

D O K T O R I É R T E K E Z É S

A TÁVI PONTY /CYPRINUS CARPIO L./ KOLINESZTERÁZ ENZIMÉNEK
JELLEMZÉSE ÉS Néhány NÖVÉNYVÉDŐ SZER HATÁSA AZ ENZIM AK-
TIVITÁSÁRA

Készítette:

Szemesné Németh Ágnes

Témavezető:

dr. Nemcsók János

JATE Biokémiai Tanszék

Szeged

Nehézvegyipari Kutató Intézet

Veszprém

1983

B 2323



T A R T A L O M J E G Y Z É K

Bevezetés	1
1. Irodalmi áttekintés	3
1.1. Az AChE jellemzése	3
1.2. A γ ChE jellemzése	4
1.3. ChE a halaknál	5
1.3.1. ChE a halak központi idegrendszerében	6
1.3.2. ChE a halak különböző szerveiben	7
1.3.3. Az AChE szerepe a halak különböző hő- mérséklethez való alkalmazkodásában	9
2. Anyagok és módszerek	11
2.1. A halak tartása és kezelése	11
2.2. A ChE aktivitásának mérése	11
2.2.1. Ellman módszer	11
2.2.2. A pH-stat módszer	12
2.3. Fehérjetartalom meghatározása	13
3. Eredmények és értékelésük	14
3.1. Kezeletlen /kontroll/ pontyok ChE enzimének vizsgálata	14
3.1.1. Az egyes szervekben mért ChE aktivitá- sok összehasonlítása	14
3.1.2. A ChE aktivitásának függése a pH-tól	15
3.1.3. A ChE aktivitásának függése a szubsztrátkoncentrációtól	17
3.1.4. A ChE aktivitásának függése a hő- mérséklettől	19

3.2. Szervetlen fémvegyületek hatása a ChE aktivitására	21
3.2.1. A cink-klorid hatása a ChE aktivitására	22
3.2.2. A réz-szulfát hatása a ChE aktivitására	22
3.3. A paraquat hatása a ChE aktivitására	30
3.4. A metidation hatása a ChE aktivitására	36
3.5. Egy halpusztulás során bekövetkezett ChE gátlás vizsgálata	43
Összefoglalás	45
Rövidítések jegyzéke	48
Irodalomjegyzék	49
Függelék	54

B E V E Z E T É S

A mezőgazdaságban egyre növekvő mennyiségben használnak növényvédő szereket. Ezen vegyületekről már korábban kimutatták, hogy esőzés révén a vízbe kerülve káros hatást fejtenek ki. A szennyeződés miatt a víz alkalmatlanná vagy csökkent értékűvé válik emberi használatra valamint a benne zajló természetes életfolyamatok fenntartására.

A használt szerek közül a legveszélyesebbek a vízi szervezetekre a nehézfémek és az idegméreg típusú inszekticidek, ezen vegyületekből egyre többet lehet kimutatni az élővizekben. Az élővizek szennyezettségének jellemzésére az un. Daphnia tesztet alkalmazzák, s a vizsgálat során az LC_{50} értéket határozzák meg. Természetesen szubakut és krónikus toxikológiai vizsgálatokat is kell végezni. Az elmúlt negyedszázadban végzett vizsgálatok alapján tényként állapítható meg, hogy a gerincesek közül a halak a legérzékenyebbek a növényvédő szerekkel szemben. E tulajdonságuk alapján használják fel a halakat egyes esetekben a folyóvizek szennyezettségének jelzésére vagy a tisztított ipari szennyvizek minőségének ellenőrzésére.

Mivel az alkalmazott növényvédő szerek egy része már kis koncentrációban gátolja a kolinszteráz enzimet, a víz kis mértékű szennyeződésének kimutatása lehetséges a halak kolinszteráz aktivitásának mérésével is. Ez a halak környezetében levő organofoszfát szennyezés jelzésére a legáltalánosabb mutatónak tekinthető.

Mindezek figyelembevételével választottuk ki a hazánkban igen elterjedt tavi pontyot /*Cyprinus carpio* L./, s kolineszteráz enzimének érzékenységét vizsgáltuk négy, a mezőgazdaságban felhasznált anyaggal szemben. E vegyületek a cink-klorid, a réz-szulfát, a paraquat és a metidation voltak. A gátlási vizsgálatok elvégzése előtt jellemeztük a tavi ponty egyes szerveiben található kolineszteráz enzimet. A vizsgált anyagok közül három vegyület /cink-klorid, réz-szulfát, paraquat/ növényvédő hatása nem a kolineszteráz bénítésán alapul, éppen ezért érdekesnek tartottuk vizsgálni, gátolják-e a ponty kolineszteráz enzimét, továbbá hatásuk összehasonlítását a tipikus kolineszteráz gátló organofoszfát metidation hatásával.

1. I R O D A L M I A T T E K I N T É S

A gerincesek szöveteiben a kolineszteráz enzimnek két típusa fordul elő, az acetilkolineszteráz /AChE, E.C. 3.1.1.7./ és a pszeudokolineszteráz /ΨChE, E.C. 3.1.1.8./. E két enzim tulajdonságai és fiziológiai szerepe különbözőek /1/.

1.1. Az AChE jellemzése

A gerincesek agyában és eritrocitáiban fordul elő, de egyes rájak vérplazmája is tartalmazza, általában azoké, amelyekben ΨChE nincs a plazmában /2,3/.

Jellemző tulajdonságai:

- specifikus ACh-ra, az egyéb kolinésztereket csak nagyon kis mennyiségben hidrolizálja,
- szubsztrátfelesleg gátlás van,
- 10^{-5} mol/dm³ fizosztigmin /eszerin/ teljesen gátolja,
- etopropazinnal nem gátolható,
- organofoszfátok gátolják. Ez a ΨChE-ra is jellemző, azonban a két enzim nem egyformán érzékeny az organofoszfátokkal szemben, például a dietil-nitrofenil-foszfát az AChE-t magasabb koncentrációban gátolja, mint a ΨChE-t /4/.

Az AChE fontos szerepet játszik az idegrendszer funkcionális aktivitásának fenntartásában, különösen a szinapszisoknál, ahol lazán kapcsolódik a posztzinaptikus membránhoz. A transzmitterként szereplő ACh elbontását katalizálja, s így a nyugalmi állapot helyreállításában működik közre. A folyamat a sejtben nem reverzibilis. Az ACh acetil-koenzim-A és kolin kapcsolódása útján keletkezik a kolin acetil transzferáz enzim részvételével /5/.

Ismert az AChE molekulaszervezete is. Az elektromos angolna elektromos szervéből tisztított AChE komplex struktúra, melyben a multialegységes fej egy fibrózus farokhoz kapcsolódik, melynek szervezete a kollagénéhez hasonló. Pepszinnel és kollagénázzal végzett hasítások eredményei alapján megállapították, hogy a negyedleges szerkezetű AChE-ban három tetramer alegység kapcsolódik diszulfidhidakkal egy kollagén - szerű tripla hélixhez /6/. Mindegyik alegységen található egy aktív hely, amely két részből áll: az egyik az eszteráz hely, a másik az anionos kötőhely. Az utóbbi negatív töltéssel és hidrofób sajátossággal rendelkezik és a szubsztrát megkötése és orientálása által segíti elő a hidrolízist. Ide kötődik a szubsztrát pozitív töltéssel rendelkező "feje" elektrosztatikus és hidrofób kölcsönhatás által /7/. Az eszteráz hely reaktív szeril oldalláncot tartalmaz, ez a valódi katalitikus hely, melyen a hidrolízis lejátsszódik /8/. A szeril oldallánc az ACh hidrolízise során acil - enzim intermediert képez, ha ezt víz támadja az acetilcsoport lehasad és a felszabadult szeril oldallánc újabb hidrolitikus reakcióra kész /9/.

1.2. A γ ChE jellemzése

A gerincesek vérplazmájában fordul elő nagy mennyiségben, bár egyes gerincesek plazmájában nem található meg, például üregi nyulban és igen sok halfajban /angolna, csuka, tőkehal, ponty/ /2/. Főképp az emlős fajok plazmájában tanulmányozták /10,11/.

Jellemző tulajdonságai:

— nemcsak az Ach-t, hanem egyéb kolinésztereket is hidrolizál, legnagyobb sebességgel a BuCh-t,

- szubsztrátfelesleg gátlás nincs,
- diizopropil-fluorofoszfát alacsonyabb koncentrációban gátolja, mint az AChE-t /12,13/, bár néhány fajban a két enzim érzékenysége csak kissé különbözik /14/,
- etopropazinnal gátolható,
- organofoszfátok gátolják /15/.

A Ψ ChE fiziológiai szerepe nem teljesen tisztázott, ezzel kapcsolatban több elmélet is van.

Az egyik feltevés szerint /16/ fő szerepe a hidrolizálható kolinerg ágensek limitálása. Ezt alátámasztja, hogy igen gyorsan hidrolizálja a BuCh-t, mely a zsiranyagcserében keletkezhet és toxikus hatású. Ez az elmélet jól magyarázza a Ψ ChE aktivitásának évszakos variációját a szérumban. Az aktivitás maximuma késő nyárra esik, ekkor a legnagyobb intenzitású a zsiranyagcsere is.

Mások szerint /17/ a Ψ ChE a szabad kolin regulátora a plazmában. Ezt alátámasztja, hogy a szabad kolin csökkenti az enzim aktivitását, míg ha a szabad kolin koncentráció a plazmában a normális érték alá csökken, a Ψ ChE aktivitása megnő, ami a kolin koncentrációjának növekedését eredményezi.

1.3. ChE a halaknál

Az enzim vizsgálatát a halaknál később kezdték, mint a melegvérű gerinceseknél, így erről kevesebb adat áll rendelkezésre. Az irodalmi adatok nagy többsége az elektromos angolna és a Torpedo elektromos rája elektromos szervében található AChE-ra vonatkozik, melyet tisztítottak és molekulaszervezetét és kinetikai paramétereit is meghatározták.



1.3.1. ChE a halak központi idegrendszerében

Augustinsson /18/ tanulmányozta a ChE aktivitást különböző halfajok agyában és azt tapasztalta, hogy az agy AChE aktivitása az egyes fajokban különböző értékeket mutat. Ψ ChE aktivitást egyik vizsgált fajban sem tudott kimutatni.

Brightman és Albers az aranyhal agyában mind AChE, mind Ψ ChE aktivitást is kimutattak, de az utobbi igen alacsony volt /19/.

Abou-Donia és Menzel /20/ a *Cymatogaster aggregata* halfaj agyának homogenizátumában vizsgálták a ChE aktivitását. Megállapították, hogy az aktivitás túnyomó része AChE-től ered, ugyanakkor igen alacsony Ψ ChE aktivitás is mérhető. Az enzim pH optimuma 7,2, a szubsztrátkoncentráció optimum pedig $1,8 \cdot 10^{-3}$ mol/dm³. Vizsgálták különböző vegyületek hatását is az aktivitásra és azt tapasztalták, hogy $1,25 \cdot 10^{-4}$ mol/dm³ koncentrációju réz-szulfát hatására 71%-ra, ólom/II/-nitrát hatására 73%-ra, higany/II/-klorid hatására pedig 45%-ra csökken a kontrollhoz képest. Meghatározták K_M értékét is, amely méréseik szerint $2,2 \cdot 10^{-4}$ mol/dm³.

Coppage a *Cyprinodon variegatus* agyát vizsgálva megállapította, hogy az AChE hidrolitikus aktivitása igen magas és Ψ ChE aktivitás nem mutatható ki /21/. Az enzim pH optimuma 7,0, szubsztrátkoncentráció optimuma 10^{-2} mol/dm³. Tanulmányozta a hőmérséklet hatását is és azt tapasztalta, hogy az aktivitás 293-303 K között állandó, 303 K-től 313 K-ig lassan csökken, majd 313 K-től meredeken esik, s 323 K-nél már nem mérhető aktivitás.

Benke és Murphy /22/ a metil-parationnak, a parationnak és az azinfoszmetilnek a naphal *Lepomis gibbosus* agyának ChE aktivitására gyakorolt hatását tanulmányozták. Lindhárom

vegyület gátolta az enzimet, közülük a paration hatása volt a legerősebb. Eredményeik alapján megállapították, hogy a naphal agyának ChE-a felhasználható a vizekben jelenlevő organofoszfát inszekticid szennyezések kimutatására.

Mukherjee és Bhattacharya vizsgálták a víz szennyezettségének hatását a halak agyának AChE aktivitására és kimutatták, hogy az agy AChE aktivitása 48 óra alatt erősen csökken olyan vízben, mely fenolt, nátrium-szulfátot, ammónium-szulfátot vagy réz-szulfátot tartalmaz /23/.

Maljarevskaja /24/ kimutatta, hogy a halak agyának AChE aktivitását csökkenti a klorofosz, a DDT, a kékalgák toxinjai és a hipoxia is. Az agónia szakaszában az aktivitás folyami sügér agyában klorofosz hatására 42%-ra, DDT hatására 50%-ra, hipoxia hatására pedig 82-87%-ra csökkent. Kimutatta azt is, hogy az élénkebb anyagcseréjű ragadozó halak esetén a vizsgált anyagok és a hipoxia erősebben gátolják az AChE-t, mint a lassabb anyagcseréjű növényevő és mindenevő halak esetében.

Összefoglalva megállapíthatjuk, hogy a szerzők többsége a vizsgált halfajok agyában magas AChE aktivitást talált, míg közülük csak néhányan találtak γ ChE aktivitást is. A halak agyának AChE-a igen érzékeny a vízben levő szennyező anyagokra, így ezeknek kvalitatív kimutatására felhasználható az agy AChE aktivitásának mérése.

1.3.2. ChE a halak különböző szerveiben

Augustinsson /18/ vizsgálta a ChE aktivitást több halfaj izmában, májában, uszóhólyagjában és vérében. Megállapította, hogy ezen szövetek egyike sem tartalmaz γ ChE-t. Későbbi vizsgálatok során AChE-t mutatott ki hal szérumban /25/.

Lundin /26/ az aranyhal és a guppi izomzatában magas AChE aktivitást tapasztalt, míg VChE jelenléte nem volt kimutatható. Hisztokémiai vizsgálatainak eredményei szerint az izom AChE aktivitása az izomsejtek felszínén lokalizálódik.

Clos és Serfaty több halfaj vizsgálata során megállapították, hogy az eritrocitákban nincs AChE. Vérben és izomban az AChE aktivitás mellett VChE aktivitást is kimutattak, szubszt rátként ACh-t és tributirint alkalmazva, azonban a kísérletben nem gátolták a nem specifikus eszterázokat. Kimutatták, hogy a mindenevő halak májában nagyobb az AChE aktivitása, mint a husevőkében /27/.

Brightman és Albers /19/ törpeharcsa izmában VChE aktivitást is kimutattak, de ez az AChE aktivitáshoz viszonyítva igen alacsony volt.

Baslow és Nigrelli /28/ az izom AChE aktivitásának és a halak megfigyelt fizikai aktivitásának összefüggését tanulmányozták. A fizikai aktivitás alapján három csoportba sorolták a halakat: kevésbé aktív, mérsékelten aktív és aktív csoportba és kimutatták, hogy a három csoport izmában az AChE aktivitása szignifikánsan különbözik, legnagyobb az utolsó, legkisebb pedig az első csoportban. Ezután megvakították a halak egy részét, ennek hatására mind fizikai aktivitásukban, mind izomzatuk AChE aktivitásában növekedés következett be.

Lundin /29/ a tengeri halak izmában tapasztalt VChE aktivitást, az édesviziekében azonban nem.

Pechot-Dechavissine /30/ a hal izom összes ChE aktivitásának 1,4-2,6%-át tulajdonítja a VChE-nak, ez az emlősökhöz képest igen alacsony érték /macskánál 14,7%, tengerimalacnál 91,7%/.

Lüdtke és Ohnesorge megállapították, hogy a halak izmában és vérében nem mutatható ki γ ChE aktivitás /31/.

Szerebrenyikova és munkatársai kimutatták, hogy az AChE a ponty májában, szívében és izmában kapcsolódik a sejtalkotókhoz és nem szabadon oldott állapotban található a citoplazmában /32/.

Gaál és munkatársai szerint a tavi ponty szérumában található ChE-ra a következő tulajdonságok jellemzők:

- a BuCh-t nem bontja,
- etopropazinnal nem gátolható,
- 95 % BW 284 C 51-gyel gátolható / specifikus AChE gátló/,
- szubsztrátfelesleg gátlás van,
- nem mérhető aktivitás a májban, ahol a γ ChE szintézise emlősökben lejátsszódik.

Ezen adatok alapján a szerzők megállapítják, hogy a tavi ponty szérum ChE-a AChE típusu /33/.

Összefoglalva megállapíthatjuk, hogy a szérumban mindig mérhető ChE aktivitás, a szerzők többsége azonban nem tapasztalt γ ChE aktivitást, azaz a halak szérumában AChE található. Izomban néhány szerző kimutatott γ ChE-t, de mennyisége és aktivitása sokkal kisebb, mint az ott jelenlevő AChE-é. Megállapítható az is, hogy a halak fizikai aktivitása jó korrelációt mutat a vázizmok AChE aktivitásával.

1.3.3. Az AChE szerepe a halak különböző hőmérséklethez való alkalmazkodásában

Az AChE fő szerepe halakban természetesen ugyanaz, mint az emlősökben. Ezen kívül azonban valószínűleg fontos tényező különböző hőmérséklethez történő alkalmazkodásukban is.

Baslow és Nigrelli /34/ azt tapasztalták, hogy magas hőmérséklethez való alkalmazkodás esetén az agy AChE aktivitása csökken, míg alacsonyabb hőmérséklethez való alkalmazkodáskor először csökken, majd emelkedik.

Baldwin és Hochachka /35/ megállapították, hogy a pisztáng agya két különböző AChE-t tartalmaz. A "meleg" változat van jelen a 290 K-hez, a "hideg" a 275 K-hez és mindkettő megtalálható a kettő közötti hőmérséklethez történő alkalmazkodás esetén. K_M értéke változó, a hőmérséklet határozza meg és attól függ, melyik enzim működik. Kimutatták, hogy a hideg - adaptált enzim aktiválási energiája kisebb.

Baldwin /36/ az enzim - szubsztrát affinitás változásait tanulmányozta, melyeket a hőmérséklet okoz. Azt tapasztalta, hogy a 300 K-hez adaptálódott fajok esetén K_M fajtól függő minimumot mutat 293-303 K között, míg a 275 K-hez adaptálódott fajoknál K_M értéke már 273 K-nél eléri a minimumot, majd kissé növekszik. Azaz a K_M érték és a hőmérséklet összefüggése adaptív és kritikus folyamat a termális akklimatizáció folyamán.

2. A N Y A G O K É S M Ó D S Z E R E K

2.1. A halak tartása és kezelése

A kísérleti állatokat a kísérlet megkezdése előtt 5-8 napig adaptáltattuk az akvárium körülményekhez. Egy-egy 100 dm³-es akváriumba öt-öt halat helyeztünk, a víz hőmérséklete 293 ± 1 K / 20 ± 1 °C/ volt.

Az in vitro körülmények között végzett méréseknél a kontroll halakból vettünk mintát, majd a mérés során a reakcióelegyhez adtuk a vizsgált anyagot.

A kezeléseket a tanulmányozott vegyületek vízbe adagolásával végeztük, 1,0 , 10,0 és 50,0 mg/dm³ koncentrációkat alkalmazva. A kezelés után két órával a halak farokvénájából vért vettünk, 277 K-en /4 °C/ centrifugáltuk és a hemolizismentes vérszérumból mértük az enzim aktivitását. A szervek vizsgálata úgy történt, hogy a megfelelő szervet az állatból kivettük a kezelés után két órával, 0,65 g/dm³ NaCl-ban homogenizáltuk 200 mg/dm³ töménységben, majd 277 K-en /4 °C/ centrifugáltuk és a felüluszból mértük az aktivitást. Természetesen minden esetben kontroll állatokból is mintát vettünk.

2.2. A ChE aktivitásának mérése

2.2.1. Ellman módszer

Az enzim aktivitását a legtöbb esetben Ellman módszerrel mértük /37/.

A mérés elve a következő:

Szubsztrátként acetil-tiokolin-jodidot használva a hidrolízis során keletkező tiokolin az 5,5'-ditiobisz-/2-nitrobenzoesav/-

val reagálva 405 nm-nél abszorpciós maximummal rendelkező 2-nitro-5-merkaptobenzoésavat eredményez.

A mérés során a reakcióelegy összetétele a következő volt:

2 cm³ 52,0 mmol/dm³ pH=7,2 foszfátpuffer
0,26 mmol/dm³ 5,5'-ditiobisz-/2-nitrobenzoésav/
/Serva Feinbiochemica, Heidelberg/
0,05 cm³ 41,2 mmol/dm³ acetyl-tiokolin-jodid /Fluka AG/
0,01 cm³ szérum vagy szövethomogenizátum, mint enzim-
forrás.

A mérést SPEKTRONOM 195 és SPECORD UV VIS fotométerrel végeztük. Az enzim aktivitása az elbontott szubsztrát koncentrációjának időegység alatti változásából számolható ki.

2.2.2. A pH-stat módszer

Réz-szulfát hatásának vizsgálatakor nem az Ellman módszert alkalmaztuk, mert a réz/II/-ion oxidálja az acetyl-tiokolin-jodid hidrolizisekor keletkező tiokolin szabad tiol-csoportját, így ez a módszer a valóságtól eltérő eredményt ad.

Helyette a pH-stat módszerrel mértünk /38/.

A mérés elve:

Szubsztrátként acetyl-kolin-kloridot alkalmazva annak enzimatisz hidrolizisekor ecetsav szabadul fel. Ezt automata titrátorral 0,2 mol/dm³ nátrium-hidroxiddal titráltuk úgy, hogy a pH állandó maradjon 7,2 értéken. A fogyott nátrium-hidroxid mennyiségéből kiszámítható az enzim által elbontott szubsztrát mennyisége, ebből pedig az enzimaktivitás.

A reakcióelegy összetétele a következő volt:

4 cm³ médium oldat /0,10 mol/dm³ NaCl-ot és
0,02 mol/dm³ CaCl₂-ot tartalmaz/

0,1 cm³ 41,2 mmol/dm³ acetil-kolin-klorid /Germed VEB
Berlin-Chemie/

0,02 cm³ szérum vagy szövethomogenizátum, mint enzim-
forrás.

A mérést RADIOMETER TTT 2 titrátorral végeztük.

2.3. Fehérjetartalom meghatározása

A fehérjetartalom meghatározását Folin-Ciocalteu reagens-
sel Lowry és munkatársai szerint végeztük /39/.

3. E R E D M É N Y E K É S É R T É K E L É S Ü K

A vizsgálatokat 350-400 g-os /un. kétnyaras/ felnőtt egyeden végeztük el, párhuzamosan 3-5 halból. A mérések eredményeit a Függelék táblázatai tartalmazzák.

3.1. Kezeletlen /kontroll/ pontyok ChE enzimének vizsgálata

3.1.1. Az egyes szervekben mért ChE aktivitások összehasonlítása

Kezeletlen állatok szérumában és szerveiben a következő aktivitásokat mértük:

U/mg fehérje	
Szérum	$(6,93 \pm 0,80) \cdot 10^{-3}$
Agy	$(4,09 \pm 0,56) \cdot 10^{-1}$
Šziv	$(2,50 \pm 0,38) \cdot 10^{-1}$
Izom	$(1,03 \pm 0,11) \cdot 10^{-1}$
U = μ mol ATCh/60 s	

1. táblázat. A ChE aktivitása a ponty különböző szerveiben.

Az enzimet nem tisztítottuk, csak közvetlenül a szérumban illetve a szervek homogenizátumaiban mértük az aktivitást. Ezért a kapott eredmények alapján nem dönthető el, hogy az egyes szervek aktivitásaiban mért különbségek kialakításába: mennyiben játszik szerepet az egyes izoenzimek specifikus aktivitásának különböző értéke és mennyiben az, hogy az egyes szervek nem egyforma mennyiségű ChE-t tartalmaznak. Méréseink

alapján valószínű, hogy a szérum lényegesen kevesebb ChE-t tartalmaz, mint a másik három vizsgált szerv.

3.1.2. A ChE aktivitásának függése a pH-tól

A mérések eredményeiből megállapítható, hogy a ChE aktivitása a vizsgált szervekben erősen függ a pH-tól és az enzim pH optimuma a 7,30-7,60 intervallumban található.

pH optimum	
Szérum	7,50
Agy	7,60
Szív	7,33
Izom	7,40

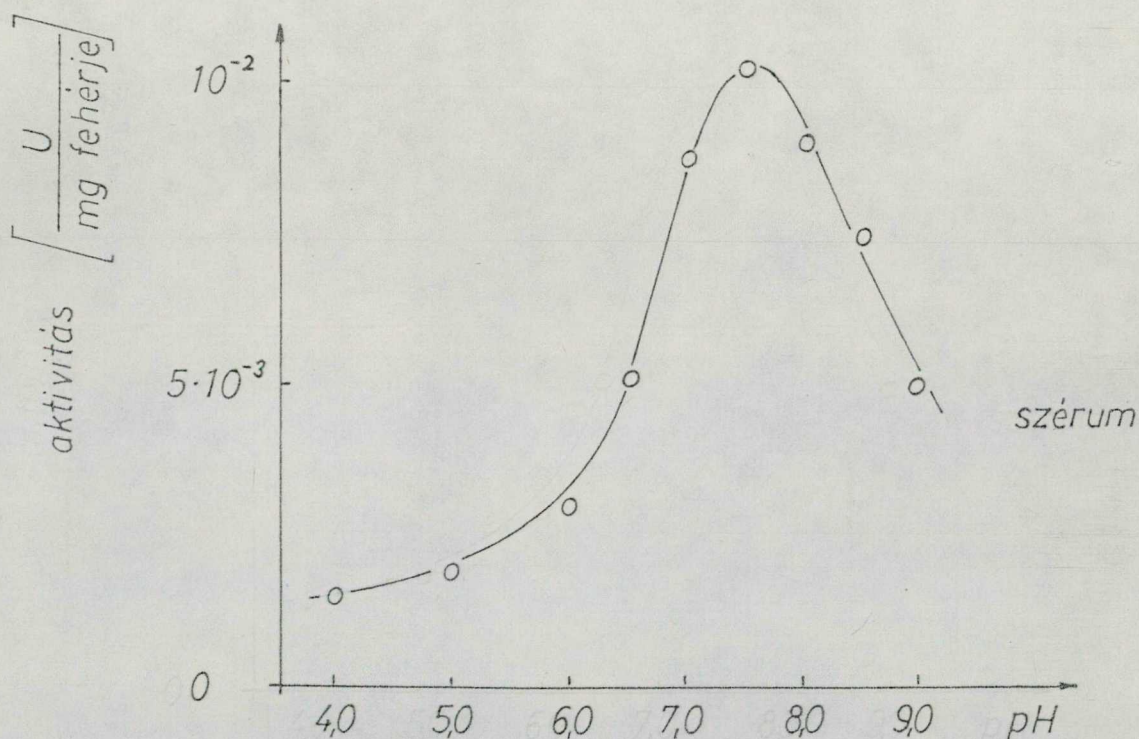
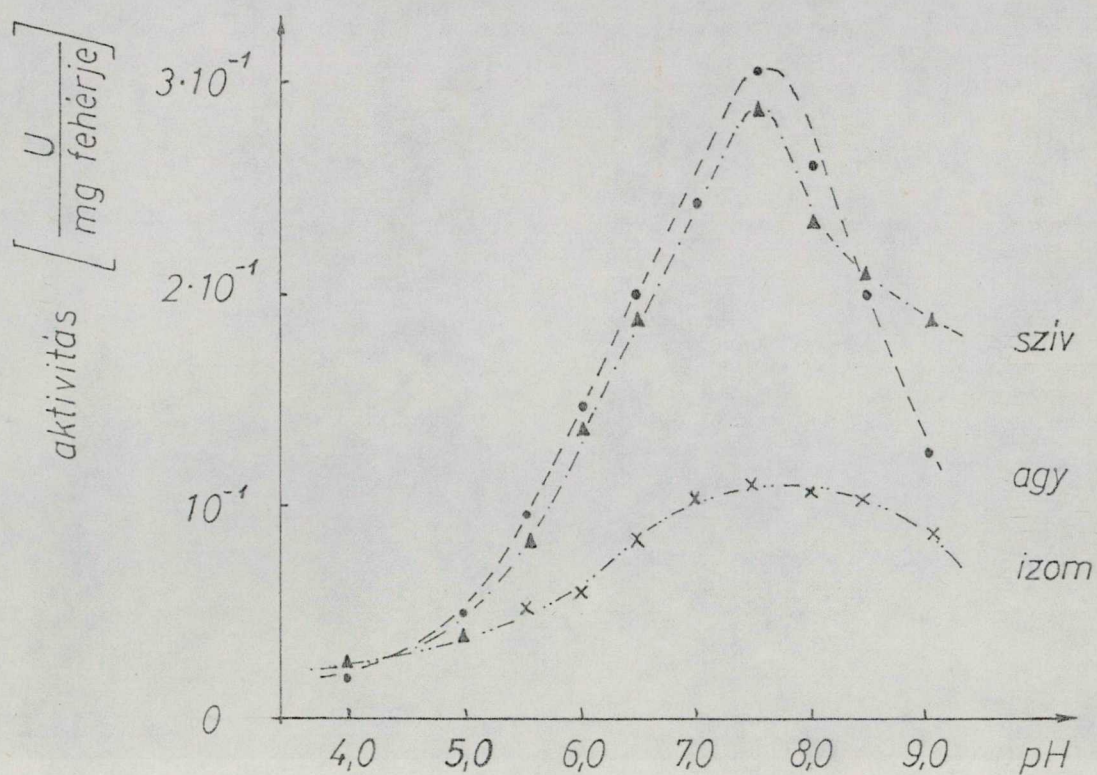
2. táblázat. A ChE pH optimumai a ponty egyes szerveiben.

Az eredmények azt mutatják, hogy az egyes szervek ChE aktivitásának pH optimumai között kicsi a különbség, így annak eldöntése, hogy mely szervekben található eltérő izoenzimek, további vizsgálatokat igényel. Az azonban az optimum értékek alapján elképzelhető, hogy az agyban és a szívben más-más izoenzimek találhatóak.

A szérum és a homogenizátumok ChE aktivitásának pH függése az 1. ábrán látható.

Az irodalomban csak az agy ChE-ának pH optimumára találtunk adatokat, de más fajokra vonatkozólag. Az általunk vizsgált

1. ábra A ChE aktivitásának pH függése



$U = \mu\text{mol ATCh} / 60\text{s}$

ponty agy ChE optima kissé magasabb, mint a pikóalakuk rendjébe tartozó *Cymatogaster aggregata*-é /20/ és a fogaspontyfélék családjába tartozó *Cyprinodon variegatus*-é /21/.

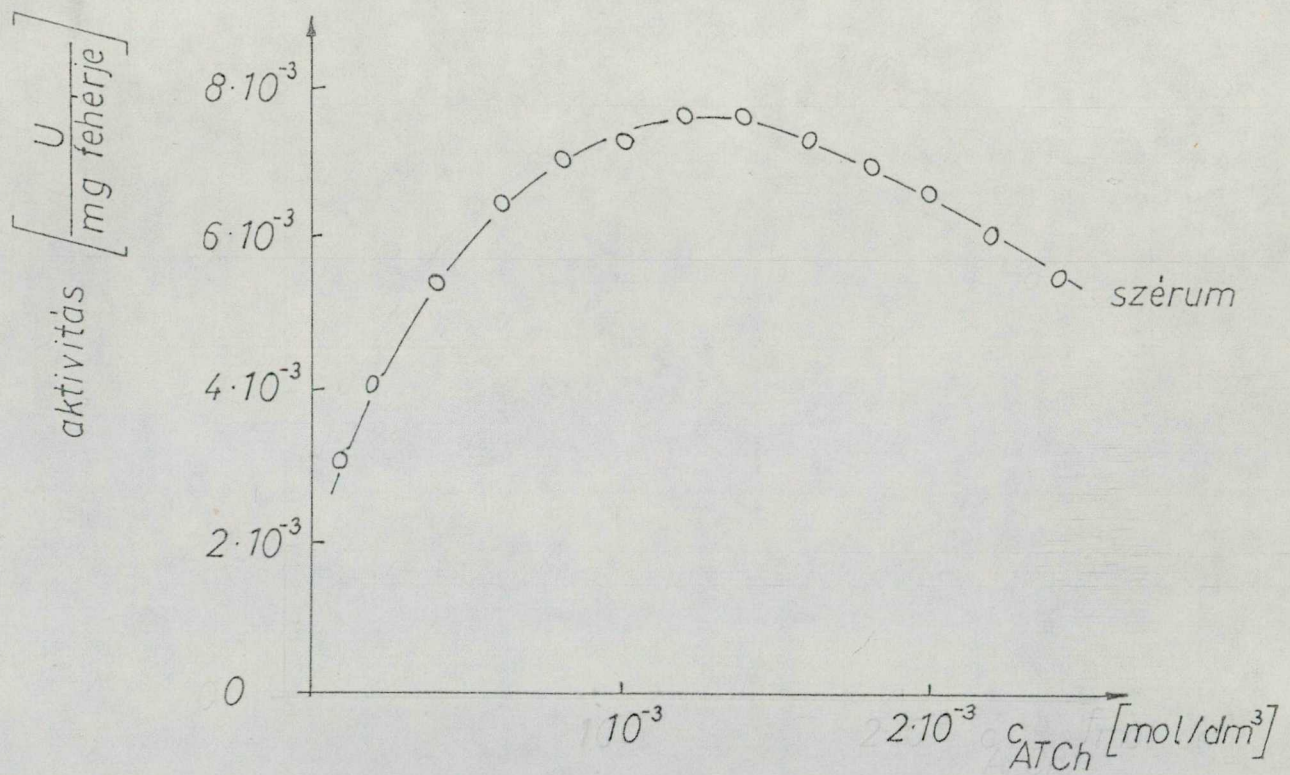
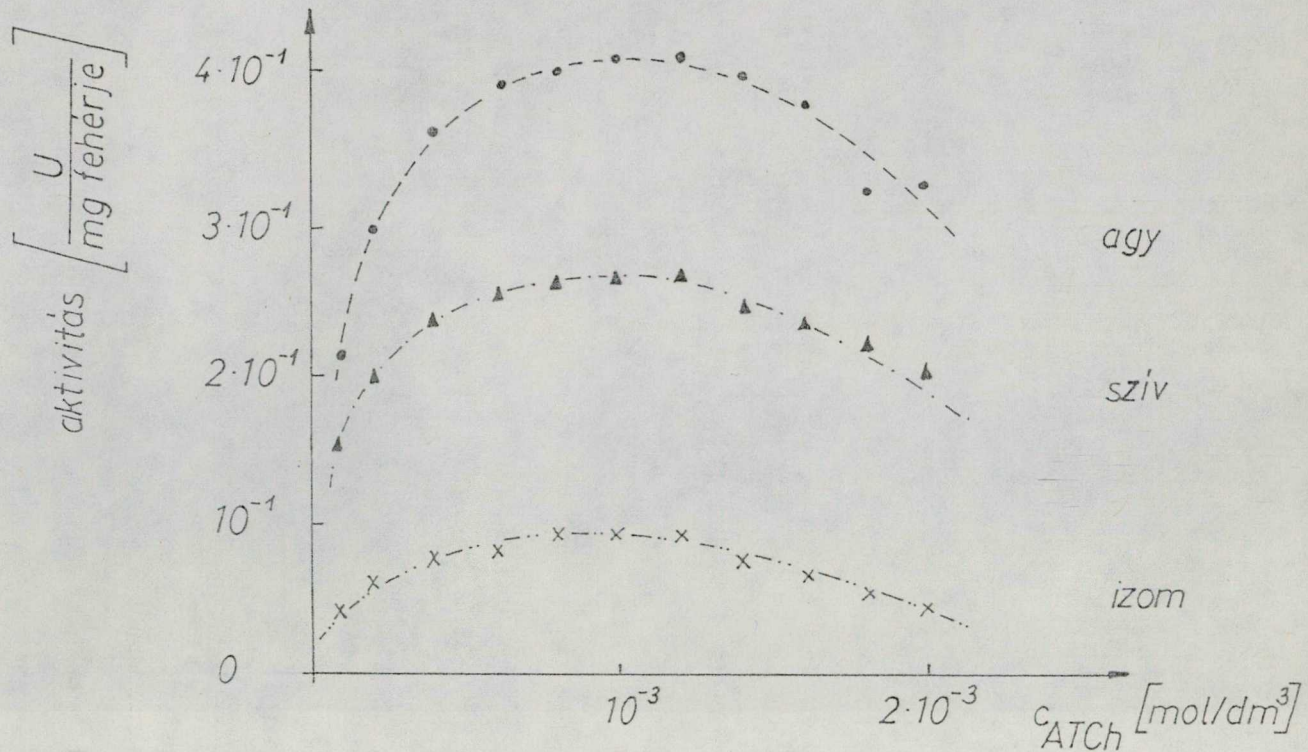
3.1.3. A ChE aktivitásának függése a szubsztrátkoncentrációtól

A vizsgált szervek ChE aktivitása a szubsztrátkoncentráció függvényében maximumgörbét ad, vagyis szubsztrátfelesleg gátlás tapasztalható. Ez arra utal, hogy ezek a szervek vagy nem tartalmazzak ψ ChE-t, vagy annak mennyisége elhanyagolható az AChE mennyisége mellett.

Az egyes szervek esetén a ChE aktivitása más-más szubsztrátkoncentrációnál éri el a maximumot. Szérum esetén $1,3 \cdot 10^{-3}$ mol/dm³-nél, agy esetén $1,1 \cdot 10^{-3}$ mol/dm³-nél, szív és izom esetén pedig $1,0 \cdot 10^{-3}$ mol/dm³-nél található a maximum.

Az általunk kapott eredményeket összevetve az irodalomban közölt, de más fajokra vonatkozó adatokkal megállapítható, hogy a ponty agyának ChE aktivitása lényegesen alacsonyabb szubsztrátkoncentrációnál éri el a maximumot, mint a már említett *Cymatogaster aggregata* és a *Cyprinodon variegatus* esetében. Abou-Donia és Menzel eredményei szerint /20/ a pikóalakuk rendjébe tartozó *Cymatogaster aggregata* agyának AChE aktivitása $1,8 \cdot 10^{-3}$ mol/dm³ szubsztrátkoncentrációnál maximális. Coppage a fogaspontyfélék családjába tartozó *Cyprinodon variegatus* agyának AChE aktivitását vizsgálva a maximális aktivitást $1,0 \cdot 10^{-3}$ mol/dm³ szubsztrátkoncentrációnál mérte /21/. A ponty ChE aktivitásának szubsztrátkoncentrációtól való függését a 2. ábrán tüntettük fel.

2. ábra. A ChE aktivitásának függése a szubsztrát-koncentrációtól



$$U = \mu mol \text{ ATCh} / 60 \text{ s}$$

Meghatároztuk a látszólagos K_M és a látszólagos v_{max} értékeket is a Lineweaver-Burk ábrázolás alapján és a 3. táblázatban tüntettük fel azokat.

	$K_{Mapp} \left[\frac{\text{mol}}{\text{dm}^3} \right]$	$v_{maxapp} \left[\frac{\mu\text{mol ATCh}}{\text{mg fehérje} \cdot \text{s}} \right]$
Szérum	$(1,47 \pm 0,33) \cdot 10^{-4}$	$(1,13 \pm 0,18) \cdot 10^{-4}$
Agy	$(9,21 \pm 1,36) \cdot 10^{-5}$	$(7,09 \pm 0,91) \cdot 10^{-3}$
Sziv	$(9,42 \pm 1,90) \cdot 10^{-5}$	$(4,96 \pm 0,73) \cdot 10^{-3}$
Izom	$(1,24 \pm 0,31) \cdot 10^{-4}$	$(1,75 \pm 0,32) \cdot 10^{-3}$

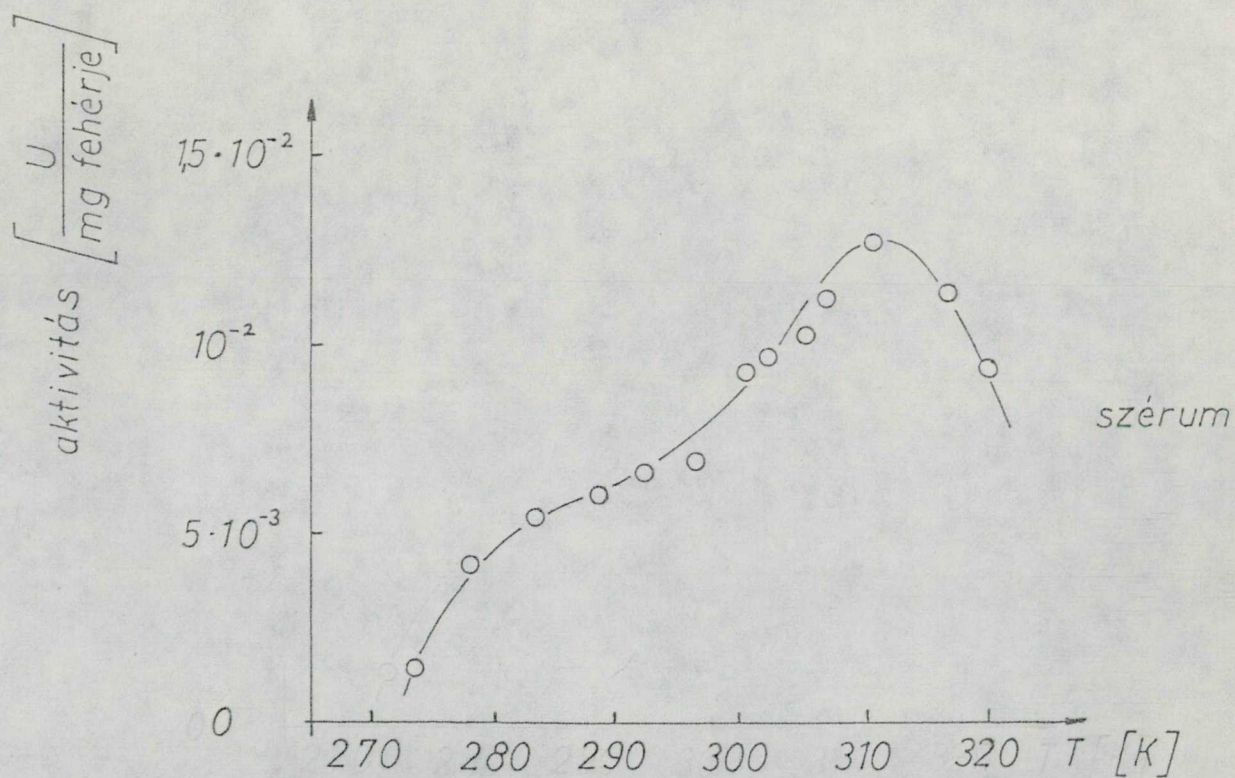
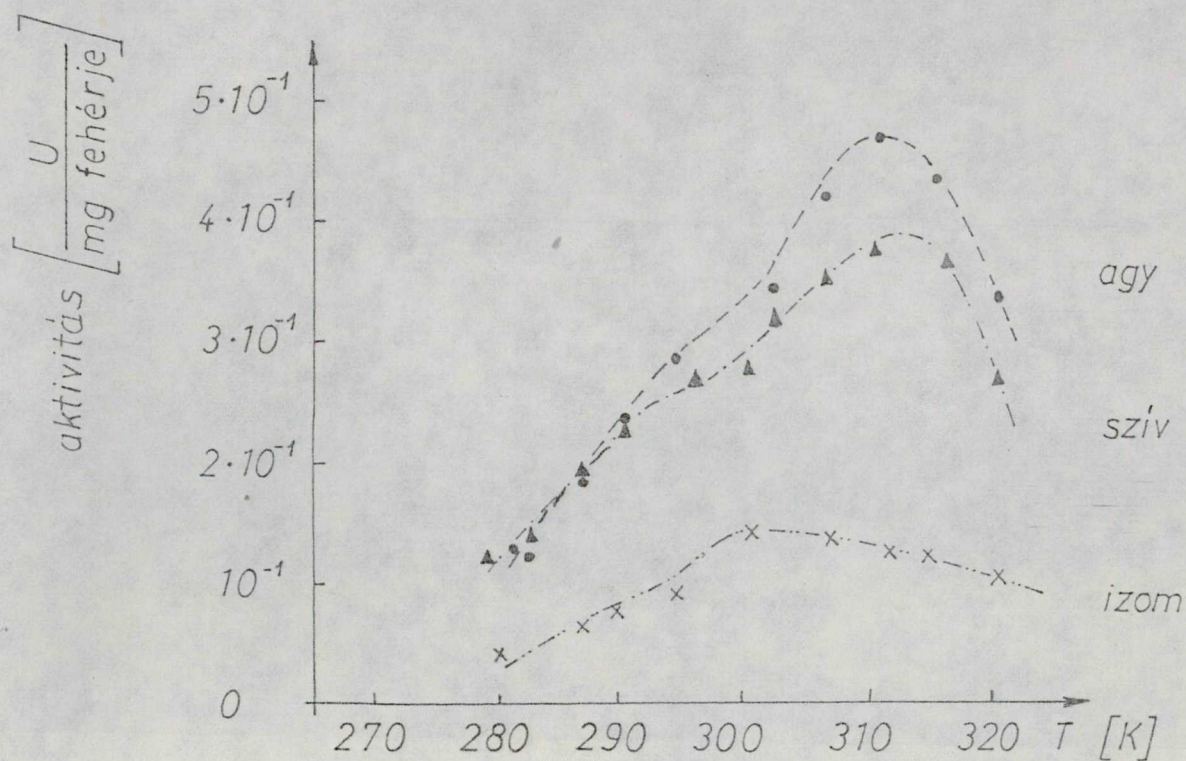
3. táblázat. Az egyes szervek ChE-ának látszólagos K_M és látszólagos v_{max} értékei.

Abou-Donia és Menzel mérései szerint a Cymatogaster aggregata agyhomogenizátumában található ChE látszólagos K_M értéke $2,2 \cdot 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$, vagyis lényegesen nagyobb, mint a ponty agyhomogenizátum esetén általunk mért érték /20/.

3.1.4. A ChE aktivitásának függése a hőmérséklettől

A ponty egyes szerveiben található ChE aktivitásának a hőmérséklettől való függését a 278-323 K hőmérséklettartományban vizsgáltuk. A mérések eredményei alapján megállapítható, hogy az enzim minden vizsgált szerv esetén hőmérsékleti optimummal rendelkezik, mely optimumok a szérum, az agy és a sziv esetén egymáshoz közeli értékek, míg izom esetén ezeknél lényegesen alacsonyabb érték. Az egyes szervek ChE aktivitásának a hőmérséklettől való függését a 3. ábrán tüntettük fel.

3.ábra A ChE aktivitásának függése a hőmérséklettől.



$U = \mu\text{mol ATCh} / 60 \text{ s}$

Az egyes szervek esetén kapott hőmérsékleti optimum értékek a következők:

optimum /K/	
Szérum	310
Agy	312
Szív	314
Izom	302

4. táblázat. A ChE hőmérsékleti optimumai a ponty egyes szerveiben.

Az optimumok viszonylag magas értékeit az magyarázza, hogy az in vitro körülmények között észlelt hőmérsékleti optimumok eltérhetnek az in vivo körülmények között tapasztaltaktól, rendszerint magasabbak az élőlény testhőmérsékleténél.

Coppage /21/ mérései szerint a Cyprinodon variegatus agyában található AChE aktivitása in vivo körülmények között 293-303 K tartományban állandó, majd 303 K fölött csökken, azaz az optimális hőmérséklettartomány in vivo körülmények között megegyezik a testhőmérséklettel. A mi in vitro körülmények között végzett vizsgálataink során a ponty esetén az optimumok 10-20 K értékkel magasabbnak adódtak a ponty testhőmérsékleténél.

3.2. Szervetlen fémvegyületek hatása a ChE aktivitására

A szervetlen fémvegyületek közül a réz-szulfátnak és a cink-kloridnak a ChE-ra gyakorolt hatását vizsgáltuk. E két vegyüle-

tet nagy mennyiségben alkalmazzák a mezőgazdaságban gombaölő illetve csávázó szerként és erőteljes akkumulációjukat több halfajban kimutatták /40,41/.

Brock megállapította, hogy a halak mája több cinket és rézet tartalmaz, mint az izom illetve a bél, vagyis e két ion a májban halmozódik fel /42/.

3.2.1. A cink-klorid hatása a ChE aktivitására

Olson és Christensen /43/ vizsgálták a cink hatását a csel-le /Pimephales promelas/ izmának AChE aktivitására és azt tapasztalták, hogy az aktivitás felére csökken $1,0 \cdot 10^{-2}$ mol/dm³ cink-ion koncentrációnál.

In vitro körülmények között végzett kísérleteinkben mi ettől eltérően azt tapasztaltuk, hogy a cink-klorid nem csökkentette egyik vizsgált szerv ChE aktivitását sem.

In vivo körülmények között végzett kísérleteink során 1,0 , 10,0 és 50,0 mg/dm³ koncentrációban adagoltuk az akvárium vizébe a cink-kloridot. Ebben az esetben sem befolyásolta a cink-klorid a vizsgált szervek ChE aktivitását.

3.2.2. A réz-szulfát hatása a ChE aktivitására

Réz-szulfát típusu növényvédő szerek gyakori alkalmazásakor a talaj réz-ion tartalma jelentős mértékben megnövekszik. Innen bekerül a folyókba is, és károsítja az algákat és a halakat /44/. Gátolja az AChE enzimet is, emiatt hosszú ideig azt gondolták, hogy az AChE aktivitásához nélkülözhetetlen az intakt tiol-csoportok jelenléte és a gátlás során a réz-ion ezeket köti le. Azonban más, tiol-csoportokkal reagáló anya-



gokkal szemben az enzim nem érzékeny és ez bizonyítja a feltételezés helytelenségét /45/.

Olson és Christensen szerint a cselle /Pimephales promelas/ izmában található AChE aktivitása in vitro körülmények között, felére csökken $1,6 \cdot 10^{-4}$ mol/dm³ réz-ion hatására /43/.

Abou-Donia és Menzel megállapították, hogy a pikóalakuak rendjébe tartozó Cymatogaster aggregata agyának homogenizátumában $1,25 \cdot 10^{-4}$ mol/dm³ réz-szulfát hatására az AChE aktivitása 29%-kal csökken /20/.

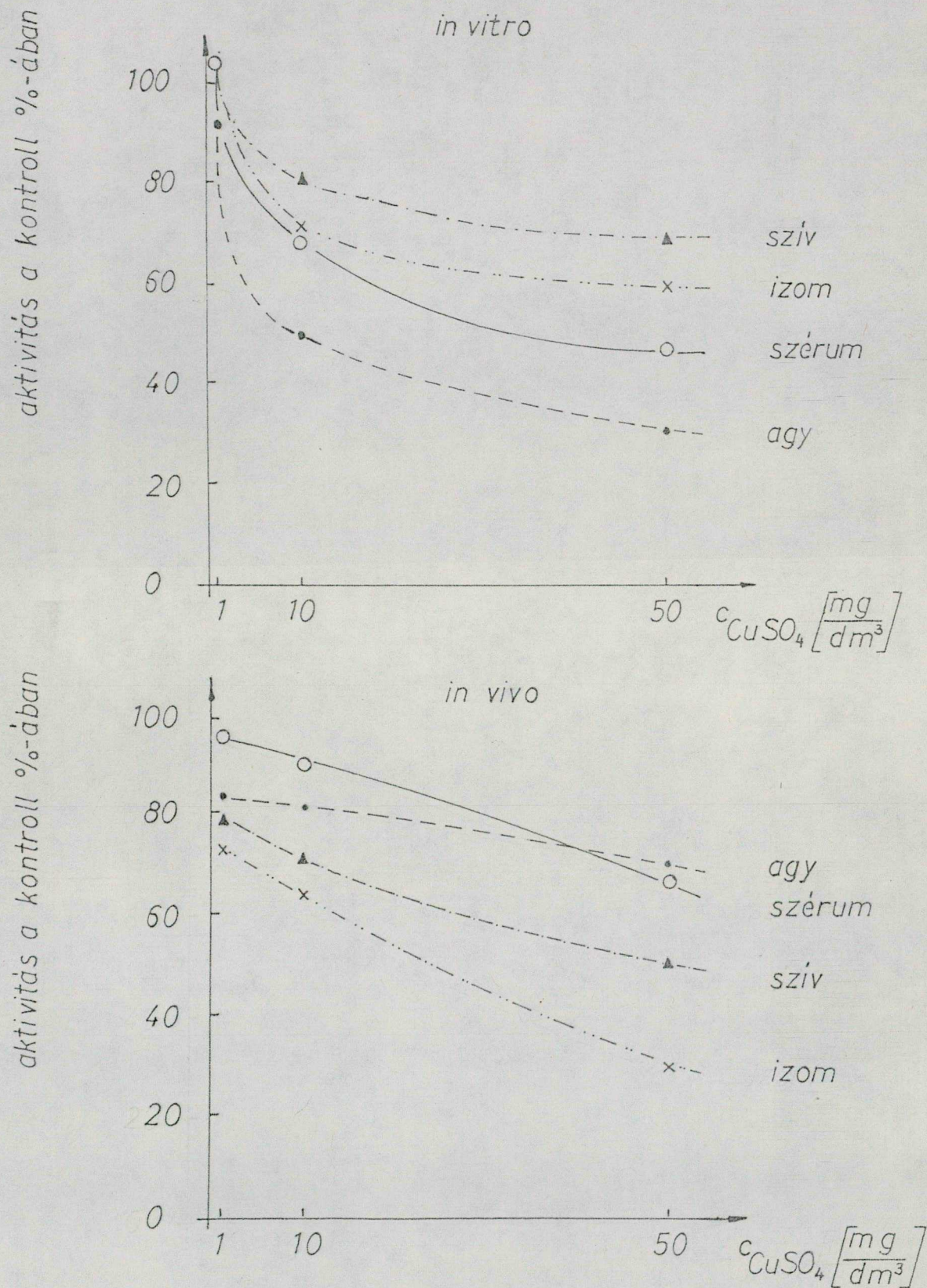
Mi in vitro és in vivo körülmények között vizsgáltuk a réz-szulfát hatását a ponty egyes szerveinek ChE aktivitására /4. ábra/. Megállapítható, hogy a réz-szulfát in vitro körülmények között legerősebben az agyban, legkevésbé pedig a szivben gátolja a ChE-t. In vivo körülmények között a legerősebb gátlás az izom, a legkisebb mértékű pedig az agy esetében tapasztalható.

Az enzim aktivitásának 50%-os csökkenését eredményező réz-szulfát koncentrációkat az alábbi táblázatban tüntettük fel.

	$c_I 50$ [mol/dm ³]	
	in vitro	in vivo
Szérum	$(2,65 \pm 0,31) \cdot 10^{-4}$	$(7,19 \pm 1,04) \cdot 10^{-4}$
Agy	$(6,45 \pm 0,83) \cdot 10^{-5}$	$(1,85 \pm 0,45) \cdot 10^{-3}$
Sziv	$(2,64 \pm 0,49) \cdot 10^{-3}$	$(3,61 \pm 0,52) \cdot 10^{-4}$
Izom	$(1,04 \pm 0,29) \cdot 10^{-3}$	$(1,54 \pm 0,33) \cdot 10^{-4}$

5. táblázat. A réz-szulfát $c_I 50$ értékei.

4.ábra. A réz-szulfát hatása a ChE aktivitására

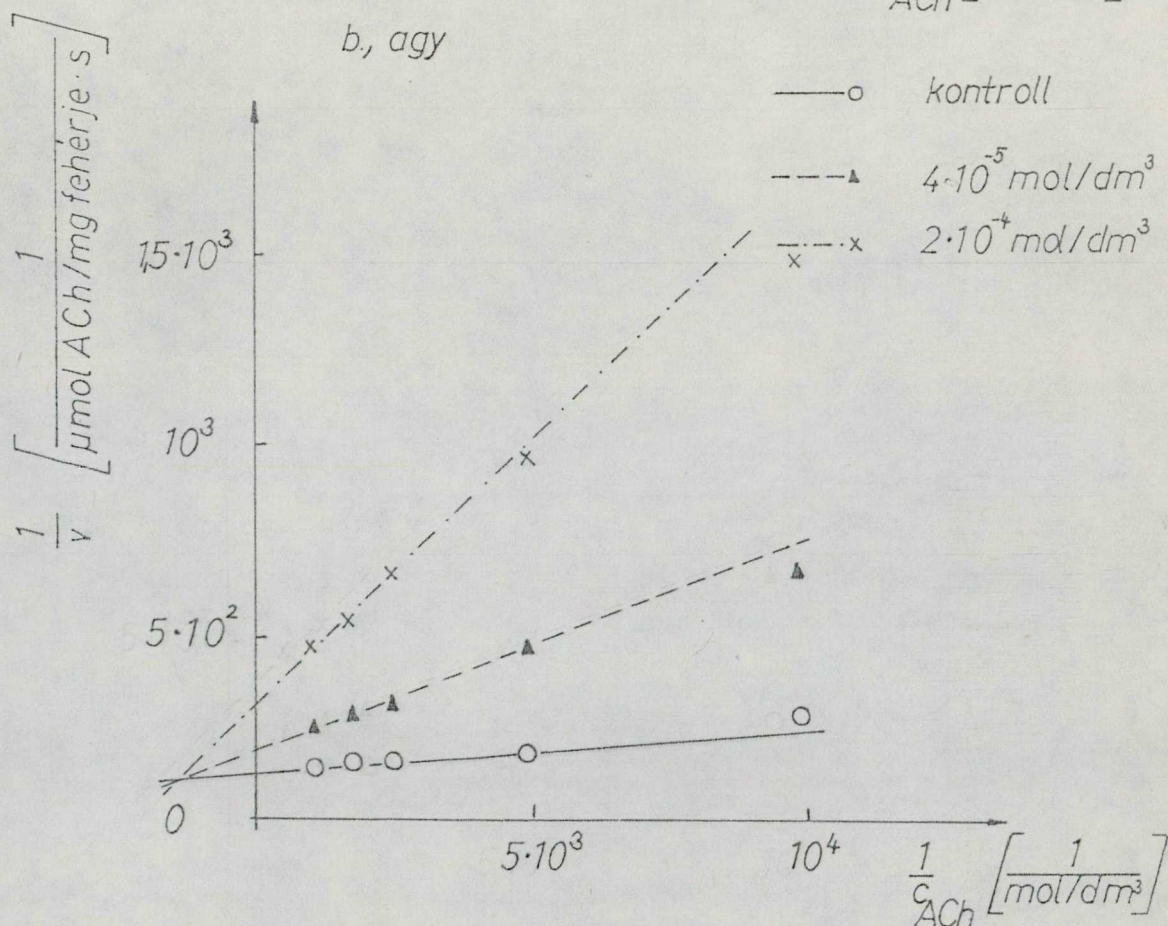
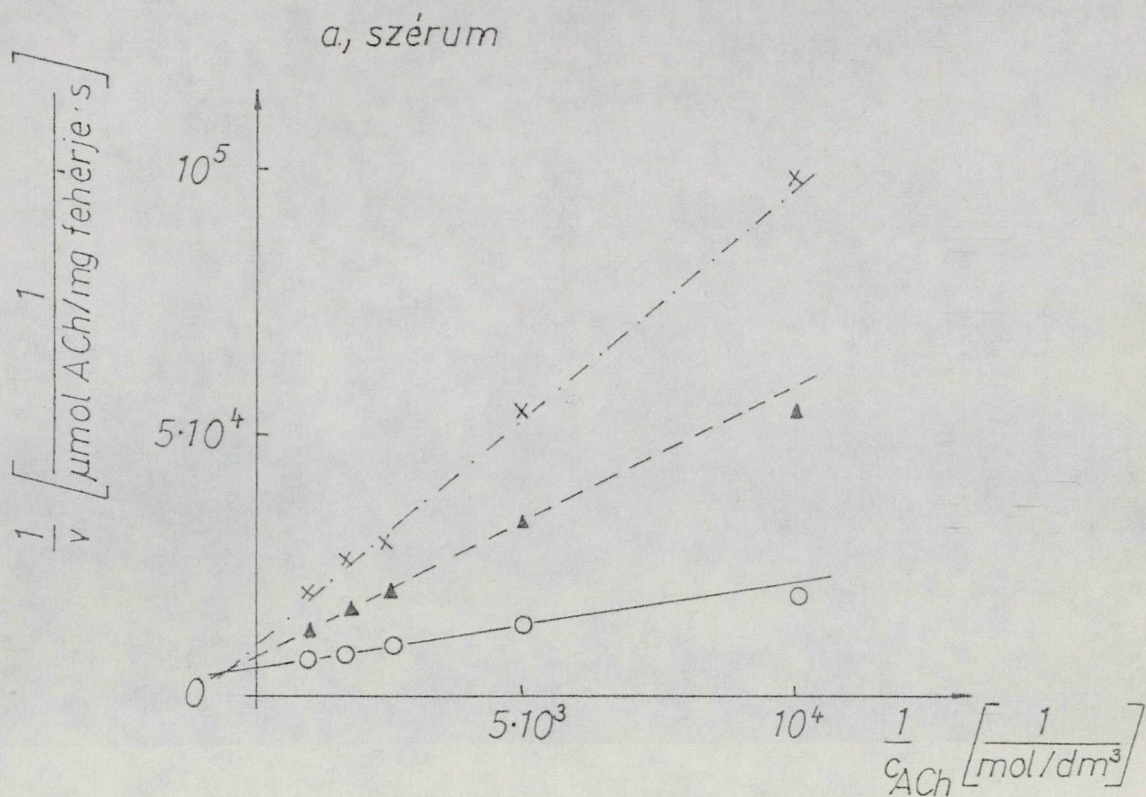


A táblázat eredményei alapján megállapíthatjuk, hogy in vitro körülmények között a réz-szulfát az agy és a szérumban erősebben gátolja, mint in vivo körülmények között, míg a szív és az izom esetén a gátlás in vivo körülmények között erősebb. A mérési eredményekből kitűnik, hogy in vitro körülmények között végzett kísérleteknél az agy ChE aktivitásának 50%-os csökkenése lényegesen kisebb réz-szulfát koncentrációnál következik be, mint más szervek esetén.

Az in vitro illetve in vivo körülmények között kapott $c_{I\ 50}$ értékek összehasonlításával megállapíthatjuk, hogy a szérumban a réz-szulfát koncentrációja 2 órás kezelés után valószínűleg kisebb, mint az akvárium vizében. Azaz a szérumban a réz-szulfát feltehetően nem akkumulálódik jelentős mértékben, illetve a vérbe jutott réz-szulfát gyorsan méregtelenítődik, vagy felhalmozódik más szervekben. Ez még szembetűnőbb az agy esetén, amikor az in vivo körülmények között mért $c_{I\ 50}$ érték közel harmincszorosa az in vitro körülmények között mért $c_{I\ 50}$ értéknek. Ez arra utal, hogy az agyba feltehetőleg kevesebb réz-szulfát jut be, mint más szervekbe. Izom és szív esetén az in vivo körülmények között mért $c_{I\ 50}$ érték kisebb, mint az in vitro körülmények között mért érték. Ez arra utal, hogy ezekben a szervekben a réz-szulfát felhalmozódik, az izomban nagyobb, a szívben pedig kisebb mértékben. Ez annál is inkább valószínű, minthogy hasonló körülmények között pontyon elvégzett izotópos vizsgálatok során is tapasztalták a réz-szulfát igen erőteljes akkumulációját az izomban és a szívben /41/. Elvégeztük a réz-szulfát gátlásának kinetikai vizsgálatát is, ennek eredményei az 5. ábrán láthatók.

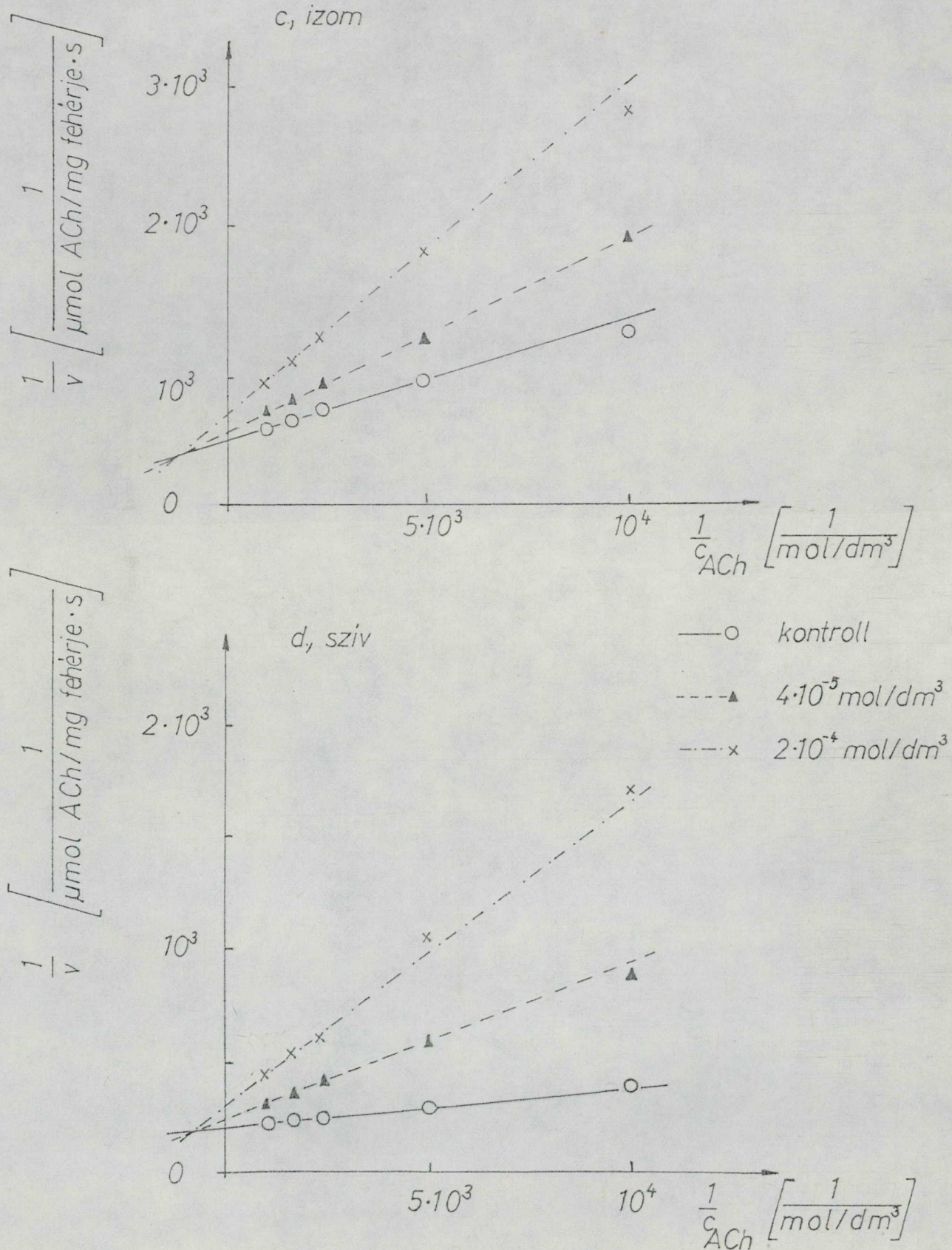
5.ábra A réz-szulfát gátlásának kinetikai vizsgálata

LINEWEAVER-BURK ábrázolás



5. ábra. A réz-szulfát gátlásának kinetikai vizsgálata

LINEWEAVER-BURK ábrázolás



A Lineweaver-Burk ábrázolás alapján megállapítottuk, hogy a réz-szulfát a vizsgált szervek esetén vegyes típusu gátlást okoz, vagyis az enzimnek mind az anionos kötőhelyét, mind pedig az eszteráz helyét befolyásolja és így az enzim-szubszt-rát komplex disszociációs állandóját növeli, a maximális sebes-séget pedig csökkenti /6. táblázat/.

	c_{CuSO_4} [mol/dm ³]	$K_{\text{M app}}$ [mol/dm ³]	$v_{\text{max app}}$ [$\frac{\mu\text{mol ACh}}{\text{mg fehérje} \cdot \text{s}}$]
	0	$(1,93 \pm 0,24) \cdot 10^{-4}$	$(1,38 \pm 0,11) \cdot 10^{-4}$
Szérum	$4,0 \cdot 10^{-5}$	$(6,44 \pm 0,68) \cdot 10^{-4}$	$(1,30 \pm 0,09) \cdot 10^{-4}$
	$2,0 \cdot 10^{-4}$	$(8,06 \pm 0,79) \cdot 10^{-4}$	$(9,26 \pm 0,84) \cdot 10^{-5}$
	0	$(1,08 \pm 0,19) \cdot 10^{-4}$	$(7,75 \pm 0,73) \cdot 10^{-3}$
Agy	$4,0 \cdot 10^{-5}$	$(2,13 \pm 0,27) \cdot 10^{-4}$	$(4,52 \pm 0,49) \cdot 10^{-3}$
	$2,0 \cdot 10^{-4}$	$(2,99 \pm 0,33) \cdot 10^{-4}$	$(2,67 \pm 0,31) \cdot 10^{-3}$
	0	$(9,27 \pm 1,06) \cdot 10^{-5}$	$(4,88 \pm 0,42) \cdot 10^{-3}$
Szív	$4,0 \cdot 10^{-5}$	$(2,76 \pm 0,41) \cdot 10^{-4}$	$(4,18 \pm 0,46) \cdot 10^{-3}$
	$2,0 \cdot 10^{-4}$	$(4,57 \pm 0,48) \cdot 10^{-4}$	$(3,19 \pm 0,26) \cdot 10^{-3}$
	0	$(1,32 \pm 0,21) \cdot 10^{-4}$	$(1,81 \pm 0,14) \cdot 10^{-3}$
Izom	$4,0 \cdot 10^{-5}$	$(1,95 \pm 0,26) \cdot 10^{-4}$	$(1,61 \pm 0,15) \cdot 10^{-3}$
	$2,0 \cdot 10^{-4}$	$(2,85 \pm 0,43) \cdot 10^{-4}$	$(1,36 \pm 0,12) \cdot 10^{-3}$

6. táblázat. Réz-szulfát hatása a látszólagos K_{M} és a látszólagos v_{max} értékekre az egyes szervek esetén.

Az előzőekben ismertetett 2 órás kezeléseken kívül hosszútávú réz-szulfát kezeléseket is végeztünk, mégpedig 24, 48, 96 órás továbbá 1 és 2 hetes kezeléseket, melyek során a halakat 283 K hőmérsékletű vízben tartottuk. Az akvárium vizébe adagolt réz-szulfát koncentrációja $5,0 \text{ mg/dm}^3$ volt. A kísérlet során a ChE aktivitást csak a szérumban határoztuk meg, ennek oka az volt, hogy önkontrollos módszerrel dolgoztunk /azaz egy adott halból kezelés előtt mintát vettünk, ebből határoztuk meg a kontroll értéket, majd ugyanezt a halat kezeltük, a megfelelő időben újra vért vettünk, s ebből mértük a ChE aktivitást a halat pedig tovább kezeltük/. Így a többi szervből természetesen nem tudtunk mintát venni. Eredményeinket az alábbi táblázatban tüntettük fel.

Kezelés időtartama	ChE aktivitás a kontroll %-ában
24 óra	$71,1 \pm 7,4$
48 óra	$112,7 \pm 9,5$
96 óra	$104,0 \pm 9,3$
1 hét	$99,2 \pm 5,5$
2 hét	$102,0 \pm 5,2$

7. táblázat. $5,0 \text{ mg/dm}^3$ koncentrációju réz-szulfát kezelés hatása a ponty szérum ChE aktivitására.

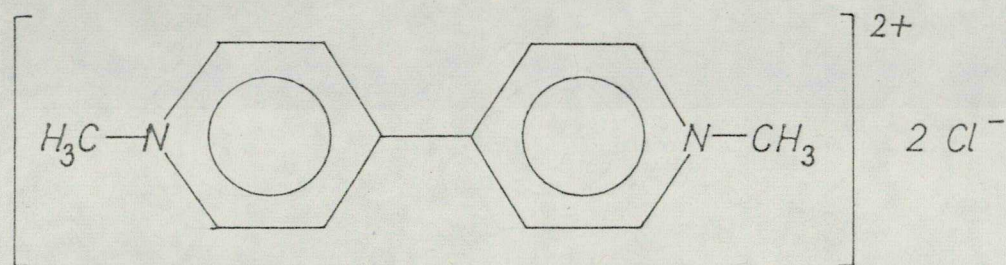
Az eredményekből megállapítottuk, hogy csak a 24 órás kezeléseknél következett be jelentős aktivitáscsökkenés, az ennél hosszabb időtartamu kezelések esetén az eredeti ChE aktivitás

értékek helyreálltak, vagyis a halak képesek voltak alkalmazkodni a réz-szulfát jelenlétéhez. Annak eldöntése, hogy ez az enzim szintézisének fokozása vagy egyéb mechanizmusok révén valósul-e meg, további vizsgálatokat igényel.

3.3. A paraquat hatása a ChE aktivitására

A paraquat /1,1'-dimetil-4,4'-dipiridilium-diklorid/ egy heterociklusos dikvaterner nitrogénvegyület, melyet a mezőgazdaságban herbicidként alkalmaznak. Vízben jól oldódik, de a talajban inaktiválódik, mert a talaj részecskéi megkötik ionos formában /44/.

Képlete a következő:

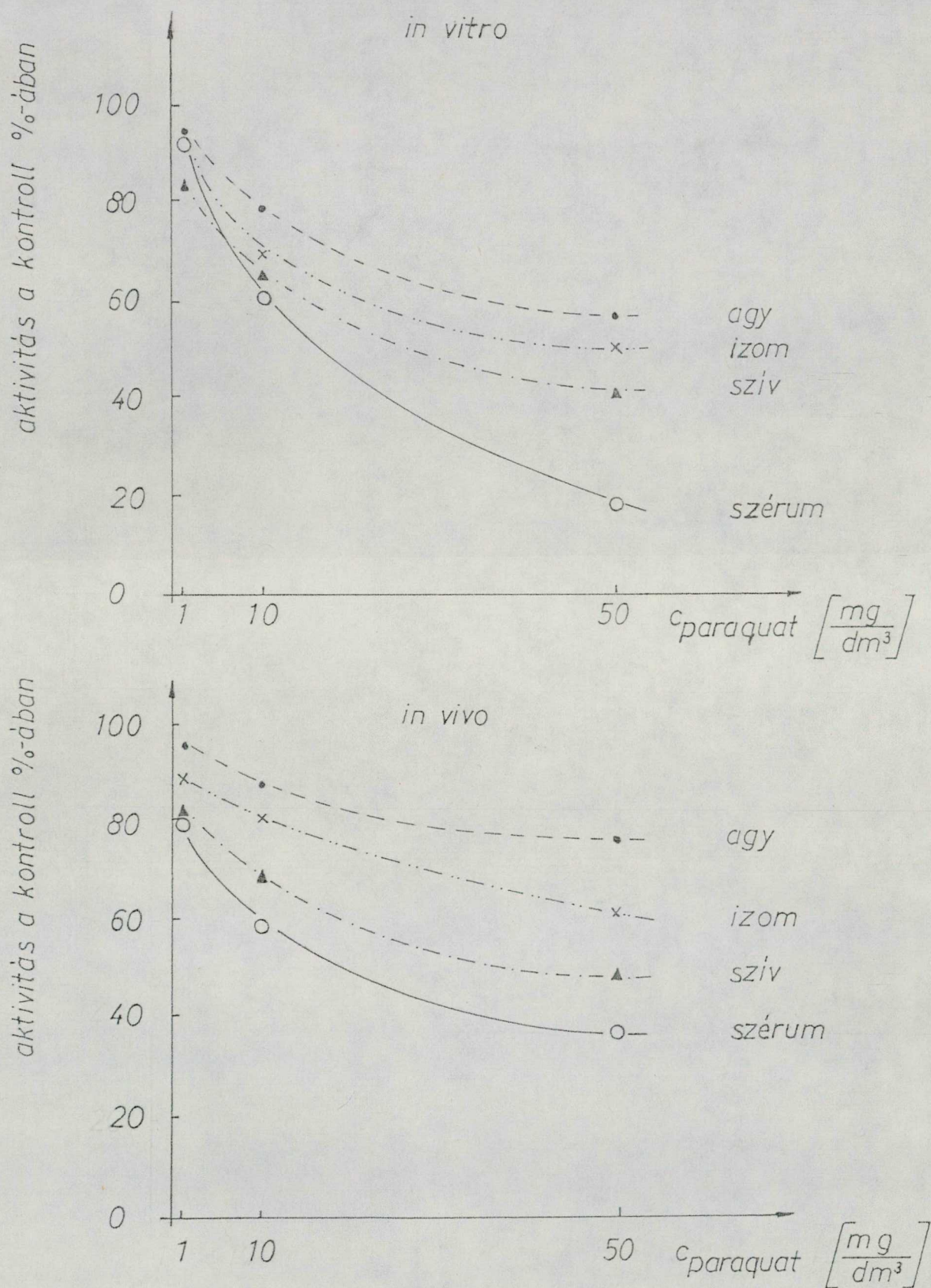


Gerincesekben elsősorban a tüdőt, de ezen kívül a májat és a vesét is károsítja. Méregtelenítése során a szervezetben hidrogén-peroxid is keletkezhet, mely roncsolja a hámszövetet /46/. Halakban károsítja a kopoltyu hámsejtjeit és így csökkenti az oxigén-felvevő kapacitást. Kimutatták, hogy elsősorban a halak bőrében és emésztőcsatornájában halmozódik fel, de kisebb mértékben az izomban is akkumulálódik /47/.

Brandenburger és Maling vizsgálták a paraquatnak a patkány tüdejében található AChE-ra gyakorolt hatását és azt tapasztalták, hogy kompetitive gátolja az enzimet /48/.

Mi in vitro és in vivo körülmények között is vizsgáltuk a paraquatnak a ponty ChE enzimére gyakorolt hatását /6. ábra/.

6. ábra. A paraquat hatása a ChE aktivitására



Mérési eredményeink alapján megállapítható, hogy a paraquat in vitro körülmények között a szérum enzimének aktivitását csökkenti a legjobban, míg legkevésbé az agy esetén gátolja az enzimet. In vivo körülmények között is ezt tapasztaltuk, vagyis itt nincs olyan lényeges eltérés, mint a réz-szulfát esetén. A paraquatnak az enzimaktivitás 50%-os csökkenését eredményező koncentrációit az alábbi táblázat mutatja.

$c_{I\ 50} \quad \left[\text{mol/dm}^3 \right]$		
	in vitro	in vivo
Szérum	$(7,11 \pm 0,66) \cdot 10^{-5}$	$(7,89 \pm 0,69) \cdot 10^{-5}$
Agy	$(3,57 \pm 0,30) \cdot 10^{-4}$	$(1,15 \pm 0,15) \cdot 10^{-3}$
Szív	$(1,24 \pm 0,81) \cdot 10^{-4}$	$(2,12 \pm 0,19) \cdot 10^{-4}$
Izom	$(2,20 \pm 0,18) \cdot 10^{-4}$	$(5,52 \pm 0,47) \cdot 10^{-4}$

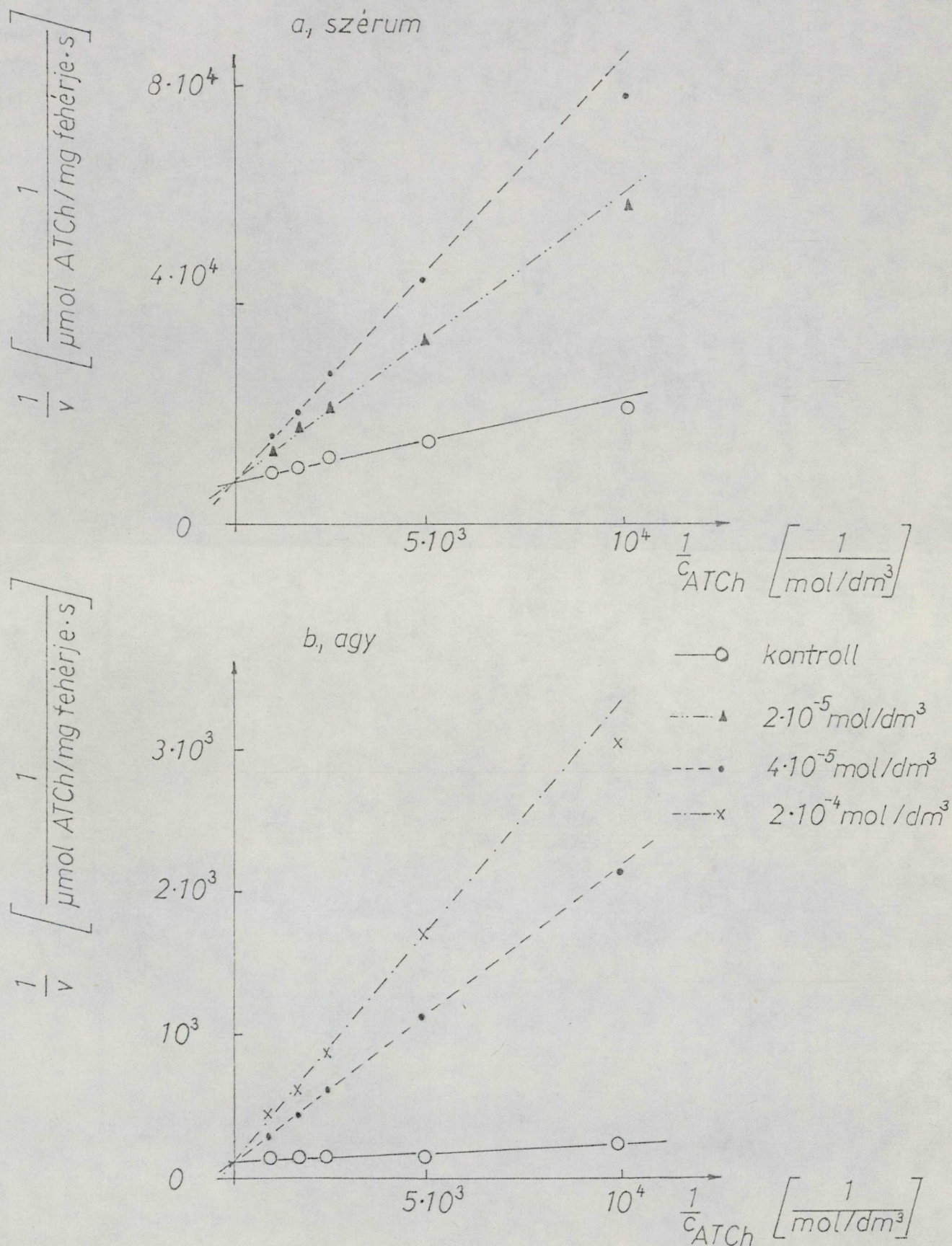
8. táblázat. A paraquat $c_{I\ 50}$ értékei.

Az adatokból látható, hogy az in vitro körülmények között mért $c_{I\ 50}$ értékek minden esetben kisebbek vagy ugyanakkorák, mint az in vivo körülmények között mért értékek. Ez arra utal, hogy a paraquat nem halmozódik fel egyik vizsgált szervben sem.

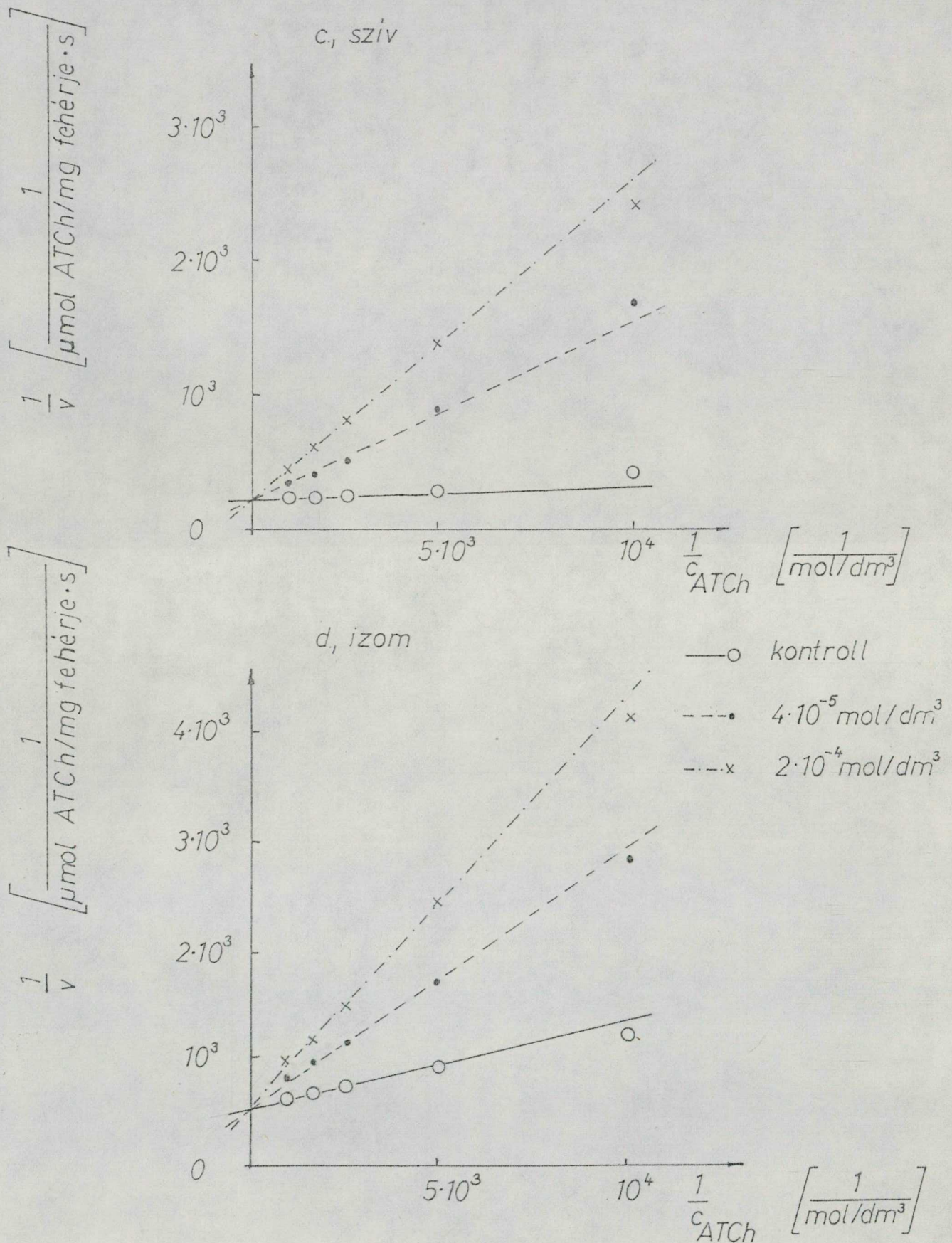
Ugy tűnik, hogy az izomba és az agyba kisebb mennyiségű paraquat jut be, mint a szérumba és a szívbe, melyekben a paraquat koncentrációja két órás kezelés után valószínűleg megegyezik az akvárium vizébe adagolt paraquat koncentrációjával.

A paraquat gátlásának kinetikai vizsgálatát is elvégeztük és a Lineweaver-Burk ábrázolás alapján megállapíthatjuk, hogy a gátlás kompetitív /7. ábra/.

7. ábra. A paraquat gátlásának kinetikai vizsgálata
LINEWEAVER-BURK ábrázolás



7. ábra. A paraquat gátlásának kinetikai vizsgálata
LINEWEAVER-BURK ábrázolás

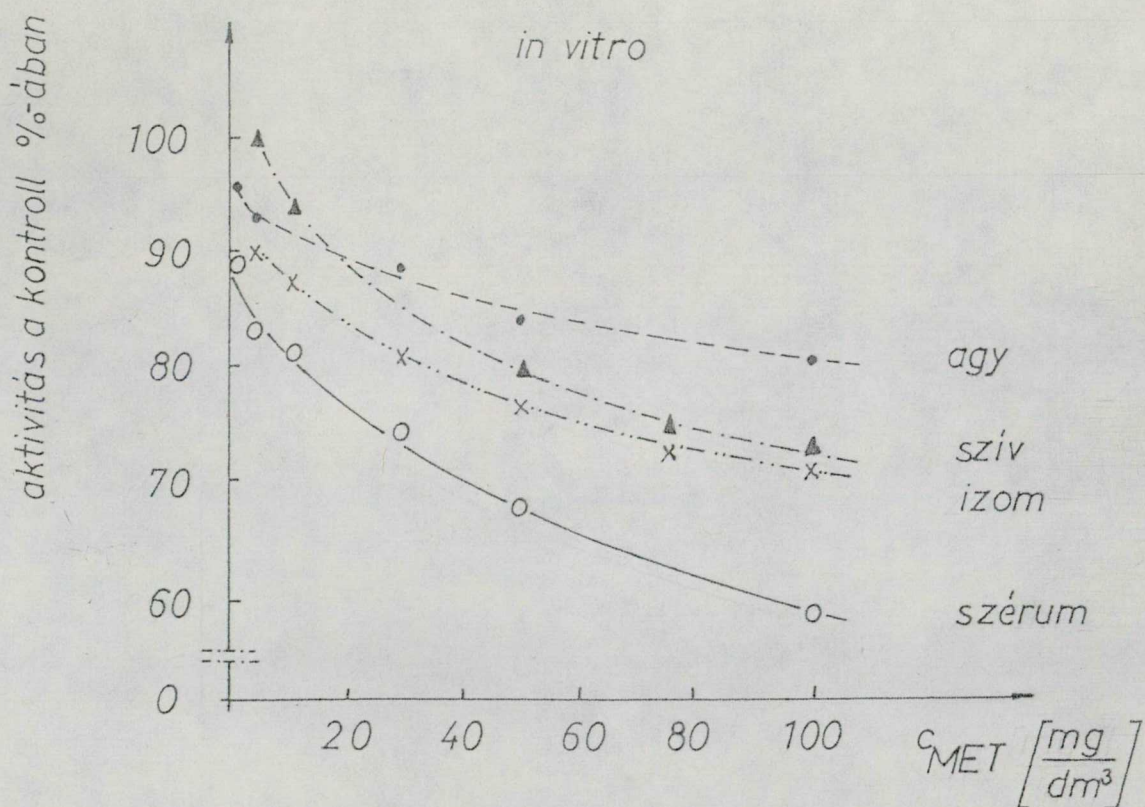
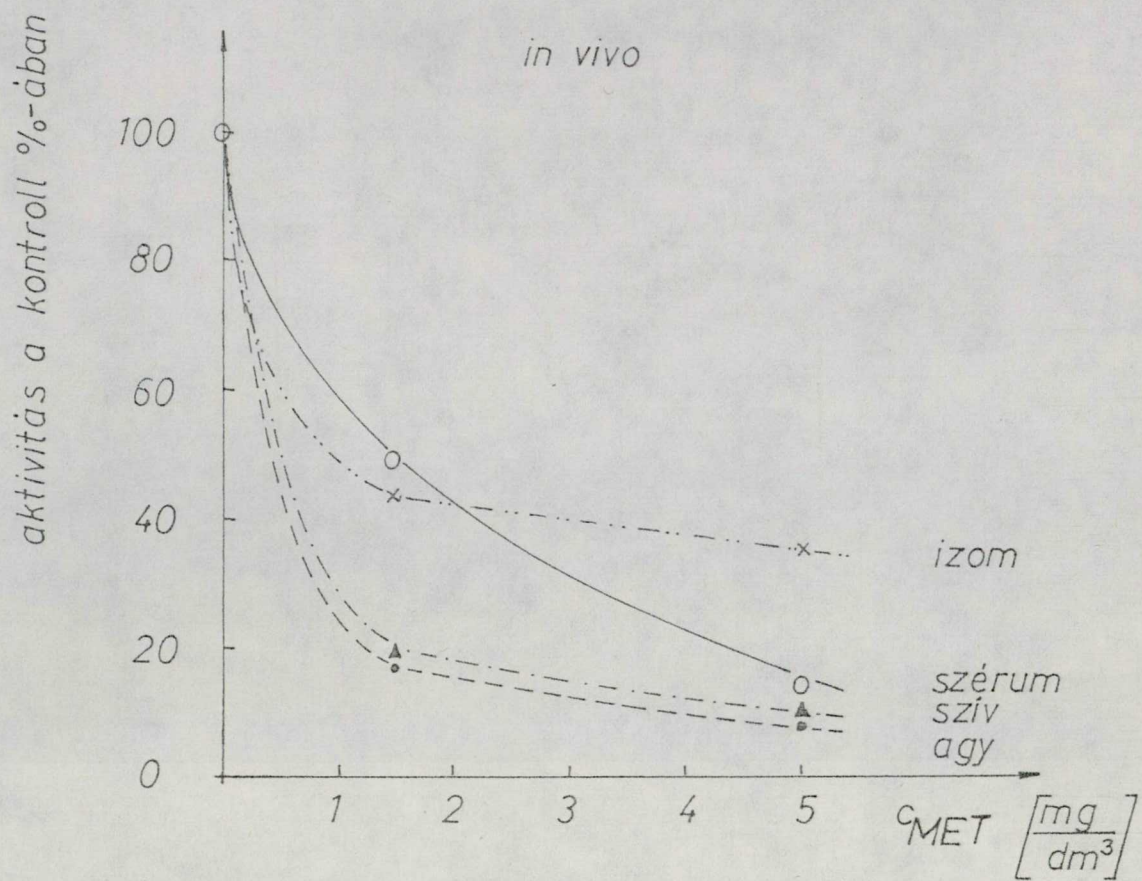


A paraquat tehát a maximális sebesség értékét nem változtatja meg, míg az enzim-szubsztrát komplex disszociációs állandóját növeli, vagyis csak az enzim anionos kötőhelyét befolyásolja, az eszteráz helyet nem. A látszólagos K_M és a látszólagos v_{max} értékeket az alábbi táblázatban tüntettük fel.

	c_{PQ} [mol/dm ³]	$K_{M_{app}}$ [mol/dm ³]	$v_{max_{app}}$ [$\frac{\mu\text{mol ATCh}}{\text{mg fehérje} \cdot \text{s}}$]
	0	$(1,57 \pm 0,13) \cdot 10^{-4}$	
Szérum	$2,0 \cdot 10^{-5}$	$(5,65 \pm 0,47) \cdot 10^{-4}$	$(1,13 \pm 0,08) \cdot 10^{-4}$
	$4,0 \cdot 10^{-5}$	$(8,02 \pm 0,73) \cdot 10^{-4}$	
	0	$(9,21 \pm 0,86) \cdot 10^{-5}$	
Agy	$4,0 \cdot 10^{-5}$	$(1,44 \pm 0,12) \cdot 10^{-3}$	$(7,09 \pm 0,61) \cdot 10^{-3}$
	$2,0 \cdot 10^{-4}$	$(2,18 \pm 0,17) \cdot 10^{-3}$	
	0	$(9,43 \pm 0,99) \cdot 10^{-5}$	
Szív	$4,0 \cdot 10^{-5}$	$(7,59 \pm 0,85) \cdot 10^{-4}$	$(4,96 \pm 0,53) \cdot 10^{-3}$
	$2,0 \cdot 10^{-4}$	$(1,19 \pm 0,09) \cdot 10^{-3}$	
	0	$(1,24 \pm 0,15) \cdot 10^{-4}$	
Izom	$4,0 \cdot 10^{-5}$	$(3,95 \pm 0,31) \cdot 10^{-4}$	$(1,75 \pm 0,14) \cdot 10^{-3}$
	$2,0 \cdot 10^{-4}$	$(6,67 \pm 0,71) \cdot 10^{-4}$	

9. táblázat. Paraquat hatása a látszólagos K_M és a látszólagos v_{max} értékekre az egyes szervek esetén.

8. ábra. A metidation hatása a ChE aktivitására



Megállapíthatjuk, hogy in vivo körülmények között a metidation lényegesen erősebben gátolja a ChE-t minden vizsgált szerv esetén, mint in vitro körülmények között. Ennek oka az lehet, hogy a metabolizmus során, amint azt növényekben már kimutatták, a vegyület oxigén analógja képződik, melynek gátló hatása sokkal erősebb, mint az eredeti vegyületé /52/.

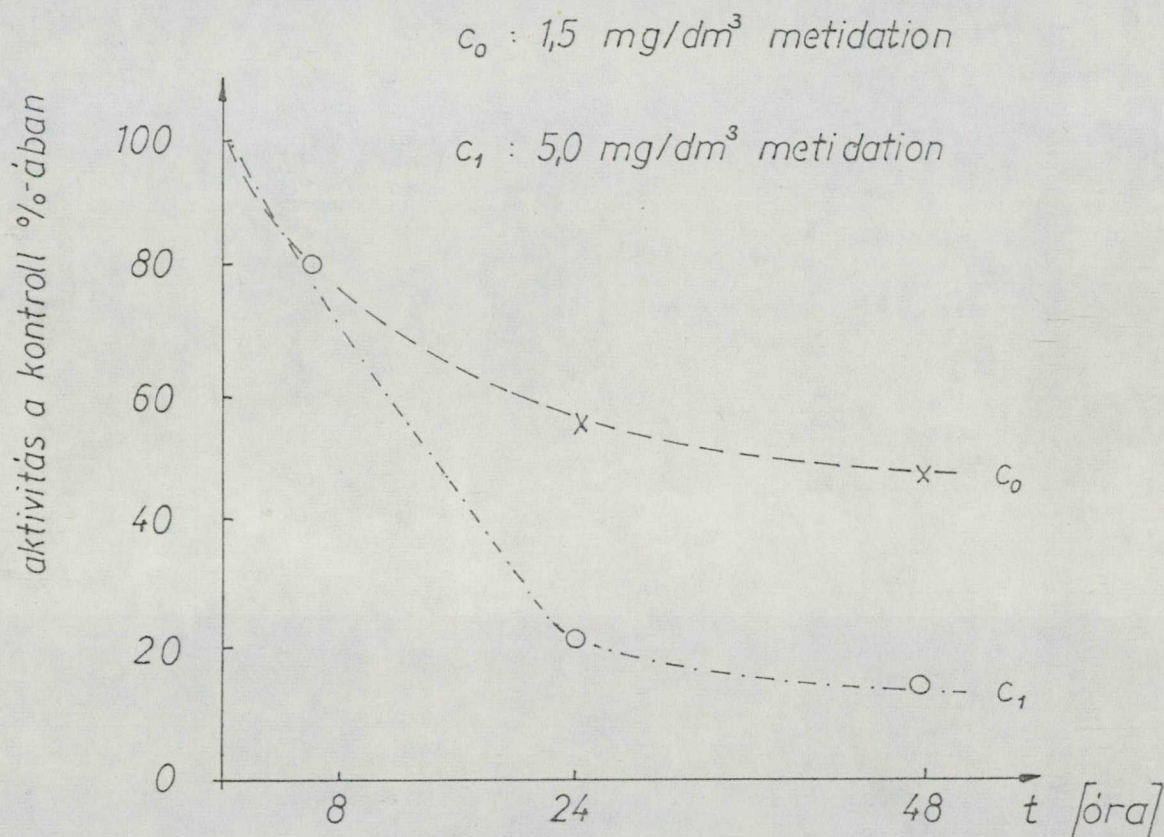
A ChE aktivitásának 50%-os csökkenését eredményező metidation koncentrációkat az alábbi táblázat mutatja.

$c_I 50 \quad \left[\text{mol/dm}^3 \right]$		
	in vitro	in vivo
Szérum	$(3,83 \pm 0,41) \cdot 10^{-4}$	$(4,13 \pm 0,71) \cdot 10^{-6}$
Agy	$(1,54 \pm 0,19) \cdot 10^{-3}$	$(6,62 \pm 0,50) \cdot 10^{-7}$
Szív	$(1,20 \pm 0,09) \cdot 10^{-3}$	$(9,93 \pm 0,76) \cdot 10^{-7}$
Izom	$(1,12 \pm 0,10) \cdot 10^{-3}$	$(2,98 \pm 0,34) \cdot 10^{-6}$

10. táblázat. A metidation $c_I 50$ értékei.

Az in vitro és in vivo körülmények között kapott $c_I 50$ értékekben tapasztalható igen nagy különbségek oka egyrészt az oxigén analóg képződése lehet, másrészt nem zárhatjuk ki az akkumulálódás lehetőségét sem, mivel a kezelési idő 48 óra volt és ezalatt felhalmozódhatott a metidation a hal szerve-

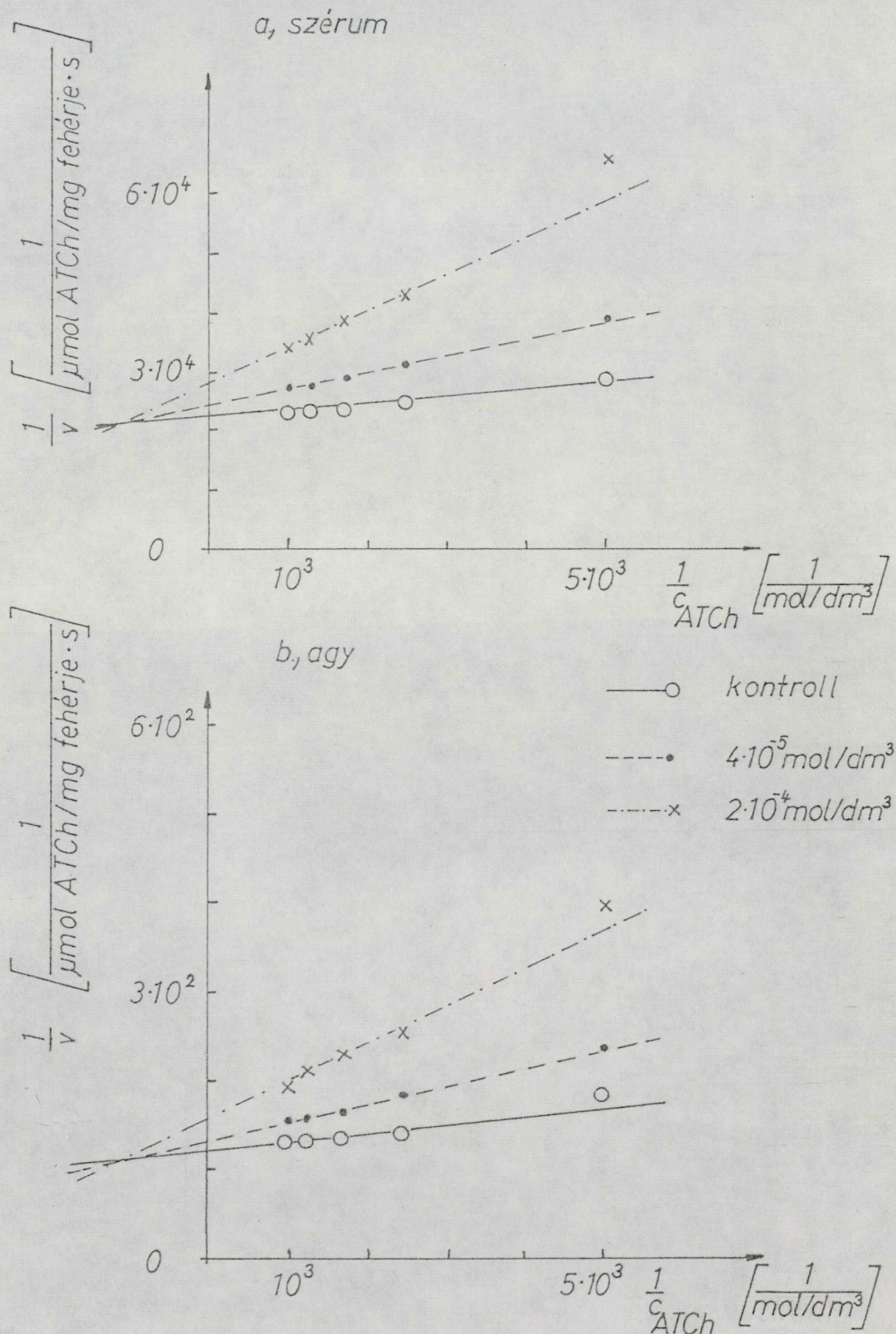
zetében. Ezt támasztja alá a metidation in vivo hatásának időbeli változása is szérum esetén, melyet a 9. ábrán tüntettünk fel. Látható, hogy a metidation gátló hatása az idő előrehaladtával növekszik.



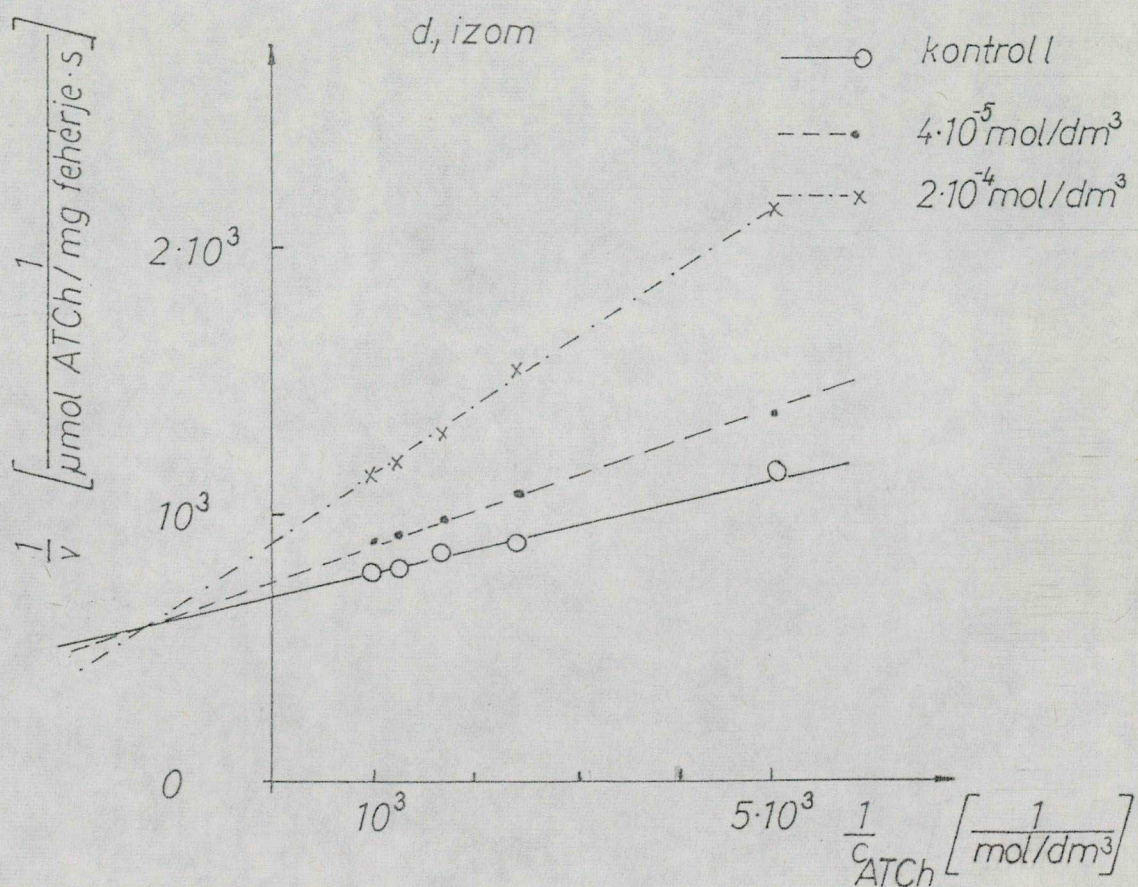
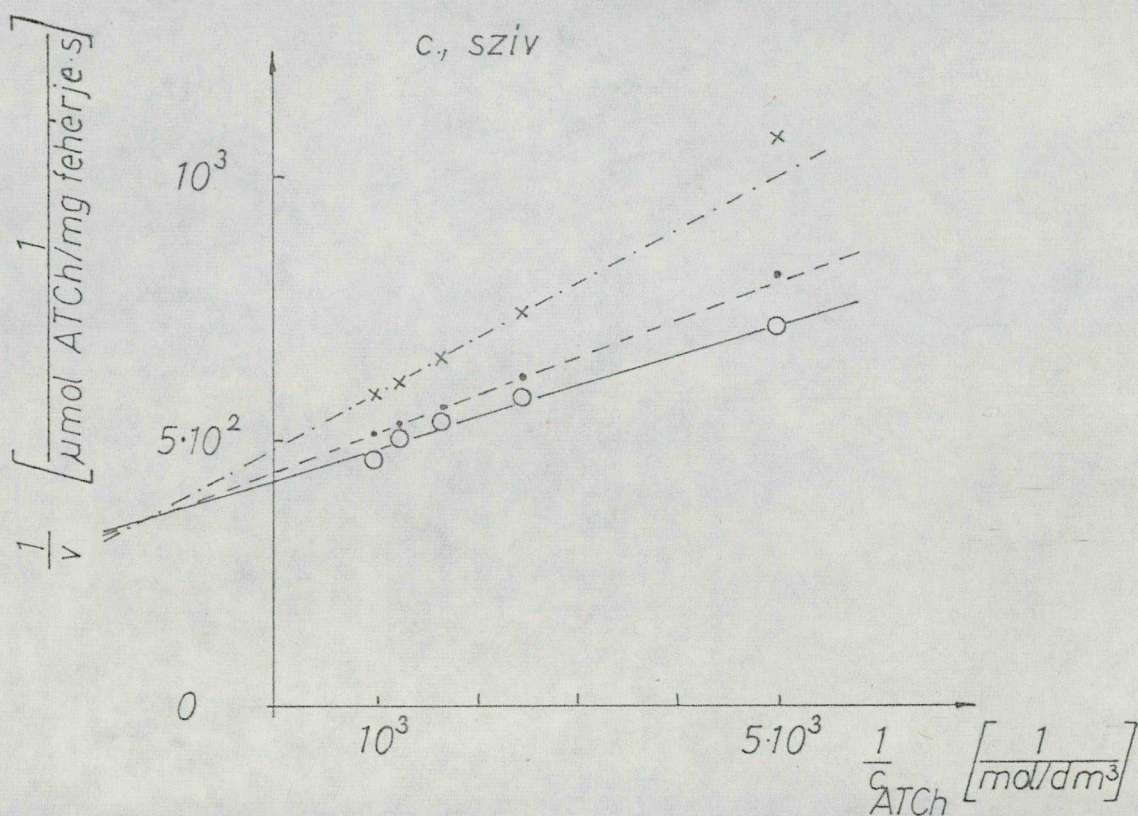
9. ábra. A ChE aktivitásának időbeni változása a metidation hatására.

Elvégeztük a metidation gátlásának kinetikai vizsgálatát is. A Lineweaver-Burk ábrázolás alapján megállapítottuk, hogy a gátlás a vizsgált szervek esetén vegyes típusú. Tehát a metidation a ChE anionos kötőhelyét és eszteráz helyét egyaránt befolyásolja, így az enzim-szubsztrát komplex disszociációs állandóját növeli, a maximális sebességet pedig csökkenti /10. ábra, 11. táblázat/. Ez összhangban van a

10. ábra. A metidation gátlásának kinetikai vizsgálata
LINEWEAVER-BURK ábrázolás



10. ábra. A metidation gátlásának kinetikai vizsgálata
LINEWEAVER-BURK ábrázolás



foszforsavészterek ismert hatásmechanizmusával, melyek a ChE anionkötő és eszteráz helyéhez is kapcsolódnak és az enzim reaktív szeril oldalláncának foszforilációját okozzák.

	c_{MET} [mol/dm ³]	K_{Mapp} [mol/dm ³]	v_{maxapp} [$\frac{\text{mol ATCh}}{\text{mg fehérje} \cdot \text{s}}$]
Szérum	0	$(3,77 \pm 0,36) \cdot 10^{-5}$	$(4,44 \pm 0,45) \cdot 10^{-5}$
	$4,0 \cdot 10^{-5}$	$(8,93 \pm 0,87) \cdot 10^{-5}$	$(4,08 \pm 0,40) \cdot 10^{-5}$
	$2,0 \cdot 10^{-4}$	$(2,04 \pm 0,20) \cdot 10^{-4}$	$(3,45 \pm 0,33) \cdot 10^{-5}$
Agy	0	$(1,34 \pm 0,12) \cdot 10^{-4}$	$(8,33 \pm 0,81) \cdot 10^{-3}$
	$4,0 \cdot 10^{-5}$	$(1,88 \pm 0,17) \cdot 10^{-4}$	$(7,69 \pm 0,70) \cdot 10^{-3}$
	$2,0 \cdot 10^{-4}$	$(2,86 \pm 0,28) \cdot 10^{-4}$	$(6,25 \pm 0,59) \cdot 10^{-3}$
Szív	0	$(9,52 \pm 0,91) \cdot 10^{-5}$	$(2,33 \pm 0,21) \cdot 10^{-3}$
	$4,0 \cdot 10^{-5}$	$(1,37 \pm 0,13) \cdot 10^{-4}$	$(2,27 \pm 0,22) \cdot 10^{-3}$
	$2,0 \cdot 10^{-4}$	$(2,31 \pm 0,22) \cdot 10^{-4}$	$(2,13 \pm 0,19) \cdot 10^{-3}$
Izom	0	$(1,45 \pm 0,13) \cdot 10^{-4}$	$(1,51 \pm 0,13) \cdot 10^{-3}$
	$4,0 \cdot 10^{-5}$	$(1,72 \pm 0,17) \cdot 10^{-4}$	$(1,39 \pm 0,12) \cdot 10^{-3}$
	$2,0 \cdot 10^{-4}$	$(2,61 \pm 0,24) \cdot 10^{-4}$	$(1,16 \pm 0,10) \cdot 10^{-3}$

11. táblázat. Metidation hatása a látszólagos K_{M} és a látszólagos v_{max} értékekre az egyes szervek esetén.

3.5. Egy halpusztulás során bekövetkezett ChE gátlás vizsgálata

Hazánkban az 1971-78 évek közötti időben összesen 280 esetben következett be kisebb-nagyobb mértékű halpusztulás, ezek közül bizonyítottan 21-et növényvédő szerek okoztak. Ezek a halpusztulások többségükben kisebb vízfolyásokban vagy öntözőcsatornáknak fordultak elő /53/.

1982 októberében a Csongrád megyei Donga érben ismeretlen szennyező anyag által eloidézett halpusztulás játszódott le. Vizsgáltuk az itt gyűjtött pontyok egyes szerveiben a ChE aktivitását. A begyűjtött halakon jól láthatók voltak a mérgezés jelei /izgatottság, vergődés, görcsös uszás, a víz felszínén való tartózkodás/. A víz hőfoka 285 K volt. Kontrollként ugyanilyen vízhőmérsékletű akváriumban tartott halakat használtunk fel. A vizsgálat eredményét a 12. táblázatban tüntettük fel.

aktivitás a kontroll %-ában	
Szérum	34,93 $\pm$ 5,71
Agy	12,66 $\pm$ 0,83
Szív	8,95 $\pm$ 1,92
Izom	46,62 $\pm$ 4,10

12. táblázat. A halpusztulás során gyűjtött halakban mért ChE aktivitás értékek.

Látható, hogy az ismeretlen szennyező anyag igen erősen gá-

tolta a ChE enzimet minden vizsgált szerv esetén. Az aktivitás csökkenésében szerepet játszhat a halak általános mérgezési állapota is, az azonban nem valószínű, hogy a teljes aktivitás csökkenésért ez lenne felelős. Az adatok alapján valószínűnek tekinthető, hogy a Donga érbe került szennyező anyag ChE gátló vegyület volt.

.

Ö S S Z E F O G L A L Á S

A növényvédő szereket a mezőgazdaság növekvő mennyiségben használja fel s így vízszennyező hatásuk is egyre nagyobb mértékű lesz. Esőzés révén a vízbe kerülve káros hatást fejtenek ki az ott élő vízi szervezetekre, így a halakra is.

Mi a hazánkban igen elterjedt tavi ponty /*Cyprinus carpio* L./ kolineszteráz enzimének érzékenységét vizsgáltuk négy, a mezőgazdaságban nagy mennyiségben felhasznált anyaggal szemben. E vegyületek a cink-klorid, a réz-szulfát, a paraquat és a metidation voltak. Közülük csak a metidation tartozik a foszfor-savészterek közé, azaz csak ennek növényvédő hatása alapul a kolineszteráz bénításán. Éppen ezért tartottuk érdekesnek összehasonlítását a másik három anyaggal.

Először jellemeztük a ponty egyes szerveiben /szérum, agy, sziv, izom/ található kolineszteráz enzimet. Megállapítottuk, hogy a kolineszteráz aktivitás minden vizsgált szervben függ a pH-tól, a pH optimumok méréseink szerint a $\text{pH} = 7,30-7,60$ intervallumban jelentkeznek. A vizsgált szervekben az enzimaktivitás a szubsztrátkoncentráció függvényében maximumgörbét ad. Ez arra utal, hogy e szervek főként acetilkolineszterázt tartalmaznak, pszeudokolineszterázt csak kisebb mennyiségben. A maximumok az $1,0 \cdot 10^{-3}$ - $1,3 \cdot 10^{-3}$ mol/dm^3 szubsztrátkoncentráció tartományban találhatók. Meghatároztuk a látszólagos Michaelis állandókat és a látszólagos maximális sebesség értékeit is a Lineweaver-Burk ábrázolás alapján, s azt tapasztaltuk, hogy az egyes szervek esetén ezek az értékek eltérőek.

Vizsgáltuk a ponty egyes szerveiben található kolineszteráz aktivitásának függését a hőmérséklettől. Megállapítottuk, hogy az enzim hőmérsékleti optimummal rendelkezik, mely optimumok a szérum, az agy és a szív esetén 310-314 K között, az izom esetén 302 K-nél mérhetők.

Munkánk fő részét a cink-klorid, a réz-szulfát, a paraquat és a metidation gátló hatásának vizsgálata képezte.

A cink-klorid az alkalmazott 1,0 , 10,0 és 50,0 mg/dm³ koncentrációkban sem in vitro, sem in vivo körülmények között nem csökkentette egyik vizsgált szervben sem a kolineszteráz aktivitását.

A réz-szulfát két órás kezelések esetén mind in vivo , mind in vitro körülmények között 10,0 mg/dm³ és nagyobb koncentrációkban gátolta az enzimet minden vizsgált szerv esetén. Lineweaver-Burk ábrázolással megállapítottuk, hogy a gátlás vegyes típusú, azaz a réz-szulfát az enzim anionos kötőhelyét és az eszteráz helyet is befolyásolja. A hosszútávú réz-szulfát kezelések közül, melyeket 5,0 mg/dm³ koncentrációban végeztünk, csak a 24 órás kezeléseknél következett be jelentős aktivitáscsökkenés, az ennél hosszabb időtartamu kezelések esetén az eredeti kolineszteráz aktivitás értékek helyreálltak, azaz a halak alkalmazkodtak a réz-szulfát jelenlétéhez.

A paraquat minden vizsgált szervben gátolta a kolineszterázt a 10,0 mg/dm³ koncentrációtól kezdve in vitro és in vivo körülmények között is. A gátlás mechanizmusa más, mint a réz-szulfátnál, ebben az esetben a gátlás kompetitív, vagyis a paraquat csak az enzim anionos kötőhelyét befolyásolja, az

eszteráz helyet nem. A kolineszteráz gátlásának vizsgálata alapján feltételezhető, hogy a réz-szulfát az izomban és kisebb mértékben a szivben is felhalmozódik, míg a paraquat egyik vizsgált szervben sem akkumulálódik olyan mértékben, hogy mérhető különbséget okozna az in vitro és in vivo körülmények között kapott $c_I 50$ értékekben. Ugy tűnik, mindkét vegyület az agyba jut be a legkisebb mennyiségben /vagy ott méregtelenítődik leggyorsabban/.

A szerves foszforsavészterek csoportjába tartozó metidation in vivo körülmények között lényegesen erősebb kolineszteráz gátlónak bizonyult, mint in vitro körülmények között. Ennek oka valószínűleg az, hogy a metabolizmus során a vegyület oxigén analógja képződik, melynek kolineszteráz gátló hatása sokkal erősebb. Megállapítottuk, hogy a gátlás ebben az esetben vegyes típusu, ez összhangban van a foszforsavészterek ismert hatásmechanizmusával, melyek az enzim anionkötő és eszteráz helyéhez is kötődnek.

A laboratóriumi körülmények között végzett vizsgálatokon kívül egy, a Csongrád megyei Donga érben 1982 októberében előfordult szennyeződés kolineszterázra gyakorolt hatását is vizsgáltuk. Az ismeretlen eredetű szennyeződésről megállapítottuk, hogy erős gátló hatást fejtett ki a halak egyes szerveiben mérhető enzimaktivitásra.

Eredményeink tehát azt mutatják, hogy a vizsgált vegyületek közül három, a réz-szulfát, a paraquat és a metidation erősen gátolják halakban a kolineszteráz enzimet, ezért alkalmazásuk az élővizek közelében fokozott óvatosságot követel meg.

R Ö V I D I T É S E K J E G Y Z É K E

ACh	acetilkolin
AChE	acetilkolineszteráz /E. C. 3.1.1.7./
ATCh	acetyl-tiokolin
BuCh	butirilkolin
BW 284 C 51	di-/p-N-dimetil-allil-ammónium-benzil/-aceton- dibromid
ChE	kolineszteráz /acetilkolineszteráz és pszeudo- kolineszteráz együttesen/
DDT	1,1,1-triklór-2,2-bisz-/4-klór-fenil/-etán
MET	metidation /O,O-dimetil-S-/2-metoxi-1,3,4,-tia- diazol-5-/4H/-onil-/4/-metil/-ditiofoszfát/
PQ	paraquat /1,1'-dimetil-4,4'-dipiridilium-di- klorid/
YChE	pszeudokolineszteráz /E. C. 3.1.1.8./

I R O D A L O M J E G Y Z É K

- /1/ Massoulié, J., Bon, S., Vigny, M.: Structural and Functional Aspects of Cholinesterase Polymorphism in Vertebrates. In "Synaptic Constituents in Health and Disease". Proceedings of the Third Meeting of the European Society for Neurochemistry. Pergamon Press. Ljubljana - Oxford, 1980. 527 old.
- /2/ Augustinsson, K.-B.: Nature 181, 1788 /1958/.
- /3/ Mazur, A., Bodansky, O.: J. Biol. Chem. 163, 261 /1946/.
- /4/ Aldridge, W. N.: Biochem. J. 53, 64 /1953/.
- /5/ Elődi P.: Biokémia. Akadémiai Kiadó. Budapest, 1980. 835-836 old.
- /6/ Silman, J., Anglistter, L.: Molecular Structure of Acetylcholinesterase. In "Synaptic Constituents in Health and Disease". Proceedings of the Third Meeting of the European Society for Neurochemistry. Pergamon Press. Ljubljana - Oxford, 1980. 577 old.
- /7/ Milos, R. P.: On the Role of the Catalytic Anionic Site in Acetylcholinesterase. In "Synaptic Constituents in Health and Disease". Proceedings of the Third Meeting of the European Society for Neurochemistry. Pergamon Press. Ljubljana - Oxford, 1980. 551 old.



- /8/ Hochachka, P. W., Storey, K. B., Baldwin, J.: Comp. Biochem. Physiol. 52, 13 /1975/.
- /9/ Walsh, C.: Enzymatic Reaction Mechanisms. W. H. Freeman and Company. San Francisco, 1979. 124 old.
- /10/ Augustinsson, K.-B.: Acta Physiol. Scand. 15, 52-53 /1948/.
- /11/ Myers, D. K.: Biochem. J. 55, 67 /1953/.
- /12/ Mendel, B., Hawkins, R.D.: Biochem. J. 41, 22 /1947/.
- /13/ Adams, D. H., Thompson, R. H. S.: Biochem. J. 42, 170 /1948/.
- /14/ Ord, L. G., Thompson, R. H. S.: Biochem. J. 46, 346 /1950/.
- /15/ Aldridge, W. H., Davison, A. N.: Biochem. J. 51, 62 /1952/.
- /16/ Clitherow, J. W., Mitchard, M., Harper, N. J.: Nature 199, 1000 /1963/.
- /17/ Funnel, H.S., Oliwer, W. T.: Nature 208, 689 /1965/.
- /18/ Augustinsson, K.-B.: Acta Physiol. Scand. 16, 176-179 /1948/.
- /19/ Brightman, E. W., Albers, R. W.: J. Neurochem. 4, 246 /1959/.
- /20/ Abou-Donia, M. B., Menzel, D. B.: Comp. Biochem. Physiol. 21, 100-103 /1967/.
- /21/ Coppage, D. L.: Bull. Environm. Contam. Toxicol. 6, 304 /1971/.

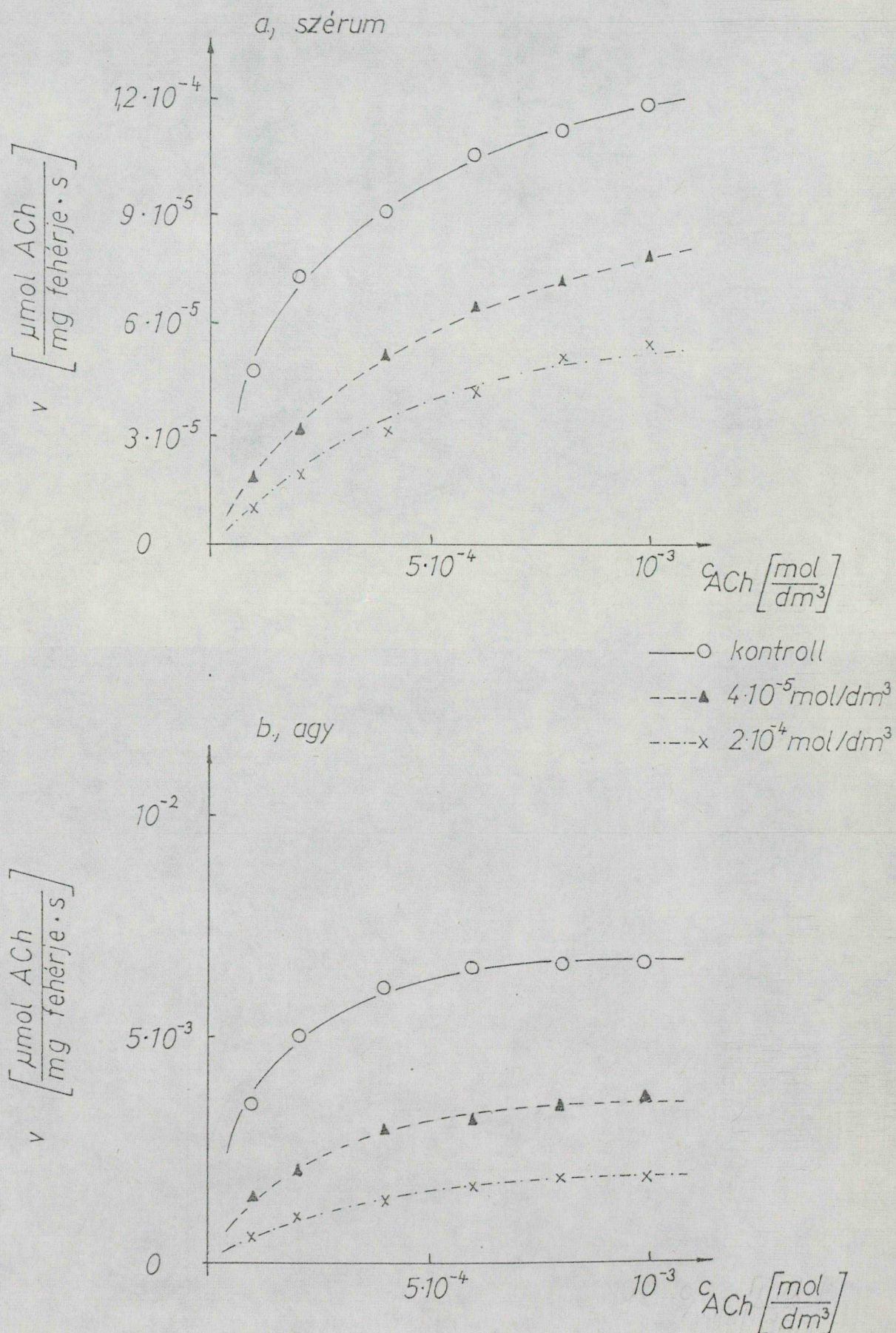
- /22/ Benke, D. M., Murphy, S. D.: Bull. Environm. Contam. Toxicol. 12, 118-119 /1974/.
- /23/ Mukherjee, S., Bhattacharya, S.: Environ. Physiol. Biochem. 4/5/, 229 /1974/.
- /24/ Maljarevszkaja, A. J.: Obmen veseštva u rib v uszlovijah antropogennava jeftrofirovanyija vodojemov. Nauka Dumka. Kiev, 1979. 101-102 old.
- /25/ Augustinsson, K.-B.: Acta Chem. Scand. 13, 1097 /1959/.
- /26/ Lundin, S. J.: Experientia 14/4, 131-132 /1958/.
- /27/ Clos, F., Serfaty, A.: Bull. Soc. Hist. Natl. Toulouse 93, 32 /1958/.
- /28/ Baslow, L. H., Nigrelli, R. F.: Copeia 1, 8-10 /1961/.
- /29/ Lundin, S. J.: J. Cell. Comp. Physiol. 59, 94-95 /1962/.
- /30/ Pechot-Dechavissine, M.: Étude biochimique, pharmacologique et histochimique des cholinesterases des muscles striés chez les poissons, les mammifères thèse. Masson et Cie. Paris, 1962. 67 old.
- /31/ Lüdke, A. H., Ohnesorge, F. K.: Z. Vergleich. Physiol. 52, 266-267 /1966/.
- /32/ Szerebrenyikova, T. P., Filoszofova-Lizlova, E. M., Hljusztina, T. B.: Zsurn. evoljuc. biohimii i fiziologii 7/5/, 461 /1971/.
- /33/ Gaál J., Horváth Z., Erőss J.: Aquacultura Hungarica 2, 117-120 /1980/.

- /34/ Baslow, M. H., Nigrelli, R. F.: Zoologica 49/1/, 41-45
/1964/.
- /35/ Baldwin, J., Hochachka, P. W.: Biochem. J. 116, 883-887
/1970/.
- /36/ Baldwin, J.: Comp. Biochem. Physiol. 40 B, 181-187
/1971/.
- /37/ Ellman, C. L., Courtney, D. K., Andres, V., Fotherstone, R. M.: Biochem. Pharmacol. 7, 88-95
/1961/.
- /38/ Augustinsson, K.-B.: Determination of Activity of Cholinesterases. In "Methods of Biochemical Analysis". Suppl. Vol. Analysis of Biogenic Amines and their Related Enzymes. John Wiley and Sons. New York, 1971, 217-273 old.
- /39/ Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randal, R. J.: J. Biol. Chem. 193, 265-271 /1951/.
- /40/ Vinikour, W. S., Goldstein, R. M., Anderson, R. V.: Bull. Environm. Contam. Toxicol. 24, 729 /1980/.
- /41/ Nemcsók J. és munkatársai személyes közlése alapján.
- /42/ Brock, W. L. F.: Environm. Pollut. 19, 25 /1979/.
- /43/ Olson, D. L., Christensen, G. M.: Environm. Res. 21, 332
/1980/.
- /44/ Cremllyn, R.: Pesticides. John Wiley and Sons. New York, 1978. 159, 212 old.

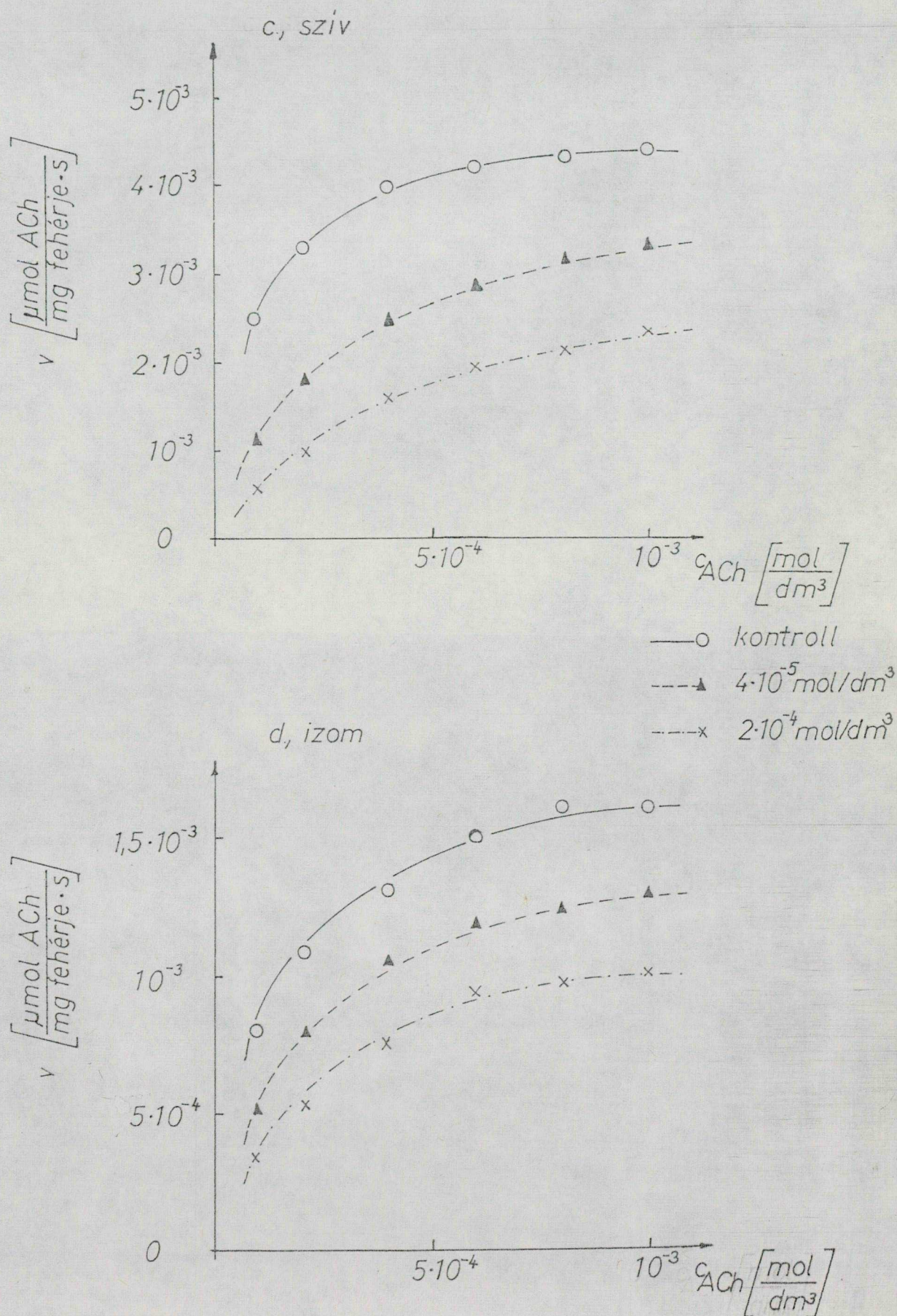
- /45/ Silver, A.: The Biology of Cholinesterases. In "Frontiers of Biology". Vol.36. North-Holland Publishing Company. Amsterdam, 1974. 9 old.
- /46/ Block, E. R.: Lung 156, 197 /1979/.
- /47/ Fytizas, R.: Bull. Environm. Contam. Toxicol. 25, 283-288 /1980/.
- /48/ Brandenburger, E. A., Maling, H. M.: Biochem. Pharmacol. 29, 466 /1980/.
- /49/ Worthing, C. R.: The Pesticide Manual. British Crop Protection Council. London, 1979. 343 old.
- /50/ Niklas, J.: Z. Angew. Zool. 66, 359-368 /1979/.
- /51/ Knaak, J. B., Schlocker, P., Ackerman, C. R., Seiber, J. N.: Bull. Environm. Contam. Toxicol. 24, 798-804 /1980/.
- /52/ Cassidy, J. E., Ryskiewich, D. P., Murphy, R. T.: J. Agr. Food Chem. 17/3/, 558-564 /1969/.
- /53/ Virág Á.: A mezőgazdasági kemizálás környezetvédelmi összefüggései. Mezőgazdasági Kiadó. Budapest, 1981. 118 old.

F Ü G G E L É K

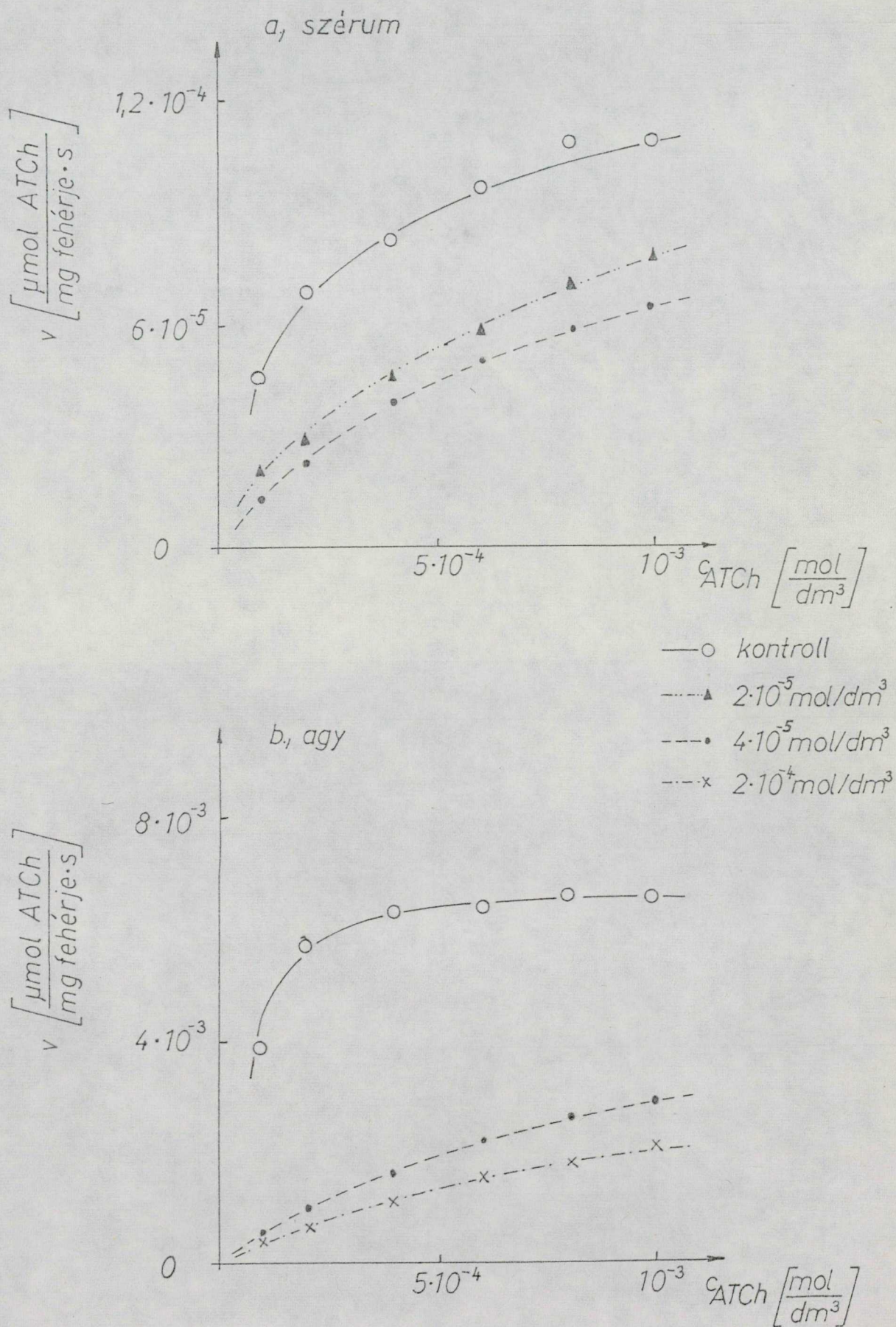
11. ábra. A réz-szulfát hatása a reakciósebességre



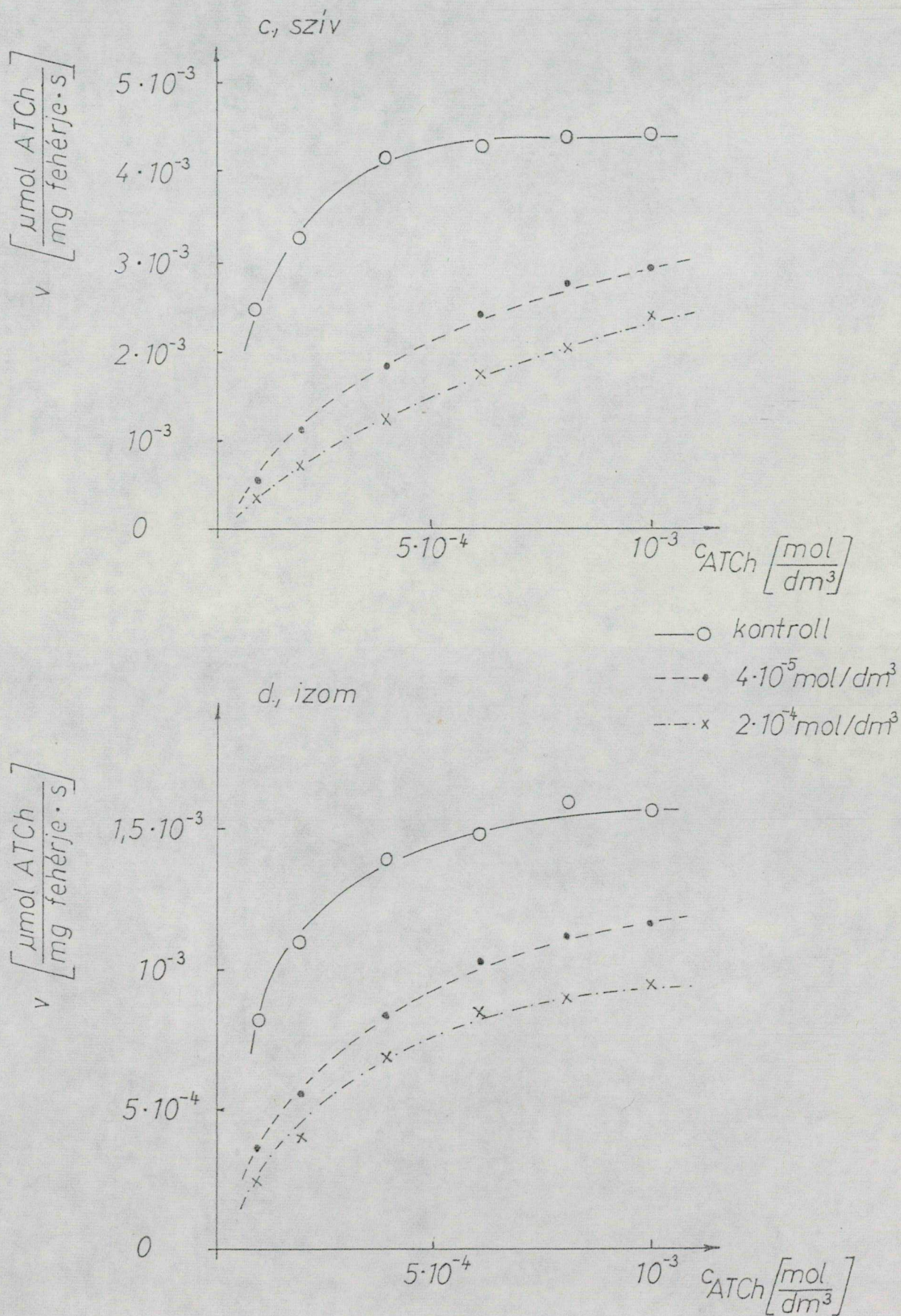
11. ábra. A réz-szulfát hatása a reakciósebességre



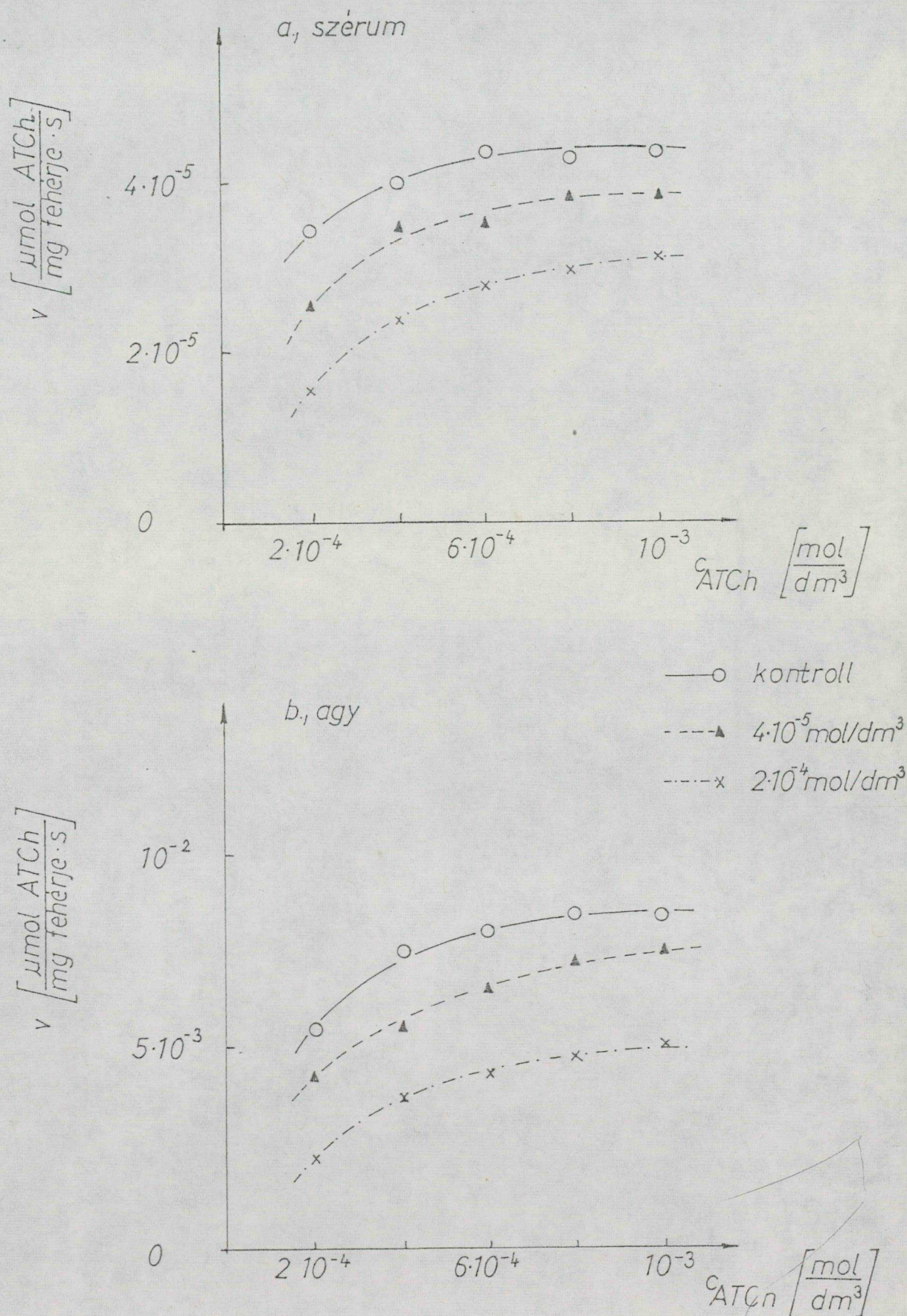
12. ábra. Paraquat hatása a reakciósebességre



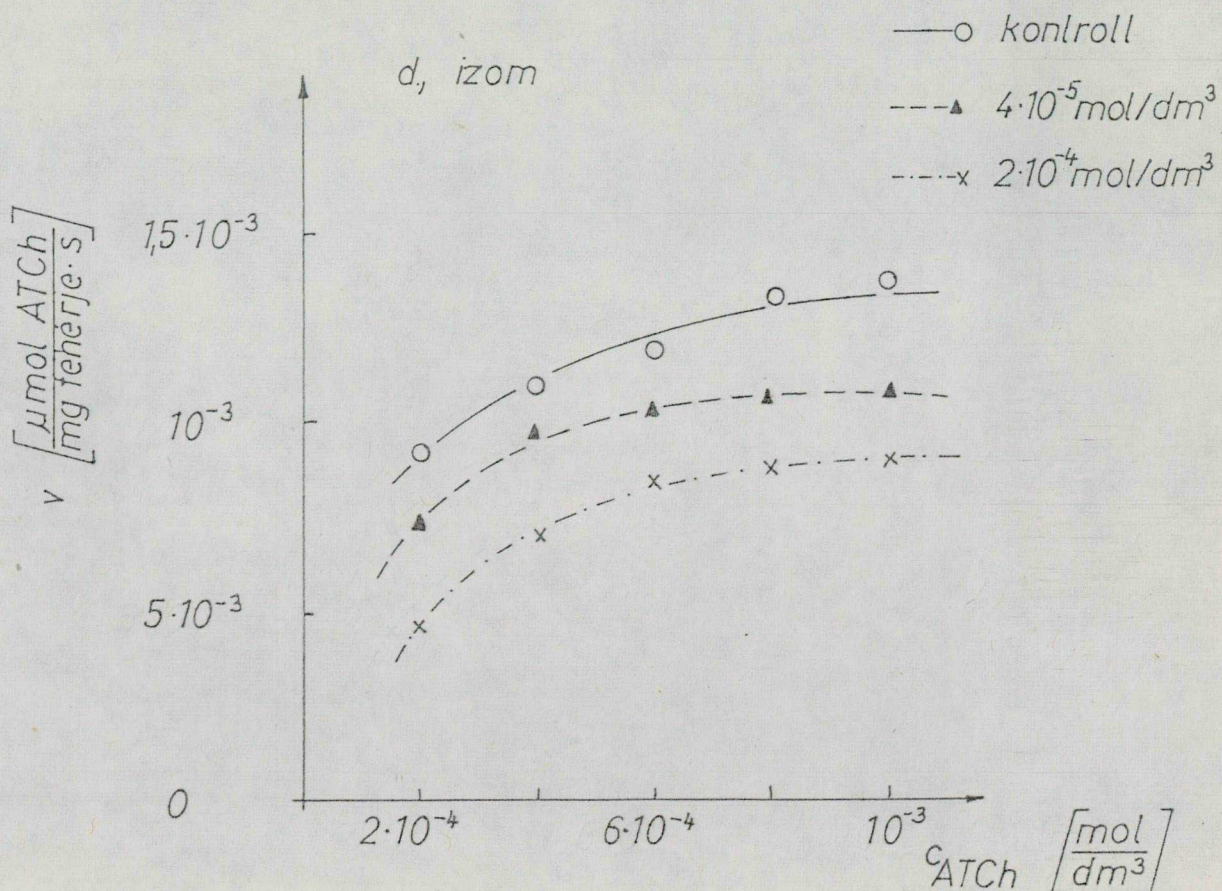
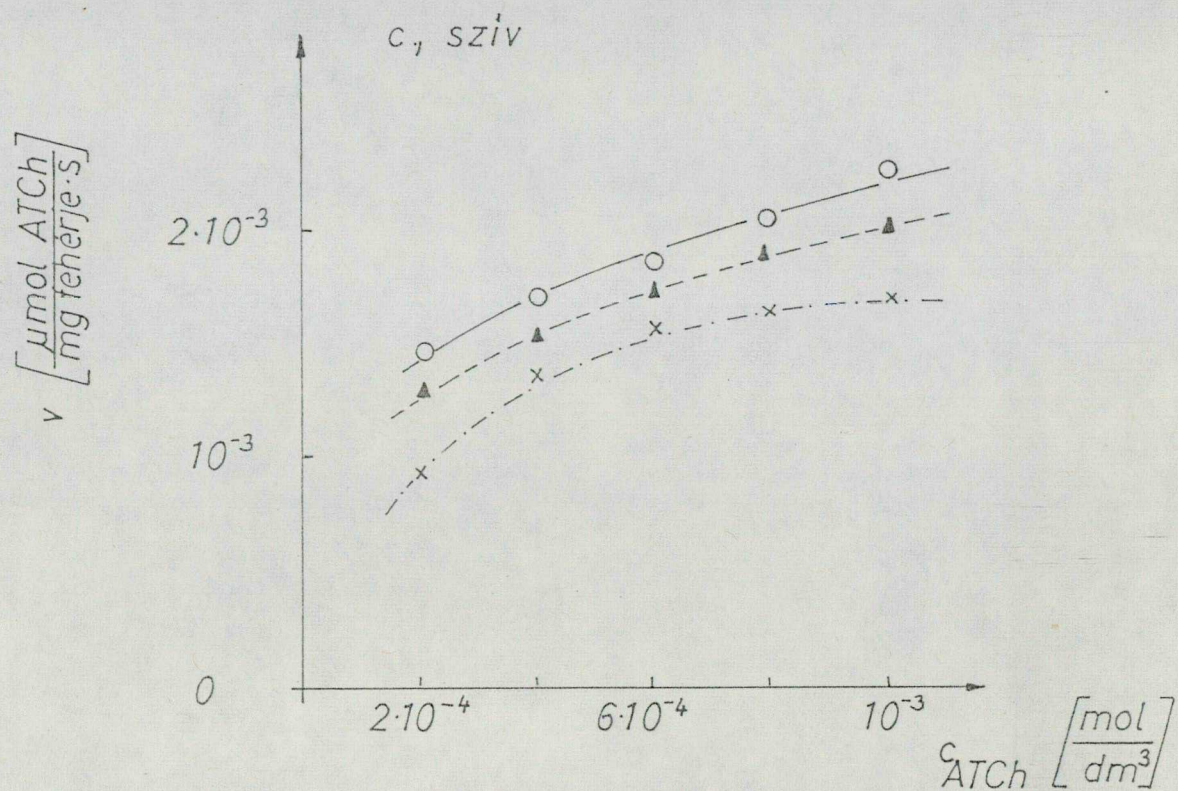
12. ábra. Paraquat hatása a reakciósebességre



13. ábra. A metidation hatása a reakciósebességre



13. ábra. A metidation hatása a reakciósebességre



pH	U/mg fehérje	
	szérum	agy
4,0	$(1,54 \pm 0,16) \cdot 10^{-3}$	$(1,81 \pm 0,14) \cdot 10^{-2}$
4,5	$(1,63 \pm 0,20) \cdot 10^{-3}$	$(2,36 \pm 0,21) \cdot 10^{-2}$
5,0	$(1,74 \pm 0,15) \cdot 10^{-3}$	$(5,04 \pm 0,58) \cdot 10^{-2}$
5,5	$(1,97 \pm 0,17) \cdot 10^{-3}$	$(9,43 \pm 0,82) \cdot 10^{-2}$
6,0	$(2,96 \pm 0,26) \cdot 10^{-3}$	$(1,47 \pm 0,12) \cdot 10^{-1}$
6,5	$(5,10 \pm 0,68) \cdot 10^{-3}$	$(2,03 \pm 0,17) \cdot 10^{-1}$
7,0	$(8,41 \pm 0,96) \cdot 10^{-3}$	$(2,51 \pm 0,29) \cdot 10^{-1}$
7,5	$(9,81 \pm 0,71) \cdot 10^{-3}$	$(3,01 \pm 0,34) \cdot 10^{-1}$
8,0	$(8,73 \pm 0,65) \cdot 10^{-3}$	$(2,68 \pm 0,21) \cdot 10^{-1}$
8,5	$(6,89 \pm 0,73) \cdot 10^{-3}$	$(1,94 \pm 0,18) \cdot 10^{-1}$
9,0	$(4,66 \pm 0,37) \cdot 10^{-3}$	$(1,16 \pm 0,09) \cdot 10^{-1}$

$U = \mu\text{mol ATCh}/60 \text{ s}$

13. táblázat. A szérum és az agy ChE aktivitásának függése a pH-tól.



pH	U/mg fehérje	
	szív	izom
4,0	$(2,01 \pm 0,17) \cdot 10^{-2}$	$(2,22 \pm 0,16) \cdot 10^{-2}$
4,5	$(2,77 \pm 0,26) \cdot 10^{-2}$	$(2,40 \pm 0,19) \cdot 10^{-2}$
5,0	$(3,54 \pm 0,39) \cdot 10^{-2}$	$(2,67 \pm 0,21) \cdot 10^{-2}$
5,5	$(8,46 \pm 0,96) \cdot 10^{-2}$	$(3,29 \pm 0,38) \cdot 10^{-2}$
6,0	$(1,31 \pm 0,10) \cdot 10^{-1}$	$(4,36 \pm 0,45) \cdot 10^{-2}$
6,5	$(1,83 \pm 0,26) \cdot 10^{-1}$	$(7,91 \pm 0,83) \cdot 10^{-2}$
7,0	$(2,55 \pm 0,22) \cdot 10^{-1}$	$(9,78 \pm 0,84) \cdot 10^{-2}$
7,5	$(2,82 \pm 0,25) \cdot 10^{-1}$	$(1,09 \pm 0,91) \cdot 10^{-1}$
8,0	$(2,42 \pm 0,21) \cdot 10^{-1}$	$(1,04 \pm 0,88) \cdot 10^{-1}$
8,5	$(2,06 \pm 0,17) \cdot 10^{-1}$	$(9,77 \pm 0,91) \cdot 10^{-2}$
9,0	$(1,81 \pm 0,16) \cdot 10^{-1}$	$(8,36 \pm 0,79) \cdot 10^{-2}$

U = $\mu\text{mol ATCh}/60 \text{ s}$

14. táblázat. A szív és az izom ChE aktivitásának függése a pH-tól.

c_{ATCh} $\left[\text{mmol/dm}^3 \right]$	U/mg fehérje	
	szérum	agy
0,1	$(2,93 \pm 0,36) \cdot 10^{-3}$	$(2,16 \pm 0,30) \cdot 10^{-1}$
0,2	$(4,11 \pm 0,48) \cdot 10^{-3}$	$(3,04 \pm 0,33) \cdot 10^{-1}$
0,4	$(5,42 \pm 0,50) \cdot 10^{-3}$	$(3,67 \pm 0,34) \cdot 10^{-1}$
0,6	$(6,31 \pm 0,69) \cdot 10^{-3}$	$(3,91 \pm 0,40) \cdot 10^{-1}$
0,8	$(6,83 \pm 0,62) \cdot 10^{-3}$	$(3,98 \pm 0,35) \cdot 10^{-1}$
1,0	$(7,14 \pm 0,67) \cdot 10^{-3}$	$(4,04 \pm 0,48) \cdot 10^{-1}$
1,2	$(7,31 \pm 0,71) \cdot 10^{-3}$	$(4,05 \pm 0,41) \cdot 10^{-1}$
1,4	$(7,32 \pm 0,69) \cdot 10^{-3}$	$(3,91 \pm 0,38) \cdot 10^{-1}$
1,6	$(7,14 \pm 0,66) \cdot 10^{-3}$	$(3,79 \pm 0,36) \cdot 10^{-1}$
1,8	$(6,83 \pm 0,73) \cdot 10^{-3}$	$(3,15 \pm 0,30) \cdot 10^{-1}$
2,0	$(6,39 \pm 0,61) \cdot 10^{-3}$	$(3,23 \pm 0,31) \cdot 10^{-1}$
2,2	$(5,89 \pm 0,60) \cdot 10^{-3}$	-
2,4	$(5,25 \pm 0,49) \cdot 10^{-3}$	-

$$U = \mu\text{mol ATCh}/60 \text{ s}$$

15. táblázat. A szérum és az agy ChE aktivitásának függése a szubsztrátkoncentrációtól.

c_{ATCh} $\left[\frac{\text{mmol}}{\text{dm}^3} \right]$	U/mg fehérje	
	szív	izom
0,1	$(1,54 \pm 0,14) \cdot 10^{-1}$	$(4,31 \pm 0,57) \cdot 10^{-2}$
0,2	$(1,99 \pm 0,16) \cdot 10^{-1}$	$(6,26 \pm 0,63) \cdot 10^{-2}$
0,4	$(2,39 \pm 0,20) \cdot 10^{-1}$	$(8,13 \pm 0,89) \cdot 10^{-2}$
0,6	$(2,58 \pm 0,21) \cdot 10^{-1}$	$(8,85 \pm 0,80) \cdot 10^{-2}$
0,8	$(2,66 \pm 0,29) \cdot 10^{-1}$	$(9,48 \pm 0,87) \cdot 10^{-2}$
1,0	$(2,68 \pm 0,27) \cdot 10^{-1}$	$(9,34 \pm 0,90) \cdot 10^{-2}$
1,2	$(2,68 \pm 0,25) \cdot 10^{-1}$	$(9,39 \pm 0,91) \cdot 10^{-2}$
1,4	$(2,52 \pm 0,28) \cdot 10^{-1}$	$(8,36 \pm 0,79) \cdot 10^{-2}$
1,6	$(2,38 \pm 0,20) \cdot 10^{-1}$	$(7,68 \pm 0,72) \cdot 10^{-2}$
1,8	$(2,18 \pm 0,19) \cdot 10^{-1}$	$(5,71 \pm 0,64) \cdot 10^{-2}$
2,0	$(1,96 \pm 0,15) \cdot 10^{-1}$	$(4,64 \pm 0,42) \cdot 10^{-2}$

U = $\mu\text{mol ATCh}/60 \text{ s}$

16. táblázat. A szív és az izom ChE aktivitásának függése a szubsztrátkoncentrációtól.

T [K]	U/mg fehérje	
	szérum	agy
274	$(1,69 \pm 0,18) \cdot 10^{-3}$	-
278	$(4,52 \pm 0,50) \cdot 10^{-3}$	-
282	-	$(1,26 \pm 0,14) \cdot 10^{-1}$
283	-	$(1,19 \pm 0,12) \cdot 10^{-1}$
284	$(5,29 \pm 0,67) \cdot 10^{-3}$	-
287	-	$(1,79 \pm 0,20) \cdot 10^{-1}$
289	$(6,01 \pm 0,83) \cdot 10^{-3}$	-
291	-	$(2,39 \pm 0,26) \cdot 10^{-1}$
294	$(6,63 \pm 0,59) \cdot 10^{-3}$	-
295	-	$(2,87 \pm 0,31) \cdot 10^{-1}$
296	$(6,55 \pm 0,74) \cdot 10^{-3}$	-
300	-	$(3,31 \pm 0,35) \cdot 10^{-1}$
301	$(9,23 \pm 0,89) \cdot 10^{-3}$	-
303	$(9,81 \pm 0,96) \cdot 10^{-3}$	$(3,29 \pm 0,44) \cdot 10^{-1}$
306	$(1,01 \pm 0,12) \cdot 10^{-2}$	-
307	$(1,11 \pm 0,10) \cdot 10^{-2}$	$(3,82 \pm 0,47) \cdot 10^{-1}$
311	$(1,28 \pm 0,16) \cdot 10^{-2}$	$(4,65 \pm 0,60) \cdot 10^{-1}$
316	$(1,10 \pm 0,97) \cdot 10^{-2}$	$(4,21 \pm 0,40) \cdot 10^{-1}$
320	$(9,40 \pm 0,91) \cdot 10^{-3}$	-
321	-	$(3,28 \pm 0,32) \cdot 10^{-1}$

$$U = \mu\text{mol ATCh} / 60 \text{ s}$$

17. táblázat. A szérum és az agy ChE aktivitásának függése a hőmérséklettől.

T [K]	U/mg fehérje	
	szív	izom
279	$(1,13 \pm 0,12) \cdot 10^{-1}$	-
280	-	$(4,54 \pm 0,42) \cdot 10^{-2}$
283	$(1,26 \pm 0,15) \cdot 10^{-1}$	-
287	$(1,83 \pm 0,19) \cdot 10^{-1}$	$(6,49 \pm 0,71) \cdot 10^{-2}$
290	-	$(7,35 \pm 0,75) \cdot 10^{-2}$
291	$(2,32 \pm 0,21) \cdot 10^{-1}$	-
295	-	$(5,93 \pm 0,61) \cdot 10^{-2}$
297	$(2,58 \pm 0,27) \cdot 10^{-1}$	-
301	$(2,46 \pm 0,28) \cdot 10^{-1}$	-
303	$(3,02 \pm 0,33) \cdot 10^{-1}$	$(1,47 \pm 0,13) \cdot 10^{-1}$
307	$(3,30 \pm 0,37) \cdot 10^{-1}$	$(1,35 \pm 0,15) \cdot 10^{-1}$
311	$(3,53 \pm 0,32) \cdot 10^{-1}$	$(1,26 \pm 0,13) \cdot 10^{-1}$
315	-	$(1,22 \pm 0,16) \cdot 10^{-1}$
316	$(3,36 \pm 0,35) \cdot 10^{-1}$	-
321	$(2,52 \pm 0,26) \cdot 10^{-1}$	$(1,13 \pm 0,10) \cdot 10^{-1}$
U = $\mu\text{mol ATCh}/60 \text{ s}$		

18. táblázat. A szív és az izom ChE aktivitásának függése a hőmérséklettől.

	c_{ZnCl_2} [mg/dm ³]	aktivitás a kontroll %-ában	
		in vitro	in vivo
szérum	1,0	93,54 ± 8,12	97,41 ± 9,12
	10,0	94,43 ± 7,23	100,32 ± 9,79
	50,0	97,05 ± 9,41	102,57 ± 10,03
agy	1,0	103,12 ± 8,27	105,97 ± 10,14
	10,0	114,41 ± 9,15	112,85 ± 10,87
	50,0	125,20 ± 9,98	119,83 ± 11,06
szív	1,0	95,32 ± 9,62	99,72 ± 9,15
	10,0	100,58 ± 8,97	104,84 ± 9,63
	50,0	103,50 ± 9,85	108,56 ± 9,89
izom	1,0	98,47 ± 8,84	103,02 ± 9,92
	10,0	108,39 ± 9,53	108,79 ± 10,07
	50,0	112,97 ± 9,47	112,98 ± 10,91

19. táblázat. Cink-klorid hatása a ChE aktivitására.

	$^c\text{CuSO}_4$ [mg/dm ³]	aktivitás a kontroll %-ában	
		in vitro	in vivo
szérum	1,0	105,19 ± 9,86	96,23 ± 9,15
	10,0	67,37 ± 7,39	88,57 ± 8,27
	50,0	47,70 ± 5,14	67,38 ± 5,98
agy	1,0	93,73 ± 8,21	85,85 ± 5,01
	10,0	50,36 ± 7,93	81,82 ± 7,86
	50,0	31,57 ± 4,11	70,03 ± 7,76
szív	1,0	105,10 ± 9,42	78,26 ± 8,64
	10,0	80,50 ± 8,63	70,83 ± 7,75
	50,0	67,82 ± 7,08	51,85 ± 6,99
izom	1,0	106,06 ± 9,85	72,80 ± 7,03
	10,0	72,45 ± 8,13	62,95 ± 6,87
	50,0	58,40 ± 6,62	33,16 ± 4,05

20. táblázat. Réz-szulfát hatása a ChE aktivitására.

$c_{\text{ACh}} \cdot 10^3$ $[\text{mol/dm}^3]$	$v \cdot 10^5$ $[\mu\text{mol ACh/mg fehérje} \cdot \text{s}]$		
	c_0	c_1	c_2
0,1	$4,76 \pm 0,55$	$1,75 \pm 0,12$	$1,03 \pm 0,09$
0,2	$6,83 \pm 0,72$	$3,07 \pm 0,28$	$1,78 \pm 0,15$
0,4	$8,98 \pm 0,93$	$5,14 \pm 0,47$	$2,92 \pm 0,31$
0,6	$10,57 \pm 0,97$	$6,31 \pm 0,63$	$3,97 \pm 0,43$
0,8	$11,27 \pm 0,92$	$7,15 \pm 0,78$	$4,91 \pm 0,42$
1,0	$11,78 \pm 0,94$	$7,72 \pm 0,69$	$5,35 \pm 0,56$

c_0 : kontroll

c_1 : $4,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol/dm}^3 \text{ CuSO}_4$

c_2 : $2,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol/dm}^3 \text{ CuSO}_4$

21.táblázat. Réz-szulfát hatása a reakciósebességre szérum esetén.

$c_{\text{ACh}} \cdot 10^3$ $[\text{mol/dm}^3]$	$v \cdot 10^3$ $[\mu\text{mol ACh/mg fehérje} \cdot \text{s}]$		
	c_0	c_1	c_2
0,1	$3,61 \pm 0,42$	$1,52 \pm 0,14$	$0,67 \pm 0,05$
0,2	$5,07 \pm 0,61$	$2,19 \pm 0,29$	$1,07 \pm 0,09$
0,4	$6,36 \pm 0,57$	$2,99 \pm 0,32$	$1,47 \pm 0,13$
0,6	$6,52 \pm 0,60$	$3,37 \pm 0,26$	$1,81 \pm 0,17$
0,8	$6,60 \pm 0,61$	$3,54 \pm 0,29$	$2,02 \pm 0,25$
1,0	$6,64 \pm 0,60$	$3,72 \pm 0,35$	$2,03 \pm 0,28$

c_0 : kontroll

c_1 : $4,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol/dm}^3 \text{ CuSO}_4$

c_2 : $2,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol/dm}^3 \text{ CuSO}_4$

22. táblázat. Réz-szulfát hatása a reakciósebességre agyhomogenizátum esetén.

$c_{\text{ACh}} \cdot 10^3$ $[\text{mol/dm}^3]$	$v \cdot 10^3$ $[\mu\text{mol ACh/mg fehérje} \cdot \text{s}]$		
	c_0	c_1	c_2
0,1	$2,56 \pm 0,21$	$1,11 \pm 0,18$	$0,58 \pm 0,05$
0,2	$3,36 \pm 0,35$	$1,72 \pm 0,21$	$0,95 \pm 0,10$
0,4	$4,08 \pm 0,46$	$2,47 \pm 0,27$	$1,51 \pm 0,11$
0,6	$4,25 \pm 0,38$	$2,87 \pm 0,21$	$1,82 \pm 0,16$
0,8	$4,31 \pm 0,40$	$3,14 \pm 0,26$	$2,01 \pm 0,19$
1,0	$4,44 \pm 0,51$	$3,28 \pm 0,34$	$2,23 \pm 0,23$
c_0 : kontroll c_1 : $4,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol/dm}^3 \text{ CuSO}_4$ c_2 : $2,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol/dm}^3 \text{ CuSO}_4$			

23. táblázat. Réz-szulfát hatása a reakciósebességre szivhomogenizátum esetén.

$c_{\text{ACh}} \cdot 10^3$ $[\text{mol/dm}^3]$	$v \cdot 10^3$ $[\mu\text{mol ACh/mg fehérje} \cdot \text{s}]$		
	c_0	c_1	c_2
0,1	$0,78 \pm 0,08$	$0,52 \pm 0,05$	$0,35 \pm 0,03$
0,2	$1,08 \pm 0,09$	$0,81 \pm 0,07$	$0,54 \pm 0,05$
0,4	$1,35 \pm 0,12$	$1,07 \pm 0,09$	$0,78 \pm 0,03$
0,6	$1,48 \pm 0,11$	$1,19 \pm 0,09$	$0,93 \pm 0,09$
0,8	$1,59 \pm 0,13$	$1,24 \pm 0,11$	$0,98 \pm 0,09$
1,0	$1,58 \pm 0,16$	$1,29 \pm 0,17$	$1,01 \pm 0,12$
c_0 : kontroll c_1 : $4,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol/dm}^3 \text{ CuSO}_4$ c_2 : $2,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol/dm}^3 \text{ CuSO}_4$			

24. táblázat. Réz-szulfát hatása a reakciósebességre izomho-
mogenizátum esetén.

	c_{PQ} [mg/dm ³]	aktivitás a kontroll %-ában	
		in vitro	in vivo
szérum	1,0	91,87 ± 9,52	79,32 ± 7,99
	10,0	60,72 ± 4,74	58,73 ± 6,21
	50,0	18,26 ± 1,97	35,12 ± 4,09
agy	1,0	94,06 ± 8,83	96,31 ± 9,12
	10,0	78,31 ± 8,25	88,23 ± 9,03
	50,0	58,12 ± 6,38	75,41 ± 7,24
szív	1,0	84,57 ± 8,11	81,94 ± 8,64
	10,0	64,10 ± 7,30	67,97 ± 7,11
	50,0	43,12 ± 5,08	49,95 ± 5,27
izom	1,0	92,72 ± 9,74	90,58 ± 9,13
	10,0	70,91 ± 8,07	79,67 ± 8,52
	50,0	50,54 ± 6,12	64,23 ± 6,87

25. táblázat. Paraquat hatása a ChE aktivitására.

$c_{\text{ATCh}} \cdot 10^3$ $[\text{mol/dm}^3]$	$v \cdot 10^5$ $[\mu\text{mol ATCh/mg fehérje} \cdot \text{s}]$		
	c_0	c_1	c_2
0,1	$4,65 \pm 0,51$	$1,69 \pm 0,19$	$1,26 \pm 0,18$
0,2	$6,85 \pm 0,63$	$2,95 \pm 0,41$	$2,24 \pm 0,35$
0,4	$8,31 \pm 0,87$	$4,48 \pm 0,46$	$3,62 \pm 0,33$
0,6	$9,61 \pm 0,85$	$5,68 \pm 0,49$	$4,97 \pm 0,46$
0,8	$11,02 \pm 0,98$	$6,59 \pm 0,64$	$5,70 \pm 0,52$
1,0	$10,86 \pm 0,95$	$7,26 \pm 0,62$	$6,11 \pm 0,64$
c_0 : kontroll c_1 : $2,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$ paraquat c_2 : $4,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$ paraquat			

26. táblázat. Paraquat hatása a reakciósebességre szérum esetén.

$c_{\text{ATCh}} \cdot 10^3$ $[\text{mol/dm}^3]$	$v \cdot 10^3$ $[\mu\text{mol ATCh/mg fehérje} \cdot \text{s}]$		
	c_0	c_1	c_2
0,1	$3,80 \pm 0,47$	$0,46 \pm 0,06$	$0,31 \pm 0,04$
0,2	$5,67 \pm 0,56$	$0,84 \pm 0,09$	$0,56 \pm 0,06$
0,4	$6,36 \pm 0,61$	$1,51 \pm 0,14$	$1,08 \pm 0,13$
0,6	$6,42 \pm 0,62$	$2,20 \pm 0,26$	$1,52 \pm 0,11$
0,8	$6,58 \pm 0,51$	$2,57 \pm 0,19$	$1,77 \pm 0,16$
1,0	$6,44 \pm 0,50$	$2,90 \pm 0,23$	$2,11 \pm 0,27$

c_0 : kontroll

c_1 : $4,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$ paraquat

c_2 : $2,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$ paraquat

27. táblázat. Paraquat hatása a reakciósebességre agyhomogenizátum esetén.

$c_{\text{ATCh}} \cdot 10^3$ $[\text{mol/dm}^3]$	$v \cdot 10^3$ $[\mu\text{mol ATCh/mg fehérje} \cdot \text{s}]$		
	c_0	c_1	c_2
0,1	$2,46 \pm 0,37$	$0,59 \pm 0,07$	$0,38 \pm 0,05$
0,2	$3,31 \pm 0,51$	$1,10 \pm 0,17$	$0,72 \pm 0,07$
0,4	$4,12 \pm 0,38$	$1,94 \pm 0,15$	$1,20 \pm 0,17$
0,6	$4,26 \pm 0,40$	$2,46 \pm 0,27$	$1,66 \pm 0,18$
0,8	$4,28 \pm 0,39$	$2,79 \pm 0,23$	$2,05 \pm 0,16$
1,0	$4,39 \pm 0,45$	$3,03 \pm 0,25$	$2,33 \pm 0,22$

c_0 : kontroll

c_1 : $4,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$ paraquat

c_2 : $2,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$ paraquat

28. táblázat. Paraquat hatása a reakciósebességre szivhomogenizátum esetén.

$c_{\text{ATCh}} \cdot 10^3$ $\left[\text{mol/dm}^3 \right]$	$v \cdot 10^3$ $\left[\mu\text{mol ATCh/mg fehérje} \cdot \text{s} \right]$		
	c_0	c_1	c_2
0,1	$0,79 \pm 0,09$	$0,35 \pm 0,04$	$0,24 \pm 0,03$
0,2	$1,12 \pm 0,10$	$0,58 \pm 0,06$	$0,41 \pm 0,05$
0,4	$1,43 \pm 0,16$	$0,87 \pm 0,07$	$0,70 \pm 0,06$
0,6	$1,51 \pm 0,13$	$1,05 \pm 0,09$	$0,86 \pm 0,07$
0,8	$1,59 \pm 0,12$	$1,13 \pm 0,10$	$0,93 \pm 0,08$
1,0	$1,55 \pm 0,18$	$1,19 \pm 0,18$	$0,96 \pm 0,12$
c_0 : kontroll c_1 : $4,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$ paraquat c_2 : $2,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$ paraquat			

29. táblázat. Paraquat hatása a reakciósebességre izomhomogenizátum esetén.

	C_{MET} [mg/dm ³]	aktivitás a kontroll %-ában
szérum	1,0	88,10 $\pm$ 9,21
	5,0	83,93 $\pm$ 8,57
	10,0	82,94 $\pm$ 9,83
	30,0	75,13 $\pm$ 8,24
	50,0	67,26 $\pm$ 5,92
	100,0	59,10 $\pm$ 6,24
agy	1,0	95,66 $\pm$ 8,73
	5,0	93,25 $\pm$ 9,12
	30,0	89,31 $\pm$ 8,57
	50,0	85,23 $\pm$ 8,72
	100,0	82,14 $\pm$ 8,11

30. táblázat. A metidation in vitro hatása a ChE aktivitására.

	C_{MET} [mg/dm ³]	aktivitás a kontroll %-ában
szív	5,0	99,13 ± 9,89
	10,0	94,21 ± 9,72
	50,0	80,74 ± 7,75
	75,0	75,43 ± 7,16
	100,0	73,15 ± 6,94
izom	5,0	91,28 ± 9,03
	10,0	87,53 ± 8,14
	30,0	82,71 ± 8,57
	50,0	77,15 ± 7,08
	75,0	73,18 ± 7,62
	100,0	70,82 ± 7,15

31. táblázat. A metidation in vitro hatása a ChE aktivitására.

	aktivitás a kontroll %-ában	
	1,5 mg/dm ³ metidation	5,0 mg/dm ³ metidation
szérum	47,62 ± 5,13	16,24 ± 1,85
agy	18,25 ± 2,07	8,51 ± 0,98
szív	19,31 ± 2,13	10,22 ± 1,34
izom	43,26 ± 4,57	37,18 ± 3,90

32. táblázat. A metidation in vivo hatása a ChE aktivitására.

kezelési idő [óra]	aktivitás a kontroll %-ában	
	1,5 mg/dm ³ metidation	5,0 mg/dm ³ metidation
8	-	80,23 ± 6,41
24	52,36 ± 4,49	22,19 ± 1,92
48	47,67 ± 3,85	16,90 ± 2,41

33. táblázat. A metidation hatása a szérum ChE aktivitására különböző kezelési idők esetén.

$c_{\text{ATCh}} \cdot 10^3$ $[\text{mol/dm}^3]$	$v \cdot 10^5$ $[\mu\text{mol ATCh/mg fehérje} \cdot \text{s}]$		
	c_0	c_1	c_2
0,2	$3,45 \pm 0,40$	$2,49 \pm 0,21$	$1,52 \pm 0,14$
0,4	$4,00 \pm 0,47$	$3,41 \pm 0,32$	$2,32 \pm 0,26$
0,6	$4,17 \pm 0,41$	$3,50 \pm 0,38$	$2,61 \pm 0,27$
0,8	$4,27 \pm 0,48$	$3,83 \pm 0,41$	$2,78 \pm 0,30$
1,0	$4,28 \pm 0,45$	$3,79 \pm 0,36$	$2,93 \pm 0,31$

c_0 : kontroll
c_1 : $4,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$ metidation
c_2 : $2,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$ metidation

34. táblázat. Metidation hatása a reakciósebességre szérum esetén.

$c_{\text{ATCh}} \cdot 10^3$ $[\text{mol/dm}^3]$	$v \cdot 10^3$ $[\mu\text{mol ATCh/mg fehérje} \cdot \text{s}]$		
	c_0	c_1	c_2
0,2	$5,70 \pm 0,59$	$4,49 \pm 0,55$	$2,54 \pm 0,26$
0,4	$7,85 \pm 0,81$	$5,74 \pm 0,60$	$3,99 \pm 0,44$
0,6	$7,97 \pm 0,75$	$7,06 \pm 0,68$	$4,47 \pm 0,46$
0,8	$8,33 \pm 0,87$	$7,22 \pm 0,71$	$4,84 \pm 0,47$
1,0	$8,36 \pm 0,89$	$7,46 \pm 0,75$	$5,16 \pm 0,50$
c_0 : kontroll c_1 : $4,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$ metidation c_2 : $2,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$ metidation			

35. táblázat. Metidation hatása a reakciósebességre agyhomo-
genizátum esetén.

$c_{\text{ATCh}} \cdot 10^3$ $[\text{mol/dm}^3]$	$v \cdot 10^3$ $[\mu\text{mol ATCh/mg fehérje} \cdot \text{s}]$		
	c_0	c_1	c_2
0,2	$1,50 \pm 0,13$	$1,30 \pm 0,12$	$0,95 \pm 0,10$
0,4	$1,76 \pm 0,17$	$1,67 \pm 0,17$	$1,37 \pm 0,13$
0,6	$1,91 \pm 0,20$	$1,85 \pm 0,18$	$1,54 \pm 0,14$
0,8	$2,02 \pm 0,19$	$1,96 \pm 0,20$	$1,67 \pm 0,17$
1,0	$2,22 \pm 0,21$	$2,08 \pm 0,19$	$1,72 \pm 0,16$
c_0 : kontroll c_1 : $4,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$ metidation c_2 : $2,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$ metidation			

36. táblázat. Metidation hatása a reakciósebességre szívho-
mogenizátum esetén.

$c_{\text{ATCh}} \cdot 10^3$ $[\text{mol/dm}^3]$	$v \cdot 10^3$ $[\mu\text{mol ATCh/mg fehérje} \cdot \text{s}]$		
	c_0	c_1	c_2
0,2	$0,90 \pm 0,09$	$0,75 \pm 0,07$	$0,48 \pm 0,05$
0,4	$1,16 \pm 0,10$	$0,99 \pm 0,10$	$0,68 \pm 0,06$
0,6	$1,20 \pm 0,13$	$1,06 \pm 0,11$	$0,82 \pm 0,07$
0,8	$1,32 \pm 0,13$	$1,14 \pm 0,10$	$0,87 \pm 0,08$
1,0	$1,35 \pm 0,14$	$1,17 \pm 0,12$	$0,91 \pm 0,08$
c_0 : kontroll c_1 : $4,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$ metidation c_2 : $2,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$ metidation			

37. táblázat. Metidation hatása a reakciósebességre izomho-
mogenizátum esetén.

Köszönetemet fejezem ki dr. Nemcsók János adjunktus Úrnak a munkám elvégzéséhez nyújtott segítségéért, hasznos tanácsaiért.

Veszprém, 1983.