B 3253

PESZTICIDEK HATÁSA HALAK ENZIMRENDSZEREIRE, KÜLÖNÖS TEKINTETTEL A KOLINÉSZTERÁZOKRA

EGYETEMI DOKTORI ÉRTEKEZÉS

Szegletes Tivadar
József Attila Tudományegyetem
Biokémiai Tanszék

1994

TARTALOMJEGYZÉK

1. Bevezetés 3

2. Irodalmi áttekintés 5
   2.1 Kolinészteráz enzimek (ChE) jellemzése 5
      2.1.1 Az acetilkolin-észteráz (AChE) 5
      2.1.2 A butirilkolin-észteráz (BChE) 6
      2.1.3 Kolinészterázok előfordulása halakban 7
   2.2 Transzamináz, kataláz, laktát dehidrogenáz, AChE, ATP-áz aktivitások és a vércukorszint, mint a halakat ért károsító tényezők indikátorai 7
   2.3 A felhasznált növényvédő szerek (peszticidek) jellemzése 8
      2.3.1 A deltamethrin (DM) 8
      2.3.2 A methidation (MD) 10
      2.3.3. A paraquat (PQ) 11
      2.3.4. A rézszulfát 12

3. Célkitűzések 13

4. Anyagok és módszerek 14
   4.1 Anyagok 14
   4.2 A kolinészteráz aktivitások mérése 14
      4.2.1 A kolinészteráz aktivitás mérése 14
      4.2.2. Az AChE aktivitásának mérése 14
   4.3 Az *in vitro* kísérletben használt módszer 15
   4.4 A kolinészterázok molekuláris formáinak meghatározása 15
   4.5 Az *in vivo* deltamethrin kísérletek során használt módszerek 16
   4.6 A methidation bomlásának, illetve a deltamethrin és a methidation akkumulációjának meghatározása 17
   4.7 Az AChE kimutatása szövetekben Koelle-módszerével 18
   4.8 Az elektronmikroszkópos vizsgálatok módszere 19
   4.9 Tartási és kezelési körülmények 19
   4.10 Az alkalmazott statisztikai módszerek és számítógépes programok 20

5. Eredmények és értékelésük 21
   5.1 Az *in vitro* kísérletek eredményei 21
      5.1.1 A deltamethrin gátlás kinetikája 21
      5.1.2 A methidation gátlás kinetikája 24
   5.2 AChE és BChE biokémiai jellemzése ponty szerveiben 29
   5.3 A kolinészterázok molekuláris formáinak eloszlása ponty szerveiben 32

5.4 A kolinészterázok molekuláris formáinak megoszlása különböző peszticidek hatására ponty szerveiben 39
5.4.1 *In vivo* deltamethrin kezelés hatása az AChE molekuláris formáinak megoszlására 39
5.4.2 *In vivo* methidation kezelés hatása a kolinészterázok molekuláris formáinak megoszlására 43
5.4.3 *In vivo* PQ és $CuSO_4$ kezelés hatása a kolinészterázok molekuláris formáira 53
5.5 *In vivo* deltamethrin kezelés hatása ponty különböző enzimparamétereire 60
5.5.1 Az acetilkolin-észteráz 60
5.5.2 A transzaminázok 62
5.5.3 A kataláz 63
5.5.4 A vércukorszint és a laktát dehidrogenáz 64
5.5.5 A vörösvérsejt ATP-ázok 66
5.5.6 A halak regenerációja deltamethrin kezelést követően 67
5.6 A methidation bomlásának, illetve a deltamethrin és a methidation akkumulációjának meghatározása 71
5.7 Az AChE gátlásának nyomon követése Koelle-módszerével 74
5.8 Májszövet károsodás kimutatása elektronmikroszkóppal 82
6. Összefoglalás 94
7. Rövidítések jegyzéke 97
8. Irodalomjegyzék 98
9. Köszönetnyilvánítás 112
10. Saját közlemények jegyzéke 113

1. BEVEZETÉS

Az elmúlt évtizedekben a kemikáliák egyre nagyobb mérvű és egyre szélesebb körű felhasználása jellemző mind az iparban, mind a mezőgazdaságban, olyannyira, hogy mára mindennapi életünk alapvető részévé váltak. A XX. század végének technikai forradalmához azonban negatív kísérőjelenségek is kapcsolódtak. Ezek közül talán a legfontosabb a környezetszennyezés problémája, mely oly kiterjedtté vált, hogy belátható időn belül az emberiség biológiai létét is megkérdőjelezheti. Becslések szerint például a brit gazdaságokban 1940 és 1962 között alkalmazott növényvédő szerek az ország szántóföldjein előforduló madár- és hasznos rovarfajok számát csaknem a felére csökkentették (Márkus, 1993). Ugyanakkor a WHO jelentése szerint évente mintegy 3 millió ember betegszik meg peszticidek okozta heveny, súlyos mérgezésben, a halálos áldozatok száma pedig a 20000-et is meghaladja (Márkus, 1993). Magyarországon 10-30 halálos növényvédő szer eredetű mérgezés történt évente (Schirilla, 1976, 1979; Márkus 1993).

A termelés és a felhasználás során keletkező gáz, illetve folyékony halmazállapotú szennyező anyagok rövid idő alatt nagy távolságokra juthatnak el. A levegőből kiülepedő, a talajból kimosódó, és a folyóvíz szállította toxinok így keletkezési helyüktől távol is kifejtik hatásukat. A legveszélyesebbek azon vegyületek, melyek az élő szervezetekben felhalmozódhatnak. Emiatt fontos vizeink ökoszisztémájának vizsgálata, az ott élő állatokban lejátszódó biokémiai folyamatok pontosabb megismerése.

Hosszú távon (hónapok, évek) a vizek tisztaságát az adott vízben előforduló élővilággal minőségileg jellemezhetjük. Legújabban a vízszennyezések nyomon követésére egyre gyakrabban használnak halakat, ugyanis a különböző algákkal, rákokkal, puhatestűekkel táplálkozó halak a táplálékkal együtt felhalmozzák testükben az idegen mérgező anyagokat. Kopoltyújukkal, bőrükkel állandó és szoros kapcsolatban vannak a vízzel, ezáltal a vízben lévő anyagokkal. A peszticidek akkumulációját a vízi táplálkozási láncban hazánkban is sokan vizsgálták (Pénzes, 1977; Gaál és mtsai, 1980; Salánki és mtsai, 1982).

A növényvédő szerek közül kiemelkedő jelentőségűek az inszekticidek (pl. szerves klórvegyületek, szerves foszforsavészterek, piretroidok), melyeket kiterjedten alkalmaznak a mezőgazdaságban, de a háztartásokban is ismertek csótány, hangya és poloskaírtó szerként. Ezek két ok miatt különösen veszélyesek: egyrészt, mivel nagyon lassan bomlanak le (mint pl. a klórozott szénhidrogének - Virág, 1981), egyes képviselőik képesek a táplálkozási láncban nagymértékű akkumulációra; másrészt specifikus idegrendszeri elváltozásokat okoznak, mint a DDT (Schirilla, 1978), a foszforsavészterek

(Moretto és Johnson, 1987), a piretroidok (Narahashi, 1984; WHO, 1990), és így görcsös merevedéssel járó tömeges halpusztulást okozhatnak (Nemcsók és mtsai, 1985). Az említett elváltozások nyomon követhetők az állatok kolinerg rendszerén, mely jól jellemzi a halak fiziológiás, neuronális állapotát. Ezen rendszer alapvető részei a kolinészteráz enzimek, melyek aktivitásában, szerkezetében előforduló változások révén az idegrendszer állapotáról kaphatunk információkat (Nemcsók és mtsai, 1987, 1988a, 1990; Szabó és mtsai, 1992).

A JATE Biokémiai Tanszékén 1979 óta folyó környezetbiológiai munkák célja a mezőgazdaságban alkalmazott, onnan közvetlen vagy közvetett úton vizekbe kerülő toxikus anyagok (elsősorban növényvédő szerek) vízi szervezetekre gyakorolt hatásának a vizsgálata. Munkánk, szorosan kapcsolódva e kutatási irányvonalhoz, a halak állapotát jellemző enzimrendszerekkel és ezek peszticidek indukálta változásaival foglalkozik.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1 Kolinészteráz enzimek (ChE) jellemzése

A kolinészterázokat (ChE) különböző gátlószerekkel szembeni viselkedésük, szubsztrát specifitásuk, előfordulásuk alapján acetilkolin-észteráz (AChE), butirilkolin-észteráz (BChE) és eszerin rezisztens (maradék) kolinészteráz típusokra osztották fel (Chatonnet és Lockridge, 1989).

2.1.1 Az acetilkolin-észteráz (AChE)

Az utóbbi két évtizedben biokémiai és farmakológiai szempontból az acetilkolin-észteráz (EC 3.1.1.7) a legintenzívebben kutatott enzimek közé sorolható (Holland és mtsai, 1967; Coppage és mtsai, 1975; Coppage és Braidech, 1976; Olson és Christensen, 1980; Habig és mtsai, 1988; Wallace és Herzberg, 1988; Horsberg és mtsai, 1989; Gill és mtsai, 1990). Különösen figyelemre méltóak azok az eredmények, melyek az AChE molekuláris formáinak kutatása területén születtek (Dudai és mtsai, 1973; Bon és Massoulié, 1976; Anglister és Silman, 1978; Bon és mtsai, 1979; Fuentes és Inestrosa, 1988; Smith és Emmerling, 1988; Berninsone és mtsai, 1989; Chatonnet és Lockridge, 1989; Gupta és mtsai, 1991). Ezek az adatok nagyban hozzájárultak az AChE enzim molekuláris működésének fiziológiai, valamint az evolúció során betöltött szerepének tisztázásához.
Jellemző tulajdonságai:

-specifikus az ACh-ra, az egyéb kolinésztereket csak nagyon kis sebességgel hidrolizálja,

-szubsztrátfelesleg gátlás van,

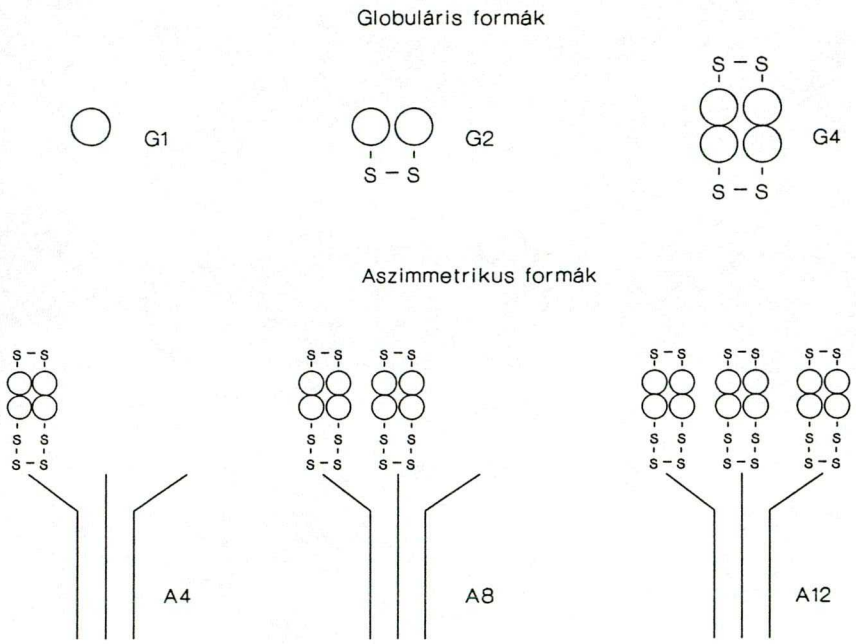
-10^{-4} M neosztigmin ill. fizosztigmin teljesen, 10^{-5} M BW 284 C51 specifikusan gátolja,

-ethopropazinnal csak 10^{-4} M vagy ennél nagyobb koncentrációban, és csak részben gátolható,

-organofoszfátok gátolják.

Az AChE biokémiai tulajdonságait és előfordulását régóta vizsgálják a gerinceseknél és a gerincteleneknél egyaránt (Dudai és mtsai, 1973; Anglister és Silman, 1978; Francis és Schechter, 1979).
Az AChE molekula felépítésében alapvető szerepet játszik egy kb. 80000 dalton molekulatömegű globuláris monomer forma (Dudai és Silman, 1974; Bon és Massoulié, 1976). A monomerből diszulfid hidak révén dimer képződhet (Rosenberry és Richardson, 1977; Anglister és Silman, 1978). A két dimer feltehetően van der Waals erők hatására tetramerré kapcsolódhat. A tetramerek elektronmikroszkóppal látható háromszálas farokrészhez kapcsolódhatnak (Dudai és mtsai, 1973; Rosenberry és mtsai,

1980), amely farokrész immunológiailag (Anglister és mtsai, 1979), valamint kollagenázzal szembeni viselkedését tekintve (Lwebuga-Mukasa és mtsai, 1976; Rieger és mtsai, 1976) a kollagénhez hasonlít. A farki rész egy-egy szálához diszulfid hidakkal összesen három tetramer egy-egy dimerje kapcsolódhat (Bon és mtsai, 1979; Rosenberry és mtsai, 1980). Ennek alapján eddig 6 féle AChE molekuláris formát különítettek el (1. ábra).



1. ábra Az AChE molekuláris formái

Az AChE a szinaptoszómában, axonális és gliamembránhoz kötődve fordul elő. Az enzim a perikarionban termelődik, és axonális transzporttal jut az axonterminálisba. Az irodalmi adatok szerint a sejtek AChE tartalma nem jelöl feltétlenül kolinerg neuront (Contestabile, 1978).

2.1.2 A butirilkolin-észteráz (BChE)

A butirilkolin-észteráz (EC 3.1.1.8) a gerincesek vérplazmájában fordul elő nagy mennyiségben, főként emlősökben, de néhány filogenetikailag alacsonyabb szinten álló osztályban is (Gautron, 1982; Chatonnet és Lockridge, 1989).

Jellemző tulajdonságai:

-nemcsak az ACh-t, hanem egyéb kolinésztereket is hidrolizál, legnagyobb sebességgel a BCh-t,

-szubsztrátfelesleg gátlás nincs,

-10^{-5} M ethopropazinnal specifikusan gátolható,

-10^{-4} M neosztigmin ill. fizosztigmin teljesen, 10^{-5} M BW 284 C51 azonban nem gátolja,

-organofoszfátok nem gátolják.

Általában nem idegszövetekben fordul elő.

2.1.3 Kolinészterázok előfordulása halakban

A halak kolinészteráz típusára vonatkozó kísérletek régóta folynak. Az első vizsgálatok nem találtak BChE-t több halfaj izmában, májában és úszóhólyagjában (Augustinsson, 1948; Lundin, 1958). Később bizonyos halak vérében, majd izomzatában is észleltek az AChE mellett BChE aktivitást is (Clos és Serfaty, 1958; Brightmann és Albers, 1959).

A halak fizikai aktivitásukat tekintve három csoportba oszthatók: kevéssé aktív, mérsékelten aktív, és aktív csoportra. Az izomban található AChE enzimaktivitás szignifikánsan különbözik, legnagyobb az utolsó, legkisebb az első csoportban (Baslow és Nigrelli, 1961).

Eddigi ismereteink szerint a halizom kolinészteráz aktivitásának csak 1.4-2.6%-a ered a BChE-tól (Pechot-Dechavissine, 1962), s ez az emlősökhöz képest igen alacsony érték (macskánál 14.7%, tengerimalacnál 91.7%). A tavi ponty vérszérum kolinészteráz aktivitása szinte kizárólag AChE eredetű (Gaál és mtsai, 1980; Szabó és mtsai, 1992).

Összefoglalva elmondhatjuk, hogy a halakban a BChE aránya sokkal kisebb (az osszaktivitás 1-5%-a), mint az emlősökben (Szabó és mtsai, 1992).

2.2 Transzaminász, kataláz, laktát dehidrogenáz, AChE, ATP-áz aktivitások és a vércukorszint, mint a halakat ért károsító tényezők indikátorai

A szervezet károsodásának egyik leggyakoribb formája a szövetnekrózis. Szövetnekrózis során a transzaminázok a vérbe kerülnek, és az ott megnövekedett aktivitásuk jelzi a szöveti károsodás mértékét (Bell, 1968; Onishi és Murayama, 1970; Kristoffersson és mtsai, 1974; Schmidt és Schmidt, 1976; Nemcsók és mtsai, 1981; Nemcsók és Boross, 1982a). A szövetnekrózist jelző transzaminász (GOT: glutaminsav-oxálecetsav transzaminász, EC 2.6.1.1; GPT: glutaminsav-piroszőlősav transzaminász, EC 2.6.1.2) enzimeket - elsősorban a humándiagnosztikában - már régóta használják szövetkárosodás kimutatására (Wrobelski és La Due, 1985; Asztalos és Nemcsók, 1985).

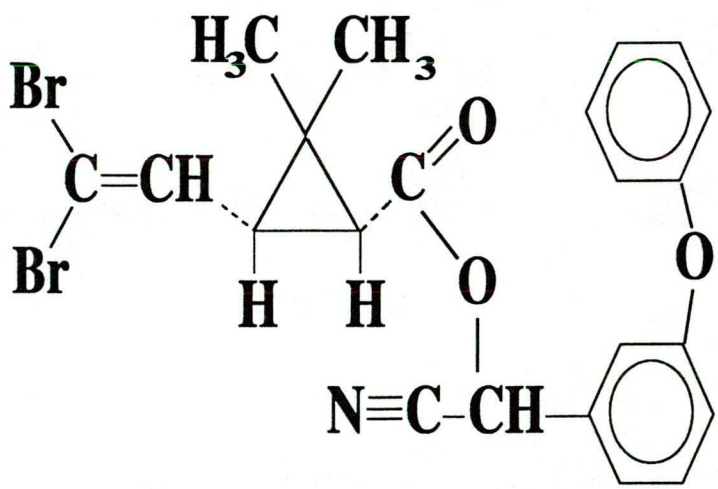
A vércukorszint és a laktát dehidrogenáz (LDH, EC 1.1.2.3) változása a szervezetet ért stresszhatás mérésére alkalmas (Wedemeyer, 1970), míg az ATP-ázok a membránkárosító hatásokról, valamint bizonyos szerves klórvegyületek jelenlétéről informálnak. Az AChE aktivitásának mérése a kolinerg rendszerre ható kemikáliák hatásának a kimutatására szolgál (Nemcsók és mtsai, 1985; Galgani és Bocqueué, 1989; Nemcsók és mtsai, 1990).

A szervezet szabadgyök reakcióiban szerepet játszó enzimek biztosítják az aerob környezethez való alkalmazkodás feltételeit. Ezek közül a kataláz (EC 1.11.1.6) kulcsfontosságú szerepet játszik. A halak szervezetének zsírtartalma 50%-ban telítetlen zsírsavakból áll (Mazeaud és mtsai, 1979), ezért a molekuláris szabadgyök reakciók, valamint a lipidperoxidáció számára fokozott a lehetőség. A szabadgyökök felszabadulásának mértékét az élő szervezetben számos külső és belső környezeti tényező befolyásolja. Némely peszticid metabolizmusa során jelentős szabadgyökképződés figyelhető meg. Mivel ezek eliminációja az antioxidatív rendszer elemein keresztül valósulhat meg, ezen enzimek magas aktivitásai jelezhetik a kiváltó folyamat (melyet indukálhatott pl. egy peszticid) jelenlétét.

2.3 A felhasznált növényvédő szerek (peszticidek) jellemzése

2.3.1 A deltamethrin (DM)

Az 1970-es évektől használják a piretroidokat a mezőgazdaságban rovarkártevők ellen. A piretroidok előnye a régebbi típusú inszekticidekkel szemben, hogy igen széles spektrumú rovarölő szerek, a környezetben lebomlanak, így akkumulációjuk nem számottevő, valamint ártalmatlanok a melegvérűekre, így az emberre is (WHO, 1990). Ugyanakkor igen toxikusak a hidegvérű gerincesekre, pl. a halakra (L'Hotellier és Vincent, 1986). A piretroidok struktúrájuk, kémiai sajátságaik, neurofiziológiai és toxikológiai hatásuk alapján két nagy csoportra oszthatók (Eells és mtsai, 1987): az első csoportba (I. típus) a cianocsoportot (nitrilcsoportot) nem tartalmazó, míg a másodikba (II. típus) a cianocsoportot tartalmazó vegyületek tartoznak.



2. ábra A deltamethrin képlete

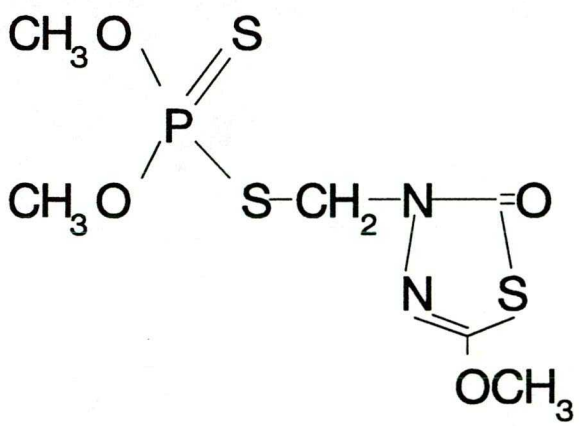
A Decis 2.5 EC hatóanyaga egy harmadik generációs inszekticid, a deltamethrin (vagy decamethrin, DM, II. típusú piretroid; (S)-α-ciano-3-fenoxibenzil-(1R)-*cisz*-3-(2,2-dibromovinil)-2,2-dimetilciklopropán-karboxilát, $C_{22}H_{19}Br_2NO_3$) (2. ábra), amit az egyik legbiztonságosabb forgalomban lévő inszekticidnek tartanak. A Decis 2.5 EC DM tartalma 25 g/l. A DM elsődleges hatása, hogy elnyújtja a Na^+-ioncsatornák becsukódását az idegsejtekben (Narahashi, 1984; Ghiasuddin és Soderlund, 1985). Valószínű, hogy a GABA receptorokhoz is képes hozzákötődni, gátolva ezzel a GABA-függő kloridion áramlást (Lawrence és Casida, 1983; Costa, 1987). Mindezeken túl számos egyéb hatása is ismert. Rose és Dewar szerint (1983) a DM-nek legalább két jól elkülöníthető hatása van: egy rövid idejű farmakológiai hatás a halálos dózishoz közeli koncentrációnál, és egy jóval hosszabb idejű neurotoxikus hatás, amelynek eredménye az idegsejtek pusztulása. Összességében megállapítható, hogy a DM neuromusculáris diszfunkciót okoz az állatokon (Rose és Dewar, 1983).

A nemzetközi irodalomban egyre többet olvashatunk a DM különböző paraméterekre gyakorolt hatásairól, mint például az agyi vérkeringésre és glükóz metabolizmusra (Cremer és Seville, 1985), a kalmodulin stimulálta Ca^{2+}-ATP-ázra és adenilát ciklázra (Sahib és mtsai, 1987), az állatok tanulási folyamataira (Stein és mtsai, 1987), a testsúly és a vérszérum fehérjetartalmának alakulására, valamint az AChE és ATP-ázok aktivitására (Shaker és mtsai, 1988). Megfigyelték továbbá, hogy a DM hat a szinapszisok kolin transzportjára és foszforilációs folyamataira (Matsumura, 1988), az egerekben megfigyelt kromoszóma aberrációkra (Bhunya és Pati, 1990), az ACh muscarin és nikotin típusú receptoraira (Eriksson és Nordberg, 1990) és a foszfoinozit/protein kináz C aktivációjára (Enan és Matsumura, 1993) is. Ezek ellenére kevés kutatás irányult a DM halakra kifejtett toxicitásának kiderítésére (Zitko és mtsai, 1979; L'Hotellier és Vincent, 1986). A nemzetközi szakirodalomból ismert, hogy a 96-órás DM kezelés LC_{50}-es értékei halfajtól függően 0.4 és 2.0 μg/l között vannak (L'Hotellier és Vincent, 1986). A szabadföldi kísérletek azonban nem mutatták ezt a nagymérvű toxicitást (WHO, 1990). Nincs jelentős különbség a toxicitásban hideg és meleg vizet kedvelő halfajok esetén (Stephenson, 1982). Úgy tűnik, hogy a DM alacsony és magas hőmérsékleten is hasonlóan hat, bár némely kutató összefüggést talált a hőmérséklet és bizonyos piretroidok hatása között (Kumaraguru és Beamish, 1981). Továbbá a piretroidok (köztük a DM) toxicitásának mértéke nem függ a víz keménységétől és pH-jától sem (Mauck és mtsai, 1976). A DM képes befolyásolni a halak ontogenezisét (Gorge és Nagel, 1990): rendellenességet figyeltek meg az ikrából való kikelés mértékében, a halak egyedfejlődésében, mely többek között a testhossz csökkenésében is megnyilvánult. Mind fiatal, mind felnőtt halakban a piretroidok képesek az agy AChE enzimet gátolni (Reddy és mtsai, 1991).

2.3.2 A methidation (MD)

A methidation (MD, S-2,3-dihidro-5-metoxi-2-oxo-1,3,4-tioazol-3-ilmetil-O,O-dimetil-foszfoditionát; $C_6H_{11}N_2O_4PS_3$) (3. ábra) egy szerves foszforsavészter, amely 1966 óta kapható a kereskedelmi forgalomban. Nagy mennyiségben használják gyümölcsösök és szőlőskertek rovarkártevői ellen. Feltételes forgalmazású növényvédőszer az Ultracid WP40, 40%-os methidation tartalommal.

A szerves foszforsavészterek hatását régóta vizsgálják mind gerinces, mind gerinctelen állatokban (Williams és Sova, 1966; Moss és Fahrney, 1978; Gaines és Linder, 1986; WHO, 1986; Moretto és Johnson, 1987; Nemcsók és mtsai, 1987; Galgani és Bocqueué, 1989; Asztalos és mtsai, 1990; Quest és mtsai, 1990; Zoppellari és mtsai, 1990; Ferrando és mtsai, 1991; Chang és mtsai, 1992; Pavlov és mtsai, 1992). Az élőlényekben elsősorban az AChE bénítása révén hatnak (Gage, 1955; Coppage és Braidech, 1976; McLeese és Metcalfe, 1979) jellegzetes kolinerg szindróma kíséretében (Moretto és Johnson, 1987).

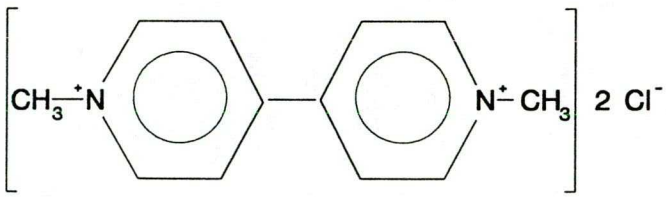


3. ábra A methidation képlete

A szerves foszforsavészterek az állati szervezetekbe kerülve ún. kevert funkciójú oxidáz enzimek segítségével, növényekbe kerülve valószínűleg peroxidáz enzimek segítségével oxidatív deszulfuráláson mennek keresztül (Chopade és Deuterman, 1981). Az AChE bénításon túl számos más hatásuk is ismert. Többek között károsítják a központi idegrendszert, a nemi szerveket, a retinát, az immunrendszert, a hormonrendszert, valamint mutagén, karcinogén és terratogén hatásuk is van (Lotti és Johnson, 1978; WHO, 1986; Quest és mtsai, 1990). A MD szennyezés akkumulálódása miatt nagymértékű toxikus hatást fejthet ki a természetes vizek ökoszisztémájára. Az akkumulálódás a táplálkozási lánc tetején található szervezeteknél a legnagyobb mértékű, így a vízi ökoszisztémában a halak szervezetében dúsul fel legjobban a MD hasonlóan más vegyületekhez (Salánki és mtsai, 1982).

2.3.3 A paraquat (PQ)

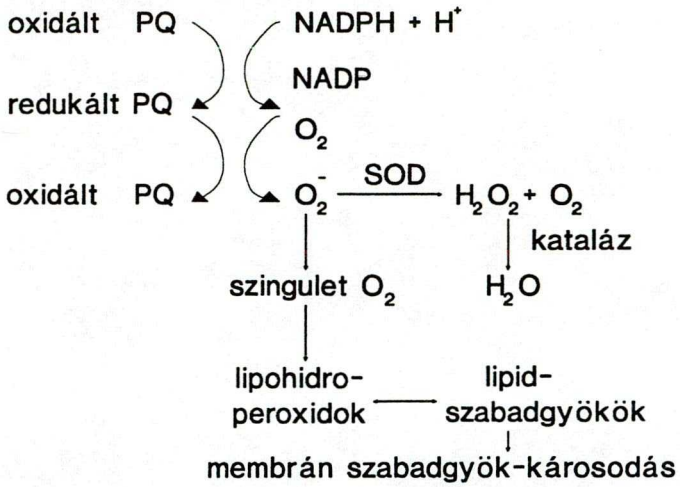
A kvaterner ammónium-vegyületek toxicitását már régen felismerték. A kutatások eredményeként 1958-ban mutatták be a bipiridilium herbicidek mindmáig legjelentősebb képviselőjét, a paraquatot (PQ, 1,1'-dimetil-4,4'-bispiridilium-dihidroklorid) (4. ábra).
Hazánkban a mezőgazdaság által eddig használt készítmények a Gomex (28% PQ-dimetil-szulfát), illetve a Gramoxon (25% PQ-diklorid) voltak, ez utóbbit 1991 elején kivonták a forgalomból. Várható azonban hasonló hatóanyagú analóg növényvédőszer megjelenése, melynek a konzisztenciája eltérő (gélszerű) a korábban használt készítménytől.
A paraquatot levélherbicidként alkalmazzák, mivel a lombozatból gyorsan felszívódik. Nem szelektív hatású, minden növényt - melynek a felületére rápermetezik - pár napon belül elpusztít. Nagyon jól oldódik vízben, majdnem teljesen ionjaira disszociál. A pozitív töltésű PQ-ion bejut a növénybe, és ott az elektrontranszport gátlása révén fejti ki a hatását. A hatás elsődleges oka az, hogy a pozitív töltésű PQ-ion elektronakceptor. Az elektrontranszportláncban kompetitíve gátolja a ferredoxin redukcióját, mert az I. fotoszintetikus rendszerből elvonja az elektronokat, így megakadályozza a NADPH képződését (Varga, 1980).
A redukált PQ viszonylag stabil, főleg oxigénhiány esetén. Oxigén jelenlétében a PQ oxidálódik, az oxigénből pedig szuperoxid-anion (O_2^-) lesz, amely azonnal redukálódik, és hidrogénperoxid (H_2O_2) képződik belőle. A PQ hatásában elsősorban a H_2O_2 illetve a szingulet O_2 képződést tekintik fitotoxikus ágensnek.



4. ábra A paraquat képlete

A PQ hatása az emlősökben is hasonló, mint a növényekben. A sejtekbe jutott PQ az emlősökben is a NADPH igényes oxido-redukciós folyamatokban vesz részt. A PQ elsősorban a Haber-Weiss és Fenton reakciókban keletkező hidroxil gyök (HO·) révén hat. Ez indítja el a lipidperoxidációt, ezáltal károsodik a sejtmembrán, és a sejt integritása megszűnik (5. ábra).
Emlősökben a PQ 1 mg/kg szövetkoncentrációban már letális (Fisher és mtsai, 1971). Az állatokban elsősorban a májat, de a tüdőt, a szívet, és a vesét is jelentős mértékben

károsítja. Halaknál az elsődleges célszerv a kopoltyú, melynél a kopoltyúlemezek hámrétegének a destrukciója következik be.



5. ábra A PQ toxicitásának feltételezett hatásmechanizmusa emlősökben

2.3.4 A rézszulfát

A fémtartalmú fungicidek gombaölő hatását a belőlük keletkező fémkationok kelátképző sajátosságai biztosítják. Fontos szerepe van a kation elektronegativitásának és méretének, ez határozza meg a fém kötésének a stabilitását, a fémkelátok és szulfidok állandóságát. A rézvegyületek (pl. a rézszulfát, $CuSO_4$) gombaölő hatása azon alapul, hogy a sejt belsejébe jutó Cu^{2+}-ionok komplexet képeznek a fehérjék tiol- és aminocsoportjaival, amelyek így nem-specifikusan gátlódnak. Legfőbb károsító hatását a membránon fejti ki, mivel a membrán szulfhidril csoportjait diszulfidokká oxidálja. Ebben a folyamatban a réz(I) - réz(II) redox reakciónak van szerepe, amely molekuláris oxigénhez kapcsolt.

E folyamatban szintén szuperoxid gyökök szabadulnak fel. A megnövekedett mértékű lipidperoxidáció a membrán destrukciójához vezet. A vízi ökoszisztéma egyensúlyát már 2 mg/l Cu^{2+} szennyeződés felboríthatja, elsősorban a baktériumflóra, majd az alsóbbrendű rákok számának a csökkenése által (Winner és Farrell, 1976; Labat és mtsai, 1977). A vízi élőlények nagymértékben akkumulálják szervezetükben a nehézfémeket. Az élőlények szerveiben bekövetkező feldúsulás miatt már a vízi környezet kis Cu^{2+} tartalma is toxikussá válhat.

3. CÉLKITŰZÉSEK

A laboratóriumi vizsgálataink három területre tagolhatóak, amelyek eredményeit megpróbáltuk felbomlott ökoszisztémájú vizek diagnosztizálására (tesztelésére) alkalmazni. Munkánk fő célja volt a különböző peszticidek biokémiai hatásmechanizmusának feltárása a ponty különböző szerveinek kolinészteráz enzimein keresztül; ezen enzimek molekuláris formáinak eloszlás vizsgálata; illetve a peszticidek indukálta változások követése bio- és hisztokémiai módszerekkel. Az alábbi célokat tűztük ki magunk elé:

1. A DM és a MD *in vitro* AChE gátlásának jellemzése és a gátlási állandó meghatározása klasszikus kinetikai módszerekkel.
2. A DM, MD, PQ és a $CuSO_4$ hatásának jellemzése az AChE (és a bélben BChE) aktivitására, valamint a molekuláris formáinak megoszlására a ponty különböző szerveiben.
3. A DM *in vivo* hatásának tanulmányozása a ponty különböző szerveinek és vérének enzimparamétereire egy viszonylag alacsony és egy magasabb vízhőmérsékleten.
4. A DM és a MD akkumulációjának meghatározása a ponty különböző szerveiben, és a MD bomlásának nyomon követése csapvízben.
5. Az AChE jellemzése hisztokémiai módszerekkel kezelt és kontroll állatok agyában, vázizmában és bélrendszerében.
6. A DM és a MD májdestrukciós hatásának kimutatása elektronmikroszkópos citopatológia segítségével.

Munkánk szorosan kapcsolódik a JATE Biokémiai Tanszékén folyó környezetbiokémiai kutatásokhoz, ezért bizonyos esetekben a már meglévő adatbázis kiegészítése történt új kísérletekkel, más esetekben pedig további paramétereket tanulmányoztunk az egyes növényvédő szerek hatásának mind részletesebb feltérképezéséhez. Kutatásaink távlati célja, hogy a tanszékünkön kifejlesztett halas biomonitoring rendszerhez újabb enzimdiagnosztikai módszereket dolgozzunk ki, melyek rutinszerűen, olcsón és gyorsan elvégezhetők, s tovább finomítják rendszerünket, lehetőséget adva természetes vizeink állapotának pontos és objektív értékelésére.

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1 Anyagok

Az általános reagensek (ahol nincs külön jelölve) Reanal Rt. beszerzésűek, a legtisztább (p.a.) jelzésűek, és további tisztítás nélkül lettek felhasználva.

Enzimek: Alkalikus foszfatáz (EC 3.1.3.1), BSA (Sigma), glükózoxidáz (EC 1.1.3.4), kataláz (EC 1.11.1.6), peroxidáz (EC 1.11.1.7), ß-galaktozidáz (EC 3.2.1.23, Sigma)

Vegyszerek: $(NH_4)_2SO_4$, 2,4-dinitrofenilhidrazin, deltamethrin (Sigma), 85%-os foszforsav, 96%-os etanol, α-oxoglutarát, acetiltiokolin-jodid (Lachema), aceton, BW 284 C51 (Sigma), Comassie-Brillant Blue, $CuSO_4*5H_2O$, D,L-alanin, dinátrium-p-nitrofenil-foszfát, 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzoesav) (Sigma), Durcupan ACM gyanta (Fluka), ethopropazin (Sigma), etil-acetát, formalin, glicin, glutáraldehid, H_2O_2, hexán, K-Na-tartarát, KI, kloroform, L-aszpartát, methidation (Sigma), metil-viologén, Na-acetát, Na-kakodilát, $Na_2HPO_4*12H_2O$, Na_2S, Na_2SO_4, NADH, NaH_2PO_4, NaOH, neosztigmin (NBS Biologicals), o-dianizidin, OsO_4, $PbNO_3$, piroszőlősav, selecton B_2 (EDTA), tris, triton X-100, uranil-acetát

4.2 A kolinészteráz aktivitások mérése

4.2.1 A kolinészteráz aktivitás mérése

A kolinészterázok aktivitását Ellman és munkatársai (1961) spektrofotometriás eljárásával mértük. A 2.06 ml végtérfogatú elegy összetétele a következő volt: 52 mM Na-foszfát puffer (pH=7.2, 25 °C), 0.26 mM 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzoesav) (DTNB) és 82.4 mM AThCh-I. A reakciót 0.01 ml homogenát hozzáadásával indítottuk, és 412 nm-en detektáltuk Cecil CE 5501 UV-VIS spektrofotométerrel. A kolinészterázok aktivitását az elhidrolizált AThCh-jodid μmol/min/mg protein értékben adtuk meg (U/mg protein).

4.2.2 Az AChE aktivitásának mérése

Mivel az egyes frakciókban az előbb leírt módszerrel nem detektálható az enzimaktivitás az AChE kis koncentrációja miatt, ezért a következő módszer szerint jártunk el:
Az elkészített, DTNB-t tartalmazó pufferhez 0.1 ml mintát vittünk fel az adott frakcióból, s a szubsztrát hozzáadása után 37 °C-os vízfürdőben 15-45 percig inkubáltuk. Az inkubálás után a reakciót 100 μl neosztigminnel állítottuk le úgy, hogy annak végkoncentrációja 10^{-4} M legyen.

Összehasonlító oldattal szemben mértük a mintákat, mely oldat a frakcióból kivett elegy hozzáadásakor már tartalmazott kolinészteráz gátló neosztigmint. A kolinészteráz aktivitást az elhidrolizált AThCh-jodidból számoltuk. Az AChE mérésekor a kiindulási elegy specifikus BChE gátló ethopropazint, míg a BChE mérésekor specifikus AChE gátló BW 284 C51 tartalmazott, melyeknek végkoncentrációja 10^{-5} M volt.

4.3 Az *in vitro* kísérletben használt módszer

Az *in vitro* kísérletekben agy homogenizátumot használtunk, mivel ez a szerv bővelkedik AChE-ban. Kezeletlen ponty agyát kipreparáltuk, 1:4 arányban elegyítettük 0.5% Triton X-100-at, 12.5 mM (pH=7.2) foszfát puffert, 67.2 mg/100 ml EDTA-t és 0.4 M NaCl-ot tartalmazó homogenizálóval, homogenizáltuk (800 min^{-1}), majd lecentrifugáltuk (7000 rpm, 1 óra, K23 centrifuga). A kapott felülúszót hal fiziológiás sóoldattal (0.62% NaCl) kétszeresére hígítottuk, majd közvetlenül AChE aktivitás meghatározásra használtuk az *in vitro* kísérletekben.

Az időfüggések vizsgálataikor két szerkoncentrációt is használtunk. A reakciópufferekhez 10 μl agy homogenát felülúszót adtunk, majd a megfelelő gátlószer mennyiségekkel inkubáltuk együtt őket 0-60 percig szobahőmérsékleten. A reakciót az AChE mesterséges szubsztrátjával (acetiltiokolin-jodiddal) indítottuk és a fényelnyelést 412 nm-en követtük. A homogenizátum fehérje tartalmának meghatározása után az enzimaktivitásokat specifikus aktivitásként adtuk meg.

A koncentrációfüggés vizsgálatakor a megfelelő szerkoncentrációkat állítottuk elő a reakcióelegyekben, és 10 percig inkubáltuk az enzimet az inszekticidekkel.

A Michaelis-Menten-féle görbéket gátlószer nélkül, 10 μM és 20 μM koncentrációjú DM-nel illetve 50 μM és 100 μM koncentrációjú MD-nal vettük fel. A Dixon-féle kinetikánál mindkét szer esetén 0.05, 0.10 és 0.20 mM-os szubsztrát koncentrációt alkalmaztunk.

4.4 A kolinészterázok molekuláris formáinak meghatározása

A különböző növényvédő szerekkel kezelt halak (4-6) agy-, máj-, bél- és szívmintáit 1:4 arányban, a vázizmot 1:9 arányban elegyítettük 0.5% Triton X-100-at, 12.5 mM (pH=7.2) foszfát puffert, 67.2 mg/100 ml EDTA-t és 0.4 M NaCl-ot tartalmazó homogenizáló oldattal. A kötött és szolubilis formák elkülönítésére különböző homogenizálókat használtunk (Rakonczay és mtsai, 1981). Különböző sókoncentrációk (0.4 M és 1.0 M) AChE extrakciójára gyakorolt hatását is vizsgáltuk. A vérminták lecentrifugálása (Eppendorf centrifuga, 12000 *g*) után a vérszérumot használtuk a továbbiakban. A mintákat Braun 853302/4 típusú Potterrel homogenizáltuk (800-1000 min^{-1}). Az így kapott homogenizátumokat előcentrifugáltuk 16000 rpm-en, 45 percig

4 °C-on Heraeus Christ Cryofuge Nr. 8730 típusú centrifugával (26000 *g*). A molekuláris formák elválasztása 5-20%-os lineáris szaharóz gradiensen történt, 16 órás 36000 rpm-es ultracentrifugálással (160000 *g*), amihez Sorval Ultra PRO 80 típusú centrifugát és TH-641-es rotort használtunk. Az ulracentrifugálás után 40 frakciót szedtünk, majd minden egyes frakcióban meghatároztuk az AChE és a marker enzimek aktivitását, illetve a protein tartalmat. Szedimentációs markerként BSA-t (4.3S), alkalikus foszfatázt (6.1S, EC 3.1.3.1), katalázt (11.3S, EC 1.11.1.6) és ß-galaktozidázt (16.0S, EC 3.2.1.23) használtunk. Az alkalikus foszfatáz, a kataláz és a ß-galaktozidáz aktivitását Boehringer Mannheim GmbH (1974) katalógusban leírtak alapján határoztuk meg.

4.5 Az *in vivo* deltamethrin kísérletek során használt módszerek

Az *in vivo* kísérletünkben a halakat 1.0, 1.5 és 2.0 μg/l koncentrációjú DM-es vízben tartottuk 96 illetve 72 óráig, majd a 2.0 μg/l DM kezelést követően tiszta vízbe téve a kísérleti állatokat folytattuk a kísérletet. 1.0 és 1.5 μg/l DM koncentrációknál 25 ± 1 °C (nyári körülmények), míg a 2.0 μg/l DM-es vizsgálatoknál 12 ± 1 °C (kora tavaszi - késő őszi körülmények) volt a vízhőmérséklet. A kísérletek alatt adott időpontokban a pontyok farokvénájából vettünk vért. A vért lecentrifugáltuk (12000 *g*, Eppendorf centrifuga) és a hemolízis mentes szérumból mértük az enzimek aktivitásait az alábbi módszerekkel:

-Az AChE aktivitását acetiltiokolin-jodid szubsztráttal határoztuk meg Ellman és mtsai (1961) szerint.

-A glutamát-oxálacetát transzamináz és a glutamát-piruvát transzamináz aktivitásokat Reitman és Frankel (1957) módszere alapján mértük a Reanal által gyártott kitt segítségével.

-A laktát dehidrogenáz aktivitásának mérésére Annon (1971) módszerét alkalmaztuk. Az enzimek specifikus aktivitását U/mg fehérje mértékegységben adtuk meg. (1 U= 1 μmol átalakított szubsztrát percenként.)

-A fehérjetartalmat Lowry és mtsai (1951) szerint határoztuk meg.

-A vércukorszint meghatározást glükózoxidáz-peroxidáz eljárással végeztük. A reakcióelegy 2.5 ml glükóz reagenst [2 mg peroxidázt és 12.5 mg glükózoxidázt oldottunk 50 ml 0.1 M foszfát pufferben (pH=7.0), majd ehhez 1 ml o-diazidin oldatot adtunk (3.3 mg/ml 1 N HCl)] és 0.1 ml fehérjementesített vérszérumot tartalmazott. Szobahőn 30 percig inkubáltuk az elegyet, majd 450 nm-en mértük a fényelnyelést.

A kezelést követően az adott szerveket eltávolítottuk, majd Braun 853302/4 típusú potterrel (200 mg nedves szövethez 0.8 ml homogenizáló oldatot adva) homogenizáltuk. Ezt követően a homogenizátumot centrifugáltuk, és az AChE valamint a kataláz enzimaktivitásokat a felülúszóból határoztuk meg. A kataláz aktivitását

spektrofotometriásan mértük H_2O_2 fogyás alapján. A reakcióelegy 3.00 ml foszfát pufferből (50 mM, pH=7.0; amely 1.2 μl 30%-os H_2O_2-ot tartalmazott 1 ml pufferre vonatkoztatva) és 200 μl mintából állt. A reakciót 240 nm-en követtük.

Az eritrocita plazmamembránt Sorensen (1983) módszere alapján preparáltuk. Az eritrocitákat centrifugálással gyűjtöttük össze, majd a csapadékot 0.16 M NaCl oldattal mostuk. Mosás után a sejteket újraszuszpendáltuk 0.15 M NaCl oldatban, 3 mM $MgCl_2$ és 0.01 M Tris-HCl puffer (pH 7.2) elegyében, és Virtis 45 homogenizálóval homogenizáltuk. A sejtmagot és a szét nem töredezett sejteket alacsony fordulatszámú differenciál centrifugálással (500-1200 *g*, 5 perc) távolítottuk el. A széttört plazmamembránt ezután a felülúszóból újabb centrifugálással (25000 *g*, 15 perc) nyertük ki, majd a membránt néhány alkalommal mostuk 0.1 M kolin kloridot tartalmazó 0.01 M Tris-HCl pufferrel (pH 7.2). Végül az említett módon mosott membránok egy részét újraszuszpendáltuk a mosóközegben és így tároltuk -60 °C-on az ATP-áz és a fehérjetartalom méréséig. Az ATP-áz aktivitást 40 mM Tris-HCl puffert (pH 7.2), 6 mM $MgCl_2$-ot, 20 mM KCl-ot és 150 mM NaCl-ot tartalmazó alap inkubálóelegyben mértük, a Mg^{2+}-ATP-áz esetében oubaint adva inhibitorként (0.7 mM) (Bourre és mtsai, 1982). A reakciót 5 perces hőmérsékleti ekvilibrálás után 4 mM ATP (trinátrium só) hozzáadásával indítottuk. Ezután 15 perces inkubálás következett 22 °C-on, amit 1 ml jéghideg 10% v/v TCA-val állítottunk le. A reakció befejeződése után a kicsapódott fehérjéket lecentrifugáltuk és a felülúszóból inorganikus foszfátot határoztunk meg Line és Way (1984) módszerével. Az ATP-áz specifikus aktivitásokat Pi/mg fehérje/óra egységben adtuk meg, a Na^+/K^+-ATP-áz aktivitást pedig a totál ATP-áz aktivitás és a Mg^{2+}-ATP-áz aktivitás különbségéből határoztuk meg.

4.6 A MD bomlásának, illetve a DM és a MD akkumulációjának meghatározása

A DM akkumulációjának meghatározásánál kontroll, és 2 μg/l koncentrációjú DM-nel 3 napig kezelt halak szerveit acetonnal homogenizáltuk, centrifugáltuk, majd a felülúszót diklórmetánba ráztuk át. A koncentrált extrakt kétszeres oszlopkromatográfiás tisztítása után a DM-t elektronbefogási detektorral gázkromatográfiásan határoztuk meg (KP 5880, HP-1 kolonna /cross-linked methyl silicone gum phase/ 12 m*0.2 mm*0.33 μm, $T_{injektor}$=280 °C Splitless, Splitless time: 30 s, T_{oszlop}=270 °C, $T_{detektor}$=300 °C ECD-Electron Capture Detector, vivőgáz: N_2 /T 45/, injektált térfogat: 0.8 μl). Standardként spektroszkópiailag tiszta DM-t használtunk.

A MD bomlásának meghatározása akváriumi körülmények között (a kezelésekkel megegyező hőmérséklet, levegőztetés), 5 mg/l-es kezdő koncentrációjú oldatból történt. Az 1 literes mintában 40 g $(NH_4)_2SO_4$-ot oldottunk fel, majd 100 ml etilacetáttal

extraháltuk. A szerves fázis vákuum bepárlása után a mintát 3.5 ml etilacetátban vettük fel.

A MD akkumulációjának meghatározásánál standardként kontroll izomszövetet használtunk, aminek a homogenizáló oldatához MD-t adtunk úgy, hogy a végkoncentrációja 0.8 mg/l legyen. A 2 mg/l MD-nal 5 napig kezelt halakból származó szervmintákat acetonnal elegyítettük 1:4 arányban, majd homogenizáltuk őket. A homogenizátumokat 30 percig rázattuk, majd 10000 *g* (7000 rpm, K23, 1 óra) mellett lecentrifugáltuk. A felülúszóhoz $(NH_4)_2SO_4$-ot adva kétszer extraháltuk 5-5 ml kloroformmal. A szerves fázis bepárlása után a mintát 1 ml abszolut etanolban vettük fel. Az etanolt szintén bepároltuk, majd az így nyert mintát 1 ml etilacetátban oldottuk. A MD-t GC-FPD (gázkromatográf-lángfotometriás detektor) rendszer segítségével mértük (HP 5890 Series II) 1 μl mintából. Az injektor (Split-splitless) hőmérséklete 200 °C volt (split ratio: 120:1). Az általunk használt kolonna (HP-17, 10 m*0.53 mm*2 μm) hőmérsékletét 160 °C-nak (izoterm), míg a detektorét 250 °C-nak választottuk.

4.7 Az AChE kimutatása szövetekben Koelle-módszerével

Az AChE hisztokémiai kimutatására módosított Koelle és Friedenwald (1949) módszert alkalmaztunk. A szövetmintákat (agy, izom, bélszegmensek) 0.05 M kakodilát pufferben (pH = 7.0) - mely 4% formalint és 2% glutáraldehidet tartalmazott - 6 órán keresztül fixáltuk immerziós módszerrel. Ezután a preparátumokat izotóniás mennyiségű (19.876 g/l) Na_2SO_4-ot tartalmazó 0.1 M cacodylat pufferben 12 órán át mostuk, 3 óránként váltva a mosóoldatot. Az agy- és az izomdarabokból *Vibratome*-mal 60-80 μm-es metszeteket készítettünk.

Ezt követően a mintákat 4 °C-on 30 percig, majd 25 °C-on újabb 30 percig inkubáltuk. 200 ml izotóniás Na_2SO_4 inkubáló elegy tartalmazott 7 mg acetiltiokolin-jodidot, 2.2 ml 0.1 M nátrium-acetátot, 0.1 ml 3.8%-os glicinoldatot, 0.1 ml 0.1%-os $Pb(NO_3)_2$ oldatot, 0.1 ml 0.1 M $CuSO_4$-ot. A pH-t 5.5-re állítottuk be. Az inkubálás után izotóniás Na_2SO_4-tal mostuk 3*5 percig a preparátumokat (váltogatva a mosó oldatot), majd 3-5 percre a mintákat az előhívó elegybe helyeztük, mely 20 ml 1 N nátrium-acetátot, 80 ml desztillált vizet és 2 g Na_2S-ot tartalmazott, és pH-ja 7.5 volt.

Ezt követte háromszori mosás, először izotóniás Na_2SO_4-ban, majd csapvízben, végül desztillált vízben. Az utolsó mosás után visszahelyeztük a mintákat 12 órára az eredeti összetételű fixálóelegybe. Az ilyen módon nyert preparátumokat (bél: Whole mount) glicerinnel lefedve *Zeiss* fénymikroszkóp (Nomarsky optika) alatt vizsgáltuk.

4.8 Az elektronmikroszkópos vizsgálatok módszere

A 2 μg/l koncentrációjú DM-nel 3 napig és a 2 mg/l koncentrációjú MD-nal 5 napig kezelt halak májából 1 mm^3 szövetdarabkákat vágtunk ki, melyeket azonnal jéghideg fixálóba helyeztük. Előfixálóként 2.5% glutáraldehidet tartalmazó cacodylát puffert (pH=7.3) alkalmaztunk. A 4 órás előfixálás után a mintákat 2%-os OsO_4 fixálóban tartottuk további 2 órán keresztül. A minták dehidrálása emelkedő alkoholgradiensben (30, 50, 75, 96, 100%) történt (a 75%-os alkohol oldat a jobb kontraszt érdekében uranil-acetátot is tartalmazott). A mintákat Durcupan ACM gyantába ágyaztuk, majd Reichert *Ultracut S* típusú ultramikrotommal 60 nm vastagságú metszeteket készítettünk belőlük. Ezeket ólomcitráttal kontrasztosítva Philips CM 10 típusú elektronmikroszkóppal vizsgáltuk.

4.9 Tartási és kezelési körülmények

Mivel Magyarország haltenyésztésének legnagyobb százalékát a ponty teszi ki, vizsgálatainkhoz mindkét nemből származó 850-1200 g tömegű pontyokat (*Cyprinus carpio* L.) használtunk. Az állatokat kettesével 100 l-es jól levegőztetett, 12 ± 1 °C-os vízhőmérsékletű akváriumokban tartottuk (kivétel a DM *in vivo* kísérletek egy részét). A vizsgált hatóanyagokat (DM, MD, PQ és $CuSO_4$) a halak egy hetes adaptációja után az akváriumok vizében oldottuk fel. Minden kezelést 3-8 állaton végeztünk el.

A kolinészterázok molekuláris formáinak vizsgálatához 2 μg/l DM-nel 3 napig, valamint 2 mg/l MD-nal 5 napig kezelt halak agyát, máját, szívét, vázizmát és vérszérumát, továbbá 2 mg/l MD-nal, 5 mg/l PQ-tal és 5 mg/l $CuSO_4$-tal 7 napig kezelt halak elő-, közép- és utóbelét használtuk.

Az *in vivo* DM kezeléseknél 25 ± 1 °C-on 1.0 és 1.5 μg/l, 12 ± 1 °C-on 2.0 μg/l piretroidot használtunk. A kezelés időtartama 96, illetve 72 óra volt. A MD bomlását 5 mg/l MD kezdeti koncentrációjú 12 ± 1 °C-os vízben tanulmányoztuk 19 napon keresztül. A DM és MD akkumulációját 2 μg/l DM-nel 3 napig illetve 2 mg/l MD-nal 5 napig kezelt állatok agyából, beléből, májából, szívéből, vázizmából, veséjéből, zsírszövetéből, és a nőstény egyedekben talált ikrából határoztuk meg. Az AChE fénymikroszkópos kimutatásához 2 μg/l DM-nel 3 napig és 2 mg/l MD-nal 5 napig kezelt halak agyát és izmát, valamint 2 mg/l MD-nal, 5 mg/l PQ-tal és 5 mg/l $CuSO_4$-tal 7 napig kezelt halak elő-, közép- és utóbelét használtuk. A májdestrukció elektronmikroszkópos vizsgálatához 2 μg/l DM-nel 3 napig és 2 mg/l MD-nal 5 napig kezelt halak máját használtuk.

4.10 Az alkalmazott statisztikai módszerek és számítógépes programok

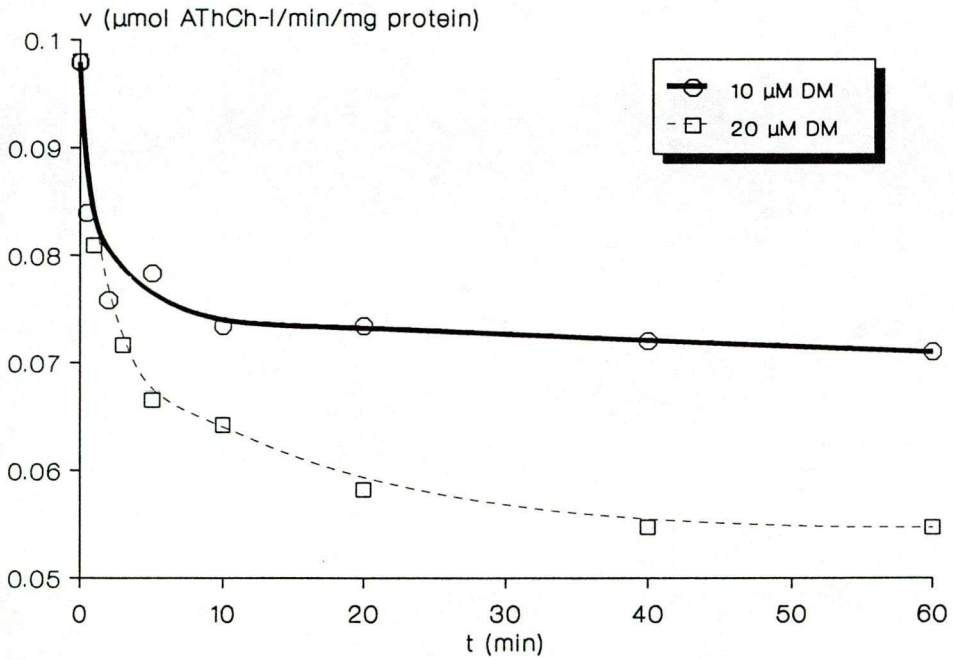
A statisztikai értékelésekhez elsősorban Student *t* tesztet használtunk. Szignifikánsnak tekintettük a változásokat, ha P értéke kisebb volt, mint 0.05. A felhasznált programok: Lotus 1-2-3, Quattro Pro, Harvard Graphics 2.1, 3.0 és 2.0 for Windows, MSWORD 5.5 és 2.0 for Windows.

5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

5.1 Az *in vitro* kísérletek eredményei

5.1.1 A deltamethrin gátláskinetikája

Ezen kísérletek célja az volt, hogy meghatározzuk a DM AChE gátlásának mértékét, időfüggését, koncentrációfüggését, a gátlás típusát, és az ún. gátlási állandót. Az időfüggés meghatározásakor arra voltunk kíváncsiak, hogy a DM hány perc alatt éri el maximális gátlását. Eredményeinket a 6. ábra mutatja.

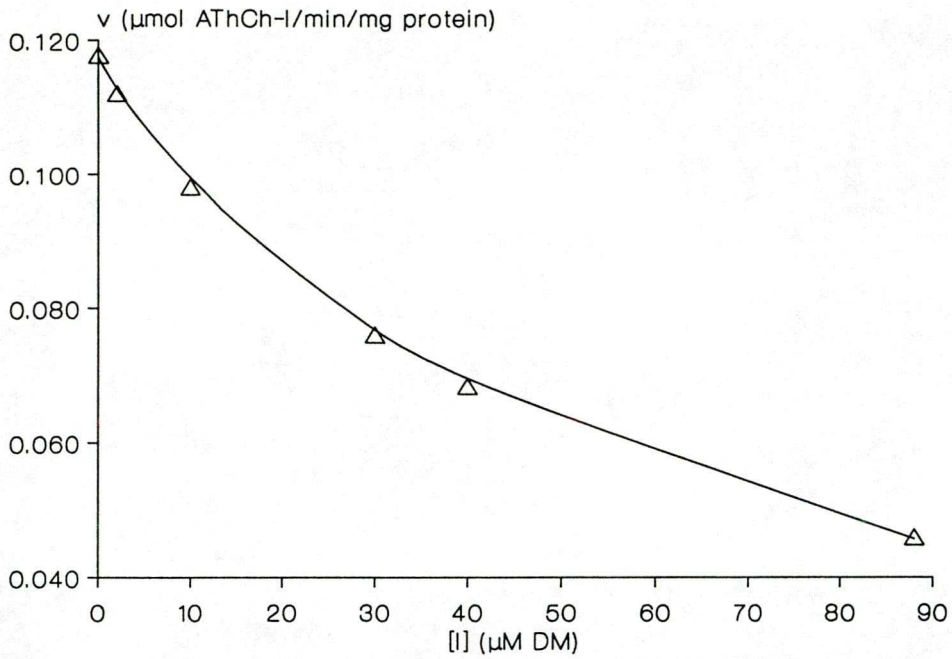


6. ábra A DM AChE gátlásának időfüggése 10 és 20 μM koncentrációban

Megjegyzés. A reakcióelegy a következő volt: 0.01 ml agyból készült homogenát felülúszója + 2.00 ml 52 mM foszfát puffer (pH=7.2) + 0.44 ml DM oldat + 0.05 ml AThCh-I (0.1 mM).

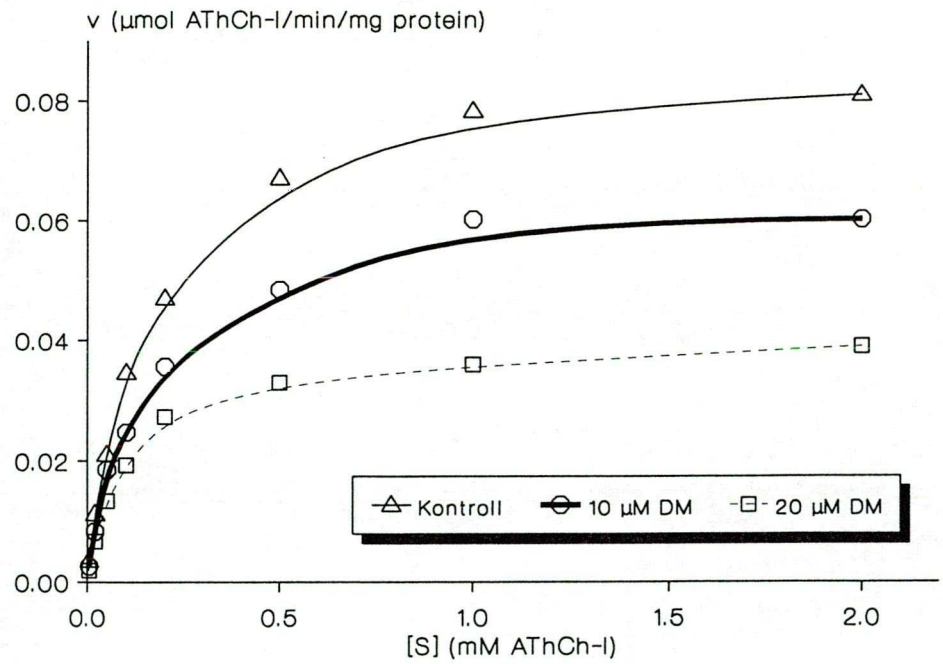
Az ábráról leolvasható, hogy a DM igen gyorsan kifejti maximális gátló hatását. A 10 μM-os koncentráció esetén már 5-10 perc után jelentős a gátlás. Nagyobb koncentráció (20 μM-os) esetén egy kicsit több időre volt szükség a maximális gátlás kialakulásához (20-40 perc).

A koncentrációfüggés megállapítására irányuló kísérletsorozat arról ad felvilágosítást, hogy a különböző *in vitro* DM koncentrációkhoz milyen gátlási százalék rendelhető. A 7. ábrából megállapítható, hogy már 10 μM-os DM koncentráció is 17%-os, a 40 μM-os koncentráció már 42%-os, a 88 μM-os koncentráció pedig 61%-os gátlást okoz. Mindezekből megállapítható, hogy bár a DM nem specifikus AChE inhibitor, de jelentős mértékben képes az AChE-t gátolni.



7. ábra A DM AChE gátlásának koncentrációfüggése

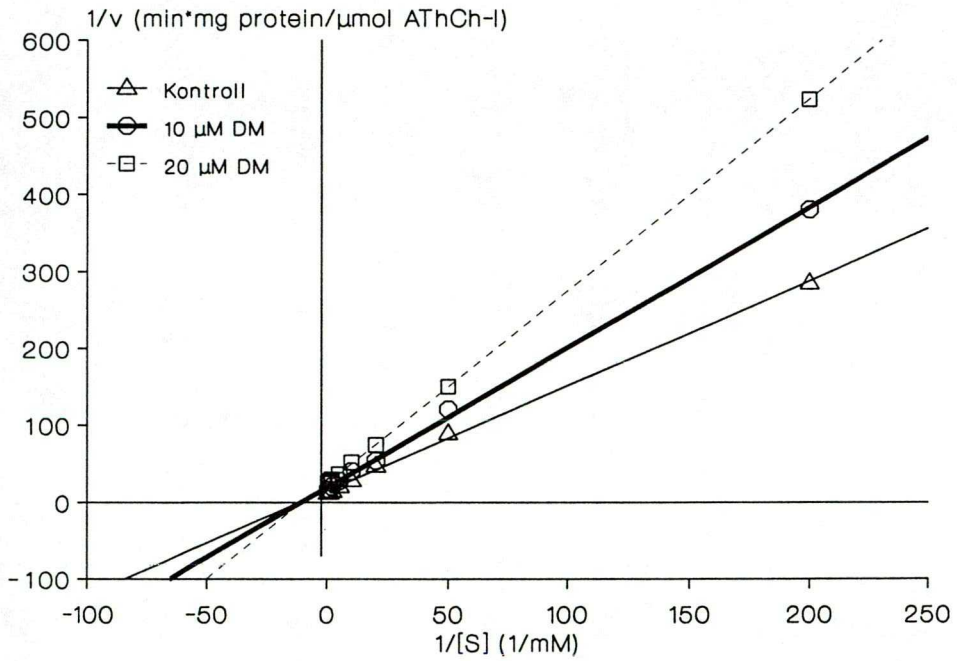
Megjegyzés. A reakcióelegy a következő volt: 0.01 ml agyból készült homogenát felülúszója + 2.00 ml 52 mM foszfát puffer (pH=7.2) + 0.44 ml DM oldat + 0.05 ml AThCh-I (0.1 mM). Inkubációs idő: 10 perc



8. ábra Az agy AChE Michaelis-Menten kinetikája gátlószer nélkül, illetve 10 μM és 20 μM koncentrációjú DM esetén

Megjegyzés. A reakcióelegy a következő volt: 0.01 ml agyból készült homogenát felülúszója + 2.00 ml 52 mM foszfát puffer (pH=7.2) + 0.44 ml DM oldat + 0.05 ml AThCh-I (0.1 mM). Inkubációs idő: 10 perc

A gátlási típus meghatározása közelebbi információt tud nyújtani az enzimgátlás mechanizmusáról. A gátlás típusának meghatározásához először a Michaelis-Menten kinetikát vettük fel (8. ábra). A kapott görbék Lineweaver-Burk (9.ábra) illetve a Hanes-féle linearizálása után megállapítható, hogy a gátlás típusa vegyes (látszólagos értékek: $K_{M(kont.)}$ = 0.0910 mM; $K_{M(10\,\mu M)}$ = 0.0955 mM; $K_{M(20\,\mu M)}$ = 0.0969 mM; $v_{max(kont.)}$ = 0.067; $v_{max(10\,\mu M)}$ = 0.053; $v_{max(20\,\mu M)}$ = 0.040 [μmol AThCh-I/perc/mg protein]). Ez az eredmény jó összhangban van azzal az irodalmi adattal, hogy a piretroidok (köztük a DM is) nem specifikus gátlószerei az AChE-nak, bár van AChE gátló hatásuk is (Reddy és mtsai, 1991).

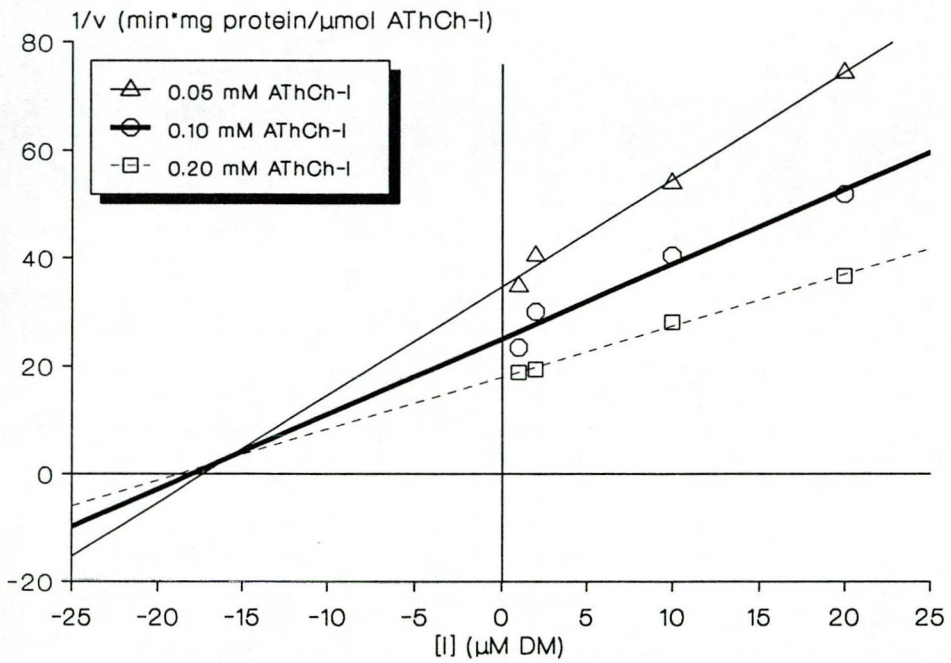


9. ábra Lineweaver-Burk-féle linearizálás

Megjegyzés. A reakcióelegy a következő volt: 0.01 ml agyból készült homogenát felülúszója + 2.00 ml 52 mM foszfát puffer (pH=7.2) + 0.44 ml DM oldat + 0.05 ml AThCh-I (0.1 mM). Inkubációs idő: 10 perc

A gátlási állandó (K_I) meghatározásához két módszer is használható. Az első abból áll, hogy a koncentráció függésnél mért értékek %-át logaritmizáljuk, és meghatározzuk az 1.7-es értékhez tartozó koncentrációt. Ez a koncentráció adja a K_I értéket. Ennek a módszernek igen nagy hátránya a pontatlansága (Moretto és Johnson, 1987): a K_I könnyen alá vagy fölé becsülhető. (Az így meghatározott értéket IC_{50}-nel is szokták jelölni.) Ezért választottuk mi a másik módszert, a Dixon-féle meghatározást (10. ábra). A K_I érték 15.6 μM adódott. Ez azt jelenti, hogy valójában 15.6 μM-os DM koncentráció okoz 50%-os AChE gátlást.

Kísérleteink eredményeit összefoglalva megállapíthatjuk, hogy a DM jó inhibítora az AChE-nak. Hatását gyorsan kifejti, kisebb koncentráció (10 μM) mellett már 10 perc után eléri a maximális gátlási hatékonyságát. 15.6 μM-os koncentráció mellett 50%-os gátlás érhető el, de ez tovább fokozható a koncentráció növelésével, bár a gátlás mértéke a koncentráció növekedésével nem lineáris. A gátlás típusa vegyes, ami arra utal, hogy a DM nem közvetlenül (pl. az enzim aktív centrumán kivül kötődve) befolyásolja az enzim szubsztrátkötő és katalikus helyét. Meg kell azonban említenünk, hogy az *in vitro* kísérletekben használt koncentráció jóval magasabb az *in vivo* LC_{50} értéknél, amiből azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a természetben a DM más módon, valószínűleg áttételesen, az idegrendszer más elemein keresztül fejti ki AChE gátlását.



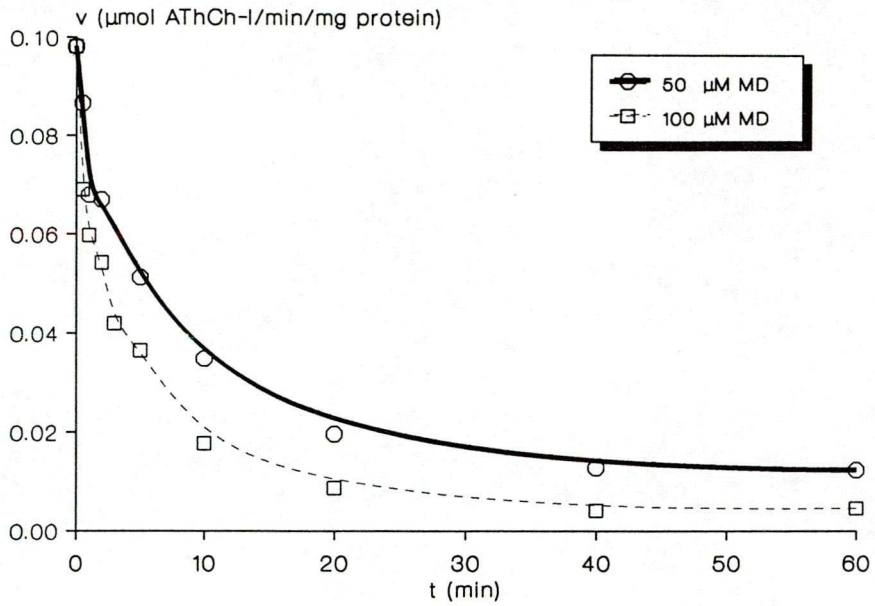
10. ábra K_I meghatározása Dixon módszerével 0.05, 0.10, 0.20 mM szubsztrát koncentrációt alkalmazva

Megjegyzés. A reakcióelegy a következő volt: 0.01 ml agyból készült homogenát felülúszója + 2.00 ml 52 mM foszfát puffer (pH=7.2) + 0.44 ml DM oldat + 0.05 ml AThCh-I (0.1 mM). Inkubációs idő: 10 perc

5.1.2 A methidation gátláskinetikája

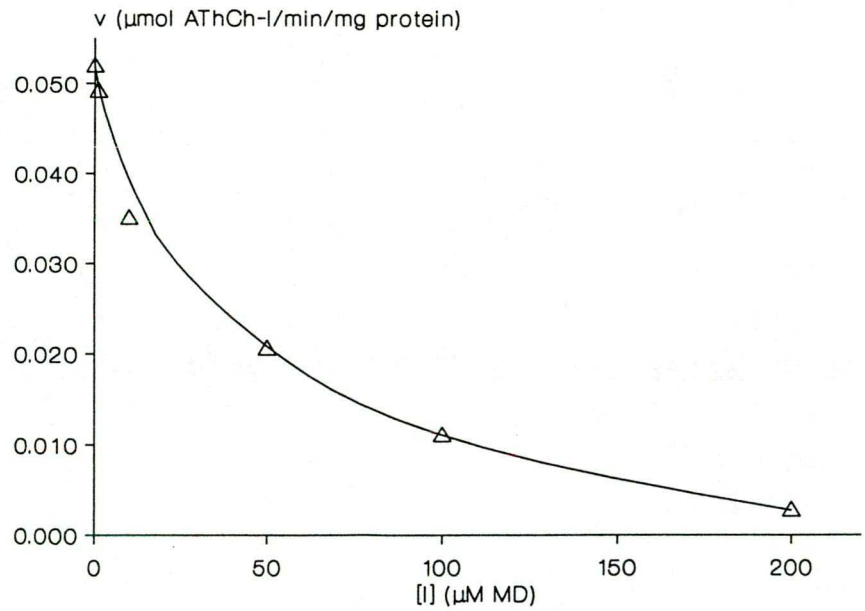
Egy kísérletsorozaton keresztül, a DM-hez hasonlóan, kinetikai módszerekkel jellemeztük a MD AChE gátló hatását. A 11. ábra mutatja a gátlás időfüggését. Megállapítható, hogy a MD gyorsan blokkolta az agyban található AChE-t. Az 50 μM-os koncentráció esetén már 5 perc után 47%-os, 20 perc után pedig 80%-os volt a gátlás. A 100 μM-os koncentráció gátlásának időfüggése is hasonló lefutású görbét adott, ám meredekebb kezdeti lefutással (5 perc után 82%-os, 20 perc után pedig 91%-os a volt a

gátlás). A koncentrációfüggésből megállapítható (12. ábra), hogy 10 perces inkubálás után, az 50 μM-os MD koncentráció 60%-os, a 100 μM-os 79%-os, míg a 200 μM-os már 95%-os gátlást okoz.



11. ábra A MD AChE gátlásának időfüggése 50 és 100 μM koncentrációnál

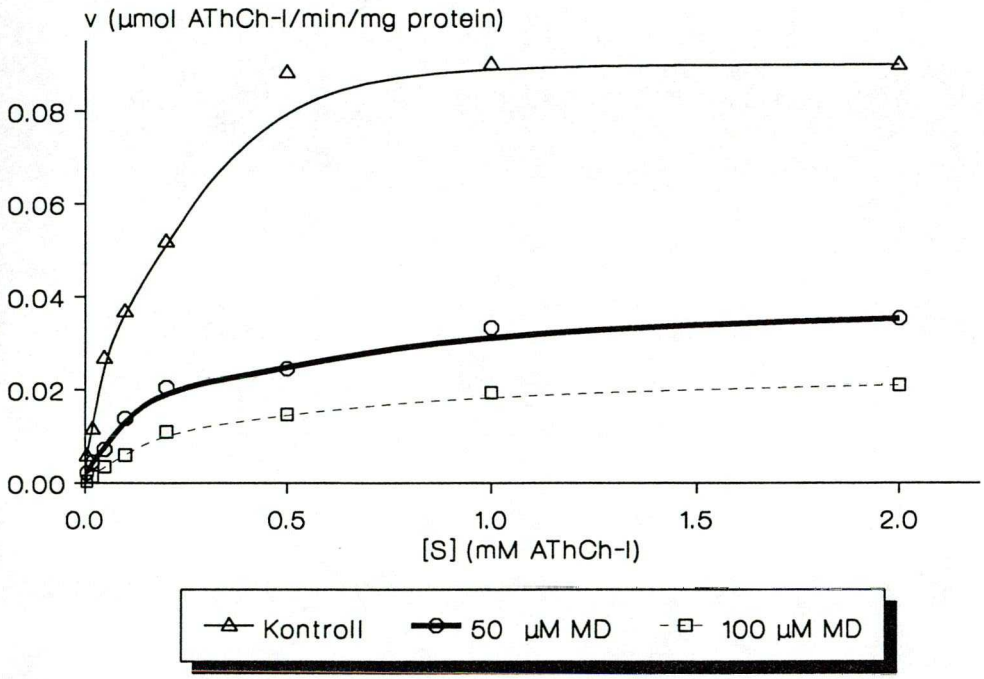
Megjegyzés. A reakcióelegy a következő volt: 0.01 ml agyból készült homogenát felülúszója + 2.00 ml 52 mM foszfát puffer (pH=7.2) + 0.44 ml MD oldat + 0.05 ml AThCh-I (0.1 mM).



12. ábra A MD AChE gátlásának koncentrációfüggése

Megjegyzés. A reakcióelegy a következő volt: 0.01 ml agyból készült homogenát felülúszója + 2.00 ml 52 mM foszfát puffer (pH=7.2) + 0.44 ml MD oldat + 0.05 ml AThCh-I (0.1 mM). Inkubációs idő: 10 perc

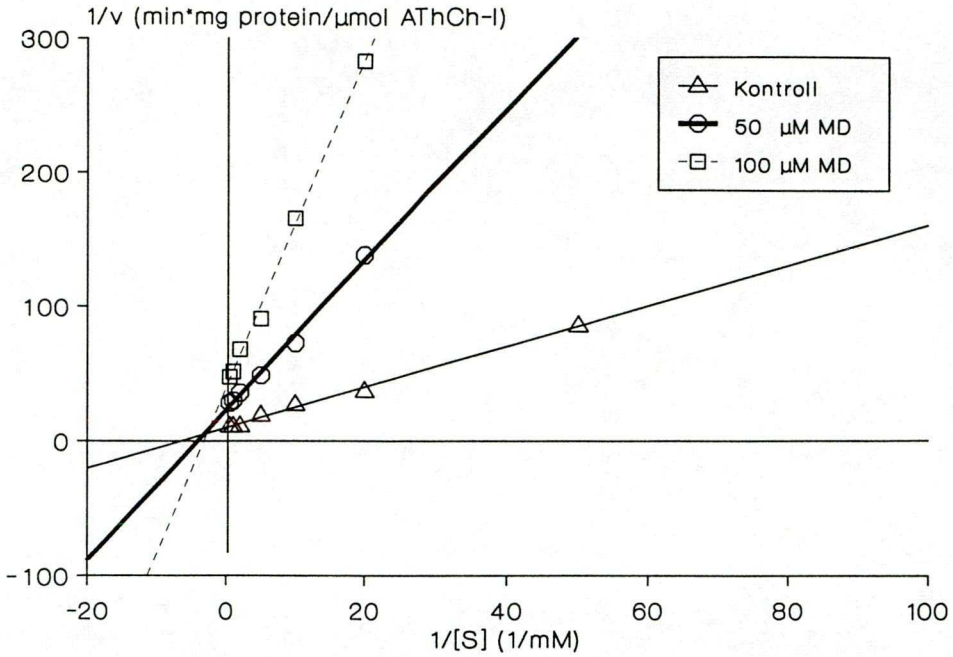
A gátlás típusának megállapításához ugyanazt a módszert alkalmaztuk, mint a DM esetén (13. ábra: Michaelis-Menten kinetika; 14. ábra Lineweaver-Burk-féle linearizálás). A gátlás típusa vegyes (látszólagos értékek: $K_{M(kont.)} = 0.152$ mM; $K_{M(50\,\mu M)} = 0.225$ mM; $K_{M(100\,\mu M)} = 0.308$ mM; $v_{max(kont.)} = 0.100$; $v_{max(50\,\mu M)} = 0.041$; $v_{max(100\,\mu M)} = 0.025$ [μmol AThCh-I/perc/mg protein]). Tehát a MD az enzim-szubsztrát komplex disszociációs állandóját növeli és az enzimreakció maximális sebességének értékét csökkenti. Ez összhangban van a szerves foszforsavészterek ismert hatásmechanizmusával, mely szerint ezen vegyületek az AChE anionkötő és észteráz helyéhez is kapcsolódnak, és az enzim reaktív szeril oldalláncának foszforilációját okozzák (Moretto és Johnson, 1987).



13. ábra Az agy AChE Michaelis-Menten kinetikája gátlószer nélkül illetve 50 és 100 μM koncentrációjú MD esetén

Megjegyzés. A reakcióelegy a következő volt: 0.01 ml agyból készült homogenát felülúszója + 2.00 ml 52 mM foszfát puffer (pH=7.2) + 0.44 ml MD oldat + 0.05 ml AThCh-I (0.1 mM). Inkubációs idő: 10 perc

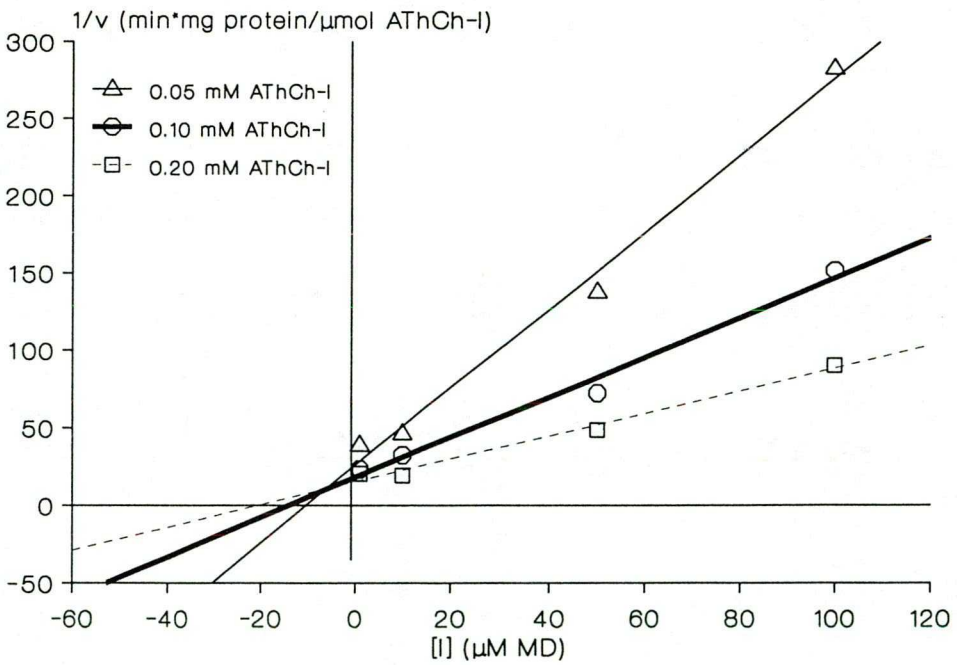
A kísérletsorozat eredményeit összefoglalva elmondhatjuk, hogy a MD nagy hatékonyságú AChE-t gátló szer. Rövid időn belül jelentősen csökkenti az enzim aktivitását. Nagyobb (200 μM feletti) koncentrációval közel 100%-os gátlás is elérhető, de már alacsony koncentrációnál is jelentősen blokkolja az enzim aktivitását. A kimért gátlási típus összhangban van azzal az irodalmi adattal, hogy a MD specifikus gátlószere az AChE-nak (Gage, 1955; Coppage és Braidech, 1976).



14. ábra Lineweaver-Burk-féle linearizálás

Megjegyzés. A reakcióelegy a következő volt: 0.01 ml agyból készült homogenát felülúszója + 2.00 ml 52 mM foszfát puffer (pH=7.2) + 0.44 ml MD oldat + 0.05 ml AThCh-I (0.1 mM). Inkubációs idő: 10 perc

A gátlási állandót ez esetben is Dixon módszerével határoztuk meg (15.ábra).



15. ábra A K_I meghatározása Dixon módszerével 0.05, 0.10 és 0.20 mM szubsztrát koncentrációt alkalmazva

Megjegyzés. A reakcióelegy a következő volt: 0.01 ml agyból készült homogenát felülúszója + 2.00 ml 52 mM foszfát puffer (pH=7.2) + 0.44 ml MD oldat + 0.05 ml AThCh-I (0.1 mM). Inkubációs idő: 10 perc

A K_I értéke 5.97 μM-nak adódott. Tehát ebben a koncentrációban okoz 50%-os gátlást a MD. Ez az alacsony érték jól mutatja a MD gátlásának hatékonyságát.

Az általunk végzett kísérletekből egyértelműen látszik, hogy mindkét inszekticid alacsony koncentrációban (μM tartományban) 50%-os szubsztrát gátlást okoz. Hatékonyságukat a kinetikai vizsgálatok megerősítették, a DM és a MD időbeni lefutása egy gyors lefutású görbével volt jellemezhető. A két szer gátlási típusa egyaránt vegyes volt, bár hatásmechanizmusuk valószínűleg eltérő (Moretto és Johnson, 1987). Hatékonyságbeli különbséget a K_I értékek meghatározásával tudtunk kimutatni, amit Dixon-módszerével adtunk meg. Nagyobb hatékonyság volt jellemző a MD-ra, ezt a kisebb K_I érték jelezte. Az eltérő hatás a két inszekticid különböző szerkezetéből fakadhat.

5.2 AChE és BChE biokémiai jellemzése ponty szerveiben

Az AChE aktivitás az agyban 79.460 ± 2.590, a szívben 47.840 ± 21.390, a vázizomban 25.290 ± 7.440, a májban 8.826 ± 0.704, a szérumban pedig 1.960 ± 0.190 mU/mg fehérjének adódott. A membránkötött és a sóval leoldható (szolubilis) AChE formák mennyisége között nem volt különbség a 0.4 M és 1.0 M NaCl-ot tartalmazó homogenizálók esetében (1. táblázat). Ebből arra lehet következtetni, hogy ponty esetében már a kisebb NaCl koncentráció is elégséges ionerősséget tud biztosítani a különböző formák extrakciójához, ezért a továbbiakban a 0.4 M NaCl-ot tartalmazó homogenizáló oldatokat használtuk. A ponty izom típusú szövet kolinészterázainak extrakciós tulajdonságai nagymértékben hasonlítottak az emlősökben találtakhoz (Munoz-Delgado és Vidal, 1987). A membránkötött (detergenssel oldható) AChE aránya a szolubilis AChE-hoz (perifériás fehérjék) képest a szív, vázizom, máj és agy sorrendjében emelkedett (16. ábra). Ez megerősíti azt, hogy az AChE különböző formáinak eltérő az eloszlása a ponty egyes szerveiben (Nemcsók és mtsai, 1990; Szabó és mtsai, 1992), ami utalhat funkcióbeli különbségekre is, ez azonban még nem bizonyított. Az AChE egyes típusainak extrakciós sajátságaihoz két tényt még meg kell említeni. Egyrészt az aszimmetrikus formáknak is két típusa van (Ramírez és mtsai, 1991). Az I. típus (a konvencionális A-formák) gyakorlatilag teljesen leoldható az ionerősség fokozásával (0.4-1.0 M NaCl), míg a II. típus extrakciójához kationkötő kelátok (EDTA, EGTA) jelenléte szükséges, mivel ezek az aszimmetrikus formák egy Ca^{2+}-hídon keresztül kapcsolódnak a membrán felszínéhez (Ramírez és mtsai, 1991). Éppen ezért használtunk kísérleteink során olyan homogenizálót, mely EDTA-t tartalmazott, habár nem tettünk különbséget az aszimmetrikus formák két típusa között, csak arra törekedtünk, hogy lehetőleg minél többet kiextraháljunk a szövetekből. Másrészt meg kell említeni, hogy bizonyos amfifil karakterű globuláris AChE formák, legalábbis részben, detergens nélkül is kinyerhetők, holott ezek szorosan beépültek a membránok struktúrájába (Massoulié és mtsai, 1991). Így ezek a membránkötött formák a sóval oldható frakcióban jelentkeznek, ami befolyásolja a kapott eredményünket. Ezért az a módszer (Rakonczay és mtsai, 1981), amelyet a kötött és a sóval oldható AChE arány meghatározására használtunk, csak bizonyos közelítést tud adni. Kísérletünknek ez a része azt a fő célt szolgálta, hogy meghatározzuk, milyen homogenizáló oldatot használjunk további vizsgálatainkhoz, amivel a lehető legtöbb AChE kinyerhető az adott szövetből.

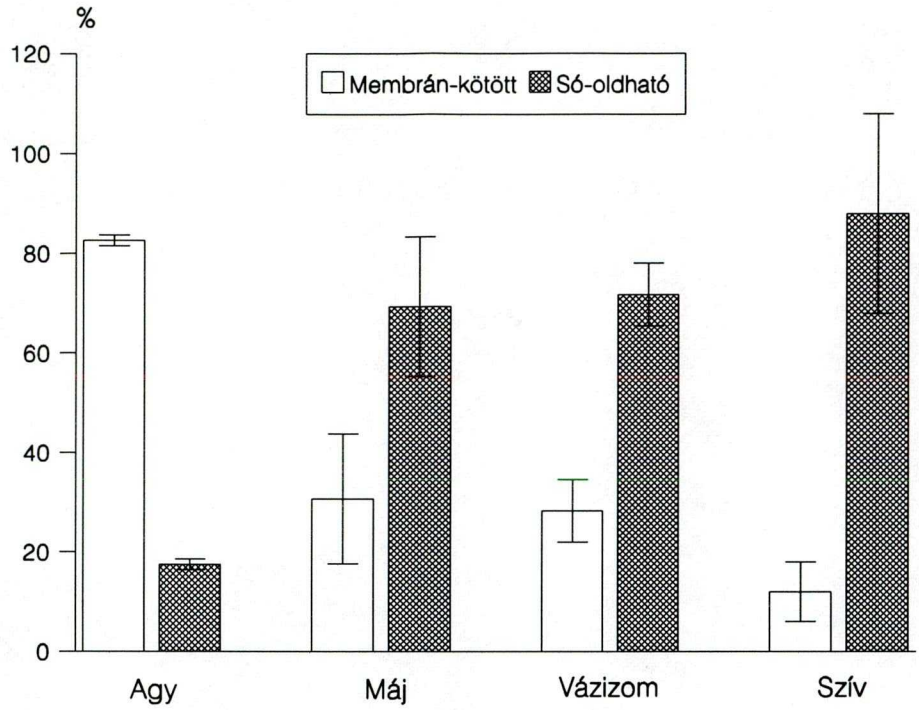
Az elő-, közép- és utóbélből készített homogenátok kolinészteráz tartalma csökkenő tendenciát mutatott, ami ismerve a tápcsatorna beidegzését nem meglepő. Az összkolinészteráz mennyisége a bél kezdeti részétől az anális nyílás felé fokozatosan csökkent (17. ábra). Természetesen a szfinkterek környéke ez alól kivételt képez, mivel erős paraszimpatikus beidegzés alatt áll.

	AChE AKTIVITÁSOK A HOMOGENÁTOK FELÜLÚSZÓIBAN (U/ml)			
	I. hom.	II. hom.	III. hom.	IV. hom.
AGY	2.013 ± 0.276	1.633 ± 0.070	0.352 ± 0.004	0.384 ± 0.035
MÁJ	0.265 ± 0.044	0.251 ± 0.064	0.178 ± 0.050	0.174 ± 0.026
SZÍV	1.045 ± 0.242	0.940 ± 0.182	0.840 ± 0.057	0.827 ± 0.179
VÁZIZOM	0.483 ± 0.029	0.455 ± 0.064	0.388 ± 0.112	0.319 ± 0.052

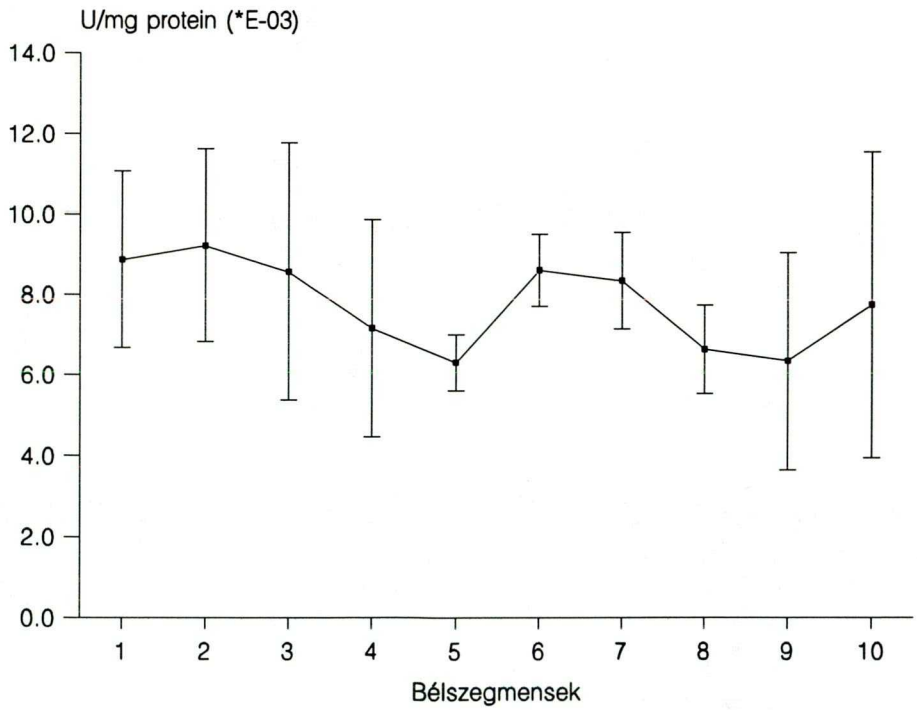
1. táblázat Különböző homogenizáló oldatokkal nyert AChE aktivitások kontroll ponty szöveteiben. I. és II. homogenizáló az összes AChE-ra (detergens- és só-oldható) utal, a III. és IV. azonban csak a só-oldhatóra.
Megjegyzés. **I. hom.**: 12.5 mM foszfát puffer (pH = 7.2) amely tartalmazott 0.67 mg/ml EDTA-t, 0.5% Triton X-100-at és 1 M NaCl-ot; **II. hom.**: 12.5 mM foszfát puffer (pH = 7.2) amely tartalmazott 0.67 mg/ml EDTA-t, 0.5% Triton X-100-at és 0.4 M NaCl-ot; **III. hom.**: 12.5 mM foszfát puffer (pH = 7.2) amely tartalmazott 0.67 mg/ml EDTA-t és 1 M NaCl-ot; **IV. hom.**: 12.5 mM foszfát puffer (pH = 7.2) amely tartalmazott 0.67 mg/ml EDTA-t és 0.4 M NaCl-ot.

	Össz ChE (U/l)	AChE(U/l)	BChE(U/l)	BChE/Össz ChE (%)
ELŐBÉL	205.4 ± 15.6	155.4 ± 18.1	50.0 ± 8.9	24.4
KÖZÉPBÉL	167.2 ± 11.4	112.8 ± 9.7	54.4 ± 6.7	32.5
UTÓBÉL	137.3 ± 31.5	107.8 ± 11.2	29.5 ± 7.9	21.5

2. táblázat Kolinészteráz aktivitások megoszlása az elő-, közép- és utóbélben
Megjegyzés. A halakat a mérés előtt 5 illetve 7 napig 12 ± 1 °C-os csapvízben tartottuk. Az AChE és BChE aktivitásokat U/l homogenátban (±S.D.) adtuk meg. Az AChE mérésénél 10^{-5} M ethopropazint, BChE mérésnél 10^{-5} M BW 284 C51 specifikus AChE gátlószert használtunk. Összkolinészteráz mérésnél nem alkalmaztunk semmiféle inhibitort. A BChE mennyiségét egyrészt kiszámoltuk az összkolinészteráz és az AChE aktivitások különbségeként (lásd táblázat), másrészt közvetlenül BW 284 C51-t alkalmazva. A kapott eredmények között nem volt szignifikáns különbség, így a táblázat csak az előbbi módon megadott BChE aktivitásértékeket tartalmazza. Szubsztrátként minden esetben acetiltiokolin-jodidot használtunk Ellman és mtsai (1961) szerint.



16. ábra Szolubilis és membránkötött AChE megoszlása ponty különböző szerveiben
Megjegyzés. Az adatok 4-6 egyedből származó mérések átlagait (± S.D.) tartalmazzák.



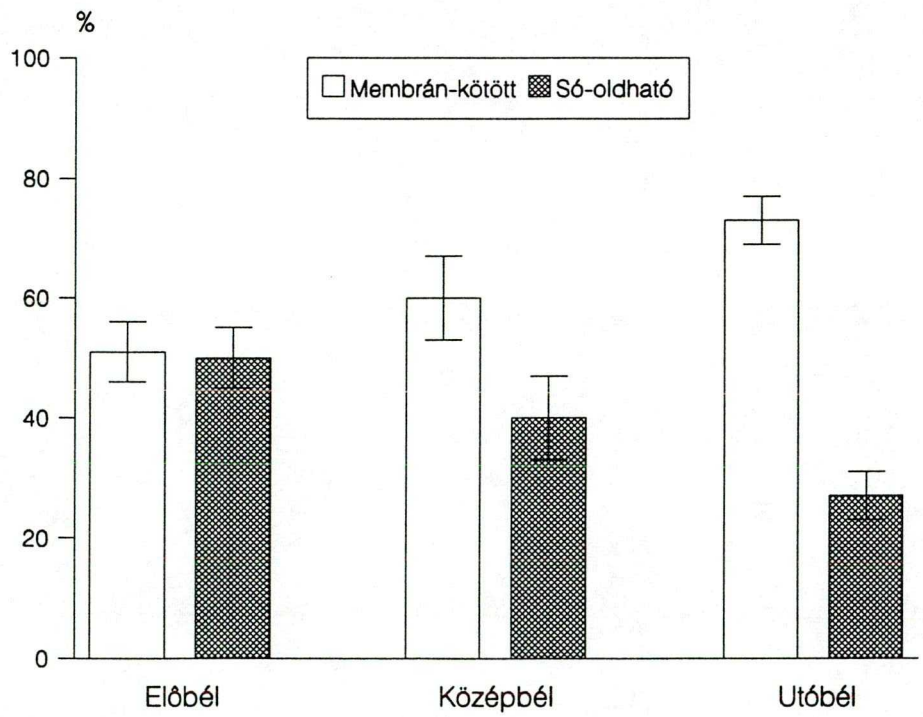
17. ábra Az AChE specifikus aktivitásai (U/mg fehérje) a tápcsatorna különböző szegmenseiben
Megjegyzés. Az adatok 4-6 egyedből származó mérések átlagait (± S.D.) tartalmazzák.

Korábbi irodalmi adatok eléggé ellentmondásosak a kolinészterázok milyenségét illetően. Hazai halakból történt mérésekből tudjuk, hogy a ponty egyes szerveiben nem,

vagy csak minimális mennyiségben találhatunk butirilkolin-észterázt (Szabó és mtsai, 1992).

Annak eldöntésére, hogy a tápcsatorna BChE vagy AChE enzimeket tartalmaz, specifikus gátlószereket használtunk (Ethopropazint és BW 284 C51-et). Méréseink szerint a specifikus BChE gátlóként ismert ethopropazin hatására mintegy 20-30%-kal csökkent az összkolinészteráz aktivitás (2. táblázat). (10^{-5} M koncentrációban alkalmazva az ethopropazint a BChE enzim aktivitását gátolja, míg az AChE aktivitását gyakorlatilag nem csökkenti.) Ebből arra következtethetünk, hogy ponty belében a BChE szint meglehetősen állandó érték az egyes szegmensekben (21.5-32.5%). Legkevesebb az utóbélben, míg legtöbb a középbélben található.

Ponty belében (elő-, közép-, utó-) Triton X-100-zal készített homogenátban a mérhető sóval oldható kolinészteráz szignifikánsan kisebb volt, mint a kötött enzim mennyisége (18. ábra). A tápcsatornában előre haladva, a közép- és utóbélben a membránkötött AChE mennyisége nőtt. Ez magyarázható azzal, hogy ennek az enzimnek az élettani szerepe, jelentősége változik a különböző szakaszokban.



18. ábra Kötött és szolubilis kolinészterázok aránya a tápcsatorna mentén

Megjegyzés. Az adatok 4-6 egyedből származó mérések átlagait (± S.D.) tartalmazzák.

5.3 A kolinészterázok molekuláris formáinak eloszlása ponty szerveiben

Az ismert AChE molekuláris formák közül a G_1 (4S), G_4 és A_4 (10S) és A_{12} (16S) típusokat tudtuk kimutatni a ponty agyában, májában, szívében, tápcsatornájában, vázizmában és a vérében. Ezek közül a G_1 és a szérum G_4 citoplazmatikusan szabad, az

aszimmetrikus formák sóval (és EDTA-val) oldhatók, míg a G_4-es forma (a szérum kivételével) a membránkötött enzimet reprezentálja.

Nagymennyiségű A_{12}-es formát (9-58%) találtunk az összes vizsgált szövetben (19-26. ábra, 3-4. táblázat), kivéve a vérszérumot (23. ábra), ahol nem fordult elő detektálható mennyiségben. Ez magas arány az emlős agy 1-2%-os tartalmához képest (Nyquist-Battie és mtsai, 1989). A szív valószínűleg A_4-es formát is tartalmazott, hiszen a szív AChE elsősorban só-oldható (1. táblázat, 16. ábra), így a 10S csúcs kevésbé reprezentálja a G_4-es formát. Az aszimmetrikus formák magas előfordulási aránya egyrészt magyarázható azzal, hogy általában az izom típusú szövetekben fordulnak elő nagy mennyiségben (Chatonnet és Lockridge, 1989); másrészről ismert, hogy a filogenetikailag korán megjelenő fajokban nagy mennyiségben mutatható ki az A_{12}-es szerkezetű enzim (Rodriquez-Borrajo és mtsai, 1982).

	AChE MOLEKULÁRIS FORMÁK (%)		
	G_1	G_4 ÉS/VAGY A_4	A_{12}
AGY	7.1 ± 4.4	83.7 ± 5.9	9.2 ±3.8
MÁJ	12.3 ± 3.1	77.3 ± 4.5	10.4 ± 3.7
SZÍV	-	42.0 ± 2.0	58.0 ± 2.5
VÁZIZOM	-	84.5 ± 2.7	15.5 ± 2.8
SZÉRUM	17.9 ± 4.5	82.1 ± 3.9	-
ELŐBÉL	32.3 ± 5.0	51.1 ± 8.6	16.6 ± 3.1
KÖZÉPBÉL	19.1 ± 3.3	64.0 ± 10.4	16.9 ± 2.1
UTÓBÉL	12.7 ± 1.7	74.1 ± 9.3	13.2 ± 1.2

3. táblázat AChE molekuláris formáinak megoszlása kontroll ponty különböző szerveiben

Megjegyzés. A halakat a mérés előtt 5 illetve 7 napig 12 ± 1 °C-os csapvízben tartottuk. Az értékeket az össz AChE mennyiség százalékában adtuk meg, és 4-6 halból származó mérés átlagát mutatják (±S.D.).

Mivel a halak a gerinces állatok egyik legalacsonyabb törzsfejlődési szintjén álló osztálya, ennek következménye lehet az A_{12}-es molekuláris forma relatíve magas aránya a többi,

fejlettebb szinten álló gerinceshez viszonyítva (Nemcsók és mtsai, 1990). Ennek oka azonban mindeddig még nem ismert.

Az agyban, a májban és a szérumban dominánsan a G_4-es forma mutatható ki (19., 22. és 23. ábra), míg a G_1 tartalom kevesebb (7.1-20%, 3. táblázat). Sem a szívben, sem az izomban monomer AChE-t nem mutattunk ki (20. és 21. ábra).

A tápcsatornában legnagyobb mennyiségben szintén a G_4-es típus fordul elő, mely 51.1-74.1%-át adja az AChE enzim összaktivitásának (3. táblázat). Aránya az anális irányban növekszik, míg a G_1-es formáé csökken. Feltűnő itt is az A_{12}-es forma magas aránya (13.2-16.9%; 3. táblázat, 24-26. ábra).

Kísérleteink szerint a ponty belében található magas BChE szint eltérő a többi szervekétől. (Feltűnő ellentmondás a korábbi adatokhoz képest az, hogy a BChE termelésért elsősorban felelős máj az eddigi vizsgálatok szerint nem, vagy csak minimális mennyiségben tartalmaz BChE-t, ugyanakkor a bélben az enzim magas aktivitását mértük.)

	BChE MOLEKULÁRIS FORMÁK (%)		
	G_1	G_4 ÉS/VAGY A_4	A_{12}
ELŐBÉL	33.8 ± 5.9	49.7 ± 11.2	16.5 ± 3.4
KÖZÉPBÉL	27.6 ± 4.1	49.2 ± 7.3	23.2 ± 6.1
UTÓBÉL	9.9 ± 1.6	68.4 ± 7.6	23.2 ± 2.3

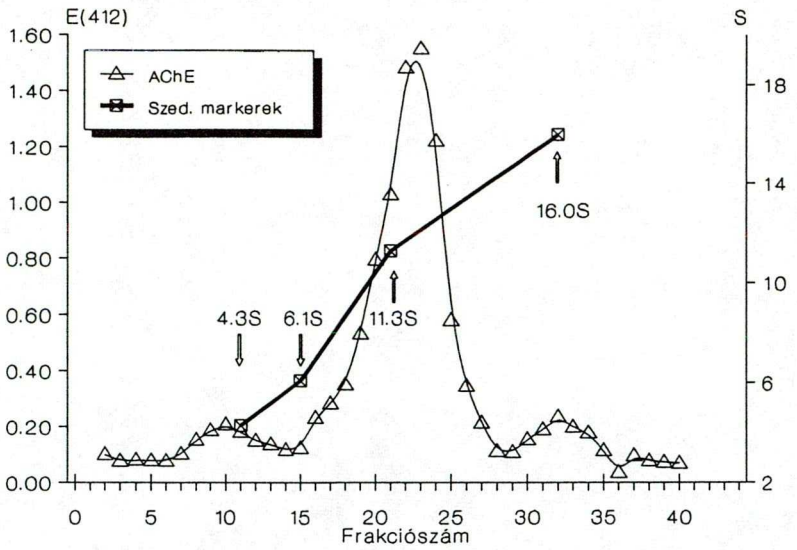
4. táblázat BChE molekuláris formáinak megoszlása kontroll ponty tápcsatornájában

Megjegyzés. A halakat a mérés előtt 1 hétig 12 ± 1 °C-os csapvízben tartottuk. Az értékeket az össz BChE mennyiség százalékában adtuk meg, és 4-6 halból származó mérés átlagát mutatják (±S.D.).

A BChE molekuláris formáinak megoszlása nem tér el jelentősen az AChE-tól (3., 4. táblázat). Legnagyobb a BChE aktivitása a 10 S-hez közeli frakciókban, azonban ez - eltérően az AChE G_4-es formájától - nem változik szignifikánsan a tápcsatorna kezdetétől a végbélnyílás felé haladva, hanem jó közelítéssel állandónak mondható. (24-26. ábra; 3., 4. táblázat) A magas BChE szint magyarázható azzal, hogy ez az enzim a szabad kolin regulátora (Chatonnet és Lockridge, 1989).

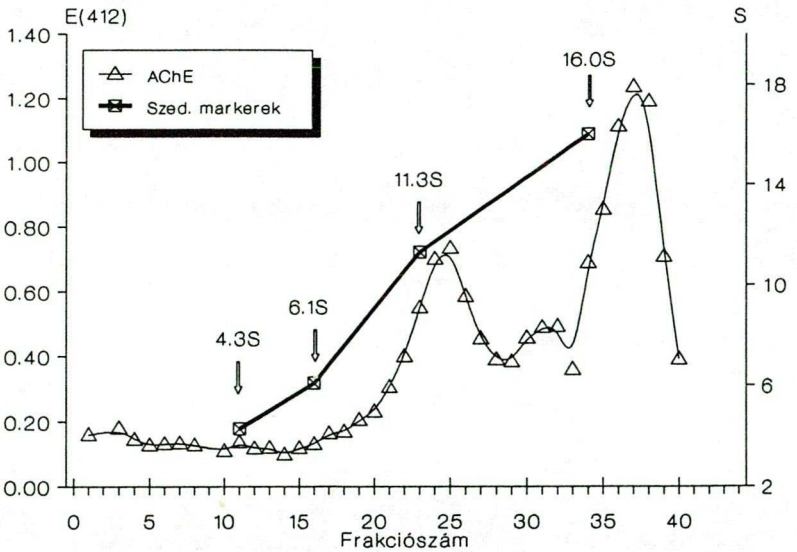
Más feltevés szerint fő szerepe a hidrolizálható kolinerg ágensek alacsony szinten tartása. Ezt alátámasztja, hogy igen gyorsan bontja a BCh-t (sokkal nagyobb hatásfokkal, mint az

ACh-t), mely például a zsíranyagcserében keletkezhet és toxikus hatású. Ezen elmélet szerint évszakos változás követhető a BChE enzim aktivitásában is, mely nyár végére éri el tetőfokát, amikor a zsíranyagcsere a legnagyobb intenzitású.



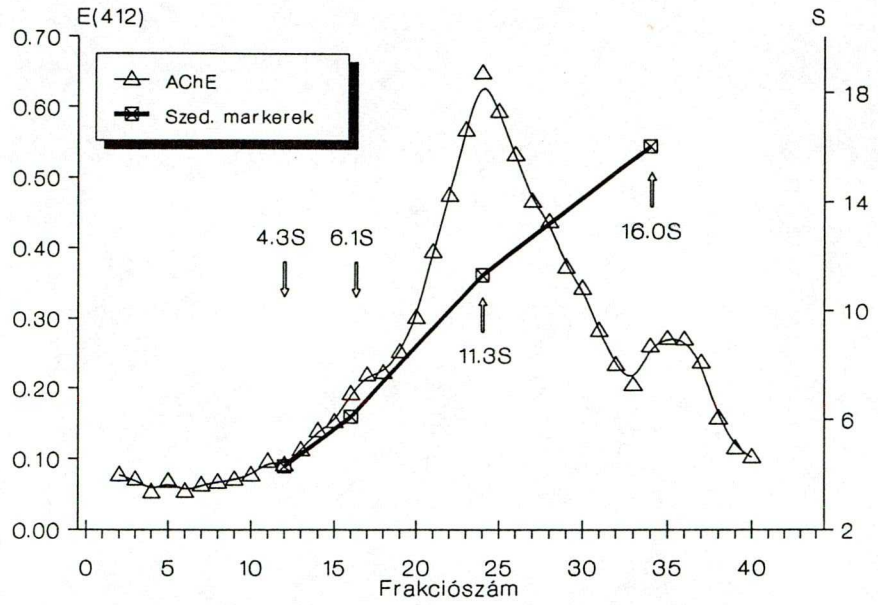
19. ábra AChE molekuláris formák szedimentációs sebességi profilja kontroll ponty agyban

Megjegyzés. A szövetmintákat 12.5 mM nátrium foszfát pufferben (pH = 7.2; 1:4 arányú elegy) homogenizáltuk (Braun 853302/4 típusú potter, 800-1000 min^{-1}, 5 perc, 4 °C), amely 0.4 M NaCl-ot, 0.67 mg/ml EDTA-t és 0.5% Triton X-100-at tartalmazott. Centrifuglás után (16000 rpm, 45 perc, 4 °C, Heraeus Christ Cryofuge Nr. 8730) 200 μl felülúszóban oldottuk fel a marker enzimeket és a BSA-t, 5-20% szaharóz gradiensre rétegeztük, majd 160000 *g*-vel 16 órán keresztül 4 °C-on választottuk szét az egyes molekuláris formákat (Sorval Ultra Pro 80 ultracentrifuga, TH 641 rotor, 36000 rpm). Minden frakcióban vizsgáltuk a kolinészterázok, a marker enzimek (β-galaktozidáz /EC 3.2.1.23/ 16.0S, kataláz /EC 1.11.1.6/ 11.3S és alkalikus foszfatáz /EC 3.1.3.1/ 6.1S/) aktivitását és az összfehérje mennyiséget (BSA 4.3S). A molekuláris formák arányát úgy határoztuk meg, hogy az adott csúcs területét viszonyítottuk az AChE görbe alatti teljes területhez.



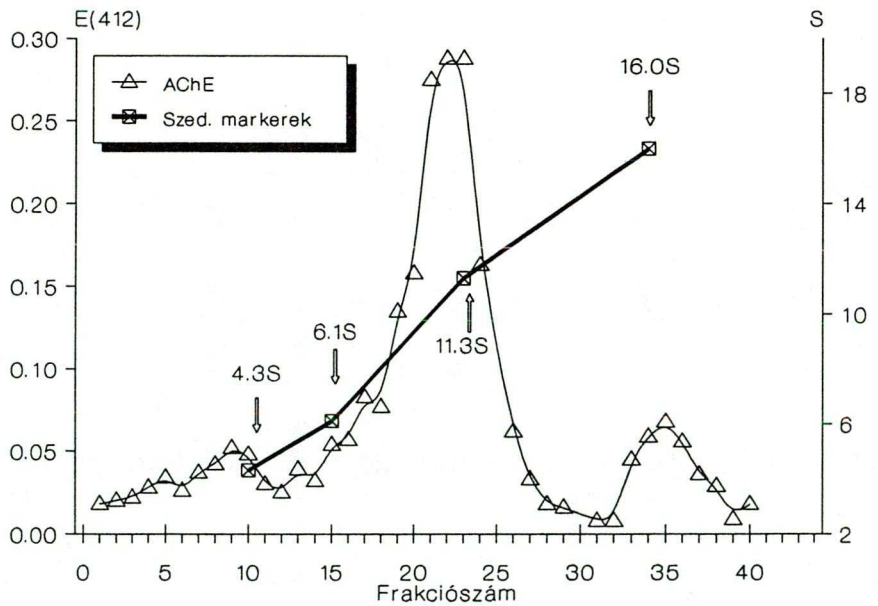
20. ábra AChE molekuláris formák szedimentációs sebességi profilja kontroll ponty szívében

Megjegyzés. A kísérleti körülményeket lásd a 19. ábrán.



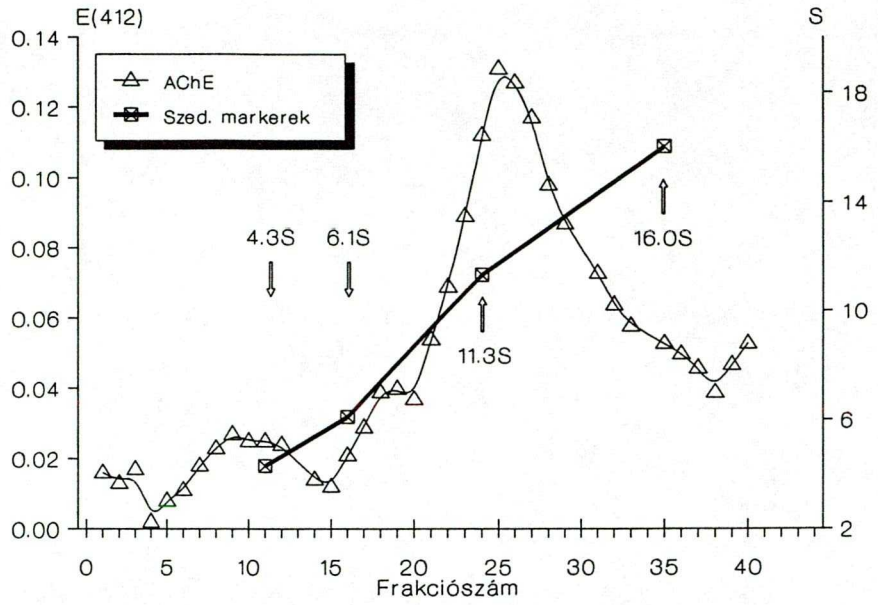
21. ábra AChE molekuláris formák szedimentációs sebességi profilja kontroll ponty izomban

Megjegyzés. A kísérleti körülményeket lásd a 19. ábrán.



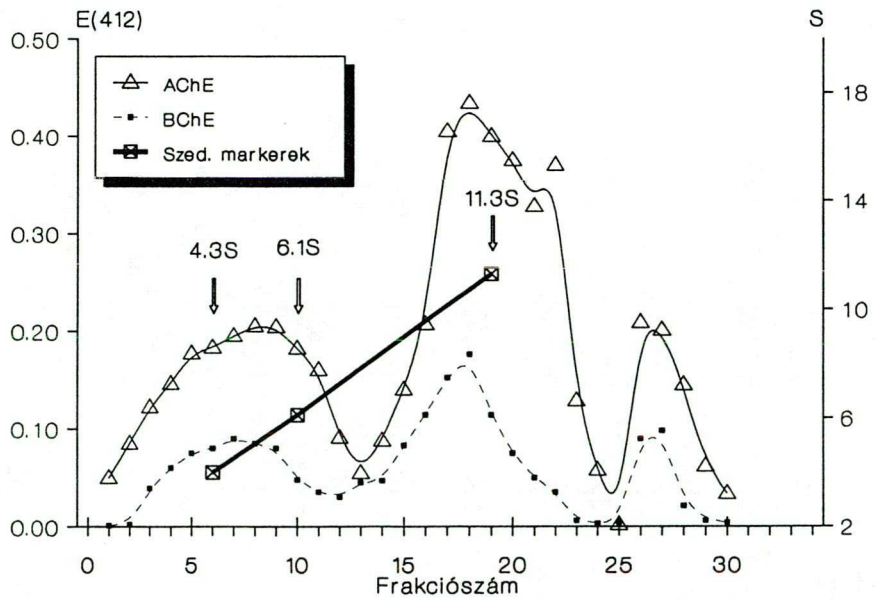
22. ábra AChE molekuláris formák szedimentációs sebességi profilja kontroll ponty májában

Megjegyzés. A kísérleti körülményeket lásd a 19. ábrán.



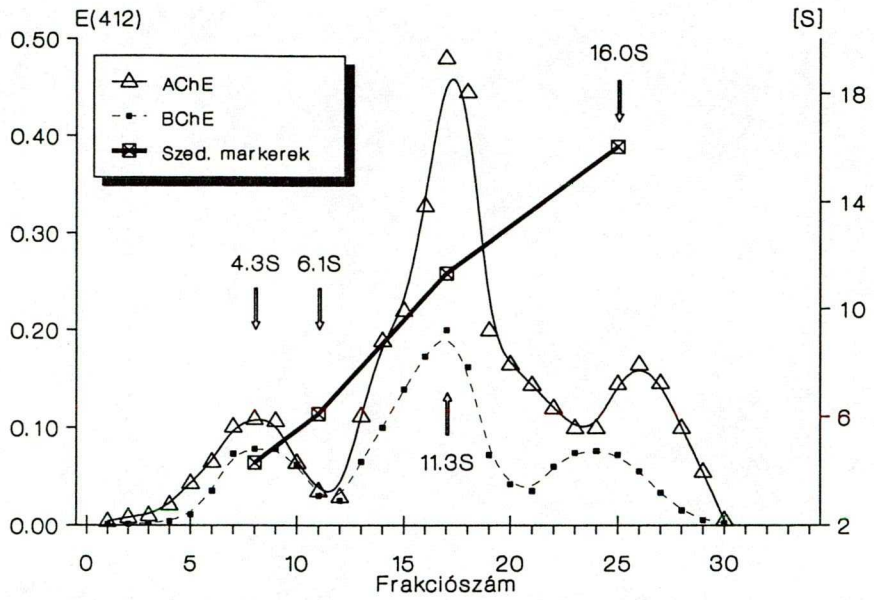
23. ábra AChE molekuláris formák szedimentációs sebességi profilja kontroll ponty szérumban

Megjegyzés. A kísérleti körülményeket lásd a 19. ábrán.



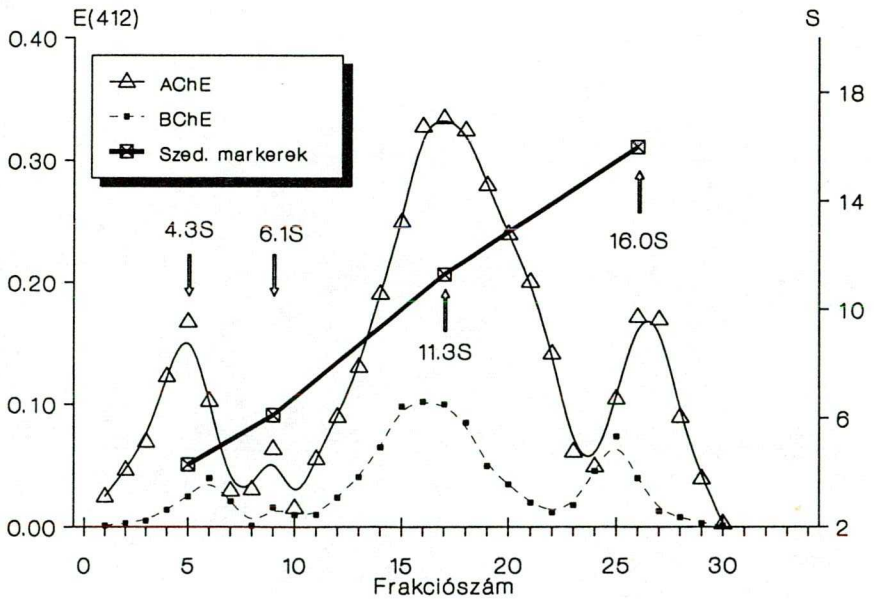
24. ábra AChE és BChE molekuláris formák szedimentációs sebességi profilja kontroll ponty előbelében

Megjegyzés. A kísérleti körülményeket lásd a 19. ábrán. Az AChE és a BChE mérésekor specifikus gátlószereket használtunk.



25. ábra AChE és BChE molekuláris formák szedimentációs sebességi profilja kontroll ponty középbelében

Megjegyzés. A kísérleti körülményeket lásd a 19. ábrán. Az AChE és a BChE mérésekor specifikus gátlószereket használtunk.



26. ábra AChE és BChE molekuláris formák szedimentációs sebességi profilja kontroll ponty utóbelében

Megjegyzés. A kísérleti körülményeket lásd a 19. ábrán. Az AChE és a BChE mérésekor specifikus gátlószereket használtunk.

5.4 A kolinészterázok molekuláris formáinak megoszlása különböző peszticidek hatására ponty szerveiben

Kísérleteinkkel vizsgáltuk az elsődlegesen a Na^+-csatornák működésére ható DM, az acetilkolin-észterázt bénító MD (inszekticidek), a potenciálisan stresszornak tekinthető és szöveti nekrózist kiváltó $CuSO_4$ (fungicid) és PQ (herbicid) hatását a ponty agy, máj, szív, tápcsatorna, vázizom és a vérszérum kolinészterázaira, azok peszticidek indukálta aktivitás és molekuláris forma eloszlás változásaira.

5.4.1 *In vivo* deltamethrin kezelés hatása az AChE molekuláris formáinak megoszlására

A következő kísérletsorozatban azt vizsgáltuk, hogy *in vivo* rendszerben 3 napos 2 μg/l-es DM kezelés milyen hatással van a különböző szervek AChE tartalmának aktivitására 12 ± 1 °C-on. Megállapítottuk, hogy a DM kezelés nem befolyásolta az agyban (20. ábra), az izomban és a májban (21. és 22. ábra) található AChE aktivitását. A szívben a kontroll érték 83%-ára, míg a vérplazmában 78.6 %-ára csökkent az AChE aktivitás értéke (5. táblázat).

	AChE AKTIVITÁS A HOMOGENÁTOKBAN mU/mg fehérje	
	KONTROLL	DM KEZELT
AGY	79.460 ± 2.590	79.190 ± 7.570
SZÍV	47.840 ± 21.390	40.150 ± 19.550
VÁZIZOM	25.290 ± 7.440	28.300 ± 4.330
MÁJ	8.826 ± 0.704	8.535 ± 0.491
VÉRSZÉRUM	1.960 ± 0.190	1.541 ± 0.105*

5. táblázat AChE aktivitások kontroll és 2 μg/l DM-nel 12 ± 1 °C-on 3 napig kezelt halak különböző szerveiben

Megjegyzés. Az AChE aktivitások 4-6 halból származó mérés átlagát (± S.D.) tükrözik (mU/mg fehérje). A kezelt halak értékei szignifikánsan különböznek a kontrolltól (Student *t* teszt, $P < 0.05$), amit a következő szimbólummal jelöltünk: *.

Ismert, hogy a DM, mint minden más II. típusú piretroid, az idegsejtek membránjának ingerelt állapotában jelentősen meghosszabbítja a Na^+-csatornák nyitvatartását, s ezzel ismétlődő impulzusok hosszan elnyúló sorozatát eredményezi a célszervekben, valamint az idegimpulzusok frekvencia függő hanyatlását az idegkötegekben (WHO, 1990). Mivel az idegimpulzus keletkezése és továbbhaladása azonos mechanizmussal történik az egész idegrendszerben, a piretroidok valószínűleg hasonló hatást váltanak ki mind a központi, mind a perifériás idegrendszerben.

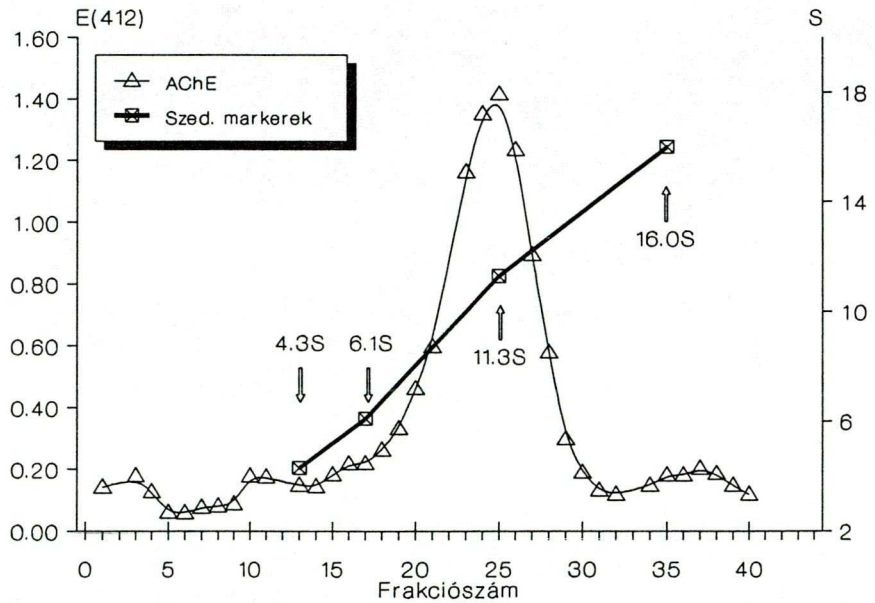
	AChE MOLEKULÁRIS FORMÁK (%)		
	G_1	G_4 ÉS/VAGY A_4	A_{12}
KONTROLL PONTY AGY	7.1 ± 4.4	83.7 ± 5.9	9.2 ± 3.8
DM KEZELT PONTY AGY	7.7 ± 1.1	83.0 ± 1.0	9.3 ± 2.1
KONTROLL PONTY SZÍV	-	42.0 ± 2.0	58.0 ± 2.5
DM KEZELT PONTY SZÍV	-	42.9 ± 3.8	57.1 ± 2.8
KONTROLL PONTY IZOM	-	84.5 ± 2.7	15.5 ± 3.6
DM KEZELT PONTY IZOM	-	77.2 ± 5.9	22.8 ± 5.0
KONTROLL PONTY MÁJ	12.3 ± 3.1	77.3 ± 4.5	10.4 ± 3.7
DM KEZELT PONTY MÁJ	7.0 ± 5.2	86.9 ± 4.7*	6.1 ± 2.18
KONTROLL PONTY SZÉRUM	17.9 ± 4.5	82.1 ± 3.9	-
DM KEZELT PONTY SZÉRUM	12.7 ± 3.4	87.3 ± 5.8	-

6. táblázat AChE molekuláris formák megoszlása kontroll és 2 μg/l DM-nel 12 ± 1 °C-on 3 napig kezelt halak különböző szerveiben
Megjegyzés. Az AChE aktivitások 4-6 halból származó mérések átlagát (± S.D.) tükrözik az össz AChE molekuláris formák százalékában. A kezelt halak értékei szignifikánsan különböznek a kontrolltól (Student *t* teszt, $P < 0.05$), amit a következő szimbólummal jelöltünk: *.

A nátrium ionok áramlásában bekövetkező változások (illetve II. típusú piretroidoknál a klorid ionok áramlásában is) kapcsolódnak egyéb, az idegrendszer más elemeinek a működésével is. A szekretorikus és az enzimatikus tulajdonságokat is befolyásolja a DM.

Így fordulhat elő, hogy a szérum AChE aktivitásában szignifikáns csökkenést tudtunk kimérni. (A hal szérum AChE-t tartalmaz, szemben az emlősök BChE-val, Szabó és mtsai, 1992.) Ez a gátlás azonban nem olyan kifejezett, különösen alacsony hőmérsékleten, mint néhány más rovarírtó szer esetén. Azt azonban meg kell jegyeznünk, hogy a DM LC_{50} koncentrációja ponty esetében mintegy 1000-szer kisebb, mint a szerves foszforsavésztereké, az általunk választott labóratóriumi körülmények között (Szegletes és Nemcsók, 1992).

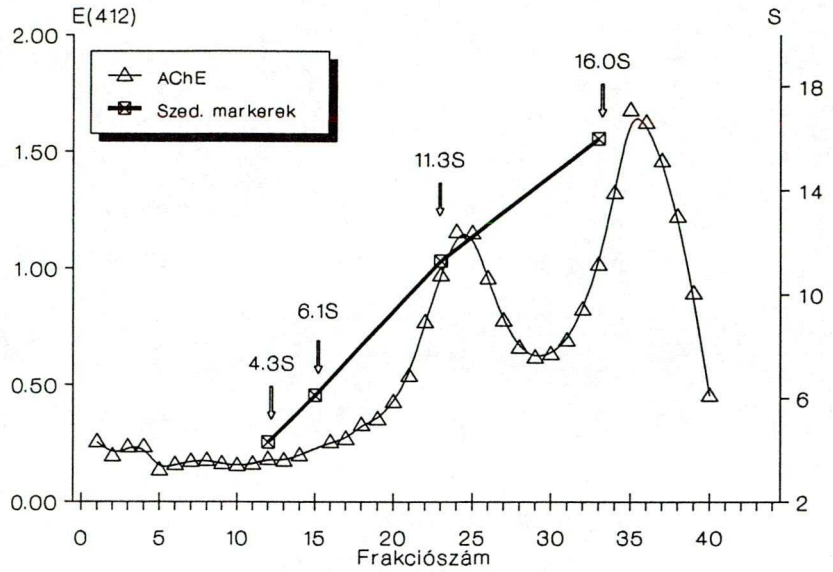
A továbbiakban arra kerestünk választ, hogy a DM kezelés vajon megváltoztatja-e az AChE molekuláris formáinak mintázatát (6. táblázat). Azt tapasztaltuk, hogy a DM nincs hatással az AChE megoszlására az agyban (27. ábra) és a szívben (28. ábra).



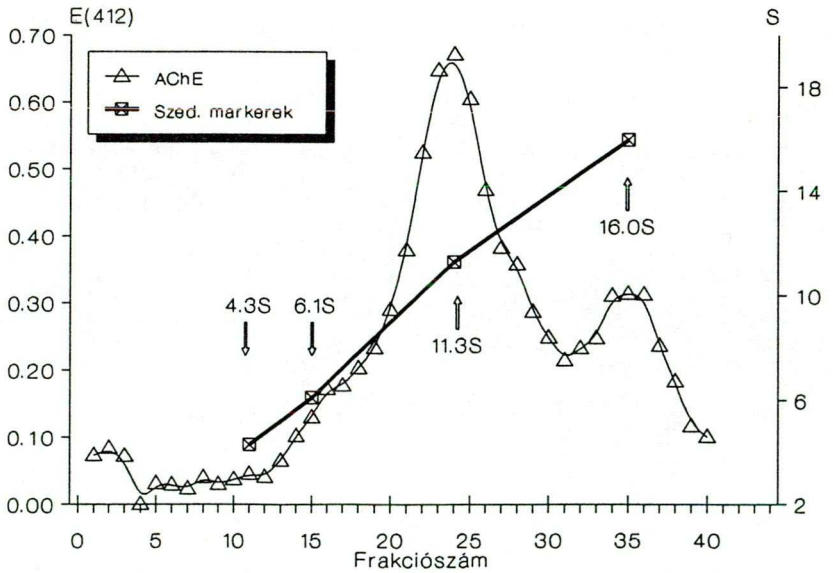
27. ábra AChE molekuláris formák szedimentációs sebességi profilja 2 μg/l DM-nel 12 ± 1 °C-on 3 napig kezelt ponty agyában
Megjegyzés. A kísérleti körülményeket lásd a 19. ábrán.

A májban némileg megnöveli a G_4 forma arányát a G_1 és A_{12} formák rovására (30. ábra). Az izomban egy kicsit az A_{12} forma irányába tolódik el az arány a G_4/A_4 rovására (29. ábra), míg a vérszérumban a G_4-esből lesz több egy kicsivel (31. ábra), bár ez a két utóbbi változás nem szignifikáns. A májban történt kismértékű változás oka feltehetően visszavezethető a DM sejtroncsoló tulajdonságára (Catinot és mtsai, 1989) és az egyes molekuláris formák eltérő lokalizációjára (Berninsone és mtsai, 1989; Volpe és mtsai, 1990). Mindemellett lehetséges, hogy a piretroidok befolyásolják az AChE negyedleges szerkezetében az asszociációs-disszociációs folyamatokat is. Mivel a nagyobb formák levezethetők a G_1-es egységből, ha a DM felborítja a monomerek összekapcsólódása illetve a nehezebb típusok lebomlása közti egyensúlyt, akkor a megoszlási arányokban eltolódások figyelhetők meg.

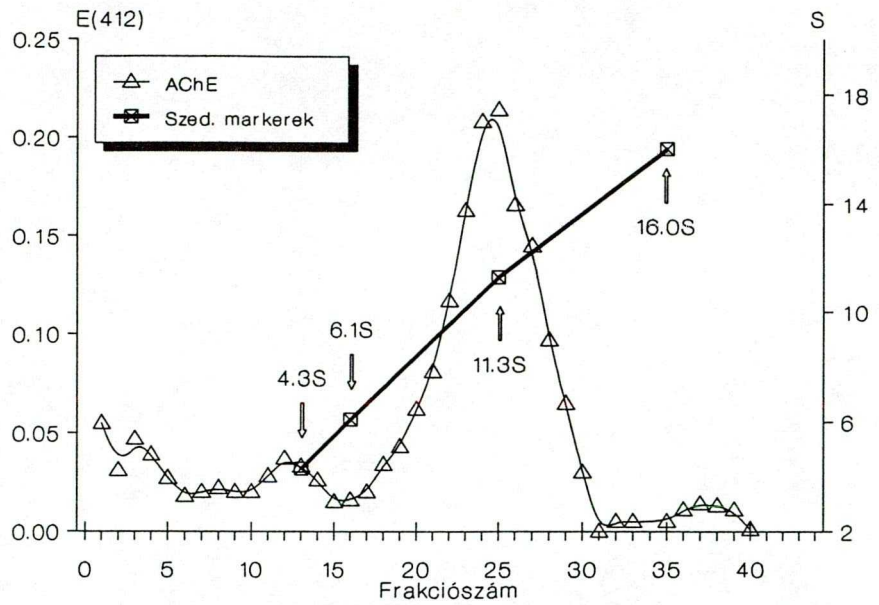
Valószínű, hogy a májnak a méregtelenítő folyamatokban betöltött központi szerepe is közrejátszik abban, hogy sem az agyban, a szívben, a vázizomban, sőt még a szérumban sem figyeltünk meg szignifikáns változást az AChE molekuláris formáinak megoszlásában, holott a vérben AChE aktivitás csökkenést is detektáltunk, míg a májban nem.



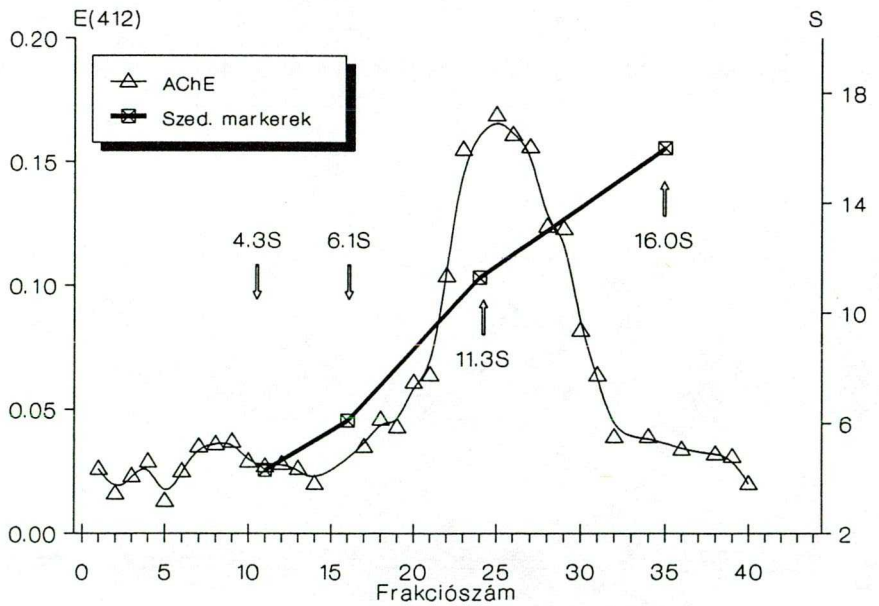
28. ábra AChE molekuláris formák szedimentációs sebességi profilja 2 μg/l DM-nel 12 ± 1 °C-on 3 napig kezelt ponty szívében
Megjegyzés. A kísérleti körülményeket lásd a 19. ábrán.



29. ábra AChE molekuláris formák szedimentációs sebességi profilja 2 μg/l DM-nel 12 ± 1 °C-on 3 napig kezelt ponty vázizmában
Megjegyzés. A kísérleti körülményeket lásd a 19. ábrán.



30. ábra AChE molekuláris formák szedimentációs sebességi profilja 2 μg/l DM-nel 12 ± 1 °C-on 3 napig kezelt ponty májában
Megjegyzés. A kísérleti körülményeket lásd a 19. ábrán.



31. ábra AChE molekuláris formák szedimentációs sebességi profilja 2 μg/l DM-nel 12 ± 1 °C-on 3 napig kezelt ponty vérszérumában
Megjegyzés. A kísérleti körülményeket lásd a 19. ábrán.

5.4.2 *In vivo* methidation kezelés hatása az AChE molekuláris formáinak megoszlására

2 mg/l 5 napos MD-os kezelés (12 ± 1 °C) a különböző szervek AChE aktivitását jelentősen gátolta. Az agyban, a szívben és a vérplazmában a kontroll értéknek csak a

7.7%-át, a vázizomban és a májban a 23.5 illetve 25.6%-át találtuk (7. táblázat). A 2 mg/l 7 napos kezelés a bélben is szignifikánsan csökkentette az AChE aktivitását (8. táblázat).

	AChE AKTIVITÁS A HOMOGENÁTOKBAN mU/mg fehérje	
	KONTROLL	MD KEZELT
AGY	79.460 ± 2.590	6.170 ± 0.910*
SZÍV	47.840 ± 21.390	3.720 ± 0.500*
VÁZIZOM	25.290 ± 7.440	5.970 ± 0.670*
MÁJ	8.826 ± 0.704	2.260 ± 0.445*
VÉRSZÉRUM	1.960 ± 0.190	0.149 ± 0.041*

7. táblázat AChE aktivitások kontroll és 2 mg/l MD-nal 12 ± 1 °C-on 5 napig kezelt halak különböző szerveiben

Megjegyzés. Az AChE aktivitások 4-6 halból származó mérés átlagát (± S.D.) tükrözik (mU/mg fehérje). A kezelt halak értékei szignifikánsan különböznek a kontrolltól (Student *t* teszt, $P < 0.01$), amit a következő szimbólummal jelöltünk: *.

	AChE AKTIVITÁS A HOMOGENÁTOKBAN (U/l)		BChE AKTIVITÁS A HOMOGENÁTOKBAN (U/l)	
	KONTROLL	MD KEZELT	KONTROLL	MD KEZELT
ELŐBÉL	155.4 ± 18.1	68.9 ± 5.4*	50.0 ± 8.9	42.7 ± 6.8
KÖZÉPBÉL	112.8 ± 9.7	50.6 ± 9.3*	54.4 ± 6.7	46.8 ± 13.5
UTÓBÉL	107.8 ± 11.2	76.3 ± 12.5*	29.5 ± 7.9	23.1 ± 4.8

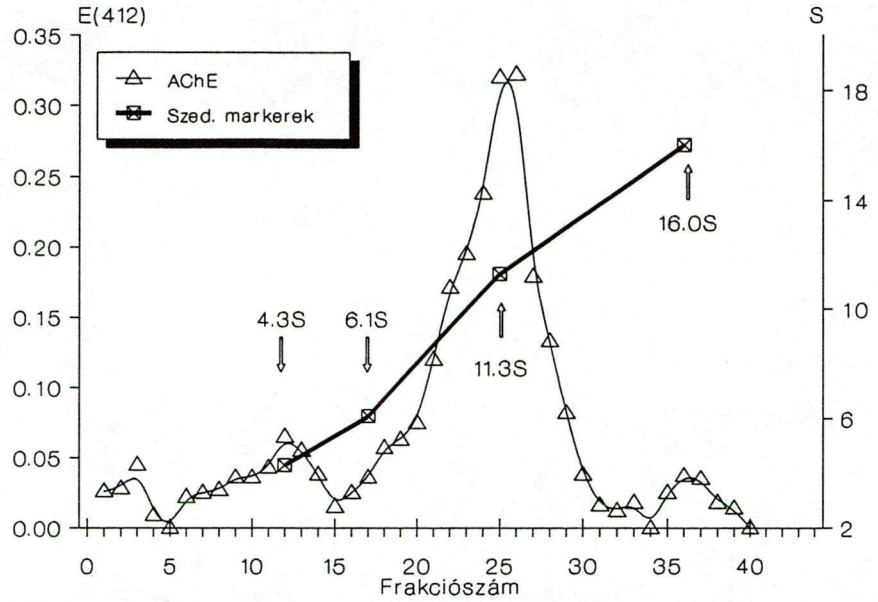
8. táblázat AChE és BChE aktivitások kontroll és 2 mg/l MD-nal 12 ± 1 °C-on 7 napig kezelt halak különböző bélszakaszaiban

Megjegyzés. Az AChE és BChE aktivitások 4-6 halból származó mérés átlagát (± S.D.) tükrözik (U/l). A kezelt halak értékei szignifikánsan különböznek a kontrolltól (Student *t* teszt, $P < 0.05$), amit a következő szimbólummal jelöltünk: *. Az AChE mérésekor 10^{-5} M ethopropazint, a BChE mérésekor 10^{-5} M BW 284 C51 inhibitort használtunk.

Ezek az adatok is azt igazolják, hogy a szerves foszforsavészterek elsődleges hatása a halakban is az AChE bénítása (Gage, 1955; O'Brien, 1960; Coppage és Braidech, 1976; Habig és mtsai, 1986). Különösen veszélyes az AChE gátlása a halak szívében, mivel annak beidegzésében a kolinerg rendszernek jelentős szerepe van (Pennec és Le Bras, 1984). Az AChE gátlás a vagus hatás fokozódásához vezethet, mely súlyos zavarokat okozhat a keringéssel összefüggő élettani folyamatokban. Csökkenhet az O_2 felvétel, ami szöveti szinten anoxiához, végső soron tömeges halpusztuláshoz vezethet (Hughes, 1976). Ezen elváltozások azonban az állatok tiszta vízbe való kerülésével megfordíthatóak, s így a vérkeringés időben normálissá válik elegendő oxigénhez és tápanyaghoz juttatva a sejteket (Asztalos és mtsai, 1988). Másrészt az AChE gátlása a halak egyéb szöveteiben (agy, izom) csökkent mozgásaktivitást eredményez, mind a táplálék megszerzésére irányuló mind a menekülési reakciók során (Post és Leasure, 1974).
Ismert, hogy a methidation *in vivo* körülmények között lényegesen erősebben gátolja az AChE-t, mint *in vitro* (Nemcsók és mtsai, 1988b). Ennek oka az lehet, hogy a metabolizmus során, amint azt növényekben már kimutatták, a vegyületek oxigén analógja képződik, melynek gátló hatása sokkal nagyobb, mint az eredeti vegyületé. A szerves foszforsavészterek gátló hatásának oka az, hogy ezen anyagok kovalens kötésbe lépnek az enzim szeril-OH csoportjával.

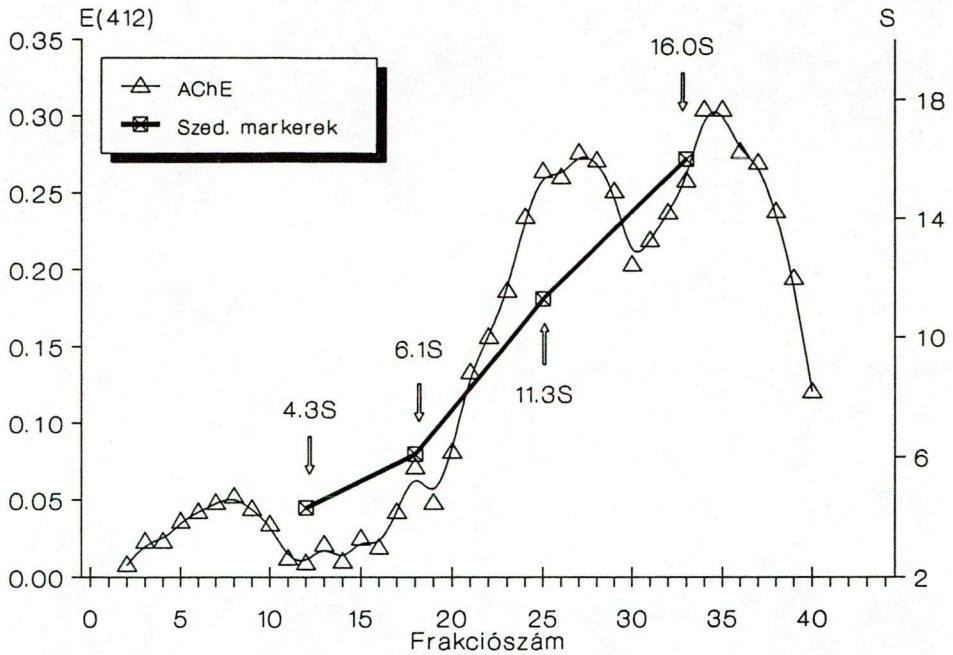
Összehasonlítva korábbi adatokkal (Nemcsók és mtsai, 1990), kísérleteink során viszonylag magas, 2 ppm-es MD koncentráció mellett következett be az AChE gátlása. Ez azzal magyarázható, hogy a halakban előforduló AChE lassabban reagál a gátlószerekkel az emlősökénél (Moss és Fahrney, 1978). A természetes vizekben élő halaknál kisebb koncentrációjú szerves foszforsavészter is tekintélyes AChE gátlást okozhat (Williams és Sova, 1966), mivel a halakban a peszticidek akkumulálódhatnak (Reichenbach-Klinke, 1972). Rágcsálókkal ellentétben, a halak megszakított vagy folyamatos kezelése letális koncentráció alatti antikolinészteráz vegyületekkel kumulatív toxicitást eredményez, mégpedig az AChE gátlás viszonylagos irreverzibilitása miatt (Wallace és Herzberg, 1988).

A MD kezelés némileg megnövelte a G_1 forma arányát az agyban (32. ábra), míg a szívben (33. ábra) és az izomban (34. ábra) a monomer detektálhatóvá vált (9. táblázat). A szívben az A_{12} aránya szignifikánsan csökkent (9. táblázat). A MD nem hatott a szérum AChE molekuláris formáinak mintázatára (36. ábra). Igen komoly változást okozott a májban és a bélben (35. és 37-39 ábrák)! A G_1 formák mennyisége a májban mintegy 4-szeresére nőtt, míg a G_4 mennyisége több mint felére csökkent (35. ábra, 9. táblázat). Minden bélszegmentben a G_1 és A_{12} relatíve mennyisége nőtt, míg a G_4 aránya szignifikánsan ($P < 0.01$) csökkent.

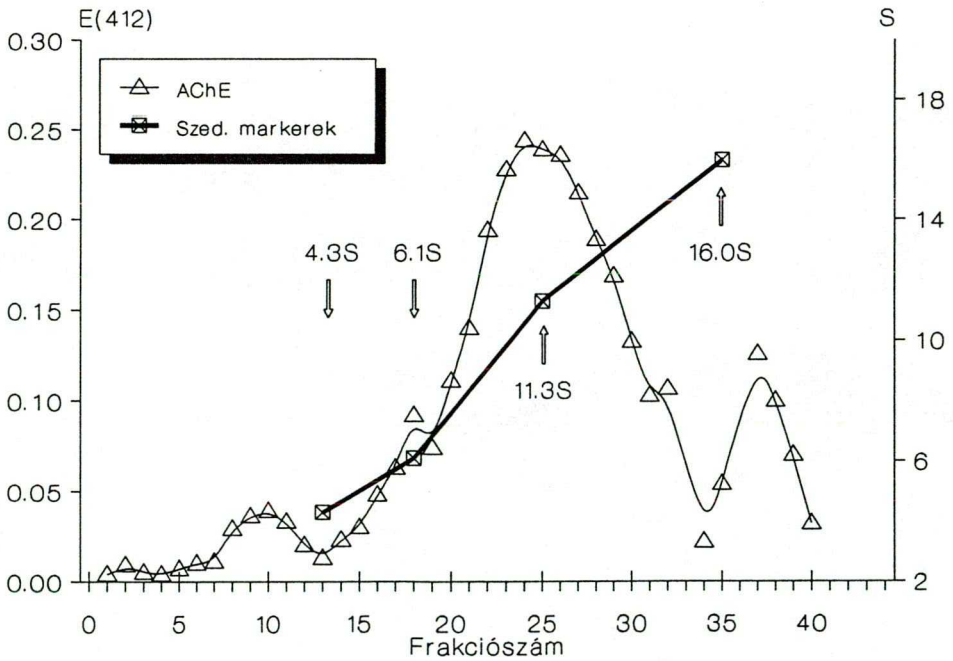


32. ábra AChE molekuláris formák szedimentációs sebességi profilja 2 mg/l MD-nal 12 ± 1 °C-on 5 napig kezelt ponty agyában
Megjegyzés. A kísérleti körülményeket lásd a 19. ábrán.

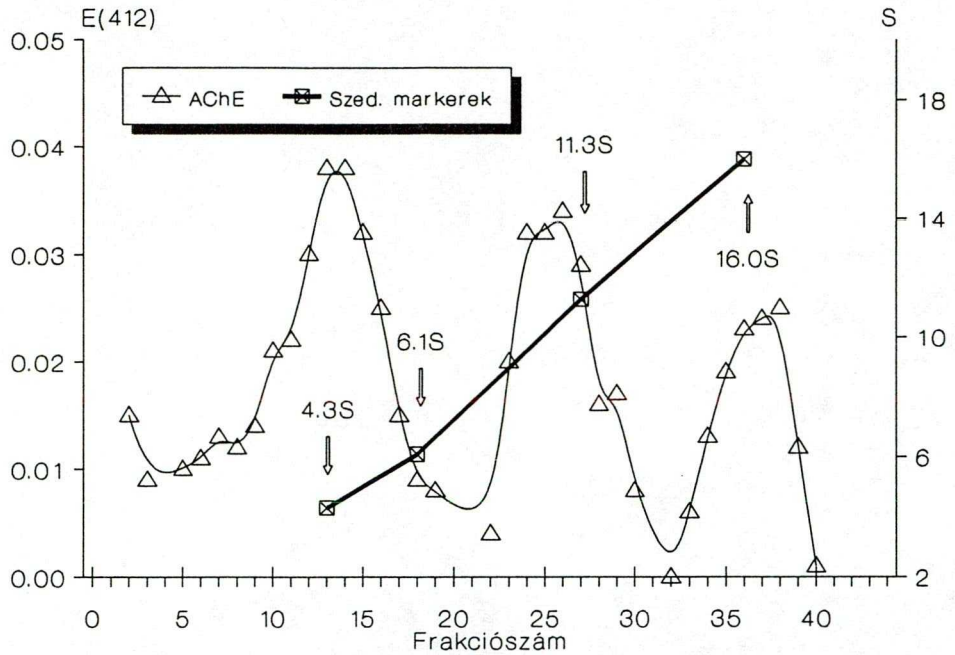
A tápcsatornában a G_1 forma egyedül az előbélben nem változott szignifikánsan (9. táblázat). A megoszlásbeli különbségek több okra is visszavezethetők. A változásokért egyrészt felelősek lehetnek a MD máj és izom típusú szöveteket károsító hatásai (Asztalos és mtsai, 1990; Sket és mtsai, 1991). A morfológiailag kimutatható léziók súlyosságát az izmok inaktivitása mérsékelheti, amit megerősít, hogy hasonló jelenséget figyeltek meg acetilkolin receptor gátlásánál, vagy izom denervációnál. Az eloszlásban mutatkozó különbség másik oka az lehet, hogy az egyes AChE formáknak eltérő a hozzáférhetősége, ami a különböző szubcelluláris elhelyezkedés következménye, és nem valamiféle egyedi érzékenységből fakad (Volpe és mtsai, 1990). Korábbi vizsgálatok szerint a májsejtek plazmamembránja és a Golgi frakció AChE-ban különösen gazdag, így ez alapján azt mondhatjuk, hogy az AChE a májban inkább integrális fehérjeként funkciónál (Berninsone és mtsai, 1989). Ezt méréseink is megerősítették, mert a csak detergenssel oldató G_4 forma aránya magas. Valószínű, hogy a szövetkárosodás együtt jár a membránhoz szorosan kötődő enzimformák bomlásával. Fontos megemlíteni, hogy *in vitro* körülmények között nem találtak különbséget az egyes formák szerves foszforsavészterekkel való reaktivitásai között (Busker és Zijlstra, 1991). Mivel, mint ahogy már említettük, a G_1 formából levezethetők az összetettebb formák, ez utóbbiak bomlása a monomer frakció növekedéséhez vezet. Továbbá valószínű, hogy a MD az AChE *de novo* szintézisét is képes gátolni (Cisson és Wilson, 1977, 1981; Fleming és Grue, 1981; Nemcsók és mtsai, 1990), kezdve a G_1-ből felépülő nagyobb formák létrejöttével. Tehát a MD képes befolyásolni a G_1-es forma átalakulását magasabb asszociáltságú formákká (Busker és Zijlstra, 1991).



33. ábra AChE molekuláris formák szedimentációs sebességi profilja 2 mg/l MD-nal 12 ± 1 °C-on 5 napig kezelt ponty szívében
Megjegyzés. A kísérleti körülményeket lásd a 19. ábrán.



34. ábra AChE molekuláris formák szedimentációs sebességi profilja 2 mg/l MD-nal 12 ± 1 °C-on 5 napig kezelt ponty vázizmában
Megjegyzés. A kísérleti körülményeket lásd a 19. ábrán.



35. ábra AChE molekuláris formák szedimentációs sebességi profilja 2 mg/l MD-nal 12 ± 1 °C-on 5 napig kezelt ponty májában
Megjegyzés. A kísérleti körülményeket lásd a 19. ábrán.

A MD BChE-ra gyakorolt hatása eltér az AChE-tól. Ezen enzim aktivitása nem változott jelentősen a kezelt állatok belében a kontrollokban mértekhez képest (8. táblázat), bár a molekuláris formák eloszlása kismértékű változást mutat (10. táblázat). A 4S-hez közeli frakciók BChE aktivitása emelkedett a 10S-es és a 16S-es frakciókhoz képest, bár ez nem olyan kifejezett, mint az AChE estében. Ez adódhat az aktív centrumok eltérő felépítéséből, hiszen a BChE az ACh-t alacsonyabb hatékonysággal hidrolizálja, mint az AChE, ugyanakkor képes a BCh hasítására.

Ez a kulcs-zár teória értelmében jelentheti azt, hogy a nagyobb térkitöltésű butiril csoport is elfér az aktív centrumban, vagyis az enzim képes sztérikusan egy 4 szénatomos oldallánc " befogadására " is. Ismert, hogy a szerves foszforsavészterek azért képesek oly nagy hatékonysággal blokkolni az AChE aktivitását, mert pontosan beilleszkednek, és irreverzibilisen bekötődnek az enzim aktív centrumának kötő és katalitikus helyére. Ez a sztérikus megfelelés a BChE esetében azonban már nem feltételezhető. Valószínű, hogy a nem azonos téralkattal és a szeril-OH csoportok számával függ össze a MD eltérő hatása.

Kísérleteinket 12 ± 1 °C-os vízű akváriumokban tartott halakkal végeztük. Ismert, hogy magasabb hőmérsékleten a halak - poikiloterm állatok révén - alapanyagcseréje, így vízből történő peszticid akkumulációja és az ezt követő metabolizmusa is intenzívebb (Nemcsók és mtsai, 1990). Az, hogy viszonylag alacsonyabb hőmérsékleten végzett kísérleteinkben is jelentős gátlás volt tapasztalható (7. és 8. táblázat), jelzi ezen inszekticid veszélyességét.

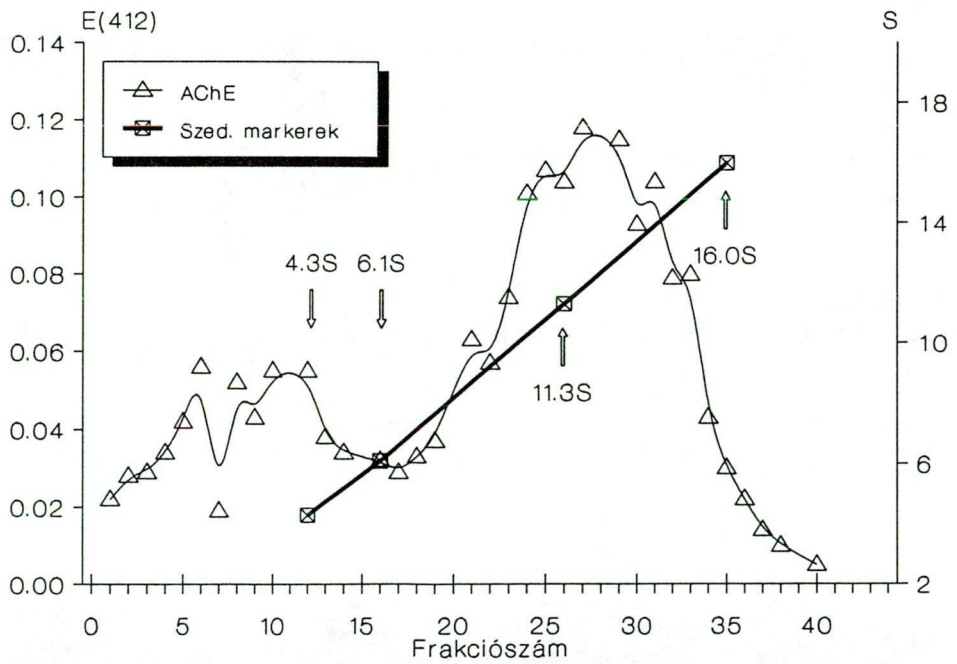
	AChE MOLEKULÁRIS FORMÁK (%)		
	G_1	G_4 ÉS/VAGY A_4	A_{12}
KONTROLL PONTY AGY	7.1 ± 4.4	83.7 ± 5.9	9.2 ± 3.8
MD KEZELT PONTY AGY	13.8 ± 1.3*	80.0 ± 1.1	6.2 ± 1.3
KONTROLL PONTY SZÍV	-	42.0 ± 2.0	58.0 ± 2.5
MD-KEZELT PONTY SZÍV	8.7 ± 0.4	46.7 ± 6.7	44.6 ± 4.8*
KONTROLL PONTY IZOM	-	84.5 ± 2.7	15.5 ± 3.6
MD-KEZELT PONTY IZOM	4.2 ± 1.0	82.7 ± 2.3	13.1 ± 0.7
KONTROLL PONTY MÁJ	12.3 ± 3.1	77.3 ± 4.5	10.4 ± 3.7
MD KEZELT PONTY MÁJ	46.9 ± 6.0*	33.6 ± 3.1**	19.5 ± 2.9*
KONTROLL PONTY SZÉRUM	17.9 ± 4.5	82.1 ± 3.9	-
MD KEZELT PONTY SZÉRUM	15.4 ± 7.3	84.6 ± 7.1	-
KONTROLL PONTY ELŐBÉL	32.3 ± 5.0	51.1 ± 8.6	16.6 ± 3.1
MD KEZELT PONTY ELŐBÉL	43.3 ± 6.3	33.4 ± 9.6*	23.3 ± 0.7*
KONTROLL PONTY KÖZÉPBÉL	19.1 ± 3.3	64.0 ± 10.4	16.9 ± 2.1
MD KEZELT PONTY KÖZÉPBÉL	25.8 ± 2.6*	31.0 ± 3.6**	43.2 ± 5.8**
KONTROLL PONTY UTÓBÉL	12.7 ± 1.7	74.1 ± 9.3	13.2 ± 1.2
MD KEZELT PONTY UTÓBÉL	35.5 ± 3.5**	28.7 ± 6.1**	35.8 ± 3.2**

9. táblázat AChE molekuláris formák megoszlása kontroll és 2 mg/l MD-nal 12 ± 1 °C-on 5 (bélnél 7) napig kezelt halak különböző szerveiben

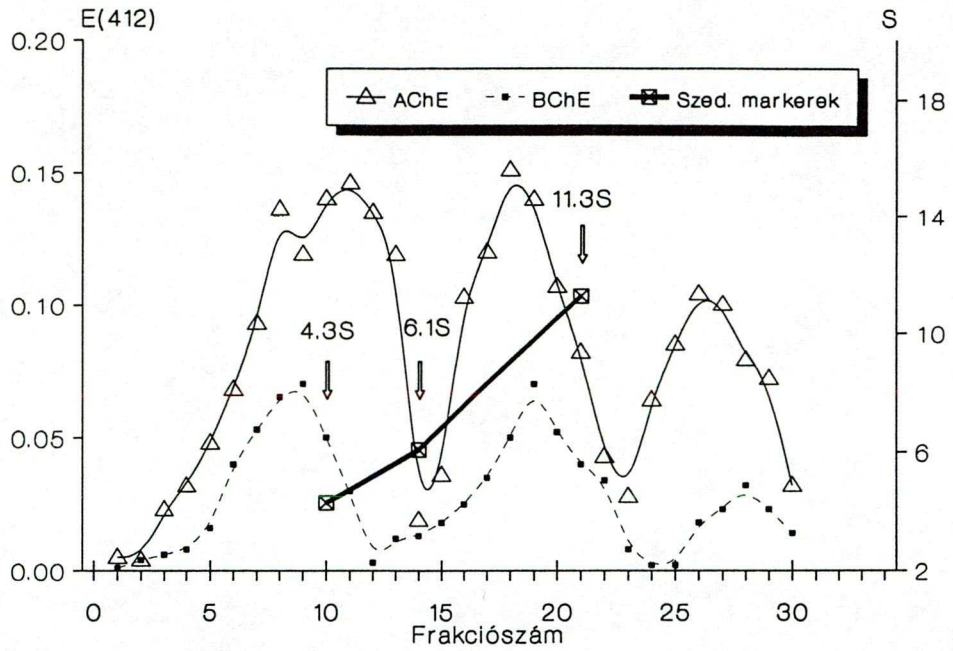
Megjegyzés. Az AChE aktivitások 4-6 halból származó mérések átlagát (± S.D.) tükrözik az össz AChE molekuláris formák százalékában. A kezelt halak értékei szignifikánsan különböznek a kontrolltól (Student *t* teszt, *P < 0.05, **P < 0.01), amit a következő szimbólumokkal jelöltünk:* és **.

	BChE MOLEKULÁRIS FORMÁK (%)		
	G_1	G_4 ÉS/VAGY A_4	A_{12}
KONTROLL PONTY ELŐBÉL	33.8 ± 5.9	49.7 ± 11.2	16.5 ± 3.4
MD KEZELT PONTY ELŐBÉL	46.6 ± 6.4*	41.5 ± 5.6	11.9 ± 3.5
KONTROLL PONTY KÖZÉPBÉL	27.6 ± 4.1	49.2 ± 7.3	23.2 ± 6.1
MD KEZELT PONTY KÖZÉPBÉL	12.2 ± 5.6	64.5 ± 9.4	23.3 ± 2.6
KONTROLL PONTY UTÓBÉL	9.9 ± 1.6	68.4 ± 7.6	23.2 ± 2.3
MD KEZELT PONTY UTÓBÉL	17.5 ± 4.4*	41.5 ± 6.5*	41.0 ± 8.2*

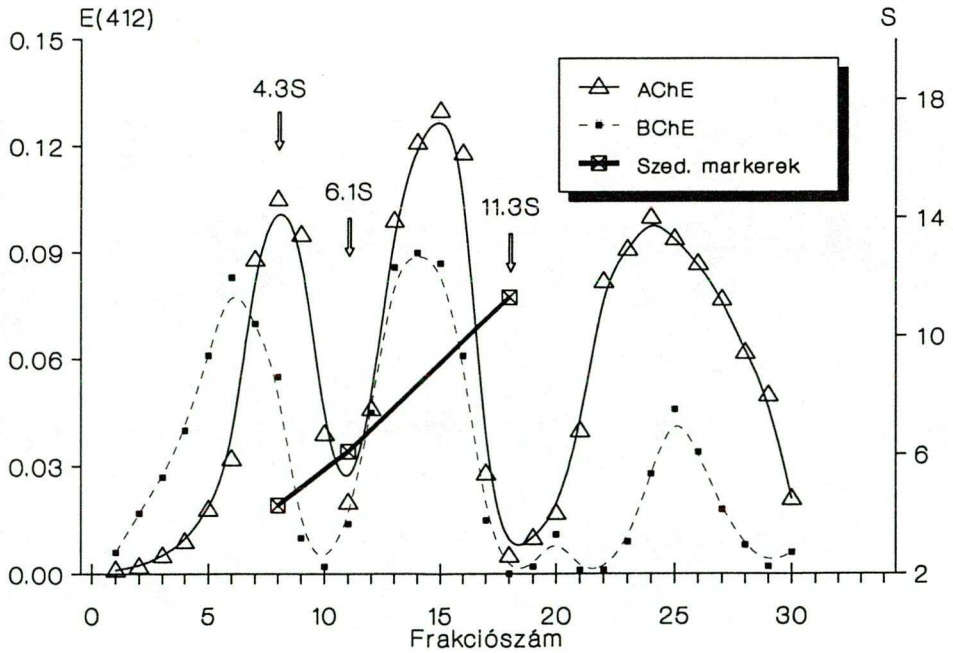
10. táblázat BChE molekuláris formák megoszlása kontroll és 2 mg/l MD-nal 12 ± 1 °C-on 7 napig kezelt halak tápcsatornájában
Megjegyzés. Az AChE aktivitások 4-6 halból származó mérés átlagát (± S.D.) tükrözik az össz AChE molekuláris formák százalékában. A kezelt halak értékei szignifikánsan különböznek a kontrolltól (Student *t* teszt, $P < 0.05$), amit a következő szimbólummal jelöltünk: *. Az AChE aktivitás mérésekor 10^{-5} M ethopropazint, míg a BChE mérésekor 10^{-5} M BW 284 C51 oldatot alkalmaztunk.



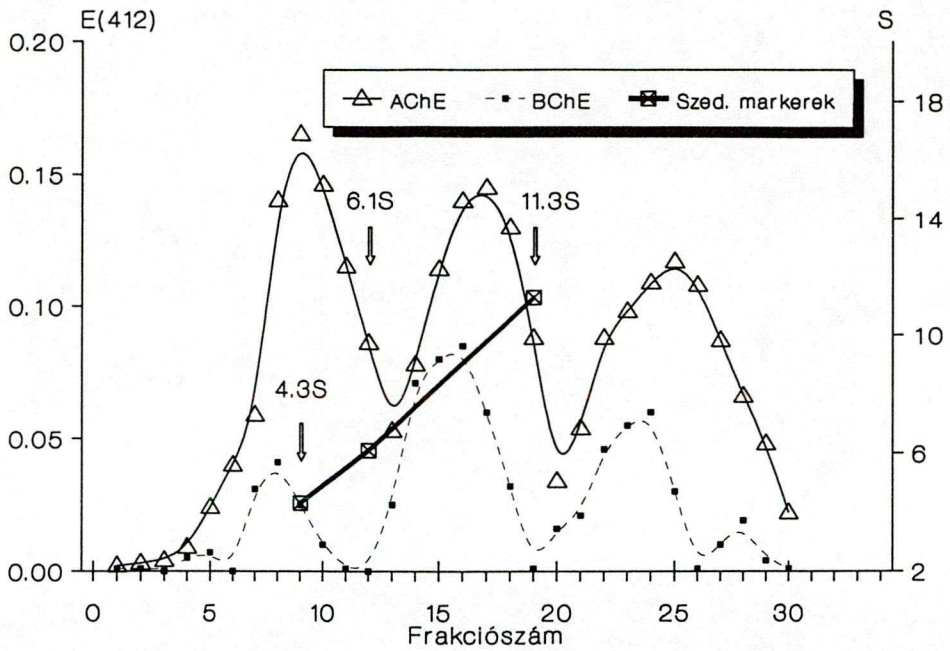
36. ábra AChE molekuláris formák szedimentációs sebességi profilja 2 mg/l MD-nal 12 ± 1 °C-on 5 napig kezelt ponty vérszérumában
Megjegyzés. A kísérleti körülményeket lásd 19. ábrán.



37. ábra AChE és BChE molekuláris formák szedimentációs sebességi profilja 2 mg/l MD-nal 12 ± 1 °C-on 7 napig kezelt ponty előbelében
Megjegyzés. A kísérleti körülményeket lásd a 19. és 24. ábrán.



38. ábra AChE és BChE molekuláris formák szedimentációs sebességi profilja 2 mg/l MD-nal 12 ± 1 °C-on 7 napig kezelt ponty középbelében
Megjegyzés. A kísérleti körülményeket lásd a 19. és 24. ábrán.



39. ábra AChE és BChE molekuláris formák szedimentációs sebességi profilja 2 mg/l MD-nal 12 ± 1 °C-on 7 napig kezelt ponty utóbelében

Megjegyzés. A kísérleti körülményeket lásd a 19. és 24. ábrán.

5.4.3 *In vivo* PQ és $CuSO_4$ kezelés hatása a kolinészterázok molekuláris formáira

5 ppm-s 1 hetes kezelést követően PQ esetében nem figyeltünk meg szignifikáns változást a kolinészterázok aktivitásában, $CuSO_4$-os kezelésnél viszont jól érzékelhető emelkedést tapasztaltunk a közép- és az utóbélben. (11. és 12. táblázat)

	AChE AKTIVITÁS A HOMOGENÁTOKBAN (U/l)		BChE AKTIVITÁS A HOMOGENÁTOKBAN (U/l)	
	KONTROLL	PQ KEZELT	KONTROLL	PQ KEZELT
ELŐBÉL	155.4 ± 18.1	149.3 ± 10.1	50.0 ± 8.9	41.4 ± 4.9
KÖZÉPBÉL	112.8 ± 9.7	99.2 ± 23.6	54.4 ± 6.7	48.4 ± 8.4
UTÓBÉL	107.8 ± 11.2	109.1 ± 14.6	29.5 ± 7.9	36.8 ± 6.7

11. táblázat AChE és BChE aktivitások kontroll és 5 mg/l PQ-tal 12 ± 1 °C-on 7 napig kezelt halak különböző bélszakaszaiban
Megjegyzés. Az AChE és BChE aktivitások 4-6 halból származó mérés átlagát (± S.D.) tükrözik (U/l). Az AChE mérésekor 10^{-5} M ethopropazint, a BChE mérésekor 10^{-5} M BW 284 C51 inhibitort használtunk.

	AChE AKTIVITÁS A HOMOGENÁTOKBAN (U/l)		BChE AKTIVITÁS A HOMOGENÁTOKBAN (U/l)	
	KONTROLL	$CuSO_4$ KEZELT	KONTROLL	$CuSO_4$ KEZELT
ELŐBÉL	155.4 ± 18.1	148.1 ± 21.2	50.0 ± 8.9	60.9 ± 4.3
KÖZÉPBÉL	112.8 ± 9.7	137.1 ± 8.0*	54.4 ± 6.7	93.5 ± 21.2*
UTÓBÉL	107.8 ± 11.2	172.8 ± 23.5*	29.5 ± 7.9	49.4 ± 9.1*

12. táblázat AChE és BChE aktivitások kontroll és 2 mg/l $CuSO_4$-tal 12 ± 1 °C-on 7 napig kezelt halak különböző bélszakaszaiban
Megjegyzés. Az AChE és BChE aktivitások 4-6 halból származó mérés átlagát (± S.D.) tükrözik (U/l). A kezelt halak értékei szignifikánsan különböznek a kontrolltól (Student *t* teszt, $P < 0.05$), amit a következő szimbólummal jelöltünk: *. Az AChE mérésekor 10^{-5} M ethopropazint, a BChE mérésekor 10^{-5} M BW 284 C51 inhibitort használtunk.

	AChE MOLEKULÁRIS FORMÁK (%)		
	G_1	G_4 ÉS/VAGY A_4	A_{12}
KONTROLL PONTY ELŐBÉL	32.3 ± 5.0	51.1 ± 8.6	16.6 ± 3.1
PQ KEZELT PONTY ELŐBÉL	18.8 ± 0.3*	64.0 ± 15.6	17.2 ± 0.7
$CuSO_4$ KEZELT PONTY ELŐBÉL	22.9 ± 6.3	64.3 ± 9.6	12.8 ± 0.7
KONTROLL PONTY KÖZÉPBÉL	19.1 ± 3.3	64.0 ± 10.4	16.9 ± 2.1
PQ KEZELT PONTY KÖZÉPBÉL	22.0 ± 2.6	43.7 ± 3.6*	34.3 ± 2.8**
$CuSO_4$ KEZELT PONTY KÖZÉPBÉL	1.3 ± 0.2**	89.9 ± 14.6*	8.8 ± 1.8**
KONTROLL PONTY UTÓBÉL	12.7 ± 1.7	74.1 ± 9.3	13.2 ± 1.2
PQ KEZELT PONTY UTÓBÉL	14.6 ± 0.5	69.0 ±10.1	16.4 ± 3.2
$CuSO_4$ KEZELT PONTY UTÓBÉL	7.3 ± 1.5*	76.2 ± 10.3	16.5 ± 1.2*

13. táblázat AChE molekuláris formák megoszlása kontroll 5 mg/l PQ-tal és 5 mg/l $CuSO_4$-tal 12 ± 1 °C-on 7 napig kezelt halak tápcsatornájában

Megjegyzés. Az AChE aktivitások 4-6 halból származó mérések átlagát (± S.D.) tükrözik az össz AChE molekuláris formák százalékában. A kezelt halak értékei szignifikánsan különböznek a kontrolitól (Student *t* teszt, *P < 0.05, **P < 0.03), amit a következő szimbólumokkal jelöltünk: *, **. Az AChE aktivitás mérésekor 10^{-5} M ethopropazint alkalmaztunk.

Mivel a paraquat elsősorban a halak bőrében és emésztőcsatornájában halmozódik fel, hatása itt érvényesül, amit citopatológiás módszerekkel Benedeczky és mtsai (1986) kimutattak. Jelen esetben AChE illetve BChE gátlást nem mértünk. Ezt a következőképpen lehet magyarázni. Rövidebb időtartamú (24 óra) kezelések erősen csökkentik az AChE aktivitást (kompetitív gátlás révén), hosszabb expozíciót követően azonban a kolinészterázok aktivitása nő, gyakorlatilag visszaáll az eredeti szintre (Szabó és mtsai, 1992). Az aktivitás növekedése a $CuSO_4$ esetén még kifejezettebb (különösen közép- és utóbélnél), és korábban jelentkezik, mint a paraquatnál. Ez annak a következménye lehet, hogy a $CuSO_4$ és a PQ elsősorban a már megszintetizált AChE (és BChE) aktivitást csökkenti, de serkentheti a *de novo* szintézisüket (Nemcsók és mtsai, 1986; Szabó és mtsai, 1992). Úgy tűnik az enzimaktivitás regenerálódása inkább az enzim

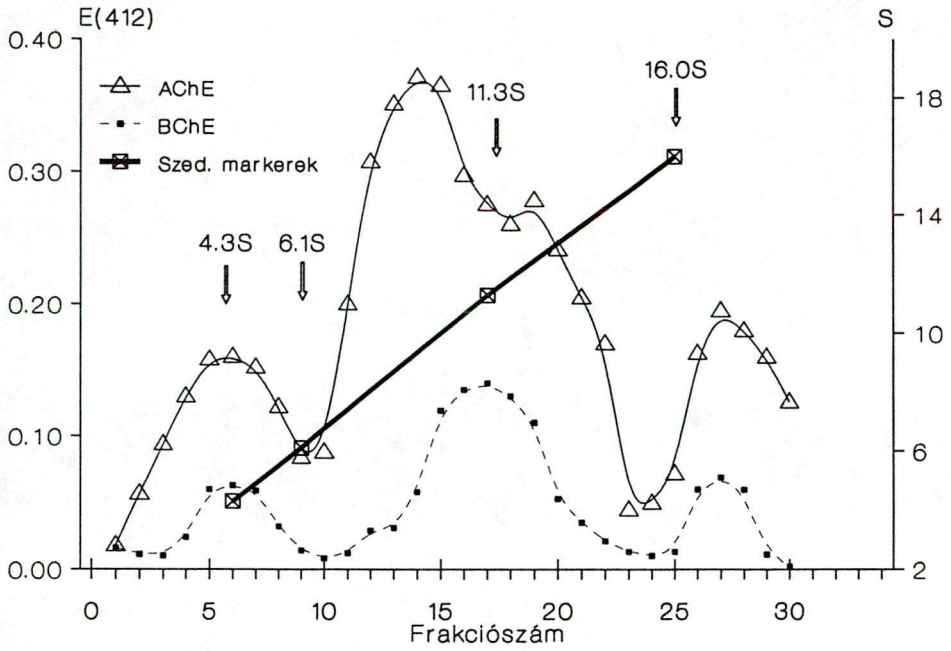
újraszintézisétől függ, nem a már gátolt enzim reaktivációjától (Cisson és Wilson, 1977, 1981).

	BChE MOLEKULÁRIS FORMÁK (%)		
	G_1	G_4 ÉS/VAGY A_4	A_{12}
KONTROLL PONTY ELŐBÉL	33.8 ± 5.9	49.7 ± 11.2	16.5 ± 3.4
PQ KEZELT PONTY ELŐBÉL	22.1 ± 6.1	62.6 ± 4.8	15.3 ± 4.0
$CuSO_4$ KEZELT PONTY ELŐBÉL	35.9 ± 3.9	46.7 ± 5.1	17.4 ± 2.8
KONTROLL PONTY KÖZÉPBÉL	27.6 ± 4.1	49.2 ± 7.3	23.2 ± 6.1
PQ KEZELT PONTY KÖZÉPBÉL	34.5 ± 6.5	39.4 ± 7.1	26.1 ± 6.6
$CuSO_4$ KEZELT PONTY KÖZÉPBÉL	15.1 ± 4.0*	64.6 ± 8.2*	20.3 ± 5.4
KONTROLL PONTY UTÓBÉL	9.9 ± 2.6	68.4 ± 7.6	23.2 ± 2.3
PQ KEZELT PONTY UTÓBÉL	12.2 ± 2.7	64.5 ± 3.3	23.3 ± 2.4
$CuSO_4$ KEZELT PONTY UTÓBÉL	5.6 ± 2.4	73.9 ± 4.1	20.5 ± 3.6

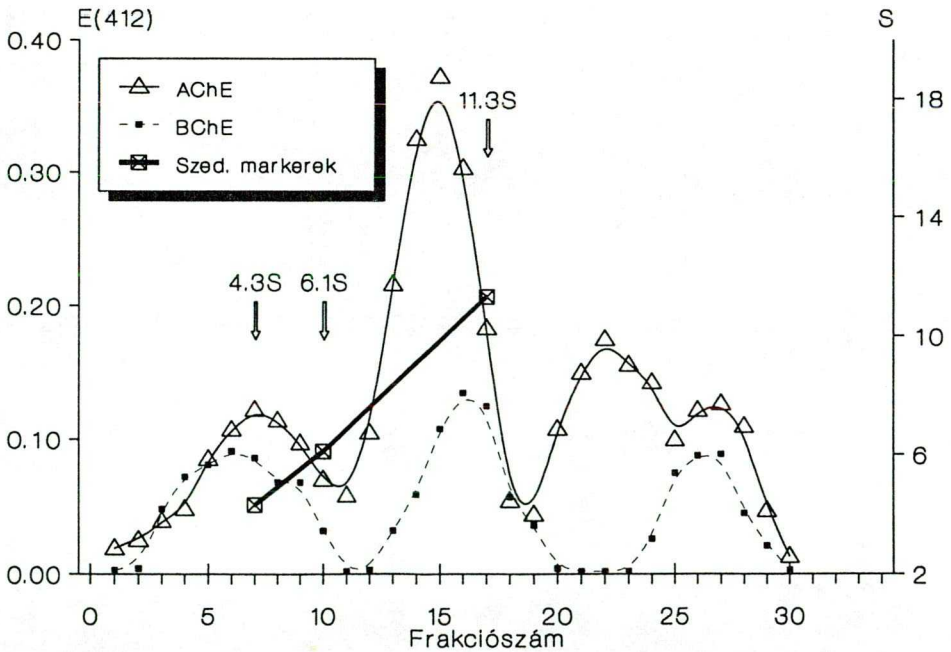
14. táblázat BChE molekuláris formák megoszlása kontroll 5 mg/l PQ-tal és 5 mg/l $CuSO_4$-tal 12 ± 1 °C-on 7 napig kezelt halak tápcsatornájában
Megjegyzés. A BChE aktivitások 4-6 halból származó mérés átlagát (± S.D.) tükrözik az össz BChE molekuláris formák százalékában. A kezelt halak értékei szignifikánsan különböznek a kontrolltól (Student *t* teszt, $P < 0.05$), amit a következő szimbólummal jelöltünk: *. A BChE mérésekor 10^{-5} M BW 284 C51 oldatot alkalmaztunk.

A molekuláris formák megoszlása PQ-tal történt kezelés hatására hasonló a kontroll állatokéhoz. A tápcsatorna első szakaszában a G_4 forma aránya kismértékben (de nem szignifikánsan) nőtt, a G_1 pedig csökkent, míg a középbélnél a G_4 csökkent valamelyest az A_{12} forma rovására. Az utóbélben változást gyakorlatilag nem figyeltünk meg. Összegezve elmondhatjuk, hogy a PQ kezelés sem a kolinészteráz aktivitásokat, sem azok molekuláris formáinak megoszlását nem befolyásolta jelentősen az adott kezelést követően (40-42. ábra, 11-13. táblázat). Úgy tűnik, hogy a különböző molekulatömegű és felépítésű alegységekre nem specifikusan hat a PQ, mely - ismerve hatásmechanizmusát -

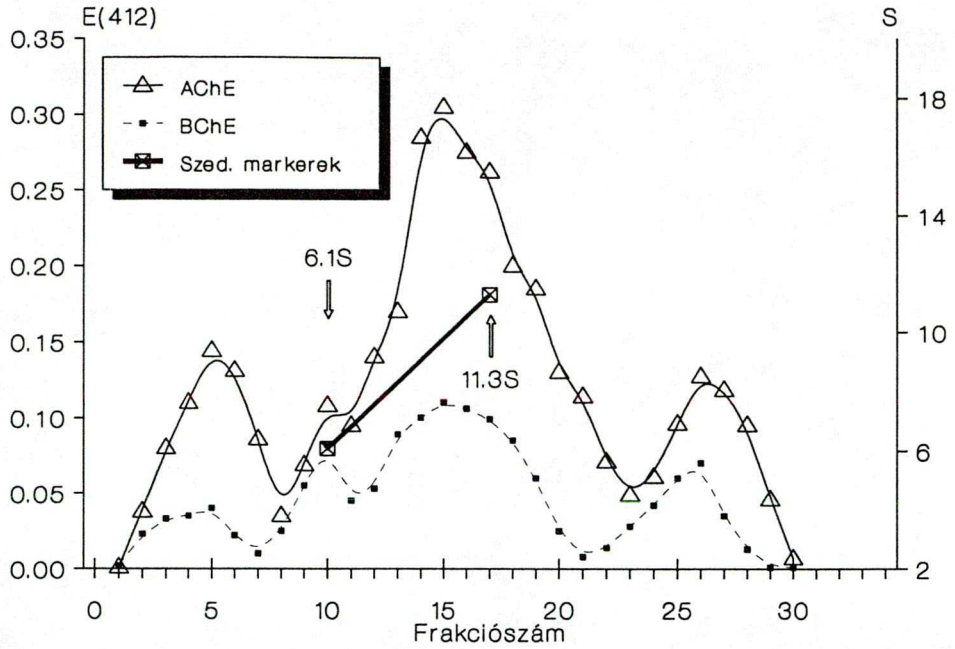
egyezik korábbi eredményeinkkel. A BChE molekuláris formáinak eloszlása hasonlít a kontrollhoz.



40. ábra AChE és BChE molekuláris formák szedimentációs sebességi profilja 5 mg/l PQ-tal 12 ± 1 °C-on 7 napig kezelt ponty előbelében
Megjegyzés. A kísérleti körülményeket lásd a 19. ábrán.



41. ábra AChE és BChE molekuláris formák szedimentációs sebességi profilja 5 mg/l PQ-tal 12 ± 1 °C-on 7 napig kezelt ponty középbelében
Megjegyzés. A kísérleti körülményeket lásd a 19. ábrán.

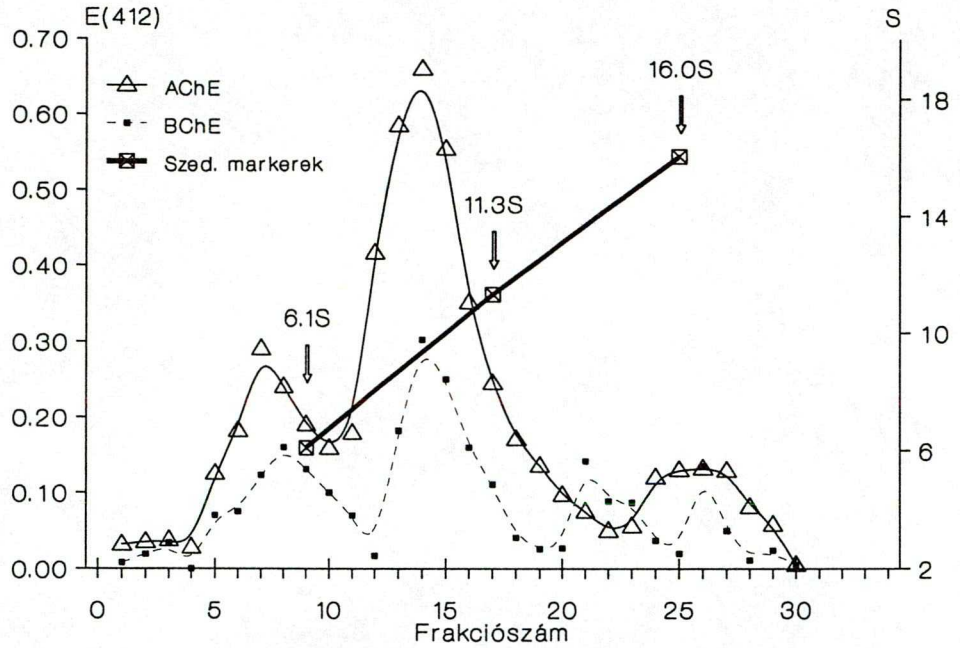


42. ábra AChE és BChE molekuláris formák szedimentációs sebességi profilja 5 mg/l PQ-tal 12 ± 1 °C-on 7 napig kezelt ponty utóbelében
Megjegyzés. A kísérleti körülményeket lásd a 19. ábrán.

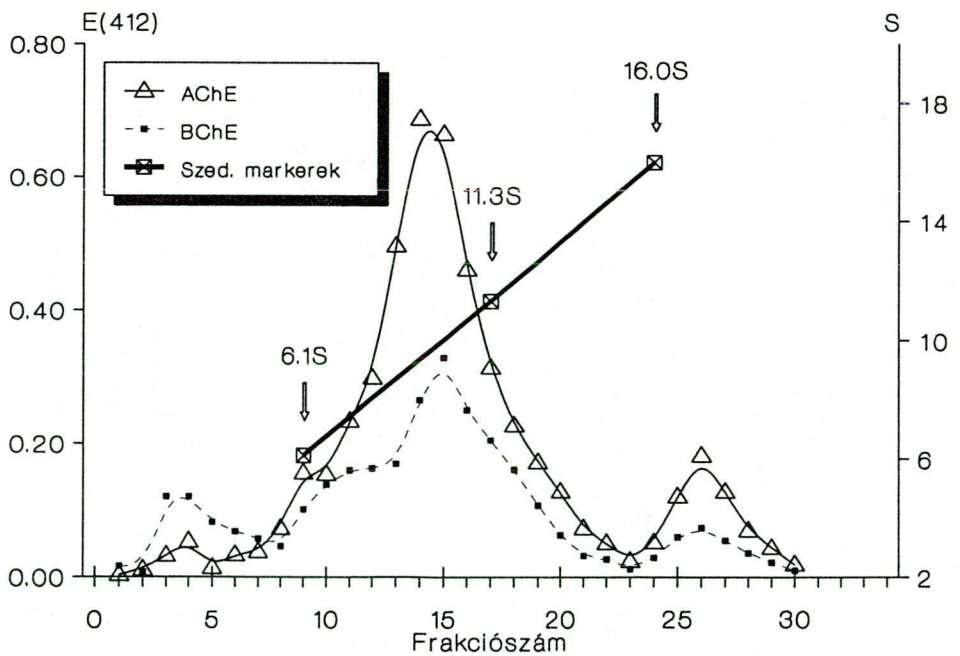
A $CuSO_4$ kezelés hatására jelentősen megnövekedett AChE aktivitás (elsősorban közép- és utóbélnél) elsősorban a G_4-es forma magas szintjéből eredt. A bélszakaszokban a G_1 típus arányának csökkenését mértük, mely a középbélben a legdrasztikusabb (91.5%-os a kontrollhoz képest) (13. táblázat, 43-45. ábra).

Az enzimaktivitás növekedése egyértelműen a G_4-es forma arányának növekedéséből ered, emellett a G_1-es akár csökkenhet is. A $CuSO_4$ serkenti az enzimszintézis fokozása révén a G_1-es monomerek képződését. Mivel a monomerből vezethető le a többi forma - elsősorban membránlokalizáltan elhelyezkedő G_4-es tetramer a bél izomzatának a felszínén - a szervezetben, ezért feltételezhetjük a G_4-es "pool" feltöltődését, mely jelentős mértékben felemészti a fokozatosan újraképződő monomereket. Eredményeink alapján feltételezzük a membránkötött forma stabilitását, és gyors képződését a monomerekből a bélben.

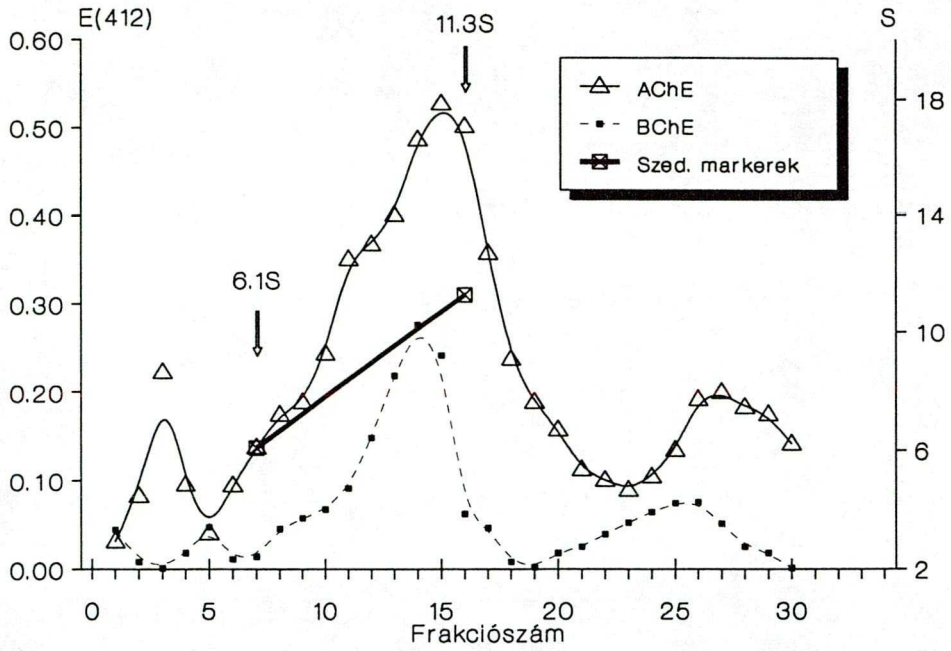
A $CuSO_4$ felszívódása és transzportálása a máj felé mindhárom bélszakaszból nyomon követhető. A két folyamat mértéke azonban eltérő, és elsősorban a közép- és utóbél régióiból zajlik. Ezzel párhuzamosan a kolinészterázok aktivitása csökken a tápcsatorna kezdeti nyílásától a végbélnyílás felé haladva. Ez a két tényező eredményezheti a viszonylag kismértékű eltéréseket a ponty belének egyes szakaszai között $CuSO_4$-tal és PQ-tal történt kezelést követően.



43. ábra AChE és BChE molekuláris formák szedimentációs sebességi profilja 5 mg/l $CuSO_4$-tal 12 ± 1 °C-on 7 napig kezelt ponty előbelében
Megjegyzés. A kísérleti körülményeket lásd a 19. ábrán.



44. ábra AChE és BChE molekuláris formák szedimentációs sebességi profilja 5 mg/l $CuSO_4$-tal 12 ± 1 °C-on 7 napig kezelt ponty középbelében
Megjegyzés. A kísérleti körülményeket lásd a 19. ábrán.



45. ábra AChE és BChE molekuláris formák szedimentációs sebességi profilja 5 mg/l $CuSO_4$-tal 12 ± 1 °C-on 7 napig kezelt ponty utóbelében

Megjegyzés. A kísérleti körülményeket lásd a 19. ábrán.

5.5 *In vivo* deltamethrin kezelés hatása ponty különböző enzimparamétereire

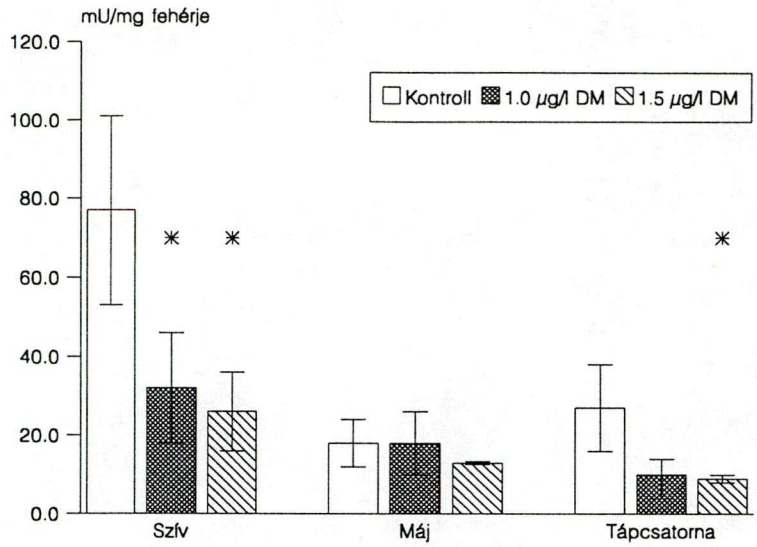
Ezen kísérletekben néhány enzim biokémiai vizsgálatát végeztük el ponty szöveteiben 4 napig tartó, 1 és 1.5 μg/l DM expozíció alatt, 24 órás mintavételekkel. A kezelt és kontroll állatokban AChE, LDH, GOT, GPT aktivitásokat határoztunk meg vérszérumból, mely értékek a halakat ért szöveti károsodásokat jelzik (Kristoffersson és mtsai, 1974; Nemcsók és Boross, 1982b; Asztalos és Nemcsók, 1985; Wrobelski és La Due, 1985). Az enzimparaméterek mellett vizsgáltuk a stresszállapotot jelző vércukorszint változást is (Wedemeyer, 1970; Nemcsók és mtsai, 1982b). Továbbá mértük a máj kataláz aktivitását, ami a szervezetben folyó szabadgyök elimináló folyamatok érzékeny indikátora, valamint az eritrocita membrán ATP-áz aktivitásait, ami az általános membrándestrukció mértékére ad felvilágosítást. Ezt a kísérletsorozatot 25 °C-on, nyári körülmények között hajtottuk végre. Az alacsonyabb hőmérsékleten való változások követése, valamint az enzimek regenerációjának tanulmányozása céljából 12 °C-on is végeztünk vizsgálatokat. Ennek során a halakat 3 napig tartottuk 2 μg/l DM tartalmú vízben (mintavétel 6 óránként történt), majd tiszta vízbe áttéve őket vizsgáltuk azok regenerációját diagnosztikai enzimek segítségével (mintavétel 24 óránként történt). Meghatároztuk a vérszérum AChE, LDH, GOT aktivitását, illetve a vércukorszintet a kezelt állatokban.

5.5.1 Az acetilkolin-észteráz

A 25 °C-on végzett kísérletek során az AChE specifikus aktivitása a szívben és a középbélben erősen gátolt volt a DM kezelés hatására, míg a májban hasonló hatást nem észleltünk. A gátlás mértéke 50-60%-os volt 96 órás kezelést követően az említett szervekben (46. ábra). A vérszérum AChE aktivitása a kontrollhoz hasonló szinten maradt, bár nem szignifikánsan csökkenő trendet figyeltünk meg; 96 óra után 1.5 μg/l DM 27%-os szignifikáns ($P < 0.05$) gátlást okozott (47. ábra). A két koncentráció hatása között különbséget még 72 óra után sem tudtunk kimutatni.

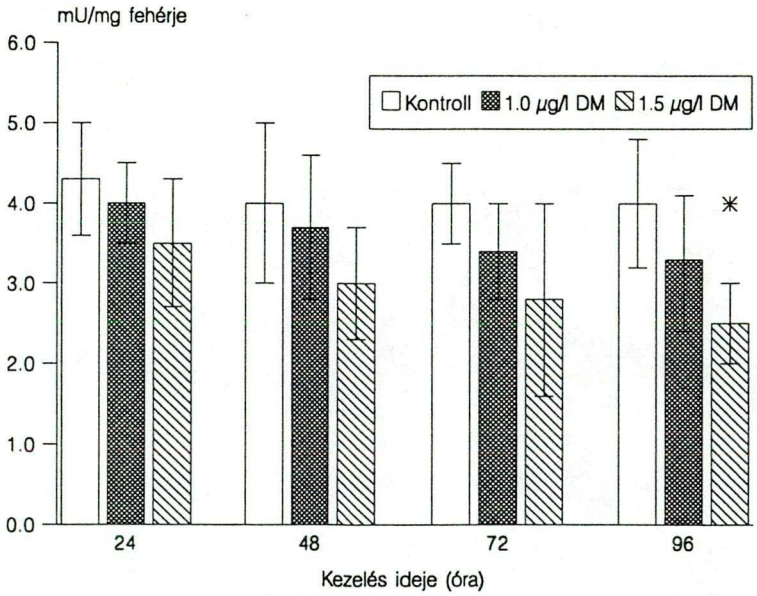
A DM pontyra vonatkozó LC_{50} értéke 96 órás kezelés esetén 1.84 μg/l (L'Hotellier és Vincent, 1986). Korábbi kísérleteinkben mi is hasonló értéket mértünk, annak ellenére, hogy egy kísérletben alacsonyabb koncentrációnál elpusztult az összes hal. Jól ismert, hogy az α-cianopiretroidok, így a DM is az idegsejt membránok - normális esetben rövid ideig tartó - Na^+ permeábilitásának elnyúlását okozzák (5.3.4 fejezet). Valószínű a szoros kapcsolat a DM Na^+-csatorna permeábilitására tett hatása és az AChE enzim gátlása között. A gátlás mértéke az alkalmazott koncentrációknál abszolút mértékben nem olyan nagymérvű, mint az a szerves foszforsavészterek esetében észlelhető, de nem szabad elfelejteni, hogy a halak érzékenysége miatt a piretroidokat ezerszer kisebb koncentrációban alkalmaztuk más inszekticidekhez képest (Szegletes és Nemcsók, 1992).

A DM LC_{50}-hez közeli értékben alkalmazva olyan biokémiai változásokat indít el a perifériás idegsejtekben, amelyek kapcsolatban vannak szórványos axon degenerációval (WHO, 1990).



46. ábra A szív, a máj és a bél specifikus AChE aktivitásainak változása DM kezelés hatására

Megjegyzés. A halakat 1.0 és 1.5 µg/l DM-nel kezeltük 96 órán keresztül 25 ± 1 °C-on. A szív, máj és bélminta AChE értékeit mU/mg fehérjében adtuk meg, és 6-8 pontyból származó mérések átlagát (±S.D.) tükrözik. A kezelt halak értékei szignifikánsan különböznek a kontrolltól (Student *t* teszt, $P < 0.05$), amit a következő szimbólummal jelöltünk: *. A kísérleti körülményeket lásd az "Anyagok és módszerek" fejezetben.



47. ábra A vérszérum specifikus AChE aktivitásainak változása DM kezelés hatására

Megjegyzés. A halakat 1.0 és 1.5 µg/l DM-nel kezeltük 96 órán keresztül 25 ± 1 °C-on. A vérszérum AChE értékeit mU/mg fehérjében adtuk meg, és 6-8 pontyból származó mérések átlagát (±S.D.) tükrözik. A kezelt halak értékei szignifikánsan különböznek a kontrolltól (Student *t* teszt, $P < 0.05$), amit a következő szimbólummal jelöltünk: *. A kísérleti körülményeket lásd az "Anyagok és módszerek" című fejezetben.

Ezek a destruktív jelenségek feltehetően sok más egyéb hatás mellett a szívizom és a tápcsatorna AChE aktivitásának csökkenésére vezethetők vissza. A két szövet AChE lokalizációja és az enzim molekuláris formáinak megoszlása is eltér a más szövetekben (pl. a májban) találtaktól (5.3 fejezet), ami magyarázza, hogy a 25 °C-on végzett kísérletekben eltérő mértékű gátlást, illetve a májban semmilyen változást nem mértünk.

5.5.2 A transzaminázok

A GOT aktivitások a vérszérumban lényegesen magasabbak voltak a kezelt állatokban, mint a kontrollokban 72 és 96 óra után (72 óra 1 μg/l: $P < 0.01$; 72 óra 1.5 μg/l és 96 óra 1 és 1.5 μg/l: $P < 0.05$; 15. táblázat). A GPT enzimnél nem figyeltünk meg szignifikáns eltérést a kontrolltól egyik koncentrációban sem, kivéve 96 óra után az 1.5 μg/l DM kezelést, ahol az aktivitása kismértékben emelkedett (16. táblázat).

	A KEZELÉS IDEJE (óra)			
	24	48	72	96
1 μg/l DM	4.60 ± 2.69	8.68 ± 1.56	9.07 ± 2.83**	10.80 ± 5.62*
1.5 μg/l DM	8.59 ± 4.56	10.40 ± 4.99	11.20 ± 6.84*	13.10 ± 5.25*
KONTROLL	2.56 ± 1.64	4.43 ± 2.95	3.68 ± 1.85	3.75 ± 2.51

15. táblázat DM hatása ponty vérplazma GOT specifikus aktivitásaira

Megjegyzés. A halakat 1.0 és 1.5 μg/l DM-nel kezeltük 96 órán keresztül 25 ± 1 °C-on. A GOT aktivitásokat $*10^{-4}$ U/mg fehérjében adtuk meg 6-8 halból származó mérés átlagaként (±S.D., *$P < 0.05$, **$P < 0.01$, Student *t* teszt). A kísérleti körülményeket lásd az "Anyagok és módszerek" című fejezetben.

Jól detektálható azoknak a szöveteknek a sérülése, amelyek jelentős mennyiségben tartalmaznak GOT vagy GPT enzimeket, mivel ilyen esetekben az adott szövet sejtjeinek szétesése következtében megnövekszik a vérszérum GOT és/vagy GPT aktivitása (Karmen és mtsai, 1955). A GOT és GPT enzimek megoszlása a halak különböző szerveiben változó (Nemcsók és mtsai, 1981), így a két enzim megnövekedett értékeinek detektálása a vérszérumban lehetőséget nyújt arra, hogy a megfelelő szervek károsodására következtessünk. A kísérleteinkben tapasztalt GOT és GPT aktivitások növekedése a vérszérumban elsősorban májkárosodásra utal, de más szervek (vese, szív, és kopoltyú) károsodását is jelzi.

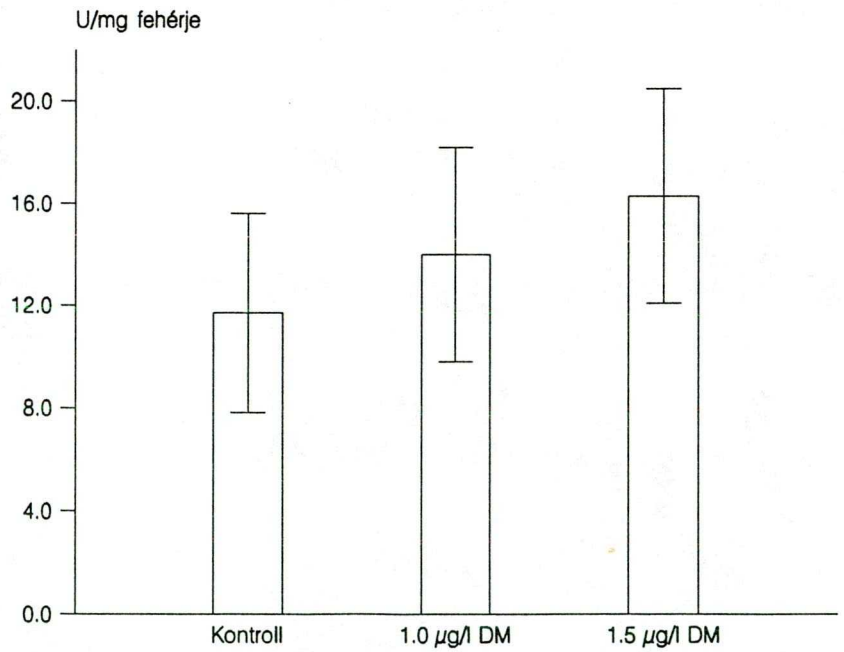
	A KEZELÉS IDEJE (óra)			
	24	48	72	96
1 μg/l DM	2.72 ± 0.43	3.47 ± 1.02	3.08 ± 0.72	3.93 ± 1.68
1.5 μg/l DM	2.64 ± 1.86	4.59 ± 1.54	5.09 ± 1.71	5.57 ± 0.90*
KONTROLL	2.35 ± 1.31	2.81 ± 1.54	3.63 ± 1.74	3.60 ± 2.47

16. táblázat DM hatása ponty vérplazma GPT specifikus aktivitásaira

Megjegyzés. A halakat 1.0 és 1.5 μg/l DM-nel kezeltük 96 órán keresztül 25 ± 1 °C-on. A GPT aktivitásokat $*10^{-4}$ U/mg fehérjében adtuk meg 6-8 halból származó mérés átlagaként (±S.D., *P < 0.05, Student *t* teszt). A kísérleti körülményeket lásd az "Anyagok és módszerek" című fejezetben.

5.5.3 A kataláz

A kataláz enzim aktivitása a kezelt halaknál a kontroll egyedekhez viszonyítva szintén nőtt, ez a növekedés azonban nem szignifikáns (48. ábra).

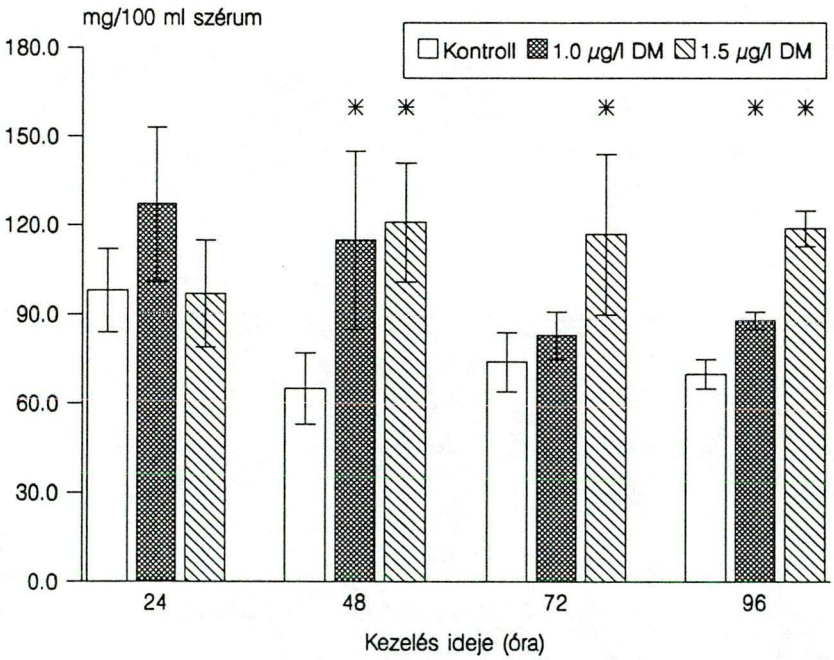


48. ábra A máj specifikus kataláz aktivitásainak változása DM kezelés hatására

Megjegyzés. A halakat 1.0 és 1.5 μg/l DM-nel kezeltük 96 órán keresztül 25 ± 1 °C-on. A máj kataláz értékeit U/mg fehérjében adtuk meg, és 6-8 pontyból származó mérés átlagát (±S.D.) tükrözik. A kísérleti körülményeket lásd az "Anyagok és módszerek" fejezetben.

Halakban a DM metabolizmusa során - ellentétben más állatokkal (egér, fürj és más melegvérűek) - az észterkötés hasítása nagyon lassan megy végbe. A metabolizmus fő útja 4-hidroxi-fenoxi származékot eredményez, ami azután az epében mint glükuronid kiválasztódik (Edwards és Millburn, 1985). Ezeknek a származékoknak a jelenléte kapcsolatban állhat a megnövekedett kataláz aktivitással, ami esetünkben nem jelentős, feltehetően a DM viszonylag gyors eliminációja (de nem az észterkötés hasítása révén), másrészt a használt inszekticid alacsony koncentrációja miatt. A kataláz enzimnek a szerepe a megnövekedett szöveti H_2O_2 bontása, mivel kisebb mennyiségeit a peroxidázok képesek eliminálni. Ez összefüggésben lehet a szabadgyökök megemelkedett számával, melyek különböző idegen vegyületek metabolizmusa során szabadulnak fel. A máj ultrastruktúrája is jellemző változásokat mutat ilyen metabolizmusok hatására, különösen a középső lebenyben. DM hatására megnövekszik a mitokondriumok száma, megváltozik alakjuk is, rendellenes szerkezetűvé válnak (Catinot és mtsai, 1989).

5.5.4 A vércukorszint és a laktát dehidrogenáz



49. ábra A vérszérum glükózszintjének alakulása DM kezelés hatására

Megjegyzés. A halakat 1.0 és 1.5 µg/l DM-nel kezeltük 96 órán keresztül 25 ± 1 °C-on. A vércukorszint értékeit mg/100 ml szérumban adtuk meg, és 6-8 pontyból származó mérés átlagát (±S.D.) tükrözik. A kezelt halak értékei szignifikánsan különböznek a kontrolltól (Student *t* teszt, $P < 0.05$), amit a következő szimbólummal jelöltünk: *. A kísérleti körülményeket lásd az "Anyagok és módszerek" című fejezetben.

A DM-mérgezett halaknál a következő szindrómákat figyeltük meg: remegés, a kopoltyúfedő abnormális mozgása (különösen a magasabb dózis esetében 25 °C-on), ataxia és hiperaktivitás. A kezelt állatok a kísérlet során rendkívül idegesek voltak,

kiszámíthatatlanul úsztak föl-alá az akváriumban, sokszor oldalra fordulva, gyakran nekiütközve a falnak, ami aztán hám- és izomszöveti sérüléseket okozott. Ezt a stresszelt állapotot jól jellemezte a magas vércukorszint is a 48, 72 és 96 órás 1.5 μg/l DM kezelések esetében (49. ábra). Alacsony koncentrációjú kezelésnél (1 μg/l DM) már 24 óra elteltével megnőtt a vércukorszint, de ez a változás nem volt szignifikáns. A 48 órás minták értékei növekedést mutattak, de a későbbiekben ez a magasabb glükózszint visszaesett a kontrollhoz közeli értékre. Ezzel szemben az 1.5 μg/l DM-nek kitett halakban csak 48 óra után mértünk szignifikáns emelkedést, ez azonban végig megmaradt a 72 és a 96 órás mintákban is. A megnövekedett vércukorszint megnövekedett LDH szinttel kapcsolódott a kezelés során (17. táblázat), ezzel is jelezve a biokémiai metabolizmus változásait a stresszelt halak esetében, különösen az izomszövetben. 24 órás 1 μg/l DM kezelést követően az LDH aktivitás emelkedett, s ez fennállt 48 óra után is. A kezelést követő 72 és 96 órás mintákban a halak LDH értékei a nagy szórás miatt nem mutattak szignifikáns eltérést a kontrolltól. A 1.5 μg/l DM hatására az LDH szintén emelkedett, azonban ez a növekedés nem szignifikáns. Összegezve elmondhatjuk, hogy nem volt korreláció az LDH aktivitások és az alkalmazott DM koncentrációja között.

	A KEZELÉS IDEJE (óra)			
	24	48	72	96
1 μg/l DM	6.01 ± 1.66*	6.79 ± 1.46*	5.49 ± 3.30	5.90 ± 2.98
1.5 μg/l DM	3.62 ± 2.05	4.09 ± 2.97	4.08 ± 2.15	4.52 ± 1.80
Kontroll	3.54 ± 1.75	3.43 ± 0.98	3.09 ± 0.75	3.30 ± 1.63

17. táblázat DM hatása ponty vérplazma LDH specifikus aktivitásaira

Megjegyzés. A halakat 1.0 és 1.5 μg/l DM-nel kezeltük 96 órán keresztül 25 ± 1 °C-on. Az LDH aktivitásokat mU/mg fehérjében adtuk meg 6-8 halból származó mérés átlagaként (±S.D., *P < 0.05, Student *t* teszt). A kísérleti körülményeket lásd az "Anyagok és módszerek" című fejezetben.

A stressz a halakban primer hatásként a kortikoszteroidok és katekolaminok szintjének emelkedésében nyilvánul meg. Ezt követik a másodlagos hatások: a fehérvérsejtek száma, az izom fehérje- és a máj glükogénszintje csökken, a vér glükóz- és tejsavszintje, valamint a szív frekvenciája emelkedik (Mazeaud és Mazeaud, 1981). Az időleges vérglükóz érték emelkedés esetünkben azonban maradandó károsodást valószínűleg nem

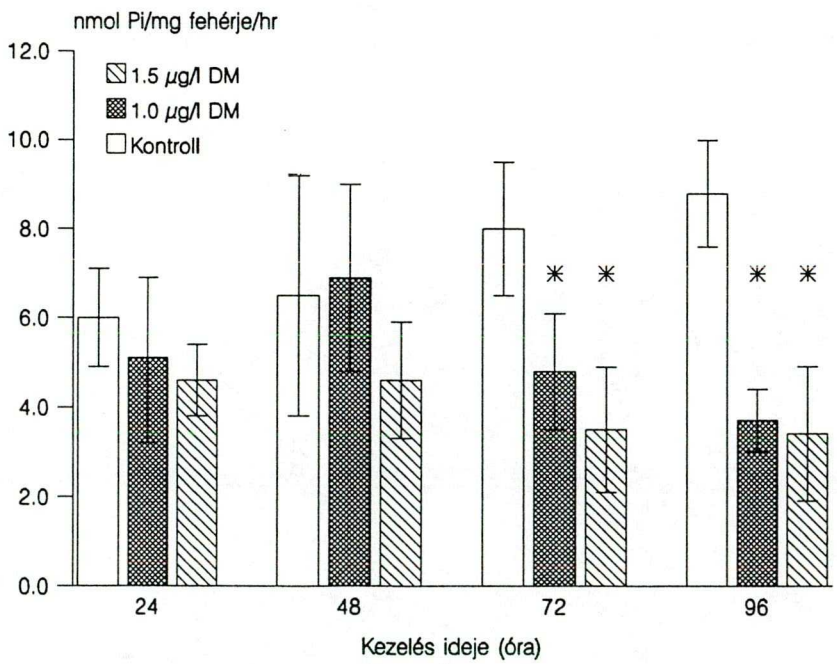
okozott, a szervezet még ki tudta védeni a DM káros hatását, legalábbis e paramétereket tekintve.

Indukált "nem motoros" szimptomák, pl. a vércukorszint növekedése, illetve az ezzel kapcsolatos folyamatos stresszhatás a γ-globulinok létrejöttét is gátolja (Bradbury és mtsai, 1983), valamint elnyomja az interferon termelést is. Mivel az utóbbi anyagok fontos szerepet játszanak a különböző fertőzésekkel szembeni ellenállóképesség létrejöttében és fenntartásában a halaknál is (Wedemeyer, 1970; Nemcsók és mtsai, 1982), ezért a szérum glükózszint növekedése jól jellemezte a károsodást.

A glükogén és a glükóz katabolizmusa magas vércukorszint esetén tejsav képződésének az irányában tolódhat el, ami akár halálos kimenetelű is lehet a halakra (Nakono és Tomlinson, 1967; Simon és mtsai, 1983).

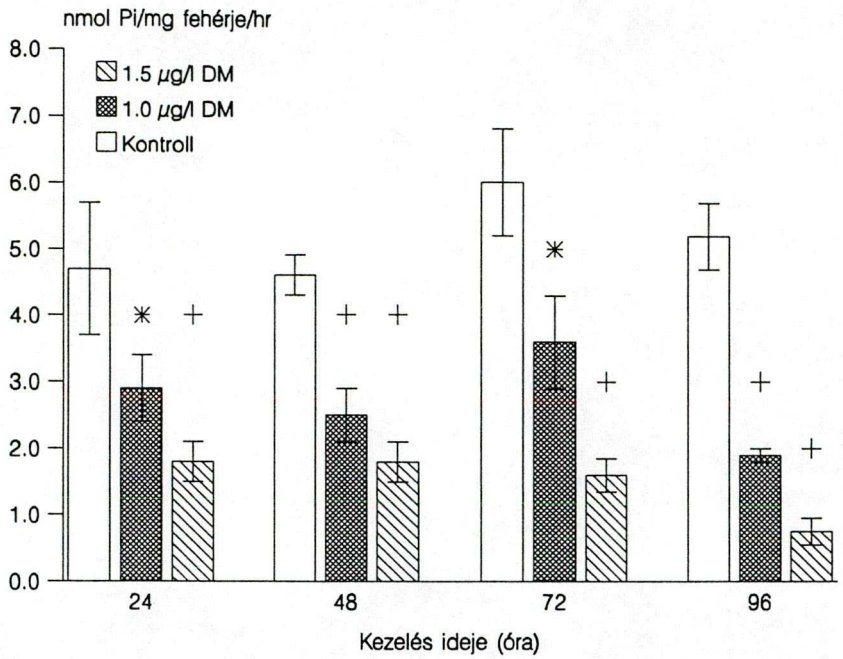
5.5.5 A vörösvérsejt ATP-ázok

Míg az eritrocita plazmamembrán Mg^{2+}-függő ATP-áz aktivitása már 48 óra után szignifikánsan csökkent a DM magasabb koncentrációinál, addig 1 μg/l DM-nél csak 72 óra után mutatott hasonló tendenciát (50. ábra). A Na^+/K^+-ATP-áz aktivitása DM koncentrációtól függően csökkent a kísérlet során (51. ábra).



50. ábra A Mg^{2+}-függő ATP-ázok aktivitásainak változása DM kezelés hatására a vörösvérsejtek plazmamembránjában

Megjegyzés. A halakat 1.0 és 1.5 μg/l DM-nel kezeltük 96 órán keresztül 25 ± 1 °C-on. Az ATP-áz aktivitások értékeit nmol Pi/mg fehérje/órában adtuk meg, és 6-8 pontyból származó mérés átlagát (±S.D.) tükrözik. A kezelt halak értékei szignifikánsan különböznek a kontrolltól (Student *t* teszt, $P < 0.05$), amit a következő szimbólummal jelöltünk: *. A kísérleti körülményeket lásd az "Anyagok és módszerek" című fejezetben.



51. ábra A Na^+/K^+-függő ATP-ázok aktivitásainak változása DM kezelés hatására a vörösvérsejtek plazmamembránjában

Megjegyzés. A halakat 1.0 és 1.5 µg/l DM-nel kezeltük 96 órán keresztül 25 ± 1 °C-on. Az ATP-áz aktivitások értékeit nmol Pi/mg fehérje/órában adtuk meg, és 6-8 pontyból származó mérés átlagát (±S.D.) tükrözik. A kezelt halak értékei szignifikánsan különböznek a kontrolltól (Student *t* teszt, $^*P < 0.05$, $^+P < 0.005$), amit a következő szimbólumokkal jelöltünk: * és $^+$. A kísérleti körülményeket lásd az "Anyagok és módszerek" című fejezetben.

A piretroid típusú inszekticideket nemcsak a Na^+-csatornák záródását befolyásoló vegyületekként tartják számon, de mint neurotranszmitterek, receptorok és ATP-áz enzimek ionofor komplexeire ható anyagokként is ismertek (Dorman és Beasley, 1991). Arról szintén beszámoltak már, hogy az ATP-ázok aktivitása erősen függ a hőmérséklettől, a pH-tól és a víznyomástól is (Zaugg és McLain, 1976; Gibbs és Somero, 1989). Mindezek a környezeti tényezők változásokat okozhatnak a membránlipidek összetételében és a plazmamembrán fluiditásában is. Mivel az említett környezeti hatások kísérleteinkben változatlanok voltak, valószínűsíthető, hogy vizsgálataink során a DM volt az, ami közvetve vagy közvetlenül zavart okozott az ATP-ázok funkciójában. Feltételezhető, hogy a DM-nek ez a hatása kapcsolatban áll a sejtben bekövetkező ionösszetétel változással.

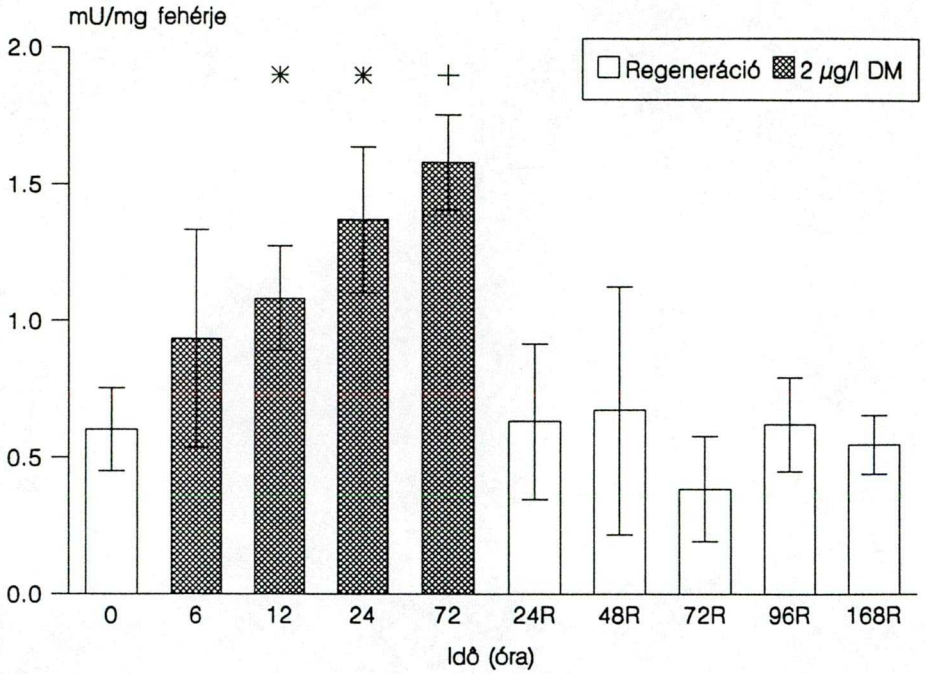
5.5.6 A halak regenerációja deltamethrin kezelést követően

Egy kísérletsorozatban a halak különböző vérparamétereinek a regenerációját vizsgáltuk 12 °C-on 2 µg/l DM hatására. A kiválasztott koncentráció nagyobb volt mint a 96 órás LC_{50} érték, így csak 3 napig kondicionáltuk a pontyokat az inszekticidet tartalmazó vízben.

Célunk a magas koncentráció kiválasztásával az volt, hogy jelentős fiziológiai és biokémiai változásokat okozzunk az állatokban, hogy azután a regeneráció jól vizsgálható legyen. A pontyok számára a legoptimálisabb hőmérsékletet (12 ± 1 °C) és magas oldott oxigén tartalmat biztosítottunk, hogy ezzel ne befolyásoljuk, illetve ne rontsuk a szervezet felépülését. A GOT aktivitása a kezelés időtartama alatt folyamatosan emelkedett, és a 3. nap végére a kontroll érték 2.5-szeresére nőtt. Az enzim aktivitása a kezelés megszüntetése után 24 órán belül visszaállt az eredeti értékre (52. ábra). Ezzel szemben az LDH aktivitása a kezelést követő 6. órában volt a legnagyobb (a kontroll érték 3-szorosa), majd fokozatosan csökkent (a 72. órában a kontroll érték 1.4-szerese). A kezelés megszüntetése után az enzim aktivitása az eredeti szintre esett vissza (53. ábra). A vércukorszint a kezelés elején jelentősen megemelkedett (a 6. órában a kontroll érték 1.7-szerese), de ez a paraméter is csökkent a kezelés során. A kezelés végeztével a vércukorszint az eredeti érték körül ingadozott (54. ábra). A kísérlet folyamán az AChE aktivitása - némi ingadozással - csökkent a vérben. Ez a paraméter azonban csak 48 óra múlva tért vissza a kontroll értékre (55. ábra).

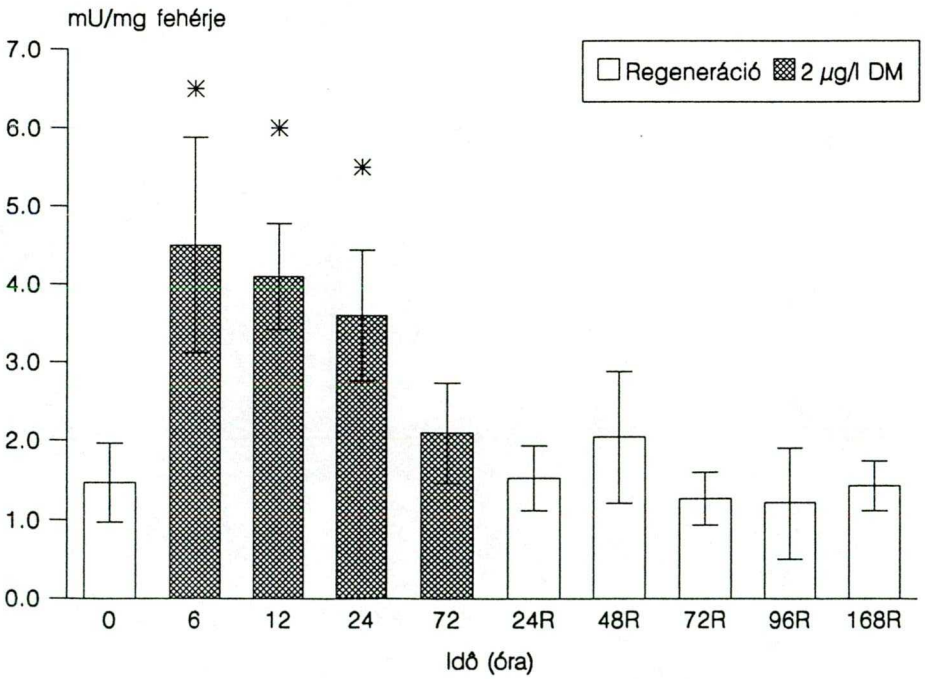
Eredményeink azt mutatták, hogy a DM már nagyon kis koncentrációban is erősen mérgező volt a halak ATP-áz enzimeire, míg az általunk vizsgált egyéb paraméterekre - elsősorban kisebb koncentrációban - kevésbé hatott. Koncentráció függő trendet tisztán csak a Na^+/K^+-ATP-áz aktivitásoknál figyeltünk meg. A DM 25 °C-on gátolta a szív és bél AChE-t, míg a májban a szintje változatlan maradt. (Érdekes, hogy 12 °C-on egyik vizsgált szervben sem volt AChE gátlás kimutatható, lásd az 5.3.1 fejezetet). A vérben az AChE kismértékű csökkenését detektáltuk 12 és 25 °C-on egyaránt. A szövetek károsodása, a halak stresszelt állapota a GOT, az LDH és a vércukorszint emelkedésében nyilvánult meg.

A regenerációs kísérletek során az LDH és a vércukorszint a kezelés első óráiban jelentősen megemelkedett, majd később csökkent, de a kontroll értékre nem tért vissza. A GOT érték folyamatos emelkedése viszont az egyre növekvő májkárosodásra utalt. A kezelést követően meglehetősen gyorsan (1-2 nap alatt) regenerálódtak a halak, paramétereik a kontroll körül ingadoztak. A vizsgált biokémiai paraméterek meghatározása alkalmas volt biomonitoring jellegű vizsgálatok elvégzésére, ami gyorsan jelzi a víz elszennyeződésének következményeit a halak szervezetére. Ilyen módon pontosabban elemezhetők és jobban megérthetők a halak megváltozott fiziológiai és biokémiai mechanizmusai már a nagyon alacsony koncentrációban jelenlévő inszekticidek hatására is.



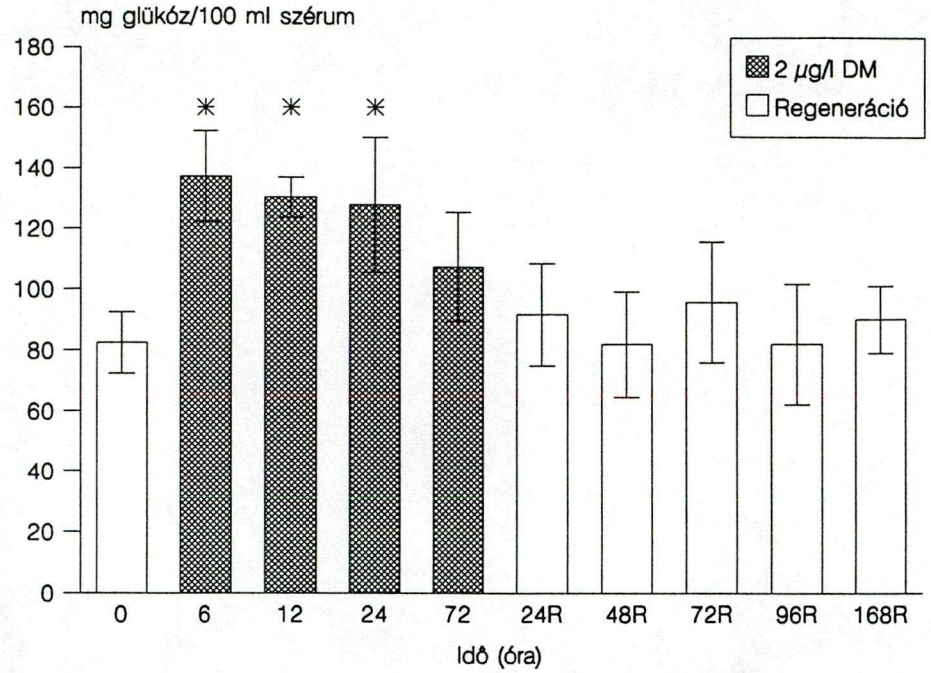
52. ábra DM kezelés és regeneráció hatása a GOT aktivitására

Megjegyzés. A halakat 2.0 µg/l DM-nel kezeltük 3 napig 12 ± 1 °C-on. A GOT aktivitások értékeit mU/mg fehérjében adtuk meg 6-8 pontyból származó mérés átlagaként (±S.D.). A kezelt halak értékei szignifikánsan különböznek a kontrolltól (Student *t* teszt, $^{*}P < 0.05$, $^{+}P < 0.01$), amit a következő szimbólumokkal jelöltünk: * és $^{+}$. A kísérleti körülményeket lásd az "Anyagok és módszerek" című fejezetben.



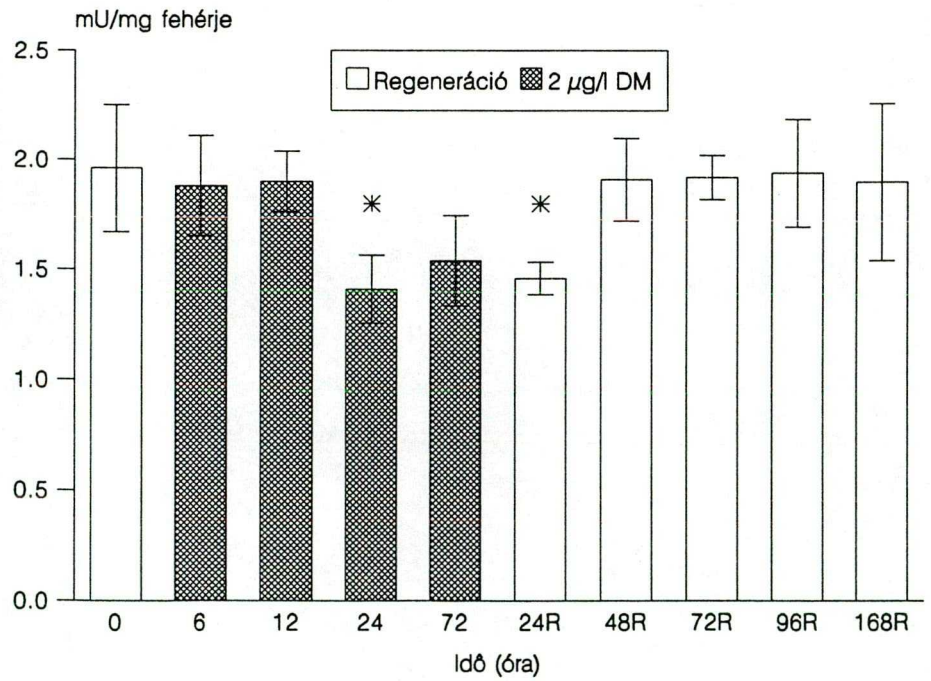
53. ábra DM kezelés és regeneráció hatása az LDH aktivitására

Megjegyzés. A halakat 2.0 µg/l DM-nel kezeltük 3 napig 12 ± 1 °C-on. Az LDH aktivitások értékeit mU/mg fehérjében adtuk meg 6-8 pontyból származó mérés átlagaként (±S.D.). A kezelt halak értékei szignifikánsan különböznek a kontrolltól (Student *t* teszt, $P < 0.05$), amit a következő szimbólummal jelöltünk: *. A kísérleti körülményeket lásd az "Anyagok és módszerek" című fejezetben.



54. ábra DM kezelés és regeneráció hatása a vércukorszint alakulására

Megjegyzés. A halakat 2.0 µg/l DM-nel kezeltük 3 napig 12 ± 1 °C-on. A vércukorszint értékeit mg glükóz/100 ml szérumban adtuk meg 6-8 pontyból származó mérés átlagaként (±S.D.). A kezelt halak értékei szignifikánsan különböznek a kontrolltól (Student *t* teszt, $P < 0.05$), amit a következő szimbólummal jelöltünk: *. A kísérleti körülményeket lásd az "Anyagok és módszerek" című fejezetben.



55. ábra DM kezelés és regeneráció hatása az AChE aktivitására

Megjegyzés. A halakat 2.0 µg/l DM-nel kezeltük 3 napig 12 ± 1 °C-on. Az AChE aktivitások értékeit mU/mg proteinben adtuk meg 6-8 pontyból származó mérés átlagaként (±S.D.). A kezelt halak értékei szignifikánsan különböznek a kontrolltól (Student *t* teszt, $P < 0.05$), amit a következő szimbólummal jelöltünk: *. A kísérleti körülményeket lásd az "Anyagok és módszerek" című fejezetben.

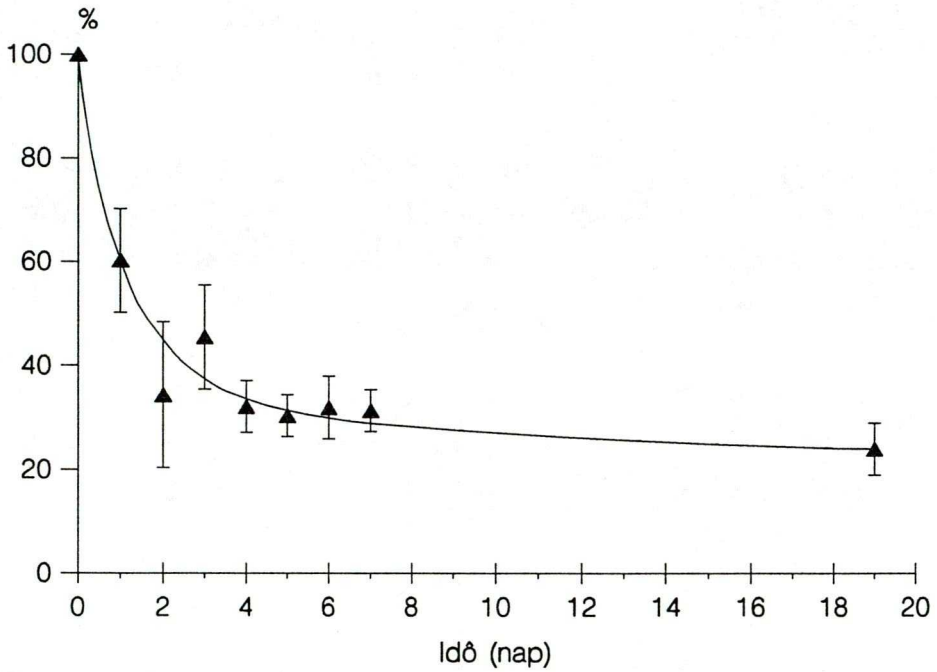
5.6 A methidation bomlásának, illetve a deltamethrin és a methidation akkumulációjának meghatározása

Vizsgáltuk ponty szöveteiben a DM és MD akkumulációját, valamint a MD bomlását csapvízben. 2 μg/l 3 napos DM kezelés után DM-t nem tudtunk kimutatni a pontyok szöveteiben, holott mérésünk érzékenysége 0.002 mg/1000 g nedves szövet volt az agy és a szív esetében, míg a többi szövetnél 0.0005 mg/1000 g nedves szövet. DM akkumulációját még a magasabb zsírtartalmú szövetekben sem mértük, ahol pedig a lipofil karakterű vegyületek leginkább felhalmozódnak.

A DM származékok gyors eltűnése a természetes vizekből jól ismert jelenség. Ez egy kétfázisú folyamat, melyben a kezdeti fázis csak kb. 5 percet vesz igénybe labóratóriumi körülmények között (Caquet és mtsai, 1992). Természetes körülmények között a DM féléletideje 2-4 órának adódott halastavakban, és 7 nap múltán már egyáltalán nem is lehetett kimutatni (Muir és mtsai, 1985). Maguire és mtsai (1989) szerint a féléletidő még kisebb, kb. 1 óra, és csak 1%-át találta 24 óra után az eredeti mennyiségnek szabadföldi kísérleti tavakban. A DM akkumulációja a vízi szervezetekben csak átmeneti jellegű és nagyon kismérvű (Caquet és mtsai, 1992). A WHO megbízásából végeztek kísérleteket törpeharcsával: egy olyan elárasztott területre helyezték őket, ahol korábban a normális DM dózis tízszeresét használták (WHO, 1990). Habár a DM koncentrációját a tóban 2.19 μg/l-nek mérték (háromszorosa az akut 96 órás LC_{50} értéknek (0.63 μg/l törpeharcsa esetén)), egyetlen hal sem pusztult el. Más vizsgálatok szerint (Muir és mtsai, 1985), a DM ugyan akkumulálódott a halakban, de a kezelés befejezése után a szövetek DM tartalma nagyon gyorsan csökkent, s látható mérgezési tünetek nem kísérték az akkumulációt. Ezen kísérletek s a mi méréseink is azt erősítik meg, hogy a DM akkumulációja elhanyagolható a halakban, valószínűleg a gyors lebontásuk miatt (Schimmel és mtsai, 1983), ami azonban eltérő az emlősökétől (Edwards és Millburn, 1985). Látható, hogy a DM szabadföldi használatban nem annyira toxikus, mint az pl. a mi labóratóriumi eredményeinkből is várható lenne.

Megvizsgáltuk a MD csapvízben történő bomlását (56. ábra). Megállapítottuk, hogy a MD kezdetben viszonylag gyorsan bomlik, hiszen 24 óra után az eredeti mennyiség 60%-át találtuk. Később azonban a bomlási folyamat lelassult (96 óra után 32%); 1 hét után is még 31%-nyi MD-t tartalmazott a víz. A bomlás elhúzódó voltát jelezte, hogy 19 nap után is még az eredeti mennyiség negyedét mértük. Megvizsgálva a MD akkumulációját különböző szervekben 5 napos 2 mg/l koncentrációjú MD kezelést követően, kiderült, hogy elsősorban a zsírban gazdagabb szövetekben halmozódott fel (57. ábra). Ilyen a májszövet (2.34 mg MD/1000 g nedves szövet), ahol nagyobb koncentrációban találtunk MD-t a kezelés koncentrációjához képest. Jelentős MD mennyiség halmozódott fel az

ikrában is (1.94 mg MD/1000 g nedves szövet). Ezzel szemben a szívizomban kismértékben halmozódott fel (0.30 mg MD/1000 g nedves szövet), míg a vázizomban detektálhatatlan volt (<0.005 mg/1000 g nedves szövet). A különbség egyrészt a vázizomban lezajló gyors anyagcsere folyamatokra vezethető vissza. A MD a vázizomban nem tud felhalmozódni, főleg a gyorsmozgású folyami halakban, de kísérleteink szerint a pontyban sem. Másrészt a szív lipidtartalma magasabb, ami elősegítheti a MD raktározását, beépülését a szövetbe.

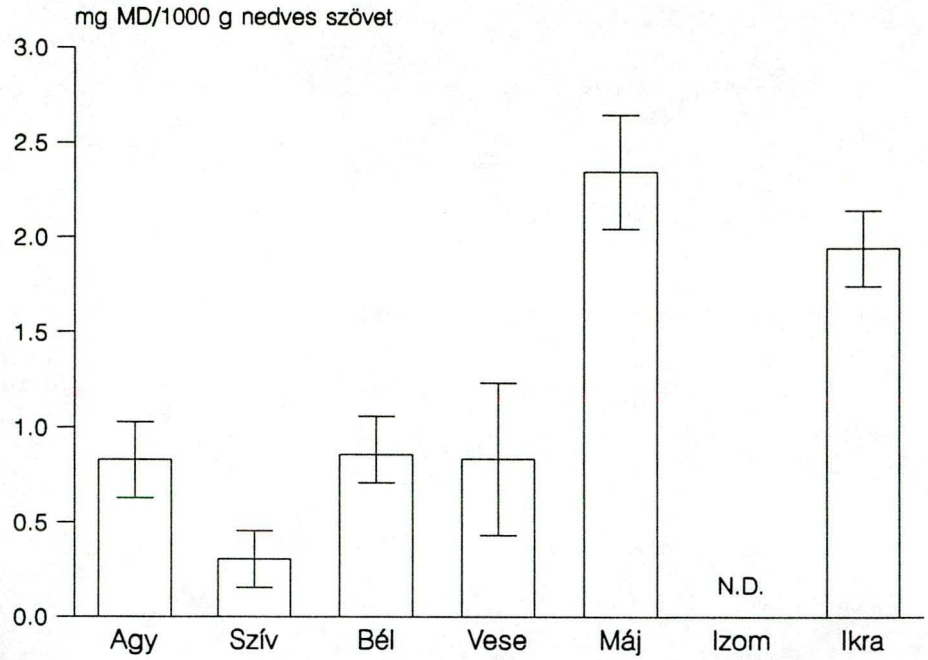


56. ábra MD bomlása csapvízben akváriumi körülmények között 12 ± 1 °C-on

Megjegyzés. A MD kezdeti koncentrációja 5 mg/l (ppm) volt, amit 100%-nak vettünk. Az értékek (±S.D.) négy mérés átlagát tükrözik. Az akváriumot folyamatosan levegőztettük, és a mintákat 1 liter vízből határoztuk meg az "Anyagok és módszerek" fejezetben leírtak szerint.

Az általunk is mért gyors és nagymértékű akkumuláció jól egyezik irodalmi adatokkal (Habig és mtsai, 1986). A legnagyobb mennyiséget ők is a májban találták, a legkevesebbet az izomban. A foszforsavészterek kiürülése a szervezetből kétfázisú: a gyors kezdeti csökkenés a kezelés végét követő 7. nap körül jelentősen lelassul (Cleveland és Hamilton, 1983). A foszforsavészterek féléletideje eltérő a különböző szövetekben: leggyorsabban a májból, leglassabban az izomból tűnik el (Habig és mtsai, 1986). Ez valószínűleg a metabolizmus mértékének eltérő aktivitását mutatja.

Összegezve elmondhatjuk, hogy a MD-t, szemben a DM-nel, magasabb koncentrációban mutattuk ki a halak szöveteiben. Ennek egyrészt a MD nagymértékű és gyors akkumulációja, másrészt viszonylag lassúbb eliminációja az oka.



57. ábra A különböző ponty szövetek MD tartalma 5 napos kezelést követően

Megjegyzés. A halakat (n = 4) 2 mg/l MD-nal kezeltük 12 ± 1 °C-on. Az akváriumot folyamatosan levegőztettük, és a mintákat 1 g nedves szövetből preparáltuk az "Anyagok és módszerek" fejezetben leírtak szerint. Az értékeket (±S.D.) mg MD/1000 g nedves szövetben adtuk meg (N.D. = nem detektálható mennyiség: <0.005 mg MD/1000 g nedves szövet).

5.7 Az AChE gátlásának nyomon követése Koelle módszerével

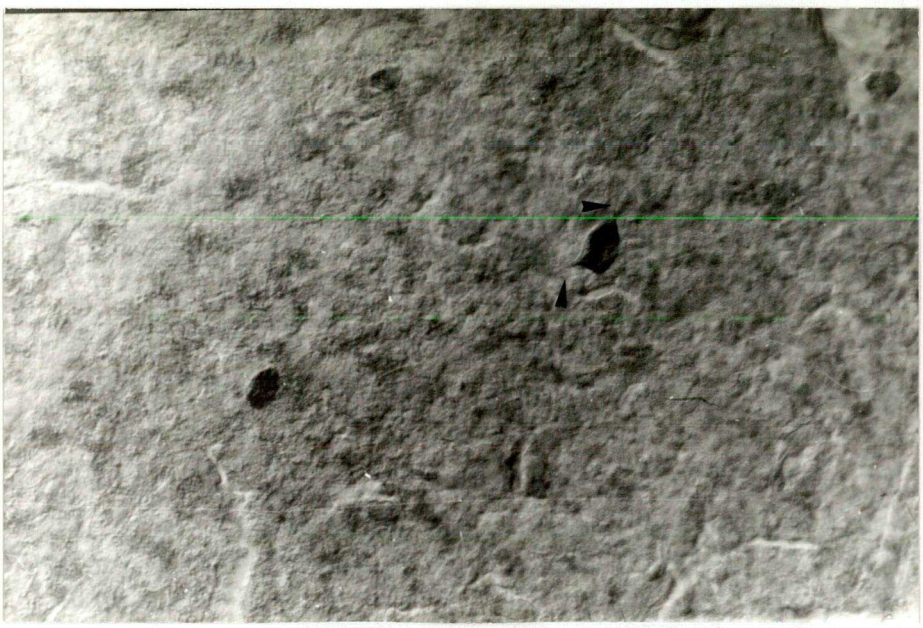
Az acetilkolin igen elterjedt neurotranszmitter mind a központi, mind a perifériás idegrendszerben (pl. a neuromuscularis junkciókban). Ennek az ingerületátvivő anyagnak a bontását végzi az AChE. Ez az enzim az idegsejtek perikarionjában termelődik és axonális transzporttal szállítódik a szinapszisok felszínéhez, így gyakorlatilag az idegsejtek központi része és nyúlványai is festődtek a halak agyszövetében (1. kép). Arra a kérdésre kerestük a választ, hogy a kinetikai vizsgálatokban kimutatott AChE gátlás vajon hogyan fejeződik ki szöveti szinten. Ezért AChE hisztokémiai festést végeztünk el a kontroll, 2 μg/l DM-nel 3 napig és 2 mg/l MD-nal 5 napig kezelt halak agy- és vázizom szövetében, valamint 2 mg/l MD-nal 7 napig és 5 mg/l PQ-tal és $CuSO_4$-tal szintén 7 napig kezelt ponty bélszövetében. Így vizsgálni tudtuk a kolinerg rendszerben a peszticidek hatására bekövetkező változásokat. A kontroll vizsgálattal szemben a DM-nel kezelt állatok agyszöveteiben a kolinerg idegsejtek egy része, míg a MD-nal kezelt állatok idegsejtjeinek jelentős része nem mutatott festődést, jelezvén az ott lévő AChE gátlódását (2. és 3. kép.). Az acetilkolin azonban nemcsak az idegsejtek egymás közötti kapcsolataiban vesz részt, hanem fontos szerepet játszik az idegsejt-izomsejt közötti kapcsolatokban, a neuromusculáris junkciókban. A kontroll izomszövetről készült felvételen jól láthatók a pozitív reakciót jelző sötét reakciótermék-foltok az izomsejtek szarkolemmáján (4. kép). A DM-nel kezelt állatok izomszövetei kissé gyengébb reakciót adtak (5. kép). A MD-os kezelés azonban jelentős AChE gátlást okozott a neuromuscularis junkcióban is, amit az igen gyenge festődés jelez (6. kép). Vagyis a MD detektálhatóan csökkenti az AChE aktivitását mind az idegszövetben, mind az ideg-izom ingerületátvivő sejtkapcsolatokban, és zavart okoz az idegrendszerben, illetve a mozgás szervrendszer működésében.

A pontybél AChE tartalmának döntő hányada a bélfal simaizomzatának a felszínén, a neuronhálózat alapvető hidrolizáló enzimeként fordul elő. Fontos szerepet játszik a paraszimpatikus, kolinerg típusú idegvégződések működésében, különösen a szinapszisoknál, ahol lazán kapcsolódik a posztszinaptikus membránhoz.
A ponty tápcsatornájának kolinerg beidegzése eltérő más, több harántcsíkolt elemet tartalmazó halfajétól. Harántcsíkolt fibrillumokat a nagyon rövid nyelőcsőben találhatunk, bélcsatornájának többi részét hosszanti és körkörös lefutású simaizomsejtek alkotják (Halasy és mtsai, 1989). A fénymikroszkópos felvételeken egy idegrostokból és perikarionokból álló hálózat rajzolódik ki. A fő ideghálózat párhuzamos lefutású a tápcsatorna hosszanti tengelyével. A vastagabb longitudinális kötegeket vékony transzverzális idegek kötik össze (7. kép), amelyek közül néhány áttörve a bél szövetrétegeit eléri a mikrovillusok végét az epithel réteg alatt. A festett sejtek nagy része a longitudinális izomrétegen kívül, vagy a longitudinális és a cirkuláris izomréteg

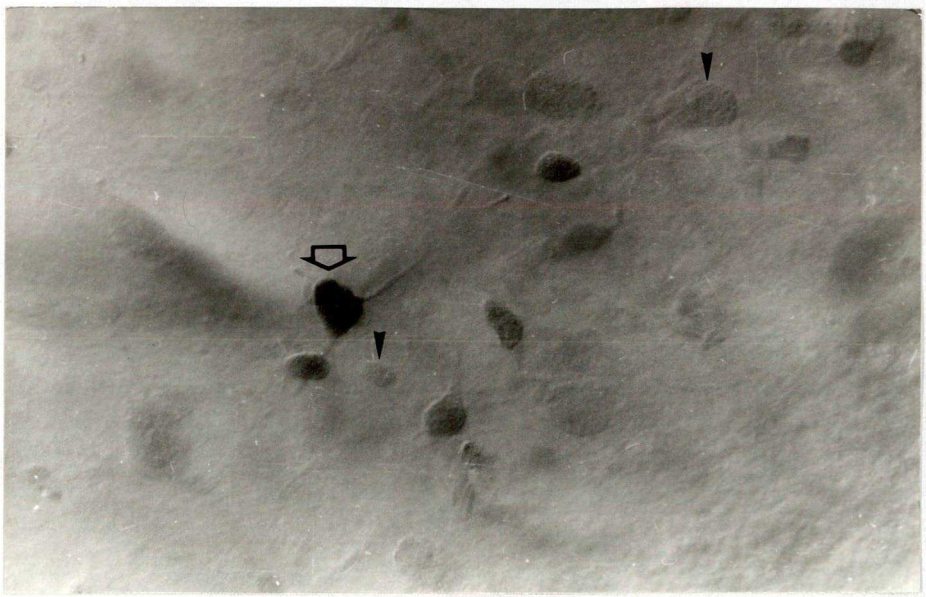
között található. Ezek szétszórtan, egyesével vagy kisebb csoportokban helyezkednek el (8. kép).

A $CuSO_4$-tal történt kezelés nem változtatta meg jelentősen a metszetek festődését, az enzimaktivitás kismértékű változásai ezzel a módszerrel nem jelezhetők (9. kép). A PQ expozíciónak kitett halakból származó preparátum festődése nagyon hasonló volt a kontrollhoz, legalábbis az áttekintő képen, kis nagyításban (10. kép). Nagyobb nagyításban azonban valamivel gyengébb a festődés, kevesebb reakcióterméket figyelhetünk meg a sejttesten belül és körülötte egyaránt (11. kép).

Jól észlelhető a MD hatása: a metszeteken AChE-ra specifikus festődést nem láttunk (12. kép), utalva az AChE aktivitásának jelentős csökkenésére. Nagy felbontásban halványan látható a sejttest, az idegek lefutása azonban nem (13. kép). Különbségeket az egyes bélszakaszok között nem tudtunk észlelni a felvételeken.



1. kép Kontroll hal agyszövete Koelle-féle festés után. 1000-szeres nagyítás. (Nyilak: a metszési sík alá bukó nyúlványok)
Megjegyzés. A felvételt Dr. Halasy Katalin (JATE Állattani Tanszék) készítette.



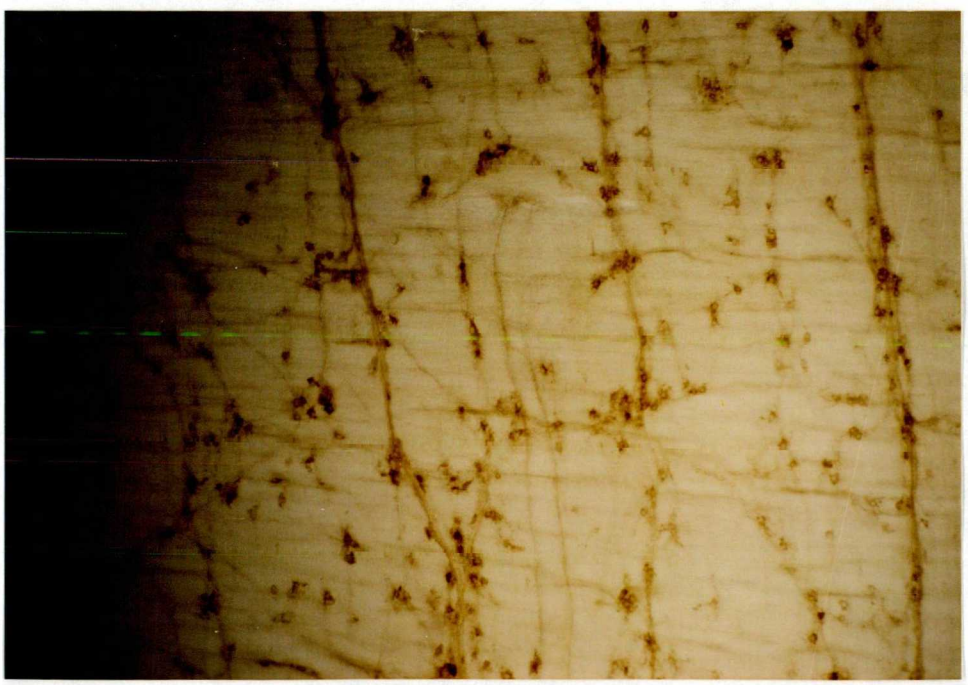
2. kép DM-nel kezelt hal agyszövete Koelle-féle festés után. 1000-szeres nagyítás. (Nyilak: nem festődött sejtek, üres nyíl: festődött sejt)
Megjegyzés. A pontyokat 2 μg/l DM-nel 3 napig 12 ± 1 °C-on kezeltük. A felvételt Dr. Halasy Katalin (JATE Állattani Tanszék) készítette.

3. kép MD-nal kezelt hal agyszövete Koelle-féle festés után. 1000-szeres nagyítás. (Nyilak: nem festődött sejtek)
Megjegyzés. A pontyokat 2 mg/l MD-nal 5 napig 12 ± 1 °C-on kezeltük. A felvételt Dr. Halasy Katalin (JATE Állattani Tanszék) készítette.

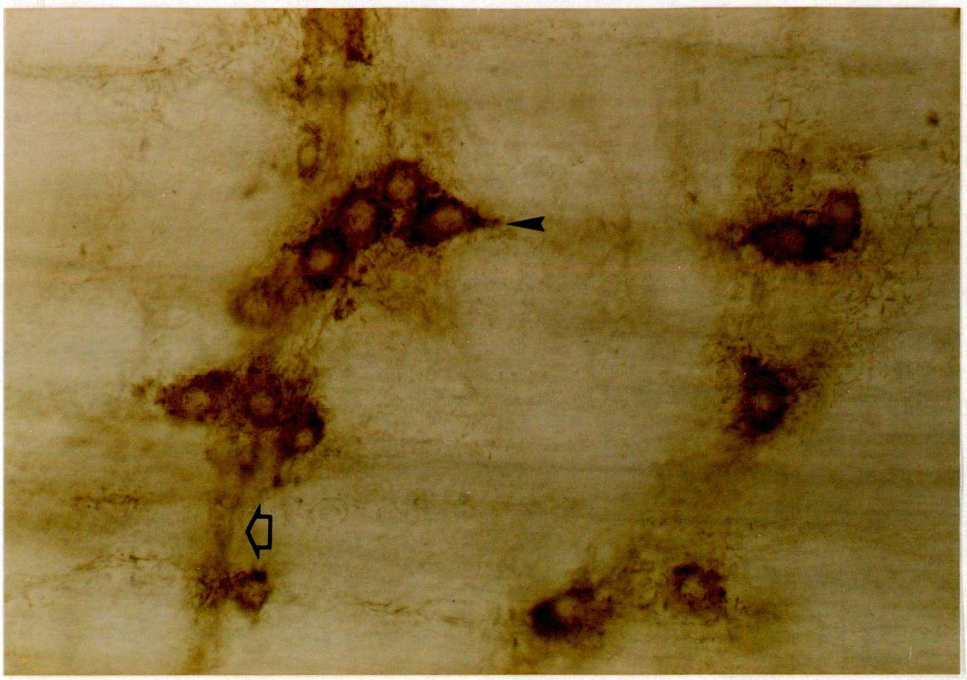
4. kép Kontroll hal vázizomszövete Koelle-féle festés után. 500-szoros nagyítás. A képen jól kivehetőek a reakciótermékek a szarkolemmán.
Megjegyzés. A felvételt Dr. Halasy Katalin (JATE Állattani Tanszék) készítette.

5. kép DM-nel kezelt hal vázizomszövete Koelle festés után. 1000-szeres nagyítás. (Nyíl: reakciótermék a szarkolemmán)
Megjegyzés. A pontyokat 2 μg/l DM-nel 5 napig 12 ± 1 °C-on kezeltük. A felvételt Dr. Halasy Katalin (JATE Állattani Tanszék) készítette.

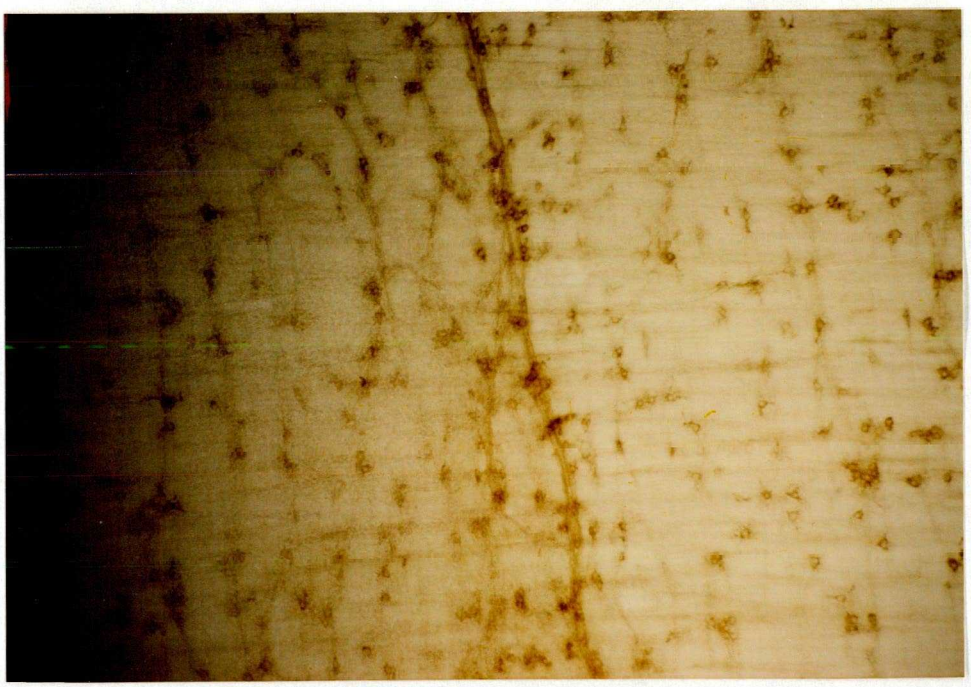
6. kép MD-nal kezelt hal vázizomszövete Koelle-féle festés után. 1000-szeres nagyítás. (Nyíl: minimális reakciótermék a szarkolemmán)
Megjegyzés. A pontyokat 2 mg/l MD-nal 5 napig 12 ± 1 °C-on kezeltük. A felvételt Dr. Halasy Katalin (JATE Állattani Tanszék) készítette.



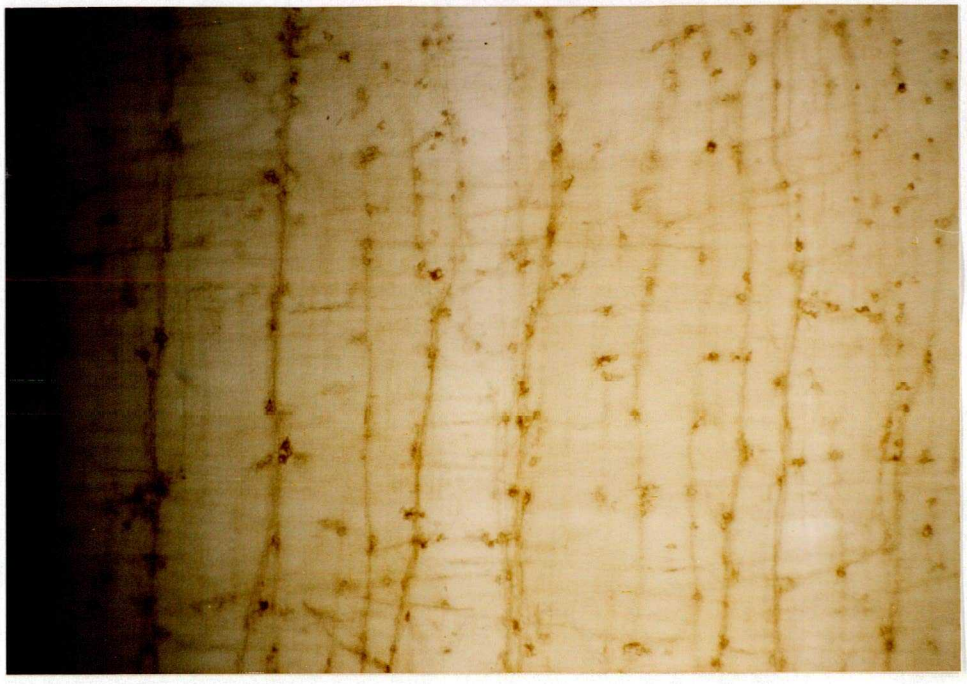
7. kép Kisnagyítású áttekintő kép pontybél izomrétegeinek AChE-pozitív idegelemeiről. 200-szoros nagyítás.
Megjegyzés. A felvételt Dr. Halasy Katalin (JATE Állattani Tanszék) készítette.



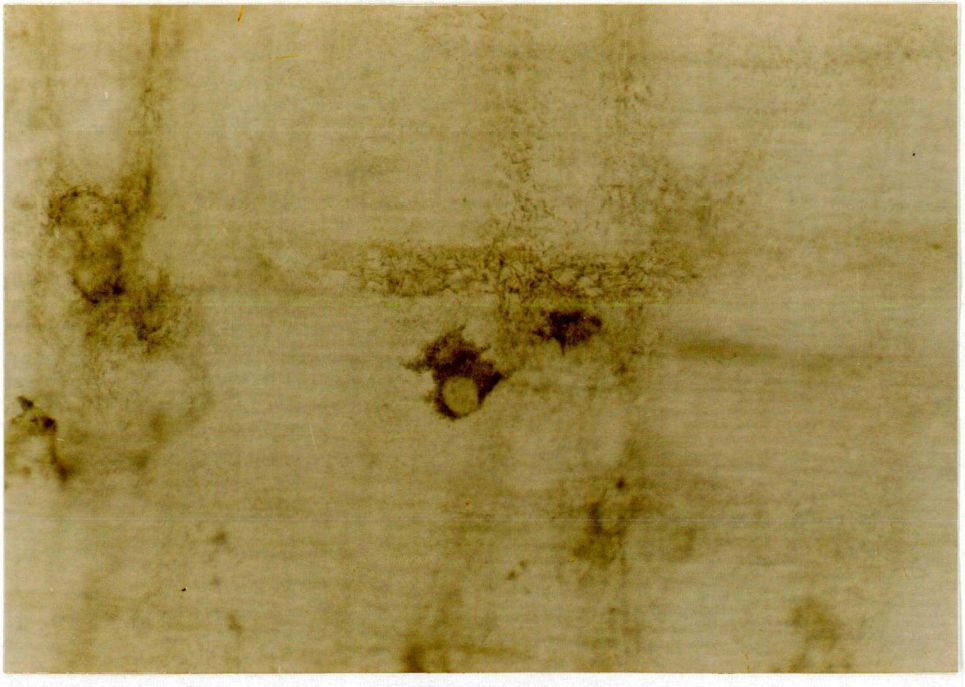
8. kép Erősen AChE-pozitív sejttestek csoportja (nyilak) ponty mienterikus plexusában gyengébben festődött idegek (üres nyilak) mentén. 1280-szoros nagyítás.
Megjegyzés. A felvételt Dr. Halasy Katalin (JATE Állattani Tanszék) készítette.



9. kép $CuSO_4$-tal történt kezelést követően a metszeten az AChE-pozitív elemek festődésében nincs szignifikáns eltérés a kontrollhoz képest. 200-szoros nagyítás.
Megjegyzés. A pontyokat 5 mg/l $CuSO_4$-tal 7 napig 12 ± 1 °C-on kezeltük. A felvételt Dr. Halasy Katalin (JATE Állattani Tanszék) készítette.



10. kép A kontrollhoz hasonló sejtcsoport PQ-os expozíció utáni festődése nem különbözik szembetűnően a nem kezelt mintákétól az áttekintő képen. 200-szoros nagyítás.
Megjegyzés. A pontyokat 5 mg/l PQ-tal 7 napig 12 ± 1 °C-on kezeltük. A felvételt Dr. Halasy Katalin (JATE Állattani Tanszék) készítette.



11. kép PQ-tal kezelt állatok tápcsatornájából készített Whole-mount preparátum nagy felbontású képe AChE pozítiv idegsejttel. 1280-szoros nagyítás.
Megjegyzés. A pontyokat 5 mg/l PQ-tal 7 napig 12 ± 1 °C-on kezeltük. A felvételt Dr. Halasy Katalin (JATE Állattani Tanszék) készítette.

12. kép A methidationnal kezelt állatok mienterikus plexusából eltűnt az AChE-pozitív festődés. 200-szoros nagyítás.
Megjegyzés. A pontyokat 2 mg/l MD-nal 7 napig 12 ± 1 °C-on kezeltük. A felvételt Dr. Halasy Katalin (JATE Állattani Tanszék) készítette.

13. kép MD-os Whole-mount preparátumon nagy felbontásban halványan látható a sejttest (nyíl). 1280-szoros nagyítás.
Megjegyzés. A pontyokat 2 mg/l MD-nal 7 napig 12 ± 1 °C-on kezeltük. A felvételt Dr. Halasy Katalin (JATE Állattani Tanszék) készítette.

5.8 Májszövet károsodás kimutatása elektronmikroszkóppal

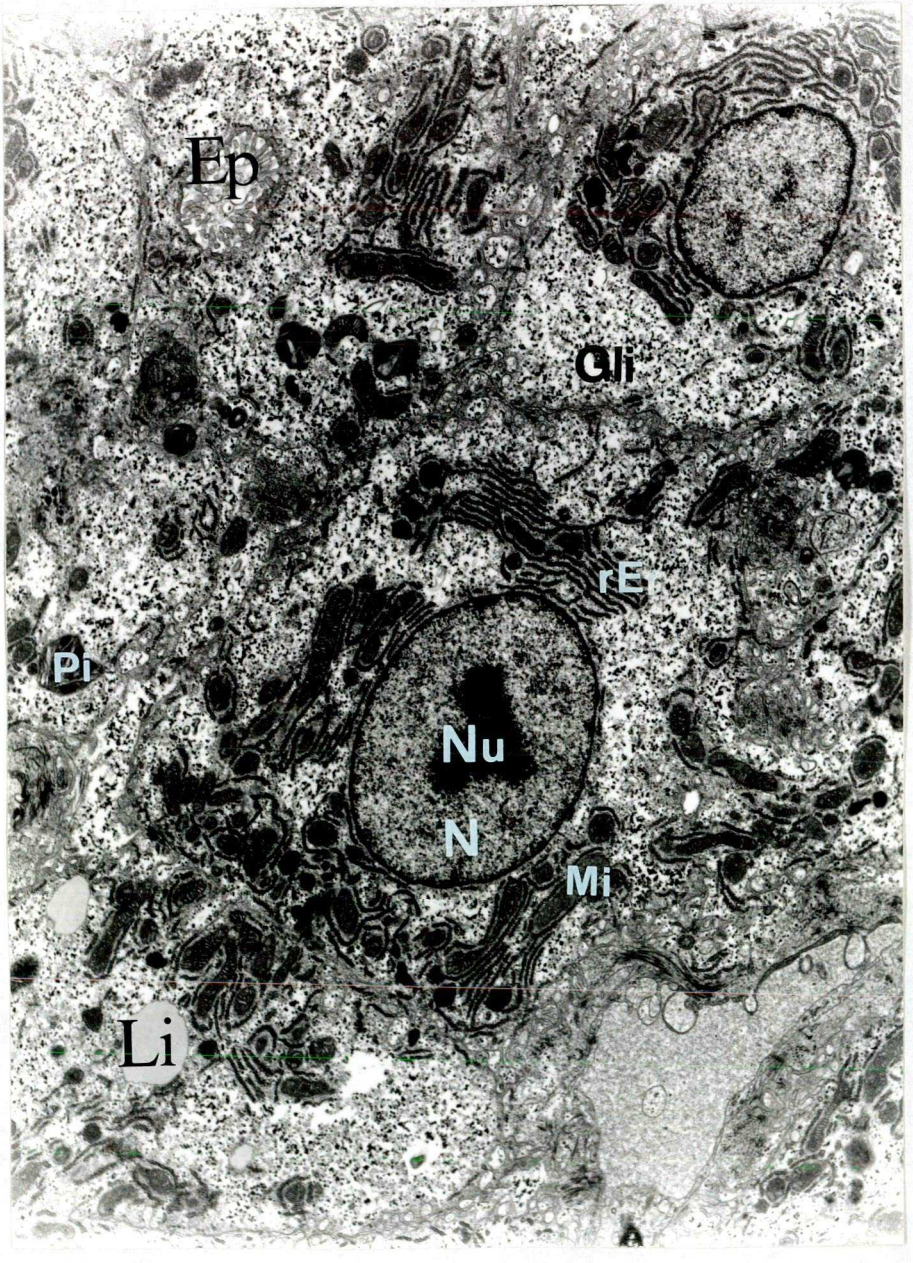
Az elektronmikroszkópos felvételeken a kontroll szövetekben jól láthatók a poligonális hepatociták, centrális helyzetű maggal, benne a nucleolusszal. A sejtorganellumoknál szembetűnő a mitokondriumok és a durvafelszínű endoplazmatikus retikulum (rEr) szoros kapcsolata. A citoplazmában nagyszámú glikogénszemcse, kevés epepigment és lipidcsepp figyelhető meg (14. és 15. kép). Az epekapillárisok lumen felé eső felszínén jól kivehetően rajzolódnak ki a mikrovillusok (16. kép). A kontroll állat májsejtjeinek a szinuszoid felé néző felszíne rendezetten mikrovilliális membránkitüremkedéseket képez. A Disse-térben kollagén rostnyalábok is megfigyelhetők (17. kép).

Deltamethrinnel kezelt hal májszövetében ún. sötét és világos sejteket különítettünk el. Mindkét sejttípusban a mitokondriumok ún. világos duzzadását figyeltük meg (18. kép). A kontrollhoz képest a mag alakja lebenyezetté vált, több heterokromatin jelent meg marginálisan és a magvacska körül (19. kép). Az epekapillárisok lumen felé néző sejtmembrán-mikrovillusai ritkábbak és rendezetlenebbek, mint a kontrollban (20. kép).

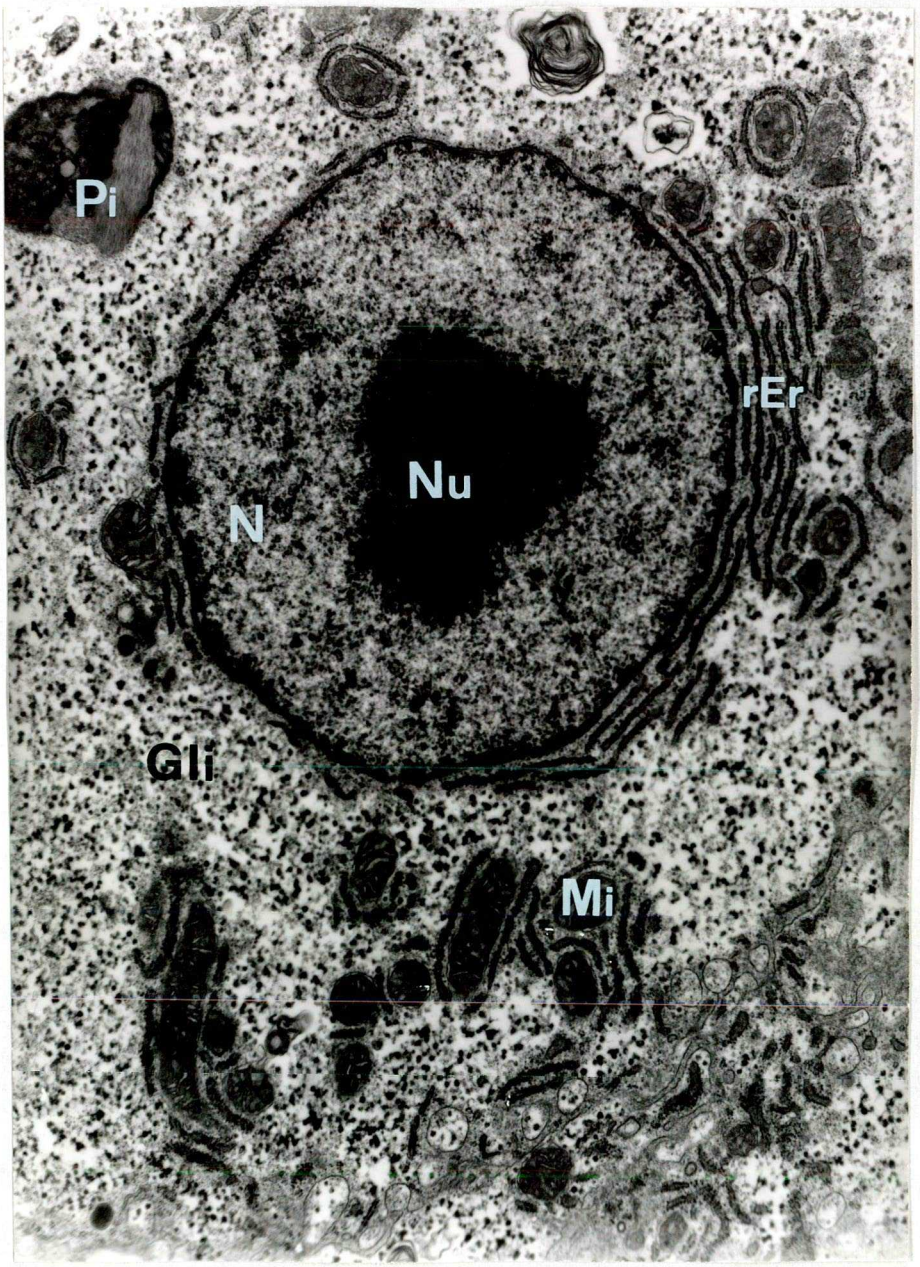
Methidation kezelést követően a citoplazmatikus sejtalkotók dezorganizációja mellett legszembetűnőbb a magok zsugorodása (21. és 22. kép), a lipid és epepigment felszaporodása (21. és 24. kép) volt. A mitokondriumok világos duzzadását és a glikogén csökkent mennyiségét itt is megfigyeltük (23. és 24. kép).

A magok károsodása utalhat a nukleinsav metabolizmusban bekövetkező változásokra, ami összefügghet a MD-nak az AChE *de novo* szintézisére kifejtett gátlásával (Lapis és Benedeczky, 1966; Stenram, 1969; Cisson és Wilson, 1981). A mitokondrium szerkezetében, illetve a rEr-mal való szoros kapcsolatában észlelhető elváltozások kapcsolatba hozhatók a csökkent energiaellátással, így zavar keletkezik a rEr-transzportban a fehérjék akkumulációját eredményezve a ciszternák lumenjében (Benedeczky és mtsai, 1986). A pigment akkumulációnak az inszekticidek okozta lipd peroxidáció fokozódása lehet az okozója. A korábban leírt (5.5.4 fejezet) - növényvédő szerek által kiváltott - glükóz növekedés a hal májban (hepatopankreász) bekövetkező elzsírosodás egyik következménye lehet. Ennek feltehetően a "pankreász" rész sérülése (lipid felszaporodás a pankreász sejtekben) az eredeti oka. Azt mondhatjuk, hogy a stressz reakció egy általános, a máj elzsírosodását követő reakció, ami a testnedvekben kimutathatóvá válik.

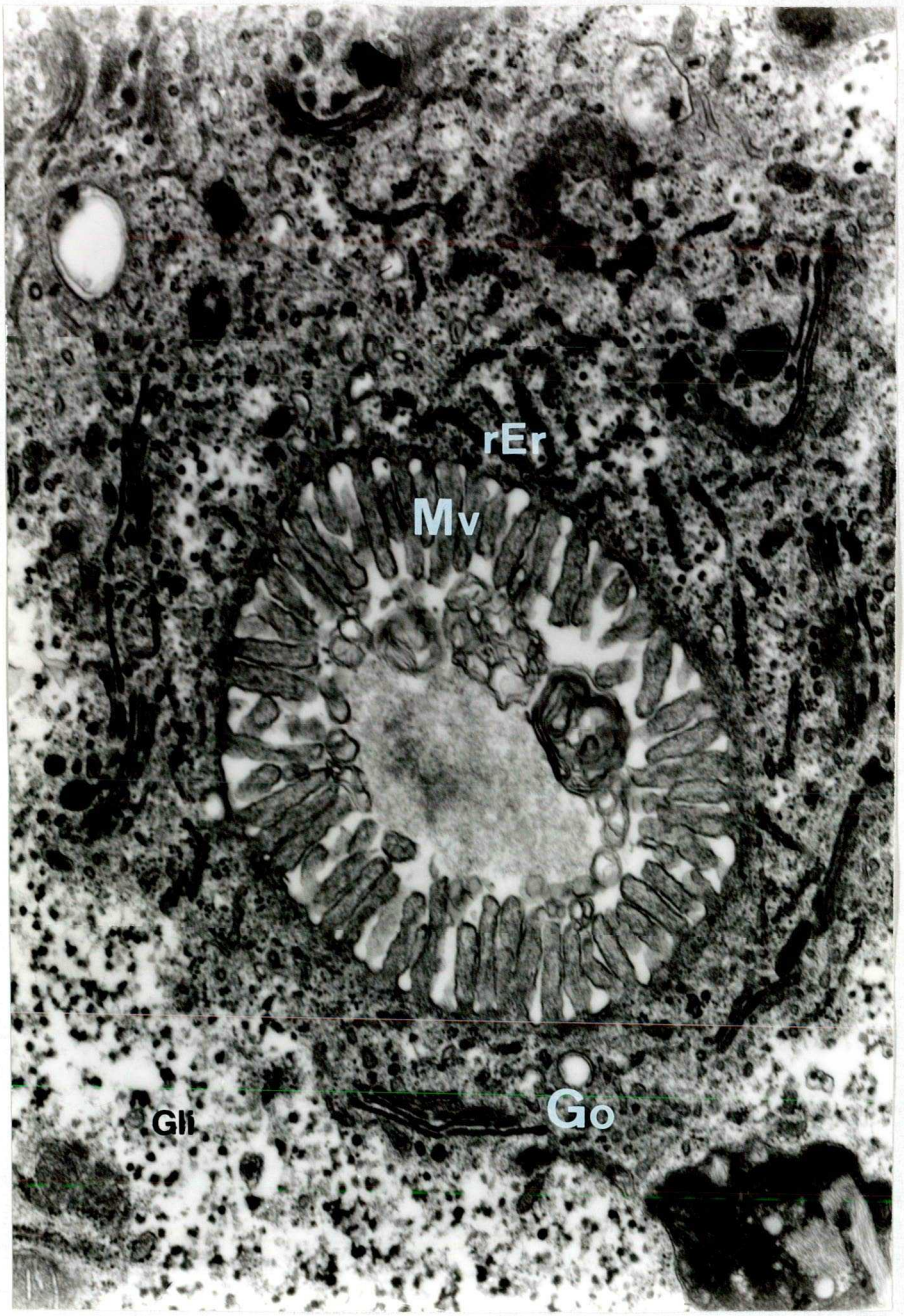
Összegezve elmondhatjuk, hogy az elektronmikroszkópos citopatológiás módszer segítségével mind a DM, mind a MD okozta korai celluláris és szubcelluláris elváltozások kimutathatók a májban. A jelzett változások kétségtelenül utalnak a fehérjeszintetizáló és az energia-ellátó sejtorganellumok kiterjedt károsodására.



14. kép Kisnagyítású kép kontroll májszövetről. 12000-szeres nagyítás. (N: nucleus, Nu: nucleolus, Mi: mitokondrium, rEr: durvafelszínű endoplazmatikus retikulum, Gli: glikogénszemcse, Pi: epepigment, Li: lipidcsep, Ep: intercelluláris epekapilláris)
Megjegyzés. A felvételt Dr. Halasy Katalin (JATE Állattani Tanszék) készítette.

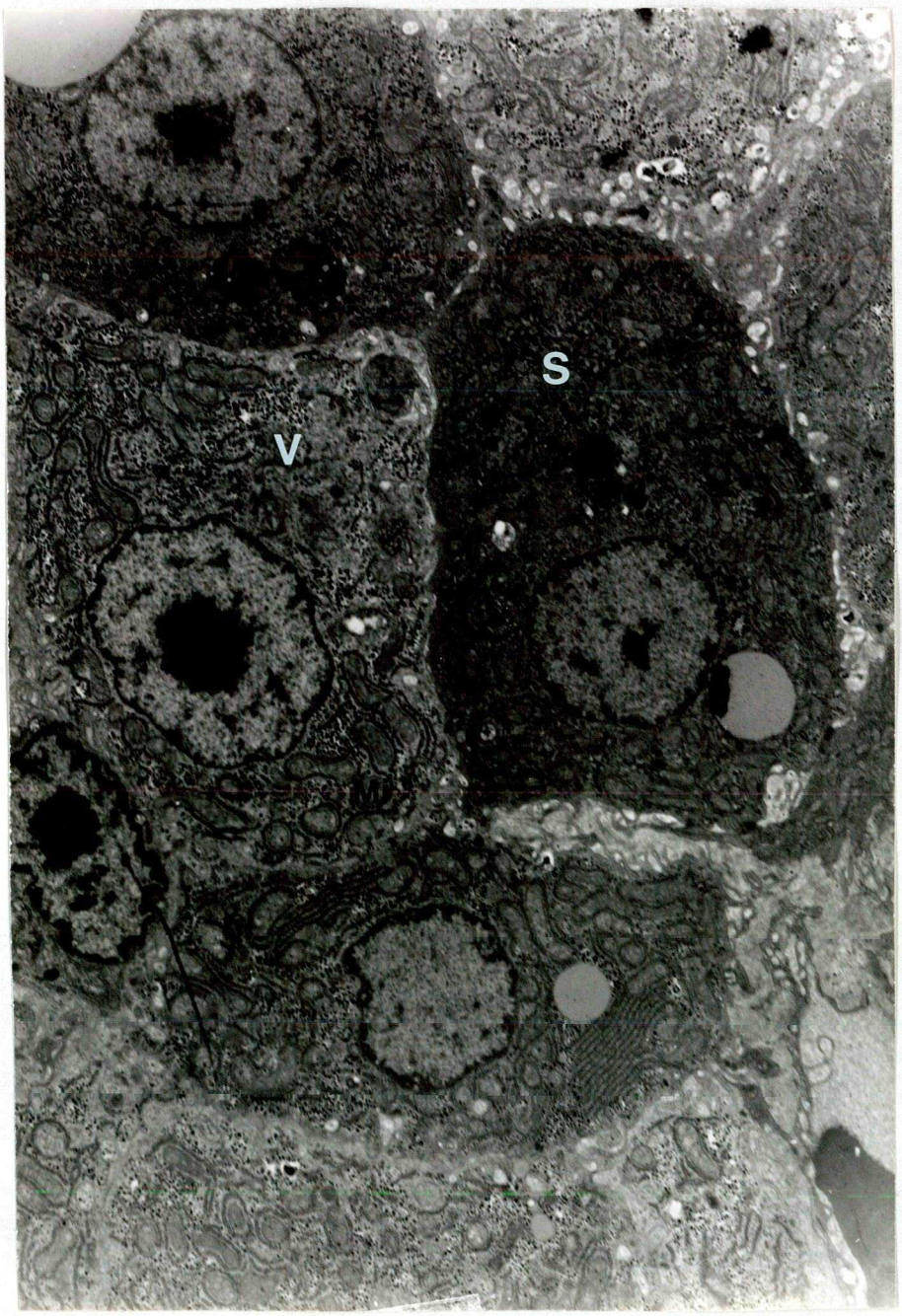


15. kép Kezeletlen hepatocita magközeli régiója. 26400-szoros nagyítás. (N: nucleus, Nu: nucleolus, rEr: durvafelszínű endoplazmatikus retikulum, Mi: mitokondrium, Gli: glikogén, Pi: epepigment)
Megjegyzés. A felvételt Dr. Halasy Katalin (JATE Állattani Tanszék) készítette.

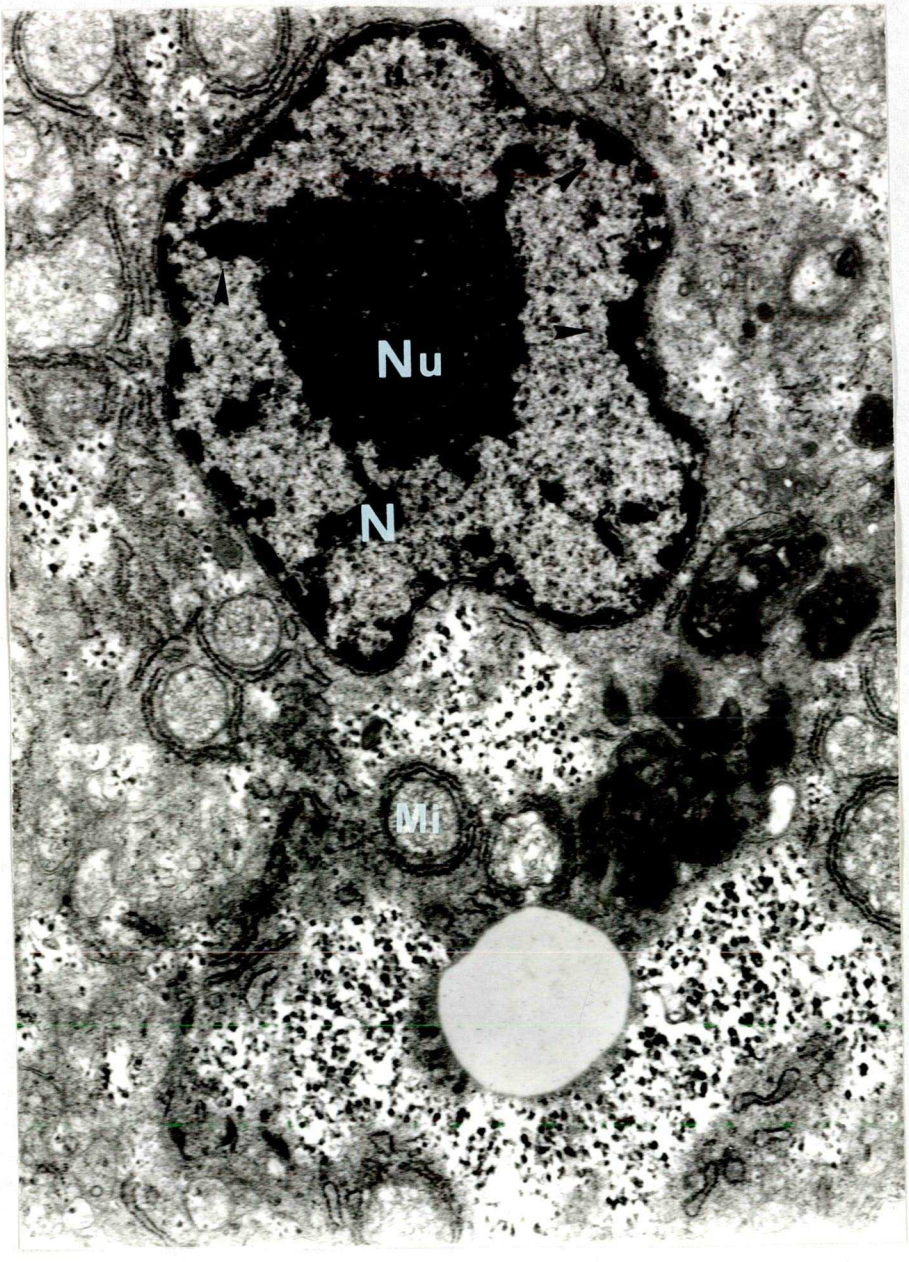


16. kép Intercelluláris epekapilláris kontroll májban. 60000-szeres nagyítás. (Mv: mikrovillusok, Gli: glikogén, Go: Golgi apparátus, rEr: durvafelszínű endoplazmatikus retikulum)
Megjegyzés. A felvételt Dr. Halasy Katalin (JATE Állattani Tanszék) készítette.

17. kép Májsejtek szinuszoid felé néző felszíne. 20800-szoros nagyítás. (Mv: mikrovillusok, Co: kollagén, Er: eritrocita, D: dezmoszómális sejtkapcsolat, Nyíl: endothel pórusa)
Megjegyzés. A felvételt Dr. Halasy Katalin (JATE Állattani Tanszék) készítette.



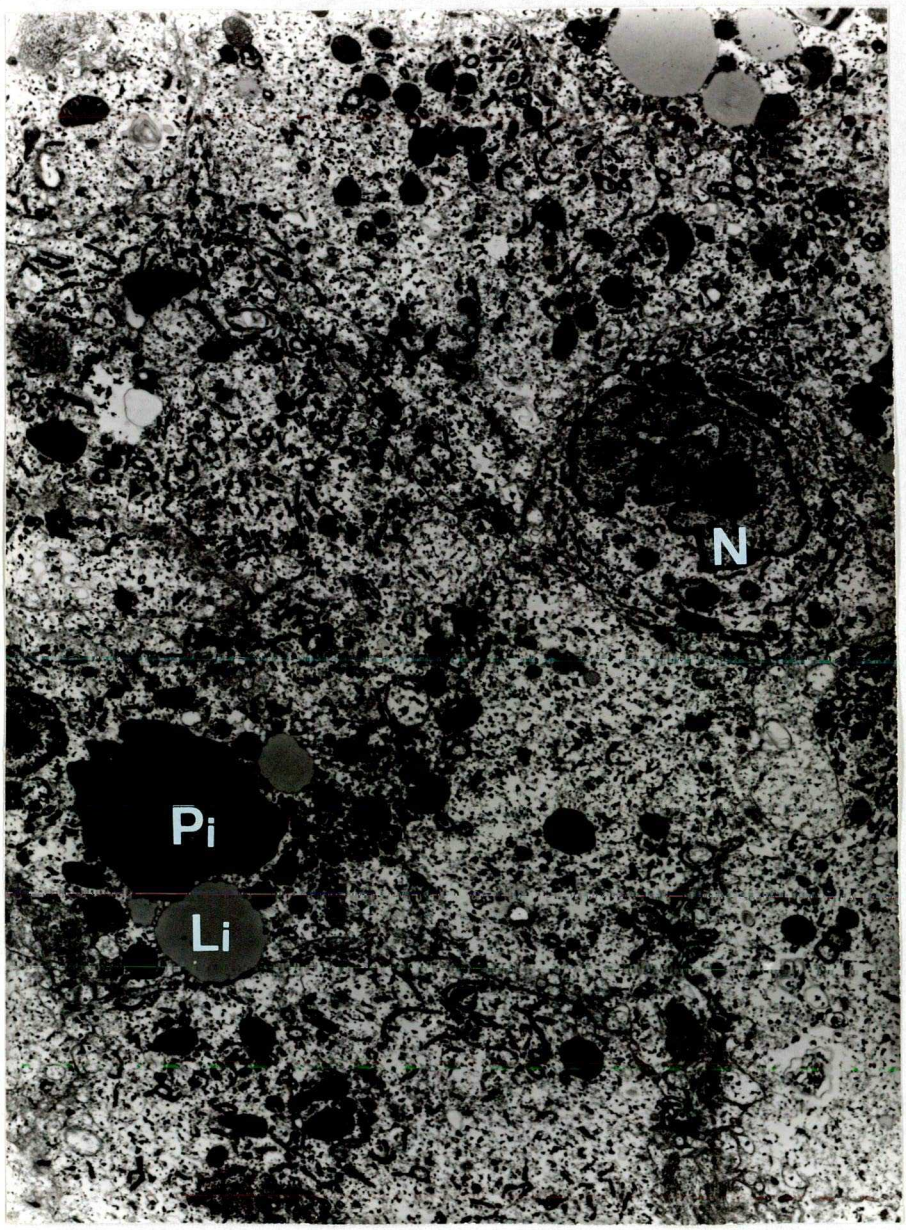
18. kép Átnézeti kép DM-nel kezelt ponty májsejtjeiről. 12000-szeres nagyítás.(S: sötét sejt, V: világos sejt, Mi: mitokondriumok)
Megjegyzés. A pontyokat 2 μg/l DM-nel 3 napig 12 ± 1 °C-on kezeltük. A felvételt Dr. Halasy Katalin (JATE Állattani Tanszék) készítette.



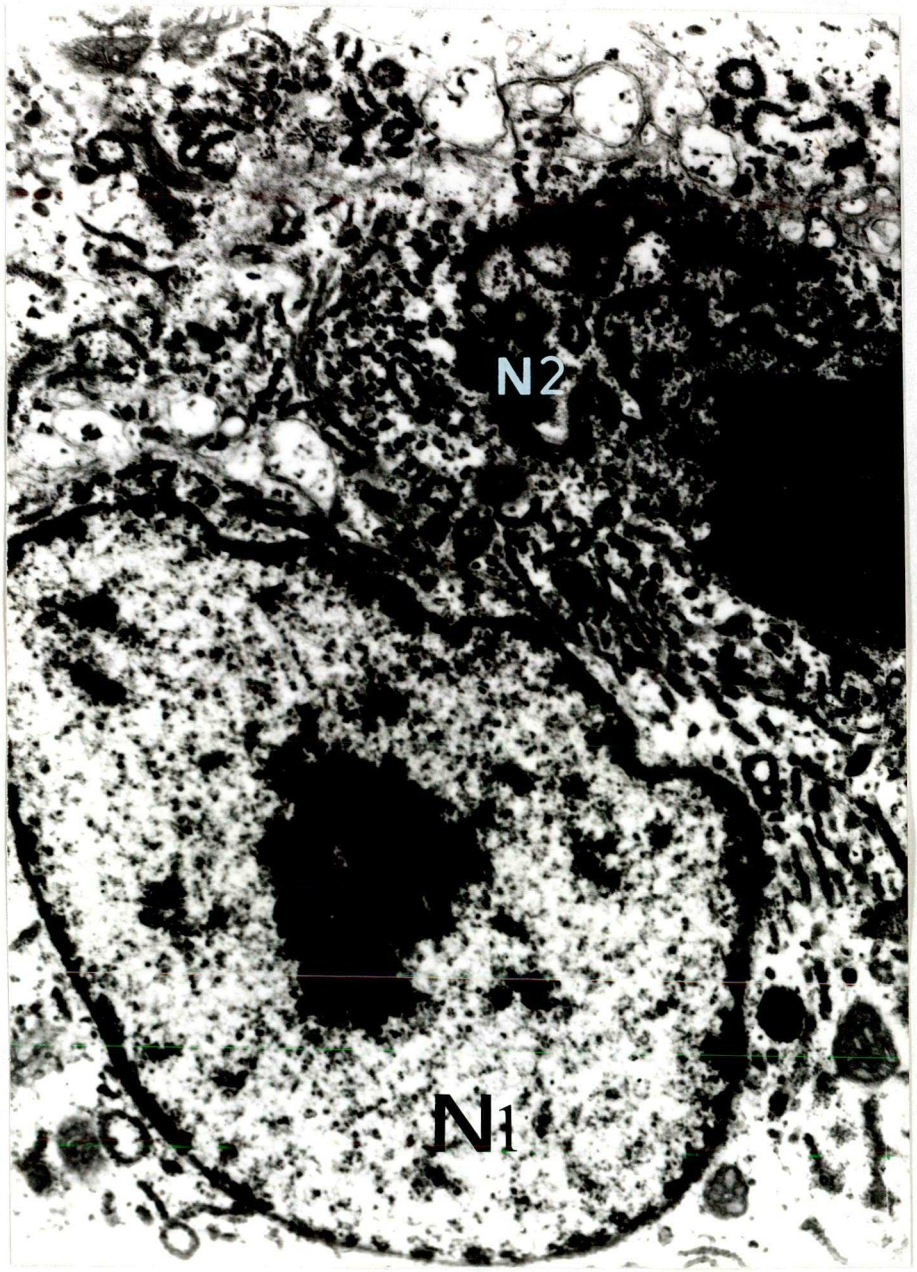
19. kép DM-nel kezelt ponty hepatocitájának károsodott sejtmagja. 36000-szeres nagyítás. (N: nucleus, Nu: nucleolus, Mi: mitokondrium, Nyilak: heterokromatin)

Megjegyzés. A pontyokat 2 μg/l DM-nel 3 napig 12 ± 1 °C-on kezeltük. A felvételt Dr. Halasy Katalin (JATE Állattani Tanszék) készítette.

20. kép DM-nel kezelt ponty májának intercelluláris epekapillárisa. 46000-szeres nagyítás. (Mv: mikrovillusok, My: myelin figurák)
Megjegyzés. A pontyokat 2 μg/l DM-nel 3 napig 12 ± 1 °C-on kezeltük. A felvételt Dr. Halasy Katalin (JATE Állattani Tanszék) készítette.

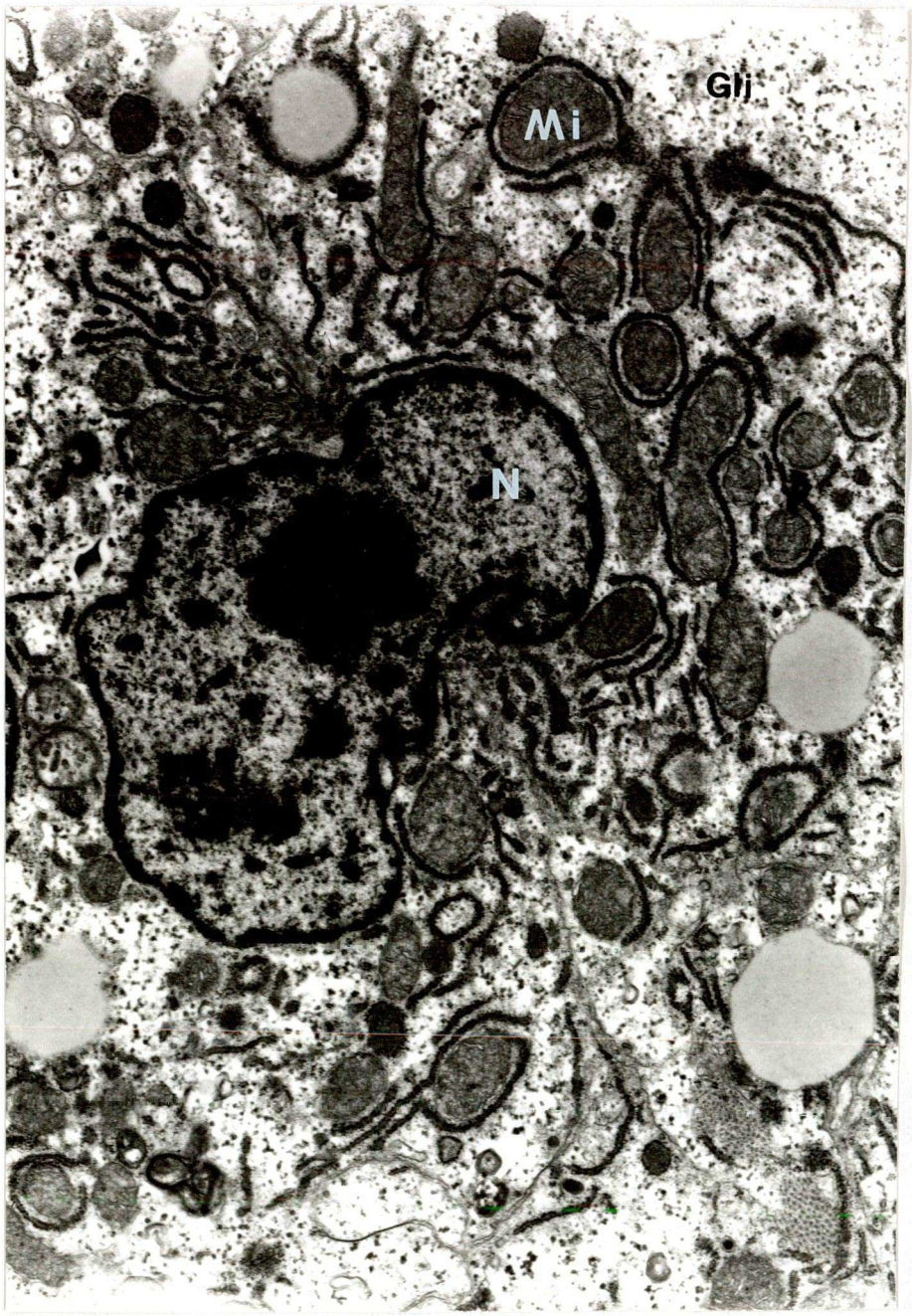


21. kép MD-nal kezelt ponty májának átnézeti képe. 12000-szeres nagyítás. (N: nucleus, Li: lipid, Pi: pigment)
Megjegyzés. A pontyokat 2 mg/l MD-nal 5 napig 12 ± 1 °C-on kezeltük. A felvételt Dr. Halasy Katalin (JATE Állattani Tanszék) készítette.

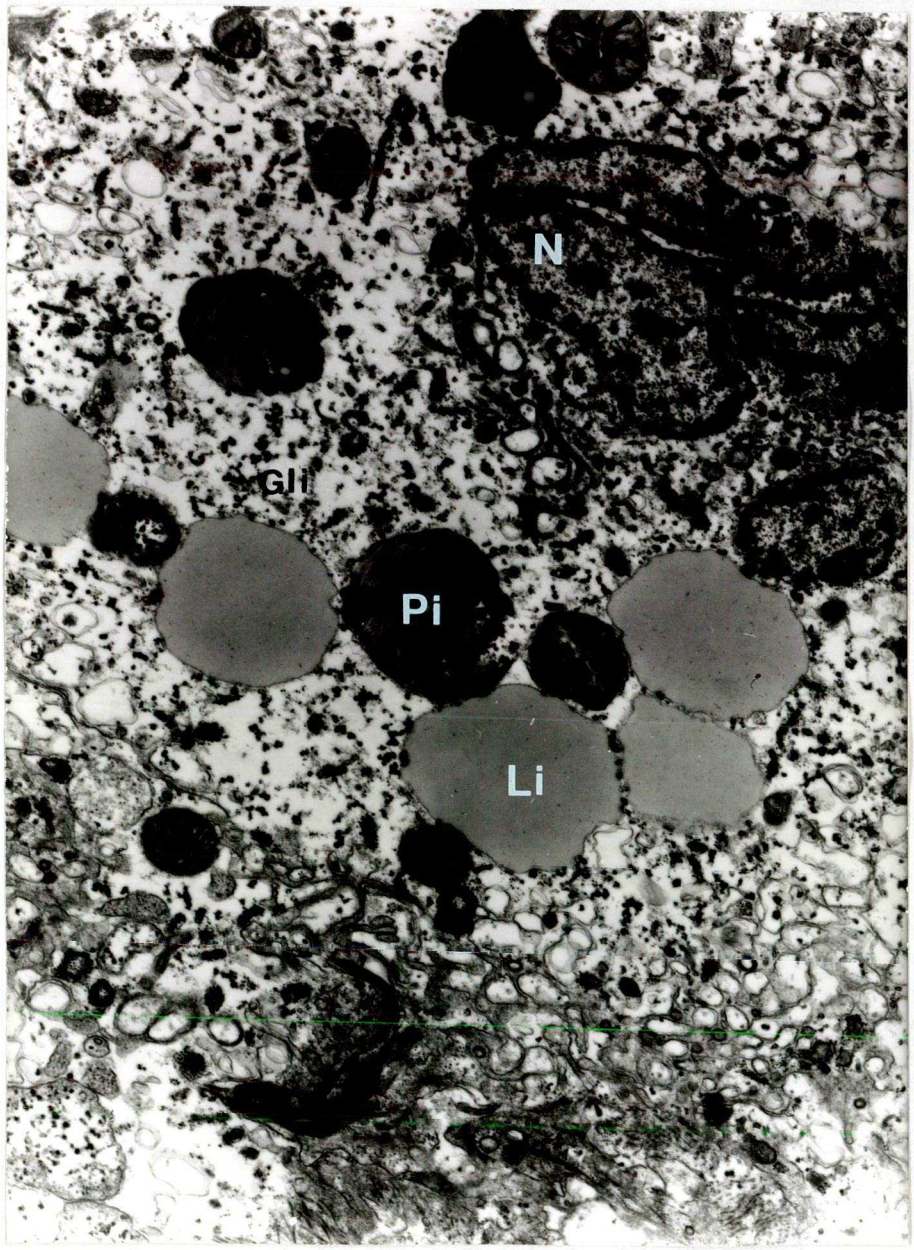


22. kép Két eltérő mértékben károsodott sejt MD kezelés után. 36000-szeres nagyítás. (N1 és N2: nucleusok)

Megjegyzés. A pontyokat 2 mg/l MD-nal 5 napig 12 ± 1 °C-on kezeltük. A felvételt Dr. Halasy Katalin (JATE Állattani Tanszék) készítette.



23. kép Közepesen károsodott hepatocita MD kezelés után. 22400-szoros nagyítás. (N: nucleus, Mi: mitokondrium, Gli: glikogén)
Megjegyzés. A pontyokat 2 mg/l MD-nal 5 napig 12 ± 1 °C-on kezeltük. A felvételt Dr. Halasy Katalin (JATE Állattani Tanszék) készítette.



24. kép Károsodott hepatocita MD kezelés után. 26400-szoros nagyítás. (N: nucleus, Gli: glikogén, Pi: pigment, Li: lipid)
Megjegyzés. A pontyokat 2 mg/l MD-nal 5 napig 12 ± 1 °C-on kezeltük. A felvételt Dr. Halasy Katalin (JATE Állattani Tanszék) készítette.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Kísérleteinkben a ponty szerveiben a kolinerg rendszer fontos katalizáló enzimeinek, a kolinészterázoknak az eloszlását, aktivitását, típusait, negyedleges felépítését tanulmányoztuk. Vizsgáltuk két inszekticid, egy herbicid és egy fungicid hatását különböző szövetek kolinészteráz molekuláris formáinak eloszlására. A deltamethrin *in vivo* hatását is értékeltük vér- és szövetbiokémiai paraméterekre, továbbá vizsgáltuk a két inszekticid felhalmozódását a ponty (*Cyprinus carpio* L.) különböző szöveteiben. A biokémiai méréseket citopatológiai vizsgálatokkal egészítettük ki.

Eredményeinket a következőkben foglalhatjuk össze:

1. Mind a deltamethrin mind a methidation *in vitro* körülmények között jelentősen gátolja az AChE-t a ponty agyban. Mindkét szer viszonylag gyorsan (5-15 perc) csökkenti az AChE aktivitását (40-80%). Klasszikus enzimkinetikai vizsgálatok (Michaelis-Menten kinetika, Lineweaver-Burk vagy Hanes-féle linearizálás) szerint az AChE gátlása vegyes típusú volt, ami utal arra hogy a vizsgált inszekticidek egyaránt befolyásolták az AChE anionos és katalitikus helyét is. Dixon módszerével meghatároztuk a K_I értékeket ($K_{I(DM)} = 15.60\,\mu M$, $K_{I(MD)} = 5.97\,\mu M$), amely értékek mutatják a már relatíve kis koncentrációban bekövetkező gátlást, másrészt arra utalnak, hogy a MD esetében az *in vitro* gátlás összevethető nagyságrendű az *in vivo* hatással, míg DM esetében ugyanakkora koncentrációt már nem viselnek el a halak a Na^+-csatornák működésének befolyásolása miatt.

2. A detergenssel illetve a sóval oldható AChE aránya szervenként változó, amely minden bizonnyal összefüggésben van az AChE szervenként változó molekuláris formáinak megoszlásával, és valószínű működésével is. Az aszimmetrikus formák mennyisége relatíve magas az izomban és a szívben, míg a globuláris formák túlsúlya (elsősorban G_4) dominál a többi szövetben. Az emlősökhöz képest minden szövetben magas az A_{12} forma aránya. Bélben, a többi szervhez képest, relatíve nagy a BChE aránya, aminek molekuláris forma megoszlása hasonló az AChE-hoz. A bél BChE tartalmának pontos funkciója még nem tisztázott.

3. A növényvédő szerek indukálta változások eltérő mértékben jelentkeztek a különböző szervek AChE és BChE enzimaktivitás változásában és molekuláris formáinak megoszlásában. A kolinerg rendszer különösen érzékeny a szerves foszforsavészterekre, melyek károsító hatása biokémiailag jól követhető volt. A növényvédő szerek elsősorban a G_1 forma arányának növekedését idézték elő, ami az egyes típusok eltérő lokalizációjából fakadhat. Másrészt vizsgálataink megerősítették

azt, hogy a szerves foszforsavészterek AChE gátlása nemcsak enzimszintű folyamat, hanem valamely lépésében az enzim *de novo* szintézisét is érintheti. Ugyanakkor a BChE gátlása a tápcsatornában nem jelentős. A többi peszticid okozta változás sokkal kisebb mértékű az AChE és a BChE aktivitására és formáinak megoszlására. Figyelemre méltó, hogy a $CuSO_4$ emelte az AChE aktivitását, és befolyásolta a molekuláris formák egymáshoz viszonyított arányát is.

4. A DM *in vivo* laboratóriumi körülmények között már 1-2 ppb-s koncentrációban befolyásolta a vizsgált enzimek aktivitását. 25 °C-on koncentráció függően gátlolta a Na^+/K^+-ATP-áz aktivitását. A többi enzim esetében dózis függés nem volt kimutatható. A DM kezelés a különböző szervek AChE tartalmát eltérően befolyásolta. A halak stresszelt állapotát a megemelkedett LDH aktivitás és vércukorszint jelezte. A májkárosodásra a GOT enzim aktivitásában bekövetkezett változásból következtettünk. 12 °C-on még nagyobb koncentrációban sem olyan erőteljes a vizsgált piretroid hatása, mint magasabb hőmérsékleten. A vérszérum enzimeinek szintje viszonylag gyors regenerációra utal. Mindezekből megállapítható, hogy a DM több biokémiai folyamatot megváltoztatott a halak szervezetében, és így lehetőség adódott enzimdiagnosztika segítségével a természetes vizekben szennyezésként megjelenő DM hatásának követésére.

5. A DM az alkalmazott kezelés során nem halmozódott fel kimutatható mennyiségben a halak szöveteiben. Ennek az oka az, hogy a halak szervezete elég nagy sebességgel képes lebontani a DM-t, de az emlősökétől eltérő módon. A MD, szemben a DM-nel, nagymértékben akkumulálodott, elsősorban a magas zsírtartalmú szövetekben. Legnagyobb mennyiséget a máj és az ikra tartalmazta, ami összefüggésben állhat azzal, hogy a MD befolyásolja a halak egyedfejlődését is. Az alkalmazott módszer lehetővé tette, hogy kimutassuk a halak szervezetére káros mennyiségű MD-t, amit a vázizomban kimutatni nem lehetett. A MD vegyület bomlása vízben egy kétfázisú folyamatként zajlott le: kb. 3-5 nap alatt elbomlott az eredeti mennyiség 70%-a, ezután azonban a bomlás lelassult, s három hét múlva is még 20-25%-ban volt jelen az akvárium vízében. Ehhez képest a májban 5 napos kezelés után nagyobb volt a MD koncentrációja, mint a kiindulási érték a vízben.

6. Koelle módszerével a ponty agyában, vázizmában és a belében tudtunk AChE aktivitást detektálni. A különböző peszticid kezelések közül a MD hatása volt a leginkább észlelhető. Mindkét inszekticid jelentős elváltozásokat okozott a máj finomstruktúrájában: a mitokondriumok világosan megduzzadtak, a lipidcseppek és az epepigmentek felszaporodtak, a sejtmag és a heterokromatin szerkezete megbomlott.

Ezek jelezték az energiatermelő és a fehérjeszintetizáló, transzportáló rendszerben bekövetkezett elváltozásokat.

A halakban bekövetkezett fiziológiai elváltozásokat az általunk mért biokémiai paraméterek alátámasztották. Mivel a szervezet leromlását gyorsan tudjuk követni az egyes szervekben, szövetekben és a vérben, ez bizonyítja, hogy a tanszékünkön kifejlesztett módszerek gyors, pontos és alapos vizsgálati bizonyítékot szolgáltatnak az élővizek tisztaságára vonatkozóan. A halak pillanatnyi egészségi állapotát tesztelő biomonitoring rendszerünk további fejlesztésére nyilik lehetőség a dolgozatban leírtak alapján.

7. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ACh	Acetilkolin
AChE	Acetilkolin-észteráz
AThCh-I	Acetiltiokolin-jodid
BCh	Butirilkolin
BChE	Butirilkolin-észteráz
BSA	Marha szérum albumin (Bovine serum albumin)
ChE	Kolinészteráz (AChE és BChE)
DM	Deltamethrin ((S)-α-ciano-3-fenoxibenzil-(1R)-cisz-3-(2,2-dibromovinil)-2,2-dimetilciklopropán-karboxilát, $C_{22}H_{19}Br_2NO_3$)
DTNB	5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzoesav)
ECD	Elektronbefogásos detektor
FPD	Lángfotometriás detektor
GOT	Glutamát-oxálecetsav transzamináz
GPT	Glutamát-piroszőlősav transzamináz
LDH	Laktát dehidrogenáz
M	Mólos oldat (1 mol anyag/l oldat)
MD	Methidation (S-2,3-dihidro-5-metoxi-2-oxo-1,3,4-tiodiazol-3-ilmetil-O,O-dimetil-foszfoditionát; $C_6H_{11}N_2O_4PS_3$)
N	Normál oldat
NADP	Nikotinsavamid adenin-dinukleotid foszfát
NADPH	NADP redukált alakja
ppb	1 ppb = 1 μg/l
ppm	1 ppm = 1 mg/l
PQ	Paraquat (1,1'-dimetil-4,4'-bispiridilium-dihidroklorid)
rEr	Durvafelszínű endoplazmatikus retikulum
SOD	Szuperoxid-dizmutáz

8. IRODALOMJEGYZÉK

Anglister, L. and Silman, I. (1978) Molecular structure of elongated forms of electric eel acetylcholinesterase. *J. Mol. Biol.*, **125**, 293.

Anglister, L., Tarrab-Hazdai, R., Fuchs, S. and Silman, I. (1979) Immunological cross reactivity between electric eel acetylcholinesterase and rat-tail-tendon collagen. *Eur. J. Biochem.*, **94**, 25.

Annon, L. (1971) Photometric determination of LDH activity in blood serum. *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.*, **8**, 658.

Asztalos, B. and Nemcsók, J. (1985) Effect of pesticides on the LDH activity and isoenzyme pattern of carp (*Cyprinus carpio* L.) serum. *Comp. Biochem. Physiol.*, **82**, 217.

Asztalos, B., Nemcsók, J., Benedeczky, I., Gábriel, R. and Szabó, A. (1988) Comparison of effects of paraquat and methidathion on enzyme activity and tissue necrosis of carp, following exposure to the pesticides singly or in combination. *Environ. Pollut.*, **55**, 123.

Asztalos, B., Nemcsók, J., Benedeczky, I., Gábriel, R., Szabó, A. and Refaie, O. J. (1990) The effects of pesticides on some biochemical parameters of carp (*Cyprinus carpio* L.). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **19**, 275.

Augustinsson, K. B. (1948) Cholinesterases - A study in comparative enzimology. *Acta Physiol. Scand.*, **15**, 52.

Baslow, M. H. and Nigrelli, R. F. (1961) Muscle acetylcholinesterase levels as an index of general activity in fishes. *Copeia*, **1**, 8.

Bell, G.R. (1968) Distribution of transaminases (aminotransferases) in the tissue of Pacific salmon (*Onchorynchus*), with emphasis on the properties and diagnostic use of glutamic-oxalacetic transaminase. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, **25**, 1247.

Benedeczky, I., Nemcsók, J. and Halasy, K. (1986) Electronmicroscopic analysis of the cytopathological effect of pesticides in the liver, kidney and gill tissues of carp. *Acta Biol. Szeged.*, **32**, 69.

Berninsone, P., Katz, E., Napp, M. and Azcurra, J. (1989) Acetylcholinesetrase and nonspecific cholinesterase activities in rat liver: subcellular localisation, molecular forms, and some extraction properties. *Biochem. Cell. Biol.*, **67**, 817.

Bhunya, S. P. and Pati, P. C. (1990) Effect of deltamethrin, a synthetic pyrethroid, on the induction of chromosome aberrations, micronuclei and sperm abnormalities in mice. *Mutagen.*, **5**, 229.

Boehringer Mannheim GmbH (1974) Biochemica Information I-II. pp. 45-46, 75-76, 148-149. Boehringer Mannheim GmbH, Biochemical Department, West Germany.

Bon, S. and Massoulié, J. (1976) Molecular forms of *Electrophorus* acetylcholinesterase: the catalytic subunits; fragmentation; intra- and intersubunit disulfide bonds. *FEBS Lett.*, **71**, 273.

Bon, S., Vigny, M. and Massoulié, J. (1979) Asymmetric and globular forms of acetylcholinesterase in mammals and birds. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 2546.

Bourre, J. M., Chanez, C., Dumont, O. and Flexor, M. A. (1982) Alteration of 5-nucleotidase and Na^+-K^+-ATPase in central and peripheral nervous tissue from dysmyelinating mutants (jumpy, quaking, trembler, shivered and mid). Comparison with CNPase in the developing sciatic nerve from trembler. *J. Neurochem.*, **38**, 643.

Bradbury, J. E., Forshaw, P. J., Gray, A. J. and Ray, D. E. (1983) The action of mephenesin and other agents on the effects produced by two neurotoxic pyrethroids in the intact and spinal rat. *Neuropharmacol.*, **22**, 907.

Brightmann, M. W. and Albers, R. W. (1959) A major component of neurohypophysial tissue associated with antidiuretic activity. *J. Neurochem.*, **4**, 246.

Busker, R. W. and Zijlstra, J. J. (1991) The molecular forms of acetylcholinesterase in relation to organophosphate toxicity, in "Cholinesterases: Structure, Function, Mechanism, Genetics, and Cell Biology" (Massoulié, J., Bacou, F., Barnard, E., Chatonnet, A., Doctor, B. P., Quinn, D. M., Eds.), American Chemical Society, Washington, DC, 1991.

Caquet, T., Thybaud, E., Le Bras, S., Jonot, O. and Ramade, F. (1992) Fate and biological effects of lindane and deltamethrin in freshwater mesocosms. *Aquatic Toxicol.*, **23**, 261.

Catinot, R., Hoellinger, H., Pfister, A., Sonnier, M. and Simon, M. T. (1989) Effects on rats of subacute intoxication with deltamethrin via an osmotic pump. *Drug Chem. Toxicol.*, **12**, 173.

Chang, J. C., Walberg, J. A. and Campbell, W. R. (1992) One-year dietary toxicity with methidathion in beagle dogs. *Fundam. Appl. Toxicol.*, **19**, 307.

Chatonnet, A. and Lockridge, O. (1989) Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. *Biochem. J.*, **260**, 625.

Chopade, H. M. and Dauterman, W. C. (1981) Studies on the *in vitro* metabolism of methidation by rat and mouse liver. *Pest. Biochem. Physiol.*, **15**, 105.

Cisson, C. M. and Wilson, B. W. (1977) Recovery of acetylcholinesterase in cultured chick embryo muscle treated with paraoxon. *Biochem. Pharmacol.*, **26**, 1955.

Cisson, C. M. and Wilson, B. W. (1981) Paraoxon increases the rate of synthesis of acetylcholinesterase in cultured muscle. *Toxicol Lett.*, **9**, 131.

Cleveland, L. and Hamilton, S. T. (1983) Toxicity of organophosphorus defoliant DEF to rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquatic Toxicol.*, **4**, 341.

Clos, F. and Serfaty, A. (1958) Specifité zoologique et cholinesterases chez les poissons dulcaquicoles. *Bull. Soc. Hist. Natl. Toluse*, **93**, 32.

Contestabile, A. (1978) Acetylcholinesterase concentration in the optic tectum and in two main cerebellar subdivisions of three freshwater marim teleost. *Brain Res.*, **157**, 182.

Coppage, D. L., Matthews, E., Cook, G. H. and Knight, J. (1975) Brain acetylcholinesterase inhibition in fish as a diagnosis of environmental poisoning by malathion O,O-dimethyl-S-(1,2-dicarbethoxy-ethyl). *Pestic. Biochem. Physiol.*, **5**, 536.

Coppage, D. L. and Braidech, T. E. (1976) River pollution by anticholinesterase agents. *Water Res.*, **10**, 19.

Costa, L. G. (1987) Interaction of insecticides with the nervous system, in "Toxicology of Pesticides: Experimental, Clinical and Regulatory Perspectives" (Costa, L. G., Galli, C. L. and Murphy, S. D., Eds.) pp. 77-91, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg 1987.

Cremer, J. E. and Seville, M. P. (1985) Changes in regional cerebral blood flow and glucose metabolism associated with symptoms of pyrethroid toxicity. *Neurotoxicol.*, **6**, 1.

Dorman, D. C. and Beasley, V. R. (1991) Neurotoxicology of pyrethrin and the pyrethroid insecticides. *Vet. Hum. Toxicol.*, **33**, 238.

Dudai, Y., Herzberg, M. and Silman, I. (1973) Molecular structures of acetylcholinesterase from electric organ tissue of the electric eel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70**, 2473.

Dudai, Y. and Silman, I. (1974) The molecular weight and subunit structure of acetylcholinesterase preparations from the electric organ of electric eel. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **59**, 117.

Edwards, R. and Millburn, P. (1985) Toxicity and metabolism of cypermethrin in fish compared with other vertebrates. *Pestic. Sci.*, **16**, 201.

Eells, J. T., Watable, S., Ogata, N. and Narahashi, T. (1987) The effects of pyrethroid insecticides on synaptic transmission in slices of guinea pig olfactory cortex, in "Toxicology of Pesticides: Experimental, Clinical and Regulatory Perspectives" (Costa, L. G., Galli, C. L. and Murphy, S. D., Eds.) pp. 267-271, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 1987.

Ellman, G. L., Courtney, D. D., Andres, V. and Featherstone, R. M. (1961) A new and rapid colorimetric determination of AChE activity. *Biochem. Pharmacol.*, **7**, 88.

Enan, E. and Matsumura, F. (1993) Activation of phosphoinositide/protein kinase C pathway in rat brain tissue by pyrethroids. *Biochem. Pharmacol.*, **45**, 703.

Eriksson, P. and Nordberg, A. (1990) Effects of two pyrethroids, bioallethrin and deltamethrin, on subpopulations of muscarinic and nicotinic receptors in the neonatal mouse brain. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **102**, 456.

Ferrando, M. D., Sancho, E and Andreu-Moliner, E. (1991) Comparative acute toxicities of selected pesticides to *Anguilla anguilla*. *J. Environ. Sci. Health*, **26**, 491.

Fisher, H. K., Humphries, M. and Bails, R. (1971) Paraquat poisoning: Recovery from renal and pulmonary damage. *Ann. Int. Med.*, **75**, 731.

Fleming, W. J. and Grue, C. E. (1981) Recovery of cholinesterase activity in five avian species exposed to dicrotophos, an organophosphorus pesticide, *Pestic. Biochem. Physiol.*, **16**, 129.

Francis, A. and Schechter, N. (1979) Activity of choline acetyltransferase and acetylcholinesterase in goldfish optic tectum after disconnection. *Neurochem. Res.*, **4**, 547.

Fuentes, M. E. and Inestrosa, N. C. (1988) Characterization of a tetrameric G_4 form of acetylcholinesterase from bovine brain: a comparison with the dimeric G_2 form of the electric organ. *Mol. Cell. Biochem.*, **81**, 53.

Gaál, J., Horváth, Z., Erőss, J. (1980) The effect of organophosphorus compounds on the cholinesterase activity of one summer old carps. *Aquacul. Hung. (Szarvas)*, **2**, 117.

Gage, J. C. (1955) Blood cholinesterase values in early diagnosis of excessive exposure to phosphorus insecticides. *Brit. Med. J.*, **1**, 1370.

Gaines, T. B. and Linder, R. E. (1986) Acute toxicity of pesticides in adult and weanling rats. *Fundam. Appl. Toxicol.*, **7**, 299.

Galgani, F. and Bocquené, G. (1989) A method for detection of organophosphates and carbamates in sea water. *Environ. Techn. Lett.*, **10**, 311.

Gautron, J. (1982) Ultrastructural localization of acetylcholinesterase. A direct method for light and electron microscopy. *Histochem.*, **76**, 469.

Ghiasuddin, S. M. and Soderlund, D. M. (1985) Pyrethroid insecticides: potent stereospecific enhancers of mouse brain sodium channel activation. *Pestic. Biochem. Physiol.*, **24**, 200.

Gibbs, A. and Somero, G. N. (1989) Pressure adaptation of Na^+/K^+-ATPase in gills of marine teleosts. *J. Exp. Biol.*, **143**, 475.

Gill, T. S., Tewari, H. and Pande, J. (1990) Use of fish enzyme system in monitoring water quality: effects of mercury on tissue enzymes. *Comp. Biochem. Physiol. C.* **97**, 287.

Gorge, G. and Nagel, R. (1990) Toxicity of lindane, atrazine, and deltamethrin to early life stages of zebrafish (*Brachyodanio rerio*). *Ecotoxicol. Environ. Safety*, **20**, 246.

Gupta, R. C., Patterson, G. T. and Dettbarn, W. D. (1991) Comparison of cholinergic and neuromuscular toxicity following acute exposure to sarin and VX in rat. *Fundam. Appl. Toxicol.*, **16**, 449.

Habig, C., Digiulio, R. T., Nomier, A. A. Abou-Donia, M. B. (1986) Comparative toxicity, cholinergic effects, and tissue levels of *S,S,S,*-tri-*n*-butyl phosphorotrithioate (DEF) to channel catfish (*Ictalurus punctatus*) and blue crab (*Callinectes sapidus*). *Aguatic Toxicol.*, **9**, 193.

Habig, C., Digiulio, R. T. and Abou-Donia, M. B. (1988) Comparative properties of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) and blue crab (*Callinectes sapidus*) acetylcholinesterases. *Comp. Biochem. Physiol. C.*, **91**, 293.

Halasy, K., Nemcsók, J., Benedeczky, I., Tóth, L., Sárosi, P. (1989) Acetylcholinesterase in the alimentary canal of fish: Light and electron microscopic detection, quantitive distribution in different segments of the gut. *Acta Histochem.*, **87**, 141.

Holland, H. T., Coppage, D. L. and Butler, P. A. (1967) Use of fish brain acetylcholinesterase to monitor pollution by organophosphorus pesticides. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **2**, 156.

Horsberg, T. E., Hoy, T. and Nafstad, I. (1989) Organophosphate poisoning of Atlantic salmon in connection with treatment against salmon lice. *Acta. Vet. Scand.*, **30**, 385.

Hughes, G. M. (1976) Polluted fish respiratory physiology, in "Effects of pollutants on aquatic organism" (Lockwood, A. P. M. (Ed)), pp. 163-183, Cambridge University Press 1976, London.

Karmen, A., Wrobelski, F. and La Due, J.A. (1955) Transaminase activity in human blood. *J. Clin. Inv.*, **34**, 126.

Koelle, G. B. and Friedenwald, J. S. (1949) A histochemical method for localizing cholinesterase activity. *Proc. Soc. Exp. Biol. (New York)*, **70**, 617.

Kristoffersson R., Broberg S., Oskari A. and Pekkarinen M. (1974) 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.

Kumaraguru, A. K. and Beamish, F. W. H. (1981) Lethal toxicity of permethrin (NRDC-143) to rainbow trout, *Salmo gairdneri*, in relation to body weight and temperature. *Water Research*, **15**, 503.

L'Hotellier, M. and Vincent, P. (1986) Assessment of the impact of deltamethrin on aquatic species. *In British Crop Protection Conference - Pests and Disease*: 1109.

Labat, R., Roqueplo, C., Richard, J. M., Lim, P. and Burget, M. (1977) Actions ecotoxicologiques de certains metaux (Cu, Zn, Pb) chez les poissons dulcaquicoles de la rivere lot. *Annls. Limnol.*, **13**, 191.

Lapis, K. and Benedeczky, I. (1966) Antimetabolic-induced changes in the fine structure of tumour cells. *Acta Biol. Acad. Sci. Hung.*, **17**, 199.

Lawrence, L. J. and Casida, J. E. (1983) Stereospecific action of pyrethroid insecticides on the gamma-aminobutyric acid receptor-ionophore complex. *Science*, **221**, 1399.

Line, S. C. and Way, E. L. (1984) Characterization of calcium-activated and magnesium-activated ATPase of brain nerve endings. *J. Neurochem.*, **42**, 1697.

Lotti, M. and Johnson, M. K. (1978) Neurotoxicity of organophosphorus pesticides: predictions can be based on *in vitro* studies with hen and human enzymes. *Arch. Toxicol.*, **41**, 215.

Lowry, O. H., Rosenbrough, N. I., Farr, A. L. and Randall, R. N. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265.

Lundin, S. J. (1958) On the location of cholinesterase in fishes. *Experientia*, **14**, 131.

Lwebuga-Mukasa, J. S., Lappi, S. and Taylor, P. (1976) Molecular forms of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*. Their relationship to synaptic membranes. *Biochem.*, **15**, 1425.

Maquire, R. J., Carey, J. H., Hart, J. H., Tkacz, R. J. and Lee, H. B. (1989) Persistence and fate of deltamethrin sprayed on a pond. *J. Agric. Food Chem.*, **37**, 1153.

Márkus, F. (1993) Növényvédő szerek környezeti hatásai Magyarországon. Vegyszeres növényvédelem csökkentésére irányuló programok Dániában, Hollandiában és Svédországban. *WWF-füzetek*, **5**.

Massoulié, J., Bon, S., Krejci, E., Coussen, F., Duval, N., Chatel, J. M., Anselmet, A., Legay, C. and Vallette, F. M. (1991) The structure and significance of multiple cholinesterase forms, in "Cholinesterases: Structure, Function, Mechanism, Genetics, and Cell Biology" (Massoulié, J., Bacou, F., Barnard, E., Chatonnet, A., Doctor, B. P., Quinn, D. M., Eds.), pp. 2-6, American Chemical Society, Washington, DC, 1991.

Matsumura, F. (1988) Deltamethrin induced changes in choline transport and phosphorylation activities in synaptosomes from the optic lobe of squid, *Loligo pealei*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **89**, 179.

Mauck, W. L., Olsen, L. E. and Marking, L. L. (1976) Toxicity of natural pyrethrins and five pyrethroids to fish. *Arch. Environ. Cont. Toxicol.*, **4**, 18.

Mazeaud, F., Maral, J. and Michelson, A. M. (1979) Distribution of superoxide dismutase and glutathione peroxidase in the carp: Erithrocyte manganase SOD. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **86**, 1161.

Mazeaud, M. M. and Mazeaud, F. (1981) Adrenergic responses to stress in fish. In "Stress and fish" (A. D. Pickering, ed.), pp. 49-75. London and New York, Academic Press.

McLeese, D. W. and Metcalfe, C. D. (1979) Toxicity of mixtures of phosphamidon and methidation to lobsters (*Homarus americanus*). *Chemosphere*, **2**, 59.

Moretto, A. and Johnson, M. K. (1987) Toxicology of organophosphates and carbamates, in "Toxicology of Pesticides: Experimental, Clinical and Regulatory Perspectives" (Costa, L. G., Galli, C. L. and Murphy, S. D., Eds.) pp. 33-48, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg 1987.

Moss, D. E. and Fahrney (1978) Kinetic analysis of differences in brain acetylcholinesterase from fish or mammalian sources. *Biochem. Pharmacol.* **27**, 2693.

Muir, D. C. G., Rawn, G. P. and Grift, N. P. (1985) Fate of the pyrethroid insecticide deltamethrin in small ponds: A mass balance study. *J. Agric. Food Chem.*, **33**, 603.

Munoz-Delgado, E. and Vidal, C. J. (1987) Solubilization and partial characterization of acetylcholinesterase from the sarcotubular system of skeletal muscle. *Neurochem. Res.*, **12**, 597.

Nakono, T and Tomlinson, N. (1967) Catecholamine and carbohydrate concentrations in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) in relation to physical disturbances. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, **24**, 1701.

Narahashi, T. (1984) Nerve membrane sodium channels as the target of pyrethroids, in "Cellular and Molecular Neurotoxicology" (Narahashi, T., ed.), pp. 85-108, Raven press, New York, 1984.

Nemcsók, J., Benedeczky, I., Boross, L., Asztalos, B. and Orbán, L. (1981) Subcellular localization of transaminase enzymes and their signification in the detection of water pollution. *Acta Biol. Szeged*, **27**, 9.

Nemcsók, J. and Boross, L. (1982a) Comparative studies on the sensitivity of different fish species to metal pollution. *Acta Biol. Acad. Sci. Hung.*, **33**, 23.

Nemcsók J., Oláh L. and Boross L. (1982b) Studies on stress effect caused by malachite green and formalin treatments of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquacul. Hung. (Szarvas)*, **III**, 57.

Nemcsók, J., Orbán, L., Dobler, L. and Szépfalussy, J. (1985) Acetylcholinesterase activity measurements as a tool for demonstrating the possible cause of fish decay. *Acta Biol. Szeged.*, **31**, 9.

Nemcsók, J., Asztalos, B., Víg, É. and Orbán, L. (1987) The effect of an organophosphorus pesticide on the enzymes of carp (*Cyprinus carpio* L.). *Acta Biol. Acad. Sci. Hung.*, **38**, 77.

Nemcsók, J. and Hughes, G. M. (1988a) The effect of copper sulphate on some biochemical parameters of rainbow trout. *Environ. Pollut.*, **49**, 77.

Nemcsók, J., Asztalos, B. and Szabó, A. (1988b) The effects of methidathion, paraquat and $CuSO_4$ singly or in combination on acetylcholinesterase activity of carp. In "Biological Monitoring of Environmental Pollution" (M. Yasuno and B. A. Whitton, Eds.) pp. 33-40, Tokyo Univ. Press, Tokyo 1988.

Nemcsók, J., Rakonczay, Z., Kása, P., Asztalos, B. and Szabó, A. (1990) Effects of methidathion on distribution of molecular forms of acetylcholinesterase in carp, as revealed by density gradient centrifugation. *Pest. Biochem. Physiol.*, **37**, 140.

Nyquist-Battie, C., Dowell, R. T. and Fernandez, H. (1989) Acetylcholinesetrase molecular forms in muscle and non muscle cells of rat heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **21**, 987.

O'Brien (1960) "Toxic Phosphorus Esters". Academic Press, New York, 1960.

Olson, D. L. and Christensen, G. M. (1980) Effects of water pollutants and other chemicals on fish acetylcholinesterase in vitro. *Environ. Res.*, **21**, 327.

Onishi, T., Murayama, S. (1970) Studies on enzymes of cultivated Salmonoid fishes II. Activities of protease, amylase, arginase, GPT and GOT in various growth stage. *Bull. Tokai Reg. Fish. Res. Lab.*, **63**, 123.

Pavlov, D. D., Chuiko, G. M., Gerassimov, Y. V. and Tonkopiy, V. D. (1992) Feeding behaviour and brain acetylcholinesterase activity in bream (*Abramis brama* L.) as affected by DDVP, an organophosphorus insecticide. *Comp. Biochem. Physiol.*, **103**, 563.

Pechot-Dechavissine, M. (1962) Étude biochimique, pharmacologique et histochimique des cholinesterases des muscles striès chez les poissons, les mammifères thèse. *Masson et Cie. Paris*, **67**.

Pennec, J. P. and Le Bras, Y. M. (1984) Storage and release of cathecolamines by nervous endings in the isolated heart of eel (*Anguilla anguilla* L.). *Comp. Biochem. Physiol.*, **1**, 167.

Pénzes, B. (1977) A hal mint "vízminőség -ellenőr". *Búvár*, **6**, 257.

Post, G. and Leasure, R. A. (1974) Sublethal effect of malathion to three salmonoid species. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **12**, 312.

Quest, J. A., Copley, M. P., Hamernik, K. L., Rinde, E., Fisher, B., Engler, R., Burnam, W. L., Fenner-Crisp, P. A. (1990) Evaluation of the carcinogenic potential of pesticides. 2. Methidathion. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, **12**, 117.

Rakonczay, Z., Vincendon, G. and Zanetta, J.-P. (1981) Heterogenity of rat brain acetylcholinesterase: A study by gel filtration and gradient centrifugation. *J. Neurochem.*, **37**, 662.

Ramírez, G., Pérez-Tur, J., Ramos, M., Busquets, X. and Barat, A. (1991) Properties of two types of molecular forms of asymmetric acetylcholinesterase in chick skeletal muscle, in "Cholinesterases: Structure, Function, Mechanism, Genetics, and Cell Biology" (Massoulié, J., Bacou, F., Barnard, E., Chatonnet, A., Doctor, B. P., Quinn, D. M., Eds.), pp. 62-65, American Chemical Society, Washington, DC, 1991.

Reddy, A. T., Ayyanna, K. and Yellamma, K. (1991) Sensitivity of brain cholinesterase to cypermethrin toxicity in freshwater teleost *Tilapia mossambica*. *Biochem. Int.*, **23**, 959.

Reichenbach-Klinke, H. H. (1972) Histologische und enzymatische Veränderungen nach Schadstoffeinwirkung beim Fisch, *Veroeff. Inst. Kuesten Binnenfisch. Hamburg*, **53**, 1124.

Reitman, S. and Frankel, S. (1957) A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic acid transaminase. *Am.. J. Clin. Pathol.*, **28**, 56.

Rieger, F., Bon, S., Massoulié, J., Cartaud, J., Picard, B. and Benda, P. (1976) *Torpedo marmorata* acetylcholinesterase; a comparison with the *Electrophorus electricus* enzyme: molecular forms, subunits, electron microscopy, immunological relationship. *Eur. J. Biochem.*, **68**, 513.

Rodriguez-Borrajo, C., Barat, A. and Romirez, G. (1982) Solubilization of collagen-tailed molecular forms of acetylcholinesterase from several brain areas in different vertebrate species. *Neurochem. Int.*, **4**, 563.

Rose, G.P. and Dewar, A.J. (1983) Intoxication with four synthetic pyrethroids fail to show any correlation between neuromuscular dysfunction and neurobiochemical abnormalities. *Arh. Toxicol.*, **53**, 297.

Rosenberry, T. L. and Richardson, J. M. (1977) Structure of 18 S and 14 S acetylcholinesterase. Identification of collagen-like subunits that are linked by disulfid bonds to catalytic subunits. *Biochem.*, **16**, 3550.

Rosenberry, T. L., Barnett, P. and Mays, C. (1980) The collagen-like subunits of acetylcholinesterase from the eel *Electrophorus electricus*. *Neurochem. Int.*, **2**, 135.

Sahib, I. K., Prasada Rao, K. S., Desaiah, D. (1987) Pyrethroid inhibition of basal and calmodulin stimulated Ca^{2+} ATPase and adenylate cyclase in rat brain. *J. Appl. Toxicol.*, **7**, 75.

Salánki, I., Balogh, K. V. and Berta, E. (1982) Heavy metals in animals of Lake Balaton. *Water Res.*, **16**, 1147.

Schimmel, S. C., Garnas, R. L., Patrick, J. M. and Moore, J. C. (1983) Acute toxicity, bioconcentration and persistence of AC 222,705, benthiocarb, chlorpyrifos, fenvalerate, methylparathion and permethrin in the estuarine environment. *J. Agric. Food Chem.*, **31**, 104.

Schirilla, Gy. (1976) Tanulságok az 1975-ben előforduló növényvédőszer-mérgezésekről. *Növényvédelem*, **5**, 170.

Schirilla, Gy. (1978) A DDT okozhat-e idegrendszeri károsodást? *Növényvédelem*, **8**, 375.

Schirilla, Gy. (1979) Tanulságok egy halálos kimenetelű Gramoxone mérgezésről. *Növényvédelem*, **9**, 421.

Schmidt, E and Schmidt, F. W. (1976) Brief guide to practical enzyme diagnosis. *Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim.*

Shaker, N., Hassan, G. A., el Nouty, F. D., Abo Elezz, Z. and Abd Allah, G. A. (1988) *In vivo* chronic effect of dimethoate and deltamethrin on rabbits. *J. Environ. Sci. Health B.*, **23**, 387.

Simon, L. M., Nemcsók, J. and Boross, L. (1983) Studies on the effect of paraquat on glycogen mobilization in liver of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Comp. Biochem. Physiol.*, **75**, 167.

Sket, D., Cucek, D. and Brzin, M, (1991) Effect of botulinum toxin type A on the appearance of organophosphate-induced lesions and AChE recovery in skeletal muscles, in "Cholinesterases: Structure, Function, Mechanism, Genetics, and Cell Biology" (Massoulié, J., Bacou, F., Barnard, E., Chatonnet, A., Doctor, B. P., Quinn, D. M., Eds.) American Chemical Society, Washington, DC 1991.

Smith, D. O. and Emmerling, M. (1988) Biochemical and physiological consequences of an age-related increase in acetylcholinesterase activity at the rat neuromuscular junction. *J. Neurosci.*, **8**, 3011.

Sorensen, P. G. (1983) The Mg^{2+} dependant ATPase from the erythrocyte plasma membrane of the flounder platichthys *Flesus* L. General properties and some observations on the steady state kinetics. *Comp. Biochem. Physiol.*, **79**, 153.

Stein, E. A., Washburn, M., Walczak, C. and Bloom, A. S. (1987) Effects of pyrethroid insecticides on operant responding maintained by food. *Neurotoxicol. Teratol.*, **9**, 27.

Stenram, U. (1969) The effects of fluorouracil actinomycin D, single and combined, on the nucleoral ultrastructure of various tissue of the rat. *Z. Zellforsh. mikr. Anat.*, **94**, 282.

Stephenson, R. R. (1982) Aquatic toxicology of cypermethrin. I. Acute toxicity to some freshwater fish and invertebrates in laboratory tests. *Aquatic Toxicol.*, **2**, 175.

Szabó, A., Nemcsók, J., Asztalos, B., Rakonczay, Z., Kása, P. and Hieu, L. H. (1992) The effect of pesticides on carp (*Cyprinus carpio* L.). Acetylcholinesterase and its biochemical characterization. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, **23**, 39.

Szegletes, T. and Nemcsók, J. (1992) Ökológiai tényezők szerepe az angolnapusztulásban. *Halászat*, **1**, 19.

Van den Thrillardt, G. (1982) Adaptation of fish energy metabolism to hyperoxia and anoxia. *Mol. Physiol.*, **2**, 49.

Varga, M. (1980) A vegyszeres gyomírtás elméleti alapjai, Szeged.

Volpe, M. T., Bisso, G. M. and Michalek, H. (1990) *In vivo* and *in vitro* effects of diisopropyl fluorophosphate and paraoxon on individual molecular forms of rat brain acetylcholinesterase. *Neurochem. Res.*, **15**, 975.

Wallace, K. B. and Herzberg, U. (1988) Reactivation and aging of phosphorylated brain acetylcholinesterase from fish and rodents. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **92**, 307.

Wedemeyer G. A. (1970) The role of stress in the disease resistance of fishes. In: Sniesko S. F. (ed) A symposium on diseases of fishes and shellfishes. *Am. Fish. Soc. Spec. Publ.*, **5**, 30.

WHO (1986) Organophosphorus Insecticides: A General Introduction. World Health Organisation, Geneva (Environmental Health Criteria 63).

WHO (1990) Environmental Health Criteria 97: Deltamethrin. Published by WHO, Geneva (NLM Classification:WA 240)

Williams, A. K. and Sova, C. R. (1966) Acetylcholinesterase levels in brains of fishes from polluted waters. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **1**, 198.

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

Virág, A. (1981) A mezőgazdasági kemizálás környezetvédelmi összefüggései. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest.

Wrobelski, F. and La Due, J.S. (1985) Serum glutamate oxaloacetate transaminase as an index of liver cell injury. *Proc. Soc. Exp. Biol.*, **90**, 210.

Zaugg, W. S. and McLain, L. R. (1976) Influence of water temperature on gill sodium, potassium-stimulated ATPase activity in juvenile coho salmon (*Onhorhynchus kisutch*). *Comp. Biochem. Physiol.*, **54**, 419.

Zitko, V., McLeese, D. W., Metcalfe, C. D. and Carson, W. G. (1979) Toxicity of permethrin, decamethrin, and related pyrethroids to salmon and lobster. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **21**, 338.

Zoppellari, R. Targa, L., Tonini, P. and Zatelli, R. (1990) Acute poisoning with methidathion: a case. *Hum. Exp. Toxic.*, **9**, 415.

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretnék köszönetet mondani:

Dr. Nemcsók János tanszékvezető egyetemi tanárnak, hogy hasznos tanácsaival munkámat segítette, a kísérleti hátteret biztosította, és lehetővé tette, hogy eredményeimet nemzetközi szimpóziumokon ismertessem.

Bálint Tamás, molekuláris biológusnak, aki a mindennapi kísérletes munkámban közvetlen segítségemre volt.

Dr. Halasy Katalin egyetemi docensnek, hogy szövettani vizsgálataival kiegészítette kutatásaimat.

Szegletes Zsolt, tudományos segédmunkatársnak, aki analitikai és számítógépes ismereteivel segítette dolgozatom elkészültét.

Polyhos Csaba, III. éves egyetemi hallgatónak, hogy a DM *in vivo* kísérletekben segítségemre volt.

Dr. Rakonczay Zoltán, tudományos főmunkatársnak, és Sóos Miklósné, laboránsnak, hogy a kolinészterázok molekuláris formáinak vizsgálatában segítségemre voltak.

Kufcsák Oszkár, tudományos titkár, és Láng Gabriella, kutatónak, hogy segítettek a munkámmal kapcsolatos problémák megoldásában.

Dr. Tóth Imre, egyetemi tanárnak, és Dr. Szécsi Mihály, tudományos segédmunkatársnak, hogy lehetővé tették, hogy az intézetükben dolgozzak.

Szüleimnek, hogy mindvégig támogattak tanulmányaim és munkám során.

A Biokémiai Tanszék és a Bay Zoltán Alkalmazott Kutatási Alapítvány Biotechnológiai Kutatóintézet valamennyi dolgozójának, akik valamilyen formában hozzájárultak munkám sikeres elvégzéséhez.

10. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

Nemcsók J., Benedeczky I., Halasy K., Kufcsák O., Láng G., **Szegletes T.**, Túry G. (1991) Az 1991. évi balatoni angolnapusztulás okainak hisztopatológiai és biokémiai vizsgálata.
Kutatási jelentés (Kapta: *Környezetvédelmi Minisztérium, Közlekedési, Hírközlési és Vízügyi Minisztérium, Földművelésügyi Minisztérium, Magyar Tudományos Akadémia, MTA Szegedi Biológiai Központ, Balatoni Halgazdaság, Környezetgazdálkodási Intézet*)

Dey I., **Szegletes T.**, Buda Cs., Nemcsók J. and Farkas T. (1992) Fish erythrocytes are useful tools to study temperature induced responses in plasma membrane. *Lipids*, **28**, 743-746.

Nemcsók J., **Szegletes T.** (1992) Biokémia a környezetvédelemben. Az 1991. évi balatoni angolnapusztulás a molekuláris biokémia szemszögéből. *Biokémia*, **1**, 25-34.

Szegletes T., Nemcsók J. (1992) Angolnára hangolva. *Élet és Tudomány*, **30**, 937-938.

Szegletes T., Nemcsók J. (1992) Ökológiai tényezők szerepe az angolnapusztulásban. *Halászat*, **1**, 19-21.

Szegletes T., (1993) Pollution of the Danube by household waste water discharges, in "P. Absil, M. ter Brugge, M Dijkman, A. Gheorghe, D.K. Nedialkova, C. Rubbens, T. Szegletes and J. Zacharová (1993) Household water use and municipal waste water discharges along the Danube", Chapter II, pp. 25-43. *Report UBM No. 1993/4, Institute for Environmental Studies, Vrije Universiteit of Amsterdam*. University Press, 1993 May. (Published in 150 copies)

Szegletes T. and K. Deja (1993) Comparison of design criteria of wastewater treatment plants: the Netherlands, Hungary and Poland. *Report for DHV Consultants and DHV Water BV*. Amersfoort, DHV Water BV Press, 1993 June.

Kufcsák O., **Szegletes T.**, Láng G., Halasy K., Benedeczky I. and Nemcsók J. (1994) Investigation of effects of pesticides on molecular forms of AChE in alimentary canal of carp. *Pest. Biochem. Physiol.*, **49**, 000-000 (nyomtatás alatt).

Szegletes T., Polyhos Cs., Bálint T., A. A. Rady, Láng G., Kufcsák O. and Nemcsók J. (1994) *In vivo* effects of deltamethrin on some biochemical parameters of carp (*Cyprinus carpio* L.) *Environ. Mon. Assess.* (Kéziratban javítás után benyújtva)

Szegletes T., Bálint T., Szegletes Zs. and Nemcsók J. (1994) Changes caused by methidathion in activity and distribution of molecular forms of carp (*Cyprinus carpio* L.) AChE. *Environ. Pollut.* (Kéziratban benyújtva).

Szegletes T., Bálint T., Szegletes Zs. and Nemcsók J. (1994) *In vivo* effects of deltamethrin exposure on activity and distribution of molecular forms of carp AChE. *Ecotoxicol. Environ. Safety* (Kéziratban benyújtva).

ELŐADÁSOK JEGYZÉKE

Nemcsók J., Le Huu Hieu, Dux L., Molnár E., Lelkes G., Farkas T., Kufcsák O., Láng G., **Szegletes T.** (1990) Comparative studies of fish and rabbit sarcoplasmatic reticulum Ca^{2+}-ATPase and its significance in the detection of water pollution. *20th Meeting FEBS*, Budapest, Hungary, August 19-24.

Nemcsók J., Halasy K., Benedeczky I., Kufcsák O. and **Szegletes T.** (1991) The effects of pesticides on the acetylcholinesterase activity and its molecular forms in the alimentary tract of fishes. *13th ISN Meeting*, Sydney, Australia, July 15-19, Abstract: *J. Neurochem.*, **57**, S28.

Nemcsók J., Kufcsák O., **Szegletes T.**, Láng G. (1992) A víz toxicitásának vizsgálata biokémiai módszerekkel. "A tiszta víz előállítása" ankét, márc. 12., Szeged.

Nemcsók J., Kufcsák O., **Szegletes T.**, Láng G., Túry G. (1992) Az angolnapusztulás okainak vizsgálata. *HAKI napok, Szarvas.*

Szegletes T. and Nemcsók J. (1994) Biomonitoring with fish. "*Biomonitoring in Hungarian waters: application and training.*" *Conference.* Session: *Biomonitoring of receiving water bodies*, Göd, Hungary, April 18-22.

Szegletes T., Bálint T., Szegletes Zs., Halasy K. and Nemcsók J. (1994) The effect of insecticide Ultracid WP40 on AChE enzyme of different tissues of carp. *3rd Meeting of The Central and Eastern European Regional Section of International Society of Ecotoxicology and Environmental Safety (SECOTOX): "Environmental Fate of Chemicals: Analytical and Toxicological Evaluation for Risk Assessment and Management"*, Balatonaliga, Hungary, May 14-19.

Nemcsók J., Láng G., Kufcsák O., **Szegletes T.**, (1994) The biochemical and ecological reasons of massive eel kill in Lake Balaton. A case report on 1991. *3rd Meeting of The Central and Eastern European Regional Section of International Society of Ecotoxicology and Environmental Safety (SECOTOX): "Environmental Fate of Chemicals: Analytical and Toxicological Evaluation for Risk Assessment and Management"*, Balatonaliga, Hungary, May 14-19.

Szegletes T., Bálint T., Szegletes Zs., Halasy K. and Nemcsók J. (1994) Két inszekticid pontyra (*Cyprinus carpio* L.) gyakorolt hatásának öszehasonlító vizsgálata. *XVIII. Halászati Tudományos Tanácskozás*, Szarvas, június 15-16.

POSZTEREK JEGYZÉKE

Szegletes T., Kufcsák O., Láng G., Nemcsók J. (1992) Fish AChE molecular forms and their biochemical characterization as a biochemical tool of aquatic environment. *36th OHOLO Conference: Multidisciplinary Approaches to Cholinesterase Functions*, April 6-10, Israel, Poster Session A. Abstract: *Mul. App. Cholin. Fun.*, A25.

Szegletes T., Polyhos Cs., Láng G., Kufcsák O., Nemcsók J. (1993) Effects of Deltamethrin on various enzymes of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *XXXII Congress of the International Union of Physiological Sciences*, Glasgow, Scotland, August 1-6. Abstract: Thursday session 364.1/P.

Bálint T., **Szegletes T.**, Szegletes Zs., Halasy K. and Nemcsók J. (1994) The effect of Decis 2,5 EC treatment on biochemical parameters of carp. *3rd Meeting of The Central and Eastern European Regional Section of International Society of Ecotoxicology and Environmental Safety (SECOTOX): "Environmental Fate of Chemicals: Analytical and Toxicological Evaluation for Risk Assessment and Management"*, Balatonaliga, Hungary, May 14-19.

Szegletes T., Bálint T., Szegletes Zs., Halasy K. and Nemcsók J. (1994) Comparative biochemical evaluation of two insecticides on fish. *International Symposium on Human Health and Environment: Mechanisms of Toxicity and Biomarkers to Assess Adverse Effects of Chemicals*. Parma, Italy, September 25-30 (Elfogadva).