



Szent István Egyetem

**A HOSSZÚTÁVÚ STRESSZ ÉS AZ EZZEL
ÖSSZEFÜGGŐ ANYAGCSERE-FOLYAMATOK
VIZSGÁLATA TÖBB HALFAJON**

Doktori (Ph.D) értekezés

Hegyi Árpád

GÖDÖLLŐ

2007

A doktori iskola

megnevezése:	Állattenyésztés-tudományi Doktori Iskola
tudományága:	Mezőgazdaság-tudomány
alprogram:	Halbiológia és halgazdálkodás
vezetője:	Dr. Horváth László egyetemi tanár, MTA doktora SZIE, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar Környezet- és Tájgazdálkodási Intézet Halgazdálkodási Tanszék
témavezető:	Dr. Váradi László egyetemi docens SZIE, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar Környezet- és Tájgazdálkodási Intézet Halgazdálkodási Tanszék

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezető jóváhagyása

1. A MUNKA ELŐZMÉNYEI, A KITŰZÖTT CÉLOK

1.1. A munka előzményei

A hosszútávú stresszhatásokat rendszerint egyes szervek vagy szervrendszerek változásaival és a szervezet életfolyamatainak zavaraival jellemzik: csökken az egészségi állapot, csökken a növekedés és csökken a betegségekkel szembeni ellenálló képesség (Gensic et al. 2004), az agy szerkezete megváltozik (Fernald 2003), károsodik a kopolyú (Pierson et al. 2004), zavart szenved a gyomor és bélműködés (Olsen et al. 2002), a viselkedés megváltozik (Clement et al. 2005), károsodik a központi idegrendszer és blokkol a hipotalamusz-hipofízis-gonád tengely (Wingfield és Sapolsky 2003). Számos vizsgálat során ezeket a változásokat szövettani metszetek készítésével és kiértékelésével is detektálják (Ghosh et al. 2007).

A hosszútávú stressz hematológiai nyomonkövetése kiaknázatlan. Elsősorban csak a vér alakos elemeinek elváltozásaival és mennyiségük alakulásával mutatják ki a hosszútávú stressz hatásait (Bagni et al. 2005).

1.2. Kitűzött célok

Első célkitűzésem volt, hogy megállapítsam, mely vérplazmaalkotó illetve vörösvérsejt hemolizátum összetevő alkalmas a *hosszabb távú folyamatos stressz kimutatására* halakban.

Már az „Előkísérletek” tervezése során felmerült a klasszikus módszertani probléma: milyen mértékben torzítják a kísérletek során alkalmazott módszerek a kísérletek végeredményét. Ezért második célkitűzésem az volt, hogy megvizsgáljam: a mesterséges körülmények (akváiumi tartás) és maguk a vizsgálatok (kiemelés az akváriumból és

elsősorban a vérvétel) milyen mértékű stresszt okoznak a kísérleti állományban.

Az előkísérletek során kapott szérum/plazma fruktózamin (SeFa) szintek eredményeiből adódóan felvetődött a kérdés, hogy hogyan változik az ezüstkárász-vér SeFa-szintje természetes és mesterséges körülmények között? Céлом volt tehát ennek a kérdésnek a tisztázása. Ez egyben a vér mindenkori alap SeFa-szintjének megállapítását is jelentette a vizsgált halfaj esetében.

Célul tűztem ki továbbá, hogy bizonyítsam: az adaptált mikromódszeres SeFa meghatározás alkalmas a gyakorlatban előforduló, gyakori stresszorok hatásának kimutatására akváriumi körülmények között is.

2. ANYAG ÉS MÓDSZER

2.1. A mintavételek módszere

Valamennyi hal és vérminta gyűjtése a Szent István Egyetem Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar Állatetikai bizottsága által, a vonatkozó rendelkezések alapján meghatározott alapelvek figyelembevételével történt.

2.1.1. A kísérleti halak gyűjtése

A kísérleti halakat IUP 12 típusú elektromos kutató-halászgéppel gyűjtöttem be és a kifogást követően a halakat testsúly és testhossz szerint válogattam. Közvetlenül a Halgazdálkodási Tanszékre szállítás után, a halakon parazitológiai vizsgálatokat is végeztem annak érdekében, hogy ne kerülhessen fertőző egyed a kísérleti állományokba. A halak beszállítása után a kopolyúlemezeket és a testfelületet vizsgáltam szabad szemmel és mikroszkóppal pontytetű (*Argulus foliaceus*), különböző kopolyúférgék (*Dactylogyrus vastator*, *Dactylogyrus extensus*, *Dactylogyrus anchoratus* és *Dactylogyrus minutus*) és lernea (*Lernaea cyprinacea*) jelenlétét kutatva. A kontroll kísérlet alkalmával vizuálisan ellenőriztem a parazita fertőzöttséget a tóparton, a mikroszkópos vizsgálatokat csak a kísérlet végén végeztem, a kísérlet jellegéből adódóan.

2.1.2. A vérminták gyűjtése

Minden kísérletemben olyan méretű egyedekkel dolgoztam, amelyekről minimálisan 1,5 ml vért lehetett venni (testhossz $16,5 \pm 4,2$ cm). A halakat oldalukra fordítottam és a tűt a farokalatti úszó és az

oldalvonal között szúrtam be. Átlagosan 1,5 ml vért vettem a halak farokvénájából (1. kép) (*vena caudalis*), a minták alvadását heparinnal gátoltam (1-2 csepp). A vérvételekhez steril, eldobható 21-25 G nagyságú tűket és minden esetben 2 ml-es fecskendőket használtam. A vért hűtőtáskában szállítottam (+ 4 °C) a feldolgozás helyére.

2.1.2.1. A vérminták előkészítése a biokémiai vizsgálatokhoz

A heparinnal kezelt vérmintákat hűtött közegben (+4 °C) tartottam, majd centrifugálással (3000 fordulat/perc, 10 perc) választottam el az alakos elemeket a vérplazmától. A vérplazma leszívása után a fehérvérsejteket és a vérlemezkéket tartalmazó réteget eltávolítottam, majd némely esetben a vörösvérsejteket 9-szeres bidesztillált vízzel hemolizáltam. A vérplazma-mintákból határoztam meg a vérplazma glükóz, a szérum fruktózamin, az albumin, az összfehérje, a glutation peroxidáz, a glutation peroxidáz aktivitás és a malondialdehid szintet. Egy kísérlet alkalmával a vörösvérsejt 1:9 hemolizátumban mértem a glutation peroxidáz mennyiségét és a glutation peroxidáz aktivitását is. A vérplazma és vörösvérsejt hemolizátum mintákat a mérések elvégzéséig -20 °C-on tároltam. A vörösvérsejtek teljes hemolízisét a hipoozmotikus feltételek mellett a fagyasztás (min. 18 óra, -20 °C), majd a meghatározások előtt a fagyasztott minták szobahőmérsékleten (20 ± 2 °C) történő lassú felengedése is segítette.

2.1.3. A vízminták gyűjtése és feldolgozása

Minden laboratóriumi vizsgálatnál a kísérlet megkezdése előtt, a kísérlet közben és a kísérlet végén meghatároztam a víz általános kémiai összetételét. Az akvárium víze vizsgálatára a hőmérsékletre (°C), pH-ra, az

oldott oxigénre (mg/l), lúgosságra (nk°), ammónium ionra (mg/l), szabad ammóniára (mg/l), nitritre (mg/l), nitrátra (mg/l), szulfidra (mg/l), kénhidrogénre (mg/l), ortofoszfátra (mg/l), foszforra (mg/l), a vezetőképességre (µS) és az összes sótartalomra (g/l), valamint a zöldalgák, kékalgák, kovaalgák, ostoros algák (%) mennyiségére terjedt ki. A vízkémiai vizsgálatok Merck típusú készítményekkel történtek, erre a vizsgálatokra akkreditált laboratóriumban.

A tavi kutatásaim során a víz hőmérsékletét (°C), pH-ját, az oldott oxigén (mg/l) mennyiségét WTW Oxi 96 mérőműszerrel határoztam meg a halak kifogása után azonnal. Az ammónium ion (mg/l) és nitrit (mg/l) mennyiségét, valamint a vezetőképességet (µS) és az összes sótartalmat (g/l) pedig laboratóriumban, közvetlenül a halak beszállítása után vizsgáltam. A vízkémiai méréseket mind nyílt vízi, mind pedig parti zónában is elvégeztem.

2.2. A kísérleti állatok tartása és takarmányozása

A halak laboratóriumba szállítása után az állatok számára egy hétig ideális, stresszmentes környezetet biztosítottam 3 m³-es recirkulációs rendszerben működő kádakban, a Halgazdálkodási Tanszék „faházában”. Ezek után az állatokat áthelyeztem 600 literes akváriumokba, ahol szintén egy- illetve kéthetes adaptációs időt alkalmaztam, ugyancsak recirkulációs rendszerben. Az akváriumokban rachel-hálóból búvóhelyet is készítettem a zavartalan adaptáció érdekében.

A vizsgált halak takarmányozása naponta egyszer történt (kb. a testtömeg 5 %-a), de a vérvételek előtti napon a takarmányt megvontam, hogy az egyes egyedek között esetleg meglévő eltérő mennyiségű

takarmányfelvétel a mérési eredményeimet ne befolyásolja. Az állatok takarmányozására harcsa- és pisztrángtápot, valamint természetes táplálékot (pl. légyenyű „csonti”) használtam.

2.3. Biokémiai módszerek

2.3.1. A vérplazma glükóz koncentrációjának meghatározása

A vérplazma glükóz szintjének meghatározását enzimátikus (GOD-POD) kolorimetriás módszer segítségével végeztem el (Reanal, Budapest No.: 36116-2-99-80).

2.3.2. A vérplazma szérum/plazma fruktózamin (SeFa) koncentrációjának meghatározása

A szérum/plazma fruktózamin (SeFa) méréséhez az OPPEL és mtsai (2000b) által kifejlesztett reagenst, illetve az erre kifejlesztett mikro módszert használtam.

2.3.3. A vérplazma albumin-koncentrációjának meghatározása

Az albumin meghatározása brómkrezolzöld (BCG, 3,3,5,5-Tetrabrom-m-krezol-szulfoftalein) festékanyag segítségével történt, 620 nm-en.

2.3.4. A tiobarbitursav-reaktív anyagok (malondialdehid) mennyiségének meghatározása

A minták (vörösvérsejt 1:9 hemolizátum) MDA koncentrációját a PLACER és mtsai (1966) által kidolgozott és MATKOVICS és mtsai (1988) által módosított módszerének megfelelően mértem.

2.3.5. A redukált glutation (GSH) koncentráció meghatározása

A redukált glutation koncentrációt a mintákban (vérplazma, vörösvérsejt 1:9 hemolizátum) SEDLAK és LINDSAY (1968) módszerének megfelelően mértem.

2.3.6. A glutation-peroxidáz aktivitás (GSH-Px) meghatározása

A glutation-peroxidáz (E.C. 1.11.1.9) aktivitását a vörösvérsejt 1:9 hemolizátumban határoztam meg. A módszer azon az elven alapul, hogy reaktív oxigéngyökök jelenlétében a redukált glutation (GSH) az enzim közreműködésével glutation-diszulfiddá (GSSG) oxidálódik. A mérési rendszerben az enzim ko-szubsztrátjaként GSH (Sigma, St. Louis) és kumul-hidroperoxid (Merck, Darmstadt) szerepel. Az enzimreakció időtartama 10 perc, melyet 10 %-os triklór-ecetsavval (Carlo Erba, Rodano) végzett fehérjekicsapással állítottam le (MATKOVICS et al., 1988). A GSH-fogyást az 5,5'-ditiobis-(2-nitro-benzoészav)-val (Sigma, St. Louis) képzett komplex fényelnyelésének 412 nm hullámhosszon spektrofotométerrel történő abszorbancia mérésével határoztam meg.

2.3.7. A fehérjekoncentráció mérése

A vérplazma minták fehérjetartalmát biuret reakcióval határoztam meg (WEICHSELBAUM 1946).

2.4. Tudományos kísérletek

2.4.1. Előkísérletek

Doktori munkám első lépéseként kombinált, több stresszor által kiváltott stressz hatását vizsgáltam különböző vérplazma-paramétereken és vörösvérsejt 1:9 hemolizátumokon keresztül, ezüstkárász (*Carassius*

gibelio BLOCH, 1782) halfajon. A kísérleteket a Gödöllő-Isaszegi tórendszer I. sz. tavából származó állatokkal végeztem.

A kísérlet előtt az egyedeket 3 m³-es medencében tartottam 15,9 °C-os vízhőmérséklet és 6,8 mg/l oxigénszint mellett, takarmányozásuk mesterséges pisztráng- és harcsatáppal történt naponta egyszer (kb. a testtömeg 5 %-a). A vizsgálati idő 10 nap volt. A vizsgálatokat egymástól jól elkülönített, összesen öt, 60 literes akváriumban végeztem, akváriumonként 10 - 10 állattal, melyeknek súlya egyedenként $97,66 \pm 4,05$ g volt. A akváriumok kiindulási vízhőmérséklete $16,05 \pm 0,35$ °C, oxigénszintjük pedig $6,85 \pm 0,25$ mg/l volt.

Egyidejűleg öt különböző stresszort alkalmaztam minden akváriumban. Ezek a következők voltak:

1. A víz hőmérsékletének emelése. 24 óra alatt 24,6 °C-ig $\pm 0,40$ °C növeltem a víz hőmérsékletét a légtér fűtésével, majd ezt a magas hőmérsékletet a kísérleti idő végéig megtartottam.
2. Oxigénhiány. A kiindulási oxigén szintek a halak gázcseréjének következtében csökkentek le $0,7 \pm 0,15$ mg/l-ig. A kísérlet közben oxigén-utánpótlás egyik akváriumban sem történt.
3. Táplálékmegvonás. A táplálék megvonása a kísérlet első napjától kezdődött.
4. A halak mozgásterének csökkentése. A kiindulási 50 liter/egyed sűrűséget 6 liter/egyed sűrűségre csökkentettem.
5. Az akváriumi adaptációs idő elhagyása. Az egyedek kísérletbe állításakor a medencéből szoktatás nélkül kerültek az akváriumokba.

A kísérlet folyamán kétnaponta vettem vérmintákat, egy akváriumban levő állatoktól csak egyetlen alkalommal. Az első akvárium egyedeitől a második, a második akvárium egyedeitől a negyedik napon

és így az utolsó ötödik akváriumban tartott halaktól csak a behelyezéstől számított tizedik nap múlva vettem vérmintákat.

A vizsgált vérplazma-összetevők az albumin, glükóz, összfehérje, szérum/plazma fruktózamin és a redukált glutation volt. A vörösvérsejt hemolizátumból pedig a redukált glutation és malondialdehid mennyiségét, valamint glutation-peroxidáz aktivitás szintjét határoztam meg.

2.4.2. Kontroll-kísérletek

A kontroll-kísérleteket két nagy részre osztottam. Az egyik vizsgálat (*A*) esetében a kifogás helyszínén (csónakban) is végeztem vérvételt, a másik vizsgálat (*B*) esetében viszont nem.

A kontroll-kísérleteket a Gödöllő-Isaszegi tórendszerből származó ezüstkárászokkal végeztem. A halak begyűjtése IUP típusú elektromos kutatóhalászgéppel történt, a víz hőmérséklete 10,4 °C volt. Az *A* vizsgálat során a kifogást követően a helyszínen azonnal vért vettem mindegyik állattól ($n = 50$). A *B* vizsgálat alapvetően megegyezett az előzővel ($n = 50$), azzal a különbséggel, hogy a helyszínen (csónakban) nem történt vérvétel. A begyűjtés után az összes egyedet azonnal laboratóriumba szállítottam (vízhőmérséklet 10,8 °C, oldott oxigén 7,2 mg/l), és öt-öt csoportot alakítottam ki 600 literes akváriumokban. Mind az *A*, mind a *B* vizsgálat során az első csoportba tartozó állatoktól hetente vettem vért, négy héten keresztül. A második csoportba tartozó ezüstkárászoktól csak a laboratóriumba történő beszállítást követően az első hét elteltével vettem vérmintát. A harmadik csoport halaitól csak a második, a negyedik csoport egyedeitől csak a harmadik, az ötödik csoport egyedeitől pedig csak a negyedik hét lejárta után történt vérvétel.

A vérvételek után minden esetben a vérplazma glükóz és SeFa mennyiségét határoztam meg. A kísérlet folyamán az akváiumi víz hőmérséklete jelentős mértékben növekedett (a kezdeti 10,8 °C-os vízhőmérsékletről 19,9 °C-ra), az oldott oxigén mennyisége pedig alig változott a kísérlet végeztével (6,9 mg/l).

2.4.3. A szérum/plazma fruktózamin (SeFa) szint évszakos változásának vizsgálata

Mind a tavi, mind pedig a laboratóriumi vizsgálatokat ezüstkáráson végeztem. A kísérleti halfaj megválasztásánál a legfontosabb szempont az volt, hogy a tavi kísérletek mintavételeinél mindig rendelkezésre álljon az adott faj.

Fontos megemlítenem, hogy a SeFa évszakos változásának vizsgálatakor, mind a tavi, mind pedig az akváiumi kísérleteknél az első három adat (január, február és március) számított érték, mert mindkét vizsgálat kezdete áprilisban volt. E nélkül a korrekció nélkül nem tudtam volna átfogó statisztikai elemzést végezni.

2.4.3.1. Tavi vizsgálatok

A tavi vizsgálatokat a Gödöllő-Isaszegi tórendszer I. sz. tavában végeztem. Az egyedeket elektromos IUP típusú kutató-halászgéppel gyűjtöttem be (2. kép). A vizsgálat elejétől, 2003-tól a mintavételezés havonta, majd később 2006-tól kéthetente történt. A mintavételek során 10 egyedtől vettem vérmintát, de előfordult, hogy ennek az egyedszámnak a megtartása fizikai okok miatt nem volt lehetséges (jég). Ezeknél a vizsgálatoknál a beteg, sérült vagy fertőzött egyedeket kizártam a vizsgálatból.

2.4.3.2. Laboratóriumi vizsgálatok

A tavi vizsgálatok egy éves eredményei után a fent említett tóból 10 egyedemet gyűjtöttem be és a Halgazdálkodási Tanszék „faházában”, 600 literes akváriumban helyeztem el recirkulációs rendszerben. A vizsgálat 2004-ben kezdődött és párhuzamosan folyt a tavi vizsgálattal. A vérvételek minden esetben a tavi vérvételek napján történetek, az eredmények összehasonlíthatósága érdekében. A laboratóriumi vizsgálat 2004. április 28-tól 2007. április 03-ig tartott. A kísérlet célja az volt, hogy kizárjam a tavi körülmények között esetlegesen jelentkező ellenőrizhetetlen hatásokat.

2.4.4. Laboratóriumi kísérletek mesterségesen előidézett stressz mértékének megállapítására

2.4.4.1. Hőmérsékleti sokk által kiváltott stressz vizsgálata

Ezekben a kísérletekben a víz hőmérsékletét fokozatosan 13 °C-ról 26 °C-ra emeltem 24 óra alatt, majd tartottam a magas hőmérsékletet, alacsony vízállást és gyors felmelegedést szimulálva. A kísérleteket 600 literes akváriumokban végeztem. Az oxigén mennyiséget mindkét csoport esetében levegőztető készülékkel pótoltam. A kontroll akváriumokban az oxigén mennyisége $6,9 \pm 0,30$ mg/l, a kezelt akváriumokban $5,8 \pm 0,40$ mg/l volt. A vizsgálatban résztvevő egyedek átlagsúlya; ezüstkárász: 72, 37 g \pm 7,73 g, ponty: 55,43 g \pm 5,22 g, amur: 83,73 g \pm 8,24 g.

2.4.4.2. Élettér csökkentése által kiváltott stressz vizsgálata

Az élettér csökkentésekor a vizsgált egyedeket a korábbinál ötször kisebb térbe helyeztem, egy esetleges rossz telepítést modellezve. A kontroll csoport egyedei 600 literes akváriumokban voltak elhelyezve, a

stresszelt állományokat pedig 120 literes akváriumokban tartottam. Az oxigén utánpótlására ebben az esetben is levegőztető készüléket alkalmaztam. A kontroll akváriumokban az oxigén mennyisége $7,7 \pm 0,60$ mg/l, a kezelt akváriumokban $6,7 \pm 0,80$ mg/l volt. A vízhőmérsékleti adatokat a 3. sz. melléklet mutatja.

A vizsgálatban résztvevő egyedek átlagsúlya; ezüstkárász: $82,35 \text{ g} \pm 5,76$ g, ponty: $58,43 \text{ g} \pm 4,65$ g, amur: $81,5 \text{ g} \pm 4,61$ g.

2.4.4.3. Oxigénhiány által kiváltott stressz vizsgálata

Ebben az esetben oxigénhiányos életteret alakítottam ki, ugyancsak 600 literes akváriumokban. Az oxigénszintet $7,2 \pm 1,4$ mg/l-ről $1,2 \pm 0,7$ mg/l-re fokozatosan csökkentettem a kísérletek előrehaladtával. A stresszelt akváriumokban oxigén utánpótlás nem történt, így a halak az oxigént maguk fogyasztották el a saját létfenntartásukhoz. A kontroll csoport egyedei recirkulációs rendszerben voltak elhelyezve a kísérlet ideje alatt. A vízhőmérsékleti adatokat a 3. sz. mellékletben foglaltam össze. A vizsgálatban résztvevő egyedek átlagsúlya; ezüstkárász: $89,85 \text{ g} \pm 9,33$ g, ponty: $61,25 \text{ g} \pm 7,82$ g, amur: $88,74 \text{ g} \pm 7,92$ g.

2.4.4.4. Ragadozó jelenléte által kiváltott stressz vizsgálata

A ragadozóval kiváltott stressz előidézésére 4 és 5 kg-os lesőharcsákat (*Silurus glanis* L., 1758) helyeztem a vizsgált halak közé. Ebben a kísérletsorozatban is 600 literes akváriumokat használtam, de az előbbi kísérletekkel ellentétben minden kontroll és stressznek kitett csoport recirkulációs rendszerben volt elhelyezve. Az oxigénszintek $5,5 \pm 1,1$ mg/l között változtak, a vízhőmérsékleteket pedig a 3. sz. melléklet mutatja.

A vizsgálatban résztvevő egyedek átlagsúlya; ezüstkárász: $66,55 \text{ g} \pm 8,71 \text{ g}$, ponty: $58,66 \text{ g} \pm 7,52 \text{ g}$, amur: $77,15 \text{ g} \pm 9,45 \text{ g}$.

2.5. Alkalmazott matematikai és statisztikai módszerek

A statisztikai értékelést Microsoft Excel 97', GraphPad Prism 4.0 for Windows és SPSS 14.0 programokkal végeztem.

Az előkísérletek, a kontroll kísérletek és a laboratóriumi kísérletek során azt vizsgáltam, hogy a kezelési idő milyen hatást gyakorol a vérplazma általam vizsgált összetevőinek szintjére. Az értékelést egyszempontos variancia-analízis (ANOVA) (Tukey's test) segítségével végeztem $P \leq 0,05$ szignifikancia-szint mellett.

A SeFa szint évszakos váltakozásának vizsgálatkor korreláció vizsgálatot végeztem a SeFa mennyisége és a víz hőmérséklete között. Ezen kívül a SeFa szintjének váltakozására ciklikusság vizsgálatot is végeztem. Így a SeFa szezonálisan kiigazított idősor elemzését multiplikatív modellben készítettem. A SeFa periodicitásának értékelését viszont periodogrammal végeztem.

3. AZ EREDMÉNYEK

3.1. Eredmények

Az előkísérletek által kiváltott, elhúzódó stresszt a SeFa mennyiségi változása mutatta a legjobban, ugyanis egyenletesen és fokozatosan emelkedett a vérplazmában. Mindezek mellett ezzel az előkísérlettel megállapítottam, hogy a vérplazma SeFa mennyisége mérhető a változó testhőmérsékletű gerinceseknél is.

A kontroll kísérletekből megállapítottam, hogy a kifogásnak és a vérvételnek nem volt szignifikáns hatása a vérplazma glükóz és a SeFa mennyiségeire.

A szérum/plazma fruktózamin (SeFa)-szint évszakos változásának vizsgálata természetes körülmények között: A SeFa mennyiségének változásában periodikus ismétlődést fedeztem fel, ami közepes negatív korrelációban állt a víz hőmérsékletével. Statisztikai módszerrel megállapítottam, hogy a SeFa mennyiségének periodicitása valamivel több, mint egy év volt vizsgálataim időtartam alatt. A szérum/plazma fruktózamin (SeFa)-szint évszakos változásának vizsgálata laboratóriumi körülmények között: A laboratóriumi vizsgálatok során a SeFa mennyisége ugyancsak periodikusan változott, de a minimum és maximum értékek eltértek a tavi vizsgálatok során leírtaktól, melynek oka a kiegyenlítettebb víz hőmérséklet volt. A SeFa értékei szintén negatív korrelációban voltak a víz hőmérsékletével. A szezonális egyenletesebb volt az akváriumi tartás során, a természetes vízi vizsgálatok eredményeihez képest. A ciklusok időtartamát tekintve azonos eredményeket kaptam, egy ciklus hossza mindkét esetben 1,2 év volt. Lényeges eredményt kaptam a vérplazma glükóz és a SeFa

összehasonlítása során. A tavi vizsgálatok alkalmával nem találtam összefüggést, de a laboratóriumban tartott egyedeknél igen. Ebben az összehasonlításban pozitív korrelációs összefüggést találtam.

Laboratóriumi kísérletek eredményei, a mesterségesen előidézett stressz mértékének megállapításakor: Az összesen tizenkét, egyenként négy hetes kísérletben a hosszútávú stressz a legtöbb esetben nem volt jellemezhető a vérplazmaglükóz mennyiségével. Ezzel szemben a SeFa mennyisége az idő előrehaladtával egyre nagyobb mennyiségben volt kimutatható a vérplazmában. A SeFa szintje a vérplazmában szinte minden kísérlet (kivéve a hőmérsékleti stressz pontynál és a ragadozó jelenléte által kiváltott stressz pontynál) során folyamatosan nőtt.

3.1. Új tudományos eredmények

1. A humán diabetes-vizsgálatokban alkalmazott szérum/plazma fruktózamin (SeFa) mérési metódust elsőként sikerült átültetnem a változó testhőmérsékletű halfajokra, ezáltal a hosszútávú stressz mérésére egy stabil, meggyőző és a gyakorlatban jól alkalmazható módszerhez jutottam.

2. Kimutattam, hogy a halak kifogása és az azt követő vérvétel nem befolyásolja a hosszútávú stressz mérésére alkalmas vérplazma-összetevők mennyiségének változását, ezáltal a módszer széles körben alkalmazható a gyakorlatban.

3. Kimutattam, hogy a halvér szérum/plazma fruktózamin mennyiségének szabályos évszakos váltakozása van, amely szignifikánsan negatív korrelációban áll a vízhőmérséklet változásával.

4. Vizsgáltam az eltérő típusú, a természetes körülmények között is előforduló stresszorok hatását több halfajon és megállapítottam, hogy a szérum fruktózámmal lehet a hosszútávú stresszválasz mértékét kimutatni.

4. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS A JAVASLATOK

4.1. Következtetések

A tényleges stressz értékének ismerete elengedhetetlenül fontos a haltermelésben. Minden egyes munkafázisnak (lehalászás, szállítás, teleltetés) megvan a negatív hatása a halakra nézve. A SeFa-nal lehet a legpontosabban a stresszt számszerűsíteni és mindez segítséget nyújthat minden termelőnek a technológia optimalizálásához. A SeFa nagy segítséget adhat a tenyésztőknek is. Nemesítésben olyan stressztűrő vonalak előállításában lehet óriási szerepe, amelyekkel nagyobb produkció érhető el. A SeFa alkalmazása új lehetőségeket adhat az egyes halfajok jobb megismerésére, például védett halfajok esetében az élőhely mesterséges átalakításának tolerálását is vizsgálhatnánk ezzel a módszerrel.

Összegezve, a SeFa mérésével jobb és pontosabb mérési eredményeket kaptam, mint a glükóznál. A SeFa kimutatása olcsó és könnyen kivitelezhető.

4.2. Javaslatok

A SeFa mennyiségének meghatározását több gazdasági halfajon is célszerű lenne elvégezni természetes vízi körülmények között. Különösen fontos ez azoknál a halfajoknál, melyeket intenzív körülmények között tenyésztünk, hiszen ezeknek a fajoknak állandó vízhőmérsékletre van szükségük életfolyamataikhoz.

Mivel a világ halfogyasztásának nagy százalékát a tengeri halak teszik ki, fontos lenne a SeFa mérési metodikát ezekre a fajokra kiterjeszteni.

A SeFa szint meghatározásával képet kaphatunk a halak általános egészségi állapotáról, ezért is javasolt ennek a vérplazma-összetevőnek vizsgálata a haltermelés szinte bármely időszakában.

A SeFa szint kimutatásához nagy mennyiségű vérplazmára van szükség. Ebből kifolyólag javasolt olyan mérési metodika kidolgozása is, amely lehetővé teszi olyan halfajok (pl. zebra-dánió *Danio rerio* Hamilton, 1822) vizsgálatát is, melyekből csak kis mennyiségű vér nyerhető.

A SeFa mennyisége negatív korrelációban áll a víz hőmérsékletével. A víz hőmérséklete mellett a máj glikogén tartalmát is célszerű lenne megvizsgálni évszakos szinten. Annál is inkább, mert irodalmi adatok alapján az feltételezhető, hogy a máj glikogén tartalma és a SeFa szint között pozitív korreláció áll fenn.

5. AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉHEZ KAPCSOLÓDÓ PUBLIKÁCIÓK

5.1. Szakkönyv/könyvrészlet

📖 **HEGYI Á.** (2005): A halak és más élőlények szerepe a vizek életében. In. *Horgászvizek kézikönyve*, (szerkesztő: Dr. Váradi László és Füstös Gábor) 61-79. p.

📖 **HEGYI Á., CSENKI ZS.**(2004): A tavak karbantartása és műszaki felszereltsége. In. *Kerti tavak kézikönyve*, (szerkesztő: Dr. Váradi László) 197-211. p.

5.2. Tudományos közlemények folyóiratban

📄 **HEGYI Á., BÉRES T., VARADI L., LEFLER K.K., TÓTH B., URÁNYI B.** (2006): Investigation of long-term stress induced by several stressors by determination of the concentration of different blood plasma components in a model of Prussian carp (*Carassius auratus gibelio* BLOCH, 1783) and Common carp (*Cyprinus carpio* L., 1758). *Acta biologica Hungarica*, 57 (3) 301-313. p.

📄 **HEGYI Á., TÓTH B., BÉRES T.** (2006): Különböző fogási módszerek hatása egyes vérplazma összetevők mennyiségére két halfaj esetében. *Halászat*, 99: 82-84. p.

📄 **HEGYI Á., URBÁNYI B., BÉRES T., TÓTH B., OPPEL K., VÁRADI L., HORVÁTH Á.** (2005): Eltérő mennyiségű kadmiummal előidézett környezeti stressz vizsgálata különböző vérplazma-összetevők mennyiségének meghatározásával, ezüstkárász (*Carrassius auratus gibelio* BLOCH, 1783) és ponty (*Cyprinus carpio* L., 1758) modellben. *Halászatfejlesztés*, 29: 27-39. p.

- ▢ **HEGYI Á., BÉRES T., TÓTH B., OPPEL K., HORVÁTH Á.** (2005): Changes in serum/plasma fructosamine concentration in some cyprinids induced by exposure to cadmium. *Hungarian Agricultural Research*, 4: 8-11. p.
- ▢ **HEGYI Á., BÉRES T., TÓTH B., OPPEL K.** (2004): Különböző vérvételi eljárások halaknál. *Halászat*, 97: 92-95. p.
- ▢ **HEGYI Á., BÉRES T., TÓTH B., OPPEL K.** (2004): Assessment of stress in common carp and silver crucian carp induced by the presence of predator using different blood plasma components. *Hungarian Agricultural Research*, 3: 13-15. p.
- ▢ **HEGYI Á., VÁRADI L., BÉRES T., KOVÁCS É., CSENKI ZS., TÓTH B., OPPEL K.** (2004): Oxigénhiányos környezet által kiváltott stressz vizsgálata és mérése három halfajon. *Halászatfejlesztés*, 28: 35-44. p.
- ▢ **HEGYI Á., VÁRADI L., KOVÁCS É., BÉRES T., CSENKI ZS., TÓTH B., OPPEL K.** (2003): A stresszhatások jelentősége és mérése koipontynál. *Halászat*, 96: 120-124. p.
- ▢ **HEGYI Á., VÁRADI L., URBÁNYI B., KOVÁCS É., BARLAI B., TÓTH B., OPPEL K.** (2003): Szérum/plazma fruktózamin (SeFa) mérés: új eljárás a halak stressztűrőképességének vizsgálatára. *Halászatfejlesztés*, 27: 229-239. p.
- ▢ **HEGYI Á., VÁRADI L.** (2002): Stresszérzékenység megítélése tógazdasági és természetes vízi körülmények között. *Halászatfejlesztés*, 26: 135-142. p.
- ▢ **VÁRADI L., HEGYI Á., HOPP B.** (2000): Narkotikumok alkalmazása a halszállításban. *Halászat*, 93. évf. 1. 44-48. p.

5.3. Konferencia kiadványban megjelent publikációk

▮ **HEGYI Á., LEFLER K.K., CSENKI ZS., HORVÁTH Á., URBÁNYI B.** (2007): New potentials for the detection of long-term stress in freshwater fish species. *Cell stress and Chaperones*, In Press

▮ **HEGYI Á., LEFLER K. K., CSENKI ZS., TÓTH B., BÉRES T., URBÁNYI B.** (2007): A szérum/plazma fruktózamin (SeFa) évszakos váltakozása természetes és akváriumi körülmények között XXXI. *Halászati Tudományos Tanácskozás*, kivonat 38. p.

▮ **HEGYI Á., BÉRES T., TÓTH B., OPPEL K., HORVÁTH Á.** (2006): Investigation of environmental stress induced by different cadmium concentrations following determination of the levels of several blood plasma components in a model of silver crucian carp (*Carrassius auratus gibelio* BLOCH, 1783) and common carp (*Cyprinus carpio* L., 1758) Aqua 2006 conference 2006. 05. 09 – 2006. 05. 13., Firenze, Abstracts book 384. p.

▮ **HEGYI Á., BÉRES T., TÓTH B., OPPEL K.** (2006): Investigation of chronic stress using different stressors by determination of levels of two blood plasma components in a model of silver crucian carp *Carrassius auratus gibelio* and common carp *Cyprinus carpio* Aquaculture America conference 2006. 02. 13 - 2006. 02. 16., Las Vegas, Abstracts book 132. p.

▮ **HEGYI Á., VÁRADI L., BÉRES T., KOVÁCS É., CSENKI ZS., TÓTH B., OPPEL K.** (2005): Oxigénhiányos környezet által kiváltott stressz vizsgálata és mérése három halfajon, XXVIII. *Halászati Tudományos Tanácskozás*, kivonat: 35-44. p.

▮ **HEGYI Á., URBÁNYI B., BÉRES T., TÓTH B., OPPEL K., VÁRADI L., HORVÁTH Á.** (2005): Eltérő mennyiségű kadmiummal

előidézett környezeti stressz vizsgálata különböző vérplazma-összetevők mennyiségének meghatározásával, ezüstkárász (*Carrassius auratus gibelio* BLOCH, 1783) és ponty (*Cyprinus carpio* L., 1758) modellben, XXIX. *Halászati Tudományos Tanácskozás*, kivonat: 14. p.

▮ **HEGYI Á., VÁRADI L., BÉRES T., KOVÁCS É., CSENKI ZS., TÓTH B., OPPEL K.** (2004): Oxigénhiányos környezet által kiváltott stressz vizsgálata és mérése három halfajon, XXVIII. *Halászati Tudományos Tanácskozás*, kivonat: 19. p.

▮ **HEGYI Á., VÁRADI L., URBÁNYI B., KOVÁCS É., BARLAI B., TÓTH B., OPPEL K.** (2003): Szérum/plazma fruktózamin (SeFa) mérés: Új eljárás a halak stressztűrőképességének vizsgálatára, XXVII. *Halászati Tudományos Tanácskozás*, kivonat: 56. p.

▮ **HEGYI Á., VÁRADI L.** (2002): Stresszérzékenység megítélése tógazdasági és természetes vízi körülmények között, XXVI. *Halászati Tudományos Tanácskozás*, kivonat: 55. p.

▮ **HEGYI Á., VÁRADI L., HORVÁTH L.** (2002): Narkotikumok alkalmazása a halszállításban. Debrecen, Innováció, a tudomány és a gyakorlat egysége az ezredforduló agráriumában. *Konferencia*, kivonat 185-190. p.

▮ **HEGYI Á., VÁRADI L.** (2001): Narkotikumok alkalmazása a halszállításban, XXV. *Halászati Tudományos Tanácskozás*, kivonat: 44. p.

5.4. Egyéb szakmai közlemények

▮ **HEGYI Á.** (2006): Stresszhatások biológiai és genetikai összefüggései halakon. Díjkiosztó és tanácskozás 2006. 05. 26. Budapest, Sigma-Aldrich Hungary