

A DELTAMETHRIN HALAKRA KIFEJTETT HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

Készítette: Fazakas Judit

Témavezető: Nemcsók János
egyetemi tanár
biológiai tudomány doktora



Szegedi Tudományegyetem
Biokémiai Tanszék
BZKA Biotechnológiai Intézet

2001.



A Deltamethrin halakra kifejtett hatásának vizsgálata

Bevezető

A kémiai vegyületek okozta vízszennyezések sok gondot jelentenek az egész világon. 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 tanulmányozták.

Munkánk 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. Tanulmányoztuk, milyen módon hat a deltametrin a kolinerg rendszerre, a hozzá tartozó kolinoczeptív Mauthner sejtekre, valamint az egyéb károsodást jelző biokémiai paraméterekre.

Célkitűzések

1. A lénai tok, angolna, busa, ponty és harcsa AChE és BuChE 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.

Összefoglalás

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) paramétereit 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 sajátosságokkal 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 vázizomban 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 szérum 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 szérum 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 $\mu\text{g}/\text{kg}$ nedves súlyra vonatkoztatva volt. A legmagasabb koncentrációt a kopoltyúokban mutattuk ki (9,0-31,1 $\mu\text{g}/\text{kg}$), míg az izom 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 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 fogassülöben 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, amelyektől 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 megfigyelhettünk.

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) Szúnyogírtó szerek szerepe az 1995. évi balatoni angolnapusztulásban *Biokémia* 20/1, 12-17.
2. Bálint T., J. Ferenczy, F. Kátai, I. Kiss, L. Kráczer, 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., Kráczter 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., Kráczter 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 biomonitring 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 und 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 (SECOTOX) '97,*
Jurmala, Latvia, 24-27 August.