0,2181 ns
T x S	0,0281 *

ns = razlika nije statistički značajna; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Iz tablice zaključujemo kako je promjena broja neutrofila kod životinja **značajno** (uz $p = 0,0281$) ovisna samo o interakciji tretmana i spola. Promjena broja neutrofila nije statistički značajna o pojedinom tretmanu, niti o spolu.

Tablica 25. Statistička značajnost promjene broja neutrofila obzirom na tretman neovisno o spolu

tretman	DKS - neutrofil
otrov : kontrola	0,5568 ns
zvuk : kontrola	0,6692 ns
zvuk +otrov : kontrola	0,9987 ns
zvuk : otrov	0,9979 ns
zvuk +otrov : otrov	0,6512 ns
zvuk +otrov : zvuk	0,7588 ns

ns = razlika nije statistički značajna; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Promjena broja neutrofila nije statistički značajno ovisna o pojedinom tretmanu ne uzimajući u obzir spol.

Tablica 26. Statistička značajnost promjene broja neutrofila u mužjaka obzirom na tretman

tretman	DKS - neutrofil
otrov : kontrola	0,1360 ns
zvuk : kontrola	0,9984 ns
zvuk +otrov : kontrola	1,0000 ns
zvuk : otrov	0,3751 ns
zvuk +otrov : otrov	0,1318 ns
zvuk +otrov : zvuk	0,9981 ns

ns = razlika nije statistički značajna; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Kod mužjaka nema statistički značajnih rezultata.

Tablica 26. Statistička značajnost promjene promjene broja neutrofila u ženki obzirom na tretman

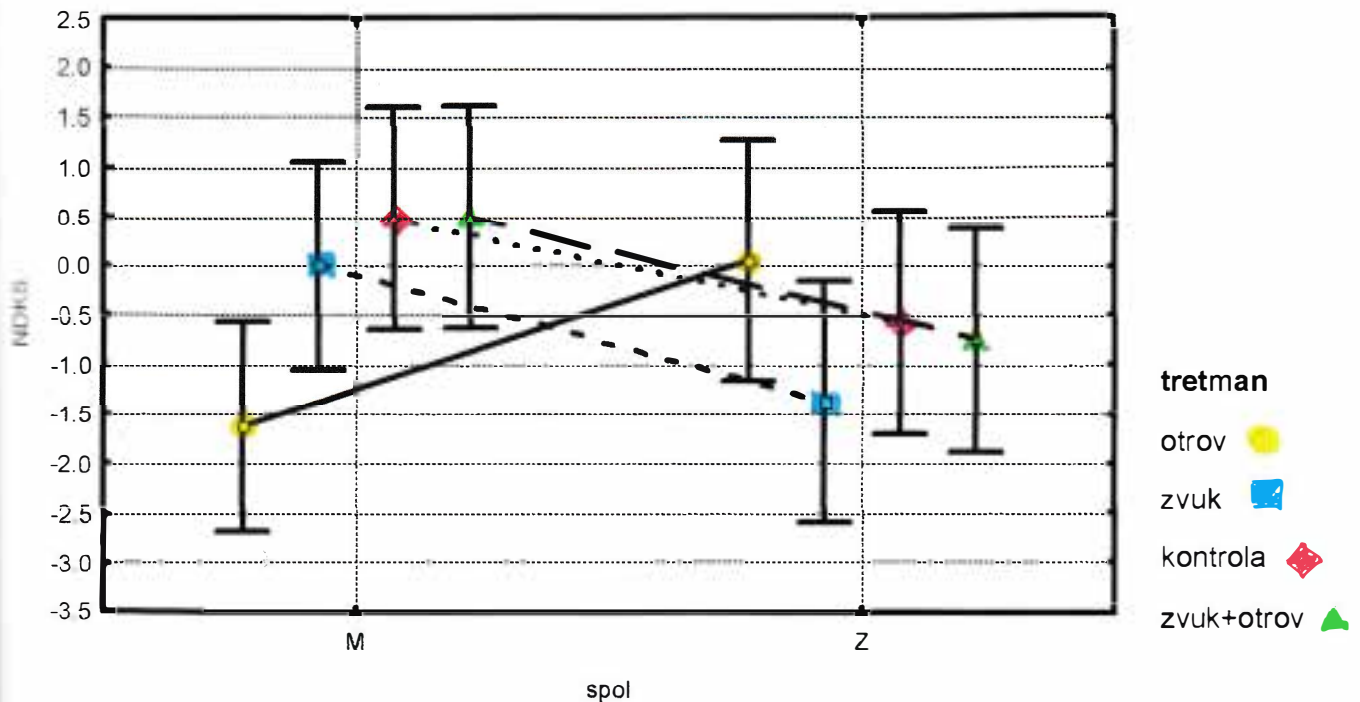
tretman	DKS - neutrofil
otrov : kontrola	0,9949 ns
zvuk : kontrola	0,9761 ns
zvuk +otrov : kontrola	1,0000 ns
zvuk : otrov	1,0000 ns
zvuk +otrov : otrov	0,7122 ns
zvuk +otrov : zvuk	0,9752 ns

ns = razlika nije statistički značajna; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Ženke također pokazuju rezultate koji nisu statistički značajni.

NEUTROFILI
OVISNOST TRETMANA O SPOLU

F= 3.2986, p= 0,02813



Slika 17. Usporedni grafikon promjene broja neutrofila u ovisnosti o tretmanu u mužjaka (M) i ženki (Ž) od početka do kraja pokusa (75. dan)

Promjena razlike broja neutrofila na početku i na kraju mjerenja pojedinog tretmana **značajno** je (uz $p = 0,02813$) ovisna o spolu. Primjenom zvuka i zvuk + otrova ženke su u prosjeku imale veći pad u broju neutrofita. Kod mužjaka je to slučaj sa grupom tretiranom samo otrovom. Kontrolna skupina nije pokazala značajniju promjenu između spolova.

4.3.4 Diferencijalna krvna slika (DKS) - limfociti

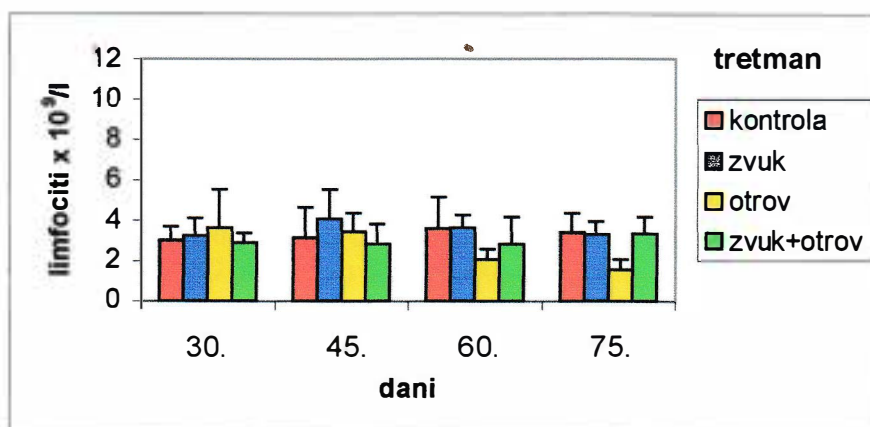
U tablici 27. i slici 18. prikazana su kretanja promjena broja leukocita kod mužjaka pokusnih životinja tijekom trajanja pokusa, a u tablici 28. i slici 19. kod ženki.

Tablica 27. Srednja vrijednost promjena broja limfocita ($\times 10^9/l$)⁺⁺ u mužjaka pokusnih skupina miševa⁺ 30., 45., 60. i 75. dan od početka pokusa

tretman	broj limfocita ($\times 10^9/l$) u krvi			
	30. dan	45. dan	60. dan	75. dan
kontrola	3,00 $\pm 0,67$	3,15 $\pm 1,48$	3,59 $\pm 1,55$	3,41 $\pm 0,96$
zvuk	3,23 $\pm 0,86$	4,05 $\pm 1,48$	3,62 $\pm 0,65$	3,30 $\pm 0,63$
otrov	3,63 $\pm 1,90$	3,44 $\pm 0,90$	2,07 $\pm 0,50$	1,55 $\pm 0,52$
zvuk+otrov	2,89 $\pm 0,49$	2,84 $\pm 0,98$	2,82 $\pm 1,33$	3,33 $\pm 0,82$

⁺ n = 7-8 (broj životinja)

⁺⁺ = \pm SD (standardna devijacija)



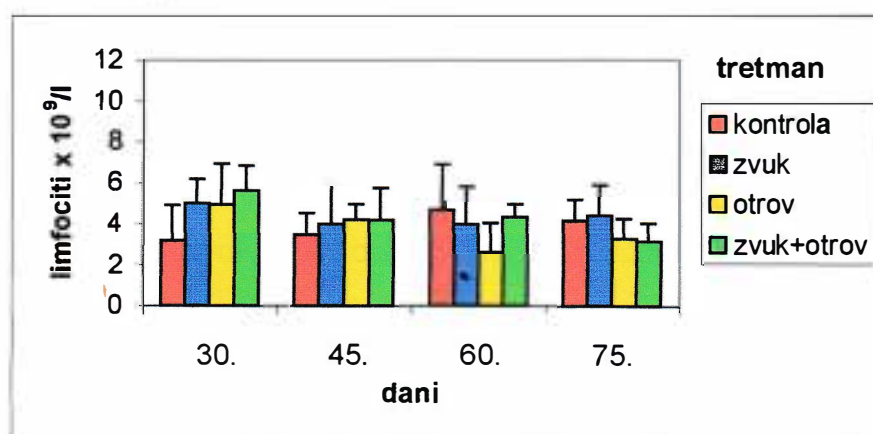
Slika 18. Grafički prikaz promjena broja limfocita u mužjaka pokusnih skupina miševa 30., 45., 60. i 75. dan od početka pokusa

Tablica 28. Srednja vrijednost promjena broja limfocita ($\times 10^9/l$)⁺⁺ u ženki pokusnih skupina miševa⁺ 30., 45., 60. i 75. dan od početka pokusa

tretman	broj limfocita ($\times 10^9/l$) u krvi			
	30. dan	45. dan	60. dan	75. dan
kontrola	3,19 $\pm 1,71$	3,47 $\pm 1,04$	4,68 $\pm 2,23$	4,16 $\pm 1,02$
zvuk	5,01 $\pm 1,17$	3,98 $\pm 2,00$	4,00 $\pm 1,80$	4,42 $\pm 1,47$
otrov	4,95 $\pm 2,00$	4,19 $\pm 0,75$	2,66 $\pm 1,41$	3,28 $\pm 0,97$
zvuk+otrov	5,63 $\pm 1,23$	4,17 $\pm 1,56$	4,34 $\pm 0,62$	3,17 $\pm 0,86$

⁺ n = 7-8 (broj životinja)

⁺⁺ = \pm SD (standardna devijacija)



Slika 18. Grafički prikaz promjena broja limfocita u ženki pokusnih skupina miševa 30., 45., 60. i 75. dan od početka pokusa

Tablica 29. Statistička značajnost ovisnosti broja neutrofila pokusnih životinja obzirom na faktore pokusa

faktori	DKS / limfociti
Tretman	<0,0001 ***
Spol	0,0891 ns
T x S	0,0059 **

ns = razlika nije statistički značajna; * p<0,05 ; **p<0,01 ; ***p<0,001

Tablica pokazuje da promjena broja limfocita kod životinja **značajno** (uz **p < 0,0001**) ovisi o tretmanu. Promjena broja limfocita primjenom pojedinog tretmana **značajno** je (uz **p = 0,0059**) ovisna o Interakciji tretmana i spola.

Tablica 30. Statistička značajnost promjene broja limfocita obzirom na tretman

tretman	DKS - limfociti
otrov : kontrola	<0,0001 ***
zvuk : kontrola	0,2584 ns
zvuk +otrov : kontrola	0,0269 *
zvuk : otrov	0,0142 *
zvuk +otrov : otrov	0,1561 ns
zvuk +otrov : zvuk	0,7291 ns

ns = razlika nije statistički značajna; * p<0,05 ; **p<0,01 ; ***p<0,001

U ovoj tablici uočava se statistički **značajna** (uz **p < 0,0001**) promjena u promjeni broja limfocita kod životinja koje su bile tretirane otrovom u odnosu na kontrolu. Grupa zvuk + otrov pokazuje **značajan** (uz **p = 0,0269**) učinak naspram kontrole. Pažnju treba obratiti i na **značajne** (uz **p = 0,0142**) međudnose grupa životinja koje su bile tretirane samo zvukom u odnosu na tretirane samo otrovom.

Tablica 31. Statistička značajnost promjene broja limfocita u mužjaka obzirom na tretman

tretman	DKS - limfociti
otrov : kontrola	0,0169 *
zvuk : kontrola	0,9997 ns
zvuk +otrov : kontrola	1,0000 ns
zvuk : otrov	0,0447 *
zvuk +otrov : otrov	0,0070 **
zvuk +otrov : zvuk	0,9933 ns

ns = razlika nije statistički značajna; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Promjena broja limfocita kod mužjaka je **značajna** (uz $p = 0,0169$) u odnosu grupe tretirane sa otrovom i kontrolne grupe. Statistički **značajnost** pokazuju (uz $p = 0,0447$) odnosi grupa tretiranih zvukom naspram otrova dok grupa zvuk + otrov pokazuje **značajnost** (uz $p = 0,0070$) naspram otrovu.

Tablica 32. Statistička značajnost promjene broja limfocita u ženki obzirom na tretman

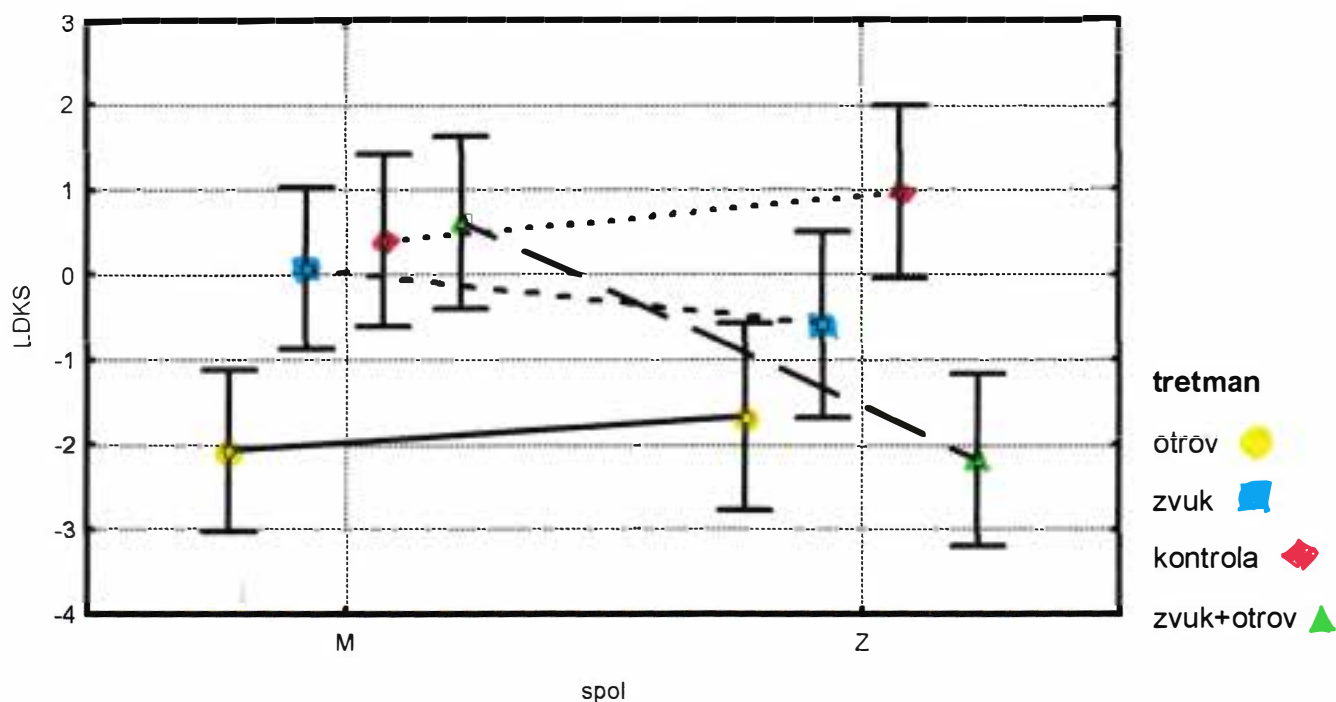
tretman	DKS - limfociti
otrov : kontrola	0,0184 *
zvuk : kontrola	0,4298 ns
zvuk +otrov : kontrola	0,0014 **
zvuk : otrov	0,8553 ns
zvuk +otrov : otrov	0,9967 ns
zvuk +otrov : zvuk	0,4034 ns

ns = razlika nije statistički značajna; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Kod ženki, promjena broja limfocita je **značajna** (uz $p = 0,0184$) u odnosu grupe tretirane sa otrovom i kontrole. Statistički **značajnost** pokazuje (uz $p = 0,0014$) odnos grupe zvuk + otrov naspram kontroli.

LIMFOCITI OVISNOST TRETMANA O SPOLU

F= 4.6981, p= 0,00590



Slika 19. Usporedni grafikon promjene broja limfocita u ovisnosti o tretmanu u mužjaka (M) i ženki (Ž) od početka do kraja pokusa (75. dan)

Promjena razlike broja limfocita na početku i na kraju mjerenja pojedinog tretmana **značajno** je (uz $p = 0,0059$) ovisna o spolu. Primjenom otrova ($p = 0,0184^*$, $p < 0,05$), a posebice tretman zvukom i otrovom ($p = 0,0014^{**}$, $p < 0,01$) ženke su pokazale veći pad u broju limfocita. Kod mužjaka skupina tretirana samo otrovom pokazuje statistički značajni pad ($p = 0,0169^*$, $p < 0,05$) u broju limfocita.

5. RASPRAVA

Prije svega valja napomenuti kako raznovrsnost interakcija u neuroendokrinologiji te drugi mehanizmi mogu pridonijeti promijeni imunološkog sustava kao posljedice stresa ili depresije. Postoji dvosmjerna komunikacija između imunološkog i neuroendokrinog sustava (7). Međustanična komunikacija između ova dva sustava primarno je posredovana od strane hormona i neuropeptida koji dosežu limfoidne organe i stanice preko vaskularnog sustava ili direktno preko autonomnih veza između živčanih završetaka i limfoidnih organa. Limfoidne stanice imaju mnoga receptorska mjesta za hormone i neuroprijenosnike, koji su identični onima u središnjem živčanom sustavu (9, 10, 11). Brojne molekule koje proizvode stanice živčanog sustava (16), kao na primjer adrenokortikotropni hormon (ACTH), prolaktin (PRL), hormon rasta (GH), tireotropin (TSH), dinorfin, dopamin i ostale imaju sposobnost moduliranja imunološke funkcije. Tijekom limfocitne aktivacije, limfoidne stanice mogu proizvesti hormonske tvari poput onih koje luči hipofiza, kao na primjer ACTH, TSH, GH, PRL, gonadotrophin, i β endorfin.

Kako bi se dobio bolji uvid u rezultate ovog pokusa zbirno su prikazani na tablici 33.

Tablica 33. Statistička značajnost ovisnosti promatranih parametara pokusnih životinja obzirom na faktore pokusa

	težina	eritrociti	leukociti	DKS (neutrofili)	DKS (limfociti)
tretman	< 0,0001***	0,0003***	0,0107*	0,4474 ns	< 0,0001***
Spol	0,8241 ns	0,7917 ns	0,0304*	0,2181 ns	0,0891 ns
T x S	0,0003***	0,1788 ns	0,0035**	0,0281 *	0,0059**

ns = razlika nije statistički značajna; * p<0,05 ; **p<0,01 ; ***p<0,001

Učinak tretmana je signifikantan za promjenu tjelesne težine, broj eritrocita, broj leukocita i broj limfocita.

Učinak spola je signifikantan samo za broj leukocita, dok je interakcija tretmana i spola signifikantna za promjenu tjelesne težine, broj leukocita te broj neutrofila i limfocita.

Dobiveni rezultati se većim dijelom poklapaju sa rezultatima do sada objavljenih radova o utjecaju zvučnog stresa na imunološki sustav, iako valja napomenuti da je ključni rad (8) na kojeg se pozivamo rađen samo sa mužjacima. Možda je to upravo zato što je rezultate kod ženki jako teško smisljeno interpretirati.

Analiza podataka i rezultata opisanih pokusa pokazuje različitu osjetljivost krvne slike na otrov lindan i pokušaj ublažavanja tih posljedica terapijom zvukom u mužjaka i ženki miševa.

Naime, u mužjaka je vidljivo kako skupina miševa u istovremenom tretmanu zvukom i otrovom ima pozitivan učinak na sve promatrane parametre razlike početnog i završnog mjerenja osim na broj eritrocita. Još je važnije zapažanje da kombinirani tretman zvukom i otrovom u usporedbi sa skupinom tretiranih miševa samo s otrovom pokazuje statistički porast u svim parametrima osim u broju eritrocita (tablice 8, 14, 20, 26 i 31). Također ovi rezultati su pokazali da tretman zvukom ima negativan učinak na krvnu sliku, ali ne i na težinu. Naime, mužjaci izloženi samo zvuku dobili su na težini ($p = 0,0404^*$, $p < 0,05$).

Dakle, vidljivo je da ritmična tonska stimulacija (tretman zvukom) kao pojedinačan čimbenik na mužjake djeluje kao umjereni negativni stresor. Zanimljivo je da primjenom kombiniranog tretmana ritmične tonske stimulacije i otrova lindana (tretman zvukom i otrovom), za koji je dokazano da djeluje imunohepatotoksično, nastupa zamjetan pozitivan učinak kako na težinu tako i na broj stanica leukocitne loze (neutrofili i limfociti) u mužjaka. To pokazuje kako u slučaju primjene kombiniranog tretmana, u mužjaka, zvuk ima učinak pozitivnog stresora. Proizlazi kako su mužjaci ukupno senzibilniji na izlaganje stresorima bilo da oni djeluju pozitivno ili negativno.

Rezultate za ženke iščitavamo u tablicama 9, 15, 21, 27 i 32. Prije svega valja naglasiti da za razliku od mužjaka kombinacija tretmana zvukom i otrovom u odnosu prema kontroli pokazuje tendenciju smanjenja težine i krvne slike, uz visoku statističku značajnost razlika samo kod eritrocita i limfocita. Nadalje, rezultati pokazuju da tretman zvukom ima učinak smanjenja u svim mjeranim parametrima osim u težini gdje je kod skupine ženki koje su bile izložene samo zvuku utvrđen blagi, ali statistički neznačajan dobitak na težini koji je bio nešto veći nego kod kontrolne skupine. Dakle, može se ustvrditi da tretman zvukom kao samostalan

tretman kod ženki djeluje stresno negativno na krvnu sliku, ali ne i na promjenu težine. Međutim, za razliku od mužjaka, broj eritrocita i limfocita u skupini ženki tretiranih kombinacijom ritmičke tonske stimulacije i otrova lindana pokazuju statistički značajan pad.

Obzirom na brojne interakcije koje su prisutne kod psiho-neuro-endokrino-imunoloških odgovora teško je na osnovu promatranih parametara i dobivenih rezultata precizno odrediti mehanizme kojim ritmička tonska stimulacija djeluje na imunohematopoetski sustav. Također treba obratiti pažnju na razlike u imunološkom odgovoru kod ženki i mužjaka. Ova razlika najvjerojatnije ima svoje korijene u razlikama fiziološko-endokrinih sustava ženki i mužjaka, kao i razlikama u građi i funkciji mozga (3,12,13,14,19). Evolucijski, potrebno je da ženke budu manje podložne različitim stresorima zbog održavanja trudnoće i produljenja vrste.

Ipak, kod oba spola načelno se može ustvrditi kako najvjerojatnije postoji aktivacija anaboličkog sustava što dovodi do povećanja tjelesne težine, a što je posebice izraženo kod mužjaka tretiranih zvukom. No za potvrdu vjerodostojnosti te tvrdnje trebalo bi određivati razine neuroprijenosnika i hormona (hormon rasta, TSH, glukagona i drugih) duž osovine hipotalamus-hipofiza-endokrine žlijezde.

Tretman subletalnom dozom otrova kroz 75 dana djelovao je na gubitak težine mnogo izražajnije kod mužjaka negoli kod ženki. Skupina miševa tretirana samo zvukom je dobila na težini. Očito je otrov imao negativan, a zvuk pozitivan učinak u dobivanju na težini. Sinergizam dvaju čimbenika tretmanom zvukom i otrovom je pokazao poništavanje negativnih posljedica trovanja lindanom.

Promjene broja leukocita u ovom pokusu, na početnom i završnom mjerenju, upućuju da je ukupno gledajući došlo do boljeg oporavka leukocitne loze kod mužjaka u odnosu na ženke. Najveće povećanje broja leukocita u odnosu na kontrolnu skupinu je u mužjaka tretiranih zvukom i otrovom. Nasuprot njima ženke koje su tretirane zvukom i otrovom su imale najveći pad u broju leukocita. Iz ovih podataka se vidi kako kombinacija zvukom i otrovom ima sasvim suprotno djelovanje ovisno o spolu tretiranih životinja. Kod mužjaka je učinak pozitivan, a u ženki negativan.

Analiza broja limfocita u perifernoj krvi pokusnih životinja pokazuje istu tendenciju promjena u mužjaka s ukupnim brojem leukocita. Ženke, naprotiv pokazuju statistički značajan pad u broju limfocita, osim kombinacijom zvukom i otrovom.

Kod broja neutrofila nije bilo značajnih statističkih razlika.

U dostupnoj literaturi nisu nađeni znanstveni radovi u kojima su promatrane promjene u broju eritrocita nakon stimulacije pokusnih životinja na glazbu ili ritam. S obzirom da eritrocitna krvna loza nije direktno povezana sa mehanizmima unutar psiho–neuro–endokrino–imunološke osi za pretpostaviti je da se ne bi trebale javljati veće promjene u broju eritrocita, što je i potvrđeno u rezultatima ovoga pokusa. Pokus je dao samo jedan statistički značajan pad rezultata kod ženki tretiranih kombinacijom zvukom i otrovom. Ta skupina je i kod mužjaka pokazala najveći pad u broju eritrocita, a pretpostavka je kako je najveću ulogu u njihovom padu ipak imao otrov lindan, koji je poznat kao hematotoksičan.

Slični rezultati dobiveni su u neuroimunološkom laboratoriju farmakološkog odjela Sveučilišta u Santiago de Compostela, Španjolska pod vodstvom dr. Freire-Garabala i suradnika (8). Navedeni znanstven su izučavali utjecaj glazbe na imunološki odgovor i razvoj tumora u glodavaca. U BALB/c miševa su praćeni: staničnost timusa i slezene, populacija perifernih T limfocita, proliferativni odgovor stanica slezene na mitogen konkalina A i aktivnost NK stanica. Sprague Dawley štakori su bili injektirani s Walkerom 256 karcinosarkoma stanicama; 8 dani kasnije štakori su žrtvovani. Makroskopski su bili izbrojeni metastatički čvorića na površini plućnih krila. Glazba je smanjila broj i razvoj plućnih metastaza. Glazba je istovremeno povećala imunološku sposobnost i protu-tumorski odgovor u pokusnih glodavaca. Podaci ovog pokusa ukazuju kako glazba može pozitivno stimulirati imunološki sustav i time umanjiti negativne učinke metastaziranja tumora. Dakako, ovo su prvi koraci koji polako vode ka uvođenju glazbe kao nefarmakološkoj komponenti liječenja uz medicinski tretman, no predstoji još mnogo mukotrpnog rada i istraživanja na području utjecaja različitih sastavnih dijelova glazbe kako bi se to omogućilo.

Većina dosadašnjih istraživanja je rađena samo na mužjacima te je stoga potrebno još više produbiti saznanja o različitosti među spolovima na psiho-neuro-hormonalnoj razini.

Rezultati ovdje opisanih pokusa ukazuju kako i sama ritmična tonska stimulacija ima određeni pozitivan utjecaj na oporavak hematopoetskog i imunološkog sustava miševa intoksiciranih otrovom koji djeluje toksično na njihov imuno-hematopoetski sustav i opći metabolizam. Moguće primjene rezultata ovog pokusa u ljudi u prvom redu odnose se na primjenu zvukova/glazbe kod imuno-kompromitiranih pacijenata, a posebice kad se javlja potreba bržeg oporavka imuno-hematopoetskog sustava bilo uslijed posljedica bolesti ili provođenja terapije.

6. ZAKLJUČAK

Istraživanjem utjecaja ritmičke tonske stimulacije i promatranih hematoloških parametara miševa intoksiciranih hematotoksičnim otrovom lindanom na promjene tjelesne težine izvedeni su ovi zaključci:

- Ritmična tonska stimulacija od 152 otkucaja u minuti uz standardiziranu frekvenciju od 440 Hz (tretman zvuk) uzrokuje porast promjena težine u oba spola. U kombinaciji sa lindanom zvuk potiče imuno-hematopoetski sustav u mužjaka nasuprot pada vrijednosti hematoloških parametara u ženki.
- Postoje značajne razlike djelovanja tretmana zvukom s obzirom na spol. Mužjaci su se pokazali općenito senzibilniji kako na pozitivne tako i negativne stresore kao što je lindan koji uzrokuje statistički značajan pad u težini te broju leukocita i limfocita.
- Tretman zvukom oporavlja imunološki sustav kod mužjaka, dok je kod ženki opažen manji učinak oporavka.
- Kod mužjaka tretman zvukom djeluje pozitivno na tjelesnu težinu uz statističku značajnost od $p=0,0404^*$, $p<0,05$.
- Lindan uzrokuje statistički značajan gubitak tjelesne težine u mužjaka uz $p=0,0378^*$, $p<0,05$.
- Kombinacija aplikacije zvuka i lindana kod mužjaka pokazuje statističku značajnost u oporavku težine ($p=0,0023^{**}$, $p<0,01$), te broja leukocita ($p=0,0031^{**}$, $p<0,01$) i broja limfocita ($p=0,0070^{**}$, $p<0,01$) u odnosu na skupinu miševa tretiranih lindanom. Dakle, zvučni tretman ima učinak u poticanju imuno-hematopoeze kod narušenog imunohematološkog sustava.

7. LITERATURA

1. ADER R, COHEN N, FELTEN D. (1995.) Psychoneuroimmunology: Interactions between the nervous system and the immune system. *Lancet*, 345, str. 99-103.
2. CARLSON, NEIL R. (1994.) *Physiology of Behavior. A Division of Paramount Publishing.* 5th Ed, Needham Heights, MA, USA
3. DIAMOND, MARIAN C., (1988.) Enriching heredity. The Impact of the Enviroment on the Anatomy of the Brain. *The Free Press. A Division of Macmillan, Inc.* New York
4. DILEO, CHERYL (1999.) Music Therapy and Medicine: Theoretical and Clinical Applications. *The American Music Therapy Asociation, Inc.*
5. GLASER, RONALD i KIECOLT-GLASER, JANICE (1998) Stress-associated immune modulation: Relevance to Viral Infections and Chronic Fatigue Syndrome. *The American Journal of Medicine*, 105 str. 35-42
6. GLASER, R; RABIN, B; CHESNEY, M. i suradnici (1999.) Stress-induced immunomodulation. Implications for infectious diseases? *JAMA* 281(24) str. 2268-2270.
7. KAPLAN, ARLINE (1999.) Implications of Stress, Psychosocial Factors on the Immune System. *Psychiatric Times*, Vol. 16, Issue 10
8. NÚÑEZ, MARÍA J.; MAÑÁ, PAULA; LIÑARES, DAVID; RIVEIRO, MARÍA P.; BALBOA, JOSÉ; SUÁREZ-QUINTANILLA, JUAN ; MARACCHI, MÓNICA; MÉNDEZ, MANUEL REY; LÓPEZ , JOSÉ M.; FREIRE-GARABAL, MANUEL. (2002.) Music, immunity and cancer. *Life Scieces*, Volume 71, Issue 9 str. 1047-1057
9. PERT, CANDANCE B.; SNYDER, SOLOMON H. (1973.) "Opiate Receptor: Demonstration in Nervous Tissue." *Science* 179
10. PERT, CANDANCE B. i suradnici (1985.) "Neuropeptides and Their Receptors: A Psychosomatic Network." *Journal of Immunology* 135, No. 2
11. PERT, CANDANCE B. i suradnici (1986.) " Octapeptides deduced from the neuropeptide receptor-like pattern of antigen T₄ in brain potently inhibit

- human immunodeficiency virus receptor binding and T-cell infectivity." *Proceedings of the National Academy of Science USA* 83, pp 1034-1036
12. RAUSHER, FRANCES H.; ROBINSON, DESIX K.; JENS, JASON J. (1998.) Improved maze learning through early music exposure in rats. *Neurological Research*, Volume 20
 13. RAUSHER, FRANCES H. and SHAW, GORDON L. (1998.) Key components of the Mozart effect. *Perceptual and Motor Skills* 86, 835-841.
 14. RAUSHER, FRANCES H.; SHAW, GORDON L.; KY, KATHERINE N. (1995.) Listening to Mozart enhances spatial-temporal reasoning: towards a neurophysiological basis. *Neuroscience Letters* 185, 44-47.
 15. ROBERTSON, PAUL (1996.) Music and the mind. *Channel 4 Television*, London
 16. RUFF, MICHAEL; PERT, CANDACE B. (1986.) "Neuropeptides Are Chemoattractants for Human Monocytes and Tumor Cells: A Basis for Mind-Body Communication." In *Enkephalines and Enorphins: Stress and the Immune System*, edited by Nicholas P. Plotnikoff, et al. New York: Plenum Publishing Corporation
 17. Priručnik za vježbe iz fiziologije čovjeka (1990.) *JUMENA*, Zagreb
 18. SALK, LEE (1960.) Effects of normal heart beat sound on the behavior of the new-born infant: implications for mental health. *World Mental Health*, 12, 168-175.
 19. SARNTHEIN, JOHANNES; von STEIN, ASTRID; RAPPELSBERG, PETER; PETCHE, HELLMUTH; RAUSHER, FRANCES H.; SHAW, GORDON L. (1997.) Persistent patterns of brain activity: An EEG coherence study of the positive effect of music on spatial-temporal reasoning. *Neurological Research*, Volume 19
 20. SAS Institute, Inc. (1989.) *SAS/STAT® User's Guide, Version 6, Fourth Edition*, Volume 1 (943 pp) & 2 (846 pp), Cary, N.C: SAS Institute Inc.
 21. SCHERMER, SIGMUND (1986.) Die Blutmorphologie der Laboratoriumstiere. *Springer Verlag*, Berlin

22. SCHRECKENBERG, GERVASIA M.; BIRD, HARVEY H. (1987.) Neural plasticity of MUS musculus in response to disharmonic sound. *Bull. New Jersey Acad. Sci.*, Vol. 32, No. 2. str. 77-86
23. SCHROEDER, LYNN; OSTRANDER, SHEILA (1994.) Super-learning 2000. *Dell Publishing*, New York, str. 96-97
24. SOKAL, RR i ROHLF, FJ. (1994.) Biometry: The Principles and Practice of Statistics in Biological Research. *WH Freeman & Co.*
25. SPRINGER, OSKAR; ROŽIĆ, MIROSLAV; ŠKRINJAR, LJUBOMIR; GRGIĆ, ZVONIMIR. (1986.) Comparative response of mice to insecticide lindane , dinitro-butyl-phenol, and parathion. *Periodicum Biologorum*, Vol.88, Supp. 1, 139-140.
26. van ZUTPHEN, L. F. M.; BAUMANS, V.; BEYNEN, A. C. (1993.) Principles of Laboratory Animal Science. A contribution to the human use and care of animals and to the quality of experimental results. *Elsevier*, Amsterdam, London, New York, Tokyo
27. WILIAMS, CHRISTINE S. F.(1976.) Practical guide to Laboratory animals. *The C. V. Mosby Company*, Saint Louis
28. podaci o povijesti metronoma na <http://www.franzmfg.com/history.htm> i <http://www.dolmetsch.com/musictheory5.htm>
29. podaci o lindanu na:
<http://pmep.cce.cornell.edu/profiles/inset-mite/fenilthrotion-methylpara/lindane/indeks.html>
30. članak iz psihoneuroimunologije na:
www.serendip.brynmawr.edu/bb/neuro/neuro00/web1/indeks.html

