

Halak antioxidatív enzimrendszerének biokémiai
vizsgálata fiziológias valamint patológias
körülmények között

Egyetemi doktori értekezés

VÍG ÉVA

Témavezető
dr. Nemcsók János
egyetemi docens

József Attila Tudományegyetem
Biokémiai Intézete
- 1988. -



Tartalomjegyzék

	old.
1. Bevezetés	1.
2. Irodalmi áttekintés	5.
2.1. Az oxigén szerepe az élő szervezetben	5.
2.2. Az oxigénből származtatható szabadgyökök	5.
2.3. A sejtekben felszabaduló szabadgyökök és reakcióik	7.
2.4. A molekuláris oxigéngyökök elleni védekező mechanizmusok	9.
2.4.1. A szuperoxid dizmutáz	9.
2.4.2. A kataláz	12.
2.4.3. A glutation peroxidáz	13.
2.4.4. Scavengerek, antioxidánsok	14.
2.5. A szabadgyökök kimutatása	15.
2.6. Patológias szabadgyök-reakciók	16.
2.7. A felhasznált növényvédőszer jellemzése	17.
2.7.1. A paraquat	17.
2.7.2. A réz-szulfát	21.
2.7.3. A metidation	23.
3. Anyagok és módszerek	27.
3.1. A kísérleti állatok szállítási és tartási körülményei	27.
3.2. Az alkalmazott kezelések	27.
3.3. A vérvétel, vörösvérsejtek preparálása	28.
3.4. Az önkontrollos módszer	29.
3.5. A szervkivonatok preparálása	29.
3.6. Az enzim aktivitások mérése	29.
3.7. A Lipid peroxidáció meghatározása	31.
3.8. A fehérje meghatározási módok	31.
3.9. A szelén meghatározása szövet- és vérmintákból	31.
3.10. A Cu, Zn - szuperoxid dizmutáz enzim tisztítása ponty májából	32.

4. Az eredmények ismertetése és értékelése	34.
4.1. A ponty máj szuperoxid dizmutáz enzim tisztítása és biokémiai jellemzése	34.
4.2. A szuperoxid dizmutáz enzim izoenzim képeinek meghatározása különböző halfajokból	48.
4.3. A szuperoxid dizmutáz, kataláz, glutation peroxidáz enzimek fiziológiai szerepének vizsgálata halakban.	51.
4.3.1. A szuperoxid dizmutáz, kataláz, glutation peroxidáz enzimek aktivitás megoszlásának vizsgálata különböző halfajokban	51.
4.3.2. A szuperoxid dizmutáz, kataláz, glutation peroxidáz enzimek kortól függő vizsgálata a pontyban	59.
4.4. A Lipid peroxidáció mértékének összehasonlító vizsgálata különböző halfajok egyes szerveiben ill. különböző korú pontyokban	62.
4.5. A szuperoxid dizmutáz, kataláz, glutation peroxidáz enzimek aktivitásának, valamint a lipid peroxidáció mértékének szezonális változása a pontyban	66.
4.6. A paraquat, a metidation, a réz-szulfát növényvédőszerrel kapcsolatos károsító hatásának vizsgálata a pontyban in vivo, és in vitro körülmények között	69.
4.7. A hipoxia valamint a hipoxiás körülmények között történt paraquat kezelés hatásának vizsgálata a ponty szuperoxid dizmutáz enzim aktivitására	79.
4.8. A szabadgyökök károsító hatásának vizsgálata a halak úszóhólyag gyulladással megbetegedésében	83.
4.9. A szelén antioxidáns hatásának vizsgálata a pontyban	87.
5. Összefoglalás	96.
6. A dolgozatban használt rövidítések	99.
7. A felhasznált irodalom jegyzéke	101.

1. Bevezetés

Az oxigén gyökök felismerése és szerepének kezdeti vizsgálata elsősorban fizikusok és kémikusok nevéhez fűződik. A biokémiai jelentőségüket McCord és Fridovich ismerték fel 1969-ben a szuperoxid (O_2^-) dizmutálását végző enzim a szuperoxid dizmutáz (SOD) szerepének kimutatásával. A biológiai és orvostudományi alkalmazás és a szabadgyökök különböző normál és kóros folyamatok létrehozásában betöltött szerepének bizonyítása lassan halad, bár napjainkban egyre szélesedik azon tudományterületek száma, ahol egyre nagyobb teret szentelnek a szabadgyökök élettani biokémiai folyamatokban betöltött szerepének vizsgálatára.

A szabadgyök-reakciók jelentőségének felismerését a biológiában a DNS szörkezetéhez, vagy a genetikai kód megismeréséhez fogható jelentőségűnek tartják. Az a vélemény, hogy az aerob élőlényekben általánosan meglévő, az aerob környezethez való alkalmazkodás feltételeit biztosító védekező mechanizmus az immunrendszerhez hasonló jelentőségű lehet.

Az élő és környezete alkotta szoros és dinamikus kölcsönhatásban a környezet változása, szennyeződése egyre nagyobb kihívást jelent az emberiség, így a kutatók számára is. Napjainkban egyre gyarapszik azon közlemények száma amelyek a környezetszennyező anyagoknak az élő szervezetekre kifejtett károsító hatásairól számolnak be (Clark és mtsai. 1966, Wedemeyer 1970, Nemcsók és mtsai 1985/a), közöttük azoké amelyek kutatási eredményei bebizonyították, hogy a kedvezőtlen környezet befolyással van az élőlények oxidatív anyagcseréjére, és patológiás szabadgyök reakciókat váltthat ki (Allen és mtsai. 1983, Matkovics és mtsai. 1980, 1983, Gibson és Cagen 1977, McCay és mtsai. 1983, Kendall és mtsai. 1987).

Közismert, hogy vizeink szennyeződéséhez komoly mértékben hozzájárulnak a mezőgazdaságban intenzív felhasználásra kerülő kémikáliák (Molnár és Szakolcai 1973), amelyek esőzések során bemosódva a vizekbe legdrasztikusabban a vízi ökoszisztémák stabilitását fenyegetik. Napjaink kutatási feladatai közé tartoznak azok a vizsgálatok, amelyek a környezetszennyezésnek a vízi élővilágra s nem utolsó sorban a táplálkozás szempontjából fontos halállományra kifejtett hatásait vizsgálják.

Tanszékünkön 9 éve folynak környezetvédelmi jellegű biokémiai kutatások halakon. Ennek alapján célkitűzésünk volt:

Az általunk korábbi biokémiai vizsgálatok kiterjesztése a halakban, eddig kevésbé vizsgált antioxidatív enzimrendszerre. Az antioxidatív védekezőmechanizmusban a szuperoxid dizmutáz (SOD), a kataláz, valamint a glutation peroxidáz (GP-áz) enzimek kulcsfontosságú szerepet játszanak. Ezek az enzimek felelősek elsősorban a szabadgyökök károsító hatásának kivédéséért. Mindezek figyelembevételével vizsgáltuk ezen enzimek előfordulását, a halak antioxidatív enzimrendszerében betöltött szerepét, (fiziológiai és körülmények között) valamint olyan káros környezeti tényezők hatását, amelyek potenciális veszélyt jelentenek napjainkban a természetes és mesterséges környezetben élő halak számára.

1. Összehasonlítottuk a halak SOD enzimének biokémiai jellemzőit, más fajokból eddig megismert SOD enzimek tulajdonságaival.

2. Meghatároztuk különböző halfajok antioxidáns enzimeinek szervenkénti megoszlását, valamint az egyes enzimek aktivitásának kortól, valamint évszaktól függő változását.

3. A szervezetben végbemenő szabadgyök reakciók következménye, hogy lipid peroxidációt (LPO) okoznak, veszélyeztetve ezzel a biológiai membránok és egyéb létfontosságú sejtalkotók normális mű-

ködéséhez szükséges integritását. Ezért minden esetben vizsgáltuk a LPO mértékét.

4. Néhány a mezőgazdasági termelésben intenzív felhasználásra kerülő kemikáliáról bebizonyosodott, hogy a szervezetbe jutva szabadgyökök keletkezése révén károsító hatást fejt ki. Ezt figyelembevéve vizsgáltuk a herbicidként ismert paraquat (PQ), az inszekticidként alkalmazott metidation (MD), és a fungicidként használt réz-szulfát (CuSO_4) hatását a halak antioxidáns enzimeire in vivo és in vitro körülmények között. A természetben ezen hatóanyagok együttes előfordulását modellezve kombinált kezeléseket is végeztünk.

5. A mérsékelt éghajlati övbe tartozó folyókban és tavakban - a víz hőmérséklet tavaszi és nyári felmelegedésekor és környezet-szennyeződések hatására - gyakran nagymértékben csökken a víz oldott oxigén tartalma, ami hipoxiás állapotot okozhat az ott élő vizi szervezetek, és így a halak számára is. A halastavak esetében sem ritka, hogy túlnépesedés következtében kevés oxigén áll a halak rendelkezésére. A szabadgyök-reakciók fiziológiás szinten tartásának alapfeltétele a környezet O_2 koncentrációjának optimális szintje. Minden ettől eltérő esetben nem kívánatos élettani biokémiai változások léphetnek fel. A hiperoxia szabadgyök-reakciókat fokozó hatásáról számos irodalmi adat áll rendelkezésünkre (Gregory és mtsai. 1974, Nerurkar és mtsai. 1978, Freeman és Crapo 1981, Guarnieri és mtsai. 1982). Ennek figyelembevételével vizsgáltuk a hipoxia hatását a halak oxidatív anyagcséréjére, valamint azt, hogyan fejt ki károsító hatását a PQ, oxigén szegény környezetben tartott halakban.

6. Egyre gyakoribb előfordulást mutat hazai vizeinkben élő halak esetében is az úszóhólyag gyulladás az Aerocystitis nevű betegség. A betegség kialakulására vonatkozóan a kutatók különböző állásponton vannak. A gyulladós megbetegedésekben egyes szerzők

szerepet tulajdonítanak a gyulladás helyén felszaporodó fagociták működésekor felszabaduló szabadgyököknek, valamint a H_2O_2 -nak (Fantone és Ward 1982, Petrone és mtsai. 1980). Ezért megvizsgáltuk, hogy a halak ezen gyulladásos megbetegedése kapcsolatba hozható e bizonyos szabad gyökös folyamatok fokozódásával a szervezetben, elsősorban az úszóhólyagban.

7. Az élő szervezetek az antioxidáns enzimeken kívül nem enzim-
mes védekezőmechanizmussal ún. scavenger vegyületekkel is rendelkeznek. Ilyen antioxidáns tulajdonsággal rendelkezik néhány vitamin, de ide sorolják a szelént (Se), is mivel a Se-dependens GP-áz működéséhez nélkülözhetetlen. Ezért végezetül megvizsgáltuk, hogy Se adással mérsékelhető e a halak szervezetében a patológiás esetben fokozódó szabadgyök felszabadulás mértéke.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Az oxigén szerepe az élő szervezetben

Az oxigén kettős szerepet játszik az élő szervezetben, miszerint az aerob szervezetek anyagcserefolyamatainak zavartalan lefolyásához nélkülözhetetlen elem, ugyanakkor azonban káros hatással is rendelkezik, mert a belőle keletkező gyökök intenzív károsító hatást fejtenek ki a biológiai rendszerekben.

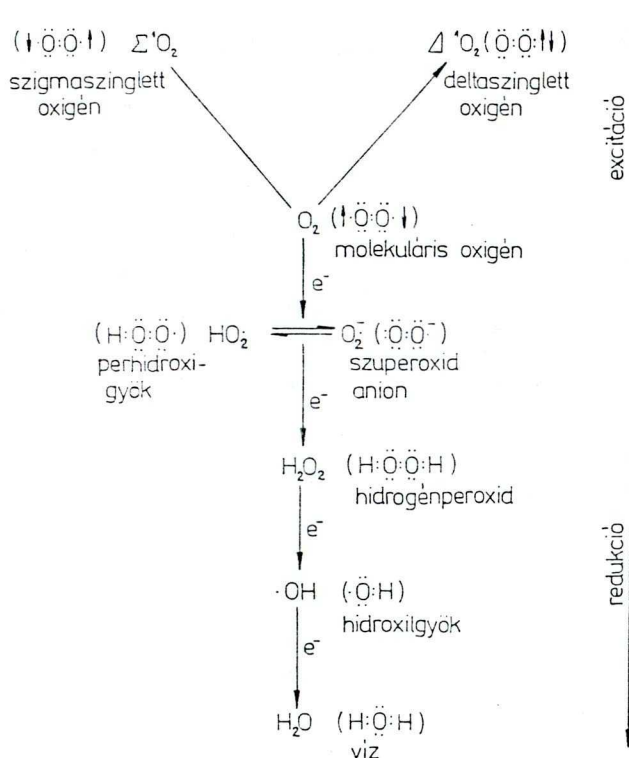
A fejlődés során az aerob szervezetekben kialakult egy védekező mechanizmus, melynek elsődleges szerepe ezen szabad gyökök károsító hatásának kivédése, mely biztosítja a fiziológias körülmények között keletkező reaktív oxigén intermedierek (ROI) hatástalanítását, s bizonyos mértékig védelmet nyújt a patológiás körülmények között fokozódó gyök felszabadulás esetén is.

2.2. Az oxigénből származtatható szabadgyökök

A szabadgyökök olyan molekulák, amelyek külső orbitáljukon egy egyedül álló, párosítatlan elektront tartalmaznak. Ez a párosítatlan elektron okozza a gyökök fokozott reaktivitását, s ezzel magyarázható rövid élettartamuk.

Az oxigén molekula kettős szabadgyöknek tekinthető ún. biradikális, mivel két párosítatlan elektront tartalmaz a külső elektronpályáján. Alap állapotban az oxigén gyenge oxidáns, mivel paralel spinű szabad elektronokat tartalmaz, belőle redukcióval ill. gerjesztéssel ROI-k keletkeznek. Az oxigén egy elektronos redukciója során szuperoxid aniongyök (O_2^-) keletkezik. Energiaabszorpcióval a molekuláris oxigén két párosítatlan elektronja közül az egyik nagyobb energiaszintre kerül, az így kialakult ener-

giával feltöltött oxigén molekulát szinglett oxigénnek nevezzük. Igen reaktív intermedier a hidroxil gyök ($\cdot\text{OH}$), amely a hidrogén-peroxidban (H_2O_2) lévő oxigén atomok kötéshasadásával keletkezik. Az oxigénből származtatható ROI-eket az 1. ábra foglalja össze.



1. ábra Az oxigén molekulából keletkező reaktív oxigén intermedierek (Klebanoff 1980)

Az oxigénből származtatható termékek közül, mint látható, nem mindegyik felel meg a gyök definíciójának (pl. szinglett oxigén, H_2O_2), azonban a szabad gyökökéhez mért reaktivitással rendelkeznek ezért szokás a szabadgyökökkel együtt reaktív oxigén intermedierek néven összefoglalni őket.

2.3. A sejtekben felszabaduló szabadgyökök és reakcióik

Oxigénből eredő szabadgyökök minden aerob anyagcseréjű szervezetben keletkeznek fiziológiás, valamint patológiás folyamatokban egyaránt. Számos enzim által katalizált folyamatban: xantin oxidáz, aldehid oxidázok, triptofán dioxigenáz, indolamin dioxigenáz, flavoprotein dehidrogenáz stb., autoxidációs folyamatokban: redukált \rightarrow oxidált ferredoxin, adrenalin \rightarrow adrenochrom, hemoglobin \rightarrow methemoglobin átalakulások során valamint a flavinok, tiolok, hidrokinonok autoxidációjakor, csak a legfontosabb reakciókat kiemelve (Lewis és mtsai. 1980, Freeman és mtsai 1982, Fridovich 1976, 1978, McCord és Fridovich 1978).

Jelentős szuperoxid felszabadulás történik a mitokondriális, mikroszómális elektrontranszportláncban, valamint a peroxiszómákban. Kimutatták, hogy a mitokondriumokban az oxigén redukciója során O_2^- -ök szabadulnak fel, a mitokondrium belső membránjában elhelyezkedő elektrontranszportlánc komponensek ha redukálódnak az oxigénnel reagálva O_2^- -öt képezhetnek. Kísérleti adatok szerint a O_2^- képződés fő helye az ubikinon-citokrom b régió, az ubiszemikinon autoxidációja következtében. A mitokondriumban létrejövő ún. "univalens szivárgás" során a citokrom-oxidázra átvitt elektronok 1-2%-a használódik fel O_2^- képzésre. Az így képződött O_2^- 80%-a H_2O_2 -dá alakul, mintegy 20%-a azonban kikerül a citoplazmába (Nohl és mtsai. 1978).

A mikroszómális elektrontranszportlánc citokrom P450 rendszerben a képződő O_2^- forrása P450Fe-szubsztrát- O_2^- komplex bomlása, ill. a citokrom P450 reduktáz flavoprotein, amely elektron átadással O_2^- -öt képez (Freeman 1982).

A peroxiszómák jelentős oxidáz aktivitással rendelkeznek (D-aminosavoxidáz, urát-oxidáz, L-alfa-hidroxisav-oxidáz, zsírsav-koenzim-A-oxidáz), amelynek következményeképpen jelentős a H_2O_2 képződés

bennük (Freeman és mtsi. 1982, Hornsby és mtsai. 1983).

Jelentős szabadgyök reakciók játszódnak le a fagocita sejtekben, ahol ROI-ek vesznek részt a fagociták oxigéndependens killing mechanizmusában. A fagocitákban inger hatására egy "respiratory burst"-nek nevezett reakciomechanizmus megy végbe, amely ROI-eket szolgáltat a fagociták target sejtjeinek elpusztításához (Babior 1978, Badwey és Karnovsky 1980, Fantone és Ward 1982, Klebanoff 1980).

A trombociták működésekor is keletkeznek ROI-ek, amelyek azonban nem a trombociták működéséhez szükségesek, hanem a bennük végbeműködő arachidonsav-metabolizmus melléktermékei (Porter 1980, Panagomala és Cornwell 1982).

A $O_2^{\cdot-}$, savas közegben igen könnyen protonálódik perhidroxigyökké: $H^+ + O_2^{\cdot-} \rightarrow HO_2^{\cdot}$. A HO_2^{\cdot} erősebb oxidáns mint a $O_2^{\cdot-}$ és citotoxikus (Fridovich 1983). A $O_2^{\cdot-}$ H_2O_2 -al is képes reakcióba lépni: $O_2^{\cdot-} + H_2O_2 \rightarrow O_2 + OH^- + \cdot OH$. Ezt az $\cdot OH$ képződési folyamatot Haber-Weiss-reakciónak nevezzük. Az élő szervezetben igen lassan megy végbe, fém katalízis hatására azonban a reakció felgyorsul.

A szabadgyök-reakciók általában láncreakciók, iniciációs lépésben keletkeznek, ún. propagációs lépések során reagálnak, majd végül valamilyen terminációs lépésen keresztül semmisülnek meg. A szabadgyökök egyik legkiterjedtebb károsító mechanizmusa a lipidek peroxidációs folyamata. Peroxidációra elsősorban a többszörösen telítetlen zsírsavak hajlamosak, mivel alfa-metilén szénatomjuk kötése meggyengült, de végbemegy telített zsírsavakon is. A lipid peroxidáció folyamatát valamilyen szabadgyök ($O_2^{\cdot-}$; $\cdot OH$) indítja el, amely a zsírsavlánchról elvon egy hidrogént, s a lipidből alkilgyök ($\cdot R$) keletkezik, amely oxigénnel reagálva peroxigyökké oxidálódik (ROO). A peroxigyök hidrogént von el a közeli molekulákról s metastabil lipid-hidroperoxidok ($ROOH$) keletkeznek. A hidroperoxid spontán elbomlásakor hidroxilgyökök ($\cdot OH$), ill. alkoxigyökök ($\cdot RO$) keletkeznek, melyek további láncreakciót indítanak el (Aust és Svingen 1982, Gutteridge és Kerry 1982).

A lipid peroxidációnak kitett fehérjék, enzimek polimerizációt szenvedhetnek, polipeptidlánc elhasadása s egyes aminosavak kémiai szerkezetének megváltozása mehet végbe. Különösen a gyűrűs ill. kéntartalmú aminosavak (triptofán, tirozin, fenilalanin, hisztidin, metionin, cisztein) érzékenyek (Freeman és Crapo 1982). A proteinek ill. lipidek károsodása súlyos membrán károsodáshoz vezethet, másrészt bizonyos enzimek aktivitásának elvesztése szintén súlyos következményekkel járhat (Tappel 1973).

2.4. A molekuláris oxigéngyökök elleni védekező mechanizmusok

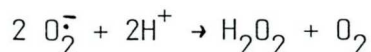
A molekuláris oxigéngyökök ellen kiterjedt védekező mechanizmussal rendelkezik a szervezet. Ebbe a védekező mechanizmusba egyrészt antioxidáns enzimeket, másrészt scavenger vegyületeket sorolunk, ill. fontos szerepe van a membrán és a molekuláris struktúra

általi kontrollnak. Az ROI-ek semlegesítésében elsődlegesen szerepet játszó enzimek a szuperoxid-dizmutáz (SOD), a kataláz, valamint a glutation peroxidáz (GP-áz).

A SOD elsősorban a O_2^- semlegesítéséért felelős, a kataláz és a GP-áz pedig a H_2O_2 ill. a GP-áz a szerves hidroperoxidok bontásáért.

2.4.1. A szuperoxid-dizmutáz

A szuperoxid-dizmutázok (EC 1.15.1.1.) O_2^- gyökök semlegesítését végzik az alábbi reakció séma szerint:



1939-ben izolálták az első réz tartalmú proteint szarvasmarha vörösvérsejéből melyet lokalizációja alapján eritrokupreinnek neveztek el. Az enzim biokémiai természetének felfedezésére azonban csak 30 évvel később került sor, McCord és Fridovich munkássága jóvoltából (McCord és Fridovich 1969).



Az eddig megismert SOD-okat három csoportba sorolhatjuk, Mn-, Fe-, Cu,Zn-SOD-ok. A Fe-SOD a prokariotákban és primitív eukariotákban (protozoák, eukariota algák) a Mn-SOD prokariotákban és eukariotákban, a Cu,Zn-SOD pedig csak eukariotákban fordul elő. Az eukariota sejtekben különös módon a citoplazmában Cu,Zn-SOD, míg a mitochondriumban Mn-SOD található (Weisiger és Fridovich 1973, Marklund 1978, Salin és mtsai. 1978, McCord és mtsi. 1977).

A Cu,Zn-SOD-ok kivétel nélkül dimer enzimek, 30.000 körüli mol. súllyal. Molekulánként 2-2g Cu ill, Zn atomot tartalmaznak (Fridovich 1974,1975). A Mn- és Fe-dizmutázok nem ilyen egységesek. Dimerek és tetramerek lehetnek, 40.000 ill. 80.000 körüli mol. súllyal. Ismerünk trimer enzimet is (Mycobacterium Mn-SOD) melynek mol.súlya 61.500. A Mn- ill. FeSOD-ok fémtartalma 0.5-1.0g atom/alegység (Fridovich 1975, Kusunose és mtsi., Oberley 1982).

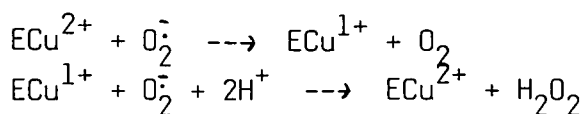
A Cu,Zn-SOD-ok izoelektromospontja néhány kivételtől eltekintve (Salin 1981) savas tartományba esik pH:4-6 közötti érték (Bannister és mtsai 1971, Keele és mtsi 1971, Albergoni és Cassini 1974, Hartz és Deutsch 1969).

Aminosavtartalmukra általában nagyon alacsony tirozin és triptofán valamint magas glicin tartalom jellemző. Ez utóbbi az enzim szerkezeti felépítésében domináló (50-60%) 3 lemez struktúrával függ össze (Richardson 1975).

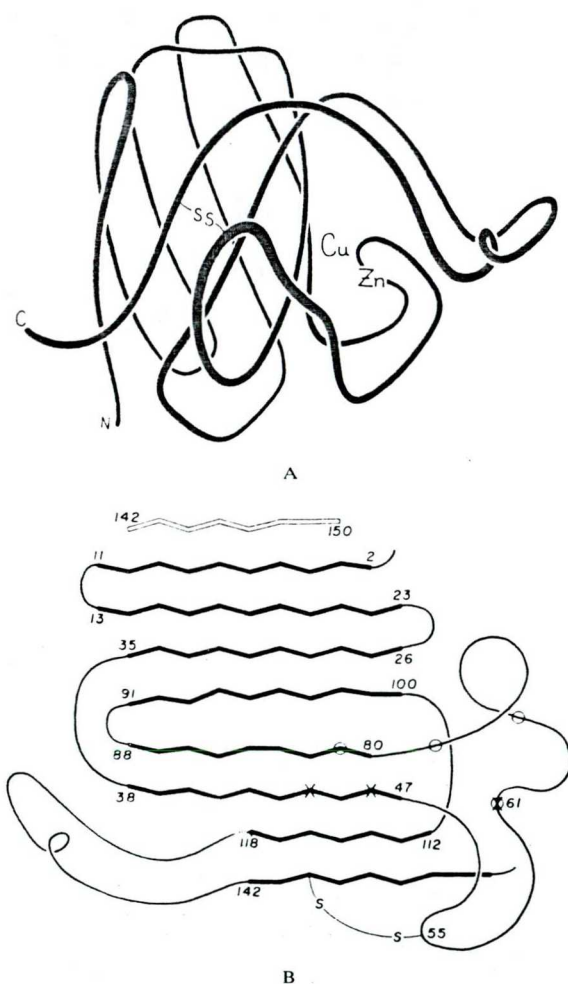
A Mn/Fe-SOD-ok esetében viszont alacsony glicin és magas tirozin ill. triptofán tartalom figyelhető meg, a legtöbb enzim izoelektromos pontja szintén savas pH:4-5 tartományba esik, néhány esetben közel semleges értéket találtak (Asayama és Burr 1983, Marklund 1978, Dougherty és mtsai 1978, Salin és mtsi 1978).

A Mn/Fe-SOD másodlagos szerkezetében a β struktúra csupán 20-30%-ot tesz ki, szemben a 45-60% α hélix struktúrával (Walker 1980).

A Cu,Zn-SOD-ok alegységeit diszulfid hidak kapcsolják össze ill. fontos szerepük van a glicin oldalláncoknak is. Az enzim aktivitásáért elsősorban a Cu a felelős:



A Zn atomnak stabilizáló szerepe van (McCord és Fridovich 1969, Forman és Fridovich 1973). A Cu ill. Zn atomok kötésében imidazol és karboxil csoportok vesznek részt. A Zn atom 3 db. hisztidin és 1 db. aszparagin oldallánchoz (His 61,69,78, Asp 81) a Cu atom pedig 4 db. hisztidin oldallánchoz kapcsolódik (His 44,46,61,118), melyek közül 3 egy síkban helyezkedik el míg a 4. a Cu és a Zn atom között hoz létre kapcsolatot.



2. ábra. A Cu,Zn-SOD szerkezete.
A:háromdimenziós,
B:kétdimenziós ábrázolásmód
(Richardson 1975)

A Mn-SOD-ban az alegységek kapcsolódásában a fém atom fontos szerepet játszik, ui. a fém atom elvonásával az enzim alegységeire disszociál. Aktívcentrumában hisztidin és triptofán oldallán-cok található (Brock és Harris 1977, Brock, Puget és Michelson 1974).

A Cu,Zn SOD alacsony pH-n EDTA-val szemben dializálva rezet veszít és inaktiválódik, az apoenzim azonban Cu hozzáadásával visszanyeri aktivitását. Az apoenzim foto-szenzitív oxidációra és diazoszulfonsavas kezelésre érzékeny, míg a holoenzim ellenálló az említett reagensekkel szemben (Forman és mtsi 1973). CN^- hatására inaktiválódik, ezzel szemben a Mn/Fe SOD CN^- -al szemben ellenálló (Fridovich 1975).

A SOD enzimek H_2O_2 érzékenységét kiterjedten vizsgálták, mivel az enzim reakciójának végterméke maga a H_2O_2 . Alapállapotban a réz Cu^{2+} állapotban van, magas H_2O_2 koncentráció esetén azonban Cu^{3+} -á alakul, ennek következtében az enzim elveszti aktivitását. In vivo ez az eset azonban nem áll fenn, mivel a kataláz ill. peroxidáz enzimek működése révén a H_2O_2 koncentráció alacsony a szervezetben (Hodgson és Fridovich 1975).

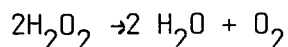
2.4.2. A Kataláz (EC 1.11.1.6.)

A szuperoxid dizmutáz mellett a kataláznak és a peroxidázoknak ezen belül elsősorban a glutation peroxidáznak van jelentős szerepe a ROI-ek semlegesítésében.

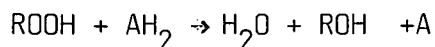
A kataláz kb. 240.000 mol.súlyú tetramer hemin-enzim, amelyben a Fe tartósan ferri állapotban van jelen. Megtalálható minden aerob mikroorganizmusban, növényi állati sejtekben egyaránt. A kataláz aktivitás mértéke igen eltérő az emlős állatok különböző szöveteiben, legmagasabb a májban és a vesében, igen alacsony a kötőszövetekben. A szöveti kataláz aktivitás a mitokondriumokban ill.

a peroxiszómákban lokalizálódik, míg a vörösvérsejtekben oldott állapotban van jelen (Deisseroth és Dounce 1970, Chance 1979).

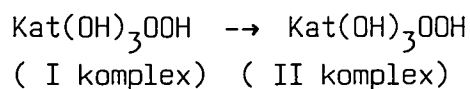
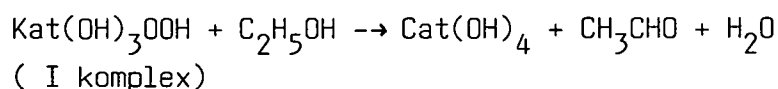
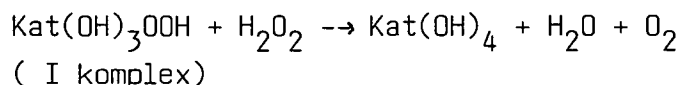
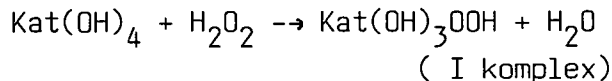
A szervezetben betöltött fiziológiai szerepe többoldalú, egyrészt szerepet játszik a H_2O_2 szint szabályzásában, miszerint a H_2O_2 bomlását katalizálja az alábbi reakció szerint:



Rendelkezik un. peroxidatív aktivitással is, miszerint H donorok (metanol, etanol, hangyasav, fenolok, aszkorbinsav, ferrocianid, pyrogallol) oxidációjára képes (Chance és Herbert 1950):



Mindkét esetben aktív kataláz- H_2O_2 -I komplex képződik amely a H_2O_2 bomlásához egy újabb H_2O_2 molekulából nyeri a H-t.

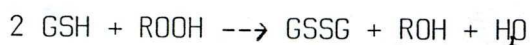


Az enzim nem telíthető szubsztrátjával, bizonyos H_2O_2 koncentráció felett (0.1mol/l) az enzim- H_2O_2 -I komplex átalakul inaktív II komplexé (Chance 1947).

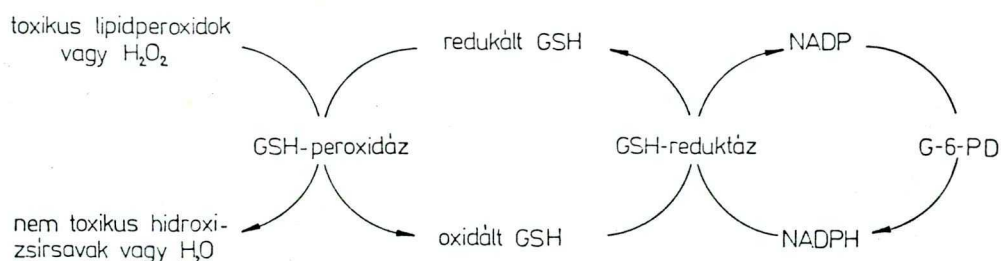
A vörösvértetekben a kataláz a GP-ázzal együtt védi a hemoglobint és más -SH proteineket az oxidációval szemben.

2.4.3. A glutation peroxidáz (EC 1.11.1.7.)

A glutation peroxidáz kb. 80.000 mol.súlyú 4 alegységből álló enzim, a következő reakciót katalizálja:



Működéséhez szelénre van szükség ezért Se dependens glutation peroxidáznak nevezik. Az utóbbi időben izoláltak egy szelén independens glutation peroxidázt is (SeiGP), ami azonban csak az organikus peroxidokat képes metabolizálni, a H_2O_2 -t nem. Valószínű, hogy a Se dependens GP-áz szerepe fontosabb a LPO elleni védelemben (Holland és mtsai. 1982). A GP-áz enzim specifitást mutat de a H_2O_2 -on kívül lipid-hidroperoxidokat is bont. Alacsony H_2O_2 koncentrációnál a GP-áz bontja a H_2O_2 -t, magasabb H_2O_2 koncentrációnál viszont a kataláz lép működésbe. Az enzim mindenkori szubsztrátja a redukált glutation (GSH). Kinetikai viselkedése ping-pong mechanizmushoz hasonlítható, az enzim először redukálja a lipid-peroxidot majd a GSH redukálásával nyeri vissza natív formáját (Chiu és mtsai 1976). Cohen és Hochstein (1963) szerint a H_2O_2 károsító hatásával szemben a GP-áz jelenti az elsődleges védelmet a katalázzal szemben. A GP-áznak a lipidperoxidációval szemben a szervezetben betöltött védekező szerepét a 3. ábra foglalja össze.



3. ábra A glutation peroxidáz rendszer működése (Chow és Tappel 1973)

2.4.4. A molekuláris oxigéngyökök elleni egyéb védelem (scavengerok, antioxidánsok)

A szervezetet a ROI-ekkel szemben természetes antioxidánsok, gyökfogók (scavengerek) is védik. Gyökfogók közé tartoznak a vitaminok közül az A-, E-, C-, K-vitamin, különböző tiol tartalmú vegyületek (cisztein, glutation, metionin) és nem utolsósorban a glükóz. A vitaminok közül elsősorban az E-vitamin antioxidáns hatása emelendő ki. Fontos szerepe van az LPO gátlásában és a szabadgyökök megkötésében (Barboriak és mtsai 1982, Bartosiewicz és mtsai 1983). A C-vitamin igen erős redukálószer. Peroxigyökökkel reagálva stabil monodehidro-aszkorbinsav keletkezik belőle. Direkt O_2^- és $\cdot OH$ scavenger hatása van (Halliwell és Foyer 1976). A tiol vegyületek közül a glutationnak jelentős szerepe van az enzimek -SH csoportjainak védelmében ill. a gyökreakciók gátlásában. A redukált glutationról feltételezik $\cdot OH$, O_2^- scavenger hatását is (Freeman és Crapo 1982).

A glükóz gyenge $\cdot OH$ scavenger hatású, de mivel fiziologias koncentrációja magas így hatása nem elhanyagolható (Sagone és mtsai 1983).

2.5. A szabadgyökök kimutatása

A szabadgyökök kimutatására számos módszert ismerünk. A teljesség igénye nélkül sorolunk fel néhányat a leginkább elterjedt módszerek közül.

A szuperoxid gyök: Kimutatására több kémiai reakció ismert. Legelterjedtebbek a ferri-citokrom c, az NBT (nitro-tetrazoliumkék) a tetranitrometán redukcióján valamint az adrenalin oxidációján alapuló meghatározási módok (McCord és Fridovich 1969, Misra és Fridovich 1972, Bors és mtsai. 1978). Kimutatható kemilumineszcencián (Vorhaben és Steele 1967). A szabadgyökök párosítatlan elektronjuk miatt gyenge mágneses erővel rendelkeznek így ESR (elektron spin rezonancia) spektroszkópiával kimutathatók (Knowles és mtsai. 1969, Jansen 1980).

A szuperoxid gyökök jelenléte kimutatható a SOD enzim aktivitás mérésén keresztül is.

A hidroxil gyök: A leggyakoribb OH kimutatási módok a következők. Metionálból $\cdot\text{OH}$ gyökök hatására etilén felszabadulás mérhető. P-nitro-dimetil anilin (NDA) $\cdot\text{OH}$ gyökök általi színreakciójával. Az alkoholok (etanol, mannitol, terc. butanol) jó $\cdot\text{OH}$ scavengerek, így a $\cdot\text{OH}$ gyökös reakciók alkohollal gátolhatók. Az ESR technika $\cdot\text{OH}$

gyökök kimutatására is alkalmas (Singh 1982).

A szinglett oxigén: Az egyik legelterjedtebb kémiai reakció a $^1\text{O}_2$ kimutatására a DPBF (1,3-difenilizobenzofurán)-DBB (dibenzoil benzén) átalakulás, ami $^1\text{O}_2$ hatására megy végbe. Általában a $^1\text{O}_2$ reakciói nátrium aziddal gátolhatók (Foot 1978) továbbá kimutathatók koleszterollal 3 β -hidroxi-5-koleszt-6-én-5-hidroperoxid képződésén keresztül (Singh 1982).

A hidrogén peroxid: Egyik kimutathatósági lehetőség, hogy a H_2O_2 savas közegben kálium jodidból jódot szabadít fel (Siigia 1966). Kimutatható továbbá kataláz enzimmel mivel az enzim a H_2O_2 bomlását katalizálja (Beauchamp és Fridovich 1970, Heikkila és Cabbat 1980).

2.6. Patológiás szabadgyök reakciók

Az utóbbi idők kutatási eredményei alapján a szabadgyökök károsító hatásának egyre nagyobb szerepet tulajdonít az orvostudomány. Számos olyan betegség ismert már, amelyben a szabadgyökök káros szerepe bizonyított. Szerepük van bizonyos gyulladásos megbetegedésekben, immunrendszeri elváltozásokban, tüdő-, máj-károsodásokban, szívbetegségekből, a gasztrointesztinális megbetegedésekben, diabetes kialakulásában, számos neurológiai elváltozásokban, szerepük lehet ateroszklerózis karcinogenezis, mutagenézis kialakulásában stb. (Fehér és Vereckei 1985).

Patológiás szabadgyök betegséget kiválthatnak káros környezeti tényezők, hipo- ill. hiperoxia (Bruce és mtsai 1981, Guarnieri és mtsai 1982), bizonyos vegyszerek. Az utóbbi évek kutatási eredményei által ismert, hogy számos a mezőgazdasági termelésben felhasználásra kerülő növényvédőszer patológiás szabadgyök reakciókat vált ki (Matkovics és mtsai 1980, 1983, Aldrich és mtsai 1983, Bus és Gibson 1982).

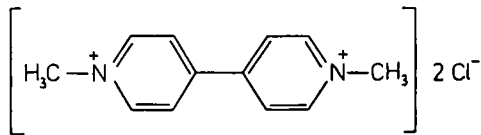
Nem utolsó sorban meg kell említeni a szabadgyököknek az öregedés folyamatában betöltött szerepét, amelyek jelentősége nem hagyható figyelmen kívül sem a genetikailag determinált öregedési folyamatban, sem a patológiás folyamatokban szerepet játszó szabadgyök reakciókkal kapcsolatban (Harman 1977,1980).

2.7 A felhasznált növényvédőszeres jellemzése

2.7.1. A paraquat

A kvaterner ammonium vegyületek toxicitását régen felismerték, a csoport néhány tagját -így például a cetil-trimetilammonium-bromidot- baktericid tulajdonságuk miatt fertőtlenítőszerként használták. Később észrevették, hogy a gombákra is erősen toxikusak, ilyen irányú gyakorlati felhasználásukat azonban lehetetlenné tette az a tény, hogy rövid idő alatt kiszárították a gazdanövényt (Metcalf 1971).

E felfedezés nyomán indult meg a kutatómunka az ICI-ban, melynek eredményeként 1958-ban bemutatták a bipyridilium herbicidok mindmáig legjelentősebb képviselőjét a paraquatot (PQ) (4. ábra).



4. ábra Paraquat-diklorid
(1,1'-dimetil-4,4'-bipiridilium-
-diklorid)

Mezőgazdasági felhasználása

A paraquat széleskörben alkalmazott növényi desszikáns. Hatásmódját tekintve átmenetet képez a kontakt és szisztémikus szerek között. Posztemergensen, levélherbicidként alkalmazzák, mivel a lombozatból gyorsan transzlokálódik. Nem szelektív hatású, minden növényt -amelynek felületére rápermetezik- pár napon belül elpusztít.

Hazánkban az alábbi PQ-tartalmú készítményeket forgalmazzák:

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

Ajánlott felhasználási mennyiségek GRAMOXONE-permetezés esetén 10.000 m²-re:

vetés előtti gyomirtásra 3.5-5.2 l (87.5-130 mg PQ/m²)
sík legelők felújításánál 7.8-12 l (195-300 mg PQ/m²)

Hatásmechanizmusa

A PQ vízben nagyon jól oldódik, majdnem teljesen ionokra diszszociál. A pozitív töltésű PQ-ion a növénybe bejutva a fotoszintetikus elektrontranszport gátlása révén fejti ki toxikus hatását. Mivel erős elektron akceptor, kompetitíve gátolja a ferredoxin redukcióját az által, hogy elvonja az elektronokat az I. fotoszintetikus rendszerből, s így megakadályozza a NADPH képződését (Varga 1980). A fenti folyamatban a PQ-ion viszonylag stabil, vízdékony szabadgyökké redukálódik -ezt a reakciót izolált növényi kloroplastokban is sikerült bemutatni- (Kearney és Kaufmann 1975). Oxigénhiány esetén ezek a szabadgyökök meglehetősen stabilak, oxigén jelenlétében azonban gyökionokká redukálódnak, melyek azonnal vissza oxidálódnak hidrogén-peroxid (H₂O₂) képződés mellett. A PQ

esetében általában a H_2O_2 -ot tekintik aktív fitotoxikus ágensnek, bár lehetséges, hogy más ideiglenes gyökintermedierek is résztvesznek a herbicid hatás kifejtésében.

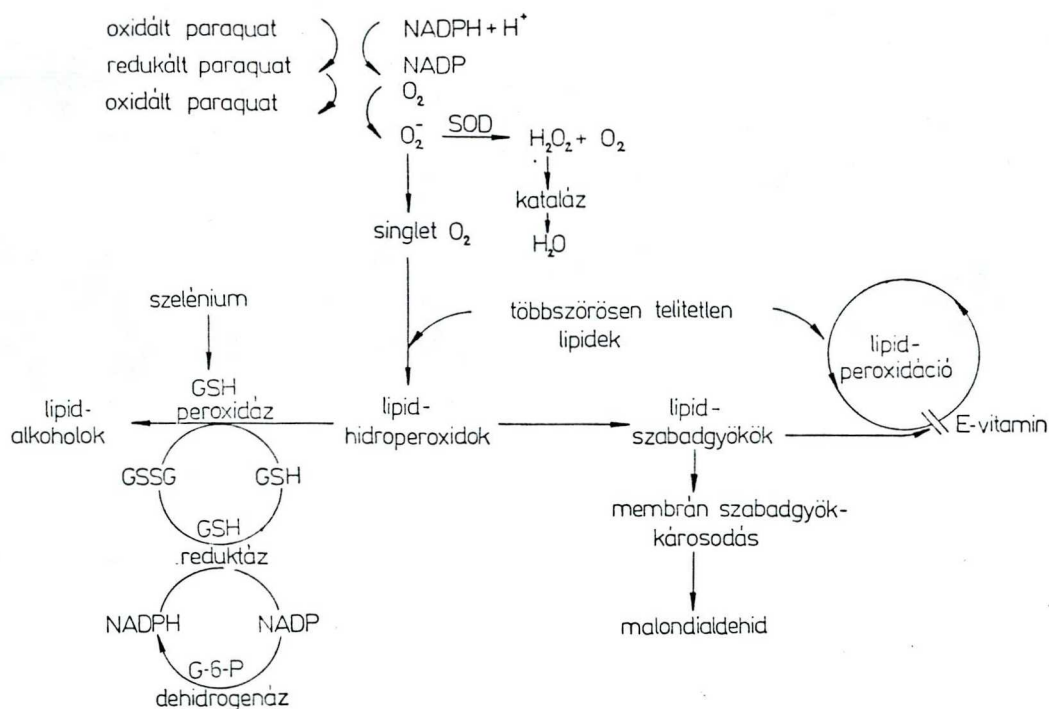
Emlősökben a PQ mind az intakt bőrön, mind a bélen keresztül nagyon gyengén szívódik fel -utóbbi esetben maximum a lenyelt dózis 5%-a (Conning és mtsai. 1969), azonban a szövetekben már 1 mg/kg PQ jelenléte letális lehet (Fisher és mtsai. 1971). A vérbe került PQ a plazmafehérjékhez gyengén kötődik,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

Rose és mtsai. (1977) különböző állatfajokból és emberből származó tüdőszelvényeket PQ tartalmú közegben inkubálva megállapították, hogy a hatóanyag aktívan koncentrálnak az alveolusok epitheliális sejtjeiben egy energia függő mechanizmus révén, melyet a noradrenalin, az 5-hidroxi-triptamin és bizonyos hisztamin-antagonisták gátolnak.

Ross és Krieger (1979) patkányokban subcutan PQ injekció hatására a következő mérgezési tüneteket figyelték meg: anoxia, tüdőödéma, veseelégtelenség, szívizomnekrózis, felfokozott érzékenység illetve a prosztaglandin és vércukorszint megváltozása. Ezekből a jelekből megállapítható, hogy a PQ-nak a tüdő az elsődleges, de nem egyedüli célszerve, hiszen jelentős mértékben károsította a szívet, a májat, a vesét és a mellékvesét is. A mérgezési tünetek sorrendjét vizsgálva Fairchter és Wilson (1975) megállapították, hogy a máj és a vese átmeneti működési zavara tapasztalható először, majd a tüdő pathológiás léziója, és az ennek következtében kialakuló légzési elégtelenség, mely a legtöbb esetben pusztuláshoz vezet.

Jelenlegi ismereteink szerint a PQ-nak nincs adekvát antidótuma. Valószínű, hogy a PQ toxikus hatását hasonlóképpen fejti ki emlősökben mint a gyomnövényekben. A sejtekbe bejutott PQ az emlősökben is NADPH igényes oxidációs-redukációs körfolyamaton megy keresztül, eközben az O_2 -ből nagyon aktív szabadgyökök keletkeznek,

melyek a sejtmembrán lipidjeit megtámadva lipid peroxidokat hoznak létre (5.ábra).



5.ábra A paraquat toxicitásának feltételezett mechanizmusa emlősökben (Bus és mtsai 1974)

Jelenlegi ismereteink szerint a PQ-toxicitás következményei:
 Lecsökken a NADH intracelluláris koncentrációja, ez meggátolja a zsírsavak ill. az összetett lipidek szintézisét (az utóbbiak alkotják a tüdő alveolusok falának védőrétegét) (Fisher 1977).
 A szabadgyökök által okozott lipid peroxidáció következtében károsodik a sejtmembrán és a sejt funkcionális integritása megszűnik.

A mitokondriális elektrontranszfer reakció szétkapcsolása miatt megszakad a sejt energiautánpótlása (Ogata és Hasegava 1978).

2.7.2. A réz-szulfát

Mezőgazdasági felhasználás

A réz-szulfátot a XVIII. században használták először csávázó-szerként búza kőüszög ellen, és herbicidként gabonában évelő gyomok irtására.

Felhasználása megnövekedett a bordói lé felfedezésével, melyet eredetének helyéről neveztek el. A szer tartalmaz CuSO_4 -ot (4,5 kg) és Ca(OH)_2 -ot (5,5 kg) (45 l) vízben oldva.

A "bordói lé" protektív, széles hatásspektrumú és hosszú ideig ható gombaölőszer, levél fungicidként alkalmazzák, igen hatásos a Peronospora, a Phytophthora és a Cercospora fajok ellen.

A réztartalmú fungicideket napjainkban is nagy mennyiségben használják a mezőgazdaságban. Hazánkban kereskedelmi forgalomban kapható réz-szulfátot tartalmazó szerek:

rézgalic: 96 % réz-szulfát

bordói lé: 45 % réz-szulfát

Hatásmechanizmusa

A fémtartalmú szerek gombaölő képessége összefügg a fémek kelátképző sajátosságával, ebben fontos szerepe van a kationok elektronegativitásának, ez meghatározza a fém kötésének stabilitását, a fémelátok és szulfidok állandóságát. A különböző fémek kationjainak relatív fungitoxicitása a következő sorrendben csökken:

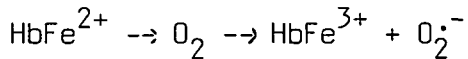
Ag, Hg, Cu, Cd, Cr, Ni, Pb, Co, Zn, Fe, Ca, (Cremllyn 1978.)

A toxicitás összefügg a fémek periódusos rendszerben elfoglalt helyével, hiszen a felsoroltak a Ca és az Pb kivételével a d mező elemei közé tartoznak.

A gombatoxicitás fokát valószínűleg az ionizálatlan fémkomplexek sejtfalhoz kapcsolódó kovalens vagy koordinációs kötéseinek erőssége szabja meg. (Lukens 1971.)

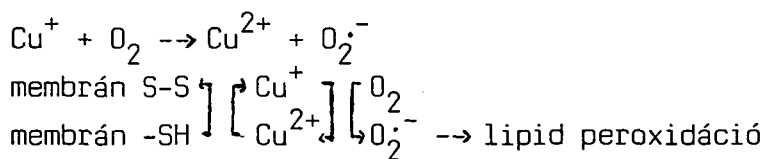
A rézvegyületek gombaölő hatása azon alapul, hogy a sejt belsejében jutó Cu^{2+} -ionok komplexeket képeznek a sejtek tiol- és aminos csoportjaival, így a gomba létfontosságú enzimeit és egyéb proteinek nem specifikus módon gátlódnak. (Nádasy 1979.)

A Cu-ról feltételezik (Hochstein és mtsai 1980.), hogy szabadgyök generáló hatással rendelkezik. A Cu serkenti a ferrohémoglobin autooxidációját methemoglonná, miközben szuperoxid gyökök szabadulnak fel.



Ezen szuperoxid gyökök dizmutációja révén H_2O_2 keletkezik, $2\text{O}_2^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2$, mely szintén citotoxikus.

Legfőbb károsító hatását a membránon fejti ki, miszerint a membrán szulfhidril csoportjait diszulfidokká oxidálja. Ebben a folyamatban a réz kupro formájának van szerepe, mely gyors folyamatban képes reagálni a molekuláris oxigénnel, mely folyamatban szintén szuperoxid gyökök szabadulnak fel.



A megnövekedett mértékű lipid peroxidáció a membrán destrukciójához vezet.

Kísérleti eredmények bizonyítják, hogy a réz toxikus hatása leginkább a vízi életmódot folytató állatokat fenyegeti. Singleton és Guthrie (1977.) 2ppm réz-szulfáttal kezelt víz baktériumflóráját a kontrolléval összehasonlítva megállapították, hogy a nehézfém csökkenti a baktériumtársulás stabilitását, felborítja a populációban kialakult természetes egyensúlyt.

A réz-szennyezés nem feltétlenül okoz letalitást, azonban szinte minden esetben kedvezőtlenül befolyásolja a vízi élőlények anyagcserefolyamatait. Kis keménységű, gyengén savas (pH 6) vízben 0.002 ppm Cu^{2+} -ion 25 %-a (!) csökkentette 5-6 g-os szivárványos pisztrángok (*Salmo gairdneri*) növekedésének mértékét (Wainwood és Beamish 1978.)

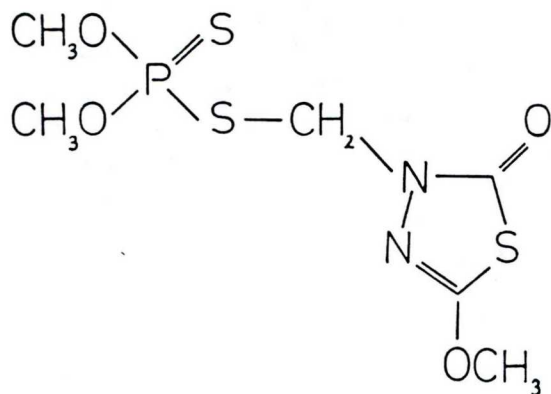
Yamamoto és mtsai (1977.) két hétig 0.1 ppm réz-szulfát tartalmú vízben tartott ponty létfontosságú szerveinek réztartalmát a kontrolléval összevetve azt tapasztalták, hogy a Hepatopnakreász, a kopoltyúk, a bél, és a vese réztartalma 2-6-szorosára megnövekedett. Az ilyen mértékű réz feldúsulás a hal legfontosabb szerveiben valószínűleg gátolja az alapvető létfenntartó mechanizmusok normális menetét.

2.7.3. A metidation

Mezőgazdasági felhasználás

Magyarországon a metidationt (MD) a gyümölcsösök és szőlő rovarkártevői, a burgonyabogár és a pajzstetvek ellen alkalmazzák (1.táblázat).

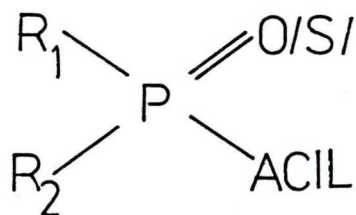
Nagyüzemi felhasználásra engedélyezett készítmény: Ultracid 40WP: 40 % metidation (6. ábra) A szer alkalmazása esetén a munkaegészségügyi várakozási idő 8 nap, az ételmezés-egészségügyi várakozási idő 28 nap, a hatóanyag engedélyezett maradék értéke 0.2 ppm.



6. ábra A metidation (MD) képlete (S-2,3-dihidro-5- metoxi-2-oxo-1,3,4-tiadiazol-e-ilmetil-0,0-dimetil-foszforoditionát

Biológiailag aktív egy szerves foszforvegyület, ha:

- 5 vegyértékű központi foszforatómot tartalmaz
- foszforatómhoz kettős kötéssel oxigén, vagy kén atom kapcsolódik
- R₁, R₂ lehet alkíl, alkoxi, vagy aminocsoport
- az acil csoport lehet savmaradék (szervetlen vagy szerves), lehet savas karakterű csoport, pl.: enol-merkaptán.



FELHASZNÁLÁSI HELY	AJÁNLOTT SZERKONC. A PERMETLÉBEN (mg/l)	AJÁNLOTT PERMETLÉ MENNY.: 1000 m ² -re (1)	1m ² -re JUTÓ HATÓANYAG MENNY: AZ AJÁNLÁS SZERINT (mg)
ALMÁS	750-1000	2000	60-80
ŐSZIBARACKOS	750-1000	1400	42-56
BORSÓVETŐMAG TERMESZTÉS	2000	-	-
KUKORICÁS	1500-2000	1000	60-80

1. táblázat: Ajánlások az Ultracid 40 WP nagyüzemi felhasználásához.
(Kónya és mtsai 1982.)

Hatásmechanizmusa

A Ciba-Geigy cég 1966-ban mutatta be az új, szerves foszforsav-észter típusú inszekticid hatóanyagát, mely a metidation fantázia nevet kapta.

Az MD atkaölő tulajdonsággal rendelkező lokoszisztémikus, azaz a növények epidermiszében behatolni képes, de onnan tovább nem transzportálódó rovarölő szer. Ahhoz, hogy AChE- bénító hatását kifejthesse - ugyanúgy mint a többi P=S kötéssel rendelkező, un. tiofoszforsav-észternek - ezt megelőzően oxidatív deszulfuráláson kell keresztül mennie. Ezt az átalakulást gerincesekben és rovarokban az un. kevert funkciójú oxidáz enzimek, míg a növényekben valószínűleg a peroxidáz enzimek katalizálják (Eto, 1974).

Ez az aktiválódás a legtöbb esetben - így a MD - nál is - a lebontás első lépcsője is.

Chopade és Dauterman (1981.) patkány és egér máj mikroszómális frakciójában vizsgálták, hogy a minimális különbségektől eltekintve a fő utak mindkét fajnál azonosak voltak: a P=S kötés enzimatis hidrolízise, a heterociklusos gyűrű leszakítása, az oxidatív deszulfurálás, illetve a demetilézés.

A folyamatban GSH-ra és NADPH-ra van szükség, így feltételezhető, hogy a szervezetbe jutva az antioxidatív enzimrendszerre is hatással lehet.

3. Anyagok és módszerek

3.1. A kísérleti állatok szállítási és tartási körülményei

A kísérleti állatokat ponty (*Cuprinus carpio* L.), harcsa (*Silurus glanis* L.), kecsege (*Acipenser ruthenus* L.) a szarvasi Haltenyésztési Kutató Intézettől, valamint a tápéi Halászati Termelőszövetkezettől, a szivárványos pisztrángot (*Salmo gairdneri* R.), az ódörögi Pisztrángtenyésztő Termelőszövetkezettől szereztük be. A halakat levegőztetett tartályban szállítottuk. A kísérletekhez városi vizet tartalmazó akváriumokba helyeztük őket, melyek oxigén telítettségét sűrített levegő átporlasztásával biztosítottuk. Mérettől függően 3-5 db. hal került egy-egy 100 l-es akváriumba. A kísérletet megelőzően 1 hétig hagytuk a halakat adaptálódni a megváltozott környezethez.

3.2. Az alkalmazott kezelések

Az *in vivo* kísérletekhez 3-nyaras 800-1000g súlyú ponty egyedeket használtunk. A kezelések során a PQ, MD, CuSO₄ növényvédőszeres esetében a kívánt hatóanyag koncentráció eléréséhez megfelelő mennyiségű törzsoldatot mértünk be az akváriumok vizébe. 96-órás egyedi és kombinált kezeléseket végeztünk, a következő koncentrációkat alkalmaztuk:

paraquat	2.5, 5.0, 10.0 mg/l
réz-szulfát	2.5, 5.0, 10.0 mg/l
metidathion	1.0, 2.0, 4.0 mg/l

A szelénrel történt kezeléseket esetében a kívánt szelén mennyiséget fiziologiás sóoldatban (0.62%) oldva a hasüregbe fecskendeztük.

50.0 ill. 100 μg Se/testsúly kg (Na_2SeO_3 , REANAL) koncentrációkat alkalmaztunk.

A hipoxia hatásának vizsgálatához azokban az akváriumokban amelyekben hipoxiás állapotot kívántunk előidézni lekapcsoltuk a sűrített levegőt. Az akváriumokban kialakult O_2 koncentrációt Winkler-féle módosított oxigén meghatározási módszerrel mértük (Antalfi és Tölg 1971).

Az in vitro kísérletek során a vizsgálni kívánt növényvédőszer megfelelő törzsoldatát adtuk a reakcióelegyhez. Ebben az esetben 1-100 mg/l koncentráció-határok között alkalmaztuk az egyes szereket.

Az akváriumi kísérletekhez a kereskedelmi forgalomban Ultracid 40 WP (MD) ill. Gramoxone (PQ, 25% hatóanyag koncentráció) néven ismert növényvédőszeret ill. $\text{Cu}\cdot\text{So}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ -t (a.l.t) alkalmaztunk. Az in vitro kezelések során a gramoxon helyett tiszta FLUKA gyártmányú PQ-ot használtunk.

Az in vivo kísérleteket a késő őszi, téli időszakban végeztük 10+-1C-os hőmérsékletű vízben.

3.3. A vérvétel, vörösvérsejtek preparálása

A szükséges mennyiségű vérmintát (2 ml) a halak farki vénájából vettük le, heparinnal átöblített fecskendővel. A vérmintákat két részre osztottuk, 1 ml-t a Se meghatározáshoz jodszámlombikba mértünk be, a másik 1 ml-t vörösvérsejtek preparálására használtuk fel, melyet a következőképpen végeztünk: A teljes vért 3000 g-vel 10 percig centrifugáltuk, majd a szérumot eltávolítottuk. A vörösvérsejteket 3x mostuk 0.62%-os sóoldattal, majd 1 térfogat d.víz hozzáadásával lizáltuk a sejteket. Ezután 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DN-áz-t adtunk a lizátumhoz és 37 C-on 2h-át inkubáltuk. A DN-ázzal való inkubálásra azért van szükség, mert a halak vörösvérsejtjei magvasak, s a kiszabaduló DNS-től gélszerű állaga lenne az oldatnak (Mazeaud és mtsi 1979). A mintákat felhasználásig fagyasztva tároltuk.

3.4. Az önkontrollos módszer

A vérből történő mérések során önkontrollos módszert alkalmaztunk. Ez azt jelenti, hogy minden halból vettünk vért a kísérlet kezdetén (0 perces minták), s a kísérlet végeztével a kapott értékeket az egyes egyedekre vonatkozó 0 perces értékek %-ában fejeztük ki, majd ezeket az értékeket átlagoltuk. Ily módon lehetőség nyílik arra, hogy a mindenkori kísérlet során bekövetkező változásokat az egyes egyedek 0 percben mért saját értékeihez hasonlíthassuk,, ezzel nagymértékben lecsökkenthető a szórás, ami egyéb esetben az igen széles határok között mozgó egyedi eltérésekből adódik. Kezelt és kontroll csoport egyidejű indításával jól elkülöníthető, hogy a mért változás szerhatás, vagy egyéb tényező okozta változás eredménye.

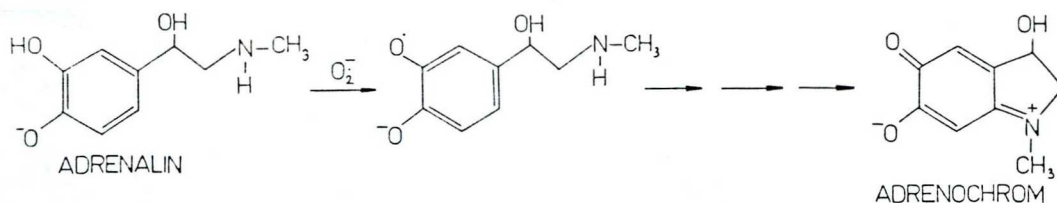
3.5. A szervkivonatok preparálása

A halakat kiemelve az akváriumból koponyafedőjükre mért csapással megbénítottuk, majd hasüregüket felnyitottuk és szerveiket eltávolítottuk. Az agyat a koponyafedő felnyitása után óvatosan kiemeltük. A szerveket hideg fiziológiás sóoldatban többször átmosva kivérettük, majd 1:5 arányban homogenizáltuk. A homogenizátumot hidegszobában centrifugáltuk (10.000g/10 perc), majd a kapott felülúszót mérésig fagyasztva tároltuk.

3.6. Az enzimaktivitások mérése

A SOD enzim aktivitását Misra és Fridovich (1972) módszerével mértük. A szervek esetében a homogenizátumból centrifugálással nyert felülúszóból mértünk, a hemolizátum esetében 300 ul hemolizátumhoz 700 ul deszt.vizet valamint 0.5ml etilalkoholt és 0.25 ml chloroformot adtunk a hemoglobin kicsapására, majd centrifugáltuk (15.000 g/2 perc), s a kapott felülúszóból mértünk.

Az enzimaktivitás mérés az adrenalin autoxidációján alapul. Lugos pH-n (pH:10.2) levegő jelenlétében az adrenalin spontán oxidálódik (7.ábra).



7. ábra Az adrenalin oxidációja (Bors és mtsai.1978)

A folyamatban O_2^- vesznek részt, amelyek protont vonnak el az adrenalin molekulából, aminek eredményeképpen több lépéses reakcióban adrenochrome keletkezik. A folyamat 480 nm-en spektrofotometriásan mérhető. Mivel szabadgyökök által generált folyamatról van szó, a SOD enzim aktivitásától függően a folyamat különböző mértékben gátolható.

Egy enzim egységnek tekintjük azt a SOD enzim aktivitást amely 50 %-os gátlást fejt ki a kontroll (adrenalin--afrenochrome) reakcióhoz képest.

A Mn-SOD aktivitást 5×10^{-3} M KCN jelenlétében mértük (Beauchamp, és Fridovich 1971)

A kataláz aktivitást Beers és Sizer (1952) módszerével határoztuk meg. A módszer a H_2O_2 kataláz aktivitás mértékétől függő fogyását alapul. A H_2O_2 fogyást 25 C-on 240 nM-en mértük.

Az enzim aktivitást Bergmeyer egységben fejeztük ki. 1 B.U. egyenlő 1g elbontott H_2O_2 /perc.

A glutation peroxidáz aktivitást az enzim által elbontott szubsztrát, a redukált glutation fogyása alapján határoztuk meg Ellman-reagenssel. Cumene hidroperoxidot használtunk peroxid forrásként (Chiu és mtsai 1976, Sedlak és Lindsey 1968).

Az enzim aktivitást 1 μ mol elbontott GSH/perc enzim egységben fejeztük ki.

3.7. A lipid peroxidáció meghatározása

A lipid peroxidációt Placer és mtsai. (1966), valamint Nair és Turner (1984) által leírt módszer alapján határoztuk meg, a lipid peroxidáció során felszabaduló malondialdehid (MDA) 2-tiobarbitur-savval történő reakciója alapján.

A lipid peroxidáció mértékét nM MDA/g nedves szövet ill. ml hemolizátum értékekben fejeztük ki.

3.8. A fehérje meghatározási módok

Az alkalmazott kromatográfiás enzimsztitási lépéseknél az egyes frakciók fehérjetartalmát a fehérjék UV abszorpciója alapján E 280-on mértük. A pontos fehérje meghatározást, valamint a vizsgált enzimek specifikus aktivitásához szükséges fehérjetartalmat Lowry és mtsai. (1951) által kidolgozott fehérje meghatározási módszerrel mértük.

3.9. A szelén tartalom meghatározása szövet és vér mintákból.

A szelén meghatározást Michael és White (1975) valamint Alftan (1984) által kidolgozott módszer alapján határoztuk meg. A módszer lényege, hogy a szerves oldószerekkel történt emésztés útján feltárt szelént diaminonaftalinnal (DAN) komplexbe vesszük,

majd ciklahexánba átrázzuk. A komplex fluorimetriásan mérhető 369/518 gerjesztő és abszorpciós hullámhosszak mellett. A módszer igen érzékeny, ng-nyi mennyiségű szelén kimutatására alkalmas. A méréseket PERKIN-ELMER MPF-44B típusu fluoreszcens spektrofotométerrel végeztük.

3.10. A Cu,Zn-SOD enzim tisztítása ponty májból

A SOD enzimet Keele és mtsai. (1970), Matkovics és Szabó (1982), Asayama és Burr, (1983) által leírt módszerek alapján tisztítottuk. A leölt állatok máját eltávolítottuk, összegyűjtöttük, Hideg 0.62%-os fiz.sóoldatban kivérettük, majd 0.1 M pH: 7.8 foszfát pufferban 1:5 arányban homogenizáltuk. A homogenizátumot 4M ecetsavval savanyítottuk pH:4.8-ra, majd centrifugáltuk (3.000 g/2h). A kapott felülúszó pH:-jét visszaállítottuk 5M NaOH-al pH: 7.8-ra, majd ammónium szulfáttal telítettük. Először 60%-ra (390 g/l), majd 4 C°-on állni hagytuk egy éjszakán át. Centrifugáltuk 3000g-vel 2 órán át, majd a felülúszót tovább sóztuk 105 g/l ammónium-szulfáttal, állni hagytuk és centrifugáltuk az előbbihez hasonló módon. Az üledéket minimális térfogatú 0.1 M pH:7.8 foszfát pufferban oldottuk, s ugyanezen pufferral szemben dializálva sómentesítettük.

Ezután 50 C°-on inkubáltuk 1h-át. Az így kivált csapadékot eltávolítottuk, s a felülúszóhoz 1:0.2 térf. chloroformot adtunk. 30 perces rázatás után a csapadékot leszűrtük, s a mintát dializáltuk először 0.01 M pH:7.8 foszfát pufferral, majd 0,005 M foszfát pufferral szemben, 24 órán át. A dializátumot DEAE-32 (Pharmacia) ioncserélő oszlopra (4cm x 20cm) vittük fel, melyet előzőleg 0.005 M pH:7.8 foszfát pufferral equilibráltunk. Az eluálást 0.005 M - 0.1 M lineáris foszfát puffer gradienssel végeztük. A felhígult mintát PAGE-val (polietilén-glikol,4000,Fluka) tömörítettük be. A további tisztítást gélkromatográfiás módszerrel végeztük. Oszlopméret 14 cm x 54 cm, töltetként Sephadex G-75 (Pharmacia) gélszűrőt használtunk. Az eluens 0.05 M pH:7.8 foszfát puf-

fer + 0.1 M KCL oldat volt. 3 ml-es frakciókat szedtünk. A kromatográfiás lépéseket is szobahőmérsékleten végeztük.

A fehérje és az aktivitás méréseket a már korábban leírt módszerek felhasználásával mértük.

A tisztított enzim-preparátum tisztaságának ellenőrzésére, ill. izoelektromos pontjának meghatározására izoelektromos fókuszálást végeztünk (Baumann és Chrambach 1976). Anolitiként 0.1 M H_2SO_4 -at, katolitiként 0.1 M NaOH -ot alkalmaztunk. Carrier amphotiként REANAL gyártmányú pH:3.5-10, ill. pH:4-6 Analytot használtunk a gradiens gélek kialakításához. A gélekben kialakult pH gradienst úgy határoztuk meg, hogy a géleket 16 egyenlő részre feldaraboltuk, az egyes darabokat 0.5 ml 0,025 M KCL oldatba helyeztük, s Beckman mikroelektroddal megmértük a pH-ját.

A fehérje festéshez a géleket 12.5 %-os TCA-ba helyeztük (Diezel és mtsai. 1972), majd 30 perc elteltével 2 ml 0.25 %-os Coomassie Brilliant Blue-t (REANAL) adtunk a mintákhoz. Az enzim aktivitás festését Beauchamp és Fridovich (1971) módszere alapján végeztük. A Cu,Zn-SOD - Mn SOD aktivitások elkülönítésére a festékkoldathoz 5×10^{-3} M KCN-ot adtunk. A géleket 0.1 M ecetsavban tároltuk.

A molekulásúly meghatározást Weber és Osborn (1969) módszere alapján végeztük. A következő molekulásúly standardokat használtuk: Ribonukleáz (12.700 D), Mioglobin (17.800 D), Kimotripszinogén (25.700 D), Ovalbumin (43.500 D), BSA (68.000 D) (FLUKA, REANAL).

Az aminosav összetétel meghatározásához a mintákat először 70 °C-on beszárítottuk, majd 6 M HCL-ban 110 °C-on vákuumban hidrolizáltuk. Az analízist JEOL-6AH típusú automata aminosav analizátorral végeztük (Simpson 1976).

A Cu és Zn tartalmat a fehérjék vizes oldatából atomabszorpciós analízissel határoztuk meg.

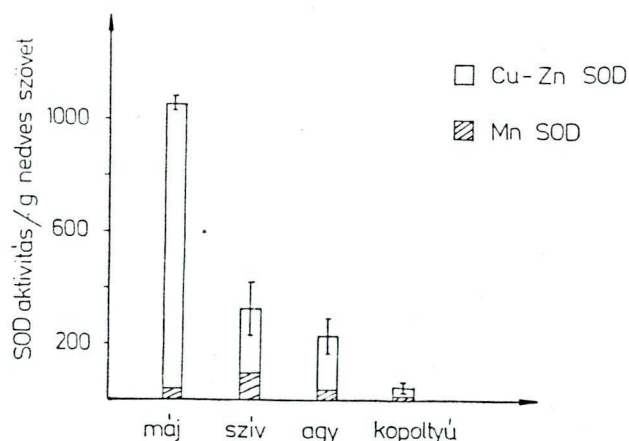
4. Az eredmények ismertetése és értékelése

4.1. A szuperoxid dizmutáz (SOD) enzim tisztítása ponty (*Cyprinus carpio* L.) májból és biokémiai jellemzése

A ponty általunk vizsgált szervei közül a legmagasabb aktivitást a májban találtuk (1080+-55 E/g nedves szövet), a szívben, agyban, kopoltyúban lényegesen alacsonyabb aktivitásokat mértünk (358+-90, 245+-42, 48+-12 E/g nedves szövet értékekben számolva (8.ábra).

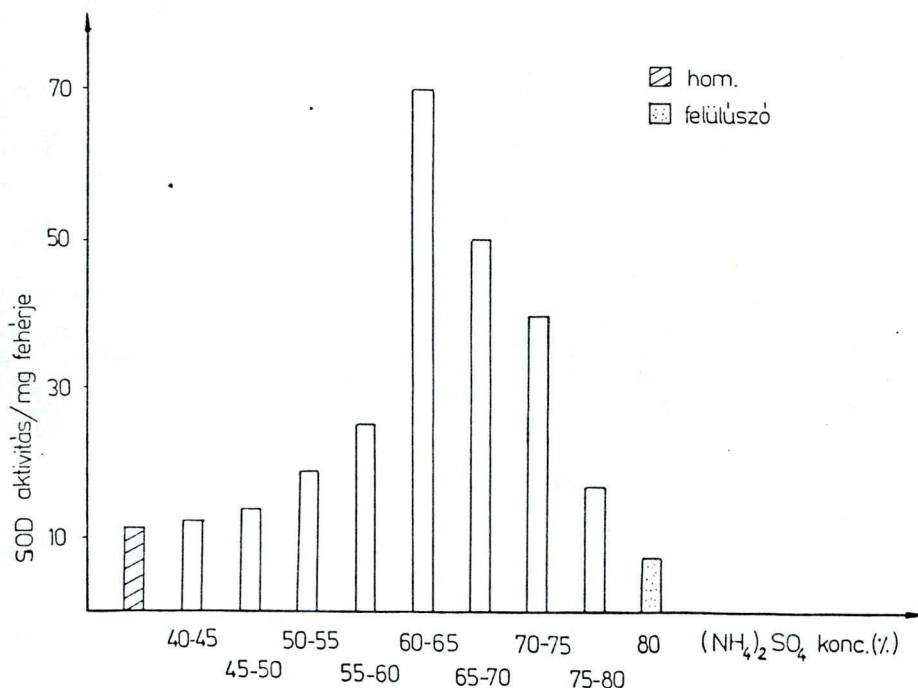
Ez összhangban áll azon irodalmi ismereteinkel miszerint a máj az egyik legjobb antioxidáns ellátottságú szerv (Weisiger és Fridovich 1973, Matkovics és mtsai. 1977, Mazeaud és mtsai. 1979). Egyik fő funkciója a toxicus anyagok detoxifikálása, amely során aktív oxigén intermedierek szabadulnak fel (Reinolds és mtsai. Ribiere és mtsai. 1983), de a csontoshalak esetében komplett hidrolizáló rendszert tartalmaz mivel a pankreasszal együtt un. hepatopankreaszt alkot (Lagler és mtsai. 1977).

A Mn-SOD-nak a Cu,Zn-SOD-hoz viszonyított mennyisége igen alacsony volt a vizsgált szövetekben (8.ábra). A szervenkénti aktivitás megoszlás alapján választottuk a májat a SOD enzim tisztítására.



8. ábra. A szuperoxid dizmutáz (SOD) aktivitásának szervenkénti megoszlása a pontyban (*Cyprinus carpio* L.). (Az eredmények 10 minta átlagát +- S.D.jelentik)

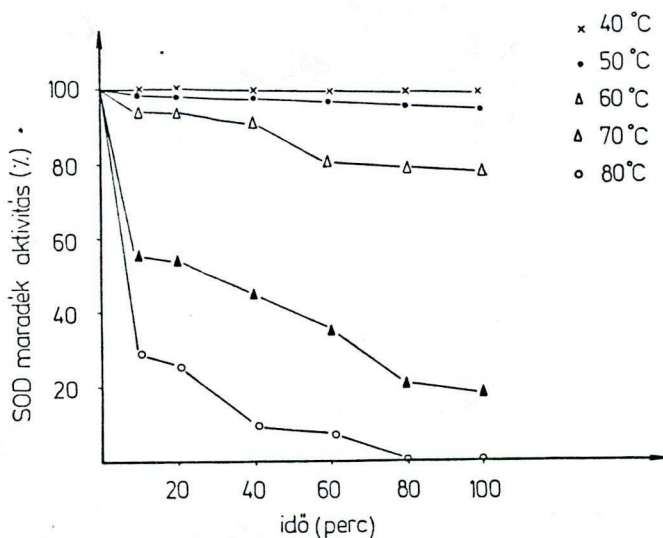
A homogenizátumból nyert felülúszó ammónium-szulfáttal történő telítésénél a 60-75%-os telítési határok látszottak optimálisnak az említett enzim kicsapására. A telítési előkísérletek eredményét ábrázolja a 9.ábra.



9.ábra. Az ammonium-szulfáttal különböző mértékben telített frakciók specifikus aktivitása

Az enzim tisztítása során alkalmazott 50 °C-os inkubációs hőmérsékletet a hőinkubációs előkísérletek eredményeképpen választottuk, amely alapján megállapítható, hogy az enzim igen hőstabil. 50 °C-on inkubálva 1h múlva aktivitásának mintegy 98%-át megőrizte (10.ábra). Összevetve Bartkoviak és mtsai. (1981) által tőkehal (*Gadus morhua*) máj homogenizátummal végzett hőinaktiválási kísérletekkel, megállapítható, hogy a ponty máj SOD hőtüró képessége nagyobb. Míg a tőkehal máj SOD 70 °C-on 80 percig inkubálva teljesen inaktiválódott, addig a ponty SOD 30 %-os aktivitással rendelkezett.

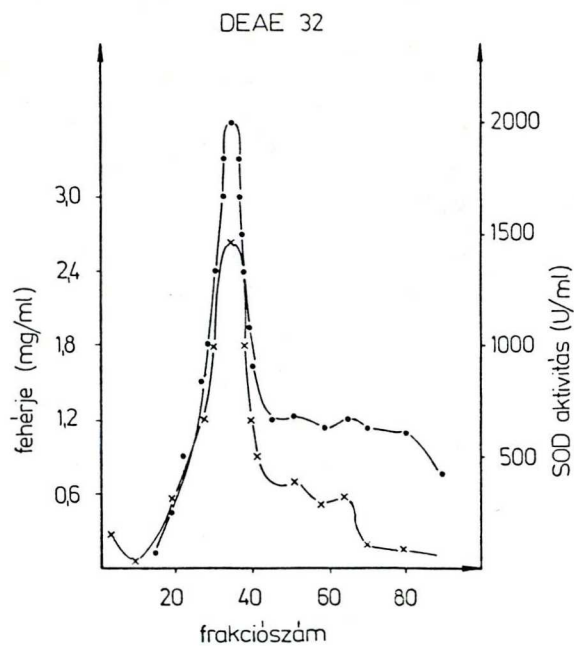




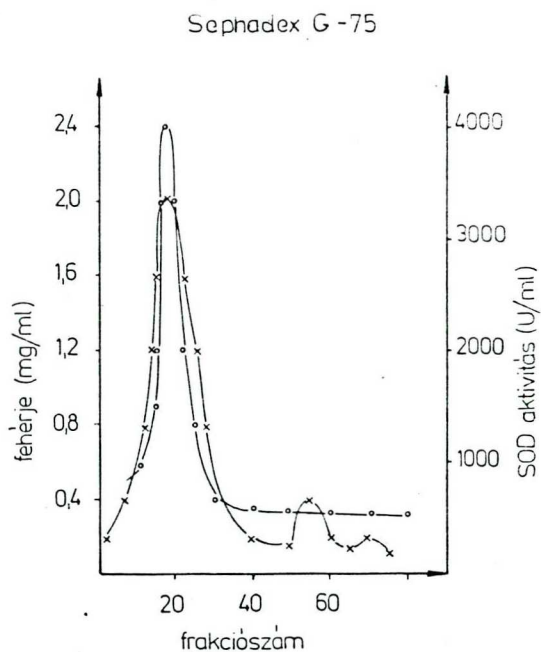
10. ábra. A hőmérséklet hatása a részlegesen tisztított ponty máj szuperoxid dizmutáz enzim (SOD) aktivitására. (pH:7.8 foszfát pufferben).

A szerves oldószerrel (chloroform) történő kicsapás az enzim nagyfokú stabilitási tulajdonságaira utal. Szerves oldószer hatására az enzim megtartja aktivitását, míg számos más fehérje ill. enzim többek között a Mn-SOD is irreverzibilisen kicsapódik (Crapo és mtsai. 1978, Weisiger és mtsai. 1972)

A legjelentősebb tisztulást a kromatográfiás tisztítási lépésekkel érték el. A kipróbált kromatográfiás tisztítási módok közül az anyagok és módszerek fejezetben leírtak alapján kivitelezett DEAE-32 ioncserés, valamint a SEPHADEX G-75 gélkromatográfiás módszerek bizonyultak a leghatékonyabbaknak (11,12.ábrák).



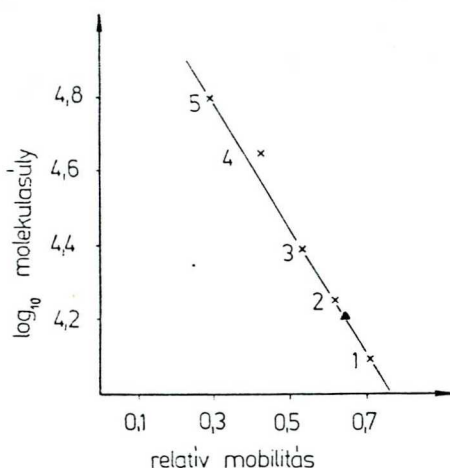
11. ábra. A ponty máj szuperoxid dizmutáz (SOD) enzim tisztítása DE-32 ioncserés kromatográfiával, a frakciók térfogata: 3ml, az eluens 0.005-0.1 M pH:7.8 lineáris foszfát puffer gradiens, az oszlop mérete:4cmx20cm.



12. ábra. A ponty máj szuperoxid dizmutáz (SOD) enzim tisztítása Sephadex G-75 gélkromatográfiával, a frakciók térfogata: 3 ml, az eluens: 0.05 M pH:7.8 foszfát puffer + 0.1 M KCL, az oszlop mérete:14cmx54cm.

A tisztítási folyamat során kapott eredményeket a 2. táblázat foglalja össze.

A tisztított enzim specifikus aktivitására 2100 E/mg fehérje értéket kaptunk, réz tartalma 0.36% volt, ami jó egyezést mutat az irodalomból ismert adatokkal (Bannister és mtsai. 1977, Bartkoviak és mtsai. 1981). Molekula súlya 32.400 D (13.ábra), a kardhal (*Xiphias gladius* L.) molekulásúlyához áll legközelebb ami 32.500 D (Bannister és mtsai. 1977).



13. ábra. A ponty máj szuperoxid dizmutáz enzim molekulásúlyának meghatározása SDS gélelektroforézissel.

A ponty máj enzim molekulásúlya \blacktriangle 32.400, D

Standardok: 1. ribonukleáz (12.700), 2. mioglobín (17.500), 3. kimotrip-szinogén (25.700), 4. ovalbumin (43.500), 5. BSA (68.000).

Az aminosav összetételét a 3. táblázat mutatja. A hal máj SOD enzim aminosav összetétele jó hasonlóságot mutat más fajokból mért értékekkel, néhány aminosavban azonban van eltérés. A ponty SOD-ban igen magas az aszparaginsav és a glutaminsav tartalom (45.9, 34.4 aminosav oldallánc/mol enzim), más halfajokban mért értékekhez viszonyítva. A különböző halfajokban mért aszparaginsav értékek viszont általában magasabbak más fajokhoz viszonyított értékeknél.

Az enzim tisztaságát valamint izoelektromospontjának meghatározását izoelektromos fókuszálással végeztük. A gélben a gradiens 4 óra alatt fejlődött ki, 110 V konstans feszültséget alkalmazva (14. ábra). A 3.5-10 pH gradiensben megfuttatva mintánkat a fehérjére festett géleken két szorosan egymás mellett álló csíkot kaptunk, az aktivitásra festett géleken pedig egy szélesebb csíkot (15. ábra). A pH:4-6-ra leszűkített gradiens gélben az izoenzimek már jól elkülönültek mind a fehérjére mind pedig az aktivitásra festett géleken (16. ábra). Az elkülönült fehérjék izoelektromos pontjainak meghatározásához látszólagos pH függést végeztünk, hogy megállapítsuk mikor érik el a fehérjék a valószínű pi értékeknek megfelelő pozíciót a gélben, ezt 5 óra elteltével tapasztaltuk (17. ábra).

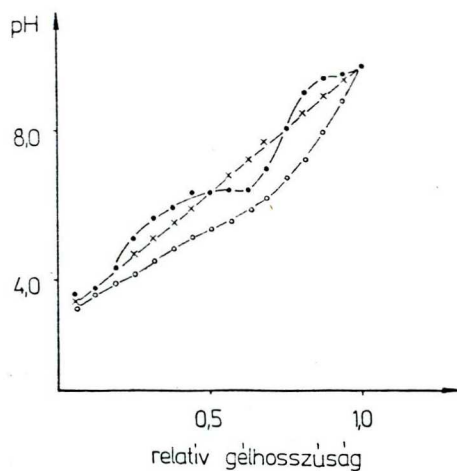
Az izoenzimek p_i értékei a következők: $p_i=4.9$, $p_i=4.73$ (18. ábra).

5×10^{-3} M KCN-ot tartalmazó festékoldatban megfestve a géleket a géleken aktivitásra jellemző csíkok nem jelentek meg (19. ábra), ami arra utal, hogy mind két izoenzim Cu,Zn-SOD.

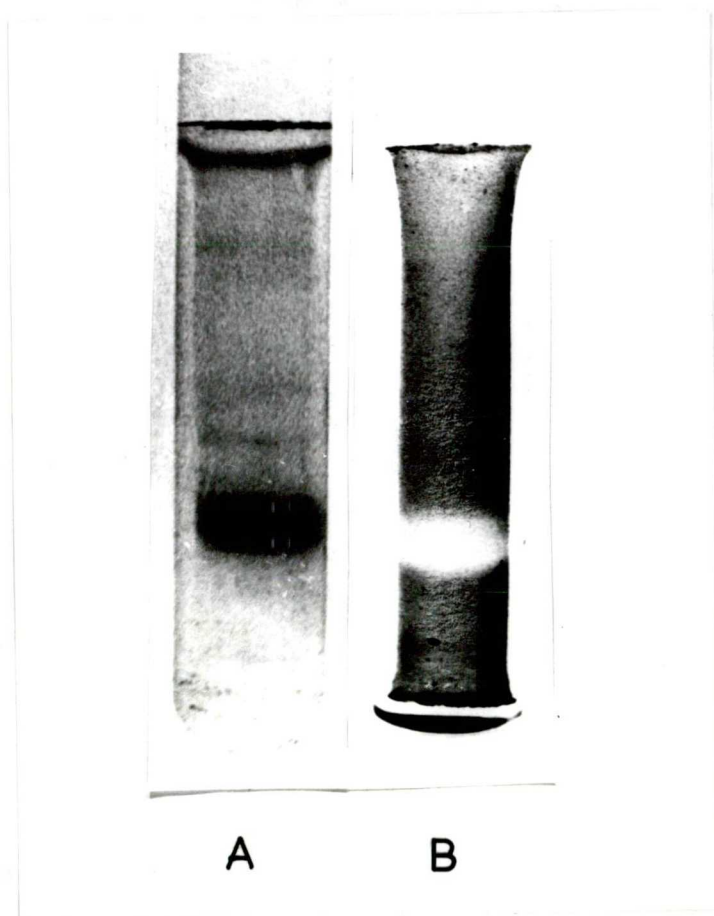
Az eddig megjelent irodalmi adatok alapján a Cu,Zn-SOD-ok izoelektromos pontja ritka kivételtől eltekintve (Salin 1981) pH:4-6 közé esik. Mind a Cu,Zn- mind pedig Mn-SOD-nak több izoenzime ismeretes. Weisiger és Fridovich (1972) csirkemájából poliakrilamid gélelektroforézissel 4 izoenzimet különítettek el. Lönnerdal és

mtsai. (1979) patkány májból 4, agyból 5, egér májból 6, agyból 9, csirke májból 6 Cu,Zn-SOD-ot izoláltak.

Az általunk vizsgált ponty máj SOD enzimnek méréseink alapján izoelektromos fókuszálással 2 elkülöníthető izoenzime van, amelyek izoelektromos pontjai közel állnak egymáshoz

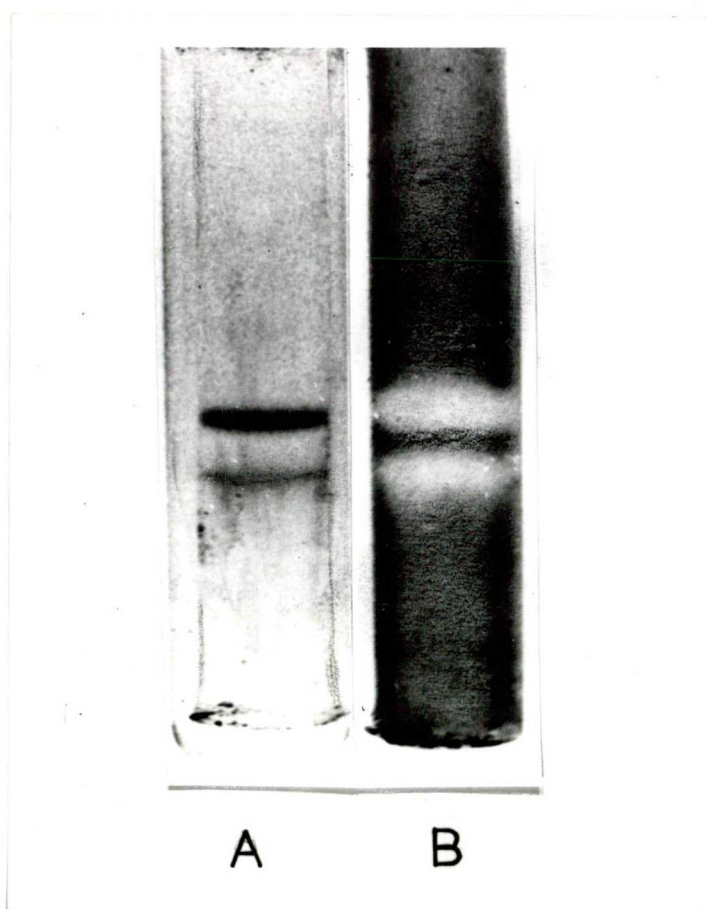


14. ábra. A 3.5-10 pH gradiens kifejlődésének időfüggése. ●-●-● 2óra, x-x-x 4 óra, o-o-o 8 óra elteltével, 0.1 M NaOH katolit és 0.1 M H₂SO₄ anolit mellett.

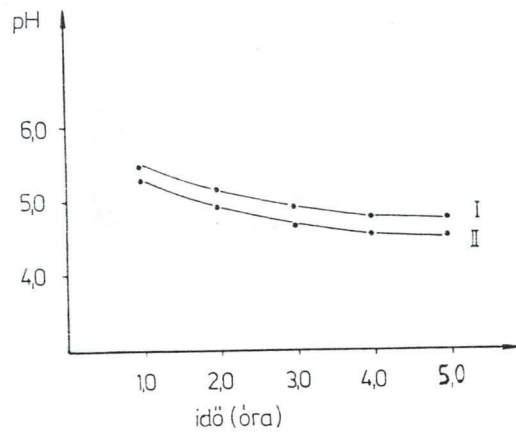


15. ábra. A ponty máj szuperoxid
dizmutáz (SOD) enzim izoenzimeinek
vizsgálata izoelektromos fókuszálás-
sal

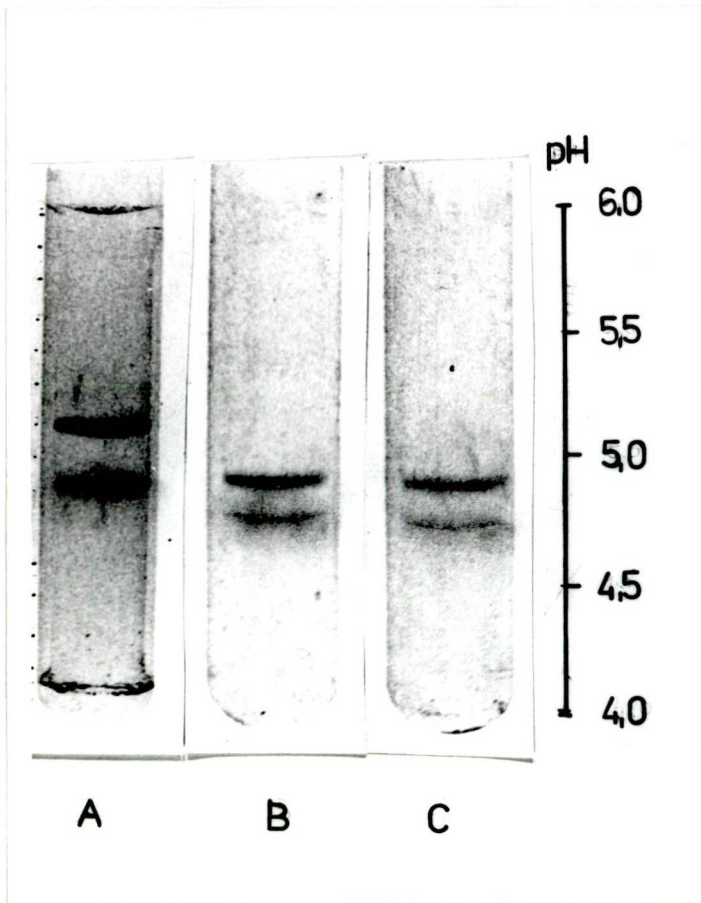
Futtatási idő: 5 óra, pH gradiens
3.5-10, A : a tisztított ponty máj
SOD enzim fehérjére festve, B : a gél
aktivitásra festve



16. ábra. A ponty máj szuperoxid
dizmutáz (SOD) enzim izoenzimeinek
vizsgálata pH:4-6 gradiens gélen
Futtatási idő:5 óra A : a tisztított
ponty máj SODfehérjére festve, B: az
enzim aktivitásra festve

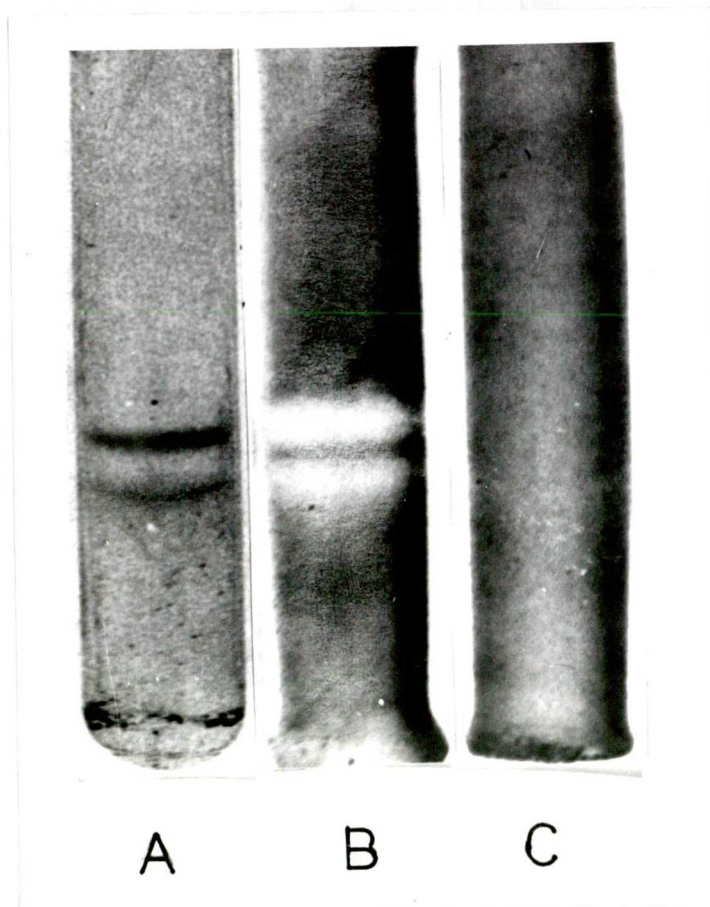


17. ábra. Látszólagos pH függés meghatározása a tisztított ponty máj szuperoxid dizmutáz enzim izoenzimeinek izoelektromospont (Pi) meghatározásához pH: 4-6 gradiens gélen, I,II: izoenzimek



18. ábra. A tisztított ponty máj
szuperoxid dizmutáz enzim izoenzi-
mei p_i értékeinek meghatározása
izoelektromos fókuszálással

A : a minta helyezete 3 óra futtatás idő után
B : a minta helyezete 4 óra futtatási idő után
C : a minta helyezete 5 óra futtatási idő után
pH gradiens:4-6
 p_i értékek: p_i 4.9, p_i 4.73



19. ábra. A tisztított ponty máj szuperoxid dizmutáz enzim vizsgálata izoelektromos fókuszálással, pH gradiens 4-6,
A : fehérjére festett gél
B : aktivitásra festett gél
C : aktivitásra festett gél 5×10^{-3} M KCN jelenlétében

Aminosav	Szarvasmarha máj/a	Csirke máj/b	Kardhal máj/c	Ponty máj/d
aminosav oldallánc / mol enzim				
Lys	20.0	20.0	20.3	21.1
His	16.0	14.0	16.2	15.9
Arg	8.0	8.1	13.7	8.1
Asp	34.0	32.0	37.4	45.9
Thr	24.0	18.0	23.1	21.4
Ser	16.0	14.0	8.6	9.0
Glu	22.0	29.0	27.3	34.4
Pro	12.0	12.0	11.1	13.9
Gly	50.0	50.0	45.5	39.0
Ala	18.0	22.0	27.2	29.2
Cys	6.0	14.0	6.2	6.4
Val	30.0	28.0	26.0	22.5
Met	2.0	4.0	2.2	2.4
Ile	18.0	14.0	19.9	19.3
Leu	16.0	16.0	17.2	15.0
TYR	2.0	2.0	4.6	4.0
Phe	8.0	8.0	8.8	9.4
TRP	-	-	-	-

- a. Steiman és mtsai., 1974.
- b. Weisiger és Fridovich, 1973.
- c. Bannister, 1977.
- d. általunk tisztított ponty máj Cu,Zn-SOD
- nem határoztuk meg

3. táblázat. A halmáj Cu,Zn-SOD enzim aminosav összetételének összehasonlítása más fajokból izolált Cu,Zn-SOD-ok aminosav összetételével

Tisztítási lépések	Térfogat (ml)	Fehérje tartalom (mg)	SOD aktivitás (U. össz.)	SOD specifikus akt.	Tisztulás	Kitermelés (%)
Homogenizátum	620.0	4882.5	29.295.0	6.0	-	-
Savanyítás	550.0	3601.0	22.330.0	6.2	1.03	76.23
(NH ₄) ₂ SO ₄ -os kicsapás	50.0	450.0	13.500.0	30.0	5.17	46.08
50°C-1 ^h hőkezelés	42.5	130.0	11.700.0	90.0	15.0	39.90
chloroformos kicsapás	20.0	50.0	7.860.0	157.2	26.2	26.83
DEAE kromatográfia	5.0	7.5	6.000.0	800.0	133.3	20.48
Sephadex G-75 kromatográfia	2.0	2.5	5.250.0	2100.0	350.0	17.92

Össztisztulás : 350 x

2. táblázat. A ponty máj Cu,Zn-SOD enzim tisztításának összefoglalása

4.2. A szuperoxid dizmutáz enzim izoenzimképeinek meghatározása különböző halfajok szerveiben

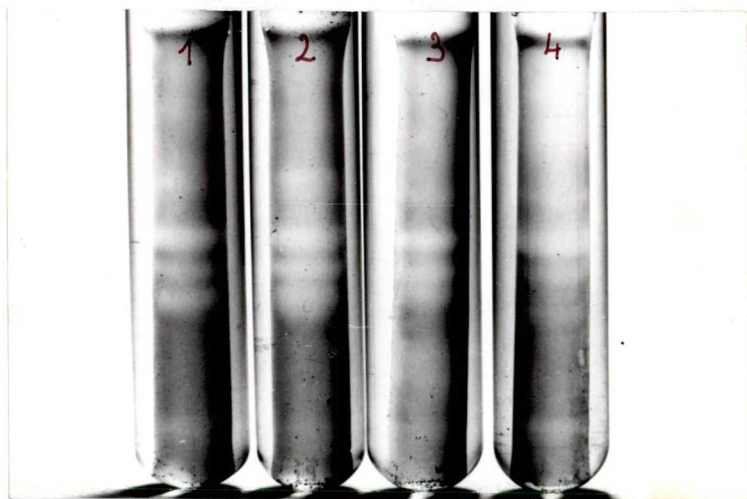
Az előző fejezetben már utaltunk arra, hogy úgy a Cu,Zn- mint a Mn-SOD-nak elektroforetikusan több izoenzime különíthető el. Ezen formák esetében nem eldöntött, hogy több gén által termelt fehérjékről van-e szó, vagy ezek poszttranszlációs módosulás révén keletkeznek (Weisiger és Fridovich 1972).

Az izoelektromos fókuszálás alkalmasnak bizonyult arra, hogy nyers homogenizátumot megfuttatva megvizsgáljuk, vajon eltérő halfajok egyes szerveinek SOD izoenzimképe milyen hasonlóságot ill. eltérést mutat.

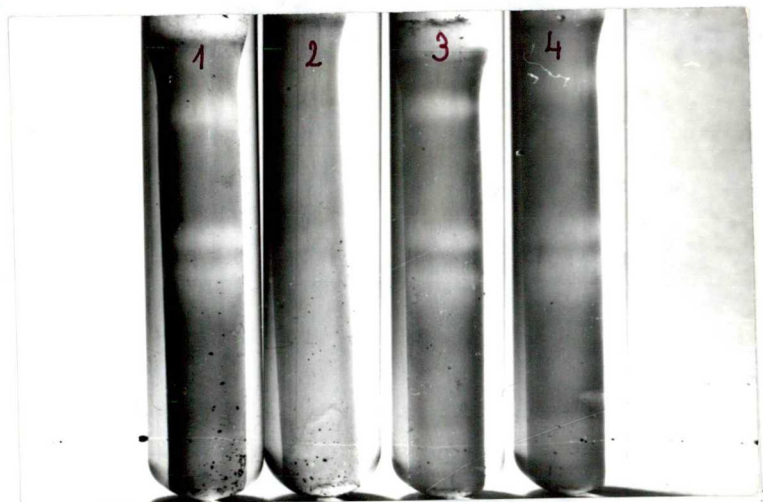
A homogenizátumok esetében nem kaptunk olyan éles elválást mint a tisztított enzim esetében, az azonban egyértelműen kimutatható volt, hogy, az egyes halfajok szerv izoenzimképe igen eltérő, sőt egy fajon belül a különböző szervek esetében is van változás.

A legtöbb izoenzimet a pisztráng szerveiből mutattunk ki. A szív, a kopolyú, az agy esetében 3 aktivitás csík különíthető el, míg a májban csak 2 (20. ábra). A kecségénél a kopolyúból nem tudtuk (SOD) aktivitást kimutatni, enzimaktivitás méréseink is azt mutatják, hogy a kecsége kopolyújának SOD aktivitása sokkal alacsonyabb a többi általunk vizsgált szervéhez képest (ld. később), míg a szívben, agyban, májban 3 csík látható, 2 közel esik egymáshoz, 1 pedig távolabb (21. ábra). Ez a távolabb eső (lúgosabb izoelektromos pontú) aktivitási csík a ponty agyban is megtalálható (22. ábra). A harcsánál az agyban található egy plusz csík a többi szervhez képest (23. ábra).

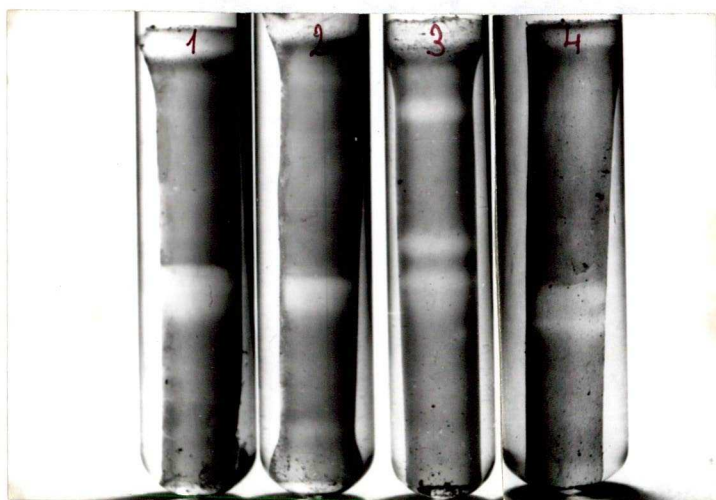
Az eredmények alapján megállapítható, hogy bár a SOD enzim ősi enzim és igen nagyfokú konzervativitást mutat egymáshoz közeli rokonságban levő fajoknál életmód ill. egyéb tényezők függvényében, az egyes szervekben az eltérő funkcióra való specializálódás következményeképpen az enzim struktúrája módosulhat.



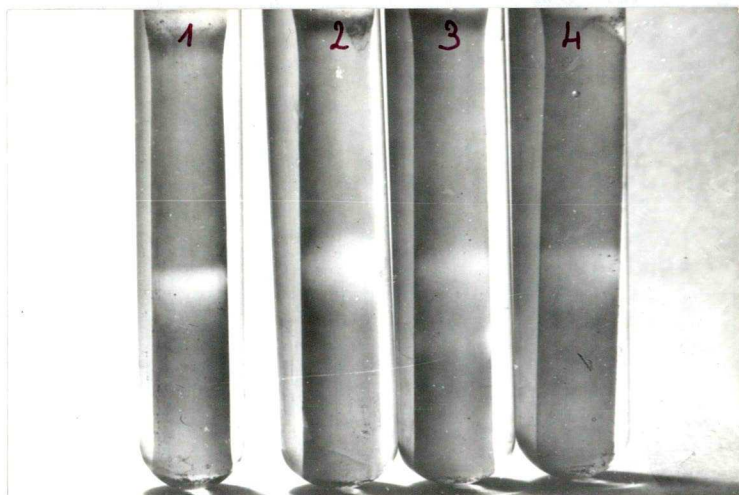
20.ábra A pisztráng (*Salmo gairdneri* R.) különböző szerveiben előforduló szuperoxid dizmutáz izoenzimek elválasztása izoelektroforézissel, 1:szív, 2:kopoltyú, 3:agy, 4:máj



21.ábra A kecsege (*Acipenser ruthenus* L.) különböző szerveiben előforduló szuperoxid dizmutáz izoenzimek elválasztása izoelektroforézissel, 1:szív, 2:kopoltyú, 3:agy, 4:máj



22.ábra A ponty (*Cyprinus carpio* L.) különböző szerveiben előforduló szuperoxid dizmutáz izoenzimek elválasztása izoelektroforézissel, 1:szív, 2:kopoltyú, 3:agy, 4:máj



23.ábra A harcsa (*Silurus glanis* L.) különböző szerveiben előforduló szuperoxid dizmutáz izoenzimek elválasztása izoelektroforézissel, 1:szív, 2:kopoltyú, 3:agy, 4:máj

4.3. A szuperoxid dizmutáz, kataláz, glutation peroxidáz enzimek fiziológiai szerepének vizsgálata

4.3.1. A szuperoxid dizmutáz, kataláz, glutation peroxidáz enzimek aktivitás megoszlásának vizsgálata különböző halfajokban

A halak szervezetének zsírtartalma 50 %-ban telítetlen zsírsavakból áll (Mazeud és mtsai. 1979), ezért a molekuláris szabadgyök reakciók valamint a lipid peroxidáció számára fokozott lehetőség nyílik. Mindezek maguk után vonják az antioxidatív enzimrendszer védekező mechanizmusban betöltött szerepének megnövekedett fontosságát is. A védekező mechanizmusban szerepet játszó enzimek közül a SOD, a kataláz valamint a GP-áz enzimek jelentik az elsődleges enzimes védekező mechanizmust a reaktív oxigén intermedierek károsító hatásával szemben.

A szabadgyökök felszabadulásának mértékét a szervezetben számos külső és belső környezeti tényező befolyásolja, amelyekről jelenleg még igen keveset tudunk. Mindezek figyelembevételével összehasonlítottuk néhány táplálkozási szokásaiban, életmódjában eltérően viselkedő ill. eltérő fejlettségi fokon álló halfaj (nevezetesen a ponty, harcsa, pisztráng, kecsege) SOD, kataláz, GP-áz aktivitásának szervenkénti megoszlását.

A szervek közül a szívet, agyat, májat és a kopoltyút vizsgáltuk, mert ezekben a szervekben különösen intenzív szintézis és lebontó folyamatok mennek végbe.

A ponty vegyes táplálkozású, a harcsa ragadozó, a pisztráng és a kecsege táplálkozási módjában egymáshoz közel állnak, szintén ragadozó életmódot folytatnak, de táplálékukat planktonok, lárvák és apró állatok jelentik. A kecsege a törzsfajlásban alacsonyabb fokot képvisel, a többi halfajhoz viszonyítva, fél-csontos halak osztályába tartozik, váza porcos, csigolyái nagyon kezdetlegesek, csontvérték borítja testét, gerinchúrja van.

Ezen vizsgált halfajok különböző szerveiben mért antioxidatív enzimek aktivitásának megoszlása igen változatos képet mutat.

Általában a májban a legmagasabb a vizsgált enzimek aktivitása minden halfajnál (24-29.ábrák), a pisztrágnál valamint a kecségénél azonban az agyban mértük a legmagasabb SOD aktivitást, ami különösképpen a kecségénél szembetűnően magas a többi szervhez képest. A pisztrágnál a szervek SOD aktivitás értékei általában magasabbak a többi halfajban mért értékeknél. A kecsége kopoltyú SOD aktivitása viszont igen alacsony a többi szerv SOD aktivitásához viszonyítva (25.ábra).

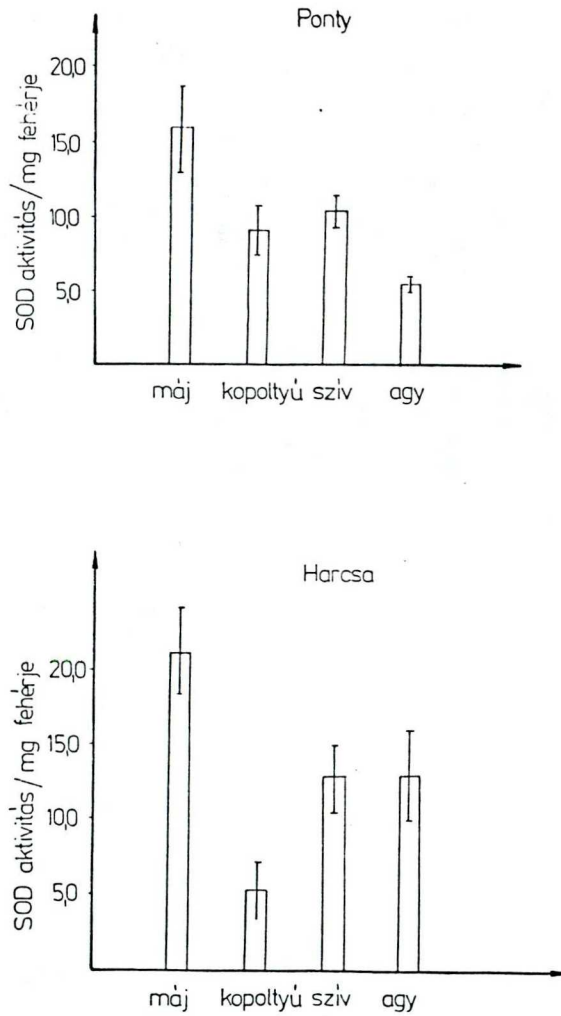
A legegységesebb szervenkénti aktivitásmegoszlást a GP-áz enzim mutatja. A kecsége kivételével minden halfajnál a májban a legmagasabb, s az agyban a legalacsonyabb az aktivitás. A kecségénél azonban itt is az agyban magasabb aktivitást tapasztaltunk a többi fajban mért értékekhez viszonyítva (26-27.ábrák).

A kataláz enzim esetében a kecsége kopoltyú aktivitása jelentősen magasabb a többi fajban mért értékekhez viszonyítva, míg a szivben tapasztalt aktivitás viszont igen alacsony, ami kis mértékű H_2O_2 metabolizmusra utal (28,29.ábrák).

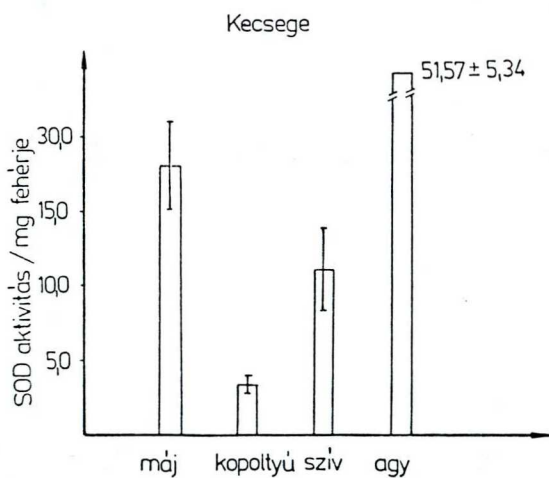
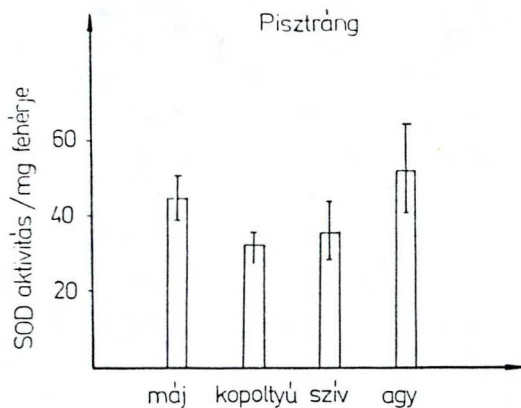
A kapott eredmények alapján megállapíthatjuk, hogy a kecsége, amely fejlődéstörténetileg alacsonyabb szintet képvisel mint a többi általunk vizsgált faj, az enzimaktivitásokban számos eltérést mutat. Az agyban tapasztalt magas SOD ill. GP-áz aktivitás fokozott szabadgyök-reakciókra utal, aminek következményeképpen magasabb a képződő lipid-hidroperoxidok mennyisége is (ld. köv. fejezet)

Az alacsony SOD aktivitás szint a kopoltyúban, ugyanakkor magas kataláz aktivitás arra utal hogy a kopoltyú antioxidáns védelmében a kataláznak van döntő szerepe.

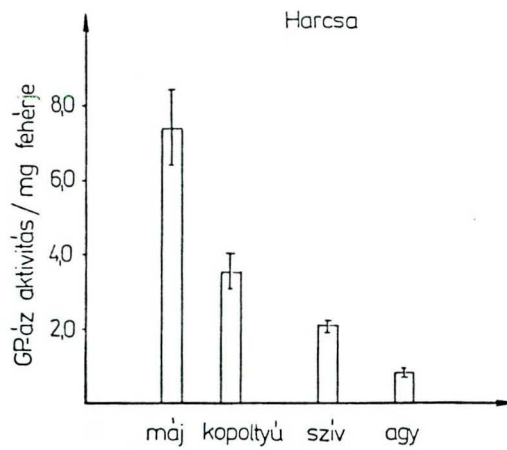
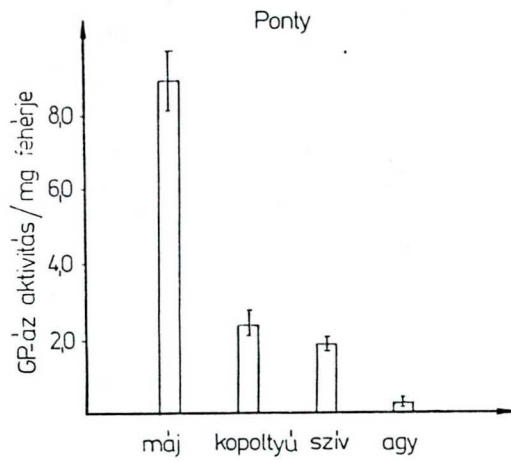
A vizsgált halfajok közül a pisztráng a leg oxigén igényesebb halfaj, nagyon tiszta hűvös vizű forrásokban él. Ezzel összefüggésben állhat szerveinek magasabb SOD enzim aktivitás értéke.



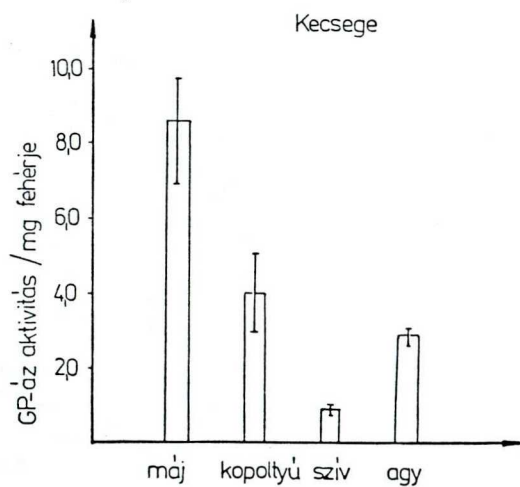
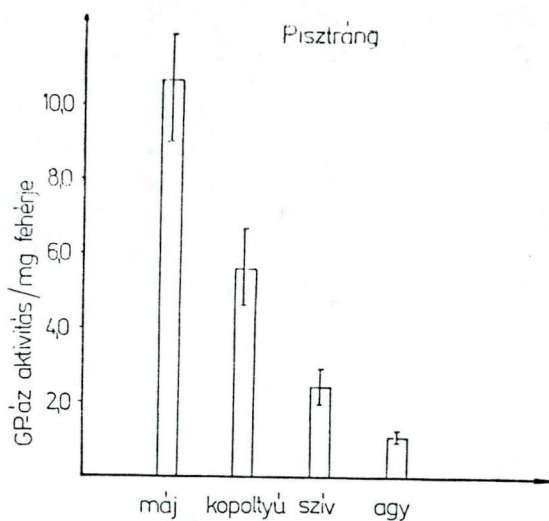
24.ábra A szuperoxid dizmutáz enzim (SOD) specifikus aktivitásának megoszlása a ponty, és a harcsa különböző szerveiben (Az oszlopok 10 halból kapott értékek átlagát \pm S.D. ábrázolják)



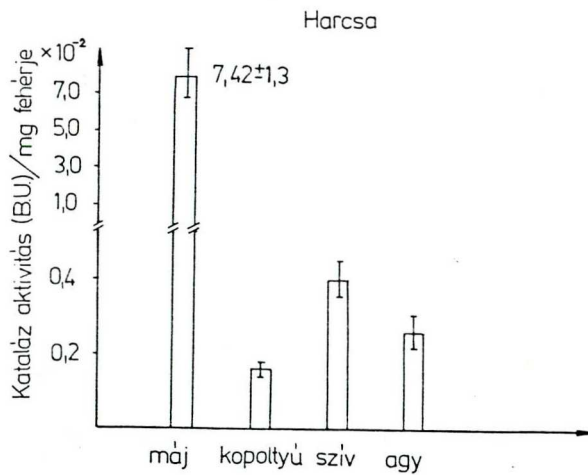
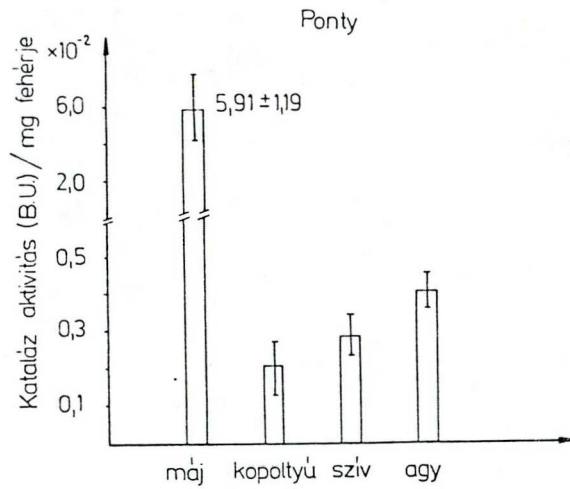
25. ábra. A szuperoxid dizmutáz enzim (SOD) specifikus aktivitásának megoszlása a pisztráng és a kecsge különböző szerveiben, (Az oszlopok 10 halból kapott értékek átlagát \pm S.D. ábrázolják)



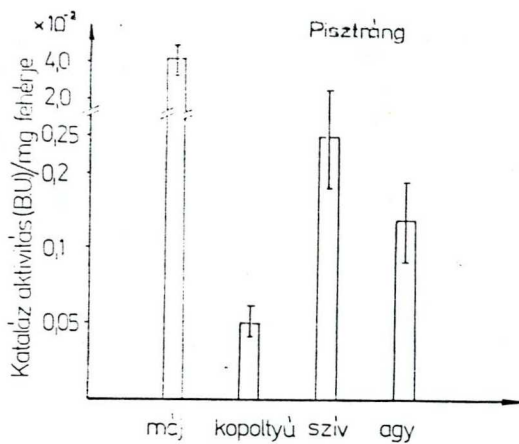
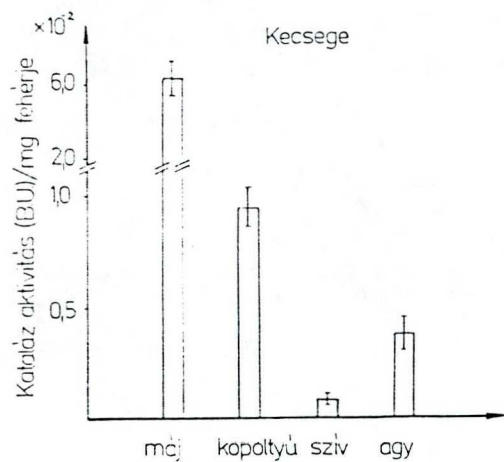
26.ábra. A glutation peroxidáz enzim (GP-áz) specifikus aktivitásának megoszlása a ponty és a harcsa különböző szerveiben, (Az oszlopok 10 halból kapott értékek átlagát \pm S.D. ábrázolják)



27. ábra. A glutation peroxidáz enzim (GP-áz) specifikus aktivitásának megoszlása a pisztráng és a kecsége különböző szerveiben, (Az oszlopok 10 halból kapott értékek átlagát \pm S.D. ábrázolják)



28. ábra. A kataláz enzim specifikus aktivitásának megoszlása a ponty és a harcsa különböző szerveiben, (Az oszlopok 10 halból kapott értékek átlagát \pm S.D. ábrázolják)



29.ábra. A kataláz enzim specifikus aktivitásának megoszlása a pisztráng és a kecsge különböző szerveiben, (Az oszlopok 10 halból kapott értékek átlagát \pm S.D. ábrázolják)

4.3.2. A szuperoxid-dizmutáz, a kataláz, a glutation peroxidáz enzimek kortól függő aktivitásának vizsgálata pontyban.

Az öregedés szabadgyökös elmélete, miszerint az életkorral jelentősen megnövekszik a sérült fehérje- és nukleinsav molekulák száma, növekszik a lipid peroxidáció mértéke stb., ami részben a szabadgyökök toxicitásával szembeni védekező mechanizmusok csökkent működésével magyarázható, napjainkban egyre több kísérleti alátámasztást nyer.

Számos kísérletben bizonyították, hogy antioxidánsok adása növeli az állatok átlagos életkorát. LPO-t csökkentő, kevés rezet, telítetlen zsírsavat, sok természetes antioxidánst (pl. E-, A-, C-vitamin) tartalmazó diéta hasonló eredménnyel jár (Harman 1969, 1978).

A felvett O_2 90%-a a mitokondriumban használódik fel, az oxigén fogyasztás feltehetően genetikai kontroll alatt áll. A légzőlánc során felszabaduló szabadgyökök lassú kumulatív károsodást okoznak a mitokondriumokban, mivel a védekezőrendszerek hatékonysága az öregedéssel csökken, s így az extramitokondriális károsodás is nő.

Figyelembe véve, hogy az élőlények megszületését követő intenzív fejlődési szakaszra a fokozott élettani tevékenység jellemző, s ez feltehetően a szabadgyök reakciók fokozódásával jár együtt, megvizsgáltuk különböző korú pontyokban a SOD, a kataláz és a GP-áz aktivitásokat, hogy információt kapjunk arra vonatkozólag, hogyan alakul ezeknek az enzimeknek az aktivitása a megszületéstől az ivarérett kor eléréséig.

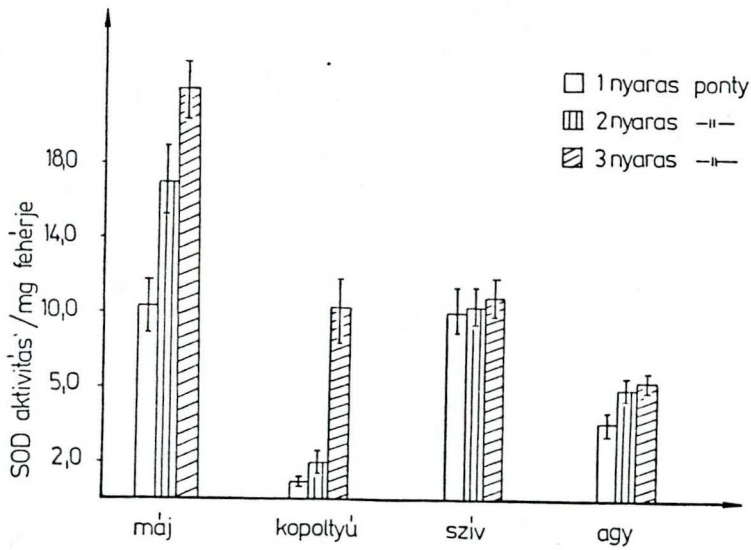
A pontyok hivatalos életkor szerinti jelölése alapján (Antalfi 1971) egynyaras ivadékkal (a születési év nyarának végétől a következő nyárig), kétnyaras (kb. másfél éves hal) és háromnyaras (két és fél-három éves hal) egyedekkel dolgoztunk. Az aktivitásokat a májból, szívből, kopolyából és az agyból határoztuk meg.

A következő eredményeket kaptuk. Mind a három vizsgált enzim esetében az életkorral nőtt az enzimek aktivitása. Általában az en-

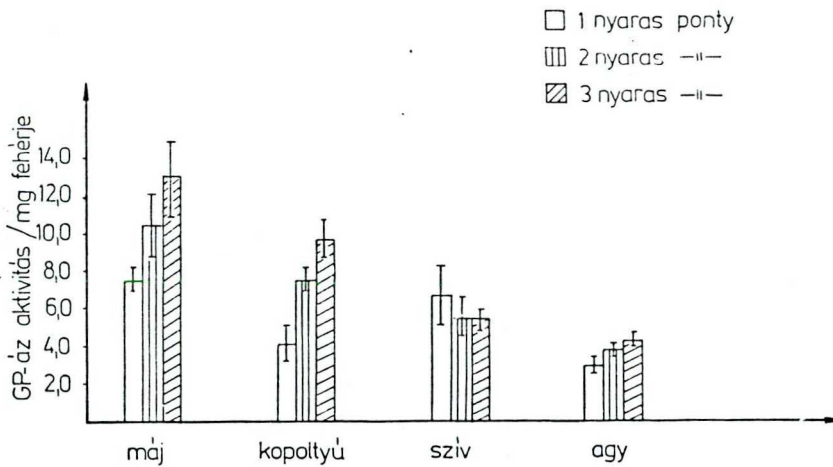
zim aktivitások növekedésének mértéke az egy és két nyaras állapot között jelentős, míg a két és három nyaras kor között a növekedés mértéke csökken. A kopoltyú esetében azonban szembetűnően magas a három nyaras pontyok SOD és kataláz aktivitása (30,32. ábrák). A szív SOD és GP-áz aktivitása közel azonosnak mondható a különböző korú egyedekben (30,31. ábrák), míg a kataláz aktivitás a kétnyaras egyedekben jelentősen megnövekszik (32. ábra).

Mindezekből arra következtethetünk, hogy az életkor előrehaladtával a szabadgyök reakciók mértéke növekszik, amit az antioxidatív enzimek aktivitás növekedése bizonyít. Idős korban azonban az enzimek aktivitásának csökkenésével a szervezet a szabadgyökök áldozatául esik, azok károsító hatása fokozódik, ilyenformán a szabadgyököknek szerves részük lehet az öregedési folyamatokban.

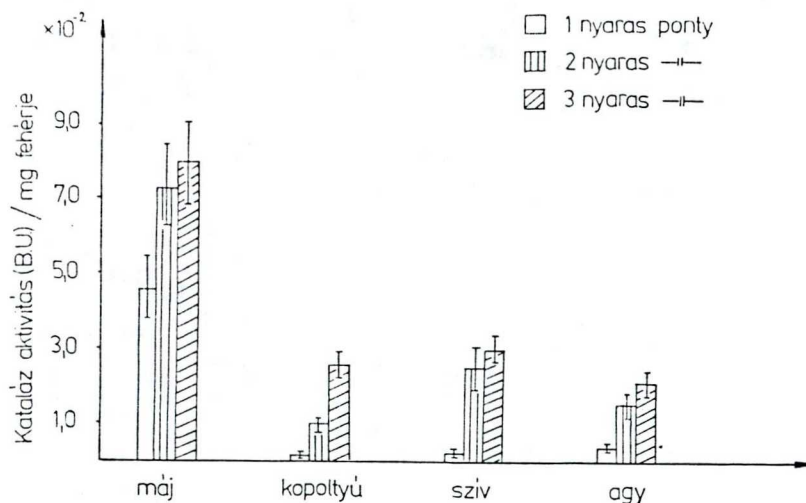
Úgy tűnik a halak esetében a máj és a kopoltyú membrán különösképpen kitett a szabadgyök reakciók károsító hatásának.



30. ábra. A szuperoxid dizmutáz enzim (SOD) specifikus aktivitásának megoszlása különböző korú pontyokban (Az oszlopok 10 halból kapott értékek átlagát \pm S.D. ábrázolják)



31. ábra. A glutation peroxidáz enzim (GP-áz) specifikus aktivitásának megoszlása különböző korú pontyokban. (Az oszlopok 10 halból kapott értékek átlagát \pm S.D. ábrázolják)



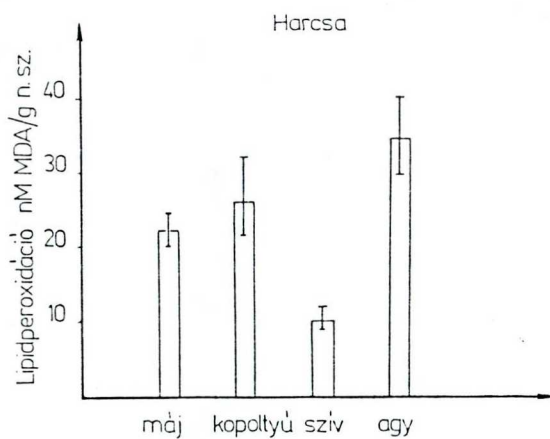
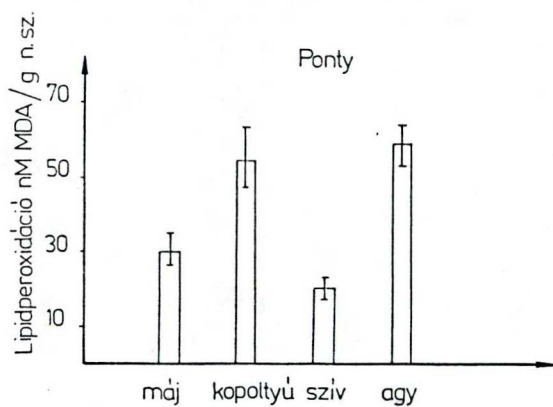
32.ábra. A kataláz enzim specifikus aktivitásának megoszlása különböző korú pontyokban. (Az oszlopok 10 halból kapott értékek átlagát \pm S.D. ábrázolják)

4.4. A lipid peroxidáció mértékének összehasonlító vizsgálata különböző halfajok egyes szerveiben ill. különböző korú ponty egyedekben.

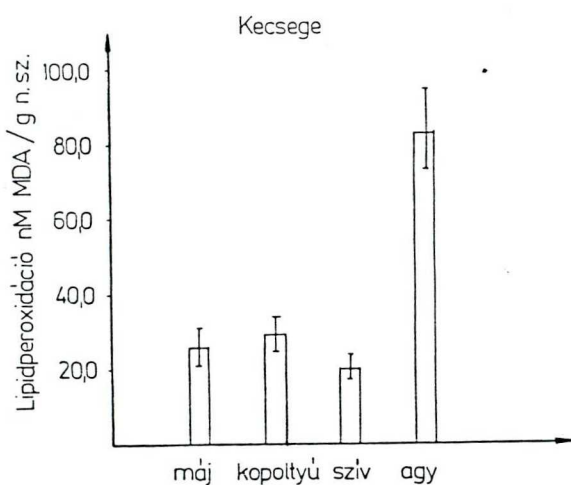
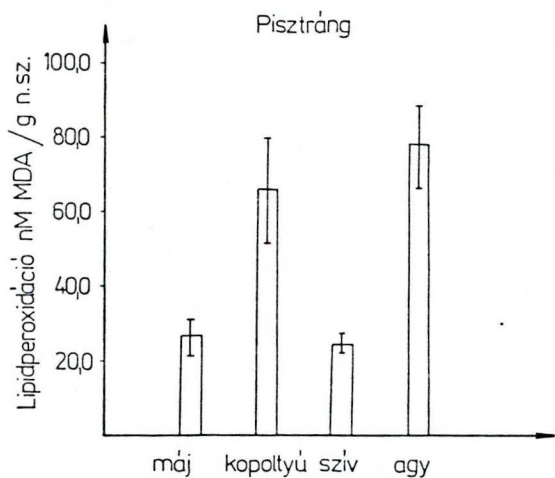
A lipid peroxidáció mértéke egyértelmű összefüggést mutat a szabadgyök reakciók mértékével. Az élő szervezet lipidjeinek autoxidációja lassú, körülírt folyamat, mivel az O_2 alapállapotban gyenge oxidáns. Ha azonban a lipidet egy szabadgyök hidrogén elvonással lipid szabadgyökké oxidál, már sokkal könnyebben reakcióba lép az oxigénnel, aminek következményeképpen peroxi szabadgyök keletkezik. Ez további láncreakciót indít el, ilyenformán a lipid peroxidáció folyamata felgyorsul.

A lipid peroxidáció elsődleges következménye a membránok integritásának megbomlása, különösképpen azon területeken ahol a telítetlen zsírsavak mennyisége nagy. Mint azt a korábbi fejezetben említettük a halak zsírtartalmának több mint 50%-a telítetlen zsírsav. A korábban tárgyalt enzimaktivitás mérésekhez kapcsolódva

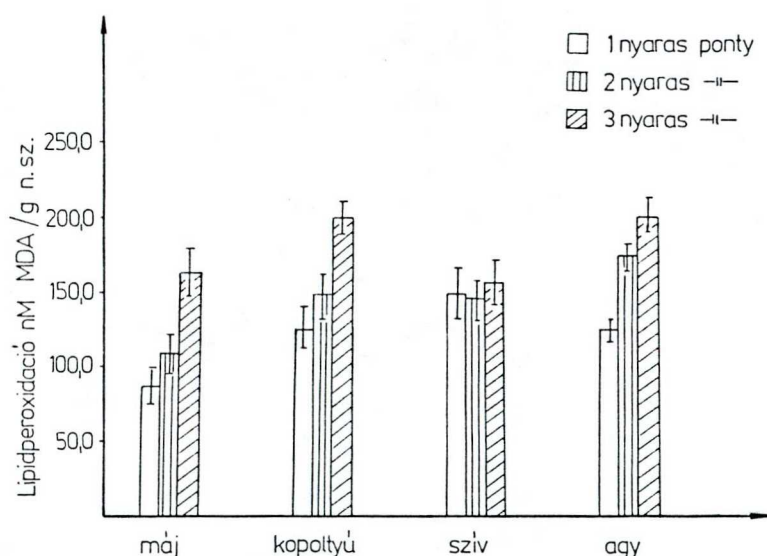
meghatároztuk az egyes halfajok szerveiben a lipid peroxidáció mértékét. A legnagyobb értéket a vizsgált fajok esetében az agyban találtuk, ami az agyszövet zsírtartalmának különösen magas telítetlen zsírsav tartalmával függ össze (Radi 1985). A legmagasabb értéket a kecsegében és a pisztrángban mértük, a legalacsonyabbat a harcsában (33,34.ábrák). Farkas és mtsai. (1978), Csengeri és mtsai. (1978), kimutatták, hogy a halakban az agy zsírösszetétele függ az adott faj táplálkozási szokásaitól, de fajonként is eltérő lehet. Minden faj esetében igen magas a lipid peroxidáció mértéke a kopoltyúban, ami magyarázható azzal, hogy a kopoltyú fokozottan ki van téve a környezet károsító hatásának. A szívben minden esetben alacsony szinteket mértünk. Megvizsgáltuk a különböző korú pontyok egyes szerveiben is a LPO mértékét. Az enzimaktivitások ahogyan azt az előző fejezetben tárgyaltuk az egy-, két-, és háromnyaras egyedekben az életkorral növekedtek. Ennek ellenére a LPO-ban is kismértékű növekedés figyelhető meg (35.ábra), ami arra utal, hogy a már létrejött lipid hidroperoxidok csak egy részét képes a védekezőrendszer a GP-áz aktivitás révén elbontani, s így az életkorral a LPO fokozódik, amit a lipid peroxidáció termékeként azonosított lipofuszcín vagy öregedési pigment időskori felszaporodása is bizonyít (Fehér és Vereckei 1985).



33.ábra. A lipid peroxidáció mértékének összehasonlító vizsgálata a ponty és a harcsa különböző szerveiben. (Az oszlopok 10 halból kapott értékek átlagát \pm S.D. ábrázolják)



34.ábra. A lipid peroxidáció mértékének összehasonlító vizsgálata a pisztráng és a kecsége különböző szerveiben. (Az oszlopok 10 halból kapott értékek átlagát \pm S.D. ábrázolják)

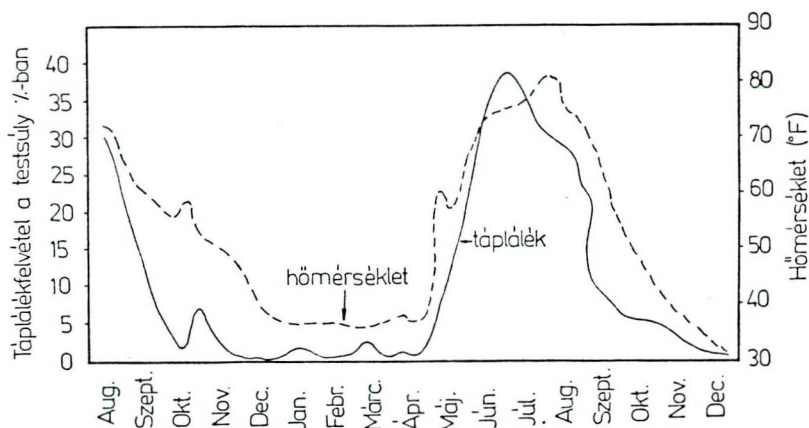


35. ábra. A lipid peroxidáció mértékének összehasonlító vizsgálata különböző korú pontyokban. (Az oszlopok az egynyaras egyedek esetében 20, a többi esetben 10 halból kapott értékek átlagát \pm S.D. ábrázolják)

4.5. A szuperoxid dizmutáz, kataláz, glutation peroxidáz enzimek aktivitásának valamint a lipidperoxidáció mértékének szezonális változása a pontyban.

A SOD, a kataláz, a GP-áz aktivitások különböző halfajokban történt meghatározásakor kapott aktivitás értékeket a ponty esetében ha összevetjük a különböző korú ponty egyedek közül a háromnyaras pontyokra kapott értékekkel, azt tapasztaljuk, hogy az utóbbi esetben az aktivitások valamint az LPO értéke sokkal magasabb, pedig azonos korú és súlyú egyedekről van szó (4,5. táblázatok). Az aktivitásértékek közötti különbség abból adódik, hogy a két kísérlet sorozatot nem azonos évszakban végeztük. Gabrielak és mtsai. (1983) végeztek évszaktól függő aktivitás méréseket. Különböző halak vörösvértestjeinek tavaszi és őszi periódusban mért SOD, kata-

láz peroxidáz enzim aktivitásait hasonlították össze. Az ősszel mért aktivitás értékek alacsonyabbak voltak a tavasszal mért értékeknél. Mi a nyári (július) és téli (december) időszakban végeztünk méréseket. A nyári évszakban mért aktivitás értékek minden esetben magasabbak a téli időszakban mért értékeknél. Ez azzal magyarázható, hogy télen az alacsony hőmérsékletű vizekben a halak mozgás aktivitása táplálék felvétele, ennek következtében anyagcsere folyamatai jelentősen lecsökkennek. A hőmérséklet növekedésével párhuzamosan növekszik a táplálék felvétel gyorsul az anyagcsere (32.ábra) Különösképpen szembeűnő a kataláz aktivitás növekedése, ami elsősorban a fokozódó aminosav anyagcsere eredménye, de sokkal magasabb a lipidperoxidáció mértéke is, ami fokozott O_2 fogyasztás eredményeképpen felszabaduló szabadgyökös reakciók növekedésére utal.



36.ábra. A halak táplálékfelvételének évszaktól függő változása (Anderson 1959)

Szervek	Szuperoxid dizmutáz (E/mg f)	Kataláz (B.U./mg f)	Glutation peroxidáz (E/mg f)	Lipidperoxi- dáció (nM MDA/g.nsz.)
máj	22.19+-1.40	8.01+-1.72	13.54+-1.84	166.28+-25.00
kopoltyú	12.26+-1.68	2.54+-0.59	9.04+-1.01	78.23+-16.83
szív	10.73+-0.83	2.99+-0.31	5.32+-0.42	147.41+-16.17
agy	10.00+-0.60	2.08+-0.34	4.41+-0.10	212.52+-28.50

4.táblázat. A ponty különböző szerveiben nyári vízhőmérséklet mellett mért szuperoxid dizmutáz, kataláz, glutation peroxidáz enzim aktivitás valamint lipid peroxidáció értékek változása

Szervek	Szuperoxid dizmutáz (E/mg f)	Kataláz (B.U./mg f)	Glutation peroxidáz (E/mg f)	Lipidperoxi- dáció (nM MDA/g.nsz.)
máj	16.25+-3.09	5.91+-1.19	9.00+-0.80	90.02+- 4.30
kopoltyú	9.16+-1.89	0.27+-0.07	2.04+-0.75	57.73+-16.55
szív	10.77+-1.20	0.28+-0.08	1.98+-0.08	20.78+- 6.07
agy	6.65+-0.50	0.40+-0.03	0.40+-0.02	58.00+- 5.81

5.táblázat. A ponty különböző szerveiben téli vízhőmérséklet mellett mért szuperoxid dizmutáz, kataláz, glutation peroxidáz enzim aktivitás valamint lipidperoxidáció értékek.

4.6. A paraquat, a metidation a réz-szulfát növényvédőszeres szabadgyökkel összefüggő károsító hatásának vizsgálata a pontyban in vivo és in vitro körülmények között.

A 2.5, 5.0, 10.0, mg/l CuSO_4 , PQ valamint az 1.0, ill. 2.0 mg/l MD koncentrációk esetében, in vivo végzett kísérletek eredményei alapján megállapíthatjuk, hogy mindhárom vegyület jelentős SOD aktivitás növekedést váltott ki a májban s az így kapott értékek jelentősen különböztek a kontroll értékekhez viszonyítva. A MD esetében a 2mg/l feletti hatóanyag koncentrációnál a halak a kezelést követően rövid időn belül elpusztultak.

A CuSO_4 alkalmazásánál már a legkisebb koncentrációnál is a SOD aktivitás növekedés meghaladta a 200 %-ot, s a hatóanyag koncentrációjának növelésével egyenes arányosságban 600 % fölé emelkedett.

A PQ valamint a MD esetében az aktivitás szintén lineárisan nőtt az alkalmazott koncentráció függvényében. A 10 mg/l PQ koncentrációnál az aktivitás növekedése meghaladta a 250 %-ot, a MD esetében a 2mg/l koncentráció értékhez tartozó aktivitás 252.5 % volt (37-39.ábrák).

A vizsgált növényvédőszeresekkel történt kombinált kezelések esetében a 2.5 mg/l CuSO_4 + 2.5mg/l PQ együttes alkalmazásakor az egyedi hatásokra kapott aktivitások mintegy összeadódtak (40. ábra).

A 2.5 mg/l CuSO_4 + 1.0 mg/l MD ill. 2.5 mg/l PQ + 1.0 mg/l MD esetében az együttes hatásra mért SOD aktivitás értékek alul maradtak az egyedi értékekhez viszonyítva (41, 42.ábrák)

Az in vitro kísérletünk során azt tapasztaltuk, hogy az alap adrenalin-adrenochrome reakciót a vizsgált vegyületek közül egyik sem befolyásolja, 5.0 mg/l PQ-t, MD-t ill. CuSO_4 -t adva a reakció kezdeti pillanatában a reakcióelegyhez külön külön megvizsgáltuk az adrenalin-adrenochrome reakció időbeli lefutását, mely teljes mértékben megegyezett a kontroll reakcióéval (43. ábra).

5mg/l hatóanyag koncentrációval szobahőmérsékleten megvizsgáltuk

a szerek hatásának inkuciós idő függését máj szövet homogenizátumban. Az eredmények alapján a további kísérletekhez 10 perces inkubációs időt alkalmaztunk (44. ábra).

A szövet homogenizátumokkal végzett in vitro kísérletekben mindhárom vizsgált hatóanyag SOD aktivitás növekedést okozott, legnagyobb mértékű növekedést ebben az esetben is a CuSO_4 váltott ki, 40 mg/l koncentráció érték felett azonban mind a három szer esetében SOD gátlás tapasztalható (45. ábra).

A tisztított hal máj SOD enzimmel történt vizsgálatokban azt tapasztaltuk, hogy a PQ, valamint a MD nem befolyásolta a SOD enzim aktivitását, míg a CuSO_4 jelentős aktivitás növekedést váltott ki, 20.0 mg/l hatóanyag koncentrációig, e fellett viszont csökkent az aktivitás, s 100.0 mg/l koncentráció értéknél kontroll érték alá csökkent (46. ábra).

A kísérleti eredmények alapján a következőket állapíthatjuk meg. A paraquattal végzett in vivo kísérletek során kapott eredmények, az emlős állatokon végzett kísérleti eredményekkel egybehangzóan arra engednek következtetni, hogy a halak szervezetében a PQ hasonló oxidációs-redukációs átalakuláson megy keresztül ami nemkívánatos szabadgyök felszabadulást idéz elő. Matkovics és mtsai. (1984) ezüst pontyon (*Hypothalamicthys molitrix* V.) már vizsgálták a PQ koncentrációtól függő hatását az antioxidáns enzimekre. Az általuk kapott eredményekhez viszonyítva mi a közönséges pontyban (*Cyprinus carpio* L.) jelentősen nagyobb SOD aktivitás növekedést tapasztaltunk közel azonos PQ koncentráció értékeknél.

A halak igen érzékenyen reagáltak a MD kezelésekre. A szerves foszforvegyület-alapú peszticidek esetleges szabadgyök károsodást indukáló hatásáról kevés irodalmi adat áll rendelkezésünkre. Szentén Matkovics és mtsai. (1980, 1983) munkájából tudjuk, hogy az ugyanezen vegyület csoportba tartozó sumithion ill. triklorfon szerves foszfát észterek patkányokban jelentősen befolyásolták a peroxid metabolizmusban szerepet játszó enzimek aktivitását. Az hogy a halak 2mg/l hatóanyag koncentrációnál rövid időn belül elpusztultak arra utal, hogy a methidation igen erős mérég a számukra. Korábbi munkánk során igazoltuk, hogy erős stressz hatást

vált ki a halakban és jelentős a kolineszteráz bénító hatása (Víg és mtsai. 1987, Nemcsók és mtsai 1987/a). Ezen túlmenően a SOD enzim aktivitásának növekedése szabad gyökös reakciók fokozódására enged következtetni. Sem a PQ sem pedig a MD nincs direkt hatással a SOD enzimre, ezt mutatták a tisztított enzimen végzett kísérleteink, viszont szövet homogenizátumhoz adva aktivitás növekedést váltanak ki, ami arra utal, hogy a májszövet SOD aktivitásának egy része gátolt formában van jelen a szövetekben, s a O_2^- mennyiségének növekedésével ez a tartalék aktivitás működésbe léphet. A szövethomogenizátumban tapasztalt gátlást a nagymennyiségben felszaporodó H_2O_2 koncentráció okozhatja.

A MD szerkezetét megvizsgálva (4. ábra) feltételezhetjük, hogy a PQ-hoz hasonlóan oxidációs-redukációs átalakuláson megy keresztül. Az oxocsoport könnyen oxidálható és redukálható, mely folyamat egy része a szén-oxigén kötés gyökös mechanizmusú átalakulásán alapul (Kovács és Halmos 1972).

A nehéz fémekről ismert, hogy különösen azért jelentenek veszélyt a vízi szervezetek ill. a halak számára, mert nagy mértékben képesek azokat akkumulálni szervezetükben (Salánki és mtsai. 1982, Nemcsók és mtsai. 1985/b, 1987/b).

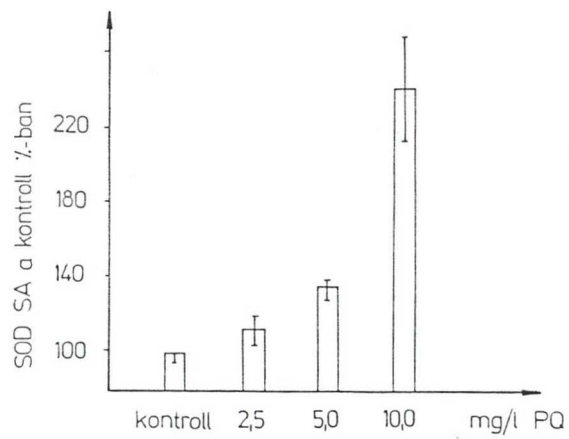
A halak szervezetében a megnövekedett réz koncentráció jelentős szövet károsodásokat ill. anyagcsere elváltozásokat okoz (Rojik és mtsai. 1983, Schreck és Lorz 1978, Pascoe és Evans 1986).

Az in vivo kísérletek során tapasztalt jelentős SOD aktivitás növekedésnek kettős oka lehet. Egyrészt eredhet a Cu szabadgyök generáló hatásának következményeként megnövekedett aktivitásból, másrészt a magasabb réz koncentráció közvetlenül is befolyásolhatja az enzim aktivitást. Ez utóbbit bizonyítja a rézzel történt in vitro kísérlet, a réz ugyanis valamilyen formában kötődött az enzimhez, s egy bizonyos koncentráció értékig növelte annak aktivitását. A Cu ionok önmagukban nem képesek O_2^- gyökök dizmutációjára, de bizonyos réz aminosav komplexek már igen (Leuthauser és mtsai. 1981), így ilyen komplexek is létrejöhetnek a Cu szervezetbe jutásakor amelyek látszólagos aktivitás növekedést eredményeznek. A kombinált kezelések során kapott eredmények arra utalnak,

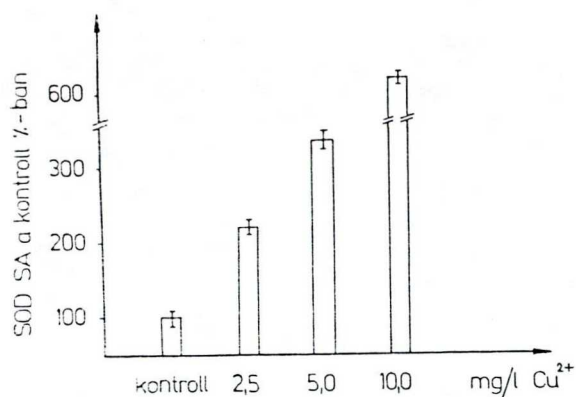
hogy a Cu szabadgyök generáló hatásából eredt az aktivitás növekedés, ugyanis a PQ-al együtt adva réz-szulfáttal a SOD aktivitás növekedés szinergista hatást mutatott. Ha a Cu direkt módon növelte volna a SOD aktivitást annak mérsékelnie kellett volna a PQ hatására megnövekedett SOD aktivitás mértékét.

Feltehetően igen bonyolult reakciokról van szó, amit a réz koncentráció nagymértékben befolyásol, hisz az in vitro kísérletek során azt tapasztaltuk, hogy bizonyos koncentráció értékig a Cu növelte majd a felett gátolta a SOD aktivitást. Így feltételezhető, hogy a Cu szervezetbe jutása megnövelheti az enzim aktivitását esetleg szintézisét is fokozhatja hisz az enzim természetes kofaktora réz. Ugyanakkor bizonyos réz-sók szabadgyök generáló hatását irodalmi adatok is bizonyítják (Gutteridge és Wilkins, 1983). Tehát a réz a szervezetbe jutva ugyanakkor antioxidatív és szabadgyök generáló hatással is rendelkezik.

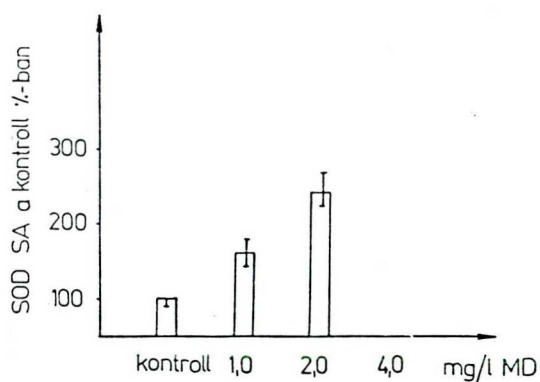
A metidation minden esetben a réz-szulfáttal ill. a paraquattal együttesen alkalmazva eddig ismeretlen hatásmechanizmus alapján antagonistán módon hatott.



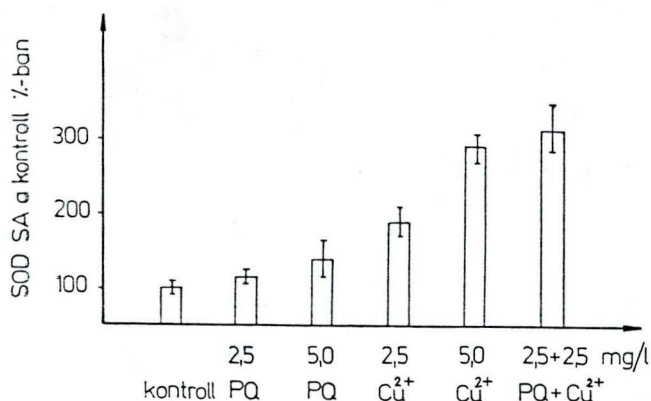
37. ábra. Különböző paraquat (PQ) koncentrációk hatásának vizsgálata a ponty máj szuperoxid dizmutáz (SOD) specifikus aktivitására (SA) in vivo körülmények között. (Egyedszám: 8-10. Az értékek a kontroll %-ában vannak kifejezve)



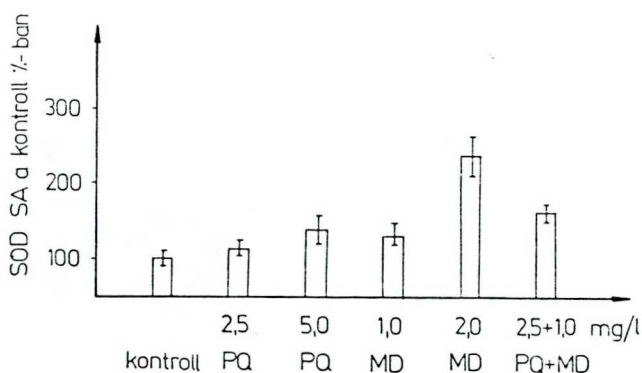
38. ábra. Különböző réz-szulfát (Cu²⁺) koncentrációk hatásának vizsgálata a ponty máj szuperoxid dizmutáz (SOD) specifikus aktivitására (SA) in vivo körülmények között. (Egyedszám: 8-10. Az értékek a kontroll %-ában vannak kifejezve)



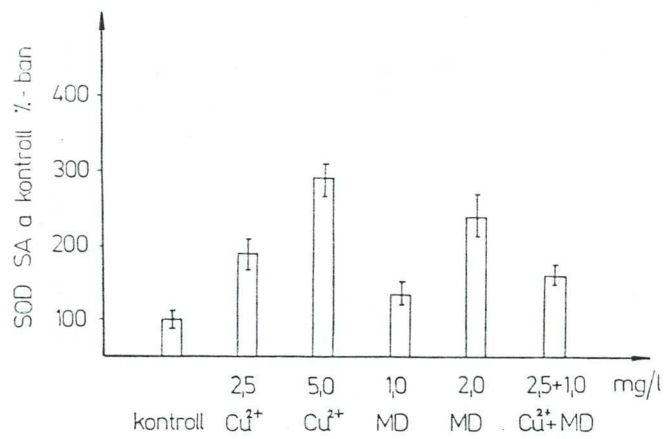
39. ábra. Különböző metidation (MD) koncentrációk hatásának vizsgálata a ponty máj szuperoxid dizmutáz (SOD) specifikus aktivitására (SA) (Egyedszám: 8-10, Az értékek a kontroll %-ában vannak kifejezve)



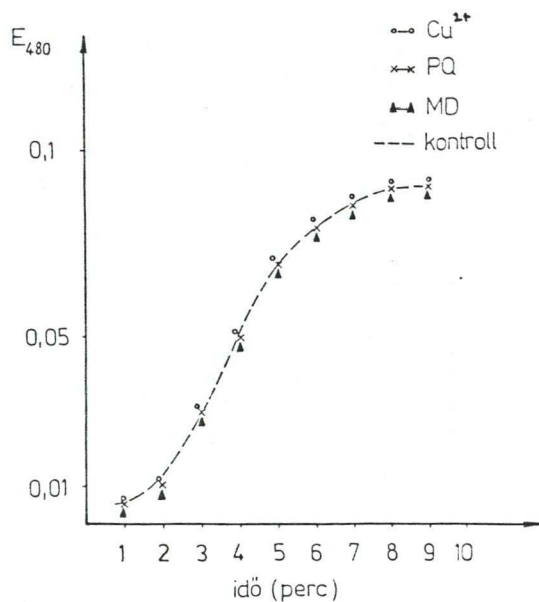
40. ábra. 2.5 mg/l paraquat (PQ) + 2.5 mg/l réz-szulfát (Cu²⁺) együttes hatásának vizsgálata a ponty máj szuperoxid dizmutáz (SOD) enzim specifikus aktivitására (SA) in vivo körülmények között (Egyedszám: 8-10. Az értékek a kontroll %-ában vannak kifejezve)



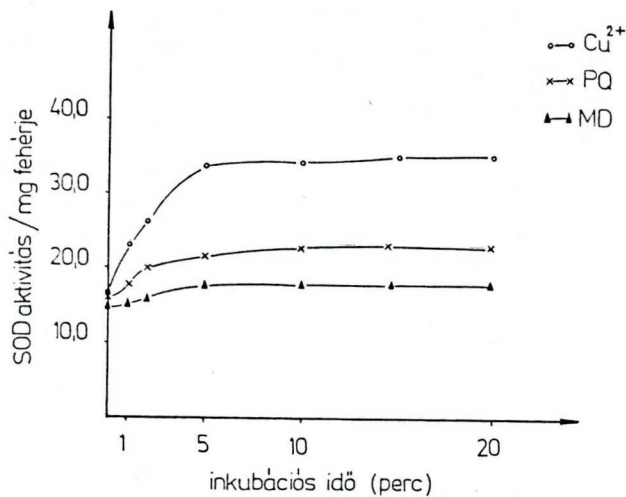
41. ábra. 2.5 mg/l paraquat (PQ) + 1.0 mg/l metidation (MD) együttes hatásának vizsgálata a ponty máj szuperoxid dizmutáz (SOD) enzim specifikus aktivitására (SA) in vivo körülmények között (Egyedszám: 8-10, Az értékek a kontroll %-ában vannak kifejezve)



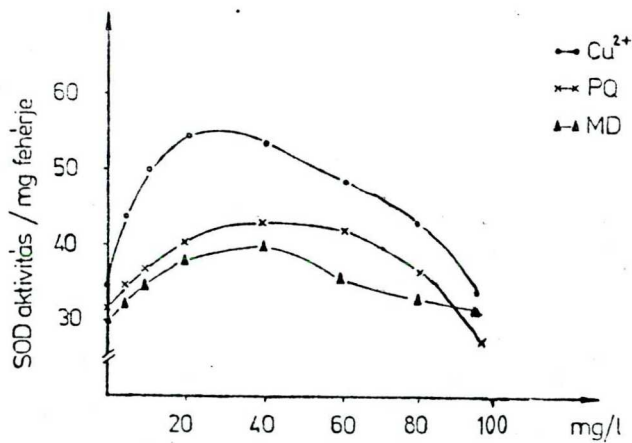
42. ábra. 2.5 mg/l réz-szulfát (Cu²⁺) + 1.0 mg/l metidation (MD) együttes hatásának vizsgálata a ponty máj szuperoxid dizmutáz (SOD) enzim specifikus aktivitására (SA) in vivo körülmények között (Egyedszám: 8-10, Az értékek a kontroll %-ában vannak kifejezve)



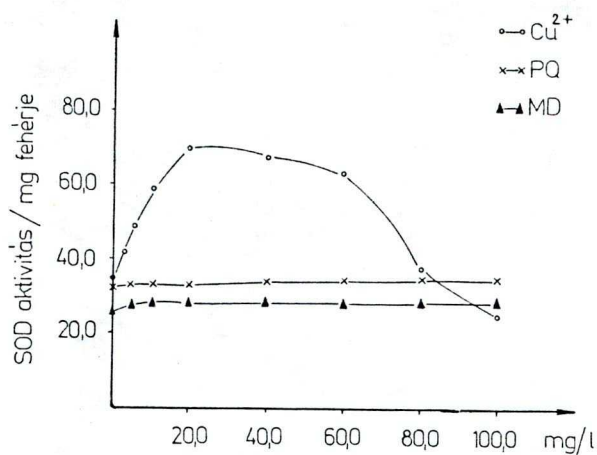
43. ábra. A paraquat (PQ), a réz-szulfát (Cu^{2+}) valamint a metidation hatásának (MD) vizsgálata az adrenalin autoxidációjára (in vitro)



44. ábra. A paraquat (PQ), a réz-szulfát (Cu) valamint a metidation (MD) hatásának inkubációs idő függése a ponty máj homogenizátum szuperoxid dizmutáz (SOD) enzim specifikus aktivitására (in vitro)



45. ábra. A paraquat (PQ), a réz-szulfát (Cu) valamint a metidation (MD) hatásának vizsgálata a ponty májhomogenizátum szuperoxid dizmutáz (SOD) specifikus aktivitására (in vitro)



46. ábra. A paraquat (PQ), a réz-szulfát (Cu²⁺) valamint a metidation (MD) hatásának vizsgálata a tisztított ponty máj szuperoxid dizmutáz (SOD) enzim specifikus aktivitására (in vitro)

4.7. Az hipoxia valamint hipoxiás körülmények között történt paraquat kezelés hatásának vizsgálata a ponty SOD aktivitására

Az akvariumok oxigén adagolását megszüntetve a halak 8 óráig éltek. Az óránkénti mérések szerint az O₂ koncentráció már 2 óra elteltével jelentősen 5mg/l-ről 1mg/l-re csökkent (47.ábra). A hipoxiás körülmények között történt PQ kezelés hatására időben azonos lefutás szerint azonban kevésbé csökkent a víz O₂ tartalma. A jelenség azzal magyarázható, hogy a paraquat metabolizmusa során képződő szabad gyökök a légzőhámot károsítják (Clark és Mtsai, 1966; Stancliffe and Pirie, 1971), így a PQ hatására sérült kopoltyú hámsejteken keresztül kevesebb O₂-t képesek felvenni a

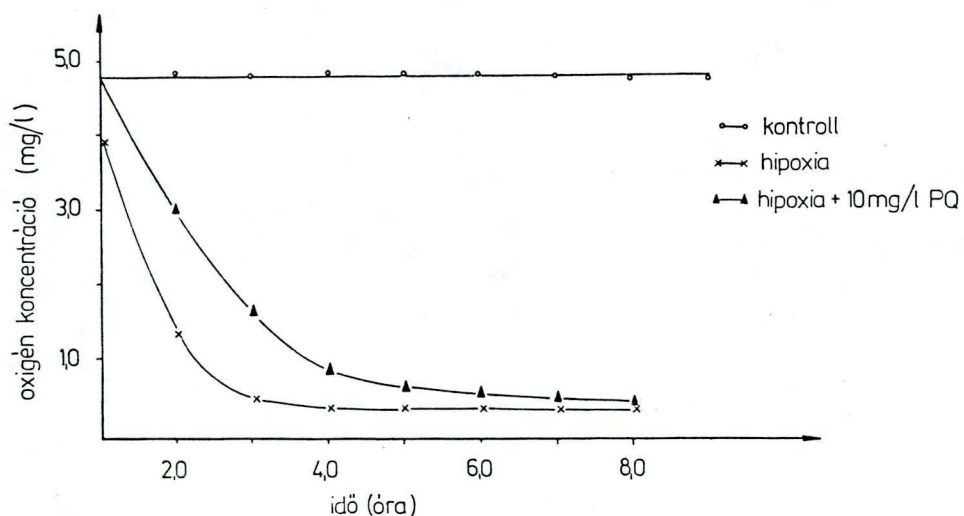
halak, mint a PQ mentes vízben. PQ kezelést követően a halakban a kopoltyú membrán sérülését korábbi biokémiai, illetve fény- és elektronmikroszkópos vizsgálataink is kimutatták (Rojik és mtsai. 1983, Matkovics és mtsai. 1984; Asztalos and Nemcsók, 1985)

Kísérleteink során a vizsgált szervezetekben mind a PQ mind a hipoxia esetében jelentősen növekedett a SOD aktivitása (48. ábra). A PQ hatására bekövetkezett SOD aktivitás változás a korábbi méréseinkkel egybehangzóan legnagyobb mértékű a májban, jelentős mértékű a kopoltyúban, alig érzékelhető az agyban. Az agyszövet nagy mértékben védett a PQ toxicitásával szemben, mivel a vér-agy-gát csökkenti a PQ-nak a plazmából az agy szövetbe jutását (Rose és Smith 1977). Az anoxiás állapot mindhárom szervben de különösképpen az agyban és a májban jelentős aktivitás növekedést váltott ki. Ez annak a következménye lehet, hogy hipoxiás körülmények között egyes anyagcsere-folyamatok módosulhatnak, kezdetben fokozódhatnak (Van den Thillard és mtsai. 1976, Van den Thillardt, 1982) és ennek során a szabad gyökök képződése is fokozódik. Továbbá kimutatták, hogy nemcsak hiperoxia hanem hipoxia hatására is ha nincs teljes anoxia, fokozódik az univalens szivárgás mértéke, mert az elektrontranszportlánc tagjai redukálódnak, egymástól disszociálnak, s fokozódik autoxidációjuk amely során O_2^- -ök keletkeznek (Nohl és Hegner 1978).

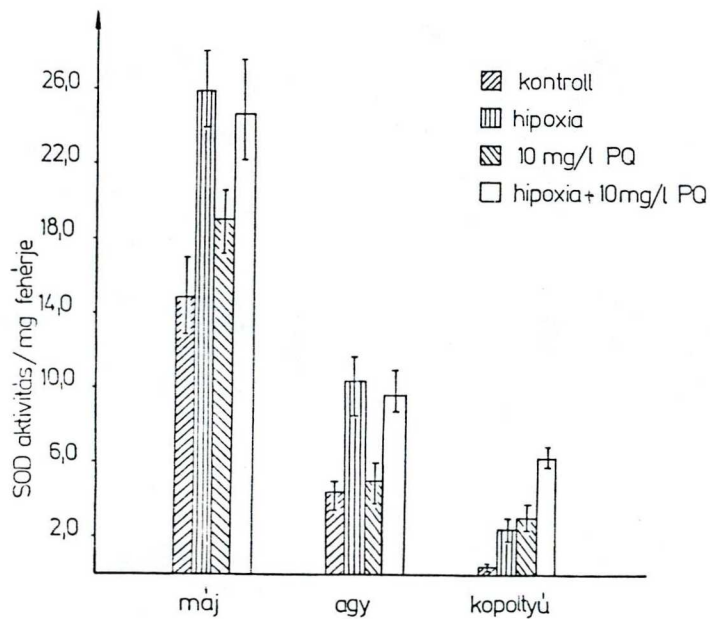
A PQ adagolás hipoxiás körülmények között az állatok kopoltyújában a csak hipoxiás körülmények között tartott állatokéhoz képest jelentősen megnövelte a SOD aktivitást, míg a máj valamint az agy esetében ez a növekedés nem figyelhető meg. Ennek oka az hogy, a PQ toxicitásának mértéke függ az oxigén koncentrációtól. Selman és mtsai. (1985), megállapították, hogy az általuk vizsgált patkányok tüdőszövetében a PQ az oxigén koncentrációjának növelésével fokozott mértékű szöveti léziót fejtett ki. Rose és Smith (1977) in vitro körülmények között vizsgálták tüdő szövet szeletek PQ felvételét s tapasztalataik szerint oxigén mentes környezetben a szövetekben nem volt kimutatható PQ felvétel.

Mivel a halak kopoltyúja közvetlenül érintkezik a vízzel, így a PQ a kopoltyúban ki tudta fejteni szövetkárosító hatását, s itt a

szabadgyökös folyamatok mértéke is fokozódott, míg a májban ill. az agyban az egyre fokozódó hipoxiás körülmények miatt nem, ill. igen kis mértékben.



47. ábra. A paraquat (PQ) valamint a hipoxia egyedi és kombinált hatásának vizsgálata a ponty oxigén felvételére



48. ábra. A paraquat (PQ) valamint a hipoxia egyedi és kombinált hatásának vizsgálata a ponty különböző szerveinek szuperoxid dizmutáz (SOD) specifikus aktivitására (Egyedyszám: 10)

4.8. A szabadgyökök károsító hatásának vizsgálata a halak úszóhólyag gyulladáshoz vezető megbetegedésében

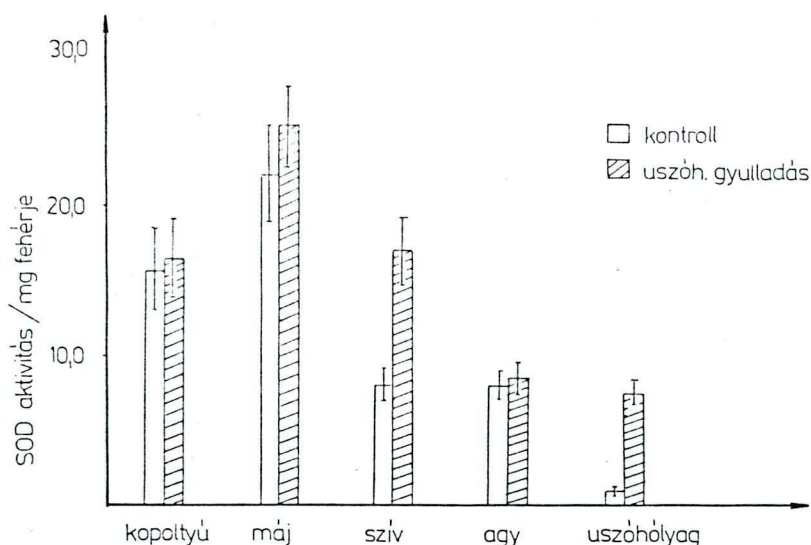
A halak úszóhólyag gyulladáshoz vezető megbetegedését (Aerocistis), német szerzők Hofer (1904) és Fiebieger (1913) írták le először 1904-ben, akik e megbetegedést paraziták, elsősorban coccidiumok tömeges jelenlétére vezetik vissza. Az úszóhólyag gyulladása oktanál nem egységes. A kutatók kiváltóokként azonban esetenként más és más behatást jelölnek meg, vannak akik egyoldalú takarmányozásnak, mások bizonyos aminosavak hiányának tulajdonítják, ill. vírusos eredetre gondolnak. A betegség leggyakrabban idült formában jelenik meg. Sok esetben, különösképpen fiatal halaknál jellegzetes tünetek nélkül zajlik le, csak az állatok elpusztulását követő boncoláskor derül fény a betegségre.

Mint ahogyan a bevezetőben már utaltunk rá, számos gyulladáshoz vezető megbetegedésben szerepet tulajdonítanak a szabadgyököknek. Ugyanis a fagocita sejtek működésekor keletkező O_2^- és H_2O_2 kijut a sejten kívülre is, s az extracelluláris tér gyenge antioxidáns védelme miatt károsíthatják az ép szöveteket. Kimutatták, hogy a felszabaduló O_2^- egy plazma prekuzorral - ami feltehetően egy albumin-lipid komplex amit maguk a fagociták termelnek - reagálva a fagocitákat aktiválja. Amíg van a gyulladás helyszínén fagocitákat aktiváló anyag, addig a folyamat erősödik, mert az aktiválódáskor keletkező ROI-ek a helyszínen összegyűlt leukocitákból olyan nagy mennyiségben szabadulnak fel, hogy magukat a leukocitákat is károsítják, ezáltal további intermedierok, lizoszómális enzimek szabadulnak fel, fokozva a szövetkárosodást. A SOD enzim több állat kísérlet során jó gyulladásgátlónak bizonyult (Fantone és Ward 1982, Petrone és mtsai. 1980).

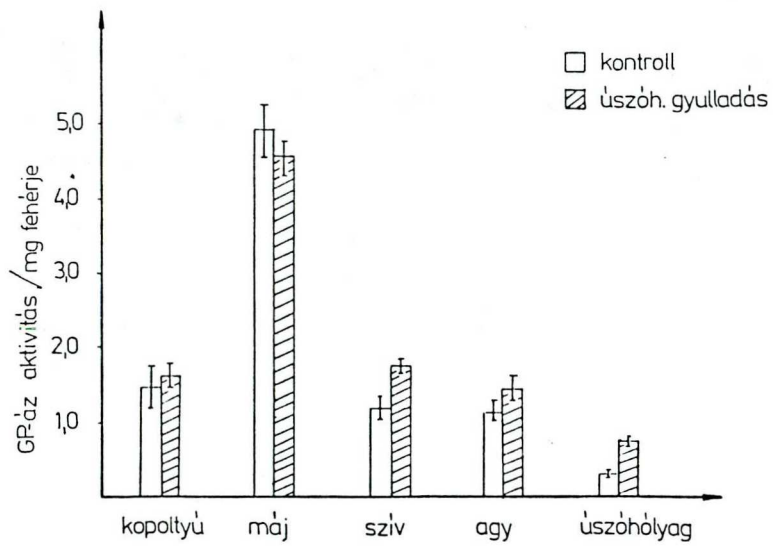
Mindezek ismeretében megvizsgáltuk úszóhólyag gyulladáshoz vezető megbetegedésben szenvedő halak különböző szervének SOD, Kataláz, GP-áz aktivitását valamint a szövetek LPO értékeit. A halakat a szarvasi Haltenyésztési Kutató Intézettől kaptuk.

Az úszóhólyag gyulladással rendelkező halak úszóhólyagjában minden esetben magasabb aktivitásokat mérünk mint a kontroll halakban, különösen a SOD és a kataláz enzimek aktivitása magas, ami szabadgyökök és H_2O_2 fokozott felszabadulására utal, és szoros összefüggésben áll a gyulladással szövetekben lejátszódó fentebb részletesen ismertetett folyamatokkal (49,50.ábrák). A GP-áz aktivitás is növekedett ami a lipid peroxidációs folyamatok fokozódására utal, ami kimutatható volt az úszóhólyagban (50,51.ábrák).

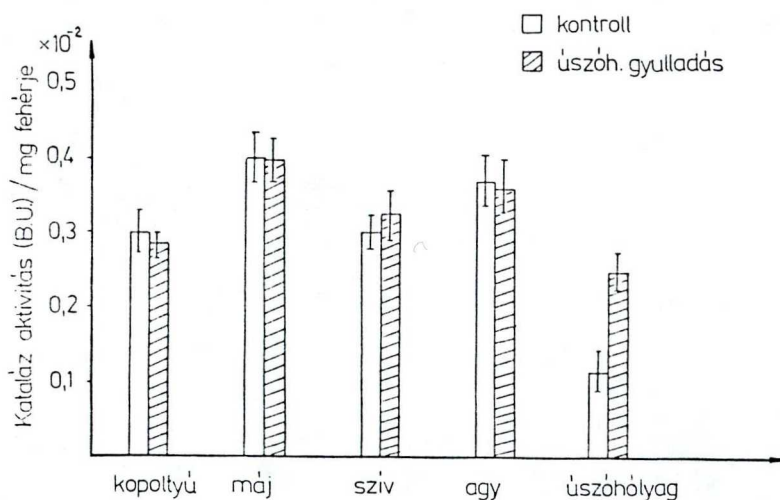
Jelentős SOD aktivitás figyelhető meg a beteg halak szívében (49. ábra), ami arra utal, hogy a gyulladás helyén fokozott mértékben felszabaduló szabadgyökök a keringéssel más szervekhez is eljuthatnak s ott szövetkárosodást fejthetnek ki.



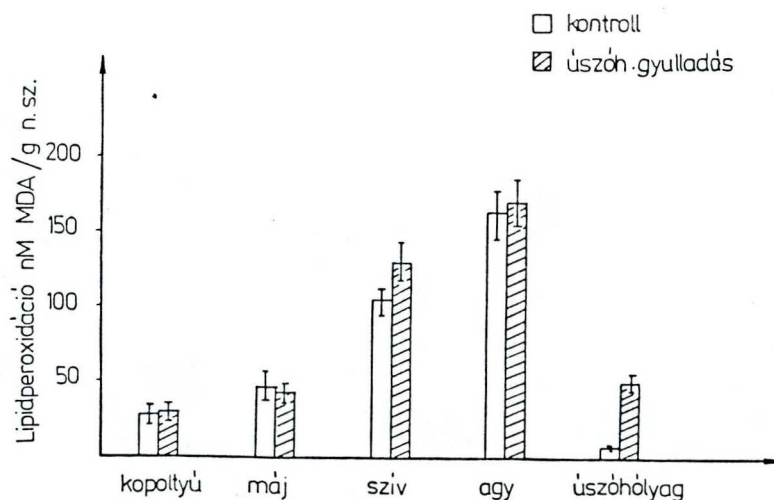
49. ábra. Egészséges és úszóhólyag gyulladással megbetegedő pontyok különböző szerveinek szuperoxid dizmutáz (SOD) specifikus aktivitása



50. ábra. Egészséges és úszóhólyag gyulladásos megbetegedésben szenvedő pontyok különböző szervének glutathion peroxidáz (GP-áz) specifikus aktivitása



51. ábra. Egészséges és úszóhólyag gyulladással megbetegedésben szenvedő pontyok különböző szerveinek kataláz specifikus aktivitása



52. ábra. Egészséges és úszóhólyag gyulladással megbetegedésben szenvedő pontyok különböző szerveinek lipid peroxidációs értékei.

4.9. A szelén antioxidáns hatásának vizsgálata a pontyban

Cross és munkatársai (1977) megállapították, hogy szelén ill. E-vitamin hiányos tápanyaggal táplált patkányokban a paraquat toxikusabb hatást fejtett ki mint a kontroll állatokban. A szelén hiányos állatokban növekedett a lipid peroxidáció mértéke, a lizoszómális enzimek aktivitása, a glutation peroxidáz aktivitás pedig csökkent. Megállapították továbbá, hogy gyulladásgátlók előzetes adásakor (aspirin, indomethacin), megnövekedett a SOD enzim aktivitása, ami növelte a kísérleti állatok ellenálló képességét a PQ-val szemben.

A szerzők által kapott eredményeket figyelembe véve kísérleteink során arra kerestük a választ, hogy szelén adásával növelhető-e a halak ellenálló képessége a PQ károsító hatásával szemben.

A halak különböző szerveinek szelén tartalmára irodalmi adat nem állt rendelkezésünkre, ezért kezdeti lépésként ezt határoztuk meg. A vizsgált szervek közül a májban, szívben közel azonos értékeket találtunk, a legalacsonyabb mennyiséget a vörös izomban mértük (53. ábra). A kapott eredmények alapján 50 ill. 100 μg /test-súly kg szelént (Na_2SeO_3) adtuk be a halaknak a hasüregébe. Ez kb. másfél ill. kétszeres mennyisége a testsúly kg-ra számított átlagos szelén tartalmuknak. Ezután megvizsgáltuk a szelén tartalom alakulását a vérben mind két koncentráció esetében a szelén beadását követően 24, 48, 72 és 96 óra elteltével. Mindkét koncentrációnál 24 óra elteltével volt a legmagasabb a szelén koncentráció a vérben, majd azután csökkent, s 72 óra után beállt egy szintre (54. ábra).

Ezek ismeretében a következő kísérletet állítottuk be. A halak egy-egy csoportjának 50 μg /tsly.kg Se-t ill. 100 μg /tsly.kg Se-t adtuk intraperitoniálisan, egy másik csoportját 10mg/l PQ-val bekezeltek (a vízbe adtuk a hatóanyagot). További két csoportot bekezeltek 10 mg/l PQ-val és beoltottuk Se-al. Mindezek mellett beállítottunk egy kontroll csoportot is. A 0. percben ill. a kísérlet végeztével 96 óra múlva levett mintákból mértük a SOD, a

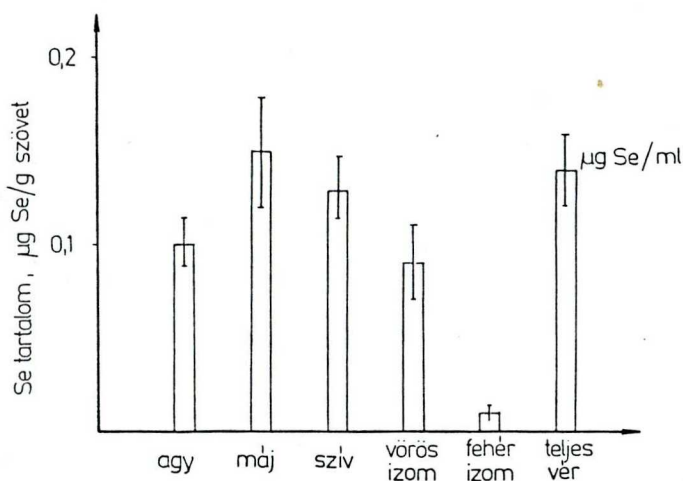
kataláz, a GP-áz aktivitásokat valamint az LPO-t, s a szelén tartalmat. Az enzimaktivitásokat a vörösvérsejtekből mértük.

A PQ hatására a vérben a SOD és a GP-áz aktivitás növekedett meg jelentős mértékben (55, 56. ábrák). Csak Se hatására a vér GP-áz aktivitása mindkét koncentráció esetében emelkedett, érdekes viszont, hogy hasonló mértékben megemelkedett a kataláz aktivitás is (57. ábra). Az LPO viszont a kontroll értékekhez képest csökkent (58. ábra). Megvizsgálva azokat a halakat amelyeket Se-el + PQ-al kezeltünk azt tapasztaltuk, hogy a PQ + Se hatására csökkent a SOD aktivitás a csak PQ-val kezeltékhez képest, s az LPO értéke hasonlóképpen alacsonyabb volt (55, 58. ábrák). A GP-áz valamint a kataláz aktivitás a PQ-al kezelt Se-el beoltott állatokban sem haladta meg a csak Se-el kezelt halakban mért aktivitások értékét (56, 57. ábrák). Mindezekből azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a Se fokozta az állatok antioxidáns védekező képességét s ezáltal csökkentette a PQ toxikus hatását. A lipid peroxidációra kapott értékek még inkább megerősítenek bennünket ezen állításunkban, hiszen a Se-al kezelt állatokban a PQ LPO-t fokozó hatása egyáltalán nem figyelhető meg. Sőt az LPO értékek ezekben a halakban még a kontroll értékeket alul is múlják (58. ábra).

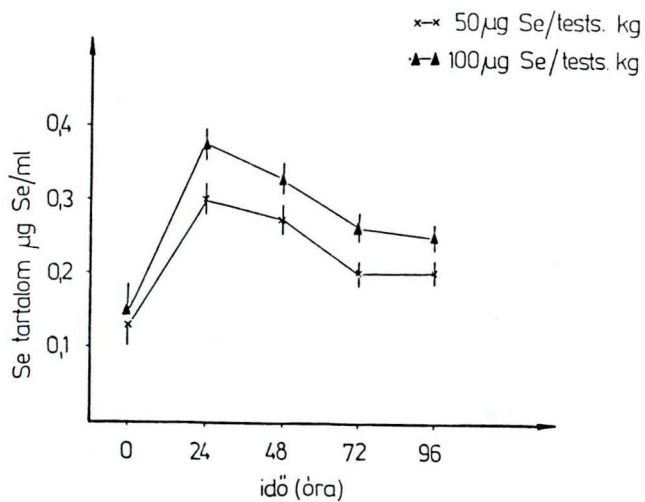
A kontroll és a kezelt halakból mért Se tartalom megoszlás jól korrelál a különböző csoportokban mért GP-áz aktivitás értékekkel, ami arra utal, hogy a vérben az oldott állapotban levő Se aránya kicsi a kötött Se-hoz viszonyítva.

Annak eldöntésére, hogy a vérből a Se a vesén át kiürül ill. akkumulálódik a halak szervezetében, meghatároztuk egyes szervek Se tartalmát. A 54. ábrán látható hogy 96 óra elteltével a beadott Se egy része kiürült. Megvizsgálva bizonyos szöveteket, azt tapasztaltuk hogy a szövetek Se tartalma viszont nőtt (59. ábra), ami ugyanakkor GP-áz aktivitás növekedést is okozott (60. ábra). A Se-al beoltott PQ-al kezelt állatokban mért GP-áz aktivitások a szövetekben sem haladták meg a csak Se-al beoltott állatokban mért aktivitás értékeket.

Az irodalmi adatok és az általunk kapott eredmények alapján megállapíthatjuk, hogy a Se-dependens glutation peroxidáz aktivitás Se adással növelhető, így fokozható a szervezet védekező képessége a káros oxidatív anyagcsere folyamatokkal szemben.

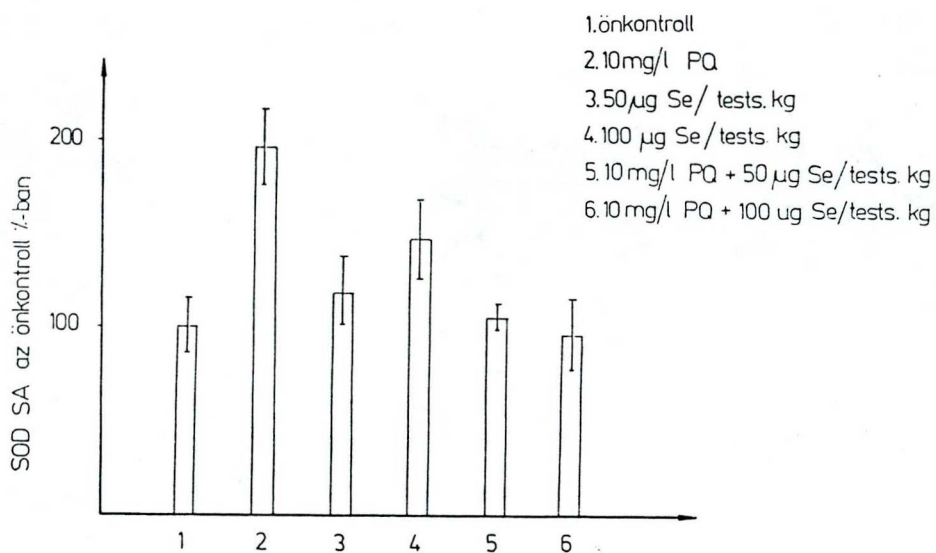


53. ábra. Szelén megoszlás a ponty különböző szerveiben és a vérben. (Egyedszám:10)

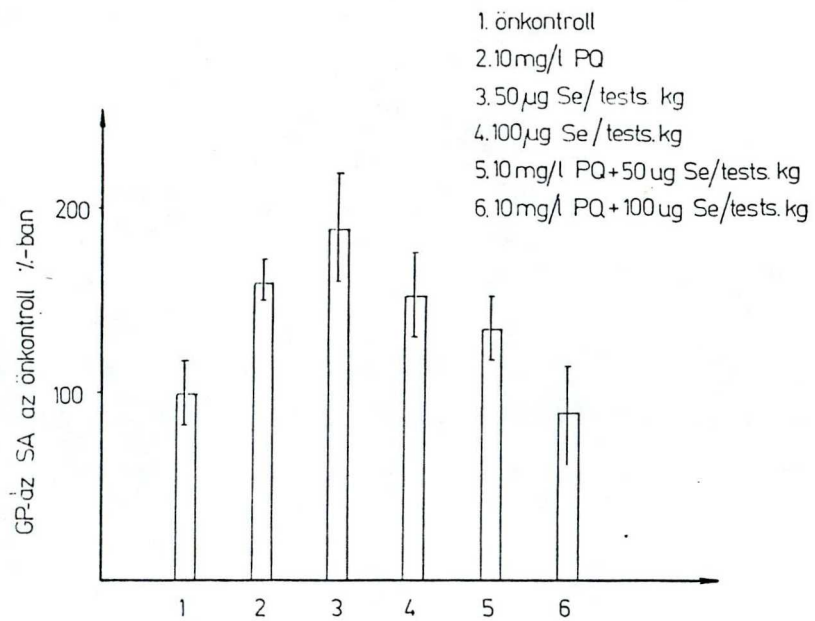


54. ábra. A szelén (Se) koncentrációváltozása a vérben 50 ill.100 µg/testsúly kg Se beadását követő 24, 48, 72, 96 óra elteltével. (Egyedszám: 5)

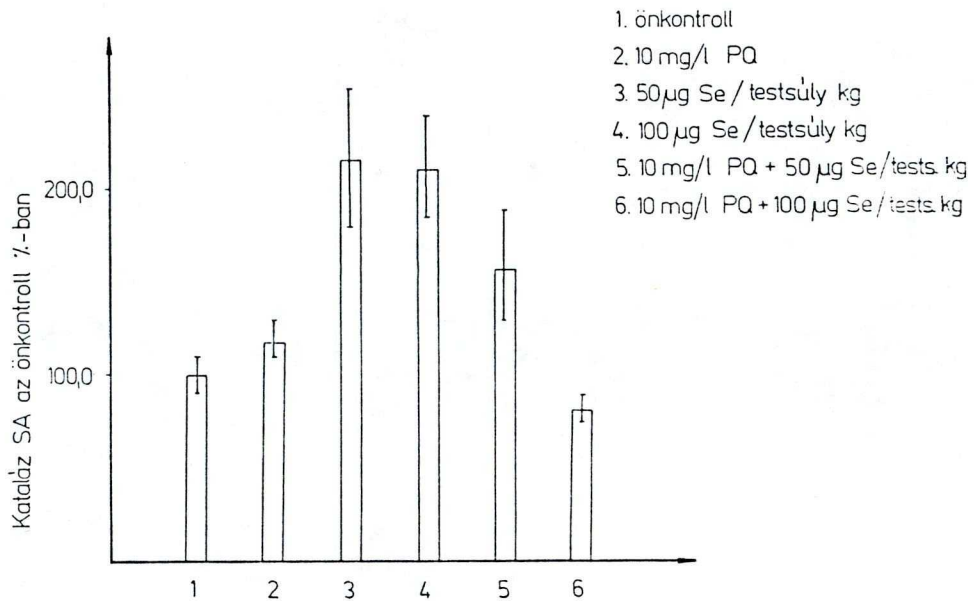




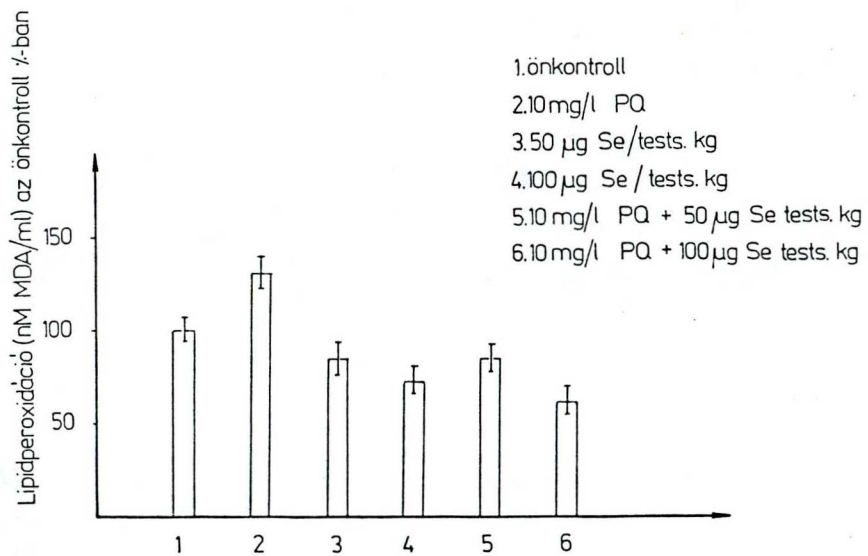
55. ábra. A paraquat (PQ) valamint a szelén (Se) egyedi és együttes hatásának vizsgálata a vörösvérsejtek szuperoxid dizmutáz (SOD) specifikus aktivitására a pontyban 96 óra elteltével. (Egyedszám:10, az értékek az önkontroll %-ában vannak kifejezve)



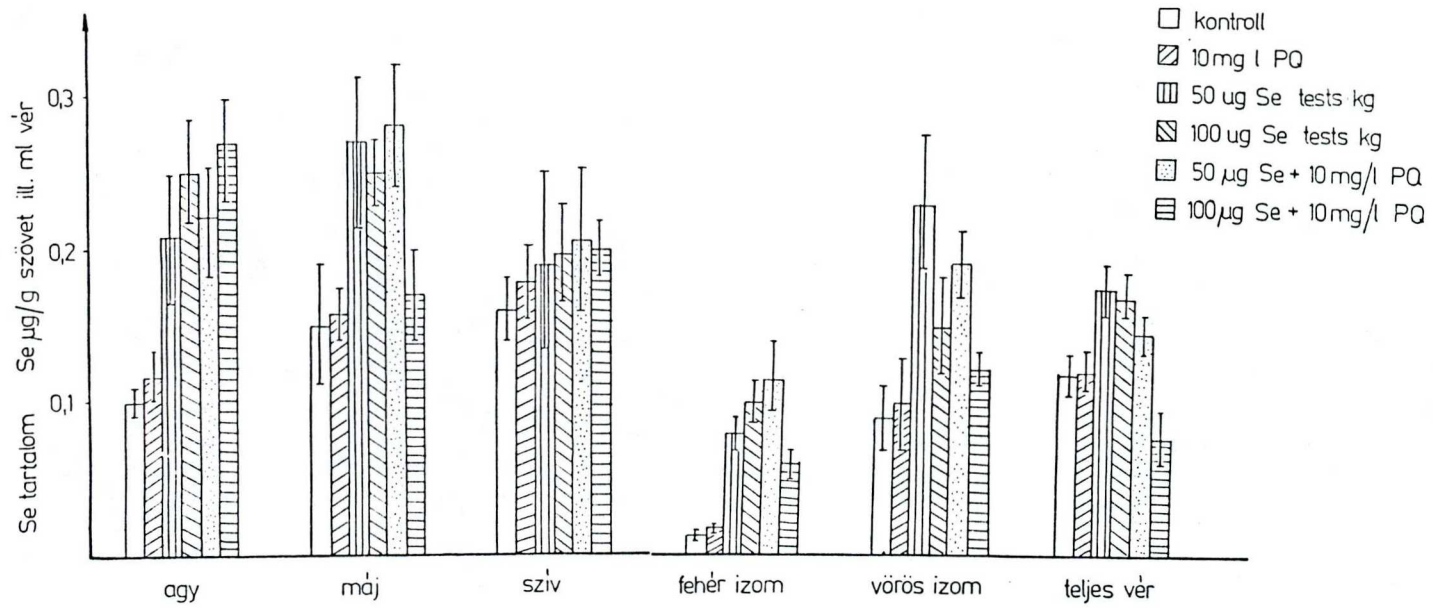
56. ábra. A paraquat (PQ) valamint a szelén (Se) egyedi és együttes hatásának vizsgálata a vörösvérsejtek glutation peroxidáz (GP-áz) specifikus aktivitására pontyban 96 óra elteltével (Egyedszám:10, az értékek az önkontroll %-ában vannak kifejezve).



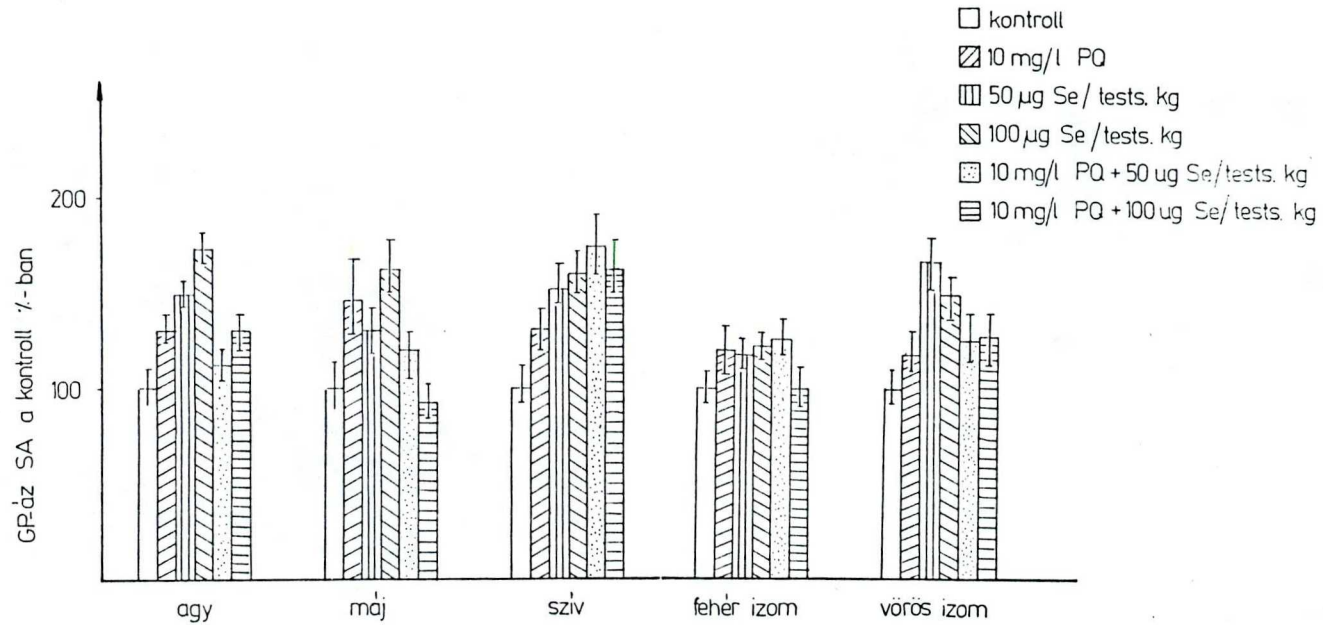
57. ábra. A paraquat (PQ) valamint a szelén (Se) egyedi és együttes hatásának vizsgálata vörösvérsejtek kataláz specifikus aktivitására a pontyban 96 óra elteltével (Egyedszám:10, az értékek az önkontroll %-ában vannak kifejezve)



58. ábra. A paraquat (PQ) valamint a szelén egyedi és kombinált hatásának vizsgálata a vörösvérsejtek lipid peroxidációjára a pontyban 96 óra elteltével (Egyedszám:10, az értékek az önkontroll %-ában vannak kifejezve)



59. ábra. A szelén (Se) koncentráció változása a ponty különböző szöveteiben ill. a vérben 96 óra elteltével a kontroll halakban valamint a paraquat (PQ) és szelén (Se) egyedi és együttes kezelésekre hatására (Egyedszám:10)



60. ábra. A glutation peroxidáz (GP-áz) specifikus aktivitás változása a ponty különböző szerveiben paraquat (PQ) és szelén (Se) egyedi és kombinált kezelések hatására 96 óra elteltével (Egyedszám:10, az értékek a kontroll %-ában vannak kifejezve)

Összefoglalás

Kísérleteink során vizsgáltuk a SOD, a kataláz, a GP-áz enzimeknek a halak antioxidatív enzimrendszerében betöltött szerepét fiziológias valamint patológias körülmények között.

Eredményeinket az alábbiakban összegezzük:

A ponty májból tisztított Cu,Zn-SOD enzim biokémiai tulajdonságaiban (molekula súly, aminosav tartalom, izoelektrons pont) jó egyezést mutat más fajokból eddig ismert hasonló enzimek tulajdonságaival. Izoelektromos fókuszálással 2 elkülöníthető izoenzimet tartalmaz melyek izoelektromos pontjai: $Pi=4.9$, $Pi=4.73$.

Mind a Cu,Zn-, mind pedig a Mn-SOD enzimeknek több izoenzime ismeretes emlős fajokban, melyekről még nem tisztázott, hogy egy gén által termelt termékek vagy posztszintetikus módosulás révén keletkeznek. A SOD enzimnek minden vizsgált halfajban több izoenzimét tudtuk kimutatni a különböző szervek (agy, szív, máj, kopolyú) homogenizátumában izoelektromos fókuszálással. A különböző fajok szerv izoenzim képe eltér egymástól, de különbség van az egyes fajok különböző szerveinek izoenzim képében is.

A SOD, kataláz, GP-áz enzimek szervenkénti aktivitás megoszlása valamint a LPO mértéke eltéréseit mutat a különböző halfajokban, ami arra utal, hogy összefüggés áll fenn a szabadgyök reakciók mértéke valamint az életmódbeli különbségek között.

Ellentétben az idős korban tapasztalható enzim aktivitások csökkenésével és a LPO erőteljes fokozódásával, ami szoros összefüggésben áll az élő szervezetek öregedési folyamataival, a kezdeti fejlődési szakasztól az ivarérett kor eléréséig vizsgálva a halak antioxidatív enzimrendszerét minden esetben az enzimek aktivitásának növekedését tapasztaltuk. Ez testtömegük gyarapodását

előidézõ fokozottabb anyagcsere folyamataikkal függ össze. Az enzim aktivitások növekedése ellenére kismértékû LPO növekedés figyelhetõ meg, ami azt jelenti, hogy normál fiziológias körülmények között sem védett a szervezet 100%-os mértékben a LPO-s folyamatokkal szemben. Kis mértékû membrán károsodások állandóan végbemehetnek. Ez alátámasztja a szabadgyököknek az öregedési folyamatokban betöltött szerepét, mivel idõs korban nem csak a védekezésben szerepet játszó enzimek aktivitása csökken hanem a reparációs folyamatok is gyengülnek így a membránok és egyéb létfontosságú fehérjék ill. nukleinsavak károsodása már élettani funkciók zavarát okozhatja.

A halak poikilotherm állatok lévén anyagcsere folyamataikban nagyfokú eltérés mutatkozik a téli és nyári idõszakot összehasonlítva. Az általunk vizsgált antioxidáns enzimek szezonális aktivitás változása szoros összefüggésben áll élettani folyamataik ezen évszaktól függõ változásával.

A növényvédõszerekkel végzett in vivo és in vitro kísérleteink további bizonyítékát adják, hogy a mezõgazdaságban felhasznált vegyszerek veszélyeztetik a vízi ökoszisztémák egyensúlyát. A vízben jól oldódó hatóanyagok bekerülnek a halak szervezetébe, ott feldúsulhatnak és súlyos mérgezést okozhatnak. Mind a PQ-, mind pedig a MD-ról bebizonyosodott, hogy szabadgyök generáló hatásukkal jelentõsen befolyásolják a halak oxigén függõ anyagcsere útjait. A Cu egyrészt fokozza a szabadgyök reakciókat másrészt lehet esetleges SOD aktivitást fokozó hatása is, viszont magas koncentrációban gátolja az enzim aktivitását.

A természetben gyakran előfordul, hogy kevesebb oxigén áll a halak rendelkezésére mint az élet folyamataik megkövetelnék. Ilyenkor szervezetük az oxigénhiány mértékétõl függõen kisebb vagy nagyobb mértékben károsodhat. Azt tapasztaltuk, hogy hipoxiás állapotban fokozódik szervezetükben a szabadgyök-reakciók mértéke, ami a vészhelyzetben az energiaraktárak fokozódó mobilizá-

iós folyamataival ill. az elektrontranszportlánc enzimeinek fokozódó autoxidációs folyamataival magyarázható.

Hipoxiás körülmények között csökken a szövetek PQ felvétele.

A halak úszóhólyag gyulladásos megbetegedésének kortana eddig még nem tisztázott folyamat. Méréseink szerint a gyulladás helyén fokozódó szabadgyök és H_2O_2 felszabadulásnak (amit az antioxidatív enzimek aktivitás növekedése valamint a LPO fokozódása jelez) is szerepe lehet a betegség kifejlődésében.

A szeléniummal mint antioxidánssal vezett kísérletek során azt tapasztaltuk, hogy 50 ill. 100 μg /testsúly kg szelén intraperitoniális adásával megnövekedett a GP-áz aktivitás, csökkenthető volt a PQ toxikus hatása a halakban. A halak szervezetéből a Se nem ürült ki - vagy legalábbis kismértékben - hanem bedúsult a különböző szervekbe.

Az antioxidatív enzimrendszerrel tanszékünkön ezen munka keretében kezdtünk el foglalkozni. A dolgozatban ismertetett kísérletes munka ezzel nem zárult le. Tervezzük a továbbiakban olyan természetes vagy mesterséges antioxidánsok hatásának vizsgálatát amelyek esetleges nagyüzemi alkalmazhatósága is lehetővé válhat, fokozni képesek a halak antioxidatív védekezőrendszerének aktivitás növelésén keresztül az esetleges fertőzések ill. mérgezésekkel szembeni ellenálló képességüket.

6. A dolgozatban használt rövidítések

AChE	acetilkolinészteráz
BSA	bovin szérum albumin
DAN	diaminonaftalin
DBB	dibenzoil benzén
DEAE	trietyl-amino-etil
DPBF	1,3-difenilizobezofurán
E	enzim egység
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav x Na
ESR	elektron spin rezonancia
G-6-PD	glukóz-6-foszfát dehidrogenáz
GP-áz	glutation peroxidáz
GSH	redukált glutation
GSSG	oxidált glutation
Hb	hemoglobin
HO ₂ [•]	perhidroxigyök
LPO	lipid peroxidáció
MDA	malondialdahid
MD	metidation
NADP	nikotinsavamid-adenin-dinukleotid-foszfát oxidált forma
NADPH	nikotinsavamid-adenin-dinukleotid-foszfát redukált forma
NBT	nitro-tetrazoliumkék
n.sz.	nedves szövet
O ₂ ^{-•}	szuperoxid aniongyök
¹ O ₂	szinglett oxigén
•OH	hidroxil gyök
Pi	izoelektromos pont
PQ	paraquat
•R	alkil gyök
•RO	alkoxi gyök
•ROO	peroxi gyök
ROOH	lipid hidroperoxid

ROI	reaktív oxigén intermedier
SA	specifikus aktivitás
SDS	nátrium-dodecil szulfát
Se	szelén
S.D.	átlagszórás
SOD	szuperoxid dizmutáz

7. A-felhasznált irodalom-jegyzéke

- Albergoni, V. and Cassini, A.,
A cupro-zinc protein with superoxide-dismutase activity from horse-liver. Isolation and properties.
Comp. Biochem. Physiol. 478, 767-771, 1974.
- Aldrich, T.K., Fisher, A.B., Cadenas, E., and Chance, B.,
Evidence for lipid-peroxidation by paraquat in the perfused rat lung.
J. Lab. Clin. Med. 101 (1), 66-73, 1983.
- Alftan, G.
A micromethod for determination of selenium in tissues biological fluids by single test-tube fluorimetry
Analitica Chimica Acta, 165, 187-194, 1984.
- Allen, R.G., Farmer, K.J., Newton, R.K. and Sohal, R.S.
Effects of paraquat administration on longevity, oxygen consumption, lipidperoxidation, superoxide dizmutase, catalase, glutathione reducyase, inorganic peroxides and glutathione in the adult housfly
Comp. Biochem. Physiol. 78C, 283-288, 1984
- Antalfi, A. és Tölg, I.,
Halgazdasági ABC, Mezőgazdasági Kiadó, 1971.
- Amal Ali Rageb Radi
Influences of environmental conditions and pollutants on the quantities of phospho-lipid fatty acids and antioxidant enzymes in fish
Candidate Dissertation, 1985.
- Asayama, K. and Burr, J.M.
Joint purification of mangano cuprocinc superoxide dismutases from single source. A symplified method.
Anal. Biochem. 136, 336-339, 1983.
- Asztalos, B. and Nemcsók, J.
Effect of pesticides on the LDH activity and isoenzyme pattern of carp (Cyprinus carpio L.)
Comp. Biochem. Physiol. 82C, 217-219. 1985.
- Aust, S.D. and Svingen, B.A.
The role of iron in enzymatic lipid peroxidation.
In: Free Radicals in Biology, vol. 5. Pryor, W.S. Ed. Academic Press, New York, 1982.
- Babior, B.H.
Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes.
N. Eng. J. Med. 298 (12), 659-668, 1978.

- Badwey, J.A., Karnovsky, M.L.
Active oxygen species and the functions of phagocytic leukocytes.
Ann. Biochem. 49, 695-726, 1986.
- Bannister, I.V., Bannister, W. and Wood, E.
Bovine erythrocyte copper-zinc protein. I. Isolation and general characterization
Eur. J. Biochem, 18, 178-183, 1971.
- Bannister, I.V., Anastasi, A. and Bannister, W.
Cytosol superoxide dismutase from sword fish (*Xiphias gladius* L.) liver
Comp. Biochem. Physiol., 56B, 235-238, 1977.
- Barber, A.A. and Bernheim, F.
Lipid-peroxidation: its measurement, occurrence and significance in animal tissues
Adv. Gerontol. Res. 2, 355-364. 1976.
- Barboriak, J.J., Shetty, K.R., El-Ghatit, A.Z., Kalbfleisch, J.H.
Plasma high-density lipoprotein cholesterol and vitamin E supplements. Vitamin-E: biochemical and clinical aspects.
Ed: Lubin, B., Machlin, L.J. Ann. New York Acad. Sci., 393, 174-183, 1982.
- Bartkowiak, A., Grzelinska, E., Varga, I. and Leyko, W.
Studies on superoxide dismutase from cod (*Gadus Morhua*) liver
Int. J. Biochem. 13, 1039-1042, 1981.
- Bartosiewicz, G., Mézes, M.
Az E-vitamin plazmaszintje és a peroxidációt szabályozó egyes enzimek aktivitása rheumatoid arthritisben és osteoarthrosisban.
Magyar Rheumatológia, 24, 65-70, 1983.
- Bauman, G. and Crambach, A.
A highly-crosslinked, transparent polyacrilamid gel with improved mechanical stability for use in isoelectric focusing and isotachopheresis
Anal. Biochem. 70, 32, 1976.
- Beauchamp, C. and Fridovich, I.
Superoxide dismutase: Improved assay and an assay applicable to acril-amid gels
Anal. Biochem. 44, 276-287, 1971.
- Beers, R.F. and Sizer, I.W.
Spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase.
J. Biol. Chem., 195, 133-140, 1952.

- Brock, C.J. and Harris, J.I.
Superoxide dismutase from *Bacillus stearothermophilus*, reversible removal of manganese and its replacement by other metals.
Biochem. Soc. Trans., 5, 1537-1543, 1977.
- Bus, J.S., Aust, S.A. and Gibson, J.E.
Superoxide- and singlet oxygen-catalyzed lipid peroxidation as a possible mechanism for paraquat (methyl viologen) toxicity
Biochem. Biophys. Res. Commun., 58, 749, 1974.
- Bus, J.S. and Gibson, J.E.
Mechanism of superoxide radical mediated toxicity
J. Toxicol.-Clein. Toxicol., 19, (6,7), 689-697, 1982.
- Chance, B.
An intermediate compound in the catalase-hydrogen peroxide reaction.
Acta Chem. Scand. 1, 236-267, 1947.
- Chance, B., Herbert, D.
The enzyme-substrate compounds of bacterial catalase and peroxidase
Biochem. J. 46, 402-414, 1950.
- Chance, B., Sies, H., Boveries, A.
Hydroperoxide metabolism in mammalian organs.
Physiol. Rev. 59, 527-605, 1979.
- Chiu, D.T.Y., Stults, F.H. and Tappel, A.L.
Purification and properties of rat lung soluble glutathione peroxidase
Biochim. Biophys. Acta, 445, 558-566, 1976.
- Chopade, H.M. and Deuterman, W.C.
Studies on the in vitro metabolism of methidathion by rat and mouse liver
Pest. Biochem. and Physiol. 15, 105-111, 1981.
- Chow, C.K. and Tappel, A.L.
An enzymatic protective mechanism against lipid peroxidation damage to lungs of ozone-exposed rats
Lipids 7, 518-524, 1972.
- Clarc, D.G., McElliot, T.F. and Hurst, E. W.
The toxicity of paraquat
Brit. J. Indust. Med., 23, 126-132, 1966.
- Cohen, G. and Hochstein, P.
Enzymatic protection against hydrogenperoxide toxicity
Biochemistry, 2, 1420-1428, 1963.

- Conning, D.M., Fletcher, K. and Swan, A. A.
Paraquat and related bipyridyls
Br. Med. Bull., 25, 245, 1969.
- Crapo, J.D., McCord, J.M. and Fridovich, I.
Preparation and assay of superoxide dismutases
Meth. Enzymol., 53, 382-390, 1978.
- Cross, C.E., Reddy, K.A., Hasegava, G.K. Chiu, M.M., Tyler, W.S.
and Omaye, S.T.
Paraquat toxicity: Effects of selenium deficiency and anty in-
flammatory drug pretreatments
In: Biochemical Mechanism of Paraquat toxicity, Ed. Autor, A.
P., Academic Press, 1977.
- Csengeri, I., Farkas, T., Majoros, F., Oláh, J. and Szalay, M.
Effects of feeds on the fatty acid composition of carp (*Cyprinus
carpio* L.)
Aquacultura Hungarica (Szarvas) 1, 24-34, 1978.
- Daughtery, H.W., Sandowski, S.J. and Baker, E.E.
A new iron containing superoxide dismutase from *Escherichia
coli*
J. Biol. Chem., 253, 5220-5228, 1978.
- Diezel, W., Kopperschlager, G. and Hoffmann, E.
An improved produce for protein staining in poliacrilamide
gels with a new type of comassie brillant blue
Anal. Biochem., 48, 617-625, 1972.
- Eto, M.
Organophosphorus pesticides: Organic and Biological chemistry
CRC Press, Cleveland 1974.
- Fairchter, R.D. and Wison, A.F.
Paraquat poisoning: Manifestations and therapy
Am. J. Med., 59,751, 1975.
- Fantone, J.V., Ward, P.A.
Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leuko-
cytes dependent inflammatory reactions
Amer. J. Pathol. 107 (3), 397-418, 1982.
- Farkas, I., Csengeri, I., Majoros, F. and Oláh, J.
Metabolism of fatty acids in relation to diet in the carp,
Cyprinus carpio L.
Aquaculture, 14,57-65, 1978.
- Fehér, J. és Vereckei, A.
Szabadgyök-reakciók jelentősége az orvostudományban
Medicina, 1985.

- Fieber, J.
Studien über Schwimmblasen coccidien der Gadus-Arten (Eimeri-
agadi n. sp.)
Arch. f. Protistencunde, 315-103. 1913.
- Fisher, H.K., Humphries, M. and Bails, R.
Paraquat poisoning: Recovery from renal and pulmonary damage
Ann. Int. Med., 75, 731, 1971.
- Fisher, H.K.
Importance of oxygen and of pulmonary alveolar surfactant in
lung injury by paraquat
In: Biochemical mechanism of paraquat toxicity, Ed. Autor, A.
P., Academic Press, New York, 1977.
- Forman, H.J., Evans, H.J., Hill, R.L. and Fridovich, I.
Histidine at the active site of superoxide dismutase
Biochemistry, 12, 823, 1973.
- Forman, H.J. and Fridovich, I.
On the stability of bovine superoxide dismutase. The effects
of metals
J. Biol. Chem., 248, 2645, 1973.
- Freeman, B.A. and Crapo, J.D.
Hyperoxia increases Oxygen radical production in rat lungs
and lung mitochondria
The J. of Biol. Chem. 256, 10986-10992, 1981.
- Freeman, B. and Crapo, J.D.
Biology of disease. Free radicals and tissue injury
Lab. Invest., 47, 412-426 1982.
- Fridovich, J.
Superoxide dismutases.
Adv. Enzimol., 45, 35-41, 1974.
- Fridovich, I.
Superoxide dismutases.
Annu. Rev. Biochem. 44, 147-159, 1975.
- Fridovich, I.
Oxygen radicals, hydrogenperoxide and oxygen toxicity
In: Free radicals in Biology. vol.1, Pryor, W.A., Ed.,
Academic Press, New York, 239, 1976.
- Fridovich, I.
The biology of free radicals
Science, 201, 875-880, 1978.
- Fridovich, I.
Superoxide radical: an endogenous toxicant.
Ann. Rev. Pharmacol.Toxicol. 23, 239-257, 1983.

- Gabrielak, T., Piatkovska, W., Leyko, W. and Pérés, G.
Seasonal variations in the activities of peroxide metabolism
enzymes in erythrocytes of freshwater fish species
Comp. Biochem. Physiol., 75C, 383-385, 1983.
- Gibson, J.E. and Cagen, S.Z.
Paraquat induced functional changes in kidney and liver
In: Biochemical Mechanisms of Paraquat Toxicity, Anne Pomeroy
(ed), Academic Press, 118-135, 1977.
- Gregory, E.M., Goscin, S.A. and Fridovich, I.
Superoxide dismutase and oxygen toxicity in an eukariote
J. of Bacteriol., feb., 456-460, 1974.
- Guarnieri, C., Lugaesi, A., Flamigni, F., Muscari, C. and Caldara,
C. M.
Effect of oxygen radicals and hyperoxia on rat heart ornithine
decarboxylase activity
Biochim. et Biophys. Acta, 718, 157-164, 1982.
- Gutteridge, J.M.C. and Kerry, P.J.
Detection by fluorescence of peroxides and carbonyls in samples
of arachidonic acid
Br. J. Pharmacol 76, 459, 1982.
- Gutteridge, M.C.J. and Wilkins, S.
Copper salt-dependent hydroxyl radical formation damage to
proteins acting as antioxidants.
Biochim. Biophys. Acta 759, 38-41, 1983.
- Halliwell, B. and Foyer, C.H.
Ascorbic acid, metal ions and the superoxide radical
Biochem. J. 155, 697-700, 1976.
- Harman, D.
Prolongation of life: role of free radical reactions in aging
J. Am. Ger. Soc., 17, 721-732, 1969.
- Harman, D.
Free radical theory of aging: effect of free radical reaction
inhibitors on the immune response
J. Am. Ger. Soc., 25 (9), 400-407, 1977.
- Harman, D.
Free radical theory of aging: nutritional implications.
Age, 1, 145-152, 1978.
- Harman, D.
The aging process
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78 (11), 7124-7128, 1981.

- Hartz, J.W. and Deutsch, H.F.
Preparation and physicochemical properties of human erythro-
cuprein
J. Biol. Chem. 244, 4565-4572, 1969.
- Heikkila, R.E. and Cabbat, F.S.
Chemiluminescence from autoxidising 6-hydroxydopamine: the in-
volvement of activated forms of oxygen.
Photochem. Photobiol. 8, 677-680, 1978.
- Hochstein, P., Kumor, S. and Forman, S.J.
Lipid peroxidation and the toxicity of copper J. Biol. Chem.
244, 1858-1864., 1980
- Hodgson, E.K. and Fridovich, I.
The interaction of bovine erythrocyte superoxide dismutase
with hydrogen peroxide: inactivation of the enzyme
Biochemistry, 14, 5294, 1975.
- Hofer, B.
Handbuch der Fischkrankheiten.
München, 1904.
- Holland, H.K., Alvarez, J.G., and Stoerey, B.T.
Production of superoxide and activity of superoxide dismutase
in rabbit epididymal spermatozoa.
Biology of Reproduction, 27, 1109-1118, 1982.
- Hornsby, P.J., Crivello, J.F.
The role of lipidperoxidation and biological antioxidants in
the function of the adrenal cortex.
Part. 1: A background review. Molec. Cell. Endocrinol. 30, 1-
-20, 1983.
- Jansen, E.G.
A critical review of spintrapping in biological systems.
In free radicals in biology, vol. IV. Ed. Pryor, W.A. Acade-
mic Press, New York, 116-154, 1980.
- Kearney, P.C. and Kaufmann, D.D.
Herbicides-Chemistry
Degradation and mode of action, vol. 2., Dekker, New York,
1975.
- Keele, B.B., McCord, J.M. and Fridovich, I.
Further characterization of bovine superoxide dismutase and
its isolation from bovine heart
J. Biol. Chem. 246, 2875-2880, 1971.
- Kendall, B.W. and Dargan, J.E.
Intrinsic metabolic clearance of parathion and paraoxon by li-
vers from fish and rodents
Toxicology and Applied Pharmacology 90, 235-242, 1987.

- Klebanoff, S.J.
Oxygen metabolism and the toxic properties of phagocytes.
Annals of International Medicine, 93, 480-489, 1980.
- Knowles, P.F., Gibson, J.F., Pick, F.M. and Bray, R.C.
Elektron-spin resonance evidence for enzymic reduction of oxygen to a free radical, the superoxide ion.
Biochem. J. 111, 53-60, 1969.
- Kónya, I., Karlinger, J. és Bordás, S.
Növényvédőszeres, műtrágyák 1982.
Mezőgazdasági Kiadó, Budapest, 1982.
- Kovács, K. és Halmos, M.
Szerves Kémia alapjai
1972.
- Kusunose, M., Noda, Y., Ichihara, K. and Kusunose, E.
Superoxide dismutase from Mycobacterium species, strain Takeo
Arch. Microbiol., 108, 65-70, 1976.
- Larry, W., Oberley, I.
Superoxide Dismutase I.
CRC.Press, 16, 1982.
- Leuthauser, S.W.C., Oberley, L.W., Oberley, T.D., Sorenson, J.R.J. and Ramakrishna
Antitumor effect of a copper coordination compound with superoxide-like activity
J. Natl. Cancer Inst., 66, 1077-1081, 1981.
- Lewis, D.H. and Del Maestro, R.F.
Free radicals in medicine and biology Proc. Pharmacia Symp. No. 1. Uppsala, Sweden, 1979
Acta Physiol. Scand. (Suppl.), 492, 1, 1980.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.
Protein measurement with Folin phenol reagent
J. Biol. Chem., 193, 265-275, 1951.
- Lönnerdal, B.O., Keen, C.L. and Hurley, L.S.
Isoelectric focusing of superoxide dismutase isoenzymes
FEBS Letters, 108, 51-55, 1979.
- Lukens, R.J.
Chemistry of fungicidal action, Champan and Hall, London, 1971.
- Marklund, S.
Purification and characterization of a manganese containing superoxide dismutase from bovine heart mitochondria
Int. J. Biochem., 9, 299-306, 1978.

Matkovics, B., Novák, R., Hoang Duc Hahn, Szabó, L., Varga, I and Zalesna, G.

A comparative study some more important experimental animal peroxide metabolism enzymes
Comp. Biochem. 56B, 31-34, 1977.

Matkovics, B., Szabó, L., Mindszenty, L and Iván, J.

The effects of organophosphate pesticides on some liver enzymes and lipid peroxidation
Gen.Pharmac. 11, 353-355, 1980.

Matkovics, B. and Szabó, L.

Purification of superoxide dismutase from different sources
Proc. of the Symp. on Advances in Liquid Chromatogr., 1982.

Matkovics, B., Szabó, L., Iván, J. and Gaál, I.

Some further data on effects of two organophosphate pesticides on the oxidative metabolism in the liver
Gen. Phamac. 14, 689-691, 1983.

Matkovics, B., Szabó, L., Varga, I., Barabás, K., Berencsi, G. and Nemcsók, J.

Effect of herbicide on the peroxide metabolism enzymes and lipid peroxidation in carp fish (*Hypothalamichthys molitrix*)
Acta Biol. Hung., 35, 91-96, 1984.

Mazeaud, F., Maral, J. and Michelson, A.M.

Distribution of superoxide dismutase and glutathione peroxidase in the carp: Erythrocyte manganese SOD
Biochem. and Biophys. Res. Comm., 86, 1161-1168, 1979.

McCay, P.B., Kiny, M., Lai, E.K., Poyer, S.L.

The effect of antioxidants on free radical production during in vivo metabolism of carbon tetrachloride
J. Amer. Coll. Toxicol., 2(3), 195, 1983.

McCord, I.M. and Fridovich, I.

Superoxide dismutase. An enzymatic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein)
J.Biol. Chem. 244, 6049-6055, 1969.

McCord, J.M., Boyle, J.A., Day, E.D., Jr., Rizzolo, L.J. and Salin, M.L.

A manganese-containing superoxide dismutase from human liver, in *Superoxide and Superoxide Dismutases*
Michelton, A.M., McCord and Fridovich, I., Ed., Academic Press, London, 129, 1977.

McCord, J.M. and Fridovich, I.

The biology and pathology of oxygen radicals.
Ann. Int. Med., 89, 122-128, 1978.

- Metcalf, R.L.
The chemistry and biology of pesticides
In: Pesticides in the Environment, Ed., White-Stevens, R.,
Vol. 1, Part I., Dekker, New York, 1971.
- Michael, S. and White, C.L.
Serum selenium concentration in ovarian cancer patients using
a simplified fluorimetric procedure
Biol. Trace Element Res., 10, 215-220, 1986.
- Misra, H.P. and Fridovich, I.
The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine
and a simple assay for superoxide dismutase
The J. of Biol. Chem. 3170-3175, 1972.
- Molnár, K., és Szokolai J.
Halbetegségek
Mezőgazdasági Kiadó, 1973.
- Nair, V. and Turner, G.E.
The thiobarbituric acid test for lipidperoxidation: Structure
of the adduct with malondialdehyde
Lipids, 19, 84-85.
- Nádasi, K.
Növényvédőszer kémia, Keszthely, 1979.
- Nemcsók, J., Orbán, L., Asztalos, B., Buzás, Zs., Németh, I., and
Boross, L.
Investigation on paraquat toxicity in fishes
Water International, 10, 79-81, 1985./a
- Nemcsók, J., Orbán, L., Víg, P., Asztalos, B. and Boross, L.
Effect of Cu on some biochemical parameters
Symposia Biologica Hungarica 29, 1985/b.
- Nemcsók, J., Asztalos, B., Víg, P. and Orbán, L.
The effect of an organophosphorus pesticide on the enzymes of
carp (*Cyprinus carpio* L.)
Acta Biol. Hung. 38 (1), 77-85. 1987/a.
- Nemcsók, J., Orbán, L., Asztalos, B. and Víg, P.
Accumulation of pesticides in the organs of carp, *Cyprinus*
carpio L, at 4 and 20 C
Bull. Environ. Contam. Toxicol. 39, 370-378, 1987/b.
- Nerurkar, L.S., Zeligs, J.B. and Bellanti, J.A.
Changes in superoxide dismutase, catalase and glucose-6-phos-
phate dehydrogenase activities of rabbit alveolar macrophages:
induced by postnatal maturation and/or in vitro hyperoxi-
a.
Photochem. and Photobiol. 28, 781-786, 1978.

- Nohl, H., Hegner, D.
Do mitochondria produce oxygen radical in vivo
Eur. J. Biochem. 82, 563-567, 1978.
- Ogata, M. and Hasegawa, T.
The effect of paraquat on the mitochondrial energy transfer
reaction
Cell Structure and Function, 3, 325-331, 1978.
- Petrone, W.F., English, O.K., Wony, K., McCord, J.
Free radicals and inflammation: superoxide dependent activation
of a neutrophil chemotactic factor in plasma
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77 (2), 1159-1163, 1980.
- Panagamala, R.V., Cornwell, D.G.
The effects of vitamin E on arachidonic acid metabolism
Ann. New York Acad. Sci. 393, 376-390. 1982.
- Pascone, D., Evans, S., Woodworth, J.M.
Heavy metal toxicity to fish and the influence of water hardness
Arch. Environ. Contam. Toxicol., 15, 481, 1986.
- Placer, Z.A., Cushman, L.L. and Johnson, B.C.
Estimation of product of lipid peroxidation (malonyl dialdehyde)
in biochemical systems
Anal. Biochem., 16, 359-364, 1966.
- Porter, N.A.
Prostaglandin endoperoxides
In: free radicals in Biology. Ed. Pryor, W.A., vol.IV. Academic
Press, New York, IV, 261-294, 1980.
- Puget, K. and Michelson, A.M.
Iron containing superoxide dismutase from luminous bacteria.
Biochimie, 56, 1255-1263, 1974.
- Reynolds, E.S., and Treinen, Moslem, H.
Free-radical damage in liver
In: Free radicals in biology. vol. IV. Ed. Pryor, W.A., Academic
Press, New York, 49-94, 1980.
- Ribiere, C., Sinaceur, S., Nordmann, J. and Nordmann, R.
Liver superoxide dismutases and catalase during ethanol inhalation
and withdrawal
Pharmacol. Biochem. Behav. 18, Suppl. 1., 263-266, 1983.
- Richardson, I.S., Thomas, K.A., Rubin, B.H. and Richardson, D.C.
Crystal structure of bovine Cu, Zn superoxide dismutases at 3
resolution: chain tracing and metal ligands
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72, 1349-1353, 1975.

- Rojik, I., Nemcsók, J. and Boross, L., Morphological and Biochemical studies on liver, kidney and gill of fishes affected by pesticides
Acta Biol. Hung., 34 (1), 81-92, 1983.
- Rose, M.S. and Smith, L.L.
The relevance of paraquat accumulation by tissues in Biochemical mechanism of paraquat toxicity
Ed. Autor, A.P., Academic Press, New York, 1977.
- Ross, J.H. and Krieger, R.I.
Toxicity of 1,1-alkyl-4,4-bipyridylium salts in the rat
Drug and Chem. Toxicol., 2 (3), 207, 1979.
- Sagone, A.L.Jr., Greenland, J., Kraunt, F.; Bianchine, J., Singh, D., Glucose: a role as a free radical scavenger in biological systems
J. Lab. Clin. Med. 101 (1), 97-104 1983.
- Salánki, I., Balogh, K.V. and Berta, E.
Heavy metals in animals of lake Balaton
Water Res. 16, 1147-1152, 1982.
- Salin, M.L., Day, E.D., Jr. and Crapo, J.D.
Isolation and characterization of a manganese-containing superoxide dismutase from liver
Arch. Biochem. Biophys., 187-191, 1978.
- Salin, L.M. and Wilson, W.W.
Porcine superoxide dismutase
Mol. and Cell. Bioch., 36, 157-161, 1981.
- Schreck, C.B. and Lorz, H.W.
Stress response of coho salmo (*Onchorhynchus kisutsch*) elicited by cadmium and copper of stress
J. Fish. Res. Bd. Can., 35, 1124-1129, 1978.
- Sedlak, J. and Lindsey, R.H.
Sulphydryl groups in tissue
Anal. Biochem., 25, 192-205, 1968.
- Selman, M., Montano, M., Monfort, J. and Perez-Tomayo, R.
The duration of the pulmonary paraquat toxicity Enhancement effect of O in the rat
Experimental and Molecular Pathology, 43, 388-396, 1985.

- Siggia, S.
Quantitative organic analysis via functional groups
John Wiley & Sons, New York, 255-266, 1966.
- Simpson, R.J., Neuberger, M.R. and Lin, Y.
Complete amino acid analysis of protein from single hydrolysate
J. Biol. Chem. 251, 1936-1940, 1976.
- Singh, A.
Chemical and Biochemical aspects of superoxide radicals and related species of activated oxygen
Canadian Journal of Physiology and Pharmacology. 60, 11, 1330-1345, 1982.
- Singleton, F.L. and Guthrie, R.K.
Aquatic bacterial populations and heavy metals I. Composition of aquatic bacteria in the presence of copper and mercury salts
Water. Res., 11 (8), 639-645, 1977.
- Stancliffe, T.D., and Pirie, A.
The production of superoxide radicals in the reactions of the herbicide diquat
FEBS Letters, 17, 297-299. 1971.
- Tappel, A.I.
Lipidperoxidation damage to cell components.
Fed. Proc. 32 (8), 1870-1874, 1973.
- Van den Thillardt, G., Kesbeke, F. and Waarde, A.
Influence of anoxia on the energy metabolism of goldfish, *Carassius auratus* L.
Comp. Biochem. Physiol., 1976.
- Van den Thillardt, G.
Adaptation of fish energy metabolism to hyperoxia and anoxia
Molecular Physiology 2, 49-61, 1982.
- Varga, M.
A vegyszeres gyomirtás elméleti alapjai
Szeged, 1980.
- Víg, P., Orbán, L., Nemcsók, J. und Asztalos, B.
Stoffwechsel überwachung beim karpfen (*Cyprinus carpio* L.) mit hilfe biochemischer parameters I-III.
Archiv für Experimentelle Veterinarmedizin 41/4, 1987.
- Vorhaben, J.E. and Steele, R.H.
Studies on the generation of electronic excitation states in a riboflavin-hydrogen peroxide-copper(II)-ascorbate redox system leading to chemiluminescence and/or aromatic hydroxylation
Biochemistry, 6, 1404-1412, 1967.

- Waiwood, K.G. and Beamish, F.W.
The effect of copper, hardness and pH on the growth of rainbow trout, *Salmo gairdnei*
J. Fish. Biol., 13, 591, 1978.
- Walker, J.E., Auffret, A.D., Brock, C.J. and Steiman, H.M.
Structural comparisons of superoxide dismutases in Chemical and Biochemical Aspects of Superoxide and Superoxide Dismutases
Bannister, J.V. and Hill, H.A.O., Eds., Elsevier/North Holland, New York, 212, 1980.
- Weber, K. and Osborn, M.
The reliability of molecular weight determinations by dodecyl-sulphate polyacrylamide gel electrophoresis
J. Biol. Chem., 244, 4406-4412, 1969.
- Wedemeier, G.
The role of stress in disease resistance of fishes. In: S.F. Sniesco (ed.), A Symposium on Diseases of Fishes and Shellfishes
Am. Fish. Soc. Spec. Publ., 5, 30-35, 1970.
- Weisiger, R.A. and Fridovich, I.
Superoxide dismutase. Organelle specificity
J. Biol. Chem., 248, 3582-3592, 1973.
- Yamamoto, Y.
Two different forms of glutamic-pyruvic transaminase in rat heart and their intracellular localization
Nature, 212-218, 1966.

Köszönetnyilvánítás

Ezúton is köszönetet mondok:

dr. Nemcsók János egyetemi docensnek, a biológiai tudományok kandidátusának, hogy munkámat irányította, hasznos tanácsaival segítette s annak feltételeit maradéktalanul biztosította

dr. Matkovics Béla egyetemi docensnek a kémia tudományok kandidátusának, hogy a munkám során felmerült problémák megoldásában segített, s tanácsaival szakirányú felkészültségemet gyarapította

Prof. dr. Wanda Leykonak, hogy a Lodzi Egyetem Biofizika Tanszékének munkájába bekapcsolódhattam, valamint az aminosav és az atomabszorpciós analízisek elvégzéséért

dr. Buzás Zsuzsanna egyetemi adjunktusnak az izoelektromosfókuszlási technikában nyújtott segítségéért

F. Vadadi Lászlóné asszisztensnek a kísérletek során végzett pontos, lelkiismeretes munkájáért

Patocskai Mária asszisztensnek az ábrák gondos megrajzolásáért

Kollégáimnak segítségükért

Mindazoknak akik valamilyen módon segítették a dolgozat létrejöttét