B 3390

KÖRNYEZETI TÉNYEZŐK ÉS NÖVÉNYVÉDŐSZEREK HATÁSA HALAK BIOKÉMIAI ÉS FIZIOLÓGIAI PARAMÉTEREIRE

Egyetemi Doktori Értekezés

Kufcsák Oszkár

Bay Zoltán Alkalmazott Kutatási Alapítvány

Biotechnológiai Intézet

1996.

Édesapám és kisfiam,
az idôben engem körülvevô
két Kufcsák Oszkár emlékének,
akik már mindketten elôttem
járnak.

Édesanyámnak, aki olyan régóta vár
magányában
véghetetlen türelemmel bízva e dolgozat
megszületésében.

Láng Gabriellának, aki tanítványomként
rendszeresen inspirált lehetetlennek tûnõ,
mégis hasznos ötleteivel,
késôbb kollégámként odaadóan segítette
munkámat,
még késôbb feleségemként elviselte az
idônkénti
eredménytelenségekkel járó zsörtölôdéseimet.

Zsuzskának, Andrisnak, Dudinak,
Petinek - gyermekeimnek.

TARTALOMJEGYZÉK

Rövidítések jegyzéke

1. Bevezetés 7

A vizsgálatok elvi alapjai 10

2. Irodalmi áttekintés 14

2.1. Réz-szulfát hatása halakra 14

2.2. Különböző peszticidek ($CuSO_4$, PQ, MD) hatása ponty bélcsatorna és vérplazma AChE aktivitásaira 15

2.3. Deltamethrin hatása pontyokra 17

2.4. Szabad gyökök és reaktív oxigén intermedierek szerepe halak úszóhólyag gyulladásos megbetegedéseiben 17

2.5. A kísérleteinkben használt peszticidek kémiai szerkezete és hatásmechanizmusa 18

2.5.1. Réz-szulfát 18

2.5.2. Paraquat 20

2.5.3. Metidathion 24

2.5.4. Deltamethrin 25

3. Anyagok és módszerek 27

A kísérletekben használt általános eljárások 27

3.1. Réz-szulfát hatása halakra 29

3.2. Különböző peszticidek ($CuSO_4$, PQ, MD) hatása ponty bélcsatorna és vérplazma AChE aktivitásaira 31

3.3. Deltamethrin hatása pontyokra 31

3.4. Szabad gyökök és reaktív oxigén intermedierek szerepe halak úszóhólyag gyulladásos megbetegedéseiben 32

4. Célkitűzések 33

4.1. Réz-szulfát hatása halakra 33

4.2. Különböző peszticidek ($CuSO_4$, PQ, MD) hatása ponty bélcsatorna és vérplazma AChE aktivitásaira 33

4.3. Deltamethrin hatása pontyokra 34

4.4. Szabad gyökök és reaktív oxigén intermedierek szerepe halak úszóhólyag gyulladásos megbetegedéseiben 34

5. Eredmények és értékelésük 35

5.1. Réz-szulfát hatása halakra 35

5.1.1. Különböző halfajok érzékenysége $CuSO_4$-ra 35

5.1.2. A halak érzékenysége alacsony O_2 koncentráció és $CuSO_4$ kombinált hatásra 39

5.1.3. A halak érzékenysége alacsony pH és $CuSO_4$ kombinált hatásra 41

5.2. Különböző peszticidek ($CuSO_4$, PQ, MD) hatása ponty bélcsatorna és vérplazma AChE aktivitásaira 44

5.2.1. $CuSO_4$, PQ, MD hatása ponty bélcsatorna AChE aktivitásaira 44

5.2.2. $CuSO_4$, PQ, MD hatása ponty vérplazma AChE aktivitására 48

5.3. Deltamethrin hatása pontyokra 52

5.4. Szabad gyökök és reaktív oxigén intermedierek szerepe halak úszóhólyag gyulladásos megbetegedéseiben 62

6. Összefoglalás 67

6.1. Réz-szulfát hatása halakra 67

6.2. Különböző peszticidek ($CuSO_4$, PQ, MD) hatása ponty bélcsatorna és vérplazma AChE aktivitásaira 68

6.3. Deltamethrin hatása pontyokra 68

6.4. Szabad gyökök és reaktív oxigén intermedierek szerepe halak úszóhólyag gyulladásos megbetegedéseiben 69

7. A felhasznált irodalom jegyzéke 71

Kapcsolódó irodalom 83

A disszertáció anyagából megjelent közlemények jegyzéke 87

Köszönetnyilvánítás

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ACh	acetilkolin
AChE	acetilkolinészteráz
AThCh	acetiltiokolin
ATP	adenozin-trifoszfát
ATP-áz	az ATP-ot bontó enzim
BuCh	butirilkolin
BuChE	butirilkolin-észteráz (= pszeudokolin-észteráz)
Cat	kataláz enzim
ChE	kolinészteráz enzim
DM	deltamethrin
DTNB	2,2'-dinitro-5,5'-ditiobenzoesav
GOT	Glutaminsav-oxálecetsav-transzamináz enzim
GP-áz	Glutation-peroxidáz enzim
GPT	Glutaminsav-piroszőlősav-transzamináz enzim
LC_{50}	50 %-os letális koncentráció (Az adott szer azon koncentrációja, amely a kísérleti állatok felének elpusztulását okozza adott idő alatt. Általában 96 órára vonatkoztatják.)
LDH	Tejsav-dehidrogenáz (laktát-dehidrogenáz) enzim
M	mólos oldat (1 mol anyag/dm^3 oldat)
MD	methidation
MDA	malondialdehid
N	normál oldat
NADP	nikotinsavamid adenin-dinukleotid monofoszfát
NADPH	NADP redukált alakja
P_i	inorganikus foszfát

ppb	µg/l (pars per billion)
ppm	mg/l (pars per million)
PQ	paraquat
SOD	szuperoxid-dizmutáz enzim
TCA	triklórecetsav
U-40-WP	Ultracid 40 WP (hatóanyaga: methidation)

1. BEVEZETÉS

A XX. századi ember mindennapi tevékenysége következtében erőteljesen beavatkozik természetes környezetébe különféle szennyezőanyagok kibocsátása révén, így az utóbbi időben egyre égetőbb problémává vált környezetünk szakszerű védelme. E tevékenység első lépése, hogy pontosan felismerjük és kimutassuk azokat a káros hatásokat, amelyek az élő szervezetek normális működését befolyásolják. A környezetszennyezés problémája mára oly kiterjedté vált, hogy belátható időn belül az emberiség biológiai létét is megkérdőjelezheti.

A termelés, felhasználás során bekövetkező szennyeződések rövid idő alatt nagy távolságra juthatnak el a levegő, valamint a vizek gyors mozgása révén. A levegőből kiülepedő, kimosódó, majd a folyóvíz szállította toxikus anyagok így keletkezési helyüktől távol fejthetik ki pusztító hatásukat, gyakran igen rövid idő alatt.

A fejlődéssel, a kemikáliák expanziójával párhuzamosan szükségessé vált a kedvezőtlen hatások kivédése, a környezeti kockázat minimálisra való csökkentése. A hatvanas évektől folynak a fejlett ipari országokban alap- és alkalmazott kutatások a környezetpusztítás összefüggéseinek megértésére. Ennek eredményeként fejlődött ki szinte új tudományágként a környezetvédelmi biokémia.

Saját természetes környezetünk fenntartása, megőrzése mindannyiunk érdeke, hiszen az ember, bár egyre inkább egy mesterséges környezetet igyekszik kialakítani maga körül, biológiai lény, így az élethez szükséges alapvető feltételeket a természet biztosítja számára (például víz, oxigén, élelem). Ugyanakkor azt is figyelembe kell vennünk, hogy az ember a táplálkozási lánc csúcsán helyezkedik el, így végeredményben az összes élőlényt ért káros hatás előbb-utóbb rajtunk is érezteti hatását. Külön ki kell emelni, hogy például a nehézfém tartalmú peszticidek, és még számos más anyag is képes a bioakkumulációra, ezért a szervezetben feldúsulva ezek károsító hatása évek múlva is jelentkezhet, annak ellenére, hogy a kémiai analízis során oly kis koncentrációban mutatható ki, amely még

veszélytelen az élő rendszerekre (Salánki, Balogh és Berta, 1982; Nemcsók, Orbán, Asztalos és Vígh, 1987).

Kutatómunkánk során a kémiai környezetszennyezés 3 fő területe közül (talaj, víz, levegő) a vizek szennyezettségét vizsgáltuk. Vizeink környezetszennyező forrásaként 3 fő tényezőt kell kiemelnünk:

1. A korszerű és termelékenyebb mezőgazdaság igen sok kemikáliát használ műtrágya, gyomirtószer, rovarirtószer és növényvédő anyag formájában. A túladagolás viszont rendkívüli károkat tud okozni a talajvizeken keresztül beszivárogva a természetes és mesterséges vizekbe, károsítva az ott élő élőlények mindegyikét.
2. Az urbanizáció gyors hazai terjedésével kapcsolatosan a hazai települések számottevő részén nem megoldott a kommunális szennyezés megfelelő elvezetése, a szennyvizek mechanikai-kémiai-biológiai úton történő tisztítása.
3. Az iparosodás fokozott térnyerésének következménye, hogy álló- és folyóvizeink mellett nő az ipari szennyezés.

Az ilyen jellegű szennyezések vízi élőlényekre gyakorolt kártékony hatásai három fő kategóriába sorolhatók: a xenobiotikumok közvetlen toxikus hatása a vízi szervezetekre, a vízben oldott oxigén csökkenése a szennyezések hatására, végül pedig a más szervezetek számára táplálékként szolgáló élőlények kellemetlen íze illetve szaga (Phipps, Holcombe és Fiandt, 1981).

Mivel a vízi táplálkozási lánc csúcsán a halak helyezkednek el, így ezek vizsgálatával a vízminőség változásai különösen jól jellemezhetők. Ezért vizsgáltuk kísérleteinkben a vizek kísérleti állatokra (esetünkben halakra) tett hatását. Ennek az úgynevezett biomonitoring eljárásnak egyik fő értéke, hogy a különböző szövet- és szervkárosodásokat enzimatikusan tesztelve, valamint a halakat ért stresszhatást mérve lényegesen kisebb mérvű vízminőség változás detektálható, mint a hagyományos kémiai módszerekkel; a vizek állapotának romlása illetve javulása már olyan szinten észlelhető illetve modellezhető, amikor az még nem okoz irreverzibilis változást a kísérleti állatoknál.

Mindezeken túlmenően az élővizekbe bejutó különböző szennyeződések egyidejű jelenléte additív és/vagy potencírozó károsító hatást okozhat a vízi élő szervezetekben, így a halakban is.

A xenobiotikumok azonban nemcsak a felnőtt korú halakra veszélyesek, de működési zavarokat válthatnak ki az egyedfejlődés embrionális fázisában is. Több szerző számol be arról is, hogy a környezetszennyező anyagok által okozott toxikus hatás csökken vagy éppen felerősödik a vízminőséget befolyásoló egyéb paraméterek változásával. Számos paraméter mellett az elsődleges befolyásoló tényezők a pH, a vízhőmérséklet, a víz keménysége, és oldott oxigén tartalma (Zitko és Carson, 1976; Pascoe, Evens és Woodworth, 1986). A károsító hatások - különösen a szubletálisak - emellett lassítják a szervezet túlélés szempontjából lényeges mechanizmusait (pl. táplálékszerzés, menekülés, stb.) a normális metabolikus folyamatok révén létrejövőkhöz képest, és gyakran elnyomják az immunrendszer aktivitását is különböző biokémiai folyamatok révén.

A különböző nem természetes vegyületek széles körű és nagy mennyiségben való használata felhívja figyelmünket az ilyen jellegű anyagok vízi környezetre tett toxicitásával kapcsolatban. Ez a felfokozott figyelem kiterjedt a xenobiotikumok halakra tett hatására is, közelebbről azoknak a biokémiai paramétereknek a vizsgálatára, amelyek a máj, a vese, a kopoltyúk és az idegrendszer károsodását jelzik (Kristoffersson, Broberg, Oskari és Pekkarinen, 1974; Nemcsók és Boross, 1982; Benedeczky, Bíró és Schaff, 1984).

Mindezek miatt - elsősorban a figyelem fokozottabb felkeltése céljából - szükségesnek éreztük szubletális koncentrációban alkalmazott xenobiotikumok hatásait kimutatni halakban akváriumi és természetes körülmények között.

A természetes vizekben előforduló szennyezések komoly szövetkárosodásokat is okozhatnak a halakban (McKim, Christiensen és Hunt, 1970; Reichenbach-Klinke 1972; Horváth és Stammer, 1979; Rojik, Nemcsók és Boross, 1983; Benedeczky, Bíró és Schaff, 1984). Így azon az enzimek aktivitás változása a vérplazmában, amelyek sejtpusztulások révén kerülhetnek a véráramba, fontos jelző értékkel bír a szövetpusztulások biokémiai detektálása tekintetében (Kristofferson, Broberg, Oskari és

Pekkarinen, 1974; Nemcsók, Benedeczky, Boross, Asztalos és Orbán, 1981; Nemcsók és Boross, 1982).

Munkánk során a halak olyan biokémiai paramétereinek változásait vizsgáltuk, amelyek a vízi környezetnek már igen csekély, kedvezőtlen változása során bekövetkezhetnek. Ezek elsősorban azok az enzimaktivitás változások, amelyek jelzik az egyes szövetek nekrózisát, az idegrendszer károsodását valamint az általános stresszhatás mértékét.

A vizsgálatok elvi alapjai

A különböző környezeti hatások és toxikus ártalmak miatt bekövetkező szövetkárosodással járó kórfolyamatoknak érzékeny jelzői az egyes enzimaktivitás értékek változásai a vérplazmában.

A toxikus anyagok méregtelenítése a májban történik. Nagy mennyiségű toxikus anyag detoxikációja során a májsejtek egy része szétesik, nekrotizál. Bell (1968) vizsgálta májmérgezések hatását a vérplazma glutaminsav-oxálecetsav-transzamináz (GOT, EC 2.6.1.1.) aktivitásának változására magas dózisú brómbenzol és széntetraklorid kezelést követően. Eredményei azt mutatták, hogy a kezelt halakban szignifikáns GOT aktivitás növekedés volt. Kisebb mérvű vérplazma GOT aktivitás növekedést észlelt beteg veséjű halaknál is a kontroll egyedekhez képest. Ez utóbbi ellenére a vérplazma GOT aktivitás mérése legelterjedtebben a májsejt lézió kimutatására használatos, ez az enzim ugyanis főleg a májban fordul elő, csak kisebb mértékben a vesében és az izmokban, így aktivitásának szintje a vérben a májparenchyma sejtek nekrózisakor növekszik meg.

Kristofferson, Broberg, Oskari és Pekkarinen, (1974) arról számoltak be, hogy 5 ppm fenol hatására megnövekedett a GOT és a glutaminsav-piroszőlősav-transzamináz (GPT, EC 2.6.1.2.) aktivitása csuka *(Esox lucius* L.) vérében. A GPT minden szövetben előfordul, legnagyobb mennyiségben azonban a vesében és a májban. Onishi és Murayama (1970) azt találta, hogy a máj GOT aktivitása a különböző halfajoknál nem mutat nagy eltérést. Megemlítik azt is, hogy a vér GOT és GPT aktivitásának növekedése leggyakrabban a májkárosodás velejárója, de főleg GPT esetén más szervek (vese és/vagy kopoltyú) nekrózisakor is észlelhető.

Az tejsav dehidrogenáz (LDH, EC 1.1.1.27.) régóta elfogadottan használt a szövetkárosodások jelzésére (Kristofferson, Broberg, Oskari és Pekkarinen, 1974; Nemcsók és Boross, 1982), az LDH aktivitás megnövekedett értékei a vérplazmában ugyanis szövetkárosodásra utalnak, anélkül, hogy tudnánk melyik szövetfajta pusztulása felelős a vérplazma megnövekedett aktivitásáért. Asztalos és Nemcsók (1985) vizsgálatai szerint a szervspecifikus LDH izoenzimek megjelenése gélelektroforézissel kimutatható. Halakban a szívizom, a vázizom és a bőrszövetek tartalmazzák legnagyobb mennyiségben az LDH-t . Enzimaktivitásának növekedése a vérplazmában tehát elsősorban e szövetek nekrózisának tudható be.

Az eddig felsorolt enzimeknek (GOT, GPT, LDH) fokozott jelenléte a vérszérumban tehát a különböző szervekben bekövetkezett sejtnekrózisokra utal, így mennyiségileg is jelezheti az esetleges szövetpusztulások mértékét (Reichenbach-Klinke, 1972; Nemcsók, Oláh és Boross, 1982; Nemcsók, Asztalos, Vígh és Orbán, 1987).

Biokémiai és farmakológiai szempontból az acetilkolinészteráz (AChE, EC 3.1.1.7.) azon enzimek közé sorolható, amelyek az utóbbi öt évtizedben a legintenzívebben vizsgáltak közé tartoznak.

Az AChE szinte valamennyi szervben és szövetben előforduló enzim. Mivel funkciója az idegingerület átvitelében fontos szerepet játszó acetilkolin elbontása az idegingerület áttevődése után, az enzim aktivitásának csökkenése fontos jelzője az idegrendszer károsodásának.

A szerves foszforsavészterek és karbamát típusú inszekticid szennyezések tesztelésére többen javasolják halakban az AChE enzim gátlását, mivel ez tökéletes jelzője az ilyen jellegű expozíciónak (Holland, Coppage és Butler, 1967), a legtöbb inszekticid ugyanis már kis koncentrációban gátolja a kolinészterázokat (Coppage, 1971; Coppage és Matthews, 1975; Coppage, Matthews, Cook és Knight, 1975; Coppage és Braidech, 1976; Klaverkamp és Hobden, 1980).

E felismerés alapján jól detektálható a vízi környezetben megjelenő szerves foszforsavészterek (így a legelterjedtebb inszekticidek, peszticidek)

jelenléte, amelyek az AChE-t gátolják, s az élőlények jelentős részénél (így a halaknál is) idegi károsodást okoznak.

Az élő szervezetekben az oxigénnek kettős szerepe van. Egyrészről esszenciális az aerob szervezetek zavartalan metabolizmusának kialakulásához, másrészt az oxigén eredetű szabad gyökök erőteljes károsító hatást fejtenek ki a normális biológiai folyamatokra. A molekuláris oxigén (O_2) esetében egy egy-elektronos redukció úgynevezett szuperoxid (O_2^-) gyök keletkezését eredményezi. Energia elnyelés révén a molekuláris O_2 egyik elektronja magasabb energia állapotba kerülhet. Az O_2 ezen, energetikailag magasabban töltött állapotát nevezik singlet-oxigénnek is. A meglehetősen reaktív intermedierként ismeretes hidroxil gyök a két oxigén atom közötti hasításból származik. Természetesen nem minden O_2-ból származó termék gyök természetű (például H_2O_2), utóbbiakat reaktív oxigén intermediereknek (ROI) nevezik.

Számos vegyület az élő szervezetbe jutva metabolizmusa során szabadgyökök és/vagy reaktív oxigén intermedierek képződését eredményezi. Hasonló hatást eredményezhetnek hipoxiás körülmények is. A szabadgyök reakciókban szerepet játszó enzimek biztosítják az élőlényeknek az aerob környezethez való alkalmazkodás feltételeit, aminek jelentősége az immunrendszerhez hasonló. Ezek az enzimek felelősek a szabadgyökök károsító hatásának kivédéséért. Így a glutation-peroxidáz (GPáz, EC 1.11.1.7.), a kataláz (Cat, EC 1.11.1.6.) és a szuperoxid-dizmutáz (SOD, EC 1.15.1.1.) enzimeknek éppen a reaktív oxigén intermedierek eliminálásában van fontos szerepe. A H_2O_2 lebontásáért a GPáz és a kataláz felelős, míg a SOD neutralizálja az O_2^--t. A GPáz ezen felül elsősorban a szerves peroxidok átalakításában játszik fontos szerepet.

Mivel a felsorolt enzimek szabadgyökök jelenlétével indukálhatók, aktivitásuk mérésével következtethetünk a szervezetet ért, szabadgyököktől származó károsító hatás jelenlétére és mértékére. A SOD aktivitás általában a májban a legnagyobb, így az enzim aktivitásának toxikus hatásra bekövetkező változásai legjobban e szervben detektálhatók (Matkovics, Novák, Hahn, Szabó és Varga, 1977a, és 1977b; Radi, Hai Matkovics és Gabrielak, 1985).

A halak szervezetében található ATP-ázok jelentős többségükben membránkötött enzimek. Aktív állapotuk fenntartásához intakt membránstruktúra szükségeltetik. Így az enzim aktivitásának csökkenése az általános membrán destrukció mértékére szolgál felvilágosítással.

A vércukorszint - korábbi eredményeink, megfigyeléseink alapján - jól tükrözi a halakat ért általános stresszhatást, miként az az emlős állatok esetében és az embernél is jól ismert jelenség (Wedemeyer, 1970; Nemcsók és Boross, 1982).

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. Réz-szulfát hatása halakra

Reichenbach-Klinke (1972) réz-szulfát kezelés hatására kopoltyú károsodásról számol be. Schreck és Lorz (1978) kísérleteiben réz kezelésnek kitett halak kopoltyújában glomeruláris atrofiát és epiteliális nekrózist tapasztaltak.

Más szerzők szerint a réz a szervezetben más helyeken is fejthet ki károsító hatást. Ponttyal végzett kísérletekben 1.5 ppm réz koncentráció mellett kopoltyú, máj-, vese- és idegrendszeri károsodást észleltek. Ugyanilyen koncentrációban a réz a pontyok számos vérparaméterében is kedvezőtlen változást okozott: szignifikánsan megemelkedett a hematokrit, a hemoglobin és protein tartalom a vérben csakúgy, mint a glükóz koncentrációja. Egyidejűleg a leukociták számának csökkenését is észlelték (Svobodova, 1982).

Reichenbach-Klinke (1972) szerint a réz károsító hatását tekintve a legnagyobb mértékben érintett célszerv a halaknál a kopoltyú epitélium, míg Schreck és Lorz (1978) véleménye szerint mind a kopoltyú, mind a vese károsodhat.

Rojik, Nemcsók és Boross (1983) elektronmikroszkópos vizsgálataikkal igazolták az említett megállapításokat. Cikkükben réz okozta elváltozásokat írnak le ponty, busa és harcsa kopoltyújában májában és veséjében, elsősorban az endoplazmatikus retikulum és a mitokondriumok károsodásának következményeként.

Réz-szulfát szennyezés AChE gátló hatásáról számolt be Olson és Christensen (1980). Ez rendkívül veszélyes, mivel gátlódik a normális idegműködés és különböző normális viselkedési mechanizmusok, amelyek esszenciálisak például a táplálékszerzési folyamatokban vagy a defenzív menekülési reakciókban.

Más szerzők (Howarth és Sprague, 1978) azt tapasztalták, hogy a réz sokkal toxikusabb pH=5.4 értéken, mint pH=7.3 értéken. Ezzel szemben Miller és Mackey (1980) azt találta, hogy a réz kevésbé toxikus 4.3 -4.7 közötti pH értéken, mint 7.3 pH-nál. Ők azt sugallják, hogy bár a savasság és a fémek együttesen stimulálják a nyálka termelődést, a savasság általi stimulus a predomináns, ezáltal réz-kelát képződik, így csökken a réz toxicitása.

Az előzőekben felsoroltak kapcsán a réz-szulfátnak, mint a mezőgazdaságban széleskörben alkalmazott fungicidnek a toxikus hatását vizsgáltuk néhány ökológiai tényező változásával egyidejűleg (vízhőmérséklet, pH, oldott oxigén). Célunk az volt, hogy modellezzük a réz-szulfát mérgező hatásának mértékét különböző ökológiai paraméterek mellett, ezzel mintegy előrejelzést adva a lehetséges, és adott körülmények mellett bekövetkező környezetkárosító hatásokról.

2.2. Különböző peszticidek ($CuSO_4$, PQ, MD) hatása ponty bélcsatorna és vérplazma AChE aktivitásaira

A növényvédőszerek közül az inszekticidek többsége idegméreg, így jelentősen károsítják a halak idegrendszerét, elsősorban a kolinerg rendszeren keresztül. A halak fiziológiás, neuronális kondíciója jól jellemezhető a kolinerg rendszer paramétereivel. Ezen rendszer alapvető részei a kolinészteráz enzimek.

Különösen veszélyes az acetilkolinészteráz enzim gátlása, mely enzim jelenléte és hiánytalan működése elengedhetetlen a szinapszisokban végbemenő idegingerület átvitel szempontjából. A gátlás súlyos esetekben jellegzetes görcsös merevedéssel járó tömeges halpusztulást okozhat. A kolinészteráz működését gátló inszekticideket igen elterjedten használják hazánkban is, ezért nagyon fontos annak meghatározása, hogy vízi szervezetek ezen anyagok milyen koncentrációját tűrik el károsodás nélkül.

Normális működés esetén az ingerület hatására a preszinaptikus vezikulumokban tárolt acetilkolin (ACh) felszabadul és a posztszinaptikus sejt membránján lévő receptor fehérjéhez kapcsolódva megváltoztatja annak konformációját. Ennek következményeként megváltozik a membrán ionáteresztő képessége, ami depolarizációhoz vezet. A nyugvó véglemezen

az egyenlőtlen ioneloszlás következtében egy - 75 mV-os potenciálkülönbség alakul ki, melyet a Na^+-K^+-ATPáz enzim működése tart fenn aktív transzporttal. ACh hatására a membrán áteresztővé válik a Na^+ és K^+ ionra nézve - a sejtbe, passzív transzporttal, nagymennyiségű K^+ áramlik be és Na^+ áramlik ki -, az ioneloszlás kiegyenlítődik, és a potenciálkülönbség 0-ra csökken. Az ioneloszlás megváltozása új "áramköröket" alakít ki, ami az érintkezési pontokban jelentős stimulust képvisel, hatására kialakul az ingerület (pl. izom összehúzódás).

A nyugalmi állapot helyreállítása, ami új ingerület továbbításának is alapfeltétele, egy ellentétes irányú ionmozgással történik. Ehhez azonban vissza kell állnia a membrán eredeti permeabilitásának, amit a receptor fehérjéhez kötött ACh elbontása útján lehet elérni. A nyugalmi állapot helyreállítását az AChE segíti elő az ACh hidrolízise révén.

A különböző kolinészteráz gátlók hatására tehát az ACh nem, vagy a normálisnál jóval lassabban bomlik, így a posztszinaptikus membrán ioncsatornái folyamatosan nyitva vannak. Ennek eredményeként a nyugalmi potenciál nem tud helyre állni, súlyos esetekben jellegzetes görcsös merevedéssel járó tünetek jönnek létre, amelyek végül a légzőizmok görcse miatt fulladáshoz vezethetnek.

Különösen veszélyes az AChE gátlása a halak szívében, mivel annak beidegzésében a kolinerg rendszer jelentős szereppel bír. Ilyenkor az AChE gátlás a vagus hatásának fokozásához vezethet, amely súlyos zavarokat okoz a keringéssel összefüggő élettani folyamatokban. Csökkenhet az O_2 felvétel, ami szöveti szinten anoxiához, végső soron tömeges halpusztuláshoz vezethet.

A különböző halfajok egyes szerveiben meghatározott kolinészteráz milyenségét illetően számos irodalmi adat áll rendelkezésre. Legkorábban Augustinsson (1948) foglalkozott a halakban előforduló kolineszterázokkal. Azt találta, hogy a különböző halfajok agyában, májában, úszóhólyagjában, vázizmában, szívében nem található butirilkolinészteráz, csak acetilkolinészteráz. Később a szérumban is detektálni tudta az AChE-t (Augustinsson, 1959).

2.3. Deltamethrin hatása pontyokra

Kísérletesen vizsgálva a DM hatását nem találtak különbséget hideg és meleg vízi halfajok között (Stephenson, 1982). Úgy tűnik, hogy a DM halakra kifejtett hatása magas és alacsony vízhőmérsékletnél azonos, annak ellenére, hogy más szerzők hideg vízben kevésbé mérgezőnek találtak számos piretroidot (Kumaraguru és Beamish, 1981). A piretroidok (beleértve a DM-t) toxicitásának mértékét a víz pH-jának nagysága sem befolyásolja (Mauck, Olsen és Marking, 1976).

Vizsgálatainkban arra voltunk kíváncsiak, hogy a DM akváriumi kezelésekben milyen biokémiai, fiziológiai elváltozásokat okoz. Néhány enzim biokémiai vizsgálatát elemeztük ponty szöveteiben. A kezelt és kontroll állatokban GOT, GPT, LDH, és AChE aktivitásokat határoztunk meg vérszérumból, mely értékek a halakat ért szöveti károsodásokat jelzik (Wrobelski és La Due, 1955; Kristoffersson, Broberg, Oskari és Pekkarinen, 1974; Nemcsók és Boross, 1982; Asztalos és Nemcsók, 1985). Vizsgáltuk a vércukorszint változását is, ami az állatok általános stresszeltségi fokát mutatja. Mértük továbbá a máj kataláz aktivitását, ami a szervezetben folyó szabadgyök eliminálló folyamatok érzékeny indikátora, és az eritrocita membrán ATPáz aktivitásait, ami az általános membrándestrukció mértékére szolgál fölvilágosítással. Vizsgálatainkat az 1991. évi balatoni angolnapusztulással kapcsolatos korábbi méréseink motiválták, az akkori élő angolnákban ugyanis az említett paraméter erőteljes változását észleltük, illetve a tetemekben DM szermaradvány volt kimutatható (Gönczy, 1992).

2.4. Szabad gyökök és reaktív oxigén intermedierek szerepe halak úszóhólyag gyulladásos megbetegedéseiben

Az úszóhólyag gyulladást (*aerocystis)* a halaknál elsőként német szerzők írták le (Hofer, 1904; Fieber, 1913), akik a betegséget paraziták, elsősorban Coccidiumok nagymérvű jelenlétének tulajdonították. Magyarországon elsőként Szakolczai (1967) számolt be úszóhólyag gyulladásról, amit 3 nyaras pontyoknál (*Cyprinus carpio* L.) észlelt.

Az úszóhólyag gyulladást sokáig ismeretlen eredetű betegségként kezelték, jóllehet néhány szerző vírusfertőzés által kialakult betegségnek tartotta

(Arshanica 1969; Ahne 1973), míg mások baktérium fertőzéssel hozták összefüggésbe (Szakolczai, 1967; Schäperclaus, 1979). Kovács-Gayer, Csaba, Békési, Bucsek, Szakolczai és Molnár (1982). Körting (1982) Myxozoa-kat talált az úszóhólyag falában a betegség akut formájának különböző fejlettségi fázisaiban. Kovács-Gayer (1983) azt figyelte meg, hogy gyulladásos esetekben az úszóhólyag falán legtöbbször laza szálak figyelhetők meg. Csaba, Kovács-Gayer, Békési, Bucsek, Szakolczai és Molnár (1984) tisztázták, hogy ezek a *Sphaerospora angula* különböző fejlődési állapotainak felelnek meg, így az úszóhólyag gyulladás egy protozoa által kiváltott betegség (Molnár, 1988).

Említett szerzők azt is kimutatták, hogy a parazitikus állapot csak a gyulladás korai stádiumára jellemző, a másodlagos baktérium fertőzés pedig az úszóhólyag falának említett megvastagodásával és a hólyag gennyes váladékával van összefüggésben.

2.5. A kísérleteinkben használt peszticidek kémiai szerkezete, és hatásmechanizmusa

2.5.1. Réz-szulfát

A réz-szulfátot eleinte herbicidként alkalmazták búzában a gyomok irtására, majd fungicidként gabona rozsda ellen. Széleskörűen a bordói-lé felfedezése után kezdték alkalmazni, ami nevét első alkalmazásának helyéről, Bordeaux városáról kapta. A bordói-lé formátum $CuSO_4$-ot (4.5 kg) és $Ca(OH)_2$-ot (5.5 kg) tartalmaz vízben (451 l) oldva.

A bordói-lé hosszan tartó hatású, széles spektrumú fungicid, és levélpermetként alkalmazva igen hatékony Peronospora, Phytophthora és Cercospora fajok ellen is.

A réz tartalmú fungicidek a mai napig is igen nagy mennyiségben használatosak a mezőgazdaságban. Magyarországon a következő réz-szulfát tartalmú termékek kaphatók a kereskedelmi forgalomban:

Blue stone (Kékkő): 96% réz-szulfát
Bordói-lé: 45% réz-szulfát

Hatásmechanizmusa:

A fém tartalmú vegyületek fungicid hatásának erőssége az adott fém kelátképző képességével van összefüggésben. Az ilyen folyamatokban a kation elektron-negativitása játszik fontos szerepet, mivel ez szabja meg a fém kötéserősségét akár a fém-kelátok, akár a fém-szulfidok, -szulfátok esetén. A kationok gombaölő hatásának relatív erőssége az alábbi - csökkenő - sorrendben változik: Ag, Hg, Cu, Cd, Cr, Ni, Pb, Co, Zn, Fe, Ca. A fémek mérgező hatásának erőssége azok periódusos rendszerben elfoglalt helyével függ össze. A fungicid hatás mértékét ugyanis valószínűleg a sejtfalban található fém-komplexek kovalens vagy koordinatív kötéseinek erőssége szabja meg.

A réz tartalmú vegyületek gombaölő hatásának alapja, hogy a Cu^{2+} ion a sejtekbe jutva komplexet képez az ott található tio- és amino csoportokkal, így specifikusan gátolja számos enzim és más fehérje működését.

Hochstein, Kumar és Forman (1980) szerint a réz szabadgyök generáló hatással is rendelkezik, ugyanis elősegíti a ferro-hemoglobin autooxidációját methemoglobinná, miközben szuperoxid gyök szabadul fel.

$$HbFe^{2+} + O_2 \rightarrow HbFe^{3+} + O_2^-$$

Az így létrejött szuperoxid gyök dizmutációja során hidrogén-peroxid keletkezik, ami szintén erősen citotoxikus.

$$2O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$$

A folyamat elsődleges következménye a sejtmembránok károsodása, mivel a membránokban található aktív -SH csoportok diszulfid hidakká oxidálódnak. E folyamat során a réz kupro formája játszik fontos szerepet, mivel ez képes a molekuláris oxigénnel reagálni egy rendkívül gyors reakcióban, amely azután szuperoxid gyökök képződésével jár.

$$Cu^+ + O_2 \rightarrow Cu^{2+} + O_2^-$$

$$\text{membrán S-S} + Cu^+ + O_2 \xrightarrow{\text{lipid peroxidáció}} \text{membrán -SH} + Cu^{2+} + O_2^-$$

Az ily módon megnövekedett mértékű lipid peroxidáció általában membrán károsodásokhoz vezet.

Kísérletek sora bizonyítja, hogy a réz mérgező hatása elsősorban a vízi élőlényeket fenyegeti. Singleton és Guthrie (1977) 2 ppm réz-szulfátot tartalmazó víz baktérium flóráját a kontrollal összehasonlítva azt találták, hogy a fém jelenlétében lecsökkent a baktérium állomány stabilitása, felborítva ezáltal a populáció természetes egyensúlyát. A réz szennyezés tehát nem feltétlen okoz mortalitás növekedést, viszont egyértelműen kedvezőtlen irányba befolyásolja a vízi élőlények metabolikus folyamatait.

Alacsony keménységi fokú és kissé savas (pH=6) vízben 0.002 ppm (tehát 2 ppb) Cu^{2+} 5-6 g testtömegű pisztrángok súlygyarapodását 25%-kal (!) vetette vissza (Wainwood és Beamish, 1978).

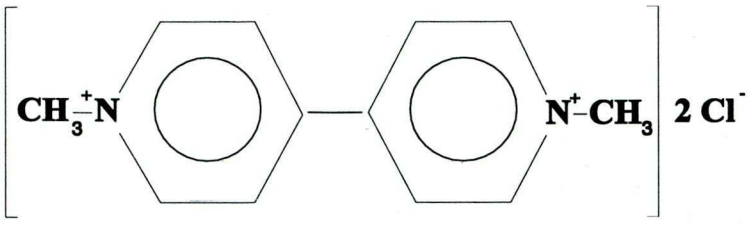
Yamamoto, Ishii és Ikeda (1977) kimutatták, hogy 0.1 ppm réz-szulfát tartalmú vízben két hétig tartott pontyok belső szerveinek réz tartalmát összehasonlítva a kontroll halak megfelelő értékeivel, a hepatopankreász, a kopoltyú, a bél és a vese réz koncentrációja 2-6-szorosára növekedett meg. Ilyen mérvű réz akkumuláció már feltehetőleg gátolja a normális fiziológiás folyamatokat.

2.5.2. Paraquat

A kvaterner ammónium származékok mérgező hatása régóta jól ismert. E csoport néhány tagja, mint például a cetil-trimetil-ammónium bromid antibakteriális hatása miatt régóta használatos. Ezek gombaellenes hatása viszont csak nem rég óta ismert, és gyakorlati alkalmazásukat korlátozta az a tény, hogy a növények kiszáradását okozhatják.

Ez utóbbi hatás felismerése indította el 1958-ban azokat a kutatásokat, amelyek eredményeként létrejött a bi-piridillium típusú herbicidek legismertebb képviselője, a paraquat (PQ; 1,1'-dimethyl-4,4'-bipiridillium-diklorid; 2. ábra).

A PQ széles körben alkalmazott növényi desszikáns. Hatásmechanizmusa szerint átmenetet képez a kontakt és a hagyományos módon használt szerek között. Levél herbicidként használatos, gyors felszívódási képessége miatt. Nem szelektív herbicid, mivel a permetezést követően mindenfajta növényt elpusztít néhány napon belül.



2. ábra. A paraquat-diklorid képlete.

PQ a hatóanyaguk a következő, kereskedelmi forgalomban kapható termékeknek:

Gramoxon: 24 % PQ-diklorid
Gomex: 28 % PQ-dimetil-szulfát

Mi az előbbi szert alkalmaztuk méréseink során.

Hatásmechanizmus:

A PQ vízben könnyen oldódó, vizes oldatban tökéletesen disszociáló vegyület. Az így létrejött pozitív töltésű PQ ion a növénybe hatolva toxikus hatását a fotoszintetikus elektrontranszportlánc gátlásán keresztül fejti ki. Kompetitív módon gátolja a ferredoxin redukcióját az I. sz. fotoszintetikus rendszerből származó elektronok elfogása által, és így korlátozza az említett folyamatokban az NADPH keletkezését.

Ezekben a folyamatokban a PQ ion relatíve stabil, és vízoldékony szabad gyökké redukálódik. Erre vonatkozóan Kearney és Kaufmann (1975) végzett sikeres kísérleteket növényekből izolált kloroplasztiszokon. E kísérletek tanúsága szerint oxigén hiányos állapot esetén a szabadgyök meglehetősen stabilnak bizonyult, annak ellenére, hogy kísérletesen a gyök könnyen ionná redukálható volt, ez az ion azonban azonnal H_2O_2 formává redukálódott. A PQ esetében általában a H_2O_2-t tulajdonítják fitotoxikus ágensnek, ám az is elképzelhető, hogy más ideiglenesen kialakuló szabad gyökök szintén felelősek a herbicid hatásért.

Emlősökben a PQ ép állapotban lévő bőrön illetve bélcsatornán keresztül lassan szívódik fel. Legrosszabb esetben is csak 5 % a felszívódás mértéke (Conning, Flethcer és Swan, 1969), ugyanakkor 1 mg/kg nedves szövet adszorbeált PQ már halálos lehet (Fisher, Humphries és Bails, 1971). A PQ a véráramba jutva csak lazán kötődik a plazma fehérjékhez, de gyorsan

bejut a szövetekbe (Conning, Flethcer és Swan, 1969), ahonnan 48 órán belül általában kiürül, míg a hatóanyag 20 -30 %-a a szervekben - leginkább a tüdőben - marad, ahonnan csak 2-3 hét múlva tűnik el (Fisher, Humphries és Bails, 1971).

A PQ toxicitás elsődleges célszerve tehát a tüdő, illetve halakban a kopoltyú. A tüdőben az alveólusokat a foszfatidok (kolin és etanolamin foszfatidok) tartják olyan formában, hogy azok ne ragadjanak össze és betöltsék a légző funkciójukat. A PQ többek között a foszfolipidek szerkezetét teszi tönkre, és így az alveólusok összetapadnak.

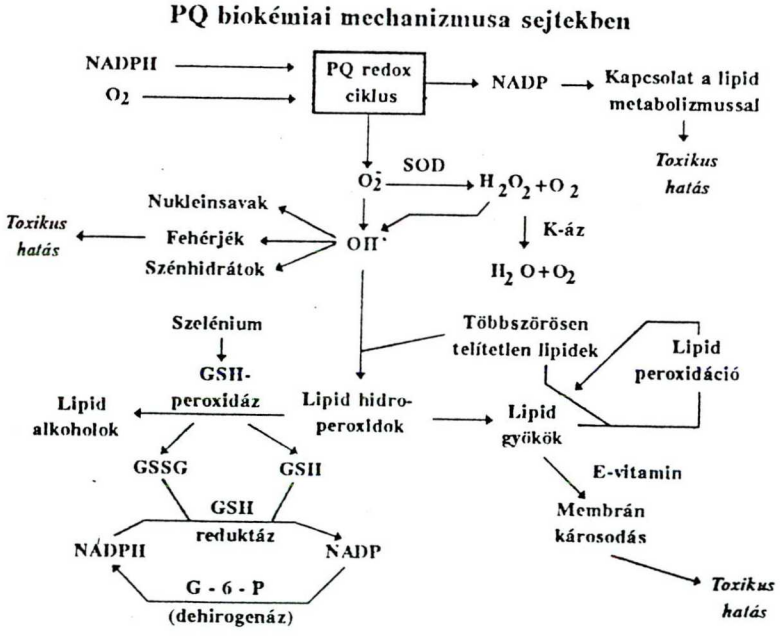
Rose és Smith (1977) kísérleteikben azt találták, hogy miután emberi és különböző állati tüdő szöveteket inkubáltak PQ tartalmú médiumban, az aktív hatóanyag az alveólusok epitélium sejtjeiben akkumulálódott egy energia igényes mechanizmus révén, amelyet 5-hidroxi-triptaminnal és más hisztamin antagonistákkal gátolni tudtak.

A PQ patkányoknál anoxiát, tüdő ödémát, vese elégtelenséget, szívizom károsodást, agresszív viselkedést, valamint prosztaglandin és vércukor szint változást okoz. Ezekből a szimptómákból arra következtethetünk, hogy a tüdő ugyan elsődleges ám nem egyetlen célszerv a PQ toxikus hatása szempontjából, az a májban, szívben, vesében is okoz elégtelenségeket. A mérgezési tünetek sorrendjének vizsgálatából az tűnik ki, hogy elsőként ideiglenes máj és vese funkció zavarok lépnek fel, és a légzés elégtelenség csak következmény, jóllehet az esetek többségében ez utóbbi vezet halálhoz.

A PQ mérgezés esetén jelenlegi tudomásunk szerint nincs ellenszer. Valószínű, hogy a PQ mérgezés mechanizmusa emlősök esetében is hasonló, mint a gyomnövényeknél. A PQ bejutva az emlős sejtekbe egy NADPH függő redox folyamaton megy keresztül, mely szabad gyökök kialakulását eredményezi. Ezek azonnal károsítják a sejtmembránok lipidjeit, miközben lipid-peroxidok keletkeznek (3. ábra).

A PQ mérgezés biokémiai következményei az alábbiak lehetnek:

- intracelluláris NADH koncentráció csökkenés, ezáltal a zsírsav és lipid szintézis gátlása (ez utóbbiak alkotnak védő réteget a tüdő alveolusokon, Fisher, 1977);
- sejtmembrán károsodás a szabad gyökök kiváltotta lipid peroxidáció hatására, ami azt eredményezi, hogy a sejtek elveszítik integritásukat;
- A szétkapcsolt mitokondriális elektrontranszport következtében a sejtek energia ellátásának zavarai;



3. ábra. A paraquat mérgezés feltételezett mechanizmusa emlősökben (Bus, Aust és Gibson, 1974).

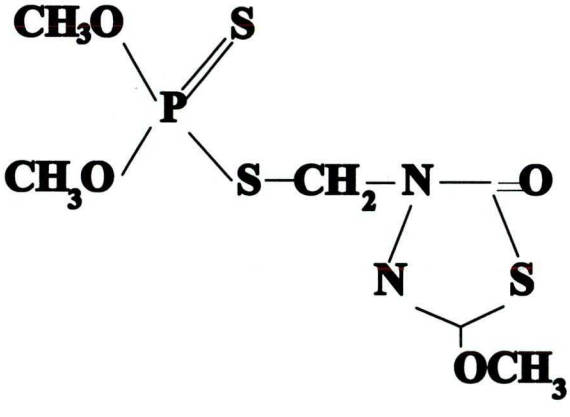
2.5.3. Metidathion

A metidathion (MD; S-2,3-dihidro-5-metoxi-2-oxo-1,3,3'-tiodiazol-e-ilmetil-O,O'-dimetil-foszfoditionát; 4. ábra) Magyarországon széles körben alkalmazott inszekticid a gyümölcsösökben és szőlészetekben. Rovarölő tulajdonságait tekintve elsősorban atkaölő tulajdonsággal rendelkező, lokoszisztematikus, azaz a növény epidermiszébe behatolni képes, de onnan nem transzportálódó szer.

A legnagyobb mértékben alkalmazott formulázott termék az Ultracid 40 WP, ami 40% MD tartalmú. A higiéniai várakozási idő 8 nap, míg a fogyasztásig 28 napos egészségügyi várakozási időt írnak elő a hatóságok. Ez esetben a szermaradvány átlagos mennyisége a gyümölcsben 0.2 ppm.

Egy szerves foszforsavészter biológiailag a következő feltételek mellett aktív:

- egy központi 5 értékű foszfor atomot tartalmaz,
- a központi foszforatomhoz egy oxigén atom kapcsolódik kettős kötéssel vagy két kén atom,
- az R_1 és R_2 szubsztituensek alkil, alkoxi, vagy amino csoportok,
- az acetil csoport egy savmaradék (szerves vagy szervetlen), vagy egy savas karakterű más jellegű csoport pl. enol-merkaptán.



4. ábra. A metidathion képlete.

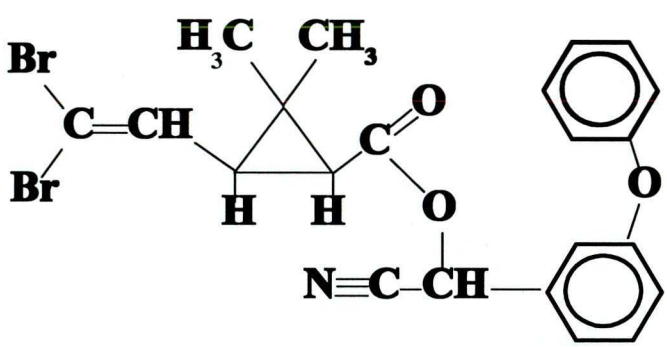
Hatásmechanizmus:

A metidathion nevű új szerves foszforsavészter típusú inszekticidet a Ciba-Geigy Co. mutatta be, mint közvetlen helyi hatású, rovarokra már igen kis mennyiségben mérgező, a növényi epidermiszbe bejutó és ott idővel lebomló vegyületet. Mint AChE gátlást indukáló vegyület - más, P - S kötést tartalmazó tiofoszforsav észterekhez hasonlóan - először oxidatív deszulfuráláson megy keresztül (McLeese és Metcalfe, 1976), és így fejti ki AChE bénító hatását. Ezt az átalakulást a gerincesekben és a rovarokban a kevert funkciójú oxidázok katalizálják, míg a növényekben valószínűleg a peroxidáz enzim segíti elő a folyamatot (Eto, 1974). A rokon vegyületekhez hasonlóan a MD estében is ez a lebomlás első lépése.

Chopade és Dauterman (1981) patkány és egér máj mikroszóma frakcióban azt mutatták ki, hogy - bár kis különbséggel - a fő lebontási út a heterociklusos karakterű P-S kötés hasítása, s a továbbiakban a deszulfurálás és a demetilálás a két fajban tökéletesen megegyezik.

2.5.4. Deltamethrin

A deltamethrin (DM; (S)-α-cyano-3-phenoxybenzyl-(1R)-*cis*-3-[2,2-dibromovinyl]-2,2-dimethylcyclopropane-carboxylate, $C_{22}H_{19}Br_2NO_3$; 5. ábra) a II típusú piretroidok családjába tartozó rovarölő szer.



5. ábra. A deltamethrin képlete.

Kereskedelmi forgalomban Decis 2,5 néven kapható 2.5 mg/ml hatóanyag tartalommal, illetve külön engedéllyel alkalmazható szúnyogirtó szerként K-Othrin 1 ULV néven használják országszerte (ennek hatóanyag tartalma 1 %).

Más piretroidokhoz hasonlóan laboratóriumi körülmények között vizsgálva a DM-t halakra nézve erősen mérgezőnek találták, jóllehet a piretroid rovarirtóknak ezt a típusát a legbiztonságosabb inszekticidek között tartják számon. Elsősorban azért, mert viszonylag gyorsan lebomlanak, melegvérűekre veszélytelenek, és a talajvizekkel szinte egyáltalán nem vándorolnak (mivel vízben igen rosszul oldódnak, talajszemcsékhez viszont erősen kötődnek). Ez utóbbival magyarázható, hogy a laboratóriumi kísérletekben észlelt nagy toxicitás általában nem volt észlelhető szabadföldi kísérletekben. Az ilyen típusú szereket tehát, ha nem vízközelben alkalmazzák, azok veszélyessége a halakra elenyésző.

Hatásmechanizmusa

A DM elsődleges hatása, hasonlóan más piretroidokéhoz abban nyilvánul meg, hogy az idegsejtek membránjában gátolja a Na^+ csatornák bezáródását. Ily módon a GABA receptorok gátlása a II típusú piretroidok hatásának alapmechanizmusa. Ezen felül természetesen számos másodlagos hatás jelentkezik a szervezetben, összességében azonban a DM idegrendszerre tett hatása a legjelentősebb. Számos irodalmi hivatkozás ismeretes a DM másodlagos hatására vonatkozóan is, így az AChE és ATPáz aktivitásokra (Shaker, Hassan, el Nouty, Abo Elezz és Abd Allah, 1988), valamint a noradrenalin és adrenalin szintekre patkányokban (de Boer, van der Gugten, Slangen és Hijzen, 1988), továbbá a kolin transzportra (Matsumura, 1988), kromoszóma aberrációk indukálására, egérben (Bhunya és Pati, 1990), vagy a muszkarin és nikotin típusú ACh receptorok megoszlására (Eriksson és Nordberg, 1990). Ezzel párhuzamosan néhányan beszámolnak a DM halakkal kapcsolatos akut toxicitásának vizsgálatáról is (Zitko, McLeese, Metcalf és Carson, 1979; L'Hotellier és Vincent, 1986).

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

A kísérletekben használt általános eljárások

Tartási, kezelési körülmények

A kísérletekhez használt halakat a legtöbb esetben 100 l-es jól levegőztetett akváriumokban tartottuk. (A kivételeket az adott részeknél külön megemlítem.) A kezelést megelőzően a halakat kb. 1 hétig aklimatizálódni hagytuk. Az kísérletek ideje alatt a halakat nem etettük. A vizsgált hatóanyagokat (a kanülözés kivételével) az akváriumok vizében oldottuk fel.

Szerv homogenizátum készítése

A halakat a fejre mért ütéssel elkábítottuk, majd szerveiket a felnyitott hasüregen keresztül eltávolítottuk. A kiszedett szerveket 1:5 arányban hal fiziológiás sóoldattal (0.62 % NaCl) illetve detergens (Triton X-100) oldatban homogenizáltuk. Ez utóbbit akkor alkalmaztuk, ha membránkötött struktúrákat, anyagokat (is) ki akartunk nyerni.

A homogenizálást követően az elegyet 10,000 g-n centrifugáltuk 10 percig, majd a felülúszót a mérések megkezdéséig fagyasztva tároltuk.

Detergens tartalmú homogenizáló oldat készítése

A homogenizáló oldat összetétele:

- 10 ml 4 M NaCl oldat
- 10 ml 5 %-os Triton X-100 oldat
- 3.1 ml 0.4 M Na-foszfát puffer (pH=7.2)

Az elegyet desztillált vízzel 100 ml végtérfogatra egészítettük ki.

Egyszerű vérmintavétel halakból

A vérmintát a véralvadás gátlás végett heparinozott fecskendőkkel vettük (1-2 ml) a halak farokvénájából (vena caudalis). Az így nyert vért 4°C-on lecentrifugáltuk (5000 g, 10 perc), majd a hemolízis mentes felülúszót (plazma) használtuk a mérésekhez.

Szérum transzaminázok (GOT, GPT) aktivitásának mérése

A GOT és GPT aktivitásokat Reitman és Frankel (1957) módszere alapján mértük a Reanal által gyártott kit segítségével.

Az LDH aktivitásának mérése

Az LDH aktivitás mérése szintén Reanal kittel történt Annon (1971) módszere alapján.

Az AChE aktivitásának mérése

Az AChE aktivitását Ellman és Courtney (1961) spektrofotometriás eljárásával határoztuk meg. A 2.06 ml végtérfogatú elegy összetétele a következő volt: 2 ml 50 mM Na/K-foszfát pufferben (pH=7.2, 25°C) oldott 2,2'-dinitro-5,5'-ditiobenzoesav (DTNB) (0.26 mM) és 0.05 ml AThCh-jodid oldat (82.4 mM, desztillált vízben oldva). A reakciót 0.01 ml homogenizátum hozzáadásával indítottuk, és 412 nm-en követtük spektrofotométerrel. Az AChE aktivitását az elhidrolizált AThCh-jodid μmól/min/l értékben adtuk meg (U/l).

A vércukorszint mérése

A vércukorszint meghatározást glükózoxidáz-peroxidáz eljárással végeztük. A reakcióelegyhez 2.5 ml glükóz reagenst [2 ml peroxidáz + 12.5 mg glükózoxidáz 50 ml 0.1 M foszfát pufferben (pH=7.00) oldva], majd 1 ml desztillált vízben oldott 3.3 mg o-dianizidint adtunk. A reakciót 0.1 ml vérplazmával indítottuk. Szobahőn 30 percig inkubáltuk az elegyet, s ezt követően 450 nm-en mértük fényelnyelését. Az eredményeket minden esetben mg/100 ml mértékegységben fejeztük ki.

Az ATPázok aktivitásának mérése

Az ATPáz aktivitásokat 40 mM Tris-HCl puffert (pH=7.2), 6 mM $MgCl_2$-ot, 20 mM KCl-ot és 150 mM NaCl-ot tartalmazó alap inkubáló elegyben mértük. A szelektív Mg^{2+}-ATPáz mérésnél 0.7 mM oubaint adtunk inhibitorként (Bourre, Chanez, Dumont és Flexor, 1982). A reakciót 5 perces hőmérsékleti ekvilibrálás után 4 mM ATP (trinátrium só) hozzáadásával indítottuk. Ezután 15 perces inkubálás következett 22°C-on, amit 1 ml jéghideg 10% (v/v) TCA-val állítottunk le. A reakció befejeződése után a kicsapódott fehérjéket lecentrifugáltuk és a felülúszóból inorganikus foszfátot határoztunk meg Line és Way (1984) módszerével. Az ATPáz specifikus aktivitásokat P_i/mg fehérje/óra egységben adtuk meg, a Na^+/K^+-ATPáz aktivitást pedig az ATPáz aktivitás és a Mg^{2+}-ATPáz aktivitás különbségéből határoztuk meg.

A kataláz aktivitásának mérése

A kataláz aktivitását spektrofotometriásan határoztuk meg H_2O_2 fogyás alapján. A reakcióelegy 3.0 ml foszfát pufferből (50 mM, pH=7.0; amely 1.2 μl 30% H_2O_2-ot tartalmazott 1 ml pufferre vonatkoztatva) és 0.025 ml felülúszóból állt. Az abszorbciót 240 nm-en mértük.

A fehérjetartalom mérése

A fehérje tartalmakat Lowry, Rosebrough, Farr és Randall (1951) módszerével határoztuk meg. A módszer Folin-fenol reagens használatán alapul.

A felhasznált vegyszerek

A használt vegyszerek a Boehringer, a Fluka, a Merck, a Reanal, és a SIGMA cégektől származtak, kivétel nélkül analitikai tisztaságúak voltak, így további tisztításukra nem volt szükség.

3.1. Réz-szulfát hatása halakra

A különböző halfajok érzékenységének vizsgálatához 350-400 g tömegű pontyot (*Cyprinus carpio* L.), busát (*Hypothalamichthys molitrix* V.) és

harcsát (*Silurus glanis* L.) a többi vizsgálathoz 262-270 g tömegű szivárványos pisztrángot (*Salmo gairdneri* L.) használtunk. (Ez utóbbiakat azért mivel ezek a legérzékenyebbek az alacsony pH-ra.)

A GOT, GPT, valamint LDH enzim aktivitásokat vérplazmából határoztuk meg.

A $CuSO_4$ + savas pH kísérletekben (Bristol), - eltérően az általános részben található leírásoktól a halakat MS222-vel (10 mg/liter) történt altatás után kanülöztük az aorta dorsalison keresztül Hughes módszere szerint (Hughes, Albers, Muster és Götz, 1983). A kanül beültetését követően minden halat külön-külön 20-30 l recirkuláltatott, levegőztetett vízben tartottunk. A kísérletek kezdetén meghatároztuk a pH-t és a víz keménységét, a kísérletek során pedig a pH-t kénsavval csökkentettük. A pH értéke a kezelések kezdete előtt 8.229-8.324 volt, melyet a réz-szulfát kezeléssel egyidejűleg 24 óra alatt a 6.618-ra csökkentettünk. A rezet réz-szulfát formájában adagoltuk 0.2 ppm koncentrációban. Minden kezelés esetében legalább 6 halat használtunk, míg kontrollként általában 12 egyedet vettünk vizsgálat alá.

A $CuSO_4$ + alacsony O_2 tartalom kísérleteinkben (Regensburg) 1200-1500 g tömegű, hím és nőnemű pontyokat (*Cyprinus carpio* L.) használtunk. Itt szintén kanült helyeztünk a dorsalis aortába MS 222-vel történt altatás után. Az operációt követően azonnal zárt kísérleti dobozokba helyeztük a halakat, ahol folyamatosan szabályozni tudtuk a vízhőmérsékletet, a pH-t és a víz oldott oxigén tartalmát. Három napos adaptáció után a halakat két csoportba osztottuk. Az első csoportot 5 napon keresztül hipoxiás körülményeknek (80 pO_2 mmHg) tettük ki napi 6 órás ciklusokban. A másik csoport az előbb említettel megegyező hipoxiás kezelést kapott 20 ppb réz-szulfát kanülön keresztüli injektálásával kombinálva. Az összehasonlíthatóság érdekében a kontroll csoport egyik kezelést sem kapta. E kezelések esetében is a kanülből vettünk vérmintát.

Az enzimek aktivitását az e fejezethez tartozó kísérletekben is az általános fejezetben leírt módon centrifugálással nyert vérplazmából határoztuk meg.

3.2. Különböző peszticidek ($CuSO_4$, PQ, MD) hatása ponty bélcsatorna és vérplazma AChE aktivitásaira

Vizsgálatainkhoz mindkét nemből származó 400-500 illetve 850-1200 g tömegű pontyokat (*Cyprinus carpio* L.) használtunk.

Az AChE aktivitás meghatározását elő- közép- és utóbélből készült homogenizátumokból illetve vérplazmából végeztük. Az enzim aktivitás értékét U/l homogenizátum illetve vérplazma egységekben fejeztük ki.

3.3. Deltamethrin hatása pontyokra

Kísérleteinkhez tavi ponty (*Cyprinus carpio* L.) hím és nőnemű, 800-1000 g-os egyedeit használtuk. A DM koncentrációja az akváriumokban 1.0 és 1.5 ppb volt. Az expozíciós idő a szervminták esetében 96 óra volt, míg vérmintát 24 óránként vettünk minden egyes egyedből 96 órán keresztül.

A vérplazmából GOT, GPT, LDH és AChE aktivitásokat valamint vércukorszintet határoztunk meg.

A szervekből az AChE aktivitásokat a homogenizátumokból felülúszójából határoztuk meg. (Szervminták homogenizálását lásd az általános részben).

Az ATPáz aktivitások méréséhez a vérminták centrifugálása utáni csapadékot használtuk, amiből eritrocita plazmamembránt preparáltunk.

Az eritrocita plazmamembránt Sørensen (1983) módszere alapján preparáltuk. Az eritrocitákat centrifugálással gyűjtöttük össze, majd a csapadékot 0.15 M NaCl oldattal mostuk. Mosás után a sejteket újra szuszpendáltuk 0.15 M NaCl-ot és 3 mM $MgCl_2$-ot tartalmazó 0.01 M Tris-HCl pufferben (pH=7.2), majd homogenizáltuk. A sejtmagot és a szét nem töredezett sejteket alacsony fordulatszámú differenciál centrifugálással (500-1200 g, 5 perc) távolítottuk el. A széttört plazmamembránt ezután a fölülúszóból újabb centrifugálással (25,000 g, 15 perc) nyertük, majd a membránt néhány alkalommal mostuk 0.1 M kolinkloridot tartalmazó 0.01 M Tris-HCl pufferrel (pH=7.2). Végül a mosott membránok egy részét újraszuszpendáltuk a mosóközegben és így tároltuk -60°C-on az ATPáz és a fehérjetartalom méréséig.

A kataláz aktivitását máj homogenizátum felülúszójából mértük.

A fehérjetartalom meghatározását minden mintából az általános részben megadottak szerint végeztük el.

Az enzim aktivitásokat (specifikus aktivitás) minden esetben U/mg nedves szövet mértékegységben fejeztük ki.

3.4. Szabad gyökök és reaktív oxigén intermedierek szerepe halak úszóhólyag gyulladásos megbetegedéseiben

A kísérletekhez 50 - 100 g tömegű, egészséges és úszóhólyag gyulladásban szenvedő pontyokat (*Cyprinus carpio* L.) használtunk, amelyek a szarvasi Haltenyésztési Kutatóintézetből származtak. A vizsgálatokhoz a halakat két csoportra osztottuk (egészséges és úszóhólyag gyulladásban szenvedő), majd mindkét csoportból szerv homogenizátumokat készítettünk.

A lipidperoxidációs értéket Placer, Cushman és Johnson (1966) által leírt módszer szerint határoztuk meg úgy, hogy a malondialdehidet (MDA) 2-tiobarbituráttal történő reakciójával hoztuk létre a lipidperoxidációs folyamat során. Az értékeket nmól MDA / g nedves szövet egységben fejeztük ki.

A kataláz aktivitását a szerv homogenizátumok felülúszójából határoztuk meg.

A SOD aktivitás méréshez Misra és Fridovich (1972) Matkovics és mtsai. (1977) által módosított módszerét használtuk.

A fehérjetartalom meghatározását az általános részben megadottak szerint végeztük el.

Az enzim aktivitásokat (specifikus aktivitás) minden esetben U/mg nedves szövet mértékegységben fejeztük ki.

4. CÉLKITŰZÉSEK

A JATE Biokémiai Tanszékén és a Bay Zoltán Alkalmazott Kutatási Alapítvány Biotechnológiai Intézetében folyó környezetbiokémiai vizsgálatokhoz kapcsolódva célunk az volt, hogy részletesen vizsgáljuk a különböző ökológiai tényezők, valamint nagy mennyiségben használt, így környezetünkbe kerülő peszticidek és metabolitjaik hatását a halak biokémiai, fiziológiai paramétereire.

Ennek érdekében a következő kérdésekre kerestünk választ:

4.1. Réz-szulfát hatása halakra

Hogyan viselik különböző halfajok ugyanannak a fungicidnek ($CuSO_4$) a toxikus hatását ?

Hogyan befolyásolják különböző környezeti tényezők (oldott oxigén, pH) e szer toxikus hatását ? (Abból a célból, hogy előre jósolható legyen e peszticidnek a halakat károsító hatása különböző alkalmazási körülmények között).

4.2. Különböző peszticidek ($CuSO_4$, PQ, MD) hatása ponty bélcsatorna és vérplazma AChE aktivitásaira

Hogyan viselkedik a táplálkozási és táplálék hasznosítási szempontból létfontosságú, halak bélcsatornájának beidegzésében döntő szerepet játszó AChE egy kiválasztott halfaj esetében különböző peszticidekkel történő szubletális kezelés hatására ?

Milyen biokémiai hatásai lehetnek a kolinerg rendszerre egy tipikus szerves foszforsavészternek halak bélrendszerében és vérében?

Milyen biokémiai változások detektálhatók halak vérében az idegrendszeri folyamatokban döntő szerepet játszó AChE-t illetően egyes peszticidek hatására, illetve az azokkal történő kombinált expozíció esetében ?

4.3. Deltamethrin hatása pontyokra

Milyen biokémiai, fiziológiai, anatómiai és viselkedésbeli hatásokat vált ki szubletális dózisú alkalmazáskor kísérletes körülmények között egy, az 1991 évi balatoni angolna pusztulás idején használt szúnyogirtó szer pontyban ?

4.4. Szabad gyökök és reaktív oxigén intermedierek szerepe halak úszóhólyag gyulladásos megbetegedéseiben

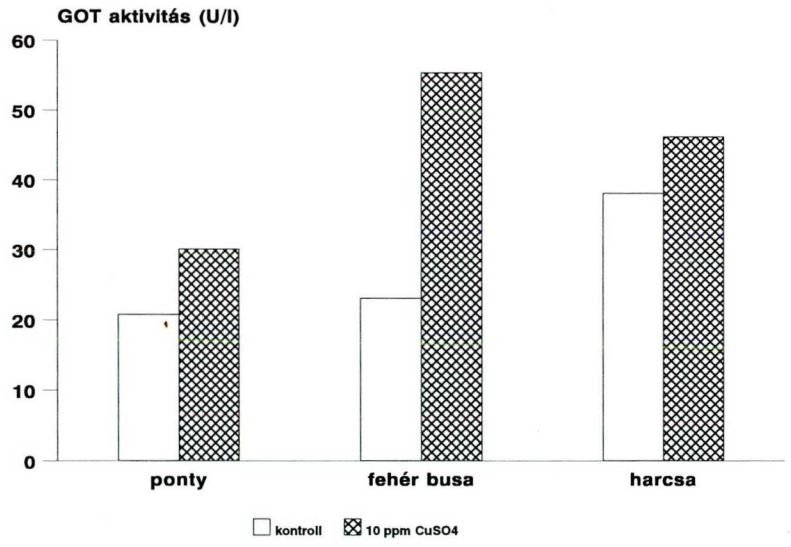
Van-e szerepe a halak úszóhólyag gyulladásos megbetegedéseiben a környezeti hatások és a szervezetbe a környezetből bekerült idegen anyagok intoxikációja következtében létrejött szabadgyököknek és reaktív oxigén intermediereknek ?

5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

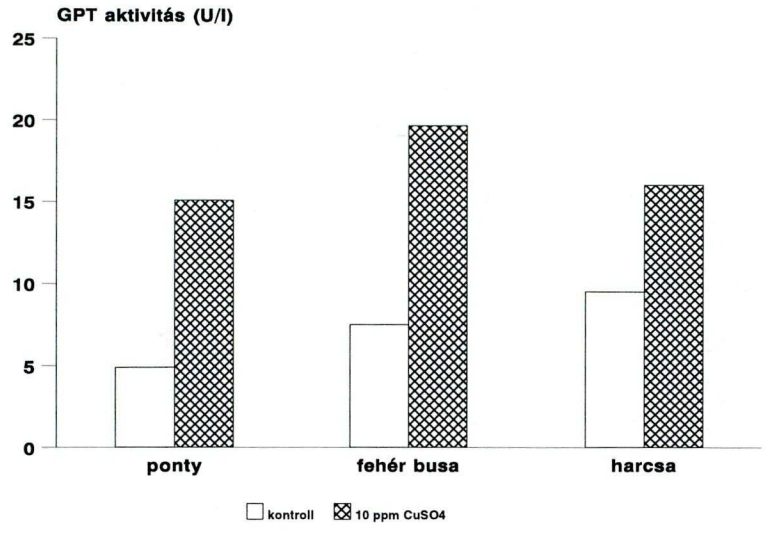
5.1. Réz-szulfát hatása halakra

5.1.1. Különböző halfajok érzékenysége $CuSO_4$-ra

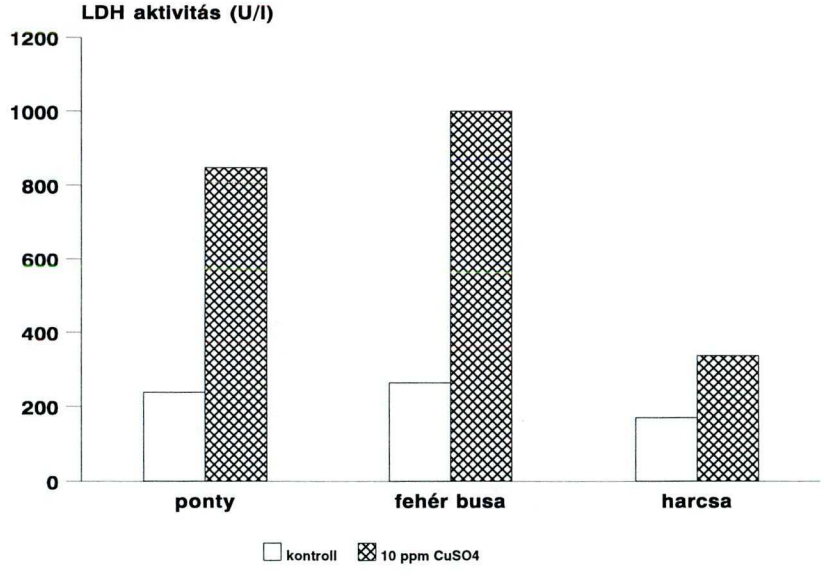
A ponty különböző biokémiai paraméterei szignifikánsan megváltoztak $CuSO_4$ kezelés hatására a kontrollhoz képest (6.-9. ábrák). A GOT aktivitás (6. ábra) mintegy 30%-kal emelkedett a vérplazmában, míg a GPT (7. ábra) mért értékei háromszor voltak magasabbak a kontrollhoz képest. A vércukorszint kétszeresére emelkedett a $CuSO_4$-tal kezelt pontyoknál (9. ábra).



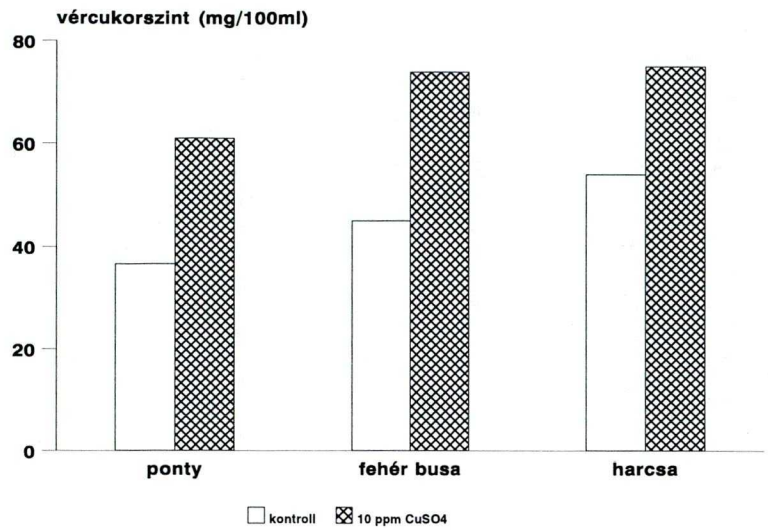
6. ábra. 10 ppm $CuSO_4$ hatása ponty, busa és harcsa vérplazma GOT aktivitására. Vízhőmérséklet: 20 ± 1 °C. Az értékek 8-10 egyed átlagai.



7. ábra. 10 ppm $CuSO_4$ hatása ponty, busa és harcsa vérplazma GPT aktivitására. Vízhőmérséklet: 20 ± 1 °C. Az értékek 8-10 egyed átlagai.



8. ábra. 10 ppm $CuSO_4$ hatása ponty, busa és harcsa vérplazma LDH aktivitására. Vízhőmérséklet: 20 ± 1 °C. Az értékek 8-10 egyed átlagai.



9. ábra. 10 ppm $CuSO_4$ hatása ponty, busa és harcsa vércukorszintjére. Vízhőmérséklet: 20 ± 1 °C. Az értékek 8-10 egyed átlagai.

A halfajok között a legszembetűnőbb változást a busa estében észleltük. A GOT aktivitás (6. ábra) és a vércukor szint (9. ábra) közel megduplázódott, míg a GPT (7. ábra) és a LDH aktivitás (8. ábra) 2.5-szeresére nőtt meg.

A réz-szulfát - hasonlóan a ponty és busa esetében észleltekhez - a harcsánál szignifikáns változásokat okozott a GOT, GPT és LDH aktivitás illetve a vércukor tekintetében (6., 7., 8., 9. ábra). Megállapítható azonban, hogy a szer harcsára kevésbé toxikus, mint a másik két vizsgált faj esetében.

Eredményeink azt mutatják, hogy a $CuSO_4$ toxicitása a három vizsgált halfajra eltérő mértékű volt. Bell (1968) máj mérgezés GOT aktivitásra tett hatását vizsgálta magas dózisban bromobenzollal és széntetrakloriddal. Kimutatta, hogy a kezelt halak GOT aktivitása szignifikánsan megemelkedett, sőt a vesekárosodásban szenvedő halak is szignifikánsan nagyobb GOT aktivitást mutattak a vérplazmában a kontroll állatokhoz képest. Kristoffersson, Broberg, Oskari és Pekkarinen (1974) arról számolnak be, hogy 5 ppm fenol kezelés hatására megnövekedett GOT és GPT aktivitást észleltek csuka vérplazmájában. Kísérleteinkben $CuSO_4$ hatására mi is emelkedő GOT és GPT aktivitásokat találtunk, bár a különböző halfajoknál eltérő mértékben. A legnagyobb GOT és GPT aktivitás növekedést a busa mutatta, jelezve ezzel a szervezetében bekövetkezett súlyos szöveti károsodásokat. Ponty esetében szintén

szignifikáns növekedést tapasztaltunk, bár ez kisebb mérvű volt. A harcsa esetében csak kismérvű GOT és GPT aktivitás növekedést észleltünk, tehát a szövetkárosodás mértéke sem volt annyira szignifikáns, mint a busa esetén. A kis változás a kezelt és a kontroll állatok között a harcsa esetében annak is betudható, hogy már a kontroll egyedek is igen magas GOT, GPT értékeket mutattak. Onishi és Murayama (1970) ezzel szemben azt mutatták ki, hogy a máj GOT aktivitása nem különbözik lényeges mértékben a különböző halfajoknál.

A megemelkedett GOT aktivitások a vérplazmában elsősorban májkárosodásra utalnak, csak kisebb mértékben okozzák a jelenséget egyéb szövetek károsodásai (vese és/vagy kopoltyú). Reichenbach-Klinke (1972) kopoltyú károsodásról számol be $CuSO_4$ kezelés hatására, Schreck és Lorz (1978) viszont Cu expozíciónak kitett halak a veséjében glomeruláris atrófiát észleltek, a kopoltyúnál pedig epiteliális nekrózist.

A vércukorszint halak esetében a környezeti stresszhatások igen érzékeny és megbízható indikátora. Eredményeink alapján a $CuSO_4$, amint az az emelkedő vércukor értékekből egyértelműen látszik, stresszorként hat a halakra. A stresszhatás nagyságának sorrendje busa > ponty > harcsa.

A LDH enzim növekedésének mértéke ugyanolyan sorrendiséget mutat a fajok között, mint azt a vércukor értékeknél láttuk. Ez a növekedés a metabolikus stresszt mutatja a halakban: a glükóz katabolizmusa tejsavat eredményez, ami igen toxikus lehet a halak számára. A megnövekedett LDH aktivitás a busa és a ponty esetén betudható a kezelés után kialakult fokozott mozgásaktivitásnak is, szemben a harcsával, amelynél a $CuSO_4$ toxicitásának mértéke jóval kisebb volt: a harcsák a kísérlet teljes ideje alatt az akváriumok alján helyezkedtek el nyugalmi állapotban.

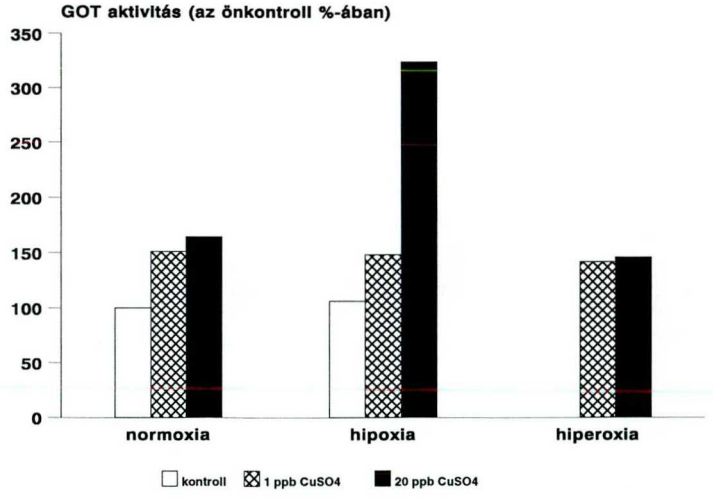
Eredményeink azt szemléltetik, hogy a harcsák viszonylag jól tolerálták a réz-szulfát szennyezést, míg a pontyok és különösen a busák nagyon érzékenyek erre a környezeti stresszorra. A különbségek a három halfaj között a réz-szulfát károsító hatásában az egyes fajok eltérő gyorsaságú kopoltyúfedő mozgásából, illetve az eltérő máj mikroszómális enzimaktivitásokból adódhatnak, minthogy e frakció enzimei felelősek a toxikus fémek metabolizációjáért.

Rojik, Nemcsók és Boross (1983) korábbi vizsgálatai szintén alátámasztják mérési eredményeinket. Említett szerzők elektronmikroszkópos vizsgálatokkal $CuSO_4$ károsító hatását állapították meg ponty, busa és harcsa kopoltyújában, májában és veséjében, főként az endoplazmatikus retikulumnál és a mitokondriumokban.

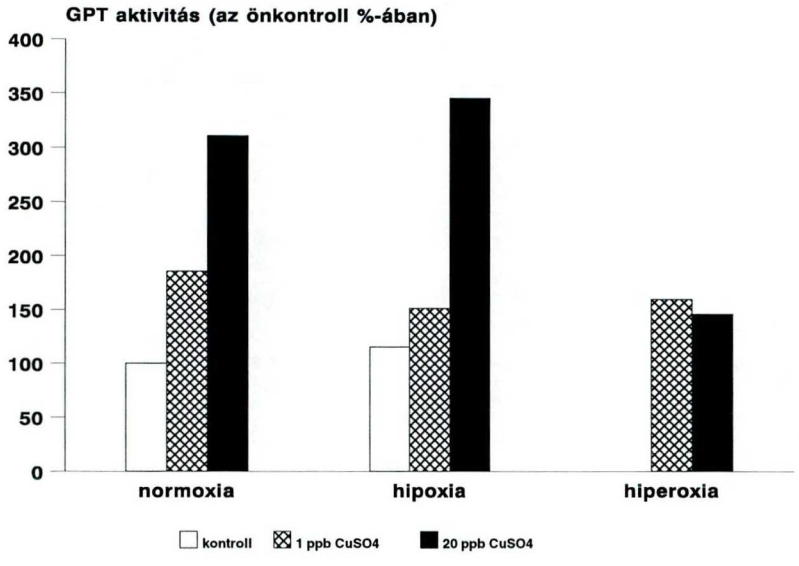
5.1.2. A halak érzékenysége alacsony O_2 koncentráció és $CuSO_4$ kombinált hatásra

Az esővizek az alkalmazott $CuSO_4$-ot bemoshatják az élővizekbe, ahol az toxikus hatást képes kifejteni a vízi élőlényekre, különösen a halakra. Mivel hipoxia gyakran fordul elő az élővizekben, a hipoxia és a $CuSO_4$ együttes hatását tanulmányoztuk ponty különböző szövetein.

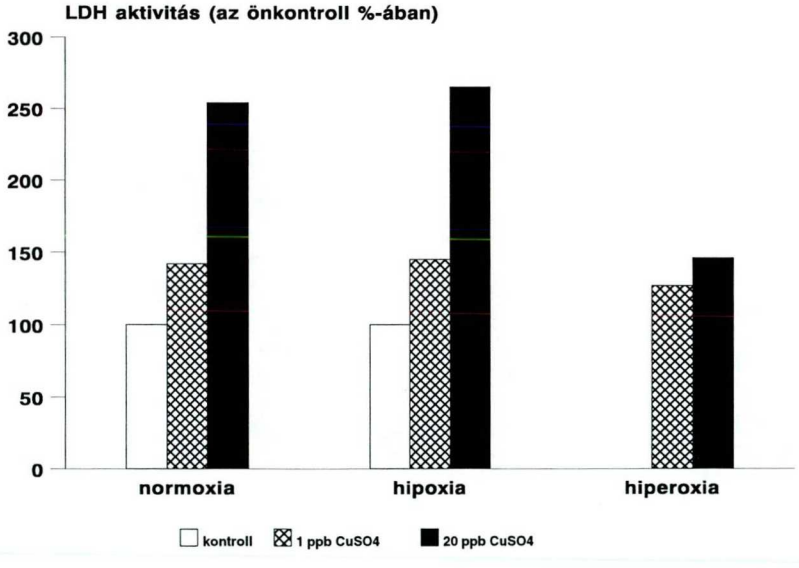
A hipoxia megnöveli a $CuSO_4$ toxikus hatását pontyoknál, miként az a megnövekedett GOT aktivitásokból jól látszik (10. ábra). A hiperoxia $CuSO_4$ kezeléssel kombinálva ugyanakkor nem okozott szignifikáns változást azokhoz a halakhoz képest, amelyeket normoxiás körülmények között csak $CuSO_4$ kezelésnek tettünk ki (10.-12. ábra). Ezek az adatok azt mutatják, hogy a víz alacsony oxigén tartalma fokozza a $CuSO_4$ szövetkárosító hatását még relatíve alacsony koncentráció esetén is.



10. ábra. Különböző $CuSO_4$ koncentrációk hatása ponty vérplazma GOT aktivitására adott kezelési idő alatt a víz oxigén koncentrációjának függvényében.



11. ábra. Különböző $CuSO_4$ koncentrációk hatása ponty vérplazma GPT aktivitására adott kezelési idő alatt a víz oxigén koncentrációjának függvényében.



12. ábra. Különböző $CuSO_4$ koncentrációk hatása ponty vérplazma LDH aktivitására a adott kezelési idő alatt a víz oxigén koncentrációjának függvényében.

A bioszférába egyre nagyobb mennyiségben kerülnek nehézfémek természetes, ipari, mezőgazdasági és kommunális forrásokból. Mind a növények, mind pedig az állatok képesek felvenni és szöveteikben tárolni ezeket a nehézfémeket (Johnels, Westernwark, Berg, Persson és Sjöstrand, 1967; Förstner és Prosi 1979; Salánki, Balogh és Berta, 1982; V-Balogh és Salánki, 1987). Néhány ilyen raktározott nehézfém, mint például a kadmium, a higany vagy a réz a legkülönfélébb patológiás elváltozásokat okozhatják a sejtekben és a szövetekben. A réz-szulfát ugyanakkor mind a mai napig széles körűen használt a mezőgazdaságban, mint gombaölőszer.

A hipoxia hatása önmagában jól ismert az emlősöknél (Popper 1982), de kevésbé a halak esetében. Enyhe hipoxia napi 6 órán keresztül 5 nap után jól kivehető ultrastrukturális változásokat okoz a májsejtekben.

5.1.3. A halak érzékenysége alacsony pH és $CuSO_4$ kombinált hatásra

A 1. táblázat és a 13. ábra a vérplazma vizsgált biokémiai paramétereinek értékeit mutatja a savas kezelés előtt, közben és abban az esetben, mikor az alacsony pH-t 0.2 ppm réz-szulfáttal kombináltuk. A 13. ábrán bemutatott biokémia paraméterek átlagértékei az önkontroll százalékában vannak kifejezve, az ábrán szintén feltüntetett korábbi kísérletek (Nemcsók és Hughes, 1988) adataival együtt, amelyet a szerzők a réz-szulfát ugyanilyen (0.2 ppm) koncentrációban, de önmagában való alkalmazása során kaptak. Az AChE aktivitások kivételével ezek az adatok a kezeléseket követően növekedéseket mutatnak, és a százalékos növekedés a legnagyobb abban az esetben, amikor a savas kezelést a réz-szulfát kezeléssel együttesen végeztük. Ez az emelkedés a GPT aktivitás esetében a legkifejezettebb. A kiértékelések során elvégzett szignifikancia vizsgálatok (variancia analízis, Barlett-próba, kétmintás t-próba) azt mutatták, hogy az oszlopok között szignifikáns különbség van 95 %-os vagy annál nagyobb szinten.

A legfontosabb konklúzió, ami ezekből az eredményekből levonható, az, hogy a kombinált kezelés (réz-szulfát savas pH mellett) hatása lényegesen nagyobb, mint az egyes kezeléseké külön-külön. Ez a megállapítás a vizsgált paraméterek többségére igaznak bizonyult, de kiemelt mértékben érvényes a vérplazma GPT aktivitására.

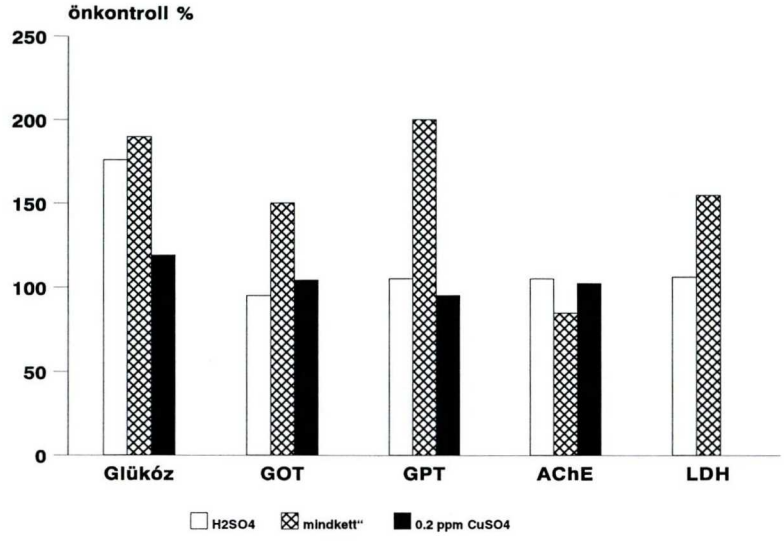
24 órás inkubálás	$CuSO_4$ (0.2 ppm)	H_2SO_4 (pH 6.6)	H_2SO_4 + $CuSO_4$ (pH 6.6) + (0.2 ppm)
GOT	nincs változás	nincs változás	+40%
GPT	nincs változás	+5%	+100%
LDH	?	kis növekedés	+50%
AChE	nincs változás	nincs változás	- 10%
vércukor	nincs változás	+75%	+90%

1. táblázat. Különböző vérbiokémiai paraméterek alakulása 24 órás 0.2 ppm réz-szulfát, pH 6.6 (kénsav) és az előbbiekkel történt együttes kezelés (0.2 ppm $CuSO_4$ + pH 6.6) hatására.

A közeg savassága egymagában - a vércukorszintet kivéve - nem okozott változásokat a mért biokémiai paraméterekben 24 órás expozíciós idő elteltével, csak a megemelkedett vércukorszint jelezte a kezdődő stresszhatást. Ugyanakkor, ha a kedvezőtlen hatás hosszú ideig elnyúlik, az rendkívül kellemetlen hatással járhat az egész hal populációra, mivel a hosszú ideig folyamatosan tartó stresszhatás csökkentheti a szervezetben a γ-globulin szintet, ami viszont a halak kórokozókkal szembeni ellenállóképességének csökkenéséhez vezet (Wedemeyer, 1970; Nemcsók, Oláh és Boross, 1982).

A savas környezet szignifikánsan megnövelte a réz-szulfát toxikus hatását, ezzel a fiziológiai és biokémiai folyamatok normális menetében zavart okozva. Különösen fontos ez az AChE gátlását illetően. Utóbbi azért említésre méltó, mivel a normális idegműködés gátlásával számos egészséges viselkedési folyamat megváltozik, ami elsősorban a táplálékszerzési és menekülési reakcióknál szembetűnő. Az AChE gátlása halaknál ráadásul különösen veszélyes a szívben, minthogy a kolinerg rendszer meghatározó szerepet játszik a halak szívének beidegzésében. Az AChE gátlását a szívben a vagus tónus felerősödése követheti, ami azután a keringéstől függően a legkülönbözőbb zavarokat okozhatja a metabolikus folyamatokban. E zavarok szükségszerűen elkerülhetetlenek, mivel a

szívműködés zavarai azonnal drasztikus hatással vannak az oxigén felvételre és a széndioxid leadásra, ami szöveti szintű anoxiához vezet.



13. ábra. Pisztráng vérplazma biokémiai paramétereinek változásai 0.2 ppm $CuSO_4$, pH=6.6 (kénsav) valamint a kettővel történt együttes (0.2 ppm $CuSO_4$ + pH=6.6) kezelés során, 24 órás expozíciós idő mellett.

Más szerzők is, mint Howarth és Sprague (1978) azt tapasztalták, hogy a réz sokkal toxikusabb savas pH-n (pH=5.4), mint magasabb pH-n (pH=7.3). Ezzel szemben Miller és Mackay (1980) azt találta, hogy pH=4.34 és pH=4.7 között a réz kevésbé toxikus, mint pH=7.3 értéknél. Fenti szerzők azt sugallják, hogy bár a savas közeg és a fémek jelenléte a közegben egyaránt fokozott nyálka termeléshez vezet a halaknál, dominánsabb a savas közeg, így Cu-kelát képződik, ami kevésbé toxikus. Úgy tűnik, hogy a sav jelenlétében a réz részleges ionos állapota megváltozik, és kísérleteinkben - feltehetőleg - ezért vált toxikusabbá.

5.2. Különböző peszticidek ($CuSO_4$, PQ, MD) hatása ponty bélcsatorna és vérplazma AChE aktivitásaira

Az AChE megoszlása halak különböző szerveiben régóta vizsgált. A bélcsatorna vizsgálatát a szervek közül azért választottuk, mert, ez a szerv viszonylag kevéssé vizsgált, ugyanakkor rendkívüli fontossággal bír beidegzése. A halakban a szervek közül a bél AChE aktivitása az agy után a legmagasabb, ezen felül a táplálkozási funkciókban betöltött szerepe az egész szervezet normális működése szempontjából meghatározó.

A vérplazma AChE aktivitás vizsgálatokat az általunk kifejlesztett komplex biomonitoring módszerben való alkalmazhatóság indokolta: a vér a különböző célszerveket ért hatások közvetítője és közös gyűjtője. Emellett gyakorlatilag az egyetlen "szerv", amelyből úgy lehet a sokrétű vizsgálatok elvégzéséhez elegendő mennyiségű mintát venni, hogy a kísérleti egyed irreverzibilis változások nélkül túléli a mintavételt. Ebből kifolyólag a vérminták analízise lehet alkalmas arra, hogy ugyanabból az egyedből történt többszöri mintavétellel követhessük az állat szervezetében bekövetkezett biokémiai, fiziológiai változásokat.

Kísérleteinkben vizsgáltuk a potenciálisan stresszornak tekinthető és szöveti nekrózist kiváltó $CuSO_4$ (fungicid) és PQ (herbicid), valamint a kolinészteráz bénítást okozó MD (inszekticid) hatásait a ponty tápcsatornájának kolinerg rendszerére és a vérben, elsősorban az ACh hidrolizálásáért felelős kolinészterázokra.

5.2.1. $CuSO_4$, PQ, MD hatása ponty bélcsatorna AChE aktivitásaira

Előzetes hisztokémiai vizsgálatok szerint, a ponty tápcsatornájának izomzata a nagyon rövid oesophagusban (előbél) rövid harántcsíkolt fibrillumokból és simaizom sejtekből áll. AChE pozitív motoros véglemezek kizárólagosan az oesophagusban a harántcsíkolt izomrétegben találhatók. AChE pozitivitás detektálható a ponty gyomrának, középbelének, végbelének mienterikus plexusaiban is. A harántcsíkolt izomréteg ugyanakkor nagyobb AChE aktivitást mutat, mint a simaizomréteg.

Korábbi méréseink szerint normál állapotban az előbélben mérhető a legnagyobb enzim aktivitás, ez összhangban áll a motoros véglemezek magas acetilkolinészteráz tartalmával.

	Kontroll	$CuSO_4$	CuSO4 ----------% Kontroll
ELŐBÉL	205.4	209.1	102.0
KÖZÉPBÉL	167.2	230.6	137.9
UTÓBÉL	137.3	222.2	161.9

2. táblázat. Kolinészteráz aktivitások (U/l) $CuSO_4$-tal *in vivo* kezelt ponty tápcsatornájában.

Egy hetes 5 ppm $CuSO_4$-os kezelésnél jól érzékelhető emelkedést észleltünk a kolinészteráz aktivitásokban mindhárom bélszakasz esetén (2. táblázat).

Egy hetes 5 ppm kezelést követően a PQ estében kismértékű kolinészteráz aktivitás csökkenést, illetve utóbélnél a kontrollhoz képest kis növekedést figyeltünk meg (3. táblázat).

Mivel a paraquat elsősorban a halak bőrében és emésztőcsatornájában halmozódik fel, hatása itt élesen detektálható.

Rövidebb időtartamú kezelések erősen csökkentik a kolinészteráz aktvitást (kompetitív gátlás), hosszabb expozíciót követően azonban a kolinészteráz enzim aktivitása nő. Ez $CuSO_4$ esetén még kifejezettebb (különösen közép- és utóbélnél), s korábban jelentkezik, mint a paraquatnál. Ez annak a következménye lehet, hogy a $CuSO_4$ és a PQ elsősorban a már megszintetizált kolinészteráz aktivitását csökkenti, de serkenti *de novo* szintézisüket. Az enzimaktivitás regenerálódása inkább az enzim újra szintézisétől függ, mint a már gátolt enzim reaktivációjától.

	Kontroll	PQ	PQ ----------% Kontroll
ELŐBÉL	205.4	190.6	92.8
KÖZÉPBÉL	167.2	137.7	82.4
UTÓBÉL	137.3	145.9	106.3

3. táblázat. Kolinészteráz aktivitások [U/l] PQ-tal *in vivo* kezelt ponty tápcsatornájában.

A $CuSO_4$ felszívódása és transzportálása a máj felé mindhárom bélszakaszban megfigyelhető, ennek mértéke azonban eltérő, s főként a közép- és utóbél régióiból történik. Másrészt a kolinészteráz aktivitás a kontrollok esetében csökken a tápcsatornában a szájnyílástól a végbélnyílás felé haladva. Ezen két tényező eredményezheti a viszonylag kis mértékű eltéréseket a ponty belének egyes szakaszai között $CuSO_4$-tal és PQ-tal történő kezelés hatására.

A 2 ppm 1 hetes MD kezelés hatására mindhárom szakaszban jelentősen csökkent a kolinészteráz aktivitás a kontrollhoz képest (4. táblázat).

Ismert, hogy a methidation *in vivo* körülmények között lényegesen erősebben gátolja a kolinészterázt, mint *in vitro*. Ennek oka az lehet, hogy a metabolizmus során, amint azt növényekben már kimutatták, a vegyület oxigén analógja képződik, melynek gátló hatása sokkal nagyobb, mint az eredeti vegyületé. A szerves foszforsavészterek kolinészteráz gátló hatásának oka az, hogy ezen anyagok kovalens kötésbe lépnek az enzim aktív centrumában található szeril-OH csoporttal.

	Kontroll	MD	MD --------- % Kontroll
ELŐBÉL	205.4	91.64	44.6
KÖZÉPBÉL	167.2	87.36	55.2
UTÓBÉL	137.3	99.35	72.4

4. táblázat Kolinészteráz aktivitások MD-nal *in vivo* kezelt ponty tápcsatornájában.

A kísérletek során viszonylag magas, 2 ppm MD koncentráció mellett következett be a kolinészteráz gátlása. Ezt avval lehet magyarázni, hogy a halakban előforduló AChE lassabban reagál e gátlószerrel, mint az emlősöké (Moss és Fahrney, 1978). A természetes vizekben élő halaknál azonban kisebb koncentrációjú szerves foszforsavészter is tekintélyes gátlást okozhat (Williams és Sova, 1966), ami a halakban végbemenő nagyfokú akkumuláció következménye lehet.

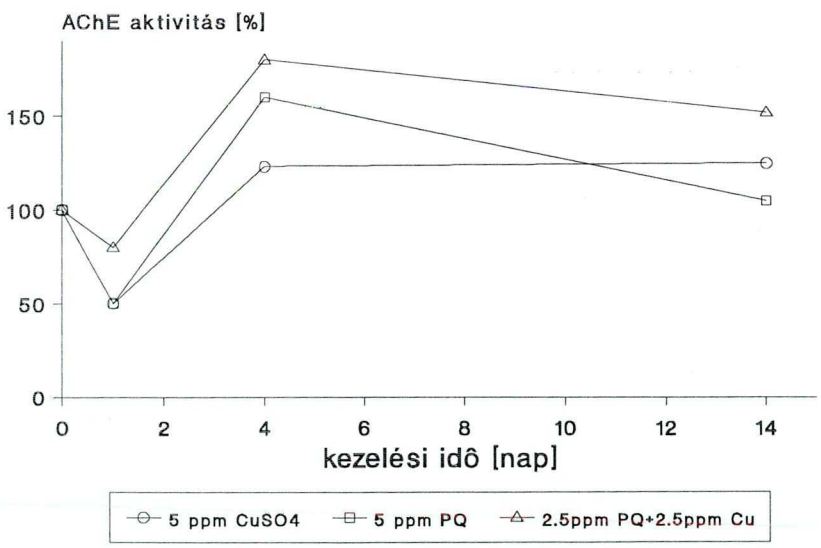
Az általunk alkalmazott 2 ppm-es 1 hetes expozíció eredményeként csökkent a kolinészteráz enzim aktivitása. A gátlások mértéke azért is veszélyes, mivel a szerves foszforsavészter típusú vegyületek nemcsak az aktív centrumot, hanem magának az enzimnek a *de novo* szintézisét is gátolják (Nemcsók, Rakonczay, Kása, Asztalos és Szabó, 1990).

Kísérleteinket 10.4 - 12.1°C-os vizű akváriumokban tartott halakkal végeztük. Ismert, hogy magasabb hőmérsékleten a halak - poikiloterm állatok lévén - alapanyagcseréje, így vízből történő peszticid akkumulációja és ezt követően metabolizmusa is intenzívebb. Az, hogy viszonylag alacsonyabb hőmérsékleten végzett kísérleteinkben is jelentős gátlás volt tapasztalható (4. táblázat) jelzi ezen inszekticid veszélyességét.

5.2.2. $CuSO_4$, PQ, MD hatása ponty vérplazma AChE aktivitására

Ebben a kísérlet sorozatban vizsgáltuk a választott fungicid, herbicid és inszekticid ($CuSO_4$, PQ, MD) kombinatív hatását a ponty vérplazma acetilkolinészteráz enzimére az esetleges szinergista vagy antagonista hatások felderítése céljából.

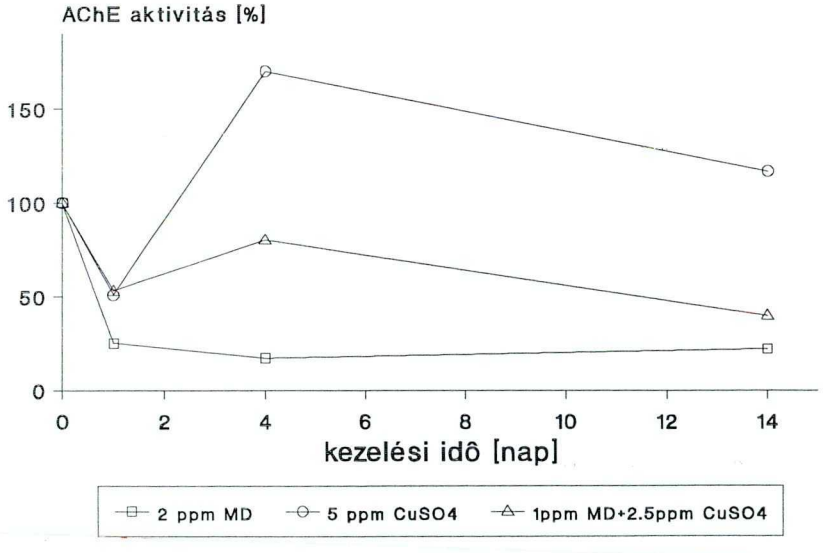
5 ppm $CuSO_4$ 24 órás kezelést követően mintegy 50 %-kal csökkentette az AChE enzim aktivitását. 96 óra elteltével a kontroll értékhez képest jelentős AChE aktivitásnövekedés mérhető, amely 2 hét elteltével is nagyjából ezen a szinten maradt (14., 15. ábra).



14. ábra. 5 ppm $CuSO_4$, 5 ppm PQ illetve 2.5 ppm $CuSO_4$ és 2.5 ppm PQ kombinált kezelés hatása a ponty vérplazma AChE aktivitására. Az AChE aktivitás a kontroll %-ában van kifejezve. Az adatok 6-18 egyedből származnak.

A $CuSO_4$ okozta változáshoz hasonló tendenciájú képet mutat az 5 ppm PQ kezelés hatása az AChE aktivitására. Az eltérés abban nyilvánul meg, hogy 96 óra elteltével a növekedés mértéke PQ esetében csupán 20 % körüli (14., 16. ábra).

A kéthetes kezelés során vizsgált vegyületek közül a legnagyobb mértékben a MD gátolta a halak vérplazma AChE aktivitását. 2 ppm MD 24 óra elteltével csaknem 80 %-kal csökkentette az AChE aktivitását, amely még 2 hét elteltével is ilyen nagymértékű aktivitás csökkenést mutatott (15., 16. ábra).

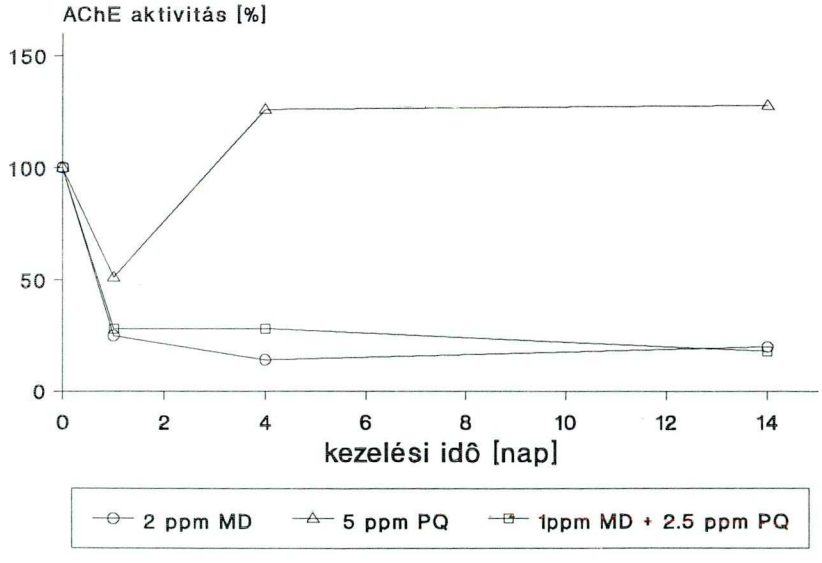


15. ábra. 5 ppm $CuSO_4$, 2 ppm MD illetve 2.5 ppm $CuSO_4$ és 1 ppm MD kombinált kezelés hatása a ponty vérplazma AChE aktivitására. Az AChE aktivitás a kontroll %-ában van kifejezve. Az adatok 6-18 egyedből származnak.

A három vizsgált vegyület egymással kombináltan történő kezelés során minden esetben csökkentette az AChE aktivitását. E változás mértéke azonban eltéréseket mutat.

A $CuSO_4$ + PQ kombinációjú kezelés során minden mért időpontban, ha szerény mértékben is, - mintegy 20-30 %-kal -, de változott az AChE aktivitása a külön-külön végzett kísérletekhez képest (14. ábra).

A PQ + MD kombinatív kezelés során az AChE aktivitás csökkenés időben hasonló lefutású, de enyhébb, mint tiszta MD-os kezelés esetében (16. ábra).



16. ábra. 5 ppm PQ, 2 ppm MD illetve 2.5 ppm PQ és 1 ppm MD kombinált kezelés hatása a ponty vérplazma AChE aktivitására. Az AChE aktivitás a kontroll %-ában van kifejezve. Az adatok 6-18 egyedből származnak.

Hasonló tendenciájú változást mutat a kép $CuSO_4$ + MD kezelést követően. Itt azonban a kombinatív kezelés során a gátlás valamennyi vizsgált időpontban szerényebb mértékű, mint MD-al történt egyedüli kezeléskor, és ez a csökkenés ellentétes azzal, amit a kizárólag $CuSO_4$-tal történt kezeléskor tapasztaltunk (15. ábra).

A $CuSO_4$ és a PQ nem kolinészteráz bénítóként ismert vegyületek. A halak szervezetében történő felhasználódásuk során elsősorban a kopoltyúhámot, májat és a vesét károsítják, mivel ezek a szervek játszanak kulcsszerepet az antropogén ágensek felvételében, tárolásában és kiválasztásában (Reichenbach-Klinke, 1972; Horváth és Stammer, 1979; Rojik, Nemcsók és Boross, 1983).

A szerves foszforsavészterek ezzel szemben közismerten gátolják a halak AChE aktivitását (Gage, 1955; Coppage és Braidech, 1976). Ennek oka, hogy e vegyület-típusok kovalens kötésbe lépnek az enzim aktív centrumában lévő szeril OH-csoporttal. A természetes vizekben élő halak esetében ugyanakkor viszonylag kisebb koncentrációjú szerves foszforsavészter is tekintélyes AChE gátlást okozhat (Williams és Sova, 1966), ami a halakban végbemenő nagyfokú akkumuláció következménye lehet (Reichenbach-Klinke, 1972).

Eredményeink szerint a MD akár egyedüli, akár $CuSO_4$-tal vagy PQ-tal történt vegyes kezelés során tartósan csökkentette az AChE aktivitását. Feltételezhető, hogy e vegyület nemcsak az enzim aktív centrumát bénítja, hanem drasztikusan gátolja a *de novo* szintézist is. Más állatfajokban, így például madarak esetében kimutatták, hogy szerves foszforsav észterek hatására az AChE aktivitása a mintegy 55-64 %-os gátlást követően csak 26 nap elteltével állt helyre, nagyrészt az AChE *de novo* szintézis gátlásának eredményeképpen (Fleming és Grue, 1981).

Jelen eredményeink alátámasztják korábbi megfigyeléseinket. Ez elmondható a 24 órás kezelést követően a $CuSO_4$-tal és a PQ-tal történt külön-külön kezelésre is. Ezekben az esetekben az AChE aktivitása túllépte a kezelést megelőző kontroll szinteket. Ez annak a következménye lehet, hogy a $CuSO_4$ és a PQ elsősorban a már megszintetizált AChE aktivitását csökkenti, de serkenti annak *de novo* szintézisét. Hasonló hatást mértek csirkeembrió mellizmában: paraoxon hatására a kezelt sejtek

AChE aktivitása egy idő után meghaladta a kontroll szintet. Ennek oka az, hogy az enzimaktivitás regenerálódása inkább az enzim újra szintézisétől függ, mint a már gátolt enzim reaktivációjától. Hasonlóan magyarázható esetünkben a $CuSO_4$ és PQ okozta aktivitás növekedés. A $CuSO_4$ + MD és PQ + MD esetében tapasztalható gátlás két hatás eredőjeként tekinthető. A vegyes kezelés során használt 1 ppm MD koncentráció nyilvánvalóan kevésbé gátolja az AChE *de novo* szintézisét, mint 2 ppm mennyiség. Ugyanakkor a kisebb koncentrációkban alkalmazott $CuSO_4$ és PQ is kevésbé hat serkentőleg a 96 órás kezelést követően az AChE *de novo* szintézisére.

A MD tehát más foszforsav típusú peszticidekhez hasonlóan (Knowles és Casida, 1966; Coppage, 1971; Klaverkamp és Hobden, 1980) jelentősen gátolja a halak AChE aktivitását. Különösen veszélyes lehet a MD okozta vízszennyeződés, mivel *in vivo* körülmények között jóval kisebb MD kezeléssel érhető el az 50 %-os AChE gátlás, mint *in vitro* kezelésekben, a halakban a környezetükben előforduló peszticidek ugyanis feldúsulhatnak (Reichenbach-Klinke, 1972; Nemcsók, Asztalos, Vígh és Orbán, 1987). Az általunk mért AChE gátlások mértéke továbbá azért is figyelem felkeltő, mert a szerves foszforsavészter kezelést követően még egy hónap múlva is közel 50 %-os AChE gátlás volt megfigyelhető korábbi kísérletek során (Fleming és Grue, 1981).

5.3. Deltamethrin hatása pontyokra

A DM LC_{50} értéke pontyra 96 órás kezelés esetén 1.84 ppb (!) (L'Hotellier és Vincent, 1986). Korábbi kísérleteink alapján mi is hasonló értéket észleltünk, annak ellenére, hogy egy kísérletben alacsonyabb értéknél is elpusztult az összes kísérleti egyed. Jelen vizsgálataink esetében úgy választottuk meg az alkalmazott koncentrációkat, hogy azok még szubletális tartományba essenek, de minél magasabbak legyenek (1.0 és 1.5 ppb). Így lehetőség nyílt arra, hogy a bekövetkező biokémia változások jól követhetőek legyenek.

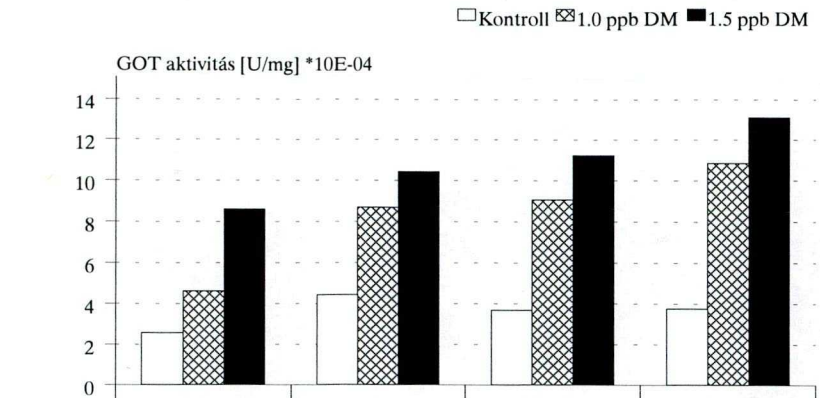
A DM-mérgezés első klinikai tünetei az állatoknál a remegés és az erős nyálkaképzés. A halaknál (különösen magasabb dózis esetén) megfigyelték, hogy a kopoltyúfedő mozgása szabálytalan és a halak állandóan oldalukra fordulnak. Ugyanilyen tüneteket tapasztaltunk mi is kísérleteinkben.

A vizsgált biokémiai paraméterek közül a transzamináz aktivitások a vérszérumban lényegesen magasabbak a kezelt állatoknál, mint a kontrollok esetében (17., 18. ábrák). A GOT enzim esetében kisebb különbség volt a két kezelés között: többé-kevésbé ugyanazon értékeket mértük mindkét DM koncentrációnál (17. ábra). Ezzel szemben a GPT aktivitása már 24 órás kezelést követően is DM koncentráció függőnek bizonyult. Míg 1 ppb DM kezelés esetén csak kismérvű volt a GPT aktivitásának növekedése, addig a magasabbik dózis alkalmazásánál nagy különbség volt észlelhető a kontroll és a kezelt állatok között, különösen 96 órás minták esetében (18. ábra).

Mint az az ábrákból is kiderül, kísérleteinkben jól detektálható volt azoknak a szöveteknek a sérülése, amelyek jelentős mennyiségben tartalmaznak GOT vagy GPT enzimeket, mivel ilyen esetekben az adott szövet sejtjeinek szétesése következtében megnövekszik a vérszérum GOT és/vagy GPT aktivitása (Karman, 1955).

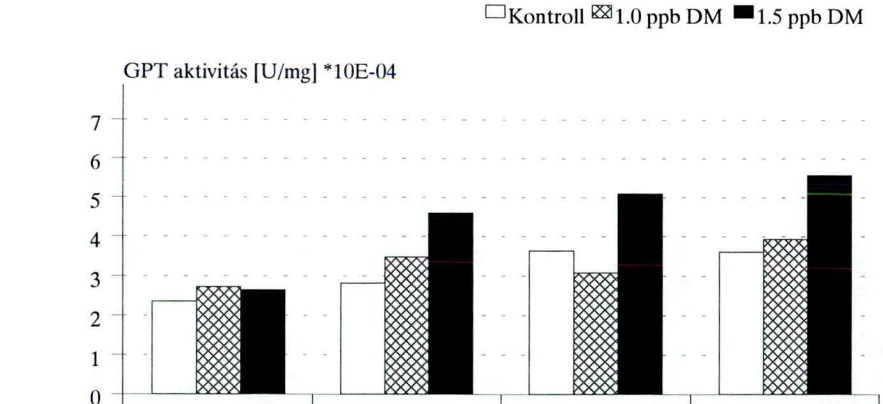
A GOT és GPT enzimek megoszlása halak különböző szerveiben változó (Nemcsók, Benedeczky, Boross, Asztalos és Orbán, 1981), így a két enzim megnövekedett értékeinek detektálása a vérszérumban lehetőséget nyújt arra, hogy a megfelelő szervek károsodására következtessünk. A kísérleteinkben tapasztalt GOT és GPT aktivitások növekedése a vérszérumban elsősorban májkárosodásra utal, de más szervek, vese és/vagy kopoltyú szintén károsodhattak.

Mind 1.0 ppb DM kezelést követően mind 1.5 ppb kezelés esetén (19. ábra) magasabb LDH aktivitás volt észlelhető a kontrollhoz képest, korrelációt azonban nem sikerült kimutatni az LDH aktivitások és az alkalmazott DM koncentrációja között.



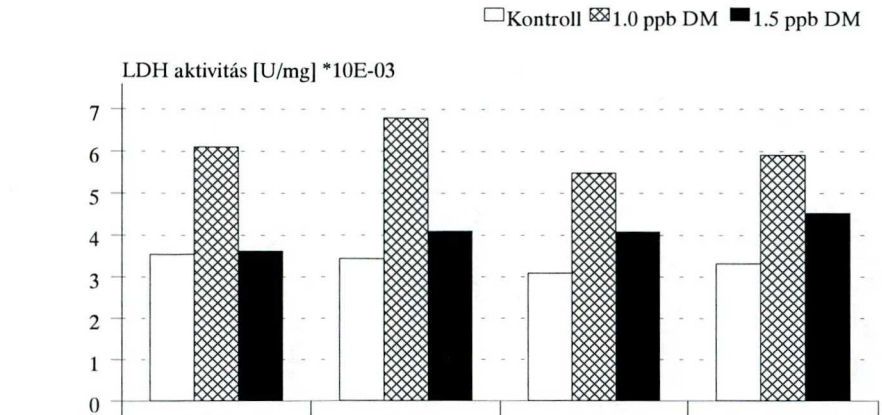
	24 óra	48 óra	72 óra	96 óra
Kontroll	2,6	4,4	3,7	3,8
1.0 ppb DM	4,6	8,7	9,1	10,8
1.5 ppb DM	8,6	10,4	11,2	13,1

17. ábra. Deltamethrin kezelés hatása vérplazma GOT enzim specifikus aktivitására pontyban, 25±1°C vízhőmérsékletnél. Az enzim specifikus aktivitását $*10^{-4}$ U/mg fehérje mértékegységben fejeztük ki. Az értékek 6-8 egyedből mért enzimaktivitások átlagai.



	24 óra	48 óra	72 óra	96 óra
Kontroll	2,3	2,8	3,6	3,6
1.0 ppb DM	2,7	3,5	3,1	3,9
1.5 ppb DM	2,6	4,6	5,1	5,6

18. ábra. Deltamethrin kezelés hatása vérplazma GPT enzim specifikus aktivitására pontyban, 25±1°C vízhőmérsékletnél. Az enzim specifikus aktivitását $*10^{-4}$ U/mg fehérje mértékegységben fejeztük ki. Az értékek 6-8 egyedből mért enzimaktivitások átlagai.

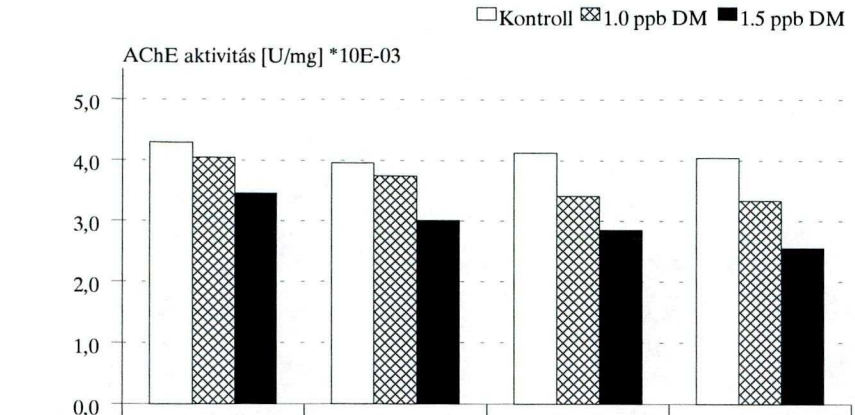


	24 óra	48 óra	72 óra	96 óra
Kontroll	3,5	3,4	3,1	3,3
1.0 ppb DM	6,1	6,8	5,5	5,9
1.5 ppb DM	3,6	4,1	4,1	4,5

19. ábra. Deltamethrin kezelés hatása vérplazma LDH enzim specifikus aktivitására pontyban, 25±1°C vízhőmérsékletnél. Az enzim specifikus aktivitását $*10^{-3}$ U/mg fehérje mértékegységben fejeztük ki. Az értékek 6-8 egyedből mért enzimaktivitások átlagai.

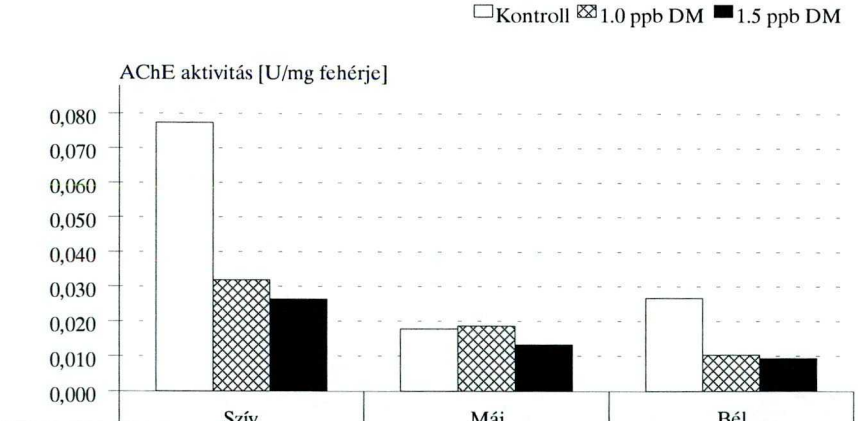
Az AChE specifikus aktivitása a szívben és a középbélben erős gátlást mutatott DM kezelés hatására, míg a májban hasonló hatást nem észleltünk (21. ábra). A gátlás mértéke 50-60 %-os volt 96 órás kezelést követően az említett szervekben. A vérszérum AChE aktivitása hasonló módon változott a szer koncentrációjának függvényében. 24 óra elteltével a változás még nem szignifikáns, a későbbi időpontban vett minták azonban már kifejezett AChE gátlást mutatnak (20. ábra).

Jól ismert, hogy a cyanopiretroidok, miként a DM is, az idegsejt membránok - normális esetben rövid ideig tartó - Na^+ permeabilitás változását elnyújtja, az ioncsatornák bezáródását gátolja. Mivel a membrán Na^+ ionokkal szembeni permeabilitás változása a felelős az idegingerület létrejöttéért és az ingerületvezetés alapvetően ugyanolyan mechanizmus szerint folyik az egész idegrendszerben, így a piretroidok hasonló módon hatnak a központi idegrendszer különböző részein.



	24 óra	48 óra	72 óra	96 óra
Kontroll	4,3	4,0	4,1	4,0
1.0 ppb DM	4,0	3,7	3,4	3,3
1.5 ppb DM	3,5	3,0	2,9	2,6

20. ábra. Deltamethrin kezelés hatása vérplazma AChE enzim specifikus aktivitására pontyban, 25±1°C vízhőmérsékletnél. Az enzim specifikus aktivitását $*10^{-3}$ U/mg fehérje mértékegységben fejeztük ki. Az értékek 6-8 egyedből mért enzimaktivitások átlagai.

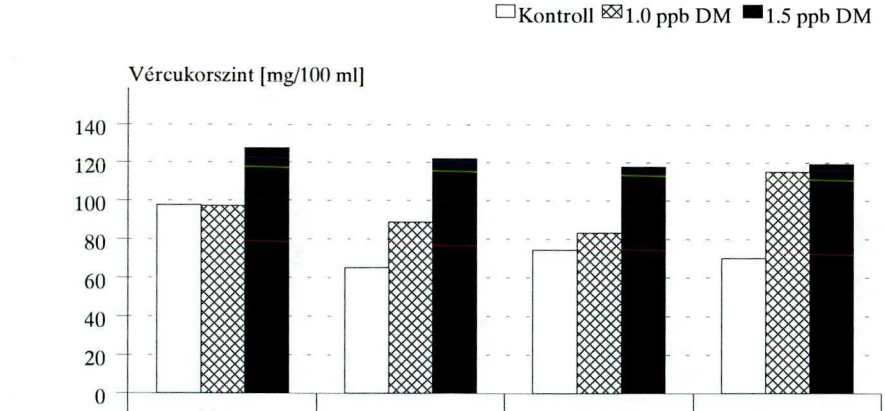


	Szív	Máj	Bél
Kontroll	0,077	0,018	0,027
1.0 ppb DM	0,032	0,019	0,010
1.5 ppb DM	0,026	0,013	0,009

21. ábra. Deltamethrin kezelés hatása ponty különböző szerveinek AChE enzim specifikus aktivitására pontyban, 25±1°C vízhőmérsékletnél. Az enzim specifikus aktivitását U/mg fehérje mértékegységben fejeztük ki. Az értékek 6-8 egyedből mért enzimaktivitások átlagai.

Nyilvánvaló a kapcsolat a DM Na^+-csatorna permeabilitására tett hatása és az AChE enzim gátlása között. A gátlás mértéke az alkalmazott koncentrációknál abszolút értékben nem olyan nagymérvű mint az a szerves foszforsavészterek esetében észlelhető, de nem szabad elfelejteni, hogy a halak érzékenysége miatt a piretroidokat ezerszer kisebb koncentrációban alkalmaztuk más inszekticidekhez képest.

A DM LC_{50}-hez közeli értékben alkalmazva olyan biokémiai változásokat indít el a perifériás idegsejtekben, amelyek megegyeznek a szórványos axon degenerációra utaló jelekkel. Ezek a destruktív jelenségek feltehetően, sok más egyéb mellett, a szívizom és a tápcsatorna AChE aktivitásának csökkenésére vezethetők vissza. Természetes, hogy ezek a szervek sokkal érzékenyebben reagálnak a gátlásra mint pl. a májszövet. Az AChE gátlása különösen a szívben veszélyes, mivel a kolinerg rendszer döntő szerepet játszik a halak szívének beidegzésében: az AChE bénítás fokozza a vagus tónust, ami rendkívül kedvezőtlen hatással van a keringést érintő metabolikus folyamatokra. Ilyen esetekben a szív normális funkciójának gátlódása megzavarhatja a kopoltyúban az O_2 felvételt és a CO_2 leadást, ami a különböző szövetekben hipoxiát okoz (Hughes, 1976).



	24 óra	48 óra	72 óra	96 óra
Kontroll	97,6	65,1	74,3	70,1
1.0 ppb DM	97,1	88,6	83,2	115,2
1.5 ppb DM	127,4	121,9	117,7	119,2

22. ábra. Deltamethrin kezelés hatása vércukorszintre pontyban, 25±1°C vízhőmérsékletnél. Az értékeket mg/100 ml egységben fejeztük ki. Az értékek 6-8 egyedből mért eredmények átlagai.

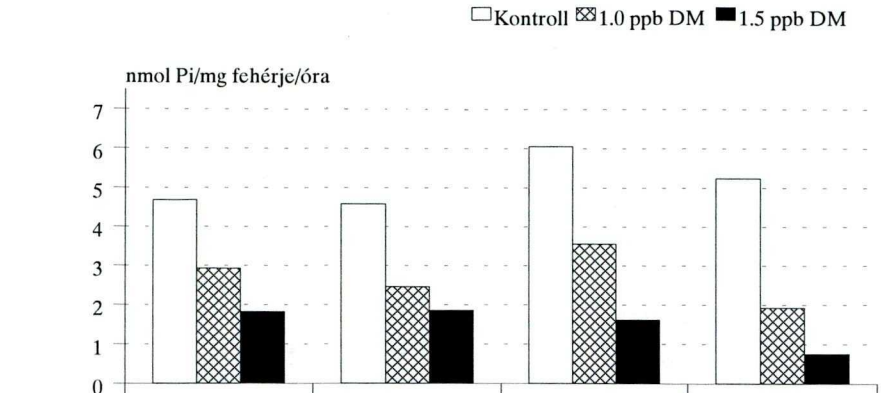
A vércukorszint változása a kezelt halaknál jól mutatja az általános stresszhatás megnövekedését. (22. ábra). A növekedés 1.5 ppb DM koncentráció esetén 24 óra elteltével szignifikáns. Ugyanakkor az 1.0 ppb-és kezelés az első 72 órában nem okoz szignifikáns változást, 96 óra elteltével viszont eléri a magasabb koncentrációjú kezelés által kiváltott stresszterheltség szintjét.

Az eritrocita plazmamembrán Na^+/K^+- és Mg^{2+} függő ATPáz aktivitása a kezelés során erőteljes csökkenést mutat, méghozzá az alkalmazott DM koncentráció tendenciájának megfelelően (23. és 24. ábrák).

A piretroid típusú inszekticideket nemcsak mint a Na^+ csatornák záródását befolyásoló vegyületeket tartjuk számon, de mint egyes neurotranszmitterek, receptorok és az ATPáz enzimek ionofor komplexei is ismertek (Dorman és Beasley, 1991). Arról szintén beszámoltak már, hogy az ATPázok aktivitása erősen függ a hőmérséklettől, a pH-tól és a víznyomástól is (Zaugg és McLain, 1976; Gibbs és Somero, 1989), mivel az említett környezeti tényezők változásokat okozhatnak a membrán lipidek összetételében is. Mivel ilyen környezeti hatást jelen kísérleteinkben nem feltételezhetünk, valószínűsíthető, hogy vizsgálataink során is a DM volt az, ami közvetlenül zavart okozott az ATPázok funkciójában. Nyilvánvaló, hogy a DM-nek ez a hatása kapcsolatban áll a Na^+ csatornák nyitásának meghosszabbodásával és az így létrejött ionösszetétel változással.

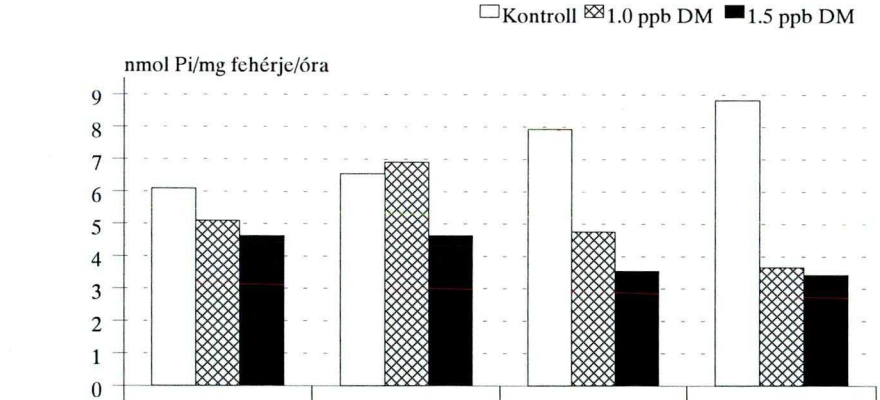
A kataláz enzim aktivitása a kezelt halaknál a kontroll egyedekhez viszonyítva szintén nőtt. (25. ábra). Ez jól mutatja a szervezetben a ROI vegyületek megjelenését, miként azt az 1. fejezet (Bevezetés) "A vizsgálatok elvi alapjai" című részében említettük.

Azt, hogy a DM miként indukál szabadgyök típusú reakciókat a halak szervezetében, egyelőre nem ismerjük pontosan, mivel ez a terület mindez idáig nem kellő részletességgel tanulmányozott. Annyi bizonyos azonban, hogy halakban a DM lebontás útja nem az emlősök esetében részletesen vizsgált úton folyik, s nem is a DM fotodegradációjánál, vagy növények általi lebontásánál megismert utakon.



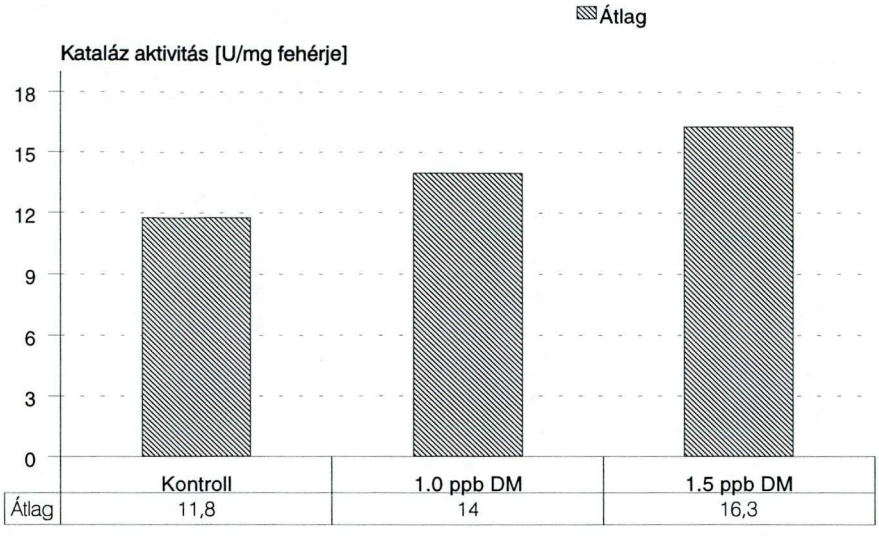
	24 óra	48 óra	72 óra	96 óra
Kontroll	4,7	4,6	6,1	5,2
1.0 ppb DM	2,9	2,5	3,6	1,9
1.5 ppb DM	1,8	1,8	1,6	0,8

23. ábra. Deltamethrin kezelés hatása vérplazma Na^+/K^+-ATP-áz enzim specifikus aktivitására pontyban, 25±1°C vízhőmérsékletnél. Az enzim specifikus aktivitását nmol P_i/mg fehérje/óra mértékegységben fejeztük ki. Az értékek 6-8 egyedből mért enzimaktivitások átlagai.



	24 óra	48 óra	72 óra	96 óra
Kontroll	6,1	6,6	7,9	8,8
1.0 ppb DM	5,1	6,9	4,8	3,7
1.5 ppb DM	4,6	4,6	3,5	3,4

24. ábra. Deltamethrin kezelés hatása vérplazma Mg^{2+}-ATP-áz enzim specifikus aktivitására pontyban, 25±1°C vízhőmérsékletnél. Az enzim specifikus aktivitását nmol P_i/mg fehérje/óra mértékegységben fejeztük ki. Az értékek 6-8 egyedből mért enzimaktivitások átlagai.



25. ábra. Deltamethrin kezelés hatása vérplazma kataláz enzim specifikus aktivitására pontyban, 25±1°C vízhőmérsékletnél. Az enzim specifikus aktivitását U/mg fehérje mértékegységben fejeztük ki. Az értékek 6-8 egyedből mért enzimaktivitások átlagai.

A DM metabolizmusa során a halakban - ellentétben más állatokkal (egér, fürj és más melegvérűek) - az észterkötés hasítása nagyon lassan megy végbe. A metabolizmus fő útja 4-hidroxi-fenoxi származékot eredményez, ami aztán az epében mint glükuronid kiválasztódik (Edwards és Millburn, 1985). Ennek a származéknak a jelenléte állhat kapcsolatban a megnövekedett kataláz aktivitással - a kataláz szerepe ugyanis éppen a megnövekedett mennyiségű szabadgyökök illetve a metabolizmusuk során felszabaduló ROI vegyületek eliminálása a szervezetből. A máj ultrastruktúrája is jellemző változásokat mutat ilyen metabolizmusok hatására, különösen a középső lebenyben. DM hatására megnövekszik a mitokondriumok száma, megváltozik kinézetük is, és rendellenes szerkezetűvé válnak (Catinot, Hoellinger, Pfister, Sonnier és Simon, 1989).

Az, hogy a halak a DM típusú piretroidokat csak igen lassan tudják metabolizálni, megmagyarázza azt a tényt, hogy a halak érzékenysége a DM toxikus hatására ppb tartományban van, ellentétben a már tárgyalt más peszticidekkel szembeni érzékenységükkel, ahol ez a tartomány ppm. A halak DM-re és más hasonló piretroidokra tehát ezerszer érzékenyebbek. Hasonló adatokat kapunk, ha a halak érzékenységét DM-

re az emlősökével, vagy más melegvérűekével hasonlítjuk össze. Nagyon valószínű, hogy ez az érzékenységbeli különbség a halak máj méregtelenítő enzim rendszerének eltérő működésén alapul, ennek bizonyítása azonban még hosszas kutatómunkát igényel.

Eredményeink azt mutatják, hogy a DM már nagyon kis koncentrációban is igen erős mérgező hatással volt a halak idegrendszerére és az általunk vizsgált egyéb paraméterekre.

A DM-el kezelt halak esetében jól detektálható enzimaktivitás változásokat észleltünk mind az állatok szerveiben, mind a vérszérumban a kontroll egyedekhez képest. A DM-mérgezett halaknál a következő szindrómákat figyeltük meg: remegés, a kopoltyúfedő abnormális mozgása (különösen a magasabb dózis esetében), ataxia és hiperaktivitás. A kezelt állatok a kísérlet során, rendkívül idegesek voltak, kiszámíthatatlanul úsztak faltól-falig az akváriumban, sokszor oldalra fordulva, gyakran nekiütközve a falnak, ami aztán hám- és izomszöveti sérüléseket okozott. Ezt a stresszelt állapotot jól jellemezte a magas vércukorszint is, különösen a 72 és 96 órás kezelések esetében. A megnövekedett vércukorszint megnövekedett LDH szinttel kapcsolódott a kezelés során, ezzel is jelezve a biokémiai metabolizmus változásait a stresszelt halak esetében, különösen az izomszövet vonatkozásában.

Indukált "nem motoros" szimptómák, pl. vércukorszint növekedése, illetve az ezzel kapcsolatos folyamatos stresszhatás párosítatlan γ-globulin formák létrejöttét eredményezi (Bradbury, Forshaw, Gray és Ray, 1983), valamint elnyomja az interferontermelést, ez utóbbiak viszont fontos szerepet játszanak a halaknál a különböző fertőzésekkel szembeni ellenállóképesség létrejöttében és fenntartásában (Wedemeyer, 1970; Nemcsók és mtsai., 1982).

A glükogén és a glükóz katabolizmusa magas vércukorszint esetén tejsav-képződés irányába tolódhat el, ami halálos is lehet a halakra (Nakono és Tomlinson, 1967).

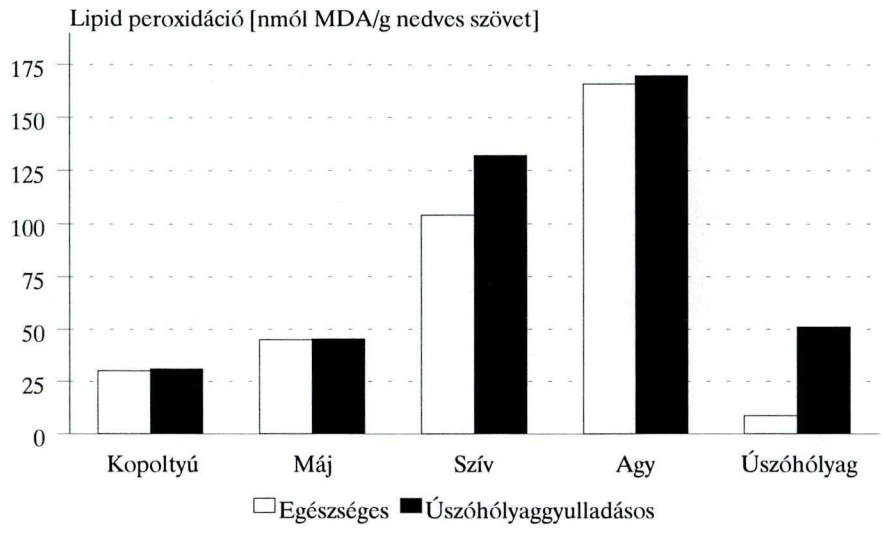
Az 1991-es évben a balatoni angolnapusztulás okait vizsgáltuk a pusztulás idején befogott angolnák biokémiai paramétereit mérve. Szignifikáns AChE bénítást tapasztaltunk az angolnák vérszérumában és egyéb szerveiben is, miközben az állatok szövetéből DM szermaradvány volt kimutatható (Gönczy, 1992). Sokatmondó továbbá, hogy a GOT, GPT és kataláz értékek, valamint a vércukorszint kísértetiesen hasonló tendenciát mutatott, mint a jelen kísérletünkben pontyok DM kezelése után.

Mindezek alapján, véleményűnk szerint az angolnapusztulás egyik oka 1991-ben a DM jelenléte volt, ami egyébként az egész Balaton körül alkalmazott K-Othrin nevű inszekticid hatóanyaga. Természetesen nem zárhatók ki egyéb okok sem, mint például,. a magas vízhőmérséklet, a nagy egyedszám, amelyek szintén fokozzák az állatokat ért stresszhatást, így akárcsak a DM érzékenyen befolyásolják a halak ellenállóképességét. Ilyen körülmények között, egy szinte törvényszerűen bekövetkező fertőzés, mint pl. a fonálféreg, már tömeges elhullást válthat ki.

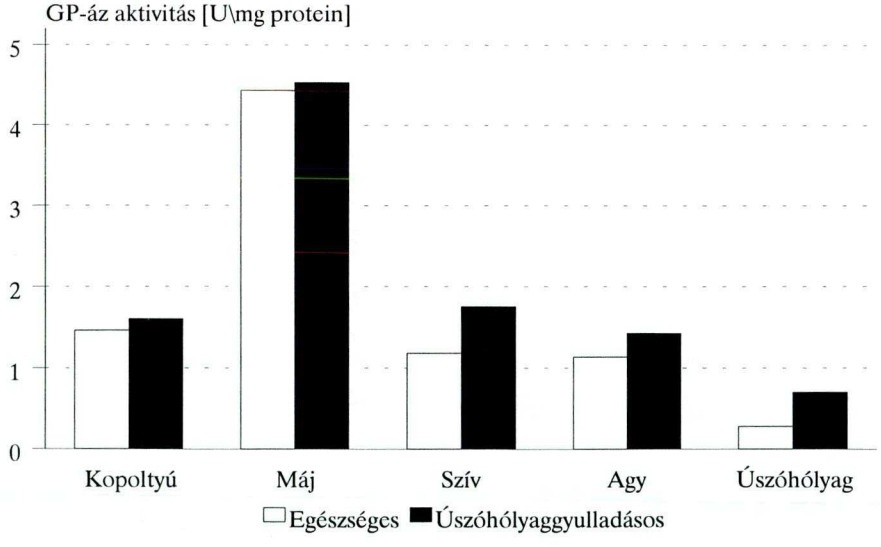
5.4. Szabad gyökök és reaktív oxigén intermedierek szerepe halak úszóhólyag gyulladásos megbetegedéseiben

Kísérleteinkben úszóhólyag gyulladásban szenvedő kísérleti állatok néhány biokémiai paraméterét hasonlítottuk össze egészséges egyedekével.

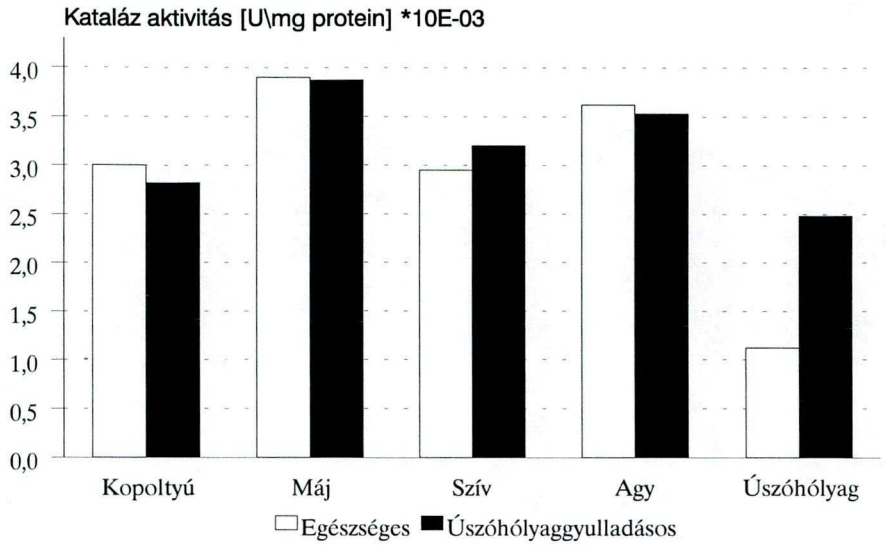
Az úszóhólyag gyulladásban szenvedő egyedek minden biokémiai paramétere magasabb értékeket mutatott a kontroll állatokhoz képest. A beteg kísérleti alanyok úszóhólyagjában a lipid peroxidációs érték 3-szoros, a GP-áz és kataláz aktivitások 2-szeres, míg a SOD aktivitása 8-szoros értéket mutatott az egészséges állatokhoz képest (26., 27, 28. és 29. ábrák). Hasonlóan magasabbak voltak a szív izolátumokból mért megfelelő értékek az úszóhólyag gyulladásban szenvedő halak esetében. Mindebből gyanítható, hogy a gyulladás megjelenésével szabad gyökök jelennek meg növekvő mennyiségben, s ezek a vérárammal eljuthatnak más szervekbe is, ott *in situ* károsodásokat okozva. Ehhez képest a kopoltyúból és agyból nem sikerült szignifikáns változásokat kimutatni.



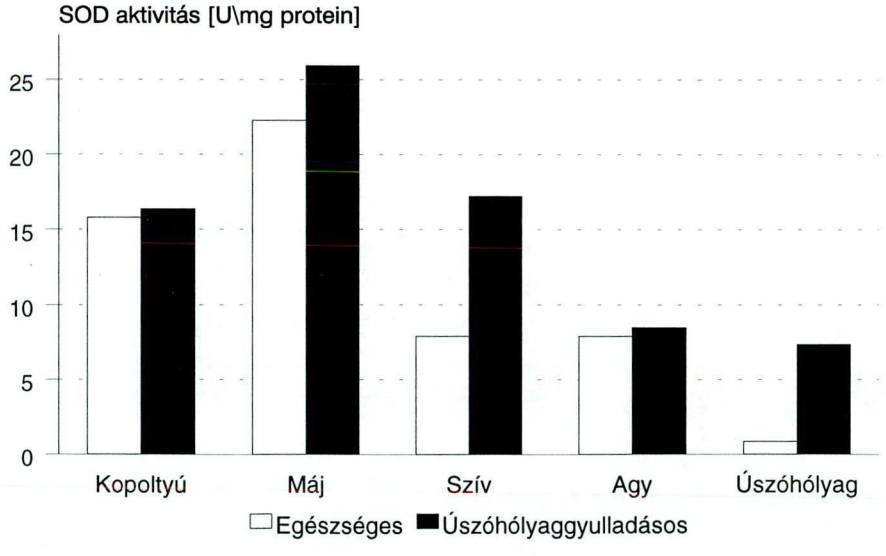
26. ábra Úszóhólyag gyulladás hatása a lipid peroxidáció mértékére ponty különböző szerveiben.



27. ábra Úszóhólyag gyulladás hatása a GP-áz aktivitásra ponty különböző szerveiben.



28. ábra Úszóhólyag gyulladás hatása a kataláz aktivitás alakulására ponty különböző szerveiben.



29. ábra Úszóhólyag gyulladás hatása a SOD aktivitás változására ponty különböző szerveiben.

A szervezetben előforduló szabad gyököknek általában komoly szerepet tulajdonítanak a gyulladásos megbetegedések létrejöttében. Nevezetesen a képződött O_2^- és H_2O_2 a sejtfalon kívüli térben az antioxidatív védelem hiányában az egyébként sértetlen szövetekben károsodásokat okozhat.

Megfigyelték, hogy a felszabadult O_2^- egy vérplazma prekurzorral - ami úgy tűnik egy albumin-lipid komplex, amit maguk a fagociták termelnek - képes aktiválni a fagocitákat. Ez a folyamat öngerjesztő, mivel így a fagociták által termelt anyag folyamatosan jelen van a gyulladásos folyamatokkor, míg a reaktív oxigén intermedierek (ROI) folyamatosan szabadulnak fel a gyulladás helyszínén lévő nagyszámú leukocitából, s a későbbiekben a kijutó intermedierek és lizoszóma enzimek fokozzák a szövetkárosodást. Az ilyen esetekben Petrone, English, Wony és McCord (1980) valamint Fantone és Ward (1982) szerint a SOD enzim igen hatékony gyulladásgátló tud lenni.

Minthogy a halak zsírtartalmát mintegy 50%-ban telítetlen zsírsavak képezik (Mazeaud, Maral és Michelson, 1979), a szervezetben képződött szabad gyököknek nagy esélyük van lipid peroxidációs folyamatokban részt venni. Így a normálistól eltérő lipid peroxidáció mértéke a halak szervezetében különösen korrelál a szabadgyök reakciók mértékével.

Ez főként azért van így, mivel a lipidek autoperoxidációja az élő szervezetben meglehetősen komplikált és lassú folyamat, tekintettel arra, hogy az elemi (molekuláris) oxigén igen gyenge oxidáns. Ezzel szemben a szabad gyökök, amelyek hidrogén redukció által oxidálódnak, az oxigénnel sokkal könnyebben képesek reagálni, ezzel peroxid gyököket hozva létre, amik aztán láncreakciószerűen gyorsítják föl a lipid peroxidációt.

A lipid peroxidáció elsődleges következménye az, hogy a membránok elveszítik integritásukat, különösen azok a membrán régiók, ahol a telítetlen zsírsavak aránya magas.

A szabadgyök képződéssel járó betegségek környezetszennyezéseket, a természetes vizekben lévő állatoknál pedig hipoxiát okozhatnak (Bus, Aust és Gibson, 1974; Guarneri, Lugaresi, Flamigni, Muscari és Caldarea 1982), s ilyet gyakran előidézhetnek különböző kémiai anyagok, ha a környezetbe kerülnek.

Az elmúlt évtizedben végzett kísérletekből az derült ki, hogy számos, a mezőgazdaságban használt peszticid szabadgyökök képződésével járó patológiás folyamatot okozhat (Bus és Gibson, 1982; Matkovics, Szabó, Iván és Gaál 1983; Aldrich, Fisher, Cadenas és Change 1983; Matkovics, Szabó, Varga, Novák, Barabás, Berencsi és Nemcsók 1984).

A szabadgyökök képződése és az azokat lebontó enzimek aktivitásának növekedése a szervezetben az úszóhólyag gyulladás karakterisztikus jellemzői. A paraziták különböző fejlődési stádiumban lévő egyedeinek folytonos szétesése, elfolyósodása, a szöveti károsodások, a kapillárisok eltömődése következtében létrejövő pangások mind szabadgyökök képződését segítik elő. Ez az állapot krónikus stádiumban baktérium fertőzéssel, a fagociták állandó jelenlétével és így a szabad gyökök növekvő mennyiségével járhat együtt egyenes következményeként a sejtnekrózisnak. Ezt a hatást elimináló (kivédő) enzimek aktivitásának változása közvetlenül jelzi.

Eredményeink azt mutatják, hogy a szabad gyökök megjelenése, ami az azokat metabolizáló enzimek megnövekedett aktivitásában is mutatkozik, közvetve vagy közvetlenül szerepet játszik a gyulladások kialakulásában és terjedésében. A közvetlen okok lehetnek környezeti tényezők, mint például hipoxia vagy hiperoxia, illetve ezek káros következményei (Guarneri és mtsai., 1982). Számos, a mezőgazdaságban használt vegyszerről is kiderült, hogy halakban patológiás szabadgyök reakciókat indukálnak (Matkovics és mtsai., 1984; Aldrich és mtsai. 1983; Bus és Gibson, 1982). Ezen felül szabadgyök képződéshez vezethet az egyoldalú táplálkozás, és/vagy számos aminosav hiánya a táplálékban.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

6.1. Réz-szulfát hatása halakra

1. A réz-szulfát toxikus hatását detektáltuk eltérő életmódú halak biokémiai paramétereire. Mindegyik halfaj esetében megnövekedett a plazma GOT, GPT és LDH aktivitása, valamint a halak vércukor szintje, ami súlyos szövetkárosodásokra és stressz terheltségre utal. A toxikus hatásra minden vizsgált paraméter tekintetében a busa reagált a legérzékenyebben, majd a ponty következett, végül a $CuSO_4$ a harcsa szervezetére fejtette ki a legkisebb toxikus hatást.

2. A hipoxia kísérleteinkben megnövelte a $CuSO_4$ toxikus hatását pontyoknál, miként azt a megnövekedett GOT, GPT, és LDH aktivitások mutatták. A hiperoxia $CuSO_4$ kezeléssel kombinálva ugyanakkor nem okozott szignifikáns változást azokhoz a halakhoz képest, amelyeket normoxiás körülmények között csak $CuSO_4$ kezelésnek tettünk ki. Ezek az adatok azt mutatják, hogy a víz alacsony oxigén tartalma fokozza a $CuSO_4$ szövetkárosító hatását még relatíve alacsony $CuSO_4$ koncentráció esetén is.

3. A réz toxikus hatásán kívül a víz savassága is szövetspecifikus károsodást okozott kísérleti állatainknál. A legfontosabb konklúzió azonban az, hogy a kombinált kezelés (réz-szulfát savas pH mellett) hatása lényegesen nagyobb, mint az egyes kezeléseknek külön-külön. Ez a megállapítás a vizsgált paraméterek többségére igaznak bizonyult, de kiemelt mértékben vonatkozik a vérplazma GPT aktivitására.

Eredményeink tanúsága szerint ökológiai faktorok (a víz oldott oxigén tartalma, pH-ja) valamint a halak faji (életmódbeli?) különbsége jelentősen befolyásolhatják a réz-szulfát toxicitását. Az általunk végzett biokémiai mérések megnövelhetik az esélyét annak, hogy a vízszennyező anyagok és az ökológiai faktorok halakra tett károsító hatását pontosabban megjósolhassuk.

6.2. Különböző peszticidek ($CuSO_4$, PQ, MD) hatása ponty bélcsatorna és vérplazma AChE aktivitásaira

1. Ponty bélcsatornájában és vérében hosszú távú szubletális koncentrációban alkalmazott kezelés esetén az egyébként rövid távon gátló hatású $CuSO_4$ a kontroll egyedekhez képest megnöveli az AChE aktivitását (overshut), amit feltehetően a AChE *de novo* szintézisének felgyorsulása okoz. Ez legkifejezettebb az utóbélben.
2. A PQ ponty bélcsatornájában és vérében hasonló hatást mutatott. Mind a kezelések kezdetén tapasztalt gátlás, mind pedig a hosszabb idő múlva jelentkező serkentés enyhébb a $CuSO_4$ esetében tapasztaltakhoz képest.
3. A MD mind a vérben, mind a bélcsatornában (különösen az előbélben) erősen gátolja az acetilkolinészterázt, így súlyos zavarokat okoz a normális idegrendszeri folyamatokban.
4. A kombinatív kezelések bizonyítják, hogy a szubletális koncentrációban alkalmazott peszticidek együttes alkalmazása során szinergista ($CuSO_4$ és PQ) és antagonista ($CuSO_4$ és MD, illetve kis mértékben PQ és MD) hatások léphetnek fel, amik az egyenkénti kezelések hatásától igen nagy mérvű eltérést is okozhatnak.

Eredményeink alapján különösen fontosnak tartjuk a szerves foszforsavészterek hatásának tanulmányozását a vízi ökoszisztéma élőlényeire, hiszen specifikusan reagálnak az idegfolyamatokban alapvető jelentőségű kolinészteráz enzimekkel, ugyanakkor elterjedten alkalmazzák őket mezőgazdasági célokra inszekticidek hatóanyagaként.

6.3. Deltamethrin hatása pontyokra

1. DM kezelés hatására az AChE aktivitás kivételével mindegyik vérből mért paraméter (GOT, GPT, LDH, vércukor) szignifikáns növekedést mutatott a kezelés hatására ($P < 0.05$), ami súlyos szövetkárosodásokra utal.

2. Az AChE specifikus aktivitása mindkét alkalmazott koncentrációnál gátlást mutatott a szívben és a tápcsatornában, míg a májban nem észleltünk AChE aktivitás változást. Ugyanakkor a vérszérum AChE aktivitása is fokozatos csökkenést mutatott, ami azért meglepő, mert a piretroidok nem mutatnak rokon szerkezetet a tipikus AChE gátlókkal.

3. A Na^+/K^+-ATPáz aktivitás az alkalmazott DM dózis mértékének megfelelően csökkent, míg a Mg^{2+}-ATPáz kevésbé mutatott dózisfüggés. Ezek az eredmények a szer hatására bekövetkezett membránkárosodásra utalnak.

4. A kataláz aktivitása a májban markánsan megnövekedett a deltamethrinnel kezelt halak esetében a kontroll állatokhoz képest. Ez fokozódó szabadgyök és/vagy ROI reakciókat jelez.

Eredményeink - mint az alkalmazott szer primer biokémiai effektusai - jól mutatják, hogy a DM pontyokra kifejtett hatása az általunk alkalmazott laboratóriumi körülmények között igen veszélyesnek bizonyult. Legfontosabb megállapításunk, hogy ilyen típusú inszekticid, közvetlenül az élő vizekbe kerülve sokkal szélesebb körű és erősebb hatást fejt ki a halakra, mint azt valaha is gondolták volna.

6.4. Szabad gyökök és reaktív oxigén intermedierek szerepe halak úszóhólyag gyulladásos megbetegedéseiben

1. Kísérleteink során az úszóhólyag gyulladásban szenvedő pontyok esetében - különösen a célszervben - a lipid peroxidáció mértékének felgyorsulását észleltük. Ez általában szabadgyökök és reaktív oxigén intermedierek jelenlétére utal.

2. Az említett csoportok eliminálásában résztvevő enzimek közül a GPáz, és a SOD aktivitása több vizsgált szervben megnövekedett, amiből arra lehet következtetni, hogy a gyulladásban szerepet játszó anyagok a szervezet más részeibe szétterjedtek.

3. A kataláz aktivitása a gyulladt úszóhólyagon kívül más szervekben nem mutatott emelkedést, ott viszont megduplázódott, jelezve a kóros folyamatok súlyosságát.

Eredményeinkből megállapíthatjuk, hogy a szabad gyökök és a reaktív oxigén intermedierek közvetlen és közvetett módon is szerepet játszanak a halak úszóhólyag gyulladásos megbetegedéseinek kialakulásában és/vagy a gyulladásos folyamat előrehaladásában.

7. A FELHASZNÁLT IRODALOM JEGYZÉKE

1. Ahne W. (1973) Zellkulturen an verschiedenen Süsswasser teleosteergeweben und Untersuchungen über die Atiologie der Schwimmblasenentzündung der Karpfen. *Ph.D. Dissertation*, Ludwig Maximilian Universität, München.

2. Aldrich T. K., Fisher A. B., Cadenas E. and Change B. (1983) Evidence for lipid-peroxidation by paraquat in the perfused rat lung. *Journal of Laboratory Clinical Medicine*, **101(1),** 66.

3. Amador E., Franey R. J., Massod M. F., (1966) Serum glutamic oxalacetic transaminase activity: diagnostic accuracy of the revised spectrophotometric and dinitrophenyl-hydrazine methods. *Clinical Chemistry*, **12**, 475.

4. Annon L. (1971) Photometric determination of LDH activity in blood serum. *Zeitung für Klinischer Chemistrie und Klinischer Biochemistrie*, **8**, 658.

5. Arshanica N. M. (1969) Data about epizootiology, diagnosis and prevention of swimbladder inflammation in carp. *Izvestia Gosniorh*, **69,** 15.

6. Asztalos B. and Nemcsók J. (1985) Effect of pesticides on the LDH activity and isoenzyme pattern of carp (*Cyprinus carpio* L.) sera. *Comparative Biochemistry and Psysiology*, **82C**, 217.

7. Augustinsson K. B. (1948) Cholinesterases - A study in comparative enzimology. *Acta Physiologica Scandinavica*, **15**, 52.

8. Augustinsson K. B. (1959) Electrophoresis studies on blood plasma esterases. *Acta Chemica Scandinavica*, **13**, 1081.

9. Bell G. R. (1968) Distribution of transaminases (aminotransferases) in the tissues of Pacifik salmon (Oncorhyncus), with emphasis on the properties and diagnostic use of glutamic-oxalacetic transaminase. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, **25**, 1247.

10. Benedeczky I., Bíró P. and Schaff Zs. (1984) Effect of 2.4 D containing herbicide (Diconirt) on ultrastructure of carp liver cells. *Acta Biologica Szegediensis*, **30**, 107.

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

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

13. Bradbury J. E., Forshaw P. J., Gray A. J. and Ray D. E. (1983) The action of mephenesin and other agents on the effects produced by two neurotoxic pyrethroids in the intact and spinal rat. *Neuropharmacology*, **22(7)**, 907.

14. Bus J. S., Aust S. A. and Gibson J. E. (1974) Superoxide and singlet oxygen catalysed lipid peroxidation as a possible mechanism for paraquat (methyl-viologen) toxicity. *Biochemical Biophysical Research Communication*, **58,** 749.

15. Bus J. S. and Gibson J. E. (1982) Mechanism of superoxide radical mediated toxicity. *Toxicology,* **19(6,7),** 689.

16. de Boer S. F., van der Gugten J., Slangen J. L. and Hijzen T. H. (1988) Changes in plasma corticosterone and catecholamine contents induced by low doses of deltamethrin in rats. *Toxicology*, **49**, 263.

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

18. Chopade H. M. and Dauterman (1981) Studies on the *in vitro* metabolism of methidation by rat and mouse liver. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **15**, 105.

19. Clarc D. G., McElliot T. F and Hurst E. W. (1966) The toxicity of paraquat. *British Journal of Industrial Medicine*, **23**, 126.

20. Conning D. M., Fletcher K. and Swan A. A. B. (1969) Paraquat and related bipyridyls. *British Medical Bullettine*, **25**, 245.

21. Coppage D. L., Matthews E., Cook G. H. and Knight J. (1975) Brain acethylcholinesterase inhibit on in fish as a diagnosis of environmental poisoning by malathion O,O-dimethyl-S-(1,2-dicarbethoxyethyl)-phosphorodithioat. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **5**, 19.

22. Coppage D. L. (1971) Characterization of fish brain thylcholinesterase with an automated pH stat for inhibition dies. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **6**, 304.

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

24. Coppage D. L. and Matthews E. (1975) Brain acethylcholinesterase inhibition in a marine teleost during lethal and sublethal exposures to 1.2-dibromo-ethyl phosphate (Naled) in sea-water. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **31**, 128.

25. Csaba Gy., Kovács-Gayer É., Békési L., Bucsek M., Szakolczai J. and Molnár K. (1984) Studies into the possible protozoan aetiology of swimbladder inflammation in carp fry. *Journal of Fish Diseases*, **7,** 39.

26. Dorman D. C. and Beasley V. R. (1991) Neurotoxicology of pyrethrin and the pyrethroid insecticides. *Veterinary and Human Toxicology*, **33**, 238.

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

28. Ellman G. L. and Courtney D. D. (1961) A new and rapid colorimetric determiation of AChE activity. *Biochemical Pharmacology*, **7**, 88.

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

30. Eto M. (1974) *Organophosphorus pesticides: Organic and biological chemistry*, CRC Press, Cleveland.

31. Fieber J. (1913) Studien üben Schwimmblasen coccidien der Gadus-Arten (*Eimeriagadi* sp.). *Archive for Protistencunde*, 315.

32. Fisher H. K., Humphries M. and Bails R. (1971) Paraquat poisoning: Recovery from renal and pulmonary damage. *Annals of International Medicine*, **75**, 731.

33. Fisher H. K. (1977) Importance of oxigen and of pulmonary alveolar surfactant in lung injury by paraquat. In: *Biochemical mechanism of paraquat toxicity* (Ed.: Anton A. P.). Academic Press, New York.

34. Fishke C., Subbarow Y. (1925) The colorimetric determination of phosphorus. *Journal of Biological Chemistry*, **66**, 375.

35. Fleming W. J. and Grue C. E. (1981) Recovery of cholinesterase activity five avian species exposed to Dicrotophos, an organophosphorus pesticide. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **16**, 129.

36. Förstner U. and Prosi F. (1979) Heavy metal pollution in freshwater ecosystem. In: *Biological Aspects of Freshwater Pollution*, (Ed.: Ravera O.) 129. Pergamon Press, Oxford.

37. Gage J. C. (1955) Blood cholinesterase values in early diagnosis of excessive exposure to phosphorous insecticides. *British Medical Journal*, **1**, 1370.

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

39. Gornall A. G., Bardawill C. J., David M. M. (1949) Determination of Serum Proteins by Means of the Biuret Reaction. *Journal of Biological Chemistry*, **177**, 751.

40. Gönczy J. (1992) Adatok és feltételezések az angolnapusztulás körülményeinek tisztázásához. *Halászat*, **1992/1**, 21.

41. Guarneri C., Lugaresi A., Flamigni F., Muscari C. and Caldarea C. M. (1982) Effect of oxygen radicals and hyperoxia on rat heart ornitine decarboxilase activity. *Biochimica et Biophysica Acta* **718**, 157.

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

43. Hochstein P., Kumar K. S. and Forman S. J. (1980) Lipid peroxidation and cytotoxicity of copper. *Annals of New York Academy of Sciences*, **355**, 240.

44. Hofer B. (1904) *Handbuch der Fischkrankenheiten.* Verlag Allgemeine Fisherei Zeitungen, München.

45. Holland H. T., Coppage D. L. and Butler P. A. (1967) Use of fish brain acethylcholinesterase to monitor pollution of organophosphorus pesticides. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **2**, 156.

46. Horváth I. and Stammer A. (1979) Electron microscopical structure of gill lamellas of the ide (*Leuciscus idus*) with particular regard to the chloride cells and H_2S pollution. *Acta Biologica Szegediensis*, **25**, 133.

47. Howarth R. S. and Sprague J. B. (1978) Copper lethality to rainbow trout in waters of various hardness and pH. *Water Research*, **12**, 455.

48. Hughes G. M., Albers C., Muster D. and Götz K. H. (1983) Respiration of the carp, *Cyprinus carpio L.* at 10 and 20°C and the effects of hypoxia. *Fish Biology*, **22**, 613.

49. Hughes G. M. (1976) Polluted fish respiratory physiology. In: *Effects of pollutants on aquatic organism.* (Ed.: Lockwood A. P. M.), Cambridge University Press, London, 121.

50. Johnels A. G., Westernwark T., Berg W., Persson P. I. and Sjöstrand B. (1967) Pike (*Esox lucius* L.) and some other aquatic organisms in Sweden as indicators of mercury contamination in the environment. *Oikos*, **18**, 323.

51. Karman A. (1955) A note on the spectrophotometric assay of glutamic oxalacetic transaminase in human blood serum. *Journal of Clinical Ivestigations*, **34**, 131.

52. Kearney P. G. and Kaufmann D. D. (1975) *Herbicides chemistry degradation and mode of action*. **Vol. 2.**, Dekker, New York.

53. Klaverkamp J. F., Hobden B. R. (1980) Brain acethylcholinesterase inhibition and hepatic activation of acephate and fenitrothion in rainbow trout *(Salmo gairdneri* L.). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **37**, 1450.

54. Knowles O. C., Casida J. E. (1966) Mode of action of organophosphate anthelmintics. Cholinesterase inhibition in Ascaris lumbricoides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **14**, 566.

55. Körting W. (1982) Protozoan parasites associated with swim bladder inflammation (SBI) in young carp. *Bullettine of the European Assotioation of Fish Pathologists*, **2,** 25.

56. Kovács-Gayer É., Csaba G., Békési L., Bucsek M., Szakolczai J. and Molnár K. (1982) Studies on the protozoan etiology of swimbladder inflammation in common carp fry. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists,* **2,** 22.

57. Kovács-Gayer É. (1983) Histopathological studies on protozoon swimbladder inflammation of common carp fry. *Parazitologia Hungarica*, **16,** 39.

58. Kristoffersson R., Broberg S., Oskari A. and Pekkarinen M. (1974) Effect of a sublethal concentration of phenol on some blood plasma enzyme activities in the pike (Esox lucius L.) in brackish water. *Annales Zoologici Fennici*, **11**, 220.

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

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

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

62. Lowry O. H., Rosebrough N. L., Farr A. L. and Randall R. I. (1951) Protein measurement with Folin phenol reagent. *Journal of Biolgical Chemistry,* **193**, 265.

63. Matkovics B., Novák R., Hahn H. D., Szabó L. and Varga Sz. I. (1977a) A comparative study of some important experimental animal peroxide metabolism enzymes (I). *Comparative Biochemistry and Physiology,* **56B**, 31.

64. Matkovics B., Novák R., Hahn H. D., Szabó L. and Varga Sz. I. (1977b) A comparative study of some important experimental animal peroxide metabolism enzymes (II). *Comparative Biochemistry and Physiology,* **56B**, 397.

65. Matkovics B., Szabó L., Iván J. and Gaál I. (1983) Some further data on effects of two organophosphate pesticides on the oxidative metabolism in the liver. *Genetic Pharmacology*, **14,** 689.

66. Matkovics B., Szabó L., Varga Sz. I., Novák R., Barabás K., Berencsi G. and Nemcsók J. (1984) Effects of herbicide on the peroxide metabolism enzymes and lipid peroxidation in carp fish. *Acta Biologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, **35(1),** 91.

67. Matsumura F. (1988) Deltamethrin induced changes in choline transport and phosphorylation activities in synaptosomes from the optic lobe of squid, *Loligo pealei*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **89C**, 179.

68. Mauck W. L., Olsen L. E. and Marking L. L. (1976) Toxicity of natural pyrethrins and five pyrethroids to fish. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **4**, 18.

69. Mazeaud F., Maral J. and Michelson A. M. (1979) Distribution of superoxide dismutase and gluthation peroxidase in the carp: Erithrocyte manganese SOD. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, **86,** 1161.

70. McKim J. M., Christiensen G. M., Hunt E. P. (1970) Changes in the blood of brook trout (*Savelinus fontinalis*) after short-term and long-term exposure to copper. *Journal of Fisheries Research*, **27**, 1883.

71. McLeese D. W. and Metcalfe C. D. (1976) Toxicity of mixtures of phosphamidon and methidation to lobsters (*Homarus americanus* L.). *Chemosphere*, **2**, 59.

72. Miller T. G. and Mackay W. C. (1980) The effects of hardness, alkalinity and pH of test water to the toxicity of copper to rainbow trout (*Salmo gairdneri* L.). *Water Research*, **14**, 129.

73. Misra H. P. and Fridovich I. (1972) The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *Journal of Biolgical Chemistry,* **247**, 3170.

74. Molnár K. (1988) Presporogonic development of *Sphaerospora renicola* Dyková and Lom 1982, in the swimbladder of the common carp, *Cyprinus carpio* L. *Journal of Fish Diseases*, **11,** 489.

75. Nair V. and Turner G. E. (1984) The thiobarbituric acid test for lipid-peroxidation: Structure of the adduct with malondialdehyde. *Lipids* **19,** 84-85.

76. Nakono T. and Tomlinson N. (1967) Catecholamine and carbohydrate concentrations in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) in relation to physical disturbances. *Journal of Fisheries Research Board of Canada*, **24**, 1701.

77. Nemcsók J., Orbán L., Vígh É. and Tóth T. (1986) Investigations on damaging effects of anthropogenic agents on carp by the measurement of some biochemical parameters. *Acta Universitati Lodziensis Folia Biochimica et Biophysica*, **5**, 45.

78. Nemcsók J., Orbán L., Asztalos B. and Vígh É. (1987) Accumulation of pesticides on the organs of carp (*Cyprinus carpio* L.) at 4 °C and 20 °C. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology,* **39**, 370.

79. Nemcsók J., Benedeczky I., Boross L., Asztalos B. and Orbán L. (1981) Subcellular localization of transaminase enzymes in fishes and their significance in the detection of water pollution. *Acta Biologica Szegediensis*, **27**, 9.

80. Nemcsók J., Asztalos B., Vígh É. and Orbán L. (1987) The effect of an organophosphorus pesticide on the enzymes of carp (*Cyprinus carpio* L.). *Acta Biologica Academiae Scientiarum Hungaricae* , **38(1)**, 77.

81. Nemcsók J., Oláh J. and Boross L. (1982) Studies on stress effect caused by malachite green and formaline treatments of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquacultura Hungarica (Szarvas)*, **III**, 57.

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

83. Nemcsók J. and Boross L. (1982) Comparative studies on the sitivity of different fish species to metal pollution. *Acta Biologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, **33(1)**, 23.

84. Nemcsók J. and Hughes G. M. (1988) The effects of copper sulphate on some biochemical parameters of rainbow trout. *Environmental Pollution*, **49**, 77.

85. Olson D. L. and Christensen G. M. (1980) Effect of water pollutants and other chemicals on fish acetylcholinesterase in vitro. *Environmental Research*, **21**, 327.

86. Onishi T. and Murayama S. (1970) Studies on enzymes of cultivated Salmonoid fishes. II. Activities of protease, amylase, arginase GPT and GOT in various growth stage. *Bulletin of the Tokai Regional Fisheries Research Laboratory*, **63**, 123.

87. Pascoe D., Evens S. and Woodworth J. (1986) Heavy metal toxicity to fish and the influance of water hardness. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **15**, 481.

88. Petrone W. F., English O. K., Wony K. and McCord J. (1980) Free radicals and inflammation: superoxide dependent activation of a neutrophyl chemotactic factor in plasma. *Proceedings of National Academy of Sciences of USA*, **77(2)**, 1159.

89. Phipps L.G., Holcombe G.W. and Fiandt J. T. (1981) Acute toxicity of phenol and substituted phenols to the Fathead Minnow. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **26**, 585.

90. Placer Z. A., Cushman L. L. and Johnson B. C. (1966) Estimation of product of lipid-peroxidation (malonyl dialdehyde) in biochemical systems. *Analitical Biochemistry*, **16,** 359.

91. Popper H. (1982) Hepatocellular degeneration and death. In: T*he Liver: Biology and Pathology* (Eds.: Arias M., Popper H., Schachter D. and Shafritz D. A.). Raven Press, New York.

92. Radi A. A., Hai D Q, Matkovics B. and Gabrielak T. (1985) Comparative antioxidant enzyme study in freshwater fish with different types of feeding behaviour. *Comparative Biochemistry and Physiology,* **81C**, 395.

93. Reichenbach-Klinke H. H. (1972) Histologische und enzymatische Veranderungen nach Schadstoffeinwirkung beim Fisch. *Veröffentnung Intstitute des Kusten Binnenfischerei (Hamburg)*, **53**, 113.

94. Reitman S. and Frankel S., (1957) A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. *American Journal of Clinical Pathology*, **28**, 56.

95. Rojik I., Nemcsók J. and Boross L. (1983) Morphological and biochemical studies on liver, kidney and gill of fishes affected by pesticides. *Acta Biologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, **34**, 81.

96. Rose M. S. and Smith L. L. (1977) *The relevance of paraquat accumulation by tissues in biochemical mechanism of paraquat toxicity.* Ed.: Autor A. P., Academic Press, New York.

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

98. Schäperclaus W. (1979) *Fishkrankheiten*. Akademie-Verlag, Berlin.

99. Schreck C. B. and Lorz H. W. (1978) Stress response of coho salmo (*Onchorhynchus kisutsch* L.) elicited by cadmium and copper of stress. *Journal of Fisheries Research Board of Canada*, **35**, 1124.

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

101. Sørensen P. G. (1983) The Mg^{2+} dependent ATPase from the erythrocyte plasma membrane of the flounder platichthys *Flesus* L. General properties and some observations on the steady state kinetics. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **79B**, 153.

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

103. Svobodova Z. (1982) Changes in some haematological parameters of the carp after intoxication with $CuSO_4 \times 5H_2O$. *Bulletion VURH Vodnany*, **2**, 26.

104. Szabó A., Nemcsók J., Kása P., Gulya K. (1989) Muscarinic cholinergic components in the carp brain. *Neurochemistry International*, **15**, 511.

105. Szakolczai J. (1967) Untersuchungen der Schwimmblasenentzündung bei Karpfen anhand von zwei Fällen in Ungarn. *Zeitschrift für Fisherei*, **15,** 139.

106. Szakolczai J. (1978) *Halbetegségek*. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest.

107. Tonhazy N. E, White N. G, Umbreit W. W, (1950) A rapid method for the estimation of glutamic-aspartic transaminase in tissues and its application to radiation sickness. *Archivs of Biochemistry and Biophysics*, **28**, 36.

108. V-Balogh K. and Salánki J. (1987) Biological monitoring of heavy metal pollution in region of Lake Balaton. *Acta Biologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, **38**, 18.

109. Wainwood K. G. and Beamish F. W. (1978) The effect of copper, hardness and pH on the growth of rainbow trout (*Salmo gairdneri* L.). *Journal of Fish Biology*, **13**, 591.

110. Wedemeyer G. (1970) The role of stress in the disease resistance of fishes. In: *A Symposium on Diseases of Fishes and Shellfishes* (Ed.: S. F. Sniesko). American Fisheries Society Special Publications, **5**, 30.

111. Williams A. K. and Sova C. R. (1966) Acetylcholinesterase levels in brains of fishes from polluted waters. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **1**, 198.

112. Wrobelski F. and La Due J. S. (1955) Serum glutamate oxaloacetate transaminase as an index of liver cell injury. *Proceedings of Society of Experimental Biology*, **90**, 210.

113. Yamamoto S. Y., Ishii T. and Ikeda S. (1977) The site of copper accumulation in the tissues of carp. *Bulletine of Japanese Society of Fisheries Sciences*, **43(11)**, 1327.

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

115. Zitko V., McLeese D. W., Metcalfe C. D. and Carson W. G. (1979) Toxicity of permethrin, decamethrin, and related pyrethroids to salmon and lobster. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **21**, 338.

116. Zitko V. and Carson W. G. (1976) A mechanism of the effects of water hardness on the lethality of heavy metals to fish. *Chemosphere*, **5**, 299.

KAPCSOLÓDÓ IRODALOM

1. Albercht M. L. (1977) Die Bedeutung von Stressfolgen für den Fishorganismus. *Zeitung der Binnenfischerei DDR*, **24**, **8**, 247.

2. Antalfi A. és Tölg I. (1971) *Halgazdasági ABC*. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest.

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

4. Benedeczky I. and Nemcsók J. (1990) Detection of phenol induced subcellular alteration by electron microscopy in the liver and pancreas of carp. *Environmental Monitoring and Assessment,* **14**, 385.

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

6. Braunbeck T., Storch V. and Bresch H. (1990) Species specific reaction of liver ultrastructure in zebrafish (*Brachydanio rerio* L.) and trout (*Salmo gairdneri* L.) after prolonged exposure to 4-chloroaniline. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **19**, 405.

7. Bunton T. E., Baksi S. M., George S. G. and Frazier J. M. (1987) Abnormal hepatic copper storage in a teleost fish (*Morone americana* L.). *Veterinary Pathology*, **24**, 515.

8. Cross C. E., Reddy K. A., Hasegava G. K., Chiu M. M., Tyler W. S. and Omaye S. T. (1977) Paraquat toxicity: Effects of selenium deficiency and anti inflammatory drug presentment's. In: *Biochemical Mechanism of Paraquat Toxicity*, Ed.: Autor A. P., Academic Press, New York.

9. Faircher R. D. and Wilson A. F. (1975) Paraquat poisoning: Manifestaions and therapy. *Annual Journal of Medicine*, **59**, 751.

10. Fantone J. V. and Ward P. A. (1982) Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocytes dependent inflammatory reactions. *American Journal of Pathololology*, **107(3),** 397.

11. Fehér J. és Vereckei A. (1985) *Szabadgyök-reakciók jelentősége az orvostudományban*. Medicina, Budapest.

12. Gaál J., Hováth Z., and Erőss J. (1980) The effect of organophosphorus compounds on the cholinesterase activity of one summer old carps. *Aquacultura Hungarica (Szarvas)*, **2**, 117.

13. Gabrielak T., Piatkovska W., Leyko W. and Pérés G. (1983) Sesonal variations in the activities of peroxide metabolism enzymes in erythrocytes of freshwater fish species. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **75C**, 383.

14. Kappus H. and Sies H. (1981) Toxic drug effects associated with oxygen metabolism: Redox cycling and lipid peroxidation. *Experientia* , **37**, 1233.

15. Keston A. S. (1956) Specific colorimetric enzymatic analytical reagents for glucose. *Abstract of Papers, 129th Meeting ACS*, Dallas (TX), 31C.

16. Labat R., Roqueplo C., Richard J. M., Lim P. and Burget M. (1977) Actions ecotoxicologiques de certains metaux (Cu, Zn, Pb) chez les poissons dulcaquicoles de la rivere lot. *Annales Limnologie*, **13(2)**, 191.

17. Lindström-Seppa P., Koivusaari U. and Hänninen O. (1983) Metabolism of foreign compounds in freshwater crayfish (*Astacus astacus* L.) tissues. *Aquatic Toxicology*, **3**, 35.

18. Lundin, S. J. (1958) On the location of cholinesterase in fishes, *Experientia*, **14/4**, 131.

19. Martin H. and Worthing C. R. (1977) *Pesticides manual.* British Crop Protection Council.

20. Matkovics B., Szabó L., Mindszenty L. and Ivan J. (1980) The effects of organophosphate pesticides on some liver enzymes and lipid peroxidation. *Genetic Pharmacology,* **11**, 353.

21. Matkovics B., Szabó L., Varga Sz. I., Novák R., Barabás K. and Berencsi G. (1980) In vivo effects of paraquat on some oxidative enzymes of mice. *Genetic Pharmacology,* **11**, 276.

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

23. Nemcsók J., Víg É., Halasy K., Fekete É., Benedeczky I. (1986) Localization and quantitative distribution of biogenic monoamines in the intestinal tract of locust, snail and carp. *Neurochemistry International*, **9(4)**, 505.

24. Nimmo I. A., (1987) The glutathion S-transferases of fish. *Fish Physiology and Biochemistry*, **3**, 163-172.

25. O'Brien (1960) *Toxic Phosphorous Esters*. Academic Press, New York.

26. Schachterle G. R. and Pollack R. L. (1973) A simplified method for the quantitative assay of small amounts of protein in biological material. *Annals of Biochemistry*, **51**, 654.

27. Van den Thillardt G. (1982) Adaptation of fish energy metabolism to hyperoxia and anoxia. *Molecular Physiology*, **2**, 49.

28. Wachtler K. (1980) The regional production of acetylcholine in the brains of lower and higher vertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **65C**, 1.

29. Wedemeyer G. A. and Wood J. W. (1974) *Stress as a presdispoing factor in fish diseases.* Division of Cooperative Research, Washington, D. C., FDL-38.

30. Winner R. W. and Farrell M. P. (1976) Acute and chronic toxicity of copper to four species of *Daphnia*. *Journal of the Fisheries Research Board of Cananada*, **33**, 1685.

A DISSZERTÁCIÓ ANYAGÁBÓL MEGJELENT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

1. Cikkek

3.975 1. Nemcsók J., Halasy K., Bendeczky I., **Kufcsák O.** and Szegletes T. (1991) The effects of pesticides on the acetylcholinesterase activity and its molecular forms in the alimentary tract of fishes. *Journal of Neurochemistry*, **57**, S28A.

0.253 2. **Kufcsák O.**, B. Asztalos, J. Nemcsók, K. H. Götz and M. Juhász (1992) Biomonitoring der Umweltschädigung durch Messungen von biochemischen und physiologischen Parametern bei fischen. *Zoologische Jahrbücher Physiologie*, **96**, 1-10.

0.806 3. Nemcsók J., Víg É., Baska F., **Kufcsák O.** (1993) Role of free radicals in swimbladder inflammation of carp. *Journal of Fish Diseases* **16**, 131-136.

4. Bálint Tamás, **Kufcsák Oszkár** (1996) Biomonitorozás, avagy párbeszéd az élő környezettel. *Biotechnológia és Környezetvédelem -Ma és Holnap*, **X/1**, 19-21.

2. Külföldi előadások, poszterek

1. Nemcsók J., Benedeczky I., Albers C., Götz K. M., Juhász M., **Kufcsák O.** (1990) The sensitivity of fish to environmental pollution depending on species and ecological factors as revealed by biochemical methods. *6th International Bioindicators Symposium of IUBS*, Dublin.

2. Nemcsók J., Halasy K., Benedeczky I., **Kufcsák O.** and Szegletes T. (1991) The effects of pesticides on the acetylcholinesterase activity and its molecular forms in the alimentary tract of fishes. *13th ISN meeting,* Sydney.

3. Szegletes T., Polyhos Cs., Láng G., **Kufcsák O.**, Nemcsók J. (1993) Effects of deltamethrin on various enzymes of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *XXXII Congress of the International Union of Physiological Sciences*, Glasgow.

4. Bálint T., Boritzki M., Kátai F., **Kufcsák O.**, Láng G., Nemcsók J., Polyhos Cs., Szabó I., Szegletes T. (1995) Biomonitoring: eine effektive Methode zur Überprüfung der Wasserqualität. *Commissioned research in Central and Eastern Europe; German-Hungarian teamwork and opportunities for advancement*, Hannover.

3. Hazai előadások, poszterek

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

4. Könyvek, könyvrészletek

1. Nemcsók J., Albers C., Benedeczky I., Götz C. I., Schricker K., **Kufcsák O.** and Juhász M. (1991) Effect of Ecological Factors on the Toxicity of $CuSO_4$ in Fish. *Bioindicators and Environmental Management* (Jeffrey D. W. and Madden B. eds.), Academic Press, London, 365-377.

2. Víg É., Nemcsók J., **Kufcsák O.**, Matkovics B. (1992) Biochemical investigations of pesticides toxicity on fish. *Proceedings of Ecological Application of Environmental Chemistry*, 408-416.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Megköszönöm Prof. Dr. Nemcsók János tanszékvezető egyetemi tanárnak, témavezetőmnek, az előlegezett bizalmat és hasznos útmutatásait, amellyel lehetővé tette, hogy kutató munkámat tanszékén illetve az általa vezetett intézetben végezzem. Munkámra serkentőleg hatott, hogy végig magam mögött érezhettem magas szintű, önzetlen szakmai és emberi támogatását.

A kísérleti feltételek megteremtésében és a kísérletes munkában nyújtott segítségéért köszönet illeti Dr. Matkovics Bélát, aki a szabadgyökök és a velük kapcsolatos enzimek vizsgálatában szakmai munkámat irányította, és gyakorlatias, hasznos tanácsaival ez irányú felkészültségemet gyarapította.

Köszönöm Dr. Kálmán Miklósnak, hogy a vezetése alatt álló intézetben a disszertációm elkészítéséhez szükséges kutatómunka egy részének elvégzését lehetővé tette és disszertációm elkészítésére rendszeresen biztatott.

Köszönettel tartozom Prof. George Hughes (University of Bristol), Karl Heinz Götz (Universität Regensburg) valamint Prof. Domenico Lanari (Università degli Studi di Udine) uraknak, akik a külföldön végzett kísérleteink során nyújtottak anyagi, szakmai és technikai segítséget.

Köszönet illeti továbbá Dr. Le Huu Hieut, Dr. Szegletes Tivadart, Láng Gabriellát, Bálint Tamást, Kátai Ferencet és Polyhos Csabát, kollégáimat a kísérletek során végzett pontos, lelkiismeretes munkájukért.

Köszönöm szüleimnek és családomnak, hogy életem során annyi meg annyi áldozatot hoztak értem, pályámon és magánéletemben mindenkor biztattak, segítettek. Az ő odaadó szeretetük nélkül ez a dolgozat sohasem jöhetett volna létre.

Végül köszönetet mondok mindazoknak, akik disszertációm létrejöttét és munkám elvégzését valamilyen módon segítették, vagy legalábbis nem akadályozták.