

HALAK AMINOTRANSZFERÁZ ENZIMEI: ÉRZÉKENY INDIKÁTOROK

KÖRNYEZETI HATÁS OKOZTA SZERVKÁROSODÁS KIMUTATÁSÁRA

Egyetemi doktori értekezés

Orbán László

Témavezető:

dr. Nemcsók János

egyetemi adjunktus

József Attila Tudományegyetem

Biokémiai Intézete

- 1983 -





## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton is köszönetet mondok:

- dr. Nemcsók János egyetemi adjunktusnak, hogy munkámat irányította, annak feltételeit maradéktalanul megteremtette és dolgozatom megírását észrevételeivel segítette
- dr. Szajáni Béla címzetes egyetemi docensnek, a biológiai tudományok kandidátusának, hogy az enzimtisztítási rész munkáit irányította és gyakorlatias, hasznos tanácsaival ezirányu felkészültségemet gyarapította
- Prof. Dr. Boross Lászlónak, hogy a vezetése alatt álló intézetben dolgozatom elkészülését lehetővé tette
- dr. Buzás Zsuzsanna egyetemi tanársegédnek problémáim megoldásához nyújtott segítségéért és a dolgozat hibáinak kijavításáért
- kollégáimnak segítségükért
- Szák Kocsis Mária asszisztensnek a kísérletek során végzett pontos, lelkiismeretes munkájáért, az ábrák gondos megrajzolásáért
- Brulichné Balázs Ágnes és F. Vadadi Lászlóné asszisztenseknek a kísérletes munkában nyújtott segítségükért
- mindazoknak, akik a dolgozat létrejöttét valamilyen módon segítették



## TARTALOMJEGYZÉK

|      |                                                                                                                                 |     |
|------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 1.   | BEVEZETÉS.....                                                                                                                  | 1.  |
| 2.   | IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....                                                                                                        | 4.  |
| 2.1. | A felhasznált hatóanyagok jellemzése.....                                                                                       | 4.  |
| 2.2. | Az aszpartát aminotranszferáz és az alanin ami-<br>notranszferáz enzimek jellemzése.....                                        | 27. |
| 3.   | ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....                                                                                                       | 37. |
| 3.1. | Felhasznált anyagok.....                                                                                                        | 37. |
| 3.2. | Kísérleti állatok.....                                                                                                          | 37. |
| 3.3. | Szállítási és tartási körülmények.....                                                                                          | 38. |
| 3.4. | Az alkalmazott kezelések.....                                                                                                   | 38. |
| 3.5. | Az önkontrollos módszer.....                                                                                                    | 39. |
| 3.6. | Vérvétel.....                                                                                                                   | 40. |
| 3.7. | A vérplazma tárolása.....                                                                                                       | 41. |
| 3.8. | Az aminotranszferáz enzimek aktivitásának méré-<br>se.....                                                                      | 42. |
| 3.9. | A fehérjetartalom meghatározása.....                                                                                            | 45. |
| 4.   | AZ EREDMÉNYEK ISMERTETÉSE ÉS ÉRTÉKELÉSE.....                                                                                    | 47. |
| 4.1. | IN VIVO növényvédőszer kezelések szervkárosító<br>hatása halakra.....                                                           | 47. |
| 4.2. | Az általunk kifejlesztett enzimdiagnosztikai<br>tesztrendszer in natur alkalmazása halpusz-<br>tulás okainak felderítésére..... | 65. |
| 4.3. | Az aszpartát aminotranszferáz enzim tisztítása<br>ponty májból.....                                                             | 67. |



|      |                                                                                                |      |
|------|------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 4.4. | A megtisztított izoenzimek jellemzése.....                                                     | 85.  |
| 5.   | ÖSSZEFOGLALÁS.....                                                                             | 93.  |
| 6.   | A DOLGOZATBAN HASZNÁLT RÖVIDÍTÉSEK.....                                                        | 95.  |
| 7.   | A FELHASZNÁLT IRODALOM JEGYZÉKE.....                                                           | 97.  |
| 8.   | A DOKTORI ÉRTEKEZÉS ANYAGÁBÓL ELHANGZOTT ELŐADÁ-<br>SOK ÉS MEGJELENT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE..... | 111. |

## 1. BEVEZETÉS

Napjaink mezőgazdaságának egyik legégetőbb problémája: hogyan lehetne még tovább növelni a termésátlagokat a növénytermesztésben. A gépesítés és az új fajták nemesítése mellett igen fontos szerepet szánnak a szakemberek az egyre nagyobb mennyiségben alkalmazott növényvédőszereknek.

A peszticidek termelésének és alkalmazásának ilyen hatalmas mérvű fejlődését azonban nem követte kielégítő módon a környezet szennyezését megakadályozó technológiák és berendezések fejlesztése, ill. a növényvédőszereket alkalmazó mezőgazdasági munkások megfelelő szintű képzése. Ennek eredményeképpen ugrásszerűen megszorodtak a peszticid-mérgezésekről szóló jelentések.

A kemikáliák szennyező hatása legdrasztikusabban a vízi ökoszisztémák stabilitását fenyegeti, hiszen a növényvédőszeres és gyártási melléktermékek legnagyobb része a vízben jól oldódó vegyületek közé tartozik. A vízben élő állatok - köztük a halak is - légzőszerveiken átszűrve a vizet, a benne oldott szennyező ágenseket döbbenetes mértékben feldusítják szervezetükben /Gakstatter, 1968; Yamamoto és mtsai, 1977/, ennek következtében anyagcseréjük normális

menete felborul, idegrendszerük károsodik, stressz-állapotba kerülnek, súlyosabb esetekben elpusztulnak. Ahhoz, hogy a pusztulás ill. a szubletális károsodás közvetlen okát és pontos mechanizmusát meg lehessen határozni, új megközelítési módot és a hal-toxikológiában eddig ismeretlen módszereket kellett alkalmazni.

Az orvostudomány egyik ága, a klinikai enzimológia már évtizedek óta sikeresen használja bizonyos vérszérum-enzimek aktivitásának mérését arra a célra, hogy egyes betegségeket még lappangó fázisukban felderítsen ill. adatokat szolgáltatasson a vizsgált szervezet pillanatnyi állapotáról. Ez adta az ötletet, hogy megpróbáljuk a szérumból történő enzim-analízis módszereit adaptálni a hal-toxikológiába és a kísérlet sikeresnek bizonyult /Bell, 1968; Kristofferson és mtsai, 1974; Racicot és mtsai, 1975/. A fentiek figyelembe vételével 1979-ben megalakult munkacsoportunk kettős célt tűzött maga elé:

1. Olyan érzékeny és viszonylag egyszerűen mérhető enzimológiai jelzőrendszer kidolgozása, és bevezetése a hazai gyakorlatba, melynek segítségével a kedvezőtlenül megváltozott környezeti tényezők okozta károsodások halakból gyorsan és pontosan kimérhetők.
2. A mezőgazdaságban nagy mennyiségben alkalmazott



vizoldékony növényvédőszeres károsító hatásának  
tesztelése ezen jelzőrendszer alkalmazásával ha-  
zai haszonhalainkon /ponty/*Cyprinus carpio* L./,  
fehér busa/*Hypophthalmichthys molitrix* V./,harcsa  
/*Silurus glanis* L./.

A csoporton belül az általunk választott szűkebb vizsgálá-  
ti terület a szervkárosodások kimutatása volt az amino-  
transzferáz enzimek tanulmányozásának segítségével.

Kísérleteink során *in vivo* növényvédőszeresekkel ke-  
zelt és kontroll halak szérumának aminotranszferáz enzim-  
aktivitásait hasonlítottuk össze; megtisztítottuk és jel-  
lemeztük az aszpartát aminotranszferáz /ASAT, E.C.2.6.1.1./  
enzimet, és megvizsgáltuk, hogyan befolyásolja annak akti-  
vítását a kiválasztott növényvédőszeresekkel történt in vitro  
kezelés.

## 2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

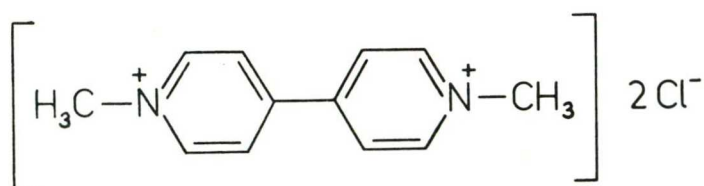
### 2.1. A felhasznált hatóanyagok jellemzése

#### 2.1.1. A paraquat

##### 2.1.1.1. Felfedezése

A kvaterner ammónium vegyületek toxicitását régen felismerték, a csoport néhány tagját -igy például a cetyl-trimetilammónium-bromidot - baktericid tulajdonságuk miatt fertőtlenítőszerként használták. Később észrevették, hogy a gombákra is igen erősen toxikusak, ilyen irányu gyakorlati felhasználásukat azonban lehetetlenné tette az a tény, hogy rövid idő alatt kiszáritották a gazdanövényt /Metcalf,1971/.

E felfedezés nyomán indult meg a kutatómunka az ICI-ban, melynek eredményeként 1958-ban bemutatták a bipyridilium herbicidek mindmáig legjelentősebb képviselőjét, a paraquatot /PQ/.



1. ábra Paraquat-diklorid

/1,1'-dimetil-4,4'-bipiridilium-diklorid/

2.1.1.2. Hatásmechanizmusa növényekben

A PQ vízben nagyon jól oldódik, majdnem teljesen ionokra disszociál. A pozitív töltésű PQ-ion a növénybe bejutva a fotoszintetikus elektrontranszport gátlása révén fejti ki toxikus hatását. Mivel erős elektronakceptor, kompetitive gátolja a ferredoxin redukcióját azáltal,

hogy elvonja az elektronokat az I. fotoszintetikus rendszerből, s így megakadályozza a NADPH képződését /Varga, 1980/. A fenti folyamatban a PQ-ion viszonylag stabil, vizoldékony szabadgyökké redukálódik - ezt a reakciót izolált növényi kloroplasztokban is sikerült bemutatni - /Kearney és Kaufmann, 1975/.

Oxigénhiány esetén ezek a szabadgyökök meglehetősen stabilak, oxigén jelenlétében azonban gyökionokká redukálódnak, melyek azonnal visszaoxidálódnak folyamatos hidrogén-peroxid képződés mellett. A PQ esetében általában a hidrogén-peroxidot tekintik aktiv fitotoxikus ágensnek, bár lehetséges, hogy más ideiglenes gyök-intermedierek is résztvesznek a herbicid hatás kifejtésében. A hidrogén-peroxid a sejtmembránt alkotó lipidek peroxidációja révén pusztítja a növényt.

#### 2.1.1.3. Toxicitása gerincesekre

A PQ toxicitása jelentősen függ az állatfajtól, fajtától és kortól. / I. táblázat /  
Hoffman és Eastin /1982/ tőkés récék előkeltetett tojásait PQ tartalmu oldatba mártva, majd tovább keltetve megállapították, hogy a herbicid már a mezőgazdasági

felhasználásra ajánlott koncentráció felénél csökkenti az embriók növekedését, embriótoxikus, sőt teratogén hatása.

1. Táblázat A paraquat toxicitása különböző állatfajokra / Manzo és mtsai, 1979 /

| Faj           | Kezelési mód | LD <sub>50</sub> /mg kg/ |
|---------------|--------------|--------------------------|
| patkány       | szájon át    | 95-143                   |
| patkány       | hasüregbe    | 33,5                     |
| egér          | hasüregbe    | 30,0                     |
| tengeri malac | szájon át    | 22,0                     |
| tengeri malac | hasüregbe    | 3,0                      |
| nyul          | hasüregbe    | 18,0                     |
| macska        | szájon át    | 35,0                     |
| szarvasmarha  | szájon át    | 35-50                    |
| majom         | szájon át    | 50                       |
| ember         | szájon át    | 4-40                     |

Emlősökben a PQ mind az intakt bőrön, mind a bélén keresztül nagyon gyengén szívódik fel - utóbbi esetben



maximum a lenyelt dózis 5 %-a - /Conning és mtsai, 1969/, azonban a szövetekben már 1 mg/kg PQ jelenléte letális lehet / Fisher és mtsai, 1971 /. A vérbe került PQ a plazmafehérjékhez gyengén kötődik, a vérben szabad formában kering, gyorsan eljut a szövetekbe /Conning és mtsai, 1969/, ahonnan a felszívódott dózis nagy része 48 órán belül kiürül, 20-30 %-a azonban a szövetekben marad - főként a tüdőben - és csak 2-3 hét alatt távozik el /Fisher és mtsai, 1971/.

Rose és mtsai /1977/ különböző állatfajokból és emberből származó tüdőszleteket PQ tartalmu közegben inkubálva megállapították, hogy a hatóanyag aktivan koncentráliódik az alveolusok epitheliális sejtjeiben egy energiafüggő mechanizmus révén, melyet a noradrenalin, az 5-hidroxi-triptamin és bizonyos hisztamin-antagonisták gátolnak.

Ross és Krieger /1979/ patkányokban subcutan PQ injekció hatására a következő mérgezési tüneteket figyelték meg: anoxia, tüdőödéma, veseelégtelenség, szívmegállás, fokozott érzékenység illetve a prosztaglandin és vércukorszint megváltozása. Ezekből a jelekből megállapítható, hogy a PQ-nak a tüdő elsődleges, de

nem egyedüli célszerve, hiszen jelentős mértékben károsította a szívet, a májat, a vesét és a mellékveséket. A mérgezési tünetek kialakulásának sorrendjét vizsgálva Fairchter és Wilson /1975/ megállapították, hogy a máj és a vese átmeneti működési zavara tapasztalható először, majd a tüdő tipikus pathológiás léziója, és az ennek következtében kialakuló légzési elégtelenség, mely a legtöbb esetben pusztuláshoz vezet. Jelenlegi ismereteink szerint a PQ-nak nincs adekvát antidotuma.

#### 2.1.1.4. Hatásmechanizmusa emlősökben mérgezésnél

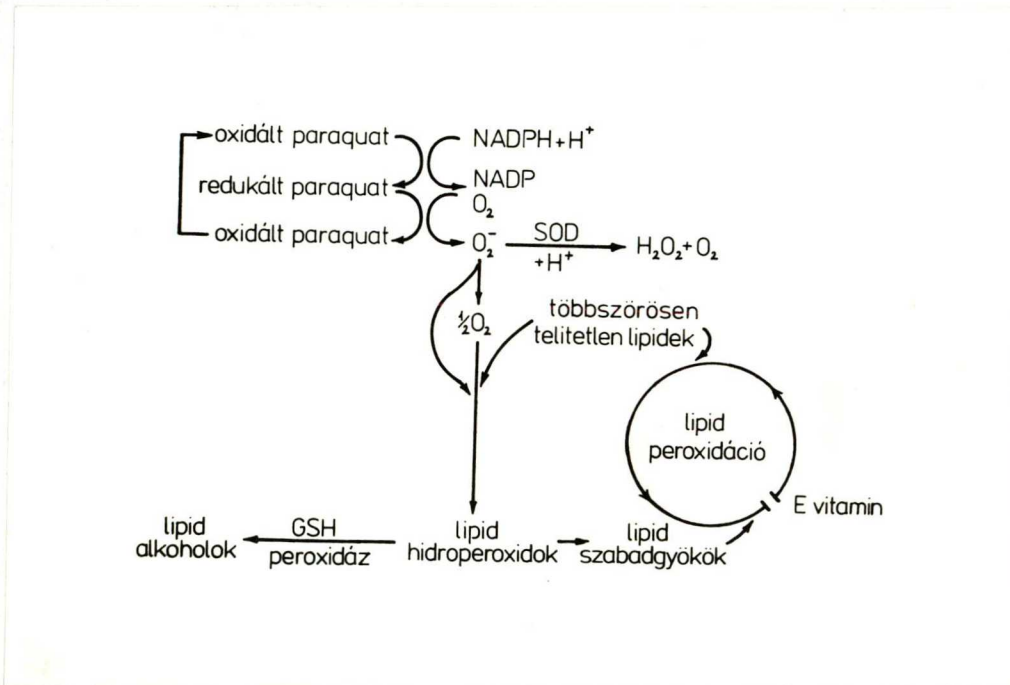
Valószínű, hogy a PQ toxikus hatását emlősökben hasonló módon fejti ki, mint a gyomnövényekben. /2.ábra/ A sejtekbe bejutott PQ az emlősökben is NADPH-igényes oxidációs-redukációs körfolyamaton megy keresztül, eközben az  $O_2$ -ből nagyon aktív szabadgyökök keletkeznek /pl. szuperoxid szabadgyökök,  $O_2^-$  /, melyek a sejtmembrán telítetlen lipidjeit megtámadva lipidperoxidokat hoznak létre /Bus és mtsai, 1974/.

Jelenlegi ismereteink alapján a PQ-toxicitás három tényező következményeként jelentkezhethet:

1. Lecsökken a NADPH intracelluláris koncentrációja, ez meggátolja a zsírsavak ill. az összetett lipidek szintézisét /utóbbiakból épül fel a tüdőben az alveolusok falának védőrétege/ /Fisher, 1977/.
2. A szabadgyökök által okozott lipidperoxidáció következtében károsodik a sejtmembrán és a sejt funkcionális integritása megszűnik.
3. A mitokondriális elektrontranszfer reakció szétkapcsolása miatt megszakad a sejt energia-utánpótlása /Ogata és Hasegawa, 1978/.

A lipidperoxidáció részvételét a PQ-toxicitásban alátámasztja Block /1979/ azon megfigyelése, hogy normál és E-vitaminhiányos patkányokat 50 mg/kg PQ-tal intraperitoneálisan kezelve az utóbbiaknál a túlélési % és idő drasztikusan lecsökkent. A PQ kezelést megelőzően többször beadott E-vitamin adag /1 mg/kg/nap/ a toxikus hatás kialakulását gátolta, mivel feltehetően antioxidánsként résztvesz a PQ által megindított szabadgyökös láncreakciók lezárásában. Kehrer és mtsai /1979/ megállapították, hogy a hiperoxia növeli a PQ akut toxicitását patkányokban; a csökkent oxigéntenzio ellentétes hatását Fisher /1977/ írta le. Ezek további bizonyítékai annak,

hogy a PQ indukálta sejtkárosodásban lipid peroxidáció  
főszerepet játszik.



2. ábra A paraquat toxicitásának feltételezett  
mechanizmusa emlőselekben /Block, 1979/

Ellentmondanak a fentieknek Kornbrust és Mavis /1980/ ill.  
Steffen és mtsai /1980/ mérései, akik patkány és egér  
mikroszómával végzett in vitro és patkánnyal végzett in  
vivo kísérletek eredményeként arra a következtetésre jutot-  
tak, hogy a lipid peroxidáció nem ill. csak mellékhatásként  
vesz részt a PQ toxicitásának kifejlődésében.

Az ellentmondás lehetséges okára Matkovics és mtsai./1980/ világítanak rá: egerek különböző dózisu PQ kezelését követően azt tapasztalták, hogy a dózis emelésével /120 mg/kg → 300 mg/kg PQ/ a lipidperoxidáció egyes szervekben a kontroll szintre, sőt az alá csökkent. Elképzelésük szerint lehetséges, hogy a PQ az alacsonyabb koncentráció-értékeknél aerob elektrondonorként hat elősegítve az  $O_2^-$  gyök képződését, míg a koncentráció növekedésével elektronakceptorrá válik, csökkentve a lipidperoxidációt.

A PQ indukálta lipidperoxidáció ellen az emlősök szervezete több módon védekezik /Block, 1979/:

1. A szuperoxid gyököt a szuperoxid-dizmutáz enzim /SOD/ gyorsan átalakítja molekuláris oxigénné és hidrogén-peroxiddá /utóbbit a kataláz hatástalanítja/.
2. Az endogén antioxidánsok /pl. E-vitamin/ megszakítják a szabadgyök-katalizálta peroxidatív láncreakciókat.
3. A glutation-peroxidáz rendszer enzimeinek /GSH-peroxidáz, glükóz-6-foszfát dehidrogenáz/stimulációja, melyek a lipidperoxidokat méregtelenítik stabil lipidalkoholokká alakítva őket.



#### 2.1.1.5. Mezőgazdasági alkalmazása

A PQ széles körben alkalmazott növényi deszikkáns. Hatásmódját tekintve átmenetet képez a kontakt és szisztémikus szerek között. Posztemergensen, levélherbicidként alkalmazzák, mivel a lombozatból gyorsan transzlokálódik. Nem szelektív hatásu, minden növényt -melynek felületére rápermetezik- pár napon belül elpusztít. Talajherbicidként nem használható fel, mert ioncsere révén azonnal adszorbeálódik a talajkolloidokon, ezáltal inaktiválódik, s így hatását nem képes kifejteni. Ez az oka, hogy a PQ-ot gyakran alkalmazzák kémiai szántás céljából, totális gyomirtószerként olyan területeken, ahol a talajerózió súlyos problémákat okoz/Mádasy, 1979/.

Hazánkban az alábbi PQ-tartalmu készítményeket forgalmazzák:

|           |      |                    |
|-----------|------|--------------------|
| GRAMOXONE | 25 % | PQ-diklorid        |
| GOMEX     | 28 % | PQ-dimetil-szulfát |

Ajánlott felhasználási mennyiségek GRAMOXONE-permetezés esetén 10 000 m<sup>2</sup>-re:

|                           |           |                                  |
|---------------------------|-----------|----------------------------------|
| vetés előtti gyomirtásra  | 3,5-5,2 l | /87,5-130 mg MD/m <sup>2</sup> / |
| sik legelők felujításánál | 7,8-12 l  | /195- 300 mg MD/m <sup>2</sup> / |

/Kónya és mtsai, 1982/.

## 2.1.2. A róz-szulfát

### 2.1.2.1. A fémek gombaölő hatása

A fémtartalmu fungicidek gombaölő hatását a belőlük keletkező fémkationok biztosítják.

A különböző fémek kationjainak relativ fungitoxicitása a következő sorrendben csökken:

Ag, Hg, Cu, Cd, Cr, Ni, Pb, Co, Zn, Fe, Ca /Cremlyn, 1978/.

Jól megfigyelhető, hogy a toxicitás összefügg a fémek periódusos rendszerben elfoglalt helyével, hiszen a felsoroltak a kalcium és az ólom kivételével a d mező elemei közé tartoznak. A periódusos rendszer egy oszlopán belül a toxicitás nő a fémek atomtömegével. A gombatoxicitás fokát valószínűleg az ionizálatlan fémkomplexek sejtfalhoz kapcsolódó kovalens vagy koordinációs kötéseinek erőssége szabja meg, mely a fémek relativ kelátképző képességétől, a fém-szulfid stabilitásától és a kationok elektronegativitásától is függ /Lukens, 1971/.

### 2.1.2.2. A réz-szulfát hatásmechanizmusa gombákban

A szervesetlen rézvegyületek gombaölő hatása azon alapul, hogy a sejt belsejébe jutó  $\text{Cu}^{2+}$ -ionok komplexeket képeznek a gomba fehérjéinek tiol- és aminocsoportjaival, ennek



következtében a gomba létfontosságú enzimeit és egyéb proteinek nem specifikus módon gátlódnak /Nádasy, 1979/.

Ahhoz, hogy a  $\text{Cu}^{2+}$ -ionok ki tudják fejteni fungicid hatásukat, át kell jutniuk a gomba sejtfalán. Mivel a komplexbe vitt  $\text{Cu}^{2+}$ -ionok lipoid oldhatósága jelentős mértékben megnő, komplexképző vegyületeket alkalmaznak. Így a fungitoxikus fémkation könnyebben bejut a sejtbe, ahol a komplex disszociál, és a  $\text{Cu}^{2+}$ -ion kifejti hatását.

#### 2.1.2.3. Toxicitása gerincesekre

A halakra a vízbe kerülő rézszennyeződés két úton fejt ki kedvezőtlen hatást:

1. a táplálékukat jelentő alsóbbrendű élőlények mennyiségének csökkentése /közvetett hatás/
2. a halak szervezetének közvetlen károsítása

A vízbe jutó rézvegyületekből ledisszociáló Cu-ion már 2 mg/l koncentrációban jelentős toxikus hatást fejt ki a baktériumokra /Singleton és Guthrie, 1977/, csökkenti a vízi baktérium-társulások stabilitását, ezáltal felborítja az egész vízi ökoszisztéma természetes egyensúlyát. Winner és Farrell /1976/ vizsgálatait szerint egyes vizilolha populációk /Daphnia magna, D. pulex, D. parvula, D. ambigua/ 0,04 mg/l Cu-tartalmu vízben 72 óra elteltével jelentős egyedszámcsökkenést mutattak.

Réóta ismert az a tény, hogy a szerves vegyületekhez kapcsolódó réz nem toxikus hatású, a réz hal-toxicitása szervesetlen vegyületeihez kapcsolható /Sprague, 1968/. A réz halakat károsító hatását számos környezeti tényező befolyásolja /pl. a víz pH-ja, keménysége és komplexképző képessége stb./. Chakoumakos és mtsai. /1979/ 3-10 g-os gyilkos pisztrángok /*Salmo clarki*/ akut  $LC_{50}$  értékét határozták meg 96 órás réz-kezelést követően különböző keménységű és pH-jú vizekben. A réz hét eltérő oldhatóságu formáját összehasonlítva a következőket találták toxikusnak az adott körülmények között:  $Cu^{2+}$ -ion /alacsonyabb pH-értékeknél/,  $CuOH$  és  $CuOH_2$  /magasabb pH értékeknél/. Megfigyelésük szerint a víz keménysége és a benne feloldott egységnyi rézvegyület toxikussága fordított arányban áll egymással.

Yamamoto és mtsai. /1977/ két hétig 0,1 mg/l réz-szulfát tartalmu vízben tartott ponty szerveinek réztartalmát a kontrolléval összevetve azt tapasztalták, hogy a hepatopankréász, a kopoltyuk, a bél és a vese réztartalma szignifikánsan /2-6-szorosára/ megnövekedett.

Drbal és Svobodová /1980/ kut- ill. tavi vízben tartott egy- és kétnyaras pontyokat 1 mg/l  $CuSO_4 \cdot H_2O$ -tal kezelték, majd 48 óra elteltével szerveik réztartalmát az azonos közegben tartott kontrollokéhoz hasonlították. Mindkét esetben

a halak kopoltyujában dúszult fel a legnagyobb mértékben a réz /kútvízben a kontroll 3,5-szörösére, tavi vízben 1,8-szorosára/. A különböző mértékű akkumuláció magyarázata a szerzők szerint az lehet, hogy a tavi vízben a réz-szulfátból komplex- és rosszul oldódó rézvegyületek képződnek.

A réz ilyen mértékű feldúsulása a halak legfontosabb szerveiben minden bizonnyal megakadályozza az alapvető életfenntartó mechanizmusok fiziológiás működését. Ezt a feltevést alátámasztják a következő adatok is: 30-95 g-os pataki pisztrángokat /*Salvenius fontinalis*/ 6 napig 24-67,5  $\mu\text{g/l}$  Cu-iont tartalmazó vízben tartva, azok vérképe jelentősen megváltozik a kontrollokéhoz képest, jelezve a fémion által közvetlenül ill. közvetve kifejtett károsító hatást, és az ennek ellensúlyozása céljából beindult folyamatokat /McKim és mtsai, 1970/.

Kedvezőtlenül befolyásolja a víz réz-szennyeződése a benne élő halak tápanyag-hasznosítását is. Gyengén savas kémhatású /pH 6,0/, lágy vízben 20  $\mu\text{g/l}$  Cu-ion 25 %-kal /!!!/ csökkentette 5-6 g-os szivárványos pisztrángok /*Salmo gairdneri*/ növekedésének mértékét /Waiwood és Beamish, 1978/.

A réz-mérgezés emlősökben az esetek legnagyobb részében gastroenteritist okoz, mely igen gyakran elhullást eredményez. A réz-szulfát  $\text{ALD}_{50}$  értéke patkányokra 300 mg/kg.

#### 2.1.2.4. Mezőgazdasági alkalmazása

A réz-szulfátot a XVIII. században használták először csávázószerként buza kőüszög ellen ill. herbicidként gabonában évelő gyomok irtására. Felhasználásában ugrás-szerű növekedést jelentett a bordói lé felfedezése, melyet eredetének helyéről neveztek el. A szer  $\text{CuSO}_4$ -ot /4,5 kg/ és  $\text{Ca(OH)}_2$ -ot /5,5 kg/ tartalmaz /454 l/ vízben oldva. Aktiv hatóanyaga valószínűleg a tribázisos réz-szulfát  $[\text{CuSO}_4 \cdot 3\text{Cu(OH)}_2]$ , kémiája és pontos hatásmódja igen bonyolult.

A bordói lé protektív, széles hatásspektrumú és nosz-szu hatástartamú gombaölőszer. Csaknem kizárólag levélfungicidként alkalmazzák, igen hatásos a Peronospora, a Phytophthora és a Cercospora fajok ellen. Szőlőperonoszpóra ellen 0,5-1,5 %-os, gyümölcsfák, szántóföldi növények és zöldségfélék gombabetegségei ellen 0,2-2 %-os töménységű bordói lé alkalmazását ajánlják a növénytermesztőknek /Kónya és mtsai, 1982/. Ez Cu-ionra átszámítva 0,75-2,25 g/l ill. 0,3-3 g/l koncentrációt jelent, amely a vízbe kerülve tíz- sőt százezerszeresére hígulva is erősen mérgező a halakra.

A réz-tartalmú fungicideket napjainkban is nagy mennyiségben használják a mezőgazdaságban. A szakemberek szerint az ezredfordulóig nélkülözhetetlenek lesznek a haszonnövények gomba elleni védelmében.

A hazánkban kereskedelmi forgalomban kapható, réz-szulfátot tartalmazó szerek:

|                  |      |                 |
|------------------|------|-----------------|
| RÉZGÁLIC         | 96 % | réz-szulfát     |
| BAKONY bordói lé | 45 % | réz-szulfát     |
| alapanyag        | 55 % | oltott mészipor |

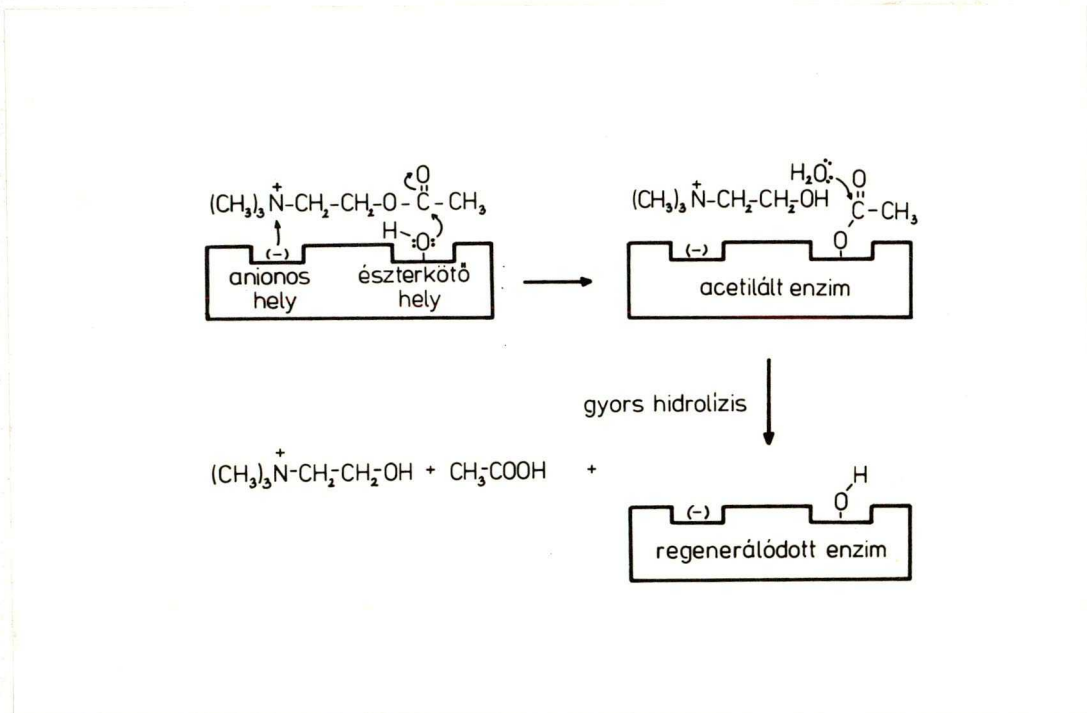
### 2.1.3. A methidathion

#### 2.1.3.1. A kolinészteráz gátlók szerek hatásmechanizmusa és toxicitása

A gerinceseknél és a rovaroknál egyaránt fontos szerepet játszik az idegrendszer működésében az acetilkolinészteráz enzim. Működése során a kolinerg rostok szinapszisaiban neurotranszmitterként funkcionáló acetilkolin molekulákat -miután azok szerepüket ellátva átjuttatták az ingerületet egyik idegsejtről a másikra- hidrolizálja el kolinra és ecetsavra. Az enzim aktív centruma két fő részből áll: az anionos helyből, amely negatív töltésű és a szubsztrát kationos részét köti meg, valamint az észterkötőhelyből, ahol egy szerin-hidroxil csoport lép reakcióba a szubsztrát elektrofil karbonil szénatomjával. /3. ábra/

Ha az acetilkolinészteráz enzim működése valamilyen okból

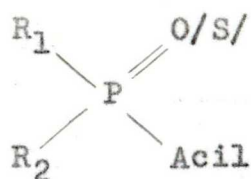
károsodik, a felszabadult acetilkolin felgyülemlik, és megakadályozza az ingerületátvitelt.



3. ábra Az acetilkolinészteráz enzim működése  
/Cremlyn, 1978/

Ez adta az ötletet, hogy olyan rovarölőszert keressenek, amely megbénítja a rovarok idegműködését, s így született meg az inszekticidek, sőt a peszticidek mindmáig legnépesebb csoportjának, a szerves foszforsavésztereknek a családja.

Ezen vegyületcsoport szinte minden tagja a következő szerkezeti képlet szerint épül fel:



$R_1, R_2$ : alkil-, alkoxi-, aminos-csoport

Acil: savmaradék vagy savas karakterű csoport

/Nádasy, 1979/

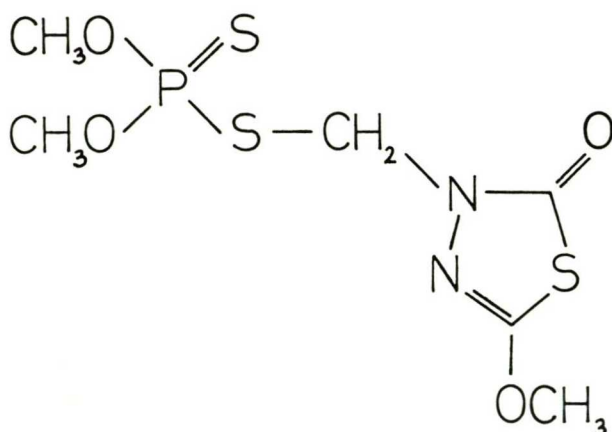
Hatásmechanizmusuk azon alapul, hogy kompetitív inhibitorai az acetilkolinnak; képesek bekötődni az anionos helyre és reagálni az észterkötőhely szerin-hidroxil csoportjával, foszforilálva azt, ezáltal gátolva az enzim aktivitását. Mivel a P-O kötés jóval erősebb, mint a C-O kötés, ezért lassabban hidrolizál, sokkal hosszabb idő telik el addig, míg az enzim újra aktív válik. Ezalatt az acetilkolin-szint egyre növekszik, majd beáll az endogén acetilkolin-mérgezés. Emlősökben a mérgezés tünetei egyrészt a nikotin mérgezés /izomrángások, ingerlékenység, izombénulás/, másrészt a muszkarin mérgezés tüneteire /hányinger, fájdalmak, izzadás, fokozott vizeletürítés, légszomj, tüdőödéma/ hasonlítanak. Súlyos esetben előbb tudatzavar, ájulás lép fel, majd bekövetkezik a pusztulás /Nádasy, 1979/.



A foszforilezett enzim reaktiválódását a hidroxil-imino-csoportot tartalmazó vegyületek gyorsíthatják.

2.1.3.2. A methidathion metabolizmusa és toxicitása

A Ciba-Geigy cég 1966-ban mutatta be új, szervesetlen foszforsavészter típusú inszekticid hatóanyagát, amely a methidathion fantázianevet kapta.



4. ábra A methidathion képlete /S-2,3-dihidro-5-metoxi-2-oxo-1,3,4-tiadiazol-3-ilmetil-0,0-dimetil-foszforoditioát/

A methidathion /MD/ némi atkaölő tulajdonsággal rendelkező



loko-szisztémikus, azaz a növények epidermiszébe behatolni képes, de onnan tovább nem transzportálódó rovarölő szer. Ahhoz, hogy AChE-bénító hatását kifejthesse -ugyanugy, mint a többi P=S kötéssel rendelkező, un. tiofoszforsav-észternek- ezt megelőzően oxidatív deszulfuráláson kell keresztül men- nie. Ezt az átalakulást gerincesekben és rovarokban az un. kevert funkciójú oxidáz /MFO/ enzimek, míg a növényekben va- lószínűleg a peroxidáz enzimek katalizálják /Eto, 1974/. Ez az aktiválódás azonban a legtöbb esetben -így a MD-nál is- egyuttal a lebontás első lépcsője is. Chopade és Dauterman /1981/ patkány és egér máj mikroszómális frakciójában vizs- gálták a MD in vitro metabolizmusát, és azt tapasztalták, hogy a minimális különbségektől eltekintve a fő utak mindkét faj esetén azonosak voltak: a P=S kötés enzimatisz hidrolizise, a heterociklusos gyűrű leszakítása, az oxidatív deszul- furálás, ill. a demetilezés.

A MD in vivo metabolizmusa és kiürülése mind az állatokban, mind a növényekben viszonylag gyors folyamat /Esser és Müller, 1966/.

McLeese és Metcalfe /1979/ a MD 48 órás és 96 órás  $LC_{50}$  ér- tékét a homárra /*Homarus americanus*/ 14 ill. 10  $\mu\text{g/l}$ -ben ál- lapították meg.

Per orálisan két éven keresztül naponta adagolt MD patkányokban 0,2 mg/kg-os, rhesus majomban 0,25 mg/kg-os dózisban nem fejtett ki detektálható káros hatást /Martin és Worthing, 1977/.

2. Táblázat A methidathion akut LD<sub>50</sub> értéke különböző állatfajokra /Martin és Worthing, 1977/

| Faj          | Kezelési mód | ALD <sub>50</sub> /mg/kg/ |
|--------------|--------------|---------------------------|
| patkány      | szájon át    | 25-54                     |
| egér         | szájon át    | 25-70                     |
| tengerimalac | szájon át    | 25                        |
| aranyhőrcsög | szájon át    | 30                        |
| nyul         | szájon át    | 63-80                     |
| tyuk         | szájon át    | 80                        |
| patkány      | bőrön át     | 150                       |

2.1.3.3. Mezőgazdasági alkalmazása

Elsősorban a gyümölcsösök és a szőlő rovarkártevői, valamint a burgonyabogár ellen alkalmazzák, de sikeresen bevethető pajzstetvek ellen is. /3. táblázat/

Hazánkban nagyüzemi felhasználásra engedélyezett készítménye:

ULTRACID 40 WP

40 % methidathion

A szer alkalmazása esetén a munkaegészségügyi várakozási idő 8 nap, az élelmezés-egészségügyi várakozási idő 28 nap, a hatóanyag engedélyezett maradékértéke 0,2 mg/kg.

3. Táblázat Ajánlások az ULTRACID 40 WP nagy-  
üzemi felhasználásához /Kónya és  
mtsai, 1982/

| Felhasználási hely         | Ajánlott szerkoncent-<br>ráció a permetlében<br>/ mg/l / | Ajánlott permetlé menny-<br>nyiség 10000 m <sup>2</sup> -re<br>/ l / | 1 m <sup>2</sup> -re jutó hatóanyag<br>mennyiség az ajánlás<br>szerint / mg / |
|----------------------------|----------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| Almás                      | 750 - 1000                                               | 2000                                                                 | 60 - 80                                                                       |
| Őszibarackos               | 750 - 1000                                               | 1400                                                                 | 42 - 56                                                                       |
| Borsóvetőmag<br>termesztés | 2000                                                     | —                                                                    | —                                                                             |
| Kukoricás                  | 1500 - 2000                                              | 1000                                                                 | 60 - 80                                                                       |

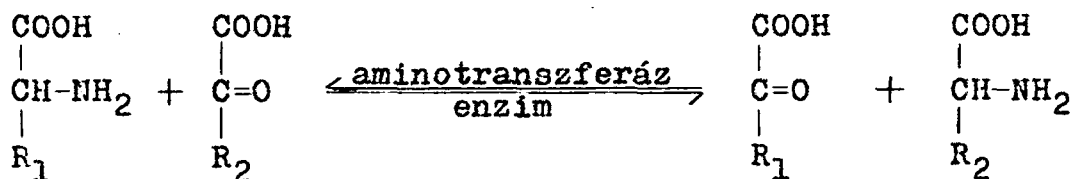
## 2.2. Az aszpartát aminotranszferáz és az alanin aminotranszferáz enzimek jellemzése

### 2.2.1. A transzaminálás

Meister /1955/ definíciója szerint: a transzaminálás az a kémiai reakció, amelyben egy aminocsoport adódik át egyik molekuláról a másikra az ammónia közvetítő részvétele nélkül. A folyamatot Herbst és Engel /1934/ írta le először.

A fenti reakciót katalizáló aminotranszferázok /korábbi nevükön transzaminázok vagy aminoferázok/ széles körben elterjedt enzimek, egyaránt megtalálhatók mikroorganizmusokban, növényekben, alacsonyabbrendű és magasabbrendű állatokban.

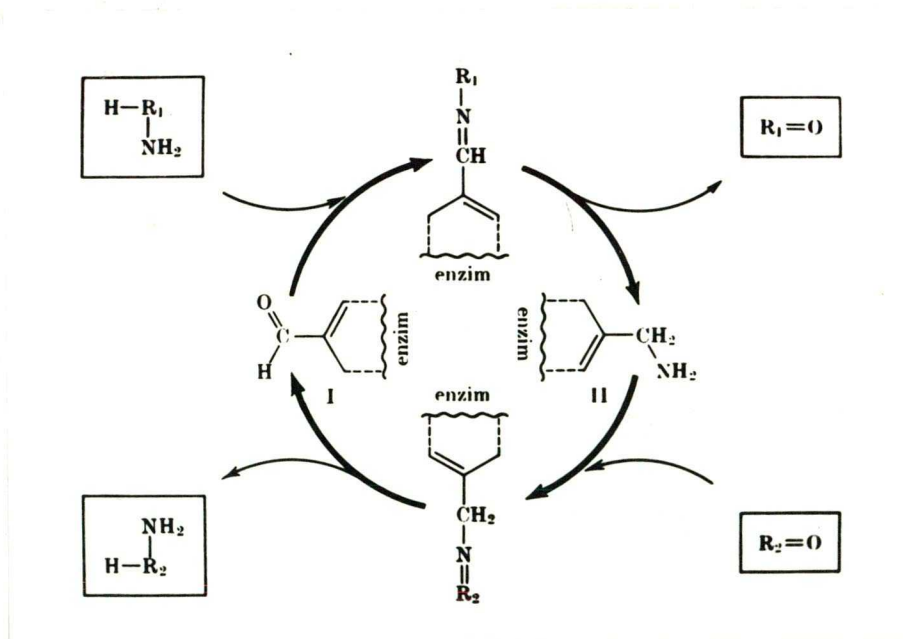
A transzaminálási reakció általános mechanizmusa a következő:



/R<sub>1</sub> és R<sub>2</sub> az amino- illetve ketosavak közös szénváza/

A folyamat egyensúlyi állandója kb. 1, tehát reverzibilisnek tekinthető.

Az aminotranszferáz enzimek koenzimként piridoxál-5-foszfátot /PLP/ tartalmaznak, mely valószínűleg heterociklusos gyűrűjének pozitív töltésű nitrogénje révén kötődik az apoenzimhez. A reakció során a koenzim az amino- és ketosavakkal felváltva reagál, s így viszi át az aminocsoportot a donorról az akceptorra /5. ábra/.



5. ábra A piridoxál-5-foszfát koenzim részvétele a transzaminálási reakcióban /Farkas,1978/

/ $R_1H-NH_2$ : kiinduló aminosav;  $R_1=O$ : keletkező ketosav;  $R_2=O$ : kiinduló ketosav;  $R_2H-NH_2$ : keletkező aminosav; I: enzimhez kötött PLP; II: piridoxamin-foszfát/

A transzaminálás révén nemcsak a természetben előforduló L- $\alpha$ -aminosavak nagy része alakulhat át keto-analógjává, hanem néhány aldehid, amid,  $\gamma$ - és  $\omega$ -aminosav, sőt egyes D-aminosavak ill. nem aminokarbonsav típusu vegyületek is /Meister és Tice, 1950; Meister, 1955; Hug és Werkman, 1957; Martinez-Carrion és Jenkins, 1965/.

Ezáltal a transzaminálás lehetővé teszi a szénhidrát-, a lipid- és a fehérjeanyagcsere közötti kölcsönhatást, kiszolgálva ezáltal a szervezet gyakran változó igényeit /Bell, 1968/.

Fontos szerepet játszanak a transzaminálási reakciók a későbbi lebontásra kerülő aminosavak aminonitrogénjének „visszamentésében”/ezt a feladatot más alternatív mechanizmusokkal együtt végzik/.

### 2.2.2. Az aszpartát aminotranszferáz enzim

#### 2.2.2.1. Izoenzimek

Az aminotranszferáz enzimek népes családjának leggyakrabban vizsgált, ezáltal legismertebb képviselője az aszpartát aminotranszferáz /ASAT, EC 2.6.1.1.; L-aszpartát:  $\alpha$ -ketoglutarát aminotranszferáz/, korábbi nevén a glutamát-oxálacetát transzamináz /GOT/ enzim.



Az enzim által katalizált reakció vázlata:

L-aszpartát +  $\alpha$ -ketoglutarát  $\rightleftharpoons$  oxálacetát + L-glutamát

Az ASAT enzimrel kapcsolatos első közlemények közül kiemelkedik Hird és Rowsell /1950/ eredménye, akik patkány máj citoplazmatikus és mitokondriális frakciójában egyaránt jelentős ASAT aktivitást mutattak ki. E felfedezés alapján született meg az ASAT izoenzimek létezésének vagy legalábbis az enzim sejten belüli elkülönülésének elmélete. A közvetlen bizonyítékra tíz évet kellett várni, ekkor Fleisher és mtsai. /1960/ kutya, sertés és emberi szívből elválasztották a két enzimformát, és rámutattak, hogy bizonyos tulajdonságaik jelentősen eltérnek. Ezáltal nyilvánvalóvá vált, hogy az ASAT enzim emlős sejtekben két izoenzim formájában fordul elő. Borst és Peeters /1961/ bebizonyították, hogy a két izoenzim egyike a mitokondriumokba zárva található.

. . . . Az ASAT vizsgálata egyre több fajra és szervre terjedt ki: többek között patkány májból /Boyd, 1961/ és agyból /Magee és Phillips, 1971/, emberi májból és szívből /Nisselbaum és Bodansky, 1964/, csirke májból és szívből /Shrawder és Martínez-Carrion, 1973/ és delfin izomból /Owen és Hochachka, 1974/ sikerült elkülöníteni, tisztítani és jellemezni a két izoenzimet.

Kiderült, hogy a fentieknél korábban megtisztított enzimpreparátumok általában csak a citoplazmatikus vagy más néven anionos /ASAT<sub>c</sub>/ izoenzimet tartalmazták, az érzékenyebb mitokondriális azaz kationos /ASAT<sub>m</sub>/ izoenzim valószínűleg már a tisztítás első lépéseinél inaktiválódott /Braunstein, 1973/.

A legtöbb adat a könnyen beszerezhető sertés szív ASAT izoenzimeiről áll rendelkezésünkre /Jenkins és mtsai. 1959; Banks és mtsai, 1968/.

A fenti forrásból tisztított ASAT<sub>c</sub> enzimmolekula tömegét Banks és mtsai. /1968/ ultracentrifugás és gél-szűrési vizsgálatok alapján 78 600-nak határozták meg, napjainkban az általánosan elfogadott érték 90 000 körül mozog /Braunstein, 1973/. Egy molekula tisztított ASAT enzim két PLP koenzimet tartalmaz stabilan kötve az apoenzim lizin-oldalláncaihoz aldimin kötéssel /Meister, 1965/.

A két izoenzim jól elválasztható egymástól CM- vagy DEAE-cellulózon végzett ioncserés kromatográfiával, papirelektroforézissel /Fleisher és mtsai, 1960/, szacharóz grádiensben végzett zónaelektroforézissel ill. differenciál centrifugálással /Boyd, 1961/, keményítő gélelektroforézissel /Martinez-Carrion és mtsai, 1967/.

poliakrilamid gélelektroforézissel /Banks és mtsai, 1968/, illetve izoelektromos fókuszálással /Rej, 1981/.

Kromatográfiás viselkedésükön és elektroforetikus mobilitásukon kívül az ASAT izoenzimek különböznek aktivitásuk pH-függésében /Boyd, 1961/, immunokémiai tulajdonságaikban /Nisselbaum és Bodansky, 1964/, a szubsztrátokhoz való affinitásukban /Fleisher és mtsai, 1960/ és primer szekvenciájukban /Teranishi és mtsai, 1978/. Ennek alapján nagy biztonsággal állítható, hogy genetikailag elkülöníthető, valódi izoenzimekről van szó.

Szerepük az anyagcserében különböző, eltérő mechanizmusok szabályozzák őket, működésük azonban szorosan összehangolódik az un. malát ingában betöltött szerep révén.

#### 2.2.2.2. Molekuláris alformák

Decker és Rau /1963/ patkány szerveinek nyers homogenizátumából keményítő gélelektroforézissel szétválasztva az ASAT izoenzimeit azt tapasztalták, hogy a zimogramon kettőnél több csík jelent meg, jelezve az egyes izoenzimek heterogenitását.

Block és mtsai. /1964/ emberi szérumból, Gabrielli és Orfanos /1968/ patkány szérumából és májából mutattak ki új ASAT frakciókat, melyekről kiderült, hogy nem további



izoenzimek, hanem a meglevő kettő molekuláris alformái. Ezt bizonyítja, hogy az egyes isoenzimek alformái nem különböznek egymástól szignifikánsan molekulaméretben, primer strukturában és immunokémiai viselkedésben /Braunstein, 1973/.

Martinez-Carrion és mtsai. /1965/ sertés szivből tisztított  $ASAT_c$  isoenzimet vizsgálva megállapították, hogy három alformát tartalmaz, melyet növekvő elektroforetikus mobilitásuk és specifikus aktivitásuk szerint  $\alpha$ ,  $\beta$  és  $\gamma$  formának neveztek el /az  $ASAT_{10}$ -nél szintén találtak alformákat/. Eredményeik szerint az alformák két egymást követő ioncserés kromatográfiás lépéssel egymástól jól elválaszthatók.

Későbbi közleményükben /Martinez-Carrion és mtsai, 1967/ már négy  $ASAT_c$  alformát írtak le, melyek között a legfőbb különbség a koenzim kötésének aktív / $\alpha$  és  $\beta$ / ill. inaktív / $\gamma$ ,  $\delta$ / módja. Tárolás alatt az alformák öregszenek azaz az  $\alpha$  és  $\beta$  frakciók egy része inaktiválódik, mert a koenzim kötődése megváltozik.

John és Jones /1974/ ill. Rej /1981/ eredményei ezzel szemben azt sugallják, hogy az alformák kialakulásának oka nem a koenzim kötési módjának megváltozása, hanem az aszparagin- és glutamin-oldalláncok dezaminálódása.

### 2.2.2.3. A szervkárosodás jelzése

Az ASAT enzim a legtöbb emberi és állat szövetben előfordul, de aktivitása széles határok között változik. Az ASAT enzimszintek kutyaiban a következő sorrendben növekednek: tüdő, here, agy, vese, vázizom, máj és szívmusculus /Dubach, 1957/.

Normál emberi /és patkányból származó/ szövetekben a fentiektől kissé eltérő sorrendben nő az összaktivitás: lép, tüdő, here, vese, máj, agy, vázizom és szívmusculus /Agress, 1959/.

Mivel a fenti szövetek enzimtartalma több ezerszerese a vérben keringő mennyiségnek /Bell, 1968/, a szervezetben előforduló szövetkárosodás a szérumban ASAT aktivitásának jelentős növekedését eredményezi, s ezáltal igen jól detektálható /Karmen és mtsai, 1955/.

A szérumban enzimszint mérése spektrofotometrián /Karmen, 1955/ és kolorimetrián /Reitman és Frankel, 1957/ egyaránt megoldható. A módszernek egyszerűsége és pontossága mellett nagy előnye, hogy a szérumok lefagyasztva napokig tárolhatók jelentős aktivitásvesztés nélkül.

Az ASAT szérumban-szintjének mérése más szérumban-enzimek /ALAT, LDH, CPK stb./ meghatározásával együtt ma is fontos eleme a szívmusculus-szövet-nekrózis, a vírusos máj-

gyulladás és egyéb szövetkárosodást előidéző betegségek kimutatásának /Schmidt és Schmidt, 1976/.

### 2.2.3. Az alanin-aminotranszferáz enzim

Az ASAT enzim mellett a legaktívabb és a legjobban ismert aminotranszferázok közé tartozik az alanin-aminotranszferáz /ALAT, EC 2.6.1.2.; L-alanin: -ketoglutarát aminotranszferáz/, korábbi nevén a glutamát-piruvát transzamináz /GPT/ enzim, mely a következő reakciót katalizálja:

$$\text{L-alanin} + \alpha\text{-ketoglutarát} \rightleftharpoons \text{piruvát} + \text{L-glutamát}$$

Az ALAT enzim igen sok tulajdonságában hasonlít az ASAT-ra, ezen a helyen inkább a közöttük lévő különbségeket emeljük ki.

Az ALAT izoenzimeit kezdetben nem sikerült elkülöníteni, e feladat megoldása Ziegenbein /1962/ nevéhez fűződik, aki DEAE-cellulóz alkalmazásával ért célhoz.

Később Gatehouse és mtsai /1967/ poliakrilamid gél-elektroforézissel is elválasztották egymástól a két izoenzimet, és az enzim molekulaszúlyát ultracentrifuga segítségével 114 000-nek határozták meg.

Azóta az izoenzimeket izoelektromos fókuszálással is sikerült szétválasztani /Ruščák és mtsai, 1982/.

Az enzimnek molekuláris alformái nem ismertek.

A szervkárosodás detektálásában az ASAT-hoz hasonlóan igen fontos szerepet játszik. Mivel a szervenkénti megoszlása eltér az ASAT-étól /Wilkinson, 1970/, ezért az emberi gyógyászatban nemcsak a károsodást jelző magas szérum-aktivitásértéküket, hanem arányukat /ASAT/ALAT arány vagy De Ritis arány/ is figyelembe veszik egyes betegségek diagnosztizálásában /Schmidt és Schmidt, 1976/.

### 3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

#### 3.1. Felhasznált anyagok

Kísérleteink során a következő speciális vegyszereket és eszközöket használtuk: Bovine Albumin Powder-BSA-/Reheis Chemical Company, USA/, Diaflo Ultrafiltration Membranes Type YM 10 /Amicon Corporation, USA/, GOT/GPT Test Combination -Cat. No. 124 354- /Boehringer Mannheim GmbH, W. Germany/, Pyridoxal 5-Phosphate /Sigma Chemical Company, USA/, Sephadex G-25 és G-200 /Pharmacia Fine Chemicals AB, Sweden/.

A többi felhasznált vegyszer Reanal gyártmányú és az elérhető legnagyobb tisztasága volt.

#### 3.2. Kísérleti állatok

A 300-400 g-os illetve 850-1 000 g-os pontyokat /Cyprinus carpio L./, fehér busákat /Hypophthalmichthys molitrix V./ és harcsákat /Silurus glanis L./ a szarvasi Haltenyésztési Kutató Intézetből ill. a tápéi Halászati Termelőszövetkezetből szereztük be.

A kísérletekhez kizárólag ép külsejű, normális viselkedésű egyedeket használtunk fel; a sérült halakat a kísérlet



kezdete előtt, az elhullottakat pedig észleléskor azonnal eltávolítottuk az akváriumból.

### 3.3. Szállítási és tartási körülmények

A halakat /30-40 egyed/ 200 l-es műanyag tartályban szállítottuk oxigén túlnyomás alatt. A szállító edény vizébe a felbontás után azonnal sűrített levegőt porlasztottunk, majd amint a tartály és az akváriumok hőmérséklete közötti különbség  $5^{\circ}\text{C}$  alá csökkent, a halakat fajonként elkülönítve szétválasztottuk a 100 literes, városi vizet tartalmazó akváriumokba 3-4 hal/akvárium sűrűségben. Az akváriumok vizének oxigéntelítettségét sűrített levegő átporlasztásával biztosítottuk.

A kezeléseket megelőzően a halakat kb. egy hétig akklimatizálódni hagytuk a környezethez. Az akklimatizáció és a kezelés ideje alatt a halakat nem etettük.

Az akváriumok vizének hőfokát közvetve temperáltuk a helyiség levegőhőmérsékletének szabályozásával.

### 3.4. Az alkalmazott kezelések

In vivo kezeléseknél a kívánt hatóanyag-végkoncentráció eléréséhez szükséges mennyiségű növényvédőszer-törzsoldatot mértünk be az akváriumok vizébe. A szer

szétoszlását a vízben a levegőztetés és a halak mozgása okozta keveredés biztosította.

A növényvédőszereket a következő koncentráció-határok között alkalmaztuk az egyes kezelések során:

|              |             |
|--------------|-------------|
| paraquat     | 1 -100 mg/l |
| réz-szulfát  | 5 - 10 mg/l |
| methidathion | 15- 10 mg/l |

A rövid távu kezeléseket /melyek időtartama 5 perctől 2 óráig huzódott/ tavasszal és nyár elején 20±1 °C-os vízhőmérsékletnél, míg a hosszú távuakat /24 órától 2 hétig/ ősszel és télen 10±1 °C-os hőmérsékletű vízben végeztük el. Az előbbi esetben 300-400 g-os, az utóbbiban 850-1000 g-os egyedeken vizsgáltuk a növényvédőszer hatását.

In\_vitro kezeléseknél a reakcióelegybe közvetlenül az enzim hozzáadása előtt mértük be a kívánt mennyiségű növényvédőszer-törzsoldatot.

### 3.5 Az önkontrollos módszer

Az első in vivo növényvédőszer-kezeléses kísérletekben azt az eljárást alkalmaztuk, hogy azonos számú kezelt és kontroll csoporttal indítottuk el a kísérletet. A tervezett idő lejártával a halakat megöltük, és vérplazmájukból a kiválasztott paramétereket meghatároztuk. Komoly nehézséget jelentett azonban ennél az eljárásnál, hogy a

kontroll és kezelt halakból mért értékek külön-külön szokatlanul széles határok között változtak -tul nagy volt a szórás-; a beteg egyedeket nem lehetett kiszűrni; nem tudunk minden egyes halat figyelembe venni az értékelésnél /a kiugróan magas és nagyon alacsony értékeket párosával el kellett hagyni/.

Uj módszert vezettünk be: az önkontrollos, túlélő vérvételt. Ennek lényege: minden halból vért veszünk a kísérlet kezdetén /un. 0 perces minta/ a későbbi értékeket ennek %-ában adjuk meg. Ezáltal csak az egyedi érzékenységet ábrázoljuk, az abszolút aktivitásokat nem, így sokkal több mért értéket figyelembe lehet venni az összegezésnél. Kezelt és kontroll csoportot indítva jól elkülöníthető a szer ill. más tényező okozta károsodás.

### 3.6. Vérvétel

Az akváriumból kiemelt halat stabilan lefogtuk, majd a farki részen a bőréről a nyálkát letöröltük, és ha szükséges volt néhány pikkelyét eltávolítottuk. A 3-4 ml vérmin-tát a farki vénából vettük heparinnal átöblített fecskendővel, 1-es tüvel. A fecskendőből a vért jeges vízfürdőben tartott centrifugacsövekbe adagoltuk, és rövid idő múlva lecentrifugáltuk 4 °C-on 12 000 rpm-en 3 percig, majd a

felüluszót automata pipetta segítségével óvatosan leszivtuk a képlékeny, könnyen felkavarható üledékről.

Az enzimaktivitások mérésére kizárólag tiszta, hemolizismentes vérplazma használható, mivel a vörösvérsejtek szétesésekor a belőlük felszabaduló jelentős mennyiségű ASAT és ALAT enzim a valódi értékeket teljesen meghamisítja.

### 3.7. A vérplazma tárolása

Emberi szérumot 4 °C-on tárolva az aminoszferáz enzimek aktivitáscsökkenése 5 nap elteltével még nem jelentős /ASAT 10 %, ALAT 14 %/ /Schmidt és Schmidt, 1976/, azonban a szívárványos piztráng ugyanezen enzimei 4 °C-os tárolás esetén 25 %-ot veszítenek kiindulási aktivitásukból /d'Apollonia és Anderson, 1980/.

Mivel saját méréseink is azt igazolták, hogy a fenti tárolásmód rövid idő alatt jelentős aktivitáscsökkenést okoz, ezért a vérplazmát -20 °C-on lefagyasztva tároltuk, és a méréseket a lehető legrövidebb idő alatt elvégeztük.

A lefagyasztott vérplazmát a mérések előtt hagytuk szobahőmérsékleten kiolvadni, az esetenként kialakult fibrinogén-csomókat eltávolítottuk, és a mintát jól összekevertük, majd mértük az enzimek aktivitását.

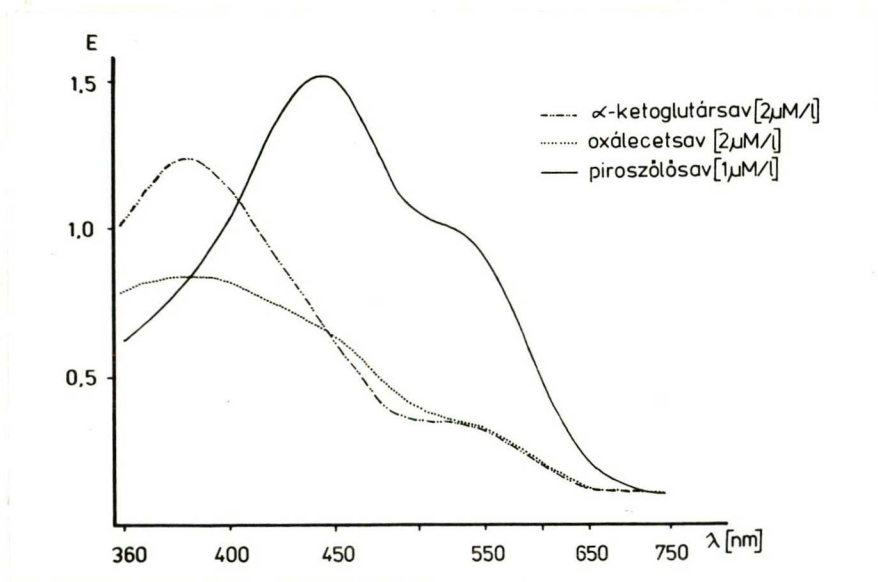


### 3.8. Az aminoszferáz enzimek aktivitásának mérése

#### 3.8.1. Aktivításmérés szérumból és kromatográfiás frakciókból

Az ASAT és ALAT enzimek aktivitását Reitman és Frankel /1957/ kolorimetriás módszere alapján a Boehringer Mannheim GmbH cég teszt-készletével határoztuk meg.

A módszer elve a következő: az  $\alpha$ -ketoglutársav, az oxálecetsav és a piroszólósav 2,4-dinitrofenil-hidrazonjainak lúgos oldata eltérő fényabszorpciós spektrumot mutat. /6. ábra/



6. ábra Az  $\alpha$ -ketoglutársav, az oxálecetsav és a piroszólósav 2,4-dinitrofenil-hidrazonjai lúgos oldatának spektruma

A mérésnél a szubsztrátoldat L-aszparaginsavat /az ALAT esetén DL-alanint/ és  $\alpha$ -ketoglutársavat tartalmaz, az enzimatis reakció eredményeképpen L-glutaminsav és oxálecetsav /az ALAT esetén piroszölősav/ keletkezik. Mivel az ASAT által katalizált reakcióban keletkezett oxálecetsav az adott körülmények között meghatározott arányban spontán dekarboxileződik piroszölőssavvá, mindkét reakció végén a képződött piroszölősav mennyiségét mérjük az enzim-mentes összehasonlító oldattal szemben. Az így kapott E értéket a tesztkészletben megadott kalibrációs egyenes segítségével számítottuk át EU/l  $e_{lys}$ -re.

Az ASAT enzim aktivitásának mérése:

0,25 ml 0,1 M/l, pH 7,4 foszfátpufferhez, mely 0,1 M/l L-aszpartátot és 2 mM/l  $\alpha$ -ketoglutarátot tartalmazott, 0,05 ml vérplazmát /az összehasonlítónál deszt. vizet/ adtunk. Az így összeállított elegyeket egy órán át inkubáltuk 37 °C-on, majd 0,25 ml 1 mM/l koncentrációju 2,4-dinitrofenil-hidrazin oldatot mértünk hozzá, és szobahőmérsékleten 20 percig állni hagytuk. Ezután 2,5 ml 0,4 M/l NaOH oldat hozzáadásával beállítottuk az elegy pH-ját, majd pontosan 5 perc elteltével 540 nm-en megmértük a fényelnyelést. Abban az esetben, ha ennek értéke meghaladta a 0,260-at akkor a vérplazmát 0,9 %-os NaCl oldattal tisztázására

higitottuk, és megismételtük a mérést.

Az ALAT enzim aktivitásának mérése:

A mérés menete hasonló volt az ASAT-éhoz a következő eltérésekkel:

- a./ A szubsztrátoldat 0,1 M/l aszparaginsav helyett 0,2 M/l DL-alanint tartalmazott.
- b./ A 37 °C-os inkubálás 30 percig tartott.
- c./ A meghatározást akkor ismételtük meg higitott vérplazmával, ha a fényelnyelés értéke 0,375-et meghaladta.

A bemérési térfogatokat takarékosági szempontból a gyártó által ajánlottak a negyedére csökkentettük, méréseink szerint ez a meghatározás pontosságát nem befolyásolta.

Az egyes mérési sorozatok esetén legalább 6 enzimmentes összehasonlító oldatot készítettünk, minden minta enzimaktivitását három mérési párhuzamos átlagaként határoztuk meg.

Az extinkciókat a PYE UNICAM cég SP 8-100 UV/VIS típusu spektrofotométerével határoztuk meg.

### 3.8.2. Aktivitätsmérés az enzimtisztítás során

Az ASAT enzim tisztítási lépéseinél kapott minták enzimaktivitását Banks és mtsai. /1968/ általunk módosított módszerével határoztuk meg.

A módszer elve: a reakcióban keletkező oxálecetsav koncentrációja a 260 nm-en mért extinkció alapján meghatározható, ebből következtetünk az enzim aktivitására.

Mérés: 2,5 ml szubsztrátoldat + 0,025 ml enzim  $\rightarrow$  extinkció mérés 260 nm-en legalább 1 percig.

A kapott egyenes meredeksége arányos az enzimaktivitással. Azt az enzimaktivitást, amely a fenti körülmények között 0,1  $\Delta E$ /perc változást okozott önkényesen 1 egységnek /AU/ml/ választottuk.

A kromatográfiás frakciók enzimaktivitását a nagyfokú higulás miatt ezzel a módszerrel pontosan meghatározni nem tudtuk, ezért a frakciókból mintát vettünk, ezt hígítottuk, és kolorimetriás módszerrel mértük meg az enzimaktivitásokat.

### 3.9. A fehérjetartalom meghatározása

Az enzimitisztítás során -kromatográfiás frakciók kivételével- minden minta fehérjetartalmát Schachterle és Pollack /1973/ szerint határoztuk meg. Ez a módszer a jól ismert Lowry és mtsai. /1951/ féle eljárás leegyszerűsített, lerövidített változata.

Minden egyes mintából deszt. vízzel olyan 5 különböző hígítást készítettünk, melyek mindegyikének fehérjetartalma



összemérhető volt a BSA kalibrációs egyenes /25-200  $\mu\text{g/ml}$  BSA/ pontjainak valamelyikével. A mért extinkciókat a minták higitása reciprokának függvényében ábrázolva egyenest kaptunk, melynek ordináta-metszete megadta a minta saját összehasonlító értékét. Ez utóbbit levonva a mért értékből a kalibrációs egyenesről leolvasható a higitott oldat fehérjetartalma, ezt a higitással beszorozva megkaptuk az eredeti oldat fehérjetartalmát.

A kromatográfiás frakciók fehérjetartalmát 280 nm-en mért extinkciójuk alapján becsültük meg.

#### 4. AZ EREDMÉNYEK ISMERTETÉSE ÉS ÉRTÉKELÉSE

##### 4.1. IN VIVO növényvédőszer kezelések szervkárosító hatása halakra

###### 4.1.1. Rövid távu, behatároló kezelések

Az élővizeinkben lezajló, növényvédőszerek okozta hal-mérgezések két csoportba sorolhatók:

- a./ Nagy peszticid-koncentráció vízbe kerülése, mely gyors pusztulást okoz /közvetlen pusztító hatás/.
- b./ Kis mennyiségű növényvédőszer bemosódása, melynek hatása hosszú hetekig, hónapokig érvényesül, és csak más károsító hatásokkal összegződve okoz elhullást /közvetett pusztító hatás/ /Nemcsók, 1981/.

Utóbbi esetben a tömeges halpusztulás gyakran megmagyarázhatatlannak tűnik, hiszen a vízből és a halak szerveiből kimutatott növényvédőszerek szintje jóval alatta marad a letális hatást kifejtő mennyiségnek.

Kísérleteink célja ezen közvetett pusztító hatás modellezése volt. A halak több hónapos eltartása azonban meghaladta volna lehetőségeinket, ezért a természetben

lezajló mérgezési folyamatokat úgy kívántuk modellezni, hogy a peszticid-koncentrációkat növeltük, a kitettség időtartamát pedig csökkentettük.

Munkánk kezdetekor első feladatunk az volt, hogy a kiválasztott növényvédőszerrek mindegyikére meghatározzuk azt a kezelési koncentrációt, mely szubletális hatású, azaz nem pusztítja el azonnal a halakat-, de károsító hatása révén jól mérhető változásokat okoz az általunk választott biokémiai paraméterekben. A peszticid-koncentráció jó megválasztása azért is lényeges, mert az egyes fajok válaszreakciója közötti esetleges különbségek csak alacsony koncentrációjú kezelést követően mutathatók meg.

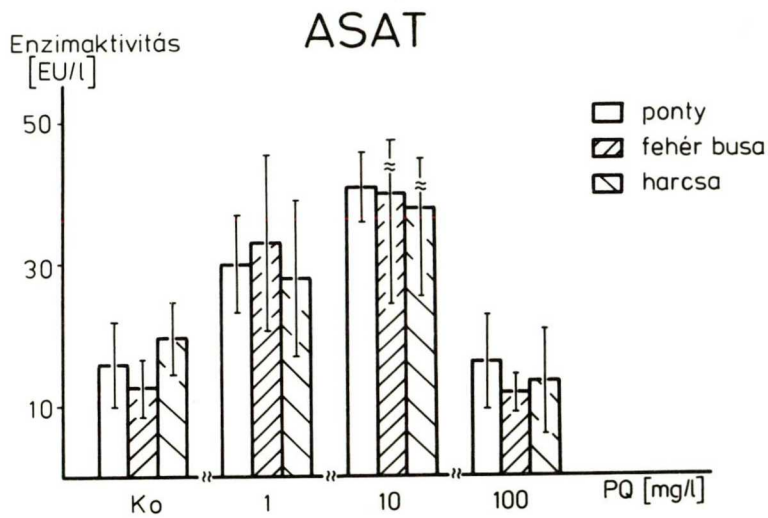
#### 4.1.1.1. Paraquat szervkárosító hatása a három halfajra

Az alacsonyabb /1 és 10 mg/l / koncentrációjú, két óra időtartamu PQ kezelések hatására mindhárom halfaj vérplazmájában jelentősen megemelkedtek az aminoszferáz enzimek aktivitásai, jelezvén a nekrozist. /7.8. tábla/.

Az aktivitás-növekedés mértéke mind a három faj esetén megközelítőleg azonosnak mondható.

A 100 mg/l-es PQ koncentrációval kezelt halak rövid időn belül hátukra fordultak, kopoltyufedőjük mozgása felgyorsult,

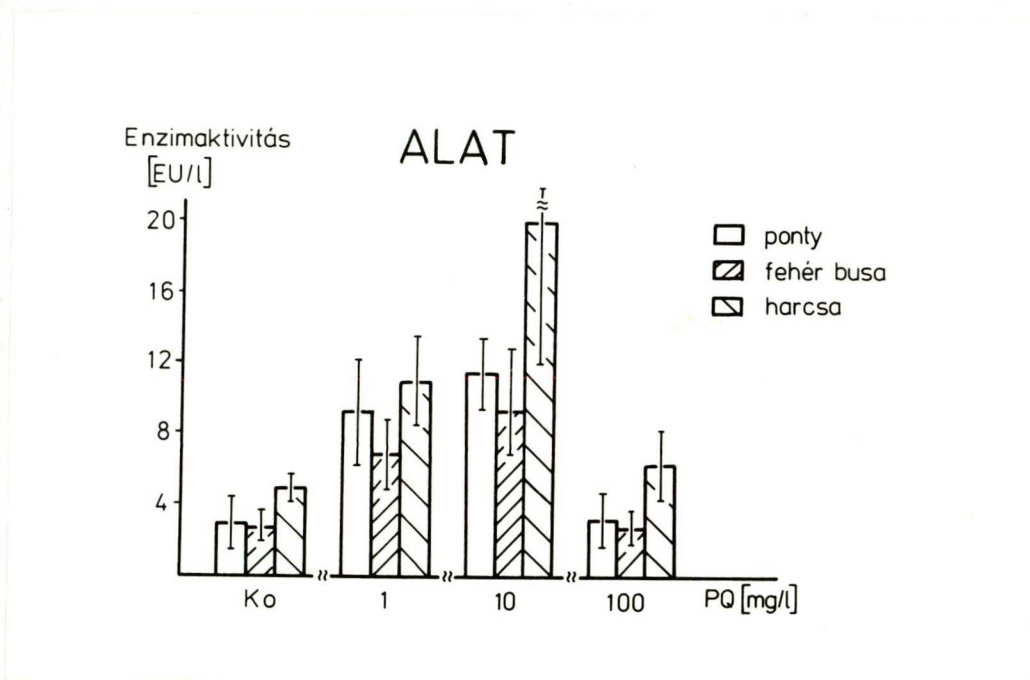
hasi hajszálereik kivörösödtek, majd a kezeléstől számított 5-10 perc elteltével elpusztultak.



7. ábra Különböző koncentrációju paraquat hatása a három halfaj vérplazma-ASAT aktivitására /3-8 minta átlaga $\pm$ S.D.; Ko:kontroll /

A felsorolt tünetek egyértelműen fulladásra utalnak, ezért valószínű, hogy nagy koncentrációju kezelés esetén a PQ elsődleges és gyors támadáspontja a kopoltyu hámja, a többi szerv /máj, vese stb./ sejtjeinek nekrozisa csak később következik be. A fenti szervek PQ-okozta károsodását Rojik és

munkatársai /1982/ morfológiai vizsgálatokkal igazolták.



8. ábra Különböző koncentrációju paraquat hatása a három halfaj vérplazma-ALAT aktivitására /3-8 minta átlaga+S.D.; Ko:kontroll/

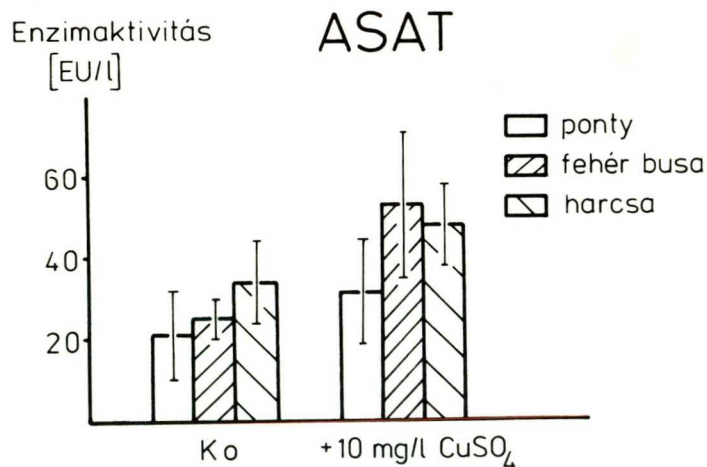
A kopoltyuhám drasztikus sérülése megakadályozta a normális gázcserét, ennek következtében a halak anoxiás állapotba kerültek, mindezt alátámasztja a vércukorszint és az LDH aktivitás megemelkedése a vérplazmában /Asztalos, 1983/.

Az aminoszferáz aktivitások változatlan szintje azt

mutatja, hogy ilyen rövid idő alatt a nagy ASAT- és ALAT-tartalmu szervek károsodása még nem következik be.

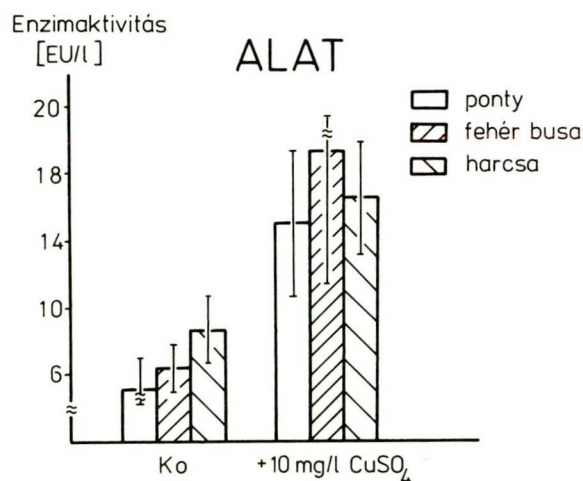
#### 4.1.1.2. Réz-szulfát szervkárosító hatása a három halfajra

A két óra időtartamu, 10 mg/l koncentrációju réz-szulfát kezelés hatását vizsgálva megállapítottuk, hogy mindhárom halfaj vérplazmájában jól mérhetően megnövekedtek a tesztelt enzimek aktivitásai /9. és 10. ábra/.



9. ábra Két óra időtartamu réz-szulfát kezelés hatása a három halfaj vérplazma-ASAT aktivitására /3-8 minta átlaga<sub>±</sub>S.D.; Ko:kontroll /

A két enzim értékeit összehasonlítva megállapítható, hogy az ALAT aktivitások kontrollhoz viszonyított emelkedése mindhárom halfaj esetén jóval meghaladja az ASAT-ét.



10. ábra Két óra időtartamu réz-szulfát kezelés hatása a három halfaj vérplazma-ALAT aktivitására /3-8 minta átlaga±S.D.; Ko:kontroll /

Mindez arra utal, hogy a réz-szulfát károsító hatása elsősorban azokra a szervekre irányul, melyek magas ALAT és alacsony ASAT tartalommal rendelkeznek; ilyen pl. a ponty esetén

a máj /Wittenberger és Giurgea, 1973/.

Reichenbach-Klinke /1972/ ill. Schreck és Lorz /1978/ eredményei alapján valószínűnek tűnik, hogy a májon kívül a kopolya és a vese sejtjei is megsérülnek.

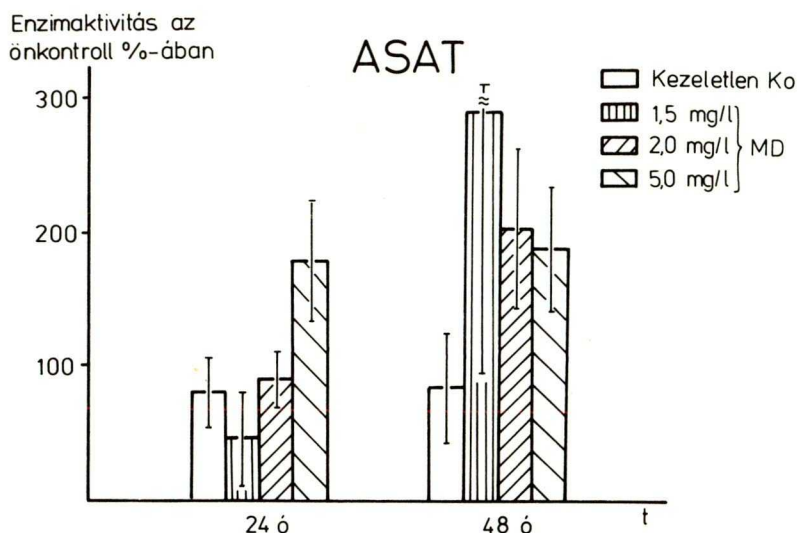
Eredményeinkből kitűnik, hogy a réz-szulfát szennyeződésre a vizsgált halfajok eltérő érzékenységgel reagáltak. A ponty és a busa vérplazmájának aminotranszferáz aktivitása nagyobb mértékben növekedett meg a kezelés hatására, mint a harcsáé, jelezve, hogy ezen halfaj szövetei nem károsodtak olyan súlyosan, mint a másik kettőé.

Ez a tény igazolja, hogy a peszticidek halakra gyakorolt hatását csak összehasonlító vizsgálatssorozatok elvégzése alapján lehet elég pontosan megbecsülni. Alapvetően hibás tehát az a hazai gyakorlat, hogy egy halfaj érzékenységéből általánosítanak a többiére.

#### 4.1.1.3. Különböző koncentrációju methidathion szervkárosító hatása pontyra

Alacsonyabb koncentrációju MD kezelés esetén 24 óra elteltével csak az 5 mg/l-es szerkoncentráció okozott jelentős ASAT aktivitás-növekedést a pontyok vérplazmájában, 48 óránál azonban már mindegyik koncentráció jól detektálható szervkárosodást eredményezett /11. ábra/.



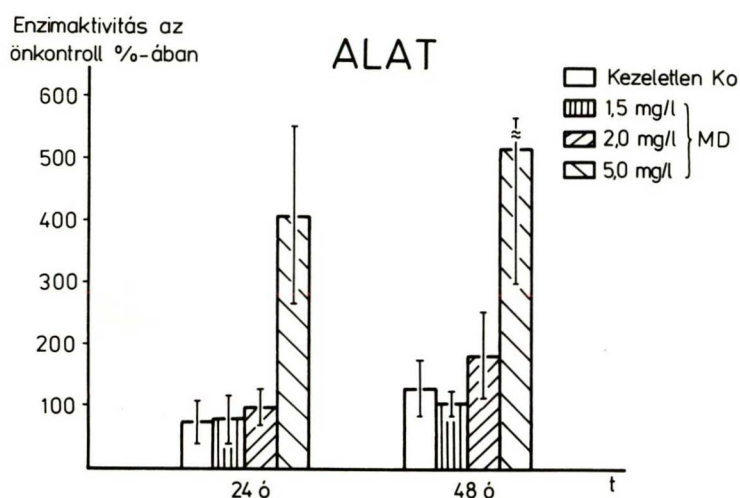


11. ábra Különböző koncentrációjú methidathion hatása pontyok vérplazma-ASAT aktivitására  
/3-8 minta átlaga±S.D.; Ko:kontroll /

Az ALAT szinteket tanulmányozva kitűnik, hogy az 5 mg/l-es MD koncentráció szervkárosító hatása mindkét időpont esetén ugrásszerűen meghaladja az alacsonyabb szertartalmu kezeléseket /12. ábra/.

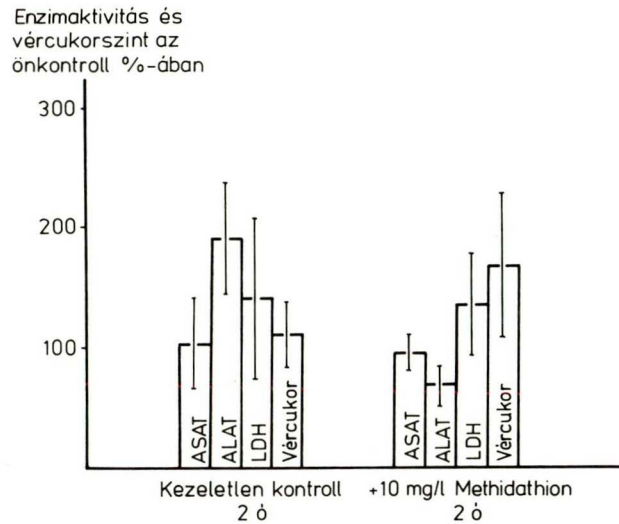
A 10 mg/l-es hatóanyag-koncentráció esetén a MD már minden valószínűség szerint az elsődleges, kolinészteráz-bénító

hatás alapján pusztítja el a pontyokat.



12. ábra Különböző koncentrációju methidathion hatása pontyok vérplazma-ALAT aktivitására /3-8 minta átlaga $\pm$ S.D.; Ko:kontroll /

Erre utal, hogy az aminoszferáz, LDH és vércukorszintek a két óra alatt elpusztult kezelt halakban nem mutatnak szembeötlő változást a kontrollokhoz képest /Asztalos és mtsai, 1982/, míg a vérplazma acetilkolinészteráz aktivitása jelentősen csökkent /Nemcsók és mtsai, 1982/.



13. ábra Letális koncentrációju methidathion hatása pontyok vérplazmájának ASAT, ALAT, LDH aktivitására és vércukorszintjére /3-8 minta átlaga+S.D./

Kísérleteink látványosan jelzik, hogy a növényvédőszerek elsődleges hatása mellett az alacsonyabb koncentrációk esetén számolni kell a mellékhatásokkal is, melyek fontos szerepet tölthetnek be a károsodás kialakulásában.

#### 4.1.2. Hosszu távu kezelések

A céljainknak megfelelő szerkoncentrációk kiválasztása után megkezdtük a növényvédőszer hosszú távu, időfüggő hatásának letesztelését.

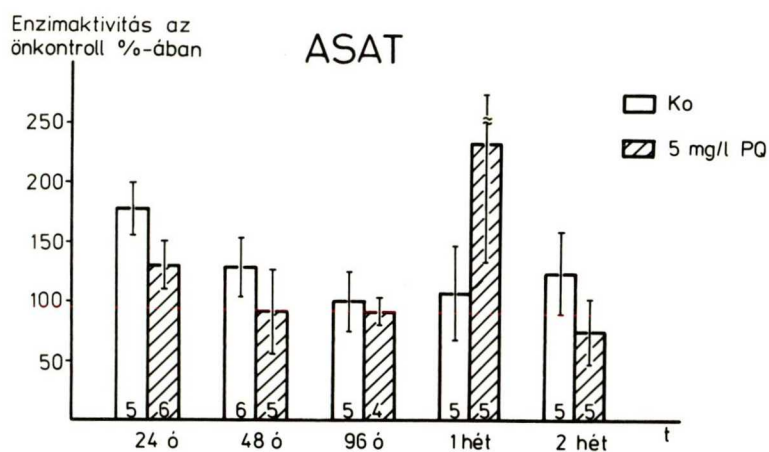
A vérmintavétel időpontjait úgy választottuk meg, hogy az esetleges gyors hatást /24, 48 és 96 óra/ és ennek „lecsengését” /1-2 hét/, ill. a lassan kialakuló szervkárosítást egyaránt ki tudjuk mutatni.

##### 4.1.2.1. Paraquat szervkárosító hatása pontyra

Előző eredményeinktől eltérően a rövidebb időtartamu PQ kezelés hatására nem következett be ASAT szintnövekedés, sőt a kezelt halakból mért enzimaktivitások a kezeletlen kontrollok értékei alatt maradtak. Egy hét elteltével jelentős szervkárosodás mutatható ki, majd a szint újra a kontrolloké alá csökken /14. ábra/.

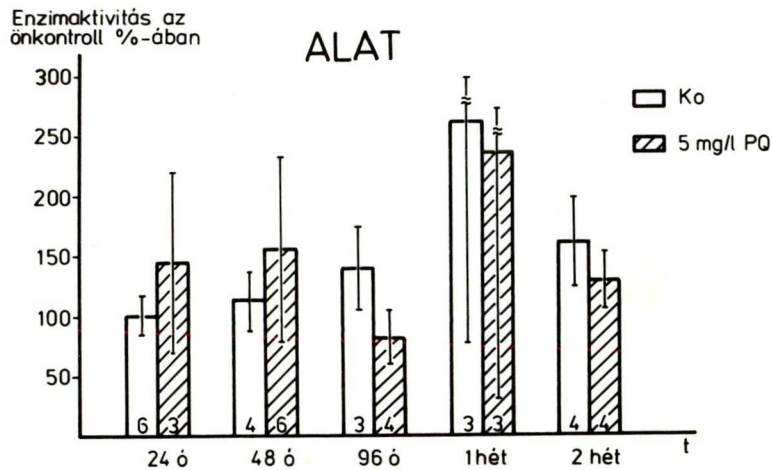
Az ALAT aktivitások elemzése rövid idő alatt kialakuló, de a 96 órás időponttól már nem detektálható szervkárosodást mutat /15. ábra/.

Az a tény, hogy a PQ szervkárosító hatása ezen kísérleteknél időben más képet mutat, mint a behatároló kezeléseknél, arra utal, hogy a halak pillanatnyi kondíciója jelentősen befolyásolhatja a károsító hatás kifejlődését.



14. ábra Hosszu távu paraquat kezelés hatása a pontyok vérplazmájának ASAT aktivitására /a vizsgált egyedszám az oszlopok alján, átlag±S.D.; Ko:kezeletlen kontroll,/

Mivel a poikilotherm állatok szervezete a víz hőmérsékletétől függően működik, ugyanaz a szerkoncentráció amely tavasszal letális hatású a legyengült halakra, télen valószínűleg nem fejt ki közvetlen pusztító hatást.



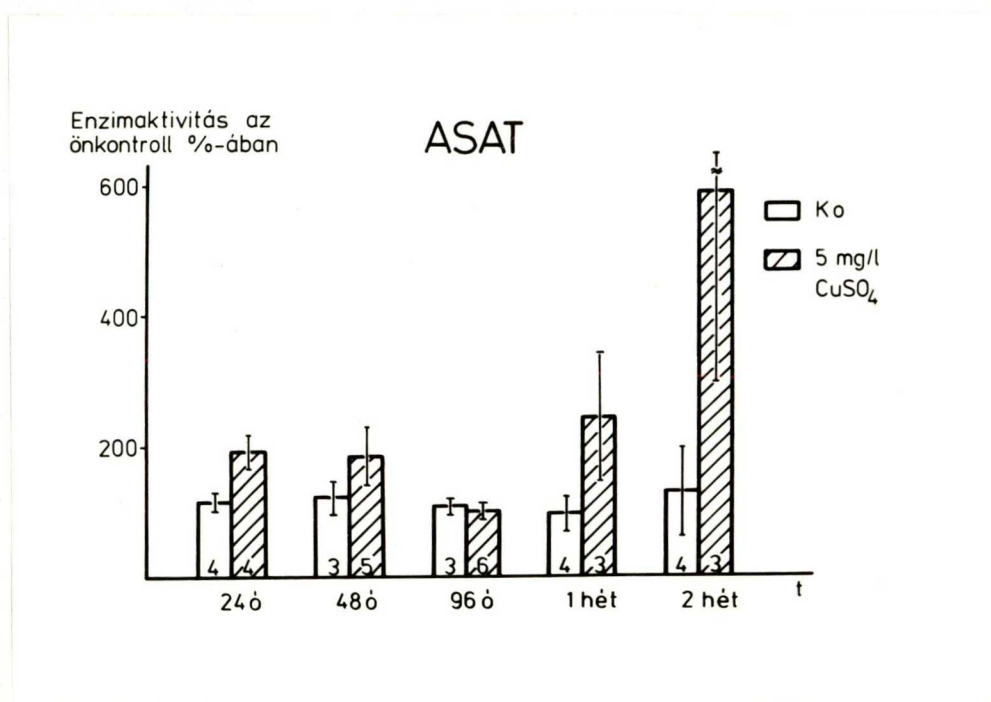
15. ábra Hosszu távu paraquat kezelés hatása a pontyok vérplazmájának ALAT aktivitására /a vizsgált egyedszám az oszlopok alján, átlag±S.D.; Ko:kezeletlen kontroll/

#### 4.1.2.2. Réz-szulfát szervkárosító hatása pontyra

A réz-szulfát 5 mg/l-es koncentrációja által kifejtett hatást tanulmányozva megállapítható, hogy az aktivitás mindkét enzim esetén nő a kezeletlen kontrollokhoz képest /24, 48 óra/, majd azok szintjére, sőt alá csökken, ezután



ujra jelentősen megnövekszik /2 hét/ /16. és 17. ábra/.

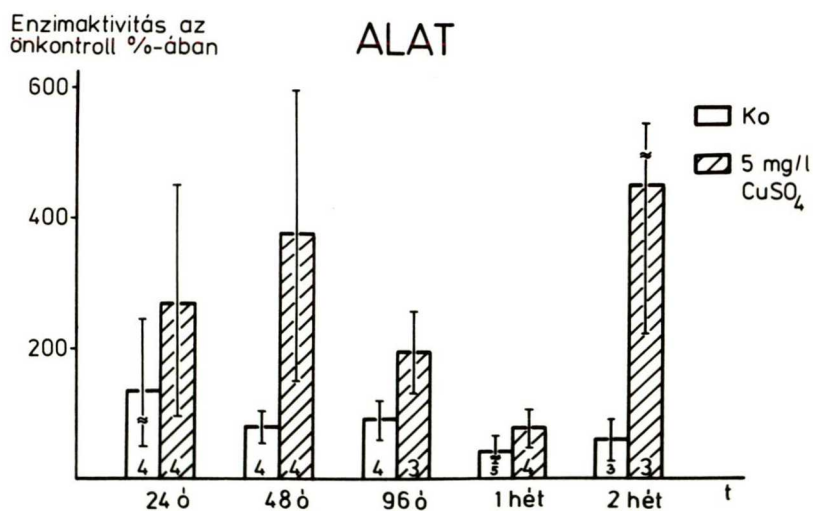


16 ábra Hosszu távu réz-szulfát kezelés hatása a pontyok vérplazmájának ASAT aktivitására /a vizsgált egyedszám az oszlopok alján, átlag±S.D.; Ko:kezeletlen kontroll/

A szervkárosodás ilyen típusu időfüggésének az okai elképzelésünk szerint a következők lehetnek:

- a./ A réz-szulfát lassabban épül be a szövetekbe, mint a PQ és a MD, és lassabban is ürül ki onnan.

b./ Az egyes szervekbe az idő függvényében más-más időpontban jut be a szer, és ilyenkor a vérplazmába kiszabaduló enzim mennyiség függ a károsodott szervek szöveteinek aminotranszferáz aktivitásától.

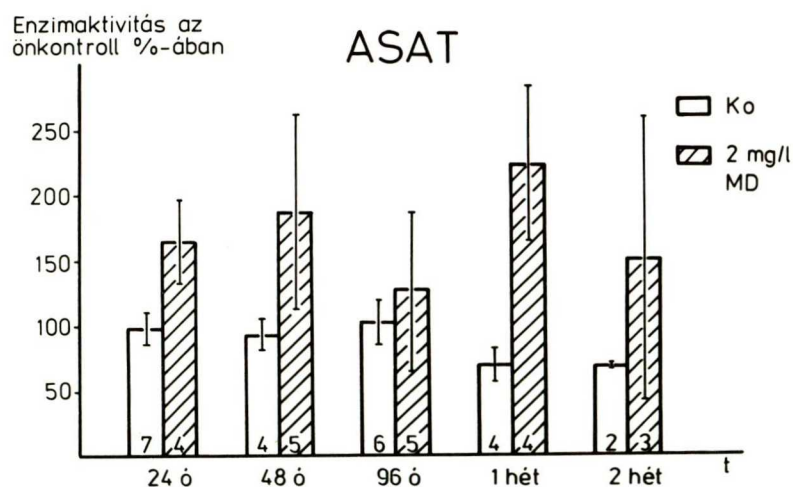


17. ábra Hosszu távu réz-szulfát kezelés hatása a pontyok vérplazmájának ALAT aktivitására /a vizsgált egyedszám az oszlopok alján, átlag±S.D.; Ko:kezeletlen kontroll/

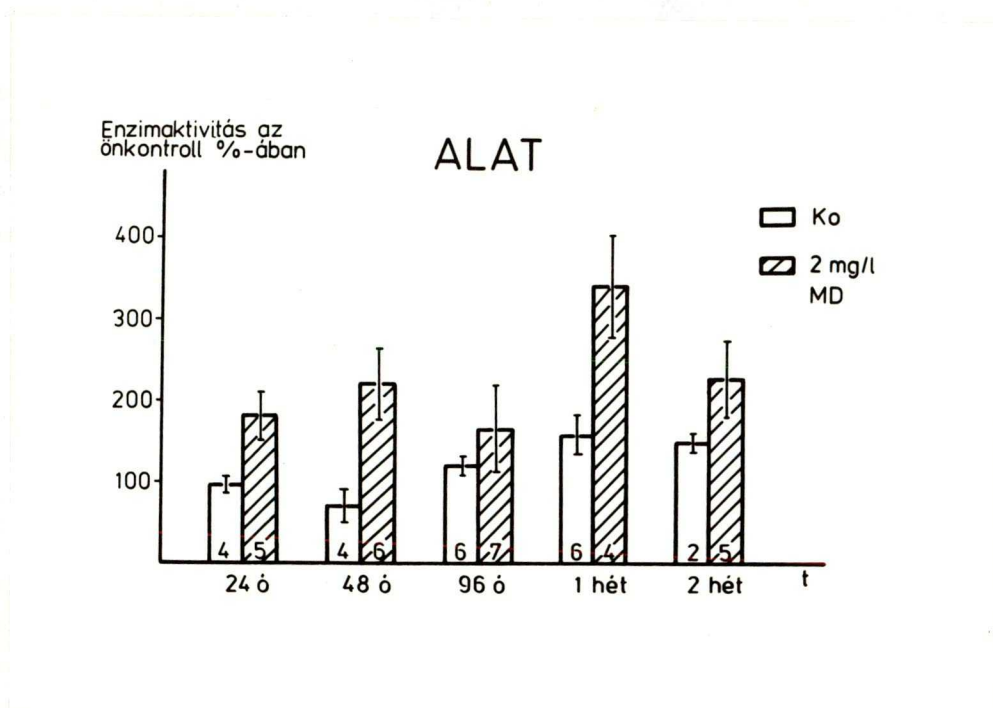


#### 4.1.2.3. Methidathion szervkárosító hatása pontyra

A MD 2 mg/l töménységben alkalmazva a réz-szulfát-hoz hasonlóan valószínűleg két lépcsős károsító mechanizmus szerint hat. /18. és 19. ábra/.



18. ábra Hosszu távu methidathion kezelés hatása a pontyok vérplazmájának ASAT aktivitására /a vizsgált egyedszám az oszlopok alján, átlag±S.D.; Ko:kezeletlen kontroll/



19. ábra Hosszu távu methidathion kezelés hatása a pontyok vérplazmájának ALAT aktivitására /a vizsgált egyedszám az oszlopok alján, átlag $\pm$ S.D.; Ko:kezeletlen kontroll/

Megállapítottuk, hogy a MD a réz-szulfátnál alacsonyabb koncentrációban alkalmazva hasonló mértékű aminoszferáz aktivitás-növekedést eredményez a pontyok vérplazmájában, ez a magas szint azonban gyorsabban kifejlődik, és hamarabb csökkenni kezd, mint az 5 mg/l réz-szulfát okozta szintnövekedés.

A károsítás két fokozata:

- a./ Gyors hatás, melynek csúcspontja mindkét enzim mérése szerint 48 óránál van, és a 96 órás időpontnál már erősen csökkent mértékű.
- b./ Lassan kifejlődő szervkárosító hatás /1 hétnél tetőzik, 2 hétnél már csökkenő tendenciát mutat/.

4.1.3. Az IN VIVO kezelések eredményeinek összegezése

Kísérleteinket elemezve megállapítható, hogy

- az ASAT és ALAT enzimek aktivitásának vérplazmából történő mérésével a vizsgált halfajok mindegyikében előforduló szervkárosodás biztonságosan detektálható
- a növényvédőszeresek szervkárosító hatása erőteljesen függ az alkalmazott hatóanyag koncentrációjától, a hatás időtartamától, a halfajtól, a halak kondicionális állapotától és a környezeti tényezőktől /viz hőmérséklete, pH-ja stb./
- a három peszticid mindegyike már viszonylag alacsony /1-5 mg/l / koncentrációban szervkárosodást okoz a vizsgált halfajokban.

#### 4.2. Az általunk kifejlesztett enzimdiagnosztikai tesztrendszer „in natur” alkalmazása halpusztulás okainak felderítésére

1982. november 4-én halpusztulást észleltek a pálfmonostorai Keleti Fény MgTsz halastavaiban. Az Alsó-Tiszavidéki Vizügyi Igazgatóság szakemberei a helyszinre érve nagy számu elpusztult és pusztulófélben levő halat találtak az un. teleltető halastavakban. A víz hőmérséklete 8 °C; oldott O<sub>2</sub> tartalma hajnalban 4,2 mg/l volt. A még élő egyedekből 3 db 6-700 g-os pontyot vizsgálat céljára beszállítottak intézetünkbe.

A halak farokvénájából a korábban leirt módszerrel vért vettünk, lecentrifugáltuk, és a vérplazmából mértük az ASAT és ALAT enzimek aktivitását Reitman és Frankel /1957/ módszere alapján, ill. az AChE enzim aktivitását Ellman és mtsai /1961/ szerint. Kontrollként megegyező vízhőmérsékleten tartott, azonos méretű egészséges pontyok megfelelő adatait használtuk fel.

A beszállított pontyok hasa alján a vérerek jól látszottak, kopoltyufedőjük mozgása szabálytalan, testtartásuk merev, görcsös volt. A vérplazmából mért aminosz-enzimaktivitások a kontrollhoz hasonló értékűek, a vérplaz-

ma AChE aktivitások nagymértékű csökkenést mutattak a kontroll egyedek értékeihez képest /3. Táblázat/. A halak szerveiben szintén erőteljesen csökkent az AChE aktivitás.

4. Táblázat Halpusztulásból származó és kontroll pontyok vérplazmájának enzimaktivitásai /átlag  $\pm$  S.D./

| Minta                          | ASAT<br>/U/l/   | ALAT<br>/U/l/   | AChE<br>/U/l/    |
|--------------------------------|-----------------|-----------------|------------------|
| Halpusztulásból                |                 |                 |                  |
| származó pontyok<br>/3 egyed/  | 28,5 $\pm$ 3,5  | 1,27 $\pm$ 0,31 | 66 $\pm$ 10,9    |
| Kontroll pontyok<br>/10 egyed/ | 32,4 $\pm$ 18,8 | 1,38 $\pm$ 0,63 | 188,4 $\pm$ 37,2 |

Eredményeink alapján a halpusztulás kolineszteráz-bénulás eredményeként következett be, ennek oka feltehetően a halastó környezetében alkalmazott inszekticid vagy más vegyület/ek/ nagyobb mennyiségének vízbe kerülése lehetett. Erre vonatkozó adatokat begyűjteni nem állt módunkban.

#### 4.3. Az aszpartát aminotranszferáz enzim tisztítása ponty májból

Munkánk ezen fejezetének célja az volt, hogy a megtisztított enzimet jellemezzük, ennek ismeretében az általunk használt ASAT mérési módszereket szükség esetén módosítsuk, ill. in vitro növényvédőszer kezeléssel megvizsgáljuk, hogyan hatnak a kiválasztott peszticidek közvetlenül az enzim aktivitására.

Enzimforrásként a májat választottuk, mert erre a célra viszonylag nagy mérete és jelentős ASAT tartalma miatt a legalkalmasabb szervnek mutatkozott.

##### 4.3.1. A pontyok májának kiemelése és tárolása

A halakat a koponyafedőjükre mért erős ütésekkel megbénítottuk, majd a hasüregüket óvatosan felnyitottuk. A májat kiemeltük, elkülönítettük a béltől, leválasztottuk róla az epehólyagot és a zsírszövetet, és jeges vízben lehűtött főzőpohárban összegyűjtöttük. Az így előkészített májakat  $-20^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk, míg elegendő mennyiség összegyűlt ahhoz, hogy a tisztítást megkezdhessük /max. 2 hét/.

##### 4.3.2. Homogenizálás

A különböző ASAT tisztítási eljárásokon számos puffert ajánlanak homogenizálásra. Legelőnyösebbnek a dikarbon-

sav-komponensű pufferek mutatkoznak, mivel ezek a vegyületek az enzim szubsztrátjaihoz való hasonlóságuk révén bekötődnek a szubsztrátkötő helyre, és védő hatást fejtenek ki. Korábban igen elterjedt volt a malát-komponensű pufferek felhasználása /Jenkins és mtsai, 1958; Velick és Vavra, 1962/, később azonban kimutatták, hogy az almasav a hőkezelés során stabil S-/ $\alpha$ ,  $\beta$ -dikarboxi-etil/-származékokat képez az enzim szabad -SH csoportjaival /Turano és mtsai, 1964/, ezért borostyánkőssavval helyettesítették.

Mindezt figyelembe véve a Banks és mtsai. /1968/ által használt 0,1 M/l koncentrációjú, pH 6,0 borostyánkőssav/NaOH puffert választottuk a homogenizáláshoz.

Az első kísérleteknél az óvatosan kiolvasztott, majd jégben hűtött máj 3-4 g-os adagjait kétszeres mennyiségű 0 °C-os homogenizáló pufferrel homogenizáltuk el Potter-csőben, alacsony fordulatszámon 2-3 percig, közben jégben tartva a csövet.

Később, mikor az egy alkalommal feldolgozott máj mennyisége egyre növekedett, áttértünk a háztartási turmixgép használatára. Ebben jóval nagyobb adagot /100 g máj + 200 ml puffer/ lehetett egyszerre elhomogenizálni 3×5 másodperc alatt, alacsony fordulatszámon. Az így kapott minta konzisztenciája, ASAT aktivitása és fehérjetartalma meg-

egyezett a Potter-csőben homogenizáltéval.

A homogenizátumot ezután 3 órán keresztül kevertettük jeges vízfürdőben tartva, majd egy éjszakán keresztül állni hagytuk 4 °C-on, hogy a szövetdarabok által bezárt enzim molekulák oldatba jutását elősegítsük. Ezután lecentrifugáltuk 0 °C-on 3000 g-vel 2 órán át, és a felülusztót leöntöttük az üledékről.

#### 4.3.3. Hőkezelés

Ez a módszer egyszerűsége és olcsósága miatt igen kedvelt az enzimtisztítási folyamatokban.

Az ASAT tisztításánál is igen gyakran szerepel az irodalomban, igaz az adott enzimforrástól függően nagyon eltérő az alkalmazott hőmérséklet és idő: pl. Rej /1981/ emberi ASAT<sub>C</sub> izoenzim tisztításánál 52 °C-on 20 percig, míg John és Jones /1974/ juh máj ASAT<sub>C</sub> izoenzim tisztításánál 76 °C-on 15 percig hőkezelték a homogenizátumot.

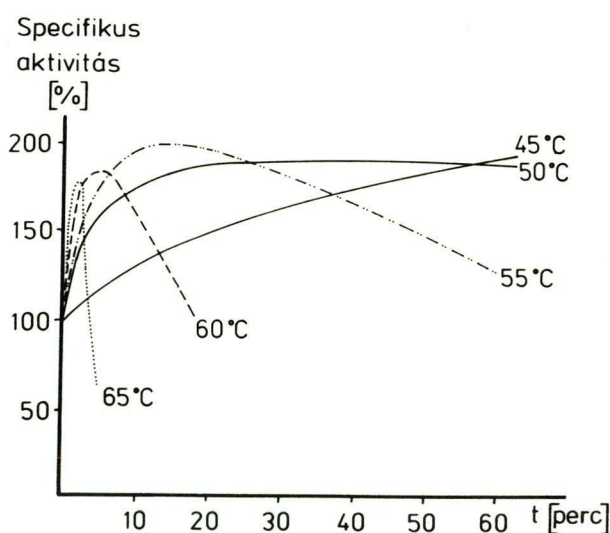
Ahhoz tehát, hogy ezt a lépést a tisztítási folyamatba beilleszthessük, meg kellett vizsgálni a ponty máj ASAT enzimek viselkedését a hőkezelés során.

##### 4.3.3.1. Az enzim hőinaktiválódásának hőmérséklet- és időfüggése

A lecentrifugált homogenizátum felülusztóját 3 ml-ként



szétosztottuk 10 ml-es centrifugacsövekbe, majd 45, 50, 55, 60, 65 és 70 °C-os vízfürdőben 1-60 percig hőkezeltük. A kívánt időtartam lejártával a centrifugacsöveket jeges vízbe helyeztük, majd lehülés után 0 °C-on 3700 g-val 2 óráig centrifugáltuk. A felülusztót leöntöttük, és mértük az enzimaktivitását ill. fehérjetartalmát.



20. ábra A különböző hőmérsékleteken hőkezelt homogenizátum specifikus aktivitásának változása az idő függvényében /100 %:a nyers homogenizátum specifikus aktivitása/

A hőkezelt homogenizátumok specifikus aktivitását vizsgálva megállapítható, hogy a legjobb tisztulást az 55 °C-os vízrüdőben 10-20 percig hőkezelt minták esetén sikerült elérni. /20. ábra/. Ez a hőmérséklet-idő párosítás annál inkább megfelelő céljainkra, mert az évszakkal és kondícióval összefüggésben minden bizonnyal változó hőérzékenyséű enzimek melegítésekor az eltérések nem okoznak nagy változást a specifikus aktivitásban a görbe lapos platója miatt.

Ennek megfelelően további kis térfogatu hőkezelési kísérleteinkben 55 °C-on 15 percig melegítettük a mintákat.

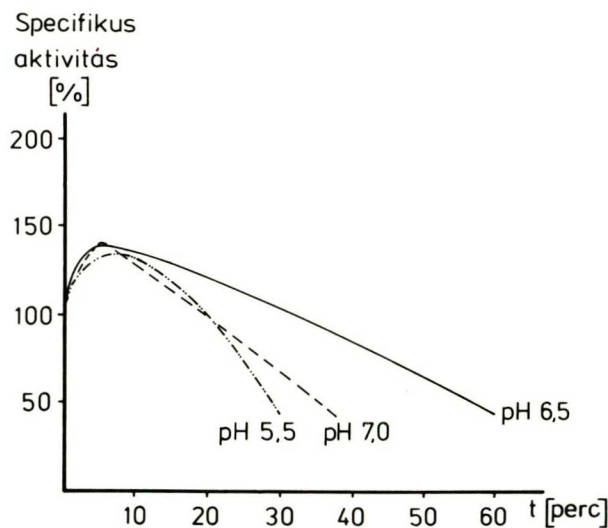
#### 4.3.3.2. Az enzim hőinaktiválódásának pH-függése 55 °C-on

A hőkezelés optimális pH-jának megállapítása céljából a lecentrifugált homogenizátum felüluszójából 50-50 ml-eket kimértünk, majd állandó kevertetés mellett 1 N HCl cseppenkénti hozzáadásával pH-jukat 5,0-ra és 5,5-re, 1 N NaOH hozzáadásával pedig pH 6,5, 7,0, 7,5, és 8,0-ra állítottuk be. Ezután az előbbi pontban leírt módon elvégeztük a hőkezelést 55 °C-on, majd a méréseket.

A csökkenő és növekvő pH egyaránt kedvezőtlenül befolyásolta a hőkezelés eredményét /21. ábra/.

A legnagyobb specifikus aktivitásu minták alkotta plató hosszúsága lecsökkent, ill. a magas pH-k esetén egészen eltűnt.

Az a tény, hogy a maximális tisztulás egyik esetben sem közelítette meg a pH 6,0-s puffer használatával elért értéket, valószínűleg a más-más szállításból származó halak enzimei közötti eltéréseknek tudható be.



21. ábra Különböző pH-ju, 55 °C-on hőkezelt homogenizátumok specifikus aktivitásának változása a hőkezelés idejének függvényében /100 %:a nyers homogenizátum specifikus aktivitása/

A kísérlettel bebizonyítottuk, hogy az eredetileg alkalmazott 6,0-s pH-érték a legoptimálisabb a hőkezeléshez.

#### 4.3.3.3. PLP, $\alpha$ -ketoglutársav és EDTA hatása az enzim hőinaktiválódására

Jenkins és mtsai. /1959/ sertés szivból tisztított ASAT enzim hőinaktiválódási görbáját vizsgálva megállapították, hogy az enzim  $\alpha$ -ketoglutarát nozzáadásával hőstabilabbá, L-aszpartát hozzáadásával hőérzékenyebbé vált. Ennek magyarázata az, hogy előbbi esetben a koenzimek piridoxal-, utóbbi esetben piridoxamin-formában vannak, és a piridoxamin-forma sokkal könnyebben leoldható az apoenzimről /Scardi és mtsai, 1963/. A koenzimét vesztett apoenzim molekula részleges proteolizist szenvedhet, mely inaktiválódását eredményezi /Okada és Hirose, 1979/.

Kagee és Phillips /1971/ 2,5 mM/l, Rej /1981/ 6,0 mM/l EDTA koncentrációju oldatban végezte a hőkezelést, valószínűleg a fémtartalmu proteázok inaktiválása céljából.

Ezen három adalékanyag különböző koncentrációinak az enzim hőstabilitására kifejtett hatását az 55 °C-on 15 percig végzett hőkezelések során mi is meghatároztuk.

A kísérletet úgy végeztük el, hogy a három anyag mindegyi-

kéből külön-külön tömény törzsoldatot készítettünk, melynek pH-ját 6,0-ra állítottuk be 1 N NaOH cseppenkénti adagolásával. Ezekből a kívánt mennyiséget hozzáadtuk a lecentrifugált homogenizátum felüluszojának 3-3 ml-éhez /kontroll: pH 6,0 homogenizáló puffer/, majd a hőkezelést a már ismertett módon elvégeztük.

A PLP még 20  $\mu\text{M}/\text{l}$  koncentrációban sem növelte a hőkezelt homogenizátum specifikus aktivitását, ezért további alkalmazásától eltekintettünk.

Az  $\alpha$ -ketoglutársav már alacsony koncentrációban jelentősen növelte a hőkezelés után kapott enzimaktivitást, a fehérjetartalom változatlan értéke mellett /22. ábra/.

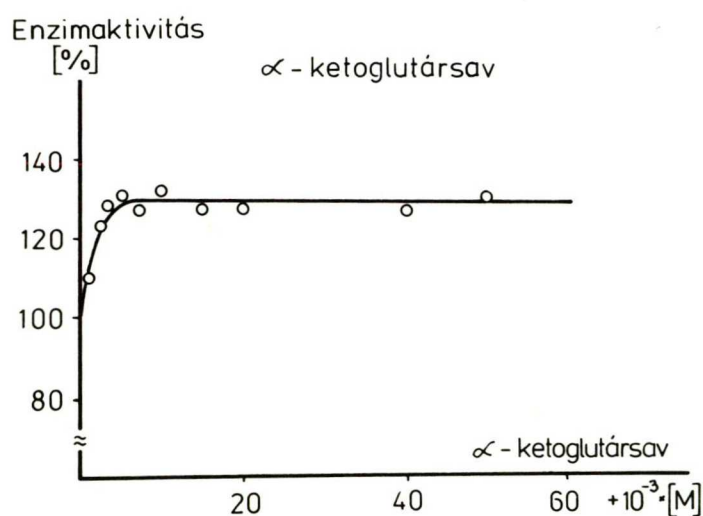
A kapott eredmények alapján valószínű, hogy a 10 mM/l

$\alpha$ -ketoglutársav koncentrációnál az enzim molekulák koenzimeinek legnagyobb hányada piridoxal-formában van, ezért további kísérleteinkben a homogenizáló puffert úgy készítettük el, hogy 10 mM/l  $\alpha$ -ketoglutársavat tartalmazott /egyéb tulajdonságait változatlanul hagyva/.

Az EDTA tartalom a hőkezelés során hőérzékenyebbé tette az enzimet /23. ábra/. Ennek oka feltevésünk szerint, egy az aktiv centrumban elhelyezkedő fématom eltávolítása lehet. Ezen feltételezett fématom kötődése viszonylag erős, mivel a

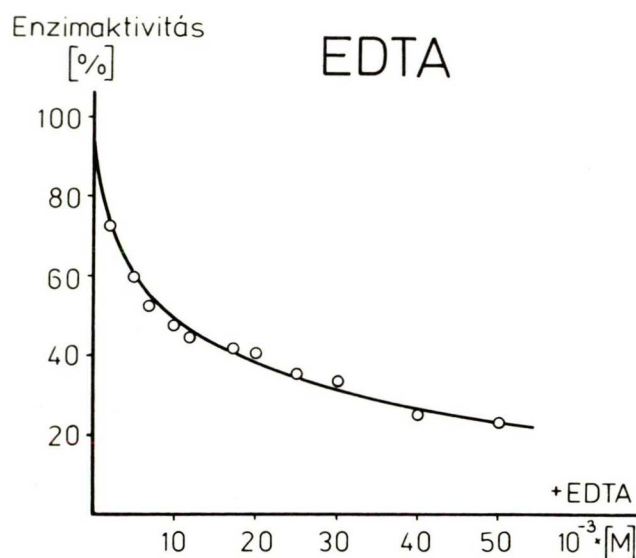


fenti EDTA koncentrációk hatására 25 °C-on 24 óra elteltével az enzim aktivitása változatlan maradt.



22. ábra Különböző koncentrációju  $\alpha$ -ketoglutársav hatása az enzimaktivitásra 55 °C-on 15 percig hőkezelt minták esetén /100 %:  $\alpha$ -ketoglutársav nélkül hőkezelt minta/





23. ábra Különböző koncentrációju EDTA hatása az enzimaktivitásra 55 °C-on 15 percig hőkezelt minták esetén /100%:EDTA nélkül hőkezelt minta/

Az EDTA alkalmazása a hőkezelésnél tehát elkerülendő.

#### 4.3.3.4. A hőkezelés felnagyítása

Ahhoz, hogy az enzimtisztítási eljárás nagy méretekben is kivitelezhető legyen, minden lépést a kellő méretűre kell nagyítani, úgy, hogy a kis mennyiségekre beállított rendszer előnyeit a lehető legkisebb mértékben veszítsük el.

Az egyszerre hőkezelt minták térfogatát növelve megállapítottuk, hogy az 100 ml-ről 200 ml-re már csak a kapott specifikus aktivitás jelentős romlásával emelhető, ezért egységként a 100 ml-t választottuk. Mivel a nagyobb térfogatú minta jóval lassabban melegedett fel, és hűlt le /9 ill. 3 perc/, ezért magasabb hőmérsékleten előmelegítést alkalmaztunk, és a hőkezelés idejét 10 percre csökkentettük le.

A hőkezelés kivitelezése: 250 ml-es lombikba /Erlenmeyer/ 100 ml homogenizátumot adagolva, intenzív kevertetés és az oldat hőmérsékletének állandó mérése mellett. Előmelegítés 65 °C-os vízfürdőben /kb. 3perc/, hőkezelés 56,5 °C-os vízfürdőben /a minta hőmérséklete 55 °C/ 10 percig, lehűtés jeges vízben kevertetve 25 °C-ra /3 perc/.

A hőkezelt homogenizátumot 0 °C-on, 3000 g-vel 2 órán át centrifugáltuk, és a felülúszóval dolgoztunk tovább.

Az így kapott specifikus aktivitások szépen megközelítették a kis térfogatú hőkezeléssel elért értékeket.

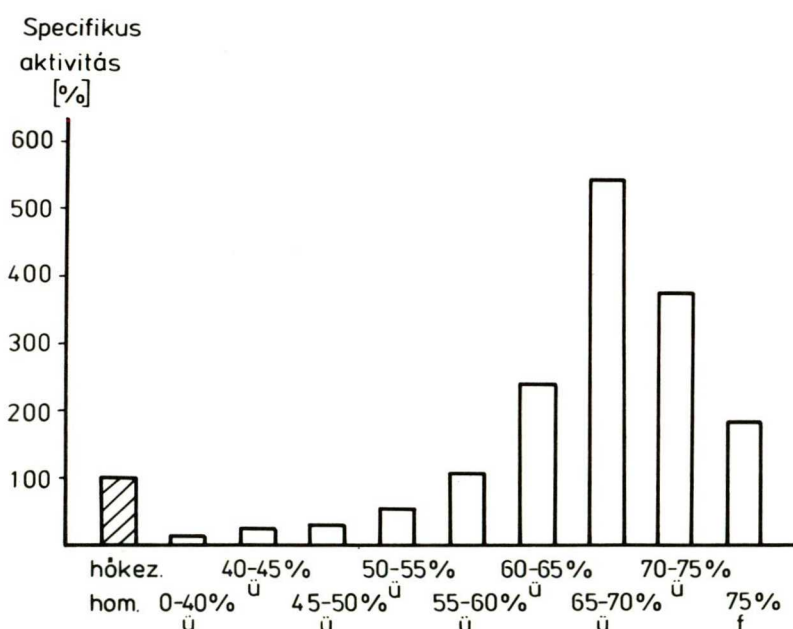
#### 4.3.4. Ammónium-szulfátos kisózás

##### 4.3.4.1. A telítés alsó és felső határának megállapítása

A hőkezelt homogenizátum 20-20 ml-es részleteihez állandó kevertetés közben porított ammónium-szulfát kis részle-



teit adagoltuk szobahőmérsékleten. Az így kapott hét, egyenként 40, 45, 50, 55, 60, 65 és 70 %-ra telített oldatot egy éjszakán át 4 °C-on állni hagytuk, majd lecentrifugáltuk 0 °C-on 3000 g-vel 2 órán át.



24. ábra Az ammonium-szulfáttal különböző mértékig telített frakciók specifikus aktivitása /100 %; a hőkezelt homogenizátum spec. akt; három párhuzamos kísérlet egyike/

A kapott felüluszókat külön-külön 5 %-kal tovább telítettük,

állni hagytuk, és lecentrifugáltuk az előbbihez hasonló módon. Az üledékeket 0,5-0,5 ml 0,02 M/l pH 7,5 foszfát-pufferben feloldottuk, és ezen puffer 2 literes térfogataival szemben 4 °C-on 3 órán, majd 1 órán keresztül végrehajtott dialízissel sómentesítettük.

Az enzim lecsapódása az üledékbe kb. az 50 ill. 55 %-os telítésnél kezdődött meg /24. ábra/.

A telítési határok kiválasztása a tisztítás céljától függ. Ha csak az egyik izoenzim megtisztítása a cél, a rést szűkíteni lehet /Campos-Cavieres és Munn, 1973/, a két izoenzim kinyeréséhez azonban tágabb intervallumot kell választani /Leung és Henderson, 1981/.

Esetünkben a 60-75 %-os telítési határok látszólag optimálisnak.

#### 4.3.4.2. A kisózás felnagyítása, sómentesítés

A hőkezelt homogenizátum 500-700 ml-ét az előző pontban leírt módon ammónium-szulfáttal frakcionálva a tisztulás nem érte el a várt értéket. Mivel a 0-60 %-os telítésnél kapott üledék ASAT összaktivitása közel 25-30 %-a volt a 60-75 %-os üledékének, a telítés alsó határát 55 %-ra szállítottuk le. Így az enzim összaktivitásának 80-85 %-a az általunk választott intervallumban csapódott le.

Mivel a dialízis után a különböző frakciókban mérhető összaktivitás kevesebbnek mutatkozott a kisózás előttinél, a továbbiakban az üledéket 10 mM/l  $\alpha$ -ketoglutarát és 40  $\mu$ M/l PLP-ot tartalmazó 0,02 M/l, pH 7,5 foszfát-puffer minimális mennyiségében oldottuk fel, és ugyanezen összetételű pufferrel többször átmosott Sephadex G-25 oszlopon /30,2 l, 4 cm/ sómentesítettük.

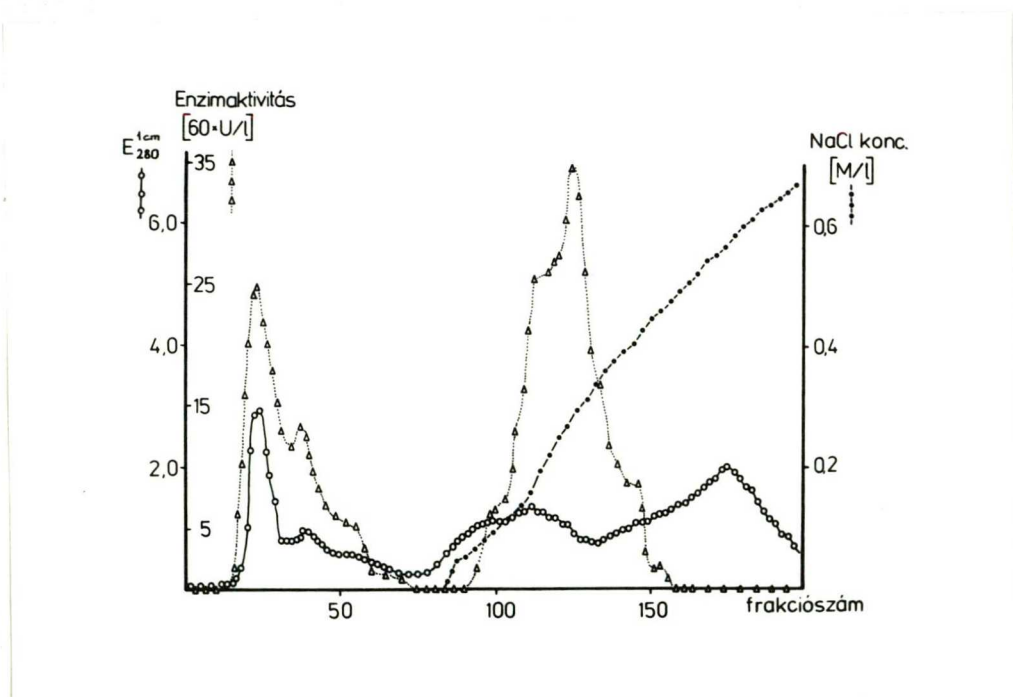
#### 4.3.5. A két izoenzim szétválasztása ioncserés kromatográfiával, membránszűrés

A két izoenzim szétválasztására a leggyakrabban alkalmazott módszert, az ioncserés oszlopkromatográfiát használtuk fel. Szorbensként a kiváló tulajdonságú DEAE-gyöngycellulózt alkalmaztuk, a hőmérséklet 4 °C volt.

Az aktivált szorbenst 0,02 M/l, pH 7,5 foszfát-pufferben pH- és vezetőképesség-állandóságig ekvilibráltattuk, majd oszlopba töltöttük /17,5  $\times$  3,9 cm/. /A puffer jellemzőinek kiválasztása a részlegesen tisztított enzim kis mennyiségeivel végzett szorpciós vizsgálatok eredményeként történt./  
Elució: először a fenti pufferrel, később a pufferben oldott NaCl grádienssel; frakció-térfogat: 5 ml /25. ábra/.

Az aktiv csucsokat tartalmazó frakciókat összegyűjtöttük, s mivel ezek térfogata a nagyfokú higulás miatt

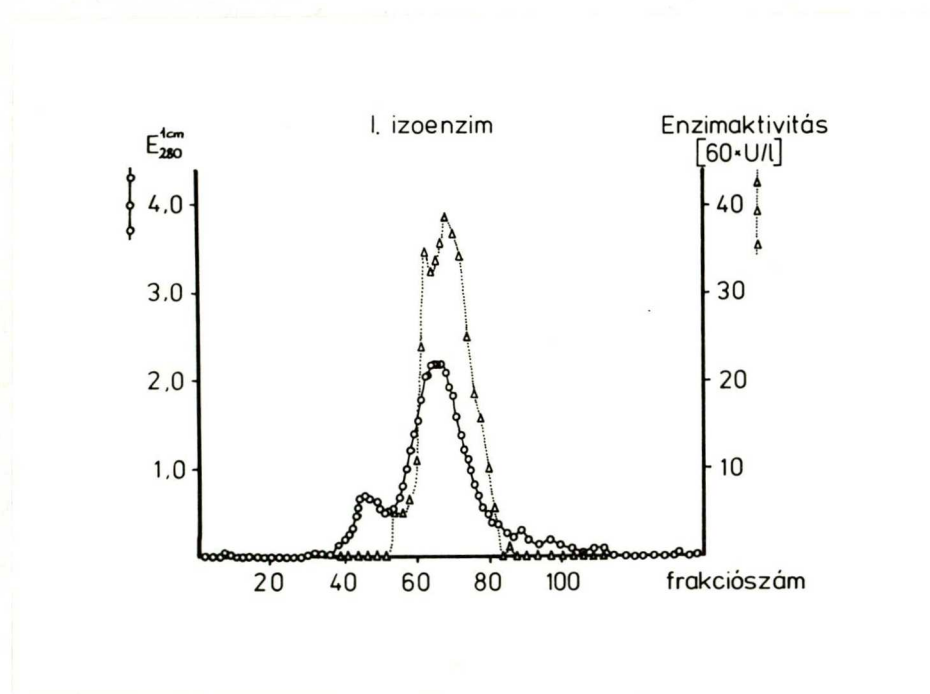
50-120 ml-nek bizonyult, ezért a két izoenzimet tartalmazó oldatot Diaflo YM 10-es membránon nyomás alatt külön-külön betöményítettük 2-5 ml térfogatra 10-30 óra alatt. A membránon átfolyt oldatban nem volt mérhető ASAT aktivitás.



25. ábra ASAT izoenzimek szétválasztása DEAE-gyöngycellulózon /három kísérlet egyike/

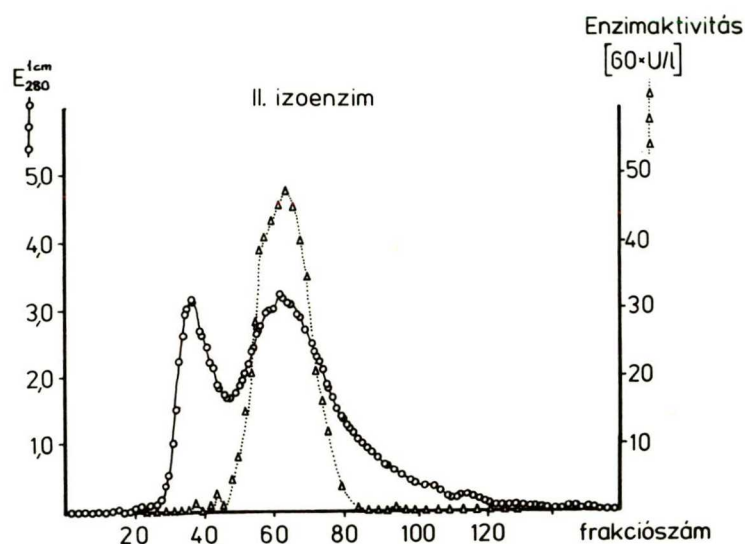
#### 4.3.6. Gélkromatográfia

Az izoenzimek további tisztítását Sephadex-G-200-on gélkromatográfiával végeztük 4 °C-os hőmérsékleten /oszlop: 49,0 × 1,4 cm/. Pufferként 0,1 M/l NaCl-ot tartalmazó 0,02 M/l, pH 7,5 foszfátpuffert alkalmaztunk, a frakciók térfogata 1 ml volt.



26. ábra A DEAE-gyöngycellulózra nem kötődött /I./  
izoenzim további tisztítása Sephadex  
G-200-on

Mindkét esetben sikerült az aktív frakcióktól további szennyeződések elválasztani /26. és 27. ábra/.



27. ábra A DEAE-gyöngycellulózra felkötődött /II./ izoenzim további tisztítása Sephadex G-200-on

Az izoenzimeket tartalmazó frakciókat külön-külön összegyűjtöttük, és porított ammónium-szulfát óvatos adagolásával, állandó kevergetés mellett telítettük, míg az oldat teljesen zavarossá nem vált. Az így kisózott izoenzimeket 4 °C-on tároltuk.

#### 4.3.7. Az izoenzimek tisztításának összegzése

A teljes tisztítási folyamat eredményeképpen az I. izoenzimet 23,46-szorosára, a II. izoenzimet 10,2-szeresére sikerült megtisztítani /5. táblázat/.

5. Táblázat Az ASAT izoenzimek tisztításának összefoglalása

| MINTA        | TÉRF. | FEHÉRJE | ÖSSZ.  | ASAT  | ÖSSZ. | SPEC.                     | TISZ-    |
|--------------|-------|---------|--------|-------|-------|---------------------------|----------|
|              | TART. | FEHÉRJE | AKT.   | AKT.  | AKT.  | TULÁS                     |          |
|              | ml    | mg/ml   | mg     | AU/ml | AU    | AU/mg<br>$\times 10^{-2}$ |          |
| nyers hom.   | 219,0 | 24,28   | 5317,3 | 0,87  | 190,5 | 3,58                      | 1,00     |
| hőkez.hom.   | 189,0 | 13,11   | 2477,8 | 0,86  | 162,5 | 6,56                      | 1,83     |
| 55-75 % ü.   | 12,75 | 31,80   | 405,5  | 7,88  | 100,5 | 24,78                     | 6,92     |
| a./          |       |         |        |       |       |                           |          |
| DEAE 20-30   | 48,0  | 1,22    | 58,6   | 0,86  | 41,3  | 70,49                     | 19,69    |
| bekonc.YM10  | 5,1   | 7,98    | 40,7   | 6,02  | 30,7  | 75,44                     | 21,07    |
| I.izoenzim   | 4,72  | 3,62    | 17,1   | 3,04  | 14,3  | 83,98                     | 23,46    |
| b./          |       |         |        |       |       |                           |          |
| DEAE 104-145 | 108,2 | 0,67    | 72,49  | 0,40  | 43,3  | 59,7                      | 16,68    |
| bekonc.YM10  | 2,0   | 29,13   | 58,3   | 13,28 | 26,6  | 45,6                      | 12,74 !! |
| II.izoenzim  | 2,68  | 4,33    | 11,6   | 1,58  | 4,2   | 36,5                      | 10,20 !! |

A táblázatból jól látható, hogy a II. izoenzim az ioncserés kromatográfiát követő lépéseknél fokozatosan inaktiválódott, ennek oka az lehetett, hogy az érzékenyebb izoenzim a több napos állást nem bírta.

#### 4.4. A megtisztított izoenzimek jellemzése

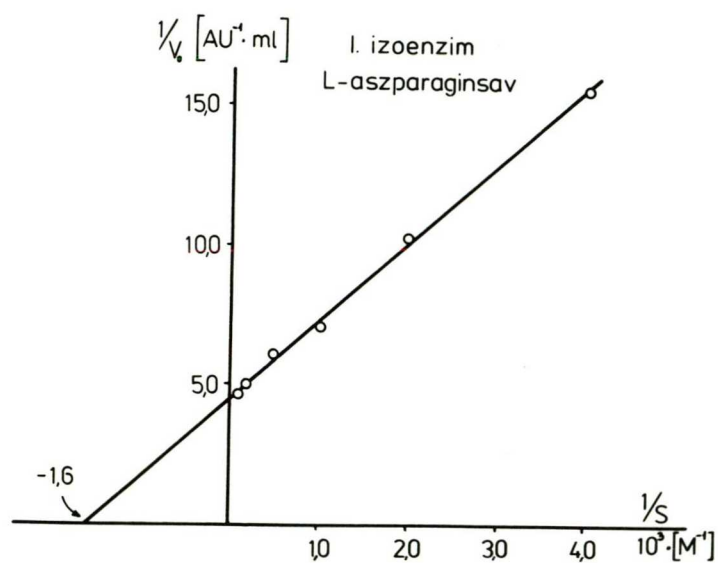
##### 4.4.1. A Michaelis-állandó értékeinek meghatározása

Az ammónium-szulfáttal telített izoenzim-oldatokból meghatározott mennyiséget kimértünk, majd 0 °C-on 8000 g-vel 10 percig centrifugáltuk. Az üledéket 40 µM/l PLP-ot tartalmazó 0,02 M/l, pH 7,5 foszfátpuffer minimális mennyiségében feloldottuk, és Sephadex G-25-ön sómentesítettük.

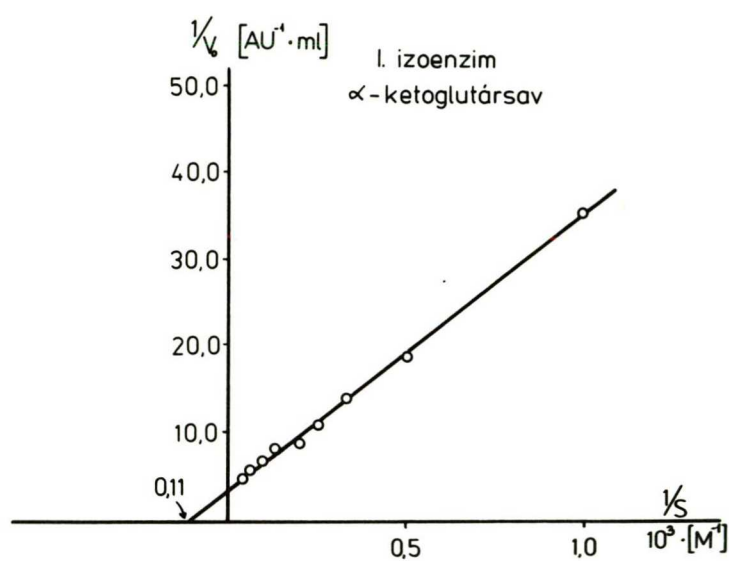
A Michaelis-állandó meghatározásánál az egyik szubszt-rát állandó szinten tartása mellett csökkentettük a másik koncentrációját, és így mértük a reakció kezdeti sebességét /28, 29, 30. és 31. ábra/.

A ponty máj ASAT izoenzimeinek  $K_M$  értékeit emlősök-ből tisztított izoenzimek megfelelő értékeihez hasonlítva megállapítható, hogy az egyes értékek hasonló nagyságrend-be esnek /6. Táblázat/.

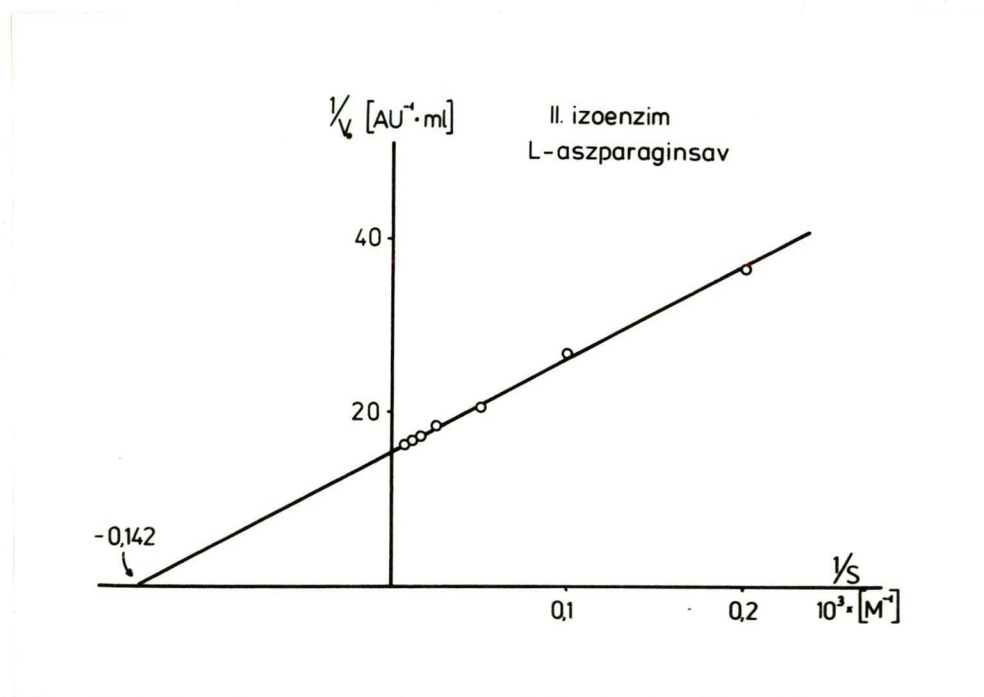




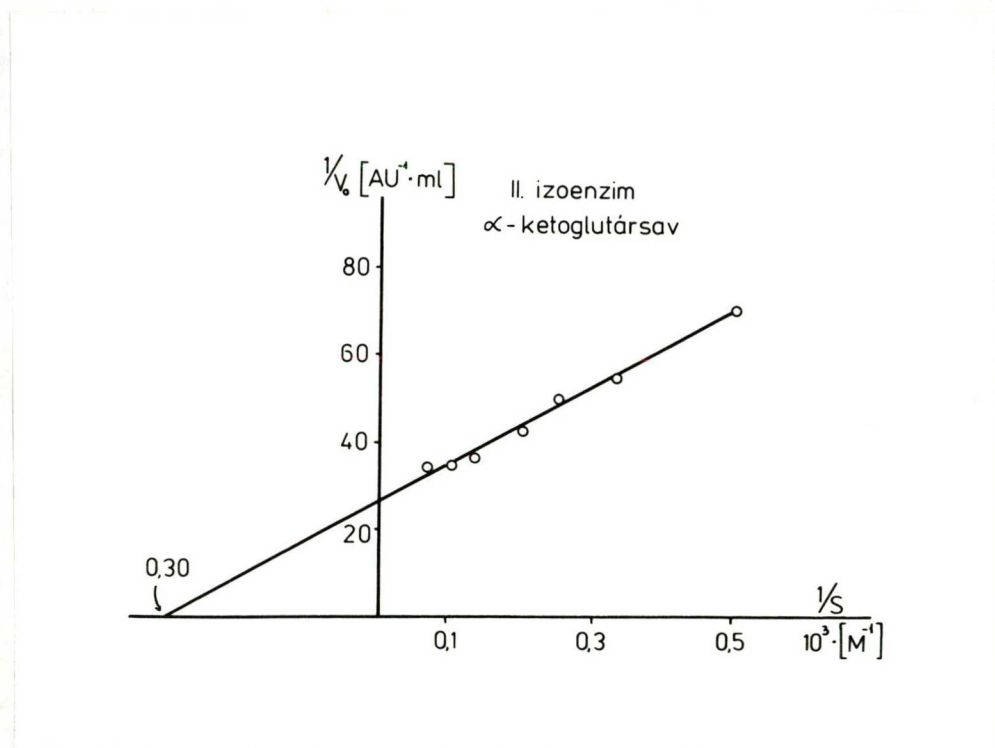
28. ábra Az I. izoenzim  $K_M$  értékének meghatározása az L-aszparaginsavra /reciprok ábrázolás Lineweaver és Burk szerint;  $\alpha$ -ketoglutarát koncentráció: 40 mM/l/



29. ábra Az I. izoenzim  $K_M$  értékének meghatározása az  $\alpha$ -ketoglutársavra /reciprok ábrázolás Lineweaver és Burk szerint; L-aszparaginsav koncentráció: 200 mM/l /



30. ábra A II. izoenzim  $K_M$  értékének meghatározása az L-aszparaginsavra /reciprok ábrázolás Lineweaver és Burk szerint;  $\alpha$ -ketoglutarát koncentráció: 40 mM/l /



31. ábra A II. izoenzim  $K_M$  értékének meghatározása az  $\alpha$ -ketoglutársavra /reciprok ábrázolás Lineweaver és Burk szerint; L-aszparaginsav koncentráció: 200 mM/l /

6. Táblázat Különböző forrásból származó ASAT izoenzimek  $K_M$  értékei L-aszparaginsavra és  $\alpha$ -ketoglutársavra

| Szerv               | Izoenzim          | $K_M$         | $K_M$              | Irodalom                   |
|---------------------|-------------------|---------------|--------------------|----------------------------|
|                     |                   | L-asp.        | $\alpha$ -ketoglu- |                            |
|                     |                   | társav        | társav             |                            |
|                     |                   | $10^{-3}$ M/l |                    |                            |
| kutya szív          | ASAT <sub>m</sub> | 1,18          | 0,70               | Fleisher és<br>mtsai, 1960 |
|                     | ASAT <sub>c</sub> | 0,57          | 11,90              |                            |
| szarvasmarha<br>máj | ASAT <sub>m</sub> | 2,00          | 0,40               | Morino és<br>mtsai, 1963   |
|                     | ASAT <sub>c</sub> | 0,30          | 5,00               |                            |
| ponty máj           | I.                | 9,09          | 0,63               | saját mérés                |
|                     | II.               | 0,33          | 7,04               |                            |

#### 4.4.2. Az aktivitás pH-függése

Fleisher és mtsai. /1960/ kutya szívből, Boyd /1961/ patkány májból származó ASAT izoenzimek aktivitásának pH-függését vizsgálva megállapították, hogy a pH érték 7,0

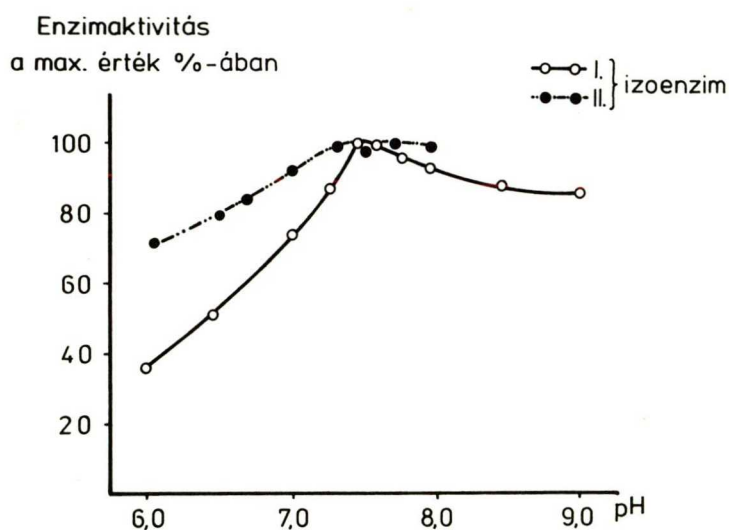
A pH értékek beállítása 7,5-ről tömény sósav és nátrium-hidroxid hozzáseppentésével történt.

Az irodalomban leírt különbséget a ponty májból származó izoenzimek aktivitásának pH-függése között nem tapasztaltuk.

#### 4.4.3. IN\_VITRO\_pesttoid\_kezelés\_hatása\_az\_izoenzimek\_aktivitására

Méréseink során azt tapasztaltuk, hogy a reakcióelegy által tartalmazott 10 mg/l MD, 10 mg/l  $\text{CuSO}_4$  és 1 mg/l PQ nem fejtett ki gátló hatást egyik izoenzim aktivitására sem. Valószínű tehát, hogy az izoenzimek aktív centruma nem tartalmaz -SH, -OH csoportokat.

alá csökkenésével az  $ASAT_c$  izoenzim aktivitása erőteljesen visszaesik, míg az  $ASAT_m$ -é közel állandó marad.



32. ábra A ponty máj ASAT izoenzimei aktivitásának pH-függése

Az általunk tisztított izoenzimek aktivitásának pH-függését 0,1 M/l trietanolamin/HCl pufferben vizsgáltuk, melynek szubsztráttartalma az egyes / I./ izoenzimmél 40 mM/l  $\alpha$ -ketoglutársav és 3 mM/l L-aszparaginsav, míg a II. izoenzimmél 10 mM/l  $\alpha$ -ketoglutársav és 20 mM/l L-aszparaginsav volt.

A pH értékek beállítása 7,5-ről tömény sósav és nátrium-hidroxid hozzáseppentésével történt.

Az irodalomban leírt különbséget a ponty májból származó izoenzimek aktivitásának pH-függése között nem tapasztaltuk.

#### 4.4.3. IN VITRO peszticid kezelés hatása az izoenzimek aktivitására

Méréseink során azt tapasztaltuk, hogy a reakcióelegy által tartalmazott 10 mg/l MD, 10 mg/l  $\text{CuSO}_4$  és 1 mg/l PQ nem fejtett ki gátló hatást egyik izoenzim aktivitására sem. Valószínű tehát, hogy az izoenzimek aktiv centruma nem tartalmaz -SH, -OH csoportokat.





4. Ponty májából klasszikus biokémiai módszerekkel elválasztottuk, megtisztítottuk és jellemeztük az ASAT enzim két izoenzimét.
5. Megállapítottuk, hogy a három növényvédőszer 1 ill. 10 mg/l-es koncentrációban in vitro nem fejt ki gátló hatást a két izoenzim aktivitására.

## 6. A DOLGOZATBAN HASZNÁLT RÖVIDÍTÉSEK

|                   |                                                       |
|-------------------|-------------------------------------------------------|
| AChe              | acetilkolinészteráz                                   |
| ALAT              | alanin aminotranszferáz                               |
| ALD <sub>50</sub> | akut letális dózis /50 %/                             |
| ASAT              | aszpartát aminotranszferáz                            |
| ASAT <sub>c</sub> | citoplazmatikus ASAT izoenzim                         |
| ASAT <sub>m</sub> | mitochondriális ASAT izoenzim                         |
| BSA               | bovin szérum albumin                                  |
| CPK               | kreatin-foszfokináz                                   |
| EDTA              | etilén-diamin-tetraecetsav · Na <sub>2</sub>          |
| f.                | felüluszó                                             |
| GOT               | glutamát-oxálacetát transzamináz                      |
| GPT               | glutamát-piruvát transzamináz                         |
| GSH               | glutathion /red./                                     |
| Ko.               | kontroll                                              |
| LC <sub>50</sub>  | letális koncentráció /50 %/                           |
| LD <sub>50</sub>  | letális dózis /50 %/                                  |
| LDH               | laktát dehidrogenáz                                   |
| MD                | methidathion                                          |
| NADPH             | nikotinsav-amid-adenin-dinukleotid-<br>foszfát /red./ |
| PLP               | piridoxál-5-foszfát                                   |

|      |                     |
|------|---------------------|
| PQ   | paraquat            |
| S.D. | átlagszórás         |
| SOD  | szuperoxid-dizmutáz |
| ü.   | üledék              |

## 7. A FELHASZNÁLT IRODALOM JEGYZÉKE

- Agress, C.M.: Evaluation of the transaminase test, Am. J. Cardiol., 3, 74 /1959/
- d'Apollonia, S. and P.D. Anderson: Optimal assay conditions for serum and liver glutamate oxaloacetate transaminase, glutamate pyruvate transaminase, and sorbitol dehydrogenase from the rainbow trout, *Salmo gairdneri*, Can. J. Fish. Aquat. Sci., 37, 163 /1980/
- Asztalos B., Orbán L., Nemcsók J. és Boross L.: Ultracid okozta szövetkárosodás és stresszhatás kimutatása taviponty szérumának GOT, GPT, LDH enzimaktivitásainak és vércukorszintjének meghatározásával, MÉT XLVII. Vándorgyűlése, Előadáskivonatok, E 57., Pécs /1982/
- Asztalos B.: Stresszhatás és szövetkárosodás kimutatása halak vércukorszintjének és tejsav-dehidrogenáz enzimeinek meghatározásával, Doktori értekezés, Szeged /1983/
- Banks, B.E.C., S. Doonan, A.J. Lawrence and C.A. Vernon: The molecular weight and other properties of aspartate aminotransferase from pig heart muscle, Eur. J. Biochem., 5, 528 /1968/

- Bell, G.R.: Distribution of transaminases /aminotransferases/ in the tissues of pacific salmon /Oncorhynchus/, with emphasis on the properties and diagnostic use of glutamic-oxalacetic transaminase, J. Fish. Res. Bd. Can., 25/6/, 1247 /1968/
- Block, E.R.: Potentiation of acute paraquat toxicity by vitamin E deficiency, Lung, 156, 195 /1979/
- Block, W.D., R. Carmichael and C.E. Jackson: Quantitative determination of isozymes of glutamic oxalacetic transaminase in human serum, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 115, 941 /1964/
- Borst, P. and E.M. Peeters: The intracellular localization of glutamate-oxaloacetate transaminases in heart, Biochim. Biophys. Acta, 54, 188 /1961/
- Boyd, J.W.: The intracellular distribution, latency and electrophoretic mobility of L-glutamate-oxaloacetate transaminase from rat liver, Biochem. J., 81, 434 /1961/
- Braunstein, A.E.: Amino group transfer in The Enzymes Vol. IX. Part B /ed. Boyer, P.D./ Academic Press, New York /1973/

- Bus, J.S., S.D. Aust and J.E. Gibson: Superoxide- and singlet oxygen-catalyzed lipid peroxidation as a possible mechanism for paraquat /methyl viologen/ toxicity, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 58, 749 /1974/ .
- Campos-Cavieres, M. and E.A. Munn: Purification and some properties of cytoplasmic aspartate aminotransferase from sheep liver, *Biochem. J.*, 135, 683 /1973/
- Chakoumakos, C., R.C. Russo and R.V. Thurston: Toxicity of copper to cutthroat trout /*Salmo clarki*/ under different conditions of alkalinity, pH and hardness, *Environ. Sci. and Techn.*, 13, 213 /1979/
- Chopade, H.M. and W.C. Dauterman: Studies on the in vitro metabolism of methidathion by rat and mouse liver, *Pest. Biochem. and Physiol.*, 15, 105 /1981/
- Conning, D.M., K. Fletcher and A.A.B. Swan: Paraquat and related bipyridyls, *Br. Med. Bull.*, 25, 245 /1969/
- Cremlyn, R.: *Pesticides: Preparation and mode of action*, John Wiley and Sons, New York /1978/
- Decker, L.E. and E.M. Rau: Multiple forms of glutamic-oxalacetic transaminase in tissues, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 112, 144 /1963/

- Drbal, K. and Z. Svobodová: Copper content in fish after short-time exposure to cupric sulphate pentahydrate, *Bul. VURH Vodnany*, 4, 9 /1980/
- Dubach, U.V.: Diagnostische Bedeutung der Serum-Glutaminsaure-Oxalessigsäure-Transaminase, *Helv. Med. Acta*, 24, 357 /1957/
- Ellman, G.L., D.D. Courtney, V. Ansress and R.M. Featherstone: A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, *Biochem. Pharm.*, 7, 88 /1961/
- Esser, H.O. and P.W. Müller: Metabolism of GS 13005, a new insecticide, *Experientia*, 22, 36 /1966/
- Eto, M.: Organophosphorus pesticides: Organic and Biological chemistry, CRC Press, Cleveland /1974/
- Fairchter, R.D. and A.F. Wilson: Paraquat poisoning: Manifestations and therapy, *Am. J. Med.*, 59, 751 /1975/
- Farkas G.: Növényi biokémia, Akadémiai Kiadó, Budapest /1978/
- Fisher, H.K., M. Humphries and R. Bails: Paraquat poisoning: Recovery from renal and pulmonary damage, *Ann. Int. Med.*, 75, 731 /1971/
- Fisher, H.K.: Importance of oxygen and of pulmonary alveolar surfactant in lung injury by paraquat in Biochemical mechanisms of paraquat toxicity /ed. Autor, A.P./ Academic Press, New York /1977/



- Fleisher, G.A., C.S. Potter and K.G. Wakim: Separation of 2 glutamic-oxalacetic transaminases by paper electrophoresis, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 103, 229 /1960/
- Gabrielli, E.R. and A. Orfanos: Effect of carbon tetrachloride on serum glutamic-oxalacetic transaminase isoenzymes, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 127, 766 /1968/
- Gakstatter, J.H.: Rates of accumulation of  $^{14}\text{C}$ -dieldrin residues in tissues of goldfish exposed to a single sublethal dose of  $^{14}\text{C}$ -aldrin, J. Fish. Res. Bd. Can., 25, 1797 /1968/
- Gatehouse, P.W., S. Hopper, L. Schatz and H.L. Segal: Further characterization of alanine aminotransferase of rat liver, J. Biol. Chem., 242/10/, 2319 /1967/
- Herbst, R.M. and L.L. Engel: A reaction between  $\alpha$ -ketonic acids and  $\alpha$ -amino acids, J. Biol. Chem., 107, 505 /1934/
- Hird, F.J.R. and E.V. Rowsell: Additional transaminations by insoluble particle preparations of rat liver, Nature, 166, 517 /1950/
- Hoffman, D.J. and W.C. Eastin: Effects of lindane, paraquat toxaphene and 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid on mallard embryo development, Arch. Environ. Contam. Toxicol., 11, 79 /1982/



- Hug, D.H. and C.H. Werkman: Transamination in *Rhodospirillum rubrum*, Arch. Biochem. Biophys., 72, 369 /1957/
- Jenkins, W.T., D.A. Yphantis and I.W. Sizer: Glutamic aspartic transaminase I. Assay, purification and general properties, J. Biol. Chem., 234, 51 /1959/
- John, R. and R. Jones: The nature of the multiple forms of cytoplasmic aspartate aminotransferase from pig and sheep heart, Biochem. J., 141, 401 /1974/
- Karmen, A., F. Wroblewski and J.A. LaDue: Transaminase activity in human blood, J. Clin. Invest., 34, 126 /1955/
- Karmen, A.: A note on the spectrophotometric assay of glutamic-oxalacetic transaminase in human blood serum, J. Clin. Invest., 34, 131 /1955/
- Kearney, P.C. and D.D. Kaufmann: Herbicides - Chemistry, degradation and mode of action, Vol. 2., Dekker, New York /1975/
- Kehrer, J.P., W.M. Haschek and H. Witschi: The influence of hyperoxia on the acute toxicity of paraquat and diquat, Drug and Chem. Toxicol., 2/4/, 397 /1979/
- Kónya Á., Karlinger J. és Bordás S.: Növényvédőszeres, műtrágyák 1982, Mezőgazdasági Kiadó, Budapest /1982/

- Kornbrust, D.J. and R.D. Mavis: The effect of paraquat on microsomal lipid peroxidation in vitro and in vivo, Toxicol. Appl. Pharmacol., 53, 323 /1980/
- Kristoffersson, R., S. Broberg, A. Oikari and M. Pekkarinen: Effect of a sublethal concentration of phenol on some blood plasma enzyme activities in the pike /Esox lucius L./ in brackish water, Ann. Zool. Fennici, 11, 220 /1974/
- Leung, F.Y. and A.R. Henderson: Isolation and purification of aspartate aminotransferase isoenzymes from human liver by chromatography and isoelectric focusing, Clin. Chem., 27, 232 /1981/
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall: Protein measurement with the Folin phenol reagent, J. Biol. Chem., 193, 265 /1951/
- Lukens, R.J.: Chemistry of fungicidal action, Chapman and Hall, London /1971/
- Magee, S.C. and A.T. Phillips: Molecular properties of the multiple aspartate aminotransferases purified from rat brain, Biochemistry, 10/18/, 3396 /1971/
- Manzo, L., C. Gregotti, A. Di Nucci and P. Richelmi: Toxicology of paraquat and related bipyridyls: Biochemical, clinical and therapeutic aspects, Vet. Hum. Toxicol., 21/6/, 404 /1979/

- Martin, H. and C.R. Worthing: Pesticide manual, British Crop. Protection Council /1977/
- Martinez-Carrion, M. and W.T. Jenkins: D-alanine-D-glutamate transaminase, J. Biol. Chem., 240, 3538 /1965/
- Martinez-Carrion, M., F. Riva, C. Turano and P. Fasella: Multiple forms of supernatant glutamate-aspartate transaminase from pig heart, Biochem. Biophys. Res. Commun., 20/2/, 206 /1965/
- Martinez-Carrion, M., C. Turano, E. Chiancone, F. Bossa, A. Giartosio, F. Riva and P. Fasella: Isolation and characterization of multiple forms of glutamate-aspartate aminotransferase from pig heart, J. Biol. Chem., 242/10/, 2397 /1967/
- Matkovics, B., L. Szabó, Sz. I. Varga, R. Novák, K. Barabás and G. Berencsi: In vivo effects of paraquat on some oxidative enzymes of mice, Gen. Pharmac., 11, 267 /1980/
- McKim, J.M., G.M. Christensen and E.P. Hunt: Changes in the blood of brook trout /*Salvenius fontinalis*/ after short-term and long-term exposure to copper, J. Fish. Res. Bd. Can., 27/10/, 1883 /1970/

- McLeese, D.W. and C.D. Metcalfe: Toxicity of mixtures of phosphamidon and methidathion to lobsters /*Homarus americanus*/, *Chemosphere*, 2, 59 /1979/
- Meister, A. and S.V. Tice: Transamination from glutamine to  $\alpha$ -keto-acids, *J. Biol. Chem.*, 187, 173 /1950/
- Meister, A.: Transamination in amino acid metabolism, *Federation Proc.*, 14, 683 /1955/
- Meister, A.: Biochemistry of the amino acids, Academic Press, New York /1965/
- Metcalf, R.L.: The chemistry and biology of pesticides in *Pesticides in the environment* /ed. White-Stevens, R./ Vol. 1., Part I., Dekker, New York /1971/
- Morino, Y., H. Itoh and H. Wada: Crystallization of 2-oxo-glutarate L-aspartate transaminases from mitochondrial and soluble fractions of beef liver, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 13/5/, 348 /1963/
- Nádasy M.: Növényvédőszer kémia, Keszthely /1979/
- Nemcsók J.: A stressz szerepe a halpusztulásoknál, *Halászat*, XXVII. /1/, 14 /1981/
- Nemcsók J., Asztalos B., Boross L., Tóth T. és Vig É.: Ultracid 40 WP hatása taviponty egyes szerveinek acetilkolinészteráz aktivitására és catecholaminszintjére, *MÉT XLVII. Vándorgyűlése, Előadáskivonatok*, E 124, Pécs /1982/

- Nisselbaum, J.S. and O. Bodansky: Immunochemical and kinetic properties of anionic and cationic glutamic-oxaloacetic transaminases separated from human heart and human liver, J. Biol. Chem., 239/12/, 4232 /1964/
- Ogata, M. and T. Hasegawa: The effect of paraquat on the mitochondrial energy transfer reaction, Cell Structure and Function, 3, 325 /1978/
- Okada, M. and M. Hirose: Regulation of aspartate aminotransferase activity associated with change of pyridoxal phosphate level, Arch. Biochem. Biophys., 193/1/, 294 /1979/
- Owen, T.G. and P.W. Hochachka: Purification and properties of dolphin muscle aspartate and alanine transaminases and their possible roles in the energy metabolism of diving mammals, Biochem. J., 143, 541 /1974/
- Racicot, J.G., M. Gaudet and C. Leray: Blood and liver enzymes in rainbow trout /Salmo gairdneri Rich./ with emphasis on their diagnostic use: Study of CCl<sub>4</sub> toxicity and a case of Aeromonas infection, J. Fish. Biol., 7, 825 /1975/
- Reichenbach-Klinke, H.H.: Histologische und enzymatische Veränderungen nach Schadstoffeinwirkung beim Fisch, Veröffent. Int. Küs. Binnenfischerei /Hamburg/, 53, 113 /1972/



- Reitman, S. and S. Frankel: A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases, Amer. J. Clin. Path., 28, 56 /1957/
- Rej, R.: Multiple molecular forms of human cytoplasmic aspartate aminotransferase, Clin. Chim. Acta, 112, 1 /1981/
- Rojik, I., J. Nemcsók and L. Boross: Morphological and biochemical studies on liver, kidney and gill of fishes affected by pesticides, Acta Biol. Hung. /közlésre elfogadva, 1982/
- Rose, M. S. and L. L. Smith: The relevance of paraquat accumulation by tissues in Biochemical mechanisms of paraquat toxicity /ed. Autor, A. P./, Academic Press, New York /1977/
- Ross, J. H. and R. I. Krieger: Toxicity of 1,1'-alkyl-4,4'-bipyridylium salts in the rat, Drug and Chem. Toxicol., 2/3/, 207 /1979/
- Ruščák, M., J. Orlický and V. Zubor: Isoelectric focusing of the alanine aminotransferase isoenzymes from the brain, liver and kidney, Comp. Biochem. Physiol., 71B, 141 /1982/

- Scardi,V., P.Scotto, M.Iaccarino and E.Scarano: The binding of pyridoxal 5-phosphate to aspartate aminotransferase of pig heart, *Biochem. J.*, 88, 172 /1963/
- Schacterle,G.R. and R.L.Pollack: A simplified method for the quantitative assay of small amounts of protein in biologic material, *Anal. Biochem.*, 51, 654 /1973/
- Schmidt,E. and F.W.Schmidt: Brief guide to practical enzyme diagnosis, Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim /1976/
- Schreck,C.B. and H.W.Lorz: Stress response of coho salmon /*Oncorhynchus Kisutch*/ elicited by cadmium and copper of stress, *J. Fish. Res. Bd. Can.*, 35, 1124 /1978/
- Shrawder,E.J. and M.Martinez-Carrion: Simultaneous isolation and characterization of chicken supernatant and mitochondrial isoenzymes of aspartate transaminase, *J. Biol. Chem.*, 248/6/, 2140 /1973/
- Singleton,F.L. and R.K.Guthrie: Aquatic bacterial populations and heavy metals I. Composition of aquatic bacteria in the presence of copper and mercury salts, *Water Res.*, 11/8/, 639 /1977/
- Sprague,J.B.:Promising anti-pollutant: Chelating agent NTA protects fish from copper and zinc, *Nature*, 220, 1345 /1968/

- Steffen,Chr., M.Muliawan and H.Kappus: Lack of in vivo lipid peroxidation in experimental paraquat poisoning, Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., 310, 241 /1980/
- Teranishi,H., H.Kagamiyama, K.Teranishi, H.Wada, T.Yamano and Y.Morino: Cytosolic and mitochondrial isozymes of glutamic-oxalacetic transaminase from human heart, J. Biol. Chem., 253, 8842 /1978/
- Turano,C., A.Giartosio, F.Riva and P.Fasella: On the formation of S-/  $\alpha$ ,  $\beta$  -dicarboxyethyl/ derivatives of glutamic-aspartic aminotransferase, Biochem. Biophys. Res. Commun., 16/3/, 221 /1964/
- Varga M.: A ve<sub>o</sub>yzzeres gyomirtás elméleti alapjai, Szeged /1980/
- Velick,S.F. and J.Vavra: A kinetic and equilibrium analysis of the glutamic oxaloacetate transaminase mechanism, J. Biol. Chem., 237/7/, 2109 /1962/
- Waiwood,K.G. and F.W.Beamish: The effect of copper, hardness and pH on the growth of rainbow trout, *Salmo gairdneri* J. Fish. Biol., 13, 591 /1978/
- Wilkinson,J.H.: Isoenzymes, J.B. Lippincott Comp., Philadelphia /1970/



Winner, R.W. and M.P. Farrell: Acute and chronic toxicity of copper to four species of Daphnia, J. Fish. Res. Bd. Can., 33, 1685 /1976/

Wittenberger, C. and R. Giurgea: Transaminase activities in muscles and liver of the carp, Rev. Roum. Biol-Zool., 18/6/, 441 /1973/

Yamamoto, Y., T. Ishii and S. Ikeda: The site of copper accumulation in the tissues of carp, Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 43/11/, 1327 /1977/

Ziegenbein, R.: Two different forms of glutamic-pyruvic transaminase in rat heart and their intracellular localization, Nature, 212, 135 /1966/

8. A DOKTORI ÉRTEKEZÉS ANYAGÁBÓL ELHANGZOTT  
ELŐADÁSOK ÉS MEGJELENT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

1. Orbán L., Asztalos B.: Paraquat,  $\text{CuSO}_4$  és hirtelen hőmérsékletváltozás hatásának összehasonlító vizsgálata három halfajon, XX. Biokémiai Vándorgyűlés, Program 34. old., Siófok, /1980/
2. Orbán L.: Peszticidek hatásának vizsgálata eltérő táplálkozású halfajokon, Diplomamunka, Szeged /1981/
3. Nemcsók J., Boross L., Orbán L., Asztalos B., Buzás Zs., and Németh Á.: Investigations on the paraquat toxicity in fishes, Berichte der Österreichische Gesellschaft für Klinische, Jahrgang 4, Heft 3, S. 143 /1981/
4. Orbán L., Asztalos B.: Paraquat,  $\text{CuSO}_4$  és hősokk vizsgálata három halfajon XXI. Biokémiai Vándorgyűlés, Veszprém /1981/
5. Asztalos B., Orbán L., Nemcsók J., Boross L.: A paraquat mérgezés hatása halakra, MMT XLVI. Vándorgyűlése, Kivonatok 7. old., I.P.11, Budapest /1981/

6. Nemcsók J., Orbán L., Asztalos B., Németh Á., Boross L.:  
The effect of pesticides on some enzyme of carp /*Cyprinus carpio* L./, Special FEBS Meeting on Cell Function and Differentiation, Abstracts, p. 229, Athen /1982/
7. Nemcsók J., Benedeczky I., Boross L., Asztalos B. and Orbán L.: Subcellular localization of transaminase enzymes in fishes and their significance in the detection of water pollution, *Acta Biologica Szegedensis* 27, /1-4/ pp 9-15 /1981/
8. Asztalos B., Orbán L., Nemcsók J., Boross L.: Ultracid okozta szövetkárosodás és stresszhatás kimutatása taviponty vérszérumának GOT, GPT, LDH enzimaktivitásainak és vércukor szintjének meghatározásával, *MTT XLVII. Vándorgyűlése, Előadáskivonatok*, E 57., Pécs /1982/
9. Nemcsók J., Orbán L., Asztalos B., Buzás Zs., Németh Á. and Boross L.: Investigations on paraquat toxicity in fishes, *Water International /USA/*, közlésre elfogadva