

**Humuszvegyületek önálló és mezőgazdasági  
vegyszerekkel kombinált hatása pontyon  
(*Cyprinus carpio* L.)**

**doktori értekezés**

**Varanka Zsolt**

*Témavezető:*

***Ábrahámné Dr. Gulyás Magdolna***

*egyetemi docens*

Szegedi Tudományegyetem Biokémiai Tanszék

Szeged

2002

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretnék köszönetet mondani:

Témavezetőmnek Ábrahámné, Dr. Gulyás Magdolnának, a Biokémiai Tanszék tanszékvezető docensének, hogy lehetőséget biztosított disszertációm elkészítéséhez, hogy értékes tanácsaival mindig segítségemre volt mind elméleti, mind gyakorlati munkám terén.

Dr. Nemcsók János egyetemi tanárnak, hogy munkámat mindvégig támogatta, és lehetővé tette számomra, hogy aktívan részt vegyek 1996-1998 között a Miniszterelnöki Hivatal Balatonkutató Programjában.

Dr. Szegletes Tivadarnak, aki figyelmemet a témára irányította, kutatásaimat elindította, és hasznos tanácsaival segítségemre volt elméleti és gyakorlati munkám terén.

Szöllősiné Dr. Varga Ilona egyetemi docensnek és Dr. Matkovics Béla egyetemi tanárnak, hogy napi munkám során felmerülő kérdésekre mindig készséggel válaszoltak, ötleteikkel hozzásegítettek egy-egy kérdés alaposabb körüljáráshoz.

Dr. Kotormán Mártának, hogy lelkiismeretes kutatói munkájával nagyban hozzájárult a dolgozat elkészüléséhez.

Dr. Kissné Dr. Deér Aranka egyetemi docensnek a citokrom témakörrel kapcsolatos segítségért, a citokrom P450-függő izoenzim aktivitások meghatározásáért.

Dr. Rojik Imre egyetemi docensnek, hogy szövettani vizsgálataival kiegészítette kutatásaimat, Dr. Bartók Tibornak a szövetek deltamethrin koncentrációjának méréséért, Dr. Farkas Tibor akadémikusnak, hogy lehetővé tette, hogy osztályán behatóbban tanulmányozzam a lipid-peroxidációs folyamatokat. Dr. Szegletes Zsoltnak, hogy analitikai és számítógépes ismereteivel segítségemre volt, és elvégezte számomra a májminták réztartalmának meghatározását.

F. Vadadi Lászlónénak, Ördögh Lászlónénak, Brulichné Balázs Ágnesnek, Túry Zemírának és Csonkáné Korom Ágnesnek, hogy precíz munkájukkal nagy segítségemre voltak laboratóriumi kísérleteim során.

Tóth Lajosnak és Varga Tamásnak, hogy számítógépes ismereteikkel hozzájárultak a dolgozat elkészítéséhez, valamint összes kollégámnak, akik valamilyen módon hozzájárultak dolgozatom elkészüléséhez.

Végül, köszönöm feleségemnek, Varankáné László Kingának a támogatást és a gyakorlati munka kivitelezésében nyújtott segítséget. Köszönetet mondok édesanyámnak, Varankáné Dr. Szőke Idának a teljes körű támogatásért és édesapámnak, Dr. Varanka Istvánnak a Balatonon és a Kis-Balatonon közösen végzett terepmunka során szerzett ökológiai tapasztalatokért, melyek meghatározóak voltak munkámra nézve.

## RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AlaAT	alanin aminotranszferáz (EC 2.6.1.2)
AspAT	aszpartát aminotranszferáz (EC 2.6.1.1)
BSA	szarvasmarha szérum albumin
CAT	kataláz (EC 1.11.1.6)
D	Dalton
DM	deltamethrin
DNS	dezoxiribonukleinsav
DTNB	Ellman-reagens, 5,5'-ditio-bisz-(2-nitrobenzoészav)
EA	ellagsav
ECOD	etoxikumarin O-deetiláz (EC 1.14.14.1)
EDTA-Na <sub>2</sub>	etiléndiamin-tetraecetsav nátrium sója
EROD	etoxiresorufin O-deetiláz (EC 1.14.14.1)
GABA	gamma amino vajsav
GC-MS	gázkromatográf-tömegspektrométer
GLU	glukóz
GPx	glutation-peroxidáz (EC 1.11.1.9)
GSH	redukált glutation ( $\gamma$ -glutamil-ciszteinil-glicin)
GSSG	oxidált glutation, glutation-diszulfid
<i>i.p.</i>	intraperitoneális
IC <sub>50</sub>	50%-os enzim aktivitás gátlást okozó koncentráció
k	reakciósebességi együttható
K <sub>S</sub>	az enzim-szubsztrát komplex disszociációs állandója, ( $K_S = [E][S]/[ES] = k_{-1}/k_1$ )
L	liter (L = dm <sup>3</sup> )
LC <sub>50</sub>	50%-os elhullást okozó koncentráció
LDL	(Low Density Lipoprotein), kis sűrűségű lipoprotein
LP	lipid-peroxidáció
M	koncentráció (mol dm <sup>-3</sup> )
MDA	malondialdehid
M <sub>t</sub>	relatív molekulatömeg
NAD(P)H	$\beta$ -nikotinsavamid-adenin-dinukleotid(-foszfát)
nm	nanométer (=10 <sup>-9</sup> m)
rEr	durvafelszínű endoplazmatikus retikulum
ROI	reaktív oxigéntartalmú intermedier
S.D.	szórás (standard deviancia)
SOD	szuperoxid dizmutáz (EC 1.15.1.1)
TA	tanninsav
TBA	2-tiobarbitursav
TBARS	tiobarbitursav-reaktív vegyületek
TRIS	tris(hidroximetil) amino-metán
ts.	testsúly
U	az enzimaktivitás mértékegysége (1 U = 1 nmol szubsztát elbontása 1 perc alatt; a SOD esetében = azon SOD enzim mennyiségével, amely az aktivitásméréshez használt szerves szubsztrát oxidációjának sebességét 50%-ára csökkentti)
UV	ultraibolya
V <sub>max</sub>	az enzimaktivitás reakciókban a maximális reakciósebesség

## TARTALOMJEGYZÉK

<b>1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK</b> .....	1
<b>2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS</b> .....	4
2.1. A növényi sejtfal bomlástermékei: a humuszvegyületek .....	4
2.2. A fenolikumok és a farmakológia .....	6
2.2.1. Az ellagsav .....	8
2.2.2. A tanninsav .....	9
2.2.3. A flavonoidok .....	11
2.3. A felhasznált mezőgazdasági növényvédő szerek jellemzése.....	13
2.3.1. A rézszulfát .....	13
2.3.2. A deltamethrin .....	14
2.4. Az oxidatív stressz és az antioxidáns védekezőrendszer .....	15
2.4.1. A reaktív oxigéntartalmú intermedierek (ROI) és hatásuk .....	15
2.4.2. A kis molekulájú antioxidánsok és az antioxidáns enzimek .....	18
2.4.2.1. A szuperoxid-gyök és a szuperoxid dizmutáz .....	20
2.4.2.2. A kataláz .....	22
2.4.2.3. A glutation-peroxidáz .....	24
2.5. A biotranszformáció: a citokrom P450 izoenzimek és a konjugációs enzimek.....	26
2.6. A halakat ért stressz és a szövetkárosodás bioindikátorai .....	27
2.7. Az élővizek biomonitorozása .....	27
<b>3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK</b> .....	29
3.1. Anyagok .....	29
3.1.1. Vegyszerek .....	29
3.1.2. Fenolszármazékok .....	29
3.2. Módszerek .....	30
3.2.1. <i>In vivo</i> módszerek .....	30
3.2.1.1. A kísérleti állatok tartása és kezelése .....	30
3.2.1.2. Mintavétel és -előkészítés .....	30
3.2.1.3. A Citokrom P-450 aktivitások és a redox-paraméterek meghatározása májból, továbbá a stressz-paraméterek mérése a vérplazmából.....	31
3.2.1.4. A máj réztartalmának meghatározása.....	31
3.2.1.5. A máj deltamethrin tartalmának meghatározása.....	32
3.2.1.6. Elektronmikroszkópia .....	32
3.2.2. <i>In vitro</i> módszerek.....	32
3.2.2.1. A fenolikumok molekulaszervezete és enzimgátló hatása közötti összefüggéseket vizsgáló kísérleteink módszerei.....	32
3.2.2.2. A fenolikumok és a toxikumok redox-paraméterekre kifejtett <i>in vitro</i> hatásának vizsgálata.....	33
3.2.2.2.1. Az antioxidáns enzimek .....	33
3.2.2.2.2. A nem-enzimatis redox-paraméterek .....	34
3.2.3. Statisztikai analízis .....	35

<b>4. EREDMÉNYEK</b> .....	36
4.1. A fenolikumok molekulaszervezete és <i>in vitro</i> enzim aktivitás gátló hatása közötti összefüggések.....	36
4.2. A tanninsav és a rézszulfát önálló illetve kombinált hatásának vizsgálata pontyon.....	43
4.2.1. A tanninsav és a rézszulfát <i>in vivo</i> hatásai.....	43
4.2.2. A tanninsav és a rézszulfát <i>in vitro</i> hatásai .....	49
4.3. Az ellagsav és a rézszulfát önálló illetve kombinált hatásának vizsgálata pontyon.....	52
4.3.1. Az ellagsav és a rézszulfát <i>in vivo</i> hatása .....	52
4.3.2. Az ellagsav és a rézszulfát <i>in vitro</i> hatása .....	57
4.4. A tanninsav és a deltamethrin önálló illetve kombinált hatásának vizsgálata pontyon.....	59
4.4.1. A tanninsav és a deltamethrin <i>in vivo</i> hatásai.....	59
4.4.2. A tanninsav és a deltamethrin <i>in vitro</i> hatásai .....	64
4.5. Az ellagsav és a deltamethrin önálló illetve kombinált hatásának vizsgálata pontyon.....	67
4.5.1. Az ellagsav és a deltamethrin <i>in vivo</i> hatásai.....	67
4.5.2. Az ellagsav és a deltamethrin <i>in vitro</i> hatásai .....	72
<b>5. EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE</b> .....	74
5.1. A fenolikumok molekulaszervezete és enzim aktivitás gátló hatása közötti összefüggések.....	74
5.2. A fenolikumok önálló hatása halakon .....	75
5.2.1. A tanninsav biológiai hatása .....	75
5.2.2. Az ellagsav biológiai hatása .....	77
5.3. A rézszulfát önálló hatása halakon .....	79
5.4. A fenolikum–rézszulfát kombináció hatása halakon .....	81
5.4.1. A tanninsav és a rézszulfát kombinációjának biológiai hatása .....	81
5.4.2. Az ellagsav és a rézszulfát kombinációjának biológiai hatása .....	84
5.5. A deltamethrin önálló hatása halakon .....	86
5.6. A fenolikum–deltamethrin kombináció hatása halakon .....	88
5.6.1. A tanninsav és a deltamethrin kombinációjának hatása halakon .....	88
5.6.2. Az ellagsav és a deltamethrin kombinációjának hatása halakon .....	90
<b>6. ÖSSZEFOGLALÁS</b> .....	92
<b>7. SUMMARY</b> .....	97
<b>8. IRODALOMJEGYZÉK</b> .....	102
<b>9. PUBLIKÁCIÓS LISTA</b> .....	109

## 1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK

A környezet kémiai változásainak hatására bekövetkező molekuláris szintű válaszadás képessége az élőlények alapvető tulajdonsága, melynek során a szervezetet szubletális koncentrációban érő, természetes eredetű vagy szintetikus vegyületek hatását igyekszik kiküszöbölni. Az intenzív mezőgazdasági tevékenység bő forrásául szolgál az egyes fajokra nézve erősen toxikus hatású vegyületek kibocsátásának, amelyek közvetlenül vagy bemosódás révén a természetes vizek élővilágára nézve éppúgy veszélyt jelentenek, mint a szárazföldiek számára. Példaként említhetők a halak szervezetébe kerülő réztartalmú gombaölők, vagy a piretroid típusú inszekticidek, amelyek olyan közvetlen és közvetett oxidációs folyamatokat indukálnak a sejtekben, amelyek károsítják a sejtmembránok és makromolekulák szerkezetét, módosítják azok működését.

Az utóbbi években számos természetes eredetű vegyületről kiderült, hogy amellett, hogy enzim gátlószerek, számottevő komplexképzési és antioxidáns aktivitással is rendelkeznek. Ilyen vegyületek például a növényi sejtfal anyagok lebomlásából származó fenol-karbonsavak, flavonoidok, és egyéb humusz komponensek. Mivel a felszíni vizekben a természetes eredetű huminsavakon kívül számos környezetszennyező ágens is jelen van, feltételezhető, hogy ezen vegyületek együttes jelenléte módosíthatja egymás hatását, amely bizonyos esetben toxikológiai szempontból előnyös, azonban más vegyület kombinációkban fokozott veszélyt jelent az élőlények számára. Tekintettel arra, hogy az antioxidáns rendszer és a biotranszformációs enzimek aktivitásának mérése, valamint a vérparaméterek meghatározása széles körben alkalmazott és elfogadott módszer a víz toxikológiai állapotának jellemzésére (biomonitorozásra), ezért különösen indokolt a különböző hatásmechanizmusú vegyületcsoportok kombinált hatásának, interakciójának tanulmányozása az élő szervezetekben.

A vízi környezet állapotának érzékeny indikátorai a halak, mivel többnyire a táplálkozási piramis felső szintjeit elfoglalva a táplálékláncban akkumulálódó mérgeanyagok a szervezetükbe már jelentősen koncentrációban kerülnek be, ezáltal ott fokozott válaszreakciókat váltanak ki. A celluláris folyamatok egyensúlyának eltolódását jól jelzik bizonyos biokémiai folyamatok, pl. a májban folyó citokrom P450-függő méregtelenítési és az ezzel együttműködő antioxidáns védekezéssel kapcsolatos

redox-reakciók változása, a szöveti károsodásra utaló enzimek specifikus aktivitásának megnövekedése a vérplazmában, vagy a kémiai stressz nyomán fellépő vércukorszint emelkedés. A fent felsorolt biomonitorozásnál alkalmazott rutin eljárások mellett a toxikus vegyületek által előidézett szöveti elváltozások kimutatásának sok részletes, hasznos adatot szolgáltató, gyakran nem nélkülözhető eljárása az elektronmikroszkópia.

A fenolikumok molekulaszervezete és antioxidáns kapacitása közötti összefüggések vizsgálata a jól tanulmányozott kutatási területek közé tartozik, azonban a molekulaszervezet és az enzim aktivitást gátló hatás viszonya még nem kellően tisztázott. Bár a növényi szervezet bomlástermékei, a humusz alkotóelemeiként a talajban és az élővizekben is megtalálhatók, a velük kapcsolatos antioxidáns témakörű *in vivo* kutatások irányvonala elsősorban farmakológiai, s az ez irányú toxikológiai vizsgálatokat is főként emlősökön végzik. S mivel a vegyületek fémkomplexáló és antioxidáns aktivitásukat túlnyomórészt *in vitro* körülmények között tanulmányozzák, igen kevés információ áll rendelkezésre a vízi ökoszisztémák stabilitása szempontjából fontos fenolikum–toxikum kombinációk enzimrendszerekre gyakorolt hatását illetően. Különösen igaz ez a gyakran bioindikátorként használt halakra nézve. Kedvező folyamat, hogy az utóbbi években egyre inkább előtérbe kerül az ökológiai irányvonal is, amely fő érdeklődési vonala elsősorban annak megállapítása a túlélési kísérletekben, hogy a fenolikumok/humuszvegyületek milyen mértékben képesek módosítani a környezetszennyező ágensek fejlődési rendellenességeket előidéző, vagy éppen letális dózist.

Mivel a fenolikumok/humuszvegyületek kutatottsága és jelentősége mind farmakológiai, mind ökológiai téren egyre nő, fontos, hogy gyakorlati felhasználhatóságuk érdekében minél jobban megismerjük hatásukat. A fenti kutatási területek fehér foltjainak felderítését tűztük ki vizsgálódásaink célpontjává, így a kérdések, amelyekre a választ kerestük, a következőképpen fogalmazhatók meg:

1) Igaz-e az a korábbi tanulmányok eredményei alapján született hipotézis, hogy a fenolikumok enzim aktivitást gátló hatása tisztán annak a függvénye, hogy *a fenolikum molekulája milyen számban hordoz hidroxil-csoportokat*? Amennyiben az enzimgátlás erőssége *más tényezők* által (is) meghatározott, milyen egyéb molekulaszervezet és enzimgátló hatás közötti összefüggésekkel kell számolni?

2) Milyen hatással van az *antioxidánsként* ismert, modell-vegyületként használt két humuszvegyület, az *ellagsav* illetve a *tanninsav* Közép-Európa egyik legismertebb és gazdasági szempontból legjelentősebb halfaja, a ponty *antioxidáns védekező rendszerére*? Valamint, e két fenolikum módosítja-e, és ha igen, milyen mechanizmus alapján a környezetszennyező fungicid rézszulfát és az inszekticid deltamethrin kedvezőtlen hatását a fenti enzimrendszeren, illetve a vele szorosan együttműködő *citokrom P450-függő monooxigenáz izoenzimek közül az ECOD és az EROD aktivitásán*? Ismeretes, hogy az említett toxikus vegyületek a kémiai stressz-indukción kívül szövetnekrotizáló hatást is kifejtenek. Kérdésünk, hogy a fenolikumok képesek-e arra, hogy befolyásolják a fenti környezetkárosító vegyületek okozta kémiai stresszt és a makroszkópikus illetve ultrastrukturális szinten jelentkező szövetkárosító hatását?

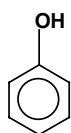


## 2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

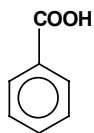
### 2.1. A növényi sejtfal bomlástermékei: a humuszvegyületek

A fenol-karbonsavak, aldehidek és flavonoidok (összefoglaló néven *phenolics*, magyarul fenolikumok) szerepe változatos a növényi szervezetben. Amellett, hogy a növényi sejtfal egyes polimereinek (ligninek, tanninok) prekursorai, ill. lebomlási termékei (Puech és mtsai., 1981), a növényi sejt citoplazmájában is jelen vannak (Hartley és mtsai., 1977), ahol a növény antioxidáns védekező rendszerének tagjaként redox-reakciókban vesznek részt (Halliwell, 1978).

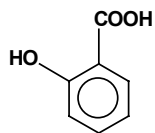
A növényi szervezet lebomlása során a tannin és lignin alkotóelemekből autooxidáció illetve mikrobiális enzimek általi hidrolízis útján fenol-karbonsavak és egyéb kis molekulatömegű vegyületek (1. ábra) szabadulnak fel és polimerizációs – jellegét tekintve kondenzációs – átalakulás útján (McKnight és Aiken, 1998) a *humusz* alkotóelemeivé válnak (Hartley és mtsai., 1977). Aiken és mtsai (1985) meghatározása szerint a humuszvegyületek olyan biológiai eredetű, a természetben közönségesen előforduló heterogén szerves savak, melyekre általánosságban jellemző a sárgától feketéig terjedő színtartomány, a középestől nagynak tekinthető molekulatömeg és a jelentős biológiai stabilitás. Mivel a humuszvegyületek változatos módon keletkeznek, nem definiálható egyfajta általános humin molekulaszervezet (Hessen és Tranvik, 1998). A szárazföldi vegetációból képződött humusz egy része a talajból a csapadék által kimosódva a felszíni vizekbe kerül (Wetzel, 1984; 1990), s ez a bemosódás képezi a mérsékeltövi vizek elsődleges humuszforrását (McKnight és Aiken, 1998). Az alga és mikrobiális biomasszából származó *in situ* humuszképződés jóval kisebb jelentőségű; azonban a leülepedett komplex szerves vegyületek szolubilizációja útján jelentős lehet a vizek oldott humusz tartalmának utánpótlása (McKnight és Aiken, 1998). A vízi humusz minősége, összetétele és koncentrációja függ számos biológiai tényezőtől (pl. a bemosódás mértéke, *in situ* képződés és lebomlás), hidrológiai faktoroktól (pl. hígulás) valamint klimatikus hatásoktól (pl. a csapadék illetve a párolgás mértékétől) (Curtis, 1998). A humuszvegyületek az édesvizek oldott szervesanyag tartalmának fő összetevői, annak akár 80%-át is alkotják (Wetzel, 1983). Egyes források szerint a 4-8 mg L<sup>-1</sup> (Perdue és Gjessing, 1990), mások szerint 5-25 mg L<sup>-1</sup> (Gjessing, 1976) szerves sav koncentráció az általános, de a "fekete vizekben" ez az érték akár 50-70 mg L<sup>-1</sup> is lehet (Gjessing, 1976).



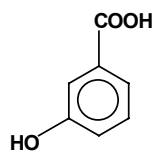
fenol



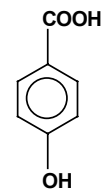
benzoesav



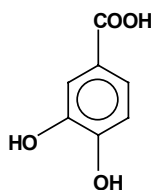
2-OH benzoesav



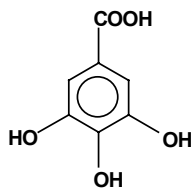
3-OH benzoesav



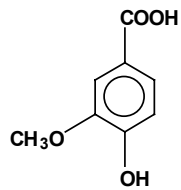
4-OH benzoesav



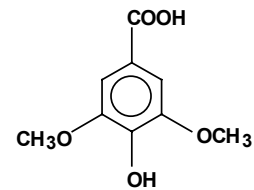
protokatechuszsav



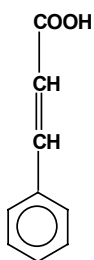
galluszsav



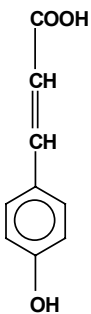
vanillinsav



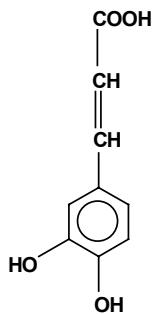
sziringsav



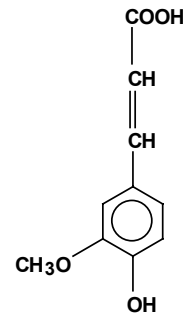
fahéjsav



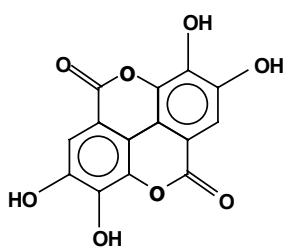
p-kumársav



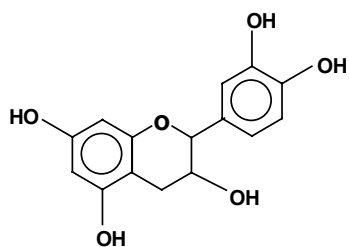
kaffeinsav



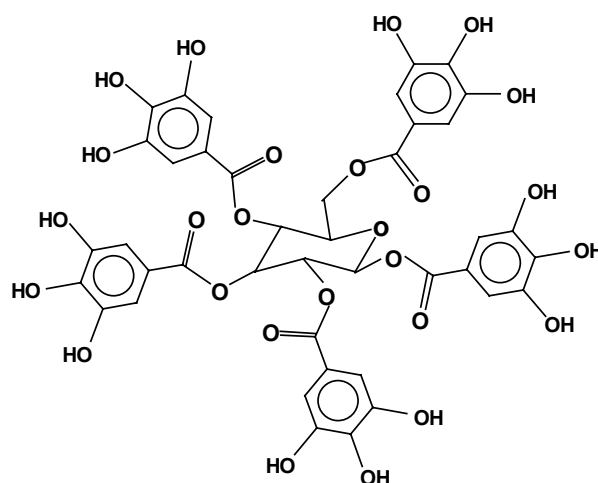
ferulasav



ellagsav



(+) -katechin

 $\beta$ -penta-O-galloil-D-glukóz

1. ábra. Néhány fenol-karbonsav és egyéb növényi sejttal bomlástermék molekulaszervezete.

A humuszvegyületek molekulái számos kelátképzésre alkalmas csoportot (pl.  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{OH}$ ,  $-\text{OCH}_3$ ,  $=\text{O}$ , stb.) hordoznak. Azáltal pedig, hogy komplexálják a szerves és szervetlen vegyületeket (Wetzel, 1993), megváltoztatják azok fizikai-kémiai állapotát, toxicitását, lebomlását és transzportját, s így módon biológiai hatását (pl. Stackhouse és Benson, 1988; Ghillebaert és mtsai., 1996). A humuszanyagokról közismert az a tény, hogy a szárazföldi növények növekedését serkentik, kevésbé ismert azonban, hogy az algák növekedésére is pozitív hatást fejtenek ki (Kim és Wetzel, 1993). Ugyanakkor, gátolják a fotoszintézist és több enzimet, pl. az alkalikus foszfatázt, a  $\text{H}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPázokat (Kim és Wetzel, 1993), illetve bizonyos xenobiotikum metabolizáló enzimek aktivitását (Baer-Dubovska és mtsai., 1998).

Az édesvizekben esetlegesen feldúsuló humuszvegyületek bekerülhetnek a vízi növények és állatok szervezetébe, ahol enzim aktivitás gátló hatást fejtenek ki (Gali és mtsai., 1992; Wetzel, 1993; Zhang és Das, 1994). Vizes fázisban a huminanyagok mikrobiális lebontása lassú – mindössze 0,5-1,0% naponta (Wetzel, 1984, 1990) –, ami jórészt enzimgátló (a mikrobák extracelluláris és membránkötött enzimeit gátló) aktivitásuknak köszönhető (Kim és Wetzel, 1993; Wetzel, 1993). Nyomelem komplexáló sajátosságuk, számottevő (UV-tartománybeli) fényelnyelésük és pH-pufferoló kapacitásuknak köszönhetően befolyásolják az adott vízi környezet fizikai és kémiai karakterét. Ezáltal regulációs szerepet töltenek be a vízi ökoszisztémákban (Wetzel, 1993; McKnight és Aiken, 1998), illetve indirekt módon befolyásolják az ökoszisztéma dinamikáját (McKnight, 1991).

## 2.2. A fenolikumok és a farmakológia

A fenol-karbonsavak, tanninok és flavonoidok népgyógyászati felhasználása az európai és távol-keleti kultúrákban is régi keletű. Az európai területeken megtalálható kocsánytalan tölgy (*Qercus petrea*) kérgének főzetét a népgyógyászat hasmenés, orális, genitális és anális nyálkahártya-gyulladás ellen használta fel, de alkalmazták külsőleg bőrgyulladás elleni, és vérzéscsillapító szerként is (König és Scholz, 1994). Újabban egyre inkább előtérbe kerül a növényi fenolikumok modern gyógyászati felhasználásának kérdése is. A kutatások elindítója a "francia-paradoxon"-nak nevezett jelenség (Frankel és mtsai., 1993; Kinsella és mtsai., 1993) felfedezése volt. Kimutatták, hogy Franciaország borvidékein szignifikánsan alacsonyabb a koronáriás- és szívbetegségekből származó elhalálozás, a trombózis és az érlemezés kialakulása

annak ellenére, hogy a franciák étrendjében igen magas a telített zsírsavtartalom (Frankel és mtsai., 1993; Kinsella és mtsai., 1993). A zsírban gazdag étrend gyakran a zsírsav metabolizmus zavarát, kiegyensúlyozatlanságát idézi elő, amely szoros összefüggésben van a fentebb említett betegségek kialakulásával. A hordók dongáiból illetve a szőlőből származó tanninanyagok (Frankel és mtsai., 1993; Laszlavik és mtsai., 1995) és további növényi polifenol komponensek az emberi szervezetben is antioxidáns ágensként viselkednek, antikarcinogén valamint kardioprotektív aktivitást fejtenek ki (Kinsella és mtsai., 1993; Salah és mtsai., 1995; Newmark, 1996).

Tudományos kutatások a vörösbor fenol-vegyületeinek (1. táblázat) a következő előnyös hatásait mutatták ki:

- 1) csökkentik a zsírfelvételt és kedvezőbb zsírsav egyensúlyt hoznak létre,
- 2) *in vitro* és *in vivo* csökkentik a LDL-oxidációt, gátolják a kémiai és enzimátikus peroxidatív reakciókat,
- 3) csökkentik a plazma és a szövetek peroxid (ROOH) koncentrációját,
- 4) csökkentik az erekben a meszes plakk-képződés és a trombózis kialakulásában szerepet játszó peroxidatív enzimek aktivitását (pl. lipoxigenáz, ciklo-oxigenáz) (Kinsella és mtsai., 1993; Abu-Amscha és mtsai., 1996). Ezek a hatások pedig gátolják egy sor krónikus betegség keletkezését és kifejlődését, mint pl. gyulladások, érlelmeszesedés, rák, szívbetegségek, trombózis és ízületi gyulladás (Kinsella és mtsai., 1993). Magyar kutatók kimutatták, hogy a vörösbor tölgyfahordóban való érlelése során az antioxidánsként ismert növényi polifenolok közül leginkább az ellagsav és a galluszsav koncentrációja növekedik meg, és a szerzők ezt a tény – tekintettel a fent elmondottakra –, összefüggésbe hozzák a vörösbor kedvező élettani hatásaival (Laszlavik és mtsai., 1995). Ugyanakkor, meg kell jegyeznünk, hogy néhány növényi polifenolról, pl. a kvercetinről kimutatták, hogy redox viselkedése (pro- vagy antioxidáns) függ koncentrációjától, a szabadgyök-forrástól és a pH-tól (Laughton és mtsai., 1989; Decker, 1997; Metodiewa és mtsai., 1999). Továbbá, bebizonyították, hogy a laktoperoxidáz, a NADPH citokrom P450 reduktáz és a NAD(P)H-kinon oxidoreduktáz képes bizonyos fenolikumok metabolikus aktivációjára (Laughton és mtsai., 1989; Metodiewa és mtsai. 1999).

**1. táblázat.** Fenol-származékok a borban (Kinsella és mtsai., 1993 nyomán)

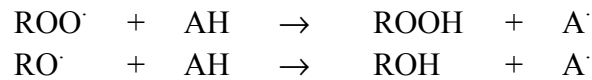
vegyületek	kb. koncentráció (galluszsav ekvivalens)	
	új borban	öreg borban
Nem flavonoidok	235	>250
Cannamates (származék)	165	150
Benzol (származék, ekvivalens)	50	60
Fenolok (illékony, ekvivalens)	5	15
Tanninok	nyomokban	<260
Flavonoidok (teljes)	1000	700
Katechinek	200	150
Flavonolok	50	10
Anthocianinok	200	20
Tanninok (oldható)	550	450
Fenolok (teljes)	1300	900-1200

### 2.2.1. Az ellagsav

Az utóbbi időben központi figyelmet kapott az *ellagsav* (EA), melynek egy sor farmakológiai hatását írták le. Felismerték, hogy csökkenti a vérnyomást (Fiedler és Hildebrand, 1954), gátolja a karcinogenezist és a mutagenezist (Wood és mtsai., 1982; Gali és mtsai., 1992), gátolja a tromboxán B<sub>2</sub> szintézist és ezáltal a trombózis kialakulását (Frankel és mtsai., 1993). Enzim gátlószerként, mint pl. H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPáz inhibitor, csökkenti a gyomorsav szekréciót, ezáltal potenciónalisán alkalmas lehet gyomor- ill. vékonybélfekély klinikai kezelésére (Murakami és mtsai., 1991). Az EA gátolja a policiklusos aromás szénhidrogén-típusú benzo[a]pirén citokrom P450-függő aktiválását, és a benzo[a]pirén DNS-hez való kötődését (Dixit és mtsai., 1985). A fenti példákából látható, hogy az EA antioxidáns hatásának háttérében összetett mechanizmus áll. Többek között szabadgyök-csapdaként is képes működni, vagyis befogja és a gyökökhöz képest alacsonyabb redox-potenciálja révén reakciójukban inaktiválja az oxil-gyököket (a szuperoxid-, hidroxil-, és lipidperoxil-gyököket) (Jovanovich és mtsai., 1995; Salah és mtsai., 1995). Ennek következtében csökken a szervezetben a lipid-peroxidáció mértéke. A polifenolok lipid-oxidációt gátló pontos hatásmechanizmusa még nem ismert, általánosságban véve önregeneráló redukáló ágensként viselkednek (Frankel és mtsai., 1993). Ez az aktivitás azt jelenti, hogy:

a) fém-ion (pl. réz-ion) kelátorként,

b) H-donor gyökfogóként működnek (Shahidi és Wanasundara, 1992; Frankel és mtsai., 1993), s így lipidalkoxil- és lipidperoxil-gyököket fognak be az alábbi reakció egyenletek szerint:



továbbá,

c) ko-antioxidánsként működve regenerálják az  $\alpha$ -tokoferolt annak gyökjén keresztül (Frankel és mtsai., 1993; Salah és mtsai., 1995; Abu-Amsha és mtsai., 1996), – mely egyébként fázis- és lánctranszfer ágensként működve prooxidáns hatást fejthet ki (Bowry és Stocker, 1993).

A réz-kelát képző folyamat lehetséges mechanizmusának azt tartják, hogy a természetes polifenolok úgy komplexálják a  $\text{Cu}^{2+}$ -iont, hogy közben  $\text{Cu}^+$ -ionná redukálják, az pedig redukálhatja a hidroperoxidokat (Frankel és mtsai., 1993). A lánctörő antioxidáns/gyökfogó hatás mellett az ellagsav képes a karcinogénekkal és a DNS-sel komplexet képezni, így gátolja azok kovalens kötással való összekapcsolódását (Wood és mtsai., 1982; Gali és mtsai., 1992; Barch és mtsai., 1995), s ezáltal az  $\text{O}^6$ -metilguanin vagy a 8-hidroxi-deoxiguanozin létrejöttét (Barch és Rundhaugen, 1994), ami egyébként antimutagén, antikarcinogén aktivitást eredményez. E mellett az EA hat a xenobiotikum metabolizmus I. és II. fázisbeli enzimeire azáltal, hogy:

- a) gátolja a benzo[a]pirén citokrom P450 1A1-függő aktiválását (Das és mtsai., 1985), továbbá,
- b) az ellagsav képes a NADPH-kinon reduktáz (Barch és Rundhaugen, 1994) és a glutation S-transzferáz-Ya gén (Barch és mtsai., 1995) antioxidáns szenzitív elemén keresztül transzkripciót indukálni, miáltal a fenti II. fázisbeli celluláris detoxifikáló enzimek specifikus aktivitása az állati szervezetben számottevően megemelkedhet.

### 2.2.2. A tanninsav

Széles körben tanulmányozott a *tanninok* csoportja, melyek általánosságban véve olyan vízdékony polimerizált fenolikumok, melyek precipitálják a fehérjéket (Haslam, 1989). A bőrcserzés (angolul "tanning") – melyhez hagyományosan magas tannin tartalmú tölgyfakéreg kivonat használatos –, ezen a hatáson alapul. Horváth (1981) megfogalmazása tágabb értelmű: a tannin vegyületek közé tartozik bármilyen eléggé

nagy molekulatömegű fenolos vegyület, amely elegendő fenolos hidroxil-csoportot vagy más alkalmas csoportot (pl. karboxil-csoport) tartalmaz ahhoz, hogy effektíve erős komplexet alkosson proteinekkal vagy más makromolekulákkal (pl. keményítő, cellulóz), ill. ásványi anyagokkal. A tanninok két osztályát különböztetjük meg:

- a) *kondenzált tanninok*, más néven proanthocyanidinek, ezek flavonoid polimerek, s toxicitásuk elhanyagolható (mindössze bélnyálkahártya léziókat okoznak, mivel nem szívódnak fel), illetve,
- b) *hidrolizálható tanninok*, melyek poliol (pl. glukóz) illetve polifenol-központú (pl. katechin) galluszsav vagy ellagsav észterek (Reed, 1995).

A hidrolizálható tanninok modell-vegyülete a tanninsav (TA,  $\beta$ -penta-O-galloil-D-glukóz, 1. ábra) (Haslam, 1989). A tanninok fokozott fényelnyelésük következtében védik a növényeket az UV-sugárzás ellen (Gali és mtsai., 1992), valamint védelmet nyújtanak a növényevő állatok ellen, azáltal, hogy ehetetlenül keserű ízűvé teszik a növényt (Gali és mtsai., 1992). A tanninok molekulatömege rendszerint többszöröse az egyszerűbb szerkezetű fenol-karbonsavakénak (pl. ferulasav, kaffeinsav, galluszsav), és a molekula vázát képező aromás gyűrűkhöz is jóval több hidroxil- vagy karboxil-csoport kapcsolódik. Ennek következménye, hogy a tanninok fokozott komplexáló kapacitással rendelkeznek. Fémekkel való kelátképzés útján gátlószerei lehetnek például a Fe-katalizálta szabadgyök és  $H_2O_2$  képződésnek (Gali és mtsai., 1992). Továbbá, gátolják a proteolitikus reakciókat azáltal, hogy H-híd és kovalens kötések, illetőleg hidrofób kölcsönhatások kialakítása révén (oldható vagy oldhatatlan) komplexet képeznek proteolitikus enzimekkel és/vagy azok szubsztrátjával (Gali és mtsai., 1992). Számos kutató számolt be a tanninok erőteljes, általános enzimgátló tulajdonságáról (Murakami és mtsai., 1992; Wetzel, 1993).

A tanninok táplálkozás élettani és toxikológiai hatásának egyaránt a fent említett erős komplexképző készség a legfőbb aspektusa. A komplexképződés erőssége függ a biomolekula és a fenol-vegyület szerkezetétől: az egyszerű fenolok és a hidroxibenzoésavak (pl. 2-hidroxibenzoésav, 4-hidroxibenzoésav) gyengébb kölcsönhatást létesítenek a fehérjékkel, mint a hidroxifenil-propénsavak (pl.: ferulasav, kaffeinsav) (Wetzel, 1993). Legerősebb a komplexképződés a hidrolizálható tanninok (gallo- és ellagotanninok) esetében. A komplexképződés a víz keménységétől is függ, ugyanis a vízben oldott két és három értékű kationok – különösen a  $Ca^{2+}$  és a  $Mg^{2+}$ -ionok –

erősebben kötődnek a fenol-karbonsavakhoz, mint azok a fehérjékhez (Wetzel, 1993), így a keményvízű ökoszisztémákban kisebb ezen vegyületek hatása a vízi élővilágra (Wetzel, 1993). A tannin-vegyületek táplálkozás élettani érték szempontjából negatív hatással is bírnak, például oly módon, hogy magas koncentrációban csökkenthetik az anyagfelvételt, a fehérjék és szénhidrátok emésztését, az állati testsúlygyarapodást. A kérődzők akut intoxikációjához vezethet, ha a fogyasztott növényi táplálék jelentős mennyisége valamely fafaj (pl. tölgy), mely kb. 20%-ban tartalmaz hidrolizálható tanninokat. Mérgezés esetén *hemorrhagicus gastroenteritis* (kifekélyesedő emésztőszervi gyulladás), májnekrozis és vese *proximalis tubulus necrosis* is kialakulhat (Holliman, 1985; Filippich és mtsai., 1991), magas megbetegedési és elhullási arányt eredményezve (Reed, 1995). Világossá vált az is, hogy a tanninok nagy mennyiségben a szervezetbe kerülve tumorkeltők (Huang és mtsai., 1992). A tanninok karcinogénitásának hatásmechanizmusa azonban részleteiben még nem ismert.

A fenol-karbonsavakat/tanninokat a vörösboron kívül a zöld és a fekete teában is megtalálták, és jelenleg is intenzív kutatás folyik az innen kinyerhető aromás vegyületek rákterápiás felhasználását illetően (Huang és mtsai., 1992; Jovanovic és mtsai., 1995; Salah és mtsai., 1995). Az emlősökön végzett farmakológiai kísérletek eredményei alapján (Wood és mtsai., 1982; Huang és mtsai., 1992) várhatóan könnyebb lesz célzottan olyan fenol-karbonsavak keresése, amelyek a rákos betegek kezelésére alkalmasak.

### 2.2.3. A flavonoidok

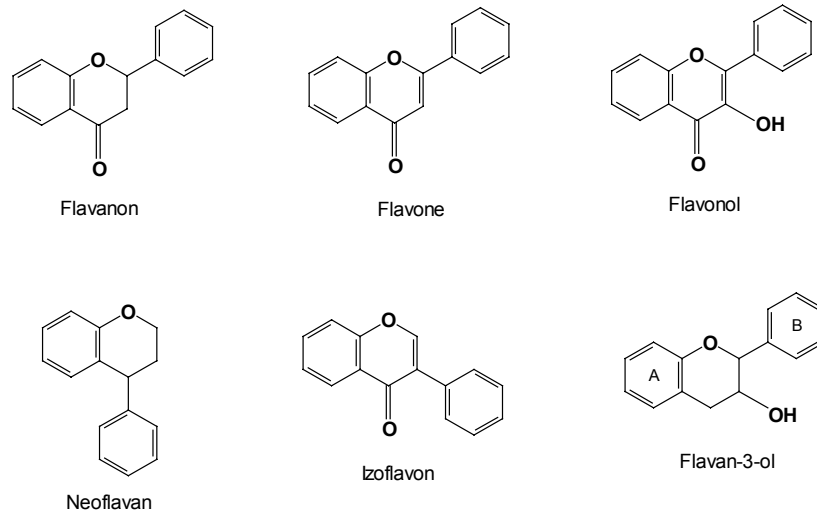
A *flavonoidok* jellegzetes molekulaszervezetük (2. ábra) alapján önálló csoportba sorolt, változó biológiai és farmakológiai hatással rendelkező, általában nem toxikus növényi eredetű polifenol vegyületek. Jellegzetes képviselőjük, a (+)-katechin az *Acacia catechu* fafaj gesztjében található nagyobb mennyiségben, s a vegyület neve is innen származik. A vegyület ezen kívül számos élelmiszerből kimutatható, pl. a kakaóból, teából, borból és az alma héjából (Pierpoint, 1986). A gallokatechinek a magasabbrendű növények másodlagos metabolitjai. Fanyar, csípős ízük miatt a rovarok elkerülik a gallátokat magas koncentrációban tartalmazó növényeket. Bizonyos flavonoidok vérnyomás- és koleszterinszint-csökkentő aktivitást fejtenek ki, továbbá antivirális és antibakteriális aktivitással is rendelkeznek (Haslam, 1989; Jovanovic, 1995), így védő funkciót látnak el számos betegség kialakulásával szemben (Igarashi és Ohmuma, 1994). A flavonoidok



jó néhány növényi eredetű gyógyszer hatóanyagát alkotják, pl. a (+)-katechin a Catergen márkanéven kapható májvédő gyógyszer fontos alkotóeleme (Liu és Castonguay, 1991). Egyébként az emberi étrend is tartalmaz flavonoidokat, kb. napi 1 gramm mennyiségben (Pierpoint, 1986). A flavonoidok jó néhány tagjáról (pl. kvercetin, (+)-katechin) bebizonyosodott, hogy hidroxil-, szuperoxid-, és peroxid-gyökfogók (Salah és mtsai., 1995, Metodiewa és mtsai., 1999). Csökkentik továbbá a  $H_2O_2$ -képződést (Huang és mtsai., 1992), és a szuperoxid-gyök produkciót azáltal, hogy gátolják a protein kináz C és a NADPH oxidáz interakcióját (Huang és mtsai., 1992). Ugyanakkor, bizonyos enzimek, pl. a glutation S-transzferáz ill. a citokromok aktivitását gátolják (Liu és Castonguay, 1991; Zhang és Das, 1994; Baer-Dubowska és mtsai., 1998). A növényi polifenolokra jellemzően a flavonoidok kémiai és biológiai viselkedését is nagyban befolyásolhatják külső tényezők. Mint korábban említettük: pl. a flavonol kvercetinről kimutatták, hogy koncentrációjától és a szabadgyök forrástól függően pro- ill. antioxidánsként is viselkedhet (Metodiewa és mtsai., 1999). A flavonoidok állati és emberi szervezetben kifejtett kedvező élettani hatásainak feltételezett mechanizmusa több pontban foglalható össze:

- a) A prokarcinogéneket (pl. N-nitrozaminokat) aktiválni képes citokrom P450 monooxygenáz enzimrendszer aktivitását gátolják (Liu és Castonguay, 1991).
- b) A prokarcinogének aktiválása során képződött reaktív elektrofil specieseket szabadgyök-csapdaként megköti, ezáltal meggátolja a karcinogének végső formáit abban, hogy kölcsönhatásba lépjenek a DNS-sel (Liu és Castonguay, 1991).
- c) A flavonoidok módosítják a tumorigenezis promóter receptorát, miáltal a daganatkeltők megkötődése és hatása gátolt. Ilyen promóter receptor például a protein kináz C, melyet aktiválni képes a teleocidin vagy a 12-O-tetradekanoilforbol-13-acetát. Ezt a promóter aktiválást képes koncentrációtól függően gátolni a (+)-katechin, az epigallokatechin-gallát, a fisetin és a luteonin (Ferriola és mtsai., 1989; c és Castonguay, 1991; Huang és mtsai., 1992).

A fenol-karbonsavak molekulaszervezete és enzimgátló hatása közti összefüggéseket kutató *in vitro* kísérleteinkben tesztelt fenolikumok közé tartozik a flavonoid típusú (+)-katechin. E vegyület DNS-védőhatást fejt ki egyrészt azáltal, hogy a DNS egyszálú töréseit gátolja, másrészt csökkenti a DNS metilációját az  $O^6$ -guanin és N-7 guanin helyeken (Liu és Castonguay, 1991). Ezáltal sok fenolikumhoz hasonlóan csökkenti néhány mutagén és karcinogén ágens káros hatását (Liu és Castonguay, 1991).



2. *ábra.* A flavonoidok különböző molekulavázai.

## 2.3. A felhasznált mezőgazdasági növényvédő szerek jellemzése

### 2.3.1. A rézszulfát

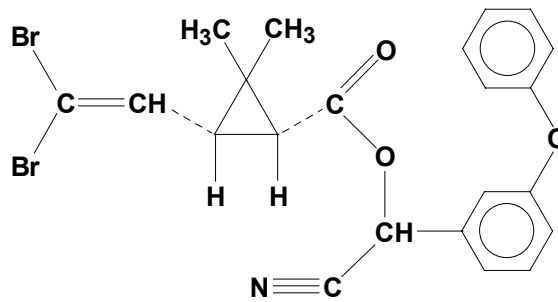
A vízi ökoszisztéma egyensúlyát már  $2 \text{ mg L}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$  szennyeződés felboríthatja, először a baktériumflóra, majd az alsóbbrendű rákok számának drasztikus csökkenése által (Winner és Farrell, 1976). A vízi élőlények nagymértékben akkumulálják szervezetükben a nehézfémeket, így a szerveikben bekövetkező feldúsulás miatt már a vízi környezet kis  $\text{Cu}^{2+}$  tartalma is toxikussá válhat. A fémtartalmú fungicidek gombaölő hatása a belőlük keletkező fém-kationok kelátképző tulajdonságára vezethető vissza. Fontos szerepe van a kation elektronegativitásának és méretének, ugyanis ez határozza meg a fémkomplexek és szulfidok stabilitását, állandóságát. A rézvegyületek (pl. a rézszulfát,  $\text{CuSO}_4$ ) gombaölő hatása azon alapul, hogy a sejt belsejébe jutó  $\text{Cu}^{2+}$ -ionok komplexet képeznek a fehérjék tiol- és amino-csoportjaival, amelyek így aspecifikusan gátlódnak. A rézvegyületek károsító hatásukat a membránon úgy fejtik ki, hogy a molekuláris oxigénhez kapcsolt, szuperoxid-gyök felszabadulásával járó  $\text{Cu}^+ \leftrightarrow \text{Cu}^{2+}$  redox-reakció során a membrán szulfhidril-csoportjait diszulfidokká oxidálja, a megnövekedett mértékű lipid-peroxidáció pedig a membrán destrukciójához vezet. A halak szervezetének zsírtartalma 50%-ban telítetlen zsírsavakból áll (Mazeaud és mtsai., 1979), ezért a molekuláris szabadgyök-reakciók, valamint a lipid-peroxidáció számára fokozott a lehetőség.

### 2.3.2. A deltamethrin

A piretroidokat közel 30 éve alkalmazzák a mezőgazdaságban a rovarkártevők ellen. A korábban kifejlesztett inszekticidekkel szemben előnyös tulajdonságuk, hogy igen széles spektrumú rovarölő szerek, s e mellett a környezetben gyorsan lebomlanak, tehát akkumulációjuk nem jelentős, és gyakorlatilag ártalmatlanok a melegvérűekre, beleértve az embert is (WHO, 1990). Ezzel szemben kifejezetten toxikusak a hidegvérű gerincesekre nézve, például a halakra (Zitko és mtsai., 1979; L'Hotellier és Vincent, 1986; Bálint és mtsai., 1995, 1997). A piretroidok a molekuláris felépítés, kémiai jellemzőik, neurofiziológiai és toxikológiai hatásuk alapján két fő osztályba sorolhatók (Eells és mtsai., 1987):

I. típus – a piretroid molekula ciano-csoportot (nitril-csoportot) nem,

II. típus – ciano-csoportot tartalmaz.



3. *ábra.* A deltamethrin molekulaszervezete.

A Decis 2.5 EC szabadforgalmú rovarirtó szer hatóanyaga a II. típusú piretroidok közé tartozó, harmadik generációs inszekticid, a deltamethrin (DM,  $C_{22}H_{19}Br_2NO_3$ , (S)- $\alpha$ -ciano-3-fenoxibenzil-(1R)-*cisz*-3-(2,2-dibromovinil)-2,2-dimetilciklopropán-karboxilát) (3. ábra), amelyet az egyik legbiztonságosabb forgalomban lévő inszekticidnek tartanak. A Decis 2.5 EC DM tartalma  $25 \text{ g L}^{-1}$ . A DM elsődleges hatása, hogy elnyújtja a  $Na^+$ -ioncsatornák záródását az idegsejtekben (Narahashi, 1984), ezenkívül feltételezik, hogy a GABA receptorokhoz is képes hozzákötődni, gátolva ezzel a GABA-függő kloridion áramlást (Lawrence és Casida, 1983). Mindezen túl számos egyéb hatása is ismert, pl. hat a glukóz metabolizmusra (Cremer és Seville, 1985), kromoszóma aberrációkat indukál (Bhunya és Pati, 1990), befolyásolja a halak ontogenezisét és motorikus aktivitását (Ghillebaert és mtsai., 1996). Számos kísérlet eredményét összefoglalva megállapítható, hogy a DM-nek alapvetően két jól elkülöníthető hatása van: egy rövid

idejű farmakológiai hatás a halálos dózishoz közeli koncentrációnál, illetve egy jóval hosszabb idejű neurotoxikus hatás, amely az idegsejtek pusztulásához vezet (Rose és Dewar, 1983). Általánosan fogalmazva megállapítható, hogy a DM *neuromuscularis dysfunctio*-t vált ki a változó testhőmérsékletű állatokon (Rose és Dewar, 1983). Helikopteres szúnyogirtás során ez a rovarirtó szer az élővizekbe kerülhet, ahol a félélet ideje 2-4 óra. 96 órás laboratóriumi kezelés halfajtól függően  $0,4-2,0 \mu\text{g L}^{-1}$   $\text{LC}_{50}$  értéket eredményez, ez pontynál  $1,84 \mu\text{g L}^{-1}$  (WHO, 1990). A szabadföldi kísérletek azonban lényegesen csökkent toxicitásról számolnak be (WHO, 1990). Nem találtak jelentős különbséget a toxicitásban a hideg és a meleg vízhez alkalmazkodott halfajok esetében (Stephenson, 1982), és úgy találták, hogy azonos halfajra a DM alacsony és magas hőmérsékleten is hasonlóan hat.

## **2.4. Az oxidatív stressz és az antioxidáns védekezőrendszer**

### **2.4.1. A reaktív oxigéntartalmú intermedierek (ROI) és hatásuk**

A szabadgyökök olyan aktivált kémiai elemek, vagy molekulatöredékek, melyek külső elektronhéján egy párosítatlan elektron található. Ebből következően igen reaktívak és általában rövid élettartamúak. Az élő szervezetekre gyakorolt hatásukat tekintve a molekuláris oxigénből, általában átmeneti fém-ionok katalizálta folyamatokban keletkező gyökök, aktivált vegyületek a dominánsak (2. táblázat) (Cadenas, 1989).

Az evolúció során az aerob élet megjelenése vezetett a biokémiai adaptáció azon szintjéhez, hogy már az igen kezdetleges fejlettségi szintű organizmusok is ki tudják védeni a ROI szervezetükre kifejtett káros hatását. A ROI fogalomköre a szabadgyökökön kívül (pl. peroxid-, szuperoxid- és hidroxil-gyökök) a hidrogén-peroxidot és a szingulett molekuláris oxigént is magába foglalja (2. táblázat).

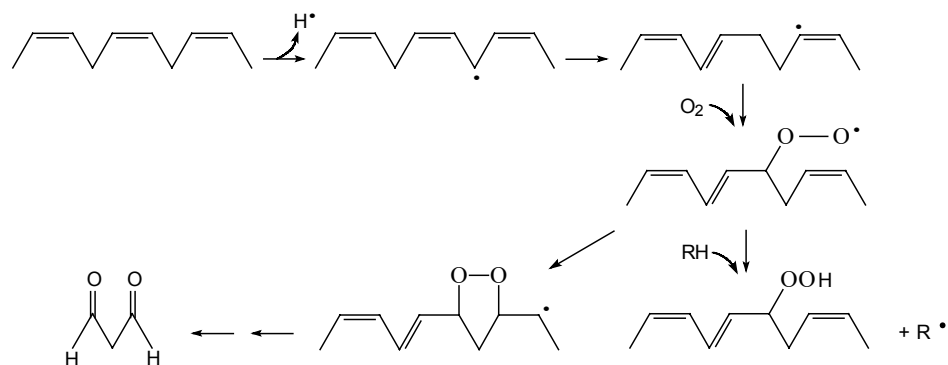
A szabadgyökök és gerjesztett molekulák az aerob szervezetekben keletkezhetnek annak normális fiziológiás működése közben és patológias körülmények között endogén úton, valamint külső ágensek hatására. A fiziológiás szabadgyök-reakciók ellenőrzötten mennek végbe a szervezetben. Fontos szerepük van a különböző sejtek, szubcelluláris organelumok, enzimek működésében, a membrán stabilitásában, a biomolekulák szintézisében, illetve lebomlásában.

2. táblázat. Néhány reaktív vegyület és gyök jellemzői (Sies, 1985).

vegyület, gyök	név	$t_{1/2}$ /[s]	Megjegyzés
$O_2^-$	szuperoxid-gyök anion	$10^{-6}$	jó redukáló és gyenge oxidáló szer, gyakran képződik autooxidációs reakciókban
$HO_2\cdot$	perhidroxi-gyök		a $O_2^-$ protonált formája, lipid-oldékonyabb
$H_2O_2$	hidrogén-peroxid		$O_2^-$ -ből, ( $HO_2\cdot$ ) dizmutációval, vagy közvetlenül $O_2$ -ből képződik; erős oxidálószer, a tiol csoportokat gyorsan oxidálja, diffúziós távolsága nagy
$HO\cdot$	hidroxil-gyök	$10^{-9}$	Fenton (Fridovich, 1983) és a Haber-Weiss (Freeman és Crapo, 1982) reakcióban képződik, igen reaktív, kicsi a diffúziós távolsága
$RO\cdot$	alkoxi-gyök	$10^{-6}$	a $HO\cdot$ -höz hasonlóan reaktív, de nagyobb a diffúziós távolsága
$ROO\cdot$	peroxi-gyök	$10^{-2}$	gyengén oxidál, de nagy a diffúziós távolsága
ROOH	szerves hidroperoxi-gyök		
$^1\Delta_gO_2(O)$	szingulett molekuláris oxigén	$10^{-6}$	erőteljesen oxidáló tulajdonságú gerjesztett $O_2$
$^3RO(RO^*)$	gerjesztett karbonil		

Gyakorlatilag a sejt minden részében keletkezhetnek ROI-ek (Fehér és Vereckei, 1985). A peroxiszomák, a sejtlégzés, a fotoszintézis elektrontranszport lánc, a glikolát, a xantin és a glukóz oxidációja, vagy a szuperoxid dizmutáz működése, az aminosav-lebontás folyamata ill. bizonyos vegyületek (pl. lipofil xenobiotikumok) autooxidációja, a sejt általi biotranszformációja példa olyan fiziológiás folyamatokra, melyek során szabadgyökök keletkeznek. A fehérvérsejtek speciális, pl. testidegen sejtek ellen irányuló működése során egy összehangolt metabolikus reakciósor megy végbe bennük, ami nagy koncentrációban aktív oxigén tartalmú vegyületeket, elsősorban szuperoxid-gyököt termel (Fehér és Vereckei, 1985). Ez szintén fiziológiás folyamat, s idegen kifejezéssel "respiratory burst"-nek nevezzük. A sejtek normális működését tehát bizonyos mértékű szuperoxid-gyök és hidrogén-peroxid termelés kíséri (Freeman és Crapo, 1982; Sies, 1985; Rein és mtsai., 1992; de Zwart és mtsai., 1999), mely olyan láncreakciókat indíthat el, mely eredményeként hidroxil-gyök és egyéb aktív vegyületek, mint pl. lipid-peroxidok képződnek. Patológias szabadgyök-reakcióknak nevezzük a sejtekben végbemenő kontrollálatlan, abnormális gyökreakciókat (Fehér és Vereckei, 1985). Ilyen folyamatokat fiziológiásan keletkező, a kontrollmechanizmusok alól felszabadult gyökök is kiválthatnak (pl. kiterjedt gyulladások kialakulásakor), de

létrehozhatják exogén ágensek, kemikáliák vagy fizikai hatás (pl. mikrohullámú-, Röntgen- vagy UV-sugárzás). A patológiás szabadgyök-reakciók minden biomolekulát képesek károsítani: szabad aminosavakat, fehérjéket, ezek közül létfontosságú enzimeket, lipideket, szénhidrátokat, valamint nukleinsavakat. A szabadgyökök változatos módon károsíthatják a sejtek genetikai anyagát: oxidálják a DNS bázisokat, DNS-száltörést keltenek, vagy kromoszóma aberrációt okoznak, ill. módosítják a génexpressziót (Gali és mtsai., 1992). Ezen hatások következménye megnyilvánulhat karcinogenezis és mutagenesis kifejlődésében (Salah és mtsai., 1995; Cadenas, 1989). Az oxidatív lipidkárosodást lipid-peroxidációnak (LP) nevezzük, mely során a telítetlen zsírsavak reagálnak az aktív oxigén tartalmú vegyületekkel, s ez úton epoxidok, majd lipid-peroxidok képződnek. Ez a folyamat károsítja a membránokat, amelyek elvesztik fluiditásukat, lecsökken membránpotenciáljuk, és megnő a permeabilitásuk. A LP olyan komplex folyamat, amely mind a növényi, mind az állati szervezetben lejátszódik. A lipid-peroxidációs reakciósor a lipid-gyökök képződésével kezdődik, majd azok propagációjával folytatódik. Ezután a telítetlen lipidekben a kettős kötés átrendeződik, a végső fázisban pedig végbe megy a membránlipidek destrukciója, mely során olyan változatos bomlástermékek keletkeznek, mint alkoholok, ketonok, aldehidek és éterek (4. ábra). Például a linolénsav peroxidációja legalább 20-féle degradációs termék képződéséhez vezet. Mivel a biológiai membránok általában telítetlen zsírsavakban gazdagok és oxigéngazdag, fém-ion tartalmú folyadékba vannak ágyazva, fokozott hajlandóságot mutatnak a peroxidációra. A LP fogalomkörébe – tágabb értelemben – beletartozik az összes alapvető biomolekula (fehérjék, nukleinsavak, szénhidrátok) ROI általi oxidatív károsodása (Fehér és Vereckei, 1985).



4. ábra. A lipid-peroxidáció alaplépései.

### 2.4.2. A kis molekulájú antioxidánsok és az antioxidáns enzimek

A fenti, veszélyes (lánc)reakciók ellen védi a sejteket az antioxidáns védekezőrendszer, mely enzimatis és nem-enzimatis elemekkel is rendelkezik. Antioxidáns lehet minden olyan komponens, amely képes közömbösíteni az aktív oxigén tartalmú vegyületeket anélkül, hogy önmaga reaktív gyökké alakulna. A szuperoxid dizmutáz (SOD), a kataláz (CAT) és a glutation-peroxidáz (GPx) egymással szorosan együttműködve alkotja az állati antioxidáns védekezés enzimatis oldalát. Az antioxidáns enzimek egymástól való függését példázza, hogy kimutatták a szuperoxid-gyök kataláz és más hemtartalmú peroxidázokat gátló hatását, amely ellen a SOD védelmet nyújt. Ugyanakkor a kataláz és a peroxidázok védelmet nyújtanak a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ellen, mely a három fajta SOD közül kettőt inaktivál (Fridovich, 1983). A nem-enzimatis antioxidánsokat a 3. táblázatban soroljuk fel.

**3. táblázat.** Nem-enzimatis antioxidánsok az élő szervezetben (Fehér és Vereckei, 1985; Sies, 1985)

antioxidánsok	megjegyzés
<b>lipidoldékony antioxidánsok</b>	
$\alpha$ -tokoferol (E-vitamin)	membránhoz kötött gyökfogó, H-donor, lánctörő antioxidáns
K-vitamin	redox-reakciókra képes kinon-struktúrával rendelkezik
koenzim Q (ubikinon)	szerkezete hasonló az E- ill. a K-vitaminhoz
$\beta$ -karotin, A-vitamin	<sup>1</sup> $\Delta_g$ O <sub>2</sub> megkötő, antikarcinogén, fémkelátor
<b>vízoldékony antioxidánsok</b>	
aszorbinsav (C-vitamin)	O <sub>2</sub> <sup>-</sup> és HO $\cdot$ -gyökfogó, erős redukáló szer, lánctörő antioxidáns, az $\alpha$ -tokoferolt regenerálja
húgysav	az aszorbinsavat regenerálja
glutation (GSH)	$\gamma$ -glutamil-ciszteinil-glicin, peptidázok nem bontják, az élő szervezetek egyik legfontosabb antioxidánsa, direkt <sup>1</sup> $\Delta_g$ O <sub>2</sub> és HO $\cdot$ -scavenger
egyéb tiolok (cisztein, ciszteinamin, metionin)	a szabadgyökök számára alternatív célt jelentenek, H-leadással diszulfidot képeznek
glukóz	HO $\cdot$ -gyökfogó (Smirnov, 1998)
flavonoidok, fenol-karbonsavak	növényi antioxidánsok (Halliwell, 1978; Newmark, 1996)
plazma proteinek cöroloplazmin, transzferrin	feroxidáz aktivitás ( $\rightarrow$ a lipid-peroxidáció fémkatalízisét gátolja), direkt O <sub>2</sub> <sup>-</sup> -scavenger

Az antioxidánsok a lipid-peroxidáció különböző fázisait gátolják, s azokat, amelyek ezt a szabadgyökök befogása útján teszik, "scavenger"-eknek (gyökfogóknak) nevezzük. A lipid-peroxidációt elősegítő anyagok a prooxidánsok. Ugyanazon anyag –

koncentrációjától és a molekuláris környezettől függően – viselkedhet pro- vagy antioxidánsként. Az antioxidánsok kölcsönhatásban állhatnak egymással, jó példa erre a C-vitamin és az E-vitamin reakciója, melyben a C-vitamin regenerálja az E-vitamint azáltal, hogy H-atomját átadja az E-vitamin-gyöknek, amely úgy képződik, hogy előzőleg az E-vitamin hidrogént adott le egy peroxid-gyöknek (Fehér és Vereckei, 1985).

**4. táblázat.** Az antioxidáns védekezőrendszerhez kapcsolódó járulékos enzimek (Fehér és Vereckei, 1985; Sies, 1985)

<b>járulékos enzimrendszer</b>	<b>megjegyzés</b>
NADPH-kinon oxidoreduktáz	2 elektronos redukciót végez, dikumarol érzékeny
aldehid-reduktáz	metabolizálja a lipid-peroxidáció termékeit
epoxid-hidroláz	metabolizálja a lipid-peroxidáció termékeit
citokrom P450 monooxygenázok	metabolizálják az endogén lipideket és prosztaglandinokat
kapcsolódó enzimrendszerek:	
UDP-Glukuronil transzferáz	metabolitok szervezetből történő kiürítésében játszik szerepet glukuronidálás útján
szulfotranszferáz	szulfát-transzferrel javítja a metabolitok vízdékonyságát
GSH S-transzferáz (GST)	az elektrofil xenobiotikumokhoz GSH-t kapcsol, így vízdékonyságuk javul
glutathion reduktáz (GR)	NADPH-függő enzim, a GSSG-t redukálja GSH-vá
NADPH források:	a glutathion reduktáz működéséhez termelnek NADPH-t
glukóz-6-foszfát dehidrogenáz	
6-foszfoglukonát dehidrogenáz	
izocitrát dehidrogenáz	
transzshidrogenázok	
transzport rendszerek	GSSG export

Az antioxidáns enzimeken kívül (SOD, CAT, GPx) számos egyéb enzim is részt vesz az antioxidáns védekezés folyamatában (4. táblázat). Funkcionális szempontból a ROI-k lipid-peroxidációt eredményező hatása ellen való védekezésnek három frontvonala különíthető el:

1. védővonal: a SOD, CAT és GPx együttműködve gátolja a LP iniciációját, ide tartoznak még azonos aktivitással a direkt gyökfogó aktivitással rendelkező természetes antioxidánsok,
2. védővonal: a LP egyes lépéseit gátló, a sejtekben jelenlévő természetes antioxidánsok,



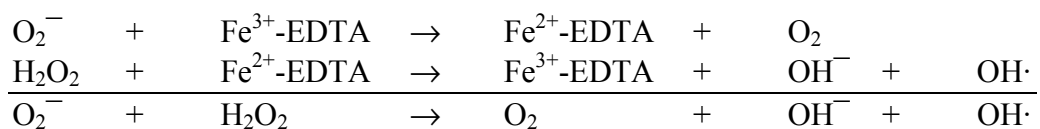
3. védővonal: tagjai a már végbement LP végtermékeit, a lipid-peroxidok bomlásakor keletkező alkánokat, alkoholokat, epoxidokat és aldehideket lebontó enzimek, pl. epoxid-hidroláz, aldehyd-reduktáz, citokrom P450 enzimek (Fehér és Vereckei, 1985).

A sejtszintű stresszválasz lényegében ezen elemek aktivitásának/koncentrációjának a megváltozásában mutatkozik meg. A kialakuló stressztolerancia a különböző szerveződési (genetikai, biokémiai, élettani, szerkezeti) szinteken megvalósuló adaptációs értékek összegeként fogható fel.

#### 2.4.2.1. A szuperoxid-gyök és a szuperoxid dizmutáz

A  $O_2^-$  számos olyan reakció során képződik, melyek során a molekuláris oxigén redukálódik, ilyen pl. a leukoflavinok, hidrokinonok, katekolaminok, tiolok, tetrahidropterinek, hemoproteidek és a redukált ferredoxin autooxidációja. Továbbá, több oxidatív enzim, pl. xantin oxidáz, vagy az aldehyd oxidáz reakciója, és olyan szubcelluláris organellek, mint a kloroplasztisz vagy a mitokondrium, de a "respiratory burst" során az aktivált polimorfonukleáris leukociták és makrofágok is szuperoxid-gyököket termelnek (Hassan és Fridovich, 1980; Fehér és Vereckei, 1985).

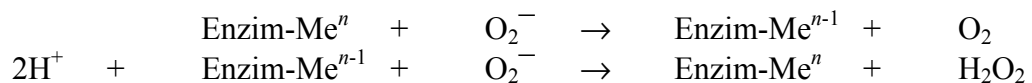
A szuperoxid-gyök kevésbé reaktív, mint a hidroxil-gyök (2. táblázat), mégis képes arra, hogy inaktiválja a vírusokat, elpusztítsa a baktériumokat, lizálja a vörösvértesteket, depolimerizálja a hialuronsavat, inaktiválja az enzimeket és károsítsa a DNS-t. A legtöbb esetben a  $O_2^-$  károsító hatása a szimultán képződő  $H_2O_2$  keletkezésének függvénye, ugyanis a  $O_2^-$  a Haber-Weiss reakció során képes redukálni a  $H_2O_2$ -t, s így a rendkívül reaktív  $OH\cdot$ -gyök képződik (Hassan és Fridovich, 1980; Fehér és Vereckei, 1985):



A fentiek alapján tehát a SOD és a CAT hidroxil-gyökfogókkal együtt képes megfelelő védelmet nyújtani a  $O_2^-$  káros hatásai ellen.

A SOD megtalálható minden aerob szervezetben, számos aerotoleráns anaerob, valamint néhány obligát anaerob élőlényben. A SOD a metalloproteinek közé tartozik, Cu és Zn, vagy Mn ill. Fe atom foglal helyet az enzim aktív centrumában. A Cu/Zn- és a

Fe-SOD, illetve a Mn-SOD-ok két elkülönülő fejlődési irányvonalat képeznek, így nem mutatnak szekvencia-homológiát. Azonos aktivitásuk, vagyis szuperoxid-gyök átalakítási képességük a légköri oxigén megjelenésének közös szelekciós hatására alakult ki. A Fe- és Mn-SOD prokariota karakterű, és jelentős a szekvencia-homológia a két típus között. A Fe-SOD az obligát anaerobokban, a Mn-SOD a mitokondriumban (de emberben a máj citoszolban is) előfordul, alátámasztva ezen sejtalkotó endoszimbiotikus eredetét. A Cu/Zn-SOD 32000 D molekulatömegű dimer enzim, alegységenként egy Cu és egy Zn atomot tartalmaz és az eukarota citoszolban fordul elő a legnagyobb mennyiségben. A Zn-nek szerkezet stabilizáló szerepe van,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$  vagy  $\text{Cd}^{2+}$  ionnal helyettesíthető, a  $\text{Cu}^{2+}$ -ion a katalitikus aktivitásért felelős. A Cu/Zn-SOD-ot a hidrogén peroxid inaktiválja, aktivitását (a  $\text{Cu}^{2+}$ -ionhoz kötődve) gátolja a cianid-ion, s ezen a tulajdonságán alapul a biológiai mintákból történő Cu/Zn-SOD és Mn-SOD aktivitások elkülönítése. A Mn-SOD baktériumokban a leggyakrabban 40000 D molekulatömegű dimer formájában fordul elő, míg csirke májból vagy élesztő mitokondriumból tetramer formát izoláltak (Hassan és Fridovich, 1980). A SOD által katalizált reakció az alábbi két reakció egyenlet alapján játszódik le:



Egyéb, SOD által katalizált reakció nem ismert, ami a SOD kizárólagos szubsztrát-specifitását jelzi.

A SOD aktivitásának meghatározására számos direkt és indirekt módszert dolgoztak ki. A direkt módszerek közé tartozik a SOD által katalizált reakció során a szubsztrát (a  $\text{O}_2^-$ -gyök) fogyásának, illetőleg a keletkező termék, a  $\text{H}_2\text{O}_2$  keletkezési sebességének mérése nagyműszerekkel (EPR, NMR) vagy polarográfiás eljárással. Habár a fenti módszerek igen megbízhatóak, a szükséges mérőműszerek és berendezések többnyire nem állnak rendelkezésre biokémiai laboratóriumokban, így elterjedtebb a spektrofotometrián alapuló indirekt módszerekkel történő aktivitás meghatározás. Az utóbbiak egyik lehetősége a "pozitív-típusú" módszerek alkalmazása. Így pl. 460 nm-nél spektrofotometrián követhető a riboflavinnal aktivált dianizidin fotooxidációja, mely reakciót a SOD elősegíti, azáltal, hogy deaktiválja a fotokémiai úton keletkező  $\text{O}_2^-$ -gyököt, mely redukálja a köztitermék dianizidin-gyököt, ezáltal csökkenti a dianizidin oxidációját. A legelterjedtebb a "negatív-típusú" módszerek alkalmazása, ahol a SOD

csökkentve a  $O_2^-$ -gyök koncentrációját, gátolja valamely szerves vegyület spektrofotometriásan követhető autooxidációját vagy redukcióját. A legutóbbira példa a xantin oxidáz–xantin–citokrom C rendszer, ahol a xantin oxidáz–xantin reakcióban keletkező, a citokrom C-t redukáló  $O_2^-$ -gyök koncentrációt csökkentő SOD gátolja a citokrom C redukcióját. A legolcsóbb és talán az egyik legegyszerűbb "negatív-típusú" módszer az epinefrin lúgos pH-n,  $O_2^-$ -gyök által katalizált, adrenokrommá történő autooxidációjának spektrofotometriás követése 480 nm-nél (Hassan és Fridovich, 1980).

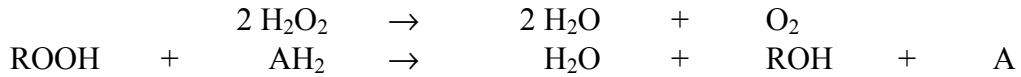
#### 2.4.2.2. A kataláz

A CAT (hidrogén-peroxid oxidoreduktáz, EC 1.11.1.6.) az egyik legelterjedtebb enzim a természetben; megtalálható az összes aerob mikroorganizmusban, a növényi és állati sejtekben. A CAT aktivitás az emlősökben szövetenként igen változó: a legmagasabb a májban és a vesében, míg a kötőszövetekben az aktivitás alacsony. Ezen sejtekben a CAT főként partikulumhoz kötött (pl. a mitokondriumban és a peroxisómában), míg a vörösvértestekben, melyek normális esetben CAT-ban gazdagok, oldott állapotban található (Bergmeyer, 1983).

A CAT 240000 D molekulatömegű, tetramer, tetraédesen elrendezett identikus alegységekből felépülő hemtartalmú enzim, alegységenként 4 db Fe atomot tartalmaz (Bergmeyer, 1983). A CAT fiziológiai funkciója többrétű. Egyrészt a szervezetben, specifikus peroxidázként  $H_2O_2$ -szint regulátorként hat (pl. a máj peroxisómákban számos  $H_2O_2$ -produkáló enzimmel, pl. urikázzal működik együtt), másrészt a vörösvértestekben a GPx-zal együtt lát el védő funkciót a hemoglobin és egyéb SH-fehérjék számára (Bergmeyer, 1983).

A máj, fehér- és vörösvérsejt CAT-t érintő orvosi és gyógyszeripari kutatások újabban egyre inkább előtérbe kerülnek, tekintettel annak az oxidatív stresszben betöltött szerepére (pl. metanol és hangyasav peroxidáció, magas  $H_2O_2$ -bontó aktivitás). Így terápiás céllal már régóta alkalmaznak SOD és CAT hatóanyagtartalmú gyógyszereket. Esetenként ajánlott a szérum CAT aktivitásának mérése diagnosztikai célból a hematológiai rendellenességeknél, és szűrő tesztként kiválasztó szervrendszeri fertőzések detektálására (Bergmeyer, 1983).

A CAT, mint enzim több tekintetben is szokatlan sajátosságokat mutat. Először is, kettős katalitikus aktivitással rendelkezik, mert a következő reakciókat katalizálja:



A második egyenlet a CAT peroxidáz-szerű aktivitását mutatja be (H-donor oxidáció, pl. etanol, hangyasav, fenolok oxidációja.)

Azt, hogy melyik lesz a domináns reakció, a H-donor koncentráció ill. a  $\text{H}_2\text{O}_2$  steady-state koncentráció, valamint a  $\text{H}_2\text{O}_2$  produkció határozza meg. Mindkét esetben az aktív kataláz- $\text{H}_2\text{O}_2$  komplex I. alakul ki először. A  $\text{H}_2\text{O}_2$ -molekula bomlása, – amelyben a 2. molekula  $\text{H}_2\text{O}_2$  szolgál H-donorként a komplex I. számára – rendkívül gyorsan játszódik le ( $k \cong 10^7 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ). Ezzel szemben a peroxidatív reakciók relatíve lassúak ( $k \cong 10^2\text{-}10^3 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ). Ismert, hogy a CAT aktivitás nem követi a Michaelis-Menten kinetikát, ugyanis az enzimet a kezelhető koncentráció-tartományon belül (5 M) nem lehet szubsztrátjával telíteni. Ennek az az oka, hogy 0,1 M  $\text{H}_2\text{O}_2$  koncentráció felett szubsztrát gátlás következtében gyors az enzim inaktivációja, mely során az aktív enzim- $\text{H}_2\text{O}_2$  komplex I. inaktív II. és III. komplexszé alakul át. Továbbá, magas  $\text{H}_2\text{O}_2$  koncentrációnál az intenzív  $\text{O}_2$  buborék képződés lehetetlenné teszi az aktuális  $\text{H}_2\text{O}_2$  koncentráció spektrofotometriás meghatározását. A gyakorlatban a  $K_S$  és  $v_{\max}$  értékének meghatározása a kisebb szubsztrát koncentrációnál mért aktivitások extrapolációjával történik. A szubsztráttal telített enzimek reakcióival szemben a  $\text{H}_2\text{O}_2$  enzimatis elbontása elsőrendű reakció, amely mindig arányos a  $\text{H}_2\text{O}_2$  koncentrációval. Mivel a CAT által katalizált  $\text{H}_2\text{O}_2$  bontásának aktiválási energiája igen alacsony ( $2500\text{-}7100 \text{ kJ mol}^{-1}$ ), a reakciónak csak kis hőmérsékletfüggése van ( $Q_{10} = 1,05\text{-}1,12$ ), így elvileg  $0\text{-}37^\circ\text{C}$  hőmérséklet-tartományban bárhol mérhetünk, de a  $20^\circ\text{C}$  az általánosan elfogadott.

A CAT aktivitás meghatározásának alapvetően két típusa lehet az alapján, hogy a  $\text{H}_2\text{O}_2$ -bontást, vagy az  $\text{O}_2$ -felszabadulást követjük az időben. A  $\text{H}_2\text{O}_2$ -fogyását meghatározhatjuk titrimetriával (jodometria vagy permanganometria), fluorimetriával (pl. diacetil-dikloro-fluoreszcein alkalmazásával), a legelterjedtebb azonban a spektrofotometria, ahol a  $\text{H}_2\text{O}_2$ -fogyást a szubsztrát abszorpciós maximumának megfelelő hullámhossznál (240 nm) követik UV-spektrofotométerrel. Alternatív módszer lehet az  $\text{O}_2$ -felszabadulás követése oxigén elektród segítségével vagy polarográfiás úton. A módszerválasztásnál figyelembe kell venni, hogy a titrimetriás módszerek elsősorban összehasonlító vizsgálatokra alkalmasak. Biológiai anyagminta

(homogenát, hemolizátum) esetén az UV-spektrofotometria alkalmazása a legelfogadottabb, mivel megfelelően érzékeny, specifikus és gyors (Bergmeyer, 1983).

#### 2.4.2.3. A glutation-peroxidáz

Közel 50 éve fedezték fel, hogy a GPx az az enzim, amely a hemoglobint védi az oxidatív károsodástól a vörösvértestekben, később pedig fény derült a prosztaglandin szintézisben betöltött szerepére. Összehasonlító kutatások megállapították, hogy az állatvilágon belül a legmagasabb GPx aktivitások egérben és pontyban mérhetők.

A szerzetkutatások 76000-95000 D közötti, változatos molekulatömegű, tetramer enzimeként írták le a GPx-t, mely semleges pH-n csak gyenge, lúgos pH-n, GSH ill. etanol jelenlétében azonban megfelelő stabilitással rendelkezik.

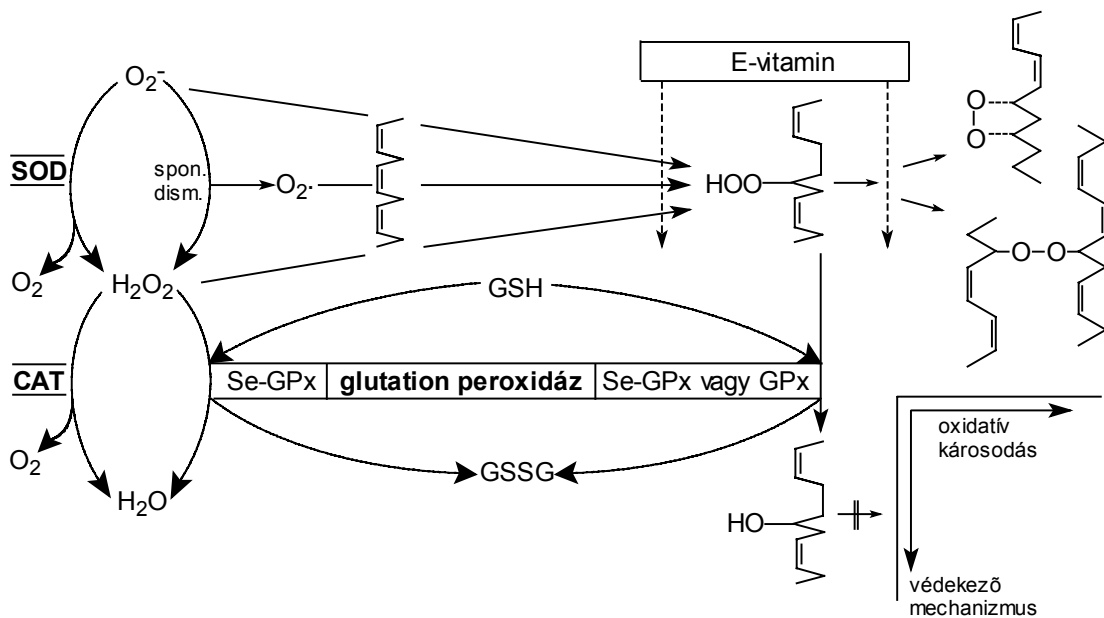
A GPx szélesebb szubsztrát specifitással rendelkezik, mint a SOD, s hasonlóan a CAT-hoz, a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-bontásán kívül katalizálja a telítetlen zsírsavakból képződött szerves hidroperoxidok stabil lipid alkoholokká történő átalakítását (Wendel, 1980). Ismert, hogy mind a szervetlen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mind a szerves peroxidok félélet ideje, tehát reakciókészsége messze alulmúlja a párosítatlan elektronnal rendelkező szabadgyökök ilyen sajátságait. Azonban, ezen ágensek – közvetett úton, láncreakciók propagálása által – mégis rendkívül káros hatást fejthetnek ki a létfontosságú biomolekulákra.

Összetétel és funkcionalitás alapján megkülönböztetünk szelено-glutation-peroxidázt, és Se-t nem tartalmazót. Csak a szelenociszteint tartalmazó GPx (Se-GPx) képes a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bontására, míg a szerves lipid-peroxidok átalakítására mindkét forma képes (Wendel, 1980). Eltérően a CAT-tól a GPx esetében, a reakció második szubsztrátja nem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, hanem GSH, amely a redox-reakcióban egy diszulfid-híd kialakulása közben oxidálódik és 2 mol GSH-ból 1 mol GSSG képződik:



A két szubsztrát reakciója során az enzim aktív centrumában két ROOH hatására a szelено-cisztein két lépésben oxidálódik, először szelenén-, majd szelenin-sav képződik, melyet két GSH redukál az eredeti, nem oxidált állapotába. Az antioxidáns védekezőrendszer enzimikus részének első vonalában tehát a SOD H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dá alakítja a O<sub>2</sub><sup>-</sup>-gyököket, s ezek további átalakítását, végső detoxifikálását végzi a Se-GPx a CAT-

zal együtt. Az antioxidáns védekezés harmadik frontvonalában pedig a Se-GPx a peroxidált membránalkotó telítetlen zsírsavak alkoholokká redukálásával gátolja a lipid-peroxidációhoz vezető szabadgyök-lánreakciók propagációját (5. ábra). Habár a  $\text{H}_2\text{O}_2$  közömbösítését tekintve a GPx és a CAT bizonyos mértékben helyettesítheti egymást, a GPx a vörösvértetek integritásának fenntartásában esszenciális szerepét tölt be. Ezt az bizonyítja, hogy amennyiben a vörösvérteteket nem éri extra prooxidáns hatás, a humán acatalasemiák hematologiailag indifferensek, ezzel szemben a csökkent vagy zéró GPx aktivitás hemolitikus betegségek kialakulásához vezet. A Se-GPx szubcelluláris előfordulására az jellemző patkányban, hogy az összaktivitás 70%-a mérhető a máj citoszólban, 30%-a a mitokondriális mátrixban, de a fő  $\text{H}_2\text{O}_2$ -produkáló és CAT-ban gazdag organellumban, a peroxiszomákban egyáltalán nem mutatható ki (Wendel, 1980).



5. ábra. Az antioxidáns védekezőrendszer összehangolt működése (Wendel, 1980).

A GPx aktivitásának meghatározásához kataláz-rezisztens szerves hidroperoxid szubsztrátot, pl. terc-butil hidroperoxidot vagy kumén hidroperoxidot használnak. A redox-reakció során még nem oxidálódott (vagyis visszamaradt) GSH-t mérik vissza Ellman-reagenssel (DTNB), mellyel a szulfid-csoportot hordozó tripeptid spektrofotometriásan meghatározható mennyiségű, sárga színű komplexet képez. A GPx-t – a CAT-hoz hasonlóan a szubsztrát okozta inaktiválódás miatt – peroxid-szubsztrátjával nem lehet telíteni. A másik elterjedt módszer a GPx által oxidált

glutation (GSSG) mennyiségét méri vissza enzimatis úton glutation reduktáz felhasználásával. Ez esetben a NADPH-fogyást határozzák meg, s ezen adatból következtetnek a GPx által átalakított GSH mennyiségére (Wendel, 1980).

Összességében megállapítható, hogy a GPx-ok igen jelentős szerepet játszanak az esszenciális intracelluláris kis molekulatömegű vegyületek, a fehérjék, illetőleg a többszörösen telítetlen zsírsavak oxidatív károsodása elleni védekezésben és az okozott elváltozások kijavításában.

## **2.5. A biotranszformáció: a citokrom P450 izoenzimek és a konjugációs enzimek**

Az állati szervezetbe került idegen, általában lipofil tulajdonságú szerves vegyületek, – az ún. xenobiotikumok –, nehezen ürülnek ki. Ezen anyagok legnagyobb része a szervezet enzimrendszereinek összehangolt működése során metabolizálódik, mely folyamatot biotranszformációnak nevezzük. A fenti folyamat központja a máj, mivel itt mérhető a metabolizáló enzimek legnagyobb specifikus aktivitása (Buhler és Williams, 1988). Az antioxidáns védekezőrendszer szoros kapcsolatban áll a biotranszformációs reakciókkal, melyek alapvetően két fázisra különíthetők el. Az I. fázisbeli enzimek közé főként a citokrom P450 enzimek tartoznak, melyek a lipofil vegyületeket oxidálják (Kleinow és mtsai., 1987). A II. fázisbeli reakciók során pedig a xenobiotikumok, vagy azok I. fázisbeli metabolitjai konjugálódnak poláros, endogén anyagokkal: glukuronsavval, szulfáttal, vagy glutationnal. Ez utóbbi reakciókat a konjugációs enzimek: az UDP-glukuronil transzferáz, a szulfotranszferáz és a glutation S-transzferáz katalizálják. Az I. fázisbeli metabolitok, illetőleg a II. fázisbeli konjugációs termékek polárosak, tehát vízoldékonyak, és általában kevésbé toxikusak, valamint gyorsan kiüríthetők a szervezetből (James, 1987; Foureman, 1989; Okey, 1990).

A citokrom P450-függő monooxigenázok terminális oxidázként a molekuláris oxigén egyik atomját a szubsztrátba építik (míg a másiktól egy molekula víz képződik). A monooxigenázok katalitikus aktivitásáért a citokrom P450 kofaktor, specifitásáért pedig a szubsztrátokat kötő izofehérjék felelősek. A citokrom P450 enzimrendszer által katalizált reakciókhoz szükséges két elektront a NADPH-ról a NADPH-citokrom P450 reduktáz szállítja. A sejten belül a xenobiotikumokat metabolizáló P450 enzimek az endoplazmatikus retikulumban találhatóak (Coon és mtsai., 1992). A xenobiotikumok közül számos specifikus induktora bizonyos citokrom P450 izoenzim géneknek. (Okey,

1990). Az elektrontranszporttal járó oxidációs folyamat erőteljesebb szabadgyök termeléssel jár (elsősorban  $O_2^-$  képződik), ez pedig hatással van az antioxidáns enzimrendszer aktivitására, illetve a kismolekulájú antioxidánsok, pl. a glutation koncentrációjára, s a LP-s folyamatokra.

Meg kell említenünk, hogy a citokrom P450 enzimek a méregtelenítésen kívül részt vesznek prokarcinogén vegyületek aktiválásában is, ugyanis az oxidáció bizonyos vegyületek esetében növeli azok toxicitását. A több mint másfélszáz P450 gént indukálhatóságuk alapján géncsaládokba sorolják. Halakban legnagyobb mértékben a CYP 1A géncsalád – tagjai pl. az etoxiresorufin O-deetiláz [EROD] és a 7-etoxikumarin O-deetiláz [ECOD] – végzi számos poliaromás szénhidrogén átalakítását. Egyes metabolitok (pl. epoxidok) kovalensen kötődhetnek a makromolekulákhoz (DNS, fehérjék), ezért fokozottan mutagén vagy citotoxikus hatásúak (Buhler és Williams, 1988). A méregtelenítő és "javító" folyamatok azonban valamelyest ellensúlyozzák a P450 1A enzimek okozta karcinogén aktiválás kockázatát (Stegeman és Lech, 1991).

## 2.6. A halakat ért stressz és a szövetkárosodás bioindikátorai

A vércukorszint változása az élőlényt ért általános stresszhatás mérésére alkalmas (Wedemeyer, 1970). A szervezet károsodásának egyik leggyakoribb formája a szövetnekrózis. Szövetnekrózis során a széteső sejtekből a transzaminázok a vérbe kerülnek, és az ott mérhető megnövekedett aktivitásuk jelzi a szöveti károsodás mértékét (Bell, 1968; Onishi és Murayama, 1970). A szövetnekrózist jelző transzamináz (AspAT: aszpártát aminotranszferáz, régebben GOT: glutaminsav-oxálecetsav transzamináz, EC 2.6.1.1; és AlaAT: alanin aminotranszferáz, régebben GPT: glutaminsav-piroszőlősav transzamináz, EC 2.6.1.2) enzimeket – elsősorban a humámdiagnosztikában – már hosszú ideje használják szövetkárosodás kimutatására (Bell, 1968).

## 2.7. Az élővizek biomonitorozása

A legnagyobb környezeti veszélyt a poliaromás szénhidrogének (Celandier és Förlin, 1995; Rodriguez-Ariza és mtsai., 1995), a poliklórozott dibenzo-*p*-dioxinek (2,3,7,8-tetraklorodibenzodioxin, [TCDD]), dibenzofuránok, planáris halogénezett aromás szénhidrogének (pl. poliklórozott bifenilek, [PCB]) (Blom és Förlin, 1997) és más



halogénezett szervesanyagok, mint pl. peszticidek és herbicidek (Jensen és mtsai., 1991) okozzák.

Számos tanulmány rámutatott, hogy a citokrom P450 1A1 izoenzimek (EROD és AHH) aktivitása gyakran megnövekszik a szennyezett vizekben élő halakban (Vindimian és mtsai., 1991; Förlin és Celandier, 1993). Megjegyzendő, hogy ezen enzimindukció kimutatása nem alkalmas a szennyező anyagok kémiai azonosítására, tehát az analitikai mérések nem helyettesíthetők toxikológiai mérésekkel. Ugyanakkor, a megemelkedett P450 aktivitás fokozott szabadgyök termeléssel jár, s ez az oxidatív stresszhatás megmutatkozik a redox-paraméterek változásában (Rein és mtsai., 1992; Lemaire és Livingstone, 1993; de Zwart és mtsai., 1999), illetve a szövetek oxidatív károsodásában is (de Zwart és mtsai., 1999; Gupta és mtsai., 1999; Kale és mtsai., 1999). Ezáltal a citokrom P450 1A izoenzimek és a redox-paraméterek együttes mérése jól használható bizonyos környezetszennyező ágensek biomonitorozására. A kapott eredmények alapján egy terület környezeti minősége jellemezhető és a várható ökológiai változások megbecsülhetők (Livingstone, 1993).

### 3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

#### 3.1. Anyagok

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

##### 3.1.1. Vegyszerek

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>×2H<sub>2</sub>O, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>×2H<sub>2</sub>O, tris(hidroximetil) amino-metán (TRIS), szarvasmarha szérum albumin (BSA) (Sigma), EDTA-Na<sub>2</sub>, 2-tiobarbitursav (TBA), CuSO<sub>4</sub>, metanol, etanol, triklór-ecetsav (Sigma), uranil-acetát, ólom-citrát, OsO<sub>4</sub>, 5,5'-ditio-bisz-(2-nitrobenzoesav) (DTNB) (Sigma), malonaldehid bisz(dimetil-acetál) (Sigma), glicerin, heparin oldat, kumén hidroperoxid (Sigma), Folin-Ciocalteu reagens (Sigma), epinefrin (Sigma), glutation (GSH) (Sigma), Durcupan ACM gyanta (Fluka), Decis 2.5 EC rovarirtó szer (2,5% deltamethrin tartalmú) (Chemark). A malondialdehidet (MDA) a kísérletek előtt frissen készítettük el malonaldehid bisz(dimetil-acetál) savas hidrolízise útján Jain (1984) módszere szerint.

##### 3.1.2. Fenolszármazékok

Fenol (kristályos, BDH Limited Poole England), benzoésav (Reanal), 2-OH benzoésav (Reanal), 3-OH benzoésav (Aldrich Chemical Co.), 4-OH benzoésav (Aldrich Chemical Co.), protokatechuszsav (3,4-dihidroxi-benzoésav) (Sigma), galluszsav (3,4,5-trihidroxi-benzoésav) (Sigma), vanillinsav (4-hidroxi-3-metoxi-benzoésav) (Sigma), sziringsav (4-hidroxi-3,5-dimetoxi-benzoésav) (Sigma), fahéjsav (Reanal), *p*-kumársav (4-hidroxi-fahéjsav) (Sigma), kaffeinsav (3,4-dihidroxi-fahéjsav) (Sigma), ferulasav (4-hidroxi-3-metoxi-fahéjsav) (Sigma), (+)-katechin (Sigma), ellagsav (4,4',5,5',6,6'-hexahidroxi difenilsav 2,6,2',6'-dilakton) (Sigma), tanninsav (M<sub>t</sub> = 1700,2; képlete nincs megadva, Sigma). A felhasznált fenolszármazékok szerkezeti képletei az 1. ábrán láthatók.

## 3.2. Módszerek

### 3.2.1. *In vivo* módszerek

#### 3.2.1.1. A kísérleti állatok tartása és kezelése

Kísérleteinkhez hazánk gazdasági és étkezési szempontból legjelentősebb és egyben legismertebb halfaját, a pontyot (*Cyprinus carpio* L.) választottuk, amely könnyű beszerezhetősége és tarthatósága miatt kedvelt kísérleti alany. A mindkét nemből származó 0,6–0,8 kg tömegű állatokat (Szeged Fish Kft.) kettesével 100 L-es, jól szellőztetett, pH~7, 12–14°C-os vízhőmérsékletű akváriumokban tartottuk. Az 1 hetes akklimatizációt követően a vizsgált hatóanyagokat intraperitoneális (*i.p.*) injekció útján juttattuk az állatok szervezetébe, illetve, a kontroll egyedek esetében desztillált vizet injektáltunk a hasüregbe. Egy-egy *in vivo* kísérlet sorozatban egy-egy humusz vegyület (TA vagy EA) és egy-egy környezetszennyező ágens (CuSO<sub>4</sub> vagy DM) halakban kifejtett önálló, ill. a két vegyület kombinált hatását vizsgáltuk. Ennek megfelelően a halak 6-8 egyedből álló egy-egy csoportja kapott külön-külön TA, EA, CuSO<sub>4</sub> vagy DM kezelést, vagy kombinált TA+CuSO<sub>4</sub>, TA+DM, EA+CuSO<sub>4</sub> vagy EA+DM kezelést. Az alkalmazott dózis tanninsavból 5,9 μmol (= 10 mg) testsúly kilogramm (ts. kg), ellagsavból 33,1 μmol (= 10 mg) ts. kg, CuSO<sub>4</sub>×5H<sub>2</sub>O-ból 25 mg ts. kg<sup>-1</sup> (10 mg kg<sup>-1</sup> Cu<sup>2+</sup>-ekvivalens). és deltamethrinből 0,4 nmol (= 0,2 μg) ts. kg. A hatóanyag oldatokat a kezelés előtt frissen készítettük, és a pH-t 7-re állítottuk be, hogy kizárjuk az eltérő savasság okozta zavaró hatást. A kezelés időtartama 24 és 48 óra volt.

#### 3.2.1.2. Mintavétel és -előkészítés

24 illetve 48 óra expozíciós idő letelte után a halak farokvénájából heparinnal átöblített orvosi fecskendővel vérmintát vettünk, és az ebből centrifugálással (Eppendorf centrifuga, 12000 g) nyert hemolízis mentes vérplazmát használtuk a vércukor (GLU) koncentráció és az aminoszferáz aktivitások meghatározásokhoz. A tarkóra mért erős ütéssel elkábított halakból a vérvétel után kiemeltük a májat. Az epehólyag sérülés mentes elkülönítése után a vért jéghideg hal-fiziológiás sóoldattal (0,62% NaCl) távolítottuk el a májszövetről, melynek 1 g-jához 4 mL 0,1 M pH = 7,4 foszfát puffert adtunk (0,15 M KCl és 0,1 M EDTA-Na<sub>2</sub>), s az elegyet 4°C-on Braun 853302/4 homogenizáló berendezésben elhomogenizáltuk. A kapott szuszpenziót 10000 g nyomatékra 20 percig centrifugáltuk 4°C-on, s az így kapott felülúszót használtuk az

antioxidáns paraméterek meghatározásához. A LP-t az irodalmi adatok alapján (Placer és mtsai., 1966) a teljes homogenizátumból mértük. Az ECOD és EROD aktivitásmérésekhez a mikroszóma frakciót Förlin (1980) differenciál centrifugálási módszere alapján preparáltuk a teljes máj homogenizátumból.

### **3.2.1.3. A Citokrom P450 aktivitások és a redox-paraméterek meghatározása májból, továbbá a stressz-paraméterek mérése a vérplazmából**

Az EROD aktivitást Burke és mtsai. (1985), az ECOD aktivitást Kamataki és mtsai. (1980) módszere szerint határoztuk meg. Az össz-SOD és a Mn-SOD aktivitásokat Misra és Fridovich (1972), a CAT aktivitást Beers és Sizer (1952) nyomán, a LP termékeiként ismert tiobarbitursav-reaktív komponensek (TBARS) koncentrációját – MDA ekvivalensként kifejezve – Placer és mtsai. (1966) eljárása szerint, a szöveti GSH-t Sedlak és Lindsay (1968) módszerével, a citoszol GPx aktivitást Chiu és mtsai. (1976) eljárásával, a fehérjetartalmat Lowry és mtsai. (1951) módszerével, a vérplazma GLU-t Trinder (1969) leírása szerint, valamint az AspAT és az AlaAT aktivitásokat Reitman és Frankel (1957) módszerét követve határoztuk meg. A CYP 1A izoenzim (EROD és ECOD) aktivitásokat pmol szubsztrát  $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  fehérje, az antioxidáns enzim aktivitásokat nmol szubsztrát  $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  fehérje mértékegységben adtuk meg, a SOD kivételével, amely esetben U  $\text{mg}^{-1}$  fehérje egységet alkalmaztunk. Egy unit (U) SOD aktivitást azon SOD enzim mennyiségében definiáljuk, amely az aktivitásméréshez használt szerves szubsztrát oxidációjának sebességét 50%-ára csökkenti (Misra és Fridovich, 1972). A MDA és a GSH koncentrációkat nmol  $\text{mg}^{-1}$  fehérje, a plazma GLU-t mmol  $\text{L}^{-1}$  egységben tüntettük fel.

### **3.2.1.4. A máj réztartalmának meghatározása**

A májszövet minták nedves súlyának lemérése után a mintákat beszárítottuk, s 100 mg-onként 4 mL  $\text{HNO}_3$  + 4 mL  $\text{H}_2\text{O}_2$  elegyben felfuszpendáltunk, majd 160°C-on hevítettük 24 órán keresztül. Végül az oldatokat 20 mL végtérfogatra töltöttük fel, és réztartalmukat egy Hitachi Z8200 Zeeman polarizált atomabszorpciós spektrofotométerrel határoztuk meg.

### 3.2.1.5. A máj deltamethrin tartalmának meghatározása

A májszövetek DM tartalmát Akhtar (1982) módszere szerint aceton-víz eleggyel extraháltuk a szövetekből, majd oszlopkromatográfiás zsírtalanítás után (Chapman és Harris, 1978) a minták DM koncentrációját GC-MS-sel mértük.

### 3.2.1.6. Elektronmikroszkópia

A halak májának effektor hatásnak közvetlenül kitett, marginális területeiről kb. 1×1×1 mm-es szövetdarabkákat metszettünk ki, melyeket Karnovsky (1965) eljárása szerint 4 órán keresztül prefixáltuk, majd 50 mM-os, pH 7,2 foszfát pufferben történő mosása után 1%-os OsO<sub>4</sub> oldatban 1 óráig utófixáltuk, ezután növekvő etanol gradiensben (30, 50, 75, 96, 100%) dehidráltuk, majd Durcupan ACM műgyantába ágyaztuk. Az ultravékony (100 nm) metszeteket Reynold módszere szerint uranil-acetáttal és ólom-citráttal kontrasztosítottuk, és Tesla BS 500 elektronmikroszkóppal tanulmányoztuk.

## 3.2.2. *In vitro* módszerek

### 3.2.2.1. A fenolikumok molekulaszervezete és enzimgátló hatása közötti összefüggéseket vizsgáló kísérleteink módszerei

Az alfejezet címében meghatározott *in vitro* vizsgálatok idő- és koncentrációfüggés mérésekre különíthetők el. Az időfüggés mérések célja annak megállapítása, hogy az előzetes vizsgálatok során kiválasztott 3 különböző fenolikum koncentrációval 1-100 perces expozíciós időt alkalmazva mely az általánosan használható minimális inkubációs idő, ami alatt az egyes fenolikumok (1. ábra) képesek kifejteni az adott koncentrációra jellemző maximális gátló hatást a teszt enzimen (vagyis a katalázon). Ez azért szükséges, hogy a kapott inkubációs időparaméterrel végzendő fenolikum koncentrációfüggés kísérletek megbízható CAT aktivitás értékeket szolgáltatassanak, melyek alapján kiszámítható az 50%-os enzimgátlást okozó fenolikum koncentráció (IC<sub>50</sub>). A hasonló molekulaszervezetű fenolikumok IC<sub>50</sub> értékeinek összevetésével és statisztikai analízisével a molekulaszervezet és az enzimgátló hatás közötti összefüggések állapíthatók meg. A CAT aktivitásának meghatározásához Beers és Sizer (1952) módszerét alkalmaztuk eltérő inkubációs időekkel és fenolikum koncentrációkkal.

### 3.2.2.2. A fenolikumok és a toxikumok redox-paraméterekre kifejtett *in vitro* hatásának vizsgálata

*In vitro* kísérleteket végeztünk azon kérdés megválaszolására, hogy a tesztelt vegyületek enzim aktiválás, gátlás vagy direkt gyökbefogás útján fejtik-e ki biológiai hatásukat. Logikai úton ugyanis feltételezhető, hogy az *in vitro* "biológiai" (enzimet, vagyis máj homogenát felülúszót tartalmazó) rendszerben mérhető enzim aktivitásokat a fent említett több tényező együttes hatásának eredője alakítja ki. Az egymás mellett kifejeződő többféle hatások pedig részben szétválaszthatók azáltal, hogy az *in vitro* "kémiai" (enzim mentes) rendszerben mért "látszólagos" antioxidáns enzim aktivitás a tesztelt vegyület direkt gyökfogó aktivitásának tulajdonítható. Természetesen, ezen *in vitro* kísérletek nem adnak információt arról, hogy az antioxidáns enzimek génjei *in vivo* körülmények között aktiválódnak-e vagy sem a tesztelt vegyületek hatására. Ezen kívül, *in vitro* körülmények között a vizsgált anyagok TBARS képződést befolyásoló hatását, illetőleg a GSH- és MDA-pigmentek abszorbanciáját növelő, vagy azokra degradálóan ható kapacitását is tanulmányoztuk. A "kémiai" környezetben végzett *in vitro* kísérletek során feltárhatók bizonyos artifaktumok, melyek ismeretében az *in vivo* eredmények helytelen interpretációja nagy valószínűséggel kiszűrhető. Tehát a "kémiai" *in vitro* rendszer mérési eredményei a "biológiai" *in vitro* rendszer számára kontrollként használhatók, így az *in vitro* mérési adatok referenciaként való alkalmazása hasznos információkkal szolgálhat az *in vivo* kísérletek eredményeinek értékeléséhez.

#### 3.2.2.2.1. Az antioxidáns enzimek

Az effektorok, vagyis a humusz-vegyületek (TA, EA) ill. a toxikumok ( $\text{CuSO}_4$ , DM) antioxidáns enzimekre gyakorolt önálló, valamint kombinált hatását a következő összetételű reakcióelegyekben tanulmányoztuk.

A CAT mérésekhez 50 mM pH = 7,0 kálium-foszfát puffert, az össz-SOD és Mn-SOD számára 50 mM pH = 10,2 nátrium-karbonát puffert (plusz 5 mM KCN a Mn-SOD esetén), továbbá a GPx aktivitásméréshez 50 mM pH = 7,5 TRIS puffert készítettünk.

A reakcióelegyek kísérlet sorozatonként 0,1  $\mu\text{M}$ -80  $\mu\text{M}$  TA-at és/vagy 1,2  $\mu\text{M}$ -125,4  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$ -ot; 1,2  $\mu\text{M}$ -75  $\mu\text{M}$  TA-at és/vagy 4-100 nM DM-t; 0,6  $\mu\text{M}$ -3 mM EA-at és/vagy 1,2  $\mu\text{M}$ -125,4  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$ -ot; illetőleg 6,6  $\mu\text{M}$ -1 mM EA-at és/vagy 4-100 nM DM-t és kontroll hal máj homogenát felülúszóját tartalmazták. A felülúszó végső hígítása a reakcióelegyen azonos mértékű volt az *in vivo* és *in vitro*

kísérletekben: 600-szoros a CAT, 1500-szoros az össz-SOD, 150-szeres a Mn-SOD és 50-szeres a GPx aktivitásmérések alatt. A 20°C-on 10 percig tartó inkubációt követően az enzimatis reakciót a szubsztrát oldat reakcióelegyhez való hozzáadásával indítottuk el (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a CAT; epinefrin a SOD-ok; és GSH+kumén hidroperoxid a GPx méréseknél), majd a fent felsorolt módszerek alapján meghatároztuk a vizsgálni kívánt antioxidáns enzim aktivitását. Az *in vitro* CAT és SOD mérések belső kontrolljaként a vizsgált hatóanyagok lehetséges H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vagy O<sub>2</sub><sup>-</sup>-gyök képző potenciálját, valamint látszólagos CAT és SOD aktivitását is leteszteltük enzim mentes (felülúszó mentes) reakciókörülmények között.

#### 3.2.2.2.2. A nem-enzimatis redox-paraméterek

Az effektorok *in vitro* TBARS-képződésre kifejtett önálló és kombinált hatását olyan reakcióelegyekben vizsgáltuk, melyek 4/3-ad arányban hígított kontroll ponty máj homogenátot, illetve – a további zavaró hatásokat elkerülendő – desztillált vízben feloldott effektorokat tartalmazott. A desztillált vízben oldott fenolikum/toxikum oldatok pH-ját a homogenáttal való elegyítés előtt 7-re állítottuk be. A MDA-del való direkt interakció lehetőségét úgy vizsgáltuk, hogy a méréseket megismételtük a fenti reakcióelegyekkel, de a homogenátot annak TBARS koncentrációjával ekvivalens (Jain módszere szerint (1984) frissen készített) 10 µM MDA-dal helyettesítettük. 20°C-on történő 30 perces inkubáció elteltével Placer és mtsai. (1966) módszere szerint meghatároztuk a TBARS (MDA) koncentrációt.

Vegyületeink *in vitro* körülmények közötti GSH-bontó/látszólagos GSH koncentrációt csökkentő aktivitását a fenti reakcióelegyek alkalmazásával tanulmányoztuk az előzőekhez hasonlóan mind "biológiai" rendszerben, vagyis aktív máj enzimek jelenlétében (a reakcióelegy kétszeresére hígított kontroll hal máj homogenát felülúszót tartalmazott), mind pedig tisztán "kémiai" körülmények között, mely esetben a felülúszót ill. annak átlagos GSH koncentrációját azzal ekvivalens 160–190 µM GSH-val helyettesítettük. A TBARS mérésekhez hasonlóan az effektorokat a további, zavaró interakciókat elkerülendő, desztillált vízben oldottuk fel, majd az oldat pH-ját 7-re állítottuk be. A reakcióelegy 20°C-on 30 percig tartó inkubálása után Sedlak és Lindsay (1968) eljárását követve meghatároztuk annak GSH koncentrációját.

A homogenát mentes (ill. felülúszó mentes) reakcióelegyekkel végzett *in vitro* kísérletek célja annak megállapítása, hogy kialakul-e interakció az effektorok és a

MDA, valamint a GSH között tisztán "kémiai" környezetben, így ezen kísérletek eredményeit a homogenáttal/felülúszóval végzettek számára referenciának tekintettük. A TBARS ill. GSH kísérlet sorozatoknál minden egyes reakcióhoz belső kontrollt használtunk, vagyis minden reakciót megismételtünk azonos összetevőkkel, de 0 perc inkubációs idővel, s az adott 30 perc inkubációs idejű reakcióval kapott koncentráció értéket saját kontrollja értékének százalékában fejeztünk ki (melyet 100%-nak tekintettünk). Mivel a GSH-val végzett kísérletek az effektorok potenciális látszólagos GPx aktivitását (is) vizsgálják, a fenti *in vitro* GPx mérésekhez jól használhatók referenciaként. Minden kísérletnél 3-5 párhuzamos meghatározást végeztünk el, és az ábrákon ill. a táblázatokban a koncentrációk és aktivitások átlag értékeit és azok szórását (standard devianciáját, S.D.) tüntettük fel.

### 3.2.3. Statisztikai analízis

A mérési eredmények statisztikai analízisét a Student-féle *t*-teszttel végeztük el. Azon változásokat tekintettük szignifikánsnak (\*) ahol a valószínűségi tényező (*P*) értéke kisebb volt 0,05-nél.

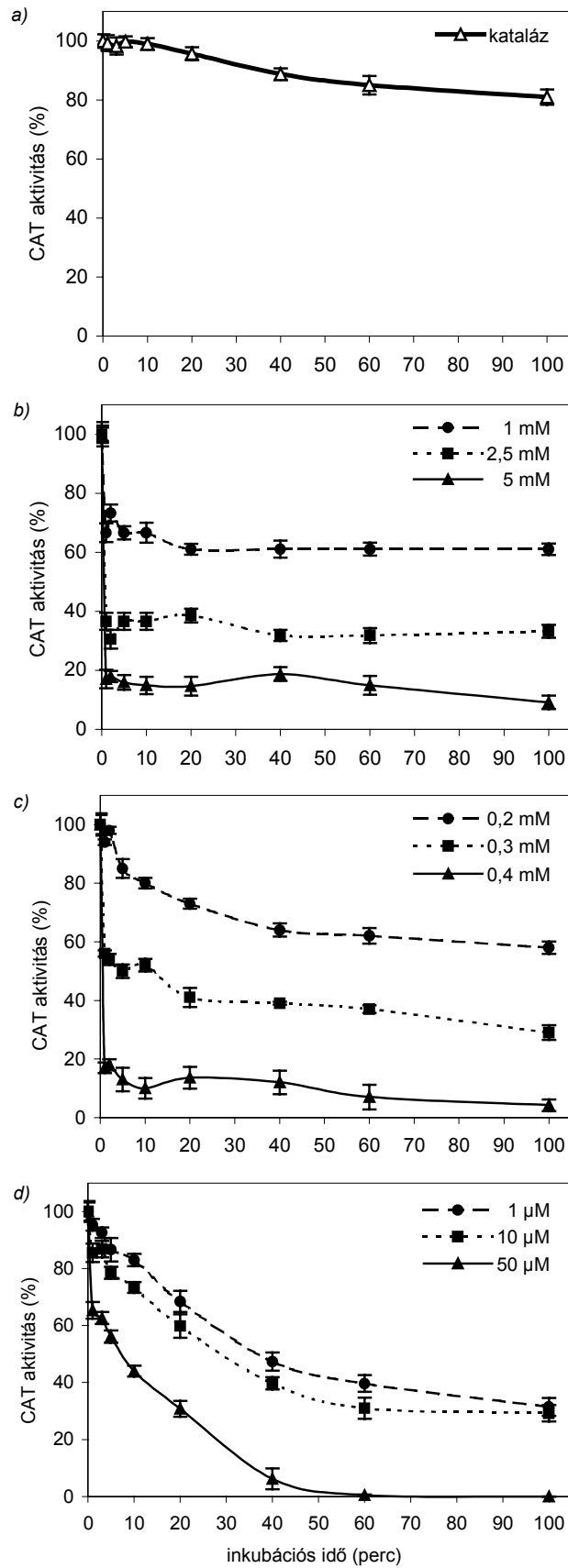


## 4. EREDMÉNYEK

### 4.1. A fenolikumok molekulaszervezete és *in vitro* enzim aktivitás gátló hatása közötti összefüggések

A növényi fenolikumok molekulaszervezete és enzimgátló hatása közötti törvényszerűségek megállapítása többek között fontos lehet a gyógyításban való felhasználhatóság előzetes megbecslése szempontjából. E mellett a kérdés ökológiai nézőpontból is jelentőséggel bír, hiszen nem mindegy, hogy a különböző vízi ökoszisztémák jellegzetes humuszsavai milyen gátlóerőt fejtenek ki az enzim aktivitásokra nézve; különösen, ha ehhez egy vagy több potenciális enzimgátló környezetszennyező ágens hatása is társul. Egyszerű és gyors aktivitás meghatározási eljárása miatt, valamint az evolúció különböző szintjein álló fajokban való általános elterjedtsége miatt a CAT teszt enzimnek igen alkalmas. A fenolikumok CAT-ra kifejtett gátló hatásának pontos értékeléséhez természetesen szükséges a teszt enzim stabilitásának ismerete az adott mérési körülmények között. A 6a ábrán jól látható, hogy a CAT spontán aktivitás vesztese 20°C-on körülbelül 30 percig igen kis mértékű (mindössze 5-7%), hosszabb inkubációs idő alkalmazása azonban zavaró lehet az eredmények értékelése szempontjából.

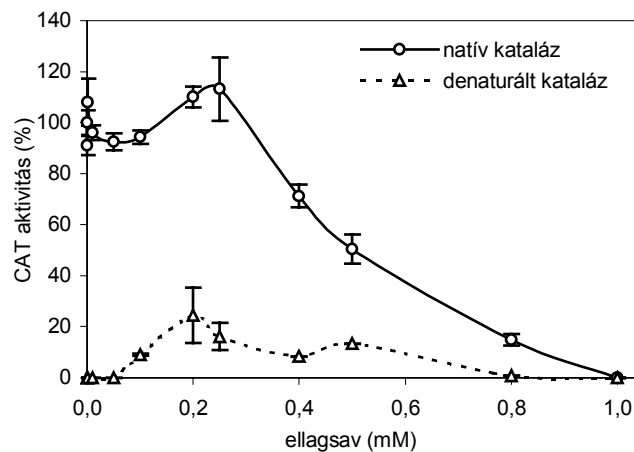
A fenolikumok gátló hatásának időfüggése amellet, hogy a vegyületek kinetikai sajátosságairól szolgáltat információt (pl. a maximális gátló hatás kifejtéséhez szükséges idő, diffúziós tulajdonságok), megadja a koncentrációfüggés méréseknél alkalmazandó megfelelő inkubációs időt. Összevetve a CAT spontán inaktiválódási és fenolikum okozta aktivitásgátlási görbéket, megállapítható, hogy meredekségük 30 perc után nagyban közelít egymáshoz, vagyis ennyi idő alatt a fenolikumok (a TA kivételével) képesek kifejtteni a CAT-on az adott koncentrációra jellemző maximális gátló hatást. Ehhez képest a fenolnak csak fele ennyi, a TA-nak viszont ezen idő kétszerese volt szükséges ahhoz, hogy maximális gátló hatása kifejeződjön. A fenol és a tanninsav CAT aktivitásra kifejtett gátlási kinetikája egy reprezentatív fenol-karbonsav (ferulasav) időfüggés görbéjével a 6b-d ábrán látható.



**6. ábra.** A a) kataláz aktivitás stabilitási görbéje 20°C-on, b) a fenol, c) a ferulasav (mint reprezentatív fenol-karbonsav) és d) a tanninsav gátlási kinetikája. A kísérleti körülmények leírása az Anyagok és módszerek fejezetben található.

A következőekben a fenolikumok CAT-on kifejtett koncentrációfüggő enzimgátló sajátságait vizsgáltuk. Eredményeinkből a következő megállapításokra jutottunk:

a) A fenol-karbonsavak koncentrációfüggés vizsgálatai azt mutatják, hogy 0,1-0,4 mM-os EA koncentrációnál a CAT aktivitás görbe maximum értéke  $115 \pm 13\%$ -ot ért el (7. ábra). A látszólagos CAT aktiválódás vizsgálatára a koncentrációfüggés mérést megismételtük hővel denaturált CAT-zal (felülúszó alkalmazásával). A natív és a denaturált CAT-zal végzett EA koncentrációfüggés mérések aktivitás görbéit összevetve megállapítható, hogy a két görbe maximum pontja jó közelítéssel megegyezik (7. ábra). Így valószínűsíthető, hogy a felülúszó tartalmaz valamely olyan komponenst (pl. fém-iont), amely az EA-val az adott (0,1-0,4 mM) koncentráció-tartományban képes  $H_2O_2$ -bontó komplexet kialakítani, ezáltal látszólagos CAT aktivitást mutatni.

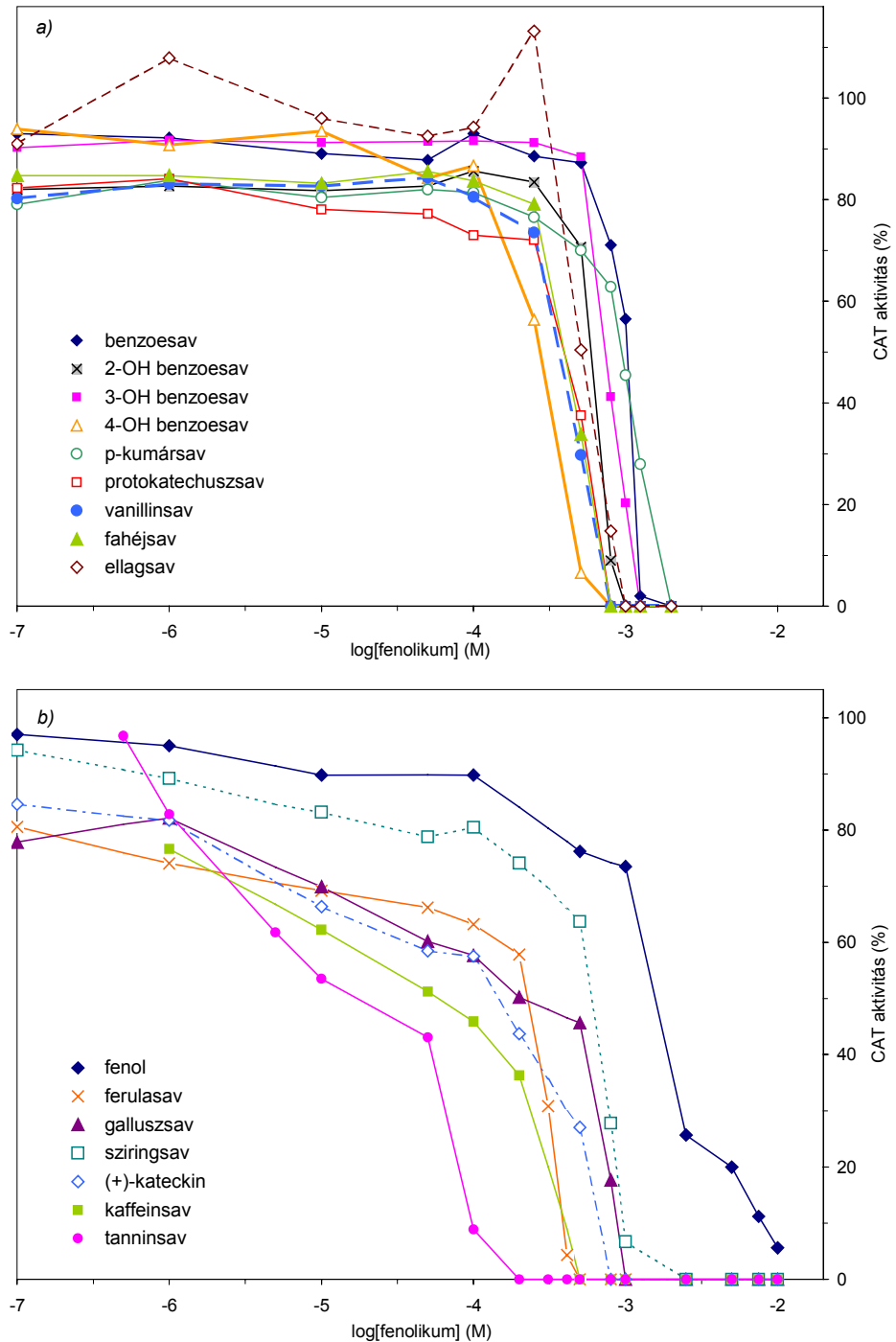


7. **ábra.** Az ellagsav koncentráció változás hatása a natív és hővel denaturált kataláz aktivitására.

b) A 8. ábrán a fenolikumok  $10^{-7}$ - $10^{-2}$  M koncentrációjának CAT aktivitásra kifejtett hatása látható. A vizsgált koncentráció-tartomány, amely összevethető az élővizekből mérhetővel (ahol  $4-8 \text{ mg L}^{-1}$  szerves sav tartalom az általános) (Wetzel, 1993; Kim és Wetzel, 1993), jól lefedte a fenolikumok enzim aktivitást gátló hatástartományát.

c) A 8. ábra alapján megállapítható, hogy a fenol-karbonsavakat a koncentrációfüggés szempontjából "szűk" és "széles" koncentráció-tartományban ható csoportokra oszthatjuk. Az előbbi csoporthoz tartozik a benzooesav, 2-OH benzooesav, 3-OH benzooesav, 4-OH benzooesav, *p*-kumársav, protokatechuszsav, vanillinsav, fahéjsav, ellagsav. Ezen vegyületek gátlási koncentráció-tartománya a vizsgált

5 nagyságrendből hozzávetőlegesen 1 nagyságrendet fog át. A "széles" koncentráció-tartományban ható vegyületek enzimgátló hatásukat koncentrációjuk tekintetében 2 vagy több nagyságrendben fejtik ki. Ide tartozó vegyületek: fenol, ferulasav, galluszsav, sziringsav, (+)-katechin, kaffeinsav, tanninsav. Az  $IC_{50}$  értékek és a hatástartomány jellege között nem találtunk összefüggést.



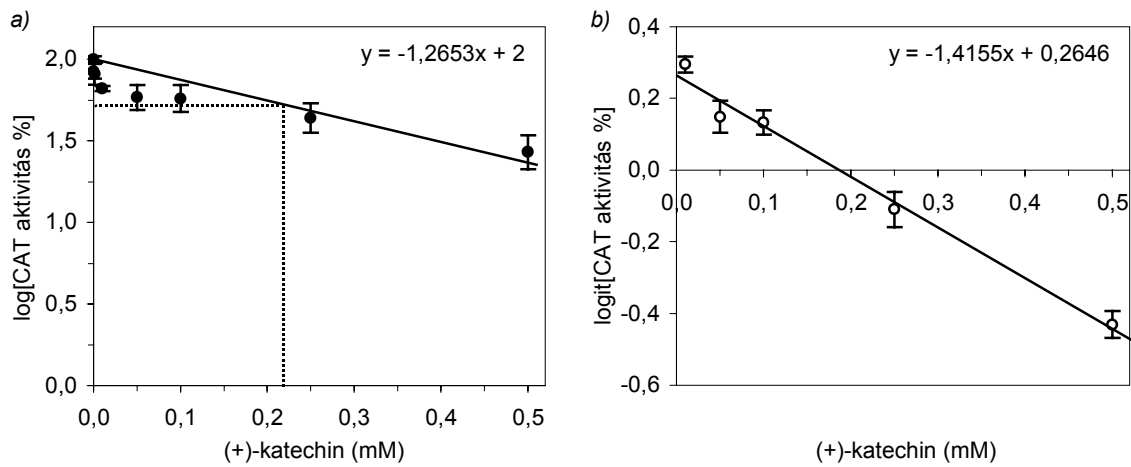
**8. ábra.** A fenolszármazékok CAT aktivitást gátló hatásának koncentrációfüggése logaritmikus ábrázolásban: a) "szűk", és b) "széles" koncentráció-tartományban ható fenolikumok.

d) A koncentrációfüggés görbe matematikai jellege alapján további két osztályba sorolhatjuk vizsgált vegyületeinket: a fenol és a tannin  $e^{-x}$  jellegű, míg a többi vegyület koncentrációfüggés görbéje *szigmoid* profillal rendelkezik. Az  $IC_{50}$  megadásához a két különböző típusú görbét linearizáltuk, s ehhez eltérő módszerek alkalmazása volt szükséges. Az  $e^{-x}$  jellegű görbék esetén matematikailag úgy helyes, ha – esetünkben – a fenol-karbonsav koncentráció függvényében ábrázoljuk a CAT maradék aktivitását százalékban kifejezve, s az így kapott görbét linearizáljuk oly módon, hogy az enzimaktivitási (ordináta) értékek tízes alapú logaritmusát képezzük, és az  $x = 0$ ,  $y = 2$  (gátlószert nem tartalmazó, 100% aktivitásnak megfelelő) koordináta pontból kiinduló regressziós egyenest állítunk a kapott pontokra. Az így nyert egyenes egyenletébe ( $y = mx + b$ ) behelyettesítve az 50%-os enzimaktivitásnak megfelelő  $y = 1,7$  értéket  $x$  az  $IC_{50}$  értékét adja meg (9a ábra). A szigmoid jellegű görbék azonban ily módon nem értékelhetők ki kellő pontossággal (Cornish-Bowden, 1979), mert a 0-20%-os és 80-100%-os gátlási tartományban levő pontok figyelembevétele nagy hibát okozhat. A megoldást a Hill-egyenlet, vagy más néven a 'logit-módszer' (Cornish-Bowden, 1979) alkalmazása kínálja. Az eljárás során a 20-80% maradék aktivitás értékeiből meghatározzuk a  $logit(y)$  értékeket a következő összefüggés segítségével:

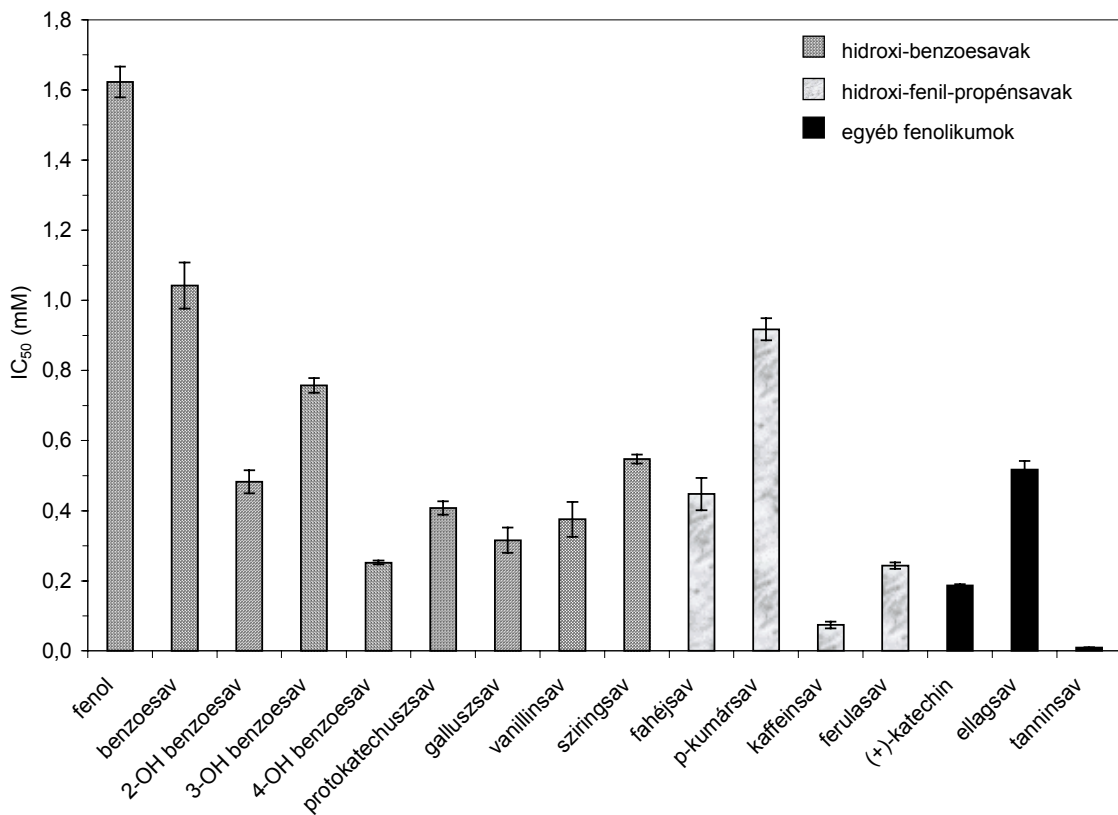
$$logit(y) = \lg\left(\frac{y}{100-y}\right)$$

ahol  $y = \text{aktivitás } (\%)$ . Az ily módon kapott  $logit(y)$  értékeket ábrázoljuk a fenol-karbonsav koncentráció függvényében, majd a legkisebb négyzetek módszerével egyenest illesztünk a pontokra (melyet azonban nem kell fix pontból indítanunk). A fenti összefüggés értelmében a  $logit(y) = 0$  értéknél, vagyis a regressziós egyenes és az  $x$ -tengely metszéspontjánál adja meg  $x$  az  $IC_{50}$  értékét (9b ábra), mely igen jól megközelíti a koncentrációfüggés görbéről közvetlenül, grafikus úton leolvasható 50%-os gátlást okozó fenolikum koncentrációját. Mivel  $e^{-x}$  és *szigmoid* lefutású koncentrációfüggés görbéket egyaránt kaptunk, kiértékeléseink során mind a két linearizálási módszerrel kiszámítottuk az  $IC_{50}$  értékeket és egyes vegyületek esetén – a vártak megfelelően – valóban nagy különbségeket kaptunk (5. táblázat). A fentiek alapján megfelelőnek a Hill-egyenlettel nyert adatokat tekintjük, és a későbbiekben is ezekre hivatkozunk (a fenol és a tanninsav esetében is, ahol a vizsgált függvényszakasz 30-70%-ra csökkentésével optimalizáltuk a Hill-féle kiértékelést).

A Hill-egyenlettel kapott értékek grafikus összevetése a 10. ábrán látható, eltérésük statisztikai kiértékelését pedig a 6. táblázat mutatja.



9. ábra. A fenolszármazékok  $IC_{50}$  értékeinek meghatározása a koncentrációfüggés görbékből az a) egyszerű linearizálási módszerrel és b) a Hill-egyenlettel a (+)-katechin példáján bemutatva.



10. ábra. A fenolikumok Hill-módszerrel kapott  $IC_{50}$  értékei a hozzájuk tartozó szórásokkal.

**5. táblázat.** A vizsgált fenolszármazékok egyszerű logaritmizálással és a Hill-féle linearizálási módszer alapján kapott IC<sub>50</sub> átlagértékeinek összehasonlítása.

Fenolszármazék	IC <sub>50</sub> [μM] (egysz. log. módszer)	IC <sub>50</sub> [μM] (Hill-módszer)
fenol	2258,0 ± 154,0	1623,0 ± 44,0
benzoesav	969,3 ± 118,3	1042,0 ± 66,0
2-OH benzoesav	307,3 ± 26,1	482,5 ± 32,9
3-OH benzoesav	564,1 ± 28,9	757,0 ± 21,2
4-OH benzoesav	159,9 ± 11,6	252,0 ± 5,3
protokatechuszsav	419,2 ± 100,4	407,2 ± 19,1
galluszsav	328,4 ± 16,0	316,1 ± 35,9
vanillinsav	316,4 ± 36,4	375,4 ± 49,7
sziringsav	491,7 ± 40,5	547,1 ± 13,0
fahéjsav	405,2 ± 64,8	447,6 ± 46,3
<i>p</i> -kumársav	799,3 ± 80,6	917,3 ± 31,2
kaffeinsav	141,1 ± 9,8	74,5 ± 9,5
ferulasav	207,2 ± 20,0	243,7 ± 9,0
(+)-katechin	239,1 ± 4,4	186,8 ± 3,5
ellagsav	365,0 ± 39,0	517,0 ± 24,8
tanninsav	29,1 ± 4,6	9,5 ± 0,7

**6. táblázat.** A Hill-módszerrel képzett IC<sub>50</sub> értékek összehasonlítása (kétoldali egymintás) Student *t*-próbával. A \*-gal jelzett értékek szignifikáns eltérést mutatnak a két IC<sub>50</sub> érték között.

Összehasonlított vegyületpár	P-érték
benzoesav – 4-OH benzoesav	0,0001*
benzoesav – protokatechuszsav	0,0042*
benzoesav – galluszsav	0,0007*
benzoesav – vanillinsav	0,0037*
benzoesav – sziringsav	0,0022*
benzoesav – fahéjsav	0,0058*
4-OH benzoesav – protokatechuszsav	0,0457*
4-OH benzoesav – galluszsav	0,0263*
4-OH benzoesav – vanillinsav	0,0616
4-OH benzoesav – sziringsav	0,0052*
4-OH benzoesav – <i>p</i> -kumársav	0,0016*
protokatechuszsav – kaffeinsav	0,0007*
protokatechuszsav – vanillinsav	0,4701
protokatechuszsav – galluszsav	0,0719
vanillinsav – sziringsav	0,0198*
vanillinsav – ferulasav	0,0517
vanillinsav – kaffeinsav	0,0109*
fahéjsav – <i>p</i> -kumársav	0,0079*
fahéjsav – kaffeinsav	0,0058*
fahéjsav – ferulasav	0,0213*
kaffeinsav – ferulasav	0,0032*

## 4.2. A tanninsav és a rézszulfát önálló illetve kombinált hatásának vizsgálata pontyon

A '70-es, '80-as években számos olyan toxikológiai tanulmány készült, mely 1-1 környezetszennyező vegyület *in vitro* vagy *in vivo* hatását vizsgálta (Winner és Farrell, 1976; Zitko és mtsai., 1979; L'Hotellier és Vincent, 1986; stb). Ennek következtében nagyszámú, az iparban és a mezőgazdaságban használt vegyület laboratóriumi körülmények között meghatározott LD<sub>50</sub> illetve IC<sub>50</sub> értéke vált ismertté. A szabadföldi kísérletek és felmérések eredményei azonban néha meglepő eltéréseket mutattak a laboratóriumi értékekhez viszonyítva (WHO, 1990). Időközben az orvostudomány és a farmakológia figyelme a növényi szerkezet degradációs termékei, a növényi fenolikumok (fenol-karbonsavak, flavonoidok, humuszvegyületek, tanninok) felé fordult (Frankel és mtsai., 1993; Abu-Amsha, 1996). Felfedezték, hogy ezek a poliaromás hidroxil-vegyületek remek komplexképző és antioxidáns aktivitással rendelkeznek (Wood és mtsai., 1982; Stackhouse és Benson, 1988; Morgan, 1997; Decker, 1997). Felmerült a lehetősége annak, hogy e vegyületek jelentős ökológiai szereppel rendelkezhetnek azáltal, hogy a fent említett aktivitásuk következtében módosíthatják a mérgező és karcinogén vegyületek káros hatását. Azonban, ezen felismerés ellenére, a mai napig igen kevés publikáció jelent meg a nemzetközi irodalomban a humuszvegyületek és környezetszennyező ágensek antioxidáns védekezőrendszerre gyakorolt *in vivo* kombinált hatásáról.

### 4.2.1. A tanninsav és a rézszulfát *in vivo* hatásai

Az *in vivo* kezelések eredményeit a 11-13. ábrán foglaltuk össze. A 7. táblázatban tüntettük fel a CuSO<sub>4</sub> *i.p.* injekciót követően májból mérhető réz mennyiségét.

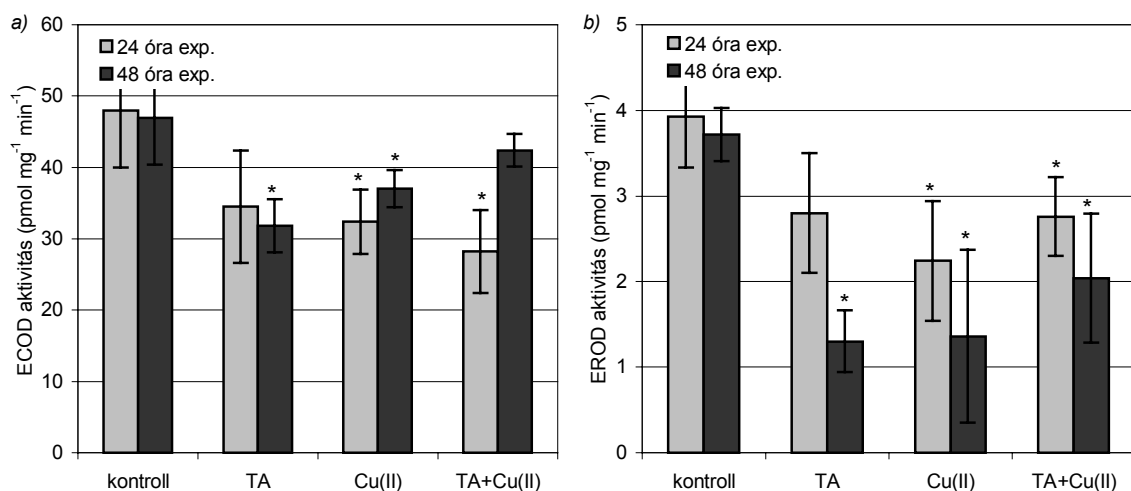
7. **táblázat.** A ponty máj réztartalma 24 és 48 órával az *i.p.* CuSO<sub>4</sub> kezelést követően.

expozíciós idő (óra)	réztartalom [ $\mu\text{g g}^{-1}$ nedves súly] <sup>a</sup>	
	kontroll	kezelt
24	1,45 ± 0,60	49,33 ± 28,49
48	2,17 ± 0,62	75,58 ± 10,19

<sup>a</sup>A koncentráció értékek 6-9 párhuzamos mérés átlagát tükrözik. A kontroll egyedeket CuSO<sub>4</sub> helyett azonos térfogatú (3 mL ts. kg<sup>-1</sup>) desztillált vízzel injektáltuk.



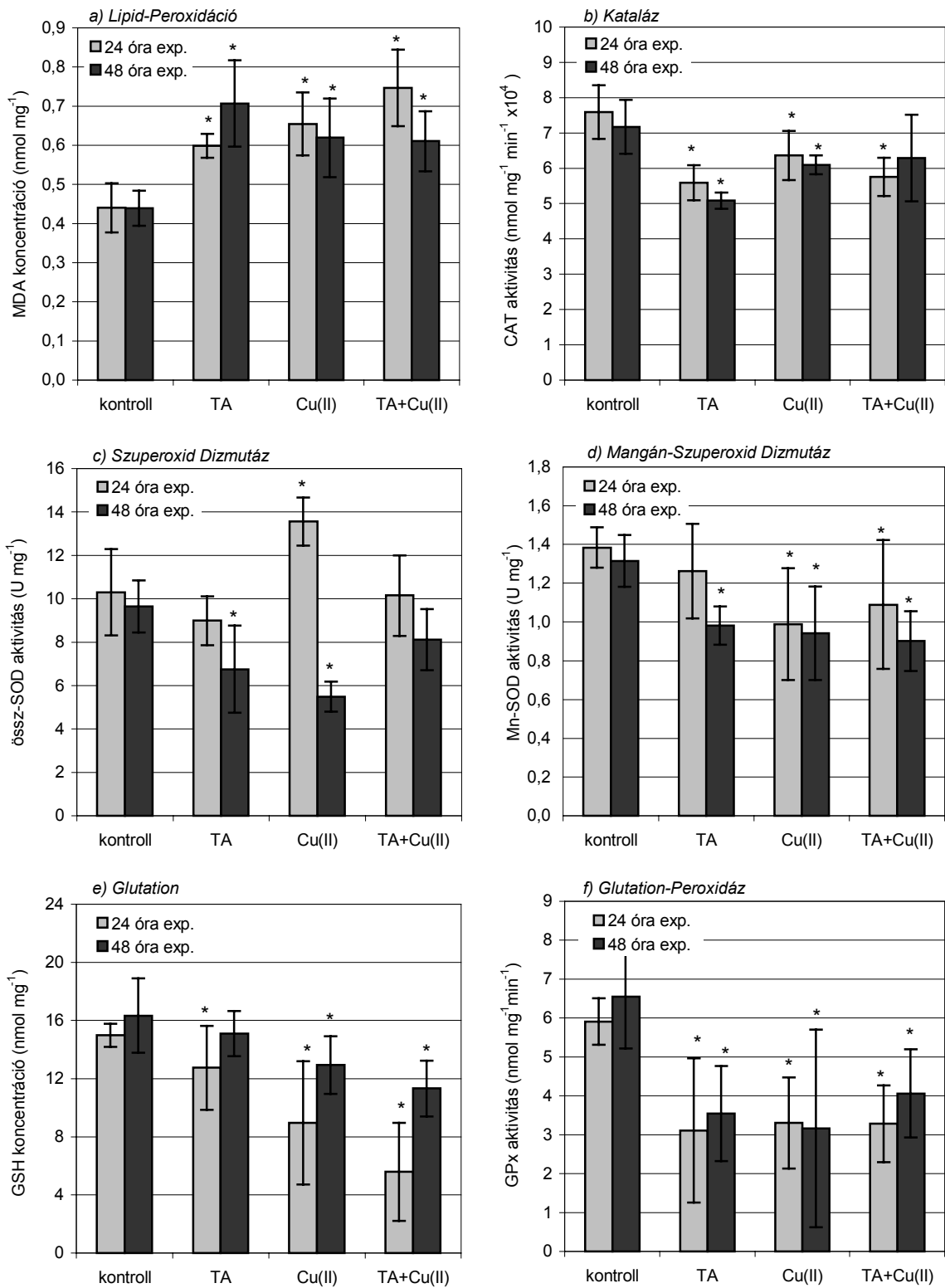
A vizsgált ágensek külön-külön és kombinálva is gátolták a citokrom P450-függő EROD és ECOD enzimek aktivitását (11. ábra). Ugyancsak gátolták az antioxidáns enzim aktivitásokat (12b-d,f ábra), s elősegítették a lipid-peroxidációs folyamatokat (12a ábra). Ezzel párhuzamosan csökkent a májszövet redox-állapotát jelző GSH koncentrációja (12e ábra). A lipid-peroxidációs hatás időfüggő: 24 óra expozíció után a TA+CuSO<sub>4</sub> kombináció magasabb LP-t váltott ki, mint a TA egyedül, azonban 48 óra után mindkét kezelés azonos LP szintet eredményezett (12a ábra). A CuSO<sub>4</sub> önmagában és a TA-val együtt hatva is magasabb CAT aktivitás kialakulását eredményezte 48 óra után, mint az egyedül adagolt TA (12b ábra). Időfüggés fedezhető fel az előbbieken kívül a Cu(II) össz-SOD-ra gyakorolt hatásában (12c ábra), ahol 24 óra után aktiváció, majd 48 óra elmúltával gátlás volt megfigyelhető, de jó példa a GSH szintjének változása is a különböző kezelések hatására (12e ábra). Itt a 24 órás expozíció minden esetben erősebben csökkentette a GSH szintjét, mint a 48 órás.



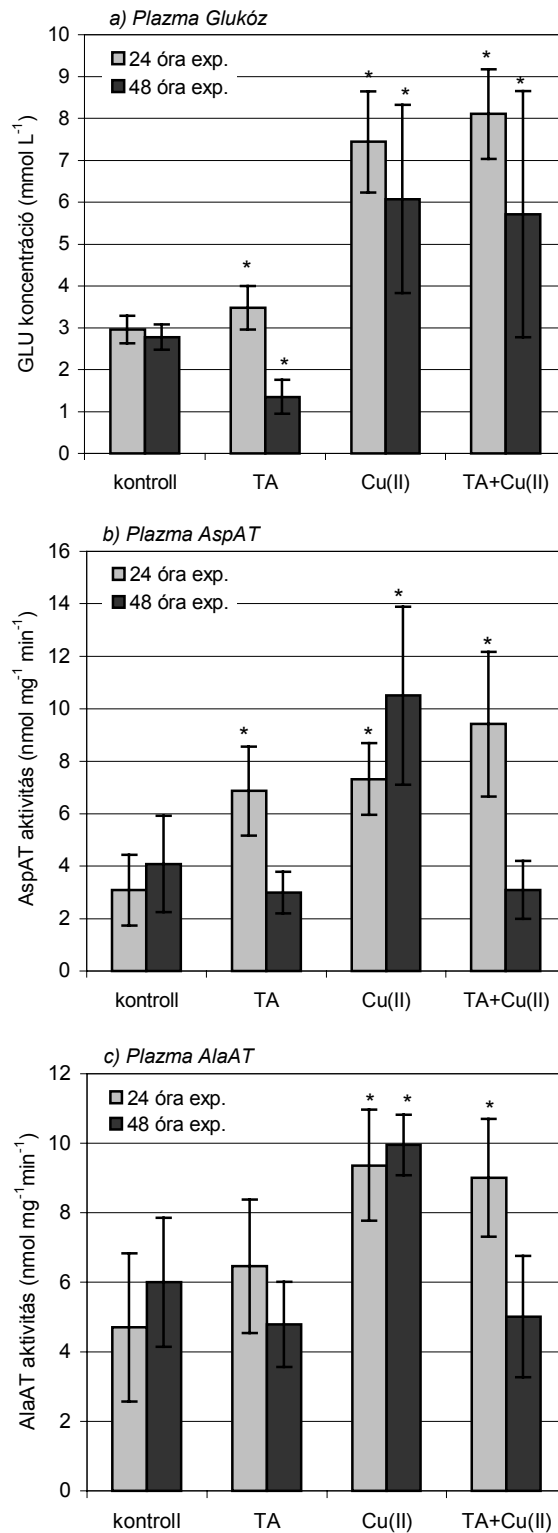
**11. ábra.** Az *in vivo* tanninsav és/vagy rézszulfát kezelés hatása ponty a) ECOD és b) EROD izoenzim aktivitására. A kísérleti körülmények leírása az Anyagok és módszerek fejezetben található. A \* szimbólum a kontroll értékétől való szignifikáns eltérést jelzi.

A kezelések vérparaméterekre (GLU, AspAT, AlaAT) gyakorolt hatását a 13. ábrán mutatjuk be. A biomarkerek értékei már 24 óra expozíció után változtak. A TA kezelés következtében eleinte megemelkedett, majd jelentősen lecsökkent a vércukorszint, komoly glukóz metabolizmus zavarokat jelezve (13a ábra). Szövetkárosodásra utalva, mindhárom kezelés relatíve magas AspAT aktivitásokat eredményezett 1 nap után, s ez a CuSO<sub>4</sub> kezelést követő 2. napon is magas maradt, de a kontroll értékére csökkent a TA és a TA+CuSO<sub>4</sub> kezelés esetében (13b ábra), ami a jelenlevő TA enzimgátló hatásának tulajdonítható. Láthatóan az AlaAT aktivitások változásának tendenciája

hasonló volt az AspAT-éhoz azzal az eltéréssel, hogy az aktivitás változás kisebb mértékű volt (13c ábra).



**12. ábra.** Az *in vivo* tanninsav és/vagy rézszulfát kezelés hatása ponty antioxidáns védekezőrendszerére. A kísérleti körülmények leírása az Anyagok és módszerek fejezetben található. A \* szimbólum a kontroll értékétől való szignifikáns eltérést jelzi.



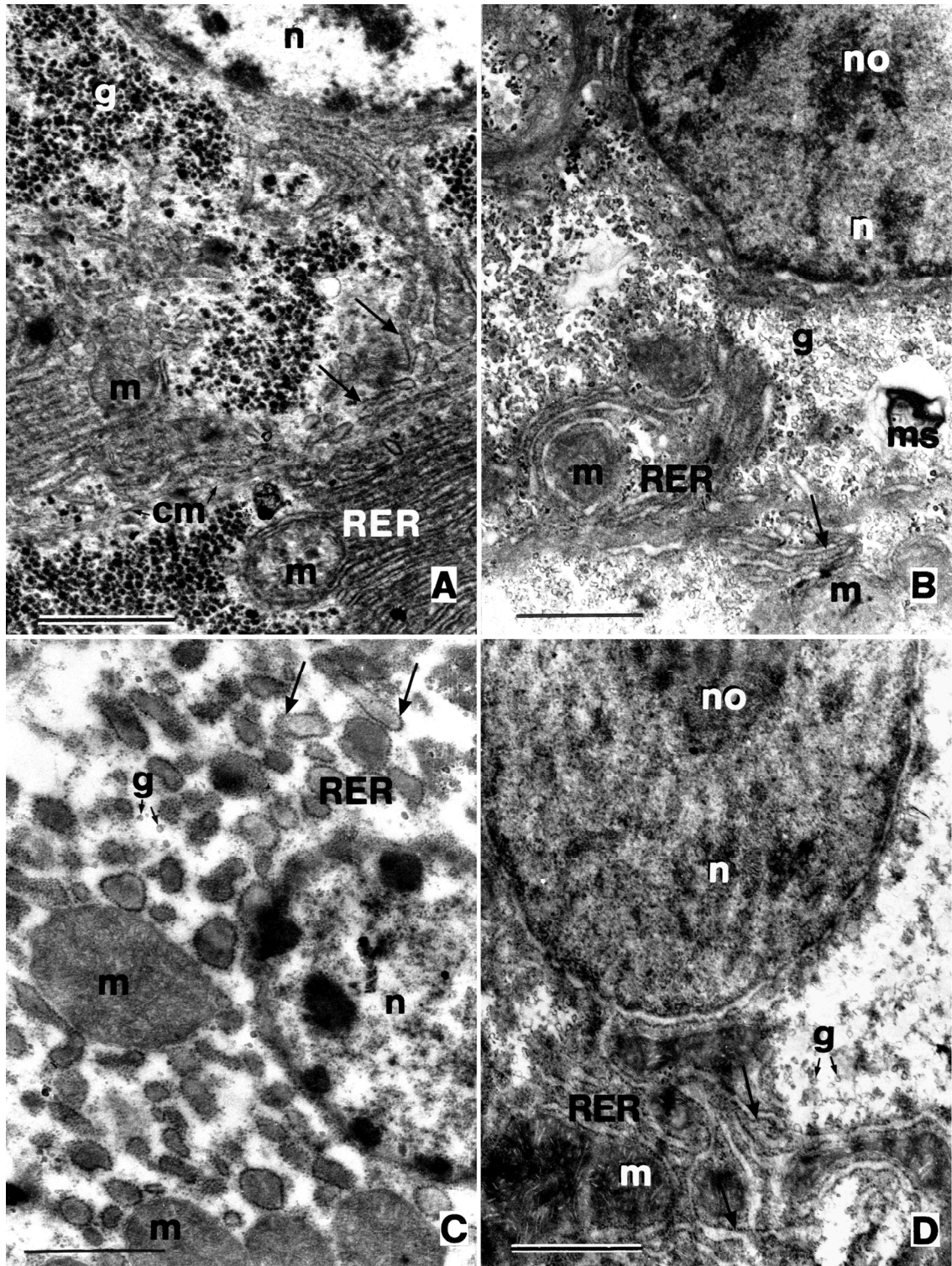
**13. ábra.** Az *in vivo* tanninsav és/vagy rézszulfát kezelés hatása ponty a) vércukor szintjére és b,c) plazma aminoszferáz aktivitásaira. A kísérleti körülmények leírása az Anyagok és módszerek fejezetben található. A \* szimbólum a kontrolltól való szignifikáns eltérést jelez.

A halak viselkedésében és külső megjelenésében is megfigyelhető volt néhány változás. A halak úszási aktivitása megnőtt a TA kezelés után, ugyanakkor az önálló, vagy a TA-val kombinált CuSO<sub>4</sub> kezelés következtében a halak aktivitása lecsökkent, és

egyensúlyozása bizonytalanná vált. E mellett a  $\text{CuSO}_4$  ill. a  $\text{TA}+\text{CuSO}_4$  keverék erőteljes nyálkaképződést váltott ki a halak bőrén, amely hatására 2-3 cm vastagságú hab alakult ki az akváriumban a víz tetején.

A farokvénából történő vérvétel során megfigyeltük, hogy a  $\text{CuSO}_4$  és a  $\text{TA}+\text{CuSO}_4$  kezelés eredményeképpen barnás árnyalatúra változott a halak vérenek egészséges vörös színe, továbbá viszkozitása jól láthatóan csökkent a kontrollhoz viszonyítva. A TA kezelés után a máj konzisztenciája nem változott, mindössze annak színe volt élénkebb, vörösebb a kontrollhoz viszonyítva. A  $\text{CuSO}_4$ -os kezelések következtében számottevő makroszkopikus elváltozások alakultak ki a májon: a  $\text{CuSO}_4$  injekció erős nekrozist okozott a májban, annak állaga képlékennyé vált, színe fakó, szürkés árnyalatot mutatott. Az epehólyag vagy jelentősen megduzzadt a kontrolléhoz képest, vagy teljesen üresnek találtuk. A hasüregben bűzös, barnás (véres) folyadék gyülemlt fel, amely következtében a hastájék jól láthatóan felduzzadt. Hasonló jellegű, de mérsékelt fiziológiai elváltozás alakult ki a  $\text{TA}+\text{CuSO}_4$  kombinált kezelést követően.

Az elektronmikroszkópos vizsgálatok feltárták a kezelések okozta ultrastrukturális változások természetét, valamint magyarázatot adnak néhány olyan kérdésre, amelyre a biokémiai paraméterek egyedüli ismerete nem ad(hat) egyértelmű választ. A 14a ábra a kezeletlen halakból származó hepatociták finomszerkezetét mutatja: a májsejtek nagy részét denz glikogén granulumok és lamellás szerkezetű durvafelszínű endoplazmatikus retikulum (rEr) tölti ki. A rEr és a sejtmag, valamint a mitokondriumok közötti szoros kapcsolat jól megfigyelhető. A heterokromatin jól elkülönül az eukromatintól és elhelyezkedése marginális a karioplazmában. A TA kezelés nem okozott végzetes elváltozásokat a májsejtek szerkezetében: a glikogén granulumok száma nem, de azok elektrondenzitása csökkent a citoplazmában, a rEr lumen és a perinukleáris ciszternák megduzzadtak, a sejtmag és a mitokondriumok mátrixa a kontrollhoz képest elektrondenzebbé vált (14b ábra). Az önálló  $\text{CuSO}_4$  kezelés rendkívül toxikus hatásának következtében fejlődtek ki a legerőteljesebb krónikus ultrastrukturális elváltozások: a glikogén granulumok teljesen eltűntek a citoplazmából, az egyébként jól szervezett lamelláris szerkezetű rEr fragmentálódott, miáltal kis, riboszómákat hordozó vakuólumok képződtek, a sejtmag megduzzadt és a marginális heterokromatin kompakt, elektrondenz szemcsékké fragmentálódott, melyek megőrizték marginális elhelyezkedésüket. A TA önálló hatásához hasonlóan a mitokondriumok megduzzadtak és mátrixuk elektrondenzitása megnövekedett (14c ábra).



**14. ábra.** Ponty májsejtek elektronmikroszkópos felvételei 48 órával a tanninsav és/vagy rézszulfát kezelés után. (A) kontroll egyedből származó hepatocita, (B) tanninsavval, (C) rézszulfáttal, (D) tanninsavval és rézszulfáttal kezelt halakból származó hepatociták átnézeti képe. Rövidítések: n, nukleusz; no, nukleolusz; m, mitokondrium; rER, durvafelszínű endoplazmatikus retikulum; g, glikogén; ms, felcsavarodott mielin-membrán specializáció; cm, sejtmembrán; nyilak, riboszómák. A képeken feltüntetett szakasz 1  $\mu\text{m}$ -nek felel meg.

A TA+CuSO<sub>4</sub> kombinált kezelések eredménye ultrastrukturális szinten hasonlóságot mutat az önálló TA-s kezeléshez (14d ábra) a következő eltérésekkel: a citoplazmatikus glikogén majdnem teljesen eltűnt, a sejtmag megduzzadt, valamint a marginális heterokromatin mennyisége lecsökkent a kontrollhoz képest.

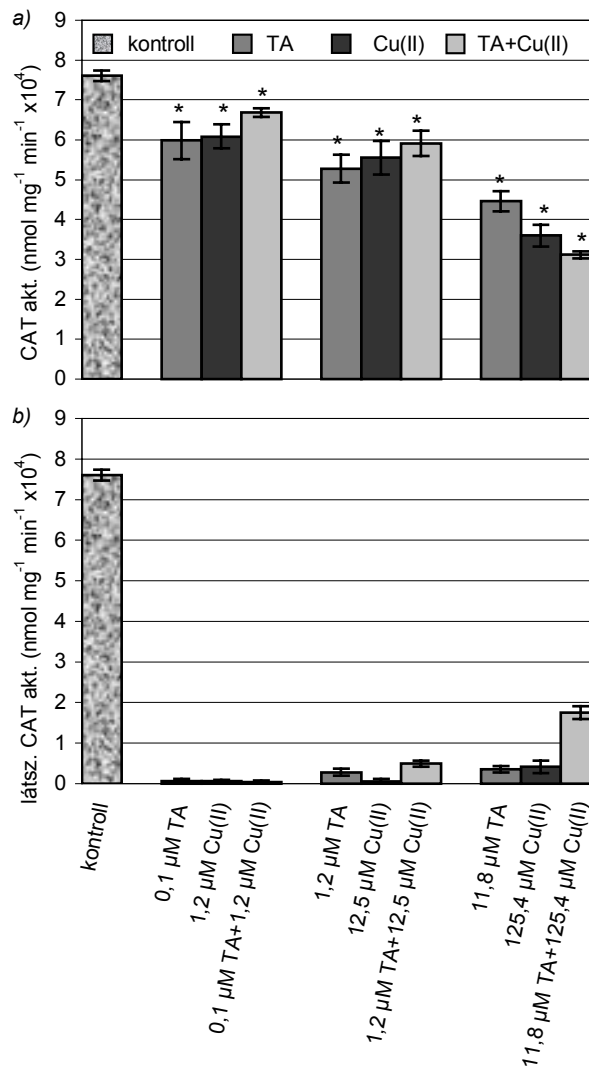
#### 4.2.2. A tanninsav és a rézszulfát *in vitro* hatásai

Úgy találtuk, hogy a TA és/vagy CuSO<sub>4</sub> az alkalmazott koncentráció-tartományokban nem befolyásolja a minták MDA koncentrációját (Varanka és mtsai., 2001). Ugyanezt tapasztaltuk a további *in vitro* kísérleteknél is (EA és/vagy CuSO<sub>4</sub>, TA és/vagy DM, EA és/vagy DM) (Varanka és mtsai., 2002).

Mivel az *in vivo* kezelések eredményeképpen a vizsgált antioxidáns enzimek aktivitása jelentősen lecsökkent, valamint a TA és a Cu(II) ismert enzim gátlószerek (pl. Radi és Matkovics, 1988; Wetzel, 1993; Baer-Dubowska és mtsai., 1998), a fent említett két vegyület CAT, SOD és GPx aktivitásra kifejtett hatását (látszólagos aktiválás vagy gátló hatás) *in vitro* körülmények között is megvizsgáltuk. Az "Anyagok és módszerek" fejezetben leírtaknak megfelelően az enzimreakciók kontrolljaként azonos összetételű, de enzim mentes reakcióelegyet használtunk. Az enzimreakciók feltárták, hogy a vizsgált két ágens önállóan és kombinálva is koncentrációfüggő módon gátolja a CAT enzimet (15a ábra). Érdekes módon, bizonyos koncentrációjú TA+CuSO<sub>4</sub> kombinációt tartalmazó enzim mentes reakcióelegyekben jelentős H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-bontó aktivitás volt mérhető (15b ábra). Mivel *in vitro* az alkalmazott koncentrációknál a TA és/vagy CuSO<sub>4</sub> számottevően elősegítette az epinefrin autooxidációját, ezen artifaktum képződése miatt az *in vitro* SOD aktivitások nem értékelhetők (Varanka és mtsai., 2001). Ugyanezt a jelenséget tapasztaltuk a későbbiekben vizsgált vegyületek (EA és DM) esetében is (Varanka és mtsai., 2002).

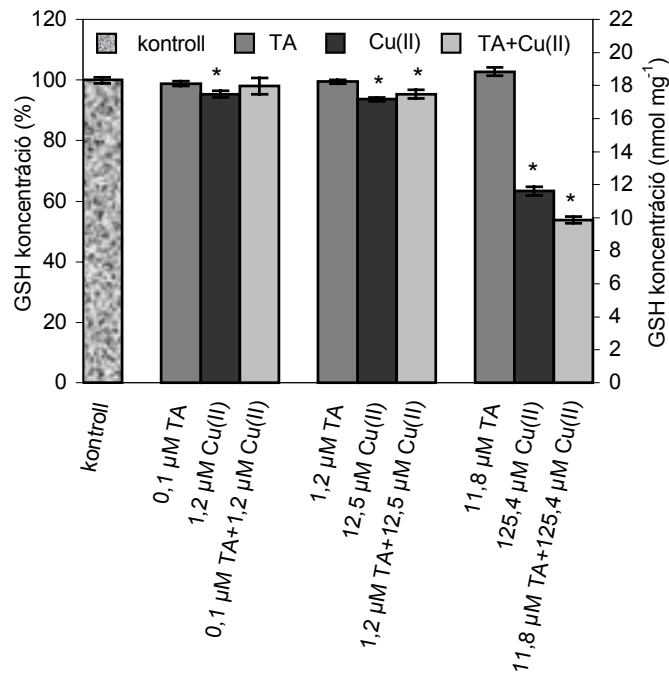
A 0,1-11,8 µM TA nem változtatta meg a redukált GSH koncentrációját *in vitro*, ezzel szemben a CuSO<sub>4</sub>, vagy kombinációja TA-val koncentrációfüggően csökkentette azt (16. ábra) (Varanka és mtsai., 2001). A GPx aktivitás TA általi *in vitro* koncentrációfüggő gátlását mutatja be a 17. ábra. A CuSO<sub>4</sub> ill. kombinációja TA-val nemcsak erőteljes (pl. GPx) enzimgátló tulajdonsággal, de számottevő, koncentrációfüggő GSH-oxidáló (vagyis látszólagos GPx) aktivitással is rendelkezik. Ez a két GSH fogyaszt eredményező aktivitás a közös szubsztrát (vagyis a GSH) miatt nem választható

szét, (Varanka és mtsai., 2001) ezért ezen mérések eredményeit a 17. ábrán nem tüntettük fel.



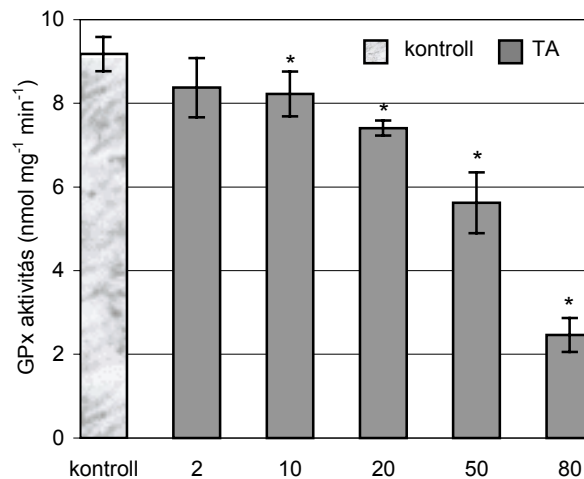
**15. ábra.** A tanninsav és/vagy rézszulfát *in vitro* koncentrációfüggő a) kataláz (CAT) aktivitást gátló hatása, és a b) felülúszó mentes ("kémiai") reakcióelegyben kifejtett H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-bontó (látszólagos CAT) aktivitása 10 perc inkubáció után.

Megjegyzés: az összehasonlíthatóság érdekében a b) ábrán a CAT-t (felülúszót) nem tartalmazó elegy peroxid-bontó aktivitását a felülúszót tartalmazó kontroll reakcióelegy specifikus aktivitásának függvényében specifikus aktivitás-ekvivalens formában adtuk meg. A kísérleti körülmények leírása az Anyagok és módszerek fejezetben található. A \* szimbólum a kontroll értékétől való szignifikáns eltérést jelzi.



**16. ábra.** A tanninsav és/vagy rézszulfát *in vitro* koncentrációfüggő hatása a redukált glutation koncentrációjára "biológiai" (felülűszót tartalmazó) rendszerben.

Megjegyzés: az ábrán a 30 perc inkubáció után mért értékeket tüntettük fel a (0 perces) belső kontrollok értéke százalékában, melyet 100%-nak tekintettünk. A kísérleti körülmények leírása az Anyagok és módszerek fejezetben található. A \* szimbólum a kontrolltól való szignifikáns eltérést jelzi.



**17. ábra.** A tanninsav *in vitro* koncentrációfüggő glutation-peroxidáz (GPx) aktivitást gátló hatása 10 perc inkubáció után.

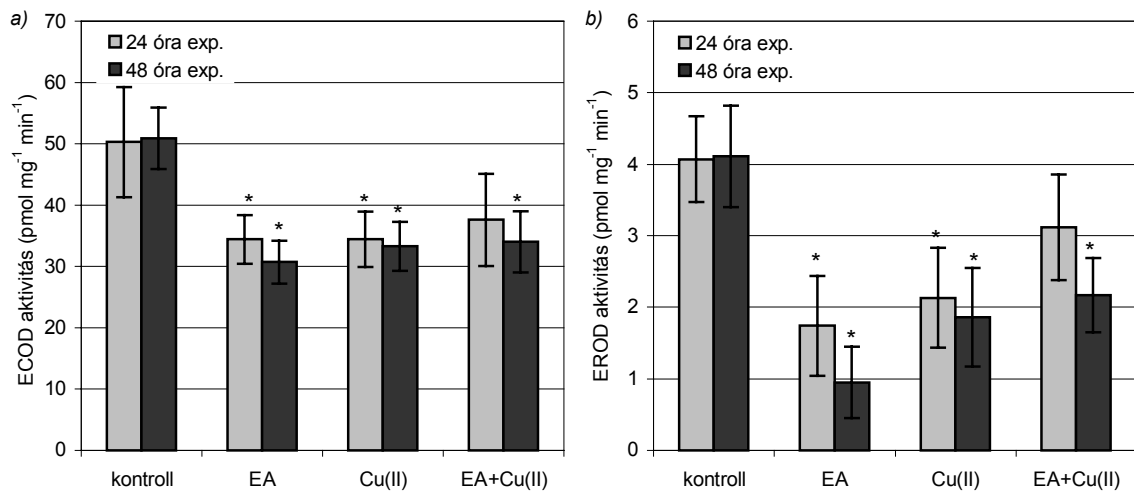
Megjegyzés: a rézszulfát illetve tanninsavval való kombinációja GPx aktivitást gátló hatása nem állapítható meg, ugyanis a rézszulfát jelentős glutation oxidáló aktivitással rendelkezik. Ez a látszólagos aktivitás és a felülűszó GPx aktivitása a közös szubsztrát (glutacion) miatt nem választható szét. A kísérleti körülmények leírása az Anyagok és módszerek fejezetben található. A \* szimbólum a kontrolltól való szignifikáns eltérést jelzi.



### 4.3. Az ellagsav és a rézszulfát önálló illetve kombinált hatásának vizsgálata pontyon

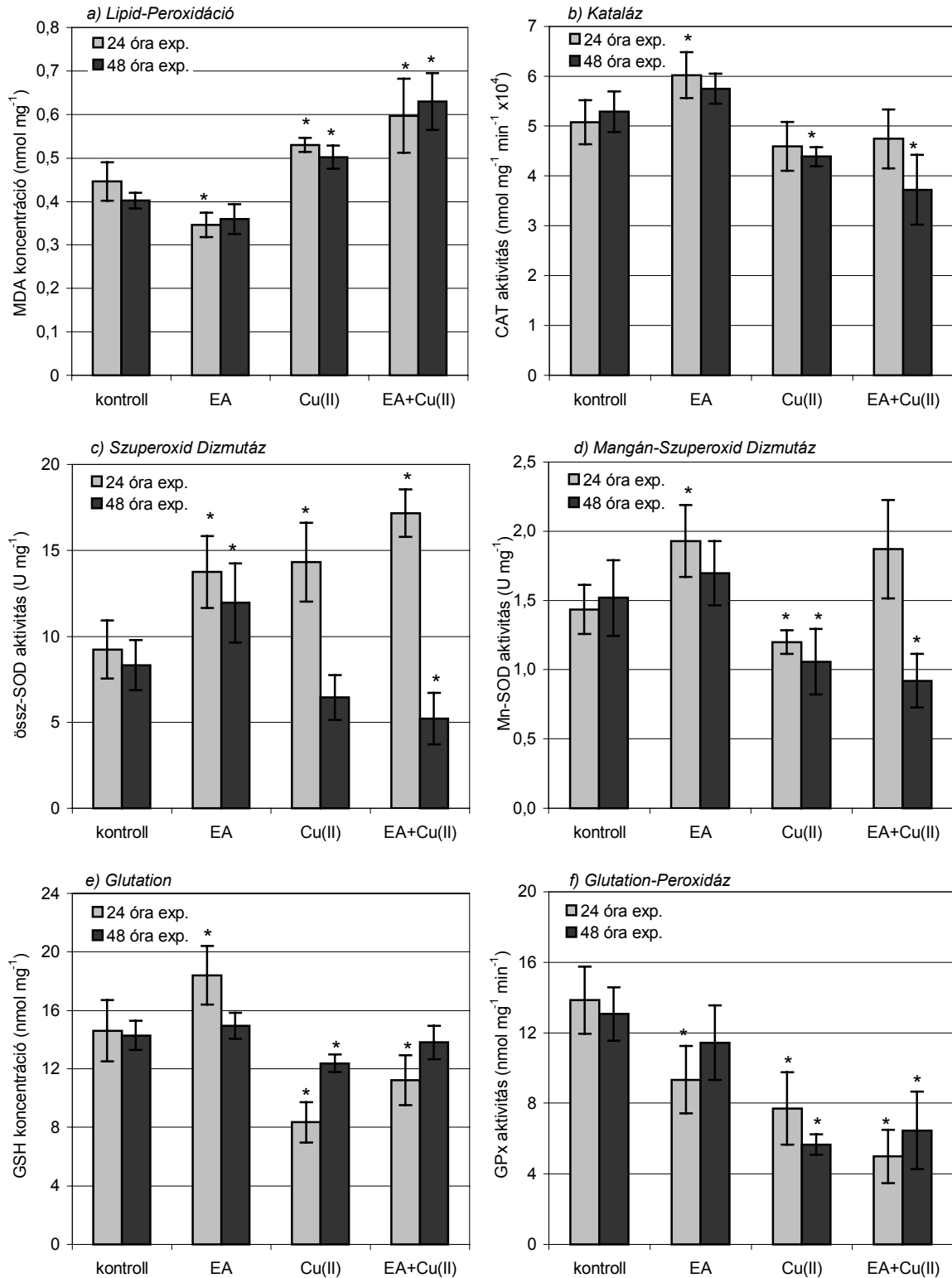
#### 4.3.1. Az ellagsav és a rézszulfát *in vivo* hatása

Az *in vivo* kezelések eredményei a 18-20. ábrán láthatók. Az ECOD-hoz képest az EROD aktivitások relatíve nagyobb mértékben gátlódtak (18. ábra). Az EROD-ra nézve a gátló hatás erőssége a következő sorrendben alakult: EA+Cu(II) < Cu(II) < EA, mely tendenciáját tekintve fordítottja annak, mint amit a CAT és a GPx esetében tapasztaltunk (18b vs. 19b,f ábra).

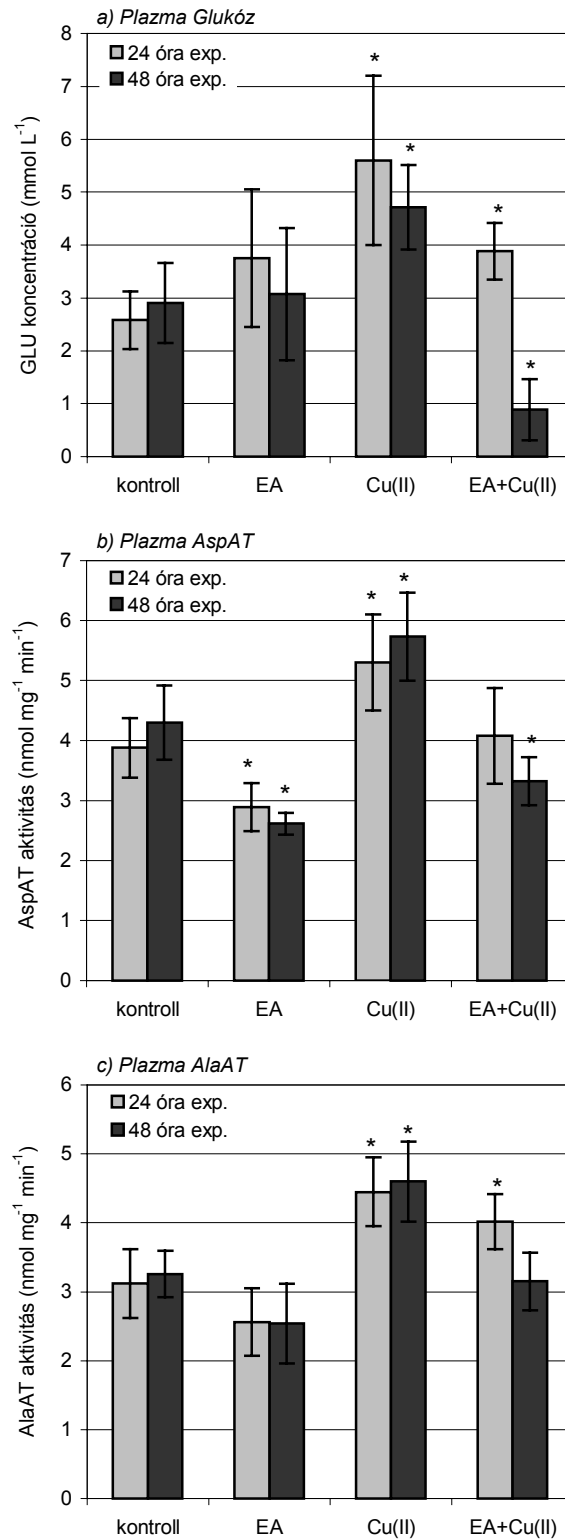


**18. ábra.** Az *in vivo* ellagsav és/vagy rézszulfát kezelés hatása ponty a) ECOD és b) EROD izoenzim aktivitására. A kísérleti körülmények leírása az Anyagok és módszerek fejezetben található. A \* szimbólum a kontroll értékétől való szignifikáns eltérést jelzi.

Az EA kezelés kissé megemelte, míg a Cu(II) és EA+Cu(II) injekció csökkentette a CAT aktivitást. Az össz-SOD esetében 24 óra múltán jelentős aktivitás emelkedés volt megfigyelhető mindhárom kezelésnél. Ezt számottevő aktivitás csökkenés követte újabb 24 óra elteltével a Cu(II) ill. EA+Cu(II) kezeléseknél. Ettől eltérően, a Mn-SOD aktivitás a Cu(II) és az EA+Cu(II) kezelésekre csökkent, ill. nem nőtt szignifikánsan (19c-d ábra). Egyértelmű összefüggés fedezhető fel az EROD, CAT és GPx háromféle kezelés során kialakult aktivitása (18b; 19b,f ábra) és a LP szintje (19a ábra) között. Az EA kezelés után a kontrollhoz viszonyítva alacsonyabb lipid-peroxidációs, de magasabb GSH szintet (19a,e ábra), és megemelkedett CAT, össz-SOD és Mn-SOD aktivitást (19b-d ábra) mértünk. Érdekes, hogy az EA+Cu(II) kombinált kezelés hatására nagyobb mértékben nőtt meg a lipid-peroxidációs ráta, mint az önállóan adott Cu(II) következtében (19a ábra).



**19. ábra.** Az *in vivo* ellagsav és/vagy rézszulfát kezelés hatása ponty antioxidáns védekezőrendszerére. A kísérleti körülmények leírása az Anyagok és módszerek fejezetben található. A \* szimbólum a kontroll értékétől való szignifikáns eltérést jelzi.



**20. ábra.** Az *in vivo* ellagsav és/vagy rézszulfát kezelés hatása ponty a) vércukor szintjére és b,c) plazma aminoszferáz aktivitásaira. A kísérleti körülmények leírása az Anyagok és módszerek fejezetben található. A \* szimbólum a kontrolltól való szignifikáns eltérést jelzi.

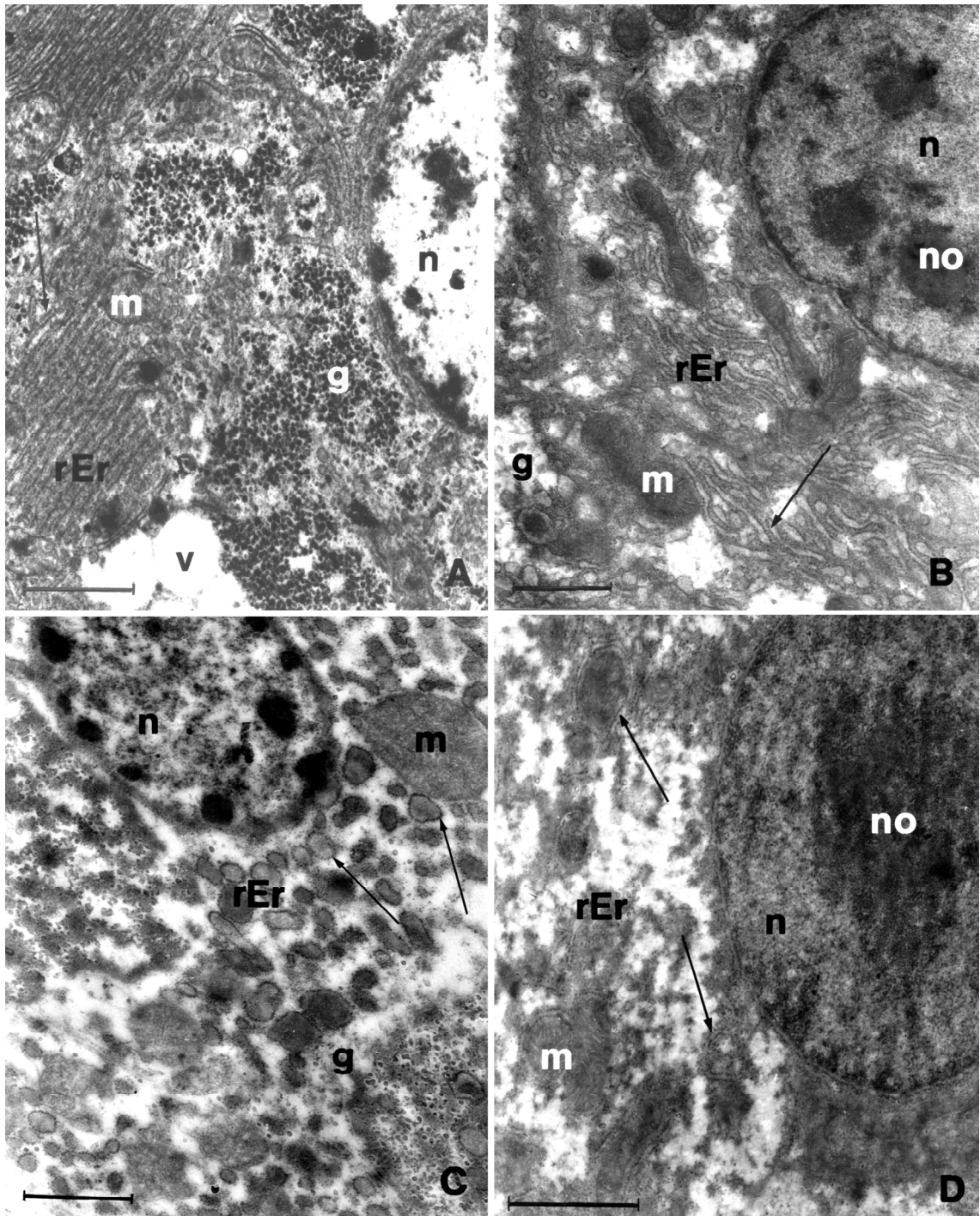
Az expozíciós időfüggő hatás legszembetűnőbb a GSH koncentráció változásánál, az EROD és az össz-SOD, valamint a Mn-SOD enzim aktivitásoknál volt. Az előző

fejezetben leírt TA/Cu kezelés hatásához képest tehát az EA/Cu kezelések lényegesen változatosabb eredményt hoztak.

Az EA kezelés változatos GLU koncentráció kialakulását eredményezte egyedenként, némelyeknél jelentős koncentráció növekedést, másoknál csökkenést okozott, így egyértelmű konklúzió levonása ezen eredményekből nem lehetséges. Az EA+Cu(II) kezelés stresszkeltő hatását tükrözi a GLU koncentráció változása (20a ábra). Az aminoszterázok esetében az EA kezelés után már 24 óra után is szignifikáns aktivitás csökkenést, vagy arra mutató tendenciát kaptunk (20b,c ábra), ami ellentétes a TA ezen enzimek aktivitására kifejtett hatásával. Összehasonlításképpen megjegyezzük, hogy a fenolikumok molekulaszervezete és gátló hatása közötti összefüggéseket vizsgáló *in vitro* kísérleteink eredményeképpen azt kaptuk, hogy a TA egy másik enzimre, a CAT-ra nézve lényegesen erősebb gátlószer, mint az EA (5. ábra). Ez arra utalhat, hogy az EA esetében nemcsak enzim aktivitás gátló, hanem egyéb, pl. antioxidáns/sejtvédő aktivitással, a TA-nál viszont az enzimgátláson túl szövetkárosító hatással is számolni kell, melyek jelentősen befolyásolhatják az *in vivo* enzim aktivitások szintjét. Időfüggő effektust csak a kombinált kezeléseknél figyeltünk meg.

Az EA kezelés után nem voltak megfigyelhetők szemmel látható makroszkopikus elváltozások a májon. A CuSO<sub>4</sub> injekció eredményét az előző fejezetben ismertettük, az EA+CuSO<sub>4</sub> kombinált kezelés – hasonlóan a TA+CuSO<sub>4</sub> mixturához – kevésbé volt nekrotizáló hatással a májra, mint a CuSO<sub>4</sub> egyedül, s a máj természetes színe is kevésbé változott a szürkés árnyalat irányába.

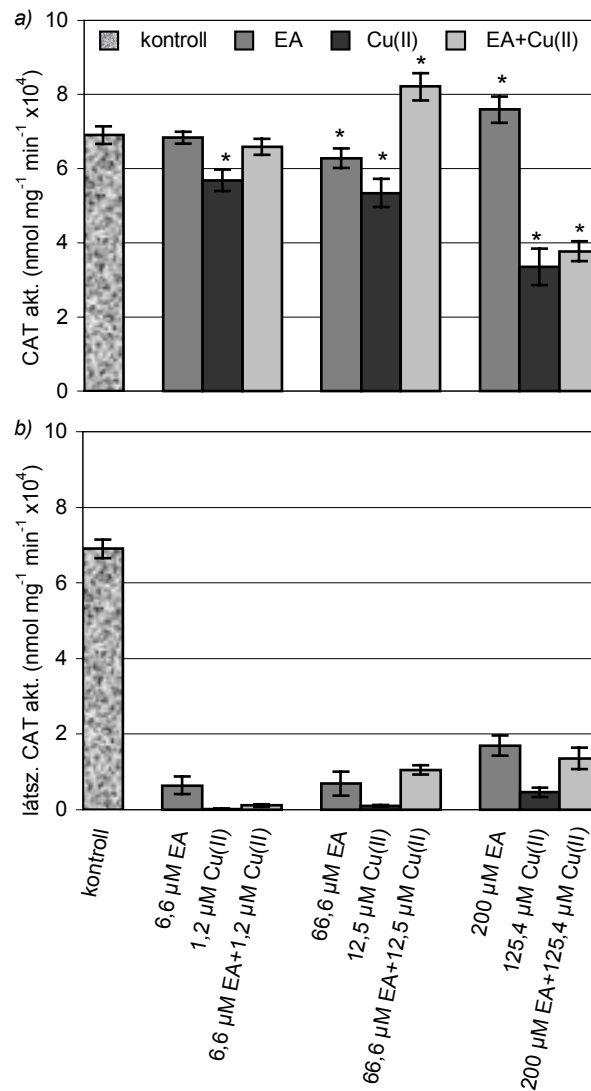
Az elektronmikroszkópos felvételeken látható, hogy a kontrollhoz képest az EA kis mértékű ultrastrukturális változásokat okozott a májsejtek finomszerkezetében (21b ábra): a glikogén mennyisége jelentősen lecsökkent, ugyanakkor a rEr és a perinukleáris ciszternák megduzzadtak. A marginális heterokromatin redukálódott, az eukromatin és a mitokondriumok elektrondenzitása megnőtt a kontrollhoz viszonyítva. A CuSO<sub>4</sub> májsejtekre kifejtett rendkívül káros hatását mutatja be a 21c ábra, részletes leírást erről az előző fejezetben adtunk. Megjegyzendő, hogy a Cu(II) kezelés után a mitokondriumok duzzadtabbak és mátrixuk elektrondenzebb volt, ahhoz képest, ami az EA kezelés után kialakult. Az EA+CuSO<sub>4</sub> kezelés a CuSO<sub>4</sub> önálló hatásához viszonyítva enyhébb strukturális elváltozásokat okozott a májsejtekben (21d ábra). A kombinált kezelést követően jól látható a felvételeken a glikogén hiánya, s az is, hogy a rEr lamellái részlegesen károsodtak, és rendezetlenséget mutatnak.



**21. ábra.** Ponty májsejtek elektronmikroszkópos felvételei 48 órával az ellagsav és/vagy rézszulfát kezelés után. (A) kontroll egyedből származó hepatocita, (B) ellagsavval, (C) rézszulfáttal, (D) ellagsavval és rézszulfáttal kezelt halakból származó hepatociták átnézetű képe. Rövidítések: n, nukleusz; no, nukleolusz; m, mitokondrium; rEr, durvafelszínű endoplazmatikus retikulum; g, glikogén; nyilak, riboszómák; v, vakuolum. A képeken feltüntetett szakasz 1  $\mu\text{m}$ -nek felel meg.

Noha a kombinált kezelés után a sejtmagok megduzzadtak, és bár a marginális heterokromatin mennyisége redukálódott és részlegesen fragmentálódott, a  $\text{CuSO}_4$  kezelés eredményéhez hasonló kromatin összecsapódást és kompakt denz testecskék kialakulását nem észleltük. Azonban a mitokondriumok is duzzadtak voltak és mátrixuk elektrondenzebb volt a kontrollhoz képest.

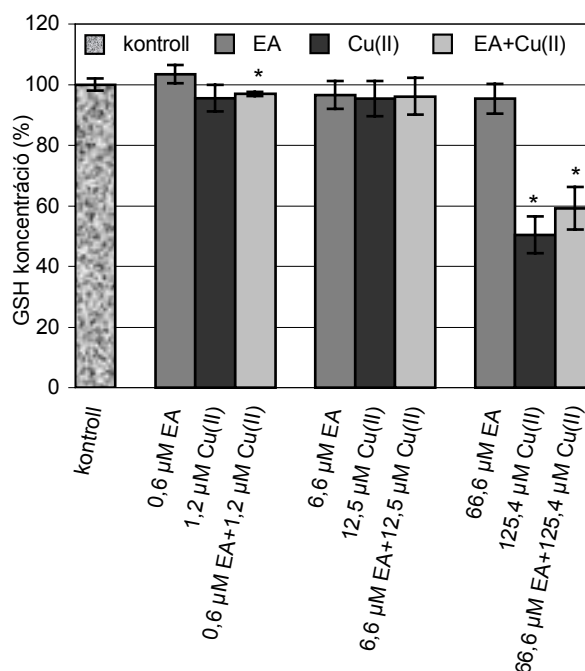
#### 4.3.2. Az ellagsav és a rézszulfát *in vitro* hatása



**22. ábra.** Az ellagsav és/vagy rézszulfát *in vitro* koncentrációfüggő a) kataláz (CAT) aktivitást gátló hatása és b) a felülúszó mentes reakcióelegyben kifejtett  $\text{H}_2\text{O}_2$ -bontó (látszólagos CAT) aktivitása 10 perc inkubáció után.

Megjegyzés: az összehasonlíthatóság érdekében a b) ábrán a CAT-t (felülúszót) nem tartalmazó elegy peroxid-bontó aktivitását a felülúszót tartalmazó kontroll reakcióelegy specifikus aktivitásának függvényében specifikus aktivitás-ekvivalens formában adtuk meg. A kísérleti körülmények leírása az Anyagok és módszerek fejezetben található. A \* szimbólum a kontroll értékétől való szignifikáns eltérést jelzi.

A 22a ábrán a 6,6-200  $\mu\text{M}$  EA-val és/vagy 1,2-125,4  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  *in vitro* CAT aktivitásra kifejtett hatása látható. A TA/Cu(II) *in vitro* vizsgálatokhoz hasonlóan koncentrációfüggő CAT aktivitás gátlást kaptunk, azonban az EA ill. az EA+ $\text{CuSO}_4$  kombináció bizonyos koncentrációinál a gátlás tendenciájába nem illő magasabb CAT aktivitás értékeket mutatott (22a ábra). Emellett azt találtuk, hogy az azonos összetételű, de enzimet (vagyis felülűszót) nem tartalmazó "kémiai" reakcióelegyekben az EA ill. az EA+Cu(II) komplex közvetlen  $\text{H}_2\text{O}_2$ -bontó (tehát látszólagos CAT) aktivitással rendelkezik (22b ábra), hasonlóan, ahogyan azt a TA+Cu(II) rendszereknél tapasztaltuk.

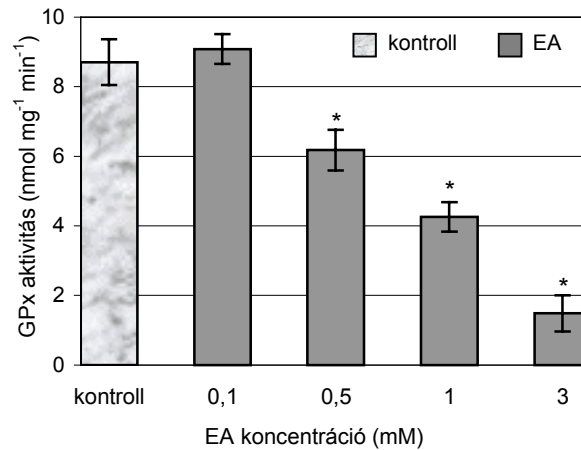


**23. ábra.** Az ellagsav és/vagy rézszulfát *in vitro* koncentrációfüggő hatása a redukált glutation koncentrációjára "biológiai" (felülűszót tartalmazó) rendszerben.

Megjegyzés: az ábrán a 30 perc inkubáció után mért értékeket tüntettük fel a (0 perces) belső kontrollok értéke százalékában, melyet 100%-nak tekintettünk. A kísérleti körülmények leírása az Anyagok és módszerek fejezetben található. A \* szimbólum a kontroll értékétől való szignifikáns eltérést jelzi.

A 23. ábrán az EA és/vagy  $\text{CuSO}_4$  GSH koncentrációra kifejtett hatását mutatjuk be. Míg a 0,6-66,6  $\mu\text{M}$  EA nem volt hatással *in vitro* a GSH koncentrációra, addig a  $\text{CuSO}_4$ , és EA-val alkotott kombinációja az *in vivo* eredményeknek megfelelően (19e ábra) erős GSH-oxidáló potenciállal rendelkezik az *in vitro* "biológiai" rendszerekben (23. ábra). A GSH koncentráció változásának mértéke az *in vitro* "biológiai" és "kémiai" rendszerekben megegyezett. Az *in vivo* GPx aktivitás csökkenéssel összhangban *in vitro* körülmények között kimutatható volt a GPx aktivitás EA általi koncentrációfüggő

gátlása (24. ábra). A GPx aktivitás  $\text{CuSO}_4$  ill. EA+ $\text{CuSO}_4$  mixtura általi gátlásának vizsgálata nem lehetséges amiatt, hogy a  $\text{CuSO}_4$  az EA jelenlétében is jelentős GSH oxidáló kapacitással rendelkezik, hasonlóan, mint a TA+Cu(II) kombináció.



**24. ábra.** Az ellagsav *in vitro* koncentrációfüggő glutation-peroxidáz (GPx) aktivitást gátló hatása 10 perc inkubáció után.

Megjegyzés: a rézszulfát, illetve ellagsavval való kombinációja GPx aktivitást gátló hatása nem állapítható meg, ugyanis a rézszulfát jelentős glutation-oxidáló aktivitással rendelkezik. Ez a látszólagos aktivitás és a felülülő GPx aktivitása a közös szubsztrát (glutation) miatt nem választható szét. A kísérleti körülmények leírása az Anyagok és módszerek fejezetben található. A \* szimbólum a kontroll értékétől való szignifikáns eltérést jelzi.

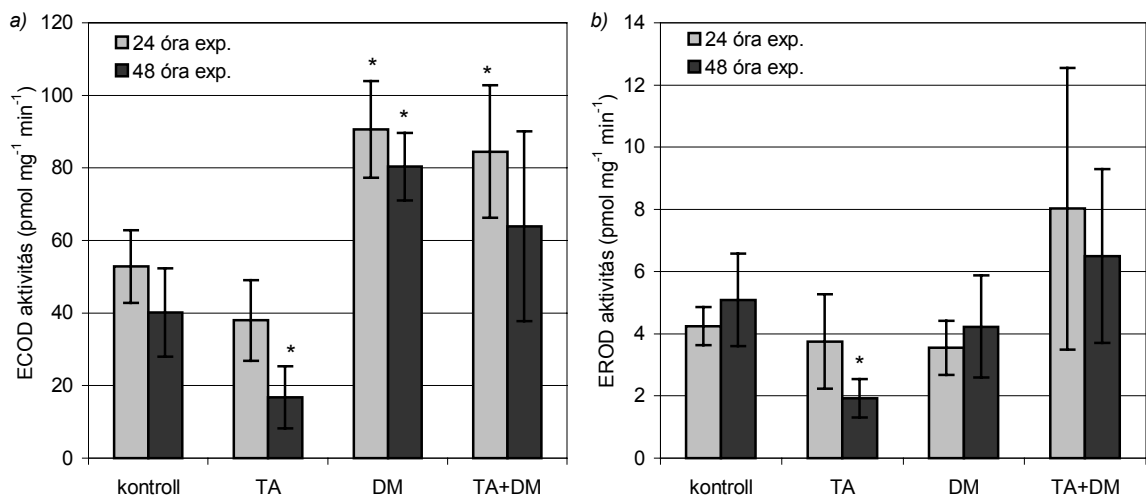
#### 4.4. A tanninsav és a deltamethrin önálló illetve kombinált hatásának vizsgálata pontyon

##### 4.4.1. A tanninsav és a deltamethrin *in vivo* hatásai

Arra voltunk kíváncsiak, hogy a TA hogyan befolyásolja a DM-nel kezelt állatokban a biotranszformációs és antioxidáns enzimek működését és a sejtek redox státuszát. Vegyületeink P450 1A izoenzimekre kifejtett hatását a 25. ábrán tüntettük fel. Látható, hogy a TA kezelés hatására a P450 1A aktivitások mellett az antioxidáns enzimek összaktivitása is csökkent (26b-d,f ábra), s a nem-enzimatis redox-paraméterek (26a,e ábra) prooxidáns hatást jeleztek. Míg a deltamethrin injekció (DM ill. TA+DM) nem okozott szignifikáns változást az EROD aktivitásokban, addig az irodalmi adatoknak megfelelően (Banka és mtsai., 1997) az ECOD (25. ábrán) az antioxidáns enzimekkel együtt (26b-d,f ábra) jelentősen aktiválódott, s a nem-enzimatis redox-paraméterek oxidáns hatást mutattak (26a,e ábra). Jelentős GSH-fogyással együtt a

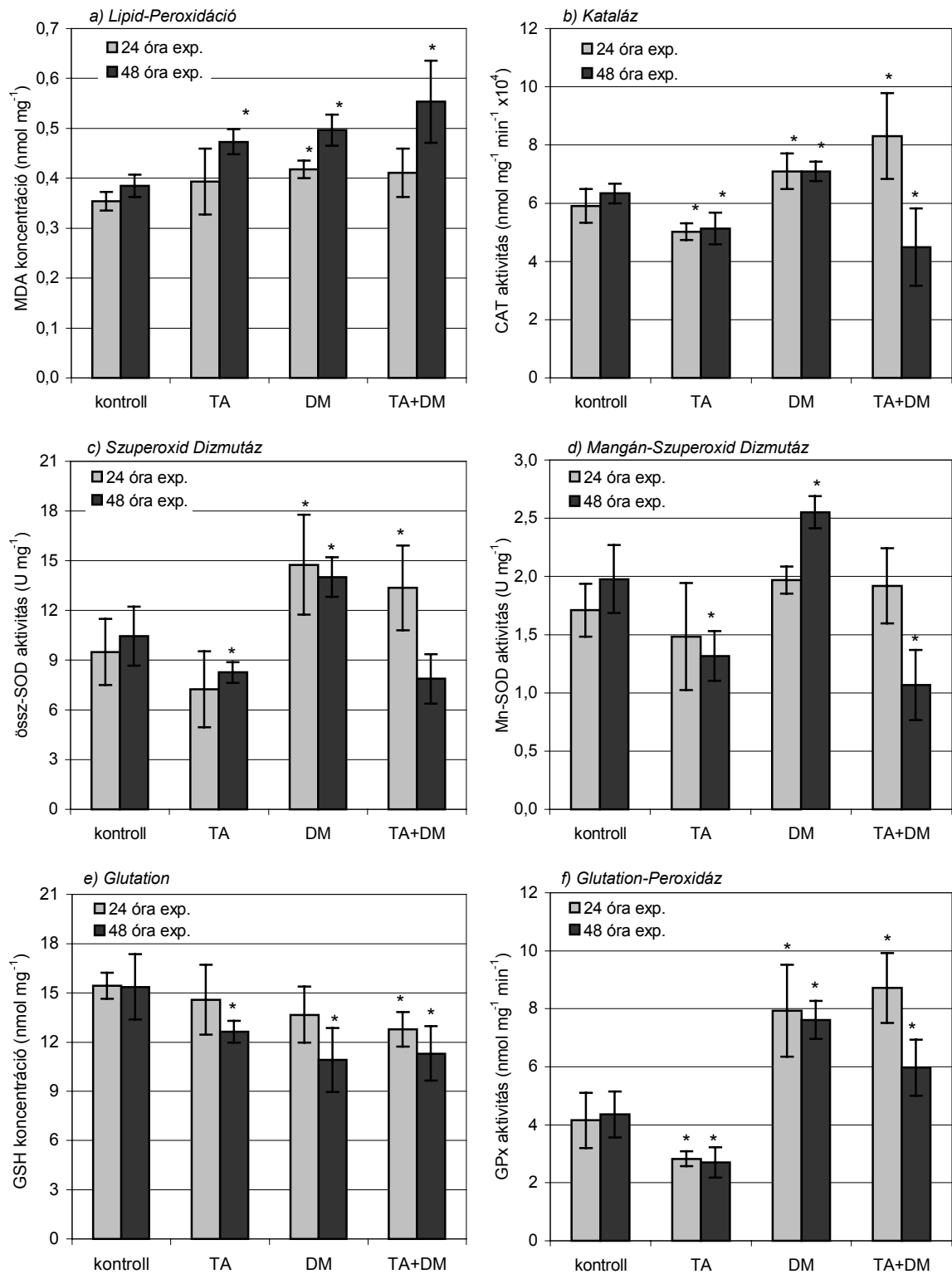


legmagasabb LP értékek a TA+DM kombinált kezelés után 2 nappal (26a,e ábra) alakultak ki, ami valószínűleg összefüggésben van azzal a ténnyel, hogy amellet, hogy az ECOD aktivitás a kontrollhoz képest megemelkedett (25a ábra), az antioxidáns enzim aktivitások 48 óra expozíció után az előző napi értékhez képest szignifikánsan csökkentek (26b-d,f ábra). A kombinált kezeléseknél a biológiai hatás expozíciós időfüggését jól demonstrálják az említett enzim aktivitások változásai (26b-d,f ábra). Megjegyezzük, hogy a kontroll halak és a TA-val kezelt halak GPx aktivitásai közötti különbség 48 óra expozíciós idő után azonos volt a DM-nel ill. a TA+DM-nel kezelt halak GPx aktivitás különbségével.

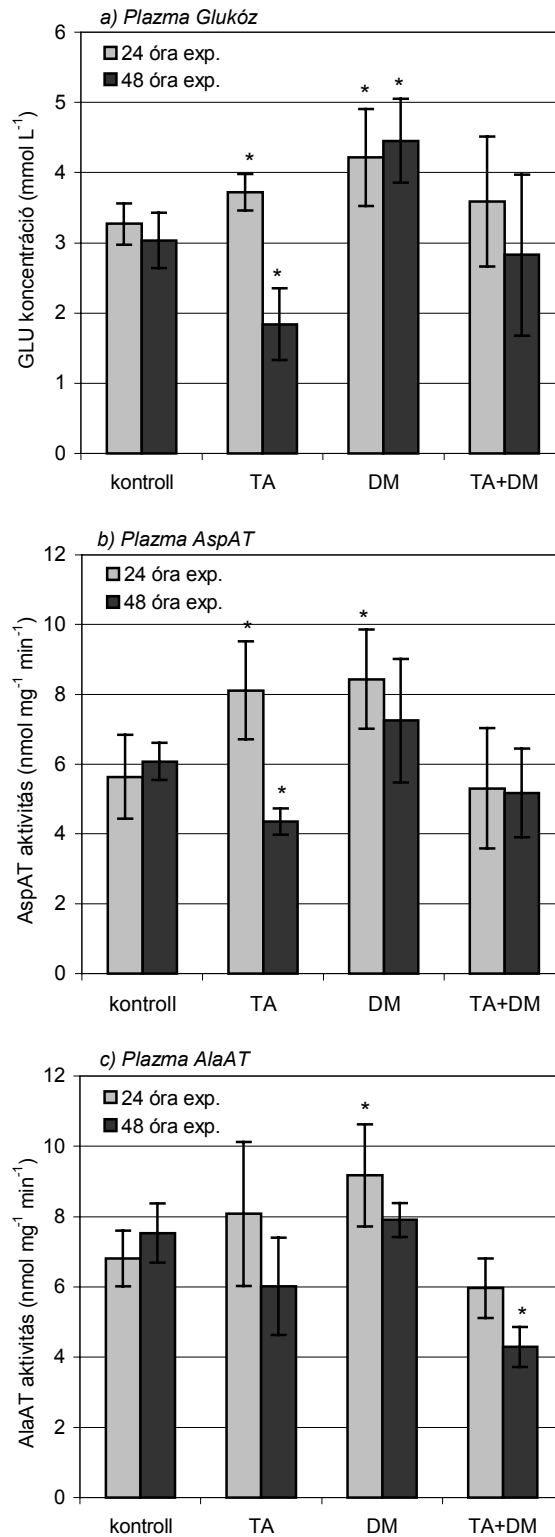


**25. ábra.** Az *in vivo* tanninsav és/vagy deltamethrin kezelés hatása ponty a) ECOD és b) EROD izoenzim aktivitására. A kísérleti körülmények leírása az Anyagok és módszerek fejezetben található. A \* szimbólum a kontroll értékétől való szignifikáns eltérést jelzi.

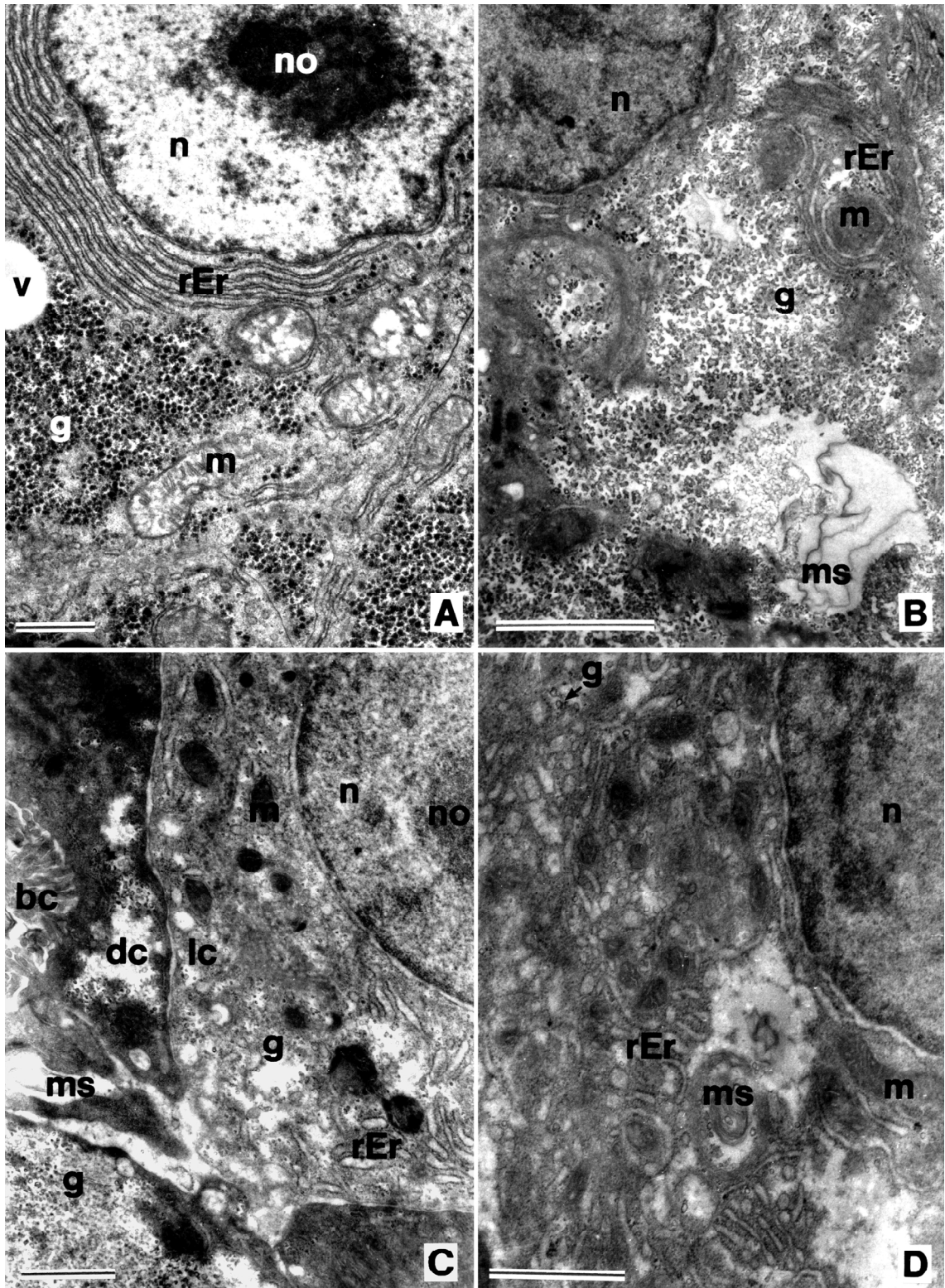
A vérparaméterek változásai a 27. ábrán láthatók. A tanninsav GLU, AspAT és AlaAT-ra gyakorolt hatását a 4.2.1. fejezetben már ismertettük. A CuSO<sub>4</sub> kezelés eredményéhez hasonlóan a DM is stresszhatást és szövetkárosodást okozott (27. ábra) (Bálint és mtsai., 1995), viszont az előbbihez képest a vérparaméterek értékei jóval kisebb mértékben változtak (13. vs. 27. ábra). A TA+DM kombinált kezelés után azt találtuk, hogy a kontrollhoz képest szignifikáns változás (csökkenés) csak egy esetben: 48 óra expozíció után, az AlaAT aktivitásban történt (27c ábra). Megfigyelhető, hogy a kontroll és a TA-val kezelt halak vérparaméter értékei közötti különbség, illetve a változás iránya nagyban hasonló volt ahhoz, mint amit a DM és a TA+DM kezelés eredményeinek összehasonlításakor kaptunk (27. ábra).



**26. ábra.** Az *in vivo* tanninsav és/vagy deltamethrin kezelés hatása ponty antioxidáns védekezőrendszerére. A kísérleti körülmények leírása az Anyagok és módszerek fejezetben található. A \* szimbólum a kontroll értékétől való szignifikáns eltérést jelzi.



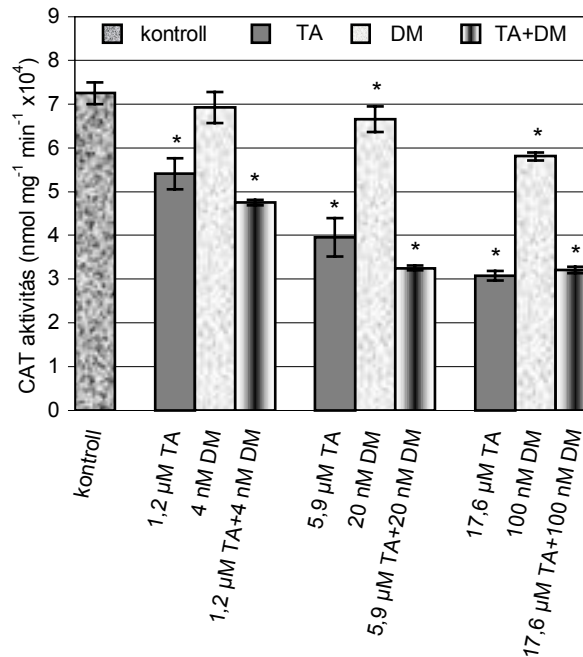
**27. ábra.** Az *in vivo* tanninsav és/vagy deltamethrin kezelés hatása ponyta a) vércukor szintjére és b,c) plazma aminoszferáz aktivitásaira. A kísérleti körülmények leírása az Anyagok és módszerek fejezetben található. A \* szimbólum a kontrolltól való szignifikáns eltérést jelzi.



28. ábra. Ponty májsejtek elektronmikroszkópos felvételei 48 órával a tanninsav és/vagy deltamethrin kezelés után. (A) kontroll hepatocita, (B) tanninsavval, (C) deltamethrinnel, (D) tanninsavval és deltamethrinnel kezelt halakból származó hepatociták átnézeti képe. Rövidítések: n, nukleusz; no, nukleolusz; m, mitokondrium; rEr, durvafelszínű endoplazmatikus retikulum; g, glikogén; ms, felcsavarodott mielin-membrán specializáció; bc, epekapillaris; dc, "sötét" sejt; lc, "világos" sejt; v, vakuolum. A képeken feltüntetett szakasz 1  $\mu\text{m}$ -nek felel meg.

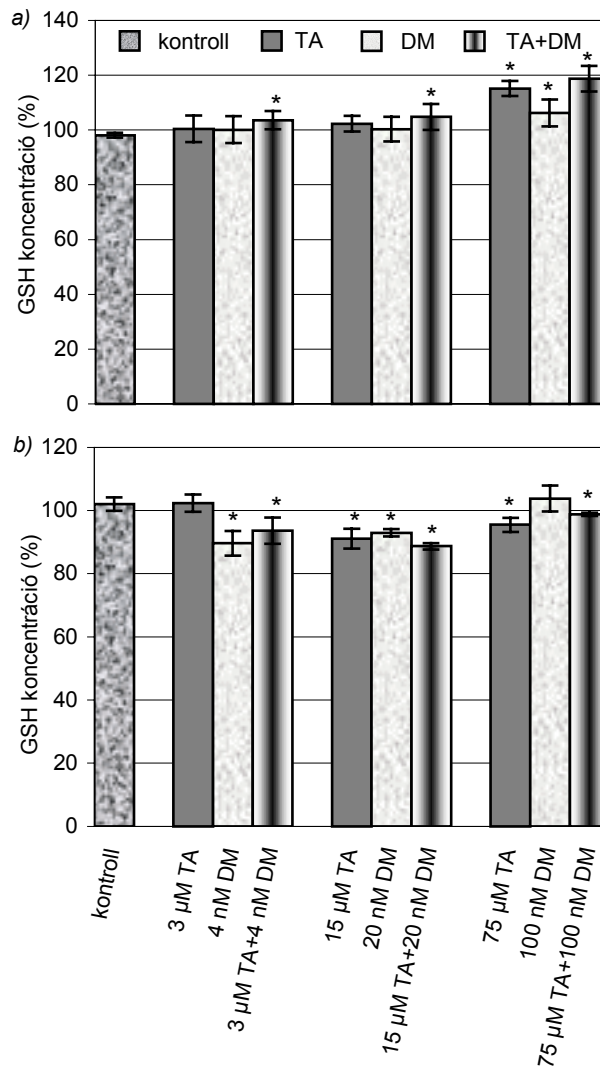
A kezelések következtében kialakult ultrastrukturális elváltozások természete a 28. ábrán látható. Mint azt a 4.2.1. fejezetben ismertettük, a TA kezelés nem okozott végzetes elváltozásokat a májsejtek szerkezetében: a glikogén granulomok száma nem, de elektronenzitása csökkent a citoplazmában, a rEr lumen és a perinukleáris ciszternák megduzzadtak, a sejtmag és a mitokondriumok mátrixa a kontrollhoz képest elektronenzebbé vált (28b ábra). A leglátványosabb elváltozást a DM kezelés okozta, amely hatására ún. "világos" és "sötét" sejtek jelentek meg (Bálint és mtsai., 1995). A glikogén granulomok száma és elektronenzitása is jelentősen lecsökkent a citoplazmában, a rEr lumen és a perinukleáris ciszternák is jól láthatóan megduzzadtak. A sejtmag és a mitokondriumok rendkívül elektronenzé váltak (28c ábra). A TA+DM kombinált kezelés következtében a glikogén teljesen eltűnt a citoplazmából. A rEr ciszternák duzzadása enyhébb volt, mint amit a DM kezelés váltott ki, a rEr jól szervezett lamelláris struktúrája azonban jobban fellazult. A kombinált kezelés esetében nem volt megfigyelhető a "világos" és "sötét" sejtek megjelenése az elektronmikroszkópos felvételeken, illetőleg a sejtmag és a mitokondriumok szerkezeti és elektronenzitásbeli elváltozása kisebb mértékű volt a DM kezelés által kiváltottnál; leginkább ahhoz volt hasonló, mint amit a TA kezelés okozott (28d ábra).

#### 4.4.2. A tanninsav és a deltamethrin *in vitro* hatásai



**29. ábra.** A tanninsav és/vagy deltamethrin *in vitro* koncentrációfüggő kataláz aktivitást gátló hatása 10 perc inkubáció után. A kísérleti körülmények leírása az Anyagok és módszerek fejezetben található. A \* szimbólum a kontroll értékétől való szignifikáns eltérést jelzi.

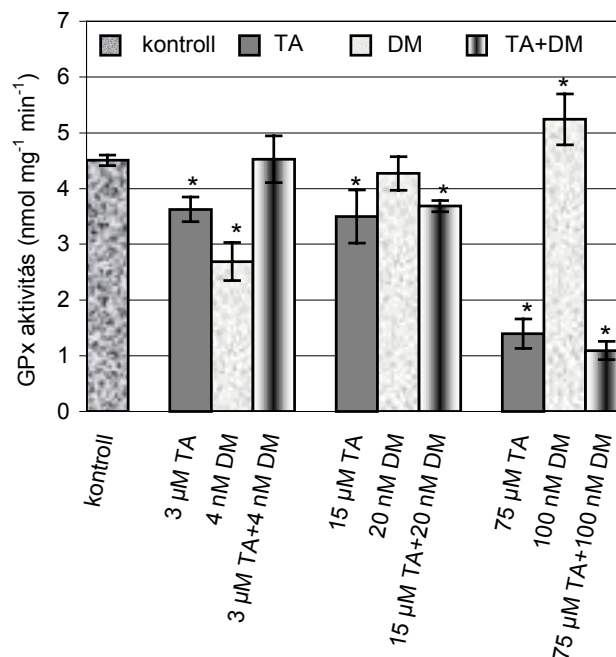
A nem-enzimatis *in vitro* méréseink eredményei alapján megállapítottuk, hogy a TA és/vagy DM a vizsgált koncentráció-tartományban szignifikáns peroxid-bontó hatást nem fejt ki. Ugyanakkor, a két vegyület ill. kombinációjuk számottevő, koncentrációfüggő CAT aktivitást gátló kapacitással rendelkezik (Varanka és mtsai., 2002). A 29. ábrán jól látható, hogy a TA és/vagy DM egymáshoz viszonyított gátló hatása a koncentráció függvényében eltérő arányban változik.



**30. ábra.** A tanninsav és/vagy deltamethrin *in vitro* koncentrációfüggő hatása a redukált glutation koncentrációjára a) 190 nM glutatont tartalmazó (felülűszó mentes) "kémiai" rendszerben és b) "biológiai" (felülűszót tartalmazó) rendszerben.

Megjegyzés: az ábrán a 30 perc inkubáció után mért értékeket tüntettük fel a (0 perces) belső kontrollok értéke százalékában, melyet 100%-nak tekintettünk. A kísérleti körülmények leírása az Anyagok és módszerek fejezetben található. A \* szimbólum a kontroll értékétől való szignifikáns eltérést jelzi.

Több esetben azt tapasztaltuk, hogy a vizsgált vegyületek bizonyos koncentrációban látszólagos GSH koncentráció növekedést okoznak *in vitro*. Ezek a koncentrációk azonban lényegesen magasabbak voltak az *in vivo* értékeknél. Ezt a látszólagos GSH koncentráció emelő effektust csak a felülúszó mentes reakcióelegyekben tapasztaltunk (30a ábra). Felülúszó jelenlétében az effektorok (kivéve a 3  $\mu\text{M}$  TA koncentráció esetét) GSH koncentráció csökkentő hatást mutattak, amely azonban a legmagasabb alkalmazott TA és/vagy DM koncentrációknál volt a leggyengébb (30b ábra). Ez az egyéb effektor koncentrációkhoz képest kisebb mértékű GSH fogyás minden bizonnyal összefüggésbe hozható a megfelelő felülúszó mentes ("kémiai") reakcióelegyben mérhető relatíve magas (megemelkedett) látszólagos GSH koncentrációval (30a ábra) (Varanka és mtsai, 2002). Mind a TA egyedül, mind pedig kombinációja DM-nel koncentrációfüggő módon gátolta a GPx aktivitását *in vitro* (31. ábra). Ugyanakkor, a 31. ábrán jól megfigyelhető, hogy az önálló DM-nel való inkubáció az előzőekhez képest fordított hatást váltott ki oly módon, hogy 100 nM-os DM koncentrációnál látszólagos GPx aktiválódást detektáltunk, ami a fent említetteken kívül további interakció(k) jelenlétét feltételezi (Varanka és mtsai, 2002).

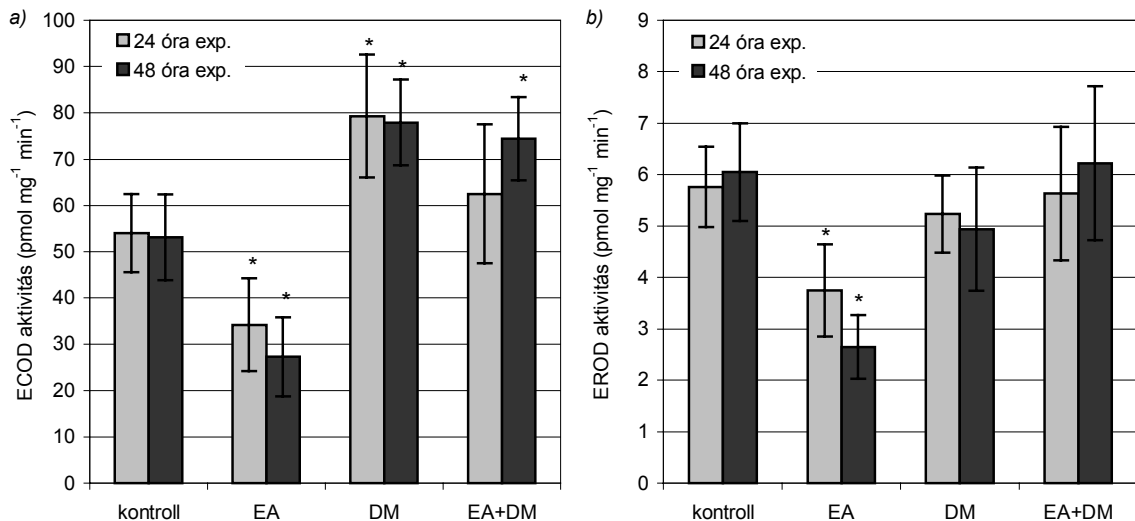


**31. ábra.** A tanninsav és/vagy deltamethrin *in vitro* koncentrációfüggő hatása glutation-peroxidáz aktivitására 10 perc inkubáció után. A kísérleti körülmények leírása az Anyagok és módszerek fejezetben található. A \* szimbólum a kontrolltól való szignifikáns eltérést jelzi.

## 4.5. Az ellagsav és a deltamethrin önálló illetve kombinált hatásának vizsgálata pontyon

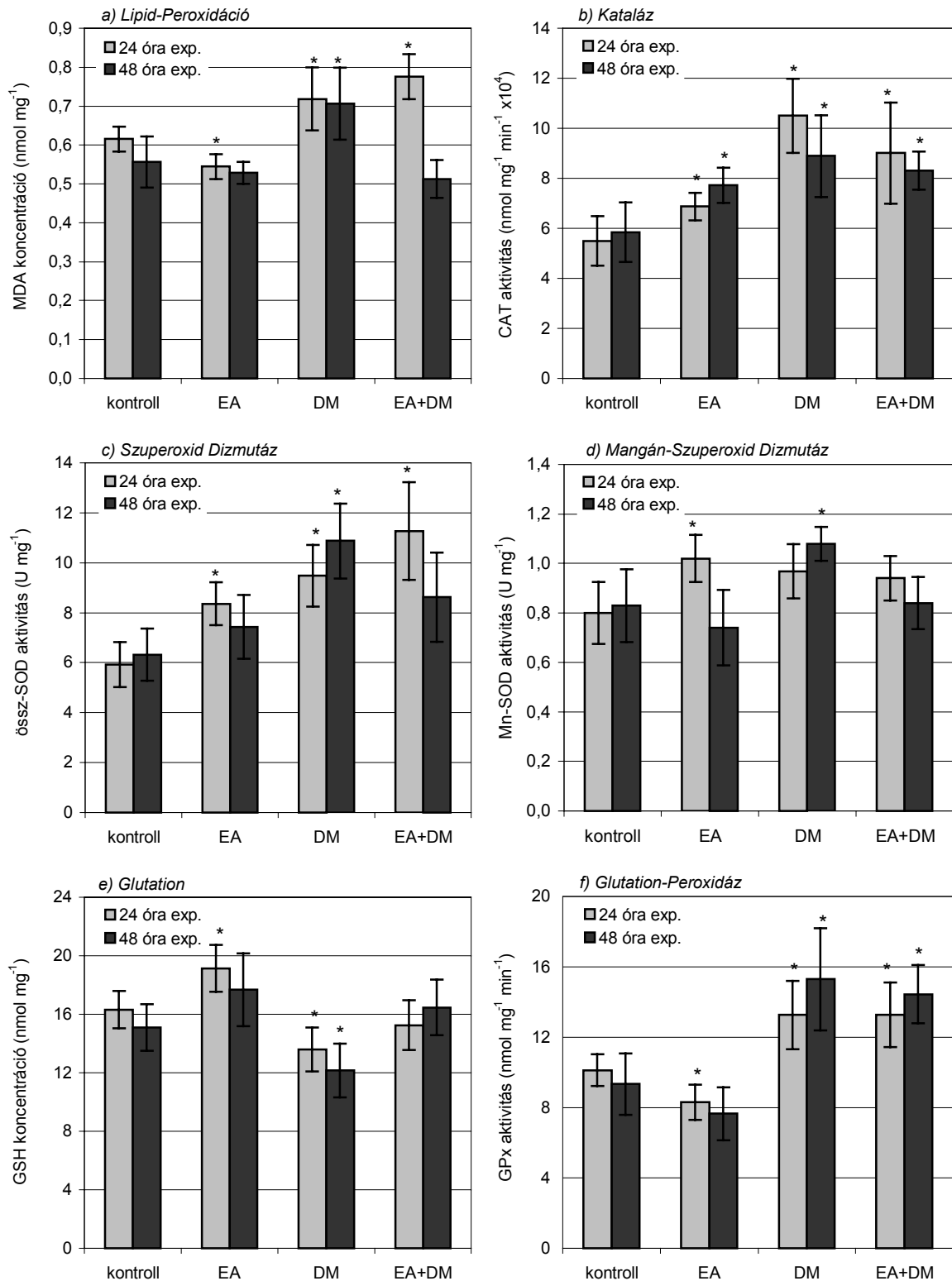
### 4.5.1. Az ellagsav és a deltamethrin *in vivo* hatásai

Az EA/DM kezelések eredményei a 32-34. ábrán tekinthetők meg. Összefoglalva az eddig bemutatott önálló EA ill. DM kezelések eredményeit azt találtuk, hogy az EA gátolta a CYP 1A izoenzimeket (18. és 32. ábra), következésképpen csökkentette a P450 által termelődő szabadgyökök mennyiségét. Az antioxidáns enzimszisztéma összaktivitása az EA hatására megemelkedett, s emellett a nem-enzimatikus redox-paraméterek (LP és GSH) értékei antioxidáns befolyást jeleztek (19. és 33. ábra). A DM kezelés megemelte az ECOD aktivitását a halakban (25. és 32. ábra), mely enzimről ismert, hogy többek között a DM metabolizációját végzi (Banka és mtsai., 1997), ami fokozott szabadgyök képződéssel jár (Sies, 1985; Rein és mtsai., 1992; Lemaire és Livingstone, 1993; de Zwart és mtsai., 1999). Ezzel összhangban a LP és a GSH szintjének változása (19a,e és 33a,e ábra) prooxidáns hatást jelezte, ami aktiválta az antioxidáns enzimeket (19b-d,f és 33b-d,f ábra). A fentiekén kívül megállapítható, hogy az EA+DM kombinált kezelés az egyedül adagolt DM-hez képest valamivel kisebb mértékben aktiválta az ECOD-ot (32. ábra), viszont a többi kezeléshez képest a legmagasabb LP és össz-SOD aktivitásokat eredményezte 24 óra expozíciós idő után.

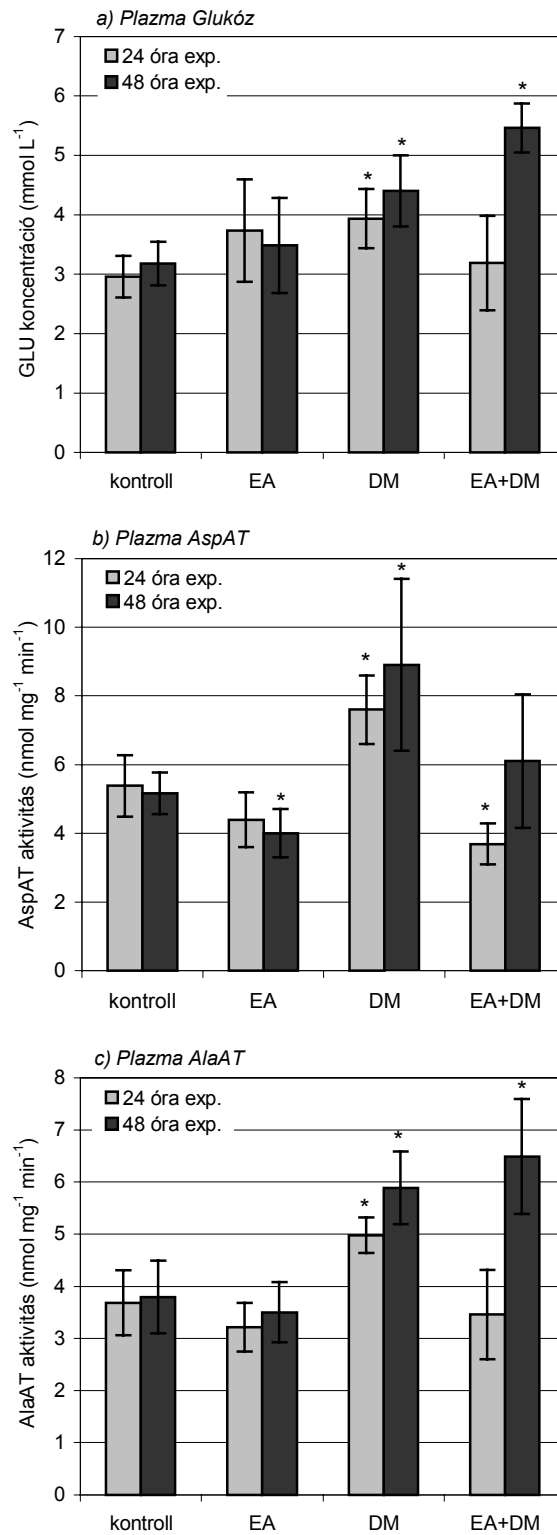


**32. ábra.** Az *in vivo* ellagsav és/vagy deltamethrin kezelés hatása ponty a) ECOD és b) EROD izoenzim aktivitására. A kísérleti körülmények leírása az Anyagok és módszerek fejezetben található. A \* szimbólum a kontroll értékétől való szignifikáns eltérést jelzi.

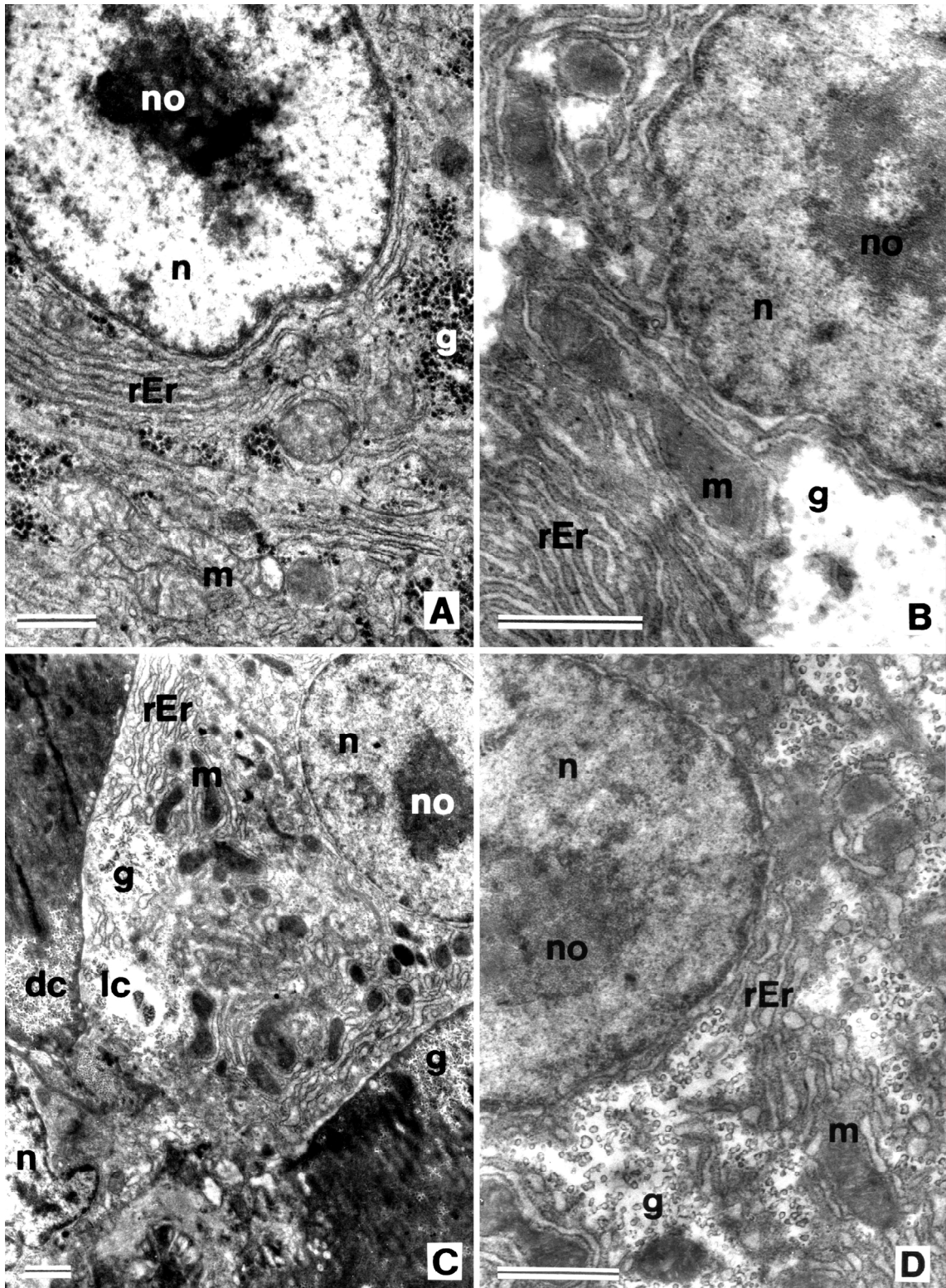




**33. ábra.** Az *in vivo* ellagsav és/vagy deltamethrin kezelés hatása ponty antioxidáns védekezőrendszerére. A kísérleti körülmények leírása az Anyagok és módszerek fejezetben található. A \* szimbólum a kontroll értékétől való szignifikáns eltérést jelzi.



**34. ábra.** Az *in vivo* ellagsav és/vagy deltamethrin kezelés hatása ponty a) vércukor szintjére és b,c) plazma aminoszferáz aktivitásaira. A kísérleti körülmények leírása az Anyagok és módszerek fejezetben található. A \* szimbólum a kontroll értékétől való szignifikáns eltérést jelzi.



35. *ábra.* Ponty májsejtek elektronmikroszkópos felvételei 48 órával az ellagsav és/vagy deltamethrin kezelés után. (A) kontroll hepatocita, (B) ellagsavval, (C) deltamethrinnel, (D) ellagsavval és deltamethrinnel kezelt halakból származó hepatociták átnézeti képe. Rövidítések: n, nukleusz; no, nukleolusz; m, mitokondrium; rEr, durvafelszínű endoplazmatikus retikulum; g, glikogén; dc, "sötét" sejt; lc, "világos" sejt. A képeken feltüntetett szakasz 1  $\mu\text{m}$ -nek felel meg.

Az EA/DM kezelésnél a biológiai hatás expozíciós időfüggő kifejlődése a leginkább a LP, és a SOD enzimek esetén figyelhető meg (33a,c-d ábra). Ennek megfelelően, a kombinált kezelésnél az EA általi enzimgátlásra utaló jelek a májparaméterek közül csak a SOD enzimeknél mutathatók ki (33c-d ábra).

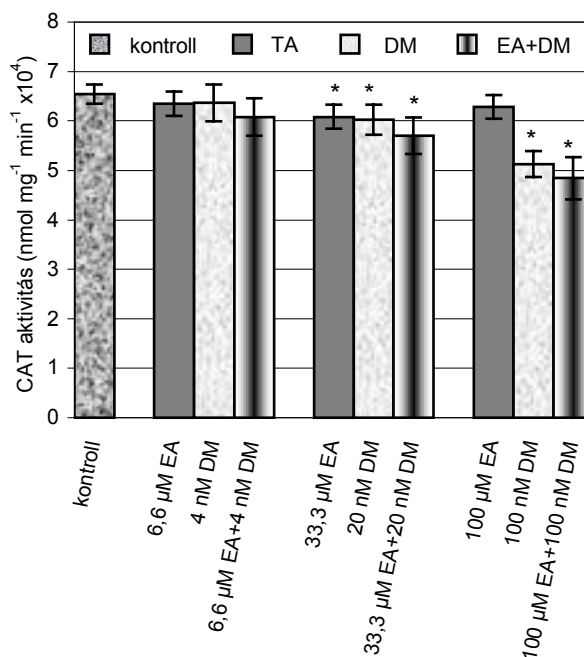
Összhangban az előző kísérletek eredményeivel, a vérparaméterek értékeinek változása megerősítette, hogy az EA enyhe stresszorként (Wedemeyer, 1970; Bálint és mtsai., 1997) és enzim gátlószerként viselkedett, a DM pedig kifejezettebb kémiai stresszt, és emellett jelentős szövethárosodást (Bell, 1968; Bálint és mtsai., 1997) okozott (34. ábra). Az EA+DM kombináció az egyedi hatásokhoz képest a vérparaméterek időbeli alakulását sajátos módon befolyásolta: azok ugyanis 24 óra expozíció után vagy nem változtak, vagy csökkentek a kontrollhoz képest, azonban újabb 24 óra elmúltával a GLU koncentrációja és az AlaAT aktivitása az előző napi értékekhez képest lényegesen megemelkedett (34. ábra).

A 35. ábrán a kontroll és a kezelt halak májából származó szövetszövetminták metszeteinek nagy felbontású elektronmikroszkópos képe látható. A jobb összehasonlíthatóság érdekében tekintsük át újra a kezelések ultrastrukturális eredményét. EA hatására a glikogén szinte teljesen eltűnt a sejtekből. A kontrollhoz viszonyítva megduzzadt a rEr lumen és a perinukleáris ciszterna. Az EA megnövelte a mitokondriumok és az eukromatin elektrondenzitását, ugyanakkor a heterokromatinét csökkentette (35b ábra). A DM-nel kezelt halak májának glikogén vesztesége csak némileg volt nagyobb mértékű ahhoz képest, mint amit korábban a TA kezelésnél kaptunk (35c vs. 28b ábra), ugyanakkor szembetűnő volt a piretroid kiváltotta ún. "sötét" és "világos" sejtek megjelenése (Bálint és mtsai., 1995). A rEr és a perinukleáris ciszterna a DM hatására nagymértékben megduzzadtak, az organellum lamelláris, hálózatos szerkezete, s az extrém elektrondenz mátrixú mitokondriumokkal való szoros kontaktusa azonban – ellentétben a CuSO<sub>4</sub>-hatásával – megmaradt (35c vs. 21c ábra). A DM hatására a sejtmag tojásformájúra duzzadt, megfigyelhető volt az eukromatin elektrondenzitásának növekedése és a marginális heterokromatin veszteség (35c ábra). Az önállóan és az EA-val együtt adott DM jelentős glikogén fogyást okozott. A sejtek kisebb mértékű elváltozása alapján megállapítható, hogy az EA csökkentette a vele együtt adagolt piretroid sejtkárosító kapacitását: bár a rEr intaktsága az önálló DM kezelés után kapotthoz volt hasonló, a kombinált kezelés után a sejtmag kisebb mértékben duzzadt meg, s kisebb volt a marginális heterokromatin veszteség, mint ahogyan a

mitokondriumok elektrondenzitása is kisebb mértékben növekedett. Általánosságban megállapítható, hogy a májsejtek habitusa az EA+DM kezelés után az EA-kezelés eredményéhez volt a leginkább hasonlatos. Az ellagsav DM toxicitását csökkentő hatására utal az is, hogy az EA+DM kombinált kezelés esetében nem volt megfigyelhető "sötét" és "világos" sejtek megjelenése (35c,d ábra).

#### 4.5.2. Az ellagsav és a deltamethrin *in vitro* hatásai

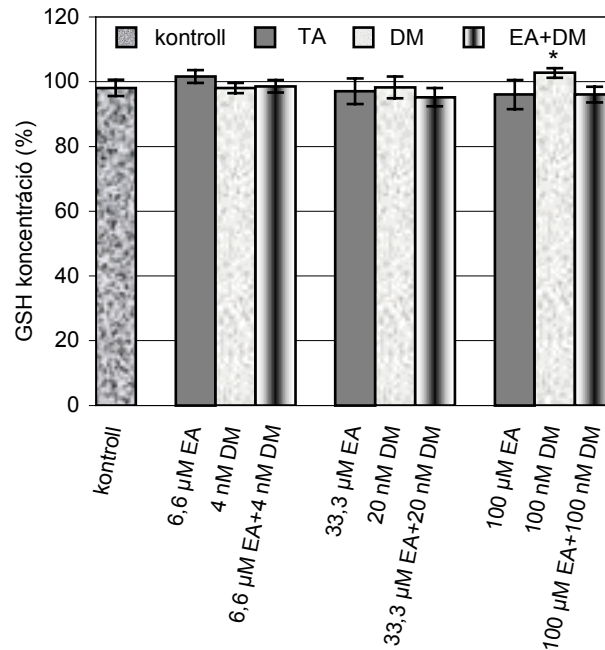
Az EA és a DM koncentrációfüggő CAT aktivitást gátló hatását a 36. ábrán mutatjuk be. Az előzőekben említettük, hogy míg a "kémiai" reakcióelegyben a DM nem fejtett ki peroxid-bontó aktivitást *in vitro*, addig az 1-100  $\mu\text{M}$  koncentrációjú EA a kontroll reakcióelegy  $\text{H}_2\text{O}_2$ -bontó aktivitása kb. 5-16%-ának kifejtésére képes (22. ábra), ez azonban néhány százalékkal csökken, ha DM is jelen van az elegyben.



**36. ábra.** Az ellagsav és/vagy deltamethrin *in vitro* koncentrációfüggő kataláz aktivitást gátló hatása 10 perc inkubáció után. A kísérleti körülmények leírása az Anyagok és módszerek fejezetben található. A \* szimbólum a kontroll értékétől való szignifikáns eltérést jelzi.

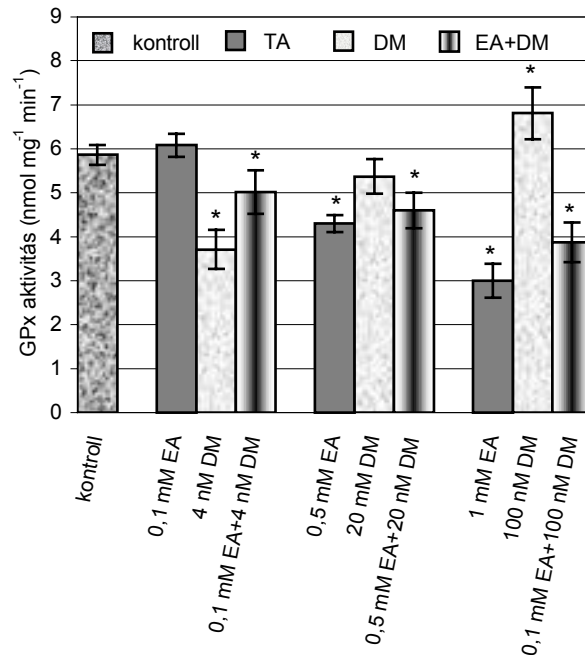
A 37. ábra az EA és/vagy DM *in vitro* GSH koncentrációra kifejtett hatását mutatja be felülűszót tartalmazó rendszerben. Látható, hogy a vizsgált koncentráció-tartományban csak a 100 nM DM változtatta meg (a rézsulfát hatásához képest elhanyagolható mértékben) a reakcióelegy látszólagos GSH koncentrációját. Az EA enzim aktivitást gátló hatását a GPx tekintetében a TA-hoz viszonyítva jelentősen magasabb, de szűkebb koncentráció-tartományban fejtette ki, melyet a DM hozzáadása koncentrációfüggően

pozitív vagy negatív irányba módosított. A DM önálló hatása az EA-éhoz képest fordított tendenciát mutatott (38. ábra).



**37. ábra.** Az ellagsav és/vagy deltamethrin *in vitro* koncentrációfüggő hatása a redukált glutation koncentrációjára felülűszöt tartalmazó rendszerben.

Megjegyzés: az ábrán a 30 perc inkubáció után mért értékeket tüntettük fel a (0 perces) belső kontrollok értéke százalékában, melyet 100%-nak tekintettünk. A kísérleti körülmények leírása az Anyagok és módszerek fejezetben található. A \* szimbólum a kontrolltól való szignifikáns eltérést jelzi.



**38. ábra.** A tanninsav és/vagy deltamethrin *in vitro* koncentrációfüggő hatása glutation-peroxidáz aktivitására 10 perc inkubáció után. A kísérleti körülmények leírása az Anyagok és módszerek fejezetben található. A \* szimbólum a kontrolltól való szignifikáns eltérést jelez.

## 5. EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE

### 5.1. A fenolikumok molekulaszervezete és enzim aktivitás gátló hatása közötti összefüggések

Az vizsgált fenolikumok molekulaszervezetét és katalázra mért gátló hatásukat összevetve a következő összefüggéseket találtuk:

- a) Amennyiben a gátlószer csak hidroxil- vagy karboxil-csoportot tartalmaz (referencia vegyületek: fenol, benzoésav, fahéjsav), akkor az aktivitás gátló hatás jóval kisebb mértékű, mintha a molekula hordozná mindkét fajta funkciós csoportot.
- b) A gátló hatás erősségének kialakítása szempontjából az egyszerűbb szerkezetű fenol-karbonsavaknál a karboxil-csoport jelenléte a döntő. A hidroxil-csoportok száma kevésbé meghatározó, vagyis újabb ligandumok bevitele csak kis mértékben változtatja meg az  $IC_{50}$  értékét (Varanka és mtsai., 1999).
- c) Az aromás gyűrűhöz kapcsolódó szubsztituensek egymáshoz viszonyított térbeli helyzete (*meta*-, *orto*-, *para*-konfigurációja) jelentősen befolyásolja a gátló hatás mértékét, nagyobb mértékben, mint a ligandumok száma.
- d) A hidroxil-benzoésavaknál a hidroxil-csoport *para*-helyzete az egyéb konfigurációkhoz képest alacsonyabb  $IC_{50}$  értéket eredményez, a hidroxil-fenil-propénsavaknál azonban fordított a hatás.
- e) A *para*-helyzetben szubsztituált hidroxil-benzoésavaknál a *meta*-helyzetbe bevitt metoxil-csoport tovább növeli a gátló hatás mértékét, míg a hidroxil-fenil-propénsavaknál az összefüggés itt is fordított (Varanka és mtsai., 1999).
- f) Wetzsel eredményeivel (1993) megegyezően, az azonosan szubsztituált hidroxil-benzoésavak és hidroxil-fenil-propénsavak közül (a *p*-kumársav kivételével) az utóbbiakat találtuk erősebb gátlószereknek.
- g) A CAT-ra nézve igen kis  $IC_{50}$  értéke alapján előre jelezhető, hogy a TA már igen alacsony koncentrációban is erősen toxikus vegyületként viselkedhet azáltal, hogy általános enzimgátlást fejt ki (Varanka és mtsai., 1999, 2001). Az igen erős enzim aktivitás gátlás magyarázata az, hogy a nagy méretű és nagy számú hidroxil-csoportot hordozó TA molekulák egyidejűleg több enzim molekulával is kapcsolódhatnak stabil precipitátumot hozva létre (Wetzsel, 1993). Ennek

következtében azonos mennyiségű enzim inaktiválásához jóval kevesebb tannin molekula elég, mint pl. ferulasav vagy fahéjsav.

- h) A gátló hatás időfüggésének eredményeiből megállapítottuk, hogy a kis molekulájú fenolszármazékok hozzávetőlegesen 30 perc alatt kifejtik az adott koncentrációra jellemző maximális gátló hatásukat. Ezzel szemben a nagy méretű és molekulatömegű TA ( $M_t = 1700,2$ ) esetében az előzőekhez képest kétszeres expozíciós időre van szükség, viszont a gátlás mértéke jóval nagyobb. Ezt az eltérő viselkedést egyrészt annak tulajdoníthatjuk, hogy a kis méretű molekulák vizes közegben gyorsabban diffundálnak, másrészt sztérikus okokból könnyebben denaturálhatják a fehérje másodlagos ill. harmadlagos szerkezetét, de az aktív centrumhoz is hozzákötődhetnek. Míg az egyszerűbb fenol-karbonsavak gátló hatása a néhány hidroxil-csoportjuk által kialakított kis számú H-híd kötés miatt kevésbé kifejezett (Wetzel, 1993), a nagy molekulájú, sok hidroxil-csoporttal rendelkező gátlószerek (pl. TA) a fehérje molekula felszínének nagy részével – a H-híd kötések nagy száma miatt igen erős – aspecifikus kapcsolatba kerülhetnek (Kim és Wetzel, 1993), mely az enzim térszerkezetében jelentős változásokat indukálva nagymértékben csökkenti annak specifikus aktivitását.
- i) Wetzel következtetéseit (Wetzel, 1993; Kim és Wetzel, 1993) a fenol-karbonsavak és tanninok ökológiai regulációs szerepét illetően megerősítik adataink, mivel a koncentrációfüggés mérések eredményeiből megállapítottuk, hogy az egyes fenolszármazékok már igen kis koncentrációban (0,1-10  $\mu\text{M}$ ) is 5-20%-os CAT aktivitás gátlást okoznak (Varanka és mtsai., 1999). Ez valószínűsíti, hogy egyéb, pl. az élővizek mikrobiális membránkötött és exoenzimeire is hasonlóan hatnak, ami számottevően befolyásolva a mikrobiális biomassza termelését, meghatározza a vízi ökoszisztéma anyagforgalmának dinamikáját.

## 5.2. A fenolikumok önálló hatása halakon

### 5.2.1. A tanninsav biológiai hatása

Annak ellenére, hogy a növényi eredetű fenolikumokat általában szabadgyök-fogó, így antioxidáns vegyületeknek tartják (pl. Gali és mtsai., 1992; Frankel és mtsai., 1993), a nem-enzimatis redox-paraméterek (12a,e; 26a,e ábra) értékeinek változása azt



bizonyítja, hogy a TA hatására a halakban oxidatív stressz indukálódott. Ez utóbbi megfigyelés egyezik más tanulmányok eredményeivel, melyek szintén feltárták a fenolikumok bizonyos körülmények közötti prooxidáns viselkedését (Decker, 1997; Sakagami és mtsai., 1999; Khan és mtsai., 2000).

Kísérleteinkben kimutattuk, hogy a TA kettős, vagyis pro- és antioxidáns aktivitását párhuzamosan fejt ki mind *in vitro*, mind *in vivo* (Varanka és mtsai., 2001). Az *in vitro* kísérletek eredményei szerint a tanninsav  $IC_{50}$  értéke a P450 1A (Baer-Dubowska és mtsai., 1998), CAT (5. táblázat, 15. és 29. ábra) és GPx (17. és 31. ábra) enzimek esetében a néhány  $\mu$ M-os nagyságrendbe esik, vagyis a TA a halakban már relatíve alacsony koncentrációban is általános enzim aktivitás gátlást tud okozni. Ennek megfelelően *in vivo* eredményeink szerint a halakban csökkent a szabadgyök termelő P450 enzimek (11. és 25. ábra), de az oxil-gyököket közömbösítő antioxidáns enzimek aktivitása (12b-d,f és 26b-d,f ábra) is. A GSH és a LP értékének figyelembe vételével megállapítható, hogy a TA a pontyokban az antioxidáns enzimek aktivitását gátolva, közvetett módon prooxidáns hatást váltott ki. Ezenkívül *in vitro* kimutattuk, hogy a TA bizonyos koncentrációban csekély  $H_2O_2$ -bontó (vagyis látszólagos CAT) aktivitással rendelkezik (15b ábra) (Varanka és mtsai., 2001). Kimutattuk továbbá, hogy a TA kölcsönhatásba lép a GSH-val, ill. annak DTNB-vel alkotott komplexével oly módon, hogy tisztán "kémiai" körülmények között növeli a GSH látszólagos koncentrációját valószínűleg azért, hogy megnöveli a GSH és a DTNB között kialakult komplex abszorbanciáját (412 nm-nél). Máj homogenizátum felülúszó jelenlétében ("biológiai" rendszer) azonban a TA gyenge GPx-szerű aktivitást mutat azért, hogy csökkenti a redukált GSH koncentrációját (30. ábra). Ez a viselkedés valószínűleg közvetlen oxidatív hatás következménye (pl. GSH-oxidáló TA-fém komplex jön létre) (Varanka és mtsai., 2001). Laughton és mtsai. (1989) ill. Metodiewa és mtsai. (1999) kimutatták, hogy a kvercetin (növényi polifenol) biotranszformációja során a laktoperoxidáz, a NADPH citokrom P450 reduktáz és a NAD(P)H-kinon oxidoreduktáz aktiválja a fenolikumot. Ennek következtében prooxidáns intermedierek/végtermékek képződnek, s az így kialakult oxidatív stressz jól mérhető. Feltételezhetően a TA esetében is lejátszódhatnak a fent említett ROI-produkcióval járó metabolikus reakciók, mint ahogyan számolni kell a fenolikumok pro/antioxidáns viselkedésének koncentráció- és pH-függésével is (Decker, 1997; Sakagami és mtsai., 1999). A P450 1A izoenzimek nem metabolizálták a TA-t. Az irodalmi adatok alapján valószínűsíthető, hogy igen

alacsony TA dózis savas pH-n való alkalmazásakor a fenolikum szabadgyök fogó/antioxidáns aktivitása (Gali és mtsai., 1992; Decker, 1997; Sakagami és mtsai., 1999) kerül előtérbe az enzim aktivitás gátló ill. szövetkárosító kapacitásával szemben (Horváth, 1981; Murakami és mtsai., 1992; Reed, 1995).

A tanninok táplálkozás élettani toxicitása már régóta ismeretes: magas dózisban *haemorrhagicus gastroenteritist* (Reed, 1995) valamint vese- és májnekrozist okoznak (Horváth, 1981; Holliman, 1985), ami többek között a fent ismertetett összetett hatásmechanizmus következményének tulajdonítható. Mint korábban említettük, az antioxidáns enzimek aktivitásának csökkenése és a nem-enzimatis redox-paraméterek változásai (12. és 26. ábra) azt mutatták, hogy a halak szervezetébe került TA oxidatív stresszt okozott. Az oxidatív stressz gyakran szövetkárosodással jár együtt, amit 24 óra expozíciós idő után jelzett az aminoszferáz aktivitások megemelkedése a vérben (13b-c és 27b-c ábra) (Bell, 1968; Horváth, 1981). A májszövet kis mértékű (visszafordítható) károsodását az elektronmikroszkópos felvételek is alátámasztották (Varanka és mtsai., 2001). A sejtek ultrastrukturális elváltozásai (14b és 28b ábra) a nukleinsav és a fehérje metabolizmus zavarát mutatják (Benedeczky és mtsai., 1986). A hepatociták glikogén tartalmának csökkenése azt jelzi, hogy felgyorsult a halakban a glukóz katabolizmus (14b és 28b ábra), a vércukorszint egyénenként nagy variabilitást mutató értéke (13a és 27a ábra) pedig változó stresszhatásra utal.

Tudomásunk szerint nem áll rendelkezésre olyan analitikai módszer, amely alkalmas a TA koncentrációjának vérből vagy szövet-homogenizátumból való pontos meghatározására, így a szövetek ill. a vér TA koncentrációját nem ismerjük. Azonban, figyelembe véve az elektronmikroszkópia eredményeit, a transzaminázok aktivitásának csökkenése 48 órával a kezelés után egyértelműen a hosszabb expozíciós időből következő nagyobb mértékű felszívódás következménye, vagyis a véráramba került magasabb TA koncentráció enzim aktivitás gátló aktivitása fejeződött ki ilyenformán.

### **5.2.2. Az ellagsav biológiai hatása**

A tanninsavval szemben az ellagsavat veszélytelen növényi antioxidánsként tartják számon a nemzetközi szakirodalomban (Wood és mtsai., 1982; Dixit és mtsai., 1985; Barch és Rundhaugen, 1994; Barch és mtsai., 1995), így előrehaladott kísérletek folynak a farmakológiai felhasználását illetően (Das, és mtsai., 1985; Takagi és mtsai., 1995).

Az EA-val végzett *in vitro* kísérletek a TA-hoz képest számottevően gyengébb enzimgátló kapacitást, vagyis jóval magasabb IC<sub>50</sub> értékeket állapítottak meg (EROD: ~100 µM (Ahn és mtsai., 1996), CAT: ~500 µM (5. táblázat, 22. és 36. ábra), GPx: ~1 mM (24. és 38. ábra)). Ezzel összhangban az EA kezelés után enzimgátlást az az antioxidáns enzimek közül csak egy enzim (a GPx) esetében tapasztaltunk, a CAT és a SOD aktivitások ugyanakkor megemelkedtek (19. és 33. ábra), s ezáltal a halak antioxidáns védekezőrendszerének összkapacitása nőtt meg. A két szabadgyök termelő izoenzim, az ECOD és az EROD aktivitásai a TA kezelés eredményéhez képest erőteljesebben gátlódtak az EA injekció után (18. és 32. ábra) (Yang és mtsai., 1985). Az ECOD és az EROD nem metabolizálta az EA-t. Majid és mtsai. (1991) patkányokon végzett kísérleteinek eredményéhez hasonlóan úgy találtuk, hogy a halak szervezetébe juttatott EA hatására csökkent a májban a LP szintje és megemelkedett a redukált GSH koncentrációja, következésképpen az EA antioxidánsként viselkedett. Ellentétben a TA-val, az EA esetében *in vitro* körülmények között sem tudtunk kimutatni közvetlen prooxidáns hatást (23. és 37. ábra), tehát az EA-ra nem jellemző a kettős, vagyis az egyidőben kifejeződő pro- és antioxidáns viselkedés. Meg kell azonban jegyeznünk, hogy a relatíve magas GSH szint kialakulásának nem csak az antioxidáns enzimek megemelkedett összkapacitása kedvezett, hanem figyelembe kell venni az enzimgátlás következtében lecsökkent *in vivo* GPx aktivitást is. Számos kutató vizsgálta a huzamosabb ideig napi rendszerességgel adagolt EA *in vivo* hatását több enzimrendszeren. Az eredmények alapján általánosságban megállapítható, hogy míg a számos prokarcinogént aktiválni képes xenobiotikum metabolizáló enzimek aktivitása csökken (Das, és mtsai., 1985; Ahn és mtsai., 1996), addig az antioxidáns védekezőrendszeré megemelkedik (Majid és mtsai., 1991) az EA kezelés alatt. Ezt a kettős biológiai hatást tartják felelősnek az EA antikarcinogén hatásmechanizmusáért (Ahn és mtsai., 1996).

A CAT fent említett *in vivo* aktivitás növekedésére részben magyarázatot adhat az a tény, hogy a TA gyenge *in vitro* látszólagos CAT aktivitásához képest az EA valóban számottevő H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-bontó kapacitással rendelkezik (7. és 22. ábra). Valószínű, hogy az EA hatására a metalloproteinekből (pl. SOD, CAT, stb.) eltávozó, így oldatba kerülő fém-ionok és a fenolikum kölcsönhatásából képződő komplex rendelkezik H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-bontó aktivitással (Varanka és mtsai., 1999). Ez a szignifikáns CAT-szerű aktivitás és a számos irodalmi adat a fenolikumok direkt szabadgyök-fogó aktivitása tekintetében (pl.

Wood és mtsai., 1982; Majid és mtsai., 1991; Shahidi és Wanasundara, 1992; Jovanovic és mtsai., 1995; Salah és mtsai., 1995; Decker, 1997) arra engednek következtetni, hogy az EA kezelés után detektált megemelkedett *in vivo* CAT és SOD aktivitások részben az EA direkt gyökfogó/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-bontó aktivitásának tulajdoníthatók, habár az enzimindukció lehetősége sem zárható ki. Az *in vitro* mérési adatok *in vivo* eredményekre való adaptációjánál természetesen figyelembe kell venni az alkalmazott kemikáliák különböző koncentrációját a kétféle kísérletben. Ezen kedvező hatásokon túl kimutatták, hogy az EA képes a glutation S-transzferáz Ya gén (Barch és mtsai., 1995) és a NAD(P)H-kinon reduktáz génjének indukálására (Barch és Rundhaugen, 1994). Mindkét enzimről ismert, hogy számos xenobiotikum detoxifikációját végzik, ezenkívül az utóbbi gátolja a szuperoxid-gyök szintézisét. A fentiek alapján tehát az EA esetében igen összetett biológiai hatásmechanizmussal kell számolni.

Az EA kezelés után sem a makroszkópiás megfigyelések, sem az elektronmikroszkópia (21b és 35b ábra) nem mutatott ki visszafordíthatatlan károsodást a máj anatómiájában, ill. a májsejtek finomszerkezetében. Hasonlóképpen, a transzaminázok sem jeleztek májnekrózist, illetőleg a változatlan vagy csökkent transzferáz aktivitás (20. és 34. ábra) az EA által kifejtett enzim aktivitás gátlásnak is tulajdonítható. Az EA hidrofíl jellege és molekulatömege ugyanis jelentősen kisebb a 24 óra expozíció után transzamináz aktivitás növekedést okozó tanninsavéhoz viszonyítva, így az EA könnyebben felszívódik, és gyorsabban kifejti enzimgátló hatását. A májsejtek glikogén vesztese és a rEr illetve a mitokondriumok kisebb szerkezeti változásai (21b és 35b ábra) bizonyos fokú metabolikus és energia ellátási zavart jeleztek.

### 5.3. A rézsulfát önálló hatása halakon

Mivel a CuSO<sub>4</sub>, mint környezetszennyező ágens, az egyik legtöbbet tanulmányozott vegyület, az ilyen irányú kísérleteink eredményeitől nem vártunk teljesen újszerű eredményeket, azonban ezen kísérletek elvégzése szükséges volt a fenolikumokkal, illetve a réz+fenolikum kombinációkkal való kezelések eredményeinek értékeléséhez.

A lángfotometriás mérések szerint a kontroll pontyok májának átlagos réztartalma 2 µg g<sup>-1</sup> (32 nmol g<sup>-1</sup>) volt nedves súlyra vonatkoztatva. A 10 mg Cu(II) ts kg<sup>-1</sup> dózisban adagolt fém 24 óra expozíciós idő elteltével az alapértéket hozzávetőlegesen 25-szeresére, 48 óra múltán kb. 37-szeresére emelte (7. táblázat). Úgy találtuk, hogy az

alkalmazott réz dózis az irodalmi adatoknak megfelelően (pl. Radi és Matkovic, 1988) a vizsgált biomarkerek értékeiben olyan változásokat idézett elő (12. és 19. ábra), melyek jól jelezték a szövetekben megindult fokozott ROI-képződést (Jacobson és Reimschuessel, 1998) és ezáltal az oxidatív stressz indukciót. Tovább fokozta az oxidatív stressz mértékét, hogy a réz részlegesen gátolta az antioxidáns enzimek aktivitását (12. és 19. ábra). Mivel a MDA relatíve instabil vegyületként ismert (Halliwell és Gutteridge, 1985), számolnunk kell azzal a lehetőséggel, hogy a szervezetben jelenlevő valamely agresszív ágens, mint pl. a szabad réz-ionok az MDA-dal reakcióba lépnek, s ez az interakció a TBA-pigment abszorbancia redukcióval járva csökkent TBARS koncentráció detektálásához vezet *in vivo*. A következő ismert mechanizmusok befolyásolhatják például a LP reakcióútjait és eredményezhetnek csökkent TBARS-képződést annak ellenére, hogy a LP mértéke valójában megnövekszik:

- a) a lipid-hidroperoxidok és a ciklikus-peroxidok átmenetifém-ionok általi hasítása/lebomlása (Halliwell és Gutteridge, 1985),
- b) a MDA-t metabolizáló mitokondriális aldehid-dehidrogenáz *in vivo* aktivitásának megváltozása (Halliwell és Gutteridge, 1985),
- c) a lipid-hidroperoxidokat hasító fém-ionok a MDA képződés rovására elősegítik a LP végtermékeiként ismert szénhidrogén gázok, karbonil-vegyületek és azok fluoreszcens komplexeinek képződését (Halliwell és Gutteridge, 1985).

*In vivo* kísérleteink eredményei azonban megemelkedett LP-t mutattak a rézsulfát kezelés után, illetőleg *in vitro* vizsgálataink eredményei alapján megállapítottuk, hogy az adott koncentrációban a MDA és a CuSO<sub>4</sub> között nem alakul ki a fent ismertetett artifaktum keltő interakció (Varanka és mtsai, 2001). Az *in vivo* eredményeknek és az irodalmi adatoknak megfelelően (Stien és mtsai., 1997) *in vitro* is kimutatható volt a réz erős enzim aktivitás gátló (15. és 22. ábra) és GSH-oxidáló kapacitása (16. és 23. ábra). A két aktivitás mechanizmusa közös, s alapja a réz redox-reakciói által képződő szuperoxid-gyök, illetve annak transzformációs terméke, a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> jelentős –SH csoport oxidáló működése. Ezen redox-reakciók a redukált GSH koncentrációjának csökkenését, illetve az enzimek ciszteinil szulfhidril-csoportjainak oxidálása révén enzim aktivitás csökkenést okoznak (pl. Bartkowiak és mtsai., 1981; Radi és Matkovic, 1988; Winterbourn és Metodiewa, 1999). A réz kifejezett szulfhidril-csoport oxidáló aktivitása *in vitro* körülmények között tehát egyfajta látszólagos GPx aktivitás

formájában is megmutatkozik, mely artifaktumként jelentkezik azon vizsgálatoknál, melyek a réz(II) GPx-re vonatkoztatott IC<sub>50</sub> értékének meghatározását célozzák (Varanka és mtsai, 2001). Az a megfigyelés, hogy míg az össz-SOD aktivitás 1 nap Cu(II) expozíció után nőtt, majd 2 nap után csökkent, ezzel szemben a CAT, Mn-SOD és GPx aktivitások egyértelműen csökkentek (12. és 19. ábra) arra utal, hogy a Cu/Zn-SOD – amely a ponty össz-SOD aktivitásának 85-90%-át teszi ki –, más antioxidáns enzimekhez képest kevésbé érzékeny a réz enzim inaktiváló effektusára (Varanka és mtsai, 2001). Habár immuno-reaktivitási próbákat nem végeztünk, irodalmi adatok alapján feltételezzük, hogy a Cu/Zn-SOD emelkedés majd csökkenés a következő módon magyarázható. Az *i.p.* injekciót követően hamarosan megindult a szuperoxid-gyök nagy mértékű termelődése (Jacobson és Reimschuessel, 1998), amely a SOD1 gén indukciója által (Steinkühler és mtsai., 1994) megindította a SOD enzim szintézisét (Lai, 1994). A Haber-Weiss reakció során keletkező H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> és hidroxil-gyökök a későbbiekben inaktiválták a SOD-ot (Bray és mtsai., 1974; Bartkowiak és mtsai., 1981). Vagyis, annak ellenére, hogy a rézzel kezelt halakban a SOD a fokozott bioszintézis következtében nagyobb mennyiségben volt jelen mint a kontrollokban, az oxil-gyökök okozta részleges enzim dezaktiválódás mégis alacsonyabb SOD aktivitás detektálásához vezetett (Bray és mtsai., 1974). *In vitro* vizsgálataink feltárták a CuSO<sub>4</sub> SOD mérésekre nézve zavaró hatását, amennyiben az 1,2-125,4 µM koncentrációban van jelen. *In vivo* SOD méréseink eredményei azonban feltételezésünk szerint ezen típusú artifaktumtól mentesek a reakcióelegy igen alacsony réz tartalma miatt (~3-160 nM) (Varanka és mtsai, 2001).

Handy és mtsai. (2000) kimutatták, hogy az orálisan adagolt CuCl<sub>2</sub> erőteljes nyálka képződést vált ki az emésztő szervrendszer lumenében, ami azáltal, hogy a Cu(II)-t komplexálja redukálja annak toxicitását (Smith, 1995). Érdekes, hogy a kültakaróval közvetlenül nem érintkező, *i.p.* adagolt CuSO<sub>4</sub> olyan mértékű erőteljes nyálka képződést váltott ki a halak kültakaróján, ami amellet, hogy szemmel jól látható volt, habképződéshez vezetett az akvárium víz tetején. Ismeretes, hogy a táplálékkal a szervezetbe kerülő réz relatíve gyorsan a májban, ill. az epében halmozódik fel, s az így szervezetbe jutott Cu egyik fő kiürülési útja az epekiválasztáson keresztül történik (Kamunde és mtsai., 2001). A halak boncolása során talált erősen megduzzadt vagy éppen teljesen kiürült epehólyag azt bizonyítja, hogy a fenti exkréciós mechanizmus az *i.p.* adagolt CuSO<sub>4</sub> esetében is azonos módon működik.

A makroszkópiás megfigyelések, az elektronmikroszkópos felvételek (14b és 21b ábra) és a plazma transzaminázok aktivitásának megemelkedése (13b-c és 20b-c ábra) egyértelműen jelezték a réz által kiváltott súlyos májnekrózist (Bell, 1968; Rojik és mtsai., 1983, Varanka és mtsai, 2001). A sejtmag és a mitokondriumok kapcsolatának megszakadása a rEr-mal, valamint a rEr és a sejtmag előrehaladott szerkezeti károsodása egyértelmű indikátora a nukleinsav és fehérje metabolizmus súlyos zavarának (Lapis és Benedeczky, 1966; Benedeczky és mtsai., 1986). A rézszulfát toxikus hatásának egyik jól látható eredménye a májsejtek teljes glikogén vesztese, ami a vércukorszint jelentős megemelkedésével együtt a halak erőteljes stressz állapotát mutatja (Rojik és mtsai., 1983; Bálint és mtsai., 1997; Varanka és mtsai, 2001). Ezen előrehaladott májszövet nekrosis minden bizonnyal letális következménnyel jár, amennyiben hosszabb megfigyelési időt alkalmazunk.

#### **5.4. A fenolikum–rézszulfát kombináció hatása halakon**

##### **5.4.1. A tanninsav és a rézszulfát kombinációjának biológiai hatása**

A szakirodalomban újabban egyre több olyan tanulmány lelhető fel, amely fenolikum–nehézfém komplexek képződésével, *in vitro* tulajdonságaival, biológiai aktivitásával foglalkozik (pl. Vinson és mtsai., 1995; Stien és mtsai., 1997; Kim és mtsai., 1999; Lopes és mtsai., 1999), ám az antioxidáns védekezőrendszerre gyakorolt hatásuk csak kevésbé ismert.

Vizsgálataink alapján úgy találtuk, hogy a biokémiai válaszreakció a TA+CuSO<sub>4</sub> kombinációra halakban a redox-paraméterek tekintetében nagyban egyezik az önállóan adott TA vagy CuSO<sub>4</sub> által kiváltottal (12. ábra). A hasonlóságok mellett a következő különbségek fedezhetők fel:

- a) a TA hatásához képest a TA+Cu(II) kombináció erőteljesebb prooxidáns befolyást fejtett ki a nem-enzimikus redox-paraméterekre (12a,e ábra),
- b) az egyedül adott Cu(II) által okozott össz-SOD aktiváció majd gátlás a kombinált kezelés esetén nem figyelhető meg, ugyanis a TA és a Cu(II) ellentétes irányú hatása közömbösítette egymást, így a SOD aktivitás a kontroll értékén maradt (12c ábra).

A két vegyület egymás mellett kifejeződő expozíciós időfüggő biológiai hatása jól kifejeződik a MDA és GSH koncentráció változásokon (12a,e ábra). Érdekes, hogy

amíg a CAT-t és a GPx-et a TA hasonló mértékben gátolta *in vivo* körülmények között (12b,f ábra), addig a CAT azonos koncentrációjú TA hatására erősebben gátlódott *in vitro* (15. és 17. ábra). Az *in vitro* kísérletek ugyanakkor fény derítették a réz+tanninsav kombináció jelentős látszólagos CAT aktivitására (15b ábra), ami a szövetekben további fém+TA kombinációk potenciális CAT aktivitásával együtt képes lehet részben kompenzálni az enzimgátlás miatt csökkent (részlegesen gátolt) *in vivo* CAT aktivitást (Varanka és mtsai, 2001). A TA+CuSO<sub>4</sub> kombináció enzimgátló képessége több tényező együttes eredményének tulajdonítható:

- a) a szabad réz-ionok redox-reakcióiból származó szabadgyökök hatásának,
- b) az enzim és a TA molekulák között kialakuló H-híd kötéseknek, melyek számos kinetikai tanulmány szerint jelentősen gátolhatják az enzim aktivitásokat (pl. Murakami és mtsai., 1992; Varanka és mtsai, 1999, 2002).
- c) Laughton és mtsai. (1989) ill. Metodiewa és mtsai. (1999) több fenolikum esetében kimutatták, hogy azok metabolikus aktivációja során enzim dezaktiváló sajátságú szabadgyökök képződnek (Bray és mtsai., 1974), s ezzel a mechanizmussal valószínűleg a TA esetében is számolni kell.

Amellett, hogy számos fenolikum-fém komplex prooxidáns hatása jól ismert (Li és Trush, 1994; Khan és mtsai., 2000), némelyek tehát bizonyos antioxidáns aktivitással is rendelkezhetnek (Vinson és mtsai., 1995; Lopes és mtsai., 1999; Varanka és mtsai, 2001). Mint láttuk, mindkét fenti megállapításra példa a réz+tanninsav kettős aktivitása: prooxidáns a GSH-ra nézve (12e és 16. ábra), ugyanakkor antioxidáns jellegű a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-bontó aktivitása (12b és 15b ábra). A TA+CuSO<sub>4</sub> kombináció kettős – a CAT aktivitást gátló ill. stimuláló, valamint a pro- ill. antioxidáns – hatása a TA és a CuSO<sub>4</sub> koncentráció, továbbá az expozíciós idő függvénye. Az *in vitro* eredmények *in vivo* körülményekre történő extrapolációjánál természetesen figyelembe kell venni az *in vivo* és *in vitro* eltérő effektor koncentrációkat.

A TA jelenlétének antioxidáns hatását jelzi az a tény is, hogy a kombinált kezeléseknél nemcsak a megfigyelhető makroszkopikus elváltozások, hanem a máj ultrastrukturális károsodása is kisebb mértékű volt annál, mint amit az önállóan adagolt CuSO<sub>4</sub> váltott ki (14. ábra). Irodalmi adatok alapján feltételezhető, hogy a TA azáltal képes csökkenteni a réz sejtmagra kifejtett degradáló hatását, hogy:



- a) komplexálja a DNS-t (Vance és Teel, 1989, Khan és mtsai., 2000),
- b) a Fe(II) ionokat (Lopes és mtsai., 1999),
- c) Fe(II)-vé redukálja a Fe(III) ionokat, gátolva ezzel a gyöktermelő Fenton-reakciókat (Lopes és mtsai., 1999), továbbá
- d) hatékony szingulett oxigén és hidroxil-gyökfogóként működik (Lopes és mtsai., 1999; Khan és mtsai., 2000).

Érdekes, hogy a TA ezen DNS-védő kapacitása mellett többen kimutatták, hogy a TA (és más fenolikumok is) réz jelenlétében fokozott DNS-hasító kapacitással is rendelkezik (Li és Trush, 1994; Khan és Hadi, 1998; Khan és mtsai., 2000).

A kombinált kezelés után mért egyedenkénti igen változó (100-320%) vércukor szint azt jelzi (13a ábra), hogy a vizsgált ágensek még az azonos korcsoportú, azonos körülmények között tartott és hasonló fizikai kondícióban levő halakban is igen eltérő mértékű metabolikus zavart tudnak okozni. A két vegyület egymás mellett kifejeződő expozíciós időfüggő biológiai hatása jól kézzelfogható az AspAT és AlaAT aktivitások időbeli változásában (13b-c ábra): 24 óra utáni emelkedés a Cu(II) okozta szövetkárosodás (14. ábra), a 48 óra utáni aktivitás veszteség pedig a vérbe került aminoszferáz aktivitások TA általi enzimgátlásának tulajdonítható (Varanka és mtsai, 2001).

Összefoglalva, az elektronmikroszkópia feltárta a TA bizonyos mértékű sejtvédő, réz-toxicitást csökkentő hatását (14. ábra), bár a TA és a TA+fém kombináció is képes toxikumként viselkedni a halakban azáltal, hogy oxidatív stresszt indukál és gátolja az antioxidáns enzim aktivitásokat (12. ábra). Fontos megjegyeznünk, hogy erős enzim gátlószerek *in vivo* alkalmazása esetén az aminoszferázok szövetkárosodás-indikátorként való alkalmazásának megbízhatósága megkérdőjelezendő (Varanka és mtsai, 2001).

#### **5.4.2. Az ellagsav és a rézsulfát kombinációjának biológiai hatása**

Az EA+Cu(II) vegyület kombináció hatása nagyban hasonlít a TA+Cu(II)-éhez, mivel ez esetben is oxidatív stressz fejlődött ki a kísérleti állatok szervezetében.

Hasonlóképpen a TA+CuSO<sub>4</sub> kombinációhoz, az EA+CuSO<sub>4</sub> keverék egyfajta antioxidáns aktivitással rendelkezik azáltal, hogy koncentrációfüggő H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-bontó aktivitást képes kifejteni (22b ábra). Azonban, az EA+CuSO<sub>4</sub> kezelés után mérhető kontrollhoz képest alacsony *in vivo* CAT aktivitás alapján megállapítható, hogy a fenolikum+réz kombináció peroxid-bontó (látszólagos CAT) aktivitása nem képes ellensúlyozni a keverék halakban okozott CAT aktivitás gátlást (22b vs. 19b ábra). Lehetséges, hogy az ellagsav+réz komplex a CAT erősebb inhibitora mint az EA vagy a CuSO<sub>4</sub> önállóan, valószínűbb viszont, hogy az együtt adott kemikáliák külön-külön kifejttet enzimgátló hatása a CAT aktivitására nézve egyszerűen összeadódik. *In vivo* kísérleteink eredményei alapján azt találtuk, hogy a Mn-SOD a TA és az EA jelenlétében is jóval érzékenyebb a CuSO<sub>4</sub> inaktiváló hatására, mint az össz-SOD (12c-d és 19c-d ábra). A kétfajta kombinált kezelés SOD aktivitásokra kifejttet hatása annyiban eltérő, hogy míg az ellagsav+réz kezelés 1 nap után a SOD enzimek aktivációját váltotta ki, addig a tannin+réz injekció után SOD aktivációt nem, hanem a kontrollal megegyező aktivitást, vagy pedig gátlást mértünk (12c-d és 19c-d ábra). Ez a különbség részben annak a következménye, hogy:

- a) az EA az *in vitro* eredmények szerint lényegesen gyengébb enzim gátlószer, mint a TA, s ez a rézzel kombinált kezeléseknél is megnyilvánul (15, 17, 22, 24. ábra),
- b) továbbá, valószínű, hogy az EA fémkomplexáló sajátága csökkentette a réz "látszólagos" koncentrációját, azaz biológiai elérhetőségét a szövetekben, miáltal az alacsonyabb biológiai elérhetőségű szabad réz indukálta, de nem hatott jelentős gátlóerővel a SOD aktivitásokra 24 óra expozíció után (12c-d vs. 19c-d ábra).
- c) végül lehetséges, hogy az EA kezelés után mért (a fenolikum számottevő szuperoxid-gyökfogó aktivitásának tulajdonított) látszólagos SOD aktivitás emelkedés jelentkezik a fémmel kombinált kezelések eredményeinél is (19c-d ábra).

*In vitro* kísérleteink az EA+CuSO<sub>4</sub> kombináció CAT aktivitást gátló tulajdonsága (22a ábra) mellett kimutatták, hogy a CuSO<sub>4</sub> EA jelenlétében is jelentős szulfhidril-csoport (illetve GSH) oxidáló (Bartkowiak és mtsai., 1981; Winterbourn és Metodiewa, 1999), kapacitással rendelkezik (23. ábra). Ezen tulajdonsága következtében nem lehetséges az EA+Cu(II) *in vitro* GPx aktivitásra kifejttet gátló hatásának megállapítása.

A redox-paraméterekben megfigyelt szoros expozíciós időfüggés a vérparaméterek esetében is megfigyelhető (20. ábra). Az elektronmikroszkópos felvételeken jól látható,

hogy a TA-hoz hasonlóan az EA is csökkenti a réz sejtmagra gyakorolt degradáló hatását, ami az irodalmi adatok tükrében a DNS-sel alkotott komplex képződésének tulajdonítható (Wood és mtsai., 1982). A Cu(II) és az EA+Cu(II) kezelés utáni felvételeket összehasonlítva elképzelhető, hogy az előbbivel szemben a kombinált kezelést a pontyok kisebb mértékű szubcelluláris károsodásokkal túlélhetik (21c-d ábra). A fentieket figyelembe véve, a kontroll ill. CuSO<sub>4</sub> kezelés utáni állapothoz képest a kombinált injekciót követő csökkent aminoszferáz aktivitások (20b-c ábra) az EA és a CuSO<sub>4</sub> additív enzimgátló hatásának, illetőleg az EA réz toxicitását csökkentő aktivitásának tulajdonítható. Ez megerősíti az aminoszferázok szövetkárosodás indikátorként való használatának korábban említett korlátozottságát. Az a megfigyelés, hogy 24 órás expozíciós idő után az indukálódó stressz bioindikátoraként a vércukor szintje számottevően megnőtt (de Boeck, 1998), azonban 48 óra múltán jelentősen lecsökkent (20a ábra), s emellett a májsejtekben teljes glikogén fogyás volt megfigyelhető (21d ábra) jelezve, hogy a két vegyület detoxifikációjához és kiürítéséhez szükséges megnövekedett metabolikus aktivitás a halak energiatartalékainak nagy hányadát felélte.

Amellett, hogy a humuszvegyületek komplexet alakíthatnak ki a nehézfém-ionokkal (Vinson és mtsai., 1995; Kim és mtsai., 1999; Stuijzand és mtsai., 1999), a humusz+fém kombinációk komponensei egymás mellett párhuzamosan kifejeződő rendkívül összetett válaszreakciókat válthatnak ki az élőlények szervezetében. A fenti vegyület kombinációk bizonyos hányada a pH ill. a komponensek összetétele és koncentrációja függvényében pro- vagy antioxidánsként, sejtvédő vagy nekrotizáló ágensként viselkedhet (Decker, 1997) a halak és más vízi élőlényekben, módosítva ezzel a szervezetükbe bekerült környezetszennyező ágens toxicitását.

### **5.5. A deltamethrin önálló hatása halakon**

A DM-t azért tartják az egyik legbiztonságosabb piretroidnak, mert rendkívül gyors metabolizációja miatt bioakkumulációja nem jelentős (WHO, 1990). Ennek tulajdonítható, hogy a hasüregbe injektált igen kis mennyiségű DM 24 óra után már nem volt kimutatható a májban még az igen érzékeny GC-MS módszerrel sem.

Többen rámutattak az igen jól indukálható citokrom P450-függő monooxigenázok esszenciális szerepére a piretroidok metabolizmusában (Deér és mtsai., 1996; Banka és

mtsai., 1997). A DM biotranszformációjáért például a CYP 1A izoenzimek közül az ECOD a felelős (Deér és mtsai., 1996). Az általunk alkalmazott rendkívül alacsony DM dózis pontyban mindössze 1,5-2-szeres ECOD aktivitás növekedést okozott (Varanka és mtsai., 2002). Az irodalmi adatok szerint azonos hőmérsékleten némileg magasabb xenobiotikum dózis akár 5-9-szeres ECOD aktivitás emelkedést is kiválthat (Deér és mtsai., 1996). Ugyanakkor, a DM dózis további emelése a citokrom P450 enzim aktivitások drasztikus csökkenését vonja maga után a kísérleti halak szervezetében elsősorban a P450 degradációja következtében (Deér és mtsai., 1996). Az *in vitro* kísérletek során bebizonyosodott, hogy a DM már nmol koncentráció-tartományban képes gátolni az antioxidáns enzimek aktivitását (29; 31; 36; 38 ábra), s a P450 1A izoenzimekre már 1  $\mu$ mol DM is erős gátlószerként hat (Banka és mtsai., 1997). A GSH koncentráció csökkenése és a LP szintjének az antioxidáns enzim aktivitásokkal való megemelkedése (26. és 33. ábra) prooxidáns hatást mutat. Az oxidatív stressz forrása a DM metabolizációját végző citokrom P450-függő redox-reakciók, melyek számottevő szabadgyök képződéssel járnak (Rein és mtsai., 1992; Lewis, 1996; de Zwart és mtsai., 1999). *In vitro* vizsgálataink feltárták a DM GSH koncentrációra kifejtett kettős hatása következtében létrejövő artifaktumot (Varanka és mtsai. 2002), mely a mérési eredmények helytelen interpretációjához vezethet. Amellett, hogy:

- a) az inszekticid bizonyos koncentráció-tartományban a nitromerkapto-benzoészav (az Ellmann-reagens és a GSH reakciójából származó sárga színű pigment) 412 nm-en mért abszorbanciájának, így a látszólagos GSH koncentrációnak a megemelkedését eredményezi (30a ábra),
- b) a peszticid jelenléte relatíve magas látszólagos GPx aktivitást produkált az *in vivo* (26f ábra) és *in vitro* kísérletekben (30b és 31. ábra).

Esetünkben, az *in vivo* GSH koncentráció és GPx aktivitások ezen artifaktumtól mentesnek tekinthetők, mivel a szövetekből a rendkívül érzékeny GC-MS módszerrel sem volt kimutatható a DM jelenléte, az artifaktumot mutató *in vitro* kísérleteket pedig relatíve magas DM koncentrációval végeztük.

Az *in vitro* látszólagos GPx aktivitás növekedés részben a xenobiotikum által indukált konformáció változásnak tulajdonítható. Másrészt, az *in vivo* mért magasabb látszólagos GPx aktivitás (a lehetséges enzim indukción túl) kapcsolatba hozható a citokrom P450 enzimek megemelkedett aktivitásából (25. és 32. ábra) származó (Lewis, 1996; Gupta és

mtsai., 1999; Kale, 1999; Varanka és mtsai., 2002) fokozott szabadgyök produkcióval (Winterbourn és Metodiewa, 1999).

Bár a DM elsődleges támadási célpontja az idegsejtek nátrium csatornái (Narahashi, 1984) és a GABA (gamma amino vajsav) receptor-ionofor komplex (Lawrence and Casida, 1993), a májszövetből mért redox-paraméterek (26. és 33. ábra) és a vérparaméterek (27. és 34. ábra) változásai a szövettani vizsgálatok eredményeivel a toxikum további káros hatásait is feltárták. Míg a  $\text{CuSO}_4$  injekció hatására a sejtmag és a rEr végzetes mértékben károsodott, addig a DM kezelés az organelumok kisebb mértékű degradációjával járt. A DM kezelés után az ún. "sötét" és "világos" sejtek megjelenése (28c és 35c ábra) (Bálint és mtsai., 1995) azonban a hepatociták egészét érintő általános elváltozásokat jelez, rámutatva a nukleinsav-, fehérje-, lipid- és glukóz-metabolizmus zavarára (Benedeczky és mtsai., 1986; Bálint és mtsai., 1995; Varanka és mtsai., 2002).

## 5.6. A fenolikum–deltamethrin kombináció hatása halakon

### 5.6.1. A tanninsav és a deltamethrin kombinációjának hatása halakon

Számos tanulmány kimutatta, hogy a fenolikumok – pl. azáltal, hogy molekuláris interakcióba lépnek a mezőgazdaságban használt kemikáliákkal –, képesek befolyásolni azok toxicitását (Ortego és Benson, 1992; Ghillebaert és mtsai., 1996).

Ugyanakkor, az antioxidáns enzimek aktivitásának *in vivo* időfüggés vizsgálata (26b-d,f ábra) arra a következtetésre vezetett bennünket, hogy a DM és TA kombináció expozíciós időfüggő hatása a külön adagolt ágensek hatásának eredőjével egyenlő. A fentiek alapján tehát az antioxidáns enzim aktivitások 24 óra után tapasztalt növekedése a xenobiotikum gyors metabolizációjából (Deér és mtsai., 1996) származó erőteljes  $\text{H}_2\text{O}_2$  és  $\text{O}_2^-$  gyöktermelődés (de Zwart, 1999; Kale és mtsai., 1999) okozta enzim indukciónak tulajdonítható. Az ezt követő újabb 24 óra expozíciós idő után bekövetkező aktivitás csökkenés viszont a TA karakteres enzim aktivitás gátló hatásának megnyilvánulása (26b-d,f ábra) (Varanka és mtsai., 2002). Ehhez hozzájárul az, hogy az alacsony dózisu DM expozíció első néhány órája alatt a piretroid szabadgyök képződés kíséretében elbomlik (WHO, 1990), így a kezelés második napján már nem jelentős a metabolizációjából származó oxil-gyökök antioxidáns enzim indukciója. A DM és a TA

hatásának időbeli eltérése jórészt a relatíve nagy méretű [ $M_t = 1700,2$ ], hidrofil TA molekulák kis abszorpciós rátájának a következménye (Reed, 1995), amihez képest a DM relatíve kisebb és lipofil tulajdonságú molekulaként könnyebben átjut a sejtmembránon, vagyis gyorsabban felszívódik. Az a tény, hogy a DM hatásához képest a TA+DM kezelés 2 nap expozíció után erőteljesebb LP növekedést váltott ki összefüggésben lehet a TA 2 nap után megnyilvánuló jelentős antioxidáns enzim aktivitás gátló kapacitásával (26. ábra). A DM előzőekben említett *in vitro* látszólagos GSH koncentrációra gyakorolt hatása a TA jelenlétében is megfigyelhető (30a,b ábra) (Varanka és mtsai., 2002).

Mivel a TA+DM kombinált kezelés (ill. az önálló TA kezelés) következtében kevésbé kifejezett elváltozások fejlődtek ki a sejtmagban, mint a DM kezelés után (28. ábra), megállapíthatjuk, hogy a TA a  $\text{CuSO}_4$ -on kívül a DM károsító hatásával szemben is egyfajta sejtmagvédő hatással rendelkezik (Varanka és mtsai., 2002). A mechanizmus valószínűleg az EA-éval azonos, vagyis a TA nemcsak a DNS-sel (Vance és Teel, 1989; Khan és mtsai., 2000), hanem a toxikus vegyület molekuláival is komplexet képez (Oris és mtsai., 1990; Ortego és Benson, 1992), s meggátolja a DNS és a toxikum interakcióját. A kombinált kezelés utáni fokozott lipid-peroxidáció (hasonlóan az önálló TA ill. DM kezelés eredményéhez) (28. ábra) membránkárosodásra, s így a membránfüggő transzport folyamatok zavarára utal. Ennek eredményeképpen a rEr ciszternákban protein halmozódott fel, ami azok duzzadásához vezetett (Benedeczky és mtsai., 1986). A kombinált kezelést követően a rEr ciszternák duzzadtsága kisebb mértékű volt, mint az önálló DM kezelés után, s ezt a bioszintetikus enzimek TA által okozott részlegesen gátolt aktivitásának tulajdoníthatjuk (28. ábra). Az elektronmikroszkópos felvételek a glikogén teljes hiányát mutatják a májsejtek citoplazmájában 2 nappal a kombinált kezelés után (28. ábra), ami a két vegyület metabolizációjának nagy energiaszükségletére, ill. erős metabolikus stresszre és a glukóz metabolizmus komoly zavarára utal (Varanka és mtsai., 2002). A transzamináz aktivitások és az elektronmikroszkópos felvételek összevetése megerősítette, hogy ezen enzimek szövetkárosodás indikátorként való felhasználhatósága olyan erős enzim gátlószerek alkalmazása esetén, mint pl. a TA, nem megbízható.

A TA+DM kombinált kezelés tehát komplex stresszválaszt váltott ki a halakban, s ebbe beleértendő a két ágens biotranszformációjából eredő erősen megnövekedett ROI-

termelés, valamint az antioxidáns védekezőrendszer TA jelenlétéből adódó csökkent kapacitása, amit bizonyos mértékben ellensúlyoz a TA általános sejtvédő aktivitása.

### 5.6.2. Az ellagsav és a deltamethrin kombinációjának hatása halakon

A TA+DM kezelés eredményéhez képest az EA+DM kombinált injekció eltérő változásokat okozott a ponty máj antioxidáns paraméter értékeiben és mintázatában (26 vs. 33 ábra). Míg az előbbi esetben a 6 vizsgált redox-paraméter közül csak a GSH koncentráció változása nem mutatott expozíciós időfüggést, addig az EA+DM kombinált kezelés után csak a LP-nál és az össz-SOD-nál látszott számottevő különbség a 24 és 48 órás értékek között. A redox-paraméterek időbeli változása (növekedés majd csökkenés) a kombinált kezelés következtében, illetve a DM és az EA+DM kezelések utáni antioxidáns státuszt összehasonlítva (33. ábra) arra a következtésre jutottunk, hogy az EA+DM kombinált kezelés hatására enyhébb oxidatív stressz indukálódott, mint az önálló DM kezelés esetében. Az antioxidáns paraméterek kedvezőbb értékei az EA gyökfogó (vagyis antioxidáns) aktivitásának (Majid és mtsai., 1991; Barch és mtsai., 1995; Takagi és mtsai., 1995; Varanka és mtsai., 1999) tulajdoníthatók (22b ábra). Emellett az antioxidáns enzim aktivitások változása tekintetében nem elhanyagolható az EA *in vivo* enzimgátló kapacitása sem (33. ábra). Az EA jelentős GSH-védő szerepét bizonyítja az, hogy bár az önálló DM hatásával egyezően jelentősen megnőtt a GPx aktivitás az EA+DM kombinált kezelés után, az előzővel szemben a GSH koncentrációja a májszövetben a kontrollnak megfelelő értéken maradt (33e,f ábra).

A vérparaméterek (GLU és AlaAT) csak 48 órás EA+DM expozíció elteltével emelkedtek meg (34a,c ábra), ami a kisebb mértékű és lassabban kifejlődő oxidatív stressz hatásának tulajdonítható. Az elektronmikroszkópia a redox-paraméterek alapján megállapítottakkal összhangban kimutatta, hogy a májsejtek struktúra változásának mértéke a kezelések fajtái tekintetében a következő sorrendben nőtt: EA < EA+DM < DM. Összevetve a TA+DM és az EA+DM kezelések ultrastrukturális eredményeit (a TA+CuSO<sub>4</sub> és EA+CuSO<sub>4</sub> injekció hatásához hasonlóan), azok megegyeznek abban, hogy a fenolikumok minden esetben csökkentették a velük együtt adagolt toxikum sejtkárosító kapacitását: a sejtmag kisebb mértékben duzzadt meg, s ezzel együtt kisebb volt a marginális heterokromatin veszteség, s a mitokondriumok elektrondenzitása kisebb mértékben növekedett. A rEr intaktsága a DM kezelés által kapotthoz volt hasonló, de a TA+DM és EA+DM kezeléseknél is gyakori volt a

ciszternák végének körteszerű kiöblösödése, mely következtében a rEr eredeti lamelláris struktúrája rendezetlenné vált. Különbséggént jelentkezik azonban, hogy bár az önállóan adott DM is jelentős glikogén fogyasztó hatással rendelkezik, a TA+DM kombináció teljesen kiürítette a sejtek glikogén készletét. Ugyanakkor az EA+DM mixtura a DM-hez hasonló mértékben okozott csak glikogén fogyást, illetve általánosságban nézve az EA+DM injekció hatására a májsejtek habitusa az EA-val kezelt halakéhoz volt hasonlatos. Az EA detoxifikáló hatására utal az is, hogy a fenolikum+DM kombinált kezeléseket esetében nem volt megfigyelhető "sötét" és "világos" sejtek megjelenése (28c,d-35c,d ábra). Az EA komplexképzésen alapuló sejtvédő hatásának mechanizmusát (Dixit és mtsai., 1985s) a fentiekben már ismertettük.

Összefoglalva, az *in vivo* biokémiai adatok alátámasztva a májon végzett összehasonlító citopatológiai vizsgálatok az *in vitro* kísérletek eredményeivel, megállapíthatjuk, hogy az EA megnövelte a pontyok DM-toleranciáját, vagyis az EA egyfajta DM toxicitás csökkentő kapacitással rendelkezik. Továbbá, az irodalmi adatok és saját kutatási eredményeink alapján valószínűsíthető, hogy a peszticidek fenolikumokkal kialakult interakciója következtében bekövetkező toxicitás változása, valamint a fenolikum jelenlétéből adódó módosult biokémiai hatás jelentősen függhet a fenolikum/humusz vegyület típusától, összetételétől és koncentrációjától (Decker, 1997). Ezáltal a toxicitás változásának mértéke és iránya eltérő lehet a különböző típusú vízi ökoszisztémákban, így pl. a rendkívül alacsony humusz koncentrációjú hegyi tavakban és az ellentétét jelentő mocsári, lápi vízi környezetben, ahol a huminsavak koncentrációja 50-70 mg L<sup>-1</sup> is lehet (Gjessing, 1976).



## 6. ÖSSZEFOGLALÁS

Kutatásaink alapvetően két problémakört érintenek. A vizsgálatainkat elindító kérdés úgy fogalmazható meg, hogy igaz-e az a tudományos feltételezés, mely szerint a növényi szerkezet degradációs termékeiként létrejött fenolvegyületek (fenol-karbonsavak, humuszvegyületek) enzim aktivitás gátló hatása tisztán annak a függvénye, hogy a fenolikum molekulája milyen számban hordoz hidroxil-csoportokat? Illetve, milyen egyéb összefüggések a meghatározók? Ezen kérdések megválaszolására hasonló szerkezetű fenol-karbonsavakkal és néhány egyéb típusú bonyolultabb szerkezetű növényi fenolikummal végeztünk összehasonlító *in vitro* koncentráció- és expozíciós időfüggő méréseket pontyból származó kataláz enzimen. Eredményeink és a szakirodalmi adatok alapján a további, *in vivo* kísérletekhez kiválasztottuk az EA-t és a TA-t, hogy tanulmányozzuk hatásukat két funkcionálisan együttműködő citokrom P450-függő monooxygenáz izoenzim- és az antioxidáns védekezőrendszeren pontyban. Mivel az élővizekben a humuszsavakon kívül számos mezőgazdasági környezetszennyező anyag is gyakran jelen van, ilyen pl. a fungicid rézszulfát és az inszekticid DM, megvizsgáltuk azt is, hogy egy-egy humuszvegyület jelenléte képes-e módosítani az említett toxikumok kedvezőtlen hatásait a halakban. A vizsgált vegyületek szövetkárosító hatását, továbbá a fenolikumok lehetséges védő hatását a vér aminotranszferáz aktivitásainak és a májsejtek ultrastruktúrájának vizsgálatával követtük. Eredményeink és következtetéseink az alábbiakban foglalhatók össze:

1. A CAT aktivitásának fenolikum koncentrációfüggése alapján a vizsgált vegyületeket "szűk" és "széles" koncentráció-tartományban ható csoportokra oszthatjuk. Az előbbi csoporthoz tartozik a benzoésav, 2-OH benzoésav, 3-OH benzoésav, 4-OH benzoésav, *p*-kumársav, protokatechuszsav, vanillinsav, fahéjsav, ellagsav. Ezen vegyületek gátlási koncentráció-tartománya a vizsgált 5 nagyságrendből hozzávetőlegesen 1 nagyságrendet fog át. A "széles" koncentráció-tartományban ható vegyületek enzimgátló hatásukat koncentrációjuk tekintetében 2 vagy több nagyságrendben fejtik ki. Ide tartozó vegyületek: fenol, ferulasav, galluszsav, sziringsav, (+)-katechin, kaffeinsav, tanninsav. A koncentrációfüggés görbe matematikai jellege szempontjából további két osztályba sorolhatjuk vizsgált vegyületeinket: a fenol és a TA  $e^{-x}$  jellegű, míg a többi vegyület koncentrációfüggés görbéje *szigmoid* profillal rendelkezik.

2. A vizsgált fenolikumok ponty katalázra vonatkozó  $IC_{50}$  értékei 30 perc inkubációs idő után általában a néhány száz  $\mu M$ -os koncentráció-tartományba esnek, kivétel a kaffeinsav a 100  $\mu M$  alatti, és a tanninsav a 10  $\mu M$  alatti  $IC_{50}$  értékével. 1 mM feletti az  $IC_{50}$  érték a referencia vegyületek (fenol és benzoésav) esetén, melyek molekulája vagy csak hidroxil- vagy karboxil-csoportot tartalmaz. Úgy találtuk, hogy a gátló hatás erősségének kialakítása szempontjából az egyszerűbb szerkezetű fenol-karbonsavaknál a karboxil-csoport jelenléte a döntő, a hidroxil-csoportok száma kevésbé meghatározó, vagyis újabb ligandumok bevitele csak kis mértékben változtatja meg az  $IC_{50}$  értékét.
3. Az aromás gyűrűhöz kapcsolódó szubsztituensek egymáshoz viszonyított térbeli helyzete (*meta*-, *orto*-, *para*-konfigurációja) jelentősen befolyásolja a gátló hatás mértékét, nagyobb mértékben, mint a ligandumok száma.
4. A homológ konfigurációjú hidroxil-benzoésavaknál és hidroxil-fenil-propénsavaknál az azonos pozícióba bevitt újabb funkcionális csoport (hidroxil- vagy metoxi-csoport) ellentétesen hat a gátló hatás erősségére.
5. A kis molekulájú fenolszármazékokhoz képest a nagy méretű és molekulatömegű TA esetében kétszeres expozíciós időre van szükség ahhoz, hogy kifejtse az adott koncentrációra jellemző maximális enzimgátló hatását, viszont a gátlás mértéke jóval nagyobb. Az eltérés annak tulajdonítható, hogy a kis méretű molekulák vizes közegben gyorsabban diffundálnak, mint a nagyobb méretűek, másrészt szterikus okokból jobban hozzáférnek a fehérje szerkezetéhez, s gyorsabban módosíthatják annak másodlagos ill. harmadlagos szerkezetét, vagy az aktív centrumhoz kötődve meggátolhatják a  $H_2O_2$  bekötődését. Míg az egyszerűbb fenol-karbonsavak gátló hatása a néhány hidroxil-csoportjuk által kialakított kis számú H-híd kötés miatt kevésbé kifejezett, addig a nagy molekulájú, sok hidroxil-csoporttal rendelkező TA nagy számú H-híd kötéssel alakít ki a fehérje molekula felszínén elhelyezkedő csoportokkal, s ez az erős aspecifikus kapcsolat az enzim térszerkezetében jelentős változásokat indukálva csökkenti annak specifikus aktivitását. Ehhez hozzájárul az is, hogy a nagy számú hidroxil-csoportot hordozó TA molekulák egyidejűleg több enzim molekulával is kapcsolódhatnak stabil precipitátumot hozva létre.
6. Az *i.p.* adott TA a májszövetben gátolta a vizsgált antioxidáns enzimek és a P450 1A izoenzimek aktivitását. Vizsgálataink szerint az ECOD és az EROD nem metabolizálja a TA-t. A halakban a TA a nem-enzimatis redox-paraméterek

változásai alapján prooxidánsként viselkedett. A májsejtek finomszerkezetében kialakult néhány nem letális következménnyel járó elváltozás. *In vitro* kimutattuk a TA erős CAT és GPx aktivitás gátló, illetve gyenge GSH koncentráció csökkentő kapacitását.

7. Az EA ezzel szemben antioxidánsként működött a pontyok szervezetében, ugyanis a LP mértéke lecsökkent a kontrollhoz képest, míg a GSH koncentrációja a CAT és a SOD aktivitásokkal megemelkedett. A P450 1A izoenzim aktivitások részlegesen gátlódtak a kezelést követően, s úgy találtuk, hogy az ECOD és az EROD az EA metabolizmusában nem vesz részt. Az EA némely esetben (pl. transzaminázok) relatíve nagyobb mértékű gátlást okozott *in vivo* mint a TA. Az EA a TA-hoz hasonló jellegű ultrastrukturális elváltozásokat keltett a májban, kivéve a glikogén fogyást, mely itt sokkal előrehaladottabb volt. Az EA esetében nem tudtunk kimutatni GSH koncentráció csökkentő aktivitást *in vitro*, de a TA-hoz képest gyengébb enzimgátló hatást és *in vitro* H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-bontó (vagyis látszólagos CAT) aktivitását igen, ami a fentiekkel együtt az EA komplex *in vivo* viselkedésére utal.

8. A fenolikum-rézszulfát kombinációk az önállóan adott CuSO<sub>4</sub> hatásához hasonlóan prooxidánsként viselkedtek, és általános enzim aktivitás gátlást okoztak. A két vegyület biológiai hatásának egymás mellett való kifejeződése expozíciós időfüggő. Ennek megfelelően a 24 óra után mért biomarker értékek a CuSO<sub>4</sub> erős prooxidáns, ezáltal antioxidáns enzim indukáló, és szövetnekrotizáló, míg a 48 óra utániak a TA vagy EA enzimgátló hatásának kifejeződését tükrözik. A fenolikum-rézszulfát kombinációk *in vitro* körülmények között is prooxidánsként működtek a GSH tekintetében, viszont az enzim aktivitás gátlásán kívül jelentős (az önálló fenolikuméhoz képest kifejezettebb) látszólagos CAT aktivitás is detektálható volt. A fenolikum-rézszulfát kombinációk számottevő GPx-szerű aktivitása miatt ezek GPx aktivitást gátló hatása nem tanulmányozható. A TA+CuSO<sub>4</sub> vagy EA+CuSO<sub>4</sub> kombinált kezeléseknél az önálló CuSO<sub>4</sub> kezeléshez képest kisebb mértékű makroszkopikus és ultrastrukturális elváltozások alakultak ki a májban. Azonban, a kombinált kezelés után talált teljes glikogén fogyás az együtt adott két vegyület detoxifikációjának ill. kiürítésének magas energiaszükségletére utal. Összegezve, a fenolikumok réz-toxicitást csökkentő kapacitása kevésbé biokémiai, mint inkább ultrastrukturális szinten figyelhető meg; a biokémiai paraméterek fenolikum+réz kombinációknál több esetben fokozott toxicitásról tanúskodnak az önálló réz hatásához képest.

9. A DM és a TA+DM kezelés után tendenciáját tekintve hasonló biokémiai változásokat tapasztaltunk: megemelkedett a DM metabolizmusát végző ECOD aktivitása a májban, ami nagyobb mértékű szabadgyök képződéssel jár. Ennek következtében csökkent a májban a GSH koncentráció, de nőtt a LP és az antioxidáns enzimek aktivitása. A TA+Cu(II) kezelés eredményéhez hasonlóan a TA+DM injekció után is azt találtuk, hogy a vegyületek biológiai hatásukat az expozíciós idő függvényében, egymás mellett fejtik ki. Így a 24 óra utáni változások a toxikum keltette fokozott szabadgyök termelődés által kiváltott enzim indukciónak tulajdoníthatók, majd a 48 óra expozíciós idő után bekövetkező aktivitás csökkenés a TA karakteres enzimgátló hatásának a következménye. A fentiekkel ellentétben a nem-enzimatis redox-paraméterek alapján megállapítható, hogy az EA+DM kezelés után számottevően enyhébb oxidatív stressz indukálódott, mint az önálló DM kezelés esetében, s ez az EA gyökfogó (vagyis antioxidáns) aktivitásának tulajdonítható. Az utóbbi esetben a vérparaméterek értékének hosszabb expozíció elteltével való megemelkedése kisebb mértékű és lassabban kifejlődő oxidatív stressz kialakulására utal. Az *in vitro* kísérletek során bebizonyosodott, hogy a DM ill. fenolikumokkal való kombinációja már nmolos koncentráció-tartományban képes gátolni a CAT és a GPx aktivitásokat – vagyis a DM rendkívül erős gátlószer –, de *in vivo* ez csak korlátozottan tudott kifejeződni az igen alacsony alkalmazott dózis miatt. *In vitro* vizsgálataink feltárták azt is, hogy a DM kettős hatást fejt ki a redukált GSH-ra: bizonyos reakciói növelően, míg mások csökkentően hatnak a GSH látszólagos koncentrációjára. Ez utóbbi számottevő látszólagos GPx aktivitást produkál *in vivo* és *in vitro*. Az EA ill. a TA csökkentette a vele együtt adagolt DM sejtkárosító kapacitását. A változásokat általánosságban tekintve megállapítható, hogy a májsejtek habitusa a fenolikum+DM kezelés után az önálló fenolikum-kezelés eredményéhez volt a leginkább hasonló, és nem volt megfigyelhető "sötét" és "világos" sejtek megjelenése, mint az önálló DM kezelést követően. Összehasonlítva a két fenolikum DM toxicitását csökkentő kapacitását az *in vivo* biokémiai adatok, a májon végzett összehasonlító citopatológiai vizsgálat s az *in vitro* kísérletek eredményeinek tükrében megállapíthatjuk, hogy a TA-hoz képest az EA számottevően megnövelte a pontyok DM-toleranciáját.

10. Úgy találtuk, hogy az aminoszferázok szövetkárosodás indikátoraként való használata erős enzim gátlószer jelenlétében nem megbízható.

**11.** A vizsgált vegyületek mind önállóan, mind kombinálva hatással voltak a májsejtek glikogén tartalmára és a vércukor szintjére, vagyis mindegyik kezelés esetében kémiai ill. metabolikus stressz indukálódott.

## 7. SUMMARY

Our research could be divided into two main parts. In the first part our goal was to find the answer to the following theoretical questions. Does the enzyme inhibitory capacity of the plant-derived phenolics depend on the number of the hydroxyl group in the phenolic molecule only? If not, what other factors determine their enzyme inhibitory power? In order to find the answer to these questions we performed time- and concentration-dependent *in vitro* experiments with phenolcarboxylic acids on carp liver catalase (CAT). Based on our results and the literature data concerning the exceptional activity of the two humics: ellagic (EA) and tannic acid (TA), we extended our study with the examination of the *in vivo* effects of the two phenolics on the two functionally collaborating cytochrome P450 monooxygenase CYP 1A isoenzymes (ECOD and EROD) and the antioxidant defense system of carp. However, not only humic acids, but several agricultural chemicals, such as the fungicide copper sulphate and the insecticide deltamethrin are often present in the aquatic ecosystems. On the above basis our aim was to clarify whether phenolics (EA and TA) are able to modify the toxicity of these pollutants in fish, or not. We also examined the tissue necrotizing capacity of the two environmental pollutants in the presence of EA or TA by measuring the blood aminotransferase activities and by electronmicroscopic analysis, as well. The summary of our results and conclusions are the followings:

1. We found two types of dose-dependent effects of phenolics on CAT activity: *a*) phenolics acting in an interval of two or more orders of concentration (from the concentration affording 100% inhibition to the smallest inhibitory concentration), i.e. phenol, ferulic acid, gallic acid, syringic acid, (+)-catechin, caffeic acid and tannic acid, and *b*) phenolics acting in an interval of approximately one order of concentration (from the concentration affording 100% inhibition to the smallest inhibitory concentration), i.e. benzoic acid, 2-hydroxybenzoic acid, 3-hydroxybenzoic acid, 4-hydroxybenzoic acid, *p*-coumaric acid, protocatechuic acid, vanillic acid, cinnamic acid and ellagic acid. According to the mathematical character of the concentration-dependent curves phenolics could be categorized as compounds have  $e^{-x}$  or *sigmoid* plot.
2. Generally, we found the IC<sub>50</sub> values (on CAT) to be around some hundred μM, except caffeic and tannic acid with its low value under 100 μM and 10 μM, respectively.

Only the references (phenol and benzoic acid), which molecule hold only hydroxy or carboxyl group, have an  $IC_{50}$  value higher than 1 mM. We concluded that as concerns the value of  $IC_{50}$ , the presence of the carboxyl group is more important than the number of hydroxy groups, (it is presumed that the small molecules may easily reach the active site, where the carboxyl group undergoes electrostatic interaction with the ionic amino acids or with the  $Fe^{3+}$  of the prosthetic group). Therefore, the influence of additional ligands on the  $IC_{50}$  value is limited.

3. The positions of the substituents on the phenyl ring (*meta*, *orto*, *para* configuration) influence the inhibitory effect more than does the number of hydroxy groups (or other substituents, e.g. methoxy groups).

4. When comparing the dependency of the inhibitory power of hydroxybenzoic and hydroxyphenylpropenoic acids with homologous structure, we found that an additional substituent (hydroxy or methoxy group) in the same position evoke opposite effect on the inhibitory power of the two different groups. For example, the presence of a hydroxy group *para* to the carboxyl group in the hydroxybenzoic acids leads to a stronger inhibitory effect, while in the hydroxyphenylpropenoic acids the effect is the opposite.

5. The time- and concentration-dependent inhibition of CAT demonstrates that the relatively small phenolic molecules can inactivate CAT in a shorter time than does the large TA molecule, which needs an approximately two-fold incubation time for full inhibition. However, TA exerts the strongest CAT inhibitory effect. This may be explained by the difference in the diffusion coefficients. Moreover, the small phenolic molecules can bind to the active site via hydrogen-bonds, preventing  $H_2O_2$  from binding to the active site, or may alter the internal structure of the enzyme. TA can form much more aspecific hydrogen-bonds with the external surface of the enzyme than do the small phenolics, but it cannot approach so closely to the internal structure of the enzyme. Further, the TA molecule, which is rather bulky, with many hydroxy groups may interact with several enzyme molecules, resulting in a stable precipitate.

6. The *i.p.* administered TA caused partial inhibition of the hepatic P450 1A izoenzyme and the antioxidant enzyme activities, and according to the non-enzymatic redox-parameters TA behaved as prooxidant in carp. TA was found not to be metabolized by ECOD and EROD. Some non-deleterious alterations developed in the ultrastructure of the hepatocytes after the TA treatment. *In vitro* studies revealed the

enhanced CAT and GPx inhibitory, but weak apparent GSH concentration decreasing capacity of TA.

7. Opposed to TA action EA acted as antioxidant in carp as proved by the decreased LP level and the increased GSH concentration as compared to the control. The low P450 1A activities with the enhanced CAT and SOD activities demonstrates diminished oxyradical production, but augmented oxyradical degradation rate in the tissues. We found EA not to be metabolized by ECOD and EROD, as well. EA induced a relatively stronger *in vivo* inhibition of some enzymes (e.g. aminotransferases) than TA. EA triggered similar ultrastructural alterations in the liver compared to those of TA with an exception: the glycogen loss was much enhanced after the EA treatment. Opposed to TA action, apparent GSH concentration-decreasing activity of EA was not detected *in vitro*, but a weaker enzyme inhibitory capacity and a considerable apparent CAT activity of EA was proved clearly. These multiple actions of EA refer to complex behavior *in vivo*.

8. Both CuSO<sub>4</sub>, and the phenolic+copper combinations acted as prooxidant and evoked enzyme inhibition in fish. The parallel expression of the exposure time-dependent effect of the two chemicals was observed after the phenolic+copper combined injections. Accordingly, the strong prooxidant, therefore antioxidant enzyme activating and tissue necrotizing effects after 24 h exposure are due to the action of CuSO<sub>4</sub>; but the decreased enzyme activities detected after 48 h might be the consequence of enzyme inhibition triggered by EA or TA. The phenolic+copper combinations behaved as prooxidant against GSH not only *in vivo*, but *in vitro*, too. In other words, these mixtures exerted notable apparent GPx activity. This way the GPx inhibition by CuSO<sub>4</sub> or the phenolic+copper combinations could not be evaluated. Besides their enhanced enzyme inhibitory capacity the EA+Cu(II) and TA+Cu(II) combinations show more enhanced apparent CAT activity than EA or TA alone. This H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-degrading activity might be additive to the 'enzymatic' CAT activity *in vivo*. Macroscopically the liver was not deleteriously necrotized. Electronmicroscopy revealed moderate alterations in the hepatocytes after the TA+CuSO<sub>4</sub> or EA+CuSO<sub>4</sub> treatments, comparing to the consequence of CuSO<sub>4</sub> injection alone. Nevertheless, the total glycogen loss refers to high energy demand of the detoxification/excretion of the two compounds, which were added together. The biochemical parameters several times indicated increased toxicity of a phenolic+copper combination compared to that of the



alone-added copper. However, electronmicrographs demonstrated the opposite. Therefore, it is concluded, that the copper toxicity decreasing action of the two phenolics is expressed on ultrastructural, rather than on biochemical parameter level.

9. Identical changes developed in the biochemical parameters after the DM and the TA+DM treatment: the activity of a DM metabolizing enzyme, the ECOD, increased in the fish. The improvement of the oxidative reactions was accompanied by increased free radical production. The consequence of the prooxidant fallout was GSH loss and enhanced LP with rose antioxidant enzyme activities. The parallel expression of the exposure time-dependent effect of the two chemicals was observed after the TA+DM treatment, similarly, like after the TA+Cu(II) injection. Hence, the changes in the enzyme activities of fish after 24 h is due to the elevated free radical production induced by the synthetic toxicant, but the loss in enzyme activities after 48 h exposure is the consequence of the characteristic enzyme inhibitory action of TA. In contrast, a significantly moderate oxidative stress was induced after the EA+DM treatment than after the DM or the TA+DM injection, as demonstrated by the non-enzymatic redox-parameters. The reduced toxicity of DM in the presence of EA is due to the considerable free radical scavenging (therefore antioxidant) activity of the phenolic. The fact, that the values of the blood parameters were increased only after longer exposure (2 days) to EA+DM also refers to weaker and slow developing oxidative stress in fish. Although, *in vitro* studies proved that DM is a rather strong enzyme inhibitor as it can inhibit CAT and GPx even in the nanomolar concentration range, this feature could not been manifested well *in vivo*, because of the very low applied DM dose. *In vitro* experiments revealed the dual effect of DM on GSH: both apparent GSH concentration increasing and decreasing reactions affect the result of the measurements. The latter reactions influence significantly the detectable GSH concentration both *in vitro* and *in vivo*. Electronmicroscopy revealed that both TA and EA were able to decrease the cell destroying activity of DM in the liver. Generally, we can say that the habitus of the hepatocytes after the phenolic+DM treatments was similar to that after the single phenolic treatment; and the appearance of "dark" and "light" cells was not observed in contradiction to the consequence of DM injection alone. Based on the comparison of the *in vivo* and *in vitro* results, collated with the electronmicrographs we concluded that EA significantly increased the DM tolerance of fish in contrast to TA action.

10. Collation of electronmicrographs with aminotransferase activities led to a

conclusion: one should be cautious when using of transferases as indicator of tissue damage when strong enzyme inhibitors (such as TA) are applied.

**11.** The examined compounds both alone and in combination decreased the glycogen content of the hepatocytes and modified the plasma glucose concentration. Consequently, each substance triggered chemical/metabolic stress in fish.

## 8. IRODALOMJEGYZÉK

- Abu-Amsha, R.; Croft, K. D.; Puddey, I. B.; Proudfoot, J. M.; Beilin, L. J. (1996) Phenolic content of various beverages determines the extent of inhibition of human serum and low-density lipoprotein oxidation in vitro: identification and mechanism of action of some cinnamic acid derivatives from red wine. *Clinical Science*. 91, 449-458.
- Ahn, D.; Putt, D.; Kresty, L.; Stoner, G. D.; Fromm, D.; Hollenberg, P. F. (1996) The effects of dietary ellagic acid on rat hepatic and esophageal mucosal cytochromes P450 and phase II enzymes. *Carcinogenesis*. 17, 821-828.
- Aiken, G. R.; McKnight, D. M.; Wershaw, R. L.; MacCarthy, P. (1985) An introduction to humic substances in soil, sediment, and water. *In: Humic substances in soil, sediment, and water: geochemistry, isolation, and characterization* (eds. Aiken, G. R.; McKnight, D. M.; Wershaw, R. L.; MacCarthy, P.). p. 1-9, Wiley-Interscience, New York.
- Akhtar, M. H. (1982) Gas chromatographic determination of deltamethrin in biological samples. *J. Chromatogr.* 246, 81-87.
- Baer-Dubowska, W.; Szaefer, H.; Krajka-Kuzniak, V. (1998) Inhibition of murine hepatic cytochrome P450 activities by natural and synthetic phenolic compounds. *Xenobiotica*. 28, 735-743.
- Bálint, T.; Szegletes, T.; Szegletes, Zs.; Halasy, K.; Nemcsók, J. (1995) Biochemical and subcellular changes in carp exposed to the organophosphorus methidathion and the pyrethroid deltamethrin. *Aquat. Toxicol.* 33, 279-295.
- Bálint, T.; Ferenczy, J.; Kátai, F.; Kiss, I.; Kráczér, L.; Kufcsák, O.; Láng, G.; Polyhos, Cs.; Szabó, I.; Szegletes, T.; Nemcsók, J. (1997) Similarities and differences between the massive eel (*Anguilla anguilla* L.) devastations that occurred in lake Balaton in 1991 and 1995. *Ecotox. Environ. Saf.* 37, 17-23.
- Banka, L.; Deér, K. A.; Nemcsók, J.; Ábrahám, M. (1997) In vivo and in vitro effects of deltamethrin on cytochrome P450 monooxygenase activity in carp (*Cyprinus carpio* L.) liver. *J. Environ. Sci. Health B*. 32, 789-802.
- Barch, D. H.; Rundhaugen, L. M. (1994) Ellagic acid induces NAD(P)H:quinone reductase through activation of the antioxidant responsive element of the rat NAD(P)H:quinone reductase gene. *Carcinogenesis*. 15, 2065-2068.
- Barch, D. H.; Rundhaugen, L. M.; Pillay, N. S. (1995) Ellagic acid induces transcription of glutathione S-transferase-Ya gene. *Carcinogenesis*. 16, 665-668.
- Bartkowiak, A.; Grzelinska, E.; Varga, I. Sz.; Leyko, W. (1981) Studies on SOD from cod (*Gadus morhua*) liver. *Int. J. Biochem.* 13, 1039-1042.
- Bell, G. R. (1968) Distribution of transaminases (aminotransferases) in the tissue of Pacific salmon (*Oncorhynchus*), with emphasis of the properties and diagnostic use of glutamicoxylacetic-transaminase. *J. Fish. Res. Bd. Can.* 25, 1247-1268.
- Beers, R. F. Jr.; Sizer, I. W. (1952) A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J. Biol. Chem.* 195, 133-140.
- Benedeczky, I.; Nemcsók, J.; Halasy, K. (1986) Electronmicroscopic analysis of the cytopathological effect of pesticides in the liver, kidney and gill tissues of carp. *Acta Biol. Szeged.* 32, 69-91.
- Bergmeyer, H. U. (1983) Methods of enzymatic analysis, Enzymes I: Oxidoreductases, transferases. p. 273-286, Verlag Chemie GmbH, Weinheim.
- Bhunya, S. P.; Pati, P. C. (1990) Effect of deltamethrin, a synthetic pyrethroid, on the induction of chromosome aberrations, micronuclei and sperm abnormalities in mice. *Mutagen.* 5, 229-235.
- Blom, S.; Förlin, L. (1997) Effects of PCB on xenobiotic biotransformation enzyme activities in the liver and 21-hydroxylation in the head kidney of juvenile rainbow trout. *Aquat. Toxicol.* 39, 215-230.
- Bowry, V. W.; Stocker, R. (1993) Tocopherol-mediated peroxidation. The prooxidant effect of vitamin E on radical initiated oxidation of human low density lipoprotein. *J. Am. Chem. Soc.* 115, 6029-6044.

- Bray, R.C.; Cockle, S.A.; Fielden, E.M.; Roberts, P.B.; Rotilio G.; Calabresel, L. (1974) Reduction and inactivation of superoxide dismutase by hydrogen peroxide. *Biochem. J.* 139, 43-48.
- Buhler, D.R.; Williams, D. E. (1988) The role of biotransformation in the toxicity of chemicals. *Aquat. Toxicol.* 11, 19-28.
- Burke, M. D.; Thompson, S.; Elcombe, C. R.; Halpert, J.; Haaparanta, T.; Mayer, R. T. (1985) Ethoxy-, pentoxy- and benzyloxyphenoxazones and homologues: a series of substrates to distinguish between different induced cytochromes P-450. *Biochem. Pharmacol.* 34, 3337-3345.
- Cadenas, E. (1989) Biochemistry of oxygen toxicity. *Ann. Rev. Biochem.* 58, 79-110.
- Celander, M.; Förlin, L. (1995) Decreased responsiveness of the hepatic cytochrome P4501A1 system in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after prolonged exposure to PCB. *Aquat. Toxicol.* 33, 141-153.
- Chapman, R. A.; Harris, C. R. (1978) Extraction and liquid-solid chromatography cleanup procedures for the direct analysis of four pyrethroid insecticides in crops by gas-liquid chromatography. *J. Chromat.* 166, 513-518.
- Chiu, D. T. Y.; Stults, F. H.; Tappal, A. L. (1976) Purification and properties of rat lung soluble glutathione peroxidase. *Biochim. Biophys. Acta.* 445, 558-566.
- Coon, M. J.; Ding, W.; Pernecky, S. J.; Vaz, A. D. N. (1992) Cytochrome P450: progress and predictions. *FASEB J.* 6, 669-673.
- Cornish-Bowden, A. (1979) Fundamentals of enzyme kinetics. p. 152-153, Butterworth & Co. (Publishers) Ltd., London.
- Cremer, J. E.; Seville, M. P. (1985) Changes in regional cerebral blood flow and glucose metabolism associated with symptoms of pyrethroid toxicity. *Neurotoxicol.* 6, 1-7.
- Curtis, P.J. (1998) Climatic and hydrologic control of DOM concentration and quality in lakes. *In: Aquatic humic substances: ecology and biogeochemistry* (eds. Hessen, D.O.; Tranvik, L.J.) p. 93-105, Springer-Verlag, Heidelberg.
- Das, M.; Bickers, D.; Mukhtar, H. (1985) Effect of ellagic acid on hepatic and pulmonary xenobiotic metabolism in mice: studies on the mechanism of its anticarcinogenic action. *Carcinogenesis.* 6, 1409-1413.
- Decker, E. A. (1997) Phenolics: prooxidants or antioxidants? *Nutr. Rev.* 55, 396-398.
- de Boeck, G. (1998) Physiological effects of sublethal copper exposure on the energy metabolism of the common carp, *Cyprinus carpio*. *Diss. Abst. Int. Pt. B - Sci. & Eng.* 58, 5220.
- Deér, K. A.; Banka, L.; Nemcsók, J.; Ábrahám, M. (1996) Effects of deltamethrin on hepatic microsomal cytochrome P450-dependent monooxygenases in carp. *J. Environ. Sci. Health B.* 31, 637-644.
- de Zwart, L. L.; Meerman, J. H. N.; Commandeur, J. N. M.; Vermeulen, N. P. E. (1999) Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. *Free Rad. Biol. Med.* 26, 202-226.
- Dixit, R.; Teel, R.; Daniel, F.; Stoner, G. (1985) Inhibition of benzo[a]pyrene and benzo[a]pyrene-trans-7,8-diol metabolism and DNA binding in mouse explants by ellagic acid. *Cancer Res.* 45, 2951-2956.
- Eells, J. T.; Watable, S.; Ogata, N.; 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* (eds. Costa, L. G.; Galli, C. L.; Murphy, S. D.) p. 267-271, Springer-Verlag, Berlin.
- Fehér, J.; Vereckei, A. (1985) Szabadgyök-reakciók jelentősége az orvostudományban. ISBN-963-241-451-9, p. 32-38, Medicina, Budapest.
- Ferriola, P. C.; Cody, V.; Middleton, E. Jr. (1989) Protein kinase C inhibition by plant flavonoids. *Biochem. Pharmacol.* 10, 1617-1624.
- Fiedler, U.; Hildebrand, G. (1954) Pharmacology of tannins: action of plant tannins on the Masseter preparation. *Arzneimittel Forsh.* 4, 426-432.
- Filippich, L. J.; Zhu, J.; Alsalmi, M. T. (1991) Hepatotoxic and nephrotoxic principles in *Terminalia oblongata*. *Res. Vet. Sci.* 50, 170-178.

- Fouremant, G. L. (1989) Enzymes involved in metabolism of PAH by fish and other aquatic animals: hydrolysis and conjugation enzymes (or phase II enzymes). *In: Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment* (ed. Varanasi, U.). p. 186-197. CRC Press Inc., Florida.
- Förlin, L.; Celander, M. (1993) Induction of cytochrome P450 1A in teleosts: environmental monitoring in Swedish fresh, brackish and marine waters. *Aquat. Toxicol.* 26, 41-56.
- Frankel, E. N.; Kanner, J.; German, J. B.; Parks, E.; Kinsella, J. E. (1993) Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *The Lancet.* 341, 454-457.
- Freeman, B. A.; Crapo, J. D. (1982) Biology of disease. Free radicals and tissue injury. *Lab. Invest.* 47, 412-426.
- Fridovich, I. (1983) Superoxide radical: an endogenous toxicant. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 23, 239-257.
- Gali, H. U.; Perchellet, E. M.; Klish, D. S.; Johnson, J. M.; Perchellet, J-P. (1992) Hydrolyzable tannins: potent inhibitors of hydroperoxide production and tumor promotion in mouse skin treated with 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in vivo. *Int. J. Cancer.* 51, 425-432.
- Ghillebaert, F.; Prodorutti, D.; Chaliou, C.; Roubaud, P. (1996) Deltamethrin multifactorial activity toward carp larva mobility related to calcium, humic acids, and pH. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 35, 268-276.
- Gjessing, E. T. (1976) Physical and chemical characteristics of aquatic humus. *Ann Arbor Science Publishers, Ann Arbor, MI.*
- Gupta, A.; Nigam, D.; Gupta, A.; Shukla, G. S.; Agarwal, A. K. (1999) Effect of pyrethroid-based liquid mosquito repellent inhalation on the blood-brain barrier function and oxidative damage in selected organs of developing rats. *J. Appl. Toxicol.* 19, 67-72.
- Halliwell, B. (1978) Lignin synthesis: The degradation of hydrogen peroxide and superoxide by horseradish peroxidase and its stimulation by manganese (II) and phenolics. *Planta.* 140, 81-88.
- Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C. (1985) Free radicals in biology and medicine. p. 139-189, Clarendon Press, London.
- Handy, R. D.; Musonda, M. M.; Phillips, C.; Falla, S. J. (2000) Mechanism of gastrointestinal copper absorption in the African walking catfish: copper dose-effects and a novel anion-dependent pathway in the intestine. *J. Exp. Biol.* 203, 2365-2377.
- Hartley, R. D.; Jones, E. C. (1977) Phenolic components and degradability of cell walls of grass and legume species. *Phytochem.* 16, 1531-1534.
- Haslam, E. (1989) Plant polyphenols-vegetable tannins revisited. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Hassan, H. M.; Fridovich, I. (1980) Superoxide dismutases: detoxication of a free radical, *In: Enzymatic basis of detoxication*, vol. 1, (ed. Jakoby, W. B.). p. 311-332, Academic Press, New York.
- Hessen, D.O.; Tranvik, L. J. (1998) Humic substances as ecosystem modifiers. *In: Aquatic humic substances*, ISBN 3-540-63910 (eds. Hessen, D.O.; Tranvik, L. J.). Springer-Verlag, Heidelberg.
- Holliman, A. (1985) Acorn poisoning in ruminants. *Vet. Rec.* 116, 546-552.
- Horváth, P. J. (1981) The nutritional and ecological significance of Acer-tannins and related polyphenols. M. S. Thesis, Cornell University, Ithaca, New York.
- Huang, M-T.; Ho, C-T.; Wang, Z. Y.; Ferraro, T.; Finnegan-Olive, T.; Lou, Y-R.; Mitchell, J. M.; Laskin, J. D.; Newmark, H.; Yang, C. S.; Conney, A. H. (1992) Inhibitory effect of topical application of green tea polyphenol fraction on tumor initiation and promotion in mouse skin. *Carcinogenesis.* 13, 947-954.
- Igarashi, K.; Ohmuma, M. (1994) Effects of isorhamnetin, rhamnetin, and quercetin on the concentrations of cholesterol and lipoperoxide in the serum and liver and on the blood and liver antioxidative enzyme activities of rats. *Biosci. Biotech. Biochem.* 59, 595-601.
- Jacobson, S. V.; Reimschuessel, R. (1998) Modulation of superoxide production in goldfish (*Carassius auratus*) exposed to and recovering from sublethal copper levels. *Fish. Shellfish. Immunol.* 8, 245-259.

- Jain, S.K. (1984) The accumulation of malonyldialdehyde, a product of fatty acid peroxidation, can disturb aminophospholipid organization in the membrane bilayer of human erythrocytes. *J. Biol. Chem.* 259, 3391-3394.
- James, M. O. (1987) Conjugation of organic pollutants in aquatic species. *Environ. Health Perspect.* 71, 97-103.
- Jensen, G. E.; Skaare, J. U.; Egaas, E.; Goksour, A. (1991) Response of xenobiotic metabolizing enzymes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to endosulfan, detected by enzyme activities and immunochemical methods. *Aquat. Toxicol.* 21, 81-92.
- Jovanovic, S. V.; Hara, Y.; Steenken, S.; Simic, M. G. (1995) Antioxidant potential of gallic catechins. A pulse radiolysis and laser photolysis study. *J. Am. Chem. Soc.* 117, 9881-9888.
- Kale, M.; Rathore, N.; John, S.; Bhatnagar, D. (1999) Lipid peroxidative damage on pyrethroid exposure and alterations in antioxidant status in rat erythrocytes: a possible involvement of reactive oxygen species. *Toxicol. Lett.* 105, 197-205.
- Kamataki, T.; Ando, M.; Yamazoe, Y.; Ishii, K.; Kato, R. (1980) Sex difference in the O-dealkylation activity of 7-hydroxycoumarin O-alkyl derivatives in liver microsomes of rats. *Biochem. Pharmacol.* 29, 1015-1022.
- Kamunde, C. N.; Grosell, M.; Lott, J. N. A.; Wood, C. M. (2001) Copper metabolism and gut morphology in rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) during chronic sublethal dietary copper exposure. *Can. Fish. Aquat. Sci.* 58, 293-305.
- Karnovsky, M. J. (1965) A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 27, 137A.
- Khan, N. S.; Hadi, S. M. (1998) Structural features of tannic acid important for DNA degradation in the presence of Cu(II). *Mutagenesis.* 13, 271-274.
- Khan, N. S.; Ahmad, A.; Hadi, S. M. (2000) Anti-oxidant, pro-oxidant properties of tannic acid and its binding to DNA. *Chem. Biol. Interact.* 125, 177-189.
- Kim, B.; Wetzel, R. G. (1993) The effect of dissolved humic substances on the alkaline phosphatase and growth of microalgae. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 25, 129-132.
- Kim, S. D.; Ma, H.; Allen, H. E.; Cha, D. K. (1999) Influence of dissolved organic matter on the toxicity of copper to *Ceriodaphnia dubia*: effect of complexation kinetics. *Environ. Tox. Chem.* 18, 2433-2437.
- Kinsella, J. E.; Frankel, E.; German, B.; Kanner, J. (1993) Possible mechanism for the protective role of antioxidants in wine and plant foods. *Food Tech.* 4, 85-89.
- Kleinow, K. M.; Melancon, M. J.; Lech, J. J. (1987) Biotransformation and induction: implications for toxicity, bioaccumulation and monitoring of environmental xenobiotics in fish. *Environ. Health Perspect.* 71, 105-119.
- König, M.; Scholz, E. (1994) Ellagitannins and complex tannins from *Quercus petraea* bark. *J. Nat. Prod.* 57, 1411-1415.
- Lai, C.C.; Huang, W.H.; Askari, A.; Wang, Y.; Sarvazyan, N.; Klevay, L.M.; Chiu, T.H. (1994) Differential regulation of superoxide dismutase in copper-deficient rat organs. *Free Radic. Biol. Med.* 16, 613-620.
- Lapis, K.; Benedeczky, I. (1966) Antimetabolic-induced changes in the fine structure of tumour cells. *Acta Biol. Acad. Sci. Hung.* 17, 199-215.
- Laszlavik, M.; Gál, L.; Misik, S.; Erdei, L. (1995) Phenolic compounds in two hungarian red wines matured in *Quercus robur* and *Quercus petraea* barrels: HPLC analysis and diode array detection. *Am. J. Enol. Vitic.* 46, 67-74.
- Lawrence, L. J.; Casida, J. E. (1983) Stereospecific action of pyrethroid insecticides on the gamma-aminobutyric acid receptor-ionophore complex. *Science.* 221, 1399-1409.
- Laughton, M. J.; Halliwell, B.; Evans, P. J.; Hoult, J. R. S. (1989) Antioxidant and prooxidant actions of the plant phenolics quercetin, gossypol and myricetin. *Biochem. Pharmacol.* 38, 2859-2865.
- Lemaire, P.; Livingstone, D. R. (1993) Pro-oxidant/antioxidant processes and organic xenobiotic interactions in marine organisms, in particular the flounder *Platichthys flesus* and the mussel *Mytilus edulis*. *Trends in Comparat. Biochem. Physiol.* 1, 1119-1150.
- Lewis, D. F. V. (1996) Cytochromes P450, structure, function and mechanism. Taylor and

- Francis, Cornwall.
- L'Hotellier, M.; Vincent, P. (1986) Assessment of the impact of deltamethrin on aquatic species. *In: British Crop Protection Conference - Pests and Disease: 1109.*
- Liu, L.; Castonguay, A. (1991) Inhibition of the metabolism and genotoxicity of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) in rat hepatocytes by (+)-catechin. *12, 1203-1209.*
- Livingstone, D. R. (1993) Biotechnology and Pollution Monitoring: Use of Molecular Biomarkers in the Aquatic Environment. *J. Chem. Biotechnol. 57, 195-211.*
- Li, Y.; Trush, M. A. (1994) Reactive oxygen-dependent DNA damage resulting from the oxidation of phenolic compounds by a copper-redox cycle mechanism. *Cancer. Res. 54, 1895-1898.*
- Lopes, G. K.; Schulman, H. M.; Hermes-Lima, M. (1999) Polyphenol tannic acid inhibits hydroxyl radical formation from Fenton reaction by complexing ferrous ions. *Biochim. Biophys. Acta. 1472, 142-152.*
- Lowry, O. H.; Rosebrongh, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem. 193, 265-275.*
- Majid, S.; Khanduja, K.L.; Gandhi, R.K.; Kapur, S.; Sharma, R.R. (1991) Influence of ellagic acid on antioxidant defense system and lipid peroxidation in mice. *Biochem. Pharmacol. 42, 1441-1445.*
- Mazeaud, F.; Maral, J.; Michelson, A. M. (1979) Distribution of superoxide dismutase and glutathione peroxidase in the carp: erythrocyte manganese SOD. *Biochem. Biophys. Res. Comm. 86, 1161-1168.*
- McKnight, D. M. (1991) Feedback mechanisms involving humic substances in aquatic ecosystems. *In: Scientists on Gaia (eds. Schneider, S. H.; Boston, P. J.). p. 330-338, MIT Press, Cambridge.*
- McKnight, D. M.; Aiken, B. R. (1998) Sources and age of aquatic humus. *In: Aquatic humic substances, ISBN 3-540-63910 (eds. Hessen, D.O.; Tranvik, L. J.). Springer-Verlag, Heidelberg.*
- Metodiewa, D.; Jaiswal, A. K.; Cenas, N.; Dickançaité, E.; Segura-Aguilar, J. (1999) Quercetin may act as a cytotoxic prooxidant after its metabolic activation to semiquinone and quinoidal product. *Free Rad. Biol. Med. 26, 107-116.*
- Misra, H.P.; Fridovich, I. (1972) The role of the superoxide anion in the autooxidation of epinephrine and simple assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem. 247, 3170-3175.*
- Morgan, J.F.; Klucas, R.V.; Grayer, R.J. (1997) Complexes on iron with phenolic compounds from soybean nodules and other legume tissues: prooxidant and antioxidant properties. *Free. Radic. Biol. Med. 22, 861-870.*
- Murakami, S.; Isobe, Y.; Kijima, H.; Nagai, H.; Muramatsu, M.; Otomo, S. (1991) Inhibition of gastric  $H^+$ ,  $K^+$ -ATPase and acid secretion by ellagic acid. *Planta Med. 57, 305-308.*
- Murakami, S.; Muramatsu, M.; Otomo, S. (1992) Inhibitory effect of tannic acid on gastric  $H^+$ ,  $K^+$ -ATPase. *J. Nat. Prod. 55, 513-516.*
- Narahashi, T. (1984) Nerve membrane sodium channels as the target of pyrethroids, *In: Cellular and Molecular Neurotoxicology (ed. Narahashi, T.). p. 85-108, Raven press, New York.*
- Newmark, H. L. (1996) Plant phenolics as potential cancer prevention agents. *Adv. Exp. Med. Biol. 401, 25-34.*
- Okey, A. B. (1990) Enzyme induction in cytochrome P-450 system. *Pharmacol. Ther. 45, 241-298.*
- 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, 123-131.*
- Oris, J.T.; Hall, A.T.; Tylka, J.T. (1990) Humic acids reduce the photo-induced toxicity of anthracene to fish and Daphnia. *Environ. Toxicol. Chem. 9, 575-583.*
- Ortego, L. S.; Benson, W. H. (1992) Effects of dissolved humic material on the toxicity of selected pyrethroid insecticides. *Environ. Toxicol. Chem. 11, 261-265.*
- Perdue, E.M.; Gjessing, E.T. (1990) Organic acids in aquatic ecosystems. p. 345. John Wiley and Sons, Chichester.

- Pierpoint, W.S. (1986) Flavonoids in the human diet. *In: Plant flavonoids in biology and medicine: biochemical, pharmacological, and structure-activity relationships.* (eds. Cody, V.; Middleton, E. Jr.; Harborne, J. B.). p. 125-140, Alan R. Liss, New York.
- Placer, Z. A.; Cushman, L. L.; Johnson, B. C. (1966) Estimation of product of lipid peroxidation (malonyl dialdehyde) in biochemical systems. *Anal. Biochem.* 16, 359-364.
- Puech, J.-L. (1981) Extraction and evolution of lignin products in Armagnac matured in oak. *Am. J. Enol. Vitic.* 32, 111-114.
- Radi, A.A.R.; Matkovic, B. (1988) Effects of metal ions on the antioxidant enzyme activities, protein contents and lipid peroxidation of carp tissues. *Comp. Biochem. Physiol.* 90C, 69-72.
- Reed, J. D. (1995) Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in forage legumes. *J. Anim. Sci.* 73, 1516-1528.
- Rein, H.; Ristau, O.; Blanck, J.; Ruckpaul, K. (1992) Regulation mechanisms of xenobiotics metabolizing liver cytochrome P-450 and toxicological implications. *In: Free radicals and the liver.* (eds. Csomós G.; Fehér J.). p. 29-35, Springer-Verlag, Heidelberg.
- Reitman, S.; Frankel, S. (1957) Determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. *Am. J. Clin. Pathol.* 28, 56-62.
- Rodriguez-Ariza, A.; Diaz-Mendez, F. M.; Navas, J. I.; Pueyo, C.; Lopez-Barea, J. (1995) Metabolic activation of carcinogenic aromatic amines by fish exposed to environmental pollutants. *Environ. Mol. Mutagen.* 25, 50-57.
- Rojik, I.; Nemcsók, J.; Boross, L. (1983) Morphological and biochemical studies on liver, kidney and gill of fishes affected by pesticides. *Acta Biol. Hun.* 34, 81-92.
- Rose, G. P.; Dewar, A. J. (1983) Intoxication with four synthetic pyrethroids fail to show any correlation between neuromuscular dysfunction and neurobiochemical abnormalities. *Arch. Toxicol.*, 53, 297-306.
- Sakagami, H.; Oi, T.; Satoh, K. (1999) Prevention of oral diseases by polyphenols. *In vivo.* 13, 155-171.
- Salah, N.; Miller, N.; Paganga, G.; Tijburg, L.; Bolwell, G. P.; Rice-Evans, C. (1995) Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants. *Arch. Biochem. Biophys.* 322, 339-346.
- Sedlak, I.; Lindsay, R.H. (1968) Estimation of total protein-bound and nonprotein sulfhydryl groups in the tissue with Ellman's reagent. *Anal. Biochem.* 25, 192-205.
- Shahidi, F.; Wanasundara, P. K. J. P. D. (1992) Phenolic antioxidants. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 32, 67-103.
- Sies, H. (1985) *Oxidative stress.* Academic Press, London.
- Smirnoff, N. (1998) Plant resistance to environmental stress. *Curr. Opin. Biotechnol.* 9, 214-219.
- Smith, D. E. (1995) Determination of the copper binding characteristics of rainbow trout mucus: possible consequences of toxicity. M. S. Thesis, p. 32, Department of Zoology and Physiology, University of Wyoming, Laramie.
- Stackhouse, R. A.; Benson, W. H. (1988) The influence of humic acid on the toxicity and bioavailability of selected trace metals. *Aquat. Toxicol.* 13, 99-108.
- Stegeman, J. J.; Lech, J. J. (1991) Cytochrome P-450 monooxygenase systems in aquatic species: carcinogen metabolism and biomarkers for carcinogen and pollutant exposure. *Environ. Health Perspect.* 90, 101-109.
- Steinkühler, C.; Carrě, M.T.; Micheli, G.; Knoepfel, L.; Weser, U.; Rotilio, G. (1994) Copper-dependent metabolism of Cu,Zn-superoxide dismutase in human K562 cells. Lack of specific transcriptional activation and accumulation of a partially inactivated enzyme. *Biochem. J.* 302, 687-694.
- Stephenson, R. R. (1982) Aquatic toxicology of cypermethrin. I. Acute toxicity to some freshwater fish and invertebrates in laboratory tests. *Aquatic Toxicol.* 2, 175-184.
- Stien, X.; Risso, C.; Gnassia-Barelli, M.; Romeo, M.; Lafaurie, M. (1997) Effect of copper chloride in vitro and in vivo on the hepatic EROD activity in the fish *Dicentrarchus labrax*. *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 214-219.
- Stuijzand, S. C.; Jonker, M. J.; Van Ammelrooy, E.; Admiraal, W. (1999) Species-specific



- responses to metals in organically enriched river water, with emphasis on effects of humic acids. *Environ. Pollut.* 106, 115-121.
- Takagi, A.; Sai, K.; Umemura, T.; Hasegawa, R.; Kurokawa, Y. (1995) Inhibitory effects of vitamin E and ellagic acid on 8-hydroxy-deoxyguanosin formation in liver nuclear DNA of rats treated with 2-nitropropane. *Canc. Lett.* 91, 139-144.
- Trinder, P. (1969) Determination of blood glucose using an oxidase-peroxidase system with a non-carcinogenic chromogen. *J. Clin. Pathol.* 22, 158-161.
- Vance, R. E.; Teel, R. W. (1989) Effect of tannic acid on rat liver S9 mediated mutagenesis, metabolism and DNA binding of benzo[a]pyrene. *Cancer Lett.* 47, 37-44.
- Varanka, Zs.; Szegletes, T.; Szegletes, Zs.; Nemcsók, J.; Ábrahám, M. (1999) Relationship between the structure of some humic compounds and their inhibitory effects on carp catalase. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 63, 751-758.
- Varanka, Zs.; Rojik, I.; Varanka, I.; Nemcsók, J.; Ábrahám, M. (2001) Biochemical and morphological changes in carp (*Cyprinus carpio* L.) liver following exposure to copper sulfate and tannic acid. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 128, 467-478.
- Varanka, Zs.; Deér, K. A.; Rojik, I.; Varanka, I.; László, K.; Bartók, T.; Nemcsók, J.; Ábrahám, M. (2002) Influence of the polyphenolic tannic acid on the toxicity of the insecticide deltamethrin to fish. A comparative study examining both biochemical and cytopathological parameters. *Acta Biol. Hung.* (nyomdában).
- Vindimian, E.; Namour, P.; Migeon, B.; Garric, J. (1991) In situ Pollution induced cytochrome P450 activity of freshwater fish: barbel (*Barbus barbus*), chub (*Leuciscus cephalus*) and nase (*Chondostroma nasus*). *Aquat. Toxicol.* 21, 255-266.
- Vinson, J. A.; Dabbagh, Y. A.; Serry, M. M.; Jang, J. (1995) Plant flavonoids, especially tea flavonols, are powerful antioxidants using an in vitro oxidation model for heart disease. *J. Agric. Food. Chem.* 43, 2800-2802.
- 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, 30-34.
- Wendel, A. (1980) Glutathione peroxidase, *In: Enzymatic basis of detoxication*, vol. 1, (ed. Jakoby, W. B.). p. 333-353, Academic Press, New York.
- Wetzel, R. G. (1983) *Limnology*, 2<sup>nd</sup> Edition. p. 858, Saunders College Publ., Philadelphia.
- Wetzel, R. G. (1984) Detrital dissolved and particulate organic carbon functions in aquatic ecosystems. *Bull. Mar. Sci.* 35, 503-509.
- Wetzel, R. G. (1990) Land-water interfaces: metabolic and limnological indicators. Edgardo Baldi memorial lecture. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 24, 6-24.
- Wetzel, R. G. (1993) Humic compounds from wetlands: Complexation, inactivation, and reactivation of surface-bound and extracellular enzymes. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 25, 122-128.
- Winner, R. W.; Farrell, M. P. (1976) Acute and chronic toxicity of copper to four species of *Daphnia*. *J. Fish. Res. Bd. Can.* 33, 1685-1691.
- Winterbourn, C. C.; Metodiewa, D. (1999) Reactivity of biologically important thiol compounds with superoxide and hydrogen peroxide. *Free Rad. Biol. Med.* 27, 322-328.
- World Health Organisation (WHO) (1990) Environmental health criteria 97: deltamethrin. WHO, Geneva.
- Wood, A. W.; Huang, M.; Chang, R. L.; Newmark, H. L.; Lehr, R. E.; Yagi, H.; Sayer, J. M.; Jerina, D. M.; Conney, A. H. (1982) Inhibition of the mutagenicity bay-region diol epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons by naturally occurring plant phenols: Exceptional activity of ellagic acid. *Biochemistry.* 79, 5513-5517.
- Zhang, K.; Das, N. P. (1994) Inhibitory effects of plant polyphenols on rat liver glutathione S-transferases. *Biochem. Pharmacol.* 47, 2063-2068.
- Zitko, V.; McLeese, D. W.; Metcalfe, C. D.; Carson, W. G. (1979) Toxicity of permethrin, decamethrin, and related pyrethroids to salmon and lobster. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 21, 338-343.
- Yang, C.S.; Tu, Y.Y.; Koop, D.R.; Coon, M.J. (1985) Metabolism of nitrosamines by purified rabbit liver cytochrome P450 isozymes. *Cancer Res.* 45, 1140-1145.

## 9. PUBLIKÁCIÓS LISTA

### **közlemények:**

Ábrahám, M.; Banka, L.; Deér, K. A.; Hermes, E.; Jemnitzk, K.; Juhász, M.; Kotormán, M.; Krizsik, A.; Monostory, K.; **Varanka, Zs.**; Vereczkey, L. (1998) A Balaton vízminőségének biokémiai módszerekkel való folyamatos ellenőrzése. *A Balaton kutatásának 1997-es eredményei* (szerk.: Salánki János és Padisák Judit), MTA Veszprémi Területi Bizottsága és Miniszterelnöki Hivatal Balatoni Titkársága, Veszprém, 176-179.

Ábrahám, M.; Deér, K. A.; **Varanka, Zs.**; Said, K. A. (1999) A Balaton vízminőségének biokémiai módszerekkel való folyamatos ellenőrzése, *A Balaton kutatásának 1998-es eredményei* (szerk.: Salánki János és Padisák Judit), MTA Veszprémi Területi Bizottsága és Miniszterelnöki Hivatal, Veszprém, 149-153.

**Varanka, Zs.**; Szegletes, T.; Szegletes, Zs.; Nemcsók, J.; Ábrahám, M. (1999) Relationship between the structure of some humic compounds and their inhibitory effects on carp catalase. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 63, 751-758.

**Varanka, Zs.**, Rojik, I., Nemcsók, J., Ábrahám, M. (2001) Biochemical and morphological changes in carp (*Cyprinus carpio* L.) liver following exposure to copper sulfate and tannic acid. *Comp. Biochem. Physiol. C*, 128, 467-478.

**Varanka, Zs.**; Deér, K. A.; Rojik, I.; Varanka, I.; László, K.; Bartók, T.; Nemcsók, J., Ábrahám, M. (2002) Influence of the polyphenolic tannic acid on the toxicity of the insecticide deltamethrin to fish. A comparative study examining both biochemical and cytopathological parameters. *Acta Biol. Hung.* (nyomdában).

### **előadások:**

**Varanka, Zs.**; Szegletes, T. (1996) Fenol-karbonsavak in vitro hatása ponty (*Cyprinus carpio* L.) máj katalázra, *II. Nemzetközi Környezetvédelmi Szakmai Diákkonferencia*, Mezőtúr.

**Varanka, Zs.**; Szegletes, T. (1997) Szegletes, Zs.; Kotormán, M.; Nemcsók, J.; Ábrahám, M.: A comparative study of the inhibitory properties of humic derivatives on fish catalase, *5<sup>th</sup> Free Radical Research Conference*, Gödöllő.

Ábrahám, M.; Banka, L.; Deér, K. A.; Hermes, E.; Nemcsók, J.; Juhász, M.; Kotormán, M.; Krizsik, A.; Tóth, L.; **Varanka, Zs.** (1997) Novel methods for biomonitoring of water pollution in lake Balaton, *7<sup>th</sup> International Conference on Lakes Conservation and Management, Lacar '97*, San Martin de los Andes (Argentina).

Ábrahám, M.; **Varanka, Zs.**; Kotormán, M.; Nemcsók, J. (1999) Can tannin decrease the bioavailability of heavy metal ion and its toxic effect for fish? *Secotox 6<sup>th</sup> meeting of the Central and Eastern European regional section*, Balatonföldvár.

**poszterek:**

**Varanka, Zs.;** Szegletes, T.; Szegletes, Zs.; Kotormán, M.; Nemcsók, J.; Ábrahám, M. (1997) The in vitro effects of humic compounds on fish catalase, *Stress of life Conference*, Budapest.

Banka, L.; Deér, K. A.; **Varanka, Zs.;** Kotormán, M.; Nemcsók, J.; Ábrahám, M. (1997) Stress responses to Beta-naphtoflavone in different freshwater fish, *Stress of life Conference*, Budapest.

**Varanka, Zs.;** Kotormán, M.; Nemcsók, J.; Ábrahám, M. (1998) A fahéjsav és a tanninsav in vivo hatásának összehasonlítása ponty antioxidáns védekezőrendszerére. *XXVIII. Membrán-transzport konferencia*, Sümeg.

**Varanka, Zs.;** Kotormán, M.; Nemcsók, J.; Ábrahám, M. (1998) Derivatives of the plant cell wall. Pro- or antioxidants for fish?, *IX Biennial Meeting International Society for Free Radical Research*, Sao Paulo.

**Varanka, Zs.;** Deér, K. A.; Nemcsók, J.; Ábrahám, M.; Vereczkey, L. (1999) A comparative in vitro study of the pro/antioxidant properties of the copper(II)-ellagic acid and copper(II)-tannic acid complexes. Concentration dependence, *7<sup>th</sup> European ISSX Meeting*, Budapest.

Deér, K. A.; **Varanka, Zs.;** Banka, L.; Kotormán, M.; Nemcsók, J.; Ábrahám, M.; Vereczkey, L. (1999) The effects of crude oil on the cytochrome P450-dependent monooxygenase activity and antioxidant defence system of carp (*Cyprinus carpio* L.) liver, *7<sup>th</sup> European ISSX Meeting*, Budapest.

**Varanka, Zs.;** Kotormán, M.; Nemcsók, J.; Ábrahám, M. (1999) Can ellagic acid detoxify copper(II) in fish? *1999 SFRR (Europe) Summer Meeting*, Drezda (Németország).

**Varanka, Zs.;** Varanka, I.; Tölg, L.; Deér, K. A.; Nemcsók, J.; Ábrahám, M. (1999) The humic acid content of living water influences the antioxidant parameters of fish. *1999 SFRR (Europe) Summer Meeting*, Drezda (Németország).