B 3007

PESZTICIDEK HATÁSA A PONTY KOLINERG RENDSZERÉRE

Egyetemi doktori értekezés

Szabó András

Témavezető:
Dr. Nemcsók János
egyetemi docens

József Attila Tudományegyetem
Biokémiai Tanszék
1990

TARTALOMJEGYZÉK

oldalszám

1. BEVEZETÉS 1.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS 4.

2.1. A kolinerg rendszer elemei 5.

2.1.1. Az acetilkolin 5.

2.1.2. A kolin-acetiltranszferáz 8.

2.1.3. Az acetilkolinészteráz 10.

2.1.4. A muszkarin tipusú acetilkolin receptor 13.

2.2. A felhasznált növényvédőszerek (peszticidek) jellemzése 14.

2.2.1. A paraquat 14.

2.2.2. A réz-szulfát 15.

2.2.3. A methidation 16.

3. ANYAGOK-MÓDSZEREK 17.

3.1. A felhasznált vegyszerek 17.

3.2. Az ACh tartalom mérési módszere 17.

3.3. A ChAT aktivitás mérése 18.

3.4. Az AChE aktivitás mérése 19.

3.5. Radioligand kötési módszer 19.

3.6. A fehérjetartalom mérése 21.

3.7. Adatelemzés 21.

3.8. A vizsgált halfajok 21.

3.9. A ponty ChAT Michaelis állandóinak meghatározása 22.

3.10. A ponty AChE biokémiai jellemzése 24.

3.11. Peszticid-kezelések hatásának vizsgálata 25.

3.11.1. Tartási és kezelési körülmények 25.

3.11.2. A methidationnak a ponty AChE-ra kifejtett hatásának vizsgálata 25.

3.11.3. A SEM felvételek készítése 26.

4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK 27.

4.1. Csontoshalak szerveinek kolinerg összehasonlító vizsgálata 27.

4.2. Ponty muszkarin tipusú kolinerg rendszerének vizsgálata 34.

4.2.1. [^{3}H](-)QNB és [^{3}H]PZ kötés 34.

4.2.2. Kolinerg drogok hatása a muszkarin receptorok kötési tulajdonságaira 38.

4.3. A ponty ChAT Michaelis állandóinak meghatározása 42.

4.3.1. A ChAT aktivitásmérés körülményeinek optimalizálása 42.

4.3.2. A ChAT tisztítása 43.

4.3.3. A ChAT Michaelis állandói 45.

4.4. A ponty AChE biokémiai jellemzése 47.

4.5. Peszticidek hatásának vizsgálata 52.

4.5.1. Peszticidek indukálta morfológiai elváltozások a kopoltyú felszínén 52.

4.5.2. A peszticidek hatása a kolinerg paraméterekre 58.

4.5.3. Peszticidek kombinatív hatása a ponty vérplazma acetilkolinészterázára 61.

4.5.4. A methidationnak a ponty AChE-ra kifejtett hatásának vizsgálata 66.

5. ÖSSZEFOGLALÁS 80.

6. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE 82.

7. IRODALOMJEGYZÉK 83.

8. A DOKTORI ÉRTEKEZÉS ANYAGÁBÓL ELHANGZOTT ELŐADÁSOK ÉS MEGJELENT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE 98.

1. BEVEZETÉS

Az elmúlt évtizedek ipari és mezőgazdasági fejlődése ugrásszerű volt szinte az egész világon, és manapság a fejlett ipari és mezőgazdasági technológia már nem nélkülözheti a különböző vegyületek felhasználását. Az egyre magasabb szintű ipari és mezőgazdasági termelés azonban komoly környezetszennyezési problémákat is okozott, amelyek kivédése egyre nagyobb erőfeszítéseket igényel, különösen Európában. A hatvanas években az iparilag fejlett országok vegyészei, toxikológusai és biokémikusai is bekapcsolódtak alap- és az alkalmazott kutatások szintjén a környezetkárosító hatások vizsgálatába. E tudományágak eredményei a hetvenes évek elejétől szinte új ágazatként hozták létre a környezetvédelmi biokémiát.

A termelések-felhasználások során bekövetkező szennyeződések rövid idő alatt nagy távolságra juthatnak el, elsősorban a levegő, valamint a vizek gyors mozgása révén. A levegőből kiülepedő, kimosódó, majd a folyóvíz szállította toxikus anyagok így keletkezési helyüktől távol fejthetik ki pusztító hatásukat, gyakran igen rövid idő alatt. Különösen veszélyesek azok a vegyületek, amelyek akkumulálódni képesek az élő szervezetekben. A vízszennyeződések még szubletális dózisban is közvetlenül kimutatható módon károsítják a vízi szervezeteket, köztük a halakat is. A toxikus anyagok lassíthatják a túlélő egyedek fejlődését (Waiwood és Beamish, 1978; Weis és Weis, 1977) és/vagy zavarják a normális metabolikus folyamatokat (Lett és mtsai., 1976; Lewis és Lewis, 1971). A peszticidek akkumulációját a vizi táplálkozási láncban hazánkban is sokan vizsgálták az elmúlt években (Balogh és Salánki, 1983; Gergely és mtsai., 1977;

Salánki és mtsai., 1982).

A halakon akváriumi körülmények között végzett vízszennyeződési modellezések révén pontosabb információkat kaphatunk a mezőgazdaságban alkalmazott vagy a nagyüzemekből kikerülő toxikus anyagok hatásmechanizmusára, támadási pontjaira vonatkozóan. A megfigyelhető elváltozások nagymértékben jellemzőek a vizsgált anyagra és koncentrációjára. A környezetszennyező anyagok jelentősen károsíthatják a halak idegrendszerét is, elsősorban a kolinerg rendszeren keresztül. Különösen veszélyes az acetilkolinészteráz (AChE) enzim gátlása, amely súlyos esetekben egy jellegzetes görcsös merevedéssel járó tömeges halpusztulást okozhat. Az enzim vizsgálatát a halaknál később kezdték mint melegvérű állatok esetében, így erről kevesebb adat áll rendelkezésre.

Tanszékünkön 1979-óta folynak környezetvédelmi jellegű biokémiai kutatások, elsősorban halakon. Ennek alapján a **célkitűzésünk** a korábbi biokémiai vizsgálatok kiterjesztése volt a halak kolinerg rendszerére is. Az irodalomban kevés adat található a különféle halfajok kolinerg rendszerére vonatkozóan, így legelőször összehasonlító vizsgálatokat végeztünk 12 halfajon, amelyek Magyarországon leggyakrabban megtalálhatóak. Munkánkban a különböző életmód (ragadozó-növényevő, mozgási aktivitás) és néhány kolinerg paraméter között fennálló összefüggéseket kívántuk vizsgálni. A halakban mértük az endogén acetilkolin (ACh) tartalmat és a kolinerg enzimeket (kolin-acetiltranszferáz; ChAT, acetilkolinészteráz; AChE). Mivel Magyarország haltenyésztésének nagy százalékát teszi ki a ponty (*Cyprinus carpio L.*), ezért a pontyot használtuk fő kísérleti állatként. Az előbbi vizsgálatok mellett jellemeztük a ponty agy muszkarinerg receptorokat radioligand kötési módszerrel (receptor szelektív és nem-szelektív antagonisták

felhasználásával), tisztítottuk a ChAT-t a Michaelis állandók mérésének céljából, és vizsgáltuk néhány szervének AChE molekuláris formáit.

A ChAT iránti tudományos érdeklődést az ACh idegműködésben játszott szerepén kívül az magyarázza, hogy az ellene termeltetett ellenanyagot fel lehet használni a kolinerg neuronok feltérképezésére.

A ponty AChE molekuláris formák vizsgálatának célja egy filogenetikailag alacsony szinten álló gerinces alosztályban az enzim szerkezetének megismerése és egy szerves foszforsav tipusú kolinészteráz bénító vegyület (MD) hatásának molekuláris szintű értelmezése. Vizsgáltuk továbbá a mezőgazdaságban intenzíven használt néhány más peszticidnek a kolinerg enzimekre kifejtett hatását is.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A kolinerg rendszer biokémiai-farmakológiai tulajdonságai, valamint a kolinerg rendszer elemeinek (acetilkolin (ACh) szint, kolin-acetiltranszferáz (ChAT), acetilkolinészteráz (AChE), acetilkolin receptorok (AChR)) helyi megoszlását régóta vizsgálják, bár elsősorban melegvérű gerinces állatokban. A fent említett kolinerg elemeket elsősorban a központi idegrendszerben lokalizálták (Kása, 1986; Saelens és Simke, 1976) és vizsgálták behatóan a tulajdonságait biokémiai (Anglister és Silman, 1978; Francis és Schechter, 1980; Kása és mtsai., 1982; Wächtler, 1980; Wang és mtsai., 1987; Yamamura és Snyder, 1974a), immunológiai (Anglister és mtsai., 1979; Kimura és mtsai., 1981; Mesulam és mtsai., 1984) és autoradiográfiai (Gulya és Kása, 1983; Wamsley és mtsai., 1984) módszerekkel a különböző alsóbbrendű (Donnellan és mtsai., 1975; Rand és Russell, 1985; Rossier, 1975; 1977; Sugden és Newsholme, 1977) és fejlett (Gulya és Kása, 1983; Hartzell és Zwemer, 1980; Mesulam és mtsai., 1984; Rossier, 1977; Su és mtsai., 1980; Sugden és Newsholme, 1977; Wächtler, 1980; Wamsley és mtsai., 1984; White és Wu, 1973) állatfajokban. A gerincesek agyában - gerinctelenekével összehasonlítva - az irodalmi adatok szerint nagyobb ChAT enzimaktivitás mérhető (Hebb és Ratkovic, 1964; Wächtler, 1980).

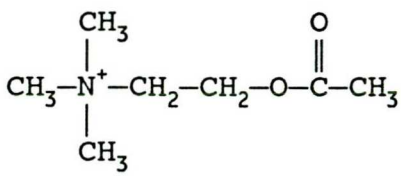
Néhány adat található a halak agyának (Francis és Schechter, 1980; Su és mtsai., 1980; Sugden és Newsholme, 1977; Wächtler, 1978), tectum opticumának (Contestabile, 1978; Contestabile és mtsai., 1979a, 1986; Migani és mtsai., 1980), cerebellumának (Contestabile és Zannoni, 1975; Contestabile és mtsai., 1979b), retinájának (Moreno-Yanes és Mahler, 1979), szívének (Holmgren, 1981) és lépének (Winberg

és mtsai., 1981) kolinerg paramétereire (elsősorban az AChE és a ChAT enzimaktivitásokra) vonatkozóan, de ezek meglehetősen sporadikusak. A halak agyának a ChAT elleni monoklonális ellenanyaggal történő kolinerg feltérképezését csak az utóbbi időkben kezdték el (Brantley és Bass, 1988; Zottoli és mtsai., 1988). Bár az irodalmi adatok már bizonyos támpontot adnak a halak különböző szerveinek AChE és ChAT aktivitására, még kevesebb adat áll azonban rendelkezésre a szövetek ACh tartalmára vonatkozóan (Florey és Michelson, 1973; Wächtler, 1983).

2.1. A kolinerg rendszer elemei

2.1.1. Az acetilkolin

1906-ban mutatták ki, hogy a paraszimpatikus ideg ingerlése muszkarinszerű hatást hoz létre, és 1914-ben osztották fel az acetilkolin hatásait hasonlóságuk alapján muszkarin- és nikotinszerű hatásokra. Loewi 1921-ben kimutatta, hogy a nervus vagus ingerlésekor izolált békaszívben egy anyag szabadul fel, amely leállítja a másik, recipiens szív működését. Ezt később az ACh-nal sikerült azonosítani, és így bebizonyosodott, hogy az ACh egy neurokémiai ingerületátvivő anyag, kémiai felépítése:



Az ACh a szervezetben a következő helyeken felelős az ingerületátvitelért:

-paraszimpatikus végkészülékeknél,
-vegetatív ganglionokban,
-neuromuszkuláris junkcióban,
-központi idegrendszer szinapszisaiban.

A negyvenes években tételezték fel, hogy az elektromosan ingerelhető membránokban az ACh kötődése egy proteinhez (az acetilkolin-receptorhoz) változást indukál a membrán kation-permeábilitásában. Felismerték azt is, hogy az AChR, valamint az ACh szintéziséért felelős kolin-acetiltranszferáz, és a lebontást végző acetilkolinészteráz enzimek egy koordinált, ciklikus folyamatot alkotnak.

Az agyszövet szinaptoszóma preparálása esetén centrifugálás után a felülúszóban ("szabad ACh") és a szinaptoszóma-üledékben ("kötött ACh") is találunk ACh-t. Ez utóbbi ACh tartalom nagy része vezikulumokban helyezkedik el, s ezért vezikuláris ACh-nak nevezzük. Ez a vezikuláris ACh a kvantális transzmitter felszabadulás morfológiai egysége, melyekből az ACh-kiáramlás exocitózissal történik.

Az ACh-felszabadulás, -tartalom és -szintézis között összefüggés mutatható ki. Tartós ingerlés alkalmazásakor kezdetben fokozott ACh-felszabadulás mérhető, amely időben csökken. Ezt a csökkenést az ACh-raktárak kimerülése okozza, amely a szöveti ACh tartalom csökkenésében mutatkozik meg. A továbbiakban azonban a kiindulási és a végső ACh tartalom a folyamatos ACh-felszabadulás ellenére sem tér el egymástól, mivel a felszabaduló ACh mennyiségét a reszintézis pótolja. Így az ACh-szintézis sebességét (vagyis a ChAT aktivitását) a kompartmentek ACh tartalma határozza meg, illetve a rendelkezésre álló kolin mennyisége (Goldberg és Hanin, 1976;

Kása, 1986). A szervek nagy részében azonban (ileum, vas deferens, cortex, striatum) a felszabaduló ACh mennyiségét az exogén kolin nem befolyásolja (Vizi és Somogyi, 1978). Ez arra utal, hogy az idegszövetben nagy mennyiségű kolin raktározódik. Alátámasztja ezt az a megfigyelés is, hogy kolin adására még AChE bénítás esetén sincs szükség, jóllehet a felszabaduló ACh hidrolízisének gátlása kolinvesztéshez vezet.

Az ACh-képződésben szereplő kolin *de novo* szintézise a májban történik, foszfatidil-etanolamin metilálódását követően foszfatidilkolin képződik. Az agyban kolinszintézis nem történik, a májból a kolin szabad és foszfolipid formában a vérrel jut az agyszövetbe.

Az idegvégződésekből felszabaduló ACh hidrolízise során képződő kolin 35-50 %-a visszavételre kerül a preszinaptikus végkészülékbe. A visszamaradó kolin részben metabolizálódik betainná, vagy foszfolipidbe épül be.

Az ACh szintézisét végző ChAT másik szubsztrátja az acetil-CoA (AcCoA). Agyban főleg glukózból vagy piruvátból képződő AcCoA vesz részt a reakcióban. Az AcCoA elsődlegesen a mitokondriumokban szintetizálódik és innét jut a citoplazmába, ahol az ACh képződés folyik.

Bár az ACh az első volt a neurotranszmitterek közül amelyet megismertek és szerepét meglehetősen felderítették a perifériás idegrendszerben, a kolinerg neuronok és pályarendszerek kimutatása a központi idegrendszerben még nehézséget jelent.

A kiváltott kationáram spontán lejátszódó, exergonikus folyamat, az iongradiensek visszaállítása és az ACh szintézise azonban metabolikus energiát igényel. Így tehát a ChAT teremt kapcsolatot a sejt metabolizmusa és az ACh ciklus között.

2.1.2. A kolin-acetiltranszferáz

Az ACh szintézisét kolinerg idegszövetben a kolin-O-acetiltranszferáz (ChAT; E.C. 2.3.1.6.) katalizálja, amelyet 1943-ban fedeztek fel. Az enzim ATP jelenlétében AcCoA által katalizálja a kolin acetilezését, amely egy tiolészter alkoholízise utáni észter- és tiolképződés. A reakció reverzibilis, az egyensúlyi állandója 41.

Az enzim a kolinerg neuron sejttestjében termelődik és axonális transzporttal (1-6 mm/nap) jut el az axonterminálisba, amely transzport kolchicinnel és vinblasztinnal gátolható. Immunhisztokémiailag a ChAT a sejttestben és az idegvégződésben mutatható ki nagy mennyiségben. Egy kolinerg sejt ChAT tartalmának 2 %-a a perikarionban, 42 %-a az axonban, és 56 %-a az axonterminálisban található.

Preparáláskor a ChAT a szinaptoszómális frakcióban található a legnagyobb mennyiségben. A vezikulák és a szinaptoszóma citoszoljának szeparálásakor a ChAT a citoszolban oldott formában mutatható ki, és nem kötődik a vezikula membránjához. Ez, valamint az, hogy a ChAT nem kötődik lektint tartalmazó kromatográfiás oszlophoz mutatja, hogy az enzim nem glikoprotein, és ha kötődik is membránhoz, az interakcióban csak intracelluláris membránok vehetnek részt.

A ChAT vizsgálatát nehezíti, hogy nem ismerünk specifikus enzimgátlót. Egyes sztirilpiridinszármazékok gátolják ugyan az enzimet, de ezek AChE gátló aktivitással is rendelkeznek (White és Cavallito, 1970).

A ChAT molekulatömegét és alegységszerkezetét régóta kutatják. Az utóbbi időben publikált adatok a *Torpedo californica* elektromos szervéből izolált enzim 63 kilodaltonja (Brandon és Wu, 1978) és a szarvasmarha nucleus

caudatusából nyert preparátum 69 kilodaltonja közé esnek (Malthe-Sörensen és mtsai., 1978). A gélszűréssel és a szedimentáció-méréssel nyert adatok jó egyezést mutatnak, ez jelzi, hogy a ChAT globuláris fehérje kis axiális szimmetriával (Slemmon és mtsai., 1984).

Annak ellenére, hogy a ChAT-t már több mint negyven éve felfedezték, viszonylag tiszta enzimet csak a legutóbbi 10-15 évben sikerült előállítani. A munka lassúsága két tényezőre vezethető vissza: az enzim igen alacsony szintje a szövetekben; és gyors inaktiválódása a tisztítási lépések során. A ChAT tisztításának eredményeként létrehozható ellenanyagot fel lehet használni a kolinerg neuronok feltérképezésére. A ChAT elleni monoklonális ellenanyag első sikeres előállítása Levey és mtsai. nevéhez fűződik (1982). Wainer és mtsai. (1984) eredményei szerint a marhaagy ChAT elleni antitest valamennyi emlős eredetű ChAT-zal reagált, és jól lehetett használni a kolinerg neuronok immunhisztokémiai lokalizációjára.

A ChAT-ot az összes elektromosan ingerelhető szövetben megtalálták. Kimutatták ezenkívül mikroorganizmusokban (Alpert és mtsai., 1966; White és Cavallito, 1970), növényekben (borsóban, spenótban, napraforgóban, kékalgákban: Smallman és Maneckjee, 1981), és az AChE-zal együtt, számos más növényben is (Miura és Shih, 1984). Egy különösen gazdag, nem idegi eredetű ChAT-forrás a placenta (Morris, 1966). A ChAT idegszöveten kívüli széleskörű elterjedtsége bizonyítja, hogy az ACh funkciója nem korlátozódik a kizárólag a szinaptikus membránok ionpermeábilitás-változásainak indukciójára.

2.1.3. Az acetilkolinészteráz

Az utóbbi két évtizedben biokémiai és farmakológiai szempontból az acetilkolinészteráz (AChE) a legintenzívebben kutatott enzimek közé sorolható. Különösen figyelemre méltóak azok az eredmények, amelyek az AChE molekuláris formáinak kutatása területén születtek. Ezek az adatok nagyban hozzájárultak az AChE enzim molekuláris működésének fiziológiai, valamint az evolúció során betöltött szerepének tisztázásához.

Az ACh lebontását a kolinészterázok végzik. Hasonlóan a ChAT-hoz, az AChE biokémiai tulajdonságait és előfordulását is régóta vizsgálják a gerinceseknél (Augustinsson 1958, 1959a, b; Anglister és Silman, 1978; Contestabile, 1976; Contestabile és Zannoni, 1975; Dudai es mtsai., 1973; Francis és Schechter, 1980; Gant és mtsai., 1984; Kimura és mtsai., 1981; Mesulam és mtsai., 1984; Wächtler, 1978, 1980) és a gerincteleneknél (Sugden és Newsholme, 1977).

A reakcióban kétféle kolinészteráz vehet részt: a valódi (vagy specifikus) acetilkolinészteráz (AChE; EC 3.1.1.7) és a pszeudokolinészteráz (vagy butirilkolinészteráz vagy nem-specifikus észteráz; EC 3.1.1.8). Az AChE az ACh-t bontja gyorsabban, specifikus gátlószere a BW 284 C51. A pszeudo-kolinészteráz a butirilkolint bontja gyorsabban, és ethopropazin a specifikus gátlószere. A neuronális szövet acetilkolinészterázt tartalmaz, míg a pszeudokolinészteráz általában nem idegszövetben fordul elő. A pszeudo-kolinészteráz jelenlétét, amely a gerincesekben általánosan előfordul, néhány halfajnál is leírták (Augustinsson, 1958; Clos és mtsai., 1957; Clos és Serfaty, 1958).

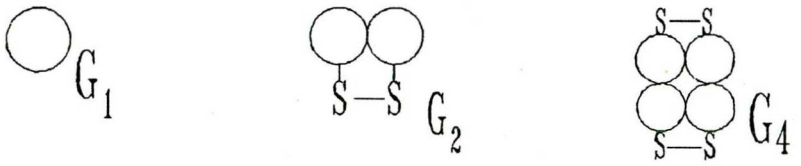
Az AChE molekula felépítésében alapvető szerepet játszik egy kb 80.000 dalton molekulasúlyú globuláris monomer forma (Bon és Massoulié, 1976; Dudai és Silman, 1974). A monomerből

diszulfid hidak révén dimer képződhet (Anglister és Silman, 1978; Rosenberry és mtsai., 1980). Két dimer feltehetően Van der Waals erők hatására tetramerré kapcsolódhat. A tetramerek elektronmikroszkóppal látható háromszálas farokrészhez kapcsolódhatnak (Dudai és mtsai., 1973; Rosenberry és mtsai., 1980), amely farokrész immunológiailag (Anglister és mtsai., 1979) valamint a kollagenázzal szembeni viselkedésüket tekintve (Lwebuga-Mukasa és mtsai., 1976; Rieger és mtsai., 1976) a kollagénhez hasonlítanak. A farki rész egy-egy szálához diszulfid hidakkal öszesen három tetramer fejrész egy-egy dimerje kapcsolódhat (Bon és Massoulié, 1976; Rosenberry és mtsai., 1980). Ennek alapján ezidáig 6-féle AChE molekuláris formát különítettek el (1. Ábra).

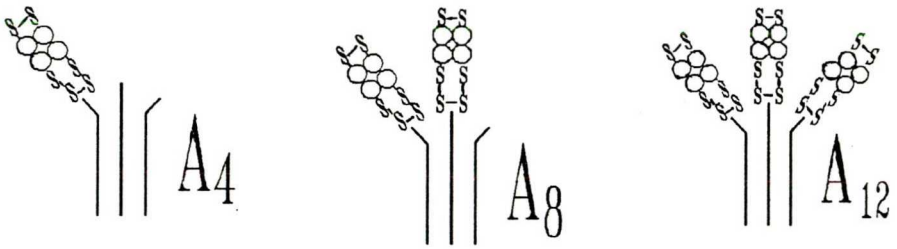
Az AChE a szinaptoszómában, axonális és gliamembránhoz kötődve fordul elő. Az enzim a perikarionban termelődik, és a ChAT-hoz hasonlóan, axonális transzporttal jut az axonterminálisba. Az irodalmi adatok szerint a sejtek AChE tartalma nem jelöl feltétlenül kolinerg neuront (Contestabile, 1978; Storm-Mathisen, 1977).

Az ACh szintéziséért és lebontásáért felelős enzimek általános előfordulása sugallja, hogy a kationpermeábilitás ACh közvetítette kontrollja a sejtműködés általános jelensége, akár innervált a sejt, akár nem.

Globuláris formák:



Asszimetrikus formák:



1. Ábra
Az acetilkolinészteráz molekuláris formáinak negyedleges szerkezete Bon és mtsai (1979) szerint. A globuláris formákat "G", az asszimetrikus formákat "A" jelöli. A diszulfid hidak elhelyezkedése és a kollagén farokhoz történő kapcsolódása Anglister és Silman (1978) modellje szerint ábrázolva.
G_1 = 4S, G_4 = 10S, A_{12} = 16S szedimentációs állandójú AChE formák.

2.1.4. A muszkarin tipusú acetilkolin receptor

Az ACh neurokémiai transzmitter a vegetatív ganglionokban, a posztganglionáris paraszimpatikus rostokban, a neuromuszkuláris junkcióban és a központi idegrendszerben. Ez arra utal, hogy a kolinerg receptorok a különböző neurotranszmissziós helyeken nagyfokú hasonlóságot mutatnak. Ugyanakkor a kolinerg receptorok közötti különbségre utal, hogy az egyes ingerületátteVődési helyeken az ACh hatását eltérő vegyületekkel lehet kiváltani, ill. felfüggeszteni.

A paraszimpatikus effektorsejtek kolinerg receptora muszkarintipusú, atropinnal gátolható. A vegetatív ganglionok és a neuromuszkuláris junkció nikotinreceptorokkal rendelkezik, míg a központi idegrendszerben muszkarinszerű és nikotinszerű kolinerg receptorok egyaránt kimutathatók. Az ACh, a muszkarin és a nikotin agonisták, ill. antagonisták azonos strukturális hasonlóságot mutatnak: kvaterner vagy tercier nitrogént, vagy ezzel ekvivalens csoportot, és egy olyan atomot tartalmaz, amely hidrogénkötés kialakítására képes. A kolinerg receptorok topográfiája nagyfokú hasonlóságot mutat az AChE aktív centrumával.

Az utóbbi tanulmányok legalább 2 muszkarinerg (M_1; kortikális tipusú, és M_2; szív tipusú) receptortípust különítenek el idegrendszeri (központi és perifériás) valamint nem idegi eredetű szövetekben a különböző állatokban: rovarokban (Donnellan és mtsai., 1975), halakban (Francis és Schecter, 1980; Moreno-Yanes és Mahler, 1979), kétéltűekben (Hartzell és Zwemer, 1980), madarakban (Meyer és mtsai., 1982) és emlősökben (Vickroy és mtasi., 1984; Wamsley és mtsai., 1984; Watson és mtsai., 1984, 1985, 1986a, b; Yamamura és mtsai., 1984). A muszkarinerg receptorok heterogenitását a nem-klasszikus pirenzepinnel (PZ) (Freedman és mtsai., 1988; Hammer és mtsai., 1980; Hammer és Giachetti,

1982; Luthin és Wolfe, 1984, 1985; Watson és mtsai., 1982; 1984; 1986a, b, c) valamint az AF-DX 116-al (Freedman és mtsai., 1988; Giachetti és mtsai., 1986; Hammer és mtsai., 1986; Micheletti és mtsai., 1986; Wang és mtsai., 1987) végzett kísérletek támasztják alá elsősorban. A radioligand kötési tanulmányok alapján a QNB nagy affinitással nem-szelektíven kötődik a muszkarinerg receptorokhoz (Birdsall és mtsai., 1980; Luthin és Wolfe, 1984; Watson és mtsai., 1986b; 1986c; Yamamura és Snyder, 1974a, b). A pirenzepin az M_1 tipusú receptorokhoz kötődik specifikusan és nagy affinitással (Gillard és mtsai., 1986; Hammer és mtsai., 1980; Luthin és Wolfe, 1984; Watson és mtsai., 1986b, c), míg az antagonista AF-DX 116 elsősorban az M_2 receptorokhoz kötődik (Hammer és mtsai., 1986; Micheletti és mtsai., 1986; Wang és mtsai., 1987; Watson és mtsai., 1986a).

2.2. A felhasznált növényvédőszerek (peszticidek) jellemzése

2.2.1. A paraquat

A kvaterner ammónium-vegyületek toxicitását régen felismerték. A kutatások eredményeként 1958-ban mutatták be a bipiridillium herbicidek mindmáig legjelentősebb képviselőjét, a paraquatot (PQ; 1,1'-dimetil-4,4'bipiridillium-diklorid). A vegyület széleskörűen alkalmazott növényi deszikkáns. Levélherbicidként alkalmazzák, mivel a lombozatból gyorsan transzlokálódik. Nem szelektív hatású, minden növényt - amelynek felületére rápermetezik - pár napon belül elpusztít. A vízben ionokra disszociálódó vegyület a növénybe jutva a fotoszintetikus elektrontranszport gátlása révén fejti ki toxikus hatását. Elektronakceptorként elvonja az elektronokat az I. foto-

szintetikus rendszerből, így megakadályozza a NADPH képződését. A folyamatban a PQ stabil szabadgyökké redukálódik, amely oxigén jelenlétében visszaoxidálódik folytonos hidrogén-peroxid (H_2O_2) képződése mellett. A hidrogén-peroxid a sejtmembránt alkotó lipidek peroxidációja révén pusztítja a növényt. Emlősökben a bekerült PQ szabad formában kering a vérben, ahonnét gyorsan eljut a szövetekbe. Egy mg/kg PQ jelenléte a szövetekben már letális lehet. Jelenlegi ismereteink szerint a szabadgyökök által okozott lipid peroxidáció következtében károsodik a sejtmembrán, és a sejt funkcionális integritása megszűnik. E sajátsága révén az állatokban elsősorban a tüdőt, de a szívet, májat, vesét is jelentős mértékben károsítja. Halaknál az elsődleges célszerv a kopoltyú, melynél a kopoltyúlemez hámrétegének destrukciója következik be.

2.2.2. A réz-szulfát

A fémtartalmú fungicidek gombaölő hatását a belőlük keletkező fémkationok kelátképző sajátosságai biztosítják. Fontos szerepe van a kationok elektronnegativitásának, ez határozza meg a fém kötésének stabilitását, a fémkelátok és szulfidok állandóságát. A rézvegyületek (pl. a réz-szulfát; $CuSO_4$) gombaölő hatása azon alapul, hogy a sejt belsejébe jutó Cu^{++}-ionok komplexet képeznek a fehérjék tiol- és aminocsoportjaival, amelyek így nem specifikusan gátlódnak. Legfőbb károsító hatását a membránon fejti ki, mivel a membrán szulfhidril csoportjait diszulfidokká oxidálja. Ebben a folyamatban a réz kupro formájának van szerepe, amely gyors folyamatban képes reagálni a molekuláris oxigénnel. E folyamatban szintén szuperoxid gyökök szabadulnak fel. A megnövekedett mértékű lipid peroxidáció a membrán

destrukciójához vezet.

A vízi ökoszisztéma egyensúlyát már 2 mg/l Cu szennyeződés felboríthatja, elsősorban a baktériumflóra, majd az alsóbbrendű rákok számának csökkentése által (Labat és mtsai., 1977; Singleton és Guthrie, 1977; Weis és Weis, 1977; Winner és Farell, 1976). A vízi élőlények nagymértékben akkumulálják szervezetükben a nehézfémeket. A feldúsulás miatt az élőlények szerveiben tehát a réz már kis mennyiségben is toxikussá válhat.

Fontos megemlíteni, hogy a Cu toxikus hatása módosítható a különböző ökológiai faktorok által (pl. pH, hőmérséklet, oldott oxigén) (Hughes és Nemcsók, 1988; Zitko és Carson, 1976).

2.2.3. A methidation

Az inszekticid methidation (MD; S-2,3-dihidro-5-metoxi-2-oxo-1,3,4-tiodiazol-3-ilmetil-O,O-dimetil-foszfoditioát) 1966 óta kapható a kereskedelmi forgalomban. Nagy mennyiségben használják gyümölcsösök és szőlő rovarkártevői ellen. Nagyüzemi felhasználásra engedélyezett készítmény az Ultracid 40WP, 40 %-os methidation tartalommal. Az állati szervezetbe kerülve ún. kevert funkciójú oxidáz enzimek segítségével, növényekbe kerülve valószínüleg peroxidáz enzimek segítségével oxidatív deszulfuráláson megy keresztül, így fejti ki AChE bénító hatását. A szerves foszforsav-észterek közismerten gátolják a vízi élőlények AChE aktivitását (Coppage és Braidech, 1976; Gage, 1955; McLeese és Metcalfe, 1979). Az élő szervezetekben az akkumulálódása miatt a MD szennyezés nagymértékű toxikus hatást fejthet ki a természetes vizek ökoszisztémájára. Az akkumulálódás a táplálkozási lánc tetején található szervezeteknél a legnagyobb mértékű, így a vízi ökoszisztémában elsősorban a halak szervezetében dúsul fel.

3. ANYAGOK-MÓDSZEREK

3.1. A felhasznált vegyszerek

[^{3}H](-)QNB ([fenil-4-^{3}H]quinuklidinil benzilát; spec. aktivitás: 1,41 TBq/mmol) és [1-^{14}C]acetil-CoA (spec. aktivitás: 1,85 MBq/mmol) az Amersham cégtől (Amersham, U.K); [^{3}H]PZ ([N-metil-^{3}H]pirenzepin; spec. aktivitás: 3,1 TBq/mmol) a NEN-től (Boston, Mass.); oxotremorin, atropin-metilnitrát, karbamilkolin-klorid (karbakol), polyetilénimin és ezerin-szulfátot a Sigma-tól (St. Louis, Mo.) szereztük be. Atropin-szulfát a Merck (Darmstadt, F.R.G), a pirenzepin (PZ) és az AF-DX 116 (11-[[2-[(dietilamino)metil]-1-piperidinil]-acetil]-5,11-dihidro-6H-pirido[2,3-b]-[1,4]benzodiazepin) a Dr. Karl Thomae Gmbh. (Biberach, F.R.G) gyártmánya. Acetiltiokolin-jodid (AcThCh-jodid) a Lachemia (Brno, Czechoslovakia), a POPOP (1,4-di-[2-[4-metil-5-feniloxazoil]]-benzol) a Koch-Light Lab. (Colnbrook, Berks., U.K) gyártmánya. Nátrium tetrafenilborát a VEB Laborchemie (Apolda, G.D.R) gyártmánya. A többi vegyszer, beleértve a PPO-t (2,5-difenil-oxazol) is, analitikai tisztaságú Reanal (Budapest, Hungary) gyártmányú volt.

3.2. Az ACh tartalom mérési módszere

A posztmortális ACh szint változásának kiküszöbölése érdekében a vizsgált halak fejére mikrohullámú sugárzást bocsájtottunk (Metabostat, Model 4101; Gerling Moore Inc., Santa Clara, Ca.) (kimeneti sugárzás: 5 kW, sugárzási idő: 0,8 sec, frekvencia: 2,45 GHz). Ezután kiemeltük a vizsgált szerveket (a cerebellum nélküli agyat, a teljes szivet, a

gyomor utáni 1-2 cm-es középbéli darabot és a mellúszók alól egy fehér-izom darabot) és 1,2 ml desztillált jéghideg acetonitrilben, Potter-csőben homogenizáltuk (5 perc, 250 rpm). Belső standardként ismert mennyiségű butirilkolint mértünk az acetonitrilbe. 30 percig jég között tartottuk a homogenizátumot, majd centrifugáltuk (15 perc, 20000 g). A felülúszó ACh tartalmának meghatározását Na-tiofenolátos demetilálás után (Jenden és Hanin, 1974) Perkin-Elmer Sigma 1 B gázkromatográffal végeztük Budai és mtsai. (1986) által leírt módon. Az ACh tartalmat nmol ACh /gramm nedves szövetsúlyban adtuk meg.

3.3. A ChAT aktivitás mérése

A ChAT aktivitását Fonnum (1975) módszere alapján mértük. Az inkubációs elegy végső koncentrációi a következők: 0,6 mM [1-^{14}C]acetil-CoA, 300 mM NaCl, 10 mM kolin-klorid, 20 mM EDTA és 0,1 mM ezerin-szulfát 50 mM-os nátrium-foszfát pufferben oldva (pH 7,4; 30 °C). A reakciót a homogenát hozzáadásával indítottuk. A vak mérésekor a homogenizátum helyett puffert mértünk az inkubáló elegybe. Az inkubációs idő (15 perc; 30 °C-on) után a csövek tartalmát 3 x 5 ml jéghideg 10 mM-os Na-foszfát pufferrel (pH 7,4) szcintillációs küvettába mostuk át. A szintetizálódott [1-^{14}C]ACh-t acetonitril-tetrafenilborát-toluol szcintillációs koktél (2 ml acetonitril, amely 0,5 % Na-tetrafenilborátot tartalmazott és 5 ml toluol, amely 0,5 % PPO-t és 0,015 % POPOP-ot tartalmazott) alkalmazásával LKB 1215 Rackbeta II folyadékszcintillációs készülékkel mértük. A ChAT aktivitását nmol szintetizált ACh /perc/gramm fehérje értékben fejeztük ki.

A módszer elve az, hogy az ACh képes lipidoldékony

komplexet képezni nátrium-tetrafenilboráttal. A ChAT által termelt jelölt ACh acetonitrilben oldott nátrium-tetrafenilboráttal komplexbe megy, amely toluolos szcintillációs koktélba átrázható, míg a jelölt AcCoA a vizes fázisban marad. A módszer előnye, hogy közel neutrális pH-n történő extrakciónál az acetilkarnitin karboxilcsoportja megakadályozza a komplexképződést, így az eljárás alkalmas a ChAT és a karnitin-acetiltranszferáz egymás melletti meghatározására.

3.4. Az AChE aktivitás mérése

Az AChE aktivitását Ellman és mtsai. (1961) spektrofotométeres eljárásával mértük. A 2,06 ml végtérfogatú elegy összetétele a következő volt: 2 ml 50 mM-os Na/K-foszfát pufferben (pH 7,2; 25 °C) oldott 2,2'-dinitro-5,5'-ditiobenzoesav (DTNB) (0,26 mM) és 0,05 ml AcThCh-jodid oldat (82,4 mM-os, deszt. vízben oldva). A reakciót 0,01 ml homogenát hozzáadásával indítottuk, és 412 nm-en detektáltuk Beckman DU-8 UV-Vis spektrofotométerrel. Az AChE aktivitását az elhidrolizált AcThCh-jodid μmol/perc/gramm fehérje értékben adtuk meg.

3.5. Radioligand kötési módszer

A frissen kivett cerebellum nélküli ponty agyakat késes homogenizálóval homogenizáltuk (2 x 1 perc) 9-szeres térfogatú jéghideg 10 mM-os nátrium-foszfát pufferben (pH 7,4) a [^{3}H]PZ kötés, és 50 mM-os Na/K-foszfát pufferben (pH 7,4) a [^{3}H](-)QNB ligand kötés méréshez. A homogenizátumot lecentrifugáltuk (2 x 10 perc; 20000 g; 4 °C), majd

a kapott üledéket felszuszpendáltuk az alkalmazott pufferben (10 mM-os nátrium- vagy 50 mM-os Na/K-foszfát puffer; pH 7,4; 4 °C). A szuszpendálás után kapott membránfrakciót használtuk a radioligandok kötéséhez.

A radioligand kötés mérését a membránfrakció készítésétől számított 2-5 órán belül elvégeztük, bár vizsgálataink szerint a ponty agy membrán néhány napig fagyasztva tárolható a radioligandok ([^{3}H]PZ vagy a [^{3}H](-)QNB) kötési paramétereinek megváltozása nélkül. A membránt 25 °C-on 120 percig inkubáltuk az alkalmazott 1 ml-nyi pufferben (10 mM-os nátrium- vagy 50 mM-os Na/K-foszfát pufferben; pH 7,4), amely tartalmazta a [^{3}H]PZ-t vagy a [^{3}H](-)QNB-t, valamint a kiválasztott kolinerg inhibítorokat. A reakciót a membránfrakció hozzáadásával (0,2 ml) indítottuk (a végső fehérjetartalom: 0,09-0,1 mg/ml a [^{3}H](-)QNB és 0,8-0,9 mg/ml a [^{3}H]PZ kötés mérésénél). A kinetikai tanulmányokban a csöveket különböző ideig inkubáltuk: 1, 2, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90 vagy 120 percig az asszociációs, és 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90 vagy 120 percig a disszociációs kísérletekben. Atropin-szulfátot használtunk (10^{-6} M) a nemspecifikus kötés meghatározásához. A meghatározott inkubációs idő után a kötődést 5 ml jéghideg halfiziológiás sóoldat (0.62 %-os NaCl oldat) hozzáadásával gyorsan leállítottuk, majd a csövek tartalmát Whatman GF/B szűrőlapra szűrtük Brandel M-24 szűrőkészülékkel. A [^{3}H]PZ használatánál a szűrőlapokat előzetesen 0,1 tf%-os polietilénimin oldatba áztattuk be, hogy csökkentsük a háttérkötődést. A szűrőket a szűrés után 3 x 5 ml jéghideg halfiziológiás sóoldattal mostuk, szárítottuk, szcintillációs küvettába helyeztük, majd 6 ml szcintillációs koktélt (900 ml toluol és 100 ml Triton X-100 keveréke, amely 4 g PPO-t és 0,15 g POPOP-ot tartalmazott) mértünk rá. A radioaktivitást LKB 1215 Rackbeta II folyadékszcintillációs számlálóval mértük (hatásfok: 44 %).

3.6. A fehérjetartalom mérése

A minták fehérjetartalmát Schacterle és Pollack (1974) által módosított Lowry és mtsai. (1951) módszere szerint határoztuk meg. Összehasonlító fehérjestandardként albumint (BSA) használtunk.

3.7. Adatelemzés

A kapott átlagokat ± S.D., valamint az adatok számát (n) tüntettük fel. Student's Newman Keuls teszttel kapcsolt egyutas variancia-analízist (ANOVA) használtunk a statisztikai elemzéshez. A korrelációs koefficienset a legkisebb négyzetek módszerével számítottuk. Szignifikanciaszint: $p<0.05$. A kötési paramétereket nemlineáris legkisebb négyzetek regressziós analízisével kompjuter illesztéssel (Biosoft, Elsevier Cambridge, U.K.) határoztuk meg.

3.8. A vizsgált halfajok

A csontoshalak kolinerg rendszerének összehasonlító vizsgálatánál 8 különböző családba tartozó 12 halfajt vizsgáltunk: **Pontyfélék (Cyprinidae):** ponty (Cyprinus carpio), compó (Tinca tinca), fehér busa (Hypophthalmichthys molitrix), pettyes busa (Hypophthalmichthys nobilis); **Harcsafélék (Siluridae):** lesző harcsa (Silurus glanis); **Törpeharcsafélék (Ictaluridae):** törpeharcsa (Ictalurus nebulosus); **Angolnafélék (Anguillidae):** angolna (Anguilla anguilla); **Pisztrángfélék (Salmonidae):** szivárványos pisztráng (Salmo gairdneri); **Csukafélék (Esocidae):** csuka (Esox lucius); **Sügérfélék (Percidae):** fogassülő

(Stizostedion lucioperca), vágó durbincs (Acerina cernua) és **Díszsügérfélék (Centrarchidae)**: naphal (Lepomis gibbosus).

A kísérletekhez az egynyaras süllő kivételével kétnyaras állatokat (testsúly: 150-350 g) használtunk. A beszerzési helyről való szállítás után az állatokat egy hétig adaptálódni hagytuk (15 °C vízhőmérsékletű) 100 l-es akváriumokban.

Az ACh tartalom mérését 9 halfajon végeztük el, fajonként 5 egészséges példányt használva. A mikrohullámú besugárzás után kiemeltük a vizsgált szerveket (a cerebellum nélküli agyat, a teljes szivet, a gyomor utáni 1-2 cm-es középbéli darabot és a mellúszók alól egy fehér-izom darabot), majd szárazjéggel rögtön lefagyasztottuk és -18 °C-on tartottuk a felhasználásig (3-10 órán belül).

A ChAT és AChE enzimek mérését fajonként 5 sértetlen, egészséges példányból végeztük. A kiválasztott halakat dekapitáltuk, és a szervdarabokat jéghideg 40 mM-os nátrium-foszfát pufferben (pH 7,0) késes homogenizálóval homogenizáltuk (2 x 3 perc), és ebből mértük az enzimaktivitásokat.

3.9. A ChAT Michaelis állandóinak meghatározása

A ponty agy ChAT Michaelis állandóinak pontos meghatározásához tisztítottuk az enzimet. A tisztításhoz szükséges pontyagyakat ép, egészséges halakból gyűjtöttük össze. A Tisza HTSZ Fehértói Halászcsárdájánál történt élőhalfeldolgozás során frissen kiemelt, lehűtött, és 2 órán belül -18 °C-ra lefagyasztott cerebellum nélküli pontyagyakat használtunk. A lefagyasztott agyak súlyát lemértük, majd Potter-csőben 4-szeres térfogatú jéghideg 40 mM-os nátrium-foszfát pufferben (pH 7,4) homogenizáltuk (3 perc;

250 rpm). Centrifugálás (1 óra; 100000 g) után a tiszta felülúszót használtuk az enzimreakció mérésének optimalizálásához és a tisztításhoz.

A ChAT tisztítás első lépését festék-ligand kromatográfiával végeztük. Ez abban különbözik az affinitáskromatográfiától, hogy a szóbanforgó aromás festékek nem állnak szembetűnő szerkezeti rokonságban az enzim szubsztrátjaival vagy inhibítoraival, bár az aktív helyhez kötődnek. A Cibacron Blue F3GA nevű textilfestéket számos globuláris fehérje tisztítására felhasználták már, dextránhoz kötött formája Blue Dextrán néven kerül a kereskedelmi forgalomba. A ChAT tisztítása során mi is ezt használtuk Sepharose 4B hordozóhoz kapcsolva.

A Sepharose 4B oszloptöltetre brómciános aktiválás után kötöttük a Blue Dextránt. Az oszlopot 40 mM-os nátrium-foszfát pufferrel (pH 7,4) equilibráltuk. A nyers enzimpreparátumot 4 °C-on 1 órán keresztül cirkuláltattuk az oszlopon, hogy maximális enzimmennyiség kötődjön fel. Az elúció lineáris NaCl sógradienssel (0-1,5 M) történt. Az enzimet tartalmazó frakciókat $(NH_4)_2SO_4$-tal kisóztuk, majd kis térfogatú 40 mM-os nátrium-foszfát pufferben (pH 7,4) történt feloldás után Sephadex G-25 töltésű Pharmacia PD-10 oszlopon sómentesítettük. Az összegyűjtött frakciókat használtuk fel a kromatofókuszáláshoz. A kromatofókuszálást a Pharmacia receptje szerint, Sluyterman és Elgersma (1978) által leírt módon végeztük 10 cm^3-es "PBE 94" (Pharmacia) töltetű oszlopon. Eluálásra "Polybuffer 96-ot" (Pharmacia) alkalmaztunk, 6,5-9 pH tartományban. A maximális tisztulást mutató frakciókat használtuk a ChAT Michaelis állandóinak meghatározásához.

A Michaelis állandók meghatározásánál az egyik szubsztrát állandó koncentráción tartása mellett a másik szubsztrát koncentrációját változtattuk, és mértük a ChAT aktivitás

kezdeti sebességeket. A kapott adatokból a Michaelis állandókat Lineweaver-Burk féle ábrázolással, grafikus úton kaptuk meg.

3.10. A ponty AChE biokémiai jellemzése

Mindkét nemből származó 850-1000 gramm súlyú ponty szerveit (agy, vázizom, szív, vérplazma) használtuk a kísérletekhez (n = 8). A hal agyát, izmát és szivét 5-szörös térfogatú jéghideg halfiziológiás sóoldatban késes homogenizálóval homogenizáltuk (2 x 3 perc). Centrifugálás (20 perc; 10000 g; 4 °C) után a felülúszóból mértük a szabad AChE aktivitást. A kötött AChE méréséhez a szabad AChE mérésekor kapott üledéket homogenizáltuk újra Triton X-100 detergens tartalmú pufferrel. A homogenizáló oldat a következő volt: 10 ml 4M-os NaCl oldatot, 10 ml 5 %-os Triton X-100 oldatot valamint 3,1 ml 400 mM-os nátrium-foszfát puffert (pH 7,2) desztillált vízzel 100 ml végtérfogatra egészítettünk ki. Pszeudokolinészteráz gátlószerként ethopropazint, acetilkolinészteráz gátlóként pedig BW 284 C51-et használtunk az aktivitásmérések során.

Az AChE molekuláris formáinak vizsgálatához a halak agyát és máját használtuk. A peszticid-kezelésnél az akvárium vizében oldottuk a MD-t (2 mg/l). Egy hetes kezelés után a szerveket 9-szeres térfogatú jéghideg 12,5 mM-os nátrium-foszfát pufferben (pH 7,2) késes homogenizálóval homogenizáltuk (2 x 3 perc). A puffer 400 mM NaCl-ot és 2 tf% Triton X-100-at tartalmazott. Centrifugálást követően (2 óra; 100000 g) a felülúszóból mértük az AChE aktivitást. Az AChE molekuláris alformáinak elválasztása 200 μl felülúszóból történt 5-20 %-os szacharóz gradienst használva, amelyet 0,5 tf% Triton X-100-at tartalmazó pufferben oldottunk. A

marker enzimeket (ß-galaktozidáz, kataláz, alkalikus foszfatáz) a 200 μl felülúszóra vittük fel. A centrifugálás Spinco L2-65 centrifugán történt (100000 g, 4 °C, 9 óra, SW 65 rotor). A molekuláris alformák azonosítása és meghatározása a marker enzimek segítségével, grafikusan történt.

3.11. Peszticid-kezelések hatásának vizsgálata

3.11.1. Tartási és kezelési körülmények

A vizsgálatokhoz mindkét nemből származó 850-1200 gramm súlyú pontyot használtunk. Az állatokat hármasával 100 literes jól levegőztetett, 20 °C vízhőmérsékletű akváriumban tartottuk. A vizsgált hatóanyagokat (PQ, $CuSO_4$, MD) az akvárium vizében oldottuk fel. Az alkalmazott peszticid koncentrációk: PQ: 5 mg/l; $CuSO_4$: 5 mg/l; MD: 2 mg/l, kezelési idő 1 hét. A kezelést követően a pontyok agyából (n = 6) mértük a kolinerg paramétereket. A vegyes kezelések koncentrációi: 2,5 mg/l PQ + 1 mg/l MD; 2,5 mg/l $CuSO_4$ + 1 mg/l MD; 2,5 mg/l $CuSO_4$ + 2,5 mg/l PQ. Kezelési idő 1, 4, 6 és 14 nap. Minden egyedből a kezelést megelőzően és a kezelést követően a megjelölt időpontokban vérmintát vettünk, és mértük az AChE aktivitást. Az értékek a minták (n = 6-18 egyed) átlagait jelentik a kontroll százalékában kifejezve.

3.11.2. A methidationnak a ponty AChE-ra kifejtett hatásának vizsgálata

Az akvárium vizében oldottuk fel a MD-t (1,5 valamint 5 mg/l-es végkoncentráció). Az állatokból 4, 24 és 48 óra

elteltével vettünk vérmintát. Centrifugálás után a vérplazma AChE aktivitását a 3.4. pontban leírt módszer alapján mértük. Az eredményeket a kontrollhoz viszonyítva százalékban adtuk meg. Az adatok 6-12 egyedből (n) származó mérések átlagát ± S.D. jelentik.

Az *in vitro* kísérletsorozatnál a ponty különböző szerveit (agy, szív, vázizom) 5-szörös térfogatú halfiziológiás sóoldatban (nedves szövetsúly/homogenizáló oldat) arányban homogenizáltuk. A kapott homogenizátumokat, valamint a vérplazmát methidationnal inkubáltuk (1, 3, 5 illetve 10 mg/l végső MD koncentrációban) 4 és 20 °C-on, 120 percig. Az minták AChE aktivitását a 10., 20., 30., 60. és a 120. percben határoztuk meg. Az eredményeket a kontrollhoz viszonyítva százalékban adtuk meg. Az adatok 6-8 egyedből (n) származó mérések átlagát ± S.D. jelentik.

3.11.3. A SEM felvételek készítése

A vizsgált peszticidek (5 mg/l PQ, 5 mg/l $CuSO_4$) valamint a gyengén savas pH (6-os pH, mint a "savas esők modellezése") kombinatív membrándestruáló hatásait ponty kopoltyúján, pásztázó (scanning) elektronmikroszkóppal (SEM) vizsgáltuk. Az alkalmazott kezelést követő 4. napon kivett kopoltyú darabokat glutárdialdehides fixálás után, növekvő alkoholsorozatban vízmentesítettük, majd aranyréteget gőzölögtettünk rá. A felvételeket TESLA BS 300 tipusú scanning elektronmikroszkóppal készítettük.

4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

4.1. Csontoshalak szerveinek kolinerg összehasonlító vizsgálata

A csontoshalak (Osteichtyes) különböző fajainak kialakulása már az Alsó-Devonban, mintegy 400 millió évvel ezelőtt befejeződött. A fajok különböző filogenetikai fejlődése különböző morfológiai, fiziológiai, biokémiai stb. tulajdonságok kialakulásához vezetett. Ezek a különbségek a környezethez való mind jobb alkalmazkodás során alakultak ki. A környezetváltozás egyúttal életmódbeli változást is okoz, amely a különböző tulajdonságok kialakulásáért felelős.

Az általunk vizsgált édesvízi halakban az agyban és a bélben találtunk magas ACh szintet, alacsonyabbat a szívben és a törzsizomban. Az acetilkolin tartalmakat az 1. táblázat tartalmazza. Az agyban mérhető ACh tartalom a harcsa és a törpeharcsa agyában a legkevesebb (≈ 10 nmol/gramm), míg a csuka és a pisztráng agyában mértük a legtöbbet (≈16 nmol/gramm), ez 1,6-szerese a harcsákban mért értékeknek. A középbéli szakasz legmagasabb acetilkolintartalmát a fehér- és a pettyes busánál mértük (16,0-17,4 nmol/gramm), a többi fajnál ez alacsonyabb, míg a harcsa középbelében nem tudtuk az ACh-t kimutatni. A szív ACh tartalma 1,5 és 4 nmol/gramm) között volt. A szívben a legmagasabb ACh tartalmat a törpeharcsánál mértük, de az angolnánál és a pontyféléknél (kivéve a fehér busát) is hasonló értéket detektáltunk. A harcsa szívében nem sikerült az acetilkolint kimutatni. Nem találtunk szignifikáns különbséget az egyes családok között a szív ACh tartalma alapján. A törzsizmok ACh tartalma 1,2-3,9 nmol/gramm értékek között változott. A pettyes busa, a pisztráng valamint a csuka izmában mértük a legnagyobb ACh

tartalmat, a pontyféléknél alacsonyabbat, míg az angolna, a törpeharcsa és a harcsa izom ACh tartalma a legalacsonyabb. A harcsa izmában szintén nem tudtuk detektálni az ACh-t.

1. táblázat
A vizsgált halak néhány szervének acetilkolin tartalma

Halfaj	Agy	Szív	Bél	Izom
	(nmol ACh/gramm nedves szövet)			
Harcsa	9,62±1,82	N.M.	N.M.	N.M.
Törpe-harcsa	9,84±2,75	3,98±0,13	10,31±1,33	1,20±0,20
Ponty	13,92±1,13	3,81±1,31	6,36±0,71	1,96±1,07
Compó	10,31±2,48	3,56±0,20	7,79±1,53	2,33±0,80
Fehérbusa	13,92±1,13	1,76±0,23	16,05±1,40	2,67±0,98
Pettyes-busa	12,51±2,47	3,41±1,10	17,42±2,80	3,87±2,00
Angolna	12,41±2,11	2,99±0,84	8,08±1,65	1,80±0,51
Csuka	15,66±1,72	2,54±0,84	7,30±0,79	3,14±1,30
Pisztráng	16,06±2,92	1,47±0,90	4,66±1,15	3,32±0,41

Az adatok 5 állatból mért értékek átlagát jelenti a szórás (± S.D.) feltüntetésével. N.M. = nem mérhető

A vizsgált halak kiválasztott szerveiben mérhető ChAT aktivitások értékeit a 2. táblázat tartalmazza. A halak agyában mérhető ChAT aktivitások 21-szeres különbséget mutattak (91 nmol ACh/perc/gramm értéktől 1930 nmol ACh/perc/gramm értékig). 3 szignifikánsan (ANOVA, $p<0,01$) különböző csoportot tudunk elkülöníteni az agyban mérhető ChAT aktivitások alapján. A harcsa és a törpeharcsa agyában

mértük a legkisebb ChAT aktivitást (91 ill. 227 nmol ACh/perc/gramm), a második csoportba a pontyfélék és az angolna tartozott kb. ötször magasabb ChAT aktivitással (607 nmol ACh/perc/gramm és 912 nmol ACh/perc/gramm értékek között). A harmadik elkülöníthető csoportba a pisztráng, a csuka, a naphal valamint a sügérfélék tartoznak magas ChAT aktivitással (1400 nmol ACh/perc/gramm érték felett). Az agyakban mért *in vivo* ACh tartalom valamint a ChAT enzimaktivitások között szoros korrelációt találtunk (korrelációs koefficiens (r): 0,92).

A törzsizmok ChAT aktivitásai alapján két szignifikánsan különböző (ANOVA, $p<0,01$) csoportot különböztethetünk meg: a pontyfélék és a pisztráng izmában magas ChAT aktivitás mérhető (88-tól 169 nmol ACh/perc/gramm), az alacsonyabb enzimaktivitású csoportba a ragadozó halak tartoznak (53 nmol ACh/perc/gramm-ig).

A szív ChAT tartalma szignifikánsan magasabb a pontyféléknél és az angolnánál, mint a ragadozó halaknál (süllő, pisztráng, csuka, harcsa), kivéve a naphalnál, ahol a legmagasabb ChAT aktivitást mértük. A szív ChAT aktivitása valamint az ACh tartalom között jó korreláció található (r: 0,72).

A ponty, a süllő, a sügér és a durbincs középbelében mérhető magas ChAT aktivitás, a legalacsonyabbat a harcsa középbelében mértük.

A 3. táblázat a vizsgált halak szerveiben mért AChE aktivitást mutatja. Az agyban mért magasabb enzimaktivitások a pontyfélékre és a törpeharcsára jellemző. Az enzimaktivitások alapján nem tudunk szignifikáns csoportokat elkülöníteni. A fehér busa szívében mérhető a legmagasabb AChE aktivitás, a harcsáéban a legkisebb. A középbélben mért AChE enzimaktivitások hasonló értékűek a fajok nagy részénél, a legmagasabb értéket az angolnánál, a legalacsonyabbat a

harcsánál mértük. Az izmok AChE aktivitása fajonként eléggé eltérő, a legmagasabb értéket a törpeharcsában, a legalacsonyabbat a csukában találtuk.

2. táblázat
A vizsgált halak szerveinek ChAT enzimaktivitása

Halfaj	Agy	Szív	Bél	Izom
	(szintetizált nmol ACh/perc/gramm fehérje)			
Harcsa	91 ± 5	9 ± 5	3 ± 1	5 ± 2
Törpeharcsa	227 ± 53	26 ± 13	56 ± 71	5 ± 12
Ponty	817 ± 50	31 ± 16	194 ± 38	153 ± 27
Compó	721 ± 173	47 ± 6	102 ± 25	88 ± 50
Fehérbusa	875 ± 201	42 ± 26	76 ± 40	169 ± 23
Pettyesbusa	607 ± 42	24 ± 22	52 ± 21	147 ± 17
Angolna	912 ± 60	31 ± 29	45 ± 6	28 ± 19
Csuka	1672 ± 173	10 ± 4	98 ± 14	50 ± 10
Pisztráng	1930 ± 260	10 ± 4	34 ± 7	108 ± 35
Süllő	1470 ± 95	8 ± 2	171 ± 30	49 ± 9
Durbin	1411 ± 286	17 ± 4	117 ± 0	53 ± 7
Naphal	1755 ± 123	68 ± 6	21 ± 6	9 ± 0

Az adatok 5 állatból mért értékek átlagát jelenti a szórás (± S.D.) feltüntetésével.

3. táblázat
A vizsgált halak szerveinek AChE enzimaktivitása

Halfaj	Agy	Szív	Bél	Izom
	(μmol/perc/gramm fehérje)			
Harcsa	113 ± 2	5 ± 1	6 ± 4	88 ± 8
Törpeharcsa	233 ± 29	21 ± 7	20 ± 4	230 ± 107
Ponty	153 ± 13	65 ± 18	19 ± 6	78 ± 20
Compó	225 ± 17	16 ± 4	32 ± 12	57 ± 1
Fehérbusa	353 ± 55	126 ± 23	35 ± 8	143 ± 19
Pettyesbusa	212 ± 11	17 ± 9	16 ± 9	164 ± 29
Angolna	156 ± 10	32 ± 6	54 ± 19	137 ± 53
Csuka	118 ± 5	8 ± 1	9 ± 1	6 ± 1
Pisztráng	114 ± 15	14 ± 4	10 ± 5	42 ± 15
Süllő	134 ± 13	12 ± 4	24 ± 3	30 ± 3
Durbincs	154 ± 8	26 ± 12	23 ± 5	17 ± 1
Naphal	198 ± 16	6 ± 1	18 ± 7	21 ± 11

Az adatok 5 állatból mért értékek átlagát jelenti a szórás (± S.D.) feltüntetésével.

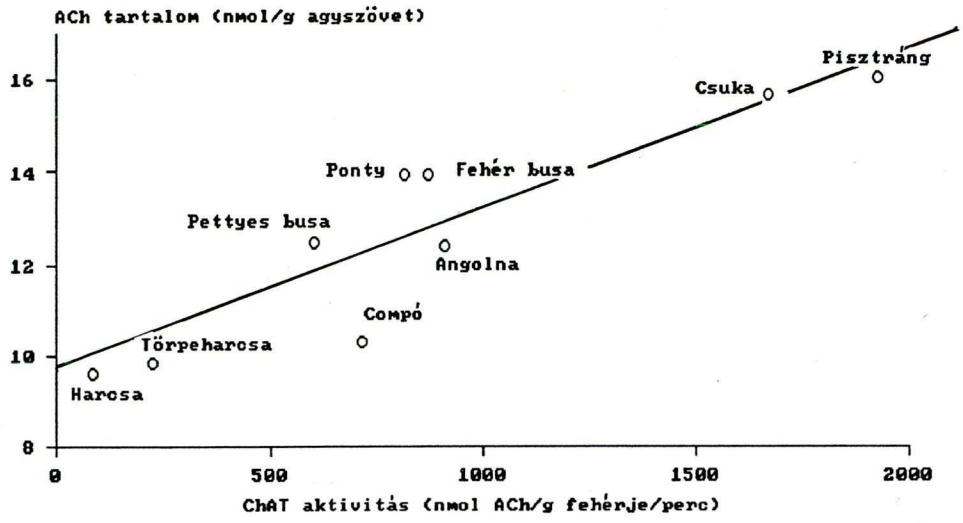
Az általunk vizsgált 12 édesvízi halfaj agyában, szívében, belében és izmában mérhető ACh tartalmak, ChAT és AChE aktivitások adatai jól egyeznek az irodalmi adatokkal (Sugden és Newsholme, 1977; Wächtler, 1980; Migani és mtsai., 1980).

Az ACh tartalom családok közötti különbségének oka nem világos, ám a halak agyában az ACh tartalom (1. táblázat) és

a ChAT enzimaktivitások (2. táblázat) közötti szoros összefüggés (r: 0,92) megerősíti ezt a különbséget. Az agyban mért ChAT aktivitások alapján három szignifikánsan elkülönülő csoportot találunk (2. Ábra).

A legmagasabb ChAT aktivitással rendelkező csoporthoz azok a halak tartoznak, amelyek fejlett vizuális orientációval rendelkeznek. Ezek azok a ragadozó halak, amelyeknél a látás elsőrendű a táplálkozás során. A középső csoportba tartozó pontyféléknél látás a táplálkozás során csak másodrendű fontosságú. A harmadik csoportba tartozó harcsa és törpeharcsa pedig elsősorban tapintással keresi meg a táplálékot. A csontoshalak látásának fiziológiai és biokémiai mechanizmusa széles körben vizsgált. A vizsgálatok nagy része a halak tectum opticumával foglalkozott behatóan (Guthrie és Banks, 1978; Migani és mtsai., 1980; Villani és mtsai., 1979; Villani, 1982; Zottoli és mtsai., 1988). Migani és mtsai. (1980) közel harmincszoros különbséget talált a pisztráng és a törpeharcsa tectum opticumának ChAT aktivitásában. Más adatok jelentős ChAT aktivitás csökkenést írnak le az aranyhal tectum opticumában a látóideg lézióját követően (Francis és Schechter, 1979; Contestabile és mtsai., 1979a, 1986). Ezek az adatok alátámasztják azt a feltételezést, melyszerint a halak agyában mérhető ChAT aktivitás szoros kapcsolatban áll a látás fejlettségével, amely viszont a táplálkozási tipustól (ragadozó-növényevő) függ.

Nem találtunk hasonló korrelációt az AChE aktivitás valamint a látás fejlettsége között, hasonlóan Contestabile (1978) adataihoz. Az AChE aktivitás sem az ACh tartalommal, sem a ChAT aktivitással nincs korrelációban. Ez az adat is alátámasztja azt a megfigyelést, hogy a kolinerg rendszert a ChAT aktivitás jobban jellemzi, mint az AChE aktivitás (Contestabile, 1978; Storm-Mathisen, 1977).



2. Ábra
Különböző halfajok agyában mérhető ChAT aktivitás valamint az acetilkolin tartalom közötti korreláció. A pontok adatait az 1. és 2. táblázatok tartalmazzák. Regressziós egyenes paraméterei: y = 0,0036 x + 9,51; korrelációs koefficiens (r): 0,92.

Néhány adat található, amely szerint az emlős izom beidegzési hálózata az izmok fiziológiai szerepétől függ (Henneman és Olson, 1965; Gruber és Zenker, 1978). Az általunk vizsgált csontoshalak törzsizmainak ChAT aktivitása a pontyféléknél és a pisztrángnál a legmagasabb. Ez - hasonlóan az agy esetében - szintén magyarázható az életmóddal. A pontyfélék szinte állandó mozgásban vannak, keresve a táplálékot, a pisztráng általában sebesfolyású vízben él, ahol szintén állandó mozgás szükséges. A ragadozóhalak törzsizmának ChAT aktivitása viszonylag alacsony, amely a redukáltabb kolinerg beidegzésre utal. A ragadozóhalak táplálékszerzésére a viszonylag kevés mozgásfázis a jellemző. Ezek a halak elsősorban lesből, sokáig mozdulatlanul állva várják a zsákmányállatot, és a

zsákmány elfogása csak egy rövid ideig tartó mozgás kíván.

A halak szivében mért ChAT aktivitások hasonló nagyságrendüek, mint Holmgren (1981) tökehalban és szivárványos pisztrángban mért értékei, az AChE aktivitások szívben és izomban mért értékei pedig Gant és mtsai. (1984) által megadott adatokkal egyeznek meg nagyságrendben.

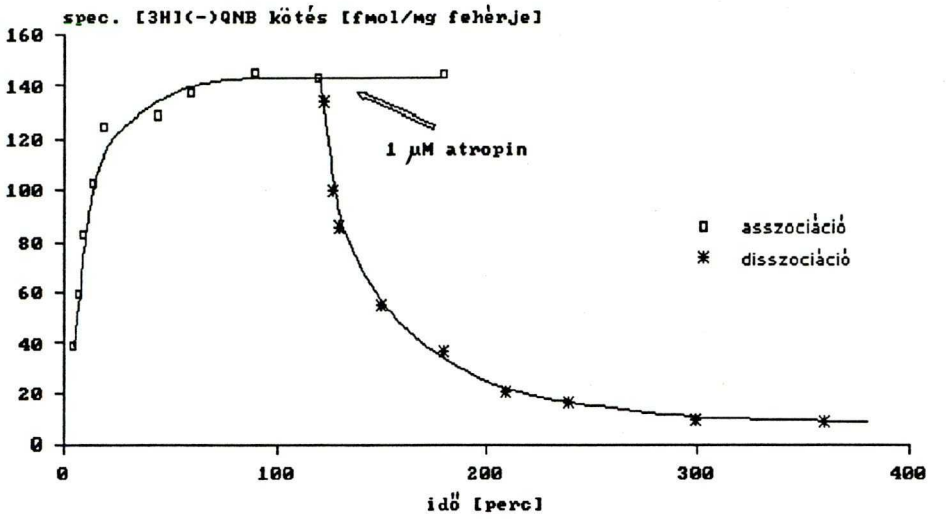
A középbél a vagus ideg kontrollja alatt áll. Holmgren és Fänge (1981) a nyálkahal (*Myxine glutinosa*) epehólyagjának kolinerg és adrenerg beidegzését írták le. A kapott adatok alapján a halak középbéli szakasza erőteljes kolinerg innervációt mutat, mivel a bélben mért ACh tartalom hasonló nagyságrendü, mint az agyban mért értékek.

Az általunk kapott összehasonlító kolinerg adatok hozzájárulhatnak a kolinerg rendszer evolúciójának jobb megértéséhez, és elősegíthetik a különböző hisztokémiai, biokémiai módszerek összehasonlítását.

4.2. Ponty muszkarin tipusú kolinerg rendszerének vizsgálata

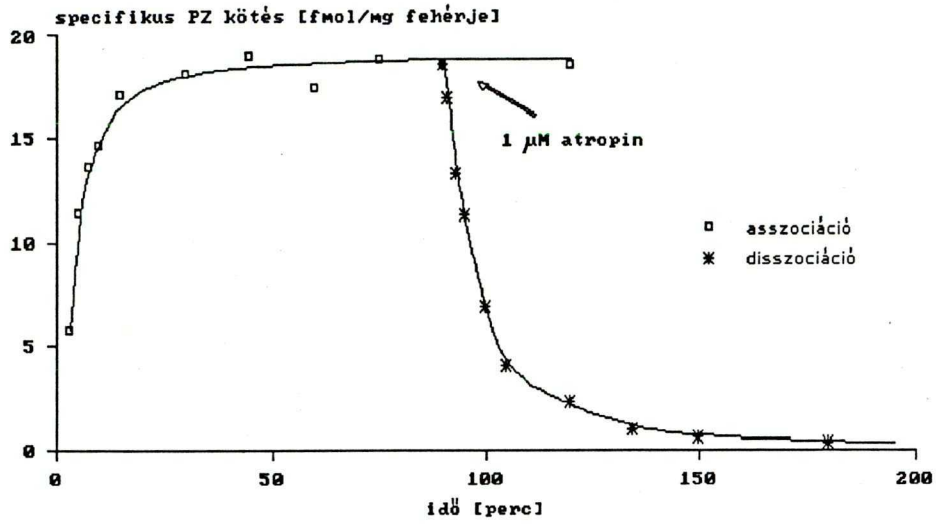
4.2.1. [^{3}H](-)QNB és [^{3}H]PZ kötés

Mind a [^{3}H](-)QNB, mind a [^{3}H]PZ kötődése a ponty agymembránhoz lineáris volt 0,1 illetve 0,9 mg/ml fehérjetartalomig. A [^{3}H](-)QNB kötődés kinetikáját a 3. ábra mutatja. Az asszociáció 45 perc alatt áll be. A [^{3}H](-)QNB-receptor asszociációs konstansa (k_{+1}) 2,56 x 10^8 $M^{-1}perc^{-1}$. A ligand-receptor disszociációs konstansa (k_{-1}) 1,09 x 10^{-2} $perc^{-1}$. A kinetikai disszociációs konstans, K_D, a k_{-1}/k_{+1} hányadosból számítva 42,7 pM. A QNB-receptor komplex disszociáció félideje ($t_{0,5}$) 20 perc.



3. Ábra
A [^{3}H](-)QNB specifikus kötés asszociációja és disszociációja az idő függésében. A kinetikai paramétereket 5 különböző kísérlet átlagából határoztuk meg. Az egyensúlyi állapot elérésekor atropin-szulfátot (10^{-6} M, végtérfogati konc.) adtunk (nyíl), és az elegyet tovább inkubáltuk a jelzett ideig. Az elegy 0,1 mg/ml fehérjét és 0,5 nM [^{3}H](-)QNB-t tartalmazott. Végtérfogat 1 ml, hőmérséklet 25 °C.

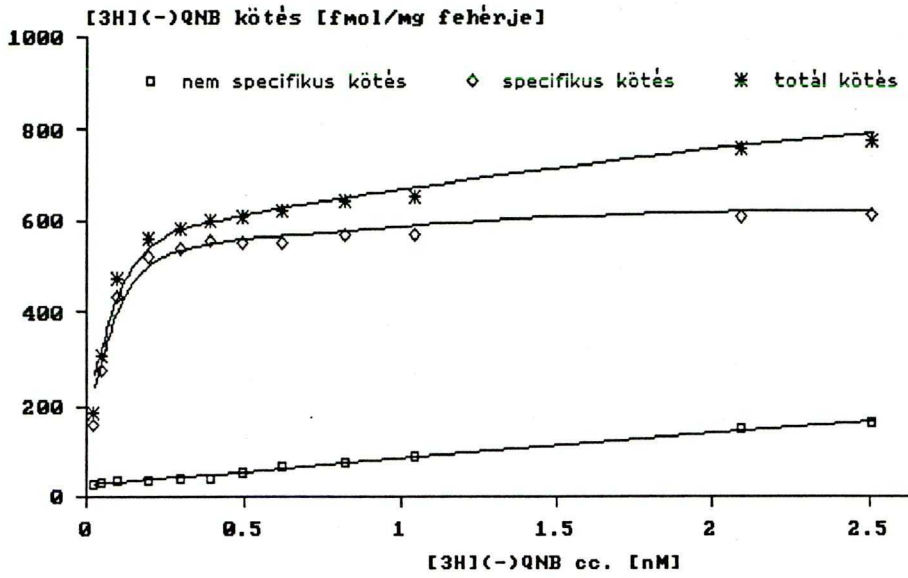
A specifikus [^{3}H]PZ kötődés a ponty agyban egy gyors asszociációt mutat 25 °C-on (4. Ábra). Az ekvilibriumot 15 perc alatt éri el a PZ-receptor komplex, a disszociációs félidő ($t_{0,5}$) 6 perc. A kinetikai asszociációs konstans (k_{+1}) 4,84 x 10^7 $M^{-1}perc^{-1}$. A becsült k_{-1} disszociációs konstans 5,90 x 10^{-2} $perc^{-1}$. A kinetikai disszociációs konstans (K_D) a k_{-1}/k_{+1} hányadosból számítva 1,22 nM.



4. Ábra
A [^{3}H]PZ specifikus kötés asszociációja és disszociációja az idő függésében. A kinetikai paramétereket 5 különböző kísérlet átlagából határoztuk meg. Az egyensúlyi állapot elérésekor atropin-szulfátot (10^{-6} M, végtérfogati konc.) adtunk (nyíl), és az elegyet tovább inkubáltuk a jelzett ideig. Az elegy 0,9 mg/ml fehérjét és 2,0 nM [^{3}H]PZ-t tartalmazott. Végtérfogat 1 ml, hőmérséklet 25 °C.

A [^{3}H](-)QNB kötődése a ponty agymembránhoz specifikus, telíthető és nagy affinitású (5. Ábra). Az ekvilibriumban mért disszociációs konstans (K_d) értéke 47,1 ± 6,3 pM, a maximális kötőhelyek száma (B_{max}) 627 ± 65 fmol/mg fehérje. A kinetikai valamint az egyensúlyi disszociációs konstansok hasonló értékűek.

A [^{3}H]PZ kötődés szintén specifikus, telíthető és nagy affinitású (6. Ábra). Az egyensúlyi disszociációs konstans (K_d) 3,85 ± 0,67 nM, a PZ kötőhelyek száma 95,3 ± 6,25 fmol/mg fehérje. Ez az egyensúlyi disszociációs konstans is

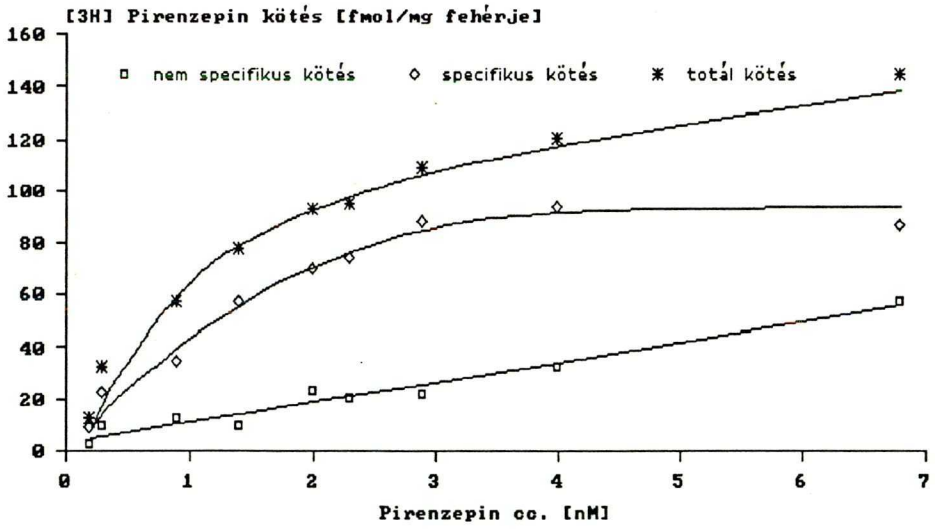


5. Ábra
Ponty agymembrán muszkarin receptorok telítése [^{3}H](-)QNB-vel. Az egyensúlyi kötési paramétereket 5 különböző kísérlet adataiból számítottuk. Teljes (∗), specifikus (◊) és nem-specifikus (□) kötés. A fehérjetartalom 0,09 mg/ml, végtérfogat 1 ml, hőmérséklet 25 °C, inkubációs idő 120 perc. A K_d 47 pM, a B_{max} 627 fmol/mg fehérje.

A [^{3}H](-)QNB és [^{3}H]PZ telítési kísérleteknél kapott maximális kötőhelyek számából az M_1-receptorok arányára 15,2 %-ot kaptunk. A fennmaradó 84,8 %-ot az M_2-receptorok alkothatják.

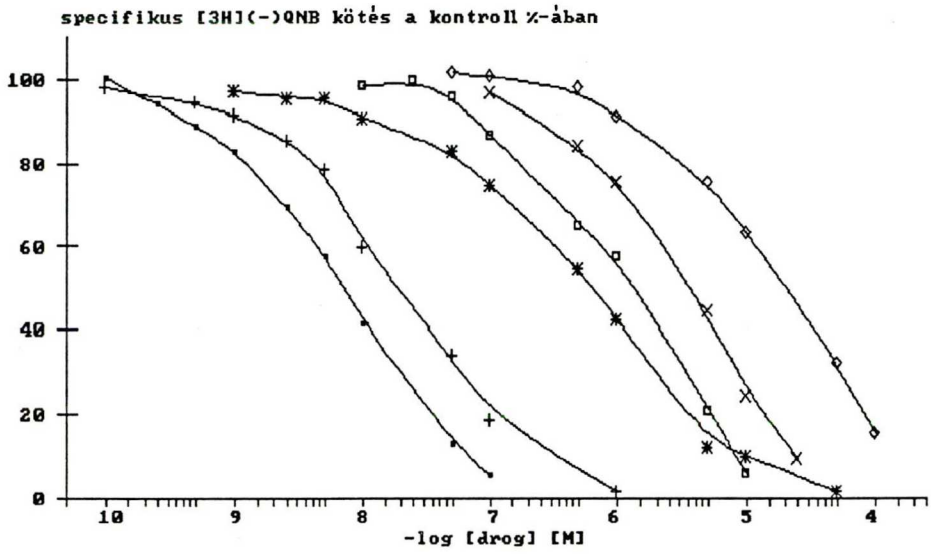
4.2.2. Kolinerg drogok hatása a muszkarin receptorok kötési tulajdonságaira

Néhány muszkarinerg drog képes gátolni a [^{3}H](-)QNB és [^{3}H]PZ kötődését a ponty agymembrán mAChR-hoz (7., 8. Ábra). Általában a muszkarinerg antagonisták potensebb inhibítorok, mint az agonisták (4. táblázat). Az atropin-szulfát és atropin-metilnitrát K_i értéke hasonló a [^{3}H](-)QNB és [^{3}H]PZ kötődésekor, míg a PZ és AF-DX 116 körülbelül százszor kisebb hatású (K_i értékek 61,19 és 10,38, valamint 307,0 és 55,87 nM). Az oxotremorin és a karbakol K_i értékei 156,3 és 62,79 nM valamint 1301 és 1696 nM a [^{3}H](-)QNB és [^{3}H]PZ kötésre.

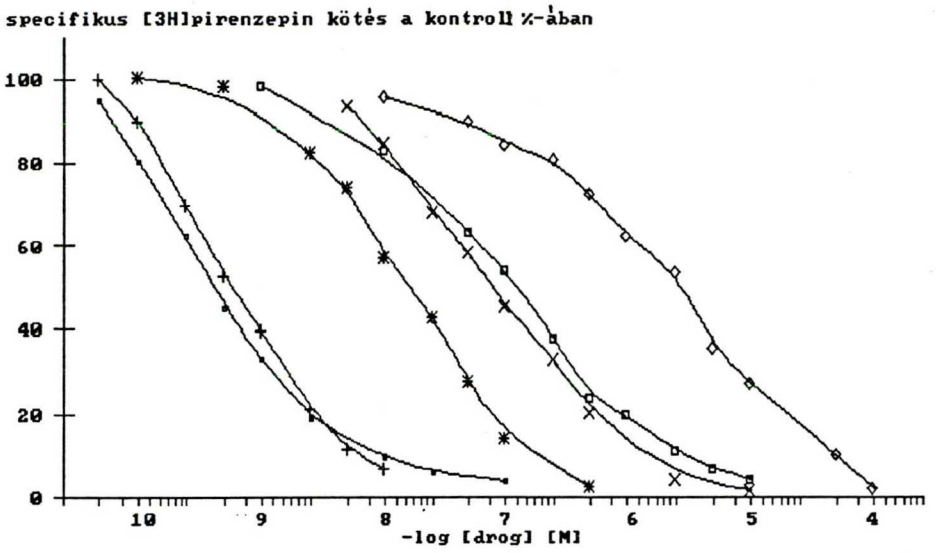


6. Ábra
Ponty agymembrán muszkarin receptorok telítése [^{3}H]PZ-vel. Az egyensúlyi kötési paramétereket 5 különböző kísérlet adataiból számítottuk. Teljes (✳), specifikus (◇) és nem-specifikus (□) kötés. A fehérjetartalom 0,85 mg/ml, végtérfogat 1 ml, hőmérséklet 25 °C, inkubációs idő 120 perc. A K_d 3,85 nM, B_{max} 95,3 fmol/mg fehérje.

Az n_H (Hill koefficiens) érték az antagonisták esetében közel 1 (0,92-1,05), kivéve az AF-DX 116-ot (n_H: 0,75) a [^{3}H]PZ kötésekor. Az oxotremorin n_H értékei a [^{3}H](-)QNB kötésnél 0,63, a [^{3}H]PZ kötésekor 0,66, míg a karbakol n_H értékei mindkét kötés esetében 0,69.



7. Ábra
Muszkarinerg drogok gátló hatása a [^{3}H](-)QNB kötődésére ponty agymembrán muszkarintipusú acetilkolin-receptorokhoz. Atropin-szulfát (—▪—); atropin-metilnitrát (+); pirenzepin (*); oxotremorin (□); AF-DX 116 (×); Karbakol (◇). A kísérleti körülmények a 4. táblázat szerint.



8. Ábra
Muszkarinerg drogok gátló hatása a [^{3}H]PZ kötődésére ponty agymembrán muszkarintipusú acetilkolin-receptorokhoz. Atropin-szulfát (-•-); atropin-metilnitrát (+); pirenzepin (*); oxotremorin (⊟); AF-DX 116 (×); Karbakol (◊). A kísérleti körülmények a 4. táblázat szerint.

Az ACh tartalom a ponty agyban alacsonyabb, mint az emlősök agyában, de a kolinerg enzimek (ChAT, AChE) aktivitása hasonló tartományba esik. Ezt más fajok esetében is leírták (Francis és Schechter, 1980; Wächtler, 1980). A muszkarinerg receptorok direkt és indirekt vizsgálata mindkét receptorpopuláció jelenlétét mutatja a ponty agyában. A PZ kötődés direkt mérésével (Watson és mtsai., 1982; 1986a, b, c) már demonstrálták, hogy a PZ sok idegi szövetben telíthető módon nagy affinitású M_1 receptorpopulációhoz kötődik. A ponty agyban, amely az emlősök agytörzsével homológ, a telencephalon kevéssé fejlett. A [^{3}H]PZ kötődés aránya a [^{3}H](-)QNB kötéséhez csak kb. 15 %, amely az M_1 receptorok alacsony arányára utal.

4. táblázat
Muszkarinerg drogok hatása a radioligandok kötésére ponty agyban.

Drog	[^{3}H](-)QNB		[^{3}H]PZ	
	K_i	n_H	K_i	n_H
Atropin-szulfát	0,55 (0,42-0,76)	0,98±0,08	0,24 (0,23-0,25)	0,98±0,10
Atropin-metilnitrát	1,61 (1,00-3,74)	1,01±0,10	0,34 (0,24-0,44)	1,05±0,02
Pirenzepin	61,19(46,8-79,8)	0,99±0,10	10,38 (8,4-14,9)	0,92±0,10
Oxotremorin	156,3 (106-332)	0,63±0,08	62,79 (48-83)	0,66±0,08
AF-DX 116	307,0 (250-407)	0,92±0,11	55,87 (47,4-61,7)	0,75±0,10
Karbakol	1301 (795,2-2886)	0,69±0,06	1696 (1328-2074)	0,69±0,10

A feltüntetett K_i értékek (nM-ban megadva) a 4-9 kísérletben kapott adatok (zárójelben a szélső értékek) mértani átlagát jelenti. Az n_H a kapott adatok számtani átlaga (± S.D.). A ponty agymembránt 25 °C-on 120 percig inkubáltuk, 1 ml végtérfogatban. Az elegy tartalmazta a kiválasztott muszkarinerg drogokat (10^{-4} és 10^{-10} M koncentráció-tartományban) és 0,5 nM [^{3}H](-)QNB-t vagy [^{3}H]PZ-t. A fehérjekoncentráció 0,1 vagy 0,9 mg/ml.

Hasonlóan alacsony M_1 populációt írtak le a patkány kéreg-alatti régióiban (Luthin és Wolfe, 1984; Wang és mtsai., 1987). A [^{3}H](-)QNB ponty agyban mért kötési paraméterek jó egyezést mutatnak más fajok agyában mért értékekhez (Luthin és Wolfe, 1985; Yamamura és Snyder, 1974a). A [^{3}H]PZ kötés K_d értéke hasonló Wang és mtsai. (1987) és Watson és mtsai. (1986a, b, c) által patkány szubkortikális régióiban mért értékekhez. A [^{3}H]PZ kötődés kinetikai eredményei azt mutatják, hogy a PZ a ponty agy M_1 receptoraihoz is egy kötőhellyel kapcsolódik, ahogyan azt már néhányan leírták (Luthin és Wolfe, 1984; Watson és mtsai., 1982,

1986b, c). Másfelől viszont a [^{3}H]PZ kötés AF-DX 116-al történt gátlásakor kapott 0,75-ös Hill koefficiens értéke azt mutatja, hogy a [^{3}H]PZ kötődése két kötőhellyel történik. Ez összhangban áll Hammer és Giachetti (1982) eredményével, akik a PZ kötődését a patkány szimpatikus dúcaiban két kötőhellyel írták le. A két kötőhely disszociációs konstansára 10-20 nM és 200-500 nM-t kaptak a magas és az alacsony affinitású helyekre vonatkozóan. Ezek az adatok azt mutatják, hogy a PZ egy második, alacsony affinitású hellyel lehet kapcsolatban, vagy a receptor kötési állapotával. A muszkarinerg antagonisták gátlási sorrendje a ponty agyban mind a [^{3}H](-)QNB, mind a [^{3}H]PZ kötés esetében hasonló, mint amit máshol leírtak (Freedman és mtsai., 1988; Watson és mtsai., 1986b, c). Az eredmények alapján a ponty agy kolinerg receptor rendszere hasonló a filogenetikailag fejlettebb gerincesekéhez viszonyítva. A [^{3}H](-)QNB és [^{3}H]PZ kötés specifikus, telíthető és nagy affinitású, de az M_1 receptor-populáció viszonylag alacsony részarányú.

4.3. A ponty ChAT Michaelis állandóinak meghatározása

Kísérleteinkben a ponty agy kolin-acetiltranszferázának tulajdonságait vizsgáltuk. Optimalizáltuk az enzimreakció mérésének körülményeit, tisztítottuk az enzimet Blue Dextrán-Sepharose 4B affinitáskromatográfiával (festék-ligand kromatográfia), meghatároztuk izoelektromos pontját kromatofókuszálással, majd meghatároztuk a Michaelis állandóit.

4.3.1. A ChAT aktivitásmérés körülményeinek optimalizálása

Fonnum (1975) által kifejlesztett módszerben az inkubációs oldat összetétele végkoncentrációban a következő volt: 0,6 mM [1-^{14}C]AcCoA, 300 mM NaCl, 10 mM kolin-klorid, 20 mM EDTA és 0,1

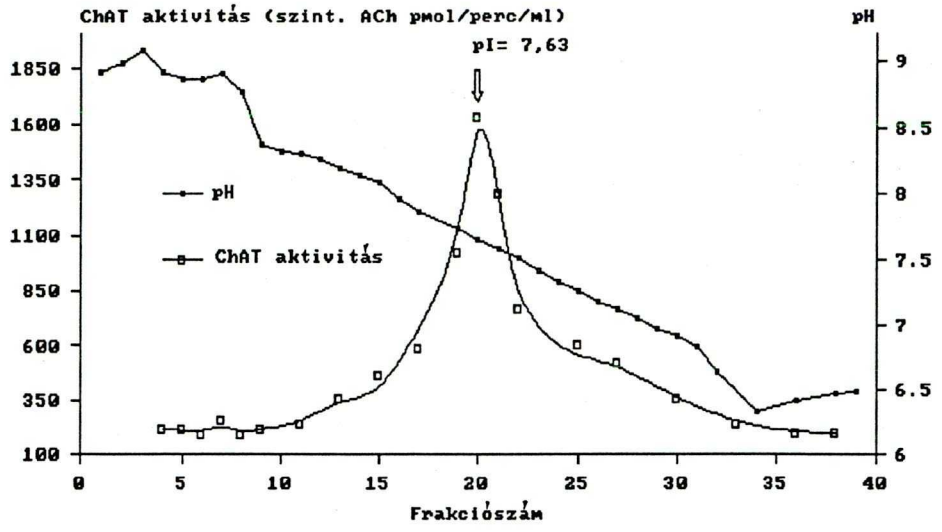
mM ezerin-szulfát, 50 mM-os nátrium-foszfát pufferben (pH 7,4). Az inkubálás 37 °C-on 15 percig tartott. Ezek az értékek patkány agy ChAT aktivitás mérésére optimalizált körülmények. Egy alacsonyabb fejlettségű gerinces esetében valószínűnek tartottuk, hogy ezek a paraméterek nem optimálisak, és így a Michaelis állandók meghatározásában szerepet játszanak.

Kísérleteink során a hőmérsékletet, a pH-t, a kolin- és az AcCoA koncentrációját változtattuk.

A kísérletek során az inkubáló hőmérsékletet 20-40 °C között két fokonként változtattuk. Eredményként kaptuk, hogy a ponty agy ChAT aktivitásának optimuma 30 °C-nál található. Ez minden bizonnyal összefüggésben van azzal, hogy a ponty poikilotherm, és így az enzim hőmérsékleti optimuma *in vivo* körülmények között is alacsonyabb az emlősökéhez viszonyítva. A továbbiakban az inkubálási hőmérsékletet 30 °C-ra változtattuk, majd vizsgáltuk a reakcióelegy pH-jának hatását az enzimaktivitásra. A reakcióelegy pH-ját 7,0-8,0 között tizedenként változtattuk. Az optimum 7,4-7,5 között mutatkozott, ezért a pH-n nem változtattunk. Ugyancsak nem változtattuk meg az eredeti kolin valamint az AcCoA koncentrációkat, mivel a megadott értékek vizsgálataink szerint már jóval a telítési tartományba esnek.

4.3.2. A ChAT tisztítása

A centrifugálás után kapott tiszta enzimpreparátumot Blue Dextrán-Sepharose 4B oszlopra vittük fel. A 3.9. pont alatt leírt módon felkötött és NaCl gradienssel eluált enzim kitermelése elérte a 75 %-ot, tisztulása a 10- szerest. Az oldat betöményítése ammónium-szulfátos kisózással történt, majd a sómentesítést követően a kis térfogatban feloldott enzimpreparátumot a kromatofókuszáló oszlopra vittük fel. A kromatofókuszálást Sluyterman és Elgersma (1978) által leírt módon végeztük. A kromatofókuszálás eredménye a 9. ábrán látható.



9. Ábra
A ponty agy kolin-acetiltranszferáz enzim tisztítása kromatofókuszálással (Sluyterman és Elgersma, 1978). Az eluálás "Polybuffer 96" (Pharmacia) ioncserélővel, 6,5-9 pH tartományban történt, 10 cm^3-es PBE 94 (Pharmacia) töltetű oszlopon. A ponty agy ChAT izoelektromos pontjára (pI) 7,63-t kaptunk.

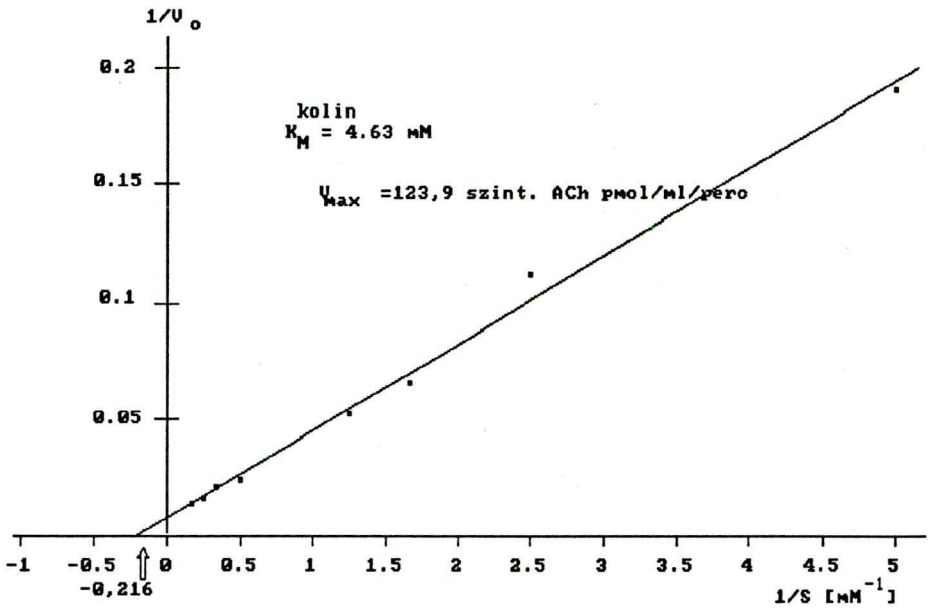
A kromatofókuszálással kapott eredmények alapján az enzim izoelektromos pontja (pI): 7.63. A kapott eredmény jó egyezést mutat az irodalomban megadott humán (pI=7.8) és patkány agyból (pI=7.5-8.4) izolált ChAT izoelektromos pontjával, ám eltér a galamb (pI=6.6) vagy a tengeri malac (pI=6.8) agyában kapott értékektől (Malamud és Drysdale, 1978). Az eredmények alapján nem találtunk az izoelektromos pontban eltérő izoenzimeket. A maximális tisztulást mutató frakciók (19-22) kitermelése elérte az 55 %-ot, míg tisztulása a 50-szerest. A továbbiakban ezeket a frakciókat használtuk a ChAT Michaelis állandóinak meghatározásához.

4.3.3. A ChAT Michaelis állandói

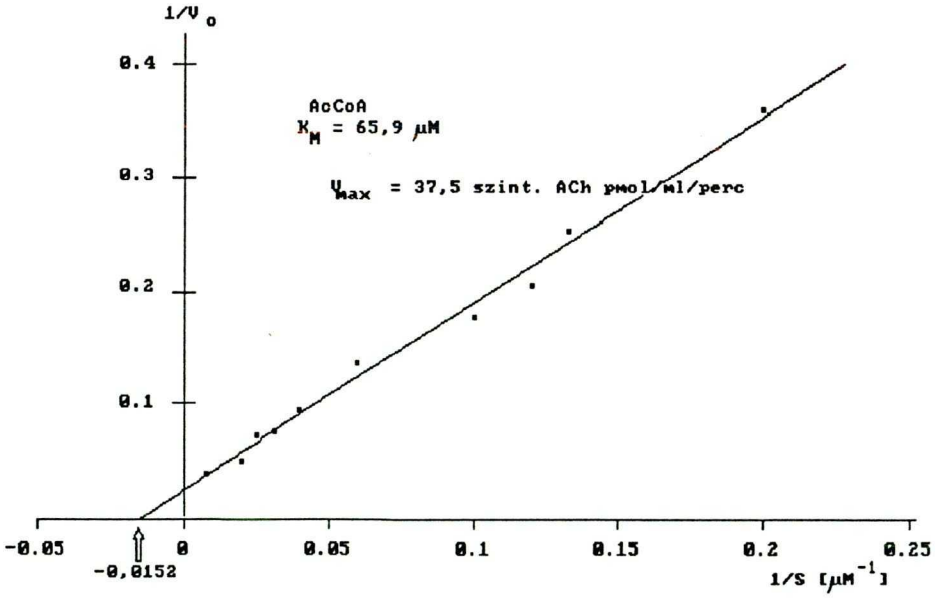
A Michaelis állandók meghatározásánál az egyik szubsztrát állandó koncentráción tartása mellett a másik szubsztrát koncentrációját változtattuk, és mértük a ChAT aktivitás kezdeti sebességeket. A kapott adatokból a Michaelis állandókat Lineweaver-Burk féle ábrázolással, grafikus úton kaptuk meg (10., 11. Ábra).

Az eredmények szerint a ponty agyban a kolinra kapott K_M érték (4,63 mM) magasabb, mint az emberben, nyúlban valamint fonálféregben (≈1 mM) mért értékek; az AcCoA-ra kapott K_M érték (65,9 μM) viszont jó egyezést mutat az irodalmi adatokkal (pl. 50 μM a fonálféregben) hasonló mérési körülmények között (Rand és Russell, 1985; White és Wu, 1973).

A ponty agy ChAT izoelektromos pontja, valamint a kapott K_M értékek eltérnek ugyan valamennyire az irodalmi adatoktól, ám mégis jelzik, hogy a ChAT eléggé konzervatív felépítésű enzim, és az eltelt évmilliók alatt - valószínüleg a szervezetben betöltött fontos szerepe miatt - alapvető biokémiai tulajdonságai nem változtak meg még az egymástól filogenetikailag igen távolálló fajokban sem.



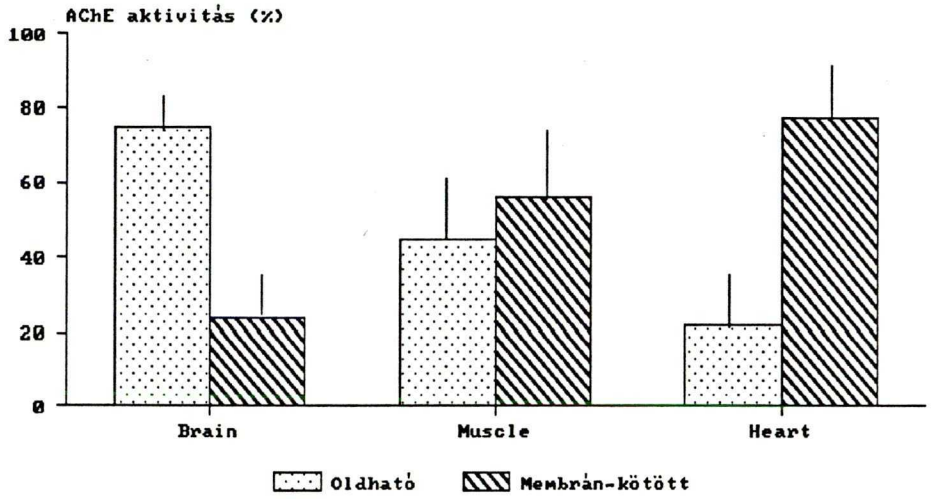
10. Ábra
Ponty agy tisztított ChAT K_M és V_{max} értékeinek meghatározása kolinra (Lineweaver-Burk féle ábrázolás). [1-^{14}C]AcCoA koncentráció 600 μM, pH 7,4; inkubálás: 30 °C, 15 perc.



11. Ábra
Ponty agy tisztított ChAT K_M és V_{max} értékeinek meghatározása [1-^{14}C]AcCoA-ra (Lineweaver-Burk féle ábrázolás). A kolin koncentrációja 10 mM, pH 7,4; inkubálás: 30 °C, 15 perc.

4.4. A ponty AChE biokémiai jellemzése

A ponty szerveiből (agy, izom, szív) Triton X-100-zal készült homogenizátumban a mérhető oldható AChE mennyisége az agy, izom, szív sorrendnek megfelelően csökkent, ill. a kötött enzim mennyisége nő (12. Ábra).



12. Ábra
Membránkötött és oldható (szolubilis) AChE molekuláris alformák százalékos megoszlása a ponty agyában (brain), vázizmában (muscle) és szivében (heart) (n = 8; ± S.D.).

Ennek megfelelően az agyban a szolubilis, míg a vázizomban - de különösen a szívben - a membránkötött AChE aránya a domináns. Szerebnyikova és mtsai. (1971) ponty szívében és vázizmában hasonlóan magasnak találta a kötött AChE enzim arányát a szolubilishez viszonyítva.

Az egyes szervekben található kötött és szabad AChE enzimek aránya minden bizonnyal összefüggésben állhat az AChE szervenkénti változó molekuláris formáival is. Annak eldöntésére, hogy a ponty agy, szív, izom és a vérplazma

pszeudokolinészterázt vagy AChE-t tartalmaz, specifikus gátlószereket használtunk. Eredményeink szerint az agy, szív, vázizom és a vérplazma kolinészteráz aktivitása igen jelentősen csökken a specifikus AChE bénítóként ismert BW 284 C51 hatására. Valamennyi szerv esetében 10^{-7}-10^{-8} M koncentrációban 50 %-os gátlást okozott. Ugyanekkora gátlást négy nagyságrenddel nagyobb (10^{-4} M) ethopropazinnal lehetett elérni (5., 6. táblázatok).

5. táblázat
A BW 284 C51 és az ethopropazin félmaximális gátló koncentrációi az AChE aktivitás gátlásában ponty szerveiben.

	IC_{50} (mol/liter)	
Szerv	**BW 284 C51**	**Ethopropazin**
Agy	3.0×10^{-8}	1.3×10^{-4}
Izom	3.8×10^{-7}	8.6×10^{-4}
Szív	2.0×10^{-8}	2.3×10^{-4}
Vérplazma	3.0×10^{-8}	8.0×10^{-4}

Az adatok 8 mérés átlagai.

A különböző halfajok egyes szerveiben meghatározott kolinészteráz milyenségét illetően ellentmondásosak az irodalmi adatok. Legkorábban Augustinsson (1958) foglalkozott a halakban előforduló kolinészteráz tipusokkal. Azt találta, hogy a különböző halfajok agyában, májában, úszóhólyagjában, vázizmában, szívében nem található pszeudokolinészteráz. Később a szérumban detektálni tudta az AChE-t (Augustinsson,

1959a, b). Ezzel ellentétben Clos és Serfaty (1958) hal izomban és vérben pszeudokolinészteráz aktivitást tudtak mérni. Gaál és mtsai. (1980) kimutatták, hogy a pontyagy kolinészteráz nem különbözik az emlősökétől, viszont a szérum igen, mivel ellentétben az emlősökkel, AChE-t tartalmaz.

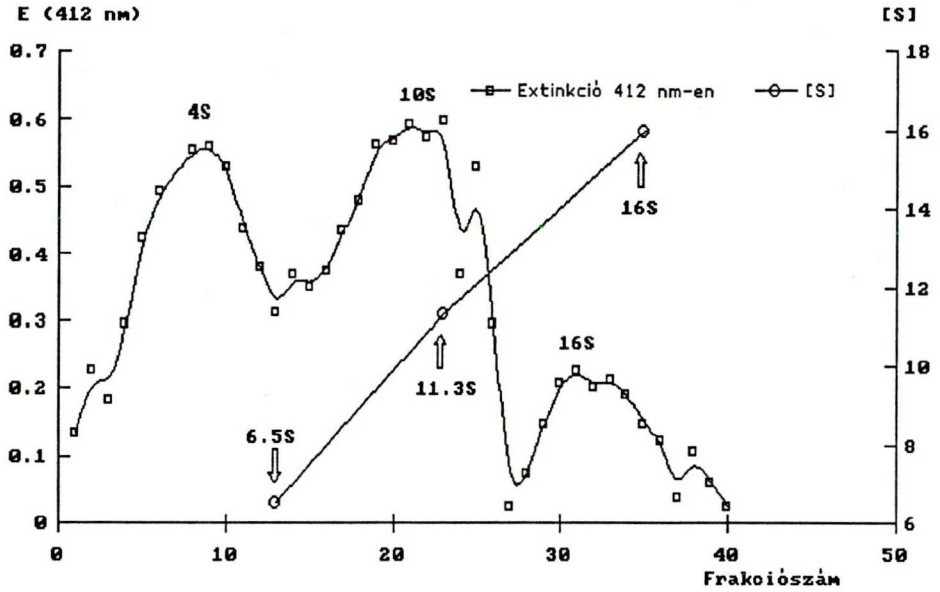
6. táblázat
A BW 284 C51 és az ethopropazin hatása az AChE aktivitására ponty szerveiben.

Inhibítor (mol/liter)	Agy	Izom	Szív	Vérplazma
BW 284 C51				
10^{-8}	67 ± 1	100 ± 7	62 ± 34	65 ± 6
5×10^{-8}	44 ± 3	93 ± 11	43 ± 38	38 ± 4
10^{-7}	26 ± 5	69 ± 9	21 ± 20	21 ± 6
5×10^{-7}	9 ± 3	43 ± 21	9 ± 10	9 ± 5
10^{-6}	N.D.	26 ± 17	4 ± 7	1 ± 1
Ethopropazin				
10^{-5}	97 ± 1	---	---	---
5×10^{-5}	79 ± 3	86 ± 9	78 ± 4	84 ± 1
10^{-4}	49 ± 9	75 ± 9	58 ± 13	70 ± 7
5×10^{-4}	28 ± 7	61 ± 9	42 ± 30	58 ± 11
10^{-3}	19 ± 5	47 ± 8	N.D.	47 ± 16

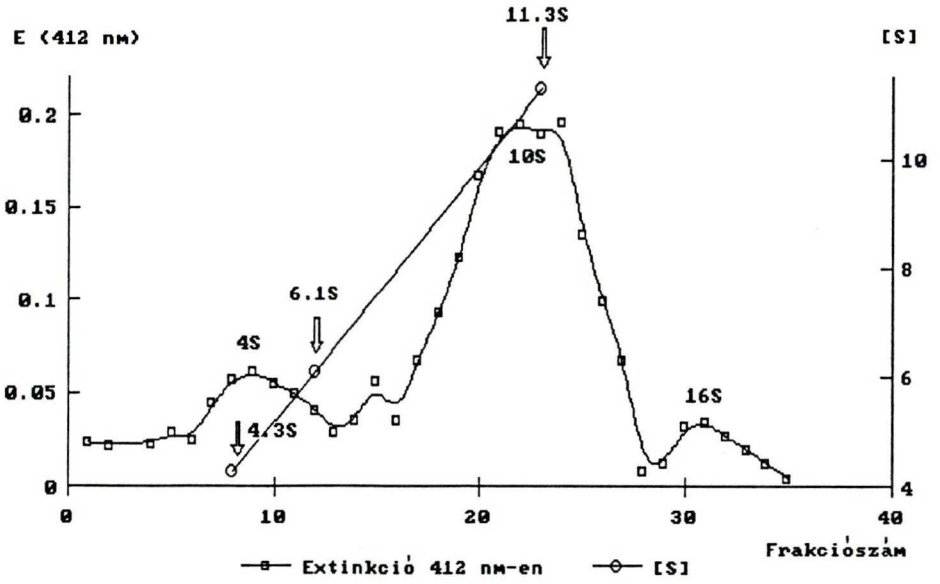
Az adatok 8 mérés átlagai (± S.D.). Az értékek a kontroll százalékában vannak kifejezve. N.D. = nem detektálható.

Jelen méréseink alapján megállapítható, hogy a vizsgált szervekben és a vérplazmában is AChE található. A pszeudokolinészteráz aránya a pontynál a vérplazmában is jelentéktelen. Ez bizonyos szempontból megegyezik Pecot-Dechavissine (1962) eredményével, amely kimutatta, hogy a halizom teljes kolinészteráz aktivitásának csupán 1,4-2,6 %-a pszeudokolinészteráz eredetű.

Ponty agyában az ismert AChE molekuláris formák (1. Ábra) közül a G_1, G_4 és A_{12} típus volt kimutatható (13. Ábra). Ezek közül a G_1 és az A_{12} forma a szolubilis formában jelenlevő AChE-t jelenti, míg a G_4-es forma a membránkötött enzimet reprezentálja. Feltünő az A_{12}-es forma magas aránya a ponty agyában. Emlős agyban ez csupán 1-2 %-ot ér el. Ismert, hogy filogenetikailag egyre magasabban álló szervezetekben csökkenő arányban mutatható ki az A_{12}-es forma. Mivel a halak a gerinces állatok egyik legalacsonyabb törzsfejlődési szintjén álló osztályát képviselik, ennek következménye lehet az A_{12}-es molekuláris forma feltünően magas aránya a többi fejlettebb szinten álló gerinces állathoz viszonyítva. A máj legnagyobb mértékben a membránkötött G_4-es formát tartalmazza. Negyedannyi a G_1 aránya, míg a legalacsonyabb az A_{12} forma mennyisége (14. Ábra).



13. Ábra
Az AChE molekuláris alformáinak megoszlása ponty agyban a szedimentációs sebességi [S] profil alapján. Mindegyik frakcióból AChE (E_{412}) és marker enzim meghatározást végeztünk. G_1 = 4S, G_4 = 10S, A_{12} = 16S szedimentációs állandójú AChE formák.



14. Ábra
Az AChE molekuláris alformáinak megoszlása ponty májában a szedimentációs sebességi [S] profil alapján. Mindegyik frakcióból AChE (E_{412}) és marker enzim meghatározást végeztünk. G_1 = 4S, G_4 = 10S, A_{12} = 16S szedimentációs állandójú AChE formák.

4.5. Peszticidek hatásának vizsgálata

Kísérletsorozatokkal vizsgáltuk a potenciálisan stresszornak tekinthető és szöveti nekrózist kiváltó $CuSO_4$ és a PQ, valamint a kolinészteráz bénítást okozó MD hatásait a ponty kolinerg paramétereire, valamint az esetleges szinergista vagy antagonista hatások felderítése céljából.

4.5.1. Peszticidek indukálta morfológiai elváltozások a kopoltyú felszínén

A kezelések során alkalmazott peszticidek (koncentrációk: 5 mg/l PQ; 5 mg/l $CuSO_4$) membránroncsoló tulajdonságai miatt, a biokémiai vizsgálatok mellett SEM-al vizsgáltuk a halak kopoltyú-lemezeit is, a fellépő destruktív morfológiai elváltozások megismerése érdekében.

A 15., 16. ábrákon a kezelés nélküli ponty kopoltyúlemeze (15. Ábra, nagyítás (N): 250x), valamint a kinagyított részen a lemezt borító többrétegű hám felvétele (16. Ábra, N: 5600x) látható. Megfigyelhető a sejtek határa (nyilak), valamint a sejtfelszínen található, halfajra jellemző vékony rajzolatok.

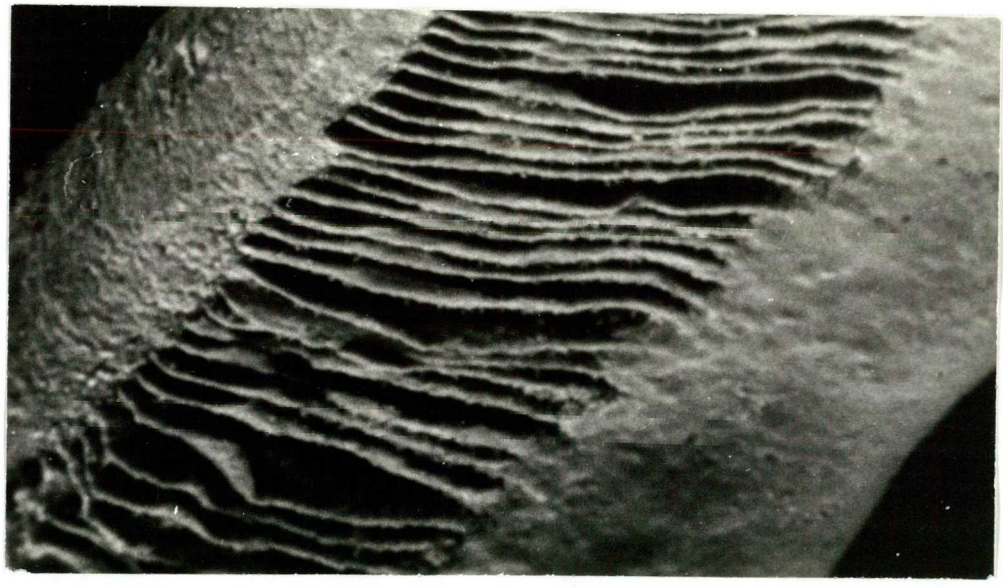
A 17., 18. felvétel az 5 mg/l koncentrációjú PQ hatását mutatja 4 napos kezelést követően. A kinagyított részen látható, hogy a kopoltyúlemezek oldalát borító többrétegű laphám sejtjei a kezelést követően kiemelkednek a felszínből.

A 19. és 20. sz. felvételeken (N: 610x és 6700x) az 5 mg/l PQ, valamint a pH 6,0-ra beállított kémhatású víz - mint a savas esők modellezése - együttes hatását vizsgáltuk. Elvékonyodott lamelláris szerkezet, valamint a kinagyított részen a kopoltyúlemezt borító hámréteg nagymértékű pusztulása figyelhető meg a kezelést követő 4. napon.

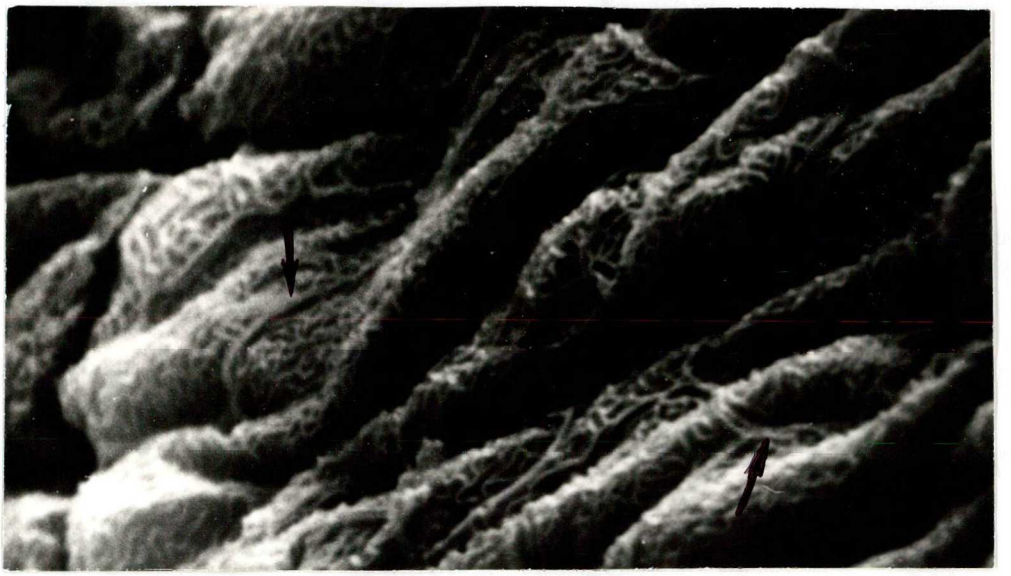
A 21. és a 22. (N: 300x és 580x) ábrákon az 5 mg/l

koncentrációjú $CuSO_4$ hatását mutatja a kezelés 4. napján. Feltűnő a légzőhám borította kopoltyúlemezkék (lamellák) elvékonyodása. A kopoltyúfelszínt nagymennyiségű nyálka és szövettörmelék borítja.

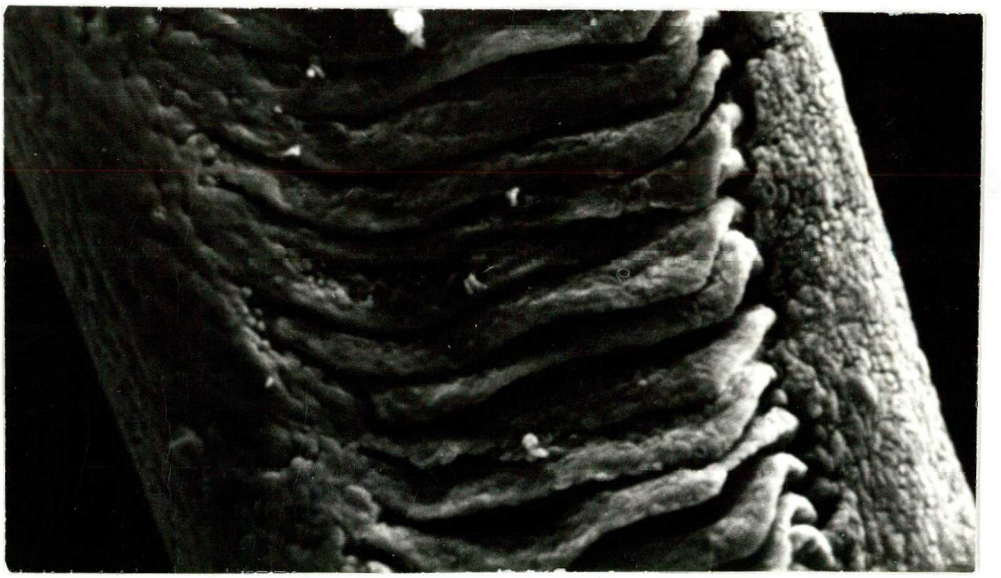
A 23. (N: 600x) és 24. (N: 380x) felvételeken a savas kémhatású víz (pH 6,0) és az 5 mg/l $CuSO_4$ együttes hatása látható a kezelés utáni 4. napon. A lamelláris szerkezet szinte felismerhetetlen, a kopoltyúfelszín teljesen nekrotizált. 0,2 mg/l Cu és a savas kémhatású víz (pH 6,0) együttes hatása már egy nap múltán SEM-al észlelhető károsodást okoz a pontyok kopoltyúján.



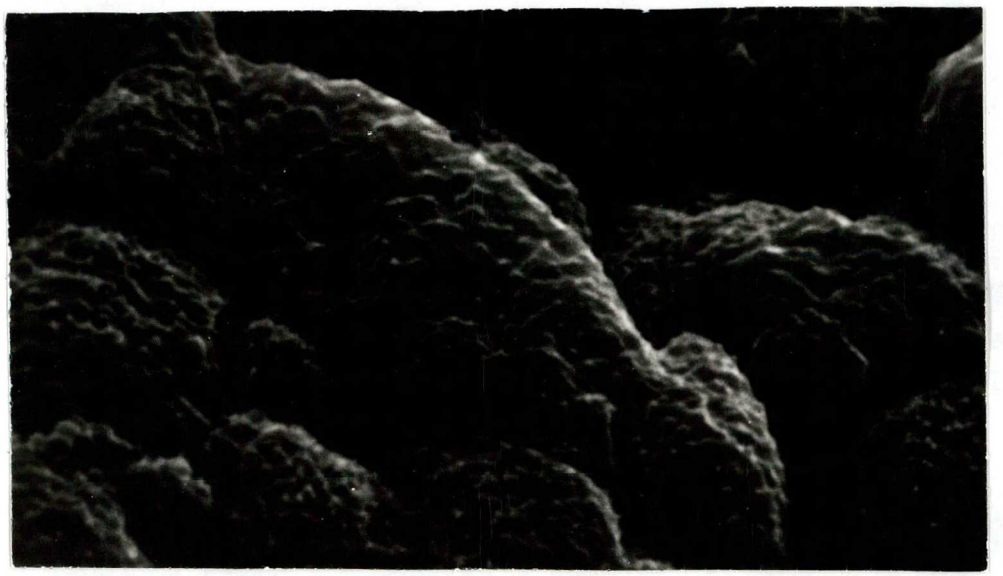
15. Ábra



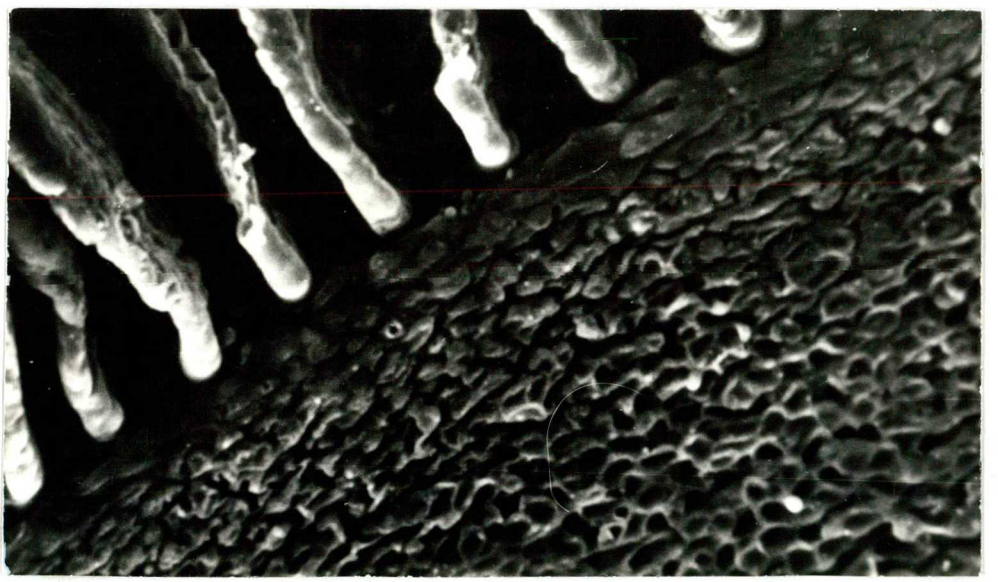
16. Ábra



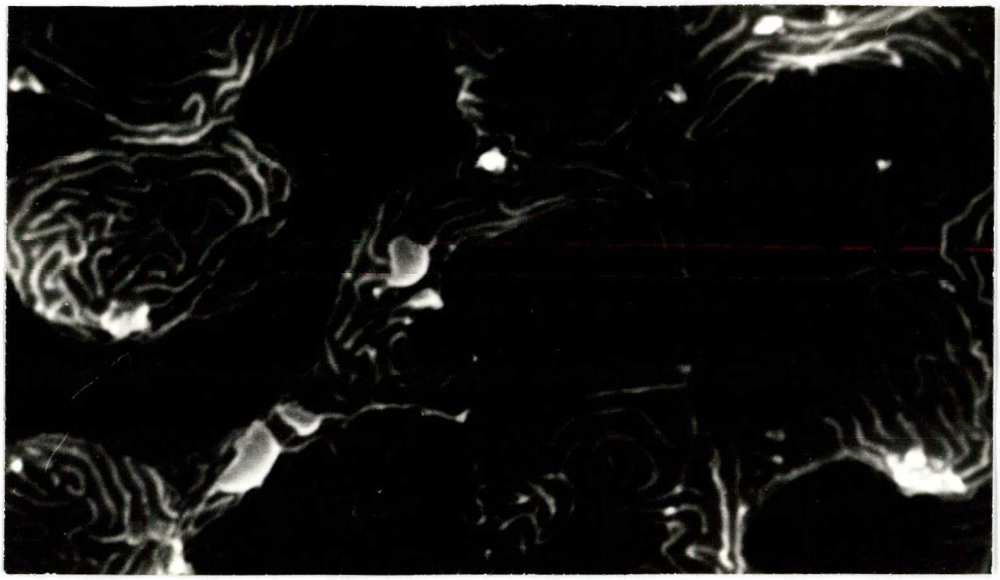
17. Ábra



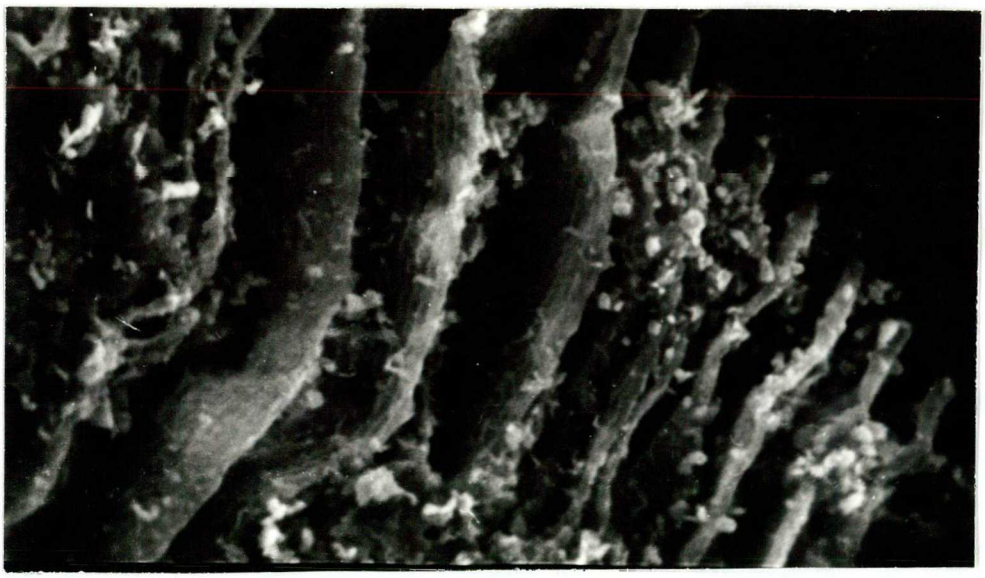
18. Ábra



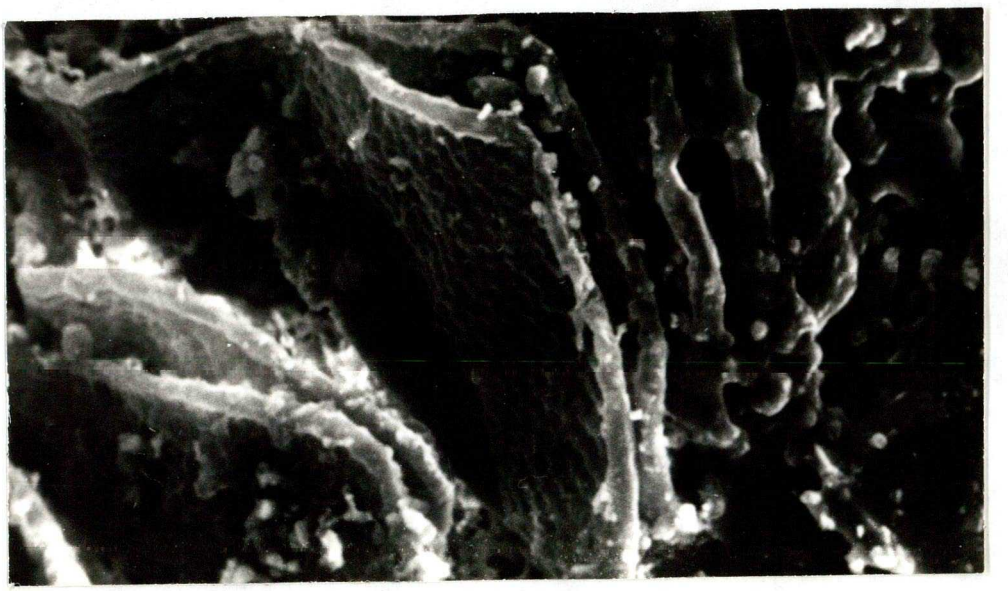
19. Ábra



20. Ábra



21. Ábra



22. Ábra

23. Ábra

24. Ábra

4.5.2. A peszticidek hatása a kolinerg paraméterekre

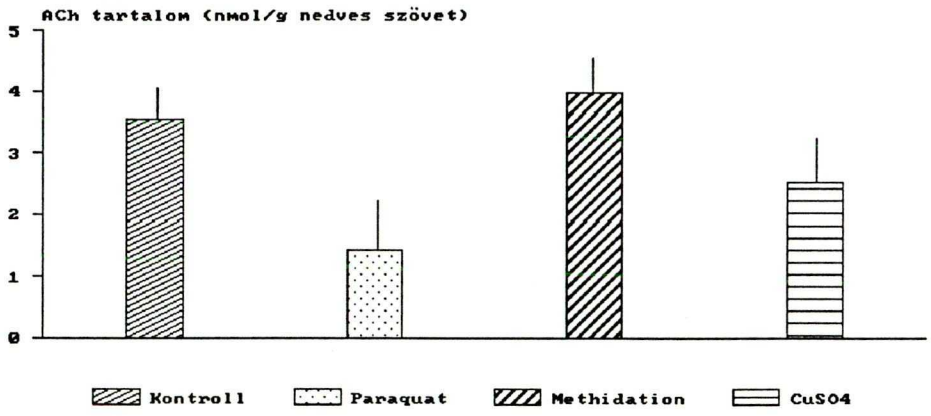
A kolinerg paraméterek közül a szöveti ACh tartalmat, a ChAT valamint az AChE enzimaktivitásokat mértük az általunk felhasznált peszticidek hatásainak kimutatására. Az akvárium vizében feloldott hatóanyagok (5 mg/l PQ; 5 mg/l $CuSO_4$; 2 mg/l MD) 1 hetes expozíciója után a pontyok agyából mértük a kolinerg paramétereket a 3.2. - 3.4. pontban leírt módszerrel.

A ponty agy *in vivo* ACh tartalmának változását peszticid-kezelés hatására a 25. ábra mutatja. A kontrollhoz képest a paraquáttal kezelt halak agyának ACh tartalma 40 %-ra, a $CuSO_4$-tal kezelteknél 70 %-ra csökkent le. Az AChE-t bénító MD kezelésnél egy nem szignifikáns, 12 %-os emelkedés mérhető.

A ChAT aktivitás a PQ és a $CuSO_4$ kezelés hatására nem

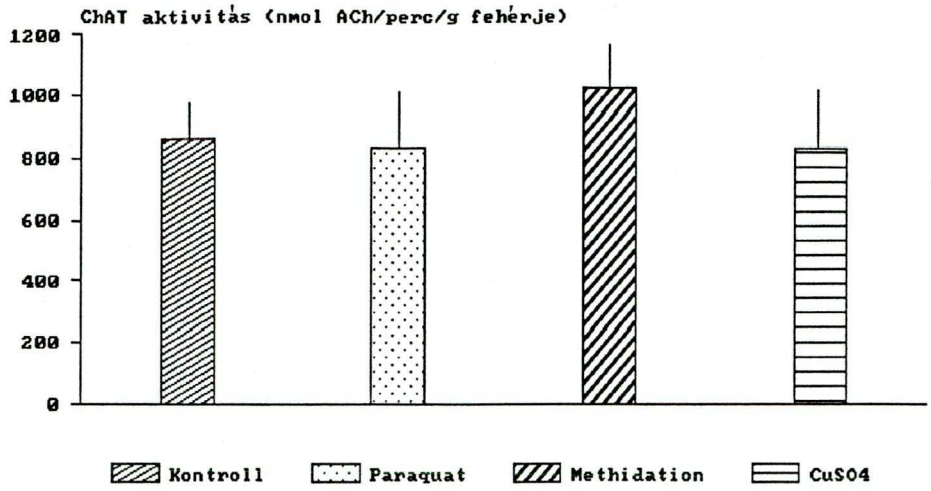
változott, míg a MD kezelés hatására 20 %-os (szignifikáns) enzimaktivitás növekedés figyelhető meg (26. Ábra).

A 27. ábrán a ponty agy AChE aktivitásának változása látható a kezelések függvényében. A PQ 27 %-os növekedést okozott az enzimaktivitásban, míg az inszekticidként alkalmazott MD kezelésre az enzimaktivitás több mint 75 %-kal csökkent. A $CuSO_4$ hatására nem történt változás az AChE aktivitásában.

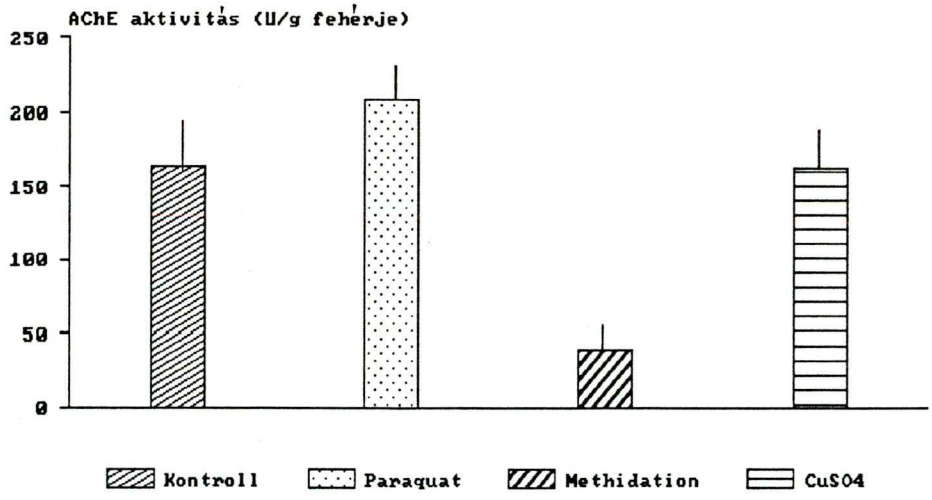


25. Ábra
Ponty agy ACh tartalma 1 hetes peszticid-kezelést követően. Az alkalmazott peszticidkoncentrációk: 5 mg/l paraquat (PQ); 2 mg/l methidation (MD); 5 mg/l $CuSO_4$. A MD kezelésre kapott ACh szint növekedés nem szignifikáns. Az adatok csoportonként 6 egyedből származnak (n) a szórás feltüntetésével (± S.D.).

Az agyban mérhető ACh tartalom csökkenése a PQ és a $CuSO_4$ kezelések hatására jól tükrözi ezen vegyületek membrándestruáló hatását. Az ACh tartalom csökkenése valószínüleg a vezikuláris ACh membrán integritásának megszünése miatt következik be.



26. Ábra
Ponty agy ChAT aktivitásváltozása 1 hetes peszticid-kezelést követően. Az alkalmazott peszticidkoncentrációk: 5 mg/l paraquat (PQ); 2 mg/l methidation (MD); 5 mg/l $CuSO_4$. A MD kezelésre kapott ChAT aktivitásnövekedés szignifikáns ($p<0,01$, ANOVA). Az adatok csoportonként 6 egyedből származnak (n) a szórás feltüntetésével (± S.D.).



27. Ábra
Ponty agy AChE aktivitásváltozása 1 hetes peszticid-kezelést követően. Az alkalmazott peszticidkoncentrációk: 5 mg/l paraquat (PQ); 2 mg/l methidation (MD); 5 mg/l $CuSO_4$. A PQ, valamint a MD kezelésre kapott AChE aktivitás változások szignifikánsak ($p<0,01$, ANOVA). Az adatok csoportonként 6 egyedből származnak (n) a szórás feltüntetésével (± S.D.). 1 U: 1 μmol szubsztrát hidrolízisét jelenti percenként.

A MD hatására fellépő kismértékű ACh szint növekedés egyrészt a hidrolízisének gátlásával, másfelől a szintézisének indukciójával magyarázható.

A ponty agy ChAT aktivitására a PQ valamint a $CuSO_4$ nincs hatással. A MD hatására fellépő aktivitásnövekedés a kolinerg autoreceptorokkal magyarázható: a MD hatására az ACh hidrolízisének gátlása az endogén ACh a szinaptikus résben történő felszaporodását okozhatja. A felszabaduló ACh aktiválja a posztszinaptikus kolinerg receptorokat és egyidejűleg stimulálja a preszinaptikus membránhoz kötött kolinerg autoreceptorokat is. Az ACh hidrolízis blokkolása miatt a preszinaptikus receptorok aktiválódnak, és ez a további ACh-felszabadulás leállítását eredményezi. A posztszinaptikus membránnál ekkor fellépő relatív ACh hiány viszont hatással lehet a további ACh szintézisére, és indukálhatja a ChAT-ot, vagy a szintézisét. Ily módon kapcsolat tételezhető fel a kolinerg autoreceptorok aktuális állapota és az ACh-szintézis (ChAT aktivitása) között.

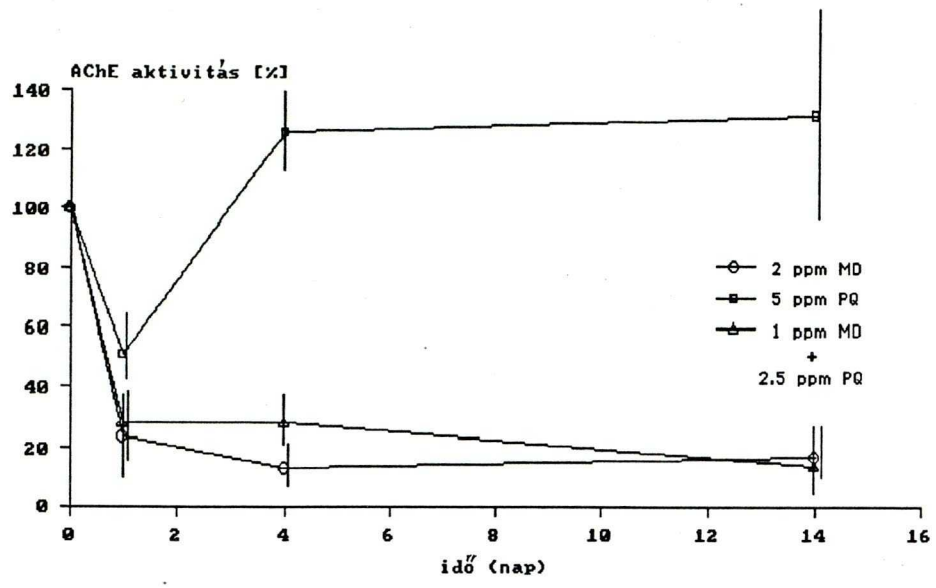
A ponty agy AChE aktivitása nem változott az egy hetes $CuSO_4$ kezelésre. A PQ hatására szignifikáns növekedés (27 %-os növekedés), MD hatására drasztikus aktivitáscsökkenést tapasztaltunk (75 %-os csökkenés).

4.5.3. Peszticidek kombinatív hatása a ponty vérplazma acetilkolinészterázára

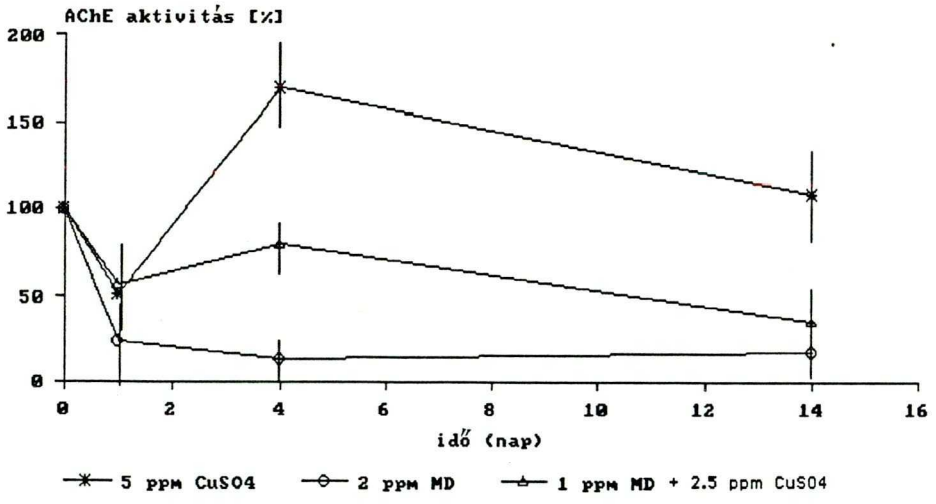
A további kísérletsorozatok alkalmával vizsgáltuk a PQ, $CuSO_4$ és a MD kombinált hatását a ponty vérplazma AChE enzimére az esetleges szinergista vagy antagonista hatások felderítése céljából. A vizsgált vegyületek közül a MD gátolta a ponty agy AChE aktivitását a legnagyobb mértékben (27. Ábra). Ez a MD koncentráció (2 mg/l) 24 óra elteltével

csaknem 80 %-kal csökkentette a ponty vérplazmájának AChE aktivitását is, amely gátlás még 2 hét elteltével is fennállt (28., 29. Ábra). 5 mg/l PQ 24 órás kezelést követően 50 %-kal csökkentette a vizsgált enzim aktivitását, azonban 96 óra elteltével a kontroll értékhez képest mintegy 20 %-os AChE aktivitásnövekedés mérhető. Ez az aktivitásnövekedés 2 hét elteltével is ezen a szinten maradt (28., 30. Ábra).

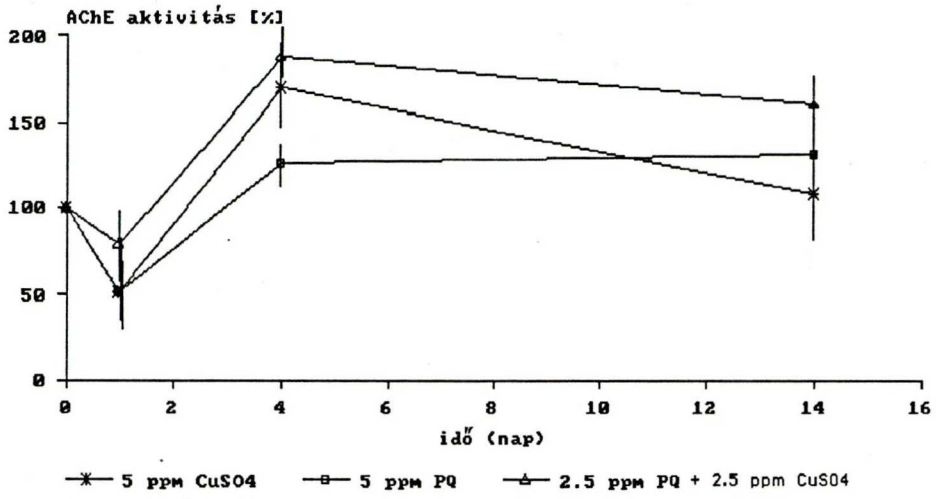
A PQ okozta változáshoz hasonló tendenciájú képet mutat 5 mg/l $CuSO_4$ kezelés hatására a vérplazma AChE aktivitás változása. Az eltérés abban nyilvánul meg, hogy 96 óra elteltével a növekedés mértéke jóval nagyobb, mint PQ esetében (29., 30. Ábra). Ezt a hatást az agy esetében nem tapasztaltuk egy hetes exponálás után (27. Ábra).



28. Ábra
2 ppm (mg/l) MD, 5 ppm (mg/l) PQ illetve 1 ppm (mg/l) MD és 2,5 ppm (mg/l) PQ kombinált kezelés hatása a ponty vérplazma AChE aktivitására. Az AChE aktivitás a kontroll százalékában van kifejezve. Az adatok 6-18 egyedből származnak (n) a szórás (± S.D.) feltüntetésével.



29. Ábra
5 ppm (mg/l) $CuSO_4$, 2 ppm (mg/l) MD illetve 1 ppm (mg/l) MD és 2,5 ppm (mg/l) $CuSO_4$ kombinált kezelés hatása a ponty vérplazma AChE aktivitására. Az AChE aktivitás a kontroll százalékában van kifejezve. Az adatok 6-18 egyedből származnak (n) a szórás (± S.D.) feltüntetésével.



30. Ábra
5 ppm (mg/l) $CuSO_4$, 5 ppm (mg/l) PQ illetve 2,5 ppm (mg/l) $CuSO_4$ és 2,5 ppm (mg/l) PQ kombinált kezelés hatása a ponty vérplazma AChE aktivitására. Az AChE aktivitás a kontroll szazalékában van kifejezve. Az adatok 6-18 egyedből származnak (n) a szórás (± S.D.) feltüntetésével.

A MD a két másik vizsgált vegyülettel kombináltan történő kezelése során minden esetben csökkentette az AChE aktivitását. E változás mértéke azonban eltéréseket mutat. A MD + PQ kombinatív kezelés során az AChE aktivitás csökkenés időben hasonló lefutású, de enyhébb, mint tiszta MD-os kezelés esetében (28. Ábra).

Hasonló tendenciájú változást mutat a kép MD + $CuSO_4$ kezelést követően. Itt azonban a kombinatív kezelés során a gátlás valamennyi vizsgált időpontban kisebb mértékű, mint MD-al vagy MD + PQ-tal történt kezeléskor, és ez a csökkenés ellentétes azzal, mint azt a kizárólag $CuSO_4$-tal történt kezeléskor tapasztaltuk (29. Ábra). A $CuSO_4$ + PQ kombinációjú kezelés során minden mért időpontban - ha szerény mértékben

is, de mintegy 20-30 %-kal magasabb az AChE aktivitása a külön-külön végzett kísérletekhez képest (30. Ábra).

A szerves foszforsavészterek gátló hatásának oka, hogy e vegyület-típusok kovalens kötésbe lépnek az enzim szeril OH-csoportjával. Kísérleteink során viszonylag magas methidation koncentráció mellett következett be a vérplazma acetilkolinészteráz gátlása. Ennek oka az lehet, hogy a halakban előforduló AChE lassabban reagál a gátlószerekkel, mint az emlősök esetében (Moss és Fahrney, 1978). A természetes vizekben élő halak esetében viszonylag kisebb koncentrációjú szerves foszforsavészter is tekintélyes AChE gátlást okozhat (Williams és Sova, 1966), ami a halakban végbemenő nagyfokú akkumuláció következménye lehet (Reichenbach-Klinke, 1972). Eredményeink szerint a MD akár egyedüli, akár PQ-tal vagy $CuSO_4$-tal történt vegyes kezelés során tartósan csökkentette az AChE aktivitását. Feltételezhető, hogy e vegyület nemcsak az enzim aktív centrumát bénítja, hanem drasztikusan gátolja a *de novo* szintézist is. Más állatfajban, így pl. madarak esetében kimutatták, hogy szerves foszforsavészterek hatására csak 26 nap elteltével állt helyre az AChE aktivitása a mintegy 55-64 %-os gátlást követően, nagyrészt az AChE *de novo* szintézisének eredményeképpen (Fleming és Grue, 1981). A PQ és a $CuSO_4$ nem kolinészteráz bénítóként ismert vegyületek. Bejutva a halak szervezetébe, elsősorban a kopoltyúhámot (SEM felvételek, 15-24. Ábra), májat és a vesét károsítják, mivel ezek a szervek játszanak kulcsszerepet az antropogén ágensek felvételében, tárolásában és kiválasztásában (Ferri és Macha, 1980; Horváth és Stammer, 1979; Reichenbach-Klinke, 1972; Rojik és mtsai., 1983). Korábbi mérések szerint a PQ és a $CuSO_4$ már két órás kezelést követően gátolta a halak létfontosságú szerveiben az AChE aktivitását (Nemcsók és mtsai., 1984, 1985). 24 órás expozíciót követően azonban az

egyedi $CuSO_4$ és PQ kezelésre az AChE aktivitása túllépte a kezelést megelőző kontrol szinteket. Ez annak a következménye lehet, hogy a $CuSO_4$ és a PQ elsősorban a már megszintetizált AChE aktivitását csökkenti, de serkenti annak *de novo* szintézisét.

Hasonló hatást mértek csirkeembrió mellizmában: paraoxon (herbicid) hatására a kezelt sejtek AChE aktivitása egy idő után meghaladta a kontroll szintet (Cisson és Wilson, 1977, 1981). Ennek oka a szerzők szerint az, hogy az enzimaktivitás regenerálódása inkább az enzim újraszintézisétől függ, mint a már gátolt enzim reaktivációjától. Hasonlóan magyarázható esetünkben a $CuSO_4$ és PQ okozta aktivitás növekedés. MD + PQ és MD + $CuSO_4$ esetében tapasztalható gátlás két hatás eredőjeként tekinthető. A vegyes kezelés során használt 1 mg/l MD koncentráció nyilvánvalóan kevésbé gátolja az AChE *de novo* szintézisét, mint 2 mg/l MD mennyiség. Ugyanakkor a kisebb koncentrációkban alkalmazott $CuSO_4$ és PQ is kevésbé hat serkentőleg a 96 órás kezelést követően az AChE *de novo* szintézisére.

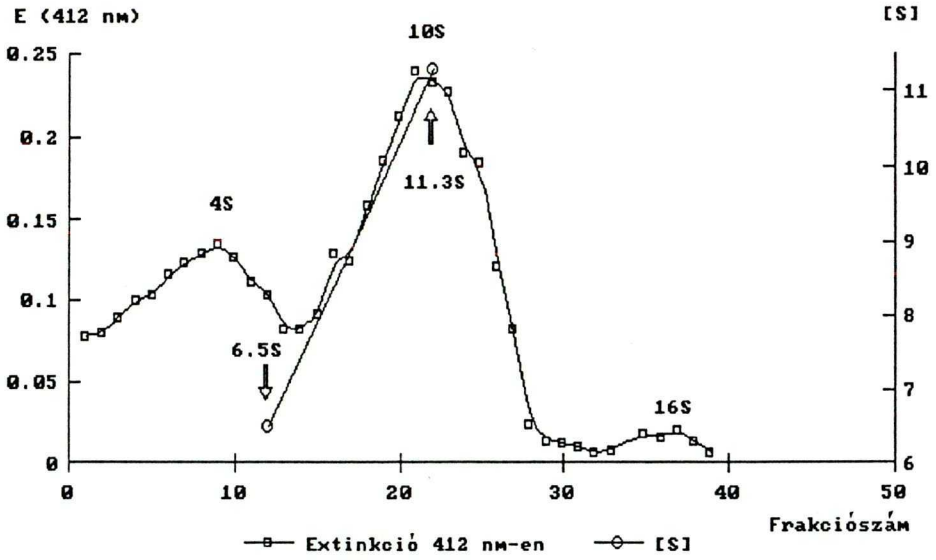
Adataink szerint megállapítható, hogy a szerves foszforsavészterek különösen azért veszélyesek halakra, mivel viszonylag alacsonyabb koncentrációban is sokáig gátolják az AChE szintézisét és adott esetben kedvezőtlenül befolyásolják más vegyületek (PQ, $CuSO_4$) okozta AChE gátlás viszonylag gyors regenerálódását.

4.5.4. A methidationnak a ponty AChE-ra kifejtett hatásának vizsgálata

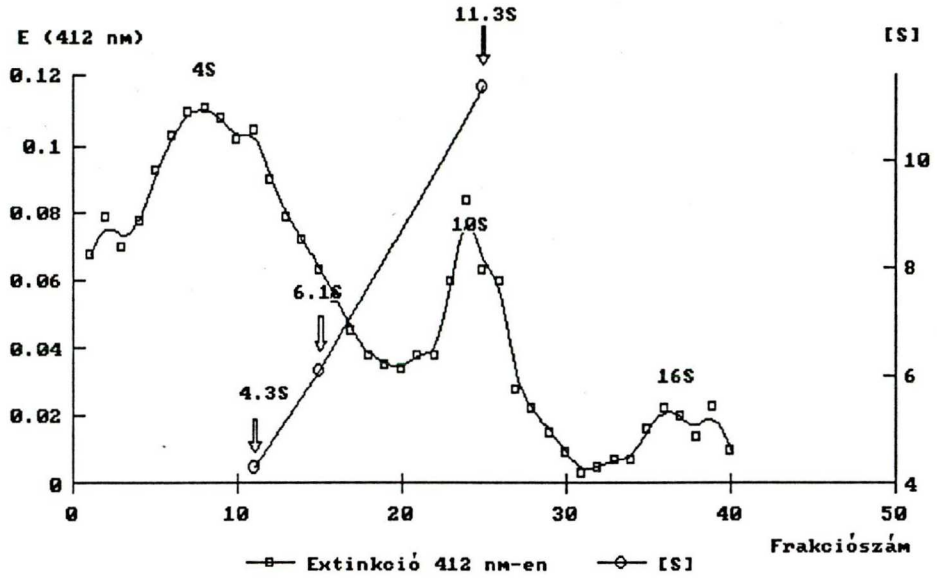
A 2 mg/l-es 1 hetes MD kezelés hatására az agyban a kontrollhoz képest (13. Ábra) jelentősen csökkent a G_1 és G_4

AChE molekuláris alforma aránya, és csökkent az A_{12}-es forma mennyisége is (31. Ábra). Ismert adat, hogy egyes vegyületek-nek nemcsak az AChE működését, hanem *de novo* szintézisét is gátolják (Cisson és Wilson, 1977; Fleming és Grue, 1981). A MD esetében is hasonló hatás feltételezhető. Mivel valamennyi AChE molekuláris alforma képződése a G_1-ből vezethető le, ezért szintézis gátló hatás esetében a G_1 forma csökkenése a legszembetűnőbb. Ez magyarázhatja a G_4 és A_{12} formák kezelést követő mennyiségének csökkenését is.

A kontroll máj legnagyobb mértékben a membránkötött G_4-es formát tartalmazza. Negyedannyi a G_1 aránya, míg a legalacsonyabb az A_{12} formák mennyisége (14. Ábra). A MD kezelés hatására a G_4 forma arányának csökkenése a májban levő membrán-károsodással lehet összefüggésben, melyet biokémiai és elektronmikroszkópos vizsgálatok támasztanak alá (Rojik és mtsai., 1983). A monomer G_1 frakció arányának növekedése a tetramer G_4 forma bomlását jelezheti (32. Ábra).



31. Ábra
Az AChE molekuláris alformáinak megoszlása ponty agyban a szedimentációs sebességi [S] profil alapján a 2 mg/l-es 1 hetes MD kezelést követően. Mindegyik frakcióból AChE (E_{412}) és marker enzim meghatározást végeztünk.
G_1 = 4S, G_4 = 10S, A_{12} = 16S szedimentációs állandójú AChE formák.

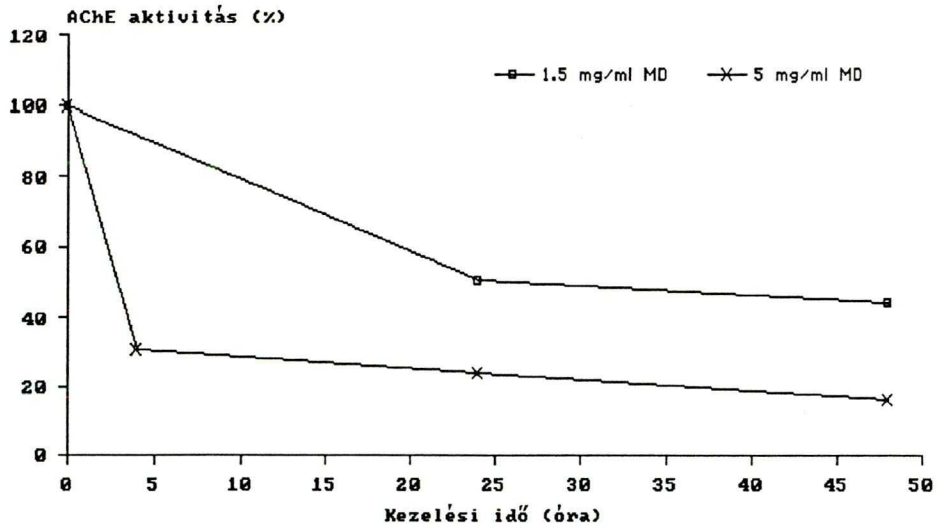


32. Ábra
Az AChE molekuláris alformáinak megoszlása ponty májában a szedimentációs sebességi [S] profil alapján a 2 mg/l-es 1 hetes MD kezelést követően. Mindegyik frakcióból AChE (E_{412}) és marker enzim meghatározást végeztünk.
G_1 = 4S, G_4 = 10S, A_{12} = 16S szedimentációs állandójú AChE formák.

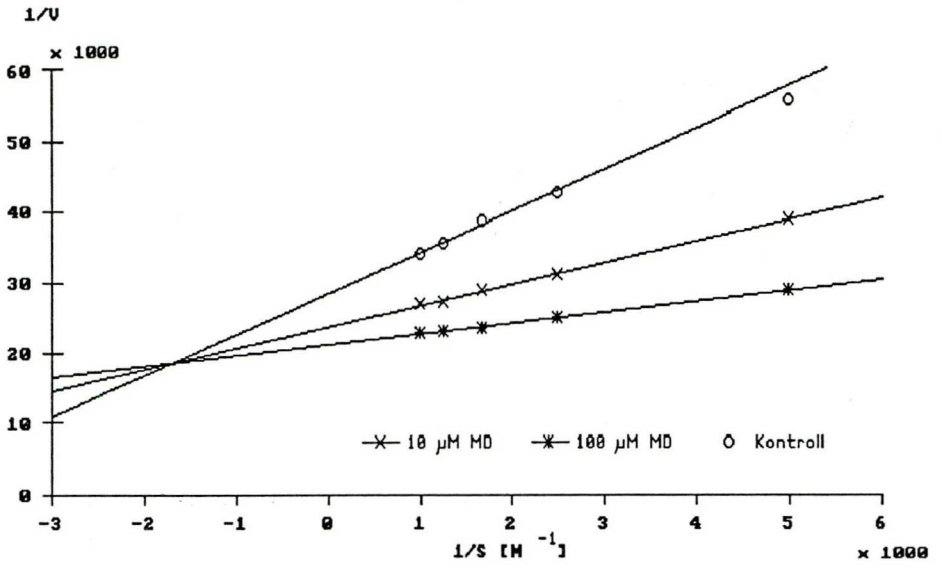
Munkánknak további részében a MD-nak a ponty különböző szerveinek acetilkolinészterázára kifejtett *in vitro* toxikus hatását vizsgáltuk. A kísérletben a szezonális változás (téli illetve nyári időszak) esetlegesen fellépő hatásának kimutatása volt a fő cél.

In vivo kísérleteink alapján mind az 1,5, mind az 5 mg/l MD koncentráció már 24 óra elteltével jelentős AChE gátlást okozott a ponty vérplazmában. 1,5 mg/l MD hatására kb. 40 %, 5 mg/l MD hatására pedig mintegy 70 %-os gátlást mértünk (33. Ábra). A Lineweaver-Burk ábrázolás alapján megállapítható, hogy *in vitro* körülmények között a MD a

vizsgált szervekben vegyes típusú gátlást okozott (34. Ábra), tehát hatással van az AChE anionos kötőhelyére és az észterázos helyre is. Ezáltal növeli az enzim-szubsztrát komplex disszociációs állandóját és csökkenti az enzimreakció maximális sebességének az értékét (7. táblázat). Ez összhangban van a foszforsavészterek ismert hatás-mechanizmusával, melyek az AChE anionkötő és észteráz helyéhez is kapcsolódnak és az enzim reaktív szeril oldalláncának foszforilációját okozzák.



33. Ábra
1,5 mg/l és 5 mg/l MD *in vivo* hatása ponty vérszérumának AChE aktivitására a kezelési idő függvényében. Az eredményeket a kontrollhoz viszonyítva százalékban adtuk meg. Az adatok 6-12 egyedből (n) származó mérések átlagát jelentik.

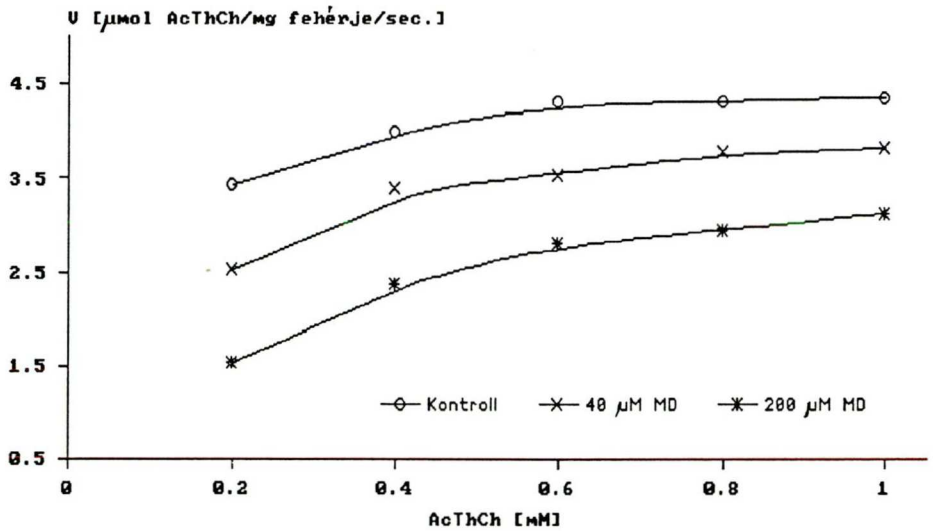


34. Ábra
A ponty agy AChE MD-al történő *in vitro* gátlásának Lineweaver-Burk féle ábrázolása.

7. táblázat
Methidation hatása az AChE látszólagos K_M és V_{max} értékeire ponty szerveiben

	MD (M)	K_M (M)	V_{max} (µmol AcThCh/mg fehérje/s)
Vérplazma	Kontroll	$3.77 \pm 0.36 \times 10^{-5}$	$4.44 \pm 0.45 \times 10^{-5}$
	4.0×10^{-5}	$8.93 \pm 0.87 \times 10^{-5}$	$4.08 \pm 0.40 \times 10^{-5}$
	2.0×10^{-4}	$2.04 \pm 0.20 \times 10^{-4}$	$3.45 \pm 0.33 \times 10^{-5}$
Agy	Kontroll	$1.34 \pm 0.12 \times 10^{-4}$	$8.33 \pm 0.81 \times 10^{-3}$
	4.0×10^{-5}	$1.88 \pm 0.17 \times 10^{-4}$	$7.69 \pm 0.70 \times 10^{-3}$
	2.0×10^{-4}	$2.86 \pm 0.28 \times 10^{-4}$	$6.25 \pm 0.59 \times 10^{-3}$
Szív	Kontroll	$9.52 \pm 0.91 \times 10^{-5}$	$2.33 \pm 0.21 \times 10^{-3}$
	4.0×10^{-5}	$1.37 \pm 0.13 \times 10^{-4}$	$2.27 \pm 0.22 \times 10^{-3}$
	2.0×10^{-4}	$2.31 \pm 0.22 \times 10^{-4}$	$2.13 \pm 0.19 \times 10^{-3}$
Izom	Kontroll	$1.45 \pm 0.13 \times 10^{-4}$	$1.51 \pm 0.13 \times 10^{-3}$
	4.0×10^{-5}	$1.72 \pm 0.17 \times 10^{-4}$	$1.39 \pm 0.12 \times 10^{-3}$
	2.0×10^{-4}	$2.61 \pm 0.24 \times 10^{-4}$	$1.16 \pm 0.10 \times 10^{-3}$

A MD kezelés következtében csökkent V_{max} és megnövekedett K_M értékek azt mutatják, hogy a MD csökkenti a felszabadult ACh lebontásának sebességét (35. Ábra, 8-10. táblázatok) és az AChE affinitását szubsztrátjához. Ezek igen kedvezőtlen irányban változtatják meg az AChE normális biokémiai és fiziológiai funkcióit. Enyhébb esetben károsan alakul a halak normál mozgásaktivitása a táplálék megszerzése és/vagy a menekülési reakciók során. Súlyosabb esetben tömeges halpusztulás is bekövetkezhet ilyen változások alkalmával.



35. Ábra
A methidation *in vitro* hatása a ponty vérplazma AChE reakciósebességére.

8. táblázat
Methidation hatása a ponty agy AChE reakciósebességére

	V x 10^3 (µmol AcThCh/mg fehérje/s)		
C_{AcThCh} (M)	Kontroll	4.0×10^{-5} (M) MD	2.0×10^{-4} (M) MD
0.2	5.70 ± 0.59	4.49 ± 0.55	2.54 ± 0.26
0.4	7.85 ± 0.81	5.74 ± 0.60	3.99 ± 0.44
0.6	7.97 ± 0.75	7.06 ± 0.68	4.47 ± 0.46
0.8	8.33 ± 0.87	7.22 ± 0.71	4.48 ± 0.47
1.0	8.36 ± 0.89	7.46 ± 0.75	5.16 ± 0.50

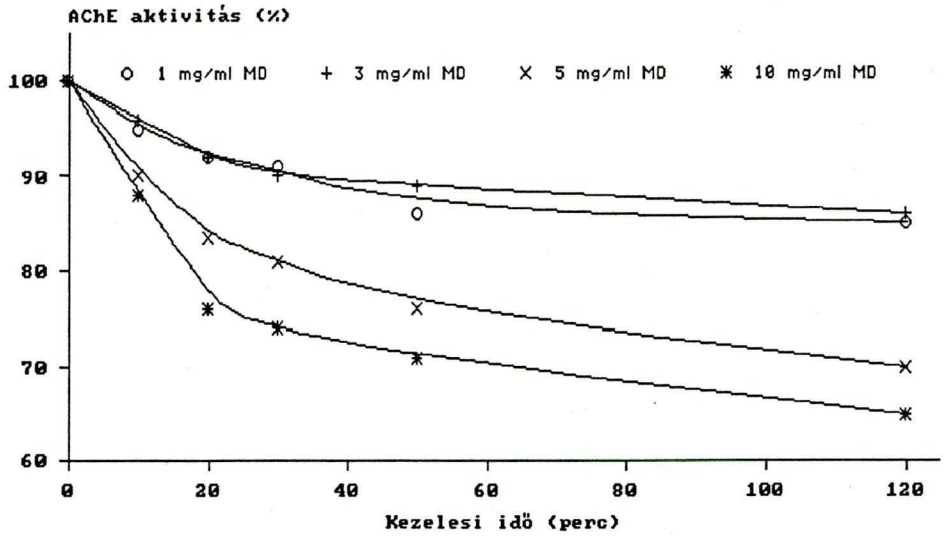
9. táblázat
Methidation hatása a ponty szív AChE reakciósebességére

	V x 10^3 (µmol AcThCh/mg fehérje/s)		
C_{AcThCh} (M)	Kontroll	4.0×10^{-5} (M) MD	2.0×10^{-4} (M) MD
0.2	1.50 ± 0.13	1.30 ± 0.12	0.95 ± 0.10
0.4	1.76 ± 0.17	1.67 ± 0.17	1.37 ± 0.13
0.6	1.91 ± 0.20	1.85 ± 0.18	1.54 ± 0.14
0.8	2.02 ± 0.19	1.96 ± 0.20	1.67 ± 0.17
1.0	2.22 ± 0.21	2.08 ± 0.19	1.72 ± 0.16

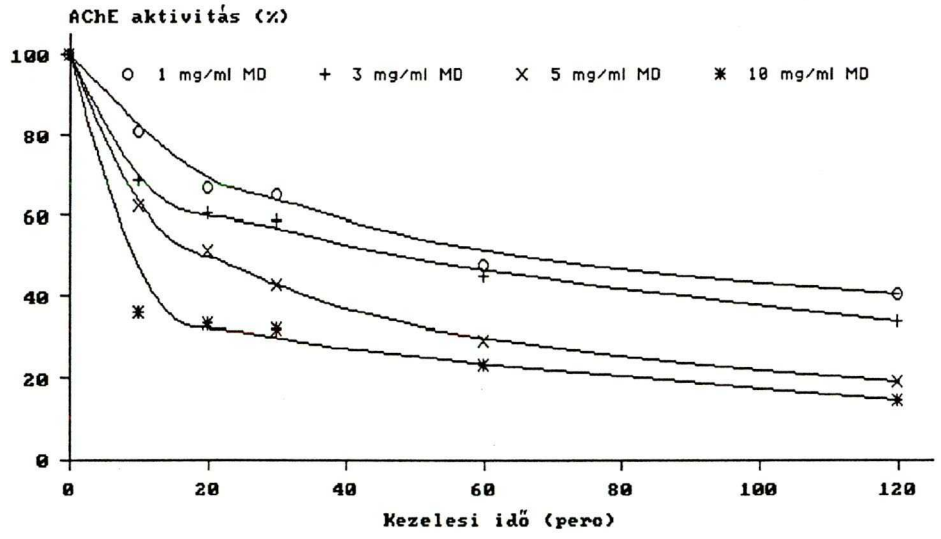
10. táblázat
Methidation hatása a ponty törzsizom AChE reakciósebességére

	V x 10^3 (µmol AcThCh/mg fehérje/s)		
C_{AcThCh} (M)	Kontroll	4.0 x 10^{-5} (M) MD	2.0 x 10^{-4} (M) MD
0.2	0.90 ± 0.09	0.75 ± 0.07	0.48 ± 0.05
0.4	1.16 ± 0.10	0.99 ± 0.10	0.68 ± 0.06
0.6	1.20 ± 0.13	1.06 ± 0.11	0.82 ± 0.07
0.8	1.32 ± 0.13	1.14 ± 0.10	0.87 ± 0.08
1.0	1.35 ± 0.14	1.17 ± 0.12	0.91 ± 0.08

In vitro, 20 °C-on végzett kísérletek alapján az AChE gátlása a legnagyobb mértékű az agyban. 10 perces 1 mg/l MD inkubálást követően már 20 %-os a gátlás figyelhető meg. 10 mg/l-es dózis hatására 2 óra elteltével már 80 %-os gátlás mérhető. Az AChE gátlás időbeli és MD koncentrációtól függő változása hasonló lefutású a többi vizsgált szervben és a vérplazmában. A gátlás mértékét illetően vérplazma, szív, izom a további sorrend. A 4 °C-on végzett kísérletek azt mutatják, hogy valamennyi vizsgált szervben jelentős mértékben csökkent az AChE gátlása a 20 °C-on mért értékhez viszonyítva. 1 mg/l-es kezelést követően még 120 perces inkubációt követően sem volt a gátlás mértéke 10 %-nál nagyobb, a vérplazma kivételével (36-37. Ábra, 11-13. táblázatok).



36. Ábra **4 °C-on**



37. Ábra **20 °C-on**

A methidation koncentrációfüggő hatása a ponty agy AChE aktivitására az expozíciós idő függvényében 4 °C-on (36. Ábra) és 20 °C-on (37. Ábra). Az eredmények a kontroll százalékában vannak megadva. Az adatok 6-12 egyedből (n) származó mérések átlagát jelentik.

11. táblázat

A methidation koncentrációfüggő *in vitro* hatása a ponty szív AChE aktivitására 20 °C-on és 4 °C-on.

MD (mg/l)	Inkubációs idő (perc)				
	10	20	30	60	120
			20 °C-on		
1	85 ± 4	84 ± 3	83 ± 5	83 ± 3	83 ± 6
3	83 ± 3	80 ± 6	77 ± 4	73 ± 5	68 ± 3
5	80 ± 5	74 ± 3	71 ± 4	69 ± 4	59 ± 3
10	60 ± 6	53 ± 5	48 ± 8	41 ± 5	31 ± 6
			4 °C-on		
1	89 ± 7	91 ± 10	201 ± 1	98 ± 10	93 ± 1
3	96 ± 9	90 ± 6	93 ± 10	87 ± 1	85 ± 7
5	85 ± 6	81 ± 6	81 ± 4	75 ± 5	68 ± 6
10	84 ± 8	81 ± 5	75 ± 2	69 ± 10	63 ± 10

Az eredményeket a kontroll százalékában adtuk meg. Az értékek 6-8 egyedből (n) származó értékek átlagát jelentik (± S.D.).

12. táblázat

A methidation koncentrációfüggő *in vitro* hatása a ponty törzsizom AChE aktivitására 20 °C-on és 4 °C-on.

MD (mg/l)	Inkubációs idő (perc)				
	10	20	30	60	120
			20 °C-on		
1	98 ± 3	92 ± 7	78 ± 8	74 ± 5	67 ± 3
3	79 ± 2	67 ± 4	62 ± 3	49 ± 1	41 ± 3
5	55 ± 8	51 ± 4	49 ± 2	42 ± 6	30 ± 1
10	44 ± 7	38 ± 1	35 ± 4	29 ± 4	23 ± 1
			4 °C-on		
1	100 ± 8	98 ± 5	92 ± 2	96 ± 6	97 ± 6
3	99 ± 2	102 ± 5	99 ± 4	101 ± 1	86 ± 5
5	95 ± 9	97 ± 5	92 ± 4	90 ± 12	79 ± 6
10	100 ± 10	89 ± 9	96 ± 6	85 ± 8	73 ± 6

Az eredményeket a kontroll százalékában adtuk meg. Az értékek 6-8 egyedből (n) származó értékek átlagát jelentik (± S.D.).

13. táblázat

A methidation koncentrációfüggő *in vitro* hatása a ponty vérplazma AChE aktivitására 20 °C-on és 4 °C-on.

MD (mg/l)	Inkubációs idő (perc)				
	10	20	30	60	120
			20 °C-on		
1	93 ± 6	89 ± 8	89 ± 4	88 ± 5	83 ± 5
3	90 ± 8	87 ± 4	81 ± 7	76 ± 2	65 ± 3
5	59 ± 1	58 ± 3	54 ± 3	53 ± 3	43 ± 1
10	59 ± 2	55 ± 3	52 ± 2	43 ± 2	34 ± 2
			4 °C-on		
1	96 ± 1	93 ± 6	88 ± 1	84 ± 5	82 ± 2
3	95 ± 6	88 ± 6	84 ± 6	81 ± 4	77 ± 1
5	93 ± 6	87 ± 7	86 ± 1	80 ± 3	75 ± 5
10	92 ± 2	86 ± 6	86 ± 5	78 ± 6	70 ± 4

Az eredményeket a kontroll százalékában adtuk meg. Az értékek 6-8 egyedből (n) származó értékek átlagát jelentik (± S.D.).

A MD tehát más foszforsav tipusú peszticidhez (Coppage és Braidech, 1976; Klaverkamp és Hobden, 1980) és más állatfajokon leírtakhoz hasonlóan (Knowles és Cassida, 1966) mindkét vizsgált hőmérsékleten jelentősen gátolja a halak AChE aktivitását. Különösen veszélyes lehet a MD okozta vízszennyeződés, mivel *in vivo* körülmények között 3 nagyságrenddel kisebb MD kezeléssel érhető el az 50 %-os AChE gátlás az *in vitro* kezelésekhez viszonyítva (Nemcsók és mtsai., 1987a). Ennek oka az, hogy a MD - mint a többi P=S kötéssel rendelkező ún. tiofoszforsav észter - AChE bénító hatását úgy fejti ki, hogy előbb oxidatív deszulfurálási reakción megy keresztül (Chopade és Deuterman, 1981). Annak ellenére, hogy a halak esetében az AChE enzim hosszabban reagál az AChE bénítókkal, mint az emlősök viszonylatában (Moss és Fahrney, 1978), a MD más szerves foszfátészterekhez hasonlóan már igen kis koncentrációban súlyos zavarokat okoz az idegrendszer működésében az AChE gátlása révén (McLeese és Metcalfe, 1979; Williams és Sova, 1966). Ezenkívül a halak igen nagy mértékben képesek a környezetükben előforduló peszticidek feldúsítására (Reichenbach-Klinke, 1972; Nemcsók és mtsai., 1987b). Különösen veszélyes az AChE gátlása a halak szivében, mivel annak beidegzésében a kolinerg rendszernek jelentős szerepe van (Pennec és La Bras, 1984). Az AChE gátlás a vagus hatása fokozásához vezethet, amely súlyos zavarokat okoz a keringéssel összefüggő élettani folyamatokban. Csökkenhet az O_2 felvétel, ami szöveti szinten anoxiához, végső soron tömeges halpusztuláshoz vezethet.

Az általunk mért AChE gátlások mértéke azért is veszélyes lehet, mivel a szerves foszforsavészter tipusú vegyületek magának az AChE enzimnek *de novo* szintézisét is gátolhatják. Ilyenkor még egy hónappal a gátlást követően is közel 50 %-os gátlás mérhető (Fleming és Grue, 1981). Mérésünk alapján az is megállapítható, hogy a nyári vízhőmérséklet mellett

jóval veszélyesebb halak számára a MD szennyeződés, mint 4 °C-on. Ennek oka nyilvánvalóan az, hogy a ponty - poikilotherm állat révén - alapanyagcseréje - így a vízből történő peszticid akkumulációja és ezt követően a metabolizmusa - 20 °C-on intenzívebb, mint 4 °C-os vízhőmérsékleten. Kísérleti adatok szerint 20 °C-on más peszticidek 2 órás *in vivo* kezelést követően 4-10-szer nagyobb koncentrációban akkumulálódnak a ponty egyes szerveiben, mint 4 °C-on (Nemcsók és mtsai., 1987b).

Eredményeink alapján feltételezhető, hogy a MD a ponty egyes szerveinek AChE aktivitását az évszaktól függő vízhőmérséklet változásával különböző mértékben gátolja. Így ezek a mérések növelik a pontos előrejelzés lehetőségét annak, hogy a MD vízhőmérséklet függő akkumulációja és metabolizmusa milyen mértékben károsítja a halak idegrendszerét.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

Kísérleteinkben a kolinerg szempontból kevéssé vizsgált csontoshalakat tanulmányoztuk. Az alapvető összehasonlításon kívül a hazánk haltenyésztésében fő szerepet játszó ponty kolinerg rendszerét vizsgáltuk behatóbban. A kolinerg paraméterek jellemzése mellett három elterjedten használt növényvédőszernek ezekre a paraméterekre kifejtett hatását is vizsgáltuk.

Munkánk része az intézetünkben 11 éve folyó kísérletsorozatnak, melyben a peszticideknek, mint potenciális környezetszennyező vegyületeknek a halakra gyakorolt káros hatásait vizsgálja.

Eredményeinket az alábbiakban foglaljuk össze:

1. A különböző csontoshalak kolinerg paramétereinek összehasonlításánál az ACh tartalom, valamint a ChAT aktivitás alapján a halfajok között szignifikáns különbségeket tapasztaltunk, amely az életmódjukkal hozható szoros összefüggésbe.

2. A radioligand kötési tanulmányok eredménye alapján a ponty agyban az M_2-receptor típusok dominálnak, amely - összehasonlítva az emlősökével - a ponty agy filogenetikailag alacsonyabb fejlettségét, ősibb tipusát bizonyítja.

3. A ponty agy ChAT izoelektromos pontja, valamint a kapott K_M értékek jelzik, hogy a ChAT eléggé konzervatív enzim, és az eltelt évmilliók alatt - valószínüleg a szervezetben betöltött fontos szerepe miatt -alapvető biokémiai tulajdonságai még az egymástól filogenetikailag igen távolálló fajokban sem változtak meg.

4. A halak agyában az acetilkolinészteráz A_{12}-es molekuláris alformájának feltűnően magas aránya szintén bizonyítja, hogy a halak - összehasonlítva a fejlettebb gerinces állatokkal - alacsonyabb törzsfejlődési szinten álló osztályt képviselnek.

5. A vizsgált peszticidek membrándestruáló hatása SEM-al kimutatható módon, igen rövid idő alatt károsítják a kopoltyúhámot.

6. A növényvédőszerek szervkárosító hatása erőteljesen függ az alkalmazott hatóanyag koncentrációjától, hatásmódjától, a hatás időtartamától, a halak kondicionális állapotától és a környezeti tényezőktől (hőmérséklet, pH stb.). A kombinált kezelések bizonyítják, hogy a szubletális koncentrációkban alkalmazott peszticidek együttes hatása az egyedüli alkalmazástól igen eltérő hatást eredményezhet.

6. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AcCoA	acetil-koenzim A
ACh	acetilkolin
AChE	acetilkolinészteráz; EC 3.1.1.7
AChR	acetilkolin-receptor
AcThCh	acetiltiokolin
AF-DX 116	M_2 antagonista, 11-[[2-[(dietilamino)metil]-1-piperidinil]-acetil]-5,11-dihidro-6H-pirido-[2,3-b][1,4]benzodiazepin
ATP	adenozintrifoszfát
ChAT	kolin-acetiltranszferáz; EC 2.3.1.6
CoA	koenzim A
DTNB	2,2'-dinitro-5,5'-ditiobenzoesav
M_1	kortikális tipusú muszkarinerg receptor
M_2	szív tipusú muszkarinerg receptor
mAChR	muszkarin-tipusú acetilkolin receptor
MD	methidation (S-2,3-dihidro-5-metoxi2-oxo-1,3,4-tiodiazol-3-ilmetil-O,O-dimetil-foszfoditioát)
n_H	Hill koefficiens
p	szignifikanciaszint
POPOP	1,4-di-[2-[4-metil-5-feniloxazoil]]-benzol
ppm	1 ppm = 1mg/l
PPO	2,5-difenil-oxazol
PQ	paraquat (1,1'-dimetil-4,4'bipiridillium-diklorid)
[^{3}H]PZ	M_1 antagonista, [N-metil-^{3}H]pirenzepin
[^{3}H](-)QNB	nem-szelektív mAChR antagonista, [fenil-4-^{3}H]-quinuklidinil-benzilát
r	korrelációs koefficiens
SEM	pásztázó (scanning) elektronmikroszkóp

7. IRODALOMJEGYZÉK

Alpert, A., Kisliuk, R.L. and Schuster, L. (1966) A simple radioisotopic assay for choline acetyltransferase and its application in the *Lactobacillus plantarum* system. Biochem. Pharmacol. **15**, 465-473.

Anglister, L. and Silman, I. (1978) Molecular structure of elongated forms of electric eel acetylcholinesterase. J. Molec. Biol. **125**, 293-297.

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**, 25-31.

Augustinsson, K.B. (1958) Electrophoretic separation and classification of blood plasma esterases. Nature (London) **181**, 1786-1789.

Augustinsson, K.B. (1959a) Electrophoresis studies on blood plasma esterases II. Avian, reptilian, amphibian and piscine plasma. Acta Chem. Scand. **13**, 1081-1096.

Augustinsson, K.B. (1959b) Electrophoresis studies on blood plasma esterases III. Conclusions. Acta Chem. Scand. **13**, 1097-1105.

Balogh, K.V. and Salánki, J. (1983) Biological tests of the heavy metal pollution in the lower Zala river (*In Hungarian*). Hidr. Közlöny (Budapest) **8**, 333-380.

Birdsall, N.J.M., Hulme, E.C. and Burgen, A.S.V. (1980) The character of the muscarinic receptors in different regions of the rat brain. Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. **207**, 1-12.

Bon, S. and Massoulié, J. (1976) Molecular forms of Electrophorus acetylcholinesterase: The catalytic subunits; fragmentation; intra- and intersubunit disulfide bonds. FEBS Lett. **71**, 273-278.

Bon, S., Vigny, M. and Massoulié, J. (1979) Assymetric and globular forms of acetylcholinesterase in mammals and birds. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **76**, 2546-2553.

Bone, Q., Kicenuik, J. and Jones, D.R. (1978) On the role of different fibre types in fish myotomes at intermediate swimming speed. Fish. Bull. **67**, 691-699.

Brandon, C. and Wu, J.Y. (1978) Purification and properties of choline acetyltransferase from *Torpedo californica*. J. Neurochem. **30**, 791-797.

Brantley, R.K. and Bass, A.H. (1988) Cholinergic neurons in the brain of a teleost fish (*Porichthys notatus*) located with a monoclonal antibody to choline acetyltransferase. J. Comp. Neurol. **275**, 87-105.

Budai, D., Szerdahelyi, P. and Kása, P. (1986) Isolation of choline and choline esters from Krebs-Ringer solution for gas chromatographic determination. Analytical Biochem. **159**, 260-266.

Chopade, H.M and Deuterman, W.C. (1981) Studies on the *in vitro* metabolism of methidation by rat and mouse liver. Pest. Biochem. and Physiol. **15**, 105-109.

Cisson, C.M. and Wilson, B.W. (1977) Recovery of acetylcholinesterase in cultured chick embryo muscle treated with paraoxon. Biochem. Pharmacol. **26**, 1955-1960.

Cisson, C.M. and Wilson, B.W. (1981) Paraoxon increases the rate of synthesis of acetylcholinesterase in cultured muscle. Toxicol. Letters **9**, 131-135.

Clos, F., Serfaty, A. and Cathala, M. (1957) Activités cholinestérterasiques chez les poissons dulcaquicoles. Bull. Soc. Hist. Natl. (Tolouse) **92**, 205-217.

Clos, F. and Serfaty, A. (1958) Specificité zoologique et cholinestérases chez les poissons dulcaquicoles. Bull. Soc. Hist. Natl. (Tolouse) **93**, 30-34.

Contestabile, A. and Zannoni, N. (1975) Histochemical localization of acetylcholinesterase in the cerebellum and optic of four freshwater teleosts. Histochemistry **45**, 279-288.

Contestabile, A. (1976) Laminar acetylcholinesterase localisation in the optic tectum of five seawater teleosts. Experientia **32**, 625-262.

Contestabile, A. (1978) Acetylcholinesterase concentration in the optic tectum and in the two main cerebellar subdivisions of three freshwater and three marine teleost. Brain Res. **157**, 182-185.

Contestabile, A., Ciani, F. and Villani, L. (1979a) Ultrastructural localization of acetylcholinesterase in retino-deprived optic tectum of the goldfish. Basic Appl. Histochem. **23**, 271-277.

Contestabile, A., Migani, P. and Cristini, G. (1979b) Choline acetyltransferase activity in the cerebellum and in the centers of lateral line system of *Teleosts*. Brain Res. Bull. **4**, 859-861.

Contestabile, A., Munarini, A., Bissoli, R., Chiodini, O. and Villani, L. (1986) Modification of ultrastructural and neurochemical parameters in synaptosomes of the retinodeprived goldfish optic tectum. Exp. Brain Res. **62**, 560-566.

Coppage, D.L. and Braidech, T.E. (1976) River pollution by anticholinesterase agents. Water Res. **10**, 19-24.

Donnellan, J.F., Jewess, P.J. and Cattell, K.J. (1975) Subcellular localization and properties of a cholinergic receptor isolated from housefly heads. J. Neurosci. **25**, 623-629.

Dudai, Y., Herzberg, M. and Silman, I. (1973) Molecular structures of acetylcholinesterase from electric organ tissue of the electric eel. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **70**, 2473-2475.

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**, 117-122.

Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V. and Featherstone, R.M. (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem. Pharmacol. **7**, 88-95.

Ferri, S. and Macha, N. (1980) Lysosomal enhancement in hepatic cells of a teleost fish induced by cadmium. Cell Biol. Int. Rep. **44**, 357-363.

Finlayson, B.J. and Verrue, K.M. (1982) Toxicities of copper, zinc and cadmium mixtures to juvenile chinook salmon. Trans Am. Fish Soc. **111**, 645-650.

Flemming, W.J. and Grue, C.E. (1981) Recovery of cholinesterase activity in five avian species explosed to Dictrophos, an organophosphorus pesticide. Pest. Biochem. Physiol., **16**, 129-135.

Florey, E. and Michelson, M.J. (1973) Occurrence, pharmacology and significance of cholinergic mechanisms in the animal kingdom. *In* Comparative Pharmacology. International Encyclopaedia of Pharmacology and Therapeutics. Vol. **85**, Part I., pp. 11-41, (Ed.: Michelson, M.J.), Pergamon Press, Oxford.

Fonnum, F. (1975) A rapid radiochemical method for the determination of choline acetyltransferase. J. Neurochem. **24**, 407-409.

Francis, A. and Schechter, N. (1979) Activity of choline acetyltransferase and acetylcholinesterase in goldfish optic tectum after disconnection. Neurochem. Res. **4**, 547-556.

Francis, A. and Schechter, N. (1980) Regional and subcellular distribution of cholinergic enzyme and receptor activity in goldfish brain. Neuroscience **5**, 293-301.

Freedman, S.B., Beer, M.S. and Harley, E.A. (1988) Muscarinic M_1, M_2 receptor binding. Relationship with functional efficacy. Eur. J. Pharmacol. **156**, 133-142.

Gaál, J., Horváth, Z. and Eörs, I. (1980) The effect of organophosphorus compounds on the cholinesterase activity of one summer old carps. Aquacultura Hungarica (Szarvas) **11**, 117-123.

Gage, J.C. (1955) Blood cholinesterase values in early diagnosis of excessive exposure to phosphorous insecticides. Brit. Med. J. **1**, 1370-1377.

Gant, D.B., Chromanski, J.M. and Webwer, L.J. (1984) A study of tissue acetylcholinesterase in fishes. Proc. West. Pharmacol. Soc. **27**, 213-216.

Gergely, A., Soós, K., Erdélyi, L. and Cieleszky, V. (1977) Determination of mercury in fish from rivers and lakes in Hungary by atomic absorption technique. Toxicology **7**, 349-355.

Giachetti, A., Micheletti, R. and Montagna, E. (1986) Cardioselective profile of AF-DX 116, a muscarine M_2 receptor antagonist. Life Sci. **38**, 1663-1672.

Gillard, M., Waelbroeck, M. and Christophe, J. (1986) *In vitro* effects of gallamine on dissociation kinetics of [^{3}H]pirenzepine from rat brain muscarinic receptors. J. Receptor Res. **6(1)**, 47-61.

Goldberg, A.M. and Hanin, I. (1976) Biology of cholinergic function. Raven Press, New York.

Gruber, H. and Zenker, W. (1978) Acetylcholinesterase activity in motor nerve fibres in correlation to muscle fibre in rat. Brain Res. **141**, 325-334.

Gulya, K. and Kása, P. (1983) Ultrastructural localization of the elements of the acetylcholine system in the rat cerebellum. Acta Biol. Hung. **34**, 155-161.

Guthrie, D.M. and Banks, J. (1978) The receptive field structure of visual cells from the optic tectum of the freshwater perch (*Perca fluviatilis*). Brain Res. **141**, 211-225.

Hammer, R., Berrie, C.P., Birdsall, N.J.M., Burgen, A.S.V. and Hulme, E.C. (1980) Pirenzepine distinguishes between different subclasses of muscarinic receptors. Nature (London) **283**, 90-92.

Hammer, R. and Giachetti, A. (1982) Muscarinic receptor subtypes: M_1 and M_2. Biochemical and functional characterization. Life Sci. **31**, 2991-2998.

Hammer, R., Giraldo, E., Schiavi, G.B., Monferini, E. and Ladinsky, H. (1986) Binding profile of a novel cardioselective muscarine receptor antagonist, AF-DX 116, to membranes of peripheral tissues and brain in the rat. Life Sci. **38**, 1653-1662.

Hartzell, H.C. and Zwemer, J. (1980) Distribution of muscarinic acetylcholine receptors and presynaptic nerve terminals in amphibian heart. J. Cell Biol. **86**, 6-20.

Hebb, C. and Ratkovic, D. (1964) Choline acetylase in the evolution of the brain in vertebrates. *In* Comparative Neurochemistry, pp. 347-354, (Ed.: Richter, D.), Pergamon Press, Oxford.

Henneman, E. and Olson, C.B. (1965) Relations between structure and function in the design of skeletal muscles. J. Neurophysiol. **28**, 581-598.

Holmgren, S. (1981) Choline acetyltransferase activity in the heart from two teleost, *Gadus morhua* and *Salmo gairdneri*. Comp. Biochem. Physiol. **69C**, 403-405.

Holmgren, S. and Fänge, R. (1981) Effects of cholinergic drugs on the intestine and gallbladder of the hagfish, *Myxine glutinosa L.*, with a report on the inconsistent effects of catecholamines. Marine Biol. Lett. **2**, 265-277.

Horváth, I. and Stammer, A. (1979): Electron microscopical structure of gill lamellas of the ide (*Leuciscus idus*) with particular regard to the chloride cells and H_2S pollution. Acta Biol. Szeged **25**, 133-142.

Hughes, G.M. and Nemcsók, J. (1988) Effects of low pH alone and combined with copper sulphate on blood parameters of rainbow trout. Environ. Pollut. **55**, 89-95.

Jenden, D.J. and Hanin, I. (1974) Gas chromatographic microestimation of choline and acetylcholine after N-demethylation by sodium benzenthiolate. *In* Choline and Acetylcholine: Handbook of Chemical Assay Methods, pp. 135-150, (Ed.: Hanin, I.), Raven Press, New York.

Kása, P., Szepesy, G., Gulya, K., Bánsághy, K. and Rakonczay, Z. (1982) The effect of 4-(1-naphthylvinyl)-pyridine on the acetylcholine system and on the number of synaptic vesicles in the central nervous system of the rat. Neurochem. Int. **4**, 185-193.

Kása, P. (1986) The cholinergic systems in brain and spinal cord. Progr. Neurobiol. **26**, 211-272.

Kimura, H., McGeer, P.I., Peng, J.H. and McGeer, E.G. (1981) The central cholinergic system studied by choline acetyltransferase immunohistochemistry in the cat. J. Comp. Neurol. **200**, 151-201.

Klaverkamp, J.F. and Hobden, B.R. (1980) Brain acetylcholinesterase inhibition and hepatic activation of acephate and fenithrotion in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Can. J. Fish. Aquat. Sci. **37**, 1450-1453.

Knowles, O.C. and Cossida, J.E. (1966) Mode of action of organophosphate anthelmintics. Cholinesterase inhibition in *Ascaris lumbricoides*. J. Agr. Food Chem. **14**, 566-572.

Labat, R., Roqueplo, G., Ricard, J.M., Lim, J.M. and Burget, N. (1977) Actions ecotoxicologiques de certains metaux (Cu, Zn, Pb, Cd) chez les poissons dulcaquide la riviere lot. Annls. Limnol. **13(2)**, 191-207.

Lett, P.F., Farmer, G.J. and Beamish, F.W.H. (1976) Effect of copper on some aspects of the bioenergetics of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). J. Fish. Res. Bd. Can. **33**, 1335-1342.

Levey, A.I. and Wainer, B.H. (1982) Cross-species and intraspecies reactivities of monoclonal antibodies against choline acetyltransferase. Brain Res. **234**, 469-473.

Lewis, S.D. and Lewis, W.M. (1971) The effect of zinc and copper on the osmolality of blood serum of the Channel Catfish (*Ictalurus punctatus Rafinesque*) and Golden Shiner (*Noterigonus crysobacus Mitchill.*). Trans. Am. Fish. Soc. **100**, 639-643.

Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin Phenol reagent. J. Biol. Chem. **193**, 265-275.

Luthin, G.R. and Wolfe, B.B. (1984) Comparison of [^{3}H]pirenzepine and [^{3}H]quinuclidinylbenzilate binding to muscarinic cholinergic receptors in rat brain. J. Pharmacol. Exp. Ther. **228**, 648-655.

Luthin, G.R. and Wolfe, B.B. (1985) Characterization of [^{3}H]pirenzepine binding to muscarinic cholinergic receptors solubilized from rat brain. J. Pharm. Exp. Ther. **234**, 37-44.

Lwebuga-Mukasa, J.S., Lappi, S. and Taylor, P. (1976) Molecular forms of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: Their relationship to synaptic membranes. Biochemistry **15**, 1425-1429.

Malamud, D. and Drysdale, J.W. (1978) Isoelectric point of proteins: A Table. Analytical Biochem. **86**, 620-647.

Malthe-Sörensen, D., Lea, T., Fonnum, F. and Eskeland, T. (1978) Molecular characterisation of choline acetyltransferase from bovine brain caudate nucleus and some immunological properties of the highly purified enzyme. J. Neurochem. **30**, 35-46.

McLeese, D.W. and Metcalfe, C.D. (1979) Toxicity of mixtures of phosphamidon and methidation to lobsters (*Homarus americanus*). Chemosphere **2**, 59-65.

Mesulam, M-M., Mufson, E.J., Levey, A.I. and Wainer, B.H. (1984) Atlas of cholinergic neurons in the forebrain and upper brainstem of the macaque based on monoclonal choline acetyltransferase immunohistochemistry and acetylcholinesterase histochemistry. Neuroscience **12**, 669-686.

Meyer, M.R., Gainer, M.W. and Nathanson, N.M. (1982) *In vivo* regulation of muscarinic cholinergic receptors in embryonic chick brain. Mol. Pharmacol. **21**, 280-286.

Micheletti, R., Montagna, E. and Giachetti, A. (1986) AF-DX 116, cardioselective muscarinic antagonist. J. Pharm. Exp. Ther. **241**, 628-634.

Migani, P., Contestabile, A., Cristini, G. and Labanti, V. (1980) Evidence of intrinsic cholinergic circuits in the optic tectum of teleosts. Brain Res. **194**, 125-135.

Miura, G.A. and Shih, T.M. (1984) Cholinergic constituents in plants: Characterization and distribution of acetylcholine and choline. Physiol. Plant **61**, 417-421.

Moreno-Yanes, J.A. and Mahler, H.R. (1979) Muscarinic cholinergic receptors in goldfish retina. Life Sci. **24**, 1787-1792.

Morris, D. (1966) The choline acetyltransferase of human placenta. Biochem. J. **98**, 754-762.

Moss, D.E. and Fahrney, D. (1978) Kinetic analysis of differences in brain acetylcholinesterase from fish or mammalian sources. Biochem. Pharmacol. **27**, 2693-2698.

Nemcsók, J., Németh, Á., Buzás, Zs. and Boross, L. (1984) Effects of copper, zinc and paraquat on acetylcholinesterase activity in carp (*Cyprinus carpio L.*). Aquatic Toxicol. **5**, 23-31.

Nemcsók, J., Orbán,L., Asztalos, B., Buzás, Zs., Németh, Á. and Boross, L. (1985): Investigations on paraquat toxicity in fishes. Water International **10**, 79-81.

Nemcsók, J., Asztalos, B., Víg, É. and Orbán L. (1987a) The effect of an organophosphorus pesticide on the enzymes of carp (*Cyprinus carpio L.*) Acta Biol. Hung., **38(1)**, 77-85.

Nemcsók, J., Orbán, L., Asztalos, B. and Víg, É. (1987b) Accumulation of pesticides in the organs of carp, *Cyprinus carpio L.*, at 4 °C and 20 °C. Bull. Environ. Contam. Toxicol. **39**, 370-378.

Pechot-Dechavissine, M. (1962) Etude biochimique pharmacologique et histochimique des cholinesterases des muscles stries ches les poissons, les mammiferes these. pp. 67, Masson et Cie., Paris

Pennec, J.P. and La Bras, Y.M. (1984) Storage and release of cathecolamines by nervous endings in the isolated heart of the eel (*Anquilla anquilla L.*). Comp. Biochem. Physiol. **1**, 167-171.

Rand, J.B. and Russell, R.L. (1985) Properties and partial purification of choline acetyltransferase from the nematode *Caenorhabditis elegans*. J. Neurochem. **44**, 189-200.

Reichenbach-Klinke, H.H. (1972) Histologische und enzymatische Veranderungen nach Schadstoffeinwirkung beim Fisch. Veröffentlich. Inst. Küst. Binnenfisch. (Hamburg) **53**, 113-120.

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 and immunological relationship. Eur. J. Biochem. **68**, 513-525.

Rojik, I., Nemcsók,J. and Boross, L. (1983) Morphological and biochemical studies on liver, kidney and gill of fishes affected by pesticides. Acta Biol. Hung. **34**, 81-92.

Rosenberry, T.L., Barnett, P. and Mays, C. (1980) The collagen-like subunits of acetylcholinesterase from the eel (*Electrophorus electricus*). Neurochem. Int. **2**, 135-141.

Rossier, J. (1977) Choline acetyltransferase: a review with special reference to its cellular and subcellular localization. *In* International Review of Neurobiology, Vol. **20**, pp. 283-337, (Eds.: Smythies, J.R. and Bradley, R.J.), Academic Press, New York.

Rossier, J. (1975) Immunohistochemical localization of choline acetyltransferase: real or artefact? Brain Res. **98**, 619-622.

Saelens, J.K. and Simke, J.P. (1976) Acetylcholine and choline concentrations of varous biological tissues. *In* Biology of Cholinergic Function, pp. 661-682, (Eds.: Goldberg, A.M. and Hanin, I.), Raven Press, New York.

Salánki, J., Balogh, K.V. and Berta, E. (1982) Heavy metals in animals of Lake Balaton. Water Res. **16**, 1147-1152.

Schacterle, G.R. and Pollack, R.L. (1974) A simplified method for the quantitative assay of small amounts of protein in biologic material. Anal. Biochem. **51**, 654-655.

Serebrenikova, T.P., Filosofova-Lyzlova, E.M. and Khlyustina, T.B. (1971) Heterogeneity of some of the enzymes of carbohydrate and nitrogen metabolism in lower vertebrates. (*In Russian*) J.Evol .Biochim. Physiol. **7(5)**, 461-466.

Singleton , F.L. and Guthrie, R.K. (1977) Aquatic bacterial populations and heavy metals. I. Composition of aquatic bacteria in the presence of copper and mercury salts. Water Res. **11(8)**, 639-645.

Slemmon, J.R., Salvaterra, P.M. and Roberts, E. (1984) Molecular characterisation of cholin acetyltransferase from *Drosophila melanogaster*. Neurochem. Int. **6**, 519-525.

Sluyterman, L.A. and Elgersma, O. (1978) Chromatofocusing: isoelectric focusing on ion exchange columns. Chromatogr. **150**, 17-30.

Smallman, B.N. and Maneckjee, A. (1981) The synthesis of acetylcholine by plants. Biochem. J. **194**, 361-364.

Stevens, R.J. (1973) A cholinergic inhibitory system in the frog optic tectum: its role in visual electrical responses and feeding behavior. Brain Res. **49**, 309-321.

Storm-Mathisen, J. (1977) Localisation of transmitter candidates in the brain: the hippocampal formation as a model. Progr. Neurobiol. **8**, 119-181.

Su, Y.Y.T., Wu, J.-Y. and Lam, D.M.K. (1980) Purification and some properties of choline acetyltransferase from catfish brain. J. Neurochem. **34**, 438-445.

Sugden, P.H. and Newsholme, E.A. (1977) Activities of choline acetyltransferase, acetylcholinesterase, glutamate decarboxylase, 4-amino-butyrate aminotransferase and carnitine acetyltransferase in nervous tissue from some vertebrates and invertebrates. Comp. Biochem. Phys. **56C**, 89-94.

Vickroy, T.W., Watson, M., Yamamura, H.I. and Roeske, W.R. (1984) Differential regulation of putative M_1/M_2 muscarinic receptors: Implications for different receptor-effector coupling mechanisms. *In* Neurotransmitter Receptors, pp. 99-114, (Eds.: Kito, S., Segawa, T., Kuriyama, K., Yamamura, H.I. and Olsen, R.W.), Plenum Publishing Corporation, New York.

Villani, L., Ciani, F. and Contestabile, A. (1979) Electron microscope histochemistry of acetylcholinesterase distribution in the optic tectum of teleosts. J Hirnforsch. **20**, 539-551.

Villani, L. (1982) Ultrastructural distribution of choline aycetyltransferase in the goldfish optic tectum. Basic Appl. Histochem. **26**, 99-105.

Vizi, E.S. és Somogyi, G. (1978) A neurokémiai transzmisszió alapjai. A biológia aktuális problémái **16**, Medicina Könyvkiadó, Budapest.

Wächtler, K. (1978) The regional distribution of cholinacetyl transferase and acetylcholinesterase in the brain of the lamprey (*Petromyzon fluviatilis*). Comp. Biochem. Physiol. **61C**, 411-413.

Wächtler, K. (1980) The regional production of acetylcholine in the brains of lower and higher vertebrates. Comp. Biochem. Physiol. **65C**, 1-16.

Wächtler, K. (1983) The regional distribution of cholinergic components in the brain of the ratfish (*Chimera monstrosa*). Comp. Biochem. Physiol. **74C**, 481-484.

Wainer, B.H., Levey, A.I., Mutson, E.J. and Mesulam, M.M. (1984) Cholinergic systems in mammalian brain identified with antibodies against choline acetyltransferase. Neurochem. Int. **6**, 163-182.

Waiwood, K.G. and Beamish, F.W. (1978). The effect of copper, hardness and pH on the growth of rainbow trout, *Salmo gairdneri*. J. Fish Biol. **13**, 591-598.

Wamsley, J.K., Gehlert, D.R., Roeske, W.R. and Yamamura, H.I. (1984) Muscarinic antagonist binding site heterogenity as evidenced by autoradiography after direct labeling with [^{3}H]-QNB and [^{3}H]-pirenzepine. Life Sci. **34**, 1395-1402.

Wang, J.X., Roeske, W.R., Gulya, K., Wang, W. and Yamamura, H.I. (1987) [^{3}H]AF-DX 116 labels subsets of muscarinic cholinergic receptors in rat brain and heart. Life Sci. **41**, 1751-1760.

Watson, M., Roeske, W.R. and Yamamura, H.I. (1982) [^{3}H]pirenzepine selectively identifies a high affinity population of muscarinic cholinergic receptors in the rat cerebral cortex. Life Sci. **31**, 2019-2023.

Watson, M., Vickroy, T.W., Roeske, W.R. and Yamamura, H.I. (1984) Subclassification of muscarinic receptors based upon the selective antagonist pirenzepine. Trends Pharmacol. Sci. Suppl. **I**, 9-11.

Watson, M., Vickroy, T.W., Roeske, W.R. and Yamamura, H.I. (1985) Functional and biochemical basis for multiple muscarinic acetylcholine receptors. Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatr. **9**, 569-574.,

Watson, M., Roeske, W.R., Vickroy, T.W., Smith, T.L., Akiyama, K., Gulya, K., Duckles, S. P., Serra, M., Adem, A., Nordberg, A., Gehlert, D.R., Wamsley, J.K. and Yamamura, H.I. (1986a) Biochemical and functional basis of putative muscarinic receptor subtypes and its implications. Trends Pharmacol. Sci. Suppl. **II**, 46-55.

Watson, M., Yamamura, H.I. and Roeske, W.R. (1986b) [^{3}H]pirenzepine and (-)-[^{3}H]quinuclidinyl benzilate binding to rat cerebral cortical and cardiac muscarinic cholinergic sites. I. Characterization and regulation of agonist binding to putative muscarinic subtypes. J. Pharmacol. Exp. Ther. **237**, 411-418.

Watson, M., Roeske, W.R. and Yamamura, H.I. (1986c) [^{3}H]pirenzepine and (-)-[^{3}H]quinuclidinyl benzilate binding to rat cerebral cortical and cardiac muscarinic cholinergic sites. II. Characterization and regulation of antagonist binding to putative muscarinic subtypes. J. Pharmacol. Exp. Ther. **237**, 419-427.

Weis, J.S. and Weis, P. (1977) Effects of heavy metals on the developement of the killfish, *Fundulus heteroctilus*. J. Fish Biol. **11**, 49-54.

White, H.L. and Wu, J.C. (1973) Kinetics of choline acetyltransferases (EC 2.3.1.6) from human and other mammalian central and peripheral nervous tissues. J. Neurochem. **20**, 297-307.

White, H.L. and Cavallito, C.J. (1970) Inhibition of bacterial and mammalian choline acetyltransferase by styrylpyridine analogues. J. Neurochem. **17**, 1579- 1589.

Williams, A.K. and Sova, C.R. (1966) Acetylcholinesterase levels in brains of fishes from polluted waters. Bull. Environm. Contam. Toxicol. **1**, 198-204.

Winberg, M., Holmgren, S. and Nilsson, S. (1981) Effects of denervation and 6-hydroxydopamine on the activity of choline acetyltransferase in the spleen of the cod, *Gadus morhua*. Comp. Biochem. Physiol. **69C**, 141-143.

Winner, R.W. and Farell, M.P. (1976) Acute and chronic toxicity of copper to four species of *Daphnia*. J.Fish. Res. Bd. Can. **33**, 1685-1691.

Yamamura, H.I. and Snyder, S.H. (1974a) Muscarinic cholinergic binding in rat brain. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **71**, 1725-1729.

Yamamura, H.I. and Snyder, S.H. (1974b) Muscarinic cholinergic receptor binding in the longitudinal muscle of the guinea pig ileum with ^{3}H-quinuclidinyl benzilate. Mol. Pharmacol. **10**, 861-867.

Yamamura, H.I., Watson, M. and Wamsley, J.K. (1984) Light microscopic autoradiographic localization of [^{3}H]pirenzepine and [^{3}H](-)quinuclidinyl benzilate binding in human stellate ganglia. Life Sci. **35**, 753-757.

Zitko, W. and Carson, W.G. (1976) A mechanism of the effects of water hardness on the lethality of heavy metals to fish. Chemosphere **5**, 299-303.

Zottoli, S.J., Rhodes, K.J., Corrodi, J.G. and Mufson, E.J. (1988) Putative cholinergic projections from the nucleus isthmi and the nucleus reticularis mesencephali to the optic tectum in the goldfish (*Carassius auratus*). J. Comp. Neurol. **273**, 385-398.

8. A DOKTORI ÉRTEKEZÉS ANYAGÁBÓL ELHANGZOTT ELŐADÁSOK ÉS MEGJELENT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

Közlemények

1. J. Nemcsók, B. Asztalos and **A. Szabó**
The effects of methidation, paraquat and $CuSO_4$ singly or in combination on the acetylcholinesterase activity of carp. *In* Biological Monitoring of Environmental Pollution, (Eds.: Yasuno, M. and Whitton, B.A.), pp. 34-40, Tokai University Press, (1987)

2. B. Asztalos, J. Nemcsók, I. Benedeczky, R. Gabriel and **A. Szabó**
Comparison of effects of paraquat and methidation on enzyme activity and tissue necrosis of carp, following exposure to the pesticides singly or in combination. Environmental Pollution **55**, pp. 123-135, (1988)

3. **A. Szabó**, J. Nemcsók, P. Kása and K. Gulya
Muscarinic cholinergic components in the carp brain. Neurochemistry International Vol. **15**, No. 4, pp. 511-516, (1989)

4. B. Asztalos, J. Nemcsók, I. Benedeczky, R. Gábriel, **A. Szabó** and O. J. Refaie
The effects of pesticides on some biochemical parameters of carp (*Cyprinus carpio L.*). Arch. Environ. Contam. Toxicol. **19**, pp. 275-282, (1990)

5. J. Nemcsók, B. Asztalos, P. Kása, **A. Szabó**, I. Virág and L.H. Hieu
Temperature dependent inhibition of fish acetylcholinesterase by an organophosphorus compound. J. Env. Sci. and Health **00**, (közlésre elfogadva), (1990)

6. J. Nemcsók, Z. Rakonczay, P. Kása, B. Asztalos and **A. Szabó**
Effects of methidation on distribution of molecular forms of acetylcholinesterase in carp, as revealed by density gradient centrifugation. Pest. Biochem. and Phys. **37**, pp. 000-000 (nyomtatás alatt), (1990)

7. A. Szabó, J. Nemcsók, P. Kása and D. Budai
Comparative study of acetylcholine synthesis in organs of freshwater teleosts. J. Fish Physiol. and Biochemistry **00**, (közlésre elfogadva) (1990)

8. A. Szabó, J. Nemcsók, B. Asztalos, Z. Rakonczay, P. Kása and L.H. Hieu
The effect of pesticides on carp (*Cyprinus carpio L.*) acetylcholinesterase and its biochemical characterization. Ecotox. and Environmental Safety (beküldve)

Előadások

1. **A. Szabó**, Gy. Wittmann, J. Nemcsók and P. Kása
Modelling of the pesticides pollutions and acidifications of the water in aquaria conditions. Toxicological Symposium, Wien, Oct. 20, 1988, Austria

2. **Szabó A.**, Nemcsók J., Kása P. és Gulya K.
Muszkarin tipusú receptorok jellemzése a ponty agyban.
MÉT Idegtudományi Szakosztály Gyűlése, Pécs, 1989 Jan. 19-21.

3. **Szabó A.** és Nemcsók J.
Peszticidek hatása a ponty kopoltyújára.
Toxikológiai Konferencia, Veszprém, 1989 Okt. 25-27.

Poszterek

1. **A. Szabó**, D. Budai, J. Nemcsók and P. Kása
Distribution of choline acetyltransferase and acetylcholinesterase, and the acetylcholine content in different organs of various fish. The Second World Congress of Neuroscience (IBRO). Neuroscience Suppl., Vol. 22., pp. 609, 1824P, (1987)

2. **A. Szabó**, J. Nemcsók, P. Kása and K. Gulya
Characterization of the M_1 (cortical) type of muscarinic cholinergic receptors in the brain of the carp (*Cyprinus carpio L.*). 7th General Meeting of the European Society for Neurochemistry. Abstract of Neurochem. Int., Vol. **13**, Suppl. 1, pp. 177, F295, (1988)

3. **A. Szabó**, J. Nemcsók, P. Kása and K. Gulya
Correlation between feeding behavior and cholinergic activity in teleost fish. 7th General Meeting of the European Society for Neurochemistry. Abstract of Neurochem. Int., Vol. **13**, Suppl. 1, pp. 178, F296, (1988)

4. K.A. Deér, **A. Szabó** and J. Nemcsók
Purification of ChAT from brain of carp (*Cyprinus carpio L.*) 14th International Congress of Biochemistry, Abstracts, pp. 241, TH709, (1988)

Ezúton is köszönetet mondok:

Dr. Nemcsók János egyetemi docensnek, témavezetőmnek, hogy hasznos tanácsaival munkámat irányította, annak feltételeit maradéktalanul megteremtette és a dolgozatom megírását észrevételeivel segítette.

Dr. Budai Dénesnek és Dr. Gulya Károlynak, akik útmutatásaikkal a dolgozat, valamint a közlemények megjelenésében, a gyakorlati tudnivalók elsajátításában önzetlenül segítettek, hasznos tanácsaikkal elláttak.

Ambrus Zsuzsának és Darányi Olgának a kísérletek során végzett pontos, lelkiismeretes munkájukért, tanácsaikért.

Prof. Dr. Kása Péternek, hogy a vezetése alatt álló intézetben dolgozatom és közleményeim elkészülését lehetővé tette.

mindazoknak, akik dolgozatom létrejöttét valamilyen módon segítették és hozzájárultak munkám sikeres elvégzéséhez.