

A DELTAMETHRIN HALAKRA KIFEJTETT HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA

Doktori (Ph.D.) értekezés

Készítette: Fazakas Judit

Témavezető: Nemcsók János
egyetemi tanár
biológiai tudomány doktora

Szegedi Tudományegyetem
Biokémiai Tanszék
BZKA Biotechnológiai Intézet

2001.

TARTALOMJEGYZÉK

1. Bevezetés.....	3
2. Irodalmi áttekintés.....	5
2.1 Kolinészteráz enzimek (ChE) jellemzése.....	5
2.1.1 Az acetilkolin-észteráz (AChE)	5
2.1.2 A butirilkolin-észteráz (BuChE)	8
2.2 Transzamináz, laktát dehidrogenáz, kataláz, acetilkolin-észteráz aktivitások és a vércukorszint, mint indikátorok és ezek alkalmazása tömeges halpusztulások okainak felderítésére	8
2.3 A felhasznált rovarirtószer, deltametrin (DM) jellemzése	9
2.4 A Mauthner sejtek neurobiológiája.....	11
3. Célkitűzések.....	15
4. Anyagok és módszerek.....	16
4.1 Anyagok	16
4.2 Tartási és kezelési körülmények	16
4.3 A kolinészteráz aktivitások mérése.....	17
4.3.1 A kolinészteráz aktivitás mérése.....	17
4.3.2 Az AChE aktivitásának mérése ultracentrifugálás után levett frakciókból	17
4.4 Az <i>in vitro</i> kísérletben használt módszer.....	17
4.5 Az AChE molekuláris formáinak meghatározása	18
4.6 Az <i>in vivo</i> kísérletek során használt módszerek	18
4.7 A DM akkumulációjának meghatározása.....	19
4.8 Az 1991-es és 1995-ös balatoni angolnapusztulás vizsgálatának módszerei.....	19
4.8.1 Az angolnapusztulás helyszínén történt gyűjtés és mintavételi eljárások leírása	19
4.8.2 Transzaminázok, tejsav dehidrogenáz, kataláz, acetilkolin-észteráz aktivitások és vércukorszint mérése.....	20
4.8.3 Deltametrin kimutatása HPLC-vel	21
4.9 A DM hatása a Mauthner sejtekre. Elektronmikroszkópos, enzim és immunhisztokémiai eljárások.....	22
4.10 Az alkalmazott statisztikai módszerek és számítógépes programok.....	23
5. Eredmények és értékelésük.....	24
5.1 Néhány édesvízi halfaj kolinerg enzimeinek jellemzése.....	24
5.1.1 A lénai tok kolinerg enzimeinek jellemzése	24
5.1.2 A ponty kolinerg enzimeinek jellemzése	30
5.1.3 A fehér busa kolinerg enzimeinek jellemzése	34

5.1.4 Az angolna kolinerg enzimeinek jellemzése	38
5.1.5 A lesőharcsa kolinerg enzimeinek jellemzése	42
5.1.6 Összehasonlító értékelés.....	46
5.2 A deltamethrin halakra gyakorolt hatásainak vizsgálata	48
5.2.1 A DM AChE gátlásának kinetikája.....	48
5.2.1.1 A DM AChE gátlásának kinetikája ponty agyban.....	48
5.2.1.2 A DM AChE gátlásának kinetikája angolna agyban.....	51
5.2.2 <i>In vivo</i> DM kezelés hatása az AChE molekuláris formáinak megoszlására	55
5.2.2.1 <i>In vivo</i> DM kezelés hatása az AChE molekuláris formáinak megoszlására pontyban	55
5.2.2.2 <i>In vivo</i> DM kezelés hatása az AChE molekuláris formáinak megoszlására angolnában.....	61
5.2.3. <i>In vivo</i> DM kezelés hatása a vér biokémiai paraméterekre.....	64
5.2.3.1 <i>In vivo</i> DM kezelés hatása a ponty vér biokémiai paramétereire.....	64
5.2.3.2 <i>In vivo</i> DM kezelés hatása az angolna vér biokémiai paramétereire.....	67
5.2.4 A DM akkumulációja különböző szervekben.....	70
5.2.4.1 A DM akkumulációja a ponty különböző szerveiben.....	70
5.2.4.2 A DM akkumulációja az angolna különböző szerveiben.....	72
5.2.5 A DM pontyra és angolnára gyakorolt hatásának összehasonlítása.....	74
5.3 Az 1991 és 1995 évi balatoni angolnapusztulás összehasonlító vizsgálata.....	75
5.3.1 Az 1991 évi angolnapusztulás vizsgálatának eredményei és ezek értékelése.....	75
5.3.2 Az 1995-ös balatoni angolnapusztulás vizsgálatának eredményei és ezek értékelése.....	80
5.4 DM hatása balatoni halfajok Mauthner sejtjeire.....	84
5.4.1 A Mauthner sejtek elhelyezkedése a balatoni halfajok agyszövetében.....	84
5.4.2 Az AChE hisztokémiai vizsgálata	85
5.4.3 A ChAT hisztokémiai vizsgálata.....	93
6. Összefoglalás.....	99
7. Rövidítések jegyzéke.....	102
8. Irodalomjegyzék.....	103
9. Köszönetnyilvánítás.....	118
10. Az értekezés anyagából megjelent közlemények jegyzéke	119
11. Summary	122

1. BEVEZETÉS

Hosszú távon (hónapok, évek) a vizek tisztaságát az adott vízben előforduló élővilággal minőségileg jellemezhetjük. Legújabban a vízszennyezések nyomon követésére egyre gyakrabban használnak halakat, ugyanis a különböző algákkal, rákokkal, puhatestűekkel táplálkozó halak a táplálékkal együtt felhalmozzák testükben az idegen mérgező anyagokat. Kopoltyújukkal, bőrükkel állandó és szoros kapcsolatban vannak a vízzel, ezáltal a vízben lévő anyagokkal. A peszticidek akkumulációját a vízi táplálkozási láncban hazánkban is sokan vizsgálták (Pénzes, 1977; Gaál és mtsai, 1980; Salánki és mtsai, 1982).

A növényvédő szerek közül kiemelkedő jelentőségűek az inszekticidek (pl. szerves klórvegyületek, szerves foszforsavészterek, piretroidok), melyeket kiterjedten alkalmaznak a mezőgazdaságban, de a háztartásokban is ismertek csótány-, hangya- és poloskairtó szerként. A legelső szintetikus inszekticidek a klórozott szénhidrogének voltak. Ezek két ok miatt különösen veszélyesek: egyrészt, mivel viszonylag lassan bomlanak le (Virág, 1981), egyes képviselőik képesek a táplálkozási láncban nagymértékű akkumulációra; másrészt specifikus idegrendszeri elváltozásokat okoznak, mint a DDT (Schirilla, 1978; Chambers és Carr, 1995). A következő generációs inszekticideket az antikolinészterázok (foszforsavészterek és karbamátok) alkották, melyek a kolinészteráz enzimek bénításán keresztül fejtették ki hatásukat (Moretto és Johnson, 1987). Ezek a vegyületek már labilisabbak, mint a klórozott szénhidrogének, de ezek sem specifikusak a célállatra, így igen gyakran okozták a kártevőkön kívül egyéb állatok pusztulását is. A piretroidok képezik az ún. haramdik generációs inszekticideket. Ezek a Na^+ -csatornák működésében okoznak zavarokat. Labilis vegyszerek, tehát a környezetben gyorsan lebomlanak, az emlősökre alig toxikusak, ezért a legbiztonságosabb vegyszereknek tartják őket (Narahashi, 1984; WHO, 1990). Viszont rendkívül mérgezőek a halakra (Chambers és Carr, 1995), például görcsös merevedéssel járó tömeges halpusztulást okozhatnak (Sályi és Csaba, 1994). Az említett elváltozások nyomon követhetők az állatok kolinerg rendszerén, mely jól jellemzi a halak fiziológiás, neuronális állapotát. Ezen rendszer alapvető részei a kolinészteráz enzimek, melyek aktivitásában, szerkezetében előforduló változások révén az idegrendszer állapotáról kaphatunk információkat (Nemcsók és mtsai, 1987, 1988a, 1990; Szabó és mtsai, 1992).

A Szegedi Tudományegyetem Biokémiai Tanszékén és a Bay Zoltán Alkalmazott Kutatási Alapítvány Biotechnológiai Intézetében végzett környezetbiológiai munkák célja a mezőgazdaságban alkalmazott, onnan közvetlen vagy közvetett úton vizekbe kerülő toxikus anyagok (elsősorban növényvédő szerek) vízi szervezetekre gyakorolt hatásának vizsgálata. Munkám, szorosan kapcsolódva e kutatási irányvonalhoz, a halak állapotát jellemző enzimrendszerekkel és ezek peszticidek indukálta változásaival foglalkozik, különös tekintettel az inszekticidek családjába tartozó deltametrin (DM) halak kolinerg rendszerére kifejett

hatására vonatkozóan. Ennek során enzimkinetikai és biokémiai módszerekkel vizsgáltuk az AChE enzim fajonkénti és szervenkénti megoszlását, kinetikai jellemzését. Külön fejezetben foglalkozunk a balatoni angolnapusztulás okainak felderítésével, amelynek során nyilvánvalóvá vált a DM lehetséges szerepe, és külön fejezetben ennek a szernek a Mauthner sejtekre gyakorolt hatásával.

Az 1990-es években két tömeges angolnapusztulás történt a Balatonon. 1991-ben 300 tonna angolna pusztult el a Balaton nyugati medencéjében, míg 1995-ben ennél kevesebb, mintegy 30 tonna hullott el a tó keleti területén. Az angolnapusztulás mindkét évében kimutatható volt az angolnáknak (*Anguilla anguilla* L.) a szúnyogirtószerként használt DM-t tartalmazó K-OTHRIN 1 ULV nevű inszekticid. Az 1995-ös angolnakatasztrófa során viszont még más halfajban is, így a keszegben (*Abramis brama* L.) és a fogasban (*Stizostedion lucioperca* L.), sőt a tófenék iszapjában is mérhető volt e szer. Ezt követően laboratóriumi vizsgálatokat végeztünk a DM angolnára kifejtett hatásának kiderítésére. Az összegyűjtött agonizáló és túlélő angolnáknak mértük a vérszérum néhány biokémiai paramétereit:

- vércukorszintet,
 - acetilkolinészteráz (AChE, E.C. 3.1.1.7)
 - kataláz (E.C.1.11.1.6)
 - tejsavdehidrogenáz (LDH, E.C. 1.1.2.3)
 - glutaminsav oxálesetsav-transzamináz (GOT, E.C. 2.6.1.1)
 - glutaminsav piroszölősav-transzamináz (GPT, E.C. 2.6.1.2)
- enzimaktivitásokat.

A DM számos idegrendszeri károsodást okozott a vizsgált balatoni halfajokban. 1,0 µg/l koncentrációjú DM akváriumi körülmények között gátolta az óriás Mauthner sejtek és azon axonterminálisok AChE aktivitását, amelyek szinaptikus kapcsolatban állnak az óriássejttel. A DM 10 µg/l koncentrációban blokkolja a kolin-acetil-transzferáz (ChAT, E.C. 2.3.1.6) expresszióját a bulbus axonterminálisokban, amelyek szinaptikus kapcsolatban állnak a Mauthner sejt laterális dendritjeivel. Mivel normál körülmények között a Mauthner sejtek funkciója, hogy koordinálja C start reakciót, amelynek révén a hal gyorsan elmozdul a fájdalmat okozó stimuláció elől (nociceptív stimuláció), feltételezhető, hogy a DM-nel kezelt hal hamarabb áldozatául esik mindazon körülményeknek, amelyek az egyed túlélési esélyeit csökkentik.

A Mauthner sejtek kolinerg rendszerének fény- és elektromikroszkópos enzim- és immunohisztokémiai vizsgálatát végeztük el néhány balatoni halfaj esetében, normál körülmények között (kontroll) és *in vivo* DM kezelést követően.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1 Kolinészteráz enzimek (ChE) jellemzése

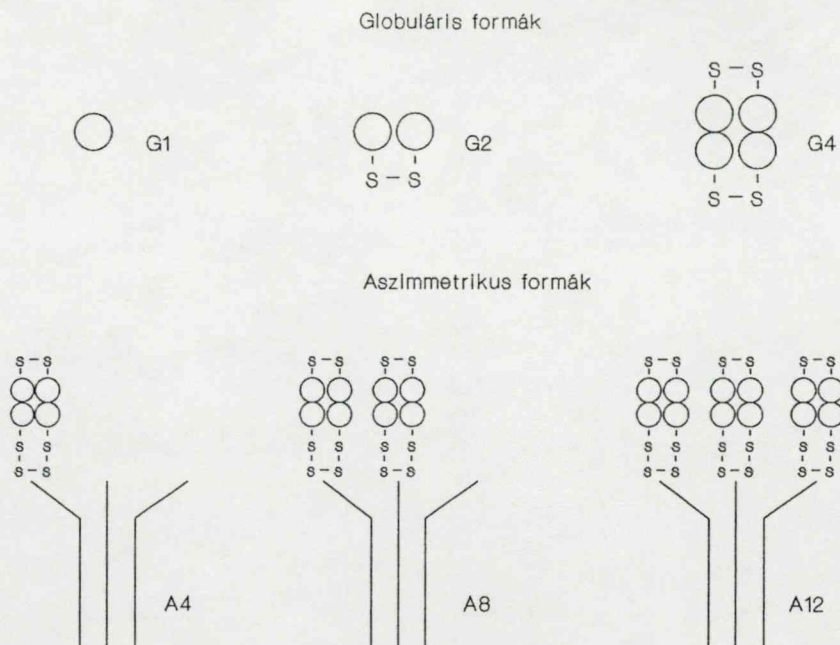
A kolinészterázokat (ChE) különböző gátlószerekkel szembeni viselkedésük, szubsztrát specifitásuk, előfordulásuk alapján acetilkolin-észteráz (AChE), butirilkolin-észteráz (BuChE) és ezerin rezisztens (maradék) kolinészteráz típusokra osztották fel (Chatonnet és Lockridge, 1989).

2.1.1 Az acetilkolin-észteráz (AChE)

Az utóbbi két évtizedben biokémiai és farmakológiai szempontból az acetilkolin-észteráz a legintenzívebben kutatott enzimek közé sorolható (Holland és mtsai, 1967; Coppage és mtsai, 1975; Coppage és Braidech, 1976; Olson és Christensen, 1980; Habig és mtsai, 1988; Wallace és Herzberg, 1988; Horsberg és mtsai, 1989; Gill és mtsai, 1990). Hatásmechanizmusát tekintve a szeril proteázok - észterázok családjába sorolható, mivel az enzim aktív centrumában egy szeril oldallánc nukleofil oxigénje a tulajdonképpeni katalitikus hely. Ez a nukleofil oxigén támadja a hasítandó észterkötés C=O csoportját. A szeril oldallánc oxigénjének nukleofilitását pedig egy aszparaginsav-hisztidin alkotta töltés relé biztosítja azáltal, hogy protont von el a szeril oldallánctól (*Torpedo californica* AChE enzimében az aszparaginsav helyett glutaminsav szerepel (Sussman és mtsai, 1991)). Ez teszi lehetővé, hogy a kémiaiilag egyébként inert oldallánc katalitikus funkcióra alkalmassá váljon (Elődi, 1983). Az itt leírt katalitikus helyhez (melyet egyes szerzők észteráz helynek neveznek) társul egy szubsztrát kötőhely, vagy más néven anionos hely is, melyet egy triptofán oldallánc alkot (Trp84, a *Torpedo californica* AChE-ban). Ez a triptofán oldallánc köti meg az acetilkolin (AcCh) trimetil-ammonium csoportját. Mind a katalitikus hely, mind a szubsztrátkötő hely egy kb. 20 Å mély zsebben helyezkedik el, melynek formálásában még két fenilalanin lánc is részt vesz. A két fenilalanin szerepe igen fontos, mivel biztosítják a zseb hidrofób jellegét. Ez egyrészt elősegíti a szubsztrát kötődését, mert csökkenti a reakcióban résztvevő molekulák hidratációját, másrészt hozzájárul ahhoz is, hogy a katalitikus működéshez szükséges poláros oldallancok speciálisan szerzett sajátosságai kifejezettebben érvényesüljenek (Elődi, 1989). A katalitikus zseben kívül - melyet acilálási zsebnak is szokás nevezni, mivel a szeril csoport aciláláson és deaciláláson megy keresztül, miközben bontja az észterkötést - feltételeznek még egy szubsztrátkötő helyet az enzimen. Ez a hely az acilálási zseb peremén helyezkedik el és egy triptofán oldallánc (Trp279) (Taylor, 1975), valamint az ezt közre fogó két polipeptid hurok néhány aminosav oldallánca alkotja (Weise 1990, Schalk 1992, Radic 1993, Barak 1994). Az egyik hurkot formájáról Ω -huroknak nevezték el.

Az AChE azonban nem egységes enzim, hisz számos molekuláris formája létezik. Ezen formák felépítésében alapvető szerepet játszik egy kb. 80.000 dalton molekulatömegű globuláris monomer forma, a G1 forma (Dudai és Silman, 1974; Bon és Massoulié, 1976). A monomerből diszulfid hidak révén dimer képződhet, G2 forma (Anglister és Silman, 1978). A két dimer feltehetően van der Waals erők hatására tetramerré kapcsolódhat, G4 forma. A tetramerek elektronmikroszkóppal látható háromszálas farokrészhez kapcsolódhatnak (Rosenberry és mtsai, 1980), amely farokrész immunológiailag (Anglister és mtsai, 1979), valamint kollagénnel szembeni viselkedését tekintve (Lwebuga-Mukasa és mtsai, 1976; Rieger és mtsai, 1976) a kollagénnel hasonlít. A farki rész egy-egy szálához diszulfid hidakkal összesen három tetramer egy-egy dimerje kapcsolódhat, A4, A8 és A12 formák (Bon és mtsai, 1979; Rosenberry és mtsai, 1980). Ennek alapján eddig 6 féle AChE molekuláris formát különítettek el (1. ábra).

Azonban ez nem jelenti azt, hogy az így elkülönített formák egységes csoportot képeznének. Ugyanis a molekuláris formákon belül is további csoportosításra ad lehetőséget a formák oldhatósága, ami azok sejtmembránhoz való kapcsolódásának erősségéről ad felvilágosítást. Például a G4 formából Flores-Flores és mtsai (1996) 3 típust különböztetnek meg: az emlősök agyában található só-oldható ($G4^H$) és a detergens-oldható ($G4^A$) formákat, illetve a teljesen hidrofil vagy más néven szekretórikus formát ($G4^S$), mely a cerebrospinalis folyadékban található. A $G4^A$ formákban két alegység a Cys580-as aminosavakon keresztül diszulfid kötéssel kapcsolódik egymáshoz, a másik két alegység pedig szintén diszulfid kötésekkel egy 20 kDa-os alegységhez (P alegység) kapcsolódik, mely alegység felelős az egész komplex membránhoz történő kapcsolódásáért. $G4^H$ forma nem rendelkezik a P alegységgel (Flores-Flores és mtsai, 1996). Fernandez és mtsai (1996) a P alegységen belül három szubdomént különböztetnek meg: egy 7 kDa-os szubdomént, mely a diszulfid kötéssel kapcsolódik a katalikus egység C-termináljához, egy 6 kDa-os pronáz szenzitív közti szubdomént és egy 7 kDa-os disztális pronáz rezisztens, zsírsavakat tartalmazó szubdomént, mely a membrán kettős rétegébe ágyazódva rögzíti az enzimet.



1. ábra Az AChE molekuláris formái

A membránhoz történő kapcsolódás azonban nem csak a P alegységen keresztül történhet. Egy másik módja ennek a glikolipideken keresztül történő kapcsolódás. Ezt a módot követi a *T. californica* elektromos szervéből izolált G2 formák (Mehlert és mtsai, 1993) és a szarvasmarha eritrocitájában található G2 formák egy csoportja (Haas és mtsai, 1996). Ezen formák egy glikoinozitol foszfolipid (GPI) horgonyon keresztül rögzülnek a membránhoz. Ez a GPI horgony etanolamin-foszfátból, mannózekből, glükózaminból, inozitolfoszfátból és a trigliceridből áll. A *T. californica*-ból izolált GPI még ezeken felül tartalmaz galaktóزامint és szerint is (Mehlert és mtsai, 1993). Az is kiderült, hogy a GPI horgonyt tartalmazó alegységek C terminálisának aminosav összetétele eltér a többi alegységtől. Ezért a GPI horgonyt tartalmazó formát elnevezték H alegységnek, míg a másikat T alegységnek. A két alegység egyetlen génről íródik át, de a mRNS érése során alternatív splicinggal jön létre. A C terminálist ugyanis két exon is kódolja (*T. californica*-nál a 4. és 5. exon) és ebből csak az egyik marad meg, a másik kivágódik (az 5. exon tartalmazza a GPI horgony szignálját) (Anselment és mtsai, 1994; Haas és mtsai, 1996). Mindezek következtében egyes szerzők megkülönböztetnek két féle amfifilikus formát: az I típusba tartoznak a GPI horgonnyal kapcsolódóak, a II típusba pedig azok, melyeknek nincs GPI horgonya. A fentiekből nyilvánvaló, hogy az I típusú formáknak az alegysége H és ide a G2 formák egy része tartozik, míg a II formák T katalitikus egységekből épülnek fel és ide az aszimmetrikus formák, a tetramer formák és az ún. könnyű G2 formák tartoznak (Flores-Flores és mtsai, 1996).

Az AChE a szinaptoszómában, axonális és gliamembránhoz kötődve fordul elő. Az enzim a perikaryonban termelődik, és axonális transzporttal jut az axonterminálisba. Az irodalmi adatok szerint a sejtek AChE tartalma nem jelöl feltétlenül kolinerg neuront (Contestabile, 1978).

2.1.2 A butirilkolin-észteráz (BuChE)

A butirilkolin-észteráz (EC 3.1.1.8) a gerincesek vérplazmájában fordul elő nagy mennyiségben, főként emlősökben, de néhány filogenetikailag alacsonyabb szinten álló osztályban is (Gautron, 1982; Chatonnet és Lockridge, 1989). Jellemző rá, hogy nemcsak az AcCh-t, hanem egyéb kolinésztereket is képes hidrolizálni, bár legnagyobb sebességgel a butirilkolint (BuCh-t) bontja. Szemben az AChE-zal, szubsztrátfelesleg gátlását még nem írták le. 10^{-5} M ethopropazinnal specifikusan gátolható, ami lehetővé teszi, hogy AChE jelenlétében is tudjuk mérni az aktivitását. Míg az AChE 10^{-5} M BW 284 C51-gyel gátolható, addig a BuChE nem, ami a mérési metodikában szintén fontos.

Ennek az enzimnek is ugyanazok a molekuláris formái léteznek, mint az AChE-nak. Ugyanúgy megtaláljuk a só-oldható formákat és a detergens-oldható formákat. Pl. az emberi vérplazma jelentős mennyiségű só-oldható BuChE-t tartalmaz. Detergens-oldható formákat jelentettek a *Torpedo marmorata* szívéből, és az emlősök agyából is. Ezen hasonlóságra alapozva állítják egyesek, hogy az embrionális fejlődés kezdeti szakaszában a BuChE helyettesíti az AChE-t (Chatonnet és Lockridge, 1989).

Bár BuChE található az emlősök és madarak agyában, de általában nem az idegi elemekben, hanem az endotél és glia sejtekben fordul elő. A vérplazma mellett a magasabb rendű gerincesek szíve is nagy mennyiségben tartalmaz BuChE-t (Chatonnet és Lockridge, 1989). Érdekes, hogy míg az emlősök szívében az AChE hasítja el a fiziológiásan felszabaduló acetilkolint, addig ez a feladat a *Torpedo* szívében - Chatonnet és Lockridge (1989) szerint - a BuChE-ra hárul.

2.2 Transzamináz, laktát dehidrogenáz, kataláz, acetilkolin-észteráz aktivitások és a vércukorszint, mint indikátorok és ezek alkalmazása tömeges halpusztulások okainak felderítésére

A szervezet károsodásának egyik leggyakoribb formája a szövetnekrózis. Szövetnekrózis során a transzaminázok a vérbe kerülnek, és az ott megnövekedett aktivitásuk jelzi a szöveti károsodás mértékét (Bell, 1968; Onishi és Murayama, 1970; Kristoffersson és mtsai, 1974; Schmidt és Schmidt, 1976; Nemcsók és mtsai, 1981; Nemcsók és Boross, 1982a). A szövetnekrózist jelző transzamináz enzimeket - elsősorban a humámdiagnosztikában - már régóta használják szövetkárosodás kimutatására (Wroblewski és La Due, 1985; Asztalos és Nemcsók, 1985). A GOT az emlősök minden szövetében előfordul. Jelentős mennyiség található az agyban, szívben, vesében és májban. Mivel a szövetek enzimtartalma több ezerszerese a vérben keringő mennyiségeknek (Bell, 1968), ezért a szervezetben előforduló szövetkárosodás a szérumban GOT aktivitásának jelentős növekedését eredményezi, s ez jól detektálható. Elsősorban szívizomszövet nekrózis (pl. szívinfarktus) és májszövetkárosodás (pl. vírusos májgyulladás) detektálásának egyik fontos eleme. A GPT szintén számos szervben

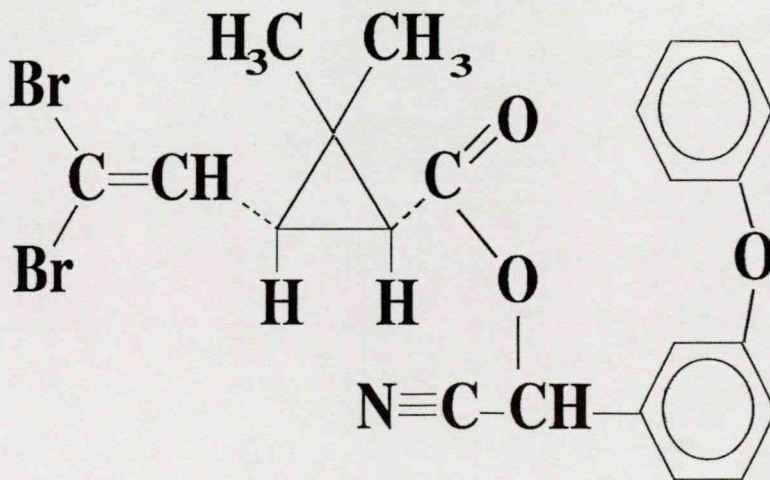
megtalálható enzim, de a szervenkénti megoszlása eltér a GOT-étól. Ezért a két enzim szérumban mért aktivitásának aránya fontos adat a diagnosztikában (Schmidt és Schmidt, 1976).

A vércukorszint és a laktát dehidrogenáz aktivitásának változása a szervezetet ért stresszhatás mérésére alkalmas (Wedemeyer, 1970). Az LDH az anoxiás stresszen kívül jelzi az izomszövetekben bekövetkezett pusztulást is. Az enzimnek két izoenzime létezik. Az ún. H izoenzim a szívizomszövetben található, míg az ún. M izoenzim a vázizomszövetekben detektálható. A két izoenzim gélelektroforézissel elkülöníthető, így megállapítható, mely típusú izomszövetet érte a károsodás (Kufcsák és mtsai, 1992). Az AChE aktivitásának mérése a kolinerg rendszerre ható kemikáliák hatásának a kimutatására szolgál (Nemcsók és mtsai, 1985; Galgani és Bocqueu, 1989; Nemcsók és mtsai, 1990).

A kataláz enzim aktivitása a halak szervezetében mindig megnövekszik szabadgyök képződés esetén. Így ezen enzim aktivitásának mérése alkalmas a szabadgyök jelenlétének kimutatására, ugyanis felelős, más enzimekkel együtt, a szabadgyökök károsító hatásának kivédéséért.

2.3 A felhasznált rovarirtó szer, a deltamethrin (DM) jellemzése

Az 1970-es évektől használják a piretroidokat a mezőgazdaságban rovarkárttevők ellen. A piretroidok előnye a régebbi típusú inszekticidekkel szemben, hogy igen széles spektrumú rovarölő szerek, a környezetben lebomlanak, így akkumulációjuk nem számottevő, valamint ártalmatlanok a melegvérűekre, így az emberre is (WHO, 1990). Ugyanakkor igen toxikusak a hidegvérű gerincesekre, pl. a halakra (L'Hotellier és Vincent, 1986; Chambers és Carr, 1995). A piretroidok struktúrájuk, kémiai sajátságaik, neurofiziológiai és toxikológiai hatásuk alapján két nagy csoportra oszthatók (Eells és mtsai, 1987): az első csoportba (I. típus) a cianocsoportot (nitrilcsoportot) nem tartalmazó, míg a másodikba (II. típus) a cianocsoportot tartalmazó vegyületek tartoznak.



2. ábra A deltamethrin képlete

A Decis 2.5 EC hatóanyaga egy harmadik generációs inszekticid, a deltamethrin (vagy decamethrin, DM, II. típusú piretroid; (S)- α -ciano-3-fenoxibenzil-(1R)-*cisz*-3-(2,2-dibromovinil)-2,2-dimetilciklopropán-karboxilát, $C_{22}H_{19}Br_2NO_3$), amit az egyik legbiztonságosabb forgalomban lévő inszekticidnek tartanak (2. ábra). A Decis 2.5 EC DM tartalma 25 g/l. A DM elsődleges hatása, hogy elnyújtja a Na^+ -ioncsatornák becsukódását az idegsejtekben (Narahashi, 1984; Ghiasuddin és Soderlund, 1985). Valószínű, hogy a GABA receptorokhoz is képes hozzákötődni, gátolva ezzel a GABA-függő kloridion áramlást (Lawrence és Casida, 1983; Costa, 1987). Mindezeket túl számos egyéb hatása is ismert. Rose és Dewar szerint (1983) a DM-nek legalább két jól elkülöníthető hatása van: egy rövid idejű farmakológiai hatás a halálos dózishoz közeli koncentrációnál, és egy jóval hosszabb idejű neurotoxikus hatás, amelynek eredménye az idegsejtek pusztulása. Összességében megállapítható, hogy a DM neuromusculáris diszfunkciót okoz az állatokon (Rose és Dewar, 1983).

A nemzetközi irodalomban egyre többet olvashatunk a DM különböző paraméterekre gyakorolt hatásairól, mint például az agyi vérkeringésre és glükóz metabolizmusra (Cremer és Seville, 1985), a kalmodulin stimulálta Ca^{2+} -ATP-ázra és az adenilát ciklázra (Sahib és mtsai, 1987), az állatok tanulási folyamataira (Stein és mtsai, 1987), a testsúlyra, a vérszérum fehérjetartalmának alakulására, valamint az AChE és ATP-ázok aktivitására (Shaker és mtsai, 1988). Megfigyelték továbbá, hogy a DM hat a szinapszisok kolin transzportjára és foszforilációs folyamataira (Matsumura, 1988), az ACh muscarin és nikotin típusú receptoraira (Eriksson és Nordberg, 1990) és a foszfoinozit/proteinkináz-C aktivációjára is (Enan és Matsumura, 1993). Ezeken felül kromoszóma aberrációkat okoz az egerekben (Bhunya és Pati, 1990). Mindezek ellenére kevés kutatás irányult a DM halakra kifejtett toxicitásának kiderítésére (Zitko és mtsai, 1979; L'Hotellier és Vincent, 1986). A nemzetközi szakirodalomból ismert, hogy a 96-órás DM kezelés LC_{50} -es értékei halfajtól függően 0.4 és 2.0 $\mu g/l$ között vannak (L'Hotellier és Vincent, 1986). A szabadföldi kísérletek azonban nem mutatták ezt a nagymérvű toxicitást (WHO, 1990). Nincs jelentős különbség a toxicitásban hideg és meleg vizet kedvelő halfajok esetén (Stephenson, 1982). Úgy tűnik, hogy a DM alacsony és magas hőmérsékleten is hasonlóan hat, bár némely kutató összefüggést talált a hőmérséklet és bizonyos piretroidok hatása között (Kumaraguru és Beamish, 1981). Továbbá a piretroidok (köztük a DM) toxicitásának mértéke nem függ a víz keménységétől és pH-jától sem (Mauck és mtsai, 1976), ugyanakkor függ a lehetséges izomerek arányától és a hordozó minőségétől (Chambers és Carr, 1995). A DM képes befolyásolni a halak ontogenezisét (Gorge és Nagel, 1990): rendellenességet figyeltek meg az ikrából való kikelés mértékében, a halak egyedfejlődésében, mely többek között a testhossz csökkenésében is megnyilvánult. Mind fiatal, mind felnőtt halakban a piretroidok képesek az agy AChE enzimet gátolni (Reddy és mtsai, 1991).

2.4 A Mauthner sejt neurobiológiája

A csontos halak (Teleostei) agyában két hatalmas idegsejt található, amelyek a gerincesek idegsejtjeinek átlagos méreteihez képest valóban „óriásnak” tekinthetők. Ezek a sejtek Mauthner (1859) nevét viselik, aki közel másfél évszázaddal ezelőtt írta le hatalmas axonjukat a halak gerincvelőjében. A sejtek perikaryonját Goronwitsch (1888) találta meg a nyúltvelőben, s kimutatta, hogy a Mauthner által megfigyelt axonok ezekből az óriás-sejtekből erednek.

Cajal (1904, 1911, 1995) szerint a Mauthner sejtek óriás („kolosszális”) axonjai a halak gerincvelőjének funiculus ventralisában, pontosabban annak is a Van Gehuchten által a funiculus ventralis „dorsalis kötegének” nevezett kontingensében futnak. Cajal szerint a Mauthner axonok valamennyi csontos halban megtalálhatók, a Plagiostomák (ferdeszájúak) kivételével. Cajal említi, hogy a Mauthner-féle rostok nyúltvelői kereszteződését már Deiters és Stieda kimutatta, továbbá, hogy saját vizsgálatai megerősítették Goronowitsch (1888), Burckhardt (1888) és Beccari (1908) eredményeit, miszerint a Mauthner-féle idegrostok eredő idegsejtjei az agytörzs VIII. agyidegmagvában foglalnak helyet.

A Mauthner sejtek méretei az irodalom adatai szerint (Beccari, 1908; Bartelmez, 1915; Bartelmez és Hoerr, 1933; Bodian, 1937, 1942, 1952; Coghill, 1934; Plat, 1950; Retzlaff, 1954, 1957; Robertson és mtsai, 1963) szokatlanul nagyok: hosszúságuk 0.5-1 mm, átmérőjük 0.06 mm.

A Mauthner-féle óriássejtek nemcsak csontos halakban, hanem porcos és tüdős halakban valamint Agnathákban, sőt kétélűekben (ebihal, szalamandra) is megtalálhatók; utóbbiaknál a metamorfózis során visszafejlődnek. Nincsenek viszont Mauthner sejtek a fenéklakó, sedentáris életformát folytató halakban, ha mégis jelen vannak, úgy csak csökevényes formában fordulnak elő. A legkifejezettebb Mauthner féle sejteket az aktív úszó életformájú, subcarengiform halakban találjuk.

Bár fajonként jelentős különbségek vannak a Mauthner sejtek morfológiájában, van négy alapvető kritérium, melyek alapján megkülönböztethetők a többi reticulospinalis neurontól. Ezek a különleges vonások az alábbiak:

1. Nagyméretű sejttest. A perikaryon átmérője arányában 100 μm -ig terjed. A Mauthner sejt a VIII. agyideg szintjén foglal helyet.
2. Két fő dendrit. A dendritek közül az egyik ventralis helyzetű, a másik laterálisan fut s egészen az agy felszínéig terjed.
3. Axon. Ez a kereszteződés után a gerincvelő felé halad a fasciculus longitudinalis medialis dorsalis kötegében.
4. Axon sapka. Az axon iniciális szegmentumát és eredési kúpját specializálódott neuropil veszi körül, melyet vastag gliahüvely borít. Ez az axon-sapka.

A Mauthner-féle idegsejt sejtmagja kb. 1 mm-nyire van a nyúltvelő felszínétől és kb. 0.3 mm-nyire a középvonaltól lateralisán, a VIII. agyideg (n. Vestibulocochlearis) belépésétől éppen cranialisán. A Mauthner sejt sajátosságaihoz tartozik, hogy a szokásos kis dendritek mellett van egy igen nagy ún. Lateralis dendritje, amely latero-caudalis irányba halad, s ezen kívül van egy valamivel kisebb, ún. Ventralis dendritje, amely ventrocranialis irányban fut. Az axon dorsomedialisán indul a nuclearis regioból, tehát a prikáryonból. További lefutása során keresztesződik az ellenkező oldali Mauthner axonnal a középvonalban, éppen csak a 4. agykamra feneke alatt, majd caudalis irányba fordul s a továbbiakban a gerincvelőben halad, s ott ágakat ad le a mellső szarvi motoneuronokhoz a gerincvelő egyes szegmentumaiban. Az axon első 0.05 mm-nyi szakasza mintegy 10 μ m-nyire vékonyodik; ezt a szakaszt nem borítja velőshüvely. Itt speciális neuropil veszi körül az axont mintegy 80-90 μ m-nyi vastagságban; ez az ún. „axon-sapka”. Ezt követően az axon gyorsan kitágul s mintegy 30-35 μ m-nyi vastagságot ér el; ezzel együtt vastag velőshüvely is társul az axonhoz.

A Mauthner sejt egész perikaryonját és valamennyi dendritjét számos szinapszis borítja. Ez alól csak a ventralis dendrit lateralis felszíne képez kivételt, amely így mintegy csupaszon marad.

A lateralis dendrit lateralis részét számos ún. bunkószerű végződés veszi körül. Ezek lényegében tompa, perpendicularis végződésai jókora méretű velőshüvelyű idegrostoknak, amelyek a lateralis dendriten végződnek. Velőshüvelyüket hirtelen elvesztik az axon végződésénél és az axon egyszerűen kiterül a dendrit felszínén miközben átmérőjük alig fokozódik.

A Mauthner sejteken végződő axon terminálok másik típusát alkotják a terminális boutonok. Ezekre jellemző, hogy a rendkívül vékony neurit (axon) bulbus-szerűen hirtelen kitágul eredeti vastagságának sokszorosára, amint elterpeszkedik a postszinaptikus membrán felett. Mind a bunkószerű végzödések, mind pedig a terminális boutonok könnyűszerrel identifikálhatók elektronmikroszkóp alatt Palay (1956) ezen végzödések általános morfológiájára vonatkozó munkája nyomán; első elektronmikroszkópos azonosításuk Robertson és mtsai (1963) nevéhez fűződik.

A lateralis dendriteken elhelyezkedő nagy bunkószerű végzödésekről ismert, hogy a VIII. agyideg végzödései. (Bartelmez, 1915; Bartelmez és Hoerre, 1933; Bodian, 1937). Feltételezik, hogy egyes kisebb bunkószerű végzödések, amelyek a sejttesten helyezkednek el a sejtmag közelében, az ellenoldali VIII. agyidegből származnak (Bodian, 1952). A boutonok eredetét nem ismerjük pontosan.

Nagy méretük és vastag velőshüvelyük révén a Mauthner sejt axonjainak ingervezetése sokkal gyorsabb, mint más, a gerincvelőben futó rostoké. Bartelmez (1915) szerint ezek egy háromsejtes reflexív részei, melynek fő érző bemenetét a VIII. agyidegnek a lateralis dendriten elhelyezkedő végzödései képezik, míg az efferens impulzusok a gerincvelő mellsőszarvi motorikus idegsejtjein keresztül lépnek ki.

A mai felfogás szerint (Korn, 1987) mindkét Mauthner-féle óriás idegsejt egy-egy ún. command neuron, amely ellenoldali „startle reflexet” vált ki váratlan ingerek hatására vagy pedig ragadozó halak támadásának elhárítására. E cél szolgálatában a Mauthner sejtek „miniatűr agyként” vannak organizálva, úgy, hogy a szinaptikus mechanizmusok valamennyi alapvető mechanizmusa működik ezen a szinten.

A Mauthner sejtek fejlődését alaposan tanulmányozták. A Mauthner sejtek az embrióban megjelenő első idegsejtek között vannak s már ekkor a felnőtt sejt miniatűr változatának felelnek meg. A differenciálódás jellegzetes sort követ: először megnagyobbodik a sejtest és kinő az axon; csak ezután következik be a citoplazma reorganizációja és a dendritek kialakulása.

A Mauthner sejt felszínén helyet foglaló szinaptikus terminálok lokalizációjuk és ultrastrukturális jellegzetességeik alapján Nakajima (1974) szerint hat csoportra oszlanak, úgy mint:

1. Vastag velőshüvelyű nagy bunkószerű végződés. Ezek a VIII. agyideg hátsó szakaszából származnak és a laterális dendrit distalis szakaszán foglalnak helyet. Kémiai szinapszisokra jellemző aktív zónákat, valamint gap funkciókat is tartalmaznak. Ezeket a végződéseket Furshpan és Furukawa (1962), valamint Furukawa és Furshpan (1963) tanulmányozta s ezek alapján identifikálta először az elektrotonikus transmissziót gerinces agyban.
2. Kicsiny velőshüvelyű bunkószerű végződés. Ezek úgyszintén kevert szinapszisokat tartalmaznak.
3. Velőtlen bunkószerű végződés. Ezek kémiai transmisszióval működő szinapszisokkal kapcsolódnak a Mauthner sejttel, főleg az axon-sapkán belül, de kisebb számban azon kívül is.
4. Kicsiny szinaptikus vesiculákat tartalmazó boutonok. Ezek az axon-sapkán kívül szinaptizálnak a Mauthner sejttel s ugyanúgy, mint a (3) alatt említett velőtlen bunkók, legalábbis részben, ugyanazon passzív hiperpolarizációs potenciált) mutató gátló interneuronokból erednek.
5. Nagy szinaptikus vesiculákat tartalmazó boutonok, melyek kevert vagy kizárólagosan kémiai szinapszisokat képeznek.
6. Spirális idegrost végződés. Ezek az inicialis szegmentre csavarodnak és az axon eredési kúpját veszik körül. Kémiai, kevert és szimmetrikus szinapszisokat képeznek, de működésük mindez ideig ismeretlen.

A Mauthner sejtek legjobban ismert szenzoros inputja az octavolateralis rendszerből (VIII. agyideg) származik. Ezek a rostok a laterális dendriten végződnek és hallási, gravitációs, szöggyorsulási, vibrációs vízáramlási és elektromos téringereket közvetítenek. A VIII. agyidegből származó kapcsolatok monoszinaptikus jellegűek, míg azok, amelyek az oldalvonal

szervből érkeznek, mono- vagy poliszinaptikusak. A Mauthner sejteknek valószínűleg vannak vizuális, tectalis és cerebelláris eredetű inputjai is. A VIII. agyideg hátsó komponensének aktiválása kettős serkentő postszinaptikus potenciált vált ki, amelynek korai komponensét elektronikus, késői komponensét kémiai szinapszisok hozzák létre.

A keresztezett Mauthner axon a gerincvelő ellenoldali felében, jóformán annak teljes hosszában végig halad, miközben motoneuronokkal és interneuronokkal létesít kapcsolatot rövid collateralisok révén, melyek 150-200 μm -ként hagyják el az axont. Maga a Mauthner axon 50-80 μm átmérővel rendelkezik; ingerületvezetési sebessége, azaz az akciós potenciál terjedési gyorsasága 60-100 m/sec, miáltal egyike a leggyorsabban vezető gerinces idegrostoknak. Az impulzusok 2-2.5 mm-ként generálódnak jól definiált, egymástól elkülönült, diszkrét aktív helyeken, amelyeket funkcionális befűződéseknek neveznek. Ezeken a helyeken igen nagy a feszültség-érzékeny natrium csatornák sűrűsége. Megjegyzendő, hogy a funkcionális befűződések nem azonosak a sokkal sűrűbben elhelyezkedő collateralisokkal. A vizsgálatok során adatok gyűltek össze arra nézve, a velőshüvely nem annyira hatékony szigetelő, mint ahogy régebben gondolták. Ezzel szemben a Mauthner sejt kimenő hálózata lényegében még ma sem ismert.

A Mauthner sejt rendszer egyike azoknak az igen kicsiny számú eseteknek a gerincesek központi idegrendszerében, ahol szigorú összefüggés áll fenn egyetlen idegsejt aktivitása és egy jól definiált magatartási válasz között. A Mauthner sejt karakterisztikus „startle” válaszmagatartást indít meg, melynek során az állat kezdetben C betű alakot vesz fel: feje és farka azonos oldalra hajlik. Ezt egy másodlagos visszacsapási stádium követi, amely a halat elhajtja eredeti helyzetéből s így eltávolítja az ingert kiváltó tényezőtől. A nem-aktivált Mauthner sejt különböző szintjein működő gátló ideghálózatok elejét veszik annak, hogy konfliktust okozó parancsot adhasson ki s így megakadályozzák annak működését.

Végül ki kell emelnünk, hogy a Mauthner-féle sejt nem adaptálódott ismételt aktiválódásra, hanem arra specializálódott, hogy esetenkénti optimális teljesítményt nyújtson. A Mauthner-reflex kifáradásának és habituációjának kérdése egyelőre nem tisztázott (Korn, 1987).

További vizsgálatok tisztázták, hogy a Mauthner sejt axonjának nincs velőshüvely-mentes, nodális hézagja (Graham és O’Leary, 1941; Leghissa, 1956; Gray, 1970; Celio, 1976; Koenig, 1978; Yasargil és mtsai, 1982). A Mauthner-féle axon kizárólag a relative rövid (50 μm) és szoros egymásutánban (100-300 μm , átlagban 150 μm -ként elhelyezkedő) axon collateralisok eredésénél található; ezek a collateralisok interneuronokkal és motoneuronokkal létesítenek szinaptikus kapcsolatokat, amit egyes szerzők (Bartelmez, 1915; Coghill, 1934; Bodian, 1952; Leghissa, 1956; Retzlaff és Fontaine, 1960; Barrets, 1961) már évtizedekkel ezelőtt megállapítottak, s amit az újabb vizsgálatok is megerősítenek (Diamond, 1971; Gray, 1970; Diamond és mtsai, 1971; Celio és mtsai, 1976, 1979; Funch és mtsai, 1984).

A Mauthner-féle axonra ugyanúgy, mint más óriás-axonokra áll az a törvényszerűség, hogy az ingerületvezetés gyorsasága az axon átmérőjének négyzetgyökével arányos (Young, 1987).

3. CÉLKITŰZÉSEK

A környezetszennyező anyagok a halakra faj-, szer- és szervspecifikusan hatnak. Mivel az általunk vizsgált rovarirtószer idegméreg, ezért az idegrendszer egyik legfontosabb enzimének, az acetilkolinészteráz enzimnek a vizsgálatára fektettük a fő hangsúlyt. Első lépésként meg akartunk győződni arról, hogy a filogenetikailag különböző fejlettségű és különböző életmódú halak kolinerg enzimrendszerében vannak-e számottevő különbségek. Majd két kiválasztott halfajon DM tartalmú inszekticiddal végeztünk kísérleteket, hogy megvizsgáljuk, vajon eltérően reagálnak-e a kezelésekre. Vizsgálataink a biológiai szerveződés három szintjére terjedtek ki: az *in vitro* kísérletekben az enzim szinten, az *in vivo* szubletális kezelések során az enzimrendszerek szintjén és a szövetek szintjén vizsgáltuk a kezelések hatását. Vizsgáltuk, milyen módon hat a deltametrin a kolinerg rendszerre, a hozzá tartozó kolinoczeptív Mauthner sejtekre, valamint az egyéb károsodást jelző biokémiai paraméterekre.

Célunk az alábbi kérdések megválaszolása volt:

1. A lénai tok, angolna, busa, ponty és harcsa AChE és BuDhE aktivitásainak meghatározása agyban, szívben, vázizomban és májban.
2. Meghatározni a fent említett halfajok fent említett szerveiből származó AChE enzimek só- és detergens oldható formáinak arányát.
3. Meghatározni a fent említett halfajok fent említett szerveiből származó AChE enzim molekuláris formamintázatát.
4. A DM *in vitro* AChE gátlásának jellemzése és a gátlási állandó meghatározása klasszikus kinetikai módszerekkel ponty és angolna esetében.
5. A DM hatásának jellemzése az AChE aktivitására, valamint a molekuláris formáinak megoszlására a ponty és az angolna különböző szerveiben.
6. Az 1991 és 1995 évi balatoni angolnapusztulás okainak kiderítése az általunk kifejlesztett monitoring rendszer segítségével.
7. A DM hatása a túlélési reakciókat koordináló Mauthner sejtekre.

Munkánk szorosan kapcsolódik a Szegedi Tudományegyetem Biokémiai Tanszékén és a Bay Zoltán Alkalmazott Kutatási Alapítvány Biotechnológiai Intézetében folyó környezetbiokémiai kutatásokhoz. Kutatásaink távlati célja, hogy a két intézet által használt halas biomonitoring rendszerhez újabb enzimdiagnosztikai módszereket dolgozzunk ki, melyek rutinszerűen, olcsón és gyorsan elvégezhetők, s tovább finomítják rendszerünket, lehetőséget adva természetes vizeink állapotának pontos és objektív értékelésére.

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1 Anyagok

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

Enzimek: Alkalikus foszfatáz (EC 3.1.3.1), BSA (Sigma), glükózoxidáz (EC 1.1.3.4), β -galaktozidáz (EC 3.2.1.23, Sigma).

Vegyszerek: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, deltamethrin (Sigma), 85%-os foszforsav, 96%-os etanol, α -oxoglutarát, acetiltiokolin-jodid (AcTCh-I)(Lachema), aceton, BW 284 C51 (Sigma), Comassie-Brillant Blue, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, D,L-alanin, nátrium-p-nitrofenil-foszfát, 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzoesav) (Sigma), ethopropazin (Sigma), etil-acetát, formalin, glutáraldehid, H_2O_2 , hexán, K-Na-tartarát, KI, kloroform, L-aszpartát, methidation (Sigma), metil-viologén (Sigma), Na-acetát, Na-kakodilát, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, Na_2S , Na_2SO_4 , NADH, NaH_2PO_4 , NaOH, neosztigmin (NBS Biologicals), o-dianizidin, OsO_4 , PbNO_3 , piroszőlősav, selecton B_2 (EDTA), tris, triton X-100, uranil-acetát.

4.2 Tartási és kezelési körülmények

A kísérleti állatok, a busa kivételével, mind felnőtt, ivarérett egyedek voltak. A vizsgált busák 1+ nyarasak voltak. A busák, harcsák származási helye a Fehér-tó, angolnákat a Balatonról, míg a lénai tokokat a Szarvasi Haltenyésztési Intézetből kaptuk. A pontyokat a Tiszai Halászati Szövetkezettől vásároltuk. A pontyokat, angolnákat kettesével 100 l-es jól levegőztetett akváriumokban, míg a többi halat 400 literes, szintén jól levegőztetett kádakban tartottuk. A vizsgált hatóanyagot (DM) a halak egy hetes adaptációja után az akváriumok vizében oldottuk fel. Minden kezelést 3-8 állaton végeztünk el.

A kolinészterázok molekuláris formáinak vizsgálatához 2 $\mu\text{g/l}$ DM-nel 3 napig kezelt halak agyát, máját, szívét, vázizmát és vérsérumát használtuk.

A pontyok *in vivo* DM kezelésekor 1.4 $\mu\text{g/l}$ piretroidot használtunk, míg az angolnák kezelése 0.5 $\mu\text{g/l}$ koncentrációval történt. A kezelés időtartama 24, illetve 96 óra volt. A DM akkumulációját 2 $\mu\text{g/l}$ DM-nel 4 napig illetve a kezelt állatok agyából, májából és kopolyájából határoztuk meg.

4.3 A kolinészteráz aktivitások mérése

4.3.1 A kolinészteráz aktivitás mérése

A kolinészterázok aktivitását Ellman és munkatársai (1961) spektrofotometriás eljárásával mértük. Az elegy összetétele a következő volt: 52 mM Na-foszfát puffer (pH=7.2, 25 °C), 0.26 mM 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzoesav) (DTNB) és 82.4 mM AcTCh-I. A reakciót 0.01-0.1 ml homogenát hozzáadásával indítottuk a vizsgált szövetből függően, és 412 nm-en detektáltuk Cecil CE 5501 UV-VIS spektrofotométerrel. A kolinészterázok aktivitását az elhidrolizált AcTCh-jodid $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein értékben adtuk meg (U/mg protein). Az AChE és BuChE arányának meghatározásakor, az AChE aktivitásának mérésekor a fent leírt elegyhez BuChE gátlószerként 10^{-5} M ethopropazint adtunk. A BuChE aktivitásának mérésekor AcTCh-I helyett BuTCh-I-ot használtunk szubsztrátként, az AChE gátlására pedig 10^{-4} M neostigmint használtunk.

4.3.2 Az AChE aktivitásának mérése ultracentrifugálás után levett frakciókból

Mivel az egyes frakciókban az előbb leírt módszerrel nem detektálható az enzimaktivitás az AChE kis koncentrációja miatt, ezért a következő módszer szerint jártunk el:

Az elkészített, DTNB-t tartalmazó pufferhez 0.1 ml mintát adtunk az adott frakcióból, s a szubsztráttal 37 °C-os vízfürdőben 15-45 percig inkubáltuk az elegyet. Az inkubálás után a reakciót 100 μl neosztigminnel állítottuk le úgy, hogy annak végkoncentrációja 10^{-4} M legyen.

Összehasonlító oldattal szemben mértük a mintákat, mely oldat a frakcióból kivett elegy hozzáadásakor már tartalmazott kolinészteráz gátló neosztigmint. A kolinészteráz aktivitást az elhidrolizált AcTCh-jodidból számoltuk. Az AChE mérésekor a kiindulási elegy specifikus BuChE gátló ethopropazint tartalmazott, melyeknek végkoncentrációja 10^{-5} M volt.

4.4 Az *in vitro* kísérletben használt módszer

Az *in vitro* kísérletekben agy homogenizátumot használtunk, mivel ez a szerv bővelkedik AChE-ban. Kezeletlen ponty és angolna agyát kipreparáltuk, 1:4 arányban elegyítettük 0.5% Triton X-100-at, 12.5 mM (pH=7.2) foszfát puffert, 67.2 mg/100 ml EDTA-t és 0.4 M NaCl-ot tartalmazó homogenizáló oldattal és homogenizáltuk (800 min^{-1}), majd lecentrifugáltuk (7000 rpm, 1 óra, K23 centrifuga). A kapott felülúszót hal fiziológias sóoldattal (0.62% NaCl) kétszeresére hígítottuk, majd közvetlenül AChE aktivitás meghatározásra használtuk az *in vitro* kísérletekben.

Az időfüggések vizsgálatakor két szerkoncentrációt is használtunk. A reakciópufferekhez 10 μl agy homogenát felülúszót adtunk, majd a megfelelő gátlószer mennyiségekkel inkubáltuk

együtt őket 0-60 percig szobahőmérsékleten. A reakciót az AChE mesterséges szubsztrátjával (acetiltiokolin-jodiddal) indítottuk és a fényelnyelést 412 nm-en követtük. A homogenizátum fehérje tartalmát Lowry és mtsai (1951) módszerével végeztük, az enzimaktivitásokat specifikus aktivitásként adtuk meg.

A koncentrációfüggés vizsgálatakor a megfelelő szerkoncentrációkat állítottuk elő a reakcióelegyekben, és 10 percig inkubáltuk az enzimet az inszekticidekkel.

A Michaelis-Menten-féle kinetikát gátlószer nélkül, 10 μ M és 20 μ M koncentrációjú DM-nel. A Dixon-féle kinetikánál 0.05, 0.10 és 0.20 mM-os szubsztrát koncentrációt alkalmaztunk.

4.5 Az AChE molekuláris formáinak meghatározása

A DM-nel kezelt halak (4-6 db) agy-, máj- és szív mintáit 1:4 arányban, a vázizmot 1:9 arányban elegyítettük 0.5% Triton X-100-at, 12.5 mM (pH=7.2) foszfát puffert, 67.2 mg/100 ml EDTA-t és 0.4 M NaCl-ot tartalmazó homogenizáló oldattal. A kötött és szolubilis formák elkülönítésére különböző homogenizálókat használtunk (Rakonczay és mtsai, 1981). A vérminták lecentrifugálása (Eppendorf centrifuga, 12000 g) után a vérszérumot használtuk a továbbiakban. A mintákat Braun 853302/4 típusú Potterrel homogenizáltuk (800-1000 min⁻¹). Az így kapott homogenizátumokat előcentrifugáltuk 16000 rpm-en, 45 percig 4 °C-on Heraeus Christ Cryofuge Nr. 8730 típusú centrifugával (26000 g). A molekuláris formák elválasztása 5-20%-os lineáris szacharóz gradiensen történt, 16 órás 36000 rpm-es ultracentrifugálással (160000 g), amihez Sorval Ultra PRO 80 típusú centrifugát és TH-641-es rotort használtunk. Az ultracentrifugálás után 40 frakciót szedtünk, majd minden egyes frakcióban meghatároztuk az AChE és a marker enzimek aktivitását, illetve a BSA tartalmat. Szedimentációs markerként BSA-t (4.3S), alkalikus foszfatazt (6.1S, EC 3.1.3.1), katalázt (11.3S, EC 1.11.1.6) és β -galaktozidázt (16.0S, EC 3.2.1.23) használtunk. Az alkalikus foszfatazt, a katalázt és a β -galaktozidázt aktivitását Boehringer Mannheim GmbH (1974) katalógusban leírtak alapján határoztuk meg.

4.6 Az *in vivo* kísérletek során használt módszerek

Az *in vivo* kísérleteinkben a pontyokat 2.0 μ g/l koncentrációjú DM-es vízben tartottuk 72 óráig 12 ± 1 °C-on (kora tavaszi - késő őszi körülmények). Angolnák esetében 1 μ g/l DM volt a kezelés koncentráció 96 óráig 20 ± 1 °C-on. A kezelést követően tiszta vízbe téve a kísérleti állatokat folytattuk a kísérletet. A kísérletek alatt adott időpontokban a pontyok farokvénájából vettünk vért. Angolnák esetében a vérvétel a szívből történt. A vért lecentrifugáltuk (12000 g, Eppendorf centrifuga) és a hemolízismentes szérumból mértük az enzimek aktivitásait az alábbi módszerekkel:

- Az AChE aktivitását acetiltiokolin-jodid szubsztráttal határoztuk meg Ellman és mtsai (1961) szerint.

- A glutamát-oxálacetát transzamináz aktivitásokat Reitman és Frankel (1957) módszere alapján mértük a Reanal által gyártott kettő segítségével.
- A laktát dehidrogenáz aktivitásának mérésére Annon (1971) módszerét alkalmaztuk. Az enzimek specifikus aktivitását U/mg fehérje mértékegységben adtuk meg. (1 U= 1 μ mol átalakított szubsztát percenként.)
- A fehérjetartalmat Lowry és mtsai (1951) szerint határoztuk meg.
- A vércukorszint meghatározást enzimatikusan glükózoxidáz-peroxidázzal végeztük. A reakcióelegy 2.5 ml glükóz reagenst [2 mg peroxidázt és 12.5 mg glükózoxidázt oldottunk 50 ml 0.1 M foszfát pufferben (pH=7.0), majd ehhez 1 ml o-dianizidin oldatot adtunk (3.3 mg/ml 1 N HCl)] és 0.1 ml fehérjementesített vérszérumot tartalmazott. Szobahőn 30 percig inkubáltuk az elegyet, majd 450 nm-en mértük a fényelnyelést.

A kezelést követően az adott szerveket eltávolítottuk, majd Braun 853302/4 típusú potterrel (200 mg nedves szövethez 0.8 ml homogenizáló oldatot adva) homogenizáltuk. Ezt követően a homogenizátumot centrifugáltuk, és az AChE enzimaktivitásokat a felülúszóból határoztuk meg.

4.7 A DM akkumulációjának meghatározása

A DM akkumulációjának meghatározásához kontroll állatok, és ponty esetében 1,4 μ g/l, angolna esetén 0,5 μ g/l koncentrációjú DM-nel 4 napig kezelt halak szerveit acetonnal homogenizáltuk, centrifugáltuk, majd a felülúszót diklórmétánba ráztuk át. A koncentrált extrakt kétszeres oszlopkromatográfiás tisztítása után a DM-t elektronbefogási detektorral gázkromatográfiásan határoztuk meg (KP 5880, HP-1 kolonna /cross-linked methyl silicone gum phase/ 12 m*0.2 mm*0.33 μ m, $T_{injektor}$ =280 °C Splitless, Splitless time: 30 s, T_{oszlop} =270 °C, $T_{detektor}$ =300 °C ECD-Electron Capture Detector, vivőgáz: N₂ /T 45/, injektált térfogat: 0.8 μ l). Standardként spektroszkópiailag tiszta DM-t használtunk.

4.8 Az 1991-es és 1995-ös balatoni angolnapusztulás vizsgálatának módszerei

4.8.1 Az angolnapusztulás helyszínén történt gyűjtés és mintavételi eljárások leírása

Vizsgált minták

1991 július 10-én a Balaton nyugati medencéjéből begyűjtött angolnák; 1995. július 25-28. között a Balaton keleti medencéjéből begyűjtött agonizáló és túlélő angolnák; 1995. július 24-26. között a Balaton keleti medencéjének különböző szegmenseiből begyűjtött iszapminta.

Megjegyzendő, hogy a K-Othrin 1 ULV-val történt szunyogirtás napján, július 14-én felhőszakadás tört ki a keleti medence fölött. Az Országos Meteorológiai Szolgálat jelentése szerint 45,8 mm csapadék esett ezen a napon. Ez a havi 60,7 mm-es csapadékmennyiségnek pontosan a 75 %-a. Ez a nagy mennyiségű, egyidőben lehullott csapadék a part menti talajt a hozzátapadt szunyogirtó szerrel együtt bemoshatta a tóba; 1995. augusztus 3-7. között a Balaton keleti medencéjéből gyűjtöttünk be túlélő angolnákat, dévérkeszegeket (*Abramis brama* L.) és sirályokat (*Larus canus*). A szabadföldi kísérletek során begyűjtött angolnák farki vénájából illetve szívéből 2 mm vért vettünk, heparinnal átölített fecskendővel. A vérmintákat hűtött körülmények között centrifugáltuk (12.000 g Eppendorf centrifuga), amellyel eltávolítottuk az alakos elemeket. A maradék szérumhoz ugyanolyan mennyiségű glicerint adtunk. A vérmintákat 4° C-on tartva szállítottuk a laboratóriumba. A szövetmintákat azonnal folyékony nitrogénbe helyeztük és így szállítottuk. A laboratóriumi kísérletek során hím és nőivarú angolnák 400-600 g tömegű egyedeit használtuk, amelyeket egyenként helyeztünk el egy folyamatosan levegőztetett, 22° C ± 2° vízhőmérsékletű 100 literes akváriumba. Az angolnákat nem etettük a kísérlet során. A DM koncentráció az akváriumban: 0,5; 1,0 és 2,0 µg/l volt. Itt a kezelési idő 96 óra.

4.8.2 Transzaminázok, tejsav dehidrogenáz, kataláz, acetilkolin-észteráz aktivitások és vércukorszint mérése

Ezen paraméterek mérése hemolízismentes szérumból történik.

- A transzaminázok (GOT és GPT) enzimek aktivitását Reitman és Frankel (1957) kolorimetriás módszere alapján a REANAL által gyártott tesztkészlettel határoztuk meg.
- A tejsav dehidrogenáz enzim aktivitásának meghatározása Annon (1971) módszere alapján.
- A vércukorszint meghatározása: Glükóz oxidáz – peroxidáz reakció alapján történt, melyhez Sigma Kit-et használtunk. A reakcióelegy összetétele 5 ml reagens oldat (ez tartalmazta a glükóz-oxidáz enzimet, a peroxidáz enzimet és az o-dianizidint) és 0.2 ml hússzorosára hígított vérszérum volt. Mindezt 30 percig 37 °C-on inkubáltuk, majd az enzimreakciót 0.5 ml, 4 N HCl oldattal leállítottuk, és az abszorpciót 562 nm-en spektrofotometriásan mértük.
- Kataláz és AChE enzim aktivitásának meghatározása: Ezen aktivitásokat a különböző szövetekben úgy határoztuk meg, hogy az adott szerveket eltávolítottuk, majd Braun 853302/4 típusú potterrel (200 mg nedves szövethez 0,8 ml homogenizáló oldatot adva) homogenizáltuk. Ezt követően a homogenizátumot centrifugáltuk és az említett enzim aktivitásokat a felülúszóból határoztuk meg.

Az acetilkolinészteráz enzim aktivitásának meghatározása Ellman és Courtney (1961) módszerével. A kataláz enzim aktivitását spektrofotometriásan mértük a H_2O_2 fogyás alapján az enzimaktivitást. A reakcióelegy 3,0 ml foszfát pufferből (50 mM, pH=7,0, amely 1,2 μl 30 %-os H_2O_2 -t tartalmazott 1 ml pufferre vonatkoztatva) és 200 μl mintából állt. A reakciót 240 nm-en követtük.

4.8.3 DM kimutatása HPLC-vel

- Iszapminta előkészítése: 10 g iszapot összekevertünk 10 ml vízzel és 50 ml acetonnal. 5 perc rázás után a mintákat 1 óráig inkubáltuk és belőlük a DM-t 10 ml hexánnal extraháltuk. A DM a hidrofób fázisba ment át, amelyet vákuum alatt szárítottunk. A szárítás után a mintákat 100 ml-re hígítottuk fel HPLC eluenssel. A DM meghatározására a szövetmintákat Akhtar (1982) módszere szerint készítettük elő. E módszert gázkromatográfiára írták le és HPLC-re módosították.
- A készülék leírása: A gázkromatográfiás méréseket Gynkotec HPLC rendszeren végeztük, amely a következő részekből áll: nagy precizitású pumpa (Model 480), gázmentesítő egység és Peltier termosztálható HPLC oszlop. A használt detektor Gynkotec 230 és 210 nm között variálható UV detektor. Az injektor 50 μl -es Rheodyne 8125 (California, USA). A használt álló fázis Bondapack C18 (3.9x300 mm) oszlop. A használt eluens acetonitril: 0.1 % H_2SO_4 ionmentesített HPLC minőségű desztillált víz (70:30). A mozgófázis áramlási sebessége 1 ml/min, az oszlop hőmérséklete 50° C.
- Vegyszerek és eluens. Az acetonitril, hexán és aceton a Sigma Chemical Company által gyártott. A HPLC eluent a Milli Q rendszerrel (Millipore, Bedford, USA) ionmentesítettük és desztilláltuk. A standardként használt Decis rovarirtószer 25 g/l DM-et tartalmazott.
- Mérések. Mivel a minták DM koncentrációja kevéssel a mérési határ felett volt, mindenik mintához azonos mennyiségű DM-et adtunk, hogy a módszert érzékenyebbé tegyük (belső standard).

4.9 A DM hatása a Mauthner sejtekre. Elektronmikroszkópos, enzim és immunhisztokémiai eljárások

Négy balatoni halfajt vizsgáltunk a Bay Zoltán Biotechnológiai Intézet akváriumaiban. Az akváriumok mérete 80x80x120 cm. Minden akváriumba egy halat helyeztünk. Ennek vize jól levegőztetett csapvíz, 18 °C, pH 7,2, 16 német keménységi fokú. A DM-ként a Fluka Chemie AG, Germany cég termékét használtuk. A kontroll állatok esetében csak oldószert adagoltunk az akváriumba (ciklohexán). A következő fajokat vizsgáltuk: ponty (négy kontroll, 9 DM kezelt), angolna (9 kontroll, 9 DM kezelt), harcsa (5 kontroll, és 9 DM kezelt) és ezüst kárász (*Carassius auratus gibelis* Bloch) (8 kontroll és 9 DM kezelt). A kezelési koncentráció minden egyed esetén 1 µg/l, 24, 48, 72, 96 órás kezelési idő; 5 µg/l esetében 72 órás; 10 µg/l esetében 24, 48, 72 és 96 órák voltak.

A kontroll és kezelt állatokat lidokainnal tettük mozgásképtelenné (Egis 2 ml 10 %-os injekciót oldottunk 1000 ml akvárium vízben). A mozgásképtelenné tett egyedeket transcárdialisan 15 percig hal Ringer oldattal mostuk át, amely 0,01 %-os véralvadásgátló heparinszulfátot tartalmazott. Ezt követően a transcárdialis rögzítés 4 %-os paraformaldehiddel vagy Zamboni pikroaldehid fixálóval történt. A halak transcárdialis perfúziójához erre a célra szerkesztett gravitációs nyomással működő szerelést állítottunk össze. A fénymikroszkópos enzim és immunhisztokémiai vizsgálatokhoz a Mauthner sejteket az agytörzs kriosztátos sorozatmetszését követően azonosítottuk. A Mauthner sejtek elhelyezkedését és citológiai sajátosságait módosított Protargol impregnációs technikával tanulmányoztuk (Csillik, 1959). Az AChE lokalizációját Koelle módszerével (1954) végeztük el, amelyet Gerebztsoff (1959), valamint Tago Kimura és Maeda (1986) módosítása nyomán acetiltiokolin szubsztráttal, pH 5,2 és 7,6 közötti tartományban, a nemspecifikus észteráz és a butirilkolin észteráz egyidejű Etopropazinnal való gátlása mellett végeztük.

Az AChE kimutatása Koelle módszerével:

A szövetmintákat 0.05 M kakodilát pufferben (pH = 7.0) - mely 4% formalint és 2% glutáraldehidet tartalmazott - 6 órán keresztül fixáltuk immerziós módszerrel. Ezután a preparátumokat izotóniás mennyiségű (19.876 g/l) Na₂SO₄-ot tartalmazó 0.1 M kakodilát pufferben 12 órán át mostuk, 3 óránként váltva a mosóoldatot. Az agydarabokból *Vibratome*-mal 60-80 µm-es metszeteket készítettünk.

Ezt követően a mintákat 4 °C-on 30 percig, majd 25 °C-on újabb 30 percig inkubáltuk. 200 ml izotóniás Na₂SO₄ inkubáló elegy tartalmazott 7 mg AcTCh-I-ot, 2.2 ml 0.1 M nátrium-acetátot, 0.1 ml 3.8%-os glicinoldatot, 0.1 ml 0.1%-os Pb(NO₃)₂ oldatot, 0.1 ml 0.1 M CuSO₄-ot. A pH-t 5.5-re állítottuk be. Az inkubálás után izotóniás Na₂SO₄-tal mostuk 3x5 percig a preparátumokat (váltogatva a mosó oldatot), majd 3-5 percre a mintákat az előhívó

elegybe helyeztük, mely 20 ml 1 N nátrium-acetátot, 80 ml desztillált vizet és 2 g Na_2S -ot tartalmazott, és pH-ja 7.5 volt.

Ezt követte háromszori mosás, először izotóniás Na_2SO_4 -ban, majd csapvízben, végül desztillált vízben. Az utolsó mosás után visszahelyeztük a mintákat 12 órára az eredeti összetételű fixálóelegybe. Az ilyen módon nyert preparátumokat glicerinnel lefedve Zeiss fénymikroszkóp (Nomarsky optika) alatt vizsgáltuk.

Elektromikroszkópos vizsgálatokra az agyszövetet perfúziós módszer segítségével Palay-féle fixálóval immerziós módszerrel rögzítettük. és vibratómmal szeleteltük. Az enzim és immunhisztokémiai reakció után a 40 nm vastag metszeteket utánfixáltuk foszfátpufferes osmiumsavval és víztelenítettük emelkedő alkoholgradiensben (Knyihár-Csillik és mtsai 1999). A Mauther sejteket sztereomikroszkóppal azonosítottuk, Epon-Durcupán keverékbe újraágyaztuk és Reichelt-féle ultramikrotommal gyémántkés segítségével metszeteket készítettünk. Az 1 μm félfinom tárgylemezre szárított metszeteket enyhén festettük, bázikus toluidin késsel a fénymikroszkópos vizsgálatokhoz. A 30 nm vastagságú finom (ultravékony) metszeteket uranil acetáttal és ólomcitráttal kontrasztosítottuk. A metszeteket Zeiss Opton 902 elektronmikroszkóppal vizsgáltuk.

4.10 Az alkalmazott statisztikai módszerek és számítógépes programok

A statisztikai értékelésekhez elsősorban Student t tesztet használtunk. Szignifikánsnak tekintettük a változásokat, ha P értéke kisebb volt, mint 0.05. A felhasznált programok: Excel 5.0, Lotus 1-2-3, Quattro Pro, Harvard Graphics 2.1, 3.0 és 2.0 for Windows, MSWORD 7.0 és 6.0 for Windows.

5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELEÉSÜK

5.1 Néhány édesvízi halfaj kolinerg enzimeinek jellemzése

Habár az elmúlt években megjelenő nemzetközi publikációk közül számos foglalkozik az AChE és BuChE enzimek biokémiai jellemzésével, sajnos azonban vagy felsőbb rendű gerincesek - madarak, emlősök (Anselmet és mtsai, 1994; Cabezas-Herrera és mtsai, 1994; Chatel és mtsai, 1994; Bajgar és mtsai 1995a, 1995b;) - vagy gerinctelen szervezetek, mint például az orvosi pióca *Hirudo medicinalis* (Talesa és mtsai, 1995), a tengeri féreg *Sipunculus nudus* (Talesa és mtsai, 1993), a folyami rák *Pacifastacus leniusculus* (Braun és Mulloney, 1994), az ecetmuslica *Drosophila melanogaster* (Toutant és mtsai, 1988) vagy a burgonyabogár *Leptinotarsa decemlineata* (Zhu és Clark, 1994) voltak a kísérleti alanyok. Csak néhány közlemény foglalkozik halakkal. Ezek szerzői is elsősorban az elektromos rája (*Torpedo marmorata*) és elektromos angolna (*Electrophorus electricus*) elektromos szerveit tanulmányozzák, mivel e szervek bőséges forrásai az AChE-nak (Krejci és mtsai, 1991; Duval és mtsai, 1992; Legay és mtsai, 1993; Mehlert és mtsai, 1993; Inestrosa és mtsai, 1994). Csak nagyon kevés cikk foglalkozik más halfajok kolinerg enzimeinek jellemzésével (Nemcsók és mtsai, 1990; Szabó és mtsai, 1992).

Ezen fejezetben belül öt hazai halfaj kolinerg enzimeit jellemeztük. Vizsgáltuk aktivitásukat, megoszlásukat, molekuláris formájuk mintázatát különböző szervezetekben. Az öt halfaj kiválasztásakor a különböző életmód és az eltérő evolúciós fejlettség volt a mérvadó.

5.1.1 Lénai tok (*Acipenser baeri*) kolinerg enzimeinek jellemzése

Magyarországon nem honos, de nagy mennyiségben tenyésztik a különböző halgazdaságok. Hazai őshonos rokonai az *Acipenseridae* rendbe sorolt kecsege (*Acipenser ruthenus*) és az igen ritka víza (*Huso huso*). Mint a porcos-vértes halak egyik faja - e hal is igen ősi jellegű. Hosszú, áramvonalas testét csontszerű lemezek, ún. pajzsok fedik több sorban. Feje, melyet szintén csontszerű pajzs véd - hegyesedő, a szája alsó állású. Szája előtt négy tapogató bajusz található. Gerince a részaránytalan farokúszó felső részében folytatódik. Iszaptúró életmódot folytat (Prichard és Linsell, 1986; Wiesinger és Szabó, 1973).

A lénai tok szerveiben mért kolinészteráz aktivitásokat és a fehérje tartalmat az 1. táblázat mutatja:

	SPECIFIKUS AKTIVITÁS	SZÖVETI AKTIVITÁS	FEHÉRJE TARTALOM
	mU/mg fehérje	mU/mg nedves szövet	mg/g nedves szövet
AGY	183.2 ± 10.6	4.7 ± 0.4	25.6 ± 1.3
SZÍV	47.9 ± 17.3	1.6 ± 0.2	35.3 ± 9.0
VÁZIZOM	30.1 ± 4.0	2.4 ± 0.2	82.3 ± 7.9
MÁJ	29.5 ± 3.5	1.0 ± 0.1	34.2 ± 5.3

1. táblázat Kolinészterázok AcTCh-I-dal mért aktivitásai és a fehérje tartalom lénai tok szerveiben

Megjegyzés: Az aktivitások 6 halból származó mérés átlagát ($\pm$ S.D.) tükrözik. A kísérleti körülményeket lásd az "Anyagok és módszerek" című fejezetben.

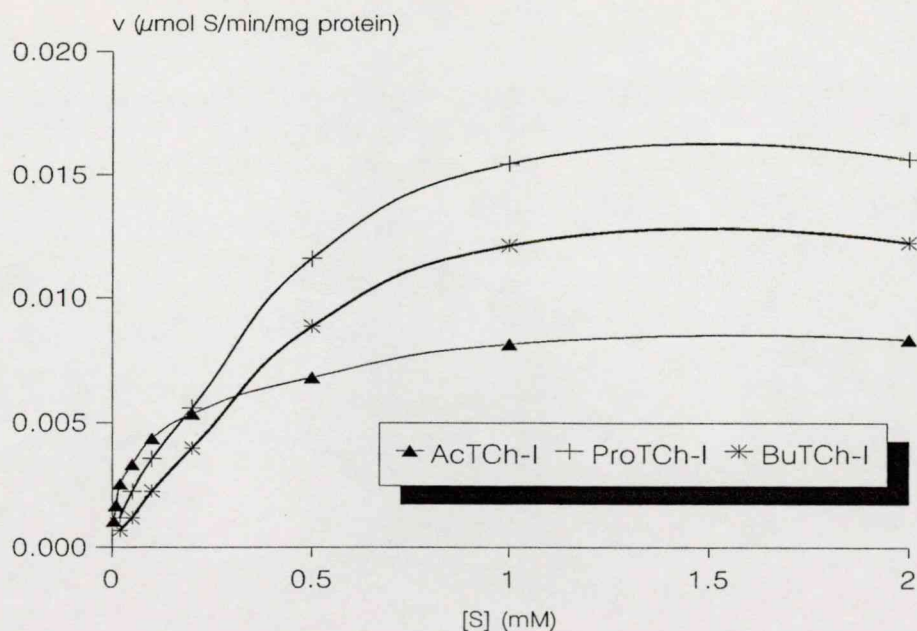
A kolinészterázok specifikus aktivitása - a vártak megfelelően - az agyban a legnagyobb. Lényegesen kisebb aktivitás mérhető a szívben, illetve a vázizomban. A májban mért specifikus aktivitás mértéke gyakorlatilag megegyezik a vázizomban mérttel. Ugyanakkor nem annyira szembetűnőek a különbségek, ha az aktivitásokat egységnyi tömegű szövetre vonatkoztatjuk. Érdekes, hogy a vázizomban nagyobb szöveti aktivitás tapasztalható, mint a szívben.

A 2. táblázatban tüntettük fel a kolinészterázok specifikus aktivitásainak százalékos megoszlását a különböző szervekben. Megállapítható, hogy a lénai tok szöveteiben a tiokolin-jodidok hidrolíziséért elsősorban az AChE felelős. BuChE aktivitás gyakorlatilag nem detektálható, hiszen speciális AChE gátlószert mellett BuTCh-I hidrolízis alig megy végbe. Ami egyben azt is jelenti, hogy a gátlószert nélkül mért BuTCh-I hidrolíziséért is (az aspecifikus hidrolázok mellett) elsősorban az AChE tehető felelőssé. Igen érdekes a májban található AChE aktivitása. Kezdetben azt gondoltuk, hogy a májban jelentős BuChE aktivitás mérhető, hisz a gátlószerek jelenléte nélkül kétszer akkora BuTCh-I hidrolízist mértünk, mint AcTCh-I hidrolízist. Később azonban kiderült, hogy ez a BuTCh-I hidrolízis eltűnik, ha specifikus AChE inhibitor mellett végezzük el a kísérletet. Ebből egyértelműen kiderül, hogy a májban detektált nagymértékű BuTCh-I hidrolíziséért az AChE a felelős.

	AcTCh-I HIDROLÍZIS	BuTCh-I HIDROLÍZIS	AcTCh-I HIDROLÍZIS 10 ⁻⁵ mM ETHOPROPAZIN GÁTLÓSZEREK NÉLKÜL	BuTCh-I HIDROLÍZIS 10 ⁻⁴ mM NEOSTIGMIN GÁTLÓSZEREK JELENLÉTÉBEN
	GÁTLÓSZEREK NÉLKÜL (%)		GÁTLÓSZEREK JELENLÉTÉBEN (%)	
AGY	64.8 ± 3.11	35.2 ± 3.11	99.6 ± 0.23	0.4 ± 0.23
SZÍV	72.0 ± 14.9	28.0 ± 14.9	99.1 ± 1.6	0.9 ± 1.6
VÁZIZOM	78.0 ± 0.7	22.0 ± 0.7	96.7 ± 1.2	3.3 ± 1.2
MÁJ	32.9 ± 0.7	67.1 ± 0.7	97.7 ± 4.1	2.3 ± 4.1

2. táblázat Kolinészterázok specifikus aktivitásainak százalékos megoszlása lénai tok különböző szerveiben specifikus gátlószerek jelenlétében és hiányában.

Megjegyzés: Az értékeket a két szubsztráttal mért aktivitások összegének százalékában adtuk meg. Az értékek 4 halból származó mérés átlagát (± S.D.) tükrözik. A kísérleti körülményeket lásd az "Anyagok és módszerek" című fejezetben.



3. ábra A lénai tok máj AChE-nak Michaelis-Menten kinetikája acetil-, propionil- és butiriltiokolin-jodiddal.

Megjegyzés: A reakcióelegy a következő volt: 0.1 ml májból készült homogenát felülszója + 2.00 ml 0.26 mM DTNB 52 mM foszfát pufferben (pH=7.2) oldva + 0.05 ml szubsztrát + 0.05 ml ethopropazin (10⁻⁵ M)

Mivel azonban a BuTCh-I hidrolízis nagyobb mérvű volt, mint a AcTCh-I hidrolízis, joggal vetődik fel a kérdés: a lénai tokban talált AChE nagyobb sebességgel bontja az BuTCh-I-t, mint az AcTCh-I-t? Úgy tűnik igen. Ezt kinetikai mérésekkel sikerült igazolnunk. Mértük a reakciósebesség szubsztrát koncentráció függését AcTCh-I-dal, ProTCh-I-dal és BuTCh-I-dal is (3. ábra). A Lineweaver-Burk-féle linearizálással számolt kinetikai adatokat a 3. táblázat tartalmazza.

	AcTCh-I	ProTCh-I	BuTCh-I
V_{MAX}	0.00846 ± 0.00043	0.01565 ± 0.00011	0.01246 ± 0.00043
K_M	0.02245 ± 0.00115	0.0753 ± 0.013	0.0754 ± 0.011

3. táblázat Lénai tok máj AChE-nak V_{MAX} és K_M értékei acetil-, propionol- és butiriltiokolin-jodidra $\mu\text{mol S/min/ mg protein}$, illetve mM mértékegységben kifejezve.

Megjegyzés: Az értékek 4 halból származó mérések átlagát ($\pm$ S.D.) tükrözik.

Az eredményekből látszik, hogy bár az enzimnek a három szubsztrát közül az AcTCh-I-hoz a legnagyobb az affinitása (ezt mutatja a kisebb K_M érték), de kisebb sebességgel bontja azt. Bár a legnagyobb sebességgel a ProTCh-I-t bontja az enzim, de számunkra igazából az a lényeges, hogy a BuTCh-I-t is 1.5 -szer akkora sebességgel bontja az enzim, mint az AcTCh-I-t.

	SÓ-OLDHATÓ FORMÁK (%)	DETERGENS-OLDHATÓ FORMÁK (%)
AGY	21.9 ± 4.7	78.1 ± 4.7
SZÍV	82.4 ± 8.9	17.6 ± 8.9
VÁZIZOM	84.0 ± 2.0	16.0 ± 2.0
MÁJ	65.4 ± 2.6	34.6 ± 2.6

4. táblázat A só-oldható- és detergens-oldható formák százalékos megoszlása lénai tok különböző szerveiben.

Megjegyzés: Az értékeket a teljes AChE aktivitás százalékában adtuk meg. Az értékek 6 halból származó mérés átlagát ($\pm$ S.D.) tükrözik. A kísérleti körülményeket lásd az "Anyagok és módszerek" című fejezetben.

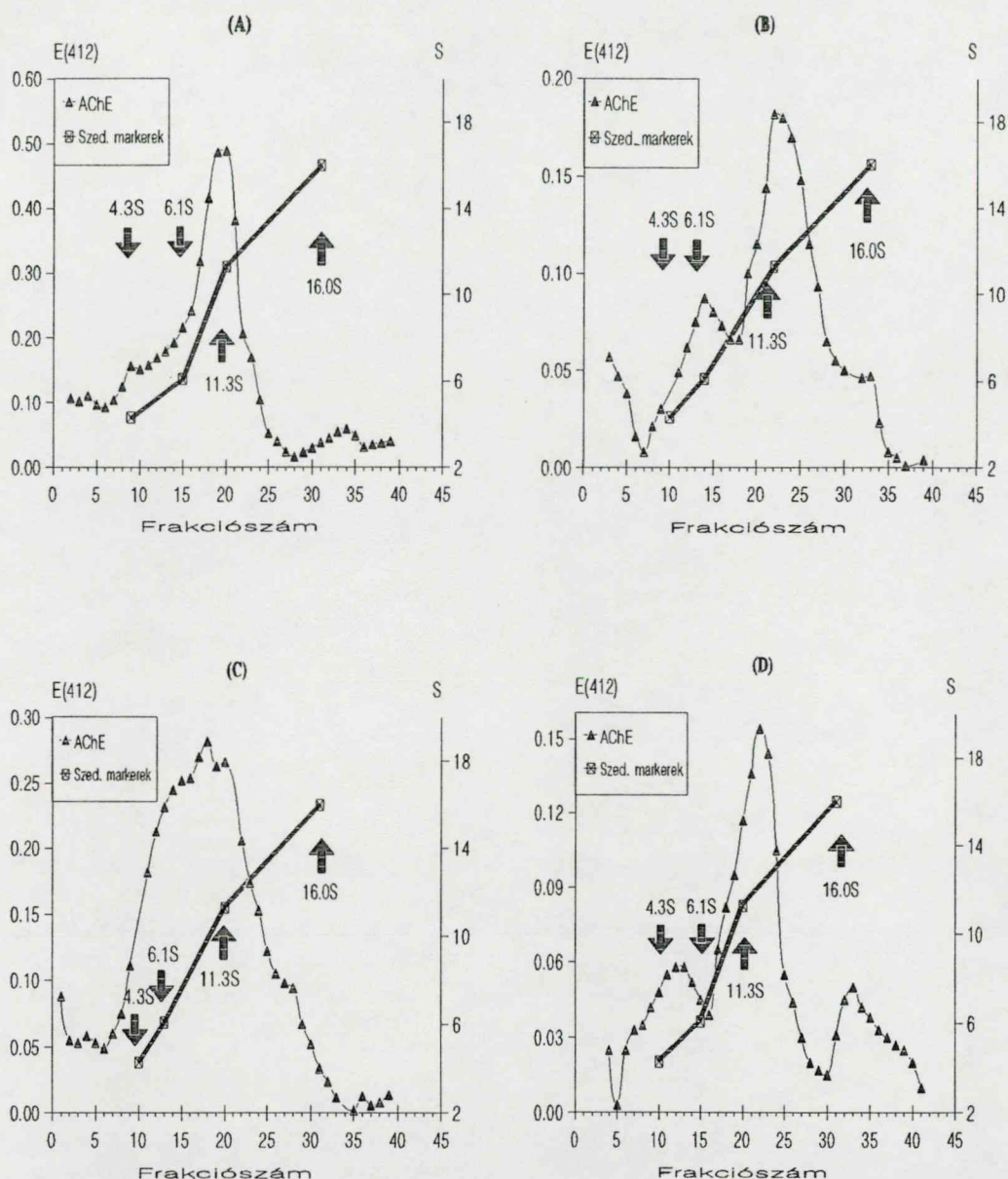
A tok szerveiben található AChE enzimekről elmondható, hogy főleg só-oldható - tehát a sejtmembránhoz kevésbé rögzülő - formákat tartalmaznak. Ez alól kivételt képez az agy, ahol a detergens-oldható - tehát a sejtmembránnal szoros kapcsolatot tartó - formák a dominánsak (4. táblázat). Bár a májban a só-oldható formák a dominánsak, de közel sem olyan mértékben, mint az izom típusú szövetekben. Ugyanis a májban a formák több, mint egyharmadát a detergens-oldható formák teszik ki.

AChE MOLEKULÁRIS FORMÁK (%)			
	G1	G4 és/vagy A4	A12
AGY	28.6 ± 4.9	67.7 ± 0.3	3.7 ± 5.2
SZÍV	24.3 ± 2.4	66.6 ± 1.7	9.1 ± 4.1
VÁZIZOM	-	100.0 ± 0.0	-
MÁJ	27.5 ± 3.0	52.2 ± 0.6	20.3 ± 2.5

5. táblázat Az AChE enzim molekuláris formáinak megoszlása lénai tok különböző szerveiben.

Megjegyzés: Az értékeket az összes molekuláris forma százalékában adtuk meg. Az értékek 4 halból származó mérés átlagát ($\pm$ S.D.) tükrözik. A kísérleti körülményeket lásd az "Anyagok és módszerek" című fejezetben.

Meglehetősen változatos képet mutat a molekuláris formák mintázata (5. táblázat, 4. ábra). Általánosságban elmondható, hogy mindegyik szervben a G4/A4 forma a domináns. Ez különösen igaz a vázizomra, mely kizárólag ezt a formát tartalmazza. Ugyanakkor a többi szervben jelentős a G1 formák aránya is, hiszen ezen szervekben az AChE aktivitások közel negyedét ez a forma adja. Számottevő mennyiségű A12 forma található a májban, a szívben ez az arány kevesebb. A12 formából az agy tartalmazza a legkevesebbet, a molekuláris formáknak csak a 3.7 ± 5.2 %-át adja ez a forma.



4. ábra.

AChE molekuláris formák szedimentációs sebességi profilja lénai tok szerveiben: A) agyban, B) szívben, C) vázizomban és D) májban

Megjegyzés: A szövetmintákat 12.5 mM nátrium foszfát pufferben (pH = 7.2; 1:4 arányú elegy) homogenizáltuk (Braun 853302/4 típusú potter, 800-1000 min⁻¹, 5 perc, 4 °C), amely 0.4 M NaCl-ot, 0.67 mg/ml EDTA-t és 0.5% Triton X-100-at tartalmazott. Centrifugálás után (16000 rpm, 45 perc, 4 °C, Heraeus Christ Cryofuge Nr. 8730) 200 µl felülúszóban oldottuk fel a marker enzimeket és a BSA-t, 5-20% szaharóz gradiensre rétegeztük, majd 160000 g-vel 16 órán keresztül 4 °C-on választottuk szét az egyes molekuláris formákat (Sorval Ultra Pro 80 ultracentrifuga, TH 641 rotor, 36000 rpm). Minden frakcióban vizsgáltuk a kolinészterázokat, a marker enzimek (β-galaktozidáz /EC 3.2.1.23/ 16.0S, kataláz /EC 1.11.1.6/ 11.3S és alkalikus foszfátáz /EC 3.1.3.1/ 6.1S/) aktivitását és az összfehérje mennyiségét (BSA 4.3S). A molekuláris formák arányát úgy határoztuk meg, hogy az adott csúcs területét viszonyítottuk az AChE görbe alatti teljes területéhez.

5.1.2 Ponty (*Cyprinus carpio*) kolinerg enzimeinek jellemzése

Hazánkban a legfontosabb és legismertebb hal. A dús növényzetű, lassú folyású folyókat és a kisebb-nagyobb tavakat kedveli. Különösen jól érzi magát ott, ahol iszapos a mederfenék, mivel szívesen turkál a rovarlárvákból, férgekől álló tápláléka után. Igen jól tűri az alacsony oxigén szintet (Prichard és Linsell, 1986; Wiesinger és Szabó, 1973). A számos nemesített formái közül mi az ún. nemesített tükörpontyot használtuk kísérleteinkhez.

A ponty különböző szerveiben mért kolinészteráz aktivitásokat az 6. táblázatban foglaltuk össze. A táblázat adatai alapján megállapítható, hogy a AcTCh-I hidrolízis mértéke az agyban igen magas. A szívben mért magas aktivitás jól mutatja ezen szerv kolinerg beidegzésének fontosságát. A vázizomban szintén elég magas aktivitást mértünk, amiért elsősorban a neuromusculáris junkcióban található enzimek a felelősek. A legkisebb aktivitást - függetlenül attól, hogy azt specifikus vagy szöveti aktivitásban fejeztük ki - a májban találtuk.

Ugyanakkor a fehérje tartalom (6. táblázat) - a vártak megfelelően - az izomszövetekben gazdag szervekben (szív, vázizom) a legnagyobb, míg a májban és az agyban ezen értékek kisebbek.

	SPECIFIKUS AKTIVITÁS	SZÖVETI AKTIVITÁS	FEHÉRJE TARTALOM
	mU/mg fehérje	mU/mg nedves szövet	mg/g nedves szövet
AGY	1361.2 ± 189.7	23.5 ± 2.7	17.3 ± 0.9
SZÍV	575.0 ± 36.3	14.8 ± 0.7	25.8 ± 1.0
VÁZIZOM	146.5 ± 21.8	9.7 ± 1.8	65.7 ± 3.5
MÁJ	126.5 ± 22.7	2.7 ± 0.4	21.2 ± 1.0

6. táblázat Kolinészterázok AcTCh-I-dal mért aktivitásai és a fehérje tartalom ponty szerveiben

Megjegyzés: Az aktivitások 6 halból származó mérés átlagát (± S.D.) tükrözik. A kísérleti körülményeket lásd az "Anyagok és módszerek" című fejezetben.

	AcTCh-I HIDROLÍZIS	BuTCh-I HIDROLÍZIS	AcTCh-I HIDROLÍZIS 10 ⁻⁵ mM ETHOPROPAZIN GÁTLÓSZEREK JELENLÉTÉBEN	BuTCh-I HIDROLÍZIS 10 ⁻⁴ mM NEOSTIGMIN GÁTLÓSZEREK JELENLÉTÉBEN
	GÁTLÓSZEREK NÉLKÜL (%)		GÁTLÓSZEREK JELENLÉTÉBEN (%)	
AGY	96.5 ± 3.5	3.5 ± 3.5	99.8 ± 0.2	0.2 ± 0.2
SZÍV	92.3 ± 2.8	7.7 ± 2.8	98.6 ± 0.9	1.4 ± 0.9
VÁZIZOM	90.4 ± 2.3	9.6 ± 2.3	98.8 ± 0.6	1.2 ± 0.6
MÁJ	91.4 ± 3.5	8.6 ± 3.5	93.9 ± 6.7	6.1 ± 6.7

7. táblázat Kolinészterázok specifikus aktivitásainak százalékos megoszlása ponty különböző szerveiben specifikus gátlószerek jelenlétében és hiányában.

Megjegyzés: Az értékeket a két szubsztráttal mért aktivitások összegének százalékában adtuk meg. Az értékek 4 halból származó mérés átlagát (± S.D.) tükrözik. A kísérleti körülményeket lásd az "Anyagok és módszerek" című fejezetben.

A 7. táblázatból kitűnik, hogy a ponty szervei gyakorlatilag csak AChE-t tartalmaznak. A máj kivételével - ahol a mért értékekből BuChE jelenlétét feltételezhetjük - a BuChE aktivitása elhanyagolható. Sajnos azonban ezen kísérletsorozat nem ad egyértelmű választ a BuChE jelenlétére a májban. Az sem zárható ki, hogy ez a látszólagos BuChE aktivitás a májban esetleg nagyobb aktivitással rendelkező egyéb észterázoktól származik. A BuChE jelenlétére egyértelmű bizonyítékot az enzim szintéziséért felelős génről íródó mRNS szolgáltatna. Ugyanakkor a táblázat adatai jól szemléltetik, hogy a másik három szervnél a gátlószer jelenléte nélkül mért BuTCh-I hidrolízis igazából az AChE tartalomnak köszönhető, hiszen specifikus AChE inhibitor mellett csak minimális BuTCh-I aktivitás mérhető.

A 8. táblázat só- illetve detergens-oldható AChE formák eloszlását mutatja különböző szervekben százalékban kifejezve. A ponty szerveiben található AChE enzimekről elmondható, hogy főleg só-oldható formákat tartalmaznak. Ez alól kivételt képez az agy, ahol a detergens-oldható formák a dominánsak. Érdekes azért megjegyezni, hogy a só-oldható formák aránya a szív-vázizom-máj sorrendben fokozatosan csökken. Míg a szívben a detergens-oldható formák csak az egynolcadát teszik ki az összes formának, addig a vázizomszövetben már az egynegyedét és végül a májban közel az egyharmadát adják ezen formák az összes formáknak.

	SÓ-OLDHATÓ FORMÁK (%)	DETERGENS-OLDHATÓ FORMÁK (%)
AGY	17.5 ± 1.2	82.5 ± 1.2
SZÍV	88.0 ± 2.0	12.0 ± 2.0
VÁZIZOM	71.7 ± 3.8	28.3 ± 3.8
MÁJ	69.3 ± 3.0	30.7 ± 3.0

8. táblázat A só-oldható- és detergens-oldható formák százalékos megoszlása a ponty különböző szerveiben.

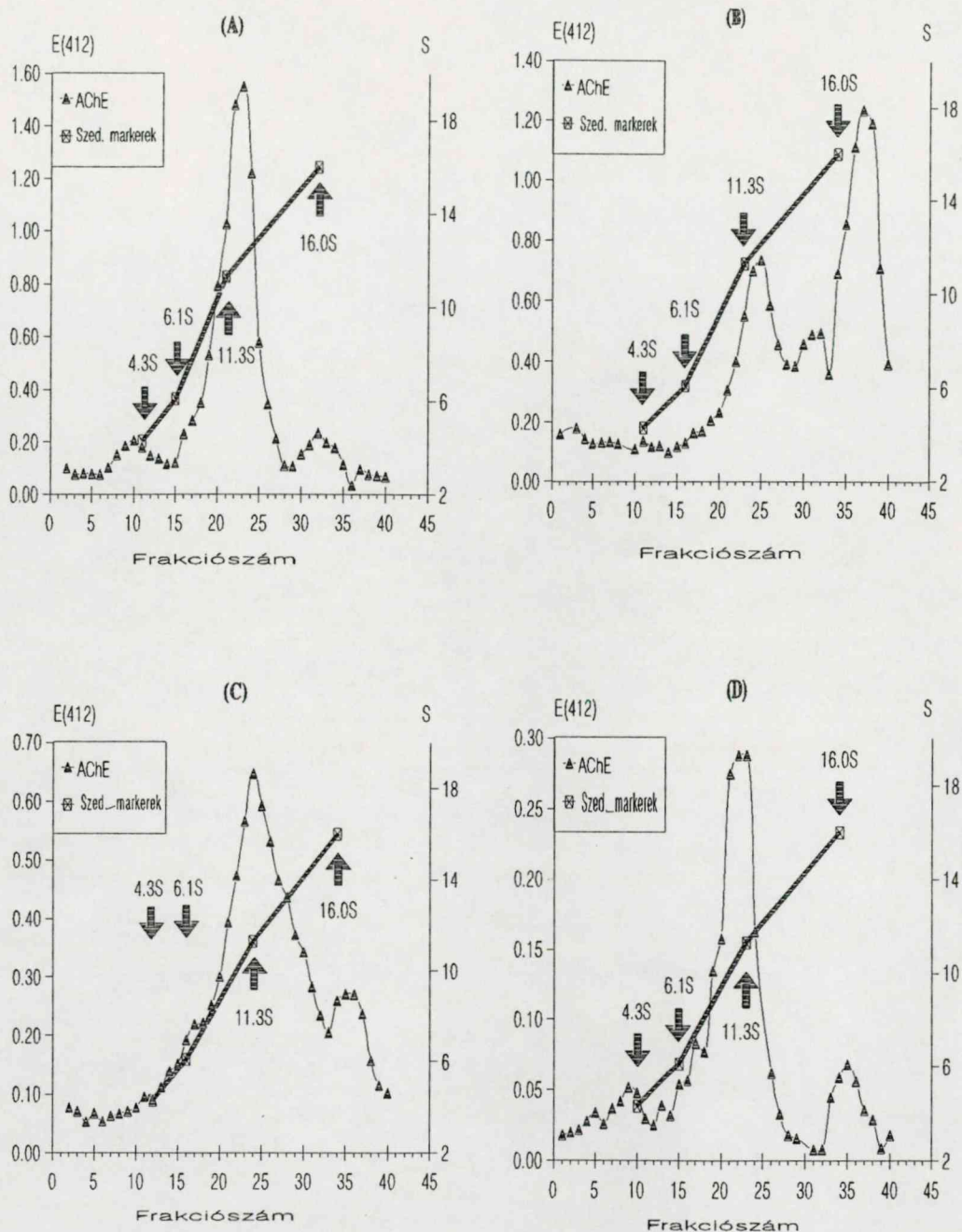
Megjegyzés: Az értékeket a teljes AChE aktivitás százalékában adtuk meg. Az értékek 6 halból származó mérés átlagát (± S.D.) tükrözik. A kísérleti körülményeket lásd az "Anyagok és módszerek" című fejezetben.

	AChE MOLEKULÁRIS FORMÁK (%)		
	G1	G4 és/vagy A4	A12
AGY	7.1 ± 4.4	83.7 ± 5.9	9.2 ± 3.8
SZÍV	-	42.0 ± 2.0	58.0 ± 2.5
VÁZIZOM	-	84.5 ± 2.7	15.5 ± 3.6
MÁJ	12.3 ± 3.1	77.3 ± 4.5	10.4 ± 3.7

9. táblázat Az AChE enzim molekuláris formáinak megoszlása a ponty különböző szerveiben.

Megjegyzés: Az értékeket az összes molekuláris forma százalékában adtuk meg. Az értékek 4 halból származó mérés átlagát (± S.D.) tükrözik. A kísérleti körülményeket lásd az "Anyagok és módszerek" című fejezetben.

A molekuláris formamintázatról elmondható, hogy a ponty szerveiben elsősorban a G4/A4 formák a dominánsak (9. táblázat, 5. ábra). Ez alól kivételt képez a szív, melyben - ha nem is nagy mértékben - több A12 forma található, mint A4/G4. Az agyban és a májban a két említett forma mellett még a legkisebb G1 forma is kimutatható, ugyanakkor az izomtípusú szövetekben ezt a formát nem sikerült kimutatni.



5. ábra AChE molekuláris formák szedimentációs sebességi profilja ponty szerveiben:
A) agyban, B) szívben, C) vázizomban és D) májban
Megjegyzés: A kísérleti körülményeket lásd az "Anyagok és módszerek" című fejezetben

5.1.3 Fehér busa (*Hypophthalmichthys molitrix*) kolinerg enzimeinek jellemzése

Hazánkba - az amurral (*Ctenopharyngodon idella*) együtt - Kínából telepítették be, hogy megakadályozza tavaink elalgásodását. Külsőre egyetlen hazai halunkhoz sem hasonlít, mert szemei rendkívül alacsony fekvésűek. Növényevő, bár az ivadékok kezdetben planktonrákokat és kerekeshétfőket fogyasztanak (Prichard és Linsell, 1986; Wiesinger és Szabó, 1973).

A busa különböző szerveiben mért kolinészteráz aktivitásokat a 10. táblázatban foglaltuk össze. A táblázatból adatai szerint az aktivitások az agyban - a többi szervhez viszonyítva - kiemelkedően magas. Sorrendben a két izomtípusú szövet következik. Specifikus aktivitásban jelentős különbség mutatkozik a két szerv között. A szívben lényegesen magasabb aktivitást mértünk, mint a vázizomban. Ugyanakkor ez a különbség nem mutatkozik meg a szöveti aktivitás szintjén. A specifikus aktivitásban megmutatkozó különbség elsődleges oka a vázizom - szívizomhoz viszonyított - magas fehérje tartalma. A legkisebb aktivitásokat e hal esetében is a májban mértük.

	SPECIFIKUS AKTIVITÁS	SZÖVETI AKTIVITÁS	FEHÉRJE TARTALOM
	mU/mg fehérje	mU/mg nedves szövet	mg/g nedves szövet
AGY	393.9 ± 153.0	15.3 ± 7.0	38.0 ± 2.1
SZÍV	136.9 ± 8.9	7.5 ± 1.3	54.3 ± 7.0
VÁZIZOM	75.2 ± 8.0	7.2 ± 2.1	96.5 ± 3.2
MÁJ	25.3 ± 1.9	1.8 ± 0.1	71.7 ± 1.4

10. táblázat Kolinészterázok AcTCh-I-dal mért aktivitásai és a fehérje tartalom fehér busa szerveiben

Megjegyzés: Az aktivitások 6 halból származó mérés átlagát (± S.D.) tükrözik. A kísérleti körülményeket lásd az "Anyagok és módszerek" című fejezetben.

A 11. táblázatból kitűnik, hogy a ponty szerveihez hasonlóan a busa szervei is gyakorlatilag csak AChE-t tartalmaznak, a BuChE aktivitása elhanyagolható. A májban mért 6%-os látszólagos BuChE aktivitásra ugyanaz a magyarázat adható, mint amit a ponty estén már megemlítettünk. A másik három szervben a gátlószer jelenléte nélkül mért BuTCh-I hidrolízis igazából ezen a halfajban is az AChE tartalomnak köszönhető, hiszen specifikus AChE inhibitor mellett csak minimális BuTCh-I aktivitás mérhető.

	AcTCh-I HIDROLÍZIS	BuTCh-I HIDROLÍZIS	AcTCh-I HIDROLÍZIS 10 ⁻⁵ mM ETHOPROPAZIN GÁTLÓSZEREK JELENLÉTÉBEN	BuTCh-I HIDROLÍZIS 10 ⁻⁴ mM NEOSTIGMIN GÁTLÓSZEREK JELENLÉTÉBEN
	GÁTLÓSZEREK NÉLKÜL (%)		(%)	
AGY	99.1 ± 0.2	0.9 ± 0.2	99.9 ± 0.1	0.1 ± 0.1
SZÍV	94.4 ± 0.5	5.6 ± 0.5	99.3 ± 0.3	0.7 ± 0.3
VÁZIZOM	66.7 ± 3.1	33.3 ± 3.1	98.6 ± 0.8	1.4 ± 0.8
MÁJ	72.2 ± 2.2	27.8 ± 2.2	93.8 ± 1.8	6.2 ± 1.8

11. táblázat Kolinészterázok specifikus aktivitásainak százalékos megoszlása fehér busa különböző szerveiben specifikus gátlószerek jelenlétében és hiányában.

Megjegyzés: Az értékeket a két szubsztráttal mért aktivitások összegének százalékában adtuk meg. Az értékek 4 halból származó mérés átlagát (± S.D.) tükrözik. A kísérleti körülményeket lásd az "Anyagok és módszerek" című fejezetben.

A fehér busa szerveiben található AChE enzim só- illetve detergens-oldható formáinak eloszlását a 12. táblázat mutatja.

	SÓ-OLDHATÓ FORMÁK (%)	DETERGENS-OLDHATÓ FORMÁK (%)
AGY	29.6 ± 4.1	70.4 ± 4.1
SZÍV	70.6 ± 2.5	29.4 ± 2.5
VÁZIZOM	58.7 ± 0.4	41.3 ± 0.4
MÁJ	48.8 ± 3.3	51.2 ± 3.3

12. táblázat A só-oldható- és detergens-oldható formák százalékos megoszlása fehér busa különböző szerveiben.

Megjegyzés: Az értékeket a teljes AChE aktivitás százalékában adtuk meg. Az értékek 6 halból származó mérés átlagát (± S.D.) tükrözik. A kísérleti körülményeket lásd az "Anyagok és módszerek" című fejezetben.

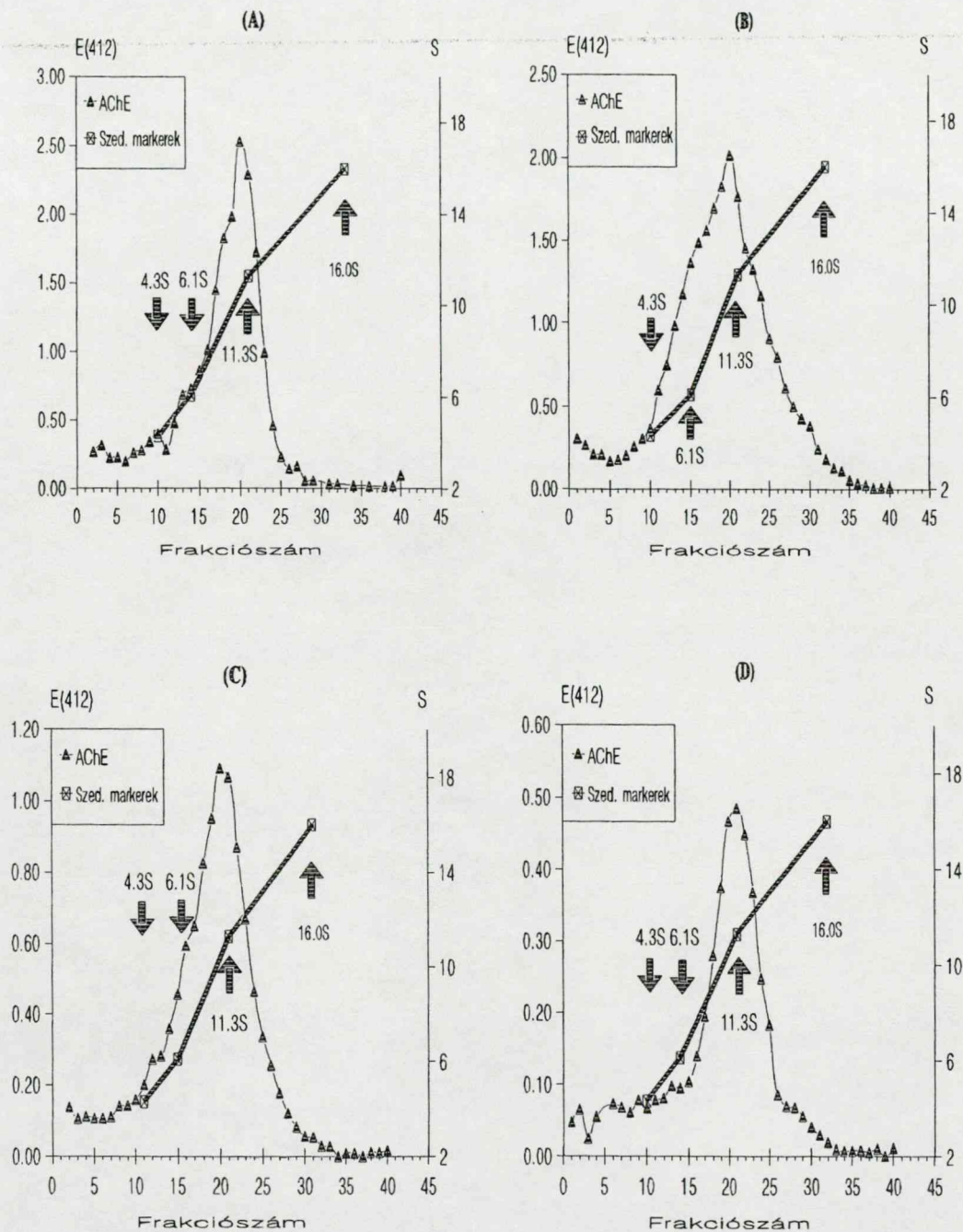
A fehér busa szerveiben található AChE enzimekről elmondható, hogy míg az agy főleg detergens-oldható formákat tartalmaz, addig a szív-, illetve a vázizom szövetekben elsősorban a só-oldható formák dominálnak. Míg ez a dominancia egyértelmű a szív esetében, addig ez kevésbé érvényes a vázizomra, ahol a detergens-oldható formák aránya meghaladja a 40%-ot. A májban a két különböző oldékonyságú formák aránya gyakorlatilag megegyezik.

AChE MOLEKULÁRIS FORMÁK (%)			
	G1	G4 és/vagy A4	A12
AGY	4.9 ± 6.9	95.1 ± 6.9	-
SZÍV	-	100.0 ± 0.0	-
VÁZIZOM	-	100.0 ± 0.0	-
MÁJ	8.1 ± 11.5	91.9 ± 10.5	-

13. táblázat Az AChE enzim molekuláris formáinak megoszlása a fehér busa különböző szerveiben.

Megjegyzés: Az értékeket az összes molekuláris forma százalékában adtuk meg. Az értékek 4 halból származó mérés átlagát ($\pm$ S.D.) tükrözik. A kísérleti körülményeket lásd az "Anyagok és módszerek" című fejezetben.

Analizálva a 13. táblázat értékeit és a 6. ábra grafikonjait szembe tűnik a G4/A4 formák abszolút dominanciája. A két izom típusú szövet kizárólag csak ezeket a formákat tartalmazza. Az agyban és májban - kis mértékben ugyan -, de a legkisebb formák, a G1 formák is elkülöníthetőek. Ugyanakkor a legösszetettebb A12 formát egyik szervben sem sikerült detektálnunk, ami merőben szokatlan jelenség.



6. ábra AChE molekuláris formák szedimentációs sebességi profilja fehér busa szerveiben: A) agyban, B) szívben, C) vázizomban és D) májban

Megjegyzés: A kísérleti körülményeket lásd az "Anyagok és módszerek" című fejezetben

5.1.4 Az angolna (*Anguilla anguilla*) kolinerg enzimeinek jellemzése

Az egyik legérdekesebb életmódú halfajként tartja számon a szakirodalom. Az angolnák az Atlanti óceán nyugati medencéjében, a Sargasso tengerben ívnak. Innen kezdik meg az ivadékok hosszú, 3-4 évig tartó vándorlásukat az európai partok felé. Vándorlásuk során jelentős, több stádiumból álló morfológiai változáson mennek át. Elérve az európai partokat, megindulnak a folyókon felfelé. Herman Ottó már a múlt században leírta ezt a halfajt a Balatonban. Mivel a Balatonnak akkor sem volt közvetlen vízfolyási kapcsolata az Atlanti óceánnal, ezért nagy valószínűséggel a vizeket elhagyva nyirkos, sáros, füves talajon tekergőzve juttottak el a Balatonig. A jelenlegi állományokat azonban természetesen úgy telepítették be a hazai tavakba, holtágakba. A tavakban, folyókban élő angolnák rovarlárvákkal, halivadékokkal táplálkoznak. Az ivaréretté válás során az angolnák szervezete jelentősen megváltozik, mintegy felkészülnek a hosszú visszaútra az óceánon keresztül a Sargasso tengerig (Prichard és Linsell, 1986; Wiesinger és Szabó, 1973).

Az angolna szerveiben mért kolinészteráz aktivitások és fehérje tartalmának értékeit a 14. táblázat mutatja be.

	SPECIFIKUS AKTIVITÁS	SZÖVETI AKTIVITÁS	FEHÉRJE TARTALOM
	mU/mg fehérje	mU/mg nedves szövet	mg/g nedves szövet
AGY	308.8 ± 22.7	10.6 ± 1.0	34.7 ± 4.8
SZÍV	81.0 ± 4.3	4.1 ± 0.2	51.0 ± 1.3
VÁZIZOM	143.7 ± 18.7	9.5 ± 1.5	65.7 ± 3.3
MÁJ	37.3 ± 8.4	2.0 ± 1.7	46.0 ± 2.5

14. táblázat Kolinészterázok AcTCh-I-dal mért aktivitásai és fehérje tartalom angolna szerveiben.

Megjegyzés: Az aktivitások 6 halból származó mérés átlagát (± S.D.) tükrözik. A kísérleti körülményeket lásd az "Anyagok és módszerek" című fejezetben.

Az angolnák esetében is az agy AcTCh-I hidrolízis aktivitása a legnagyobb a vizsgált szervek közül, függetlenül attól, hogy specifikus vagy szöveti aktivitást számolunk. Ugyanakkor a második legnagyobb aktivitást a vázizomban tapasztaltuk. Itt a szöveti aktivitás jelentősen megközelíti az agyét. Ez nem meglepő, ha meggondoljuk, hogy az angolna testtömegének 90%-át a vázizom adja. A vázizomszövet beidegzése meglehetősen specifikus az angolna

esetében. Igen jelentős szerepet játszanak a gerincdúcokból kiinduló és oda visszatérő afferens és efferens rostok. Ezt igazolja az a csak angolnáknál tapasztalt jelenség, hogy az állatot dekapitálva a törzs még sokáig képes a tekergőző mozgást fenntartani. Lényegesen kisebb aktivitást mértünk a szívben, bár a mért aktivitás itt is reprezentálja a kolinerg beidegzés jelentőségét.

	AcTCh-I HIDROLÍZIS	BuTCh-I HIDROLÍZIS	AcTCh-I HIDROLÍZIS 10 ⁻⁵ mM ETHOPROPAZIN GÁTLÓSZERKEK NÉLKÜL	BuTCh-I HIDROLÍZIS 10 ⁻⁴ mM NEOSTIGMIN JELENLÉTÉBEN
	GÁTLÓSZERKEK NÉLKÜL (%)		GÁTLÓSZERKEK JELENLÉTÉBEN (%)	
AGY	96.5 ± 3.9	3.5 ± 3.9	99.8 ± 0.2	0.2 ± 0.2
SZÍV	92.3 ± 2.8	7.7 ± 2.8	98.7 ± 0.9	1.3 ± 0.9
VÁZIZOM	90.4 ± 2.3	9.6 ± 2.3	98.8 ± 0.6	1.2 ± 0.6
MÁJ	88.2 ± 7.5	11.8 ± 7.5	96.7 ± 1.4	3.3 ± 1.4

15. táblázat Kolinészterázok specifikus aktivitásainak százalékos megoszlása angolna különböző szerveiben specifikus gátlószerek jelenlétében és hiányában.

Megjegyzés: Az értékeket a két szubsztráttal mért aktivitások összegének százalékában adtuk meg. Az értékek 4 halból származó mérés átlagát (± S.D.) tükrözik. A kísérleti körülményeket lásd az "Anyagok és módszerek" című fejezetben.

A 15. táblázat adatai szerint az angolna szerveiben BuChE, vagy számottevő aspecifikus észteráz aktivitással gyakorlatilag nem számottevő. Így tehát nyugodt szívvel kijelenthetjük, hogy a 14. táblázatban szereplő aktivitás adatok elsősorban a valós AChE aktivitásoknak felelnek meg, más enzimek aktivitás értékeit nem tartalmazzák.

Az angolna szerveiben található AChE enzim só- illetve detergens-oldható formáinak megoszlását a 16. táblázat szemlélteti.

Általánosságban elmondható, hogy az angolna szervei a detergens-oldható AChE formákból tartalmazznak többet. Ez különösen igaz az agyra, ahol ezen formák aránya meghaladja a 82%-ot. Bár kisebb mértékben, de a vázizomban is a detergens formák aránya a nagyobb. Ugyanakkor a májban a nevezett formák aránya nem sokkal haladja meg az 50%-ot, tehát dominanciáról ebben az esetben nem beszélhetünk. A szívben, az eddig taglalt szervekkel ellentétben, némileg több só-oldható forma található, mint detergens-oldható. Ez a különbség azonban nem igazán jelentős.

	SÓ-OLDHATÓ FORMÁK (%)	DETERGENS-OLDHATÓ FORMÁK (%)
AGY	17.8 ± 0.9	82.2 ± 0.9
SZÍV	53.3 ± 8.9	46.7 ± 8.9
VÁZIZOM	35.6 ± 0.7	64.4 ± 0.7
MÁJ	44.2 ± 6.5	55.8 ± 6.5

16. táblázat A só-oldható- és detergens-oldható formák százalékos megoszlása az angolna különböző szerveiben.

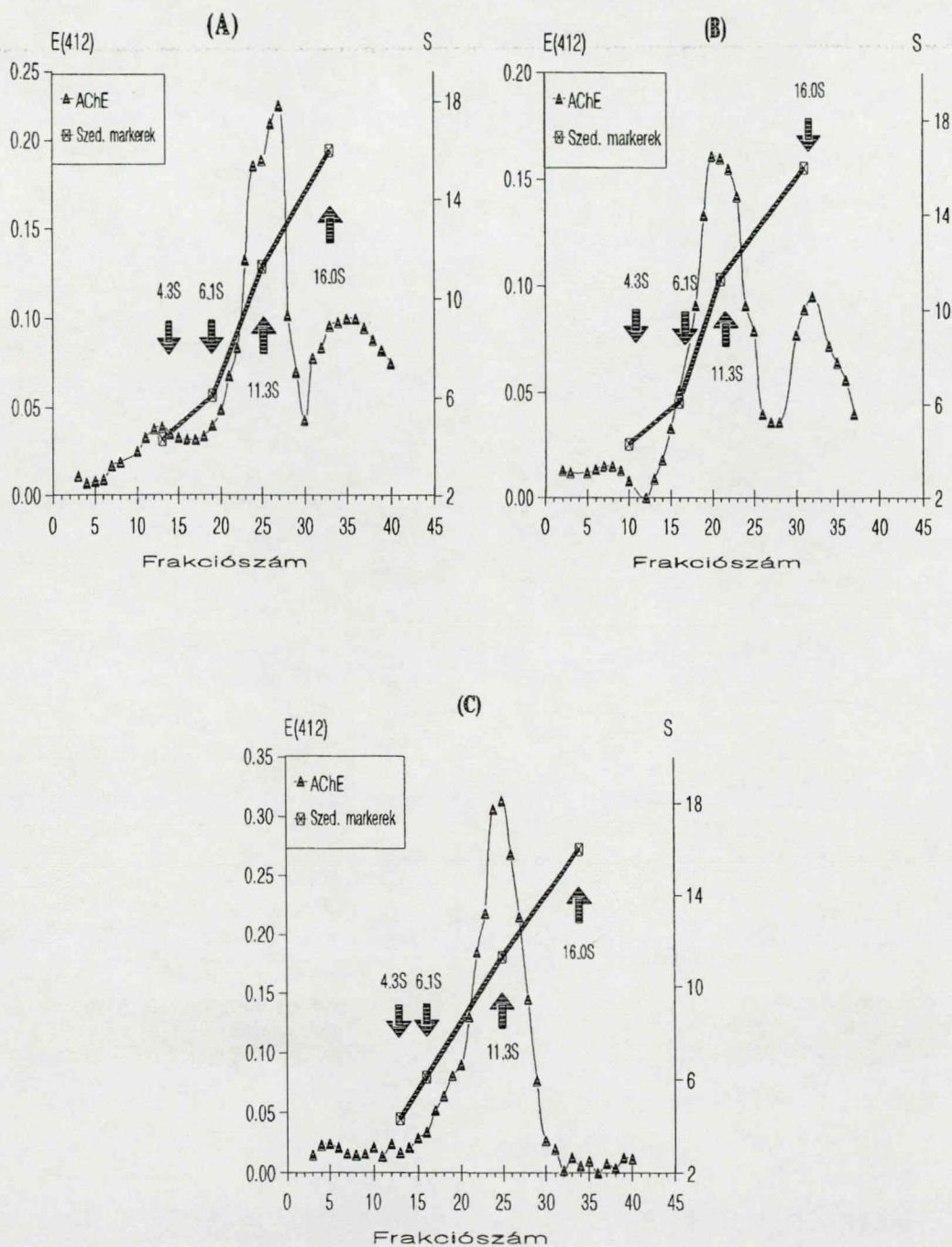
Megjegyzés: Az értékeket a teljes AChE aktivitás százalékában adtuk meg. Az értékek 6 halból származó mérés átlagát (± S.D.) tükrözik. A kísérleti körülményeket lásd az "Anyagok és módszerek" című fejezetben.

AChE MOLEKULÁRIS FORMÁK (%)			
	G1	G4 és/vagy A4	A12
AGY	5.1 ± 7.2	67.3 ± 14.8	27.6 ± 7.6
SZÍV	4.6 ± 2.3	67.8 ± 0.7	27.6 ± 1.6
VÁZIZOM	-	96.1 ± 5.6	3.9 ± 5.6

17. táblázat. Az AChE enzim molekuláris formáinak megoszlása az angolna különböző szerveiben.

Megjegyzés: Az értékeket az összes molekuláris forma százalékában adtuk meg. Az értékek 4 halból származó mérés átlagát (± S.D.) tükrözik. A kísérleti körülményeket lásd az "Anyagok és módszerek" című fejezetben.

Az elkülöníthető formák közül az angolna szervei túlnyomó többségben a G4/A4 formát tartalmazzák (17. táblázat és 7. ábra). E mellett azonban jelentős mennyiségű A12 forma is megfigyelhető. Az agyban és a szívben e forma teszi ki az összes forma több, mint a negyedét. A vázizomban, bár jelen van az A12 forma, de meglehetősen kis mennyiségben. Az agyban és a szívben - kis mennyiségben ugyan -, de G1 formát is sikerült kimutatnunk. Sajnos a májban az AChE térfogati aktivitása nem volt elegendő ahhoz, hogy a molekuláris formákat a szacharóz gradiensen ultracentrifugálással történt elválasztással detektálni tudjuk.



7. ábra AChE molekuláris formák szedimentációs sebességi profilja angolna szerveiben:
A) agyban, B) szívben és C) vázizomban
Megjegyzés: A kísérleti körülményeket lásd az "Anyagok és módszerek" című fejezetben

5.1.5 A lesőharcsa (*Silurus glanis*) kolinerg enzimeinek jellemzése

Hazánk őshonos ragadozó halfaja. Vizeink legnagyobb testű hala (nem számítva az elvétve a Dunán feltévedő vizákat). Nem ritkák a két méteres, 60-80 kg-os példányok sem. Lassú folyású folyókat, iszapos fenekű tavakat kedveli. Éjszakai ragadozó, halakat, békákat és ebihalakat, alkalom adtán kis víziemlősöket is elnyel (Prichard és Linsell, 1986; Wiesinger és Szabó, 1973).

A lesőharcsa különböző szerveiben mért kolinészteráz aktivitásokat a 18. táblázatban foglaltuk össze.

	SPECIFIKUS AKTIVITÁS	SZÖVETI AKTIVITÁS	FEHÉRJE TARTALOM
	mU/mg fehérje	mU/mg nedves szövet	mg/g nedves szövet
AGY	467.8 ± 36.2	21.6 ± 2.9	45.9 ± 2.9
SZÍV	26.2 ± 7.5	1.2 ± 0.3	55.8 ± 2.0
VÁZIZOM	149.0 ± 31.4	11.4 ± 2.6	89.1 ± 8.9
MÁJ	64.6 ± 13.4	4.5 ± 0.5	71.1 ± 1.4

18. táblázat Kolinészterázok AcTCh-I-dal mért aktivitásai és a fehérje tartalom lesőharcsa szerveiben.

Megjegyzés: Az aktivitások 6 halból származó mérés átlagát (± S.D.) tükrözik. A kísérleti körülményeket lásd az "Anyagok és módszerek" című fejezetben.

A lesőharcsa esetében is az agy AcTCh-I hidrolízis sebessége jelentősen meghaladja a többi szervben mért értékeket. Számottevő aktivitást lehetett detektálni a vázizomban. Jelentősen kisebb aktivitás mérhető a májban. A szívben mért alacsony aktivitás igen meglepő, hisz eddigi tapasztalataink szerint általában a szív viszonylag magas AcTCh-I hidrolitikus aktivitással rendelkezik, amit a kolinerg beidegzés magyaráz.

	AChTCh-I HIDROLÍZIS	BuTCh-I HIDROLÍZIS	AcTCh-I HIDROLÍZIS 10 ⁻⁵ mM ETHOPROPAZIN GÁTLÓSZEREK JELENLÉTÉBEN	BuTCh-I HIDROLÍZIS 10 ⁻⁴ mM NEOSTIGMIN GÁTLÓSZEREK JELENLÉTÉBEN
	GÁTLÓSZEREK NÉLKÜL (%)		GÁTLÓSZEREK JELENLÉTÉBEN (%)	
AGY	98.3 ± 0.6	1.7 ± 0.6	99.8 ± 0.11	0.2 ± 0.11
SZÍV	60.5 ± 3.2	39.5 ± 3.2	76.9 ± 3.7	23.1 ± 3.7
VÁZIZOM	93.1 ± 2.7	6.9 ± 2.7	98.4 ± 0.9	1.6 ± 0.9
MÁJ	92.5 ± 2.5	7.5 ± 2.5	98.0 ± 0.7	2.0 ± 0.7

19. táblázat Kolinészterázok specifikus aktivitásainak százalékos megoszlása a leső-harcsa különböző szerveiben specifikus gátlószerek jelenlétében és hiányában.

Megjegyzés: Az értékeket a két szubsztráttal mért aktivitások összegének százalékában adtuk meg. Az értékek 4 halból származó mérés átlagát (± S.D.) tükrözik. A kísérleti körülményeket lásd az "Anyagok és módszerek" című fejezetben.

A 19. táblázat adatai szerint a lesőharcsa szerveiben - a szív kivételével - gyakorlatilag csak AChE található. Az AChE gátlószer jelenlétében mért minimális BuTCh-I hidrolízis nagy valószínűséggel az AChE szívárgó aktivitásának köszönhető. Így az előző táblázatban feltüntetett aktivitások - a szív kivételével - kizárólagosan az AChE-nak tulajdoníthatók. Más a helyzet azonban a szívben. Méréseink alapján úgy tűnik, hogy az AChE mellett jelentős BuChE aktivitással is számolni kell, mivel nem valószínű, hogy ilyen magas arányban aspecifikus észterázok lennének jelen a szívben. Ezt támasztja alá az a tény is, hogy a két gátlószer együttes jelenlétében nem tapasztaltunk BuTCh-I hidrolízist. Mindenesetre érdekes, hogy az eddig vizsgált halakfajok szerveiben egyedül itt találunk jelentős mértékű BuChE aktivitásra utaló nyomokat.

A lesőharcsa szerveiben található AChE enzimekről elmondható, hogy szervenként eltérő arányban tartalmazzák a só-, illetve detergens-oldható főmákat (20. táblázat). Az agyban és a májban a detergens-oldható formák a dominánsak. Mindkét szervben a detergens-oldható formák adják az összes forma háromnegyedét. A vázizomban némileg a só-oldható formákból van több, míg a szívben a különböző oldhatóságú formák aránya gyakorlatilag megegyezik.

	SÓ-OLDHATÓ FORMÁK (%)	DETERGENS-OLDHATÓ FORMÁK (%)
AGY	25.1 ± 2.9	74.9 ± 2.9
SZÍV	48.7 ± 2.3	51.3 ± 2.3
VÁZIZOM	54.2 ± 4.7	45.8 ± 4.7
MÁJ	23.1 ± 1.3	76.9 ± 1.3

20. táblázat A só-oldható- és detergens-oldható formák százalékos megoszlása a lesőharcsa különböző szerveiben.

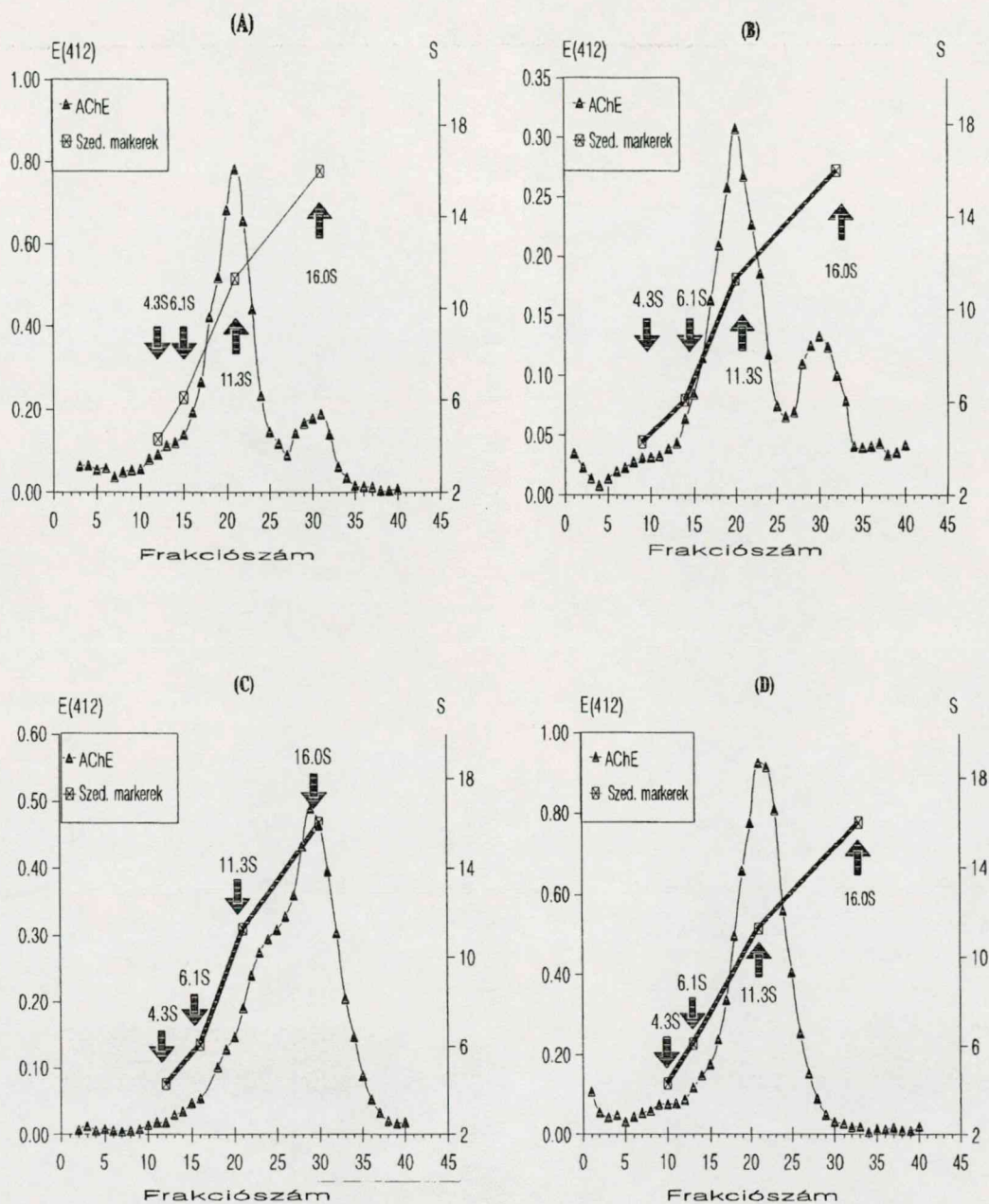
Megjegyzés: Az értékeket a teljes AChE aktivitás százalékában adtuk meg. Az értékek 6 halból származó mérés átlagát (± S.D.) tükrözik. A kísérleti körülményeket lásd az "Anyagok és módszerek" című fejezetben.

	AChE MOLEKULÁRIS FORMÁK (%)		
	G1	G4 és/vagy A4	A12
AGY	-	81.3 ± 1.5	18.7 ± 1.5
SZÍV	-	77.3 ± 4.0	22.7 ± 4.0
VÁZIZOM	-	-	100.0 ± 0.0
MÁJ	-	100.0 ± 0.0	-

21. táblázat Az AChE enzim molekuláris formáinak megoszlása a lesőharcsa különböző szerveiben.

Megjegyzés: Az értékeket az összes molekuláris forma százalékában adtuk meg. Az értékek 4 halból származó mérés átlagát (± S.D.) tükrözik. A kísérleti körülményeket lásd az "Anyagok és módszerek" című fejezetben.

A molekuláris forma mintázatot vizsgálva meglepő eredményt kaptunk: a lesőharcsa egyik szervében sem sikerült kimutatni az AChE magasabb asszociáltságú formáinak alapjául szolgáló G1 formát (21. táblázat és 8. ábra). Ugyanakkor a többi magasabb asszociáltságú forma igen magas arányban képviselteti magát. A májban a G4/A4 forma, míg a vázizomban az A12 forma az egyeduralkodó, de a szív és az agy is jelentős mértékben tartalmazza mindkét formát.



8. ábra AChE molekuláris formák szedimentációs sebességi profilja lesóharcsa szerveiben: A) agyban, B) szívben, C) vázizomban és D) májban
 Megjegyzés: A kísérleti körülményeket lásd az "Anyagok és módszerek" című fejezetben

5.1.6 Összehasonlító értékelés

Ezen fejezetben belül öt hazai halfaj kolinerg enzimeit jellemeztük. Vizsgáltuk aktivitásukat, megoszlásukat, molekuláris formájuk mintázatát különböző szervekben. A halfajok kiválasztásánál a különböző életmód és az eltérő evolúciós fejlettség volt a mérvadó.

Megállapítható, hogy az öt halfaj közül a ponty szerveiben detektáltuk a legnagyobb aktivitásokat. Ez alól kivételt képez a vázizom, ugyanis a harcsa vázizmában mért aktivitások némileg felülmúlják a pontyét. A legkisebb aktivitásokat az evolúciósan legfejletlenebb lénai tok szöveteiben mértük. Természetesen mind az öt halfajnál az agyban találtuk a legnagyobb aktivitást, bár ezek az aktivitások meglehetősen különbözőek voltak a halfajokban, mint ahogy azt már mások is megfigyelték (Gant és mtsai, 1984; Bocquene és mtsai, 1990; Szabó és mtsai, 1991). Három esetben (lénai tok, ponty és busa) a szívben mértük a második legnagyobb aktivitást, mely jól jelzi e szerv kolinerg beidegzésének fontosságát. Ugyanis a szívfrekvencia és a pitvari összehúzódás erőssége a kolinerg vagus egy kardiális ágának kontrollja alatt áll (Laurent és mtsai, 1983). Ugyanakkor a harcsa és az angolna vázizmában magasabb aktivitást mértünk, mint a szívben. Talán ez összefüggésbe hozható életmódjukkal. E két halfaj általában ragadozó életmódot folytat, ezért szükségük van arra, hogy támadáskor hirtelen gyors helyzetváltoztató mozgást végezzenek, amihez nagy és összehangolt izomerő szükséges. Ez pedig nem képzelhető el magas mérvű idegi aktivitás nélkül. Ugyanakkor a másik három halfaj egyedei növényevő, iszaptúró életmódot folytatnak, tehát szervezetük az állandó, de lassú mozgásra van berendezkedve, ami nem igényel nagy mérvű idegi szabályozást. A legkisebb aktivitás - a harcsa kivételével - a májban található, ami nem meglepő. Ugyanakkor arra is találunk példát a szakirodalomban, hogy a májban mért aktivitás meghaladja a szívben mértet (Gant és mtsai, 1984), mint például az általunk tanulmányozott harcsa esetében.

A kolinerg enzimek minőségének megállapítására tett kísérleteink eredményeiből megállapítható, hogy a vizsgált halfajok szerveiben csak AChE található. Ez az eredmény egyébként jól összecseng a szakirodalomban olvasható általános nézettel, mely szerint a halak szervei általában nem tartalmaznak BuChE-t (Szabó és mtsai, 1991). Ez alól talán a lesőharcsa szíve lehet a kivétel, ahol BuChE jelenlétére utaló jeleket találtunk.

A só- és detergens-oldható formákról meglehetősen nehéz általános konklúziót levonni, hisz meglehetősen változatos képet mutatnak az öt halfaj szervei. Általánosságban azért elmondható, hogy mind az öt halfaj agyában a detergens-oldható formák vannak túlsúlyban, ami összhangban van a szakirodalomban található adatokkal (Rakonczay és mtsai, 1981). A lénai tok, ponty és a fehér busa szívében a só-oldható formákból találunk többet, míg a két ragadozó halfaj szívében a két különböző oldhatósági formák aránya nagyjából megegyezik. A vizsgált halfajok vázizmában - az angolna kivételével - szintén a só-oldható formák vannak túlsúlyban, igaz a harcsa esetében e formák aránya nem sokkal múlja felül a detergens-oldható formák arányát. Ezen eredményeink hitelességét támasztja alá az a tény is, hogy mások is hasonló konklúzióra jutottak más fajokon végzett kísérletek eredményeiből (Massoulié és Bon,

1982; Guillon és Massoulié, 1976). A máj általában szintén a só-oldható formákból tartalmaz többet. Ez kifejezetten igaz a lénai tok és a ponty esetére. A busa májában egyenlő arányban található a két forma. A két ragadozó halfaj esetében a májban is a detergens-oldható formákból van némileg több.

A molekuláris formákat elemezve megállapíthatjuk, hogy a szervek túlnyomó többsége a G4/A4 formából tartalmaz a legtöbbet. Ugyanakkor az is figyelemre méltó, hogy a harcsában G1 formát, míg a busában A12 formát nem találtunk. Viszont kifejezetten sok G1 formát tartalmaznak a lénai tok szervei.

Megállapítható, hogy a lénai tok agyában a G4/A4 forma mellett jelentős mennyiségben szerepel G1 forma is. Ezzel szemben ezen forma aránya nem számottevő az angolna és a harcsa esetében, ahol inkább az A12 forma jelentőségét kell hangsúlyoznunk. Ez az eredmény ellentmondásban áll Nyquist-Battie és mtsai (1989) emlősnél kapott eredményeivel, mely szerint az agyból teljesen hiányzik az A12 forma. Ugyanakkor mások is beszámoltak arról, hogy a filogenetikailag fejletlenebb állatoknál, mint például a halaknál magas arányban találunk asszimetrikus formát (Massoulié és Bon, 1982; Chatonnet és Lockridge, 1989; Nemcsók és mtsai, 1990).

Vizsgálva a különböző halfajok szívében található AChE molekuláris formáinak eloszlását, megállapíthatjuk, hogy itt is túlnyomó többségben a G4/A4 formák vannak túlsúlyban. Ez különösen igaz a busa szívére, mely kizárólag csak ezt a formát tartalmazza. Ugyanakkor a ponty szíve mégsem ebből a formából tartalmaz a legtöbbet, hanem az A12 formából. Ez nem meglepő, ha figyelembe vesszük azt, hogy az asszimetrikus formák előfordulása elsősorban az izomtípusú szövetekben várható (Massoulié és Bon 1982, Chatonnet és Lockridge 1989). A két ragadozó halfaj, az angolna és a harcsa szívében a G4/A4 mellett jelentős mennyiségű A12 formát találunk. Ezzel szemben a lénai tok szívében a G1 forma aránya jelentős.

Meglehetősen vegyes képet mutat a vázizom AChE formamintázata. Míg a busa és a lénai tok vázizmában csak A4/G4 formákat találunk, addig a harcsa izmában csak A12 formát. Az angolna és ponty vázizmában mindkét forma előfordul. Az angolna esetében kevesebb az A12 forma aránya, a ponty esetében több. Az A12 formák ilyen magas aránya alátámasztja Massoulié és Bon (1982) azon elméletét, mely szerint ezen formák lennének a funkcionáló formák a neuromusculáris junctionokban.

A májnál viszonylag egységesebb a kép, domináns forma a G4/A4. Míg busa májában emellett csak G1 formát találunk, addig a lénai tok és a ponty mája A12 formát is tartalmaz.

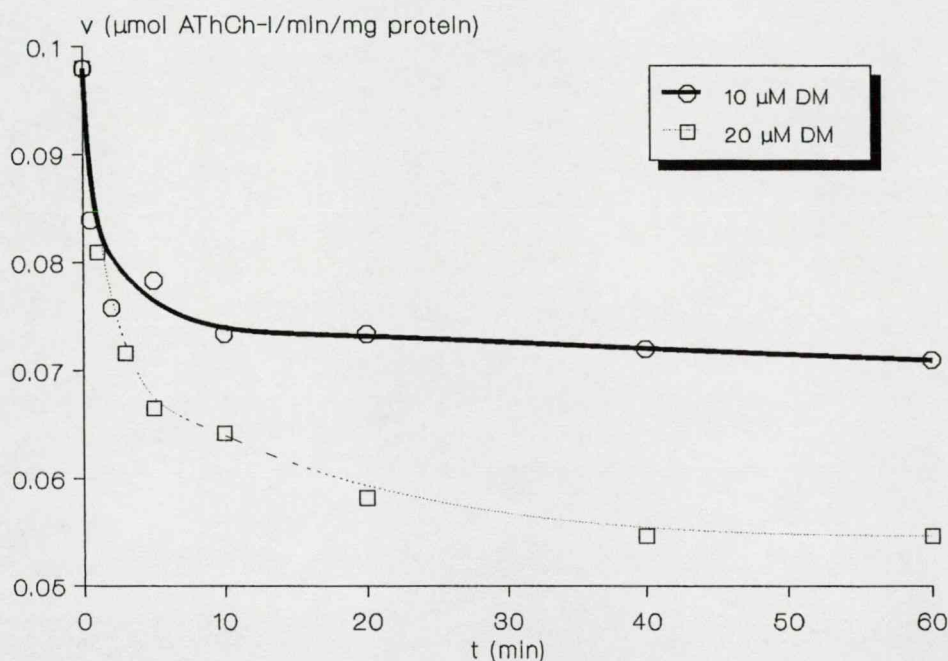
5.2 A deltamethrin halakra gyakorolt hatásainak vizsgálata

5.2.1 A DM AChE gátlásának kinetikája

5.2.1.1 A DM AChE gátlásának kinetikája ponty agyban

Ezen kísérletek célja az volt, hogy meghatározzuk a DM AChE gátlásának mértékét, időfüggését, koncentráció függését, a gátlás típusát, és az ún. gátlási állandót. Az AChE forrása ebben az esetben a ponty agya volt, mivel ebben a szervben megfelelően magas ezen enzim aktivitása ahhoz, hogy az *in vitro* gátlási kinetikákat felvegyük.

Az időfüggés meghatározásakor arra voltunk kíváncsiak, hogy a DM hány perc alatt éri el maximális gátlását. Eredményeinket a 9. ábra mutatja.



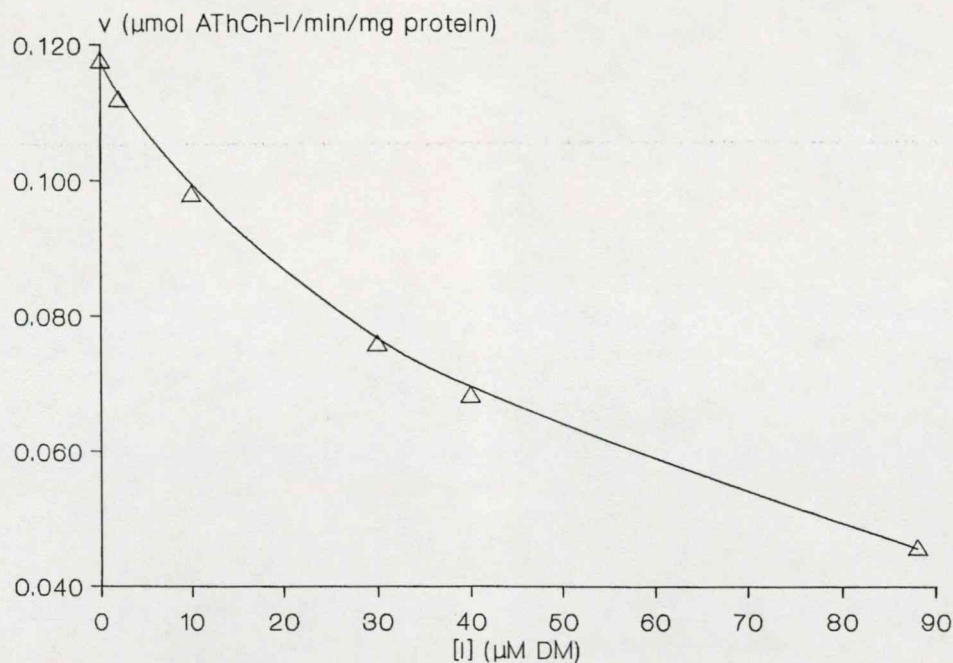
9. ábra A DM AChE gátlásának időfüggése 10 és 20 µM koncentrációban

Megjegyzés: A reakcióelegy a következő volt: 0.01 ml agyból készült homogenát felülúszója + 2.00 ml 0.26 mM DTNB 52 mM foszfát pufferben (pH=7.2) oldva + 0.44 ml DM oldat + 0.05 ml AcTCh-I (2 mM).

Az ábráról leolvasható, hogy a DM igen gyorsan kifejti maximális gátló hatását. A 10 µM-os koncentráció esetén már 5 perc után jelentős a gátlás. Nagyobb koncentráció (20 µM-os) esetén több időre volt szükség, a maximális gátlás 20 perc után alakul ki.

A koncentrációfüggés megállapítására irányuló kísérletsorozat arról ad felvilágosítást, hogy a különböző *in vitro* DM koncentrációkhoz milyen gátlási százalék rendelhető.

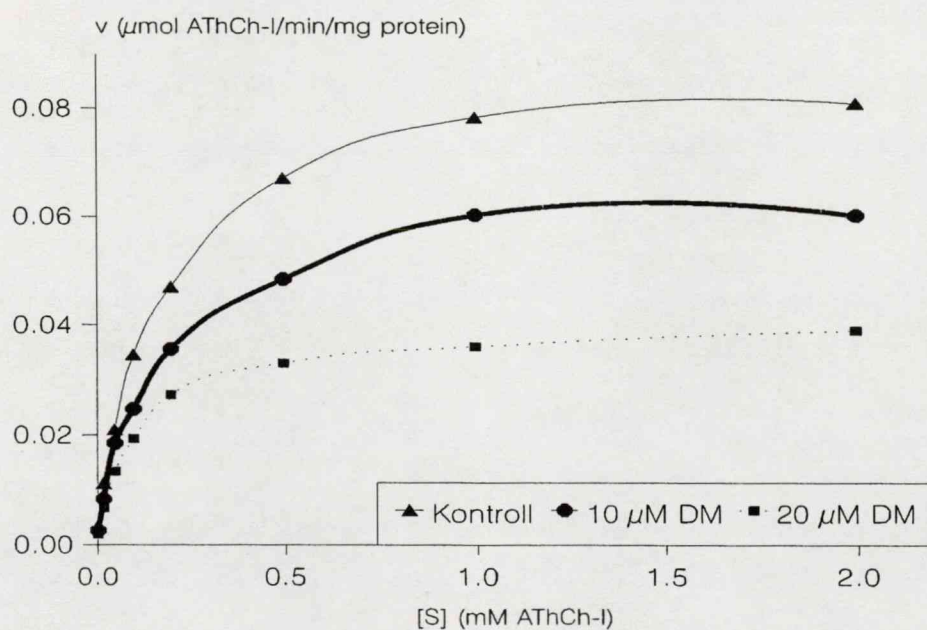
A 10. ábrából megállapítható, hogy már 10 µM-os DM koncentráció is 17%-os, a 40 µM-os koncentráció már 42%-os, a 88 µM-os koncentráció pedig 61%-os gátlást okoz. Mindezekből megállapítható, hogy bár a DM nem specifikus AChE inhibitor, de igen jelentős AChE gátló hatással rendelkezik.



10. ábra

A DM AChE gátlásának koncentráció függése

Megjegyzés: A reakcióelegy a következő volt: 0.01 ml agyból készült homogenát felülúszója + 2.00 ml 0.26 mM DTNB 52 mM foszfát pufferben (pH=7.2) oldva + 0.44 ml DM oldat + 0.05 ml AcTCh-I (2 mM). Inkubációs idő: 10 perc



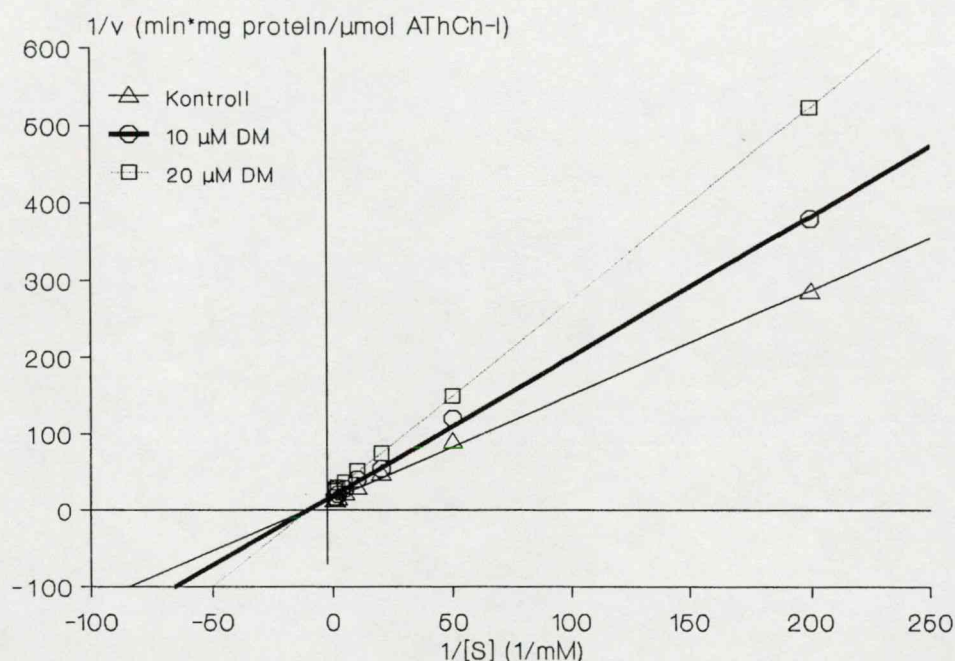
11. ábra

Az agy AChE Michaelis-Menten kinetikája gátlószer nélkül, illetve 10 μM és 20 μM koncentrációjú DM esetén

Megjegyzés: A reakcióelegy a következő volt: 0.01 ml agyból készült homogenát felülúszója + 2.00 ml 0.26 mM DTNB 52 mM foszfát pufferben (pH=7.2) oldva + 0.44 ml DM oldat + 0.05 ml AcTCh-I (2 mM). Inkubációs idő: 10 perc

A gátlási típus meghatározása közelebbi információt tud nyújtani az enzimgátlás mechanizmusáról. A gátlás típusának meghatározásához először a Michaelis-Menten kinetikát

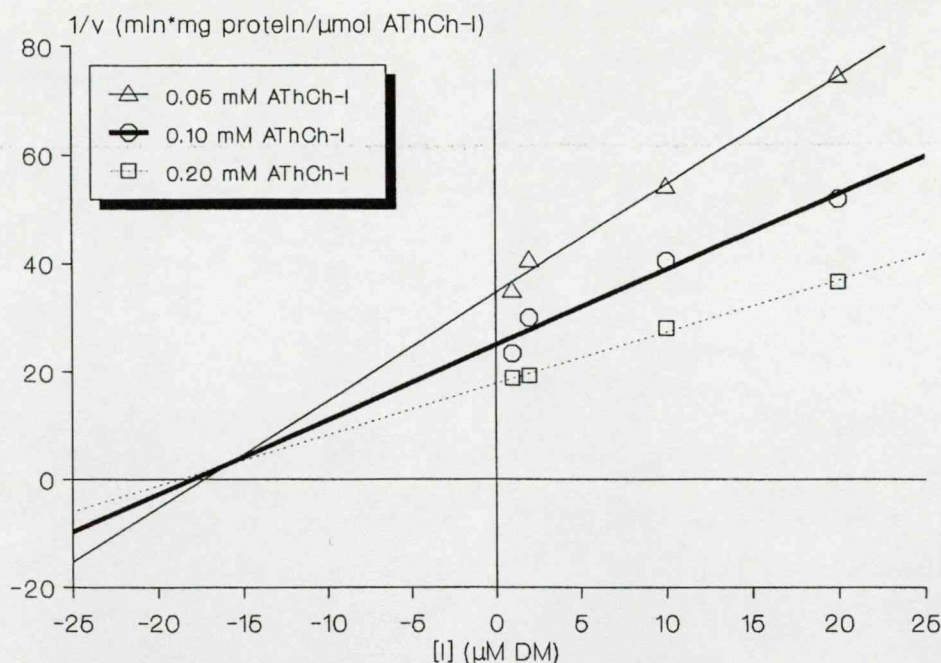
vettük fel (11. ábra). A kapott görbék Lineweaver-Burk (12. ábra) illetve a Hanes-féle linearizálása után megállapítható, hogy a gátlás típusa vegyes ($K_M(\text{kont.}) = 0.0910 \text{ mM}$; $K_M(10 \mu\text{M}) = 0.0955 \text{ mM}$; $K_M(20 \mu\text{M}) = 0.09686 \text{ mM}$; $v_{\text{max}}(\text{kont.}) = 0.067$; $v_{\text{max}}(10 \mu\text{M}) = 0.053$; $v_{\text{max}}(20 \mu\text{M}) = 0.040$ [$\mu\text{mol AcTCh-I/perc/mg protein}$]). Ez az eredmény jó összhangban van azzal az irodalmi adattal, hogy a piretroidok (köztük a DM is) nem specifikus gátlószerei az AChE-nak, bár van AChE gátló hatásuk is (Reddy és mtsai, 1991).



12. ábra Lineweaver-Burk-féle linearizálás

A gátlási állandó (K_I) meghatározásához két módszer is használható. Az első abból áll, hogy a koncentráció függésnél mért értékek %-át logaritmizáljuk és meghatározzuk az 1.7-es értékhez tartozó koncentrációt. Ez a koncentráció adja a K_I értéket. Ennek a módszernek igen nagy hátránya a pontatlansága (Moretto és Johnson, 1987): a K_I könnyen alá vagy fölé becsülhető. Ezért választottuk a másik módszert, a Dixon-féle meghatározást (13. ábra). A K_I érték $15.6 \mu\text{M}$ -nak adódott. Ez azt jelenti, hogy a $15.6 \mu\text{M}$ -os DM koncentráció okoz 50%-os AChE gátlást. Tehát a DM jó gátlószere az AChE-nak.

Kísérleteink eredményeit összefoglalva megállapíthatjuk, hogy a DM meglehetősen jó inhibitora az AChE-nak. Hatását gyorsan kifejti, kisebb koncentráció ($10 \mu\text{M}$) mellett már 10 perc után eléri a maximális gátlási hatékonyságát. $15.6 \mu\text{M}$ -os koncentráció mellett 50%-os gátlás érhető el, de ez tovább fokozható a koncentráció növelésével, bár a gátlás mértéke a koncentráció növekedésével nem lineáris. A gátlás típusa vegyes, ami arra utal, hogy a DM nem közvetlenül (pl. az enzim aktív centrumán kívül kötődve) befolyásolja az enzim szubsztrátkötő és katalikus helyét.



13. ábra K_I meghatározása Dixon módszerével 0.05, 0.1, 0.2 mM szubsztrát koncentrációt alkalmazva

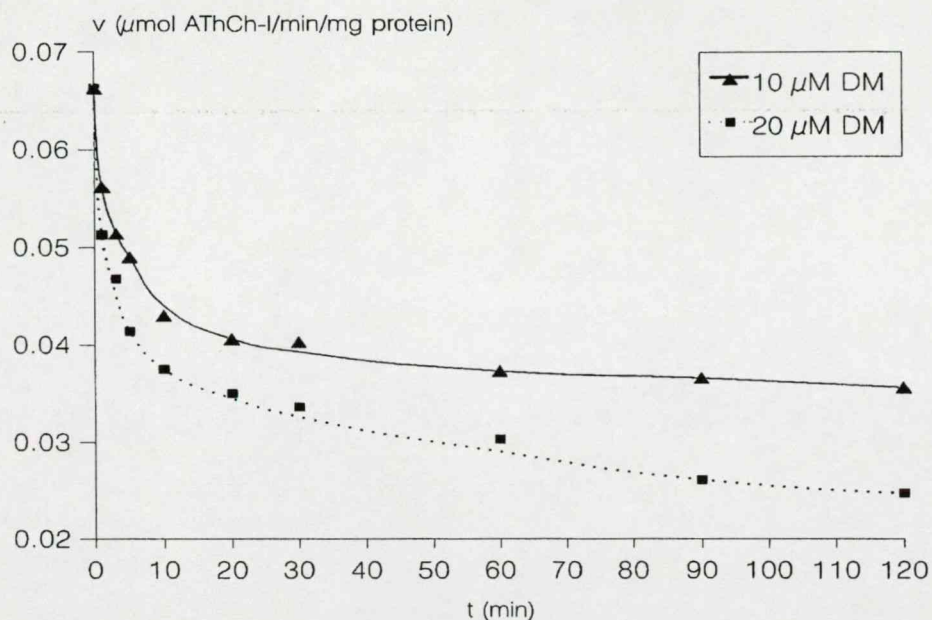
Megjegyzés. A reakcióelegy a következő volt: 0.01 ml agyból készült homogenát felulúszója + 2.00 ml 0.26 mM DTNB 52 mM foszfát pufferben (pH=7.2) oldva + 0.44 ml DM oldat + 0.05 ml AcTCh-I (2 mM). Inkubációs idő: 10 perc

5.2.1.2 A DM AChE gátlásának kinetikája angolna agyban

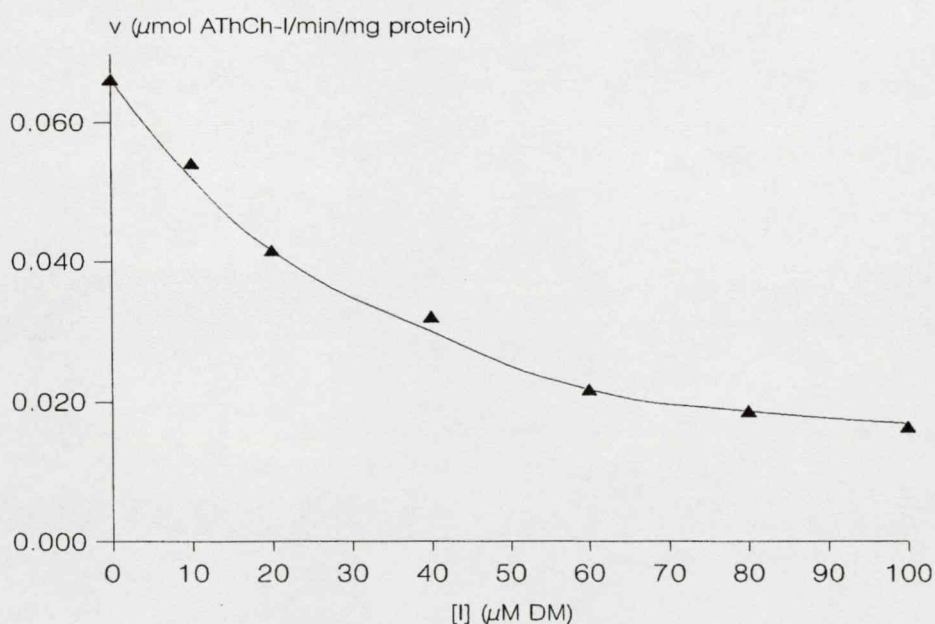
Célunk ezen kísérletsorozat kapcsán az volt, hogy összehasonlítsuk a ponty AChE kinetikus paramétereit az angolna agyából származó AChE paramétereivel.

Először itt is arra voltunk kíváncsiak, hogy a DM hány perc alatt éri el maximális gátlását. Eredményeinket a 14. ábra mutatja.

A DM ebben az esetben is gyorsan kifejti hatását. A 10 μ M-os koncentráció esetén már 5 perc után jelentős a gátlás, és 10 perc után már a maximális gátláshoz közeli gátlás figyelhető meg. Nagyobb koncentráció (20 μ M-os) esetén egy kicsit más a görbe lefutása, hiszen a 30 perces gátlás után is még nő a gátlás mértéke. Összehasonlítva a ponty agy esetében kapott eredménnyel elmondhatjuk, hogy a 10 μ M-os koncentrációnál a DM hatásának időbeni lefutásában nincs különbség, hisz mindkét esetben 10 perc után már közel maximális gátlás mérhető. A 20 μ M-os koncentrációnál is hasonló figyelhető meg, bár meg kell jegyeznünk, hogy az angolna esetében 30 perc után is nőtt a gátlás mértéke, ami a ponty esetében nem tapasztalható. Igaz, itt nem mértünk 90 és 120 perces gátlást.

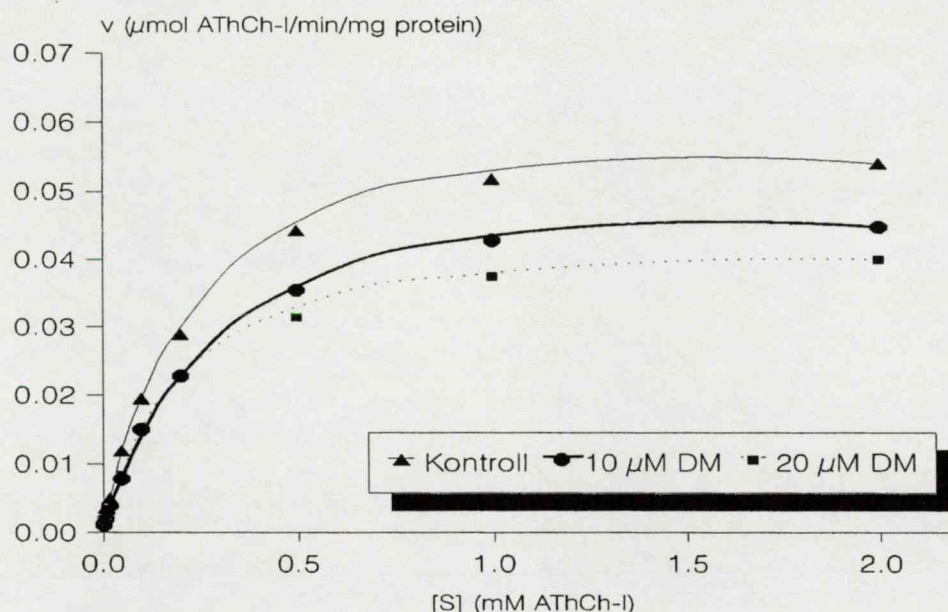


14. ábra A DM AChE gátlásának időfüggése 10 és 20 μM koncentrációban
Megjegyzés: A reakcióelegy a következő volt: 0.02 ml agyból készült homogenát felülúszója + 2.00 ml 0.26 mM DTNB 52 mM foszfát pufferben (pH=7.2) oldva + 0.43 ml DM oldat + 0.05 ml AcTCh-I (2 mM).



15. ábra A DM AChE gátlásának koncentráció függése
Megjegyzés: A reakcióelegy a következő volt: 0.02 ml agyból készült homogenát felülúszója + 2.00 ml 0.26 mM DTNB 52 mM foszfát pufferben (pH=7.2) oldva + 0.43 ml DM oldat + 0.05 ml AcTCh-I (2 mM). Inkubációs idő: 10 perc

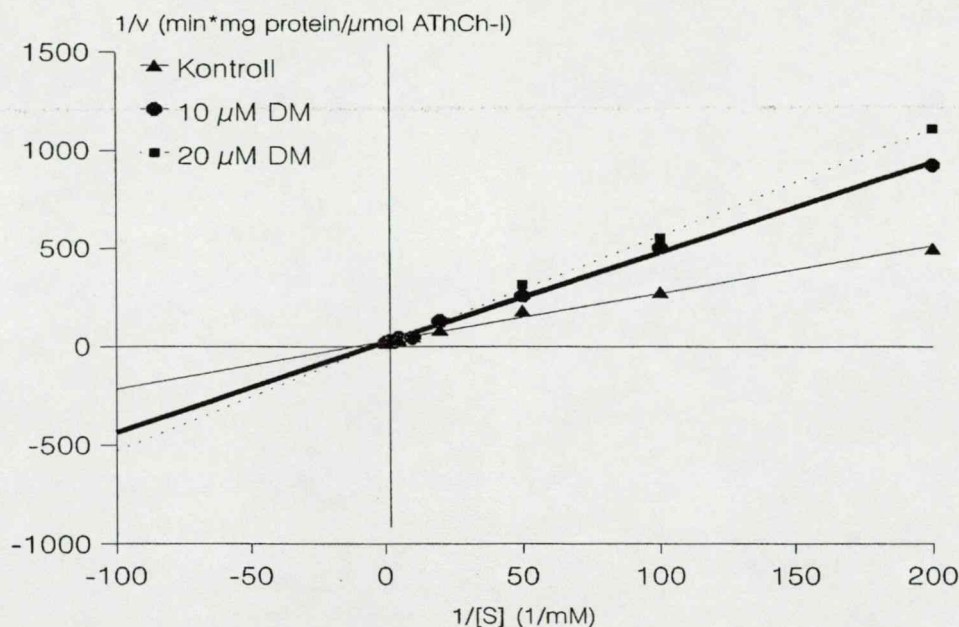
A 15. ábrából megállapítható, hogy már 10 μM -os DM koncentráció is 19%-os, a 20 μM -os koncentráció 37%, a 40 μM -os koncentráció már 52%-os, a 60 μM -os koncentráció 67%-os és végül a 100 μM -os koncentráció 75% gátlást okoz. Mindezekből megállapítható, a DM jelentős AChE gátló hatással rendelkezik az angolna esetén is. Ugyanakkor azt is elmondhatjuk, hogy némileg erősebben gátolja az angolna agyából származó AChE-t, mivel például ponty esetében a 40 μM -os koncentráció csak 42%-os gátlást okoz, addig angolna esetében ugyanez a koncentráció már 52%-os gátlásért felelős. Ezenkívül angolna esetében a 60 μM -os koncentráció is 67%-os gátlást okoz, szemben a ponty esetével, ahol 88 μM -os koncentráció okoz hasonló mérvű (61%-os) gátlást.



16. ábra Az angolna agy AChE Michaelis-Menten kinetikája gátlószer nélkül, illetve 10 μM és 20 μM koncentrációjú DM esetén

Megjegyzés: A reakcióelegy a következő volt: 0.02 ml agyból készült homogenát felülúszója + 2.00 ml 0.26 mM DTNB 52 mM foszfát pufferben (pH=7.2) oldva + 0.43 ml DM oldat + 0.05 ml AcTCh-I (2 mM). Inkubációs idő: 10 perc

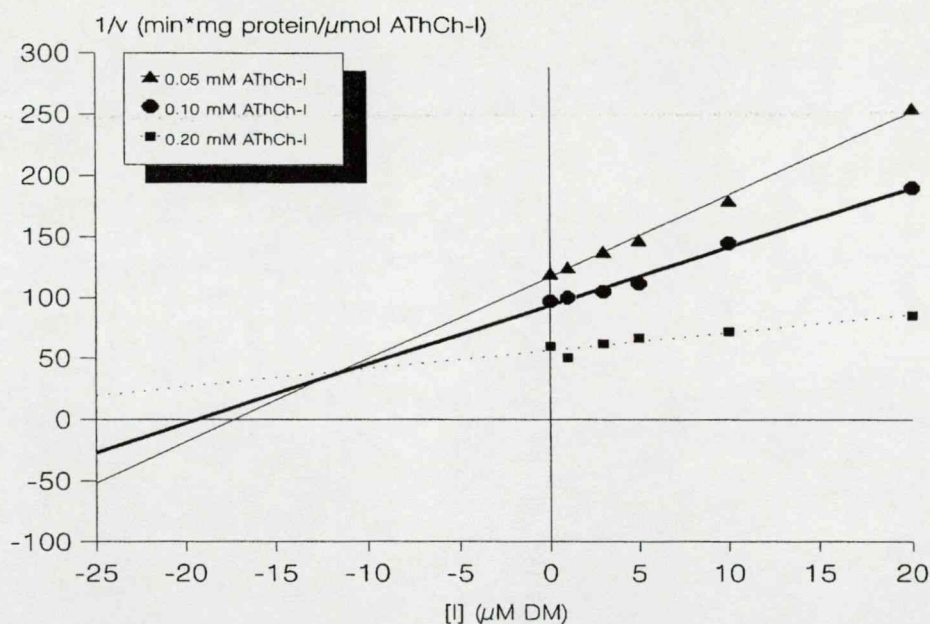
A gátlás típusának meghatározásához itt is először a Michaelis-Menten kinetika alapján számoltunk (16. ábra). A kapott görbék Lineweaver-Burk (17. ábra) illetve a Hanes-féle linearizálása után megállapítható, hogy a gátlás típusa vegyes ($K_M(\text{kont.}) = 0.0953 \text{ mM}$; $K_M(10 \mu\text{M}) = 0.1863 \text{ mM}$; $K_M(20 \mu\text{M}) = 0.2134 \text{ mM}$; $v_{\text{max}}(\text{kont.}) = 0.0394$; $v_{\text{max}}(10 \mu\text{M}) = 0.0378$; $v_{\text{max}}(20 \mu\text{M}) = 0.0348 [\mu\text{mol AcTCh-I/perc/mg protein}]$).



17. ábra Lineweaver-Burk-féle linearizálás

A gátlási állandó meghatározásához - hasonlóan az előző fejezetben leírtakhoz - itt is a Dixon módszerét követtük és különböző gátlószer-koncentráció mellett mértük az AChE aktivitást három szubsztrát koncentrációt alkalmazva. A metszéspont abszcisszára történő vetületének abszolút értéke adta meg a K_I értéket. Ez az érték 11.3 μM (18. ábra).

Kísérleti eredményeinket hasonlóképpen foglalhatjuk össze, mint azt az előző fejezetben tettük: megállapíthatjuk, hogy a DM meglehetősen jó inhibitora az AChE-nak. Hatását gyorsan kifejti, kisebb koncentráció (10 μM) mellett már 10 perc után magas gátlási hatékonyságot mutat. 11.3 μM -os koncentráció mellett 50%-os gátlás érhető el, de ez tovább fokozható a koncentráció növelésével, bár a gátlás mértéke a koncentráció növekedésével nem lineáris. A gátlás típusa vegyes, ami arra utal, hogy a DM nem közvetlenül (pl. az enzim aktív centrumán kívül kötődve) befolyásolja az enzim szubsztrátkötő és katalikus helyét. Ugyanakkor elmondhatjuk, hogy az angolna agyból származó AChE némileg nagyobb érzékenységet mutatott a DM-re, mint a ponty agyból származó enzim. Ezt igazolja egyrészt az a tény, hogy kisebb DM koncentráció mellett is nagyobb gátlást tapasztaltunk, mint a pontynál (angolna esetében a 60 μM -os koncentráció is 67%-os gátlást okoz, szemben a ponty esetével, ahol 88 μM -os koncentráció okoz hasonló mérvű (61%-os) gátlást). Másrészt a K_I érték is némiképp kisebb (11.3 μM az angolna és 15.6 μM a ponty esetében). Meg kell azonban említenünk, hogy mindkét érték jóval magasabb az *in vivo* LC_{50} értéknél, amiből azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a természetben a DM más módon, valószínűleg az idegrendszer más elemein keresztül fejt ki toxikus hatását.



18. ábra K_I meghatározása Dixon módszerével 0.05, 0.1, 0.2 mM szubsztrát koncentrációt alkalmazva

Megjegyzés: A reakcióelegy a következő volt: 0.02 ml agyból készült homogenát felulúsója + 2.00 ml 0.26 mM DTNB 52 mM foszfát pufferben (pH=7.2) oldva + 0.43 ml DM oldat + 0.05 ml AcTCh-I (2 mM). Inkubációs idő: 10 perc

5.2.2 *In vivo* DM kezelés hatása az AChE molekuláris formáinak megoszlására

5.2.2.1 *In vivo* DM kezelés hatása az AChE molekuláris formáinak megoszlására pontyban

A következő kísérletsorozatban azt vizsgáltuk, hogy *in vivo* rendszerben 3 napos 2 μg/l-es DM kezelés milyen hatással van a ponty különböző szerveiben mérhető AChE aktivitásra 12 ± 1 °C-on. Megállapítottuk, hogy a DM kezelés nem befolyásolta az agyban, az izomban és a májban található AChE aktivitását. A szívben a kontroll érték 83%-ára, míg a vérplazmában 78.6 %-ára csökkent az AChE aktivitás értéke (22. táblázat). Reddy és Philip (1994) arról számol be, hogy 20 μg/l-es cypermethrin (egy másik piretroid inszekticid) kezelés során 60%-os AChE aktivitás csökkenést tapasztaltak a ponty agyában 2 nappal a kezelés után. A májban, vázizomban és kopolyúban ez idő alatt 30%-al csökkent az AChE aktivitás. Az AChE aktivitás csökkenésével párhuzamosan megnőtt az acetilkolin mennyisége a szövetekben. Az agyban 86%-al, a vázizomban 76%-al mértek több acetilkolint, mint a kontroll egyedekben.

AChE AKTIVITÁS A HOMOGENÁTOKBAN mU/mg fehérje		
	KONTROLL	DM KEZELT
AGY	79.460 ± 2.590	79.190 ± 7.570
SZÍV	47.840 ± 21.390	40.150 ± 19.550
VÁZIZOM	25.290 ± 7.440	28.300 ± 4.330
MÁJ	8.826 ± 0.704	8.535 ± 0.491
VÉRSZÉRUM	1.960 ± 0.190	1.541 ± 0.105*

22. táblázat AChE aktivitások kontroll és 2 µg/l DM-nel 12 ± 1 °C-on 3 napig kezelt halak különböző szerveiben

Megjegyzés: Az AChE aktivitások 4-6 halból származó mérés átlagát (± S.D.) tükrözik (mU/mg protein). A kezelt halak értékei szignifikánsan különböznek a kontrolltól (Student *t* teszt, *P* < 0.05), amit a következő szimbólummal jelöltünk: *.

Ismert, hogy a DM, mint minden más II típusú piretroid, az idegsejtek membránjának ingerelt állapotában jelentősen meghosszabbítja a Na⁺-csatornák nyitvatartását, s ezzel ismétlődő impulzusok hosszan elnyúló sorozatát eredményezi a célszervekben, valamint az idegimpulzusok frekvencia függő hanyatlását az idegkötegekben (WHO, 1990). Mivel az idegimpulzus keletkezése és továbbhaladása azonos mechanizmussal történik az egész idegrendszerben, a piretroidok valószínűleg hasonló hatást váltanak ki mind a központi, mind a perifériás idegrendszerben.

A nátrium ionok áramlásában bekövetkező változások (illetve II. típusú piretroidoknál a klorid ionok áramlásában is) kapcsolódnak egyéb, az idegrendszer más elemeinek a működésével is. A szekretorikus és az enzimatisz tulajdonságokat is befolyásolja a DM. Így fordulhat elő, hogy a szérumban AChE aktivitásában szignifikáns csökkenést tudunk mérni. (A hal szérumban AChE-t tartalmaz, szemben az emlősök BuChE-val, Szabó és mtsai, 1992.) Ez a gátlás azonban nem olyan kifejezett, különösen alacsony hőmérsékleten, mint néhány más rovarirtószer esetén. Azt azonban meg kell jegyeznünk, hogy a DM LC₅₀ koncentrációja ponty esetében mintegy 1000-szer kisebb, mint a szerves foszforésztereké, az általunk választott laboratóriumi körülmények között (Szegetes és Nemcsók, 1992).

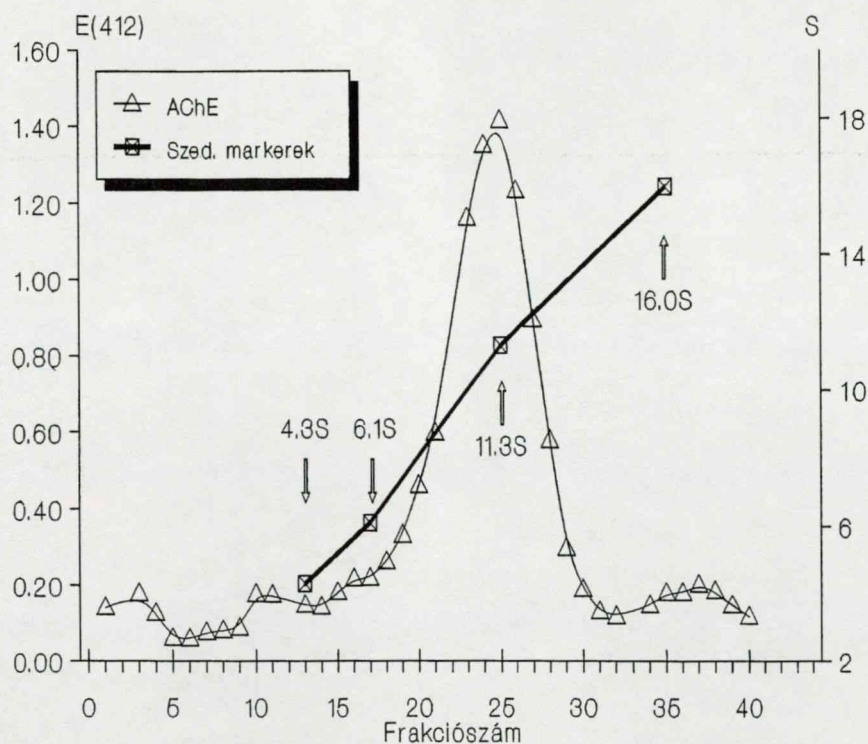


	AChE MOLEKULÁRIS FORMÁK (%)		
	G1	G4 ÉS/VAGY A4	A12
KONTROLL PONTY AGY	7.1 ± 4.4	83.7 ± 5.9	9.2 ± 3.8
DM KEZELT PONTY AGY	7.7 ± 1.1	83.0 ± 1.0	9.3 ± 2.1
KONTROLL PONTY SZÍV	-	42.0 ± 2.0	58.0 ± 2.5
DM KEZELT PONTY SZÍV	-	42.9 ± 3.8	57.1 ± 2.8
KONTROLL PONTY IZOM	-	84.5 ± 2.7	15.5 ± 3.6
DM KEZELT PONTY IZOM	-	77.2 ± 5.9	22.8 ± 5.0
KONTROLL PONTY MÁJ	12.3 ± 3.1	77.3 ± 4.5	10.4 ± 3.7
DM KEZELT PONTY MÁJ	7.0 ± 5.2	86.9 ± 4.7*	6.1 ± 2.18
KONTROLL PONTY SZÉRUM	17.9 ± 4.5	82.1 ± 3.9	-
DM KEZELT PONTY SZÉRUM	12.7 ± 3.4	87.3 ± 5.8	-

23. táblázat AChE molekuláris formák megoszlása kontroll és 2 µg/l DM-nel 12 ± 1 °C-on 3 napig kezelt halak különböző szerveiben

Megjegyzés: Az AChE aktivitások 4-6 halból származó mérések átlagát (± S.D.) tükrözik az össz AChE molekuláris formák százalékában. A kezelt halak értékei szignifikánsan különböznek a kontrolltól (Student *t* teszt, *P* < 0.05), amit a következő szimbólummal jelöltünk: *.

A továbbiakban arra kerestünk választ, hogy a DM kezelés vajon megváltoztatja-e az AChE molekuláris formáinak mintázatát (23. táblázat). Azt tapasztaltuk, hogy a DM nincs hatással az AChE megoszlására az agyban (19. ábra) és a szívben (20. ábra).

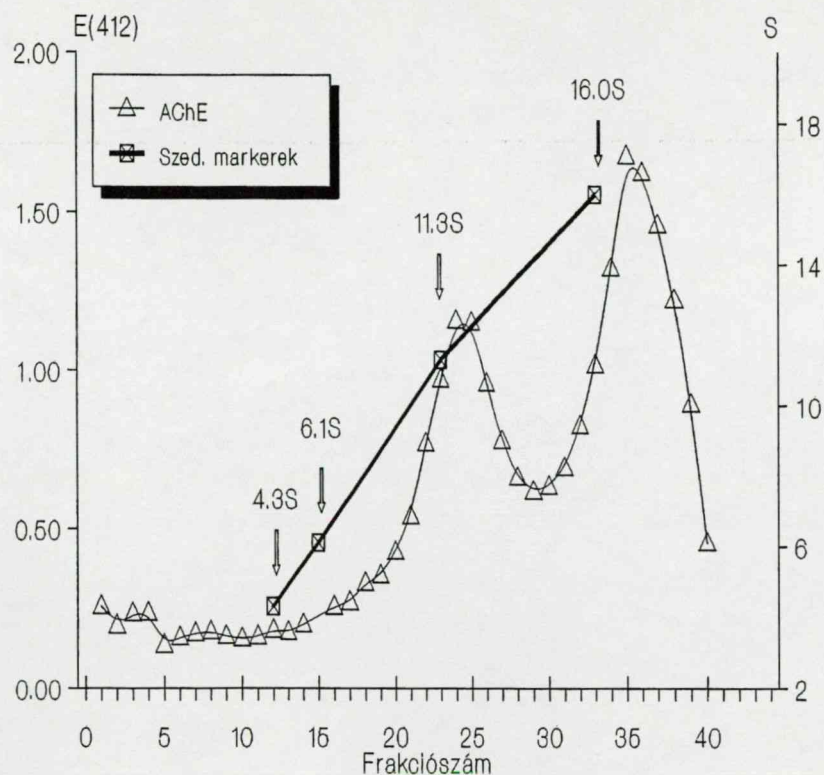


19. ábra AChE molekuláris formák szedimentációs sebességi profilja 2 $\mu\text{g/l}$ DM-nel 12 ± 1 °C-on 3 napig kezelt ponty agyában

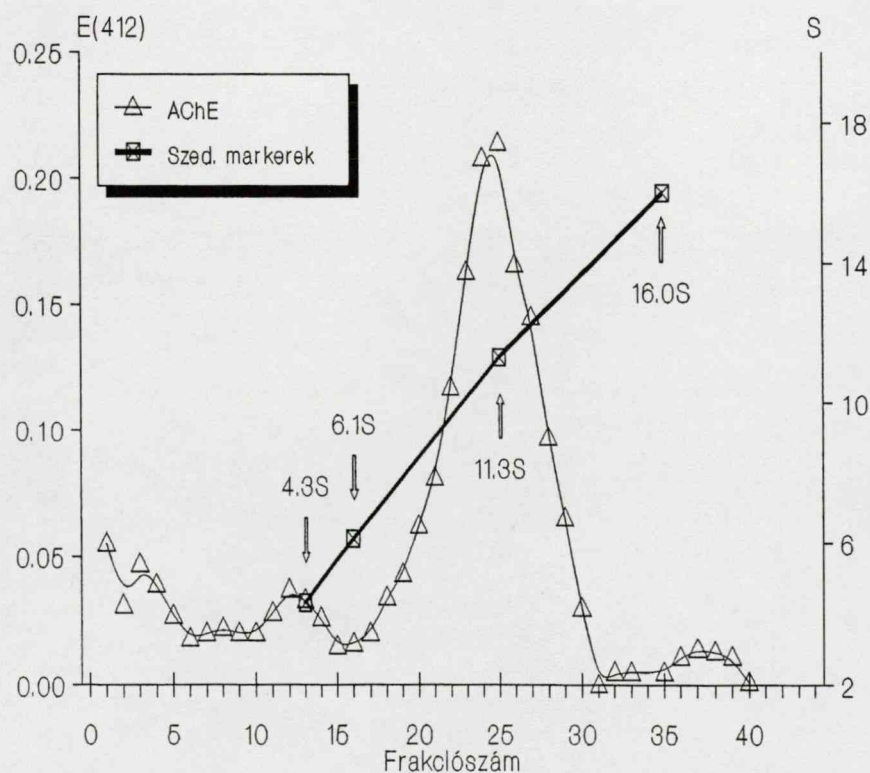
Megjegyzés: A kísérleti körülményeket lásd az “Anyagok és módszerek” című fejezetben.

A kezelés májban némileg megnöveli a G4 forma arányát a G1 és A12 formák rovására (21. ábra). Az izomban egy kicsit az A12 forma irányába tolódik el az arány a G4/A4 rovására (22. ábra), míg a vérsérumban a G4-esből lesz több egy kicsivel (23. ábra), bár ez a két utóbbi változás nem szignifikáns. A májban történt kismértékű változás oka feltehetően visszavezethető a DM sejtroncsoló tulajdonságára (Catinot és mtsai, 1989) és az egyes molekuláris formák eltérő lokalizációjára (Berninsone és mtsai, 1989; Volpe és mtsai, 1990). Mindemellett lehetséges, hogy a piretroidok befolyásolják az AChE negyedleges szerkezetében az asszociációs-disszociációs folyamatokat is. Mivel a nagyobb formák levezethetők a G1-es egységből, ha a DM felborítja a monomerek összekapcsolódása illetve a nehezebb típusok lebomlása közti egyensúlyt, akkor a megoszlási arányokban eltolódások figyelhetők meg.

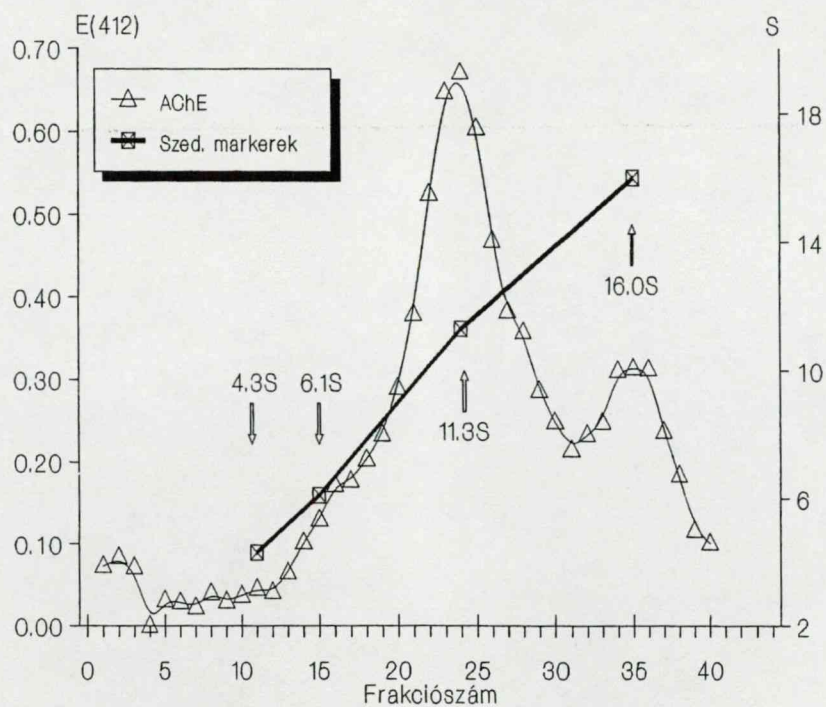
Valószínű, hogy a májnak a méregtelenítő folyamatokban betöltött központi szerepe is közrejátszik abban, hogy sem az agyban, a szívben, a vázizomban, sőt még a sérumban sem figyeltünk meg szignifikáns változást az AChE molekuláris formáinak megoszlásában, holott a vérben AChE aktivitás csökkenést is detektáltunk, míg a májban nem.



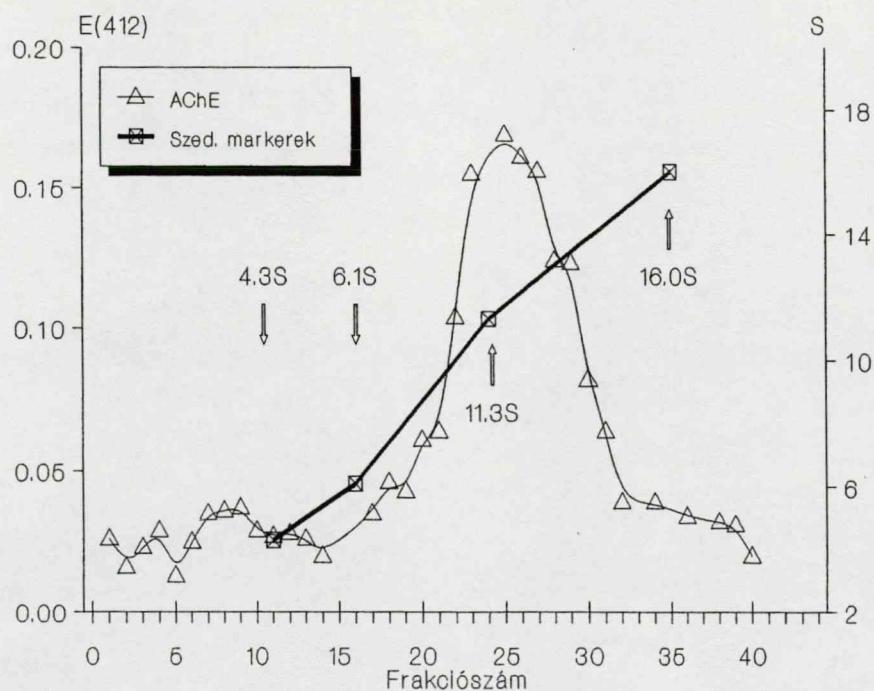
20. ábra AChE molekuláris formák szedimentációs sebességi profilja 2 $\mu\text{g/l}$ DM-nel 12 ± 1 °C-on 3 napig kezelt ponty szívében
Megjegyzés: A kísérleti körülményeket lásd az "Anyagok és módszerek" című fejezetben



21. ábra AChE molekuláris formák szedimentációs sebességi profilja 2 $\mu\text{g/l}$ DM-nel 12 ± 1 °C-on 3 napig kezelt ponty májában
Megjegyzés: A kísérleti körülményeket lásd az "Anyagok és módszerek" című fejezetben



22. ábra AChE molekuláris formák szedimentációs sebességi profilja 2 $\mu\text{g/l}$ DM-nel 12 ± 1 °C-on 3 napig kezelt ponty vázizmában
Megjegyzés: A kísérleti körülményeket lásd az “Anyagok és módszerek” című fejezetben.



23. ábra AChE molekuláris formák szedimentációs sebességi profilja 2 $\mu\text{g/l}$ DM-nel 12 ± 1 °C-on 3 napig kezelt ponty vérszérumában
Megjegyzés: A kísérleti körülményeket lásd az “Anyagok és módszerek” című fejezetben.

5.2.2.2 *In vivo* DM kezelés hatása az AChE molekuláris formáinak megoszlására angolnában

A következő kísérletsorozatban azt vizsgáltuk, hogy *in vivo* rendszerben 3 napos 1 µg/l-es DM kezelés milyen hatással van az angolna különböző szervei AChE tartalmának aktivitására 20 ± 1 °C-on. Megállapítottuk, hogy a DM kezelés nem befolyásolta az agyban és a májban található AChE aktivitását, azonban a szívben és a vázizomban egyformán a kontroll érték 71%-ára csökkent az AChE aktivitás értéke (24. táblázat). Ez a változás jelentős, különösen akkor, ha figyelembe vesszük az *in vivo* kezelés alacsony koncentrációját (1 µg/l). Az aktivitás csökkenése ráadásul olyan jelentős szervben történt, mint a szív, melynek beidegzésében a kolinerg rendszernek jelentős szerepe van (Pennec és La Bras, 1984). Tehát ez az aktivitás csökkenés súlyos zavarokat okozhat a keringéssel kapcsolatos élettani folyamatokban. Így például csökkenhet az O₂ felvétel, ami anoxiához vezethet. Ez pedig akár olyan súlyos angolnapusztulásokhoz vezethet, mint ami 1991-ben és 1995-ben történt a Balatonon. Itt szeretném megemlíteni, hogy mindkét esetben DM szermaradékot találtak az angolnák szervezetében (20.0 µg/kg nedves szövet koncentrációban 1991-ben (Gönczy, 1992) és 2.7-31,1 µg/kg nedves szövet koncentrációban 1995-ben (Bálint mtsai, 1997)).

AChE AKTIVITÁS A HOMOGENÁTOKBAN mU/mg fehérje		
	KONTROLL	DM KEZELT
AGY	308.8 ± 22.7	315.5 ± 20.1
SZÍV	81.0 ± 4.3	57.5 ± 18.9 *
VÁZIZOM	143.7 ± 18.7	102.7 ± 11.5 *
MÁJ	37.3 ± 8.4	39.0 ± 3.3

24. táblázat AChE aktivitások kontroll és 1 µg/l DM-nel 20 ± 1 °C-on 3 napig kezelt halak különböző szerveiben

Megjegyzés. Az AChE aktivitások 4-6 halból származó mérés átlagát (± S.D.) tükrözik (mU/mg protein). A kezelt halak értékei szignifikánsan különböznek a kontrolltól (Student *t* teszt, *P* < 0.05), amit a következő szimbólummal jelöltünk: *.

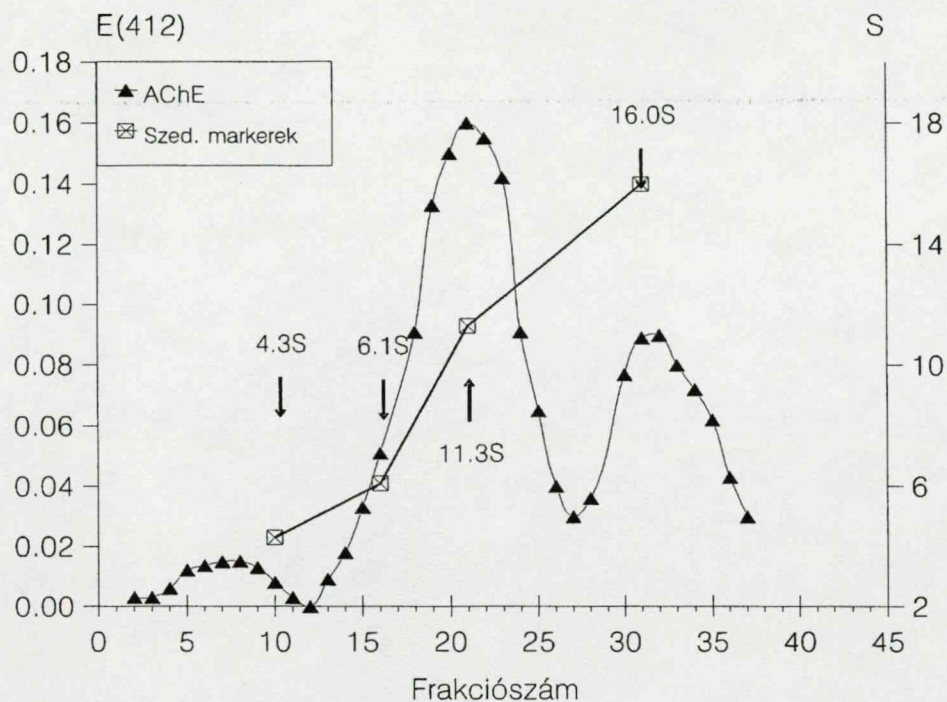
Akár csak a ponty esetében, itt is a továbbiakban azt vizsgáltuk, hogy a DM kezelés vajon megváltoztatja-e az AChE molekuláris formáinak mintázatát (25. táblázat). Azt tapasztaltuk,

hogy a DM nem befolyásolja a formamintázatot a szívben (24. ábra) és a vázizomban (25. ábra). Bár a kezelt angolnák vázizmában nem tudtunk A12 formát elválasztani, de ez a változás inkább magyarázható azzal, hogy az A12 formák amúgy is alacsony aktivitása a kezelés hatására a detektálási szint alá csökkent, sem mint azzal, hogy a DM kezelés hatására szétestek volna. Ezzel szemben szignifikáns változás volt megfigyelhető az agyban (26. ábra). A kezelés hatására harmadára csökkent az A12 formák aránya és ezzel párhuzamosan emelkedett a G4/A4 formák aránya. Mindez azt sejteti, hogy a DM befolyásolta a formák összeszerelődésének folyamatát, vagy legalábbis megváltoztatta a disszociációs állapotokat. Sajnos az angolna májában olyan alacsony AcHE aktivitás mérhető, hogy az még a kontroll hal esetén sem volt elegendő ahhoz, hogy a különböző formákat ultracentrifugálással elválasszuk egymástól.

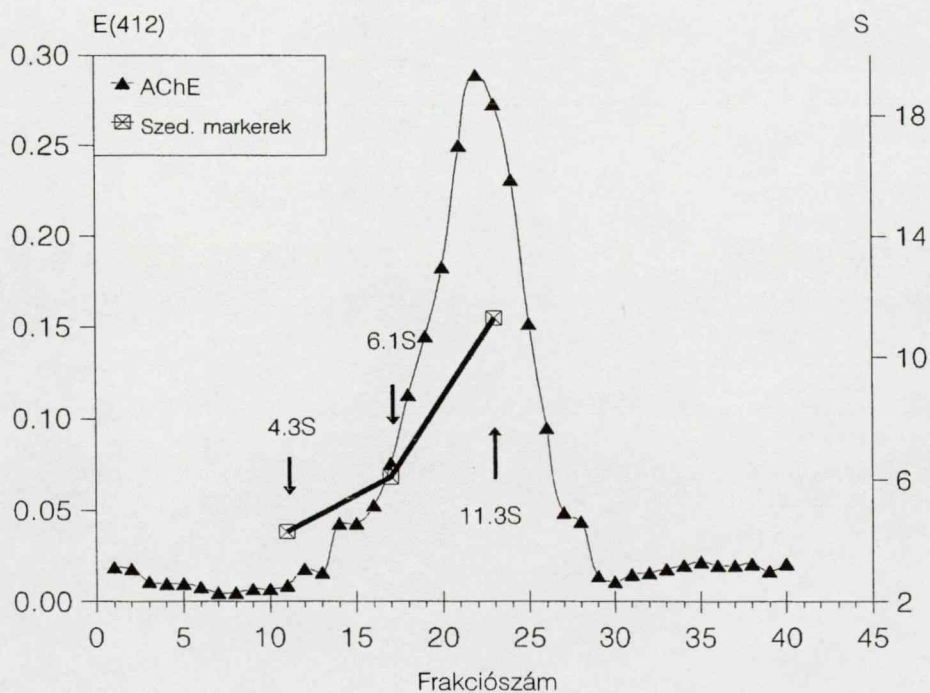
	AChE MOLEKULÁRIS FORMÁK (%)		
	G1	G4 ÉS/VAGY A4	A12
KONTROLL ANGOLNA AGY	5.1 ± 7.2	67.3 ± 14.8	27.6 ± 7.6
DM KEZELT ANGOLNA AGY	8.1 ± 0.6	82.9 ± 2.2*	9.1 ± 2.8*
KONTROLL ANGOLNA SZÍV	4.6 ± 2.3	67.8 ± 0.7	27.6 ± 1.6
DM KEZELT ANGOLNA SZÍV	6.2 ± 1.5	69.3 ± 2.6	24.5 ± 3.1
KONTROLL ANGOLNA IZOM	-	96.1 ± 5.6	3.9 ± 5.6
DM KEZELT ANGOLNA IZOM	-	100	-

25. táblázat AChE molekuláris formák megoszlása kontroll és 1 µg/l DM-nel 20 ± 1 °C-on 3 napig kezelt halak különböző szerveiben

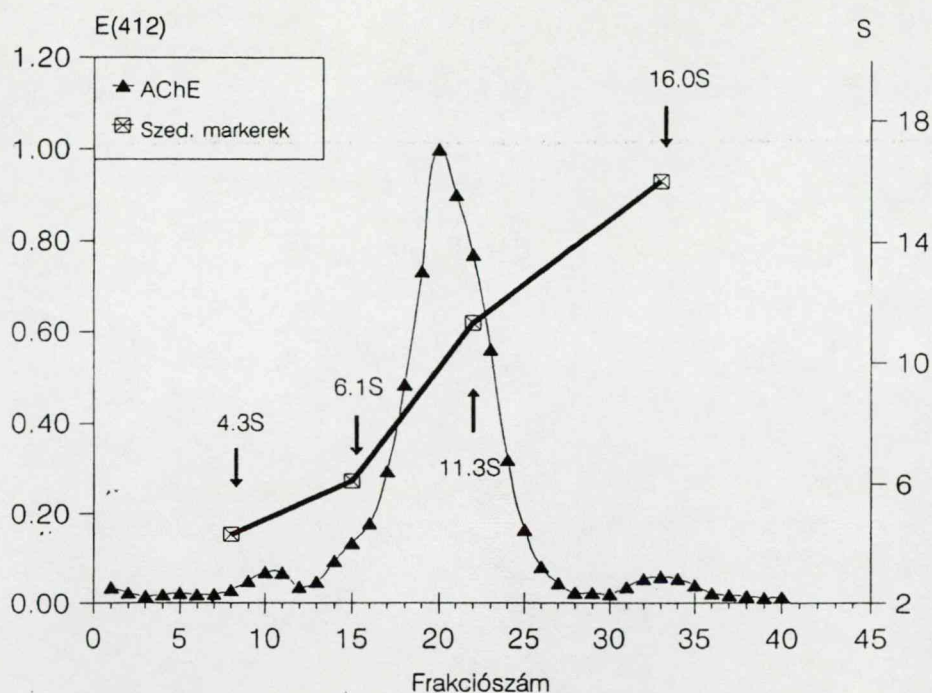
Megjegyzés. Az AChE aktivitások 4-6 halból származó mérések átlagát (± S.D.) tükrözik az össz AChE molekuláris formák százalékában. A kezelt halak értékei szignifikánsan különböznek a kontrolltól (Student *t* teszt, *P* < 0.05), amit a következő szimbólummal jelöltünk: *. Sajnos, a májban mért térfogati aktivitás nem volt elegendő a formák tökéletes elválasztásához.



24. ábra AChE molekuláris formák szedimentációs sebességi profilja 1 $\mu\text{g/l}$ DM-nel 20 ± 1 °C-on 3 napig kezelt angolna szívében.
 Megjegyzés: A kísérleti körülményeket lásd az "Anyagok és módszerek" című fejezetben.



25. ábra AChE molekuláris formák szedimentációs sebességi profilja 1 $\mu\text{g/l}$ DM-nel 20 ± 1 °C-on 3 napig kezelt angolna vázizmában.
 Megjegyzés: A kísérleti körülményeket lásd az "Anyagok és módszerek" című fejezetben.



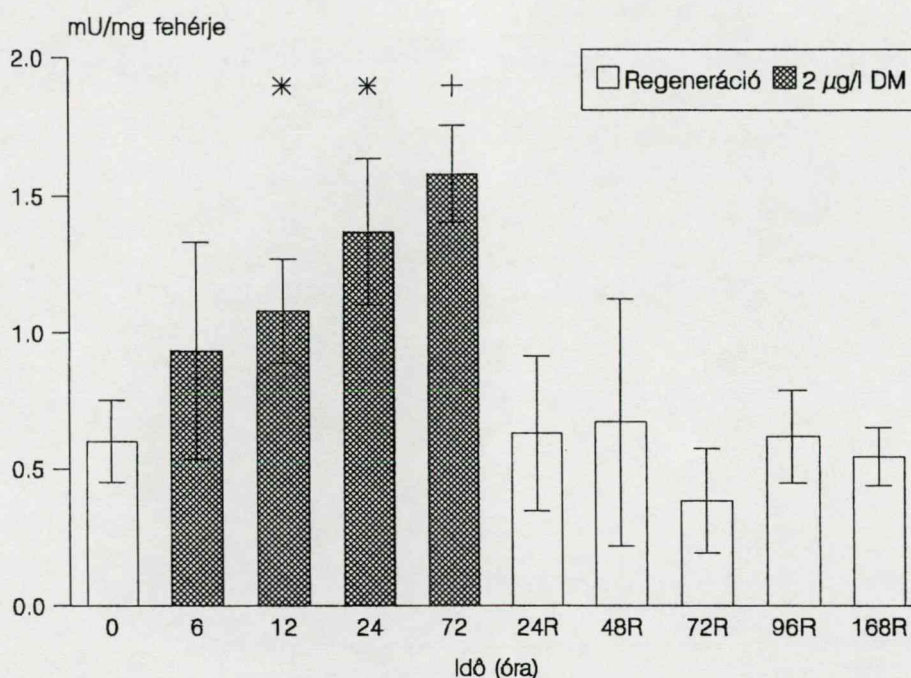
26. ábra AChE molekuláris formák szedimentációs sebességi profilja 1 $\mu\text{g/l}$ DM-nel 20 ± 1 °C-on 3 napig kezelt angolna agyában
Megjegyzés. A kísérleti körülményeket lásd az “Anyagok és módszerek” című fejezetben.

5.2.3 *In vivo* DM kezelés hatása a vér biokémiai paraméterekre

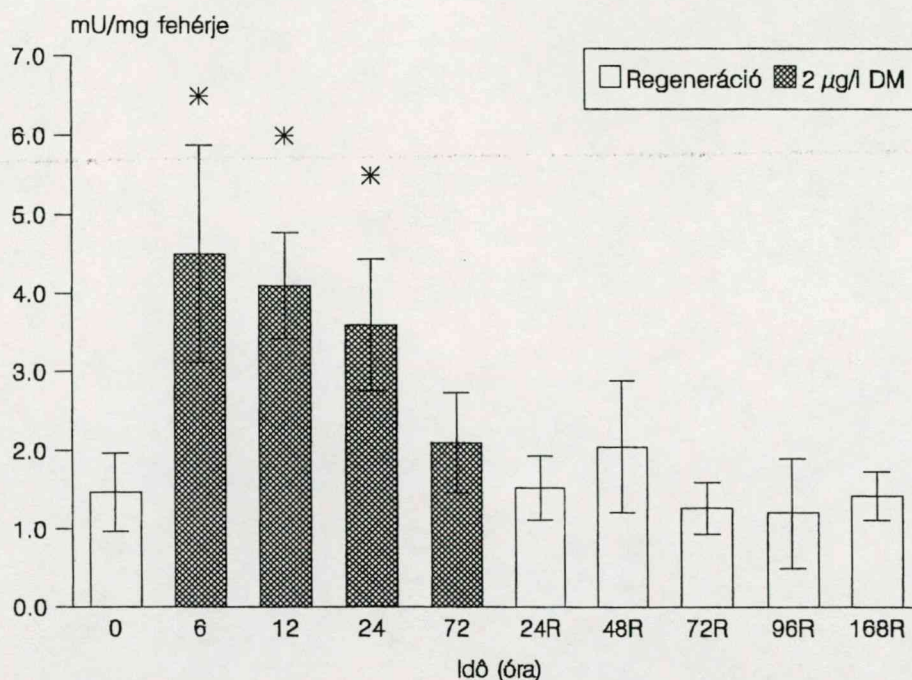
5.2.3.1 *In vivo* DM kezelés hatása a ponty vér biokémiai paramétereire

Az *in vivo* DM kezelés során a pontyokat 3 napig tartottuk 2 $\mu\text{g/l}$ DM (LC_{50} -hez közeli érték) tartalmú vízben, majd tiszta vízbe áttéve vizsgáltuk regenerációjukat diagnosztikai enzimek segítségével. Meghatároztuk a vérszérum AChE, LDH, GOT aktivitását, illetve a vércukorszintet a kontroll és a kezelt állatokban. Az enzimek aktivitásában bekövetkező változások jelzik a szöveti károsodások mértékét (Wrobelksi és La Due, 1955; Kristofferson és mtsai, 1974; Nemcsók és Boross, 1982). Hasonlóan, a vércukorszint emelkedése demonstrálja a metabolikus stressz nagyságát (Wedemeyer, 1970; Nemcsók és Boross, 1982). A kezelés során - különösen az első napon - néhány egyedén az agonizálás jeleit lehetett felismerni. Ezek az állatok az oldalukon feküdtek, igen sűrűn tátogtak, de egyébként meglehetősen mozdulatlanok voltak. Ezek után vizsgáltuk állapotukat a vérből mért diagnosztikai enzimek segítségével. A glutamát-oxálacetát transzamináz (GOT) aktivitása a kezelés időtartama alatt folyamatosan emelkedett. A 3. nap végére a kontroll érték 2.5-szeresére nőtt. A kezelés megszüntetése után azonban 24 órán belül visszaállt az eredeti értékre (27. ábra). Hasonló tendenciáról számol be Reddy és Bashamohideen (1995 a.,b.). Megállapították, hogy a cypermethrinnel kezelt pontyok szöveteiben jelentősen megnő a GOT aktivitás. Ezzel szemben a laktát-dehidrogenáz (LDH) aktivitása a kezelést követő 6. órában volt a legnagyobb (a

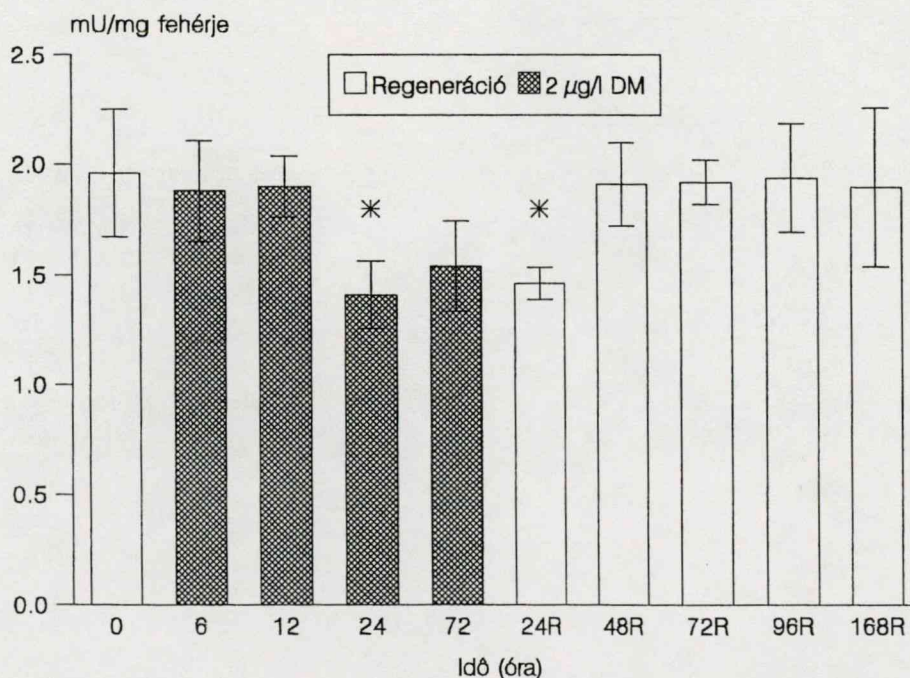
kontroll érték 3-szorosa), majd fokozatosan csökkent (a 72. órában a kontroll érték 1.4-szerese). A kezelés megszüntetése után az enzim aktivitása az eredeti szintre esett vissza (28. ábra). Az AChE aktivitása - némi ingadozással - csökkent a vérben a kezelés folyamán. Ez a paraméter azonban csak 48 óra múlva tért vissza a kontroll értékre (29. ábra). A vércukorszint a kezelés elején jelentősen megemelkedett (a 6. órában a kontroll érték 1.7 szerese), de ez a paraméter is csökkent a kezelés során. A kezelés végeztével a vércukorszint az eredeti érték körül ingadozott (30. ábra).



27. ábra DM kezelés és regeneráció hatása a ponty vérplazma GOT aktivitására
Megjegyzés: A halakat 2.0 µg/l DM-nel kezeltük 3 napig 12 ± 1 °C-on. A GOT aktivitások értékeit mg/fehérjében adtuk meg 6-8 pontyból származó mérés átlagaként (±S.D.). A kezelt halak értékei szignifikánsan különböznek a kontrolltól (Student *t* teszt, *P < 0.05, +P < 0.01), amit a következő szimbólumokkal jelöltünk: * és +. A kísérleti körülményeket lásd az "Anyagok és módszerek" című fejezetben.

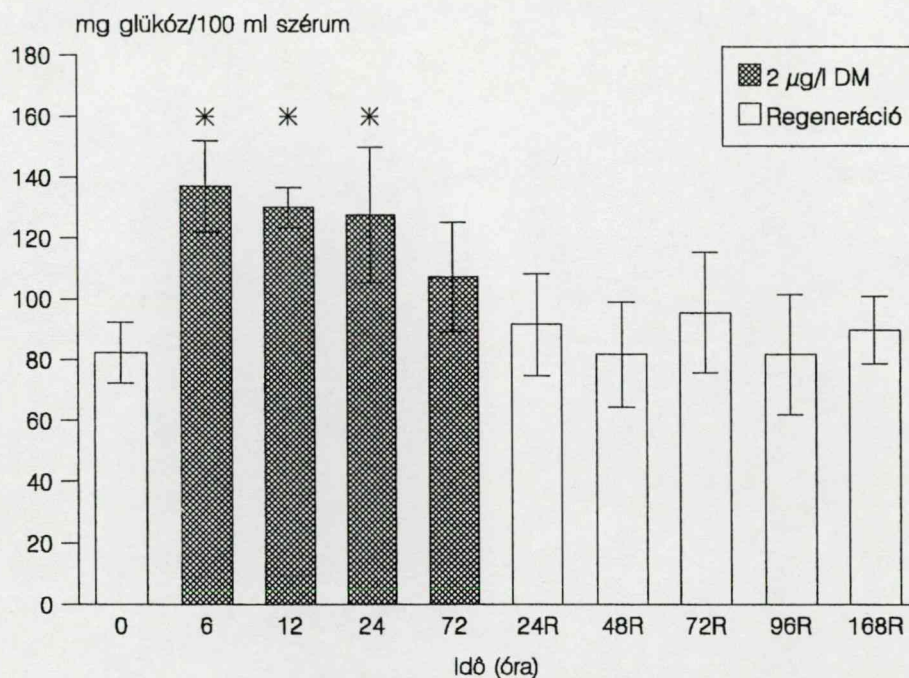


28. ábra DM kezelés és regeneráció hatása a ponty vérplazma LDH aktivitására
Megjegyzés: A halakat 2.0 µg/l DM-nel kezeltük 3 napig 12 ± 1 °C-on. Az LDH aktivitások értékeit mg/fehérjében adtuk meg 6-8 pontyból származó mérés átlagaként ($\pm$ S.D.). A kezelt halak értékei szignifikánsan különböznek a kontrolltól (Student *t* teszt, $P < 0.05$), amit a következő szimbólummal jelöltünk: *. A kísérleti körülményeket lásd az "Anyagok és módszerek" című fejezetben.



29. ábra DM kezelés és regeneráció hatása a ponty vérplazma AChE aktivitására
Megjegyzés: A halakat 2.0 µg/l DM-nel kezeltük 3 napig 12 ± 1 °C-on. Az AChE aktivitások értékeit mg/proteinben adtuk meg 6-8 pontyból származó mérés átlagaként ($\pm$ S.D.). A kezelt halak értékei szignifikánsan különböznek a

kontrolltól (Student t teszt, $P < 0.05$), amit a következő szimbólummal jelöltünk: *. A kísérleti körülményeket lásd az "Anyagok és módszerek" című fejezetben.



30. ábra DM kezelés és regeneráció hatása a ponty vércukorszint alakulására
Megjegyzés: A halakat $2.0 \mu\text{g/l}$ DM-nel kezeltük 3 napig $12 \pm 1^\circ\text{C}$ -on. A vércukorszint értékeit mg/100 ml szérumban adtuk meg 6-8 pontyból származó mérés átlagaként ($\pm\text{S.D.}$). A kezelt halak értékei szignifikánsan különböznek a kontrolltól (Student t teszt, $P < 0.05$), amit a következő szimbólummal jelöltünk: *. A kísérleti körülményeket lásd az "Anyagok és módszerek" című fejezetben.

Eredményeinket összegezve megállapíthatjuk, hogy a GOT és az AChE kivételével valamennyi paraméter szintje a kezelést követő első órákban jelentősen megemelkedik, majd annak során csökken, de a kontroll értéket nem éri el. Ezek a változások jelzik a DM kezelés során a halakban kialakuló stressz nagyságát. A halak a kezelést követően meglehetősen gyorsan (1-2 nap alatt) regenerálódnak, paramétereik a kontroll értékre térnek vissza. A GOT szintjének folyamatos emelkedése viszont az egyre növekvő májkárosodásra utal.

5.2.3.2 *In vivo* DM kezelés hatása az angolna vér biokémiai paramétereire

Hasonló kísérletet végeztünk el balatoni angolnákkal, melyeket $1 \mu\text{g/l}$ DM-nel (LC_{50} -hez közeli érték) kezeltünk 4 napig, majd tiszta vízbe raktuk át őket. Az angolnákból rendszeresen vért vettünk. Mivel az angolnák farki vénájából nem tudtunk vért venni, ezért kénytelenek voltunk szívpunktálással vérmintához jutni. Természetesen ezt a beavatkozást nem éltek túl az állatok. Mivel csak igen behatárolt számú angolnát tudtunk akváriumainkban elhelyezni, ezért - a

staszitikai értékelhetőséget is szem előtt tartva - kénytelenek voltunk ritkábban vért venni az állatokból, mint azt az előző fejezetben leírtaknál tettük.

A GOT érték a kezdeti $1,94 \pm 0,87$ mU/mg-os értékről a kezelés 48. órájában $3,41 \pm 0,40$ mU/mg-ra, a 96. órában $4,79 \pm 0,62$ mU/mg-ra emelkedett (26. táblázat). A kiürülési fázis 24. órájára ez az érték $2,57 \pm 0,51$ mU/mg-ra, a 164. órában $2,14 \pm 0,53$ mU/mg-ra mérséklődött, míg a 188. órában érte el a kontroll szintet ($1,74 \pm 0,75$ mU/mg).

A kezelés hatására az AChE szint - a többi enzimmel ellentétben - némileg csökkent, bár ez a csökkenés nem volt szignifikáns. A kontroll értékhez képest ($1,59 \pm 0,43$ mU/mg) a kezelés 96. órájában $1,34 \pm 0,60$ mU/mg-ra csökkent és ez csak a regenerációs fázis 188. órájában érte el a $1,65 \pm 0,25$ mU/mg-os szintet.

A GOT-hoz hasonló tendenciát mutat az LDH is. A kontroll értékhez képest ($15,71 \pm 4,59$ mU/mg) a kezelés 96. órájában $54,73 \pm 1,79$ mU/mg-ra emelkedett és ez csak a regenerációs fázis 188. órájában érte el a $15,05 \pm 1,25$ mU/mg-os szintet.

A vércukorszintek is követték az enzimszintek változását. A kontroll értékhez képest ($81,36 \pm 23,6$ mg/100 ml) a kezelés 96. órájában $158,8 \pm 18$ mg/100 ml-re emelkedett és ez még a regenerációs fázis 188. órájában is $100,4 \pm 35$ mg/100 ml-es szinten maradt.

	KEZELÉS ALATT			REGENERÁCIÓ ALATT		
	0 h	24 h	96 h	24 h	96 h	188 h
GOT	1,94 ± 0,86	3,41 ± 0,40*	4,79 ± 0,62*	2,57 ± 0,51	2,14 ± 0,53	1,74 ± 0,75
AChE	1,59 ± 0,43	1,55 ± 0,33	1,34 ± 0,60	1,33 ± 0,27	1,45 ± 0,29	1,65 ± 0,25
LDH	15,71 ± 4,59	21,57 ± 2,56*	54,73 ± 1,78*	45,76 ± 2,59*	25,87 ± 2,56*	15,05 ± 1,25
VÉRCUKOR	81,4 ± 23,6	102,6 ± 16,2	158,8 ± 18,0*	150,6 ± 11,6*	129,3 ± 21,6*	100,4 ± 35,0

26. táblázat DM kezelés és regeneráció hatása az angolna vérének néhány biokémia paraméterére

Megjegyzés: A halakat 1.0 µg/l DM-nel kezeltük 4 napig 20 ± 1 °C-on. Az enzimaktivitások értékeit mg/proteinben, míg a vércukorszintet mg/100 ml-ben adtuk meg 4-6 angolnából származó mérés átlagaként (±S.D.). A kezelt halak értékei szignifikánsan különböznek a kontrolltól (Student *t* teszt, *P* < 0.05), amit a következő szimbólummal jelöltünk: *. A kísérleti körülményeket lásd az "Anyagok és módszerek" című fejezetben.

Kísérleti eredményeinket összegezve megállapíthatjuk, hogy az AChE kivételével valamennyi paraméter szintje a kezelést követően jelentősen megemelkedett. A GOT szintjének folyamatos emelkedése az egyre növekvő májkárosodásra utal, míg az LDH aktivitásának növekedése az izomszövetben bekövetkezett káros elváltozásokat jelzi. A vércukorszint emelkedése pedig jelzi a DM kezelés során a halakban növekvő stressz nagyságát. A halak a kezelést követően meglehetősen lassan (kb. 4-8 nap alatt) regenerálódnak, paramétereik csak 188 óra múlva térnek vissza a kontroll értékre.

Összevetve a pontyokon végzett hasonló kísérlet eredményeivel, hasonlóságokat illetve olyan érdekes különbségeket lehet felfedezni, melyeket sem a különböző kezelési koncentrációval (pontyok esetén 2, angolnák esetén 1 µg/l DM), sem pedig a különböző vízhőmérséklettel (pontyok esetén 12 ± 1 °C, angolnák esetén 20 ± 1 °C) nem lehet megmagyarázni. Valószínűbbnek tartjuk, hogy ezen eltérések inkább a két halfaj közötti biokémiai különbségekre vezethetők vissza.

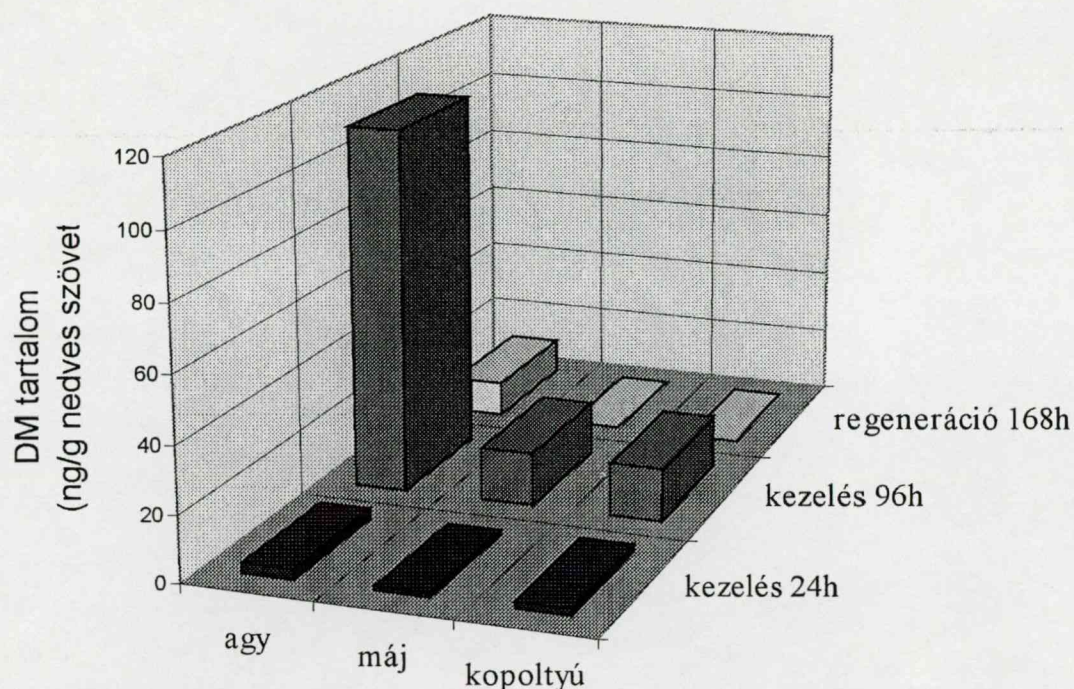
A GOT értéke mindkét kezelés során folyamatosan emelkedett, de az angolnák esetében ez az érték csak a regenerációs fázis későbbi szakaszán éri el a kontroll értéket, szemben a pontyokkal, ahol gyakorlatilag már az első napon visszaáll az eredeti érték. Az AChE-t tekintve mindkét halfaj esetében gyenge (de nem szignifikáns) gátlódásról számolhatunk be.

Ezzel szemben az LDH értékek a ponty esetében a kezelést követő első órákban voltak a legmagasabbak, majd fokozatosan csökkentek. A regeneráció első napján azonban már a normális értékhez közeli LDH értéket mértünk. Ugyanakkor az angolnák esetében egy fokozatosan növekvő LDH értéket figyelhetünk meg és még a regeneráció 96. órájában is a kontroll értékhez képest szignifikánsan magasabb értéket kaptunk. Hasonló különbség figyelhető meg a vércukorszint változásában. Ez a paraméter a ponty esetében is a kezelést követő első órákban volt a legmagasabb, majd fokozatosan csökkent. Már a kezelés 72. órájában sem tudtunk a kontroll értékhez képest szignifikánsan magasabb értéket kimutatni. Ugyanakkor az angolnák esetében egy fokozatosan növekvő vércukorszint értéket figyelhetünk meg és - hasonlóan az LDH-hoz - még a regeneráció 96. órájában is a kontroll értékhez képest szignifikánsan magasabb vércukorszintet mértünk.

5.2.4 A DM akkumulációja különböző szervezetben

5.2.4.1 A DM akkumulációja ponty különböző szerveiben

Vizsgáltuk a szer akkumulációját ponty szerveiben, illetve az onnan történő kiürülést. Kísérletünk során szubletális (1.44 µg/l DM-re vonatkoztatva) kezelést végeztünk 96 óráig, majd halakat tiszta vízbe átrakva egy hét után vizsgáltuk a szer kiürülését. Megállapítottuk, hogy a kezelést követő 24 órában a májban a kezelési koncentrációnak megfelelő (1.35 ng/g nedves szövet), míg az agyban (3.14 ng/g nedves szövet) és kopoltyúban (2.07 ng/g nedves szövet) valamivel nagyobb koncentrációban akkumulálódott a DM. 96 óra eltelte után mind a májban, mind a kopoltyúban az akkumuláció jelentősen meghaladta a kezelési koncentrációt (16.1 ng/g nedves szövet). Az agyban ez az akkumuláció komoly méreteket öltött: a kezelési koncentráció közel 80-szorosára dúsult (110.8 ng/g nedves szövet). Az egy hetes kiürülési periódus alatt a kopoltyúból és a májból a szer teljesen kiürült. Ezzel szemben az agyban a kezelést követő 96. órában mért szermaradványnak több, mint 10%-a még mindig detektálható volt (10.6 ng/g nedves szövet). Eredményeinket összefoglalva a 31. ábra mutatja.

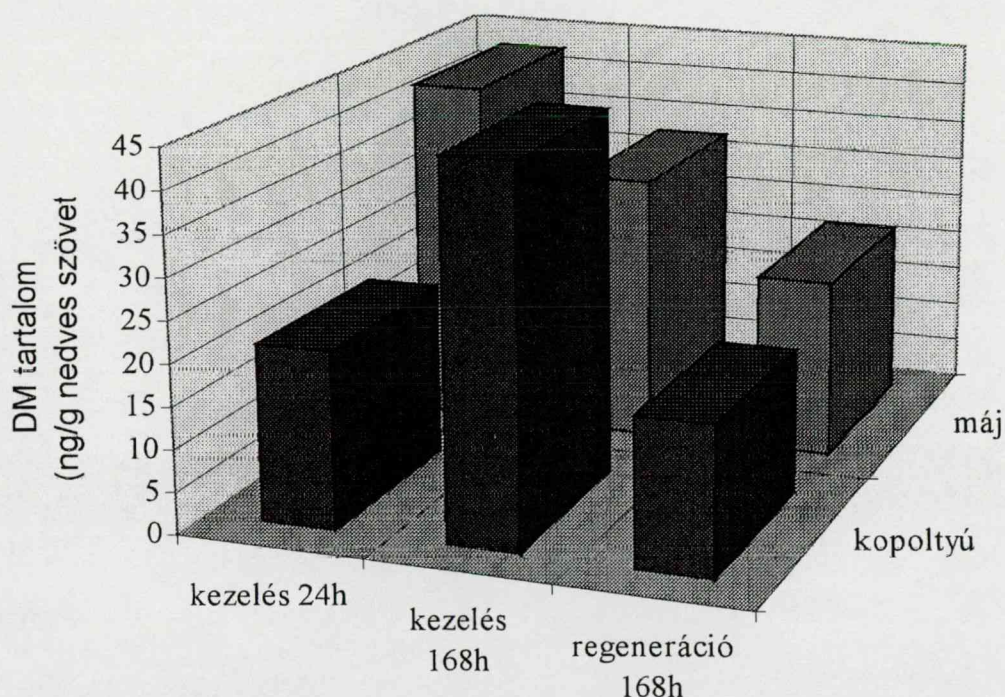


31. ábra. A DM akkumulációja és kiürülése ponty szerveiben

Megjegyzés: A halakat $1.44 \mu\text{g/l}$ DM-nel kezeltük 4 napig $20 \pm 1^\circ\text{C}$ -on, majd ugyan ilyen hőfokú tiszta vízbe tettük át őket egy hétre. A halakból szövetmintákat vettünk adott időpontokban és meghatároztuk ezen szövetek DM tartalmát, melyet ng/g nedves szövet koncentrációban adtuk meg. Eredményeink ezen mérések átlagait mutatják. A kísérleti körülményeket lásd az "Anyagok és módszerek" című fejezetben.

5.2.4.2 A DM akumulációja angolna különböző szerveiben

Kísérletünk során megállapítottuk, hogy a zsírdékony tulajdonsággal rendelkező DM az angolnák szerveiben nagyobb mértékben akumulálódik, mint a ponty esetén. Ennek valószínű oka, hogy az angolna szövetei több zsírt tartalmaznak, mint a ponty szövetei. Az angolna kopoltyúja a 0.5 µg/l (0.5 ng/g)-es kezelés első 24 órája után már 21 ng/g nedves tömeg koncentrációban tartalmazta a DM-t (32. ábra). Ez az érték az egy hetes kezelés végén elérte a 44.8 ng/g nedves szövet értéket. Az egy hetes regenerációs periódus végén vett mintákban is detektáltunk DM szermaradványt 17.5 ng/g nedves tömeg koncentrációban. A májban érdekes módon a legnagyobb szermaradvány értéket a kezelés 24. órájában detektáltuk 42.7 ng/g nedves tömeg koncentrációban. Ettől az időponttól a szermaradvány koncentrációja fokozatosan csökkent, bár a regenerációs fázis 168. órájában is 21,7 ng/g nedves tömeg koncentrációban tartalmazta a DM-t. Sajnos az angolna agyának kis tömege miatt hasonló vizsgálatokat nem tudtunk elvégezni.



32. ábra A DM akumulációja és kiürülése angolna szerveiben

Megjegyzés: A halakat 0,5 µg/l DM-nel kezeltük 4 napig 20 ± 1 °C-on, majd ugyan ilyen hőfokú tiszta vízbe tettük át őket egy hétre. A halakból szövetmintákat vettünk adott időpontokban és meghatároztuk ezen szövetek DM tartalmát, melyet ng/g nedves szövet koncentrációban adtuk meg. Eredményeink ezen mérések átlagait mutatják. A kísérleti körülményeket lásd az "Anyagok és módszerek" című fejezetben.

Érdemes összevetni a DM két halfaj szöveteiben történő relatív akkumulációját (27. táblázat), vagyis azt a viszonyszámot, melyet úgy kapunk, hogy a szövetekben mért szermaradvány koncentrációt elosztjuk a kezelési koncentrációval. Ennek a számolásnak akkor van jelentősége, ha különböző koncentrációjú kezeléseket akarunk összehasonlítani. A táblázatból kitűnik, hogy a DM igen jelentős mértékben akkumulálódik a két halfaj szervezetében. Ponty esetén a vizsgált három szerv közül az agyban dúsul fel legnagyobb mértékben a DM, a kezelési koncentráció több, mint 75-szeresére, míg a másik két szervben csak 11-szeresére. Érdekes, hogy ez a mutató jóval magasabb az angolnák esetében, ahol a DM felhalmozódás akár a kezelési koncentráció 85-90-szeresét is elérheti. Ez az igen jelentős eltérés talán magyarázatot adhat arra, hogy miért tűnnek az angolnák érzékenyebbek a DM mérgezéssel szemben. Okként pedig feltehetőleg az angolna szöveteinek magasabb zsírtartalmát jelölhetjük meg, melyben a lipofil DM igen jól oldódik.

		KEZELÉS 24. h	KEZELÉS 96. h	REGENERÁCIÓ 168. h
PONTY	AGY	2,18	76,96	7,35
	MÁJ	0,94	11,18	0
	KOPOLTYÚ	1,44	11,18	0
ANGOLNA	MÁJ	85,4	65,2	43,4
	KOPOLTYÚ	42	89,6	35

27. táblázat A DM relatív akkumulációs faktora ponty és angolna különböző szerveiben
Megjegyzés. A relatív akkumulációs faktor kiszámításánál a szövetekben detektált és ng/g mértékegységben kifejezett DM tartamát osztottuk el a ng/g mértékegységben kifejezett kezelési koncentrációval.

A DM halakban történő igen jelentős akkumulációját igazoló eredményeink némileg ellentmondásban vannak a szakirodalomban található adatokkal. Caquet és munkatársai (1992) szerint a DM származékok gyorsan eltűnnek a természetes vizekből. Ez egy kétfázisú folyamat, melyben a kezdeti fázis csak kb. 5 percet vesz igénybe laboratóriumi körülmények között (Caquet és mtsai, 1992). Természetes körülmények között a DM féléletideje 2-4 órának adódott halastavakban, és 7 nap múltán már egyáltalán nem is lehetett kimutatni (Muir és mtsai, 1985). Maguire és mtsai (1989) szerint a féléletidő még kisebb, kb. 1 óra, és csak 1%-át találta 24 óra után az eredeti mennyiségnek szabadföldi kísérleti tavakban. A DM akkumulációja a vízi szervezetekben csak átmeneti jellegű és nagyon kis mérvű (Caquet és mtsai, 1992). A WHO megbízásából végeztek kísérleteket törpeharcsával: egy olyan elárasztott

területre helyezték őket, ahol korábban a normális DM dózis tízszeresét használták (WHO, 1990). Habár a DM koncentrációját a tóban $2.19 \mu\text{g/l}$ -nek mérték (háromszorosa az akut 96 órás LC_{50} értéknek ($0.63 \mu\text{g/l}$ törpeharcsa esetén)), egyetlen hal sem pusztult el. Más vizsgálatok szerint (Muir és mtsai, 1985), a DM ugyan akkumulálódott a halakban, de a kezelés befejezése után a szövetek DM tartalma nagyon gyorsan csökkent, s látható mérgezési tünetek nem kísérték az akkumulációt. Ezen kísérletek azt erősítik meg, hogy a DM akkumulációja elhanyagolható a halakban. Ugyanakkor eredményeink épp az ellenkezőjét bizonyítják. Ezen ellentmondás talán feloldható, ha figyelembe vesszük, hogy mi akvárium körülmények között csapvízzel dolgoztunk, míg a fent leírt kísérletek szabadföldiek voltak, tehát természetes, élővízzel végezték el. A DM gyors eltűnése az élővizetből jól magyarázható a szer kitapadásával mindenféle lebegő anyaghoz (iszapszemcsék, algafonalak stb.). Így természetes vizekben nincs annyi idő az akkumulálódásra, mint az akvárium vizében. Tehát a DM szabadföldi használatban nem annyira toxikus, mint az pl. a mi laboratóriumi eredményeinktől is várható lenne.

5.2.5 A DM pontyra és angolnára gyakorolt hatásának összehasonlítása

Ebben a fejezetben a DM pontyra és angolnára gyakorolt hatásának vizsgálatával foglalkoztunk és kerestük a választ arra, hogy mi okozhatja a ponty és az angolna DM iránti érzékenységében megmutatkozó különbséget. Vizsgálataink kiterjedtek a DM *in vitro* AChE gátlásának tipizálására, a szubletális kezelés okozta AChE formamintázat változásra, a vérbiokémiai paraméterek változására, a szer különböző szervekben történő akkumulációjára.

Megállapítottuk, hogy a DM mindkét halfaj agyából származó AChE-t gátolja. Hatását gyorsan kifejti. A gátlás mértéke a koncentráció növekedésével nem lineáris. A gátlás típusa vegyes, ami arra utal, hogy a DM nem közvetlenül befolyásolja az enzim szubsztrátkötő és katalitikus helyét. Az angolna agyból származó AChE némileg nagyobb érzékenységet mutatott a DM-re, mint a ponty agyból származó enzim. Ezt igazolja egyrészt az, hogy kisebb DM koncentráció mellett is nagyobb gátlást tapasztaltunk, mint a pontynál. Másrészt a K_i érték is némiképp kisebb, $11.3 \mu\text{M}$ az angolna és $15.6 \mu\text{M}$ a ponty esetében.

A szubletális kezelés mindkét halfaj esetén csökkentette a szívben mérhető AChE aktivitást. Ez az aktivitás csökkenés súlyos zavarokat okozhat a keringéssel kapcsolatos élettani folyamatokban. Így például csökkenhet az O_2 felvétel, ami anoxiához vezethet (Hughes, 1976). A szubletális kezelés hatására egyes szervek AChE mintázata megváltozott. A ponty májában és az angolna agyában csökkent az A12 formák aránya és nőtt a G4/A4 formáké. Mindez azt sejteti, hogy a DM befolyásolta a formák összeszerelődésének folyamatát, vagy legalábbis megváltoztatta a disszociációs állapotokat.

A vérbiokémiai paraméterek vizsgálata kimutatta, hogy az angolnák vizsgált enzimparaméterei lassabban térnek vissza a normális szintre DM kezelés után, mint a ponty paraméterei. Ez jelzi az angolnák lassabb regenerációját.

A szer akkumulációjára irányuló vizsgálatainkból kiderült, hogy a DM akkumulációja az angolnák szerveiben nagyobb mérvű, mint a ponty szerveiben, ami az angolnaszövetek nagyobb zsírtartalmával magyarázható. Talán ez magyarázatul szolgálhat a két halfaj DM kezelésre adott válaszaiban felmerült különbségekre. Ugyanis kimutatták, hogy a lipofil inszekticidek kopolyún keresztül történő felvétele egyenes arányban áll a szer oktanol:víz megoszlási koefficiensével (a lipofilitás egyik mérőszáma), viszont a szer eliminációja fordítva arányos ezzel a mérőszámmal (Carr és mtsai, 1995), vagyis a lipofil inszekticidek bioakkumulációja magasabb, mint hidrofób társaiké. Már pedig például a lipofil szervesfoszforsav-észterek hosszabban tartó AChE gátlást okoznak, mint a hidrofób társaik (Carr és mtsai, 1995).

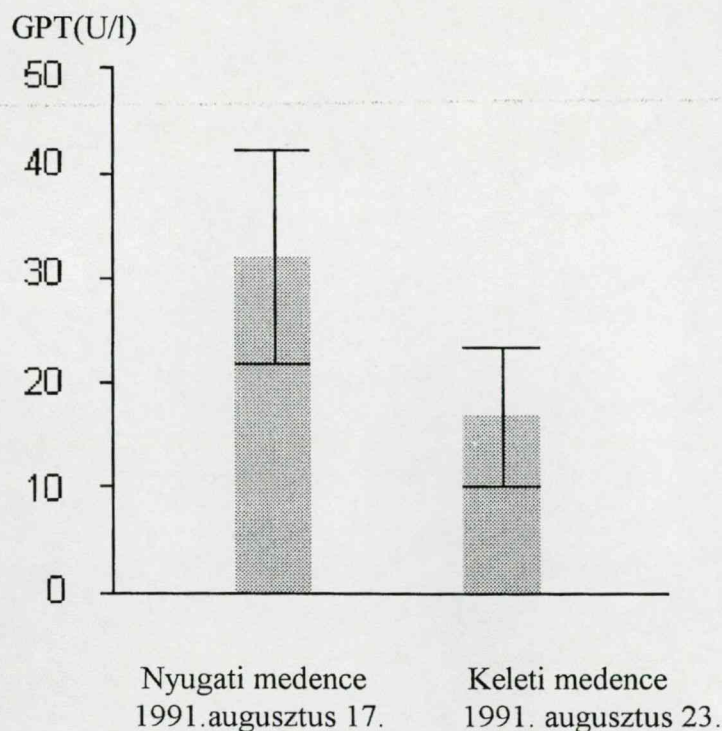
5.3. Az 1991 és 1995 évi balatoni angolnapusztulás összehasonlító vizsgálata

5.3.1 Az 1991 évi balatoni angolnapusztulás vizsgálatának eredményei és ezek értékelése

1991-ben a nyugati medencéből származó angolnák vérbiokémiai paraméterei egyértelműen súlyos szöveti, elsősorban májkárosodást mutattak.

A GOT aktivitása 20 %-kal volt magasabb a nyugati medencéből nyert mintákban (1. táblázat). Egy hónappal a tömeges pusztulás után a GOT aktivitása a szérumban a kontroll szintre csökkent.

Hasonló eredményt találtunk a GPT enzimaktivitására vonatkozóan is, amely a nyugati medencéből származó mintákban 2-szeres értéket mutatott a kontrollhoz viszonyítva (33. ábra). A keleti medencéből származó GOT és GPT értékek is relatív magasak voltak a normál szokásos értékekhez viszonyítva (a tó ezen részén nem volt tömeges angolna pusztulás). Ez azt mutatja, hogy a keleti medencében is szövetnekrózis folyamata indult be a halaknál, azonban ez nem érte el a kritikus szintet.



33. ábra

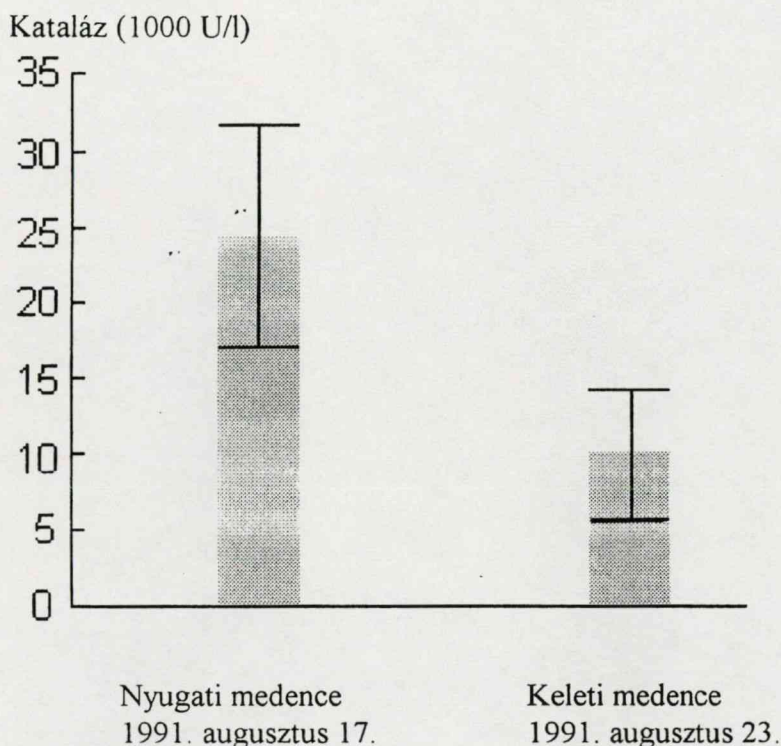
GPT aktivitása az 1991-es tömeges angolnapusztulás helyszínéről (nyugati medence) és a keleti medencéjében összegyűjtött (kontroll) egyedek vérszérumában. Az aktivitások 9 illetve 10 egyedből származó mérések átlagai $\pm$ SD; az enzimaktivitások U/l-ben vannak megadva.

Megjegyzés: a két méréssorozat Student t teszt alapján szignifikáns különbséget mutat ($P < 4 \times 10^{-3}$)

Az AChE aktivitás a vérmintákban 50 %-kal csökkent a kontrollhoz viszonyítva. (28. táblázat) Ez a gátlás még 1 hónappal később a második vizsgálat során is megmaradt. Az AChE gátlása különösen veszélyes a halak szívében, mivel a kolinerg rendszer döntő szerepet játszik a halak szívének beidegzésében (Pennec és Le Bras, 1984): az AChE gátlása fokozza a vágusz tónust, amely a keringési folyamattal kapcsolatos metabolikus folyamatokat kórosan befolyásolja. Ilyen esetben csökken az oxigénfelvétel és a széndioxid leadása, amely szöveti szinten hipoxiát okoz (Hughes, 1976).

Az angolnapusztulás helyszínéről származó szérummintákban jelentősen magasabb volt a vércukor szint (28. táblázat). Ezt azt mutatja, hogy komoly stresszterheltség alatt álltak a halak. Az állandó stressz zavart okoz a γ -globulin és interferonképződésben, illetve szintézisükben, amelyek jelentős szerepet játszanak a különböző fertőzésekkel szembeni védekezésben (Wedemeyer, 1970; Nemcsók és Boross, 1982).

A nyugati régióból származó angolnák úszóhólyagjában mért kataláz aktivitása jelentős mértékben megnövekedett (34. ábra). Ez arra utal, hogy a megnövekedett a szabad gyökök mennyisége a kedvezőtlen környezeti tényezők hatására. Ilyen esetben a megnövekedett szabad gyökök az úszóhólyag szövetsejtjeiben membrán elhaláshoz vezetnek.



34. ábra

A kataláz aktivitása az 1991-es tömeges angolnapusztulás helyszínéről (nyugati medence) és a tó keleti medencéjéből összegyűjtött (kontroll) egyedek úszóhólyagjában. Az aktivitások 9 illetve 10 egyedből származó mérések átlagai $\pm$ SD; az enzimaktivitás 1000 U/l-ben van megadva.

Megjegyzés: a két mérésorozat Student t teszt alapján szignifikáns különbséget mutat ($P < 2 \times 10^{-2}$).

Gönczi, 1991-ben 20 μ g/kg nedves szövetre vonatkoztatva DM típusú szunyogirtószer koncentrációját mutatta ki a nyugati medencéből begyűjtött túlélő angolnák szöveteiből. Mindezek alapján Gönczi azt feltételezte, hogy a tömeges angolnapusztulást a DM okozta (Gönczi 1992).

28. táblázat

GOT, AChE aktivitások és a vércukorszint változása a nyugati medencéből származó agonizáló és a keleti medencéből származó túlélő (kontroll) angolnák vérszérumból az 1991-es angolnapusztulás idején

A minták eredete	GOT (U/l)	AChE (U/l)	vércukor (mg/100 ml)
Nyugati medence 1991. augusztus 17.	261.13±43.13	110.67±14.61	517.74±33.28
Keleti medence 1991. augusztus 23.	198.26±24.03 ^a	278.54±82.67 ^a	383.28±44.15 ^b
Nyugati medence 1991. szeptember 5.	162.49±20.54 ^b	132.21±20.49	182.51±42.65 ^b
Kontroll angolnák 1995. július 24.	154.27±13.34	262.50±21.06	148.96±32.52
Agonizáló angolnák 1995. július 24.	311.86±19.25 ^c	115.68±16.37 ^c	354.12±29.80 ^c

Megjegyzés: Az enzimaktivitások U/l-ben, a vércukorszint mg/100 ml-ben van megadva, amelyek 9-10 egyedből származó mérések átlagai ±SD.

1995-ben a túlélő és az agonizáló egyedeket a pusztulás helyszínéről gyűjtöttük össze (keleti medence).

„a” - a megadott értéket az 1991. augusztus 17-én a nyugati medencében kifogott értékkel hasonlítottuk össze és ezek szignifikáns különbséget mutatnak a Student t teszt szerint ($P < 0,05$)

„b” - a megadott értéket az 1991. augusztus 17-én a nyugati medencében mért értékkel vetettük össze, amely a Student t teszt szerint szignifikáns különbséget mutatott ($P < 0,01$).

„c” - az agonizáló egyedekre vonatkozó értékeket összehasonlítottuk a túlélők értékeivel, amelyek a Student t teszt szerint szignifikánsan különböznek. ($P < 0,01$)

A fenti vizsgálatainkon kívül számos más intézet is próbálkozott annak kiderítésével, hogy mi okozta a nagymértékű angolnapusztulásokat.

1991-ben a Magyar Tudományos Akadémia Állatorvosi Kutató Intézete a fonálféreg fertőzés következtében fellépő úszóhólyagkárosodás szerepét hangsúlyozta. Megállapították, hogy az elpusztult és az agonizáló egyedek úszóhólyagja megtelt folyadékkal és benne 60-80 mm hosszú 30-50 kifejldött fonálférget, valamint 3. és 4. fejlettségi stádiumu lárvákat tartalmaz (Molnár és mtsai, 1991). A kifejlett fonálféreg mellett elpusztult egyedeket is találtak. Sok esetben a papírvékony úszóhólyagból savóval beivódott 3-4 mm-es kötőszövetes hüvely keletkezett, melyben kiterjedt vérzések voltak. Ez az úszóhólyag már nemcsak a funkciójának betöltésére nem volt alkalmas, de még arra sem volt jó, hogy a férgek életben maradjanak

benne. Az ilyen angolna egy defektes szervvel élt, és a legkisebb stresszhatásra is elhullt (Molnár, 1992).

Az Országos Állategészségügyi Intézet, hivatkozván az angolnák nagyarányú fonálféreg fertőzöttségére (60-80 %), illetve az úszóhólyagban talált magas (30-40 db) féregszámra, megállapította, hogy a július-augusztus hónapban lezajlott angolnapusztulást az *Anguillicola crassus* féreg – Európa természetes vizeiben eddig még nem tapasztalt – nagymértékű elszaporodása és az ennek következtében legyengült halakban másodlagosan megtelepedő (a vizekben és halainkon egyébként közönséges) fakultatív patogén baktériumok együttesen okozták. A szokatlan mértékű féregfeldúsulás okaiként környezeti tényezőket jelöltek meg, mint például a Zala folyón érkező tápanyagban gazdag víz, az angolnák nagyobb egyedsűrűsége és az állandóan magas vízhőmérséklet (Csaba és Láng, 1992). Szokolczai szerint a parazitaferőzöttség önmagában nem magyarázza meg az angolnaelhullást. Ő a külső toxikus (a tóba jutott mérgeanyag, algatoxin) vagy belső (hormonális anyagforgalmi) okok következményeként fellépő májkárosodásra hívta fel a figyelmet (Szokolczai, 1992).

Pénzes azt feltételezte, hogy az angolnapusztulás fő oka az *Aeromonas punctata* baktériumfertőzés, amely más stresszforrásokkal együtt hatott a halakra. Ilyen stresszforrás a pusztulás helyén mért magas vízhőmérséklet (19–24 °C), az eutrófizálódott vízminőség, amelyek együttesen hozzájárulhatnak az ún. vöröskórt okozó baktériumok elszaporodásához. Véleménye szerint mindezt az is bizonyítja, hogy az angolnapusztulás megszűnt, amikor a vízhőmérséklet 20° C alá csökkent (Pénzes, 1992).

A mi eredményeink súlyos szöveti, elsősorban májkárosodást mutattak ki, amit az angolnák májáról készült elektronmikroszkópos vizsgálatok is alátámasztottak. A megnövekedett kataláz aktivitás azt mutatta, hogy jelentős mértékben növekedett a szabad gyökök képződése, amely az úszóhólyagot ért fonálféreg fertőzés által okozott gyulladás következménye. A magas vércukorszint világosan mutatta a halak stresszterheltségét. A hosszan tartó AChE gátlás pedig arra bizonyíték, hogy az inszekticideknek is szerepe lehetett az angolnapusztulásban.

A rovarirtószer elméletét támogatta Gönczy is, aki 20 µg/kg nedves szövet DM koncentrációt mért a nyugati medencéből gyűjtött túlélő angolnák agy- és májszövetéből. Feltételezte, hogy ez a peszticid kioldódott a hordozóanyagból és a táplálkozási lánc mentén feldúsult az angolnában. Ezért úgy vélte, hogy a DM az angolnapusztulás oka. Hivatkozott arra, hogy az elhullott angolnák között számos parazitamentes volt, illetve nagy számban fogtak olyan élő egyedeket, amelyekben az élő paraziták száma meghaladta az elhullott angolnák átlagos parazitaferőzöttségét (Gönczy, 1992).

Mindezek alapján látható, hogy nem lehet egyetlen tényezőt kizárólagos okként megnevezni a halpusztulásban. Egyrészt a fonálféreg fertőzés, másrészt pedig a DM is okozhat elhullást.

Vizsgálataink azt mutatják, hogy az angolnapusztulás közvetlen oka a fonálféreg fertőzés volt, annak kialakulását azonban más stresszfactorok gerjesztették, mint a magas víz hőmérséklet, a rossz vízminőség, hipoxiás körülmények és DM együttes hatása.

5.3.2 Az 1995-ös balatoni angolnapusztulás vizsgálatának eredményei és értékelésük

Vizsgálataink során a mért paraméterek ugyanazt mutatták, mint 1991-ben. Az 1995-ös mérések során egyaránt meghatároztuk az agonizáló és a túlélő egyedek biokémiai paramétereit.

A szérumban GOT aktivitása szignifikánsan magasabb volt az agonizáló egyedekben, mint a túlélőkben. (28. táblázat).

A GPT nem mutatott jelentős különbséget a két mérési csoport között.

Az agonizáló egyedekben mért szérumban AChE aktivitása jelentős (60 %-os) gátlást mutatott a másik csoporthoz viszonyítva (28. táblázat).

1995-ben a kataláz helyett LDH aktivitást mértünk. Az agonizáló egyedekben eddig soha nem mért magas aktivitást mutatott az LDH. A megnövekedett LDH aktivitás a stresszes állapotú halak megváltozott metabolizmusát jelzi, amely különösen jellemző az izomsejtekre: a glükogén és a glükóz lebomlása a tejsav irányába tolódik el, amely letális lehet a halak számára (Nakono és Tomlinson, 1967; Simon és mtsai, 1983).

A vércukorszint 2,5-szer magasabb volt az agonizáló egyedekben a túlélőkhöz viszonyítva.

Az agonizáló állatok különböző szerveiben DM tartalmat sikerült kimutatnunk (29. táblázat).

A DM koncentrációja a májban 2,7-18,5 µg/kg nedves súlyra vonatkoztatva volt. A legmagasabb DM koncentrációt a kopoltyúban mutattunk ki (9,0-31,1 µg/kg), míg az izom 3 µg/kg mennyiségben tartalmazott DM-et.

Az angolnapusztulás hat különböző helyszínéről gyűjtött iszapmintában is kimutatható volt a DM jelenléte 5,5-30,0 µg/kg koncentráció nedves mintára vonatkoztatva. Az egy hónappal később megismételt mérések a fenti koncentráció ¼-ét még mindig kimutatták az iszapban.

29. táblázat

Különböző fajok szövetmintáinak, valamint különböző helyszínről származó iszapminták DM tartalma

Vizsgált minták	gyűjtés időpontja	DM tartalom ^a
angolna máj	1991.július 10.	20.0
agonizáló angolna máj	1995. július 24-28.	2.7-18.5
agonizáló angolna kopoltyú	1995. július 24-28.	9.0-31.1
agonizáló angolna vázizom	1995. július 24-28.	3.0
angolna	1995. augusztus 7.	0.1-0.3
dévérkeszeg	1995. augusztus 7.	0.4
fogassüllő	1995. augusztus 7.	2.1
sirály	1995. augusztus 3.	1.1
4. számú mintavételi hely	1995. július 26.	13.0-16.2
5. számú mintavételi hely	1995. július 26.	12.4-30.0
9. számú mintavételi hely	1995. július 26.	19.0-26.6
21. számú mintavételi hely	1995. július 26.	5.6-8.0
4. számú mintavételi hely	1995. augusztus 24.	7.0
5. számú mintavételi hely	1995. augusztus 24.	8.8

Megjegyzés: A megjelölt mintavételi helyek az 1995-ös angolnapusztulás helyszínére esnek. A DM-nel történt permetezés 1995. július 13-14-én történt.

„a” – a megadott koncentrációk µg/kg nedves szövetre, illetve nedves iszapmintára vonatkoznak.

Ismeretes, hogy a piretroidok gyorsan lebomló peszticidek. Nyári vízhőmérséklet mellett természetes vizekben a felezési ideje 72-96 óra a piretroid típusától függően (WHO, 1990). E gyors lebomlás egyik oka, hogy a piretroidok képesek kötődni a lebegő részecskékhez (WHO, 1990). Az iszapban a DM lebomlása főként az üledék jellemző adataitól függ (annak hőmérséklete, szemcsenagysága és levegővel való ellátottsága). Az üledékben történő DM lebomlás relatív hosszú ideig (11-72 napig) tart (WHO, 1990).

1995-ben számos más intézet végzett méréseket az angolnapusztulás okának kiderítésére.

A VITUKI Vízművelődési-védelmi Intézet a július 22-én gyűjtött döglött és 28-án gyűjtött élő, agonizáló és döglött egyedek, valamint július 22-én és augusztus 1-én Balatonfüzfő és Balatonkenese körzetében gyűjtött üledék minták permethrin - a Balatonon július 13-14-én használt Reslin Super ULV szúnyogirtószer hatóanyaga - tartalmát vizsgálták tömegspektrométerrel felszerelt gázkromatográffal.

Vizsgálataik során az alábbi eredményeket kapták: a július 22-én gyűjtött döglött angolnák feji részében $100,0 \mu\text{g} / \text{kg}$ nedves szövet, a 28-án gyűjtött agonizáló angolnák izmában $1,7$; májában $24,0$; és kopolyájában $96,0 \mu\text{g} / \text{kg}$ nedves szövet mennyiségben detektáltak permethrint. Ezek a mért eredmények egy, illetve két nagyságrenddel meghaladták az egészséges, nyíltvízi példányoknál mért $0,5 - 1,0 \mu\text{g} / \text{kg}$ nedves szövet értéket.

Ezen kívül a permethrint a balatonfüzfői parti sáv iszapjából is sikerült kimutatniuk $0,6 \mu\text{g} / \text{kg}$ nedves iszap mennyiségben. Továbbá megállapították, hogy a mintákban talált permethrin *cisz* és *transz* izomereinek aránya megfelel a permetezőszer összetételének.

Az intézet kutatói szerint a Balatonban, de különösen annak felszíni rétegében a szúnyogirtószer akár 1000-szer nagyobb koncentrációban is előfordulhat, mint a víztestben és ebben a régióban a 96 órás LC 50 illetve letális permethrin koncentráció helyi előfordulása sem zárható ki. A szúnyogirtószer angolnára gyakorolt "szelektivitását" a VITUKI munkatársai az angolna azon viselkedésével magyarázzák, hogy azok időnként kidugják fejüket a vízből, és így a víz felszínén úszó, filmszerű bevonatot képező szúnyogirtószerrel közvetlen érintkezésbe kerülnek. Ilyen expozíciós úton az angolnát elérő hatóanyag, fiziológiai és biokémia változásokat indíthat el, amelyeknek eredményeképpen az állat károsodik, vagy elpusztul. Ezt az elméletet támasztja alá a kopolyákban illetve a feji részekben talált magas permethrin tartalom (VITUKI Rt. Vízművelődési-védelmi Intézet, 1995).

Az Állami Népegészségügyi és Tisztiorvosi Szolgálat Pest Megyei Intézete is végzett szermaradvány meghatározást. A halászok által augusztus 7-én, tehát 24 nappal az utolsó K-OTHRIN 1 ULV-val történt permetezés után, fogott angolnákból, keszegekből és süllőből, valamint augusztus 3-án befogott döglött illetve élő sirályból végezték a méréseket. Eredményeik a következők voltak: angolnában $0,12 - 0,32$; keszegekben $0,44$; süllőben $2,14$; az elpusztult sirályban $1,06$; az élő, de "kóválygó" sirályban $0,12 \mu\text{g} / \text{kg}$ nedves szövet mennyiségben találtak deltamethrint. A madarakban talált szermaradvány nem meglepő, hiszen a sirályok előszeretettel fogyasztanak a elhullott haltetekből. Így az angolnában felhalmozódott szer bekerülhetett a velük táplálkozó sirályokba. A rovarirtószeres táplálékláncban ilyen módon történő felhalmozódása már jól ismert jelenség.

A különböző vélemények összefoglalása

Mint láthatjuk, a vélemények megoszlanak az 1995-ös angolnapusztulás okairól. A tudóstábor két részre szakadt a Balatonon használt szúnyogirtószerek szerepének vitájában. Az egyik fél nem tarja valószínűnek, hogy a Balatonban kialakulhatott olyan rovarirtószert koncentráció, amely az angolnák pusztulásához vezetett, hiszen ezeknek a szereknek a felezési ideje vízben 3 - 4 nap. Ők inkább a fonálféreg-fertőzés és az általa okozott úszóhólyagfal megvastagodás mellett teszik le voksukat. Az ellentábor bizonyítottan látja a szúnyogirtószert okozta mérgezést és fő érvként az elpusztult angolnákban, valamint a tó iszapjában detektált, a szakirodalom által is halakra rendkívül toxikusnak tartott rovarirtószert maradványok jelenlétét említi.

Már számos esetben gyanították, hogy Magyarországon néhány halpusztulásért a piretroidok a felelősek (Sályi és Csaba, 1994). Tisztán laboratóriumi körülmények között már bizonyították a piretroidok halakra kifejtett toxikus hatását. A 96 órás LC 50 értékeket 0,4-2,0 µg/l közötti koncentrációban határozták meg (L'Hotellier és Vincent, 1986). Ismeretes, hogy a DM súlyos zavarokat okoz az élő szervezetek neuromuszkuláris folyamataiban (Rose és Dewar, 1983). Elsődleges hatása a Na⁺-ioncsatornák becsukódásának elnyújtása az idegsejtekben. De megfigyelték, hogy a deltamethrin hat a szinapszisok kolin transzportjára és foszforillációs folyamataira (VITUKI Rt. Vízminőség-védelmi Intézet, 1995), az acetil-kolin muscarin és nikotin típusú receptoraira (Vizélettani Laboratórium, Százhalombatta, 1995), valamint képes közvetlenül gátolni az acetilkolin-észteráz enzimet (Pénzes, 1995).

A GABA receptorok szintén gátlódnak. Ezen kívül számos másodlagos hatása van a DM-nek az egész szervezetre nézve.

Korábbi eredményeink azt bizonyították, hogy alacsony koncentráció (1,5 µg/l) DM kezelés erőteljes kolinészteráz bénítást okozott a vizsgált halak szívében, középbelében és vérszérumában (Szegetes és mtsai, 1995). *In vitro* enzimkinetikai vizsgálataink szerint a DM vegyes típusú gátlás szerint bénítja az AChE-t, melynek során a $K_i = 15,6 \pm 2,4$ µM (Bálint és mtsai, 1995.) Megemlíthető, hogy a DM-kezelés szignifikánsan növelte a vércukorszintet és annak GOT, GPT és LDH aktivitását. A kataláz aktivitása 1,5 µg/l DM kezelés során nem változott (Szegetes és mtsai, 1995).

Végzetül 1,0 µg/l DM 96 órás kezelés az angolnák 50 %-ának pusztulását okozta.

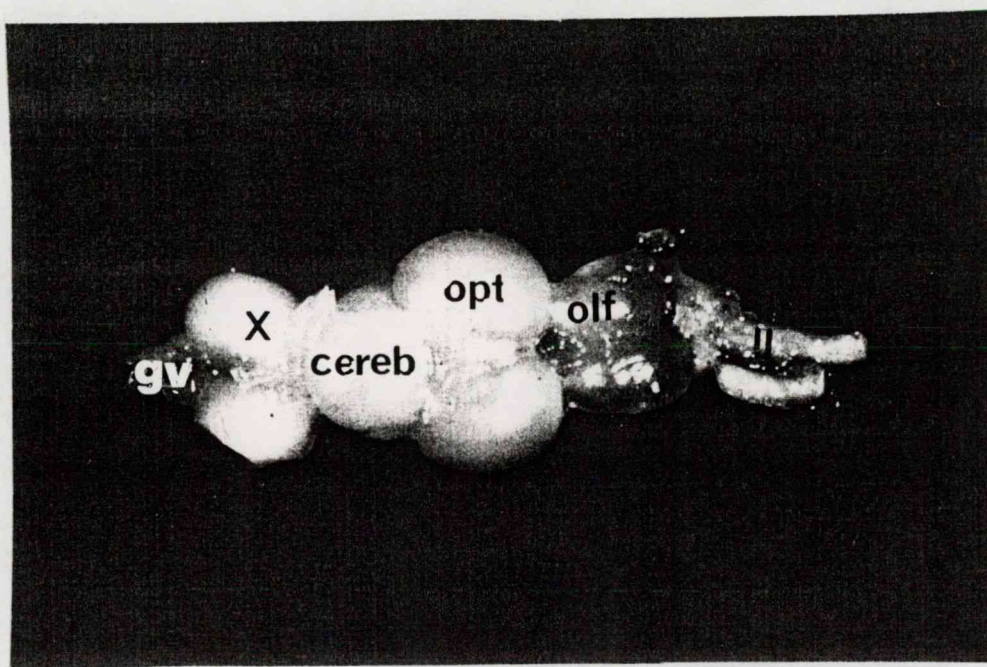
Számos ellentétes vélemény alakult ki a 1991 és 1995-ös angolnapusztulás kapcsán. 1991-ben főként a fonálféreg okozta úszóhólyag-károsodás váltotta ki az angolnák tömeges pusztulását, azonban ehhez hozzájárult a peszticidek és egyéb ökológiai tényezők együttes hatása is (Szegetes és Nemcsók, 1992).

1995-ben a DM volt a fő oka a tömeges angolnapusztulásnak, amelyet az üledékben és a haltetekben mért koncentrációk és a megváltozott biokémiai paraméterek tükröztek.

5.4. A DM hatása a balatoni halfajok Mauthner sejtjeire

5.4.1 A Mauthner sejtek elhelyezkedése a balatoni halfajok agyszövetében

A Mauthner sejtek az agytörzs azon részén találhatók, amely régiót a kisagy borítja. Az ezüst impregnációs vizsgálatok szerint a 2 Mauthner sejt axonja a középvonal felett kereszteződik és a gerincvelőig nyúlik le. A Mauthner sejtek laterális és ventrális dendritjeinél különböző nagyságú és szerkezetű terminális boutonok százai találhatók. A kisagy topográfiáját, amely beborítja a 2 Mauthner sejtet a 35. ábra mutatja be.

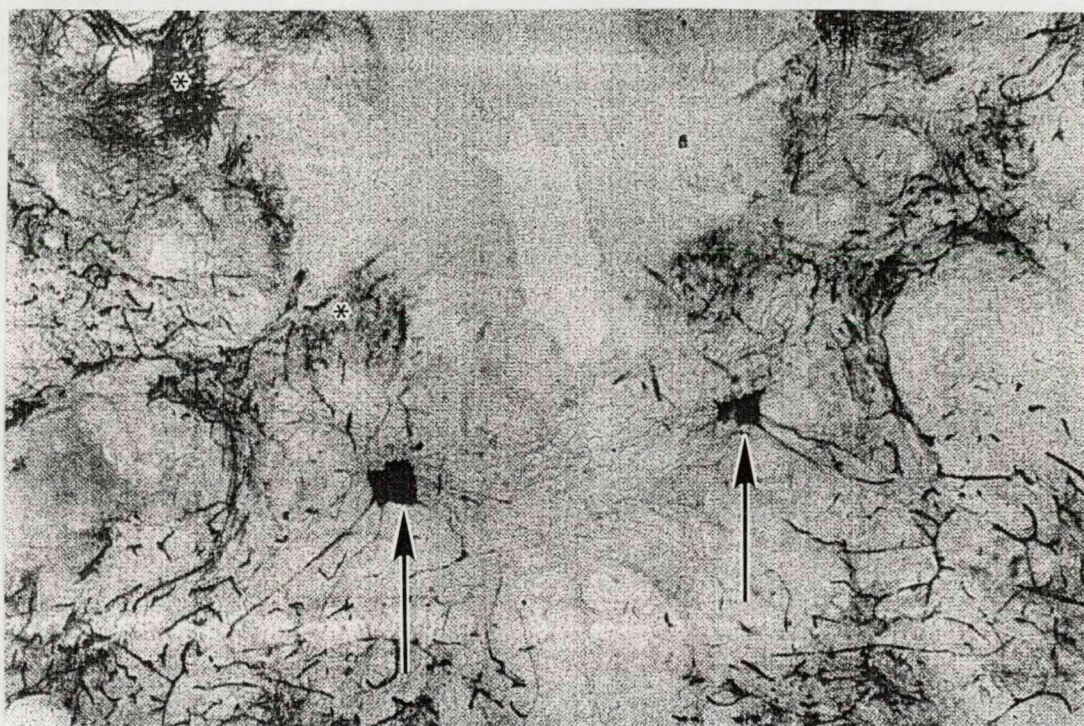


35. ábra

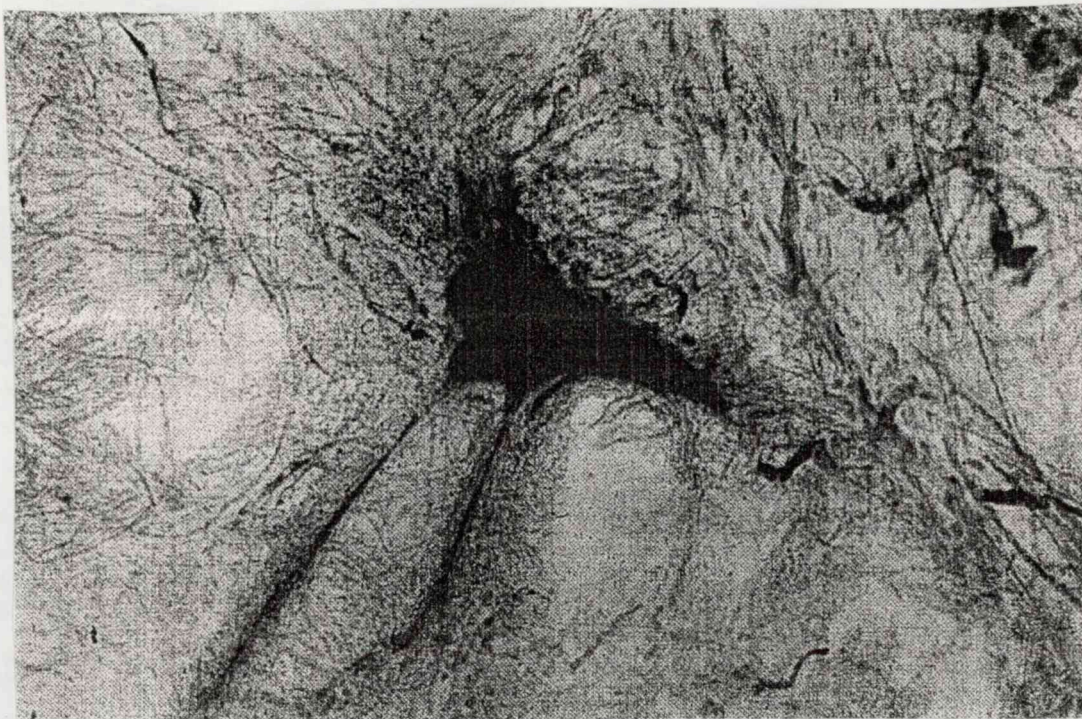
Ponty agyának makroszkópikus fényképe dorsal felől. Baloldalt látható a gerincvelő kezdete (gv), ezt követi a két lobus vagus (X), a kisagy (cerebell), a két lobus opticus (opt) és a szaglógumó (olf). II:n. optici

5.4.2 Az AChE hisztokémiai vizsgálata

Enzimhisztokémiai vizsgálataink egyik legfontosabb eredménye, hogy megegyezően Pfister és munkatársainak (1973), valamint Rhodes és munkatársainak (1986) véleményével, a Mauthner féle óriássejtek valamennyi vizsgált halfajban intenzív AChE aktivitást mutatnak. Ugyancsak AChE aktivitással rendelkeznek főleg a laterális dendriteken végződő nagy bunkószerű végződések, valamint a sejttesten és valamennyi dendriten előforduló kisebb méretű, de ugyancsak kémiai transzmisszió segítségével működő boutonok.

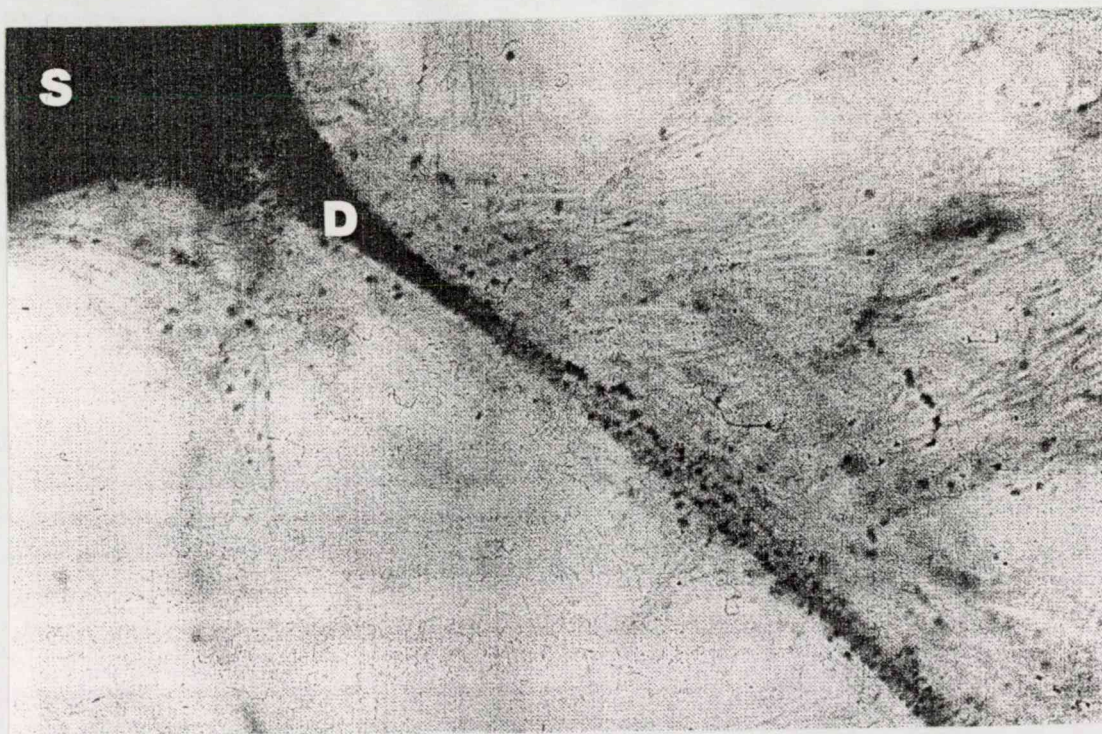


36. ábra A két Mauthner sejt (nyilak) szimmetrikus elhelyezkedése az agytörzs harántmetszetén. Mind a Mauthner sejtek, mind pedig számos axon (csillag) intenzív AChE aktivitást mutat. Ezüstkárász, x 25



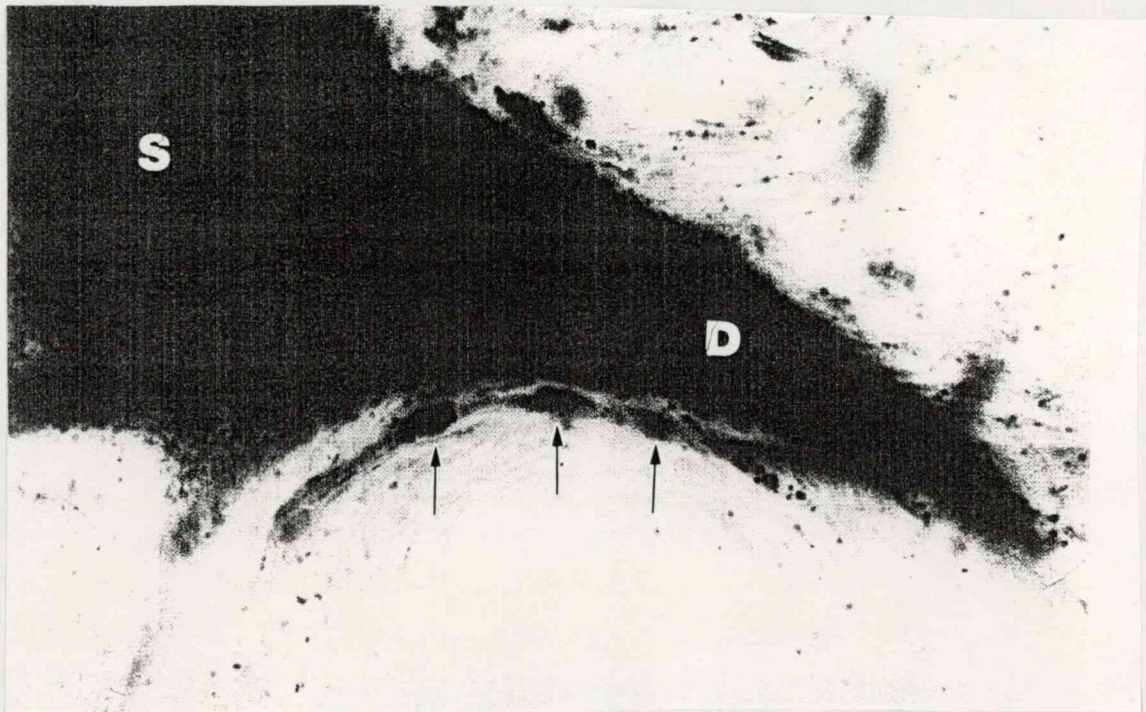
37. ábra

Mauthner sejt AChE aktivitása. Az enzimaktivitás a sejttestre, az axonra, mind pedig a dendritekre kiterjed. Ezüstkárász, x100



38. ábra

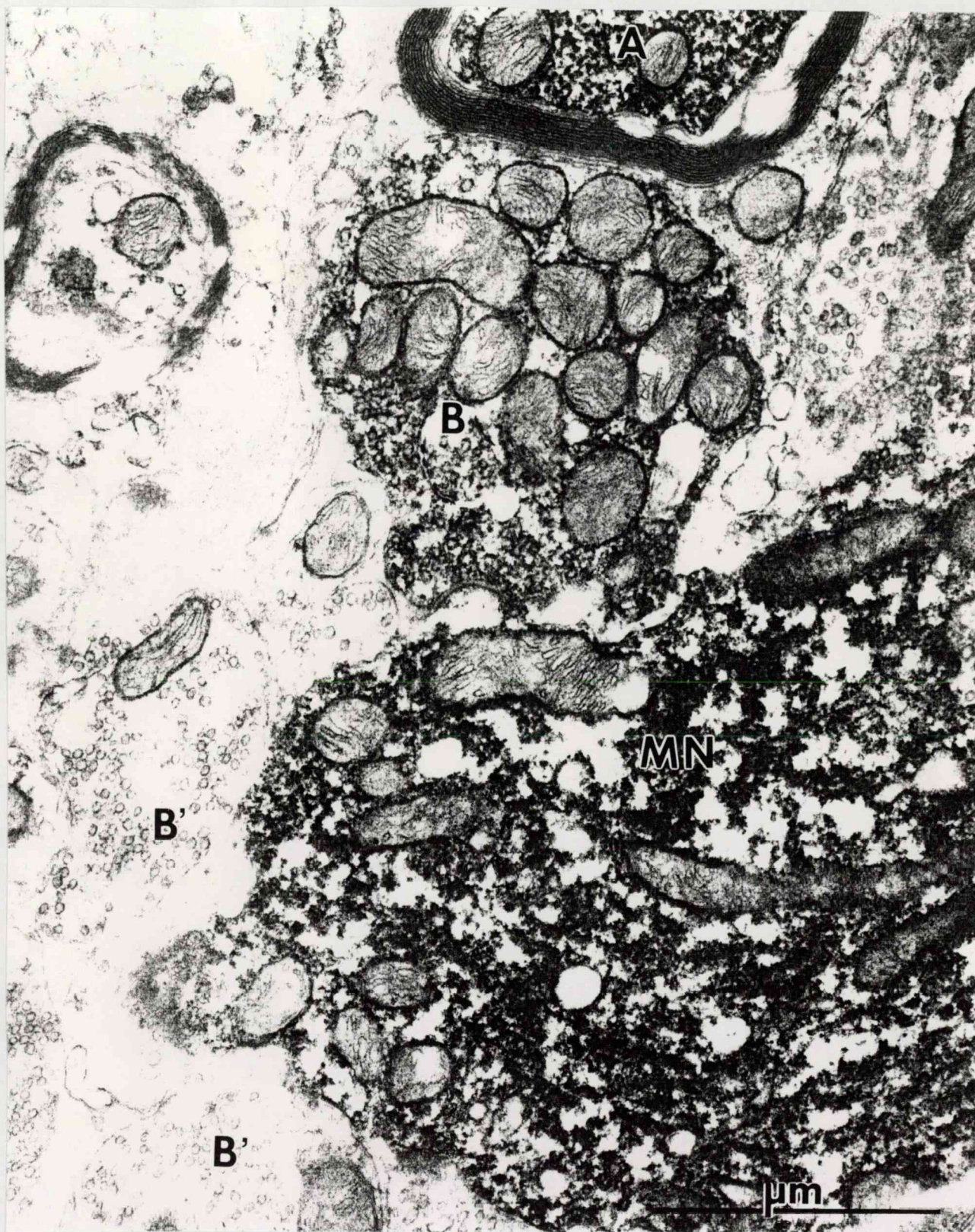
Mauthner sejt sejttestjének (S) és dendritjének (D) AChE aktivitása. Jól megfigyelhető a dendriten szinaptizáló boutonok enzimaktivitása. Ezüstkárász, x 400



39.ábra

Mauthner sejt test (S) és dendrit (D) AChE aktivitása. A dendriten végződő hatalmas, bunkószerű idegvégződések (nyilak) ugyancsak enzimaktivitást mutatnak. Ezüstkárász, x1000

Elektronmikroszkópos szinten az enzimreakció termékeként erős foltok láthatók a perikaryonban és a dendritekben, amelyekben mikrotubulusokat, mikrofilamentumokat és mitokondriumokat is láthatunk.



40. ábra

Mauthner sejt sejtestjének (MN) és axonjának (A) AChE aktivitása elektronmikroszkópos szinten. A sejtestben az enzimreakció az endoplazmás retikulumra (ER) lokalizálódik, míg az axonban kitölti az axoplazmát. A sejtesthez kapcsolódik egy, ugyancsak AChE aktivitású bouton (B), míg két másik bouton (B') nem tartalmaz reakció végterméket. Aranykárász



41. ábra

Mauthner sejt dendritjének (MN) AChE aktivitása elektronmikroszkópos szinten. A dendritben az enzimreakció az endoplazmás retikulumra (ER) lokalizálódik, míg a mitochondriumok (M) reakciómentesek. A dendrithez szinaptikusan kapcsolódik egy, ugyancsak AChE aktivitású bouton (B), míg a másik bouton (B') nem tartalmaz reakció végterméket. Aranykárász

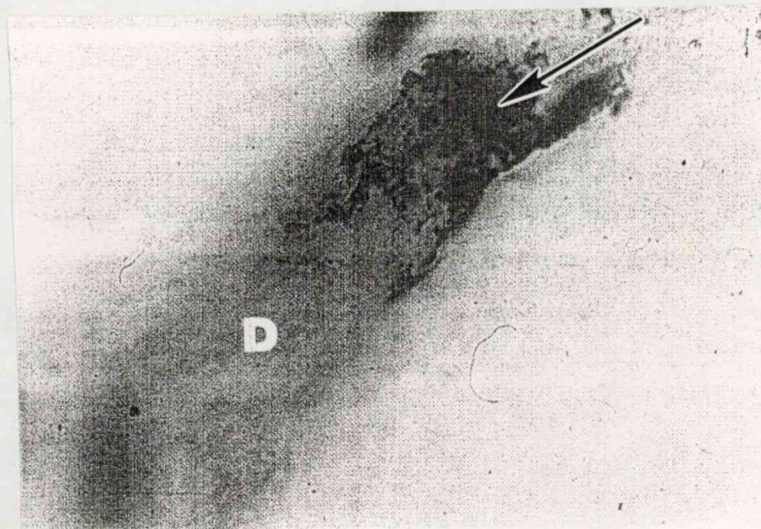
A DM okozta elváltozásokat fény- és elektronmikroszkóppal vizsgáltuk (30. táblázat).

30. táblázat

A vizsgált egyedek száma és a DM hatásának szemikvantitatív meghatározása a Mauthner sejtekre citokémiai és hisztokémiai módszerekkel.

Faj	Kontroll szám	Tömeg (g)	DM-es kezelés sz.	Tömeg (g)	Dózis (mg/l)	Kezelési idő (óra)	Hatás
Ponty	(4)	1200	(9)	1100	1	24	0
		1500		1200	1	48	0
		1650		1250	1	72	+
		1700		1250	1	96	+
				1300	5	72	++
				1300	10	24	++
				1450	10	48	++
				1500	10	72	++
				1700	10	96	++
Ezüst- kárász	(8)	100	(9)	100	1	24	0
		110		110	1	48	++
		115		110	1	72	+
		120		120	1	96	++
		120		125	5	72	+++
		120		125	10	24	+++
		130		125	10	48	++++
		135		130	10	72	++++
				135	10	96	++++
Angolna	(9)	350	(9)	300	1	24	0
		400		350	1	48	+
		420		350	1	72	++
		430		420	1	96	++
		440		440	5	72	++
		440		440	10	24	++
		450		450	10	48	+++
		450		450	10	72	+++
		450		450	10	96	++++
Harcsa	(5)	2010	(9)	2000	1	24	0
		2050		2200	1	48	0
		2050		2250	1	72	+
		2150		2300	1	96	+
		2400		2300	5	72	++
				2300	10	24	+
				2350	10	48	++
				2350	10	72	++
				2400	10	96	++

48 órás *in vivo* DM kezelést követően (1 $\mu\text{g/l}$ DM az akvárium vizében) az AChE aktivitás intenzitása a citoplazmában elkezdett csökkenni és 96 órát követően az AChE gyakorlatilag eltűnt a Mauthner sejt sejttestjéből és dendritjeiből. Magasabb DM koncentráció esetében (5,0-10,0 $\mu\text{g/l}$) 72 órán belül az AChE reakciója teljesen gátlódott a perikaryális és dendritikus területeken.



42. ábra

A Mauthner sejt dendritjének (D) AChE aktivitása megszűnt, míg a rajta végződő szinaptikus boutonok (nyíl) aktivitása változatlan. 5 $\mu\text{g/l}$ DM, 72 óra x100. Ezüstkárász

Ugyanakkor még magasabb DM koncentráció esetében is az AChE reakciója kimutatható a Mauthner sejtek szómájában és dendritjeiben, ahol más idegterminálisokkal lép kapcsolatba. Ez különösen jól látható az elektromikroszkópos felvételeken. (43. ábra)

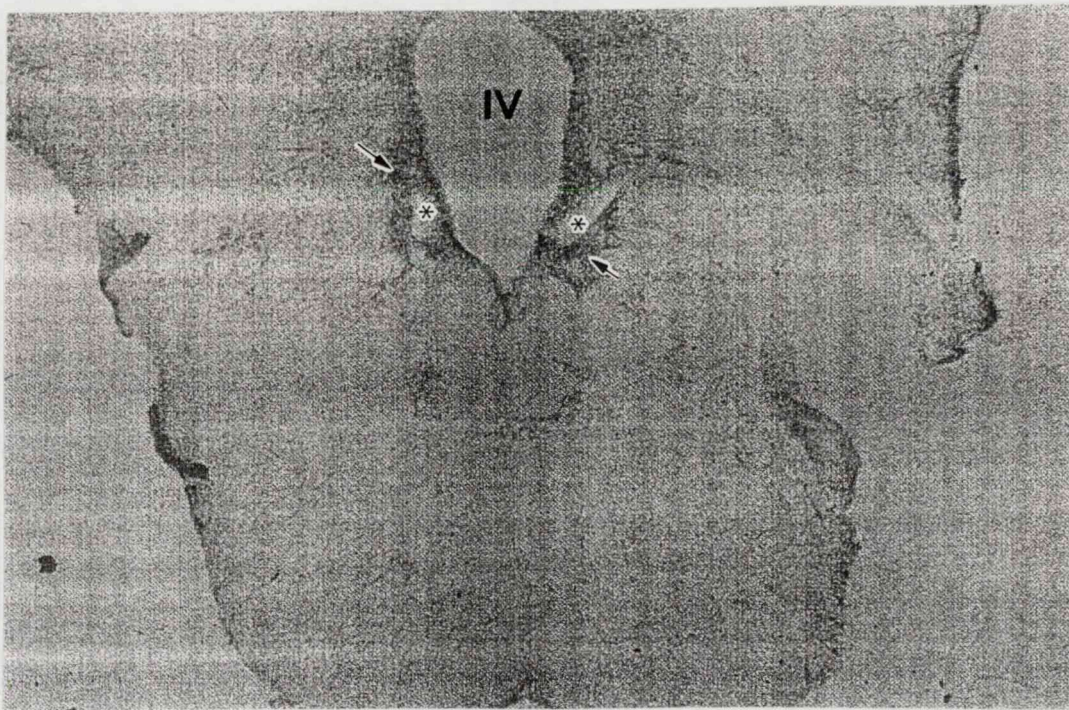


43. ábra

DM kezelés hatása (10 $\mu\text{g/l}$ 24 órás kezelés). A Mauthner sejttestből hiányzik az AChE reakció (MN), míg a bouton (B) erős reakciót mutat. Ezüstkárász

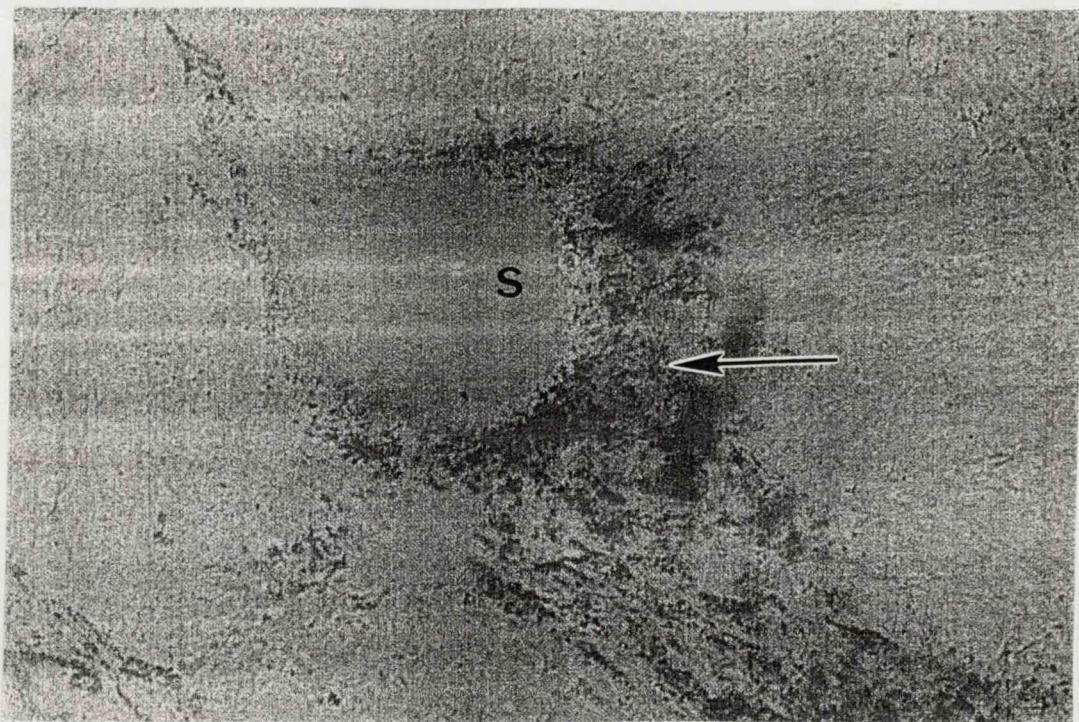
5.4.3 A ChAT hisztokémiai vizsgálata

A Mauthner sejtek Rhodes és mtsai szerint (1986) annak ellenére, hogy AChE aktivitást mutatnak, mégsem tekinthetők kolinerg jellegűnek. Immunhisztokémiai vizsgálataink alapján kitűnik, hogy a Mauthner sejtek perikaryonja és dendritjei nem mutatnak ChAT immunreaktivitást, ami pedig a kolinergiás jelleg alapvető bizonyítéka lenne. Ezzel szemben normál körülmények között a Mauthner sejtek dendritjein vagy sejttestjén végződő boutonok intenzív ChAT immunreaktivitást mutatnak. A különbség a ChAT-t expresszáló boutonok és a ChAT negatív Mauthner sejt sejttestje és dendritjei között feltűnő fénymikroszkópos és elektronmikroszkópos szinten egyaránt.

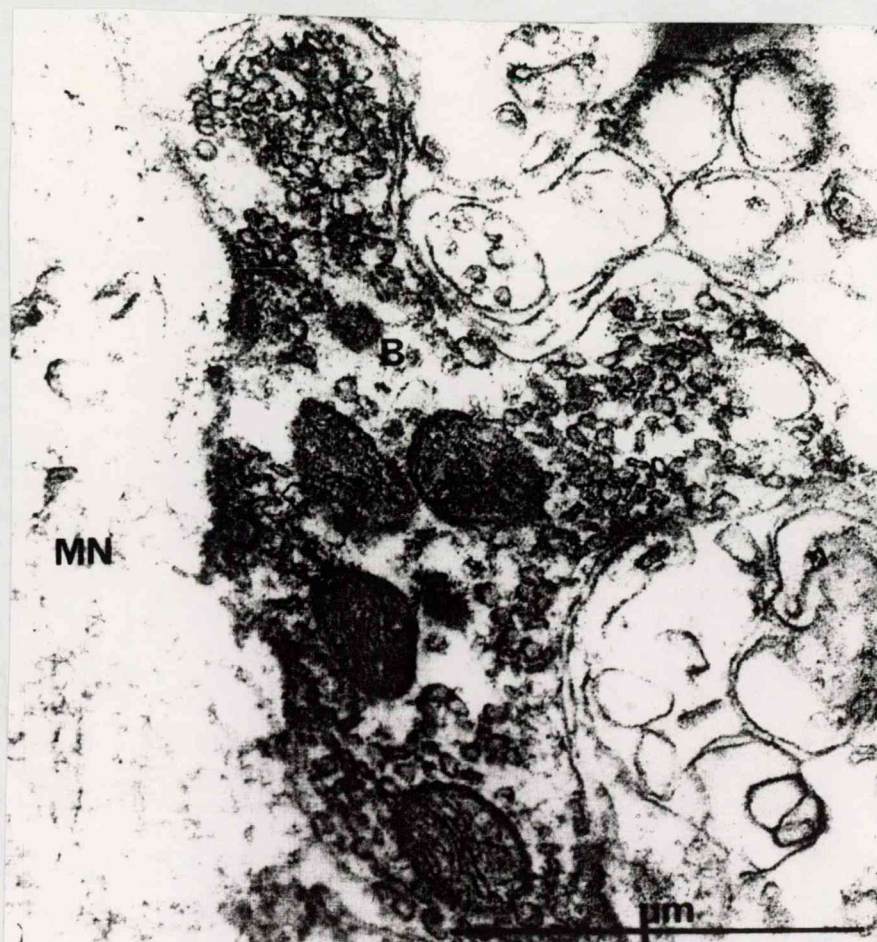


44. ábra

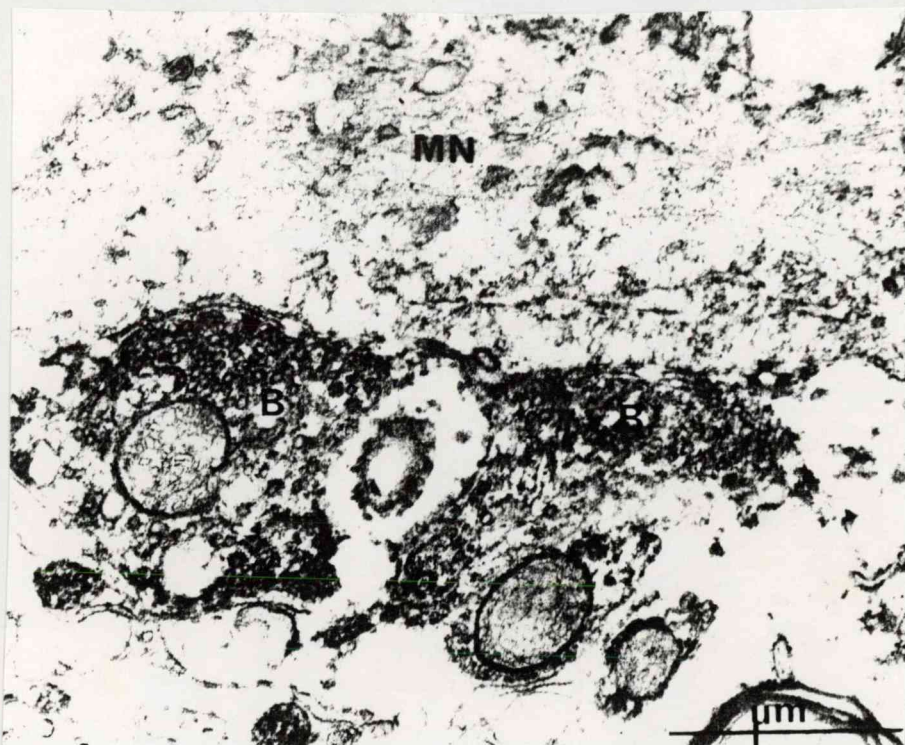
ChAT immunhisztokémiai reakció ezüstkárász agytörzsében. IV: negyedik agykamra. A csillagok a két nem reagáló Mauthner sejtet jelzik, melyeket számos ChAT reaktív idegvégződés (nyilak) vesz körül. x25



45. ábra ChAT a Mauthner sejt enzim-negatív sejttestjét (S) körülvevő dús idegvégződés-csoportban. Ezüstkárász, x400



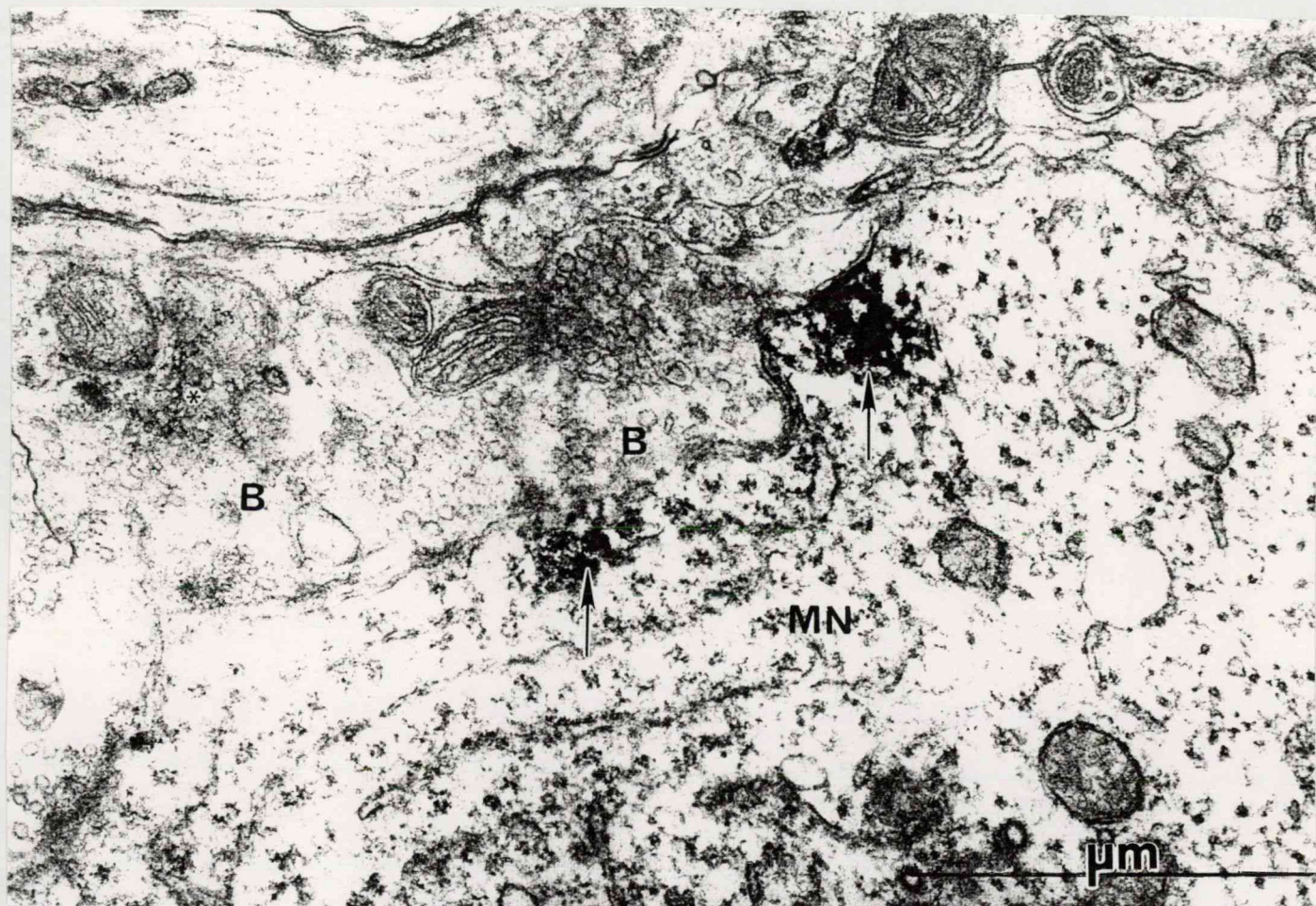
46. ábra
ChAT immunpozitív bouton (B) szinaptizál a Mauthner sejt immun-negatív sejttestjével (MN).
Ezüstkárász



47. ábra

ChAT immunpozitív bouton (B) szinaptizál a Mauthner sejt immun-negatív dendritjével (MN).
Ezüstkárász

A DM-nel kezelt halakban a ChAT nagymértékben lecsökken a normál körülmények között észlelttel szemben.



48. ábra

Elektronmikroszkópos szinten a Mauthner sejten végződő kolinerg szinapszisok ChAT immunreakciója DM kezelés hatására eltűnik. MN: A Mauthner sejt perikaryonja; B: boutonok. A nyilak az idegsejt citoplazmájának igen gyenge, és csak helyenként észlelhető immunpozitivitására mutatnak, amely fénymikroszkóposan egyáltalán nem tűnik elő. Ezüstkárász, DM kezelés (5μg/l, 48 óra) x1000

A ChAT expresszió blokája teljes volt 96 óra intoxikáció után 10 µg/l esetén ezüstkárászban. Alacsonyabb koncentráció vagy rövidebb kezelés esetén a ChAT expresszió csökkenése nem feltűnő.

Az enzim és hisztokémiai vizsgálatok szerint a Mauthner sejtek „kolinerg karaktere” vitatott marad. Phister és mtsai (1973) kimutatták, hogy a Mauthner sejtek mutatják az AChE hisztokémiai reakcióját. Az axonterminálisok is adták az AChE reakciót. Másrészt Rhodes és mtsai (1986) immunohisztokémiai tanulmánya azt mutatta, hogy a Mauthner sejtek nem tartalmaznak ChAT-t. Így ezek a sejtek nem sorolhatók az „kolinerg” közé. Mégis, mivel azon axonterminálisok boutonjai, amelyek kapcsolatban vannak a Mauthner sejtekkel, tartalmaznak ChAT-t, sugallják azt a végkövetkeztetést, hogy a Mauthner sejtek ha nem is kolinerg, de legalább „kolinoceptív”. A Mauthner sejtek óriás axonjai a gerincvelőig nyúlnak le. Ezek axon kollaterálisokon keresztül inerválják a gerincvelői motoneuronokat, amelyek megtalálhatók minden egyes gerincvelői szegmentben. (Robertson és mtsai 1963)

A DM kezelés *in vivo* hatása ezekre a kolinoceptív óriás idegsejtekre nyilvánvaló. A korábbi vizsgálatok (Banka és mtsai, 1997) kimutatták, hogy a DM jelentős hatással van a ponty máj, citokróm P₄₅₀ monooxygenáz rendszerére. Láng és mtsai (1997) vizsgálatai szerint a DM káros hatással van a bél beidegzését végző kolinerg rendszerre. Vizsgálataink szerint valószínűsíthető, hogy a DM jelentős hatással van a mozgásaktivitásért felelős izomzat beidegzésére a Mauthner sejtek kolinerg rendszerének gátlásán keresztül.

A Mauthner sejt afferens innervációjának komplexitását Furshpan és Furukawa (1962), valamint Furukawa és Furshpan (1963) derítette ki. Retzlaff és Fontaine (1960) szerint a két Mauthner sejt reciprokal gátlást fejt ki egymásra. Korn és Faber (1975, 1976) szerint ebben a rendszerben ugyanazok a neuronok végeznek elektromos és kémiai gátlást. Újabban Korn és mtsai (1978 és 1982) kimutatták, hogy míg a Mauthner sejt megindít egy karakterisztikus „startle” (megriasztási) reflexet, amelyet C-startnak neveznek, a nem aktivált Mauthner sejten végződő gátló ideghálózatok, amelyek glicinnel és GABA-val (gamma-amino-vajsavval) működnek, megakadályozzák, hogy ez a sejt ellentmondásos parancsokat adjon ki. Stimulációs kísérletek (Kruk és mtsai, 1997) bizonyítják a csatornák megnyitásához szükséges időtartam receptorokként változik.

A Mauthner sejt szerepét abban az idegi hálózatban, amely a C-start kiváltásáért felelős, legújabban részletesen tanulmányozták (Eaton és mtsai, 1995, 1999). Kimutatták, hogy különböző ingerek, ún. akusztikus, optikus és vibrációs ingerlés, a Mauthner sejt unilaterális aktiválását okozza. Az óriási Mauthner axon, amely a gerincvelő ellenoldalán száll le, az ellenkező oldali motoneuronokat elsősorban axon kollaterálisok révén stimulálja. Ennek eredményeként a motoneuronok a testizomzat gyors és szinkronizált kontrakcióját okozzák,

amely a törzs erős meghajlását váltja ki, amelyet C-start reakciónak neveznek. A másodlagos visszahatást okozó csapás megindítja a halat olyan irányba, amely az okozó ingertől eltávolítja.

Normális körülmények között hanginger hatására a fej az ingerrel ellentétes oldalra fordul, míg a törzs az inger felé domborodik (Eaton és mtsai, 1996), ezáltal a test az ingerre merőleges irányba fordul, míg a törzs és a farok fokozatosan kiegyenesedve követi a fej irányát. A hal végül az inger helyéről gyors iramban eltávolodik. DM-nel (1-5-10 µg/l) 24-72 óra hosszát kezelt állatokon megfigyelhető, hogy a fej elfordulását nem, vagy csak kismértékben követi a törzs konvexitásának kialakulása. Ennek megfelelően az inger helyétől való eltávolodás csak nehezkiesen vagy egyáltalán nem indult meg. Említésre méltó, hogy az utóbbi két évben, amióta a DM-t legalább is részben biológiai szerekekkel, mint pl. a *Bacillus thuringiensis varietas israeliensis* (H-14 szerotípus) helyettesítik a korábbi évekre jellemző halpusztulás megszűnt. 1976-ban kimutatták a fent említett baktériumról, hogy a csipőszúnyogok lárváit elpusztítja. Ezzel a felfedezéssel új, modern és környezetbarát szúnyogirtószer került az emberiség kezébe, amely, ha a megfelelő körülmények között (időpont, dózis, formulázás) alkalmazzák a szúnyogpopuláció 90 %-os csökkenéséhez vezethet.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Kísérleteinkben az öt különböző halfaj (lénai tok, ponty, fehér busa, angolna, lesőharcsa) szerveiben a kolinerg rendszer fontos katalizáló enzimeinek, a DM inszekticid egyik fő támadáspontját képező kolinészterázoknak az eloszlását, aktivitását, típusait, negyedleges szerkezetének felépítését tanulmányoztuk. Elemeztük a deltamethrin hatását két halfajon, az angolnán (*Anguilla anguilla*) és a pontyon (*Cyprinus carpio*). Kísérleteink során vizsgáltuk a deltamethrin különböző szövetek kolinészteráz aktivitására, molekuláris formáinak eloszlására gyakorolt hatását, jellemeztük a gátlás kinetikáját, értékeltük *in vivo* hatását vérbiokémiai paraméterekre, továbbá vizsgáltuk a szer felhalmozódását különböző szövetekben.

Eredményeinket a következőkben foglalhatjuk össze:

1. Megállapítottuk, hogy jelentős eltérések tapasztalhatók az említett halfajok AChE és BuChE aktivitásaiban, az AChE só- és detergens oldható formáinak arányában, illetve az AChE molekuláris formamintázatában. Nem tapasztaltunk hasonlóságot a két rokon halfaj (fehér busa és a ponty) paraméterei között. Ugyanakkor az életmód és az AChE aktivitások közötti összefüggésre utalhat az a tény, hogy a ragadozó halak vázizmában magas AChE aktivitást mértünk. Ez a magas aktivitás a hirtelen nagy erejű izommozgás (pl. az áldozat elkapására irányuló mozgás) szabályzását teszi lehetővé. Jelentős mennyiségű BuChE aktivitást csak a lesőharcsa szívében találtunk. Meglepő kinetikai sajátságokkal rendelkező AChE-t találtunk a lénai tok májában. Az itt található enzim nagyobb sebességgel bontja a BuTCh-I-ot, mint az AcTCh-I-ot.

2. Mi mutattuk ki először, hogy a deltamethrin – melyről a szakirodalom azt tartja, hogy nem gátolja az emlősök AChE-át – *in vitro* körülmények között gátolja a ponty és az angolna agyából származó AChE-t. Mindkét halban viszonylag gyorsan (5-15 perc) csökkenti az AChE aktivitását (40-80%). Klasszikus enzimkinetikai vizsgálatok (Michaelis-Menten kinetika, Lineweaver-Burk vagy Hanes-féle linearizálás) szerint az AChE gátlása vegyes típusú volt, ami arra utal, hogy a vizsgált inszekticid egyaránt befolyásolta az AChE szubsztrátkötő és katalitikus helyét is. Dixon módszerével meghatároztuk a K_I értékeket ($K_{I(\text{ponty})} = 15.60 \mu\text{M}$, $K_{I(\text{angolna})} = 11.3 \mu\text{M}$), amely értékek egyrészt mutatják a már relatíve kis koncentrációban bekövetkező gátlást, másrészt arra utalnak, hogy az angolna agyában található AChE valamelyest érzékenyebb a DM-re, mint a ponty agyában található.

3. A szubletális DM koncentrációval végzett kísérleteink azonban nem mutattak ki számottevő AChE gátlást a szervekben. Pontynál szívben és vérplazmában, angolna esetében a szívben és a vázizmokban mértünk jelentősebb gátlást. A DM kezelés szignifikánsan megváltoztatta az AChE molekuláris formamintázatát a ponty májában és az angolna agyában. A két változásban

hasonlóságot mutat az A12 formák arányának jelentős csökkenése, mely arra enged következtetni, hogy a DM befolyásolja az összetettebb formák stabilitását.

4. A szubletális koncentrációjú DM kezelés során jelentős különbségeket detektáltunk a vérbiokémiai paraméterek időbeni lefutásában a ponty és az angolna esetében. Különösen feltűnő volt, hogy az angolna esetében ezen paraméterek a kezelést követően jóval később térnek vissza a normál értékhez, mint a ponty esetében. Ez - véleményünk szerint - további bizonyítékot jelent arra, hogy az angolna érzékenyebb a DM kezelésre, mint a ponty. Mindenesetre az megállapítható, hogy a DM több biokémiai folyamatot megváltoztatott a halak szervezetében, és így lehetőség nyílik arra, hogy az enzimdiagnosztika segítségével a természetes vizekben szennyezésként megjelenő DM hatását nyomon kövessük.

5. A DM az alkalmazott kezelés során jelentős mértékben halmozódott fel a halak szöveteiben. Ez az akkumuláció különösen nagymértékű volt a ponty agyában. Azonban még nagyobb akkumulációt figyeltünk meg az angolna szöveteiben. Ennek okaként az angolna szöveteinek nagyobb zsírtartalmát jelölhetjük meg. Ugyanis a lipofil tulajdonságú DM jól oldódik az állati zsírban.

6. Megállapíthatjuk, hogy a különböző édesvízi halak kolinerg enzimrendszerében jelentős különbségek mutatkoznak. A ponty és az angolna vizsgált paraméterei különböző mértékben változnak szubletális deltamethrin kezelésre. Véleményünk szerint ezek a különbségek magyarázatul szolgálhatnak a különböző halfajok deltamethrin érzékenységében megmutatkozó különbségekre.

7. Az 1991-es balatoni angolnapusztulás során a Szegedi Tudományegyetem Biokémiai Tanszék eredményei súlyos szöveti, elsősorban májkárosodást mutattak ki, amit az angolnák májáról készült elektronmikroszkópos vizsgálatok is alátámasztottak. A megnövekedett kataláz aktivitás azt mutatta, hogy jelentős mértékben növekedett a szabad gyökök képződése, amely az úszóhólyagot ért fonálféreg fertőzés által okozott gyulladás következménye. A magas vércukorszint világosan mutatta a halak stresszterheltségét. A hosszan tartó AChE gátlás pedig arra bizonyíték, hogy az inszekticideknek is szerepe lehetett az angolnapusztulásban. Tehát nem lehet egyetlen tényezőt kizárólagos okként megnevezni a halpusztulásban. Egyrészt a fonálféreg fertőzés, másrészt pedig a DM is okozhatott elhullást. A vizsgálatok azt mutatták, hogy az angolnapusztulás közvetlen oka a fonálféreg fertőzés volt, annak kialakulását azonban más stresszfaktorok gerjesztették, mint a magas víz hőmérséklet, a rossz vízminőség, hipoxiás körülmények és DM együttes hatása.

8. Az 1995-ös balatoni angolnapusztulás során végzett vizsgálataink alapján bizonyítottnak látjuk a DM mérgezést, amelyet az üledékben és a haltetekben mért koncentrációk és a megváltozott biokémiai paraméterek is tükröznek. A 1995-ös mérések során egyaránt meghatároztuk az agonizáló és a túlélő egyedek biokémiai paramétereit. A szérumban GOT aktivitása szignifikánsan magasabb volt az agonizáló egyedekben, mint a túlélőkben. A GPT nem mutatott jelentős különbséget a két mérési csoport között. Az agonizáló egyedekben mért szérumban AChE aktivitása jelentős (60 %-os) gátlást mutatott a másik csoporthoz viszonyítva. 1995-ben a kataláz helyett LDH aktivitást mértünk. Az agonizáló egyedekben eddig soha nem mért magas aktivitást mutatott az LDH. A megnövekedett LDH aktivitás a stresszes állapotú halak megváltozott metabolizmusát jelzi, amely különösen jellemző az izomsejtekre: a glikogén és a glükóz lebomlása a tejsav irányába tolódik el, amely letális lehet a halak számára (Nakono és Tomlinson, 1967; Simon és mtsai, 1983). A vércukorszint 2,5-szer magasabb volt az agonizáló egyedekben a túlélőkhöz viszonyítva. Az agonizáló állatok különböző szerveiben DM tartalmat sikerült kimutatnunk. E szer koncentrációja a májban 2,7-18,5 µg/kg nedves súlyra vonatkoztatva volt. A legmagasabb koncentrációt a kopolyútkban mutattuk ki (9,0-31,1 µg/kg), míg az izom 3 µg/kg mennyiségben tartalmazta. Megemlíthető, hogy nemcsak az angolna volt az egyetlen faj, amelyben DM-et mértünk. Négy héttel az utolsó DM-mel történt permetezést követően a dévérkeszegben, a fogassülőben és az angolnát fogyasztó sirályban is mérhető volt a DM. A peszticidek ilyen mértékű akkumulációja a táplálkozási lánc során jól ismert. (Salánki és mtsai, 1982). Az angolnapusztulás hat különböző helyszínéről gyűjtött iszapmintába is kimutatható volt a DM jelenléte 5,5-30,0 µg/kg koncentráció nedves mintára vonatkoztatva. Az egy hónappal később megismételt mérések a fenti koncentráció ¼-ét még mindig kimutatták az iszapban.

9. A DM gátolja a ChAT expresszióját azokban a neuronokban, amelyek szinaptizálnak a Mauthner sejtekkel, így feltételezhető, hogy a Mauthner sejtek dendritjein levő ingerlő szinapszisok szinaptikus transzmissziója lecsökken. Az ingerlés hiányának logikus következménye a C-start reakció kiesése. Minthogy a DM a menekülési reakció csökkenését okozza, az intoxikált halak fokozottan ki vannak téve a környezet káros hatásainak. Joggal feltételezhető, hogy az ilyen halak elpusztulnak olyan veszélyes szituációkban, amelyekből normál körülmények között a C-start reakció megvédte volna őket. A DM intoxikáció végeredménye az az endemikus halpusztulás, amelyet az utóbbi évtizedekben a Balaton partjainál megfigyelhattunk.

Kísérleteink eredményei rámutatnak arra, hogy az élő vizekbe bejutó DM milyen káros hatással lehet az ott élő halpopulációra.

7. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

Å	Angström (10^{-10} méter)
AcCh	Acetilkin
AChE	Acetilkin-észteráz
AcTCh-I	Acetiltiokolin-jodid
BuCh	Butirkin
BuTCh-I	Butiriltiokolin-jodid
BuChE	Butirkin-észteráz
BSA	Marha szérum albumin (Bovine serum albumin)
ChAT	Kolin-acetil-transzferáz
ChE	Kolinészteráz (AChE és BuChE)
DM	Deltamethrin ((S)- α -ciano-3-fenoxibenzil-(1R)-cisz-3-(2,2-dibromovinil)-2,2-dimetilciklopropán-karboxilát, $C_{22}H_{19}Br_2NO_3$)
DTNB	5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzoesav)
ECD	Elektronbefogásos detektor
GOT	Glutamát-oxálecetsav transzamináz
GPI	glikoinozitol foszfolipid
GPT	Glutamát-piroszölősav transzamináz
LDH	Laktát dehidrogenáz
M	Mólos oldat (1 mol anyag/l oldat)
N	Normál oldat
NADP	Nikotinsavamid adenin-dinukleotid foszfát
NADPH	NADP redukált alakja
ProTCh-I	Propioniltiokolin-jodid
SOD	Szuperoxid-dizmutáz

8. IRODALOMJEGYZÉK

- Alfei L, Onali A, Caronti B, Valente AM, Medolago-Albani L, Pasqualini C, Denizot JP.(1998).; Phosphorylated and non-phosphorylated neurofilament epitopes are co-distributed in the fish Mauthner axon. *Cell Mol Biol* 44:605-614
- Anglister, L. and Silman, I. (1978) Molecular structure of elongated forms of electric eel acetylcholinesterase. *J. Mol. Biol.*, **125**, 293.
- Anglister, L., Tarrab-Hazdai, R., Fuchs, S. and Silman, I. (1979) Immunological cross reactivity between electric eel acetylcholinesterase and rat-tail-tendon collagen. *Eur. J. Biochem.*, **94**, 25.
- Annon, L. (1971) Photometric determination of LDH activity in blood serum. *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.*, **8**, 658.
- Anselment, A., Fauquet, M., Chatel, J-M., Maulet, Y., Massoulié, J. and Valette, F-M. (1994) Evolution of acetylcholinesterase transcript and molecular forms during development in the central nervous system of the quail *J. Neurochem.*, **62**, 2158
- Asztalos, B. and Nemcsók, J. (1985) Effect of pesticides on the LDH activity and isoenzyme pattern of carp (*Cyprinus carpio* L.) serum. *Comp. Biochem. Physiol.*, **82**, 217.
- Bajgar, J., Bisso, G. M. and Michalek, H. (1995b.) Differential inhibition of rat brain acetylcholinesterase molecular forms by 7-methoxytacrine *in vitro*. *Toxicol. Lett.*, **80**, 109.
- Bajgar, J., Michalek, H. and Bisso, G. M. (1995a). Differential reactivation by HI-6 *in vivo* of paraoxon-inhibited rat brain acetylcholinesterase molecular forms. *Neurochem. Int.*, **26**, 347.
- Bálint T, Szegletes T, Szegletes Z, Halasy K, Nemcsók J. (1995); Biochemical and subcellular changes in carp exposed to the organophosphorous methidation and the pyrethroid deltamethrin. *Aquat Toxicol* 279-295
- Bálint, T., Ferenczy, J., Kátai, F., Kiss, I., Kráczér, L., Kufcsák, O., Láng, G., Polyhos, Cs., Szabó, I., Szegletes, T. and Nemcsók, J. (1997) Similarities and differences between the massive eel (*Anguilla anguilla* L.) devastations that occurred in Lake Balaton in 1991 and 1995. *Ecotoxic. Environ. Safety* **37**, 17.

- Banka L, Deér K.A, Nemcsók J, Ábrahám M. (1997); *In vivo* and *in vitro* effects of deltamethrin on cytochrome P450 monooxygenase activity in the carp (*Cyprinus carpio* L.) liver. *J Environ Sci Health B* 32:789-802
- Barak, D., Kronman, C., Ordentlich, A., Ariel, N., Bromberg, A., Marcus, D., Lazar, A., Velan, B. and Shafferman, A. (1994). Acetylcholinesterase peripheral anionic site degeneracy conferred by amino acid arrays sharing a common core. *J. Biol. Chem.* 269, 6296
- Barets A. (1961); Contribution a l'étude des systemes moteurs „lent” et „rapide” du muscle latéral des téléostéens. *Arch. Anat. Microsc. Morphol. Exp.* 50: 91-187
- Bartelmez GW, Hoerr NL (1933): The vestibular club endings in Ameiurus. Further evidence on the morphology of the synapse. *J. Comp. Neurol.* 57: 401-428
- Bartelmez GW (1915): Mauthner's cell and the nucleus motorius tegmenti. *J. Comp. Neurol.* 25: 87-128
- Beccari N (1908): Ricerche sulle cellule e fibre del Mauthner e sulle loro connessioni in pesci ed anfibi. *Arch. Ital. Anat. E Embryol.* 6: 660-705
- Bell, G.R. (1968) Distribution of transaminases (aminotransferases) in the tissue of Pacific salmon (*Onchorynchus*), with emphasis on the properties and diagnostic use of glutamic-oxalacetic transaminase. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, 25, 1247.
- Berninsone, P., Katz, E., Napp, M. and Azcurra, J. (1989) Acetylcholinesterase and nonspecific cholinesterase activities in rat liver: subcellular localisation, molecular forms, and some extraction properties. *Biochem. Cell. Biol.*, 67, 817.
- 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. *Mutagen.*, 5, 229.
- Bocquené, G., Galgani, F. and Truquet, P. (1990.) Characterization and assay conditions for use of AChE activity from several marine species in pollution monitoring. *Mar. Environ. Res.*, 30, 75.
- Bodian D (1942): Cytological aspects of synaptic function. *Physiol. Rev.* 22: 146-169
- Bodian D (1952): Introductory survey of neurones. *Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol.* 17: 1-13
- Bodian D (1937): The structure of the vertebrate synapse. A study of the axon ending on Mauthner's cell and neighboring centers in the goldfish. *J. Comp. Neurol.* 68: 117-159

- Bon, S. and Massoulié, J. (1976) Molecular forms of *Electrophorus* acetylcholinesterase: the catalytic subunits; fragmentation; intra- and intersubunit disulfide bonds. *FEBS Lett.*, **71**, 273.
- Bon, S., Vigny, M. and Massoulié, J. (1979) Asymmetric and globular forms of acetylcholinesterase in mammals and birds. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 2546.
- Boone, J. S. és Chambers J. E. (1997) Biochemical factors contributing to toxicity differences among chlorpyrifors, parathion, and methyl parathion in mosquitofish (*Gambusia affinis*). *Aquat. Toxic.*, **39**, 333.
- Braun, G. and Mulloney, B. (1994.) Acetylcholinesterase activity in neurons of crayfish abdominal ganglia. *J. Comp. Neurol.*, **350**, 272.
- Burckhardt (1888): Histologische Untersuchungen am Rückenmarke der Tritonen. *Arch. Für Mikrosk. Anat.* **34**
- Cabezas-Herrera, J., Campoy, F. J. and Vidal, C. J. (1994.) Amphiphilic properties of molecular forms of acetylcholinesterase in normal and dystrophic muscle. *J. Neurosci. Res.*, **38**, 505.
- Cajal SR: Histology of the Nervous System. (1904) Translated from the Spanish by L. Azoulay (1911) and from the French by N. Swanson and L.W. Swanson. P. 458. Oxford University Press, New York-Oxford (1995)
- Caquet, T., Thybaud, E., Le Bras, S., Jonot, O. and Ramade, F. (1992) Fate and biological effects of lindane and deltamethrin in freshwater mesocosms. *Aquatic Toxicol.*, **23**, 261.
- Carr, R. L., Straus, D. L. és Chambers, J. E. (1995) Inhibition and aging of channel catfish brain acetylcholinesterase following exposure to two phosphorothionate insecticides and their active metabolites. *J. Toxic. Env. Health*, **45**, 325
- 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 Chem. Toxicol.*, **12**, 173.
- Celio MR (1976): Die Schmidt-Lantemann'schen Einkerbungen der Myelinscheide des Mauthner-Axons: Orte longitudinalen Myelinwachstums? *Brain Res.* **108**: 221-235
- Celio MR, Gray EG, Yasargil GM (1979): Ultrastructure of the Mauthner axon collateral and its synapses in the goldfish spinal cord. *J. Neurocytol.* **8**: 19-29
- Chambers, J. E. és Carr, R. L. (1995) Biochemical mechanisms contributing to species differences in insecticidal toxicity. *Toxicology*, **105**, 291

- Chatel, J-M., Eichler, J., Vallette, F-M., Bon, S., Massoulié, J. and Grassi, J. (1994.) Two-site immunoradiometric assay of chicken acetylcholinesterase: Active and inactive molecular forms in brain and muscle. *J. Neurochem.* **63**, 1111.
- Chatonnet, A. and Lockridge, O. (1989) Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. *Biochem. J.*, **260**, 625.
- Coghill GE (1934): New anatomical relations and probable function of Mauthner's fiber. *Psychiat. En Neurol. Bladen* **38**: 386-391
- Contestabile, A. (1978) Acetylcholinesterase concentration in the optic tectum and in two main cerebellar subdivisions of three freshwater marim teleost. *Brain Res.*, **157**, 182.
- Coppage, D. L. and Braidech, T. E. (1976) River pollution by anticholinesterase agents. *Water Res.*, **10**, 19.
- Coppage, D. L., Matthews, E., Cook, G. H. and Knight, J. (1975) Brain acetylcholinesterase inhibition in fish as a diagnosis of environmental poisoning by malathion O,O-dimethyl-S-(1,2-dicarbethoxy-ethyl). *Pestic. Biochem. Physiol.*, **5**, 536.
- Costa, L. G. (1987) Interaction of insecticides with the nervous system, in "Toxicology of Pesticides: Experimental, Clinical and Regulatory Perspectives" (Costa, L. G., Galli, C. L. and Murphy, S. D., Eds.) pp. 77-91, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg 1987.
- Cremer, J. E. and Seville, M. P. (1985) Changes in regional cerebral blood flow and glucose metabolism associated with symptoms of pyrethroid toxicity. *Neurotoxicol.*, **6**, 1.
- Csaba Gy, Láng M. (1992) Az 1991 évi balatoni angolnapusztulás okának vizsgálata. *Halászat*, **1992/1**, 14-17.
- Csillik B, Nemcsók J, Chase B, Csillik AE, Knyihár-Csillik E. (1999) Infraterminal spreading and extrajunctional expression of nicotinic acetylcholine receptors in the denervated rat skeletal muscle. *Exp Brain Res* **125**:426-434
- Csillik B, Rakic P, Knyihár-Csillik E. (1998) Peptidergic innervation and the nicotinic acetylcholine receptor in the primate basal nucleus. *Eur J Neurosci* **10**:573-585
- Csillik B. (1959) Rapid silver impregnation for demonstrating amyelinate nerve fibers. *Acta Neurovegetativa (Wien)* **1959**> **20**:423-426
- Csillik, B. (1996) Beszámoló „ a Balaton halállományának makroszkópos anatómiai, szövettani, hisztokémiai és elektronmikroszkópos vizsgálata: egy szúnyogirtószer (Deltamethrin) hatásának vizsgálata halak bélidegrendszerén és májában” című témában. *Balaton konferencia*, Veszprém, 1996.

- Diamond J, Gray EG, Yasargil GM: The function of the synaptic spine: an hypothesis. *Excitatory Synaptic Mechanisms*, P. Andersen, J.K.S. Jansen, ed.pp. 213-224. Scandinavian University Books, Oslo (1971)
- Diamond J: The Mauthner cell. *Fish Physiology*. W.S. Hoar, D.J. Randall, ed Vol 5, pp. 265-346. Academic Press, New York (1971)
- Dudai, Y. and Silman, I. (1974) The molecular weight and subunit structure of acetylcholinesterase preparations from the electric organ of electric eel. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **59**, 117.
- Duval, N., Massoulié, J. and Bon, S. (1992.) H and T subunits of acetylcholinesterase from *Torpedo*, expressed in COS cells, generate all types of globular forms. *J. Cell Biol.* **118**, 641.
- Eaton RC, Canfield JG, Guzik AI.(1995) Left-right discrimination of sound onset by the Mauthner system. *Brain Behav Evol* **46**:165-179
- Eaton RC, Lee RKK, Foreman MB. (1999) The identified neuron concept and the behavioral role of the Mauthner cell. In: *Identified Neurons in Model Systems: Twenty Five Years of Progress* (Ed: Leonard JL) Harvard University Press
- Eaton RC, Popper AN. (1995)The octavolateralis system and Mauthner cell: interactions and questions. *Brain Behav Evol* **46**:124-130
- Eells, J. T., Watabe, S., Ogata, N. and Narahashi, T. (1987) The effects of pyrethroid insecticides on synaptic transmission in slices of guinea pig olfactory cortex, in "Toxicology of Pesticides: Experimental, Clinical and Regulatory Perspectives" (Costa, L. G., Galli, C. L. and Murphy, S. D., Eds.) pp. 267-271, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 1987.
- Ellman, G. L., Courtney, D. D., Andres, V. and Featherstone, R. M. (1961) A new and rapid colorimetric determination of AChE activity. *Biochem. Pharmacol.*, **7**, 88.
- Elődi, P. (1983) *Biokémia Akadémiai Kiadó*
- Enan, E. and Matsumura, F. (1993) Activation of phosphoinositide/protein kinase C pathway in rat brain tissue by pyrethroids. *Biochem. Pharmacol.*, **45**, 703.
- 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. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **102**, 456.
- Fernandez, H. L., Moreno, R. D. and Inestrosa N. C. (1996) Tetrameric (G4) acetylcholinesterase: structure, localization and physiological regulation *J. Neurochem.* **66**, 1335

- Flores-Flores, C., Martinez-Martinez, A., Munoz-Delgado, E. and Vidal, C.J. (1996) Conversion of acetylcholinesterase hydrophilic tetramers into amphiphilic dimers and monomers *Biochem. Bioph. Res. Co.*, **219**, 53
- Funch PG, Wood MR, Faber DS (1984): Localization of active sites along myelinated goldfish Mauthner axon: morphological and pharmacological evidence for saltatory conduction. *J. Neuroscience* **4**: 2397-2409
- Furshpan EJ, Furukawa T. (1962) Intracellular and extracellular responses of several regions of the Mauthner cell of the goldfish. *J Neurophysiol* **25**:732-771
- Furukawa T, Furshpan EJ. (1963) Two inhibitory mechanisms in the Mauthner neurons of the goldfish. *J Neurophysiol* **26**:140-176
- Furukawa T, Furshpan EJ: Two inhibitory mechanisms in the Mauthner neurons of the goldfish. *J. Neurophysiol.* **26**: 140-176 (1963)
- Gaál, J., Horváth, Z., Erőss, J. (1980) The effect of organophosphorus compounds on the cholinesterase activity of one summer old carps. *Aquacul. Hung. (Szarvas)*, **2**, 117.
- Galgani, F. and Bocquené, G. (1989) A method for detection of organophosphates and carbamates in sea water. *Environ. Techn. Lett.*, **10**, 311.
- Gant, D. B., Choromanski, J. M. and Weber, L. J. (1984.) A study of tissue acetylcholinesterase in fishes. *Proc. West. Pharmacol. Soc.*, **27**, 213.
- Gautron, J. (1982) Ultrastructural localization of acetylcholinesterase. A direct method for light and electron microscopy. *Histochem.*, **76**, 469.
- Gerebtzoff MA. (1959) Cholinesterases. A Histochemical Contribution to the Solution of some Functional Problems. Pergamon Press, New York
- Ghiasuddin, S. M. and Soderlund, D. M. (1985) Pyrethroid insecticides: potent stereospecific enhancers of mouse brain sodium channel activation. *Pestic. Biochem. Physiol.*, **24**, 200.
- Gill, T. S., Tewari, H. and Pande, J. (1990) Use of fish enzyme system in monitoring water quality: effects of mercury on tissue enzymes. *Comp. Biochem. Physiol. C.* **97**, 287.
- Gorge, G. and Nagel, R. (1990) Toxicity of lindane, atrazine, and deltamethrin to early life stages of zebrafish (*Brachydanio rerio*). *Ecotoxicol. Environ. Safety*, **20**, 246.
- Goronwitsch (1888), cit. Cajal (1904, 1911, 1995) és Korn (1987)
- Gönczy, J. (1992) Adatok és feltételezések az angolnapusztulás körülményeinek tisztázásához. *Halászat*, **1**, 21.
- Graham HT, O'Leary JL (1941)

- : Fast central fibers in fish. Properties of Mauthner and Müller fibers of medullospinal system. *J. Neurophysiol.* 4: 224-242
- Gray EG (1970): The fine structure of nerve. *Biochem. Physiol.* 36, 419-448.
- Greef K (1976): Impulse conduction in a myelinated giant nerve fibre. *Experientia* 32: 756
- Guillon, G. and Massoulié, J. (1976.) Multiplicité des formes moléculaires de l'acétylcholinestérase et acclimatation thermique chez le *Carassius auratus*. *Biochimie*, 58, 465.
- Haas, R., Jackson, B. C., Reinhold, B., Foster, J. D. and Rosenberry, T.L. (1996) Glycoinositol phospholipid anchor and protein C-terminus of bovine erythrocyte acetylcholinesterase: analysis by mass spectrometry and by protein and DNA sequencing *J. Biochem.*, 314, 817
- Habig, C., Digiulio, R. T. and Abou-Donia, M. B. (1988) Comparative properties of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) and blue crab (*Callinectes sapidus*) acetylcholinesterases. *Comp. Biochem. Physiol. C.*, 91, 293.
- Horsberg, T. E., Hoy, T. and Nafstad, I. (1989) Organophosphate poisoning of Atlantic salmon in connection with treatment against salmon lice. *Acta. Vet. Scand.*, 30, 385.
- Hughes, G. M. (1976) Polluted fish respiratory physiology, in "Effects of pollutants on aquatic organism" (Lockwood, A. P. M. (Ed)), pp. 163-183, Cambridge University Press 1976, London.
- Hughes, G. M., Szegetes, T. és Nemcsók, J. (1997) Study of the effects of brief exposure to an organophosphorus insecticide (Methidation) on blood characteristics of carp (*Cyprinus carpio*). *Acta Biol. Hung.* 48 (2), 157
- Inestrosa, N. C., Pérez, C. A. and Simpfendorfer, R. W. (1994.) Sensitivity of acetylcholinesterase molecular forms to inhibition by high $MgCl_2$ concentration. *Biochim. Biophys. Acta*, 1208, 286.
- Koelle GB. (1954) The histochemical localization of acetyl-cholinesterase in the central nervous system of the rat. *J Comp Neurol* 100:211-228
- Koenig E (1978): Molecular biology of the Mauthner axon. *Neurobiology of the Mauthner cell*. D.S. Faber és H. Korn. eds. pp. 167-182 Korn H, Faber DS. An electrically mediated inhibition in goldfish medulla. *J Neurophysiol* 1975; 38:452-471
- Korn H, Faber DS (1975): An electrically mediated inhibition in goldfish medulla. *J. Neurophysiol.* 38: 452-471
- Korn H, Faber DS.(1976) Vertebrate central nervous system: same neurons mediate both electrical and chemical inhibition. *Science* 194:116-1169

- Korn H, Mallet A, Triller A, Faber DS (1982): Transmission at a central inhibitory synapse. II. Quantal description of release, with a physical correlate for binomial $n.J.$ *Neurophysiology* **48**: 679-707
- Korn H, Triller A, Faber DS (1978): Structural correlates of recurrent collateral interneurons producing both electrical and chemical inhibitions of the Mauthner cell. *Proc. R. Soc. Lond. B.* **202**: 533-538
- Korn H. (1987) The Mauthner cell. *Encyclopedia of Neuroscience* Vol. 2 (Ed: G. Adelman). Birkhauser, Boston-Basel-Stuttgart, pp. 617-619
- Krejci, E., Coussen, F., Duval, N., Chatel, J-M., Legay, C., Puype, M., Vandekerckhove, J., Cartaud, J., Bon, S. and Massoulié, J. (1991.) Primary structure of a collagenic tail peptide of *Torpedo* acetylcholinesterase: co-expression with catalytic subunit induces the production of collagen-tailed forms in transfected cells. *EMBO J.*, **10**, 1285.
- 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. *Ann. Zool. Fennici*, **11**, 220.
- Kruk PJ, Korn H, Faber DS. (1977) The effects of geometrical parameters on synaptic transmission: a Monte Carlo stimulation study. *Biophys J* **73**:2874-2890
- Kufcsák, O., Asztalos, B., Nemcsók, J., Götz, K.H. és Juhász, M. (1992) Biomonitoring der Umweltschädigung durch Messungen von biochemischen und physiologischen Parametern bei Fischen. *Zool. Jb. Physiol.* **96**, 1
- Kumaraguru, A. K. and Beamish, F. W. H. (1981) Lethal toxicity of permethrin (NRDC-143) to rainbow trout, *Salmo gairdneri*, in relation to body weight and temperature. *Water Res.*, **15**, 503.
- Láng G, Kufcsák O, Ferenczi J, Nemcsók J, Knyihár-Csillik E, Csillik B. (1997) Effect of a pesticide (Deltamethrin) on the intestinal nervous system and liver of Balaton lake fish. *Neurotoxicology* **18**:876-877
- Laurent, P., Holmgren, S. and Nilsson, S. (1983.) Nervous and humoral control of the fish heart: structure and function. *Comp. Biochem. Physiol.*, **76A**, 525.
- Lawrence, L. J. and Casida, J. E. (1983) Stereospecific action of pyrethroid insecticides on the gamma-aminobutyric acid receptor-ionophore complex. *Science*, **221**, 1399.
- Legay, C., Bon, S., Vernier, P., Coussen, F. and Massoulié, J. (1993.) Cloning and expression of a rat acetylcholinesterase subunit: Generation of multiple molecular forms and complementarity with a *Torpedo* collagenic subunit. *J. Neurochem.*, **60**, 337.

- Leghissa S (1956): Contribution ulterieure a une meilleure connaissance de l'appareil de Mauthner chez les poissons et observations sur la morphologie de la fibre. *International Meeting of Neurobiologists. Progress in Neurobiology*. J. Ariens Kappers, ed. pp. 45-62, Elsevier, Amsterdam
- 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.
- Lowry, O. H., Rosenbrough, N. I., Farr, A. L. and Randall, R. N. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265.
- Lundebye, A. K., Curtis, T.M., Braven, J. és Deplege, M.H. (1997) Effects of the organophosphorus pesticide, dimethoate, on cardiac and acetylcholinesterase (AChE) activity in the shore crab *Carcinus maenas*. *Aquat. Toxic.*, **40**, 23.
- Lwebuga-Mukasa, J. S., Lappi, S. and Taylor, P. (1976) Molecular forms of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*. Their relationship to synaptic membranes. *Biochem.*, **15**, 1425.
- Maquire, R. J., Carey, J. H., Hart, J. H., Tkacz, R. J. and Lee, H. B. (1989) Persistence and fate of deltamethrin sprayed on a pond. *J. Agric. Food Chem.*, **37**, 1153.
- Massoulié, J. and Bon, S. (1982.) The molecular forms of cholinesterase and acetylcholinesterase in vertebrates. *Ann. Rev. Neurosci.*, **5**, 57.
- Matsumura, F. (1988) Deltamethrin induced changes in choline transport and phosphorylation activities in synaptosomes from the optic lobe of squid, *Loligo pealei*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **89**, 179.
- Mauck, W. L., Olsen, L. E. and Marking, L. L. (1976) Toxicity of natural pyrethrins and five pyrethroids to fish. *Arch. Environ. Cont. Toxicol.*, **4**, 18.
- Mayer F: Das Centralnervensystem von Ammocoetes. *Anat. Anz.* **13** [24]: (1897)
- Mehlert, A., Varon, L., Silman, I., Homans, S. W. and Ferguson, M. A. J. (1993) Structure of the glycosyl-phosphatidylinositol membrane anchor of acetylcholinesterase from the electric organ of the electric-fish, *Torpedo californica*. *J. Biochem.*, **296**, 473
- Meuthner L. Untersuchungen über den Bau des Rückenmarkes der Fische. Sitz Ber Kgl Preuss Wiss 1859; 34:312-338
- Molnár, K., Székely, Cs., and Baska, F. (1991). Mass mortality of eel in Lake Balaton due to *Anguillicola crassus* infection. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* **11**,. 211.

- Moretto, A. and Johnson, M. K. (1987) Toxicology of organophosphates and carbamates, in "Toxicology of Pesticides: Experimental, Clinical and Regulatory Perspectives" (Costa, L. G., Galli, C. L. and Murphy, S. D., Eds.) pp. 33-48, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg 1987.
- Muir, D. C. G., Rawn, G. P. and Grift, N. P. (1985) Fate of the pyrethroid insecticide deltamethrin in small ponds: A mass balance study. *J. Agric. Food Chem.*, **33**, 603.
- Nakono, T., and Tomlinson, N. (1967). Catecholamine and carbohydrate concentrations in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) in relation to physical disturbances. *J. Fisheries Res. Board Canada*, **24**, 1701-1715
- Nádasy, M. (1979) Növényvédőszer kémia, Keszthely
- Nakajima Y. (1974): Fine structure of the synaptic endings on the Mauthner cell of the goldfish. *J. Comp. Neurol.* **156**: 375-402
- Narahashi, T. (1984) Nerve membrane sodium channels as the target of pyrethroids, in "Cellular and Molecular Neurotoxicology" (Narahashi, T., ed.), pp. 85-108, Raven press, New York, 1984.
- Nemcsók, J. and Boross, L. (1982a) Comparative studies on the sensitivity of different fish species to metal pollution. *Acta Biol. Acad. Sci. Hung.*, **33**, 23.
- Nemcsók, J. and Hughes, G. M. (1988a) The effect of copper sulphate on some biochemical parameters of rainbow trout. *Environ. Pollut.*, **49**, 77.
- Nemcsók, J., Asztalos, B., Vig, É. and Orbán, L. (1987) The effect of an organophosphorus pesticide on the enzymes of carp (*Cyprinus carpio* L.). *Acta Biol. Acad. Sci. Hung.*, **38**, 77.
- Nemcsók, J., Benedeczky, I., Boross, L., Asztalos, B. and Orbán, L. (1981) Subcellular localization of transaminase enzymes and their signification in the detection of water pollution. *Acta Biol. Szeged*, **27**, 9.
- Nemcsók, J., Orbán, L., Dobler, L. and Szépfalussy, J. (1985) Acetylcholinesterase activity measurements as a tool for demonstrating the possible cause of fish decay. *Acta Biol. Szeged*, **31**, 9.
- 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. *Pest. Biochem. Physiol.*, **37**, 140.

- Nyquist-Battie, C., Dowell, R. T. and Fernandez, H. (1989) Acetylcholinesterase molecular forms in muscle and non muscle cells of rat heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **21**, 987.
- O'Brien (1960) "Toxic Phosphorus Esters". Academic Press, New York, 1960.
- Olson, D. L. and Christensen, G. M. (1980) Effects of water pollutants and other chemicals on fish acetylcholinesterase *in vitro*. *Environ. Res.*, **21**, 327.
- Onishi, T., Murayama, S. (1970) Studies on enzymes of cultivated Salmonoid fishes II. Activities of protease, amylase, arginase, GPT and GOT in various growth stage. *Bull. Tokai Reg. Fish. Res. Lab.*, **63**, 123.
- Palay SL (1956): Synapses in the central nervous system. *J. Biophysic, and Biochem, Cytol.* **2**: 193-
- Pavlov, D. D., Chuiko, G. M., Gerassimov, Y. V. and Tonkopi, V. D. (1992) Feeding behaviour and brain acetylcholinesterase activity in bream (*Abramis brama* L.) as affected by DDVP, an organophosphorus insecticide. *Comp. Biochem. Physiol.*, **103**, 563.
- Pennec, J. P. and Le Bras, Y. M. (1984) Storage and release of catecholamines by nervous endings in the isolated heart of eel (*Anguilla anguilla* L.). *Comp. Biochem. Physiol.*, **1**, 167.
- Pénzes, B. (1977) A hal mint "vízminőség –ellenőr". *Bűvár*, **6**, 257.
- Pénzes, B. (1992) Az angolnák tömeges elhullásának oka – különös tekintettel a nemzetközi irodalomra. *Halászat*. **1992/1**. 13-14.
- Piat J (1956): Further studies on the differentiation and growth of Mauthner's cell in Amblystoma. *J. Exp. Zool.* **113**: 379- (1950)
- Prichard, M. and Linsell, K. (1986) Gem guide to fresh and saltwater fish *William Collins Sons and Co. Ltd*, Glasgow
- Radic, Z., Pickering, N. A., Vellom, D. C., Camp, S. and Taylor, P. (1993). Three distinct domains in the cholinesterase molecule confer selectivity for acetyl- and butyrylcholinesterase inhibitors. *Biochemistry* **32**, 12074
- Rakonczay, Z., Vincendon, G. and Zanetta, J.-P. (1981) Heterogeneity of rat brain acetylcholinesterase: A study by gel filtration and gradient centrifugation. *J. Neurochem.*, **37**, 662.
- Reddy, A. T., Ayyanna, K. and Yellamma, K. (1991) Sensitivity of brain cholinesterase to cypermethrin toxicity in freshwater teleost *Tilapia mossambica*. *Biochem. Int.*, **23**, 959.

- Reddy, P. M. és Bashamohideen, M. (1995a) Alteration in protein metabolism in selected tissues of fish, *Cyprinus carpio*, during sublethal concentration of cypermethrin. *Environ. Mon. Asses.*, **36**, 183.
- Reddy, P. M. és Bashamohideen, M. (1995b) Modulations in the levels of respiration and ions in carp *Cyprinus carpio* (L.) exposed to cypermethrin. *Environ. Mon. Asses.*, **35**, 221.
- Reddy, P. M. és Philip, G. H. (1994) *In vivo* inhibition of AChE and ATPase activities in the tissues of freshwater fish, *Cyprinus carpio* exposed to technical grade cypermethrin. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **52**, 619.
- Reitman, S. and Frankel, S. (1957) A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic acid transaminase. *Am. J. Clin. Pathol.*, **28**, 56.
- Retzlaff E, Fontaine J (1960): Reciprocal inhibition as indicated by a differential staining reaction. *Science* **131**: 104-105
- Retzlaff E (1954): Neurohistological basis for the functioning of paired half-centers. *J. Comp. Neurol.* **101**: 407-445
- Rhodes KJ, Zottoli SJ, Mufson EJ. (1986) Choline acetyltransferase immunohistochemical staining in the goldfish (*Carassius auratus*) brain: evidence that the Mauthner cell does not contain choline acetyltransferase. *Brain Research* **381**:215-224
- Rieger, F., Bon, S., Massoulié, J., Cartaud, J., Picard, B. and Benda, P. (1976) *Torpedo marmorata* acetylcholinesterase; a comparison with the *Electrophorus electricus* enzyme: molecular forms, subunits, electron microscopy, immunological relationship. *Eur. J. Biochem.*, **68**, 513.
- Robertson JD, Bodenheimer TS, Stage DE. (1963) The ultrastructure of Mauthner cell synapses and nodes in goldfish brains. *J Cell Biol* **19**:159-199
- Robertson JD, Bodenheimer TS, Stage DE (1963): The ultrastructure of Mauthner cell synapses and nodes in goldfish brains. *J. Cell Biol.* **19**: 159-199
- Rose, G.P. and Dewar, A.J. (1983) Intoxication with four synthetic pyrethroids fail to show any correlation between neuromuscular dysfunction and neurobiochemical abnormalities. *Arch. Toxicol.*, **53**, 297-316.
- Rosenberry, T. L., Barnett, P. and Mays, C. (1980) The collagen-like subunits of acetylcholinesterase from the eel *Electrophorus electricus*. *Neurochem. Int.*, **2**, 135.
- Salánki, I., Balogh, K. V. and Berta, E. (1982) Heavy metals in animals of Lake Balaton. *Water Res.*, **16**, 1147.
- Sályi, G. és Csaba, Gy. (1994) A halak piretroidmérgezése. *Magy. Állatorv. Lap.*, **49**, 664-670.

- Schalk, I., Ehret-Sabatier, L., Bouet, F., Goeldner, M. and Hirth, C. (1992) Structural analysis of acetylcholinesterase ammonium binding sites. *In: Multidisciplinary Approaches to Cholinesterase Functions* (Safferman, A. and Velan, B., ed.), Plenum Press, New York, pp. 117
- Schirilla, Gy. (1978) A DDT okozhat-e idegrendszeri károsodást? *Növényvédelem*, **8**, 375.
- Schmidt, E and Schmidt, F. W. (1976) Brief guide to practical enzyme diagnosis. *Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim*.
- 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. *J. Environ. Sci. Health B.*, **23**, 387.
- Simon M., J. Nemcsók, L. Boros (1983) Studies on the effect of paraquat on glycogen mobilization in liver of common carp (*Cyprinus carpio* L.) *Comp. Biochem. Physiol.* **75C** No 1, 167-169
- Stein, E. A., Washburn, M., Walczak, C. and Bloom, A. S. (1987) Effects of pyrethroid insecticides on operant responding maintained by food. *Neurotoxicol. Teratol.*, **9**, 27.
- Stenram, U. (1969) The effects of fluorouracil actinomycin D, single and combined, on the nucleolar ultrastructure of various tissue of the rat. *Z. Zellforsch. mikr. Anat.*, **94**, 282.
- Stephenson, R. R. (1982) Aquatic toxicology of cypermethrin. I. Acute toxicity to some freshwater fish and invertebrates in laboratory tests. *Aquatic Toxicol.*, **2**, 175.
- Szabó, A., Nemcsók, J., Asztalos, B., Rakonczay, Z., Kása, P. and Hieu, L. H. (1992) The effect of pesticides on carp (*Cyprinus carpio* L.). Acetylcholinesterase and its biochemical characterization. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, **23**, 39.
- Szabó, A., Nemcsók, J., Kása, P. and Budai, D. (1991.) Comparative study of acetylcholine synthesis in organs of freshwater teleosts. *Fish Physiol. Biochem.*, **9**, 93.
- Szakolczai, J. (1992). Gondolatok az angolnapusztulásról. *Halászat*. **1992/1**, 18-19.
- Szegletes T. és Nemcsók J. (1992) Ökológiai tényezők szerepe az angolnapusztulásban. *Halászat*, **1**, 19
- Szegletes T, Polyhos C, Bálint T, Rady A, Láng G, Kufcsák O, Nemcsók J. (1995) *In vivo* effects of deltamethrin on some biochemical parameters of carp (*Cyprinus carpio* L.). *J Environ Monitoring and Assessment* **35**:97-111

- Tago H, Kimura H, Maeda T. (1986) Visualization of detailed acetylcholinesterase fiber and neuron staining in rat brain by a sensitive histochemical procedure. *J Histochem Cytochem* 34:1431-1438
- Talesa, V., Grauso, M., Giovannini, E., Rosi, G. and Toutant, J-P. (1995). Solubilization, molecular forms, purification and substrate specificity of two acetylcholinesterase in the medicinal leech (*Hirudo medicinalis*). *Biochem. J.*, 306, 687.
- Talesa, V., Principato, G. B., Giovannini, E., Di Giovanni, V. and Rosi, G. (1993.) Dimeric forms of cholinesterase in *Sipunculus nudus*. *Eur. J. Biochem.*, 215, 267.
- Taylor, P. and Lappi, S. (1975). Interaction of fluorescence probes with acetylcholinesterase. The site and specificity of propidium binding. *Biochemistry* 14, 1989.
- Toutant, J-P., Arpagaus, M. and Fournier, D. (1988.) Native molecular forms of head acetylcholinesterase from adult *Drosophila melanogaster*: Quaternary structure and hydrophobic character. *J. Neurochem.*, 50, 209.
- Virág, A. (1981) A mezőgazdasági kemizálás környezetvédelmi összefüggései. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest.
- VITUKI RT Vízminőség-védelmi Intézet (1995) Angolnapusztulás okainak felderítése, peszticid vizsgálat halból és üledékből
- Vizélettani Laboratórium, Százhalombatta (1995) Vizsgálati jelentés az 1995 júliusi balatoni angolnapusztulásról
- Volpe, M. T., Bisso, G. M. and Michalek, H. (1990) *In vivo* and *in vitro* effects of diisopropyl fluorophosphate and paraoxon on individual molecular forms of rat brain acetylcholinesterase. *Neurochem. Res.*, 15, 975.
- Wallace, K. B. and Herzberg, U. (1988) Reactivation and aging of phosphorylated brain acetylcholinesterase from fish and rodents. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 92, 307.
- Wedemeyer G. A. (1970) The role of stress in the disease resistance of fishes. In: Sniesko S. F. (ed) A symposium on diseases of fishes and shellfishes. *Am. Fish. Soc. Spec. Publ.*, 5, 30.
- Weise, C., Kreienkamp, H.-J., Raba, R., Pedak, A., Aaviksaar, A. and Hucho, F. (1990). Anionic subsites of the acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: affinity labelling with the cationic reagent N,N-dimethyl-2-phenyl-aziridinium. *EMBO J.* 9, 3885.
- WHO (1986) Organophosphorus Insecticides: A General Introduction. World Health Organisation, Geneva (Environmental Health Criteria 63).

WHO (1990) Environmental Health Criteria 97: Deltamethrin. Published by WHO, Geneva
(NLM Classification: WA 240)

Wiesinger, M. és Szabó, Z. J. (1978) Halak *Móra Könyvkiadó* ISBN 9631113949

Wrobelski, F. and La Due, J.S. (1985) Serum glutamate oxaloacetate transaminase as an index of liver cell injury. *Proc. Soc. Exp. Biol.*, **90**, 210.

Yasargil GM, Greff NG, Luescher HR, Akert K, Sandri C (1982): The structural correlate of saltatory conduction along the Mauthner axon in the tench (*Tinca tinca* L.): Identification of nodal equivalents at the axon collaterals. *J. Comp. Neurol.* **212**: 117-124

Young JZ (1982): Giant nerve fibers. *Encyclopedia of Neuroscience* (Ed: G. Adelman) Vol. I. p. 461. Birkhauser, Boston-Basel-Stuttgart (1987)

Zamboni L, De Martino C. (1967) Buffered picric acid-formaldehyde: a new, rapid fixative for electron microscopy. *J Cell Biol* **35**:148A

Zhu, K. Y. and Clark, J. M. (1994.) Purification and characterization of acetylcholinesterase from the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say). *Insect Biochem. Molec. Biol.*, **24**, 453.

Zitko, V., McLeese, D. W., Metcalfe, C. D. and Carson, W. G. (1979) Toxicity of permethrin, decamethrin, and related pyrethroids to salmon and lobster. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **21**, 338.

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretnék köszönetet mondani:

Prof. Nemcsók János tanszékvezető egyetemi tanárnak és férjemnek, hogy bízott, hasznos tanácsaival munkámat segítette és az ehhez szükséges kísérleti hátteret biztosította.

Dr. Szegletes Tivadarnak és Dr. Bálint Tamásnak, akik a mindennapi kísérletes munkámban közvetlen segítségemre voltak és akiktől igen sokat tanultam.

Prof. Pungor Ernőnek, a Bay Zoltán Alkalmazott Kutatási Alapítvány főigazgatójának és Dr. Kálmán Miklósnak, a Bay Zoltán Alkalmazott Kutatási Alapítvány Biotechnológiai Intézet igazgatójának, hogy tanulmányaimhoz ösztöndíjat biztosítottak.

Ábrahámné Dr. Gulyás Magdolnának, tanszékvezető egyetemi docensnek, aki munkámat szakmai tanácsokkal segítette.

Prof. Csillik Bertalannak, aki a Mauthner sejttel kapcsolatos kísérletes munka kivitelezését irányította és segítette.

Tury Zemirának, aki a mindennapi kísérletes munkámat segítette.

Dr. Tóth Imre, egyetemi tanárnak és Dr. Szécsi Mihály, tudományos segédmunkatárnak, akik lehetővé tették, hogy az intézetükben dolgozzam.

Dr. Koleszár Zsuzsának, aki a dolgozat összeállításában segítségemre volt.

A Bay Zoltán Alkalmazott Kutatási Alapítvány Biotechnológiai Intézet Biomonitoring munkacsoportja és a Szegedi Tudományegyetem Biokémiai Tanszék valamennyi dolgozójának, akik valamilyen formában hozzájárultak munkám elvégzéséhez.

10. AZ ÉRTEKEZÉS ANYAGÁBÓL MEGJELENT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

Közlemények jegyzéke

1. Bálint T., Ferenczy J., Kátai F., Kiss I., Kufcsák O., Láng G., Polyhos Cs., Szabó I. és Nemcsók J. (1996) Szúnyogirtó szerek szerepe az 1995. évi balatoni angolnapusztulásban *Biokémia* 20/1, 12-17.
2. Bálint T., J. Ferenczy, F. Kátai, I. Kiss, L. Kráczér, O. Kufcsák, G. Láng, Cs. Polyhos, I. Szabó, T. Szegletes and J. Nemcsók (1997) Similarities and differences between the massive eel (*Anguilla anguilla* L.) devastations that occurred in Lake Balaton in 1991 and 1995. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 37, 17-23. Impact factor: 0.731
3. Csillik B., J. Fazakas, J. Nemcsók and E. Knyihár-Csillik (2000). Effect of the Pesticide Deltamethrin on the Mauthner Cells of Lake Balaton Fish. *Neurotoxicology* 21(3):343-352, Impact factor: 1.205
4. Ferenczy J., T. Szegletes, T. Bálint, M. Ábrahám and J. Nemcsók. (1997) Characterization of acetylcholinesterase and its molecular forms in organs of five freshwater teleosts. *Fish Physiology and Biochemistry* 16:515-529, Impact factor: 1.488
5. Láng G., Kufcsák O., Bálint T., Ferenczy J., Kátai F., Kráczér L., Le Huu Hieu és Polyhos Cs. (1997) K-othrin 1 ULV (hatóanyaga deltametrin) halakra kifejtett hatásának vizsgálata akvárium körülmények között. *Technika* 41/4, 18-19.
6. Láng G., O. Kufcsák, J. Fazakas, J. Nemcsók, E. Knyihár-Csillik and B. Csillik (1997) Effect of a pesticide (Deltamethrine) on the intestinal nervous system, and liver of Balaton lake fish. *Neurotoxicology* 1997; 18:876-877. Impact factor: 1.205
7. Kufcsák O., Bálint T., Ferenczy J., Kátai F., Kráczér L., Láng G., Le Huu Hieu., Polyhos Cs., Szabó I. és Nemcsók J. (1996) Vízminőség vizsgálata biomonitorozással. *Technika* 40/4-5, 16-18.

8. Nemcsók J., T. Bálint, J. Fazakas, F. Kátai, I. Kiss, Le Huu Hieu, O. Kufcsák, G. Láng, Cs. Polyhos, I. Szabó and T. Szegletes (1999) The contribution of a pyrethroid insecticide to the massive eel (*Anguilla anguilla*) devastation, in Lake Balaton, in 1995. *Acta Biologica Hungarica* 50/1-3. 161-173. Impact factor 0.136
9. Nemcsók J., Benedeczky I., Láng G., Kufcsák O., Ferenczy J. (1996) Vizi környezet biomonitoring vizsgálata biokémiai módszerekkel. In: Környezet-Biokémia Stúdium Kiadó 155-204.

Össz impact factor: 4.765

Előadások jegyzéke

1. Bálint T., Ferenczy J., Szegletes T., Ábrahámné Gulyás M. és Nemcsók J. (1996) AChE molekuláris formái különböző édesvízi halfajokban és peszticidek hatásai ezen formákra. *Conaqua '96 Olasz – Magyar Halászati Tanácskozás*, Szarvas, Magyarország, Október 30 – november 2.
2. Bálint T., J. Ferenczy, T. Szegletes, O. Kufcsák, G. Láng. and J. Nemcsók (1997) Biochemical differences between carp and eel AChE. *70th Event of the European Federation on Biotechnology*, Budapest, Hungary, 17-21 August
3. Bálint T., J. Ferenczy, L.H.Hieu, F. Kátai, L. Krátzer, O. Kufcsák, G. Láng, Cs. Polyhos, T. Szegletes and J. Nemcsók. (1997) Effects of deltamethrin on the biochemical parameters of carp and eel. *70th Event of the European Federation of Biotechnology*, Budapest, Hungary, 17-21 August
4. Bálint T., J. Ferenczy, T. Szegletes, M.Á. Gulyás and J. Nemcsók (1997) Biochemical differences between carp and eel AChE. *Meeting of The Central and Eastern European Regional Section of International Society of Ecotoxicology and Environmental Safety (SECOTOX) '97*, Jurmala, Latvia, 24-27 August

5. Ferenczy J. és Bálint T. (1996) AChE molekuláris formái különböző édesvízi halfajokban. *Országos Szakmai Napok*. Marosvásárhely, Románia, Október 18-21.

6. Láng G., O. Kufcsák, J. Fazakas, L.H. Hieu, F. Kátai, L. Kráczner, Cs. Polyhos, T. Bálint, J. Nemcsók, E. Knyihár-Csillik. and B. Csillik (1997) Effects of a pesticide (deltametrine) on the intestinal nervous system, liver and biotransformation system of Balaton lake fish. *70th Event of the European Federation of Biotechnology*, Budapest, Hungary, 17-21 August.

Poszterek jegyzéke

Ferenczy J., Bálint T., Szegletes T., Ábrahámné Gulyás M. és Nemcsók J. (1996) AChE molekuláris formái különböző édesvízi halfajokban. *Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztály I. Munkaértekezlete*, Seregélyes, Magyarország, április 16-18.

Ferenczy J., T. Bálint, M.Á. Gulyás. and J. Nemcsók (1997) Detection of adverse environmental effects as revealed by AChE molecular in freshwater fish AChE. *Meeting of The Central and Eastern European Regional Section of International Society of Ecotoxicology and Environmental Safety (SECOTOC) '97*, Jurmala, Latvia, 24-27 August.

11. SUMMARY

The aim of the study

The aim of the study was to determine those factors, that could contribute to the variety of the sensitivity of different fish species to the same insecticide. Since the main target of the most insecticide is the nerve system, we highlighted, therefore, our research on the acetylcholinesterase enzyme. First, we wanted to be sure that there are differences in the cholinerg enzyme system of the studied fish. After that, we made some experiments on two fish species with the pyrethroid type deltamethrine (DM) use for extermination of mosquitoes on the shores of lake Balaton and investigated whether there are differences in the changing of the studied parameters of the different fish species or during different treatment.

1. Characterisation of the cholinerg enzymes in five freshwater teleosts

In the comparative study between the fish species we measured the activity of the cholinerg enzymes in the brain, heart, skeletal muscle and liver by the method of Ellman, the ratio of the acetyl- and butyrylcholin-esterase by usage of the specific inhibitors, the ratio of the salt- and detergent soluble AChE forms, by usage of homogenising solution with and without detergent. Besides them we studied the proportion of the molecular forms of AChE separated in saccharose gradient by ultracentrifuge.

To determine the effects of DM, we studied in an *in vitro* experiment the type of the DM caused inhibition on AChE by classical biochemical methods, we measured the AChE activity, determined the proportion of the molecular forms of AChE in *in vivo* treated and untreated carp (*Cyprinus carpio*) and European eel (*Anguilla anguilla*). We studied the blood biochemical parameters by photometric assays and the concentration of the insecticide residues in the tissues of fish during and after *in vivo* DM treatment.

To compare the effects of DM on treated carp.

Characterisation of the cholinerg enzymes

The type, the activity and molecular forms of cholinesterases (AChE, EC 3.1.1.7 and BuChE, EC 3.1.1.8) were characterised in the brain, heart, white skeletal muscle and liver of the Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*), European eel, catfish (*Silurus glanis* L.), common carp and silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix* V.), belonging in four families. The brain had the highest (between 183.2 ± 10.6 and 1361.2 ± 189.7 mU mg⁻¹ protein and between 4.7 ± 0.4 and 23.5 ± 2.7 U g⁻¹ wet tissue) and the liver the lowest (between 25.3 ± 1.9 and 126.5 ± 22.7 mU

mg⁻¹ protein and between 1.0 ± 0.1 and 4.5 ± 0.5 U g⁻¹ wet tissue) activity in all these fish, with the exception of the catfish, where the heart contained the smallest amount of AChE (26.2 ± 7.5 mU mg⁻¹ protein and 1.2 ± 0.3 U g⁻¹ wet tissue). The highest tissue AChE activity was found in the carp and lowest in the sturgeon.

Generally the tissues of fish do not contain BuChE with the exception of the heart of catfish, where the 20% of the activity are originated from BuChE.

The solubility properties and molecular forms of AChE in the four tissues were studied by extraction in high-salt medium (1.0 M NaCl) with and without the detergent Triton X-100 (0.5%, v/v). The proportions of detergent-soluble (DS) and salt-soluble (SS) forms of AChE varied considerably from one species to another, but a general tendency could be observed: the proportion of DS AChE was generally higher in the brain (between 70.4 ± 4.1 and $82.5 \pm 1.2\%$) and lower in the heart (between 12.0 ± 2.0 and $51.3 \pm 2.3\%$) and skeletal muscle (between 16.0 ± 2.0 and $64.4 \pm 0.7\%$).

Velocity sedimentation centrifugation revealed that most tissues contained the G₄ or A₄ form. Three tissues (brain, heart, and liver) of the Siberian sturgeon contained a relatively high proportion of the G₁ form (between 24.3 ± 2.4 and $28.6 \pm 4.9\%$), while the skeletal muscle of the catfish contained only the most complex type of AChE, i.e. A₁₂. Amongst the tissues studied, the brain and liver mostly contained amphiphilic globular forms of the G₄ type, while the heart and skeletal muscle were rich in asymmetric forms (A₄ and A₁₂). It was concluded that the differences revealed in the activities of AChE and in the distribution of its molecular forms may be connected with the variation in behavioural habits (feeding and swimming patterns), and the developmental stage of the nervous system.

2. The in vitro and in vivo effects of the insecticides deltamethrin (DM) on carp and eel

The *in vitro* and *in vivo* effects of the insecticides deltamethrin (DM) on acetylcholinesterase (AChE, EC 3.1.1.7) in different tissues were examined in adult carp (*Cyprinus carpio* L.) and eel (*Anguilla anguilla*). The changes in biochemical blood parameters, such as the levels of glutamic-oxaloacetic transaminase (GOT, EC 2.6.1.1), lactate dehydrogenase (LDH, EC 1.1.2.3) and glucose, were also studied in DM-treated fish. The *in vitro* kinetic results showed that in both fish species the inhibition of brain AChE was of mixed type, with $K_I(\text{carp}) = 15.6$ μM and $K_I(\text{eel}) = 11.3$ μM.

The *in vivo* treatment did not show drastic inhibition of AChE in the tissues. In the case of carp significant inhibition could be detected only in the blood while in the case of eel the heart and skeletal muscle showed lower AChE activity after the sublethal DM treatment.

The DM treatment significantly increased the proportion of A4/G4 form and decreased the proportion of the other forms (G1, A12) in the liver of carp. Similar changes could be detected in the brain of DM treated eel.

In vivo DM treatment for 3 days caused a 20% decrease in the AChE activity of the blood serum of carp, while the GOT and LDH activities increased 2.5-fold (72-hr sample) and 1.5-fold (6-hr sample) as compared with those of the control carp. The blood glucose level was 30% higher (6-hr sample) than that of the control fish. After the fish were returned to clean water, the parameters revealed that the recovery took only 24-48 hr.

In vivo DM treatment for 4 days caused 15% decrease (96 hr sample) in the AChE activity of blood serum of eel. The GOT activity increased by 250% (96 hr sample), the LDH increased by 3.5-fold (96 hr sample) and the blood sugar content also increased by 2-fold (96 hr sample) compared to the control level. After the fish were returned to clean water, the parameters revealed that the recovery took more time (188 hrs) than in the case of carp.

High DM residues could be detected in the tissues of fish. Since the eel tissues contain more fat, therefore the relative accumulation of DM was higher in the tissues of eel than in carp.

3. Similarities and differences between the massive eel devastations that occurred in Lake Balaton in 1991 and 1995

In the past few years, two massive eel devastations occurred in Lake Balaton. In 1991, 300 tons of eel perished in the western basin of the lake, while in the summer of 1995 30 tons of eel died in the eastern part of the lake. Investigations carried out to find the causes of these ecocatastrophes included measurements of certain biochemical parameters: the blood sugar level, and the acetylcholinesterase lactate dehydrogenase, glutamic-oxaloacetic transaminase (GPT, EC 2.6.1.2) activities in the blood serum of the collected eels. In both 1991 and 1995 (DM), the active ingredient of the insecticide K-OTHRIN 1 ULV used against mosquitoes, was detected in the eels; in 1995 it was demonstrated in several other animal species, i.e., bream (*Abramis brama* L.), pike perch (*Stizostedion lucioperca* L.), and the common gull (*Larus canus*), and in sediment samples from the lake. Additionally, laboratory experiments were carried out to study the effects of DM on eels. In 1991, eels were carried out to study the effects of DM on eels. In 1991, eels were collected from the western (the site of the devastation) and eastern basins of the lake. The eels from the eastern basin were used as controls. At that time, the AChE activity in the blood serum of the eels from the western basin was significantly inhibited compared to that in animals from the eastern basin ($P < 0.05$, Student *t* test). Eels from the western part of the lake had GOT and GPT levels 20 and 100 %, respectively, higher than those of eels from the eastern part of the lake. The blood glucose level was much higher in the eels from the affected area of the lake as compared to those

from the eastern part. The brain and liver of the eels contained DM residues at 20 µg/kg wet tissue (Gönczy, 1992). In 1995, when the eel devastation occurred in the eastern basin, moribund and surviving eels were collected from this part of the lake. The AChE activity was significantly inhibited in the blood serum of the dying eels as compared to that in surviving animals ($P < 0.05$, Student t test). The blood glucose content exhibited a difference too: it was 2.5 times higher in the dying eels than in the surviving ones. A huge increase in the LDH level was measured in the dying eels, indicating damage to different muscle tissues to an extent never observed previously. The GOT activities of the serum were twice as high in the dying eels as in the living fish. The GPT was not significantly changed in the serum of dying eels as compared to the surviving animals. DM was detected in different tissue samples of the dying eels: 2.7-18.5 µg/kg in the liver, 9.0-31.1 µg/kg in the gill, and 3.0 µg/kg wet tissue in the muscle. DM residues were found in tissue samples from other animals, in the following concentrations: 0.4 µg/kg in bream, 2.1 µg/kg in pike perch, 1.1 µg/kg wet tissue in dead gulls. The sediment samples collected from different places and at different times contained DM in a concentration of 5.5-30.0 µg/kg wet sediment at the time of the eel deaths, while the sediment samples collected from the same places a month later still contained DM at 7.0-8.8 µg/kg wet sediment. Laboratory experiments with the insecticide K-OTHRIN 1 ULV revealed that 1.0 µg/l of its active ingredient, DM, caused the death of 50 % of the eels after an incubation time of 96 hr. In the liver of the dead eels, DM was detected at 2.9-20.0 µg/kg wet tissue. All the abovementioned changes and the DM residue detected in the eels appear to demonstrate the contribution of DM in the severe eel devastation. This finding on the ecological risk of such types of insecticides might be useful in their further application.

4. Effect of the DM on the Mauthner cells of Lake Balaton fish

DM, in a concentration of 1 µg/l in the aquarium water, inhibits acetylcholinesterase enzyme activity of the giant Mauthner's nerve cells as well as of the axon terminals synapsing with these cells. Even more importantly, however, DM in a concentration of 10 mg/liter, induces blockade of the expression of choline acetyltransferase in the bulbous axon terminals synapsing with the lateral dendrites of the Mauthner cells. Since, under normal conditions, the function of the Mauthner cells is to co-ordinate the C-start reaction, by which fish rapidly leave sites of nociceptive stimulation, it stands for reason to assume that DM intoxicated fish may be prone to become victims of various factors which endanger survival of the individual. During the last decade, waves of fish deaths were observed in Lake Balaton, which is the largest fresh-water lake in Europe. Fish death coincided with airborne mosquito-killing campaigns. Results of the enzyme- and immunohistochemical studies suggest that fish death might be caused by the indiscriminate use of DM airborne spray in the mosquito-extermination campaigns.