

Készült: a József Attila Tudományegyetem
Biokémiai Tanszékén

STRESSZHATÁS ÉS SZÖVETKÁROSODÁS KIMUTATÁSA HALAK
VÉRCUKORSZINTJÉNEK ÉS TEJSAV-DEHIDROGENÁZ ENZIME-
INEK MEGHATÁROZÁSÁVAL

DOKTORI DISSZERTÁCIÓ

Készítette: Asztalos Béla

Szeged, 1983.



Köszönet nyilvánítás

Köszönetet mondok Dr.Nemcsók Jánosnak mint témavezetőnek amiért lehetővé tette, és hasznos tanácsaival segített elvégezni munkámat.

Köszönetet mondok Prof.Dr.Boross Lászlónak, amiért a vezetése alatt álló tanszéken biztosította számomra a munka lehetőségét.

Köszönetet mondok Dr.Szajáni Bélának a tanácsaiért, amelyekkel a munkám során ellátott.

Köszönetet mondok a Biokémiai Tanszék dolgozóinak mivel segítségükkel hozzájárultak munkám sikeres elvégzéséhez.



R Ö V I D Í T É S E K

ATP	Adenozin-trifoszfát
G-6-P	Glukóz-6-foszfát
G-6-P DH	Glukóz-6-foszfát dehidrogenáz
GSH	Glutation
h	óra (időtartam)
K_m	Michelis-állandó
LDH	Tejsav dehidrogenáz
LD ₅₀	Letális dózis 50%-a
M	Mól
mM	mili-mól
NAD ⁺	Nikotinamid dinukleotid ox.forma
NADP ⁺	Nikotinamid dinukleotid foszfát ox.forma
NBT	Nitro tetrazólium kék
PMS	Fenazin metaszulfát
PQ	Paraquat
ppm	1 ppm = 1 mg/l
TL _m	A tolerancia határ félértéke
V _{max}	Az enzimreakció maximális sebessége.

TARTALOMJEGYZÉK

BEVEZETÉS	1. oldal
A VIZSGÁLT KEMIKÁLIÁK ÉS A SZERVEZETRE KIFEJTETT HATÁSUK ISMERTETÉSE	3. "
Rézszulfát	3. "
Paraquat	6. "
Methidathion	14. "
Vércukor	17. "
Tejsav-dehidrogenáz (LDH) enzim	19. "
ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	23. "
A halak szállítása és tartása	23. "
A halak kezelése	23. "
A szérum előkészítése	24. "
A vércukorszint mérés	26. "
LDH aktivitás mérése	27. "
Az LDH enzim pH függésének mérése	29. "
Az LDH szorvenkénti megoszlásának mérése	29. "
Az LDH izoenzimok olválasztása poli- acrilamid gélelektroforézissel	29. "
Tejsav mérés	34. "
Piruvát mérés	35. "
Az LDH tisztítása	35. "
RÖVIDTÁVÚ KEZELÉSEK EREDMÉNYEI	39. "
Cinkklorid ($ZnCl_2$) hatása a vizsgált fajokra	39. "

Hirtelen hőmérsékletváltozás hatása a vizsgált halfajokra	40. oldal
Rézsulfát (CuSO_4) hatása a vizsgált fajokra	41. "
Paraquat hatása a vizsgált fajokra	43. "
A methidathion kezelés hatása a ponty enzimaktivitásaira és a vércukorszintjére	44. "
A HOSSZÚTÁVÚ KEZELÉSEK EREDMÉNYEI	46. "
Paraquat hatása ponty vércukorszintjére	46. "
Paraquat hatása ponty LDH enzim aktivi- tására	47. "
CuSO_4 kezelés hatása a ponty vércukor- szintjére	48. "
CuSO_4 kezelés hatása a ponty LDH aktivitására	49. "
A különböző koncentrációjú methidathion hatásai a vizsgált paraméterekre	50. "
Methidathion kezelés hatása a ponty vércukorszintjére.	52. "
Methidathion kezelés hatása a ponty LDH enzimaktivitására	53.
Az LDH szervenkénti megoszlása két időpontban	54. "
LDH izoenzimek elválasztása lap-gélelektro- forézissel	54. "
LDH tisztítása ponty szérumból	59. "

LDH enzim pH függése	61. oldal
LDH enzim aktivitás gátlása piruváttal és tejsavval in vitro	63. "
CuSO ₄ PQ és a Methidathion gátló hatása az LDH enzim-aktivitásra in vitro	64. "
Az eredmények értékelése	65. "
Irodalomjegyzék	72. "

LDH enzim pH függése	61. oldal
LDH enzim aktivitás gátlása, piruváttal és tejsavval in vitro	63. "
CuSO_4 PQ és a Methidathios gátló hatása az LDH enzim-aktivitásra in vitro	64. "
Az eredmények értékelése	65. "
Irodalomjegyzék	72. "

B E V E Z E T É S

Élővizeink tisztaságának és a bennük kialakult biológiai egyensúlynak a megőrzése korunk egyik fő feladata. A mezőgazdaságban felhasznált kémiai ágensek száma és mennyisége egyre nő. Ezekről a vegyületekről már korábban kimutatták, hogy esőzés révén a vízbe kerülve káros hatást fejtenek ki az ottéélő szervezetekre, így a halakra is (Molnár-Szakolcai, 1980). Jelentős mértékben károsítják a létfontosságú szerveiket: az idegrendszert, májat, vesét, kopolyút és az emésztési folyamatokat is (Sauerbier és Meyer, 1978; Warwood és Beamish, 1978; Labat és mtsai, 1977). Egyes peszticidek már igen kis koncentrációban a halak pusztulását okozhatják (Schreck, 1978). Ezenkívül már embrionális állapotban is károsítják a halakat, aminek eredményeképpen életképtelen egyedek kelnek ki a petéből (Weis 1977). A vízszennyeződés és a vízi környezet hirtelen megváltozása stresszhatást vált ki a halakban (ellgard és mtsai, 1978; Freyer, 1975; Albrecht, 1977). Ilyenkor a halak, "közérzete" romlik, rosszul tápálkoznak, és mindezek következtében fogékonyabbá válnak a fertőző betegségekre (Wedemeyer, 1970; Wedemeyer és Wood, 1974). A humán diagnosztikából átvett módszer főként tengeri halak esetében már jól bevált eljárás a máj-, vese- és izomszövet-károsodás kimutatására a vérszérum transzamináz és tejsav dehidrogenáz

enzimeinek meghatározásával. E módszer alkalmasnak mutatkozott a tengeri halakat ért környezet-szenyeződés okozta szövetkárosodások kimutatására is, (Kristoffersson és mtsai 1974). Ezek az enzimek normál állapotban a sejthártyán belül a citoplazmában és a mitokondriumokban találhatók. Abban az esetben, ha a sejtek károsodnak és szétesnek (sejtnekrózis), ezek az enzimek nagy mennyiségben a vérbe kerülnek. Ez a vérszérum-enzimaktivitás hirtelen növekedését okozza. A környezetszenyeződés a szövetkárosodáson kívül stresszhatást is okoz a halakban, melynek egyik tünete a vércukorszintemelkedés (Silbergerd E.K., 1972).

Az utóbbi másfél évtizedben egyre gyakoribbá vált hazánkban a folyó és állóvizekben a tömeges halpusztulás. Ennek pontos okait modern biokémiai módszerekkel ezidáig hazánkban nem vizsgálták. A vizsgálatok csupán arra terjedtek ki, hogy egyes növényvédőszer LD₅₀, TL_m értékeit adják meg. A tanszéken olyan biokémiai módszerek beállításán dolgozunk, amelyek bevezetésével vizsgálni lehet a halak olyan biokémiai és élettani folyamatait, amelyek a vízi környezet kedvezőtlen irányú változását még a krónikus halpusztulások megkezdődése előtt jelzik. Különböző koncentrációjú paraquat (PQ), réz (CuSO₄), és cink (ZnCl₂), és a vízhőmérséklet hirtelen válto-

zásának hatását vizsgáltuk három eltérő táplálkozású halfajon (ponty: *Cyprinus carpio*, busa: *Hypotlalmicus thys mollitrix*, harcsa: *Silurus glanis*), valamint a metidathiont pontyon. A vizsgált anyagok károsító hatása a halak vérszérumának transzamináz, tejsav-dehidrogenáz, acetilkolineszteráz és proteolitikus emésztőenzim aktivitásának, valamint a vércukorszint meghatározásával történt.

A VIZSGÁLT KEMIKÁLIÁK ÉS A SZERVEZETRE KIFEJTETT HATÁSUK ISMERTETÉSE

Réz-szulfát

A különböző fémkationok toxicitása a periódusos rendszerben elfoglalt helyükkel függ össze. Az elektro-negativitásuk növekedésével csökken a toxikus hatásuk (Cremlyn 1978).

A gombaölő képesség a fémek kelátképző képességével van kapcsolatban. A gombákra kifejtett toxicitás fokát az ionizálatlan fémkomplexeknek a sejtfalhoz kapcsolódó kovalens vagy koordinációs kötéseinek erőssége szabja meg (Lukens, 1971).

A réz toxikus hatása leginkább a vízi életmódot folytató állatokat fenyegeti Singleton és Guthrie (1977) 2 ppm réz-szulfáttal kezelt víz baktériumflóráját hasonlították kontrollhoz, és megállapították, hogy a réz csökkenti a baktériumflóra stabilitását.

Nehézfémek bizonyos esetekben erősen feldúsulnak a vízben. Egyre gyakrabban kapunk hírt nagyarányú nehézfém-szennyeződésről. Gergely és Cielszky 1977-ben leírták, hogy 1940-1970 között az USA-ban majd százszorosára emelkedett a Hg szint a halakban. Magyarországon 1977-ben egy tisztavízű patakban fogott halakban (Szalajka patak) a Hg-szint 0,1 mg/kg, míg a Balatonban 0,4 mg/kg, a Dunában 0,6 mg/kg (Molnár-Szakolcai, 1980).

Yamamoto és mtsai (1977) két hétig 0,1 ppm réz-szulfát tartalmú vízben tartott ponty szerveinek réztartalmát kontrollhoz hasonlítva azt tapasztalták, hogy a hepatopankreász, a kopolyúk, a bél és a vese réztartalma 2-6 szorosára növekedett. A halak egyes szerveiben a külső koncentráció sokszorosa is lehet (Molnár-Szakolcai, 1980); Greig és mtsai 1977, sok halfajból 250 ppm rézet tudtak mérni bizonyos esetekben akár 5000-szeresére is akkumulálódhat Reichenbach-Klinke 1972, Nemcsók J., L. Boross (1980) 1, 10, 100 ppm CuSO_4 -tal kezelt halakat két órán keresztül, és az egyes szervekből radioaktív jelzett rézet határoztak meg. Az akkumuláció - különösen nyári vízhőmérséklet (20 C) mellett - több tízszeres értéket mutatott.

A réz-szulfát nagy mennyiségben felhasznált fungicid

hatású permetezőszer,	Rézgálic 96%	CuSO_4
	Dordói 16 45%	CuSO_4

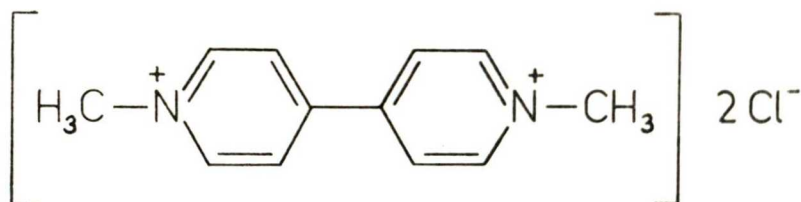
A réz és a cink szükséges a szervezet számára bizonyos metalloproteinek működéséhez, de mennyiségük nem mutat egyenes arányt a testsúllyal (Vinikous és Goldstein 1980). Rézet a legnagyobb mennyiségben a májból tudtak kimutatni, és megfigyelték, hogy mennyisége szezonálisan változott. Tavasszal és ősszel nagyobb volt, mint nyáron (Braek W.L.F. 1979). A réz LD_{50} értéke patkányra 300 mg/kg. Vízi szervezetre az LD_{50} értéke függ a víz minőségétől is. A víz pH-értékének emelkedése növeli a réz toxikus hatását. (Chakoumakos C., Rossemario C. Russia és R.V.Thumston 1973). Kemény vízben kisebb a réz hatása, mint lágyban. A réz ott könnyebben alkot komplexet, és ebben a formában nem toxikus (Pagenkopf és Rosemarie 1974). Szubletalis koncentrációjú rézzel kezelt halak LD_{50} értéke nőtt cinkkel szemben. A hatás fordítva még erősebb (Dixon és Sprague 1981). Réz kezelés hatására (10^{-4} M $CuSO_4$) a vesecsatornákban csökken a Na és Cl ionok viasszaszívódása, aminek következtében a testfolyadék hipotóniás lesz (Spronk és mtsai 1971). A cink-klorid ($ZnCl_2$) csávázószer hatóanyaga. Toxicitása kisebb mint a rézé. Halakra a réz TL_m értéke 0,143 mg/l víz, cink esetén 2,5 mg/l víz.



Cinket nemcsak májból, hanem izomból is nagy mennyiségben mutattak ki. A májban kétféle formában fordul elő: nagy része egy nagy molekulásúlyú fehérjefrakcióhoz kötődik, kisebbik része egy kis molekulásúlyú fehérjefrakcióhoz (Sugawara Naoki 1977).

Paraquat

A quaterner ammónium vegyületek toxicitását régen felismerték. Az ICI 1958-ban dobta piacra a herbicidek máig is legjelentősebb képviselőjét a paraquatot (PQ).



PARAQUAT (PQ)

(1,1'- dimetil - 4,4' - dipiridilium - dichlorid)

A növényekben vízdoldott állapotban oxigénhiány esetén stabil pozitív töltésű PQ ion formában van jelen. Oxigén jelenlétében gyökionokká redukálódnak, melyek károsítják a kloroplasztisz membránját.

Sötétben, borús időben hatása lassúbb, így felszívódik a növényben és a mélyebb talajrétegekig is eljut. A talajban nagy a perzisztenciája, stabilan a talajszemcsékhez kötődik. Felszíni vizeinkbe nem innen jut elsősorban, hanem a vízelvezető árkokból és a rizsföldekről, mivel ezeket is paraquattal kezelik. Újabban az állóvizekben is alkalmazzák hínárirtásra. A növényekre két úton hat:

1. mint erős elektronakceptor a fotoszintézist gátolja
2. a növényekbe jutva redukálódik, majd oxigén hatására reoxidálódik, miközben H_2O_2 keletkezik; az erős membránkárosító hatásával roncsolja a plasztiszokat.

Állatizervezetbe kerülve a plazma proteinjaihoz gyengén kötődik, a vérben szabad formában kering, gyorsan eljut minden szövetféleséghez, ahonnan a fel szívódott dózis nagy része 48 órán belül kiürül (Conning és mtsai, 1969). 20-30%-a azonban a szövetekben - főleg a tüdőben - marad, és csak 2-3 hét múlva ürül ki (Fisher és mtsai 1971; Rose és mtsai 1977). A tüdőben aktívan koncentrálnak az alveolusok epitheliális sejtjeiben egy energiafüggő mechanizmus révén, amelyet bizonyos anyagokkal gátolni lehet. Hoffman és Eastin (1982) tőkésrécén végzett vizsgálatokkal megállapította, hogy a mezőgazdasági fel-

használásra ajánlott koncentráció felénél már embriotoxikus és terratogén hatású.

Toxicitás emlősökre:

1. Intracelluláris NADPH koncentrációját csökkenti, mely gátolja zsírsavak és az összetett lipid-ek szintézisét (az utóbbiból épül fel a tüdő alveoláris falának védőrétege) (Fisher és mtsai 1971).
2. A szabadgyökök által okozott membrán-károsító hatás.
3. A mitokondriális légzőláncot kapcsolja szét; így csökken az ATP szintézis (Masana O., T.Hasegawa, 1978). A bipyridilium vegyületek, amik a légzőláncot a legelején kapcsolják szét a NAD és a FMN között, amitokondriális membránokat nem károsítják.
4. A lipid peroxidációra kifejtett hatás: Gátolja a lipid peroxidációt, de ez csak mellékhatás a PQ toxicitásnak kialakulásában (Steffen és Netter 1979; Steffen és mtsai 1980). A tüdőben a legnagyobb a hatás, de máj, vese, agyszövet esetén is kimutatható. Fajonként változik a hatás. Patkánymájban csökkenti a lipid peroxidációt, egértüdőben - májban, juhájban növeli. Nincs korreláció az in vivo és az in vitro kezelések eredménye között.

In vitro nagyon kicsi a hatás (Douglas, Kornburst és Mavis 1980). Az elbontmondást Matkovics és mtsai (1980) próbálják feloldani. Egerekben kis dózisú paraquatkezelést követően azt tapasztalták, hogy a dózis emelkedésével (120 mg/kg 300 mg/kg PQ) a lipidperoxidáció a kontroll szintre, sőt alá csökkent. Elképzelésük szerint lehetséges, hogy a PQ az alacsonyabb koncentrációban aerob elektrondonorként hat, elősegítve az O_2^- gyök képződését, míg a koncentráció növelésével elektronakceptorra változik, csökkentve a lipid peroxidációt.

5. O_2^- anion termelése következtében a lizoszómák is károsodnak, a lizoszóma enzimekészlete a citoplazmát támadja (Block 1979). Az "A" és az "E" vitamin, valamint a kortizon stabilizálja a lizoszómembránt. A O_2^- anionok a vörösvérsejtmembránt is támadják, hemolízist idéznek elő (Kobayashi és mtsai 1979).

6. Rose és mtsai (1976) megfigyelték, hogy a PQ, diquat stimulálja glukóz elbontását. A glukóz egyes és hatos szénatomját jelezték ^{14}C módszerrel, és a tüdőből mutatták ki a jelzett CO_2 -t. Azt találták, hogy a pentózfoszfát-ciklust stimulálja, és 10^{-5} M-os

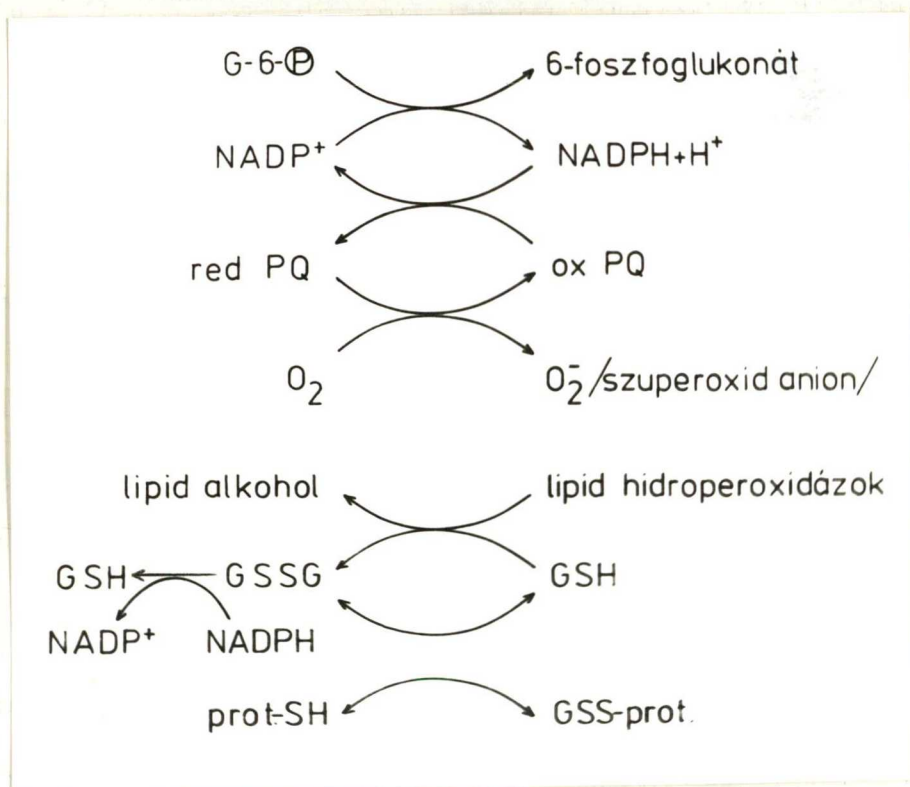
koncentrációban a legerősebb a hatás. A paraquattal kezelt állatok tüdejében szövethárosodást is kimutattak. Montgomery és mtsai (1979) eredményei ezt alátámasztják. A biokémiai méréseket elektromikroszkópos felvételekkel igazolták. Paraquatkezelését követően a tüdő légzőhámjának sérülését mutatták ki. Diquat hatására is gyorsult a pentozfoszfát ciklus működése, de szövethárosodás nem volt kimutatható. Ebből arra lehet következtetni, hogy a glukóz oxidálás serkentése nem jár együtt szövethárosító hatással. A kezelések in vitro is hasonló eredményt adtak. Manzo és mtsai (1979) megfigyelték, hogy bár a tüdőhám az elsődleges támadáspont, veseelégtelenséget, szívizomkróvizist, fokozott érzékenységet, illetve a proszttaglandin és a vércukorszint megváltozását is okozza. Rojik és mtsai (1982) halaknál máj, vese kopoltyúhám sérülést mutatták ki.

A paraquat detoxikációja 3 mechanizmust foglal magába:

1. Az O_2^- gyök lebontását szuperoxid-dizmutáz és kataláz tevékenység révén.
2. A paraquat indukálta lipid-peroxidáció szabadgyökös láncreakcióinak terminációját az "E" vitamin antioxidáns hatása által.

3. A GSH-peroxidáz rendszer enzimeinek (GSH peroxidáz, GSH reduktáz és G6PDH) stimulációját.

A paraquat mérgeztelenítése során a NADPH-ra és GSH-ra van szükség. A paraquat redukálása a májban megy végbe (Keeling P.L., és mtsai(1982) szerint a következő módon.



Az elsődlegesen glikolitikus anyagcsere termékeinek felhasználásával működő vörösvérsejtek számára a G-6-PDH és 6-P-glukoronát DH működésének eredményeként $\text{NADPH} + \text{H}^+$ keletkezik, ami a vörösvérsejtekben nem a bioszintézis hidrogenálási reakcióira használdik fel, hanem különleges redox egyensúlyának fenntartására. Az eritrocitákban ugyanis nagy az oxigén koncentráció, ami a szulfhidril tartalmú fehérjéket oxidálhatja. Ha kellő mennyiségű NADPH keletkezik, redukáló anyag jelenlétében az oxidáció nem következik be, mivel a PQ elhasználja a NADPH-t és a keletkezett O_2^- anionok hatására bekövetkeznek a fehérjék káros oxidációi.

A paraquat a bőrön keresztül is felszívódik, bőr és nyálkahártya gyulladást okoz. Halak esetében megszűnik a bőr védőfehérjéinek kiválasztása, ezáltal fokozottabban hajlamossá válnak fertőző betegségekre (Davis 1982).

A paraquat felhasználását és a hatóanyag talajba kerülését Magyarországon a következő táblázat szemlélteti.

alkalmazási terület	engedélyezett mennyiség hektáronként	mg hatóanyag/m ²
Vetés előtt gyomirtásra	3,5 - 5,2 l	87,5 - 130
Gyümölcsös kor-donművelésű szőlő	4,3 l	107,5
Sík legelők felújítása	7,8 - 12 l	195 - 300

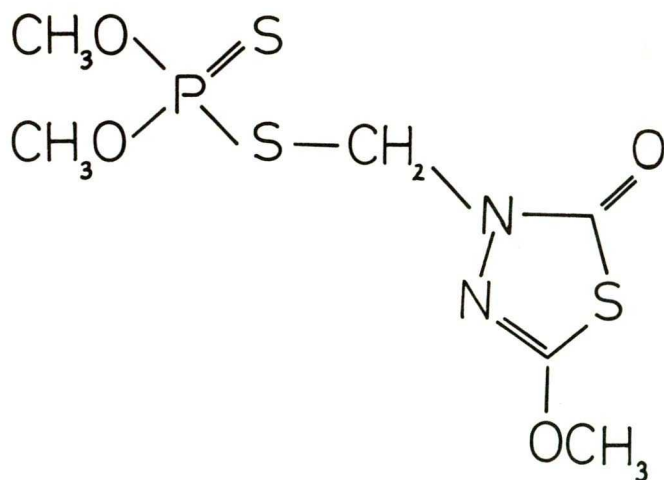
1. táblázat: Gramoxon-permetezésnél ajánlott növényvédőszer mennyiségek.

(Engedélyezett növényvédőszerek 1982)

Methidathion

Szerves foszforvegyületek hatásmechanizmusát a melegvérűeknél jól ismerjük, a rovaroknál és halaknál azonban még bizonytalanok a kutatók a hatóanyagok biológiai hatását illetően, bár 1950 óta széleskörben elterjedtek a növényvédelemben. Melegvérűeknél Wing K.D., és mtsai (1983) szerint a szerves foszforvegyületek úgy fejtik ki hatásukat, hogy megbénítják az acetil-kolinesteráz enzim működését. Az acetil-kolinesterázt kompetitíve gátolják, úgy hogy annak anionos vagy észterkötő helyett elfoglalják.

Az általunk vizsgált metidationnak kevés irodalma van éppen ezért esett rá a választás.

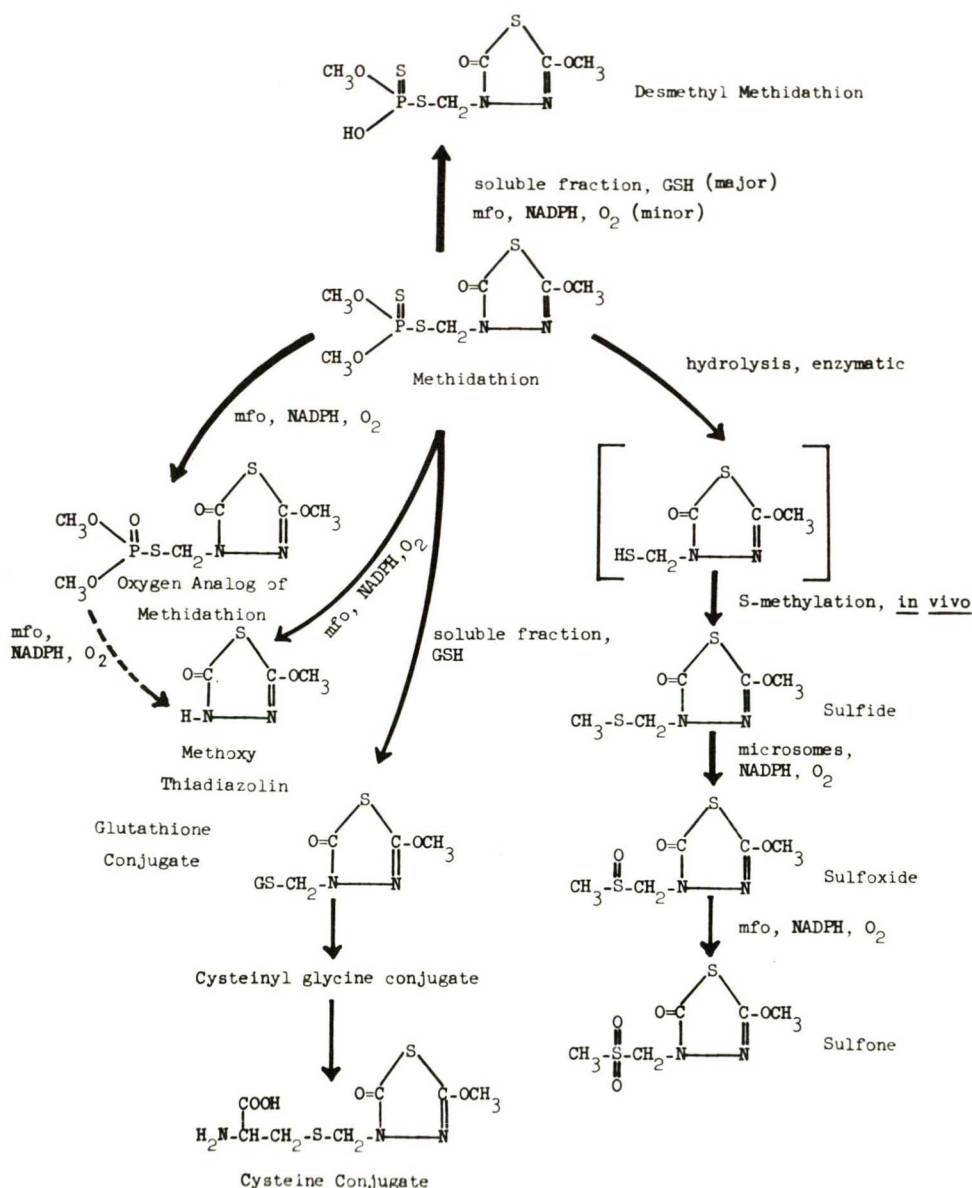


METHIDATHION

/O,O-DIMETIL-S/2-METOXI-1,3,4-TIA-DIA-
ZOL-5/4H/-ONIL-4-METIL 1/DITIOFOSZFÁT/



Chopade H.M., és W.C.Dauterman(1981) vizsgálta a metidation metabolizmusát. A metidation bomlása során vízben és kloroformban oldható termékek keletkeznek. Az átalakításokban glutathion S-transzferáz vagy kevert funkciójú monooxygenázok vesznek részt. A lebontáshoz szükség van GSH-ra és NADPH-ra, a lebomlás sebessége egyenesen arányos ezek mennyiségével. Ezen szubsztrátok nélkül a mikroszomáknak nincs metabolitikus aktivitásuk.



(Glatt H. és Foesch(1977) megfigyelték, hogy a metabolizmus termékei a mikroszomában a különböző szubsztrátokkal konjugátumokat alkotnak. Patkány és egér májban eltérő sebességgel megy a degradáció, ennek valószínű oka az eltérő szubszt-rát koncentráció.

Ajánlások az Ultracid 40 WP nagyüzemi felhasználáshoz
(Engedélyezett növényvédőszer, 1982)

Felhasználási hely	Ajánlott szerkonc. a permetlében	Ajánlott permetlé menny. 1000 m ²	1 m ² -re jutó ható- anyag menny. az ajánlás szerint
Almás	750-1000mg/l	2000 l	60-80 mg
Őszibarackos	750-1000 mg/l	1400 l	42-56 mg
Borsóvetőmag termesztés	2000 mg/l	—	—
Kukoricás	1500-2000 mg/l	1000 l	60-80 mg

Vércukor

Stresszhatás kimutatása vércukorszint mérésével humámdiagnosztikában rég elfogadott eljárás. Silbergeld (1972) halakra is alkalmazta ezt az eljárást, és érzékeny módszernek bizonyult. Dildrinneel kezelt halak vércukorszintje a kezelést követő ötödik napon háromszáz százalékkal emelkedett, majd a huszadik nap tért vissza nyugalmi szintre. Kraybill (1969) szerves-klórvegyületekkel kezelt emlősökben hasonló eredményt kapott. Az okot vizsgálva Hort és mtsai (1971) arra az eredményre jutott, hogy a vércukorszint emelkedését a vese glukokortikoid hormonjának a stimulációja okozta. Dando (1969) kezelési stresszt mért halakban, úgy hogy azokat kiemelte a vízből, meghatározott ideig (1-5 perc) levegőn tartotta, vagy injekcióval megszúrta a halakat. Eredményül azt kapta, hogy a kezelést követő fél órán belül jelentősen megemelkedett a vércukorszint, a tizedik órában érte el a maximumot, és egy nap alatt csengett le. Heath (1965) megfigyelte, hogy hypoxia és anoxia hatására is megemelkedik a vércukorszint, miközben az izomban nagyarányú és tartós glukogénszint-csökkenés mutatható ki. A májban kezdetben csökken a glukózsztint, de rövid időn belül a normál szint fölé emelkedik.

Gerincesek vérében és testnedveiben előforduló gyakorlatilag egyetlen szénhidrát a glukóz, ez a leggyorsabban felhasználható tápanyag. A vér-glukóz szintjét, illetve a májban és az izomban glukogén formában történő raktározódását a szervezet szabályozza. A máj, az izomszövet, glukóz anyagcseréjét szabályozó hormonok, az inzulin és az adrenalin. Közvetett hatása van szomatotrop hormonnak a glukokortikoidnak és a tiroxinnek. Murat (1967) a α amiláznak is szabályozó szerepet tulajdonított. Éhezés hatására a hal sejteinek lizoszómáiból szabadul ki, és mobilizálja glukózt. A vércukorszint bizonyos mérvű szabályozására maga a máj is képes. A vércukorszint csökkenésére a máj fokozott glukogenolizissal és glukózelválasztással válaszol, míg a vércukorszint emelkedése a glukózleadást csökkenti. A máj szabályozó működését a Langerhans szigetek és a mellékvesevelő működése segíti. A szigetapparat a vércukorszint emelkedésére fokozott inzulinszekrécióval válaszol, ami részben a perifériás glukóz felhasználás, részben a májbeli glukogénszintézis fokozása révén helyreállítja a vércukorszintet. A hipoglikémia ezzel szemben reflexes úton a mellékvese-velőállomány adrenalin termelését ser-

kenti, s ez a máj glikogénlebontását növeli a vércukorszintet a normális értékre emeli. A központi idegrendszer szabályozó mechanizmusa a hipotalamuszon keresztül valósul meg (Ádám és Fehér 1975).

Tejsav dehidrogenáz(EDH) enzim

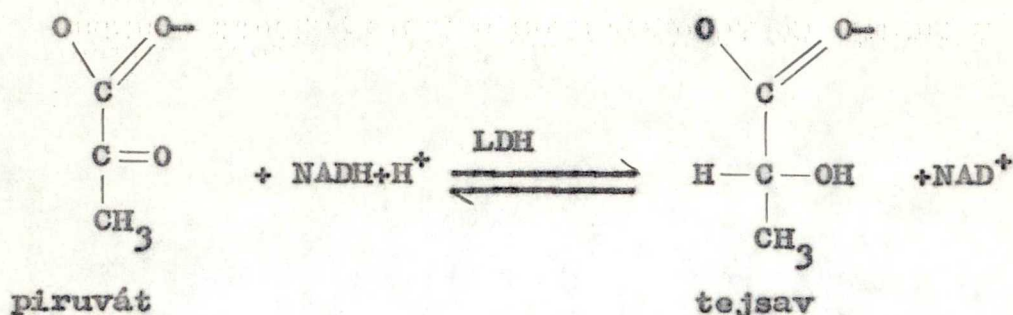
Az LDH sertésből izolálva 140000 dalton molekulasúlyának bizonyult. Ez a cink tartalmú proteid emlősnél két féle alegységből: "M" típusú; ami a vázizomra jellemző és "H" típusú; ami a szívizomra jellemző (Appella és Markert 1961). Halakból izolált LDH azonban izoelektromos elválasztás után több csíkot adott mint az várható volt a kétféle alegység kombinációjából. A kétféle alegység 5 féle kombinációt adhat.

Markert és Faulhaber (1965) kilenc csíkot tudott elkülöníteni keményítő gél-elektroforézissel és így egy "C" típusú alegység létezését tételezték föl. 30 fajban ki is mutatták a jelenlétét. Whitt és Booth (1972) a "C" alegységet vizsgálva kimutatták, hogy csak csontoshalakban fordul elő.

Shaklee és mtsai (1973) csontos halakban elektroforetikus és hisztokémiai módszerekkel vizsgálva a "C" alegységet általában szemből és spermiumból tudták kimutatni, de pontyféléknél a májból is.

Meállapították, hogy a háromféle alegységet három gén határozza meg. A "C" alegységet meghatározó gén nem azon a kromoszómán van amelyen a másik két alegységet meghatározó gén gén. Az LDH enzim csak tetnamer állapotban képes kifejteni hatását.

Az LDH enzim működése:



A laktát dehidrogenzához a NAD nyújtott alakban kapcsolódik, és számos oldallánccal létesít kölcsönhatást. A piruvát szubsztrát (enol-alakban) metilén csoportjával a NAD piridingyűrűjének 4-helyzetéhez kötődik. Az enzim működéséhez essen- ciális a His-195, ami a nikotinamidgyűrű karbonil-oxigénjével képez hidrogénkötést, ha protonált állapotban van (pruvát nincs jelen). Vesell E.S. és mtsai (1966) az egyes izoenzimek előfordulásá- nak gyakoriságát vizsgálták, és arra a következtetés- re jutottak, hogy M_4 típusú izoenzim anaerob élet módot is folytató szervezetekre vagy sejtekre jellemző.

Sejten belül az LDH 65%-a a citoszolban oldva 35%-a pedig különböző strukturális elemekhez kötve található, főleg az endoplazmatikus retikulum terminálisaiban, továbbá az izom szarkoplazmatikus retikulumában (Melnick és Hultim 1981).

Az azonos alegységekből felépülő izoenzim az M_4 a vázizomra a H_4 a szívizomra a C_4 fajtól függően a májra a szemre és a spermiumra jellemző. A köztes formák: $M_x H_y$, ahol x és y nem nagyobb mint három, összegük viszont mindig négy, a többi szövetféleségre jellemző. Fritz és mtsai (1969) az LDH izoenzimok mennyiségi meghatározását végezték el az egyes szervekben. Azt tapasztalták, hogy az egyes formák és mennyiségi megoszlásuk a szövetre jellemző értéket ad. Egy későbbi munkájuk során Fritz és mtsai (1973) az LDH újratermelődésének sebességét írták le. Patkányban az LDH szintézis sebessége: májban 79 p mol/nap/g szövet, szívben 53 p mol/nap/g szövet, izomban 13 p mol/nap/g szövet. Hochachka (1966) valamint Kepes és Whitt (1972) vizsgálták az egyes izoenzimokat pontyféléken. Úgy találták, hogy a májspecifikus C_4 izoenzim, kinetikájában és immunreakciójában

az M_4 izoenzimhez áll közelebb. Tsukuda (1975) különböző hőmérsékleten aklimatizált halak LDH izoenzimein végzett vizsgálat közben azt találta, hogy 18 °C-28 °C-on tartott halakban az M_4 -es forma a legaktívabb. Az aktivitás 18 °C-on nagyobb mint 28 °C-on, ekkor az M_4 -es forma össz.aktivitás 60-70%-át teszi ki.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

A halak szállítása és tartása

Vizsgálatainkhoz ponty; (*Cyprinus carpio*) busa; (*Hypophthalmichthys molitrix*) harosa; (*Silurus glanis*) egy és kétnyaras egyedeit használtuk fel. A halakat a szarvasi haltenyésztési és Kutató Intézetből, és a Tápéi Halgazdaságtól kaptuk. A halakat 200 l-es műanyag tartályban levegőtúlnyomás alatt szállítottuk. A tartályból a halakat akkor raktuk át az akváriumokba amikor azok vízhőmérséklete már meg-egyezett a szállított tartály vízhőmérsékletével. A kezelt akváriumokba három, a kontroll akváriumokba négy halat tettünk. A vízhőmérsékletét a szoba levegőjének szabályozásával állítottuk be, a kísérletnek megfelelő hőmérsékletre ± 1 C. Az akváriumok üvegét a külső ingerek kizárása céljából elszórtítottuk. Az oxigénellátást sűrített levegő beporlasztásával biztosítottuk. A halakat a kísérlet folyamán nem tápláltuk. A kísérlet megkezdése előtt a halakat legalább egy hétig adaptálódni hagytuk az akváriumi körülményekhez.

A halak kezelése

A kezelést az akváriumokban in vivo végeztük el. Az akváriumok 100 l vizet tartalmaznak. A ható-

anyagból törzsoldatot készítettünk és megfelelő koncentrációban oldottuk az akvárium vizében.

Hirtelen hőmérséklet változás hatásának vizsgálatakor meleg vízzel, illetve jéggel állítottuk be a megfelelő hőmérsékletet. A kezelések időtartama rövid távúkezelés esetén 2 óra, hosszú távú kezelés esetén 24 óra és 2 hét között változott.

A szérum előkészítése

A halakat lehetőleg gyorsan és óvatosan vettük ki az akváriumból. Heparinnal átöblített fecskendővel a farokvénából vettünk vért. Egyszerre 5-6 ml vért vettünk. A vért hűtött centrifugacsövekbe tettük és azonnal lecentrifugáltuk: 12000 g értéken öt percig, hidegszobában, így a szérum tiszta hemolizismentes lett. Minden haltól kétszer vettünk vért a kezelést megelőzően az ún. "nullaperces" vért és a kezelés után a kezelés időtartamától függő időben. A kezelés befejeztével a halakból a szerveket is kiszedtük és a felhasználástól függően homogenizáltuk. Az LDH méréshez, és izoenzim elválasztáshoz 53 mM-os pH=7,5 foszfát pufferban homogenizáltuk a szerveket 1:5 arányban. A homogenizálást lengyel gyártmányú elektromos meghajtású potterrel végeztük (max. 200 ford/perc).

A pottercsövet jeges fürdővel hűtöttük. A homogenizátumot hideg centrifugában 12000 g értéken 10 percig centrifugáltuk. A felülúszót használtuk a méréseink során.

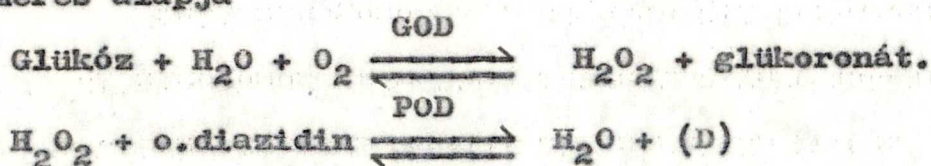
Az anyagot további felhasználás céljából lefagyasztottuk. Irodalmi adatok szerint az LDH enzimaktivitás -4 C-on 7 nap alatt 12%-ot +4 C-on 25%-ot csökken. Mi -18 C-on tartottuk és azt tapasztaltuk, hogy egy hónap múlva is csak 2-3%-ot csökken az enzimaktivitás. Tanishima és Nagahama (1982) vizsgálta az LDH stabilitását és hasonló eredményt kapott. -20 C-on tartott enzim 100 nap alatt 15-20% aktivitáscsökkenést mutatott, ha glicerollal stabilizálta, 1:9 glicerol:szérum arányában, gyakorlatilag nem változott az aktivitás.

A vérvételnél figyelembe vettük az LDH napszakos váltakozását (Sauerbier és Meyer 1978). Ezért a vérvételek azonos időben történtek. A szervek esetében mindig teljes szervet vettünk ki, mert a szívben (Johnson és mtsai 1973) nem homogén az LDH enzim aktivitás megoszlása. Izom esetén is hasonló a helyzet ezért mindig ugyanabból az izomcsoportból vettünk mintát.

Vércukorszint mérés

Glükózoxidázos (GOD), peroxidázos (POD) rendszerrel dolgoztunk, o.diazidin segítségével.

A mérés alapja



(D) = eloxidált o.diazidin hidroklorid, szín intenzitása egyenesen arányos a glükóz mennyiségével.

Reagensek:

- 1./ Puffer enzim: 0,1 M-os foszfát puffer pH = 7,0
+40 ug POD/ml puffer
+250 ug GOD/ml puffer
- 2./ Kromogén: 6,6 mg o.diazidin/ml 0,1 M HCl
- 3./ Glükóz standard: 1,2,5,8,10,20,50 mg glükóz/ml víz
- 4./ Glükóz reagens: 100 térfogat egyes oldat + 1 térfogat kettes oldat.
- 5./ TCA 0,33N
- 6./ Vércsérum

Mérés:

A későbbi kiértékeléshez először a glükóz standardból kalibrációs egyenest készítettem.

A vércsérum fehérjementesítése, 0,9 ml TCA + 0,1 ml vércsérum. Alapos összekeverés után 6000 rpm/perc értéken 5 percig centrifugálni kell.



A méréshez a felülúszót kell használni. A mérés 450 nm-en 0,1 mm-es résállásnál vakkal szemben történik. A méréseket VSU 2 típusú fotométeren végeztük.

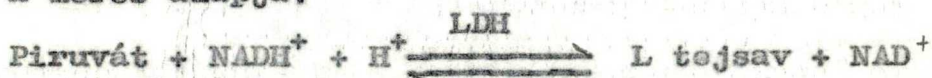
A mérendő oldat összeállítása:

	vak /ml/	színreakció standard /ml/	minta /ml/
bideszt víz	0,2	-	-
standard	-	0,2	-
vérsavó	-	-	0,2
glükóz reagens	5,0	5,0	5,0

Az anyagok összemérése után 35 perc inkubálási idő után mértem. (Az inkubálás szobahőn megy). Mivel a reakció időfüggő a reakciókat 20 mp-enként indítottam, hogy az extinció mérésénél azonos időpontokban mérjek. Minden esetben három párhuzamossal dolgoztam. Az eredményeket mg/100 ml dimenzióban adtam meg.

LDH aktivitás mérése

A mérés alapja:



A piruvátból az LDH hatására tejsav keletkezik, miközben a NADH_2 oxidálódik NAD-ra. A NADH_2 fogyását tudom nyomonkövetni extinció méréssel.

Ez természetesen egy csökkenő extinciót ad.

Reagensek:

- 1./ Foszfát puffer 0,052 M-os pH = 7,5
+ piruvát 0,62 mM-ra
- 2./ NADH₂ 11 mM-os
- 3./ Szérum

A mérendő oldat összeállítása

3 ml az egyes oldatból

+ 0,05 ml a kettős oldatból

+ 0,1 ml szérum

Mérést PYE UNICAM SP 800-as fotométeren végeztem
340 nm-en. Vakot nem használtam.

A reakciót a kuvettában indítottam a szérum hozzáadásával, ezzel egy időben indítottam a rekordert is, a mérést 3 percig végeztem. Olyan hígítást használtam, ahol a ΔE az idővel lineárisan változott. A hígítás mértékével vissza kell szorozni.

$$\frac{\Delta E}{t} \cdot \frac{1000}{d \cdot \epsilon} \cdot \frac{G V}{P V} = U/1$$

ΔE = extinció változás

t = 1 perc

ϵ = moláris extinciókoefficiens (LDH-ra 6,22)

d = kuvetta átmérő

$P V$ = bevitt mennyiség térfogata

$G V$ = reakció elegy térfogata

Az eredményeket szintén három párhuzamosból számoltam.

Az LDH enzim pH függésének mérése

Na foszfát pufferből (0,052 M-os) pH sorozatot készítettem pH = 5,5 - pH = 8,5 között. Durva közelítéssel azt találtam, hogy az enzimaktivitás maximuma pH=7,2- pH=8,2 közé esik minden szervben. Ez a mérés szempontjából jó, mivel a Na foszfát puffer ezen tartományon belül kielégítően fejti ki pufferelő hatását, ezen tartományon kívül a puffer-kapacitás rohamosan csökken. A továbbiakban pH=7,2 - pH=8,2 között 0,1 pH értékenként készítettem puffert. A mérés minden esetben friss preparátumból történt. 10 pontyból szervenként 3 párhuzamossal végeztük el a mérést.

Az LDH szervenkénti megoszlásának mérése

A pH függés alkalmával mért eredményeket felhasználva az optimális pH értéken ponty 4 szervéből határoztam meg az LDH enzim mennyiségét. Szintén 3 párhuzamossal dolgoztunk.

Az LDH izoenzimek elválasztása poliakrilamid gélelektroforézissel

Törzsoldatok és elegyítési arány lugos közegű szűk-pórusú kationos szeparáló gélközeghez.

(Általunk módosított E.Goldberg recepturája).

- | | |
|-----------------------|-----------------------------|
| 1./ 36,6 g TRIS | A TRIS-ből töményebb olda- |
| 0,30 ml TEMED | tot készítünk, hozzáadjuk |
| 48 ml 1N HCl | a sósavat majd ebben old- |
| 100 ml-re d.vízzel | juk a TEMED-et, azután |
| | hígítjuk végtérfogatra és |
| | megszűrjük. Hűtőben tárolj- |
| | uk pH=8,9. |
| 2./ 28 g akrilamid | A bisz oldatban oldjuk az |
| 0,757 g bisz ~ | akrilamidot, utána szűrjük. |
| 100 ml-re d.vízzel | Hűtőben tárolható. |
| 3./ 0,20 g perszulfát | Mindig frissen kell készí- |
| 100 ml-re d.vízzel | teni! |

A megfelelő sorszámú oldatok elegyítési arányai:
1 : 2 : víz : 3 = 1 : 2 : 1 : 4 térfogat arányban.
Ezen arányok betartásával a szeparáló gél 7%-os
akrilamidra nézve.

Törzsoldatok és elegyítési arány lugos közegű
tágporusú, közbülső anionos gélrendszerhez.
(Davis - Canalco Inc. recepturája).

4./ 5.98 TRIS

1,8 ml 1N HCl

0,46 g TEMED

100 ml-re d.vízzel

A TRIS töményebb sósav-

as oldatában oldható a

TEMED; Végterfogatra

való hígítás után hűtőben

tárolható pH=6,7.

5./ 2,5 bisz

10 g acrilamid

100 ml-re d.vízzel

Bisz oldatban oldjuk

az acrilamidot, hűtőben

tárolható.

6./ 4 mg riboflavin

100 ml-re d.vízzel

7./ 40 g glükóz (dextróz)

100 ml-re d.vízzel

A megfelelő sorszámú törzsoldatok elegyítési aránya:

4 : 5 : 6 : 7 = 1 : 2 : 1 : 4 térfogat

Elektróda-pufferoldat pH = 8,3

6 g TRIS

28,8 g glicin

1000 ml-re d.vízzel

Homogenizálás 4-szeresére hígított gélpufferben

vagy pH=7,2-es 0,052 M-os sósavas foszfát pufferben

1:5 arányban.

Minta: Glicerín $20\ \mu\text{l}$ + $100\ \mu\text{l}$ szérum

+ 1 1 brómfenolkék.

Festés: 1 ml TRIS + 1,3 mg NAD A TRIS pH-ja 7,2

0,45 mg NBT 6,1 g TRIS

0,14 mg PMS 3,68 ml cc.HCl

1000 ml-re d.vízzel

Az egészhez tejsavat kell adni úgy, hogy a végtérfogat tejsavra nézve 0,05 M-os legyen.

(A festést Allen J.M. után módosított eljárással végeztük.) Festési időt nem lehet pontosan megadni mert nagyban függ az alkalmazott vegyszerek állapótól (némelyik bomlékony) és a szérum enzimaktivitásától.

Fixálás: 5:4:1 = víz:metanol: cc.ecetsav

a fixálóelegybe tett gél hűtőben megtartja állagát.

Az elválasztást OE-107 típusú poliacrilamid-gélelektroforézis készülékkel végeztem.

A műanyag tubusok hátránya, hogy a gél nem nedvesíti elég jól, ezért a gél és a tubus fala között egy folyadékfilm képződik ahol az elválasztás során szabad elektroforézis játszódik le. Ez rontja az elválasztás hatékonyságát. Előnye viszont, hogy a gél sokkal könnyebben kiszedhető belőle. A készülék egyszerűen összeállítható mert csavarmenettel vannak ellátva a tubusok.

Célszerű a gélrendszert előelektroforézissel (üresjárat) a minta felvitele előtt megtisztítani az esetleges peroxisulfát eltávolítása céljából.

Az előelektroforézis után a mintát a spacer-gél fölé rétegezzük óvatosan. Kezdetben 2 mA cső feszültséget kapcsolunk rá, addig amíg a minta túl nem halad a spacer-gélen, ezután 5 mA cső feszültséggel futtatunk.

A bromfenolkék, mint jelzőfesték, a leggyorsabban mozgó fehérje helyét mutatja, s az elektroforézis végét jelzi. A bromfenolkék valamelyik albumin frakcióhoz kötődik. Az elektroforézist akkor célszerű befejezni mikor a festékkorong 3-5 mm-re megközelíti a tubus végét.

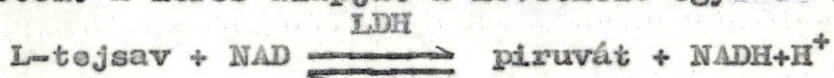
A laktát dehidrogenáz negatív töltésű fehérje és az alsó póluson elhelyezett anód felé vándorol töltésének megfelelő sebességgel.

A gélrudacskákat festékkoldatot tartalmazó Vasserman csövekbe raktuk. A festék pH-ját 37 C-on a festés előtt NaOH-dal pH=7,6-ra be kell állítani. A festés 37 C-os termosztátban sötétben kb. 5-10 perc alatt játszódik le. Festésnél ügyelni kell arra, hogy a gél ne szineződjön el mert a sötét háttér rontja a kiértékelést.

Festés után a gél fixáló oldatban helyezzük és hűtőben tárolható több hétig is. Fotózás céljából olyan állványt célszerű alkalmazni amely alulról világítja meg a gélét. Áteső fényben szebb képeket nyerünk. Célszerű a gél által szabadon hagyott felületet fekete kartonnal leárnyékolni, így állítani be az expozíciós időt és a blendét, majd az árnyékolást eltávolítva exponálni. Így biztosított, hogy a gélre állítottuk be az értékeket nem a háttérre.

Tejsav mérés

A receptet a Boehringer-Mannheim, Test Handbook-ból vettem. A mérés alapját a következő egyenlet magyarázza.



A keletkezett NADH-t lehet mérni, amely ekvivaláris mennyiségben keletkezik a fogyott tejsav mennyiségével. A kapott extinció értékből számolható a tejsav mennyisége, vagy kalibrációs egyenesről közvetlenül leolvasható.

Szükséges anyagok:

A mérendő mintát fehérjementesíteni kell.

(1ml 0,6 M-os perklórsav + 0,5 ml minta, 3000 r.p.m.-en 5 percig centrifugálni és a felülúszót kell használni)

- 1./ Hidrazin-glicin puffer 0,5 M-os pH=9,0
- 2./ 27 m M-os NAD oldat
- 3./ LDH (2 mg LDH/ml)

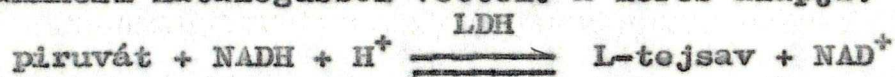
A mérés elvégzése:

	Vak	minta
1-es oldat	2,00 ml	2,00 ml
fehérjementesített minta	-	0,20 ml
perklórsav	0,20 ml	-
2-es oldat	0,20 ml	0,20 ml
3-as oldat	0,20 ml	0,20 ml

A mérést Spekord 195-ön végeztem 340 nm-en.

Piruvát mérés

A méréshez szükséges receptet szintén a Boehringer-Mannheim katalógusból vettem. A mérés alapja:



Szükséges anyagok:

A mintát fehérjementesíteni kell (4 ml 0,6 M-os perklórsav + 4 ml minta, 3000 r.p.m-en 5 percig centrifugálni, a felülúszót kell használni).

- 1./ Foszfát puffer 0,7 M pH=9,0
- 2./ NADH (2,5 mM NADH)
- 3./ LDH (2mg LDH/ml)

Mérés elvégzése:

- I. 1-es oldat 4 ml + 2 ml a fehérjementesített mintából 10 percet állni hagyjuk majd szűrőpapíron megszűrjük, a szűrlet pH-ját 7-8-as értékre állítjuk.
- II. Szűrt minta 2 ml + 0,20 ml 2-es oldat keverés után mérjük az extincióját E , 340 nm-en.
- III. Az előző mintához hozzáadjuk a 3-as oldatot 5 perc állás után mérjük az extinciót E_2
 $E_1 - E_2 = \Delta E$ -ből számolható a piruvát, vagy kalibrációs egyenesről leolvasható.

Az LDH tisztítása

Első lépésben szérumot XM 100-as jelzésű Diafló microporusú membránszűrőn 2 atmoszféra nyomáson tisztítottam. A készüléket a tanszéken készítettük. 20 ml szérum 24-26 óra alatt ment át a szűrőn hidegszobában, 1-2-szeres relatív tisztulást lehet így elérni. A száz ezer daltonnál kisebb molekulasúlyú fehérjék eltávoznak. A módszer hátránya, hogy az LDH egy része alegységeire disszociál és így képes átjutni a membrán-szűrőn, így a kitermelés alacsony fokú.

Második lépésben affinitás kromatográfiát alkalmaztam O Carra és Barry (1972) után miáltalunk módosítva.

Anyagok: AH sepharose 4B, minden 5 ml-hez adunk: 140 mg kálium-oxalátot 2 ml desztillált vízben oldva pH=4,7 értékre beállítva, ezután 370 mg vízzoldható 1-ethyl-3-(3-diemthylaminopropyl carbodiimid)-ot 1 ml desztillált vízben, lassan csepegtetve és kevergetve. Utánna újból beállítjuk a pH-t; szobahőn 20 órán át kevertetjük, a végén megint pH-ellenőrzést végzünk. Az oszlop kapacitásának megállapítására NaOH-os titrálást végeztünk 2 ml gél szuszpenzióval. A fogyott NaOH mennyisége ekvivalens az oxamáttá át nem alakult kálium-oxalát mennyiségével. 15 mm-es átmérőjű 120 mm hosszúságú oszlopot használtam.

Az anyagot 0,02 M-os foszfátpufferben pH=6,8 vittük fel, amely 0,1 M-os volt NaCl-re nézve, és 200 mM NADH-ra. Az elválást 0,02 M-os foszfátpufferrel 0,5-0,5 M NaCl gradiens mellett végeztük. Az első két oszloptérfogatban 200 M NADH volt, itt jött le a fehérje csúcs. Ezután 4 mM piruvátot tettünk a NADH helyett és az LDH is lejött az oszlopról.



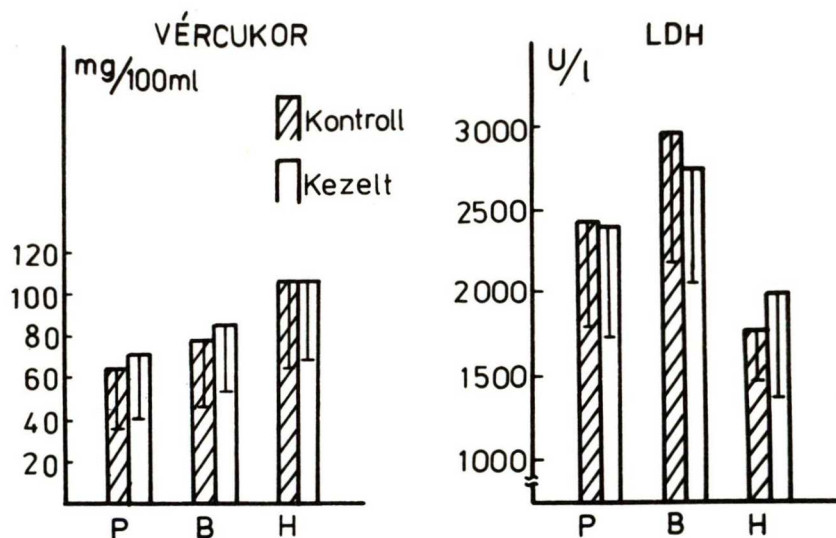
A Na Cl-ra azért van szükség, hogy megakadályozza a nem a specifikus fehérjék kötődését, nagyobb koncentrációban pedig elősegíti az LDH leválását az oxamátról. Az oxamát piruvát analóg, NADH jelenlétében az LDH k hozzákötődik. Az oxamát a gélhez az aminoshexil karon keresztül kötődik. Az elválás folyamán a NADH elhagyása negatív eluciót eredményez.

Oxamatos AH szefaróz 4B oszlop kapacitása
William és mtsai. (1974) szerint 0,5 mg LDH/gél ml.
 M_4 típusú izoenzimre a kapacitás kisebb. Az általunk készített oszlop kapacitása 3 mg LDH/gél ml volt.

A RÖVIDTÁVÚ KEZELÉSEK EREDMÉNYEI

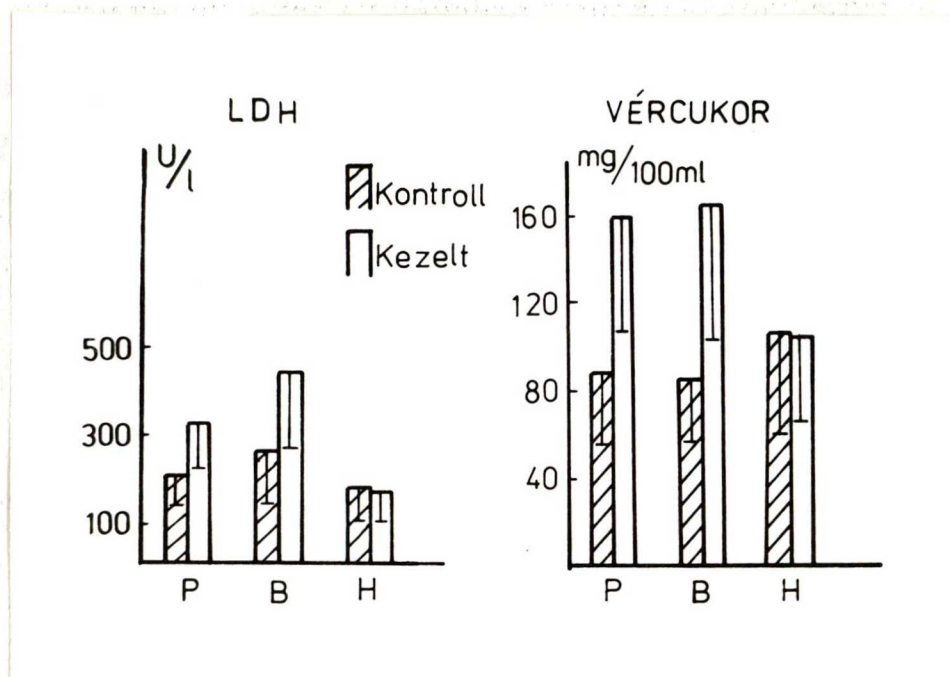
Cinkklorid (ZnCl_2) hatása a vizsgált fajokra

A CuSO_4 -el azonos (10mg/l) koncentrációban adott ZnCl_2 kezelés hatására a vércukorszint egyik vizsgált halfajban sem változott meg szignifikánsan. Az LDH enzimaktivitás is hasonló eredményt adott. ZnCl_2 kezelést követően nem volt kimutatható változás a kontrollhoz képest. Néha arra lehetett következtetni, hogy Zn ionok hatására csökken az enzimaktivitás.

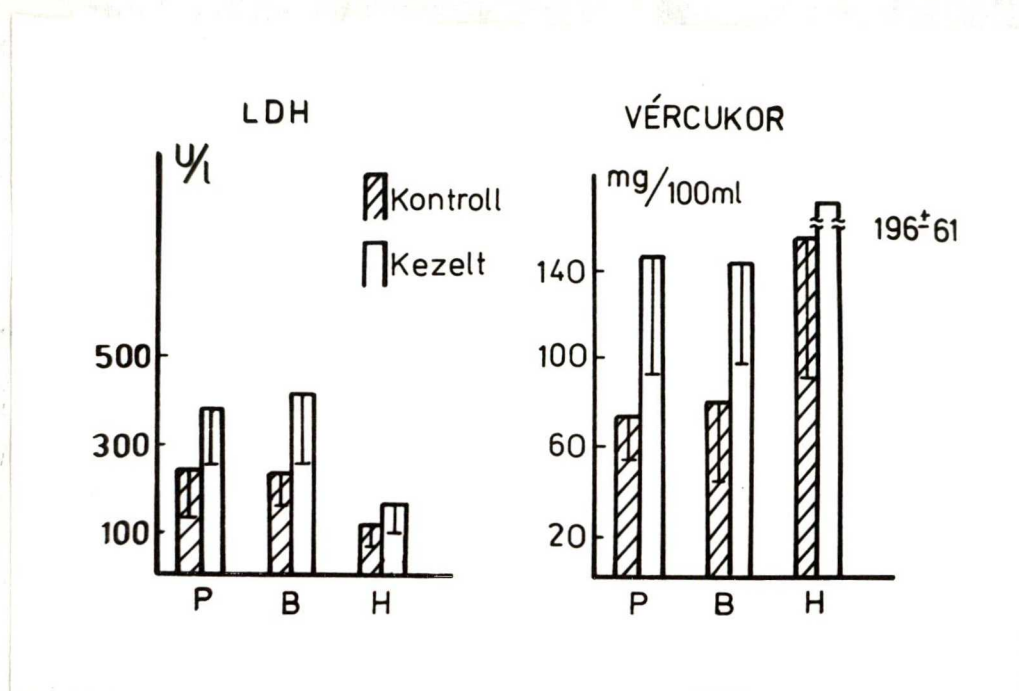


1. ábra: A vizsgált halfajok vérszérumának és LDH- és vércukorszint változása 10 mg/l ZnCl_2 hatására. Kezelési idő 2 óra, kezelési hőmérséklet $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$; 3-5 halból; $P < 0,001$.

Hirtelen hőmérsékletváltozás hatása a vizsgált
halfajokra



2. ábra: A vizsgált halfajok vérszérumának LDH- és vércukorszintjeinek változása a hirtelen hőmérséklet növekedés hatására. Kezelési idő 2 óra, kezelési hőmérséklet: $20\text{ C} \pm 1\text{ C}$ -ről $26\text{ C} \pm 1\text{ C}$ -ra. 3-5 halból $P < 0,001$



3.ábra:A vizsgált halfajok vérszérumának LDH- és vércukorszintjeinek változása a hirtelen hőmérséklet csökkenés hatására. Kezelési idő 2 óra, kezelési hőmérséklet $20\text{ C} \pm 1\text{ C}$ -ről $10\text{ C} \pm 1\text{ C}$ -ra. 3-5 halból $P < 0,001$

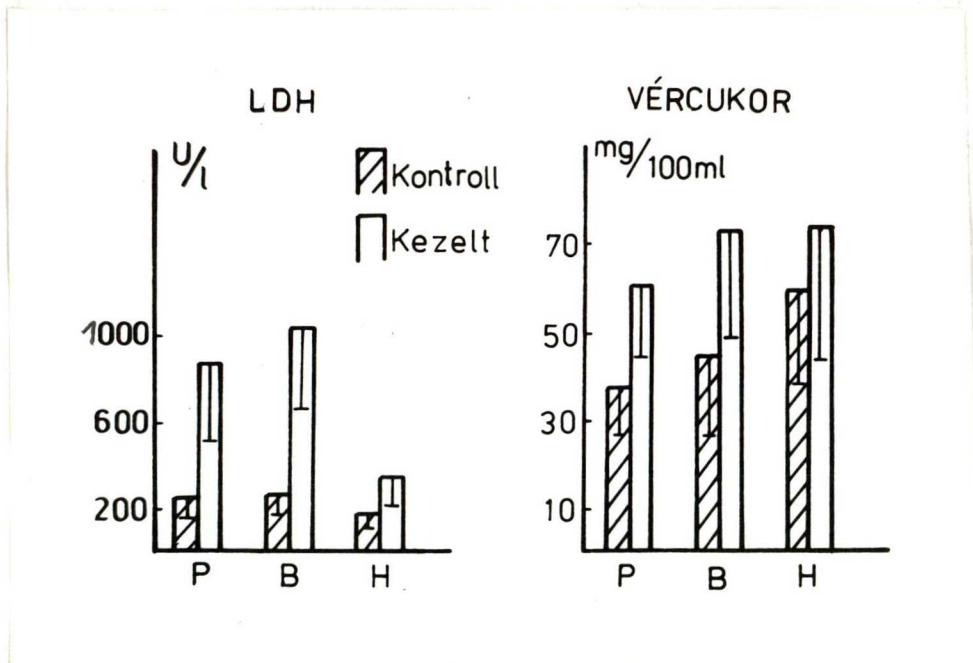
Hirtelen hőmérséklet-növekedés szignifikánsan megemeli a ponty és a busa vércukorszintjét, valamint a vérszérum LDH aktivitását. Ezzel szemben a harcsából meghatározott értékek nem mutatnak változást.

A hirtelen hőmérséklet-csökkenésre is eltérő módon reagáltak a vizsgált halfajok. Míg a ponty és a busa vércukorszintje és LDH aktivitása a hideg

stresszt követően jelentősen nőtt, addig harcsa esetében a vércukorszint csak alig emelkedett, az LDH aktivitás pedig inkább csökkent.

Rézsulfát (CuSO_4) hatása a vizsgált fajokra

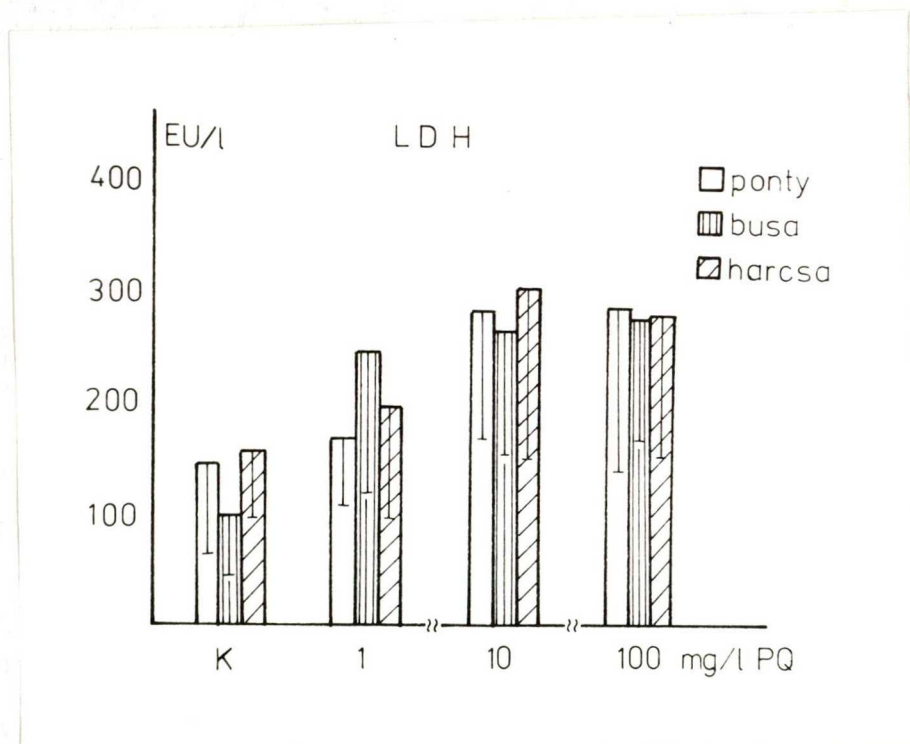
A rézsulfát a kezelt koncentrációban a vércukorszintet szignifikánsan megváltoztatta a kontrollhoz képest. Itt is busa, ponty, harcsa a sorrend. Az LDH enzimaktivitás többszörösére változott. Busa esetében 4,5-szörösére, pontynál 4-szeresére és harcsánál 2-szeresére.



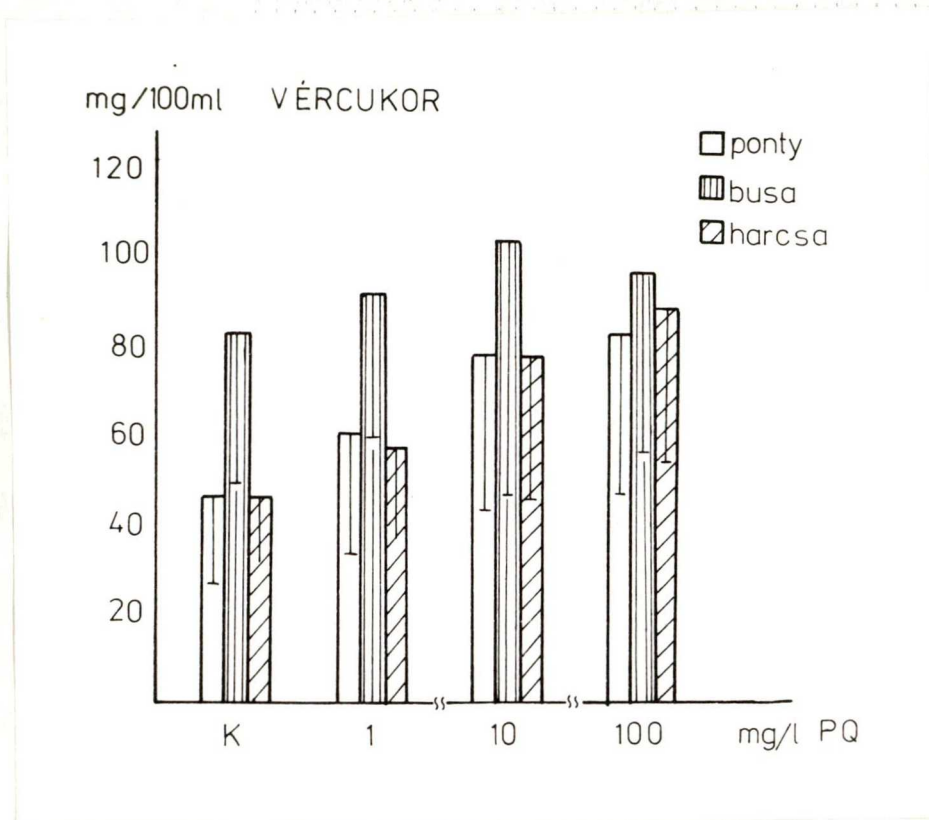
4. ábra: A vizsgált halfajok vérszérumának LDH-és vércukorszintjének változása 10mg/l CuSO_4 hatására. Kezelési idő 2 óra, kezelési hőmérséklet $20\text{ C} \pm 1\text{ C}$, 3,-5 halból; $P < 0,001$

Paraquat hatása a vizsgált fajokra

A paraquat minden koncentrációban mérgezőnek mutatkozott. 100 mg/l paraquat hatására valamennyi hal tipikus fulladásos tünetek közepette (hátonuszás, felgyorsult kopoltyúmozgás, hasi hajszálerek kivörösödése) elpusztult. A vércukorszint és az LDH enzim aktivitás a kezelési koncentrációval arányosan növekedett, mindhárom vizsgált halfaj esetében. A legnagyobb változást a busa vérszéruma tükrözte, majd ponty, harcsa a sorrend.



5. ábra: A vizsgált halfajok vérszérumának LDH-szint változása 1, 10, 100 mg/l PQ kezelés hatására. Kezelési idő 2 óra; kezelési hőmérséklet $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$; 3-5 halból, $P < 0,001$

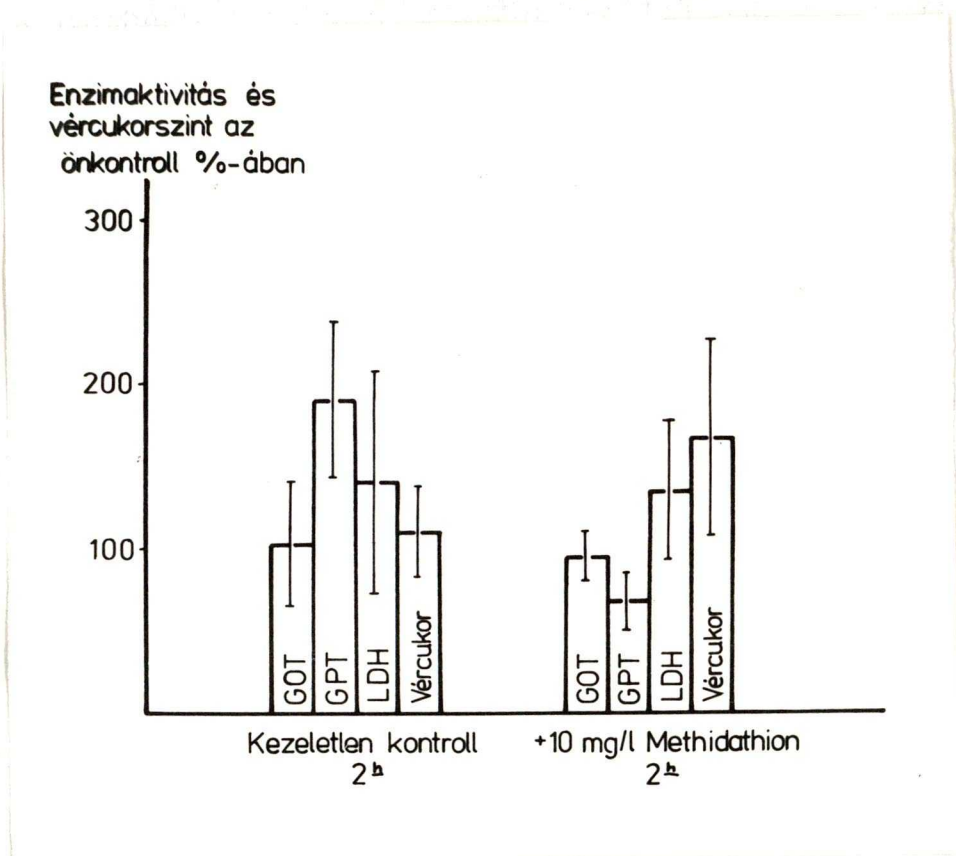


6.ábra: A vizsgált halfajok vérszérumának vércukorszint változása 1, 10, 100 mg/l PQ kezelés hatására. Kezelési idő 2 óra; kezelési hőmérséklet $20\text{ C} \pm 1\text{ C}$; 3-5 halból, $P < 0,001$

A metidation kezelés hatása a ponty enzimaktivitásaira és a vércukorszintjére

A metidation ilyen rövid expozíciós idő alatt nem volt képes megemelni a vérszérumban az LDH enzim mennyiségét, a vércukorszintet viszont szignifikánsan,

majdnem duplájára emelte. A transzamináz szintet (Orbán L.) mérései alapján csökkentette.

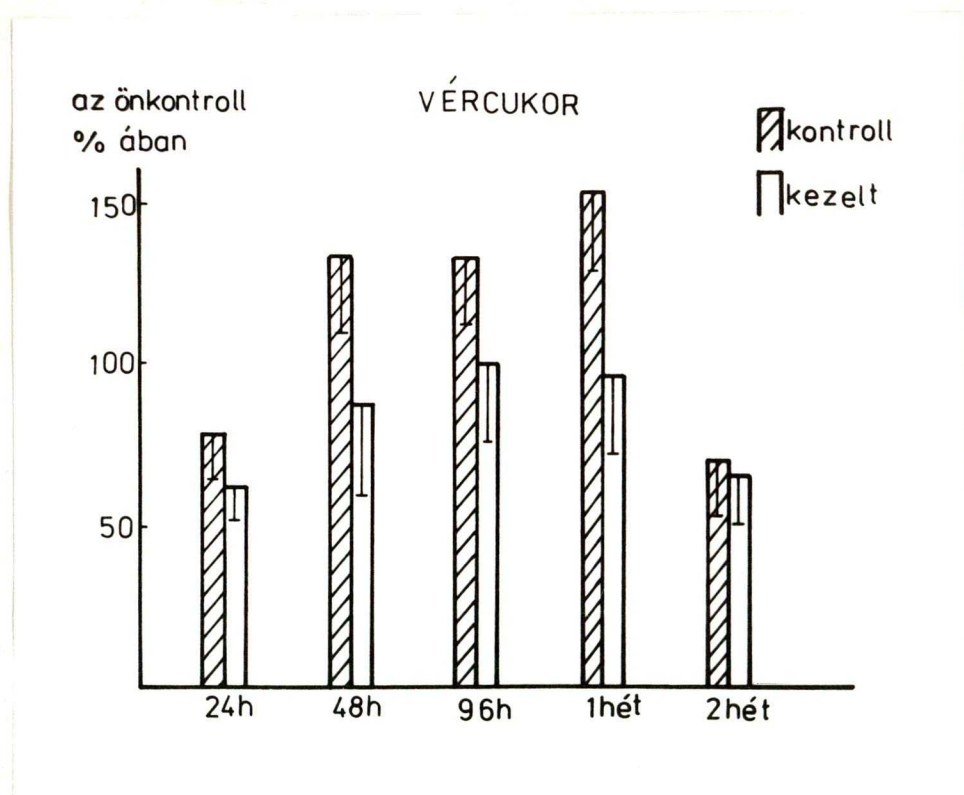


7.ábra: Ponty vérszérumának LDH-, és vércukorszint, valamint transzaminázszint változása 10 mg/l metidation hatására. Kezelési idő 2 óra; kezelési hőmérséklet $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$; 6-9 halból; $P < 0,001$

A HOSSZÚTÁVÚ KEZELÉSEK EREDMÉNYEI

Paraquat hatása ponty vércukor szintjére

A kontroll állatokon jól látható a szűrési stressz-hatás a megemelkedett vércukorszintből. A kezelt halak vércukorszintje ennek ellenére még a nullaperces szintjüket sem éri el. A kontrollhoz mért különbség az egyhetes kezelés során a legnagyobb, két hét elteltével már nem jelentős.

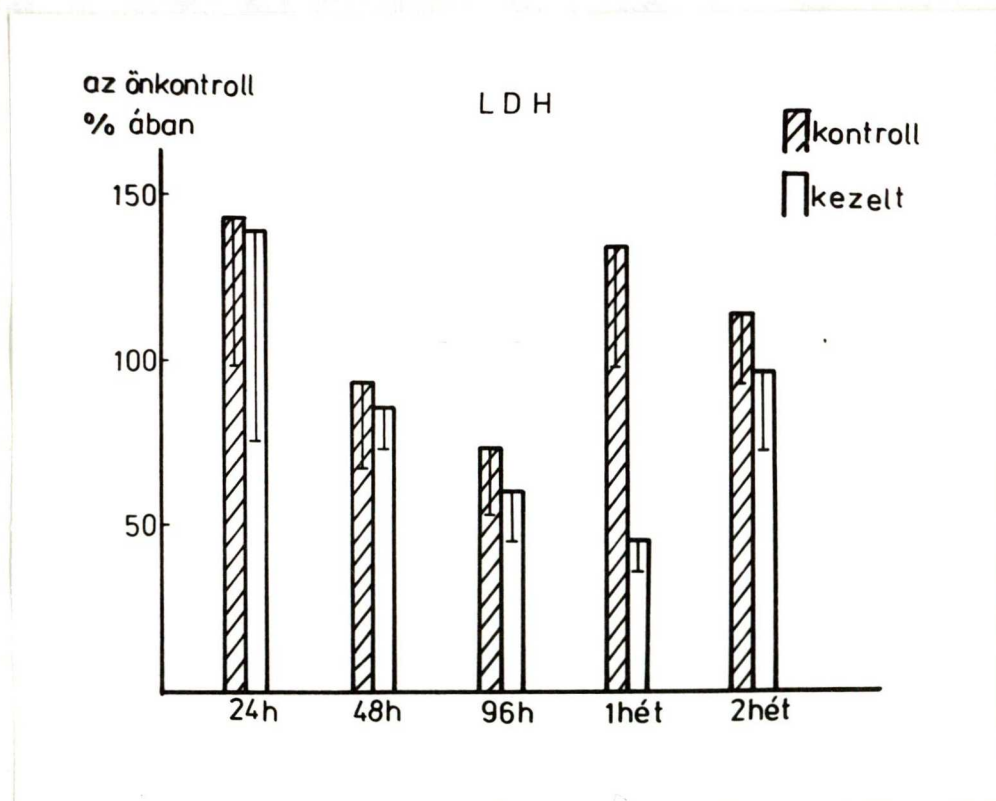


8.ábra

Ponty vérszérumának vércukorszint változása 5 mg/l PQ kezelés hatására az idő függvényében. Az értékeket (kontroll 6-8, kezelt 6-9 hal) az önkontroll %-ában adtuk meg; $P < 0,001$

A paraquat hatása ponty LDH enzim
aktivitására

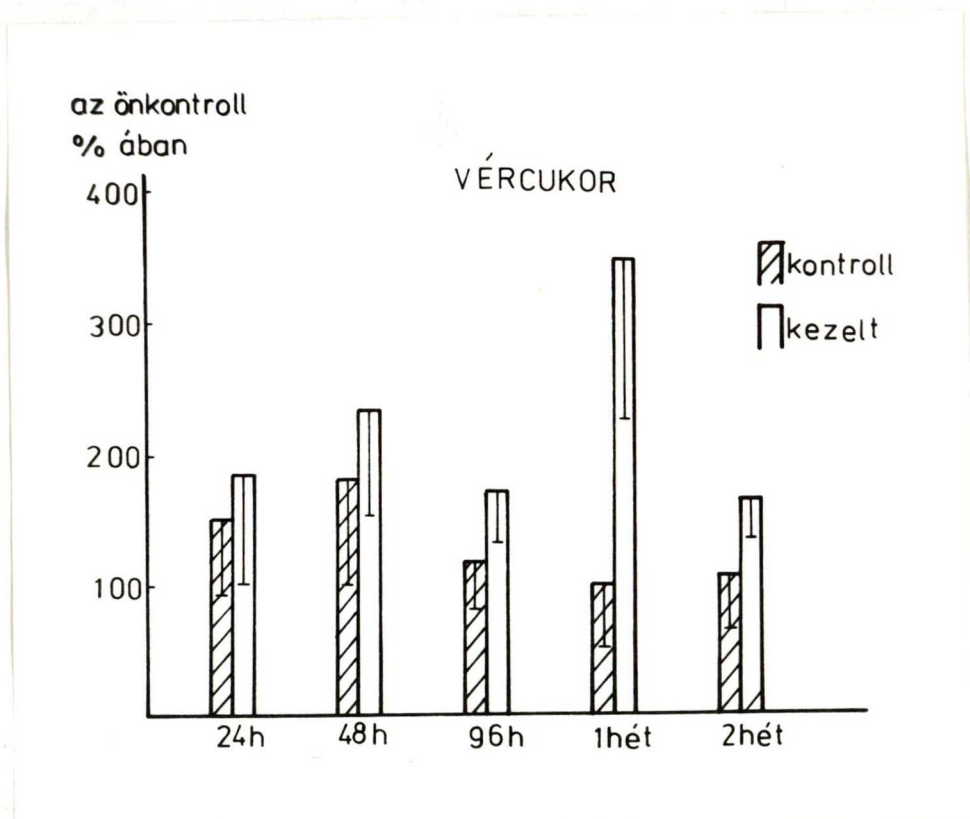
A paraquat kezelés hatásának a maximuma az egyhetes kezelésnél mérhető. 24, 48, 96 óras kezelések hatására bekövetkezett LDH szint-változások nem szignifikánsak. A két hetes kezelés kontroll és kezelt értékeinek a különbsége is szóráson belül van.



9.ábra: Ponty vérszérumának LDH szint változása PQ kezelés hatására az idő függvényében. Az értékeket (kontroll 6-8, kezelt 6-9 hal) az önkontroll %-ában adtuk meg; $P < 0,001$

CuSO₄ kezelés hatása a ponty vércukorszintjére

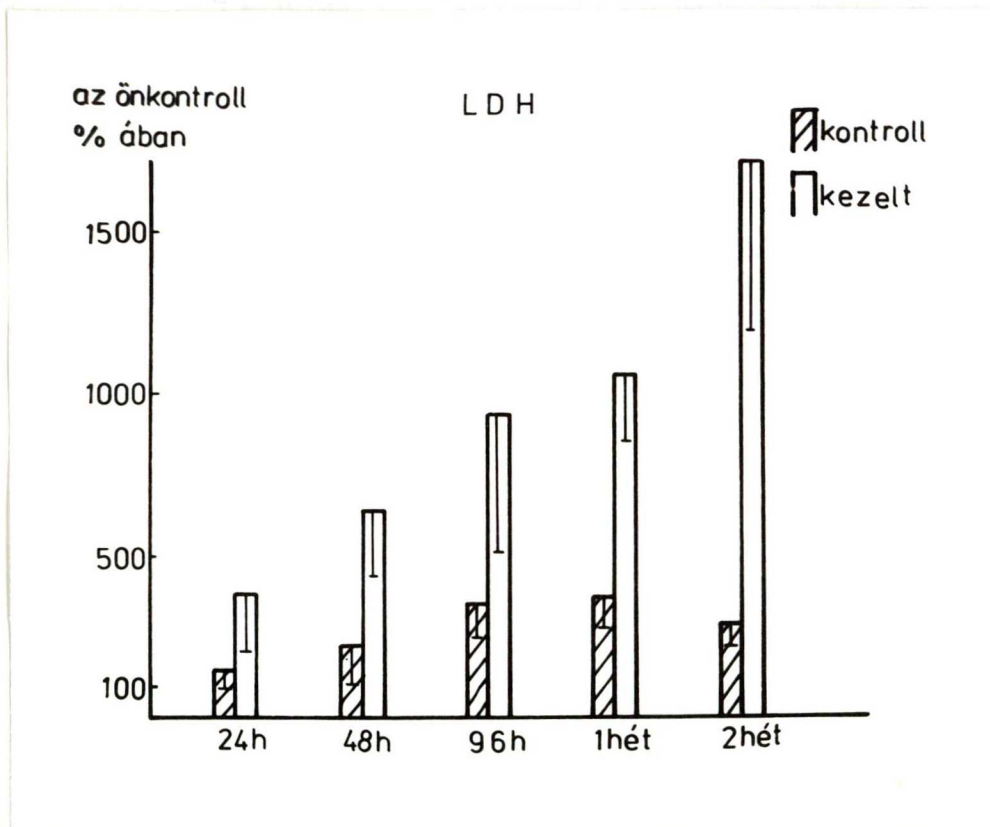
Az egyhetes kezelést követően a vércukor szint 250%-al nőtt a kontrollhoz képest és a különbség kívül volt a szóráson. A 96 órás és két hetes kezelés hatására bekövetkezett változások már nem olyan nagyok de szóráson kívül vannak. A 24, és 48 órás minták növekedésének aránya is a kontrollhoz viszonyítva elég nagy de a különbségek szóráson belül vannak.



10. ábra: Ponty vérszérumának vércukorszint változása 5 mg/l CuSO₄ kezelés hatására az idő függvényében; Az értékeket (kontroll 6-8, kezelt 6-9 hal) az önkontroll %-ában adtuk meg $P < 0,001$

A CuSO_4 kezelés hatása a ponty LDH
aktivitására

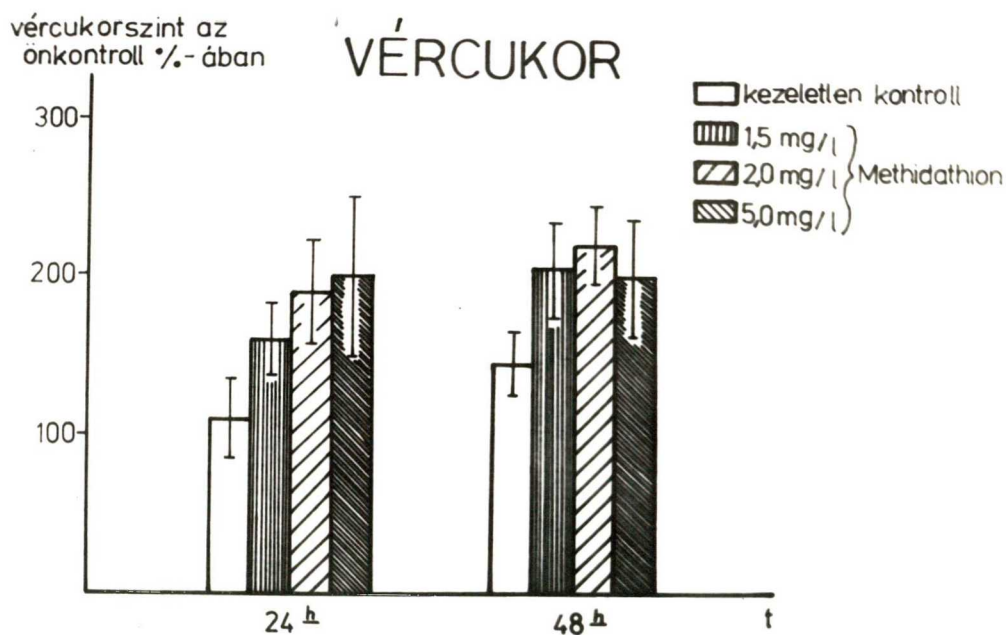
A rézsulfát hatása az időfüggvényében végig emelkedő tendenciát mutatott. Már 24 óra elteltével 230%-os az emelkedés, és a két hetes mintáknál már 143%-os az emelkedés. Az különbségek minden esetben a szóráson kívül esnek.



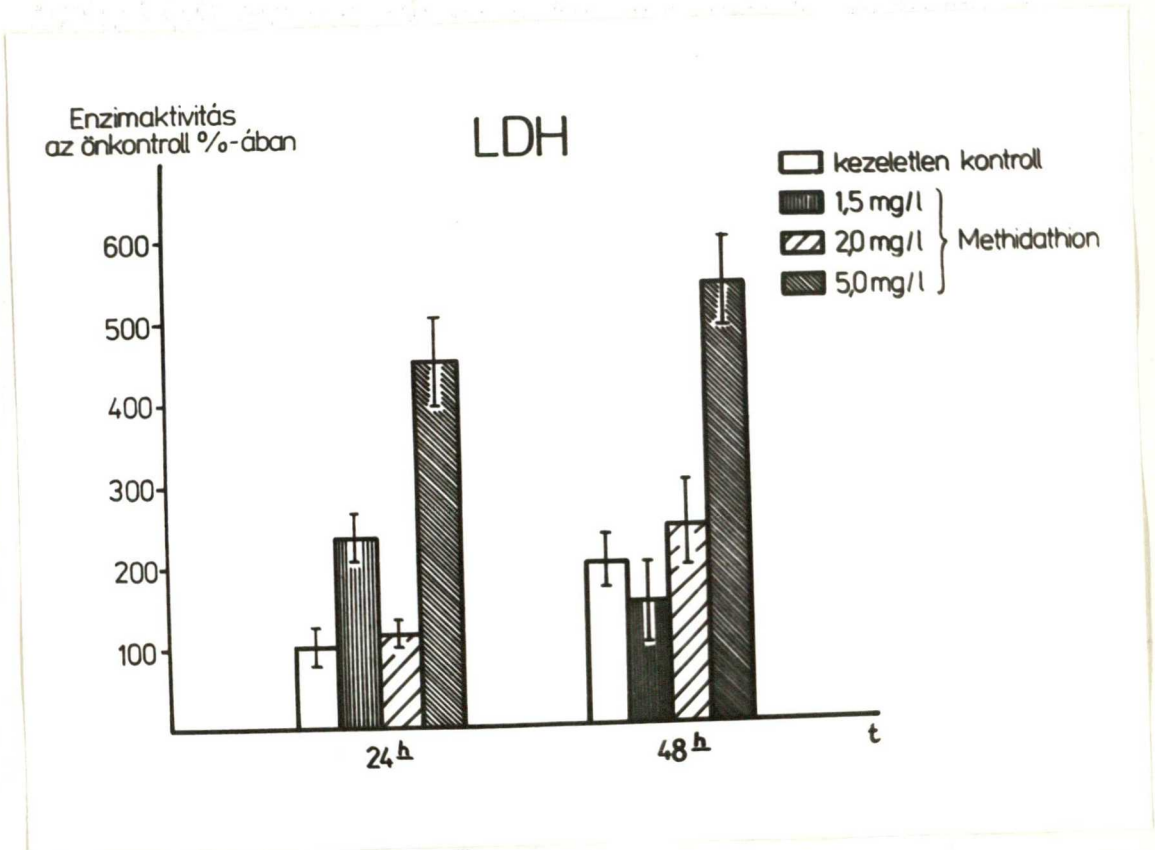
11. ábra Ponty vérszérumának LDH szint változása
5 mg/l CuSO_4 kezelés hatására az idő függvényében.
Az értékeket (kontroll 6-8, kezelt 6-9 hal) az
önkontroll %-ában adtuk meg; $P < 0,001$.

A különböző koncentrációjú metidation hatásai
a vizsgált paraméterekre

Három koncentrációban kezeltünk metidationnal halakat, egy és két napon keresztül. Az LDH- és a vércukorszint az egynapos kezelést követően a kezelési koncentrációval arányosan növekedett. Két napos kezelést követően az LDH is és a vércukor is nőtt, de a vércukor már nem a kezelési koncentrációval arányosan.



12.ábra: Ponty vérszérumának vércukorszintje - változása, a hatóanyag koncentráció és az idő függvényében. Az értékeket (kontroll 6-8, kezelt 6-9 hal) az önkontroll %-ában adtuk meg; $P < 0,001$



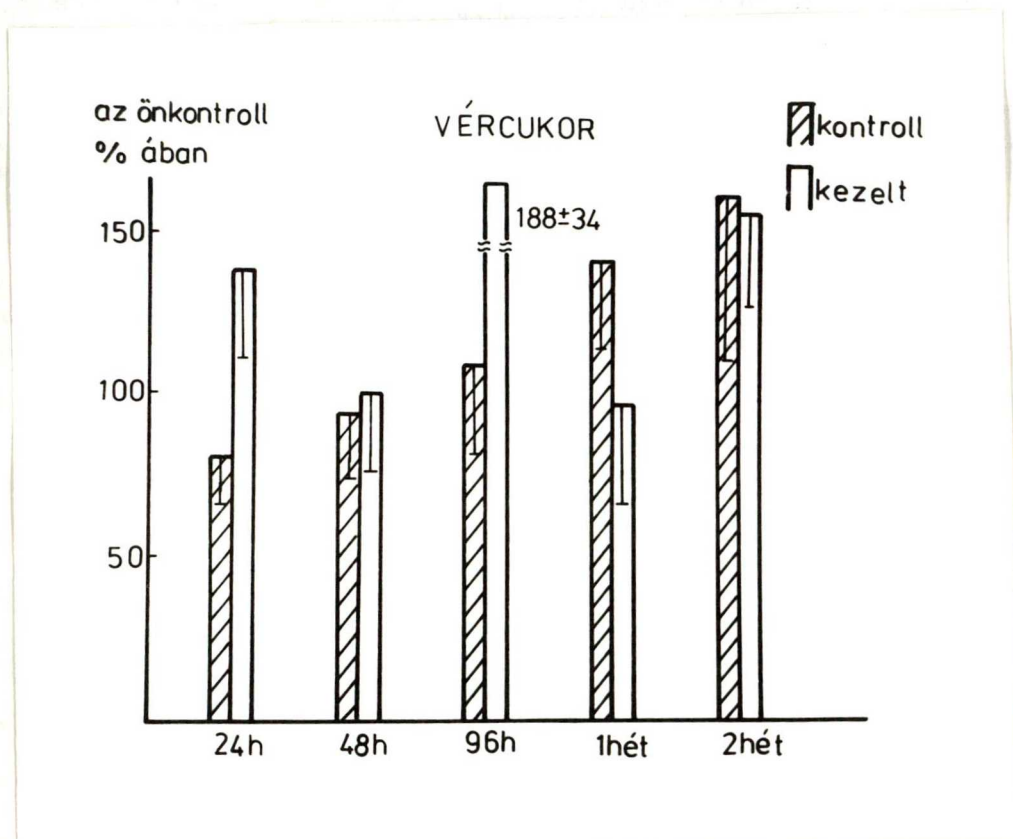
13.ábra Ponty vérszérumának LDH szint változása, a hatóanyag koncentráció és az idő függvényében. Az értékeket (Kontroll 6-8, kezelt 6-9 hal) az önkontroll %-ában adtuk meg;

$P < 0,001$



A Metidation kezelés hatása a ponty
vércukorszintjére

A metidationnal kezelt halak vérszérumának vércukorszintje az első három nap szignifikánsan emelkedik, de egy hét után csökken, és a második hétre kezd beállni a kontroll értékre.

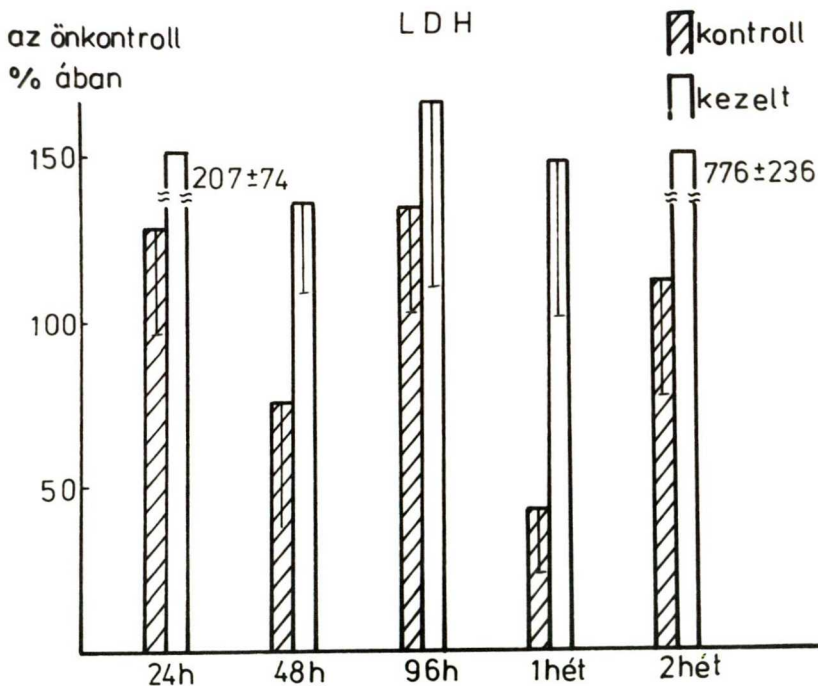


14. ábra: Ponty vérszérumának vércukorszint változása 2 mg/l metidation kezelés hatására az időfüggvényében. Az értékeket (kontroll 6-8, kezelt 6-9 hal) az önkontroll %-ában adtuk meg; $P < 0,001$

A metidation kezelés hatása a ponty

LDH enzimaktivitására

Metidationnal kezelt pontyok vérszérumának LDH szintje a kontrollhoz viszonyítva két eltérési maximumot ad. Egyik az első napon van és ezután a harmadik napig csökken a kontrollhoz viszonyított enzimszint-növekedés, de egy hét után ismét emelkedni kezd, és a második héten extrém nagy eltérés mutatkozik.



15.ábra Ponty vérszérumának LDH-szint változása 2 mg/l metidation kezelés hatására. Az értékeket (kontroll 6-8, kezelt 6-9 hal) az önkontroll %-ában adtuk meg; $P < 0,001$

Az LDH szervenkénti megoszlása két időpontban

	<u>szív</u>	<u>izom</u>	<u>máj</u>	<u>vér</u>
téli hőmérséklet	6928	2872	3840	112
	± 1986	± 561	± 1080	± 37
nyári hőmér-	6870	4460	7420	21
séklet	± 2510	± 628	± 2890	± 8

1. táblázat: az értékek U/1-ben vannak megadva

LDH aktivitás szezonális változása ponty egyes szerveiben, nyári és téli időszakban. A szívben változatlanul magas az aktivitás mind téli, mind nyári hőmérsékleten kondicionált halaknál. Az izomban és a májban nyári hőmérsékleten magasabb, míg a vérben télen magasabb az aktivitás.

LDH izoenzimok elválasztása lap-gélelektorforézissel

Kezdetben diskelektroforézissel dolgoztunk, megkerestük a megfelelő elektród puffert, Odense és mtsai (1966) munkája hatására először borát puffert pH=8,3 használtunk, de ebben a rendszerben csak a lassú vándorlási sebességű alegységek váltak el.

A pH emelésével pH = 9,0-ig némi javulást lehetett elérni. Goldberg E. (1966) munkája nyomán tértünk át a TRIS-glicin elektród pufferre, és pH = 8,3-nál volt a legjobb az elválás. Ezek után az elektród puffer ionerősségét kellett beállítani. A legjobb elválást akkor értük el, amikor a felső tartályban 0,33 M-os az alsóban pedig 0,25 M-os TRIS-glicin puffert alkalmaztunk. A gélkonzentráció is nagy mértékben meghatározza az elválást. Az emlősökből nyert LDH izoenzimek elválasztására ajánlott 7 és 8%-os poliakrilamid gélen az elválás nagyon lassú és rossz volt. 4-6%-os gélen már kielégítőbben váltak szét az alegységek. A 4%-os gél viszont lágyága miatt nagyon nehezen kezelhető. A legjobb elválást gradiens gélen tudtunk elérni: 5-6% között. A biszakorilamid aránya 4%-os az akrilamidhoz viszonyítva.

A gradienst 11 cm hosszú lapgélén állítottuk elő. A felvitt anyag 25%-os volt glicerinnre és 2%-os brómfenolkékre nézve. A jó elválás érdekében az anyagot max. 2-3 milliméter rétegvastagságban lehet fölvenni a gélre. Disc. elektroforézis esetén ezt a nagypórusú tömörítőgél alkalmazása biztosítja. Lapgélre viszont nem lehet nagy-

pórusú gélt tenni, mert a felület geometriája nem alakítható ki annak lágyága miatt. Betömöríthető az anyag, ha az elektroforézis elején nagy áramerősséget alkalmazunk (5mA/mm^2) 1-2 percig.

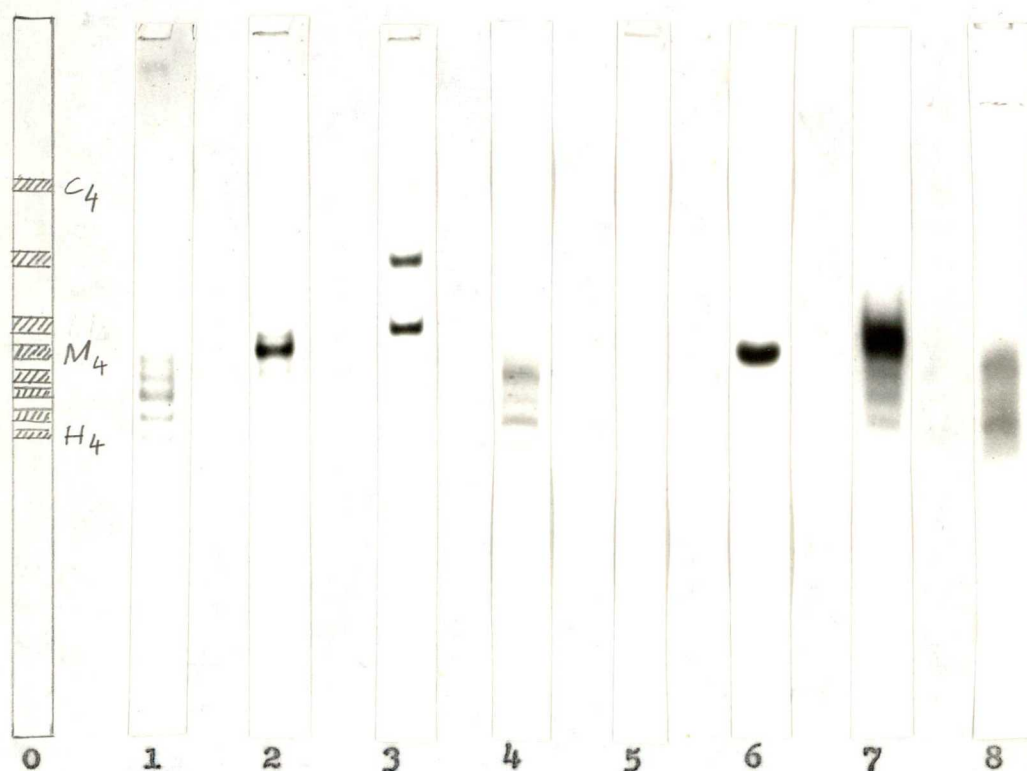
Ha a felső tartályban 0,33M-os, az alsóban 0,25 M-os TRIS-glicin puffert alkalmaztunk, és 1mA/mm^2 gél áramerősséggel futtattunk, mint ahogy Goldberg E.(1966) javasolta, a futási idő 7-8 óra volt. 3mA/mm^2 gél áramerősséget alkalmazva ez az idő 2,5-3 órára csökkent. A gél melegedése itt már számottevő volt, a légűtés nem volt elegendő, ezért a rendszert folyadékűtéssel láttuk el.

A felső puffertartály nagyságától függően előbb utóbb elfogynak a töltéshordozó ionok, és a megfelelő áramerősség tartása érdekében a feszültséget emelni kell a megnövekedett ellenállás függvényében az $I=U/R$ összefüggés értelmében. Egy határon túl a feszültség emelése olyan mérvű hőtermeléssel jár, hogy azt az intenzív hűtés sem képes kompenzálni. Ugyanis a feszültség négyzetesen arányos a rendszerben termelődő hővel a Joule törvény értelmében, $Q_{\text{cal}} = K(U^2/R)t$, ahol K az elektromos hőekvivalenst, U a feszültséget, R az ellenállást, t az időt jelöli.

Mérési tapasztalataink szerint 15V/mm^2 gél érték fölé menni nem szabad, mert nagyon melegszik a gél. Ezért áramstabilizált feszültségforrás helyett ajánlatosabb teljesítmény stabilizált feszültség forrásokat alkalmazni.

11 cm hosszú lappal dolgoztunk amennyiben a gél hossza ettől eltér a futtatási áramerősség meghatározásánál figyelembe kell venni, mivel a lap hosszával az ellenállás egyenes arányban nő az $R=(S \cdot l)/a$ egyenlet alapján. Ahol a a fajlagos ellenállás " a " az áramvezető keresztmetszete " l " pedig a hossza.

Ponty különböző szerveinek LDH izoenzim képe



16. ábra: 5-6%-os gradiens poliakrilamid gélen elválasztott LDH izoenzimek ponty különböző szerveiből.

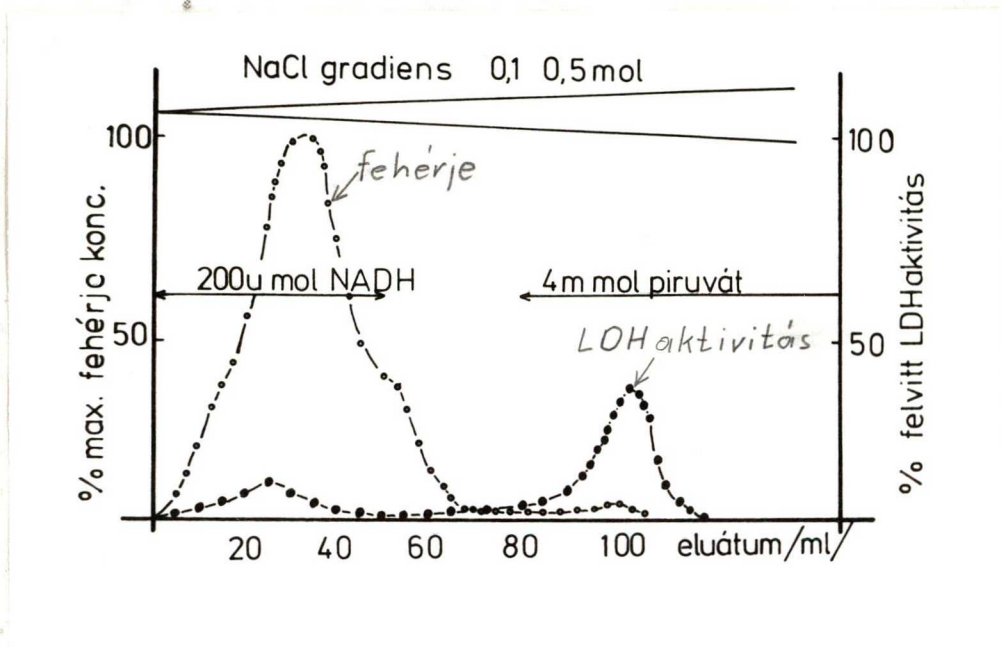
1. Kontroll ponty szív-homogenizátum
2. Kontroll ponty izom-homogenizátum
3. Kontroll ponty máj-homogenizátum
4. Kontroll ponty kopoltyu-homogenizátum
5. Kontroll ponty vérsérúm-homogenizátum

6. 2 mg/l metidationnal 2 hétig kezelt ponty vérszérum
7. 5mg/l CuSO_4 -al 96 óráig kezelt ponty vérszéruma
8. 5mg/l PQ-al 1 hétig kezelt ponty vérszéruma

LDH tisztítása ponty szérumból

Diafló XM 100-as microporusú membránszűrőn előtisztított és betöményített szérumot vittem föl oxamátos AH szefarőz 4B oszlopra, 15 ml oszlop térfogatra 4 ml-t. Ellentétben az eredeti recepturával (P.O Cara és Barry (1972) 0,5 M NaCl-t tartalmazó elváló folyadékban az LDH nem kötődött fel az oszlopra, 0,1 M NaCl koncentrációt alkalmaztam, így viszont nem jött le az oszlopról. Közbülső megoldást használtunk, 0,1-0,5 M NaCl gradiens mellett elvált.

Haszonhétszeres relatív tisztulást tudtunk elérni 40%-os kitermelés mellett. A közepes eredmény valószínű oka a nagyon kicsi LDH és a nagy fehérje tartalom. Több lépcsős tisztítást kell alkalmazni, de a hagyományos módszerek, hődenaturációs, kisózás módszer, alkalmazásakor az izoenzimek megváltozhatnak mivel az egyes alegységek nem egyformán reagálnak ezekre a kezelésekre.



17. ábra: LDH tisztítás ponty vérszérumból affinitás kromatográfiával. (Oxamátos AH szefaróz 4B-n.)

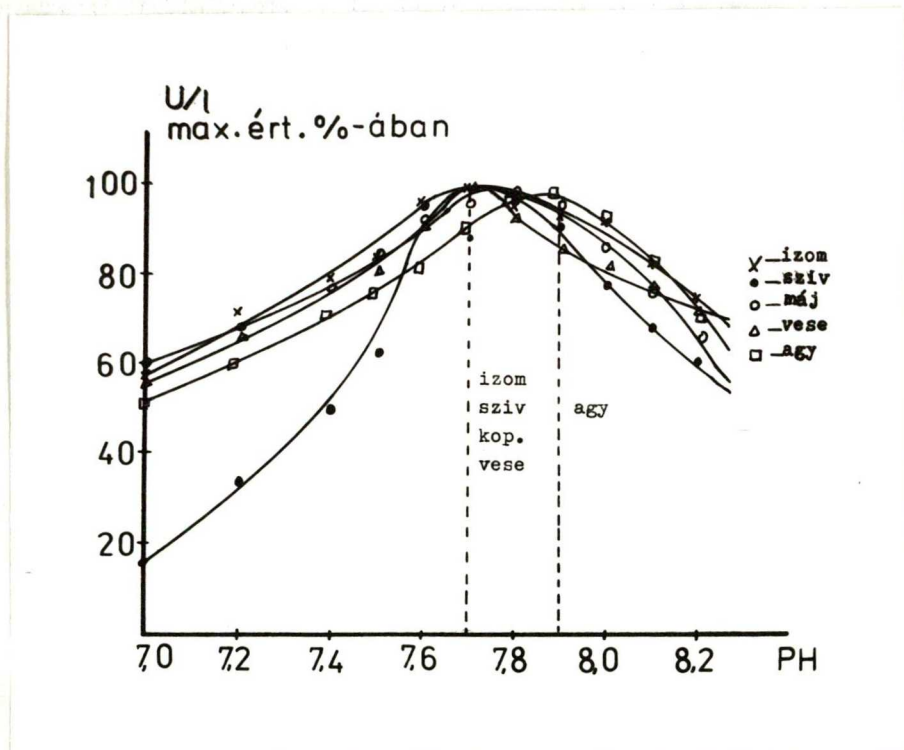
K_m és V_{max} mérések

Májból tisztított és tisztítatlan LDH enzimaktivitását mértük a szubsztrát telítettség függvényében, és ebből, linearizálással meghatároztuk a maximális sebesség (V_{max}) és a Michelis állandó (K_m) értékét. Eltérés csak a maximális sebesség (V_{max}) értékénél adódott. Mivel a tisztított enzimnek a K_m értéke nem változott a nyers enziméhez képest, a további kinetikai vizsgálatoknál nyers homogenizá-

tumból mértem, tehát látszólagos értékeket kaptam, de a tendenciára ebből is lehet következtetni.

LDH enzim pH függése

Ponty különböző szerveiből nyert tisztítatlan LDH pH függésének in vitro vizsgálata során egyetlen helyen: az agy homogenizátum esetén mutatkozott némi eltérés, de az sem szignifikáns. Az enzimaktivitások értéke pH=7,7 agy esetében pH=7,9 értéken mutatattak maximális értéket.



18. ábra: Ponty különböző szerveiből nyert tisztítatlan LDH enzimaktivitásának sebessége a pH függvényében.

hal	vér		izom		szív		máj	
	tejsav	piruvát	tejsav	piruvát	tejsav	piruvát	tejsav	piruvát
kontroll	2,6 $\pm$ 0,6	0,16 $\pm$ 0,08	6,2 $\pm$ 1,2	0,51 $\pm$ 0,09	4,2 $\pm$ 1,1	0,21 $\pm$ 0,06	9,9 $\pm$ 2,1	0,72 $\pm$ 0,12
kezelt 24h	2,9 $\pm$ 0,7	0,27 $\pm$ 0,07	7,0 $\pm$ 1,0	0,60 $\pm$ 0,12	-	-	10,2 $\pm$ 2,4	0,79 $\pm$ 0,18
kezelt 48h	-	-	8,3 $\pm$ 0,9	0,67 $\pm$ 0,13	6,1 $\pm$ 1,2	0,22 $\pm$ 0,06	14,2 $\pm$ 3,6	-
kezelt 96h	3,0 $\pm$ 0,5	0,17 $\pm$ 0,06	-	-	-	-	12,2 $\pm$ 4,0	0,69 $\pm$ 0,10
kezelt 1hét	2,4 $\pm$ 0,6	0,18 $\pm$ 0,05	6,2 $\pm$ 1,1	0,51 $\pm$ 0,08	5,0 $\pm$ 0,9	0,21 $\pm$ 0,08	10,1 $\pm$ 3,6	0,70 $\pm$ 0,12
kezelt 2hét	2,5 $\pm$ 0,6	0,16 $\pm$ 0,05	6,1 $\pm$ 1,2	0,50 $\pm$ 0,07	4,1 $\pm$ 1,0	0,20 $\pm$ 0,07	9,7 $\pm$ 3,0	0,7 $\pm$ 0,11

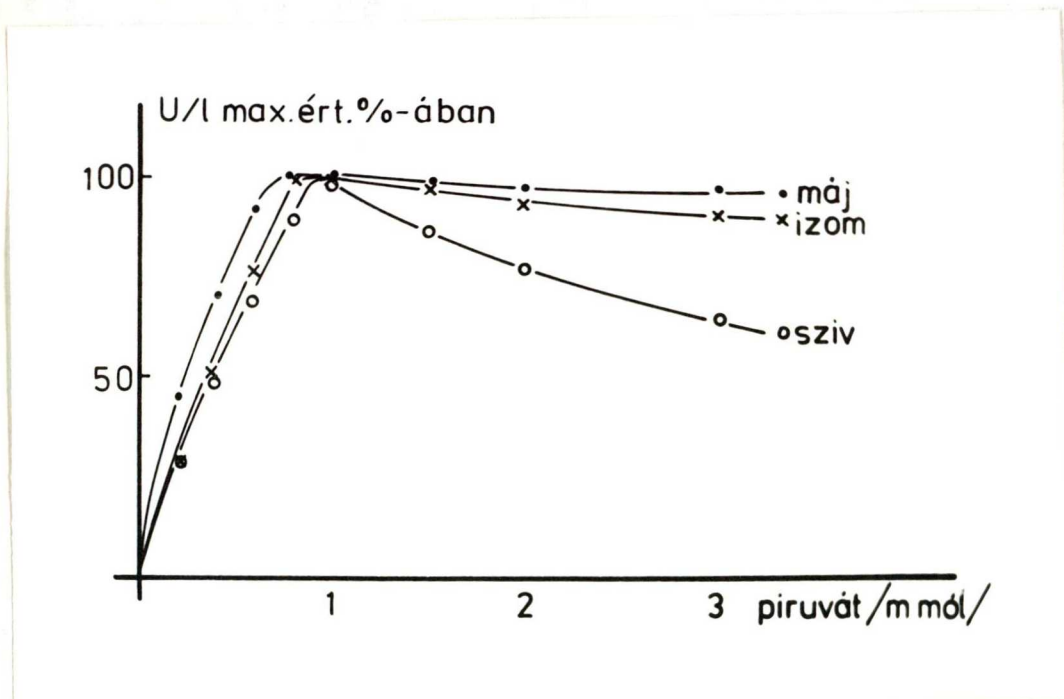
2. táblázat:

piruvát és tejsav mennyisége ponty különböző szerveiben 5 mg/l

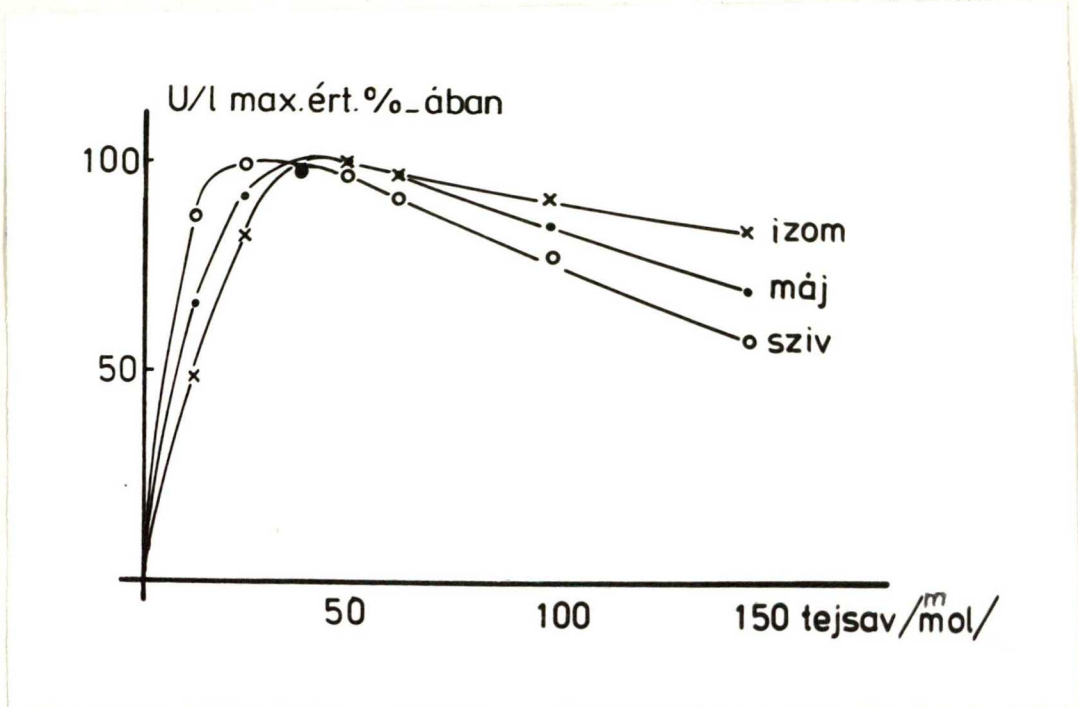
PQ kezelés hatására ml/100g szövet

LDH enzim aktivitás gátlása piruváttal és tejsavval
in vitro

Ponty különböző szerveiből nyert tisztítatlan LDH, szubsztrát (piruvát) és termékátlását (tejsav) vizsgáltuk in vitro. Az egyes szervekben közel azonos értékek adódtak. Termék és szubsztrát gátlást is csak a fiziológiás mennyiségeknél magasabb értékeken tapasztaltunk.



19. ábra: Ponty különböző szervéből nyert tisztítatlan LDH enzim-aktivitásának gátlása piruváttal



20. ábra: Ponty különböző szervéből nyert tisztítatlan LDH enzim-aktivitásának gátlása tejsavval

CuSO₄, PQ és a Methidathion gátló hatása az LDH enzim-aktivitása in vitro

In vitro 5 és 50 mg/l CuSO₄, PQ, 2 és 20 mg/l methidathionnal kezeltünk izom, szív, máj homogenizátumot, és így vizsgáltuk az LDH enzim sebességének szubsztrát függését. A vizsgált kemikáliák az LDH aktivitását nem befolyásolták szignifikánsan egy esetben sem a kontrollhoz viszonyítva.

Az eredmények értékelése

A munkát a kezelési koncentrációk meghatározásával kezdtük. A rövidtávú kezelések célja az volt, hogy a rövid expozíciós időket nagy szerkoncentrációval kompenzálva modellezzük a természetes viszonyokra. A kezeléseket $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on, tehát nyári vízhőmérsékleten végeztük.

10 mg/l ZnCl_2 -vel történt két órás kezelés hatására jelentős változásokat nem kaptunk sem az LDH enzimszint, sem a vércukorszint esetében (1. ábra). Tehát ZnCl_2 ebben a koncentrációban nem mutatkozott sem mérgezőnek sem stresszor anyagnak. Finelli és mtsai (1977) hasonló eredményt kaptak patkányon végzett kísérletek során.

A hirtelen hőmérséklet változás már jelentős mértékben hatott mind az LDH enzimszint mind a vércukorszint emelkedésére (2. és 3. ábra). Halak közel azonos LDH enzimszint és vércukorszint változással reagáltak a hőmérséklet emelkedésre és a hőmérséklet csökkenésre. A legkisebb változás a harcsa esetében tapasztalható. Amely azt mutatja, hogy ez a faj képes leginkább elviselni a hirtelen hőmérsékletváltozást, úgy hogy az jelentősebb stressz hatást nem okoz.



10 mg/1 CuSO_4 -el történt 2 órás kezelés hatására az LDH enzimszint a vérsérumban 6-800%-kal nőtt a kontrollhoz képest, a vércukor 40-60%-kal nőtt (4. ábra). Most is a harcsa bizonyult a legérzékletlenebbnek a kezelésekkel szemben. A harcsa kisebb fokú reagálásának valószínű oka az, hogy a kezelést követően viszonylag nyugton maradt az akvárium alján, míg a másik két faj idegesen úszkált.

A paraquat hatását a halakra a kezelési koncentrációk függvényében vizsgáltuk (5. és 6. ábra). 1-10 mg/1 koncentrációig arányosan nőtt a változás mértéke a 2 órás kezelést követően mind az LDH enzimszint, mind a vércukorszint esetében. 100 mg/1 kezelési koncentráció esetén az LDH enzimszint és a vércukorszint értékei is emelkedtek, noha a halak a kezelést követően 10-15 perc alatt elpusztultak. A paraquatnak elsődleges és gyors támadáspontja halak esetében valószínűleg a kopoltyúhám, amit Rojik és mtsai (1983) igazoltak is elektronmikroszkópos felvételekkel.

A kopoltyúhám drasztikus sérülése 100 mg/1 paraquat kezelés hatására megakadályozza a normális gázanyagcserét, amelynek következtében a halak anoxiás állapotba kerülnek. Ebből következik, hogy megnövekszik az LDH enzimszintje és a vércukorszint is. Ugyanakkor változatlan marad az aminoszint (Orbán L. 1983).

Tehát a rövid idő elteltével bekövetkezett halpusztulás oka a megemelkedett LDH és vércukorszint lehet.

10 mg/l methidathionnal történt 2 órás kezelést követően csak a vércukorszint növekedett meg. A kapott eredmény magyarázata talán az, hogy a kezelést követően a halak mozgásaktivitása teljesen lecsökkent. Emiatt a kísérletnél vezettük be az ún. kontroll-os kiértékeléseket. Az új kísérlet nagy előnye, hogy a kontroll halak mellett egy belső kontrollhoz is tudunk viszonyítani. A számolás során minden halnak a saját "nullaperces" értékéhez viszonyított százalékos értéket adtuk meg. Ezzel a módszerrel az egyedi szórásokat ki lehetett küszöbölni. A kontroll halak használatával a kezelési (vérvétel) stressz okozta hatásokat tudjuk korekcióba venni. A kétszeres kontroll használata biztosítja, hogy csak a kezelés hatására bekövetkező változásokkal számoljunk.

A rövidtávú kezelések eredményeit felhasználva kezdtünk hozzá a hosszútávú kezelésekhez. A kezeléseket 10 C-os vízben végeztük, tehát téli vízhőmérsékleten. 5 mg/l paraquat kezelés hatására a kezelt állatok vércukorszintje és LDH enzimaktivitása is

csökkent. Látszólagos ellentmondást a rövidtávú kezelésekkel az magyarázza, hogy a paraquat serkenti glukóz oxidációját, főleg a pentózfoszfát cikluson keresztül (Rose és mtsai 1976). Az eredmények kialakításában feltehetőleg szerepet játszott az is, hogy a paraquatnak közvetett hatása van a hormonális rendszerre is (Ross és Krieger 1979). A paraquat két lépésben ürül ki a szervezetből (Fisher és mtsai 1971). Eredményeink alapján az a paraquat mennyiség amely az első két nap ürül ki nem fejt ki jelentős hatást sem a vércukorszintre, sem az LDH szintre. A vérben az első két nap nem jelennek meg izoenzimiek, tehát szervkárosodás sem alakul ki. A szervezetben maradó 20-30% biztosan eljut a mélyebben levő sejtekig is és ott maradéktalanul kifejti hatását. A vérszérumban megjelenő izoenzimiek a kopoltyú károsodására utalnak (16. ábra 8. oszlop). Két hét elteltével a maradék paraquat is eltávozik a szervezetből, amit a mért értékeknek a kontrollszint közelébe való visszatérése is mutat.

5 mg/l CuSO_4 -el történt kezelés hatására (10. és 11. ábra) a vércukor és az LDH szint is emelkedett. A vércukor 1 hét alatt három és félszeresére nőtt, majd a második héten visszaállt az eredeti érték közelébe. Valószínű magyarázat, az, hogy az LDH szint több

mint ezerötszáz százalékkal nőtt, és az összes glukóz tejsavvá oxidálódott. Kimerültek a glukózártárak, csökkent a vércukorszint. A rézszulfát elsődleges támadáspontja a szívizom és a vázizom lehet, amit a 16. ábra 7. oszlopa mutat, mivel a szívizomra jellemző "H" és a vázizomra jellemző "M₄" izoenzimok jelennek meg a vérben.

Methidathionnal történő hosszútávú kezeléseket 2 mg/l koncentrációban végeztük el, mivel a kezelés hatására bekövetkező változások elég nagyok voltak (12. ábra) és a halak hosszútávon is kibírták ezt a kezelési koncentrációt, míg 5 mg/l kezelési koncentráció esetén a halak hamar elpusztultak. Methidathion kezelés hatására hasonló eredményeket kaptunk, mint a paraquat kezelés során. Az első hétre a vércukorszint csökkent a kontrollhoz képest, míg az LDH enzimszintje az első héttől rohamosan emelkedett. A methidathion is paraquathoz hasonlóan serkentheti a glukóz-oxidációt azáltal, hogy a metabolizmusa során $\text{NADPH} + \text{H}^+$ -t fogyaszt (Chopade és Dauterman 1981). A magas LDH szint és az előző tény eredménye, hogy elfogy a glukóz és csökken a vércukorszint. Elsődleges támadáspontja valószínűleg a vázizom, amit 16. ábra 6. oszlopa is igazol.

Megnértük az egyes szervek tejsav és piruvátszintjét 5 mg/l paraquattal történő 96 órás kezelést követően az idő függvényében (2.táblázat). Ezután megnéztük az LDH enzimek aktivitás gátlását a tejsav és a piruvát koncentráció függvényében, és azt kaptuk, hogy egyik szervben sem érik el azt a szintet amely gátlólag hat az LDH enzimaktivitására. Továbbiakban a rézszulfát a paraquat és a methidathion hatását vizsgáltuk az LDH enzimre a koncentráció függvényében in vitro. Eredményeink alapján bebizonyosodott, hogy egyik szer sem fejt ki gátló hatást az LDH enzim aktivitására in vitro körülmények között. Ezek alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a vizsgált szerek közvetetten fejtik ki hatásukat az LDH enzimre. Nagyon valószínűnek látszik, hogy a kezelések hatására a halak erősen stresszes állapotba kerülnek és ez az oka a megnövekedett LDH enzim szintnek.

Méréseink alapján kijelenthetjük, hogy a szövetkárosodás és stressz hatás kimutatására alkalmas a vércukor és az LDH enzim szint változás mérése. Megemelt értékei egyértelműen stressz hatásra utalnak, a vérben megjelenő izoenzimek pedig az egyes szerveket ért szövet-károsodásokat jelzik.



Stressz hatás következtében csökken a szervezet
globulin szintézise, és zavarok lépnek föl
az interferon képzésben is. Mindezek következté-
ben a halak legyengülnek, fogékonyabbá válnak a
fertőző betegségekkel szemben.

IRODALOM JEGYZÉK

- Allen J.M. Multiple forms of ~~L~~actic Dehidrogenase
in Tissues of the Mouse Ann.N.Y.Acad Sci.
94 937-951 (1961)
- Appella E., and C.L.Markert Dissociation of Lactate
Dehidrogenase into Subunits with Guanidin
Hydrochloride Biochem.Biophys.Res.Commun.
9 171-176 (1961)
- Block E.R., Potentiation of Acute Paraquat Toxicity
by Vitamin E Deficiency Lung 156 195-203
(1979)
- Brook W.L.F., Seasonal Levels of Chlorinated
Hydrocarbons and Heavy Metals in Fish and
Brown Shrimps From the Medway Estuary, Kent:
Environ. Pollution 19 21-37 (1979)
- Bus J.S. and at.all Environ. HL th. Perspect.
16 139 (1976)
- Chakoumakos C.R., C.Russia Toxicity of Copper to
Cuthroat Trout (Salmo Clarki) under Different
Conditions of Alkalinity, PH and Hardness
Environ. Science and Technology 13 213-219
(1973)
- Chopade H.M. and W.C.Dauterman Studies on the In
Vitro Metabolism of Metidation by Rat and
Mouse Liver Pesticide Biochemistry and
Physiology 15 105-119 (1981)

- Clement L. Markert and Ilse Faulhaber Lactate
Dehydrogenase Isozyme Patterns of Fish
J.Exp.Zool. 159 319-332 (1965)
- Conning D.M., K.Fletcher, and A.A.B. Swan:
Paraquat and Related Bipiridyls: Br. Med.
Bull. 25 245 (1969)
- Cremlyn R., Pesticides, Wiley, New York (1978)
- Dando P.R. Lactate Metabolism In Fish J. Mar.
Biol. Ass. U.K. 49 209-223 (1969)
- Davis R.E., Skin absorpoion of Paraquat
The Medical Journal of Australia 2 222 (1982)
- Dixon G.D. and J.B.Sprague Aaclimation Copper by
Rainbow Trout-A Modifying Factor in Toxicity
Can. J. Fish.Aquat. Sci. 38 880-888 (1981)
- Douglas J. Kornburst and R.D.Mavis The Effect of
Paraquat on Microsomal Lipid Peroxidation In
Vitro and In Vivo Toxicology and Applied
Pharmacology 53 , 323-332 (1980)
- Ellgard, E.G., J.E.Tusa and A.A. Malizia
Locomotor activity of bluegill Lepomis
macrochirus: hyperactivity induced by sublethal
concentrations of cadmium, chromium and zinc.
J. Fish Biol. 1 19-23 (1978)

Finelli V.N., and R.M. El-Gazzar

Interaction of Lead on Zinc on the
Prothombin Activiti in Rats Toxicology
Letters 1 33-39 (1977)

Fisher H.K., Humpries and R.Bails Paraquat
poisoning: Recovery Form Renal and
Pulmonary Damage Ann. Int. Med. 75 731
(1971)

Fritz P.J., Vesell E.S., White E.L.,
The Roles of Synthesis and Degradation in
Determining Tissue Concentration of
Dehidrogenase Biochemistry 62 558-565
(1969)

Fritz P.J., E.L. White, M.P. Kenneth, S.V.Elliot
Lactat Dehidrogenase Isozyme Turnover in
Rat Heart Skeletal Muscle and Liver
Biochemistry 12 21 4034-4039 (1973)

Fryer, J.N. Stress and adrenocorticosteroid
dinamics in the goldfish, Carassius
antratus Can. J. Zool. 53 1012-1020
(1975)

Gergely A., K.Soos L. Erdélyi and V.Cielszky
Determination of mercuri in fish from
rivers and Lakes in hungang by Atomic
Absorption Technique Toxicology 349-355
(1977)

- Glatt H. and F.Oesch Inactivation of
Electrofilic Metabolites by Glutathione s-trans-
ferases and Limitation of the System Due to
Subcellular Localization Arch. Toxicol
39 452-461 (1977)
- Goldberg E. Lactate Dehydrogenase of Trout: Hybri-
dization in vivo and in vitro Science 151
1091-1093 (1966)
- Greig R.A., D.R. Wenzloff, A.Adams, B.Nelson and
C.Shelpuk Trace Metals in Organisms from
Ocean Disposal Sites of the Middle Eastern
United States Arch. Environm. Contam. Toxicol.
6 395-409 (1977)
- Hart M.M., and J.A.Straw Effect of Pesticides
on Blood Glucose Level Steroids 17 559-567
(1971 a.)
- Heath Alan G. and A.W.Pritchard Effect of Severe
Hypoxia on Carbohydrate Energy Stores and
Metabolism in Two Species of Fresh-Water fish
Physiological Zoology 38 4 325-333 (1965)
- Hochachka P.W. Lactate Dehydrogenases in Poikilo-
therms: Definition of a complex isozyme system
Comp. Biochem. Physiol. 18 261-269 (1966)



- Hoffman D.J., and W.C.Eastin, Effect of Lindane,
Paraquat Toxafen and 2,4,5-Trichlorophenoxyacetic
Acid on Mallard Embryo Development
Arc. Environm.Contain. Toxicol. 11 79 (1982)
- Horawitz J.J. and Gregory S.W. Evolution of a
Nervous System Specific Lactate Dehydrogenase
Isozyme in Fish J. Exp. Zool. 180 13-32
(1973)
- Johnston I.A. and G.Goldspink A study of Glycogen
and Lactate in the Myotomal Muscles and Liver
of the Coalfish, During Sustained Swimming
J. Marine. Biol. Ass. U.K. 53 17-26 (1973)
- Keeling P.L., L.L.Smith and W.N.Aldridge
The Formation of Mixed disulphides in Rat
Lung Following Paraquat Administration:
Correlation With Changes in Intermediary
Metabolism B.B.A 716 249-257 (1982)
- Kepes K.L. és G.S.Whitt Specific Lactate Dehydroge-
nase Gene function in the Differentiated Liver
of Cyprinid Fish Genetics 71 529-536 (1972)
- Kobayashi J., S.Okabata and T.Usui Hemolysis of
Human Erythrocytes by Paraquat in Relation to
Superoxide Dismutase Activity Biochemical
and Biophysical Research Comm. 91 (4) 1288-1294
(1979)

- Kraybill H., Biological Effect of Pesticides
in mammalian System Annal. N.Y.Acad. Sci.
160 1 (1969)
- Kristoferson R. et.al: Effect of Sublethal concentration of Phenol on Some Blood Plasma Enzyme Activities in the Pike (Esox Lucius L.) in Brackish Water Ann. Zool. Fennici 11 220-223 (1974)
- Labat, R., Roqueplo, C. Ricard, J.M. Lim, P. and Burget, M. Actions ecotoxicologiques de certains metaux (Cu, Zn, Pb, Dc) chez les poissons dulcaquicoles de la riviere lot. Annls. Limnol. 13 (2) 191-207 (1977)
- Lukens R.J., Chemistry of Fungicidal action
Chapmann and Hall, London (1971)
- Manzo L., C.Gregatti, A.Di Nucci, P.Richelmi
Toxicology of Paraquat and related Bipiridils:
Biochemical, Clinical and therapeutic Aspects
Veterinary and Human Toxicology 21 (6) 404-410
(1979)
- Masana O., T.Hasegawa The Effect of Paraquat on
the Mitochondrial energy transfer reaction
3 325-329 (1978)

- Matkovics B., L.Szabó, Sz.I Varga, R.Novák,
K.Barabás and G.Berenosi: In Vivo Effect
of Paraquat on Some Oxidative enzymes of
Mice Gen.Pharmac. 11 267-270 (1980)
- Melnick Ronald L., and H.O Hultin: Lactat
Dehidrogenase and Glyceraldehyde-3-phosphate
Dehidrogenase in Chicken Skeletal Muscle
Journal Cell.Physiol. 139-148 (1981)
- Molnár K., J.Szakolcay, Halbetegségek 221-227
Mezőgazdasági Kiadó (1980)
- Montgomery M.R., Patric J. Casey, A.A.Valls
Biochemical and Morphological Correlation
of Oxidant Induced Pulmonary Injury: Low
Dose Exposure to Paraquat, Oxygen, and Ozone
Archives of Environm. Health. 34 16 396-401
(1979)
- Murat J.C. Studies on Glicogenolysis in Rarp
Liver: Evidence for on Amylase Pathway for
Glycogen Breakdown. Comp. Biochem. Physiol.
55B 461-465 (1967)
- Nemesók J., L.Boross Comparative Studies on the
Sensitivity of different Fish Species to
Metal Pollution Acta. Biol.Acad. Sci.Hung.
33 1 23-27 (1982)

- O.Carra and S.Barry Affinity Chromatography of
Lactate Dehydrogenase Febs.Letters 21 3
281-285 (1972)
- Odeuse P.H., T.M.Allan, and T.C.Leung Multiple
form of Lactate Dehydrogenase and Aspartate
Aminotransferase in Herring. Canadian J. of
Biochem. 44 1319-1326 (1966)
- Pagenkopf G.K., C.R.Rosemarie, R.V.Thurston
Effect of Complexation on Toxicity of Copper
to Fishes Journal. Fish Res.Board of Can.
31 4 463-465 (1974)
- Pedersen G., A Pedersen, M.Gregusen, B.Kalme
Paraquat poisoning Ugeskr.Laeger. 143 1202-1206
(1981)
- Reichenbach-Klinke H.: Histologische und ensyna-
tische Veränderungen nach Schadstoffeinwirkung
beim Fisch Vröfent. (1972)
- Rose S.M., L.L. Smith, Jon Wyatt The Relevance of
Pentose Phosphate Pathway Stimulation in Rat
Lung to the Mechanism of Paraquat Toxicity
Biochem.Pharmacol. 25 1763-1767 (1976)
- Ross J.A., Krieger R.I. Toxicity of 1,1-alkyl-4,4
-bipyridilium Salts in the Rat, Drug and Chem.
Toxicol., 2 3, 207-222 (1979)

Sauerbier J., And Meyer W. Circadian Study on
Certain Enzyme Activities in the Liver of the
Common Goldfish Zool. Ib. Physiol. Bd.
82,^S 134-140 (1978)

Singleton F.L., R.K. Guthrie Aquatic Bacterial
Populations and Heavy Metals. Composition of
Aquatic Bacteria in the Presence of Copper
and Mercury Salt
Water Research 11 8 639-642 (1977)

Schreck C.B., and H.W. Lorz Stress Response of
Coho Salmon (*Oncorhynchus kisutch*) Elicited
by Cadmium and Copper of Stress Journal Fish Res.
Res. Board. Can. 35 1124-1129 (1978)

Shaklee J.B., Kepes K.L., and G.S. Whitt
Specialized LDH isozymes: The Molecular and
Genetic Basis for the Unique Eye and Liver
Lactate Dehydrogenases of Teleost Fishes
J. Exp. Zool. 185 217-240 (1973)

Silbergeld Ellen K. Blood Glucose: A Sensitive
Indicator of Environmental Stress in Fish.
Journal. Fish. Res. Board. Can. 28 624-636
(1972)

Sprank H.F.G. Brinkman, R.J. van Hoek and D.L. Knock
Copper in *Lymnea stagnalis* L.-II. Effect on
the Kidney and Body Fluids Comp. Biochem.
Physiol. 38 A 309-316 (1971)

- Steffen C., and K.J. Netter On the Mechanism of
Paraquat Action on Microsomal Oxygen Reduction
and its Relation to Lipid Peroxidation
Toxicol. Appl. Pharmacol 47 593-602 (1979)
- Steffen C., H. Mulivan, H. Koppus Lack of In Vivo
Lipid Peroxidation in Experimental PQ Poisoning
Archives of Pharmacology 310 241-243 (19)
- Egawara Naoki Influence of Cadmium on Zinc Distri-
bution in the Mouse Liver and Kidney: Role of
Metallothionein Toxicology and Applied
Pharmacology 42 377-386 (1977)
- Tanishima K. and Nagahora M. Lability of Lactate
Dehydrogenase Activity in Ethylene Glycol-
Treated Pooled Serum, and the Stabilizing
Effect of Glycerol Clinical Chemistry
28 1996-1997 (1981)
- Tsukuda Hiroko Temperature Dependency of the
Relative Activities of Liver Lactate Dehydro-
genase Isozymes in Goldfish Acclimated to
Different Temperatures. Comp. Biochem.
Physiol 52 B 343-345 (1975)
- Minikour W.S., R.M. Goldstein and R.V. Anderson
Bioconcentration Patterns of Zinc, Copper,
Cadmium and Lead in Selected Fish Species
From the Fox River, Illinois Bull. Environm.
Contam Toxicol 24 727-734 (1980)

- Vesell Elliot S. and Peter Pool Lactate and Pyruvate Concentrations in Exercised Ischemic Canine Muscle: Relationship of Tissue Substrate Level to Lactate Dehydrogenase Isozyme Pattern Physiology 55 756-761 (1966)
- Waiwood, K.G. and F.W.H.Beamish The effect of copper, hardness and pH on the growth of rainbow trout, *Salmo gairdneri*. J. Fish Biol. 13 591-598 (1978)
- Weis J.S. And P.Weis Effects of heavy metals on development of the killifish, *Fundulus heteroclitus*. J.Fish. Biol. 11 49-54 (1977)
- Wedemeyer G.A. The Role of Stress in the Disease Resistance of Fishes Am. Fish Soc.Spec. 5 30-35 (1970)
- William E., W.O.Keneth, and L.H.Morwin The purification of Porcine Heart Lactate Dehydrogenase by Affinity Chromatography Biochimica et Biophysica Acta 34 1 327-331 (1974)
- Whitt G.S., and G.M.Booth Localization of Lactate Dehydrogenase Activity in the Cells of the Fish Eye J. Exp. Zool. 174 215-224 (1972)
- Yamamoto Y., Ishii T., Ikeola S. The Site of Copper Accumulation in the Tissues of Carp. Bull of the Jap. Soc. of Sci. Fish 43 11 1327-1332 (1977)



Wing Keith D., Andrew H. Glickeman, and John E.

Casida Oxidativ Bioactivation of S-Alkyl
Phosphorathiolate Pesticides: Stereospecificity
of Prophenophos Insecticide Activation
Science 219 63-65 (1983)

Wedemayer G.A. and Wood J.W., Stress as a predis-
posing factor in fish diseases U. S, Depart.
of the Interior, Fish and Wildlife Service,
Divis of Coop. Research, Washington,
D.C., FDL-38. (1974)

Albrecht M.L. Die Bedeutung von Stressfolgen
für den Fischorganismus. Z. Binnenfischerei DDR.
24. Jg. H. 8. S. 247-250 (1977)

Orbán L. Doktori disszertáció (1983)

Rojik I., J. Nemcsók and L. Boross Morphological
and Biochemical Studies on Liver, Kidney and
Gill of Fishes Affected by Pesticides
(Közleményre elfogadva 1983)

Ádám György, Fehér Ottó Összehasonlító Élőttan
Tankönyvkiadó (1975)