

DEBRECENI EGYETEM
AGRÁRTUDOMÁNYI CENTRUM
MEZŐGAZDASÁGTUDOMÁNYI KAR
ÁLLATTENYÉSZTÉS- ÉS TAKARMÁNYOZÁSTANI TANSZÉK

ÁLLATTENYÉSZTÉSI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Doktori Iskola vezető: Dr. Bánszki Tamás MTA doktora

Témavezető:
Dr. Pócsi László
egyetemi docens
biológiai tudomány kandidátusa

**A C-VITAMIN ÉS FORMÁINAK HATÁSA
AZ EURÓPAI HARCSÁRA (SILURUS GLANIS L.) ÉS EGY TOK HIBRIDRE
(*ACIPENSER RUTHENUS* L. X *ACIPENSER BAERI* BRANDT)**

Készítette:
Gyöngyösi Gyuláné dr. univ. Papp Zsuzsanna
doktorjelölt

**Debrecen
2003**

**A C-VITAMIN ÉS FORMÁINAK HATÁSA
AZ EURÓPAI HARCSÁRA (SILURUS GLANIS L.) ÉS EGY TOK HIBRIDRE
(ACIPENSER RUTHENUS L. X ACIPENSER BAERI BRANDT)**

*Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az Állattenyésztési Tudományok tudományágban*

Írta: Gyöngyösi Gyuláné dr. univ. Papp Zsuzsanna

A doktori szigorlati bizottság:

	Név	Tud. fokozat
Elnök:	Dr. Bánszki Tamás	MTA doktora
Tagok:	Dr. Müller Ferenc	mezőgazdasági tudomány kandidátusa
	Dr. O. Tóth Erzsébet	biológiai tudomány kandidátusa
Titkár:		

A doktori szigorlat időpontja 2002. április 23.

Az értekezés bírálói:

Név	Tud. Fokozat	Aláírás
Dr. Ó. Tóth Erzsébet	kandidátus	
Dr. Pekár Ferenc	PhD	
		

A bíráló bizottság:

	Név	Tud. fokozat	Aláírás
Elnök:			
Titkár:			
Tagok:			
			
			
			
			
			

Az értekezés védésének időpontja: 200.....

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS	7
1.1. <i>Előzmények</i>	7
1.2. <i>Célkitűzések</i>	11
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	13
2.1. <i>A C-vitamin tulajdonságai</i>	13
2.1.1. A C-vitamin fizikai és kémiai tulajdonságai	13
2.1.2. A C-vitamin bioszintézise	15
2.1.3. A C-vitamin legfontosabb biokémiai és élettani funkciói	16
2.1.4. C-vitamin felvétel és lebontás az állati szervezetekben	19
2.2. <i>A C-vitamin analitikája</i>	20
2.2.1. C-vitamin meghatározás sav-bázis titrálással	20
2.2.2. A C-vitamin meghatározása fotometriás módszerekkel	21
2.2.3. A C-vitamin meghatározása kromatográfiás módszerekkel	23
2.2.3.1. Papír- és vékonyréteg, valamint oszlopkromatográfiás módszerek	23
2.2.3.2. A C-vitamin és formáinak meghatározása HPLC-vel	24
2.3. <i>A C-vitamin szerepe a halak életében</i>	25
2.3.1. A C-vitamin hiány, illetve túladagolás következtében kialakuló tünetek	25
2.3.2. A legfontosabb C-vitamin formák stabilitása takarmányokban	27
2.3.3. A legfontosabb C-vitamin formák bioaktivitása és hatása	28
2.3.4. A különböző halfajok C-vitamin igénye	34

2.3. <i>A C-vitamin hatása halakra különböző stresszhelyzetekben</i>	35
3. A VIZSGÁLATOK ANYAGA ÉS MÓDSZERE	39
3.1. <i>A halfajok bemutatása</i>	39
3.2. <i>Kísérleti helyszínek, módszerek és mintavételek bemutatása</i>	40
3.2.1. <i>Mintavételi és kísérleti helyszínek</i>	40
3.2.2. <i>Kísérleti takarmányok</i>	42
3.3. <i>Etetési alapkísérletek</i>	43
3.3.1. <i>Megfigyelések, mintavételek</i>	43
3.3.2. <i>Az etetési alapkísérletek körülményei</i>	43
3.4. <i>Kísérletek európai harcsa (<i>Silurus glanis</i> L.) lárvákkal</i>	50
3.4.1. <i>Az ikrák és a különböző embrionális fázisok vizsgálata</i>	50
3.5. <i>A C-vitamin felvétel vizsgálata $1\text{-}^{14}\text{C}$-vel jelölt L-aszkorbinsav alkalmazásával</i>	52
3.6. <i>Az emésztőcsatorna tartalmának C-vitamin státusza</i>	52
3.7. <i>Különböző környezeti stresszek hatása a halak C-vitamin státuszára</i>	53
3.7.1. <i>Nitrit szennyezés hatásának vizsgálata</i>	53
3.7.2. <i>Alacsony oxigéntartalom okozta hatások vizsgálata</i>	54
3.7.3. <i>A nagy egyedsűrűség hatásának vizsgálata</i>	54
3.7.4. <i>Formalinos fürdetés hatása</i>	54
3.7.5. <i>Éhezés hatása a tok hibrid szöveteinek C-vitamin státuszára</i>	55
3.8. <i>A gulonolakton oxidáz enzim aktivitás alakulása tok hibrid esetében a különböző C-vitamin szintű takarmányozás során</i>	55
3.9. <i>A C-vitamin hatásának vizsgálata spontán darakór fertőzésnél</i>	55
3.10. <i>Kémiai és biológiai mérési módszerek</i>	55
3.10.1. <i>C-vitamin és formáinak meghatározása HPLC-vel</i>	56
3.10.2. <i>Az aszkorbát-2-észterek hidrolízisének vizsgálata</i>	59
3.10.3. <i>L-gulonolakton oxidáz enzim jelenlétének kimutatása</i>	61
3.10.4. <i>Methemoglobin tartalom mérése</i>	62
3.10.5. <i>Szövettani vizsgálatok</i>	62
3.10.6. <i>C-vitamin meghatározások spektrofotométerrel</i>	62
3.10.7. <i>Csontkollagén-tartalom meghatározás gravimetrián</i>	65

3.10.8. Oxalát tartalom meghatározása a halak különböző szöveteiben	65
3.10.9. Aminosav-analízis HPLC-vel (Pico-tag módszer)	66
3.11. Az adatok feldolgozása és az eredmények értékelése során alkalmazott statisztikai módszerek	67

4. VIZSGÁLATI EREDMÉNYEK ÉS AZOK ÉRTÉKELÉSE 68

4.1. C-vitamin meghatározás HPLC-vel	68
4.2. A különböző C-vitamin formák emészthetősége és stabilitása a takarmányokban	73
4.2.1. Emészthetőség	73
4.2.2. Stabilitás	74
4.3. A C-vitamin és formáinak hatása a halak növekedésére, mortalitására és a skorbut kialakulásának megjelenésére	74
4.3.1. Az európai harcsa (<i>Silurus glanis</i> L)	74
4.3.2. A tok hibrid (<i>Acipenser ruthenus</i> L. x <i>Acipenser baeri</i> Brandt)	81
4.4. A vizsgált halfajok C-vitamin tárolási képessége	82
4.4.1. Különböző olasz farmokról származó halfajok C-vitamin státusza	82
4.4.2. Az európai harcsa szöveteinek C-vitamin státusza	83
4.4.3. A szövetek összes aszkorbát koncentrációjának változása különböző C-vitamin szintű és formájú takarmányok hatására az európai harcsánál	85
4.4.4. A C-vitamin felhalmozódásának és kiürülésének vizsgálata 1- ¹⁴ C-vel jelzett L-aszkorbinsavval az európai harcsánál	89
4.4.5. A tok hibrid szöveteinek C-vitamin státusza	93
4.4.6. Gulonolakton oxidáz enzim jelenlétének kimutatása tok hibridnél	93
4.5. A kollagén-tartalom változásai	95
4.5.1. Az európai harcsa csontkollagén-tartalmának változása C-vitamin hatására	95
4.5.2. A tok hibrid porcos vázának kollagén-tartalma	95
4.6. C-vitamin ürítés a bélcsatornában	99
4.6.1. Az európai harcsa C-vitamin ürítése	99
4.6.2. A tok hibrid C-vitamin ürítése	99
4.7. C-vitamin hatása európai harcsa lárvákra	102
4.7.1. Az európai harcsa ikrák és embriók C-vitamin státusza	102

4.7.2. C-vitaminnal dúsított tubifex alkalmazása európai harcsa lárváknál	105
4.8. C-vitamin felhasználás különböző stressz helyzetekben	108
4.8.1. Egyes stressz helyzetek hatása az európai harcsa C-vitamin felhasználására	
108	
4.8.1.1. A nagy egyedsűrűség okozta stressz	108
4.8.1.2. Formalinos fürdetés okozta stressz	108
4.8.1.3. Nitrit szennyeződés okozta stressz	111
4.8.1.4. Alacsony oxigéntartalom okozta stressz	113
4.8.1.5. Spontán fertőzés okozta stressz hatása európai harcsa lárvákra	115
4.8.2. Egyes stresszhelyzetek hatása a tok hibrid C-vitamin felhasználására	116
4.8.2.1. Nitrit szennyeződés okozta stressz	116
4.8.2.2. Alacsony oxigéntartalom okozta stressz	118
4.8.2.3. Az éhezés hatása	120
4.9. Az Európai harcsa (<i>Silurus glanis</i> L.) C-vitamin igénye	122
4.10. A tok hibrid (<i>Acipenser ruthenus</i> L. x <i>Acipenser baeri</i> Brandt) C-vitamin igénye	123
5. KÖVETKEZTETÉSEK, JAVASLATOK	124
6. ÖSSZEFOGLALÁS	127
7. IRODALOMJEGYZÉK	132
8. FÜGGELÉK	143
8.1. Fogalmak, rövidítések	143
8.2. Kiegészítő táblázatok	144

1. BEVEZETÉS

1.1. Előzmények

Amióta a XX. század elején bizonyítottá vált, hogy a C-vitamin hiánya okozza az emberiség egyik rettegett betegségét, a skorbutot, egyre többen tanulmányozták annak élettani szerepét és szükségességét különböző állatok esetében is. A közismert, triviális nevén L-aszkorbinsav nevű vegyületről azóta bebizonyosodott, hogy több jelentős élettani hatása is van. Így pl. az emberi és állati szervezetekben végbemenő hidroxilálási reakciókban résztvevő enzimek nélkülözhetetlen kofaktora, kulcsszerepe van a szabadgyökök veszélyes reakciói elleni védelemben, antioxidáns és immunstimulátor, valamint nélkülözhetetlen egyes stresszhatások kivédésében is. Míg a növényvilág tagjai igen, addig az ember és az állatok egy része gulonolakton oxidáz enzim hiányában nem képes előállítani ezt az élő szervezetek számára nélkülözhetetlen vitamint (MOSER, 1990).

A C-vitamin felfedezésének története valószínűleg visszanyúlik az ókorba. Már Egyiptom, Görögország és a Római Birodalom polgárai is ismerhették a skorbutot (MOSER, 1990). A középkorban, a tengeri hajózás fejlődésével a matrózok rettegett betegségévé vált, de sokszor megtizedelte a háborúkban küzdő katonákat is. Bár mind a hajózási társaságok, mind pedig a hadseregek küzdöttek a skorbut ellen, hosszú évszázadok teltek el, amíg sikerült bizonyítani, hogy ez a súlyos, legtöbbször halálos kór összefüggésben van a táplálkozással. Az első klinikai kísérletet J. Lind, a Királyi Flotta orvosa végezte és bizonyította, hogy a citrusfélék gyümölcseivel meg lehet gyógyítani a skorbutot. MOSER (1990) hivatkozása szerint eredményeiről „A treatise of the scurvy” címmel 1753-ban könyvet is megjelentetett Edinburghben. Kezelési javaslatai azonban még a XX. század elejére sem váltak közismertté. Scott kapitány és társai minden valószínűség szerint a C-vitamin hiányos étkezés miatt haltak meg 1912-ben a Déli-sarkra vivő felfedező útjukon.

Miután Axel Holst és Theodor Frölich 1907-ben felfedezték, hogy a tengerimalacnak is külső forrásra van szüksége a skorbut megelőzésére, megkezdődtek a C-vitaminnal kapcsolatos biológiai kutatások. Többek között ez a felfedezés indította el a kísérleteket az antiskorbutikus faktor izolálására és jellemzésére. C-vitaminnak DRUMMOND

(1920) nevezte el. Akkoriban néhány hiánybetegség ismert volt már, így többféle vitamin létezésére lehetett következtetni. Mivel ezeket betűkkel jelölték és az „A”, valamint a „B” betű már foglalt volt, az újonnan felfedezett vitamin a C-vitamin nevet kapta. Kristályos formában Szent-Györgyi Albert izolálta először a vegyületet 1928-ban mellékveséből és hexuronsavnak nevezte el. Megállapította összegképletét is, amely $C_6H_8O_6$. Ekkor azonban még nem ismerték fel, hogy a hexuronsav azonos a C-vitaminnal. Szent-Györgyi 1932-ben paradicsompaprika présnedvéből is izolálta és viszonylag nagy mennyiségben előállította a hexuronsavat. Majd egymástól függetlenül Ő és Tillmans is igazolták tengeri malacokkal végzett kísérleteik során, hogy a két vegyület azonos. Alig egy évvel később Hirst és Harworth meghatározták a C-vitamin szerkezetét, és Szent-Györgyivel együtt javasolták, hogy a vegyület neve L-aszkorbinsav legyen, utalva annak antiskorbutikus hatására (SZENT-GYÖRGYI és HARWORTH, 1933). Egy éven belül Reichstein megoldotta az újonnan felfedezett vitamin laboratóriumi szintézisét, amely a mai napig alapját képezi a C-vitamin gyártásának. Harworth és Szent-Györgyi C-vitaminnal kapcsolatos munkáját 1937-ben Nobel-díjjal jutalmazták (MOSER, 1990).

Mivel a természetes körülmények között élő, vagy halastavakban tenyésztett halak környezetükből könnyen hozzájutnak a számukra szükséges mennyiségű C-vitaminhoz, az L-aszkorbinsav felfedezését követően a kutatók még hosszú ideig nem tudtak arról, hogy sok halfaj esetében esszenciális ez a vitamin. Az intenzív haltenyésztés elterjedésével azonban hamarosan észleltek egyes halfajoknál az emberi skorbuthoz hasonló tüneteket. TUCKER és HALVER (1986) hivatkozása szerint MCCAY és TUNISON már 1934-ben megfigyelték, hogy formalinnal tartósított hússal etetett pisztrángoknál lordózis és scoilózis jelentkezett. Mivel a tünetek a nagyobb halaknál gyakran hosszú idő, hónapok, vagy akár egy év alatt alakultak ki, nem gondoltak skorbutra. Bár KITAMURA et. al. (1965) továbbá HALVER et. al. (1969) leírták, hogy az intenzív haltartás során egyre többször jelentkező problémát a C-vitamin hiány okozza szivárványos pisztráng, illetve atlanti lazac esetében, a kutatások e területen csak a hetvenes évek közepétől gyorsultak fel.

Sokan foglalkoztak továbbra is a skorbut kialakulásával. A betegséget több halfajra is leírták, pl. a csatorna harcsára (LOVELL, 1973; WILSON és POE, 1973), vagy a tengeri sügérre (DOIMI et. al., 1985). A későbbiekben azonban olyan halfajokat is találtak, amelyek elő tudják állítani a C-vitamint. Ilyenek általában a porcos halak, mint a tokfélék (DABROWSKI, 1994) és a cápák (MÆLAND és WAAGBØ, 1998).

Az 1970-es és 80-as években sokan foglalkoztak a C-vitamin meghatározási módszerek fejlesztésével azért, hogy minél pontosabban meg tudják mérni a különböző halfajok szöveteinek vagy takarmányának aszkorbát tartalmát. Leggyakrabban spektrofotometriás (CARR et. al., 1983; DABROVSKI és HINTERLEITNER, 1989) és magas nyomású folyadékkromatográfiás (FELTON és HALVER, 1987; MAUGLE, 1993) módszerekkel találkoztunk, amelyekkel vagy a természetben is jelenlévő, vagy pedig az iparilag előállítható C-vitamin formák mérhetők. Nem találtunk azonban olyan módszert, amivel a leggyakoribb természetes vagy iparilag előállítható formákat egy minta ugyanazon extraktumából meg lehetne határozni.

MEAD és FINAMORE (1969) a garnélarák szöveteiből izolálták az L-aszkorbinsavnál lényegesen stabilabb aszkorbát-2-szulfátot. Ezt követően állították fel azt az egyébként attraktív és széles körben elfogadott hipotézist, hogy az állatok egy része képes a C-vitamint szulfát formában tárolni, amit azután szükség esetén L-aszkorbinsavvá hidrolizál (BAKER et. al., 1975; CHATTERJEE et. al., 1975; HORNIG, 1975). Nem sokkal később TUCKER és HALVER (1984a,b) kísérleti eredményei alapján arra a következtetésre jutott, hogy a halak főleg szulfát formában tárolják a C-vitamint és szulfát-transzferáz enzimmel alakítják L-aszkorbinsavvá. A meghatározások pontatlanságai miatt azonban hamarosan központi és vitatott kérdéssé vált a halak C-vitamin tárolási képessége. DABROWSKI és HINTERLEITNER (1989) egy, az addigiaknál pontosabb módszerrel csak az artémia petékben tudta az aszkorbát-2-szulfátot kimutatni, halakban nem. A vita még a 90-es évek közepén is tartott (DABROWSKI et. al. 1994).

Bár a nyolcvanas évek végétől napjainkig sokan foglalkoztak az egyes halfajok C-vitamin igényének meghatározásával, még a mai napig sincs egy általánosan alkalmazható módszer. A növekedés, a mortalitás és a skorbut tüneteinek vizsgálata legfeljebb a minimális szükséglet meghatározásához elegendő. Az egyes szervek telítődése C-vitaminnal, továbbá a csontok kollagén-tartalmának mérése már közelebbi értéket adhat, de nem lehet kihagyni a különböző stresszhatásokat sem (DABROWSKI et. al., 1994).

A természetes vegyület, az L-aszkorbinsav vízben könnyen bomlik, így a megfelelő C-vitamin szintű tápok előállítása nem egyszerű feladat. A hetvenes évek közepétől egyre több stabil, aszkorbát-2-mono-, illetve polifoszfát, aszkorbát-2-monoszulfát, palmitát, stb. észter formában előállított C-vitaminnal találkozhatunk a különböző cégek tápjaiban. A halak azonban nem rendelkeznek valamennyi forma hidrolizálására

alkalmas enzimekkel, így nem is képesek hasznosítani az összes, egyébként előállítható stabil C-vitamin formát (DABROWSKI et. al., 1994).

Külön fejezetet érdemelnek a lárvákkal és ivadékokkal folytatott kísérletek. Ez a korosztály minden halfajnál jelentősebb C-vitamin igénnyel jelentkezik, mint az idősebbek. Ebben az időszakban azonban a halakat általában élő táplálékkal etetik, aminek nehezen oldható meg a vitaminnal történő dúsítása (MERCHIE et. al., 1995, 1996).

A C-vitamin és a stressz kapcsolata kezdettől fogva az egyik központi kérdés volt. A különböző kutatások egyaránt foglalkoznak a C-vitamin szerepével a környezeti hatások és a fertőzések okozta károk elleni védekezésben. Találkoztunk pl. a nitrit okozta methemoglobinémia (WISE et. al., 1988), vagy a darakór túlélésében betöltött szerepével (WAHLI et. al., 1986).

Napjaink kutatásai elsősorban a halak C-vitamin szintetizáló képességének genetikai kérdései felé fordultak. Többek között sikerült megállapítani, hogy a csontos halak valószínűleg a triász korban veszítették el L-aszkorbinsav előállító képességüket (MOREAU és DABROWSKI, 2000). Érdekességgént megjegyezzük, hogy bár sikertelenül, de a gulonolakton oxidáz enzim előállításáért felelős gént is megpróbálták patkányból lazacba átvinni (KRASNOV et. al., 1999).

Bár a C-vitamin létfontosságú több, hazánkban is intenzíven tenyésztett halfaj számára, Magyarországon csak a kilencvenes évek elején kezdődtek el a kutatások, valószínűleg a kis volumenű hazai intenzív haltenyésztés miatt. Mivel az EU csatlakozási folyamat során a takarmányozás területén is egyre több minőségi garanciát kell biztosítani a már eddig is kutatott makro-tápanyagszükségleteken túl, egyre nagyobb figyelmet kell fordítani a vitaminok, valamint a takarmányokban alkalmazott egyéb mikro-tápanyagok vizsgálatára. Bemutatásra kerülő munkánkat is nagyrészt az Európai Gazdasági Közösség 1992-ben meghirdetett „*Cooperation in Science and Technology with Central and Eastern European Countries*” azaz „*Tudományos és Technológiai Együttműködés a Közép- és Kelet-Európai Országokkal*” című kutatási pályázaton nyert támogatás tette lehetővé.

Partnerünk az olaszországi Basilicata tartomány Állami Egyeteme (Potenza) Állattani Tanszékének akvakultúrával foglalkozó kutatócsoportja volt. A téma címe: „*Különböző, a kereskedelemben kapható C-vitamin formák tápértékének és szükségletének összehasonlító vizsgálata az intenzív technológiában nevelt tengeri sügér, angolna, tok és európai harcsa esetében*” (Témaszám:

CIPACT93140(PL928019). Kutatási lehetőségeink kiszélesítéséhez több alkalommal hozzájárult az FVM K+F pályázatain nyert kutatási támogatás is.

Dolgozatomban munkánk azon részét szeretném bemutatni, amely a hazai haltenyésztés számára fontos két halfajra, az európai harcsára (*Silurus glanis* L.) és a kecsge x lénai tok hibridre (*Acipenser ruthenus* L. x *Acipenser baeri* Brandt) vonatkoznak.

1.2. Célkitűzések

Bár eredeti célkitűzéseinket 1994-ben fogalmaztuk meg az akkori nemzetközi és hazai ismereteknek megfelelően, a folyamatosan tanulmányozott irodalomnak és a saját kísérletek eredményeinek figyelembevételével munkánk során továbbfejlesztettük azokat.

Témaválasztásunk hazai vonatkozásokban hiánypótló kutatásokat tett lehetővé. Kutatóink körében és a gyakorlatban sem eléggé ismert a C-vitamin szerepe a halak tenyésztésében. A ma is használt Halgazdálkodás című könyv II. kötetében például találkoztunk azzal a téves nézettel, mely szerint a vízdoldható vitaminokat, köztük a C-vitamint a bélben élő mikroorganizmusok szintetizálják (TAMÁS et. al., 1997).

Kísérleteink során ezért választ kívántunk kapni a kutatókat leggyakrabban foglalkoztató kérdésekre, hazai halfajok vonatkozásában. Ezek alapján főbb célkitűzéseinket az alábbiakban foglaltuk össze:

1. Egy olyan HPLC-vel (magas nyomású folyadékkromatográffal) végezhető C-vitamin meghatározási módszer kidolgozása, amellyel egy minta ugyanazon extraktumából kis koncentrációban is meghatározhatók a természetes és a tápokban alkalmazott legfontosabb iparilag előállítható vitamin formák.
2. A természetes C-vitaminnak és iparilag előállítható formáinak hatása az európai harcsára (*Silurus glanis* L.). A C-vitamin igény meghatározása 5-200 g tömegű halak esetében az alábbiak figyelembevételével:
 - A növekedés, a mortalitás, a skorbut tünetei és a kollagén-tartalom változásai különböző szintű és formájú C-vitamint tartalmazó takarmányok etetése során;
 - A természetes C-vitaminnak és iparilag előállítható formáinak felhalmozódása és telítődése a különböző szövetekben;
 - A C-vitamin kiürülése a szervezetből;

- A C-vitamin hatásának vizsgálata egyes stresszhelyzetekben;
 - A C-vitamin hatása lárvákra.
3. A természetes C-vitaminnak és iparilag előállítható formáinak hatása a kecsege x lénai tok hibridre (*Acipenser ruthenus* L. x *Acipenser baeri* Brandt) az alábbiak szerint:
- A növekedés, a mortalitás, a skorbut tünetei és a kollagén-tartalom változásai különböző szintű és formájú C-vitamint tartalmazó takarmányok etetése során;
 - A tok hibrid C-vitamin szintetizáló képességének vizsgálata;
 - A természetes C-vitaminnak és iparilag előállítható formáinak felhalmozódása a különböző szövetekben;
 - A C-vitamin kiürülése a szervezetből;
 - A C-vitamin hatásának vizsgálata egyes stresszhelyzetekben.

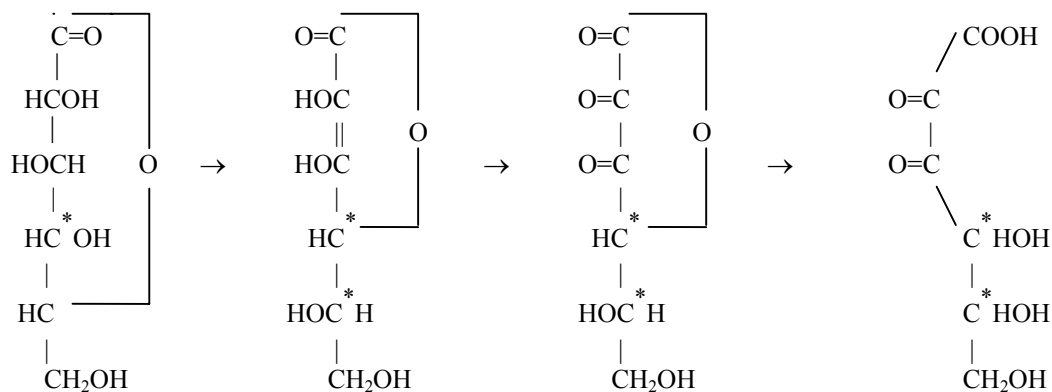
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A C-vitamin tulajdonságai

A cukorsavak fontos származéka az L-aszkorbinsav, azaz a C-vitamin, amit a hexonsav γ -laktonjának tekinthetünk. A C-vitamin a vízben oldódó vitaminok közé tartozik. Biokémiai és élettani funkciói sokrétűek, ezért nélkülözhetetlen az ember és az állatok számára. Néhányan közülük, mint az ember, a majmok, a tengerimalac, egyes madarak és a halak nagy része csak táplálkozás útján jut hozzá, míg más állatok szintetizálják (ELŐDI, 1981).

2.1.1. A C-vitamin fizikai és kémiai tulajdonságai

Az L-aszkorbinsav, vagy C-vitamin, a IUPAC terminológia szerint L-treo-2-hexono-1,4-lakton, színtelen, kristályos vegyület. Fizikai és kémiai tulajdonságait meghatározza az öt szénatomból álló gyűrű, amely egy savas protont tartalmaz. Bioszintézisének utolsó lépése az L-gulonolakton oxidációja gulonolakton oxidáz enzimmel (1. ábra).



GLO
L-gulonolakton $\rightarrow$ L-aszkorbinsav $\leftrightarrow$ dehidro-L-aszkorbinsav $\rightarrow$ 2,3-diketo-gulonsav

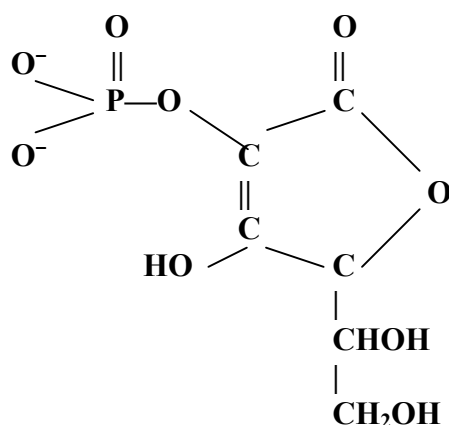
1. ábra: Az L-aszkorbinsav keletkezése és lebomlása a természetben

Megjegyzés: * királis szénatomok; GLO = gulonolakton oxidáz enzim

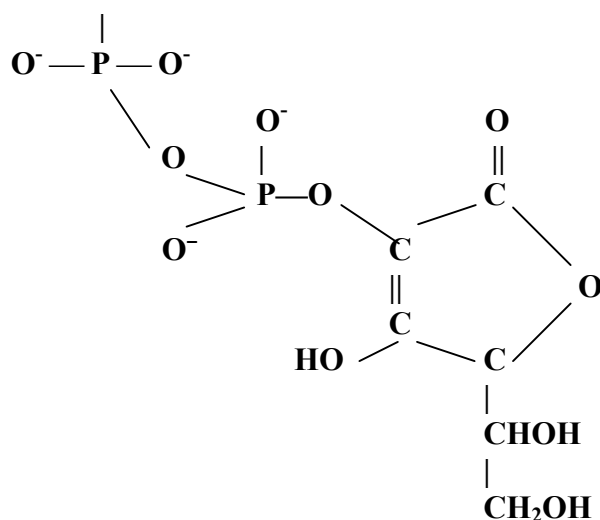
Forrás: DABROWSKI et. al. (1994)

Két királis (*) központja a 4. és 5. szénatomon négy sztereo-izomert tesz lehetővé (L- és D-aszkorbinsav, L- és D-izo-aszkorbinsav), de ezek közül csak az L-aszkorbinsav mutat jelentős biológiai aktivitást (HAY et. al., 1967). CRAWFORD és CRAWFORD (1980) szerint a 2. és 3. pozícióban levő hidroxil csoportok savas kémhatásúak (pK_1 4,17 és pK_2 11,79). Erős redukáló hatása miatt könnyen oxidálódik, két lépésben történő reverzibilis oxidációja során szemidehidro-L-aszkorbinsavvá, illetve dehidro-L-aszkorbinsavvá alakul. A dehidro-L-aszkorbinsav azonban könnyen oxidálódik irreverzibilisen 2,3-diketo-gulonsavvá, aminek már nincs biológiai aktivitása (DABROWSKI et. al., 1994; O'KEEFE, 2001). Az L-aszkorbinsav száraz, kristályos formában, valamint savas oldatokban viszonylag stabil, de semleges vagy lúgos oldatban könnyen oxidálódik. Mivel kémiaiailag erősen reaktív csoportjai vannak, iparilag több, a természetes formáknál stabilabb, biológiailag aktív formája is előállítható (SANDNES, 1991). A legismertebbek ezek közül:

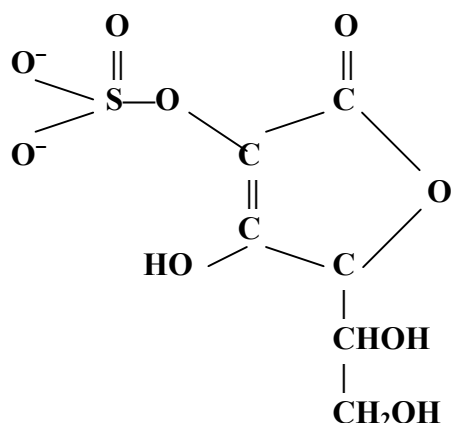
Aszkorbát-2-monofoszfát:



Aszkorbát-2-polifoszfát:



Aszkorbát-2-monoszulfát:



Különböző mértékű C-vitamin aktivitást mutatnak és alkalmazhatók a takarmányozásban az aszkorbát-palmitát (SOLIMAN et. al., 1986), és az aszkorbát-2-glükózid (MUTO et. al., 1992) is. Összesen mintegy 125 különböző biológiai aktivitású L-aszkorbinsav származékot izoláltak vagy állítottak elő a világon WANG és SEIB (1990) szerint.

2.1.2. A C-vitamin bioszintézise

A C-vitamin szintézisére képes állatok az α -D-glükózból kiindulva a glükuronsavat követve „*de novo*” szintetizálják az L-aszkorbinsavat, UDP glükuronsavból, az uronsav úton, májukban vagy veséjükbenben (BRAUN et. al., 1996). A szintézis kulcsreakciója az L-gulonolakton L-aszkorbinsavvá alakítása (1. ábra). Az ember és azok az állatok, amelyeknek szervezetéből hiányzik az L-gulonolakton oxidáz enzim, nem képesek szintetizálni a C-vitamint (CHATTERJEE, 1978).

TOUHATA et. al. (1995) szerint a főemlősök, a tengerimalac, továbbá 16 madárfaj nem tudják előállítani az L-aszkorbinsavat a gulonolakton oxidáz (GLO) enzim hiányában. Az állatvilágban a GLO vagy a vesében, vagy a májban található. A kétéltűek a veséjükben, az emlősök általában a májukban állítják elő a C-vitamint. Különlegesen alakul a madarak és a halak L-aszkorbinsav szintetizáló képessége. Vannak madárfajok, amelyek csak a vesében, 2 faj mind a két szervben, 10 faj pedig csak a májban szintetizálja a C-vitamint. A halak közül a porcos halak (tokfélék, cápák), a tüdőshal, valamint a lapátorru hal veséjében találtak elegendő GLO aktivitást a számukra szükséges C-vitamin előállításához. Szerintük a ponty, az ezüstkárász és a

márna mind a két szervben szintetizál C-vitamint, de kérdéses, hogy ez elegendő-e normális fejlődésükhöz. A tilápia a májában képes C-vitamint előállítani. Jó néhány hal szervezetéből hiányzik azonban a gulonolakton oxidáz enzim, így ezek a fajok külső C-vitamin forrásra szorulnak. DABROWSKI (1990a) szerint a csontos halak általában nem tudják előállítani a C-vitamint, a primitív, porcos halak azonban elegendő gulonolakton oxidáz enzimmal (GLO) rendelkeznek, és veséjükben szintetizálják az L-aszkorbinsavat (DABROWSKI, 1994). Kilenc különböző halfajt vizsgált MÆLAND és WAAGBØ (1998), melyek közül a tuskés cápa (*Squalus acanthias* L.) és a kecsege (*Acipenser ruthenus* L.) nem szorul külső C-vitamin forrásra. Nem képesek az L-aszkorbinsav szintézisére, ezért takarmányukban kiegészítést igényelnek, az atlanti hering (*Clupea harengus* L.), az európai angolna (*Anguilla anguilla* L.), az atlanti lazac (*Salmo salar* L.), az atlanti tőkehal (*Gadus morhua* L.), az atlanti makréla (*Scomber scombrus* L.), az atlanti óriás laposhal (*Hippoglossus hippoglossus* L.), valamint az atlanti nagy rombuszhal (*Scophthalmus maximus* L.).

MOREAU et. al. (1999b) szerint a C-vitaminnal táplált tavi tok (*Acipenser fulvescens*) „in vitro” gulonolakton oxidáz enzimaktivitása azonban nem csökken. A szerzők véleménye szerint ez esetben tehát nem működik az a „feed back” szabályozás, amit az L-aszkorbinsavat a májukban szintetizáló emlősöknél tapasztaltak. Hasonló eredményre jutottak FRACALOSSO et. al. (2001). A tanulmányozott 13 különböző Amazoniában élő halfajból 11 csontos halfaj nem mutatott GLO aktivitást, míg két nem csontos halfaj (édesvízi rája és dél-amerikai tüdőhal) vizsgálataik szerint fejlődéséhez elegendő C-vitamint képes előállítani.

MOREAU és DABROWSKI (2000) több, még fennmaradt Actinopterygian halat vizsgált (*Polypterus senegalus*, *Lepisosteus osseus*, *Amia calva*), eredményeik szerint valamennyi képes a veséjében „de novo” C-vitamin szintézisre. SATO et. al. (1978) és TOUHATA et. al. (1995) eredményeivel ellentétben azonban nem találtak GLO aktivitást a pontynál (*Cyprinus carpio* L.) és az ezüstkárásznál (*Carassius auratus* L.). Összehasonlító genetikai vizsgálataik alapján feltételezhető, hogy a csontos halak a triászkorban veszítették el C-vitamin szintetizáló képességüket.

2.1.3. A C-vitamin legfontosabb biokémiai és élettani funkciói

Az L-aszkorbinsav elektron donor, biokémiai funkciói is ezen alapszanak (MOSER, 1990). Egy vagy két elektront tud átadni a fémionoknak, vagy egyes redox-reakciókban,

mint pl. a hidroxiláció. Az 1. táblázatban bemutatjuk a legfontosabb C-vitamin függő enzimeket.

1. táblázat. A legfontosabb C-vitamin függő enzimek

<i>Enzim</i>	<i>Funkció</i>
Prolin hidroxiláz	Prolin transz-4-hidroxiláció a pro-kollagén szintézisben
Pro-kollagén-prolin-2-oxoglutarát-3-dioxigenáz	Prolin transz-3-hidroxiláció a pro-kollagén szintézisben
Lizin hidroxiláz	Lizin 5-hidroxiláció a pro-kollagén szintézisben
γ -Butirobetain, 2-oxoglutarát-4-dioxigenáz és Trimetil-lizin-2-oxoglutarát dioxigenáz	Karnitin prekuzor hidroxiláció
Dopamin β -monoxigenáz	Dopamin β -hidroxiláció a nor-adrenalin szintézisben

Forrás: MOSER, 1990

Az L-aszkorbinsav kofaktora a kollagén-szintézisnek (ELŐDI, 1981). A kollagén vázfehérje, fontos összetevője a bőrnek, a csontoknak, a gerincoszlopnak, valamint a véredények endoteliumának. A többi fehérjével ellentétben hidroxiprolin és hidroxilizint tartalmaz, mely vegyületek poszt-szintetikusán, prolinból és lizinből, a polipeptidlánc létrejötte után keletkeznek. A láncon belül a glicin és a hidroxiprolin között hidrogénkötések jönnek létre, amelyek segítségével alakul ki a kollagén sajátos hármas hélix szerkezete. A prolin hidroxiláz enzim működéséhez L-aszkorbinsav szükséges. C-vitamin hiányában tehát nem szintetizálódik elegendő hidroxiprolin, vagy hidroxilizin, és nem megfelelő minőségű polipeptidláncok alakulnak ki. A fehérjerészen kívül a kollagén szénhidrátot is tartalmaz, amely glükózaminból és galaktózaminból álló mukopoliszaharid és a hidroxilizin OH csoportjához kapcsolódik. Elegendő hidroxiaminosav hiányában a szénhidrát részek sem tudnak a fehérjelánchoz kapcsolódni. Mivel a hármas hélix szerkezet átstrukturálódik, a nem hidroxilált kollagén nem képes megfelelő fonalas szerkezetet létrehozni, a kötőszövet lazává, a véredények és a bőr törékennyé válik. Ez a szerkezeti átalakulás okozza a skorbutot.

A kollagén szintézis mennyiségileg követhető a csontok összes kollagén tartalmának mérésével. A prolin/hidroxi-prolin arányának meghatározása pedig arra is alkalmas, hogy tájékozódjunk a kialakult kollagén szerkezetéről (DABROWSKI et. al., 1994).

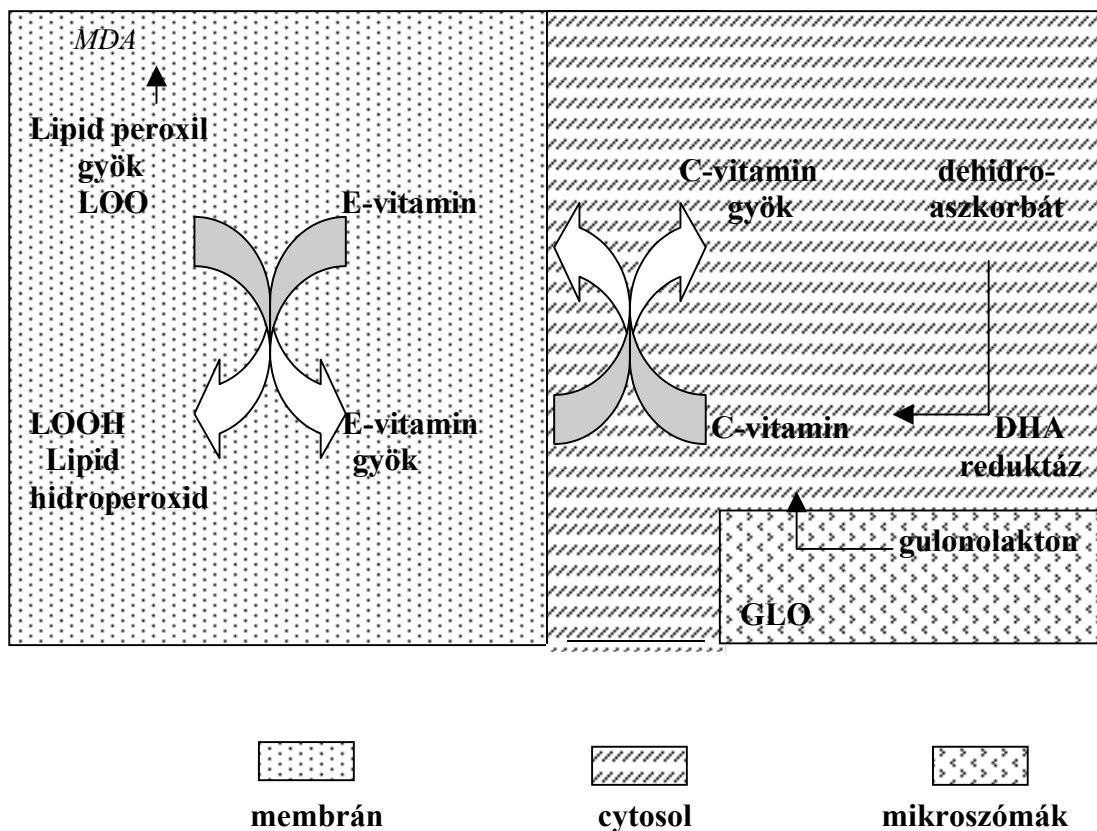
Az L-aszkorbinsav kofaktora a katekolamin-szintézisnek (ELŐDI, 1981). Mivel a stresszreakciók elsődlegesen az endokrin-rendszer által kontrolláltak a kortizol és a katekolaminok segítségével, C-vitamin hiány esetén a szervezet nem ad megfelelő válaszreakciókat. A C-vitamin oxidatív szerepet játszik a tirozin lebontásában. Hiányában hipertirozinémia jön létre.

Az L-aszkorbinsav antioxidáns, így többek között szerepet játszik a májban végbemenő olyan detoxikációs folyamatokban, mint a xenobiotikumok, drogok, mérgek és szteroidok (TUCKER and HALVER, 1984b), vagy a környezetből származó nitrit szennyeződés okozta methemoglobin lebontása (SCARANO et. al., 1991).

A C-vitamin fontos immunstimulátor, segít a szervezet általános fiziológiai állapotának javításában, védelmet nyújt egyes fertőzések és a környezet okozta károsodások ellen (VERLACH and GABAUNDAN, 1997; GOMOZOVA JENEY, 1999).

A C-vitamin szerepet játszik a vas metabolizmusában (HILTON et. al., 1979), pl. a skorbutos hal lépében megemelkedik a vas koncentráció.

A C-vitamin csökkenti egyes fémek, pl. a kadmium, a nikkell és az ólom mérgező hatását. Ezeket a fémeket redukált formájukba alakítja, amelyek ezt követően kevésbé képesek abszorbeálódni és gyorsabban távoznak a szervezetből (VERLACH and GABAUNDAN, 1997). A C-vitamin védelmet nyújt a különböző környezeti, vegyi és egyéb hatások során felszabaduló szabadgyökök támadásával szemben (VERLACH and GABAUNDAN, 1997). Így pl. szerepet játszik az E-vitamin regenerációjában (MOREAU, et. al., 1999a). Az E vitamin a sejtmembránok legnagyobb mennyiségben jelenlévő antioxidánsa, amely védelmet nyújthat a membránok foszfolipidjeinek peroxidációja ellen. A szabad gyökök hatására az oxidált tokoferolt (E vitamin gyök) a C-vitamin képes újra redukálni és α -tokoferollá (E-vitamin) alakítani (2. ábra).



2. ábra: Az E-vitamin antioxidáns reakciója és regenerációja C-vitamin segítségével a sejtekben. MDA → malondialdehyd, DHA → dehidro-aszkorbinsav, GLO → gulonolakton oxidáz

Forrás: MOREAU et. al. 1999a

A C-vitamin védelmet nyújt a különböző környezeti, vegyi és egyéb hatások során felszabaduló szabadgyökök támadásával szemben (VERLACH and GABAUNDAN, 1997). Így pl. szerepet játszik az E-vitamin regenerációjában (MOREAU, et. al., 1999a). Az E vitamin a sejtmembránok legnagyobb mennyiségben jelenlévő antioxidánsa, amely védelmet nyújthat a membránok foszfolipidjeinek peroxidációja ellen. A szabad gyökök hatására az oxidált tokoferolt (E vitamin gyök) a C-vitamin képes újra redukálni és α-tokoferollá (E-vitamin) alakítani (2. ábra).

2.1.4. C-vitamin felvétel és lebontás az állati szervezetekben

Azoknál a fajoknál (pl. tengerimalac), amelyek nem képesek szintetizálni a C-vitamint, az L-aszkorbinsav abszorpciója nagymértékben a belekben történik egy aktív transzport mechanizmuson keresztül (DABROWSKI et. al., 1994). A felvehető C-vitamin mennyisége függ a nyálka Na^+ koncentrációjától. Egyes sejtek, mint pl. a limfociták, csak dehidro-L-aszkorbinsav formájában, passzív diffúzió útján képesek felvenni a C-vitamint, ami azután a sejten belül gyorsan redukálódik L-aszkorbinsavvá (VERLACH és GABAUNDAN, 1997). A dehidro-L-aszkorbinsav elektrokémiai szempontból semleges formája a C-vitaminnak, így ez a felvételi mechanizmus független a Na^+ ion koncentrációtól. BIANCHI et. al. (1986) szerint a C-vitamin felvétele az emésztőrendszerben túlnyomó részben L-aszkorbinsav formában történik.

A C-vitamin lebomlása az állati szervezetekben jelenlegi ismereteink szerint két útvonalon is végbemehet. A folyamat első lépése minden esetben az L-aszkorbinsav reverzibilis oxidációja dehidro-L-aszkorbinsavvá, ami azután már irreverzibilisen diketo-gulonsavvá alakul. BRAUN et. al. (1996) szerint a diketo-gulonsav nagyobb része 5 szénatomos intermediereken keresztül pentózfoszfáttá („*major pathway*”), míg egy kisebb rész 4 szénatomos intermediereken át oxaláttá („*minor pathway*”) alakul. Más kutatók szerint ez a lebomlás a szervezet fiziológiai pH-ján gyorsan végbemegy, de főleg oxalát keletkezik (TOLBERT et. al., 1975; MOSER, 1990).

2.2. A C-vitamin analitikája

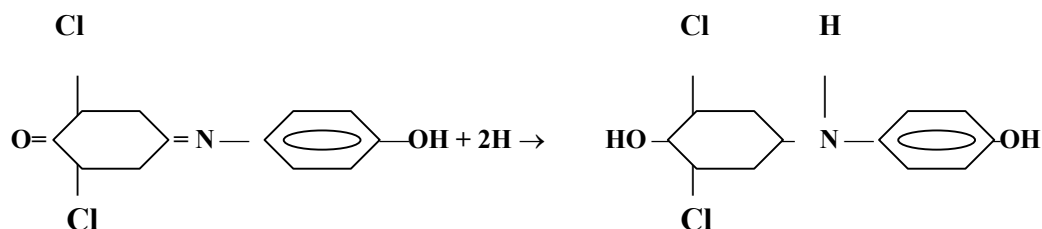
A C-vitamin felfedezését követően koncentrációjának minél pontosabb meghatározására törekedtek a kutatók. Már a harmincas évek végétől találkozunk sav-bázis titrálós, valamint kolorimetriás mérési módszerekkel. A sokkal szelektívebb kromatográfiás meghatározások a magasnyomású oszlopkromatográfia (HPLC) elterjedését követően, a hetvenes években jelentek meg a C-vitamin analitikájában.

2.2.1. C-vitamin meghatározás sav-bázis titrálással

ROE (1954) szerint a C-vitamin koncentrációja szövetek kivonatából mérhető az L-aszkorbinsav 2,6-diklór-fenol-indofenollal (DCIP) adott reakciójának segítségével,

melyet hivatkozása szerint BESSEY 1938-ban írt le. A lúgos közegben kék, savas közegben rózsaszín vegyületet az L-aszkorbinsav elszínteleníti, miközben redukálja.

2,6 diklór-fenol-indofenol



oxidált forma (kék vagy rózsaszín)

redukált forma (színtelen)

A reakciót zavarhatják fenolok, szulfhidril csoportok, tioszulfát, Fe^{3+} , Cu^{2+} és más oxidált formában jelenlévő ionok, ezért természetes szövetkivonatokban a tényleges L-aszkorbinsav koncentráció könnyen, akár a többszörösével is felülbecsülhető ezzel a módszerrel. A módszer szerint a növényi és állati szövetek extrakciójának kivitelezéséhez legalkalmasabb az oxálsav 0,4%-os, vagy a metafoszforsav 1%-os oldata. Mind a két vegyület koagulálja a fehérjéket, ezért a C-vitamin stabilizálásán túl, egyben fehérje-mentesítésre is alkalmas. Az extraktumban $10\text{-}50\ \mu\text{gml}^{-1}$ L-aszkorbinsavat lehet meghatározni oly módon, hogy azt ismert koncentrációjú DCIP oldattal titráljuk.

2.2.2. A C-vitamin meghatározása fotometriás módszerekkel

A két klasszikus kolorimetriás módszer alapja a az L-aszkorbinsav színreakciója az előző pontban ismertetett 2,6-diklór-fenol-indofenollal, illetve a dinitro-fenilhidrazinnal.

A 2,6-diklór-fenol-indofenol reakció felhasználását a C-vitamin quantitativ meghatározására EVELYN et. al. 1938-ban írták le. Az L-aszkorbinsav tartalmat $520\ \text{nm}$ -en, fotométerrel határozták meg. Először megmérték az ismert koncentrációjú DCIP oldat színintenzitását, majd hozzáadták a C-vitaint tartalmazó mintát. A koncentráció a színintenzitás csökkenéséből számítható. A módszer előnye a titrálással kivitelezetthez képest, nagyobb érzékenysége ($2\text{-}10\ \mu\text{gml}^{-1}$ az extraktumban), a pontosabb végpontjelzés, valamint a zavaró anyagok biztonságosabb kiszűrése.

Az L-aszkorbinsav mérhető 2,4-dinitro-fenil-hidrazin (DNPH) segítségével is (ROE and KUETHER, 1943). A DNPH erősen savas közegben vörösbarna színreakciót ad a dehidro-L-aszkorbinsavval, illetve annak spontán bomlástermékével, a diketo-gulonsavval. A reakció terméke kémiaiilag stabil, abszorpciós maximuma 350-380 nm, illetve 500-550 nm között van. A méréshez először enyhe oxidációval át kell alakítani az L-aszkorbinsavat dehidro-L-aszkorbinsavvá. A reakcióhoz a szerzők noritot alkalmaztak. A meghatározást elsősorban az 5 és 6 atomos cukrok zavarhatják. Az extraktumban jelenlévő színes zavaró hatású anyagokat tiokarbamiddal színtelenítették. A szöveteket 6%-os triklór-ecetsavval extrahálták, oly módon, hogy a kivonat 1-10 $\mu\text{g l}^{-1}$ koncentrációjú legyen. A módszer továbbfejlesztése (ROE, 1954) lehetővé tette, hogy az L-aszkorbinsav (AS), a dehidro-L-aszkorbinsav (DHA), valamint az utóbbi spontán bomlásterméke a diketo-gulonsav (DKS) is mérhető legyen. A mintákat három részre osztotta a szerző, melyből az egyiket (A) H_2S -sel redukálta, a másodikat (B) nem kezelte, végül a harmadikat (C) brominnal oxidálta. A színreakció intenzitását 524 nm-en mérték. Az A adta a diketo-gulonsav, a B a DKS+DHA, a C pedig az összes C-vitamin koncentrációt. Mivel a módszerrel jól mérhető az állati szövetek C-vitamin tartalma is, ez volt az alapja a halászati kutatások során alkalmazott spektrofotometriás méréseknek is. Az alkalmazott redukciós és oxidációs reakciók azonban nem specifikusak a C-vitamin különböző természetes formáira nézve, ezért a későbbiek során sokszor találkozhatunk mérési pontatlanságból adódó tévedésekkel.

Két kolorimetriás módszert mutatnak be CARR et. al. 1983-ban az összes C-vitamin tartalom meghatározására. Az elsőben a deproteinizált vérmintákban az L-aszkorbinsavat 2,6-diklór-fenol-indofenollal oxidálták dehidro-L-aszkorbinsavvá, majd erős kénsavas közegben reagáltatták 2,4-dinitro-fenil-hidrazinnal. A színreakciót 3 órás inkubáció után 524 nm-en mérték. Megállapításuk szerint az interferáló komponensek miatt a mért értékek kb. 30 %-kal felülbecsültek. A második módszer az α,α' -bipiridil technika volt. A meghatározás azon alapszik, hogy az L-aszkorbinsav redukálja a Fe^{3+} -at Fe^{2+} -vé, ami színreakciót ad az α,α' -bipiridillel, és 525 nm-en mérhető. A szerzők szerint ezzel a módszerrel az összes C-vitamin tartalom jelentősen, kb. 253-463 %-kal felülbecsülhető, mivel ezzel a reagenssel a minta összes többi redukáló hatású komponense reagál.

A C-vitamin 2,4-dinitro-fenil-hidrazinnal történő meghatározását DABROWSKI és HINTERLEITNER (1989) fejlesztették tovább oly módon, hogy azzal mind az észterkötéssel kötött aszkorbát-2-szulfát, mind pedig az aszkorbát-2-foszfátok

meghatározhatók. A CARR et. al. (1983) által ismertetett interferáló komponenseket a háttér abszorbanancia meghatározásával küszöbölték ki. A C-vitamin szulfátot KBrO_3 -tal hidrolizálták. A módszert kisebb változtatásokkal alkalmaztuk méréseink során, ezért a „Vizsgálatok anyaga és módszere” című fejezet 3.10.6. pontjában részletesen ismertetjük.

2.2.3. A C-vitamin meghatározása kromatográfiás módszerekkel

Széles skáláját mutatják be a különböző szerzők a C-vitamin kromatográfiás meghatározásainak. A továbbiakban a leggyakrabban alkalmazott módszerek közül mutatunk be néhányat, amelyeket elsősorban állati szövetek, vagy humán vérplazma aszkorbát tartalmának meghatározására használtak.

2.2.3.1. Papír- és vékonyréteg, valamint oszlopkromatográfiás módszerek

Papír és vékonyréteg kromatográfiás módszerrel is mérték a patkány májából izolált aszkorbát-2-szulfátot MUMMA és VERLANGIERI (1972). Egy bonyolult eljárással kinyert aszkorbát-2-szulfát tartalmú extraktummal kloroform-víz-metanol-ecetsav 60:50:15:1 vagy 2 elegyében fejlesztették ki a vékonyréteg-kromatogramokat, illetve fenol-víz 100:40, vagy i-butanol-propionsav-víz 10:5:7 keverékében a papír-kromatogramokat. A szerintük specifikus reakciót adó 1 % FeCl_3 metanolos oldatával hívták elő az aszkorbát-2-szulfátot.

Úttörőnek tekintett munkájukban klasszikus oszlopkromatográfiával izolálták az aszkorbinsav szulfátot artémia petékből MEAD és FINAMORE (1969). Az artémia peték homogenizátumát vizes-sósavas oldattal extrahálták, majd hosszú és bonyolult eljárással tisztították. Az ily módon nyert oldatban az L-aszkorbinsavat (AS) az aszkorbát-szulfáttól (AMS) hangyasav és ammónium-formiát oldattal választották el alumíniumoxid oszlopon, gradiens elúcióval. Az AS-t 265, az AMS-t 254 nm-en mérték UV spektrofotométeren. Az aszkorbát-szulfátot savas hidrolízissel sztöchiometrikusan L-aszkorbinsavvá alakítva igazolták, hogy valóban C-vitamin származékot találtak. Infravörös spektroszkópiával megállapították az aszkorbát-szulfát kémiai szerkezetét, mely szerint a természetes formában a szulfát a 2-es szénatomon helyezkedik el.

2.2.3.2. A C-vitamin és formáinak meghatározása HPLC-vel

Összes C-vitamin tartalmat mértek vérmintákban SPEEK et. al. (1984). A teljes vérmintát triklór-ecetsavval (TCA) fehérjementesítették, majd aszkorbát-oxidáz enzimmal kezelték, így alakították az L-aszkorbinsavat dehidro-L-aszkorbinsavvá. Az oldatot ezután *o*-fenilén-diaminnal reagáltatták. A HPLC-s elválasztást fordított fázisú (C₁₈) ODS –Hypersil oszloppal, izokratikus körülmények között, 20 % metanolt tartalmazó kálium-dihidrogén-foszfát pufferrel végezték. Fluorimetriásan detektáltak, háttérkorrekciót nem alkalmaztak.

Különböző élelmiszerek és italok összes C-vitamin, valamint dehidro-L-aszkorbinsav tartalmát mérte KIM (1989). A minták előkészítése során a DHA-t ditiotreitollal (DTT) L-aszkorbinsavvá redukálták. Az elválasztást HPLC-vel végezték, anioncserélő oszlopon, majd elektrokémiai detektorral, amperometriásan, platina elektróddal mértek. A klinikai kémia is használja az elektrokémiai detekciót a vérplazma C-vitamin tartalmának meghatározására (UMEGAKI et. al., 1994). Ezekben a módszerekben az L-aszkorbinsavat erős redukálószerrel, ditiotreitollal (DTT) stabilizálják (MARGOLIS et. al., 1990).

Különböző haltápok L-aszkorbinsav és aszkorbát-2-szulfát tartalmát mérték ANTONIS et. al. (1993). Az elválasztáshoz C₁₈-as fordított fázisú oszlopot és EDTA-val stabilizált nátrium-acetát puffert alkalmaztak, amely ionpár reagenst (oktánszulfonsav) tartalmazott. Amperometriásan detektáltak, arany elektród alkalmazásával.

A C-vitamint és formáit azonban leggyakrabban fordított fázisú oszlopon, ionpár reakciót alkalmazva választják el és UV-ben detektálják. FELTON és HALVER (1987) az L-aszkorbinsav és az aszkorbát-2-szulfát elválasztására dolgozott ki HPLC módszert. Perklórsavval fehérjementesítették a halak különböző szöveteinek homogenizátumát, majd szilárd fázisú extrakciót követően (Sep-Pak C₁₈, Waters), fordított fázisú C₁₈-as oszlopon választották el a két C-vitamin formát. Az ionpár reagens *n*-oktilamin volt. 250 nm-en UV-ben detektáltak. A minták dehidro-L-aszkorbinsav tartalmát nem redukálták L-aszkorbinsavvá és háttérkorrekciót sem alkalmaztak, így a mért értékek lehetnek alul és felülbecsültek is. A módszer kisebb változtatásokkal az L-aszkorbinsav és az aszkorbát-2-foszfát elválasztására is alkalmazható, háttérkorrekciót azonban az extrakció technikája nem tesz lehetővé (GY. PAPP, 1992).

SCHÜEP et. al. (1989) pisztrángtáp aszkorbát-2-szulfát tartalmát mérték ODS-Hypersil oszlopon. Eluensként nátrium-acetát puffer – metanol keverékét alkalmazták. Az ionpár reagens 1,5-dimetil-hexamin volt. Az extraktumot nem fehérjementesítették. UV-ben detektálták, a kimutatási határ $2-4 \mu\text{gg}^{-1}$ volt.

HOFFMAN et. al. (1992) három (két C_{18} oszlop ionpár és egy NH-pak oszlop) HPLC módszert próbáltak ki és hasonlítottak össze munkájukban, a halak takarmányaiban leggyakrabban alkalmazott három C-vitamin forma (L-aszkorbinsav, fehérjementesítéshez triklór-ecetsavat vagy meta-foszforsavat alkalmaztak és mind a kettőt megfelelőnek találták. Fehérjementesítés nélkül nem érték el megfelelő elválasztást. Megállapították, hogy az L-aszkorbinsav és az aszkorbát-2-szulfát igen, de az aszkorbát-2-foszfát nem választható el NH oszlopon. Így a három C-vitamin formát javaslatuk szerint C_{18} oszlopon ionpár reagens alkalmazásával kell meghatározni. Ők sem alkalmaztak háttérkorrekciót egyik módszerben sem. A módszerek alsó méréshatára $2 \mu\text{gml}^{-1}$ L-aszkorbinsav és $10-10 \mu\text{gml}^{-1}$ aszkorbát-2-szulfát, illetve -foszfát.

MAUGLE (1993) haltápok extraktumából mérte az L-aszkorbinsav, az aszkorbát-2-szulfát és aszkorbát-2-foszfát tartalmát. Az L-aszkorbinsavat erős redukálószerrel, ditioneitrítollal (DTE) stabilizálta. Az eddig bemutatott módszerekhez képest új minta-előkészítést alkalmazott a C-vitamin foszfát meghatározására. A tápok extraktumát savas foszfataz enzimmal kezelte, így a polifoszfátokból is felszabadította az L-aszkorbinsavat. A C-vitamin foszfát aszkorbát tartalmát a reakció előtti és a reakció utáni kromatogramok különbségéből határozta meg. Eluensként $0,04 \text{ mol l}^{-1}$ nátrium-acetát puffert alkalmazott, tetrabutil-ammónium-dihidrogén-foszfát ionpár reagenssel. 250 nm-en UV-ben mért.

2.3. A C-vitamin szerepe a halak életében

2.3.1. A C-vitamin hiány, illetve túladagolás következtében kialakuló tünetek

Számos halfajra és egyéb tenyésztett vízi állatra leírták a skorbutot, amely nagyon hasonló az emberen tapasztalhatóhoz. Így többek között KITAMURA (1969) pisztráng, HALVER et. al. (1969) lazac és pisztráng, LOWELL (1973), WILSON és POE (1973), LIM és LOVELL (1978) a csatorna harcsa, DOIMI et. al. (1985) a tengeri sügér,

valamint CHÁVEZ DE MARTÍNEZ (1990) a *Cichlasoma urophthalmus* esetében írta le ezt a súlyos takarmányozási hiánybetegséget. Mint már korábban említettük, a kollagén szerkezetének megváltozása okozza a C-vitamin-hiány tüneteit. Szivárványos pisztráng esetében a makroszkopikusan is észlelhető tünetek jelentkezése előtt már kimutatható volt a hidroxiprolin arányának mintegy 10 %-os csökkenése a prolinhoz képest (SATO et. al., 1978).

TUCKER és HALVER (1986) szerint a C-vitamin hiány okozta makroszkopikus tünetek sok esetben viszonylag lassan, több hét, esetleg hónapok alatt alakulnak ki. Az étvágytalan, mozgásukban lelassult halaknak először csökken a növekedése. Ezt követően kezdetben apró, pontszerű bevérzések jelentkeznek a test különböző területein, amelyek később egészen nagy területekre is kiterjedhetnek, és mélyen az izomzatban is kialakulhatnak. A sebek gyógyulási ideje jelentősen lelassul. A kötőszövetek és a csontok kollagén-tartalmának csökkenése eredményezi a gerincvonal torzulásait, ami scoliosisban és lordosisban jelentkezik. Gyakran előfordul a kopolyúfedő megrövidülése, a bőr sötét elszíneződése, az úszók, különösen a farokúszó deformálódása is. Csökken a vér hemoglobin tartalma, a betegségekkel és egyéb környezeti stresszel szembeni ellenálló képesség.

A különböző szervekből, szövetekből vett mikroszkopikus metszeteken is számos rendellenességet tapasztalhatunk (MEIER és WAHLI, 1990). Skorbutban szenvedő pisztrágnál a kopolyúlemezek porcos része erősen duzzadt és deformálódott, a sejtekben nagyszámú vízzel telt sejtüreg található. A kopolyúlemezek vége erősen lapított és torzult. A gerincvonalon rendellenes fejlődés, diszlokáció, kompresszió és bevérzések látszanak. A vese szöveteiben sorvadás és a fehérjetartalmú sejtközi folyadék mennyiségének emelkedése tapasztalható. Az izomszövetekből készített metszeteken általában nagyszámú mikroszkopikus bevérzés található. A betegség végül a halak elhullásához vezet, ehhez azonban többnyire hónapok kellenek. Egy-két hónapnál rövidebb ideig tartó kísérletek során például nem alakult ki skorbut európai harcsánál, bár a C-vitaminnal táplált halak különböző szerveiben és szöveteiben az összes aszkorbát tartalom megnőtt (GY. PAPP et. al., 1994b és 1995a).

Bár a C-vitaminról sokáig azt feltételezték, hogy feleslegben adagolt része a vizelettel távozik, ma már bizonyított, hogy hosszú ideig tartó túladagolása károsodásokhoz vezethet. Ennek legismertebb formája az L-aszkorbinsav lebomlási termékeként keletkező oxalátból származó vesekő (MOSER, 1990).

2.3.2. A legfontosabb C-vitamin formák stabilitása takarmányokban

Mivel a természetes C-vitamin, az L-aszkorbinsav csak por alakban stabil vegyület, hőre, fényre és vízre rendkívül érzékeny (HILTON et. al., 1977; TUCKER és HALVER, 1986). A szokásos takarmány-előállítás során a gőz, a magas hőmérséklet és a nyomás hatására gyakorlatilag 100 %-ban lebomlik a tápokban. Hasonló eredményre jutottunk saját, korábban végzett kísérleteink során, amikor a HAKI tápüzeme által gyártott harcsatápot vizsgáltuk. A gyártás során hozzáadott 100 mgkg^{-1} L-aszkorbinsavat nem tudtuk kimutatni HPLC-vel, ami azt jelenti, hogy a táp AS tartalma $<5 \text{ } \mu\text{gkg}^{-1}$ (GY. PAPP et. al., 1994a). SANDNES és UTNE (1982) különböző formájú (por, roppantott és pellet) takarmányokban vizsgálta az L-aszkorbinsav stabilitását. Ezek a takarmányok kémleletes eljárással készültek, de így is lényegesen alacsonyabb C-vitamin koncentrációt sikerült bennük kimutatni a hozzáadottnál. A legkevesebb veszteséget a laboratóriumi körülmények között, hideg pelletálással előállított táp mutatta (23 %). A gyártás során valamilyen hőkezelésnek kitett takarmányokban a hozzáadott L-aszkorbinsav 44-61 %-a bomlott. Vizsgálták a szerzők a tárolási veszteségeket is. Eredményeik szerint 20 °C-on 16 hét alatt a teljes C-vitamin tartalom, 4 °C-on pedig átlagosan annak 40 %-a bomlott le. Vízbe kerülve a tápok 10 mp alatt elveszítették L-aszkorbinsav tartalmuk 10 %-át (SAROGLIA et. al., 1990). Amíg -20 °C-on 8 hét alatt 10 %-nál kevesebb a takarmányokban mért C-vitamin veszteség, addig 4, 15 és 25 °C-on méréseik szerint 30, 75 és 93 % AS bomlott le ugyanannyi idő alatt. Vízbe kerülve az AS gyorsan lebomlott, tengervízben pl. az L-aszkorbinsav tartalom 19-39 %-a 60 mp alatt oxidálódott.

Már a hetvenes évektől igyekeztek a takarmányokban kötött C-vitamint alkalmazni (O'KEEFE, 2001). Az egyik lehetőség az L-aszkorbinsav kapszulázása. Próbálkoztak etil-cellulózhoz kötött L-aszkorbinsavval is, de a gyártás során a hőkezelés hatására ennek gyakorlatilag 74-100%-a lebomlott (HILTON et. al., 1977; WAAGBO et. al., 1991). Valamivel több sikerrel járt a vitamin zsírokhoz, viaszokhoz kötése, de az extrudált tápok gyártása során ez is sokat veszített aktivitásából (O'KEEFE, 2001).

Lényegesen nagyobb stabilitást mutatott az L-aszkorbinsav szulfát észtere, az aszkorbát-2-monoszulfát, de amint azt a következők során részletesen bemutatjuk, ennek sok esetben nincs, vagy alacsony a vitaminaktivitása (MURAI et. al., 1978).

SEIB és LIAO 1987-ben eljárást fejlesztett ki (O'KEEFE, 2001) az L-aszkorbinsav mono-, di és trifoszfórilált észtereinek előállítására. Mind az aszkorbát-2-monofoszfát,

mind pedig az aszkorbát-2-polifoszfát stabil a gyártási folyamat során, és C-vitamin aktivitása az L-aszkorbinsavval egyenértékű több halfaj számára.

Az etil-cellulózhoz kötött L-aszkorbinsav stabilitását hasonlították össze ROBINSON et. al. (1989). Méréseik azt mutatják, hogy azonos eljárással előállított takarmányokban a hozzáadott etil-cellulózhoz kötött C-vitamin 39 %-a, az aszkorbát-2-polifoszfát pedig 83 %-a volt visszamérhető a takarmányban. Az egy hónapig tartó tárolás során az L-aszkorbinsav 78 %-a lebomlott, az aszkorbát-2-polifoszfát viszont 100 %-ban megmaradt a takarmányban. Ehhez hasonló eredményre jutott GADIANT és FENSTER (1994) is. Ők arról számolnak be, hogy amíg az aszkorbát-2-polifoszfát 10 %-os veszteséget mutatott, addig az etil-cellulózhoz kötött L-aszkorbinsav 49-78 %-a bomlott le.

2.3.3. A legfontosabb C-vitamin formák bioaktivitása és hatása

DABROWSKI et. al. (1994) szerint a szulfát, foszfát és glükóz származékokat alkalmazzák leggyakrabban a halak takarmányozásában. Biológiai aktivitásuk azonban nemcsak különböző lehet az egyes halfajoknál, hanem kérdéses is. Ellentmondásokkal teli vita alakult ki az állatok takarmányozása során gyakran használt, iparilag viszonylag könnyen előállítható két stabil C-vitamin forma, az aszkorbát-2-monoszulfát, valamint az aszkorbát-2-mono- és polifoszfát vitamin aktivitását illetően.

A stabil aszkorbát származékok alkalmazása, mint antiskorbotikus faktor, már akkor felmerült, amikor aszkorbát-2-szulfátot találtak nagy mennyiségben a vízi állatok közül a garnélarák szöveteiben (MEAD és FINAMORE, 1969), illetve a szárazföldi állatok közül a patkány májában (MUMMA és VERLANGIERI, 1972). Ezeket a felfedezéseket követően HALVER et. al. 1975-ben először lazacfélékre javasolták a C-vitamin szulfátot, mint antiskorbutikus hatású takarmány-kiegészítőt, és C₂ vitaminnak nevezték el. MURAI et. al. (1978) vizsgálataik során azonban kimutatták, hogy a csatorna harcsa maximális növekedéséhez és takarmányhasznosításához a természetes C-vitaminnal összehasonlítva négyszer annyi aszkorbát-2-szulfátra van szükség, de ily módon a halak számára elegendő mértékű antiskorbutikus hatást lehet elérni. Szerintük ennek oka a limitált szulfatáz enzim aktivitásban keresendő.

TUCKER és HALVER (1984a) szerint azonban a melegvízi mindenevő halak szulfatáz enzime nem aktiválódik, amikor elegendő L-aszkorbinsav áll rendelkezésükre. Kísérleteikben ¹⁴C izotóppal jelölt L-aszkorbinsavval egészítették ki a szivárványos

pisztráng takarmányát. Spektrofotometrikus (DNPH módszerrel) és HPLC-vel is mérték mind a kiválasztott, mind pedig a különböző szövetekben raktározott L-aszkorbinsav és az L-aszkorbát-2-szulfát koncentrációt. Eredményeik arra utaltak, hogy a szivárványos pisztráng elsősorban szulfát formában tárolja szöveiben a C-vitamint, majd a szükségletnek megfelelően szulfát-transzferáz enzim segítségével alakítja át L-aszkorbinsavvá. Ennek alapján javasolták az aszkorbát-2-szulfát nátrium sójának használatát esetleges stabil vitaminforrásként. Szcintillációs számlálóval mérték a szervek és a kiválasztási termékek ^{14}C tartalmát. Meghatározták a C-vitamin felezési idejét is a szivárványos pisztráng (*Salmo gairdneri*) esetében, amely 42 napnak adódott.

FELTON és HALVER 1987-ben lazac és pisztráng, valamint HOFFMANN et. al. 1992-ben garnélarák szöveinek extraktumában mutattak ki aszkorbát-2-szulfátot, de az alkalmazott HPLC módszerrel, háttérkorrekció hiányában, valószínűleg felülbecsülték az értékeket. ALEXIS et. al. 1989-ben a tengeri sügér (*Dicentrarchus labrax*) minden vizsgált szervében magas C-vitamin szulfát koncentrációt mértek ROE (1954) DNPH módszerével, ami nem specifikus az aszkorbát-2-szulfátra vonatkozóan, ezért valószínűleg felülbecsülték az értékeket. SATO et. al. 1991-ben a szivárványos pisztráng ivadékok esetében mutatták ki az aszkorbát-2-szulfát antiskorbutikus hatását. Kísérletüket kilenc hétig végezték, amíg a C-vitamin-mentes, kontroll csoport halain már megfigyelhetők voltak a skorbut makroszkópikus tünetei. HALVER et. al. (1993) hét hónapig etetett 70 g kezdeti átlagtömegű pisztrángot 100 mg kg^{-1} aszkorbáttal egyenértékű L-aszkorbinsav, illetve aszkorbát-2-szulfát tartalmú tápokkal, és nem talált különbséget növekedésükben.

A fentiekkel szemben állnak DABROWSKI és HINTERLEITNER (1989) eredményei, akik az általuk módosított spektrofotometriás DNPH módszerrel mérték a különböző C-vitamin formák, köztük az aszkorbát-2-szulfát koncentrációját különböző gerinces és gerinctelen vízi állatokban. Méréseik során a gerincesek közül vizsgálták a bodorka (*Rutilus rutilus*) és a pisztráng (*Salmo gairdneri*), valamint a gerinctelenek közül a tubifex (*Tubifex tubifex*), egy édesvízi garnélarák (*Palamomonetes antennarius*) szöveiben és artémia petékben (*Artemia salina* cyst) található C-vitamin formákat. Eredményeik alapján az artémia pete egyedülállóan magas aszkorbát-2-monoszulfát koncentrációt mutatott, míg a vizsgált halakban és a tubifexben nem tudták még nyomokban sem kimutatni a vegyületet. WANG és SEIB 1990-ben nyomokban talált C-vitamin szulfátot a csatorna harcsa (*Ictalurus punctatus*) különböző szöveiben. Ők az

aszorbát-észtereket dehidratálást és metanolízist követően mérték. A mért aszorbát-2-szulfát azonban valószínűleg a takarmányból kerülhetett az állatok szervezetébe. Az L-aszorbinsavval összehasonlítva hatszor gyengébb C-vitamin aktivitást mutattak ki növendék szivárványos pisztrángnál szulfát esetében (DABROWSKI, 1990a).

DABROWSKI és KÖCK 1989-ben természetből gyűjtött, egyéves szivárványos pisztrángok emésztőrendszerében hasonlították össze az L-aszorbinsav (AS) és az aszorbát-2-szulfát (AMS) hasznosulását. Három csoportban (C-vitamin-mentes kontroll, 500 mgkg⁻¹ AS, valamint 1.084 mgkg⁻¹ AS) etették a halakat 28 napig. Különbözően vizsgálták a gyomor, a pilorusz, a középbel, az utóbél és a végbél, valamint a bélsár C-vitamin formáinak koncentrációját. Eredményeik azt mutatják, hogy amíg az L-aszorbinsavval etetett halak minden bélszakaszában megtalálható volt az AS, addig az aszorbát-2-szulfáttal táplált halaknak csak a gyomrából sikerült kimutatni az AMS-t. A bélsár ezzel szemben jelentős mennyiségű AMS-t tartalmazott ebben a csoportban. A C-vitamin mentesen táplált kontroll halak emésztőrendszerének egyetlen szakaszában sem sikerült kimutatni semmilyen aszorbát formát. Véleményük szerint lehetséges, hogy egészen csekély C-vitamint felvesz a szivárványos pisztráng az aszorbát-2-szulfátból a gyomrán keresztül, de ez semmiképpen nem elégíti ki a halfaj szükségleteit.

A szivárványos pisztránggal végzett 28 napos kísérlet értékelését az eritrociták, a máj, a vese, a bél, a lép és az agy vizsgálatával folytatták (DABROWSKI, 1990b). Aszorbát-2-szulfátot csak az AMS-sel táplált csoport halainak veséjében, májában, belében és lépében tudtak kimutatni. Ugyanezen csoport szerveiben a kísérlet végére lényegesen alacsonyabb volt az összes vizsgált szerv L-aszorbinsav tartalma, mint a természetes C-vitaminnal etetett halaké, oly mértékben, hogy az agy, a lép és a máj AS tartalma nem különbözött szignifikánsan az aszorbát mentes táppal etetett kontroll csoporttól. Eredményeik alapján a szerzők arra következtettek, hogy az aszorbát-2-szulfát nem megfelelő C-vitamin forrás a szivárványos pisztráng számára.

Tizenkét hétig tartó, 20 g átlagtömegű halakkal végzett kísérletük során SANDNES et. al. 1990-ben az L-aszorbinsavval összehasonlítva szintén lényegesen alacsonyabb C-vitamin aktivitást mutattak ki az aszorbát-2-szulfátra az atlanti lazac (*Salmo salar*) esetében. Kísérletükben 500 mgkg⁻¹, valamint egészen magas, 5.000 mgkg⁻¹ L-aszorbinsavat, továbbá aszorbát-2-szulfátot alkalmaztak. A kísérleti idő alatt a csoportok nem mutattak szignifikáns különbséget növekedésükben. A halak májában azonban lényegesen magasabb, mintegy háromszoros volt az L-aszorbinsavval etetett

csoportok AS koncentrációja, mint az aszkorbát-2-szulfáttal tápláltaké. CHO és COWEY (1993) szerint a 15 ppm aszkorbát-2-szulfát koncentrációjú táppal etetett halak a C-vitamin mentes kontroll takarmánnyal tápláltakkal egyenlő mértékű mortalitást (79 %) mutattak. SHIAU és HSU (1994) egy garnélarák faj (*Penaeus monodon*) vizsgálatakor az AMS C-vitamin aktivitását 25 %-osnak találta az L-aszkorbinsavval összehasonlítva.

PILLAI et. al. (1990), valamint FUKUDA et. al. (1991) patkány vese és máj szöveteinek extraktumában *in vivo* körülmények között nem tudták igazolni az aszkorbát-2-szulfát szintézisét. Kísérletük értékelése során azonban leírták, hogy a C-vitamin szulfát meghatározására szolgáló HPLC módszer pontossága megengedi, hogy nyomokban kimutatható mennyiségű AMS keletkezhetett a kísérlet során. MIYASAKI et. al. 1991-ben kimutatták, hogy a szivárványos pisztráng májában és szöveteiben található aszkorbát-2-szulfát szintetáz enzim. A mért K_m értéke (65 mgml^{-1}) alapján azonban az ily módon keletkező C-vitamin szulfát mennyisége elhanyagolható.

EL NAGGAR és LOVELL (1991) eredményei azt mutatják, hogy csatorna harcsa ivadékok esetében az aszkorbát-2-szulfátnak van némi, az L-aszkorbinsavval összehasonlítva mintegy 5,2 %-os C-vitamin aktivitása. Tapasztalataik szerint azonban még a legmagasabb, 132 mgkg^{-1} L-aszkorbinsavval egyenértékű aszkorbát-2-szulfáttal etetett halak is kifejezetten mutatták a skorbut makroszkópikus és mikroszkópikus tüneteit is, holott 11 mgkg^{-1} természetes C-vitamin már elegendő volt a betegség kialakulásának megelőzéséhez.

Az aszkorbát-2-mono- és polifoszfát biológiai aktivitását több állatfajra is igazolták, így pl. MACHLIN et. al. (1979) a rhesus majom, SHIGUENO és ITOH (1988) a garnélarák, valamint LIAO és SEIB (1990) a tengerimalac esetében.

A C-vitamin foszfátésztereinek antiskorbutikus hatását a csatorna harcsára 11 hétig tartó összehasonlító kísérletükben mutatták ki WILSON et. al. 1989-ben. A különböző C-vitamin formákat (etil-cellulózra kötött L-aszkorbinsav, aszkorbát-2-monoszulfát, aszkorbát-2-monofoszfát és C-vitamin-mentes kontroll) tartalmazó tápok 100 mgkg L-aszkorbinsavval egyenértékű vitamint tartalmaztak. A 91-95 g kezdeti tömegű halak a kísérlet végére már mutatták a skorbut jeleit. Növekedésük visszamaradt, jelentkezett a gerinc és a kopolytű torzulása is. A különböző C-vitamin formákkal etetett halak nem betegedtek meg, de az aszkorbát-2-monofoszfáttal táplált halak növekedése szignifikánsan magasabb volt az összes többinél.

A természetes C-vitaminnal azonos vitaminhatást mutattak ki az L-aszkorbát-2-monofoszfátra vonatkozóan 13 g átlagtömegű csatorna harcsákkal végzett kísérletükben EL NAGGAR és LOVELL (1991). A halakat 14 hétig etették aszkorbátra nézve ekvivalens vitamintartalmú tápokkal, és a csoportok között nem találtak szignifikáns különbséget sem a növekedésben, sem a csont kollagén tartalmában. Hasonló eredményre jutottak Na- és Mg-aszkorbil-2-monofoszfát alkalmazásával 1,5 g átlagtömegű csatorna harcsák esetében MUSTIN és LOVELL (1992). A 12 hétig tartó kísérlet során a C-vitamin mentes táppal etetett kontroll halak növekedésükben visszamaradtak és mutatták a skorbut jellegzetes tüneteit, valamint a csontok kollagén tartalma is alacsonyabb volt, mint az aszkorbát-2-foszfát sókkal etetett halaké. SANDNES et. al. (1992) különböző szintű L-aszkorbinsavval és aszkorbát-2-foszfáttal kiegészített tápokkal etettek atlanti lazac lárvákat. Vizsgálták a halak növekedését, mortalitását, a gerinc és bőr hidroxiprolin tartalmát, valamint a máj C-vitamin koncentrációját. Szignifikáns különbségeket nem találtak, a két vitaminforma biológiai aktivitását egyformának ítélték. ALEXIS et. al. (1999) a tengeri sügér (*Dicentrarchus labrax*) és a tengeri keszeg (*Sparus aurata*) esetében találták megfelelő C-vitamin forrásnak a különböző aszkorbát-2-foszfátokat.

DABROWSKI et. al. (1994) szerint a halak teljes emésztőrendszerében, valamint a májban és a vesében is megtalálhatók azok a savas foszfátáz enzimek, amelyek rövid idő alatt képesek hidrolizálni a C-vitamin foszfát észtereit és ez a reakció nem specifikus aszkorbát-2-foszfátokra. Mivel az aszkorbát-2-foszfátok lényegesen stabilabb vegyületek, mint a természetes C-vitamin, kiváló vitaminforrást jelenthetnek a tenyésztett halak számára. Ezt a feltevést az is igazolja, hogy a különböző kutatók által, többféle halfajon végzett kísérletekben egyetlen esetben sem találtak a skorbut jeleivel, a halak kondíciója, étvágya, úszásaktivitása, stressz válaszai soha nem különböztek a természetes C-vitaminnal etetett állatokétól.

A stabil C-vitamin formák emészthetőségéről egy-egy halfaj számára „*in vitro*” hidrolízisének vizsgálatával is képet szerezhethünk. Rendkívül alacsony aszkorbát-szulfát szulfhidroláz enzim aktivitást mutatott ki pl. DABROWSKI et. al. (1990b) a szivárványos pisztráng májában és bélcsatornájában. A különböző szövetek (máj, bélcsatorna) nedvei az aszkorbát-2-mono- és polifoszfátot ezzel szemben „*in vitro*” teljes egészében L-aszkorbinsavvá hidrolizálták.

SOLIMAN et. al. (1986) növendék tilápiákra nézve vizsgálták a C-vitamin szulfát és palmitát biológiai aktivitását és azt mind a két esetben elegendőnek találták a skorbut megelőzéséhez, továbbá a halak megfelelő fejlődéséhez.

MUTO et. al. (1992) az aszkorbát-2-glükózid (AG) C-vitamin aktivitását igazolták. A bélcsatornában jelenlévő α -glukozidáz enzimmal hidrolizálták az AG-t és kimutatták a keletkezett L-aszkorbinsavat. Véleményük szerint az ily módon kémiai kötéséből felszabaduló vegyület bekerül a szervezetbe, és ott kifejti vitamin hatását.

Több szerző foglalkozik a C-vitaminnak az egyes halfajok lárváira, zsenge ivadékaira gyakorolt hatásával is.

DABROWSKI (1990c) vizsgálta a frissen kelt fehér maréna (*Coregonus lavaretus* L.) lárvák C-vitamin státuszát a szikzacskó felszívódása során. A teljes test aszkorbát tartalmának folyamatos, de lassú csökkenése szerint arra utal, hogy ebben az időszakban nincs nagy C-vitamin igénye a halaknak. A lárvákat 4 napos koruktól etette különböző, 10-1.700 mgkg⁻¹ aszkorbát tartalmú takarmányokkal, és élő táplálékként artemiával. Megfigyelései szerint a mesterséges takarmányon nevelt halak növekedése az első hetekben lényegesen elmarad az artemián neveltektől, függetlenül a C-vitamin tartalomtól. A teljes test aszkorbát tartalma csökkent az AS tartalmú tápokon nevelt halaknál is. A szerzők ezt azzal magyarázzák, hogy az első 10 nap során a lárvák nem hasznosítják a kívülről bevitt L-aszkorbinsavat.

ALBREKTSEN et. al. (1988) az aszkorbil-palmitát biológiai aktivitását hasonlították össze az L-aszkorbinsavval. Kísérletükhöz már éppen úszni tudó pisztráng lárvákat használtak. A 12 hétig tartó kísérlet eredményei szerint az aszkorbil-palmitát rendelkezik ugyan C-vitamin aktivitással, de ez alacsonyabb, mint az L-aszkorbinsavé. A halak átlagtömege a 12. hét végén a következő sorrend szerint mutatott szignifikáns különbséget: $m_{AS} > m_{AP} > m_K$, ahol m_{AS} az L-aszkorbinsavval; m_{AP} az aszkorbil-palmitáttal kiegészített és az m_K a aszkorbát mentes táppal etetett csoport átlagtömegét jelenti. Hasonló volt a trend a teljes test és a máj összes C-vitamin tartalmára vonatkozóan is.

KONTARA et. al. (1995) garnélarák lárvákat (*Penaeus vannamei*) etettek különböző L-aszkorbát-2-polifoszfát koncentrációjú tápokkal. A 40 napig tartó kísérlet során nem tapasztaltak különbséget még a C-vitamin, és a 2.000 mgkg⁻¹ aszkorbátot tartalmazó takarmányon nevelt rákok növekedésében sem. Jelentős különbség volt viszont a mortalitásban. A megmaradási % a következő módon alakult: 0 APF~27,5%; 10, 20, 100 mgkg⁻¹ APF 34-38% és 2.000 mgkg⁻¹ APF 96%.

MERCHIE et. al. (1995) tengeri sügér és afrikai harcsa lárvák első élő táplálékait, a rotiferát és az artemiát sikerrel dúsították aszkorbát-palmitáttal (APT). Feltételezésük szerint ezek a táplálékul szolgáló szervezetek hagyományos tenyésztéstechnológia alkalmazása esetében nem tartalmaznak elegendő C-vitamint, ezért 0, 10 és 20 % APT-t tartalmazó telítetlen zsírsav emulziót etettek az élő tápláléknak szánt rotiferával és artémiával. Mind a két esetben jelentősen emelkedett a táplálékszervezetek L-aszkorbinsav tartalma. Az etetési kísérletek szerint a 20 % aszkorbát-palmitáttal kiegészített élő táplálékkal etetett afrikai harcsa lárvák átlagtömege kb. 15 %-kal magasabb volt a 21 napos kísérlet végén. MERCHIE et. al. (1996) vizsgálták az aszkorbát-2-polifoszfát és az aszkorbát-palmitát hatását a nagy rombusz hal (*Scophthalmus maximus*) és a tengeri sügér (*Dicentrarchus labrax*) zsenge ivadékaire. Mind a két halfaj esetében magasabb volt a szövetek C-vitamin tartalma az aszkorbát-2-foszfáttal kiegészített tápon nevelt halak esetében, de az aszkorbát-palmitát is elegendő vitamin aktivitást mutatott. Csak az aszkorbát mentes tápon nevelt halak mutattak visszamaradt növekedést, illetve a skorbut tünetei is ennél a csoportnál jelentkeztek.

2.3.4. A különböző halfajok C-vitamin igénye

A természetes L-aszkorbinsavval és annak különböző stabil, iparilag előállított formáival végzett kísérletek során számos halfajra és különböző korosztályok esetében is mérték a halak C-vitamin igényét (DABROWSKI et. al., 1994). A halak C-vitamin szükségletének meghatározásához azonban nem elegendő a megfelelő növekedéshez és a skorbut megelőzéséhez szükséges aszkorbát szintet (minimális C-vitamin igény) ismerni. Néhány más szempontot is figyelembe véve lehet a takarmányok optimális C-vitamin tartalmát meghatározni. Ezek közül legfontosabbak a csont kollagén tartalma, a szövetek (különösen a máj, a vese és az agy) aszkorbát koncentrációja, és az ellenálló képesség a fertőzések és különböző környezeti stresszekkel szemben.

A 2. táblázatban bemutatott minimális és optimális aszkorbát koncentrációk jól érzékeltetik, hogy az egyes halfajok és egyéb tenyésztett vízi élőlények C-vitamin igénye a fajon kívül a korosztályoktól és az alkalmazott vitamin-forma bioaktivitásától

és stabilitásától is függ. Összefüggés van a halfajok életmódja és a számukra optimális vízhőmérséklet között is. A hideg vizet kedvelő szivárványos pisztráng C-vitamin igénye például minden korosztályban lényegesen magasabb a csatorna harcsáénál.

FRACALOSSI et. al. (1998) az *Astronotus ocellatus* esetében, a skorbut tüneteinek megfigyelésén túl, figyelembe vették a szöveti aszkorbát koncentrációt és a csontok kollagén tartalmát is a halfaj minimális C-vitamin igényének meghatározásakor, amely szerintük 25 mgkg⁻¹ AS.

2. táblázat: Különböző halfajok és más vízi állatok C-vitamin igénye (mgkg⁻¹)

Halfaj	L-askorbinsav (mgkg ⁻¹) min. opt.	C-vit. foszfát (mgkg ⁻¹) min. opt.	C-vit. szulfát (mgkg ⁻¹) min. opt.	Egyéb C-vit forma (mgkg ⁻¹)	Szerző
Angyal cápa (<i>Pterophylum scalare</i>)	120 360				Bloom et. al., 2000
Atlanti lazac (<i>Salmo salar</i>)	10	1	Ø	-	Sandnes és Waagboe, 1991
Atlanti lazac 3 g	<50 100				Lall et. al., 1989
Astronotus ocellatus	25				Fracalossi et. al., 1998
<i>Cichlasoma urophthalmus</i>	110				Chávez de Martinez, 1990
Csatorna harcsa (1,5 g) (<i>Ictalurus punctatus</i>)	100	100	-	-	Mustin és Lovell, 1992
Csatorna harcsa (13 g)	9,1	8,8	169	-	El Naggar és Lovell, 1991
Csatorna harcsa (91-95 g)	-	100	100	etilc. kötött 100	Wilson et al., 1989
Csatorna harcsa (96 g átlag tömeg)	-	75,6		etilc. kötött 320	Robinson et al, 1989
Garnélarák (<i>P. japonicus</i> , 1,36 g)	215-430	215-430			Shigueno és Itoh, 1988
Garnélarák 183-254 mg)		100-200			Catacutan és Lavilla-Pitogo, 1994
Garnélarák 183-254 mg)	≈2000	40	160	-	Shiau és Hsu, 1994
Szivárványos pisztráng Lazac (<i>Soho salmon</i>) Csatorna harcsa Ponty (<i>Ciprinus carpio</i>) Garnélarák	100 200 50 50 100				Tucker és Halver, 1986
Szivárványos pisztráng (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) (0,65 g)	2000	-	2000	-	Sato et al., 1991
Szivárványos pisztráng (4-5 g)	360	360 (polifoszfát)			Matusiewicz et al., 1995
Szivárványos pisztráng (lárva)	260	-	részleges C- vitamin aktivitás 500mg/kg		Dabrowski et al., 1990a
Tengeri sügér (<i>Dicentrarchus labrax</i> L.) (3,3 g és 11,3 g)	200	-	-	-	Saroglia és Scarano, 1992
Tilapia (1 g) (<i>Oreochromis niloticus</i>)	40 79				Shiau and Jan, 1991
Tilapia (1 g)	125		>125	aszkpalmítát 125 mg/kg	Soliman et al., 1986

HWANG ÉS LIN (2002) szerint például az optimális 25 °C-hoz képest 10 °C-kal magasabb hőmérsékleten nevelt ponty C-vitamin igénye megnő. Bár nem mérték a tényleges C-vitamin igényt, következtetésüket az aszkorbát felhasználást igénylő néhány paraméter változása alapján vonták le. Magasabb hőmérsékleten pl. szignifikánsan csökkent a csont és a bőr kollagén tartalma, valamint a hidroxiprolin-prolin arány is, pedig magas, 2.000 mgkg⁻¹ L-aszkorbinsav tartalmú takarmánnyal nevelték a halakat.

2.4. A C-vitamin hatása halakra különböző stresszhelyzetekben

Környezetüktől, tartás-technológiájuktól függően különböző stresszhatások érhetik a halakat tenyésztésük során. Így a befolyó víz hozhat magával különböző mérgező anyagokat, de a nem megfelelő takarmányozás, vagy a halak tartására szolgáló medencék tisztántartási hiányosságai is okozhatnak pl. ammónia, nitrit, nitrát stb. szennyeződéseket, vagy oxigénhiányos állapotot. Stresszhelyzetet teremthetnek a technológia szükségszerű lépései (lehalászás, átrakás, szállítás, stb.), de pl. a túlnépesítés, vagy a nem megfelelő hőmérséklet. További veszélyt jelenthetnek a halakra a különböző fertőzések, illetve az ezek ellen alkalmazott gyógy- vagy fertőtlenítőszeres is. Ezek a hatások érhetik hosszabb ideig (krónikus stressz), vagy rövidebb ideig is a halakat (akut stressz).

Az, hogy a C-vitamin bizonyos mérgezési tünetek enyhítésében szerepet játszik, már a XX. század közepétől ismert volt. BANCROFT et. al. (1940) például leírták, hogy a nitrit mérgezés során kialakuló methemoglobinémia gyorsabban szivódik fel a C-vitamin segítségével. WISE et. al. (1988) szerint azok a csatorna harcsák mutattak alacsonyabb plazma methemoglobin tartalmat, amelyek legalább egy héttel a nitrit szennyezést megelőzően magas L-aszkorbinsav szintű táppal etettek. Nem tapasztaltak védő hatást azoknál a halaknál, amelyek 65 órával a teszt előtt már nem kaptak C-vitamint. A methemoglobinémia elleni védekező képességet a máj aszkorbát tartalmával hozzák összefüggésbe SCARANO et. al. (1991). Tengeri sügérrel végzett kísérleteik során azt tapasztalták, hogy a máj alacsony aszkorbát koncentrációja magasabb plazma methemoglobin szintet eredményezett (3. táblázat), amely a nitrit szennyezés mértékével összefüggően emelkedik. A szerzők úgy látják, hogy a halfaj számára minimális C-vitamin kiegészítés a takarmányban nem elegendő a methemoglobinémia elleni védekezéshez.

A minimális C-vitamin igénynek megfelelő aszkorbát koncentrációjú takarmány elegendő volt a csatorna harcsa számára rövid ideig tartó (24 h) ammónia mérgezés részbeni ellensúlyozására (MAZIK et. al., 1987). Nem találtak összefüggést azonban a takarmány aszkorbát koncentrációja és az LC₅₀ érték között. A C-vitamin mentes táppal etetett csoportok LC₅₀ értéke átlagosan 30 mg l⁻¹ NH₃-N körül, a 78,390 mg kg⁻¹ AS koncentrációjú takarmánnyal etetett csoportoké 42-45 mg l⁻¹ NH₃-N volt.

3. táblázat: A C-vitamin hatása tengeri sügér (*Dicentrarchus labrax* L.) methemoglobinémiájára

C-vitamin a tápban mg kg ⁻¹	Összes aszkorbát a májban μg g ⁻¹ ± S.D.	NO ₂ -N mg l ⁻¹	Methemoglobinémia 100 % MHb ± S.D.
400	131 ± 18.	50	41 ± 4
		100	59 ± 4
		150	74 ± 6
50	45 ± 10	50	68 ± 2
		100	84 ± 2
		150	93 ± 7

Forrás: SCARANO et. al. 1991

Ugyanezen szerzők nem találtak különbséget a túlnépesítést vagy szállítást modellező kísérletükben a C-vitamint tartalmazó, és az aszkorbát mentes táppal etetett csoportok mortalitásában. Vizsgálták a víz alacsony oxigéntartalma által okozott elhullást is. Az ammóniához hasonlóan, a két L-aszkorbinsav tartalmú takarmánnyal táplált csoport mortalitása alacsonyabb volt, mint a kontroll halaké, de szignifikáns különbség itt sem volt közöttük. ISHIBASHI et. al. (1992) 16 hétig tartó kísérletben 35 alkalommal csökkentették a víz oxigén koncentrációját a japán papagáj halnál (*Oplegnathus fasciatus*). Három különböző L-aszkorbinsav szintű (0, 75, 300 mg kg⁻¹ AS) takarmánnyal etették a halakat. Figyelték a növekedést, a mortalitást, majd az utolsó kezelést követő harmadik napon mintákat vettek élettani paraméterek és a különböző szövetek C-vitamin szintjének meghatározására. A rendszeresen ismétlődő, tehát krónikusnak tekinthető stressz hatására a C-vitaminnal etetett csoportoknál a mortalitás szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a kontroll halaknál. Az aszkorbát mentes táppal etetett csoport 12 héttel a kísérlet kezdete után teljesen elpusztult. A szöveti C-vitamin tartalom nem mutatott szignifikáns különbséget a kezelt és kezeletlen csoportok között a máj, a vese, az agy és a kopoltyú esetében. A stresszmentesen nevelt 75 mg kg⁻¹ L-aszkorbinsavval táplált halak plazma aszkorbát koncentrációja azonban szignifikánsan alacsonyabb volt a stresszel kezelt párhuzamos csoporténál.

SANDNES és WAAGBØ (1991) előzetesen négy hétig 0, illetve 500 mgkg⁻¹ aszkorbát-2-monofoszfáttal táplált atlanti lazacokról 3x5 percig leeresztették a vizet, majd ezt követően 72 órán keresztül összesen 10 alkalommal. Mintákat vettek élettani paraméterek, valamint a máj és a fejvese aszkorbát koncentrációjának meghatározásához. A hematokrit, a hemoglobin, a kortizol és a glükóz tartalom nem mutatott szignifikáns különbséget a stressz előtt és után mért értékekben. Hasonlóan alakult a máj aszkorbát koncentrációja is. A fejvese C-vitamin koncentrációja viszont megemelkedett a kontroll csoportnál, egy órával a stressz-kezelést követően. A szerzők szerint a halaknak négy hét után még volt tartalékuk - valószínűleg az izomban - és ezt mobilizálták.

Szivárványos pisztrángnál végeztek fertőzési kísérleteket a darakórt okozó parazitával (*Ichthyophthirius multifiliis*) WAHLI et. al. (1985 és 1986). A halakat 6-6 csoportban a fertőzést megelőzően 9 napig a C-vitamint megadózisban (5.000 mgkg⁻¹) tartalmazó, illetve aszkorbátmentes takarmánnyal etették. A tizedik napon két C-vitaminnal etetett és két L-aszkorbinsav mentesen táplált csoportot 8.800, további 2-2 csoportot pedig 11.600 kórokozóval fertőztek meg halanként. 2-2 csoportot kórokozóval kezeletlen kontrollként neveltek tovább. A 8.800 kórokozóval fertőzött halak mortalitása az 50 napig tartó kísérlet alatt a C-vitaminnal táplált csoportoknál 2 %, a magasabb dózis (11.600) esetében pedig 16 % volt. Ezzel szemben az aszkorbátmentes táppal etetett, hasonló módon fertőzött halak 52, illetve 100 %-a pusztult el. A kórokozóval nem kezelt kontroll halak gyakorlatilag 100 %-a életben maradt. Az életben maradt halakból nem lehetett kórokozót kimutatni egyik kezelés esetében sem. Míg a fertőzést túlélő halak a takarmány C-vitamin tartalmától függetlenül kimutatható immunitást szereztek a darakórral szemben, addig a kezeletlen kontroll halak nem mutattak ellenálló képességet.

A bemutatott irodalom alapján elmondható, hogy a kutatók a témakörön belül leggyakrabban az alábbi kérdésekkel foglalkoznak:

- C-vitamin meghatározás a halak szöveteiben és a takarmányban;
- Az egyes halfajok C-vitamin szükséglete;
- Az egyes iparilag előállítható C-vitamin formák alkalmazhatósága;
- A C-vitamin hatása a lárvák takarmányozása során;
- A C-vitamin hatása és felhasználása stresszhelyzetekben.

3. A VIZSGÁLATOK ANYAGA ÉS MÓDSZERE

3.1. A halfajok bemutatása

C-vitamin hiány a halaknál elsősorban az intenzív tartástechnológiák alkalmazása során jelentkezhet. Ezért kísérleteinkhez olyan halfajt, illetve hibridet választottunk, amelyek jól tenyészthetők iparszerű rendszerekben, továbbá jelentőségük van a hazai haltenyésztésben. További szempont volt, hogy legyen közöttük C-vitamin szintézisre képes, illetve azt előállítani képtelen halfaj vagy hibrid is. Munkánkban így az európai harcsával (*Silurus glanis* L.; 1. kép) és egy tok hibriddel (*Acipenser ruthenus* L. x *Acipenser baeri* Brandt; 2. kép) végzett kísérleteinket mutatjuk be.



1. kép: Európai harcsa (Silurus glanis L.)

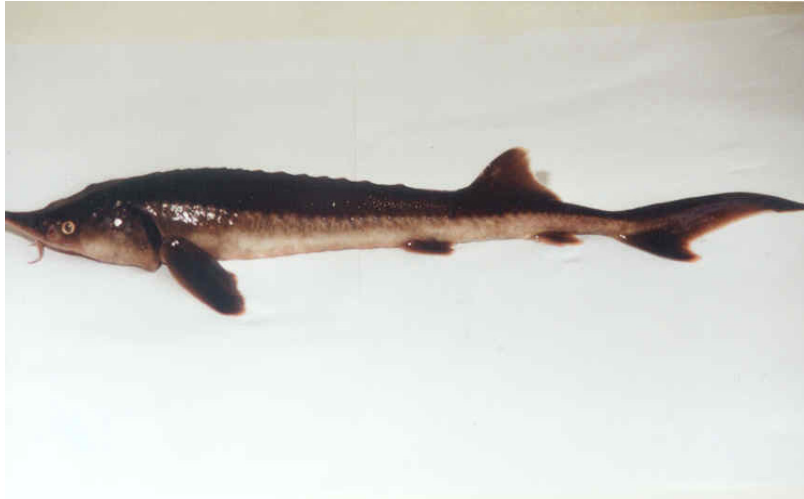
Választásunkat indokolja, hogy az európai harcsa hazánk legnagyobb testű, ragadozó hala, jól tenyészthető intenzív rendszerekben, mesterségesen szaporítható, néhány hetes korában könnyen szoktatható iparilag gyártott takarmányra. Rendszertani besorolása:

Siluriformes

Siluridae

Silurus

Silurus glanis Linné 1758



2. kép: Tok hibrid (*Acipenser ruthenus* L. x *Acipenser baeri* Brandt)

Az intézetünkben nemesített tok hibrid (*Acipenser ruthenus* L. x *Acipenser baeri* Brandt), amely a kecsege és a lénai tok keresztezésével jött létre, termelés-technológiai mutatóit tekintve gyakorlatilag egyenértékű a lénai tokkal, fiatal és idősebb korosztályai egyaránt eredményesen nevelhetők mesterséges takarmányok alkalmazásával (RÓNYAI et al., 1989). Régebbi kísérleteink alapján (GY. PAPP et. al., 1995a,b) már munkánk kezdetekor is valószínűsíthető volt, hogy képes C-vitamint szintetizálni.

Azokban a kísérletekben, amelyeket Olaszországban végeztünk, más, az olasz haltenyésztésben gyakran előforduló halfajok is szerepelnek. Így tanulmányoztuk az édesvízi halfajok közül az angolnát (*Anguilla anguilla* L.) és a szivárványos pisztrángot (*Oncorhynchus mykiss*), a brack-, illetve tengervízben tenyésztethetők közül pedig a tengeri sügért (*Dicentrarchus labrax* L.).

3.2. Kísérleti helyszínek, módszerek és mintavételek bemutatása

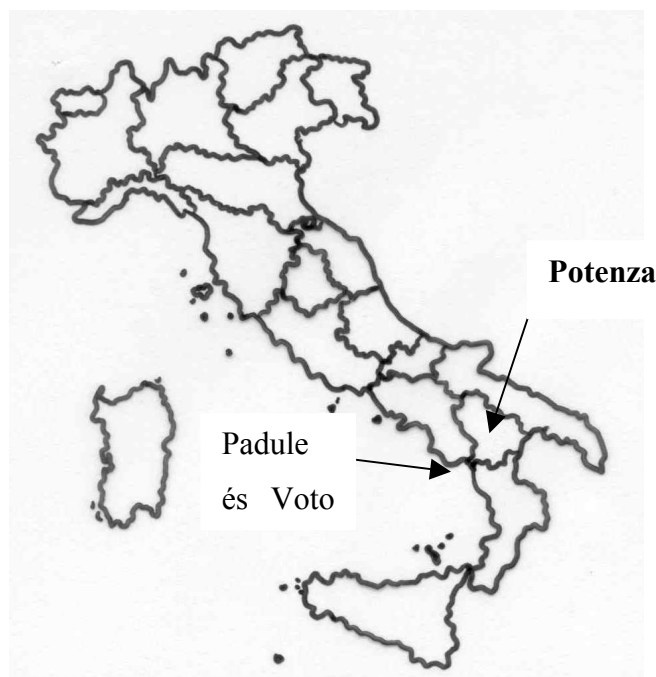
3.2.1. Mintavételi és kísérleti helyszínek

A takarmányozási, valamint a fertőzési és környezeti stresszel kapcsolatos kísérleteinket a Haltenyésztési Kutató Intézet (HAKI) kísérleti recirkulációs rendszerében végeztük. Az etetési alapkísérletekben 5-150 g között változó kezdeti átlagtömegű halak vizsgálatakor a 3. képen látható 100 l, míg egyes stressz kísérletekhez 400 l térfogatú EWOS kádakat alkalmaztunk.



3. kép: Kísérleti kádak elrendezése a HAKI recirkulációs rendszerében

A C-vitamin különböző stabil formáinak emészthetőségét és az egyes halfajok aszkorbát tárolási képességét vizsgáló méréseinkhez mintákat vettünk különböző



3. ábra: Mintavételi helyszínek Olaszországban

olasz farmokról is, amelyek Basilicata tartományban Potenza város körül, illetve az Adriai-tenger partján (Padule és Voto) helyezkednek el (3. ábra).

3.2.2. Kísérleti takarmányok

Lárvákkal végzett kísérleteink során első élő táplálékként tubifex féreggel etettünk. A tubifexet kiegészítettük C-vitaminnal, amelyet L-aszkorbinsav, illetve aszkorbát-2-polifoszfát formájában alkalmaztunk. A tubifexet szükség szerinti méretre vágtuk, majd 1:1 térfogat arányban 1.000 mg l^{-1} koncentrációjú L-aszkorbinsav, vagy 600 mg l^{-1} aszkorbát-2-polifoszfát oldatba helyeztük és tíz percig áztattuk néhányszor megkeverve. Az ily módon elkészített táplálékot azonnal etettük.

Valamennyi kísérlet során a 4. táblázatban ismertetett összetételű alaptápot használtuk C-vitamin-mentes kontrollként, a halak korának megfelelő méretben. A tápot a szarvasi Haltáp Kft. tápüzemében állították elő a kísérletekhez. A C-vitamin kiegészítést L-aszkorbinsav esetében naponta, (hétvégén kétnaponta), foszfátformák esetében pedig hetente vízben feloldva, spray technikával jutattuk a tápra, a homogenitás érdekében folytonosan keverve. Felhasználásig valamennyi tápot $-18 \text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk. A tápok C-vitamin tartalmát minden mintavételkor ellenőriztük.

4. táblázat: A kísérleti alaptáp összetevői

Nyers fehérje	48%
Nyers rost	1,2%
Nyers zsír	8%
Metabolizálható energia	$13,8 \text{ MJ kg}^{-1}$
Vitamin premix (C-vitamin mentes)	1%
HPLC-vel meghatározott C-vitamin	$<5,0 \text{ mg kg}^{-1}$
Kalcium	3,8%
Foszfor	2,17%
Lizin	3,42%
Metionin és cisztein	2,05%

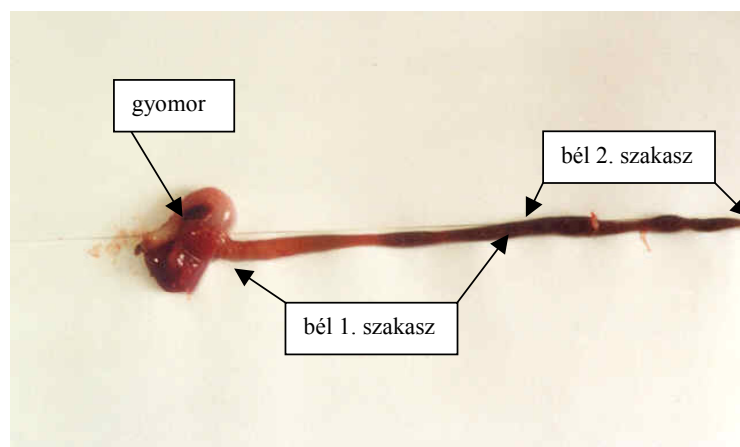
3.3. Etetési alapkísérletek

A C-vitamin hatásainak tanulmányozásához etetési alapkísérleteket végeztünk a vitamint különböző koncentrációban és formában tartalmazó tápokkal. Az alábbiakban ezeket ismertetjük. Az egyes alapkísérletek halait általában több megfigyeléshez, méréshez is felhasználtuk. A könnyebb áttekinthetőség érdekében a kísérletekről és mintavételekről a 3.3. fejezet végén egy összefoglaló táblázatot is közlünk (5. táblázat).

3.3.1. Megfigyelések, mintavételek

Néhány megfigyelést valamennyi alapkísérlet során elvégeztünk, a mortalitást mind a két hal esetében naponta feljegyeztük, az európai harcsák közül az esetleges kannibálokat pedig minden reggel eltávolítottuk. Kéthetente csoportos tömegmérés volt és ilyenkor vizsgáltuk meg a halakon az esetlegesen kialakult skorbutot.

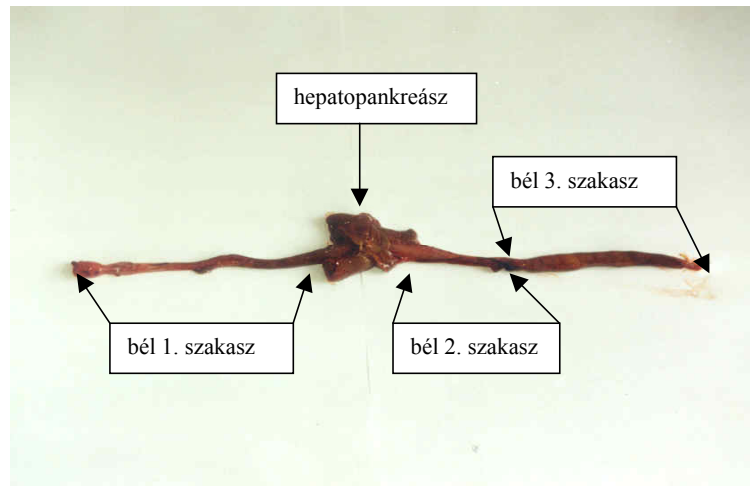
A mintavételek során a halakat mindig azonos módon dolgoztuk fel. Meghatározott ideig tartó éheztetés - általában 12 óra - után a halakat a fejükre mért ütéssel megöltük. Lemértük egyedi tömegüket, majd eltávolítottuk a vizsgálni kívánt szerveket, ami többnyire az agy, a máj a vese és a jobb oldali hátizom középről vett 2 cm-es darabja volt. Az aszkorbát-2-szulfátot és az aszkorbát-2-foszfátokat bontó enzimek aktivitásának meghatározásához kivettük a májat és az emésztőcsatornát, majd a béltartalmat óvatos préseléssel eltávolítottuk.



4. ábra: Az európai harcsa (*Silurus glanis* L.) bélcsatornájának vizsgált szakaszai

A bélcsatornát európai harcsa esetében a 4. ábra szerint, a tok hibrid esetében pedig az 5. ábra szerint feldaraboltuk, és a feldolgozásig -18°C -on tároltuk.

A béltartalom C-vitamin státuszának mérésekor ugyanezeket a szegmenseket vizsgáltuk oly módon, hogy óvatosan feldaraboltuk a teli bélcsatornát, majd kipréseltük a tartalmát.



5. ábra: A tok hibrid (*Acipenser ruthenus* L. x *Acipenser baeri* Brandt) emésztő csatornájának vizsgált szakaszai

3.3.2. Az etetési alapkísérletek körülményei

Az összes etetési alapkísérletet a HAKI recirkulációs rendszerében végeztük. A haltartás körülményeinek egy része mind a két halfaj esetében azonos volt:

Kád térfogat: általában 100 l (ahol eltér, külön közöljük)

Vízátfolyás: 7 lmin^{-1}

Víz hőmérséklet: $22\text{-}23^{\circ}\text{C}$

Víz pH: 8,5

Oldott oxigén tartalom: 80-90 %

Kísérletek időtartama: 3-4 hónap, ahol eltér, külön megjegyezzük

1. Etetési alapkísérlet

Halfaj: európai harcsa (*Silurus glanis* L.)

A halak mérete: 9-10 g az etetési kísérlet kezdetekor

Népesítés: 55 hal/kád

A kísérlet időbeosztása:

- C-vitamin mentes takarmány etetésének kezdete: 1994. 08. 10.
- Egy hét múlva 55-55 hal kiválogatása után adaptáció kezdete a kísérleti berendezéshez.
- Újabb egy hét múlva etetés kezdete 3x5 csoportban a különböző koncentrációjú L-aszkorbinsavval kiegészített tápokkal.

Alkalmazott takarmányok: 0, 10, 100, 1.000, 10.000 mgkg⁻¹ L-aszkorbinsavval kiegészített alaptakarmány.

Takarmány-előállítás: az alaptápot a 3.2.2. pontban ismertetett eljárás szerint spray technikával egészítettük ki L-aszkorbinsavval.

Etetések: hat óránként, összesen naponta négyszer, étvágy szerint.

2. etetési alap kísérlet

Halfaj: tokhibrid (*Acipenser ruthenus* L. x *Acipenser baeri* Brandt)

A halak mérete: 200-300 g az etetés kezdetekor.

Kád térfogat: 400 l

Népesítés: 10 hal/kád, 2x3 csoportban.

A kísérlet ideje: 1994. nyara

A kísérlet időtartama: 4 hét

Alkalmazott takarmányok: 0 és 1.000 mgkg⁻¹ L-aszkorbinsavval kiegészített alaptakarmány.

Etetések: hat óránként, összesen naponta négyszer, étvágy szerint.

3. etetési alapkísérlet

Halfaj: európai harcsa (*Silurus glanis* L.)

A halak mérete: 5-6 g a minimális 10 mgkg⁻¹ C-vitamin tartalmú táp etetésének kezdetekor.

Népesítés: 45 hal/kád

A kísérlet időbeosztása:

- 10 mgkg⁻¹ C-vitaminnal kiegészített táp etetésének kezdete: 1995. 09. 05.
- Egy hét múlva 45-45 hal kiválogatása után adaptáció kezdete a kísérleti berendezéshez.

- Újabb egy hét múlva etetés kezdete 2x8 csoportban a különböző koncentrációjú és formájú C-vitaminokkal kiegészített tápokkal.

Alkalmazott takarmányok: 0 és 1.000 mgkg⁻¹ L-aszkorbinsavval; 100, 200, 400 mgkg⁻¹ aszkorbát-2-monofoszfáttal (PHOSPITAN C[®] AMP-Mg, Sintofarm, Italy), valamint 150, 300 és 600 mgkg⁻¹ aszkorbát-2-polifoszfáttal (ROVIMIX STAY[®] - C 25, Roche, Basel, Switzerland) kiegészített alaptakarmány.

Etetések: négy óránként, naponta hatszor, étvágy szerint.

4. etetési alapkísérlet

Halfaj: tokhibrid (*Acipenser ruthenus* L. x *Acipenser baeri* Brandt)

A halak mérete: 10-12 g az etetés kezdetekor

Népesítés: 50 hal/kád

A kísérlet időbeosztása:

- A halakat egységesen 10 mgkg⁻¹ C-vitaminnal kiegészített takarmánnyal etettük: 1995. 08. 28-tól.
- Három hét múlva csoportonként 45-45 halat kiválogattunk és az kísérleti rendszerbe helyeztük adaptálódni.
- Egy hét múlva megkezdjük az etetést kezdete 2x8 csoportban a különböző koncentrációjú és formájú C-vitaminokkal kiegészített tápokkal.

Alkalmazott takarmányok: 0 és 1000 mgkg⁻¹ L-aszkorbinsavval; 100, 200 és 400 mgkg⁻¹ aszkorbát-2-monofoszfáttal (PHOSPITAN C[®] AMP-Mg, Sintofarm, Italy), valamint 150, 300 és 600 mgkg⁻¹ aszkorbát-2-polifoszfáttal (ROVIMIX STAY[®] - C 25, Roche, Basel, Switzerland) kiegészített alaptakarmány

Etetések: négy óránként, naponta hatszor, étvágy szerint

5. etetési alapkísérlet.

Halfaj: európai harcsa (*Silurus glanis* L.)

A halak mérete: 45±6 g az adaptációs idő kezdetekor.

Népesítés: 50 hal/kád

A kísérlet időbeosztása:

- Válogatás és az adaptációs idő kezdete: 1996. 09. 24.
- Egy hét múlva etetés kezdete 2x6 csoportban a különböző koncentrációjú és formájú C-vitaminokkal kiegészített tápokkal.

Kísérlet időtartama: a stressz kísérletek kezdetéig változó (16-21 hét).

Alkalmazott takarmányok: 0, 100, és 1.000 mgkg⁻¹ L-aszkorbinsavval 45, és 450 mgkg⁻¹ aszkorbát-2-polifoszfáttal (ROVIMIX STAY® - C 25, Roche, Basel, Switzerland) kiegészített alaptakarmány. További két csoportot 100 mgkg⁻¹ L-aszkorbinsav kiegészítést kapott, amelyeket nyolc hét után 10.000 mgkg⁻¹ C-vitamin tartalmú táppal etettünk tovább.

Etetések: négy óránként, naponta hatszor, étvágy szerint.

6. Etetési alapkísérlet

Halfaj: tokhibrid (*Acipenser ruthenus* L. x *Acipenser Baeri* Brandt)

A halak mérete: 72±6 g az adaptációs idő kezdetekor.

Népesítés: 50 hal/kád

A kísérlet időbeosztása:

- Válogatása és az adaptációs idő kezdete. 1996. 09. 25.
- Egy hét múlva etetés kezdete 2x6 csoportban a különböző koncentrációjú és formájú C-vitaminokkal kiegészített tápokkal.

Kísérlet időtartama: a stressz kísérletek kezdetéig változó (16-21 hét).

Alkalmazott takarmányok: 0, 100, és 1.000 mgkg⁻¹ L-aszkorbinsavval 45, és 450 mgkg⁻¹ aszkorbát-2-polifoszfáttal (ROVIMIX STAY® - C 25, Roche, Basel, Switzerland) kiegészített alaptakarmány.

Etetések: négy óránként, naponta hatszor, étvágy szerint.

7. Etetési alapkísérlet

A kísérlet kivitelezése: A kísérletet 1994. októberében, 10 db 215 g átlagtömegű tok hibriddel végeztük, a HAKI recirkulációs rendszerében, 400 l-es kádban. Tíz napig etettük a halakat 100 mgkg⁻¹ aszkorbát-2-monoszulfátot (*Sigma Chemical Co. St. Luis, Missouri, USA*) tartalmazó takarmánnyal.

5. táblázat: Az etetési alapkísérletekhez kapcsolódó megfigyelések és mintavételek rendszere

Sorszám	Halfaj	Alkalmazott tápok	Kísérleti cél	Mérések, mintavételek időpontja	Minták típusa és száma	Mérési módszerek
1.	Európai harcsa	AS 0, 10, 100, 1000, 10000	Növekedés, mortalitás, skorbut	Kéthetenként	-	Csoportos tömegmérés
1.	Európai harcsa	AS 0, 10, 100, 1000, 10000	C-vitamin státusz és a szervek telítődése	Havonta	5-5 hal; máj, vese, agy, izom	3.10.1. HPLC
1.	Európai harcsa	AS 0, 10, 100, 1000, 10000	Szöveti vizsgálatok	A kísérlet 18. hetében	3-3 hal; kopolyú, máj, gerinc metszet	Tartósítás, 10 % formalinban
1.	Európai harcsa	AS 0, 10, 100, 1000, 10000	Nagy sűrűség okozta stressz	A kísérlet 23. hetében	5-5 hal; máj és agy	3.10.1. HPLC
1.	Európai harcsa	AS 0, 10, 100, 1000, 10000	Formalin okozta stressz	A kísérlet 25. hetében	5-5 hal; máj és agy	3.10.1. HPLC
1.	Európai harcsa	AS 0, 10, 100, 1000, 10000	Magas nitrit	A kísérlet 27. hetében	5-5 hal; máj és agy	3.10.1. HPLC
1.	Európai harcsa	AS 100,	Foszfát és szulfát emésztése	A kísérlet 27. hetében	5 hal emésztő-csatornája	3.10.1. HPLC
2.	Tok hibrid	AS 0 és 1000	Foszfát és szulfát emésztése	A kísérlet 4. hetében	5 hal emésztő-csatornája	3.10.1. HPLC
3.	Európai harcsa	AS 0 és 1000; AMF 100, 200, 400; APF 150, 300, 600	Növekedés, mortalitás, skorbut	Kéthetenként	-	Csoportos tömegmérés
3.	Európai harcsa	AS 0 és 1000; AMF 100, 200, 400; APF 150, 300, 600	C-vitamin státusz	A kísérlet 12. hetében	5-5 hal máj, vese, agy	3.10.1. HPLC
3.	Európai harcsa	AS 0 és 1000; AMF 100, 200, 400; APF 150, 300, 600	Csont-kollagén tartalom	A kísérlet 8. és 16. hetében	3-3 egész hal	Gravimetriás kollagén meghatározás
3.	Európai harcsa	AMF 100, APF 300,	¹⁴ C felvétel	A kísérlet 30. hetében	agy, máj, vese, bélcsatorna	Folyadék szcintillációs analízátor
3.	Európai harcsa	AS 0 és 1000; AMF 100, 200, 400; APF 150, 300, 600	C-vitamin formák kiválasztása	A kísérlet 27. hetében	3-3 hal emésztő csatornája	3.10.1. HPLC

Sorszám	Halfaj	Alkalmazott tápok	Kísérleti cél	Mérések, mintavételek időpontja	Minták típusa és száma	Mérési módszerek
4.	Tok hibrid	AS 0 és 1000; AMF 100, 200, 400; APF 150, 300, 600	Növekedés, mortalitás, skorbut	Kéthetenként	-	Csoportos tömegmérés
4.	Tok hibrid	AS 0 és 1000; AMF 100, 200, 400; APF 150, 300, 600	A porcos váz kollagén tartalma	A kísérlet 8. és 16. hetében	3-3 egész hal	Gravimetriás kollagén meghatározás
4.	Tok hibrid	AS 0 és 1000; AMF 100, 200, 400; APF 150, 300, 600	C-vitamin státusz	A kísérlet 15. hetében	5-5 hal; máj, vese, agy	3.10.1. HPLC
4.	Tok hibrid	AS 0 és 1000; AMF 100, 200, 400; APF 150, 300, 600	C-vitamin formák kiválasztása	A kísérlet 27. hetében	3-3 hal emésztő csatornája	3.10.1. HPLC
5.	Európai harcsa	AS 0, 100, 1000, 10000; APF 45 és 450	Alacsony oxigén stressz	A kísérlet 3. hónapja	5-5 hal; máj és agy	C-vitamin spektrofotometrián
5.	Európai harcsa	AS 0, 10, 100, 1000,	¹⁴ C felvétel	A kísérlet 30. hetében	agy, máj, vese, bélcsatorna	Folyadék szcintillációs analizátor
5.	Európai harcsa	AS 0, 100, 1000, 10000;	Szöveti oxalát tartalom	A kísérlet 27. hetében	5-5 hal; máj, vese és gerinc metszet	Sigma oxalát KIT
6.	Tok hibrid	AS 0, 10, 100, 1000, APF 450	Alacsony oxigén stressz	A kísérlet 3. hónapja	5-5 hal; máj és agy	C-vitamin spektrofotometrián
6.	Tok hibrid	AS 0, 10, 100, 1000, 10000; APF 450	Magas nitrit koncentráció	A kísérlet 3. hónapja	5-5 hal; máj és agy	3.10.1. HPLC
6.	Tok hibrid	AS 0, 10, 100, 1000, 10000; APF 450	Éhezési stressz	A kísérlet 4. hónapja	5-5 hal; máj és agy	3.10.1. HPLC
6.	Tok hibrid	AS 0, 100, 1000,	Gulonolakton oxidáz enzim aktivitás	A kísérlet 4. hónapja	5-5 hal; máj és vese	3.10.1. HPLC

3.4. Kísérletek európai harcsa (*Silurus glanis* L.) lárvákkal

3.4.1. Az ikrák és a különböző embrionális fázisok vizsgálata

A kísérlet célja: az ikra és az egyes embrionális fázisok C-vitamin státuszának meghatározása.

A kísérlet időpontja és helye: Szarvas, 1994. 06. 07-10., valamint 1996. 06. 01-10. között HAKI, recirkulációs rendszer.

A kísérlet kivitelezése: A halakat mesterségesen szaporítottuk HORVÁTH et. al. (1981) által kifejlesztett módszerrel, a HAKI recirkulációs rendszerében. Az ovulációt acetonnal szárított ponty hipofízissel indukáltuk. Az ikrás halak $4-4,5 \text{ mgkg}^{-1}$, a tejesek pedig $3-4 \text{ mgkg}^{-1}$ hipofízist kaptak injekció formájában. Az anyák ikráját altatásban fejtük le. A tejesek egyik heréjét SIWICZKI és JENEY (1986) módszerével operáltuk ki. A megtermékenyítéshez az ikrákat szárazon összekevertük a spermával, amelyet 0,35 %-os NaCl-dal aktiváltunk. A megtermékenyített ikrákat 9 l-es Zuger üvegekbe (vízhőfok $22-24^\circ\text{C}$) helyeztük a lárvák kikeléséig. Az embrionális fejlődés különböző stádiumait mikroszkóp alatt követtük és C-vitamin tartalom meghatározás céljából 1994-ben mintákat vettünk a megtermékenyítés előtt és közvetlenül utána, majd kettő, négy és nyolc sejtes, valamint a hólyagsíra, a bélcsíra állapotban, továbbá közvetlen kelés előtt és az éppen kikelt embriókból. 1996-ban az eredmények ismeretében a mintavétel megtermékenyítés előtt és közvetlenül utána, 2, 8 sejtes és bélcsíra állapotban, közvetlen kelés előtt 70 % és 90 %, majd az éppen kikelt embriókból, ezt követően 3, 5 és 7 nappal kelés után történt. Ezekből a mintákból a C-vitamin koncentráción kívül aminosav tartalmat is mértünk a kollagén szintézis tanulmányozásának céljából. A mintákat folyékony nitrogénben azonnal lefagyasztottuk és -80°C -on tároltuk feldolgozásig.

1. Lárwanevelési kísérlet

A kísérlet célja: módszer kidolgozása a harcsalárvák első élő táplálékának (*Tubifex tubifex* L.) kiegészítésére L-aszkorbinsavval. A C-vitamin kiegészítés hatásainak vizsgálata.

A kísérlet időtartama: 1994. 06. 13 – 07. 19.

A kísérlet kivitelezése: 10 nappal a kelés után 1500-1500 lárvát csoportosan lemértünk és 100 l-es kádakban helyeztük el, a víz hőmérséklete 24-26 °C, áramlási sebessége 7 lmin⁻¹ volt. A kísérlet során két kezelést alkalmaztunk négy ismételtsben. Négy csoport az etetést közvetlenül megelőzően apróra vágott tubifexet evett C-vitaminos kiegészítés nélkül. A másik négy csoport táplálékát kiegészítettük L-askorbinsavval közvetlenül az etetések előtt. Ehhez az apróra vágott tubifexből 100 ml-t 400 ml 2,0 gl⁻¹ L-askorbinsavat tartalmazó vízbe helyeztünk egy órára, tíz percenként óvatosan megkevertük, majd azonnal megettük a halakat. Naponta négyszer etettünk. A kannibalizmust mutató halakat naponta eltávolítottuk. A mortalitást naponta feljegyeztük, a halak tömegét csoportosan víz alatt mértük kéthetente. C-vitamin tartalom meghatározáshoz a tömegmérésekkel azonos időben vettünk mintát, csoportonként 50-50 halat.

2. Lárwanevelési kísérlet

A kísérlet célja: az askorbát-2-polifoszfát kiegészítés hatásainak vizsgálata európai harcsa (*Silurus glanis* L.) lárváinak növekedésére. Fertőzési kísérletek végzése.

A kísérlet időbeosztása:

Etetés tubifexszel: 1997. 06. 23 – 06. 27.

Tápra szoktatás vegyes etetéssel: 1997. 06.28. - 07.04.

Etetés granulált táppal: 1997. 07.05.- 06.28.

A kísérlet kivitelezése: 10 nappal a kelés után 1000-1000 lárvát csoportosan lemértünk és 100 l-es kádakban helyeztük el, a víz hőmérséklete 24-26 °C, áramlási sebessége 7 lmin⁻¹ volt. A kísérlet során két kezelést alkalmaztunk négy ismételtsben. Naponta nyolcszor etettünk éjjel-nappal. Négy csoport az etetést közvetlenül megelőzően apróra vágott tubifexet evett C-vitaminos kiegészítés nélkül. A másik négy csoport táplálékát kiegészítettük askorbát-2-polifoszfáttal közvetlenül az etetések előtt. Ehhez az apróra vágott tubifexből 100 ml-t, 400 ml 600 mg l⁻¹ askorbát-2-polifoszfátot (ROVIMIX STAY[®]-C 25, Roche, Basel, Switzerland) tartalmazó vízbe helyeztünk egy órára, tíz percenként óvatosan megkevertük, majd azonnal etettünk. Egy hét után a tubifexet 1:1 arányban kevertük a csoportnak megfelelő C-vitamin mentes, illetve 600 mg kg⁻¹ askorbát-2-polifoszfáttal kiegészített harcsatáppal négy napig. A következő három napban etetés előtt a halakat megkínáltuk granulált harcsatáppal. A halak ily módon 15 nap alatt átszoktak a granulált takarmányra. A kannibalizmust mutató halakat naponta eltávolítottuk. A mortalitást naponta feljegyeztük, a halak tömegét csoportosan víz alatt

mértük hetente. C-vitamin tartalom meghatározáshoz a tömegmérésekkel azonos időben vettünk mintát, csoportonként 50-50 halat.

3.5. A C-vitamin felvétel vizsgálata $1\text{-}^{14}\text{C}$ -vel jelölt L-aszkorbinsav alkalmazásával

A kísérlet célja: A C-vitamin felvétel és kiürülés vizsgálata az európai harcsa különböző szerveiben.

A kísérlet kivitelezése: A 3.3. pont 1. etetési alapkísérletből kiválasztottunk négy csoport európai harcsát (0, 100, 1.000 és 10.000 $\mu\text{g g}^{-1}$ L-aszkorbinsav) és a kísérlet 30. hetében két 18-18 halból álló csoportot alakítottunk az $1\text{-}^{14}\text{C}$ -vel jelölt L-aszkorbinsavval történő vizsgálatokhoz. Kontrollként újabb 18 halat válogattunk ki a 10 mg kg^{-1} AS csoportokból, ezek a halak nem kaptak $1\text{-}^{14}\text{C}$ -vel jelzett tápot, de egyébként teljesen azonos módon kezeltük őket a többi csoporttal. A halak átlagtömege 90-95 g volt. 24 órás éheztetés után egyszer megetettük a biomasszára vonatkoztatva 2% 100 mg kg^{-1} L-aszkorbinsav koncentrációjú, 206 MBq g^{-1} aktivitású táppal, melyet az alaptakarmányra spray technikával vittünk fel. 15 percig tartó etetés után eltávolítottuk a radioaktív tápot és vizet a kádakból. A halakat $23\text{-}24^{\circ}\text{C}$ -on 7 l min^{-1} vízfolyás mellett továbbra is 100 mg kg^{-1} L-aszkorbinsav koncentrációjú táppal etettük „ad libitum” 30 napig. Csoportonként 3-3 halból szövetmintákat (máj, vese, agy, bél, és béltartalom) vettünk 12 órával, 1, 3, 6, és 11 nappal az $1\text{-}^{14}\text{C}$ -vel jelölt táppal történt etetést követően. A mintákat -80°C -on tartottuk feldolgozásig. A ^{14}C aktivitás meghatározásához a mintákat $0,4\text{ mol l}^{-1}$ nátriumacetát pH 4,8 pufferben extraháltuk majd 1 ml extraktumot $150\text{ }\mu\text{l}$ 10 %-os perklórsav oldattal fehérjementesítettük. 10 perc 10.000 g-vel történő centrifugálást követően a felülúszót 4% Cab-O-Sil Bray koktélaban oldottuk, majd Beckman LS 100C típusú folyadék szcintillációs analizátorban mértük az aktivitást. A méréseket megismételtük a 3. etetési alapkísérlet 100 mg kg^{-1} aszkorbát-2-monofoszfát és 300 mg kg^{-1} aszkorbát-2-polifoszfáttal táplált halaival is. Ebben az esetben mintákat vettünk 24 óra, valamint 4, 7, 14, és 25 nap múlva.

3.8. Az emésztőcsatorna tartalmának C-vitamin státusza

A kísérlet célja: a C-vitamin formák felszívódásának vizsgálata az emésztőrendszerben.

A kísérlet kivitelezése. a 3. és a 4. etetési alapkísérletek 27. hetében éheztetés nélkül vizsgáltuk az európai harcsa és a tok hibrid gyomor és béltartalmának C-vitamin státuszát. A vizsgálathoz a kontroll, az 1.000 mgkg^{-1} L-aszkorbinsav, a 200 és 400 mgkg^{-1} AMF, valamint a 300 és 600 mgkg^{-1} APF csoportokat használtuk. Csoportonként 3-3 halból kivettük a teljes emésztőrendszert, a 4. és az 5. ábra szerint feldaraboltuk és óvatosan kipréseltük az egyes szakaszok tartalmát. A C-vitamin koncentrációkat HPLC-vel mértük.

3.7. Különböző környezeti stresszek hatása a halak C-vitamin státuszára

A kísérletek célja: A stresszhelyzetek jelentősen megnövelhetik a halak C-vitamin felhasználását. Kísérleteink célja ennek megfelelően az egyes szervek C-vitamin felhasználásának követése egyes stresszhelyzetekben. Mindkét halfaj esetében vizsgáltuk a nitrit szennyezés és az alacsony oxigéntartalom okozta hatásokat. Az európai harcsa esetében formalinos fürdetést és nagy egyedsűrűségi tesztet is alkalmaztunk. A tok hibridnél egy éheztetési kísérletet is elvégeztünk.

3.7.1. Nitrit szennyezés hatásának vizsgálata

A kísérlethez az európai harcsa esetében az 1. etetési alapkísérlet 27. hetében használtunk fel 10-10 halat minden kísérleti csoportból (0, 10, 100, 1.000 és 10.000 mgkg^{-1} L-aszkorbinsav). Európai harcsával és tok hibriddel a 3. és 4. alapkísérlet 19. hetében a 0, és 1.000 mgkg^{-1} L-aszkorbinsav, az AMF 100 és az APF 150 mgkg^{-1} halait kezeltük, csoportonként szintén 10-10 halat. A kísérletet 400 l-es kádakban végeztük. A halakat állandó levegőztetés mellett $300 \text{ l } 100 \text{ mg l}^{-1} \text{ N-NO}_2$ koncentrációjú vízben tartottuk 24 órán át, etetés nélkül. Ezt követően a halakat visszahelyeztük eredeti kádjaikba és folytattuk az etetésüket. Minden csoportból 3-3 halmintát vettünk a kísérlet megkezdése előtt, 24 óra múlva és egy héttel a stressz után. A különböző szövetek C-vitamin tartalmát a 3.10.6. pontban ismertetett spektrofotometriás módszerrel határoztuk meg.

3.7.2. Alacsony oxigéntartalom okozta hatások vizsgálata

Az európai harcsa esetében az 5., a tok hibrid esetében a 6., etetési alapkísérlet valamennyi csoportjának (0, 100, 1.000 mgkg⁻¹ L-aszorbinsav, 45 és 450 mgkg⁻¹ APF) halait kezeltük, a kísérlet 3. hónapjában. A 374±60 g átlag tömegű harcsákból és a 150±49 g átlagtömegű tokokból 10-10 halat helyeztünk 50 l-es kádakba. A kísérletet mind a két halfaj esetében úgy végeztük, hogy a halak már mutassák az oxigénhiány tüneteit, de ne pusztuljanak el. Az oxigénhiányra nagyon érzékeny tokok esetében a víz oxigén koncentrációja 1 óra alatt 5,3 mg l⁻¹-ről 2,2 mg l⁻¹-re esett, amikor a halak a víz felszínén folyamatosan mozgatták kopolyúfedőiket, ezzel jelezve oxigénhiányukat. A harcsák vizének induló oxigén koncentrációja 2,2 mg l⁻¹ volt, amely két óra alatt 0,9 mg l⁻¹-re esett és a halak ekkor jelezték a hiányt. A kísérleteket az oxigénhiány tüneteinek jelentkezésekor befejeztük. Csoportonként 3-3 halból máj, vese és agy mintákat vettünk a stresszt megelőzően és utána is. A C-vitamin meghatározás ebben az esetben is spektrofotometriásan történt.

3.7.3. A nagy egyedsűrűség hatásának vizsgálata

A kísérlettel a szállítás során fellépő stresszhelyzetet kívántuk modellezni. Az 1. etetési alapkísérlet harcsáiból a 23. héten csoportonként 30-30 halat 30 l vízben tartottunk állandó levegőztetés mellett 2 órán át. A halakat ezután visszahelyeztük eredeti kádjukba és folytattuk az etetést. 3-3 halból máj, vese és agy mintákat vettünk a stressz előtt és után. A C-vitamin meghatározás HPLC-vel történt (3.10.1.).

3.7.4. Formalinos fürdetés hatása

A különböző fertőzések megjelenésekor intenzív rendszerekben gyakran alkalmazzák a formalinos fürdetést, ami a betegségen kívül újabb stresszt is jelent a halaknak. Kísérletünk célja annak eldöntése, hogy a megfelelő C-vitaminnal történő takarmányozás segíti-e a halakat ennek ellensúlyozásában.

Az 1. etetési alapkísérlet harcsáinak minden csoportját kezeltük a 25. héten 45 percig 0,25 ml l⁻¹ koncentrációjú formalinnal. 3-3 halból máj-, vese-, és agymintákat vettünk a kísérlet előtt és után. A C-vitamin meghatározás HPLC-vel történt (3.10.1.).

3.7.5. Éhezés hatása a tok hibrid szöveteinek C-vitamin státuszára

A kísérlet során azt vizsgáltuk, hogy éhezés során hogyan változik a halak C-vitamin szintetizáló képessége a takarmány aszkorbát koncentrációjával összefüggésben.

A 6. etetési alapkísérlet 19. hetében a 78 ± 8 g átlag tömegű halak minden kezelési csoportjából 10-10 darabot 54 órán keresztül éhezettünk. 12 óra múlva és az éheztetés végén csoportonként 3-3 halból kivettük a veséket és a 3.10.6. pontban ismertetett módszerrel spektrofotometriásan megmértük az összes C-vitamin koncentrációjukat.

3.8. A gulonolakton oxidáz enzim aktivitás alakulása tok hibrid esetében a különböző C-vitamin szintű takarmányozás során

A kísérlet célja volt, hogy a gulonolakton oxidáz enzim működését gátolja-e a C-vitamin kiegészítés a vitamint egyébként előállítani képes halaknál.

A 6. etetési alapkísérlet halainak kontroll, 100 és 1.000 mg kg^{-1} csoportjából 12 órás éheztetés után vettünk mintákat. A 78 ± 8 g átlagtömegű halakból 5-5 hal veséjét eltávolítottuk és feldolgozásig -72°C -on tároltuk. A gulonolakton oxidáz enzim aktivitását a 3.10.3. pontban ismertetett módon határoztuk meg.

3.9. A C-vitamin hatásának vizsgálata spontán darakór fertőzésnél

A 2. lárvabetetési kísérlet halain darakór (*Ichthyophthirius multifiliis*) jelentkezett a kísérlet ötödik napján. A halakat a technológia szerint ilyenkor szokásos módon malachitzölddel fürdettük. A C-vitamin tartalom meghatározáshoz 50-50 ivadékot vettünk a kísérlet 5. és 18. napján. Ugyanekkor csoportos halmérést és egyedszámlálást is végeztünk.

3.10. Kémiai és biológiai mérési módszerek

A kísérletek során különböző célból vett minták kémiai és biológiai paramétereinek meghatározásához saját kidolgozású, továbbfejlesztett, illetve standard módszereket alkalmaztunk.

3.10.1. C-vitamin és formáinak meghatározása HPLC-vel

A méréseket saját fejlesztésű módszerrel végeztük (GY. PAPP et. al., 1998).

A méréshez szükséges reagentisek:

A HPLC-vel történő mérések alapvető kívánalmainak megfelelően méréseink során nagy tisztaságú HPLC vagy spektrofotometriai minőségű vegyszereket használtunk, melyek a következők voltak:

- *Sigma Chemical Co. (St. Luis, Missouri, USA):* L-aszkorbinsav, dehidro-aszkorbinsav, L-aszkorbát-2-monoszulfát, aszkorbát-oxidáz enzim, savas foszfatáz enzim (LOT N° 72H7150), szulfatáz enzim, HPLC minőségű metanol
- *Aldrich-Chemie GmbH (Steinheim, Germany):* tetrabutylammonium-dihidrogénfoszfát, EDTA, nátriumacetát, 1,4-ditioeritritol (DTE)
- *Más cégektől beszerzett vegyszerek:* aszkorbát-2-monofoszfát (magnézium só, 95 % tisztaságú) „PHOSPITAN C[®]” Sintofarm, Olaszország; aszkorbát-2-polifoszfát „ROVIMIX STAY[®] -C25” Roche, Basel, Svájc; a HPLC minőségű vizet NORGANIC ioncserélő oszlopon állítottuk elő (Millipore Co., Bedford, USA)

A minták előkészítéséhez szükséges standard és egyéb oldatok:

- *L-aszkorbinsav 1.000 mg l⁻¹ alap standard*

Naponta készítettük 0,2 mol l⁻¹ pH 4,8 nátrium-acetát oldatban hígítva, amely 0,2 % DTE-t tartalmazott.

- *Dehidro-L-aszkorbinsav standard 25 mg l⁻¹*

Naponta készítettük 0,2 mol l⁻¹, pH 4,8 nátrium-acetát oldatban hígítva, amely nem tartalmazott DTE-t.

- *Az aszkorbát-2-monoszulfát és -monofoszfát* oldatokat az L-aszkorbinsav alap standardhoz hasonlóan 1.000 mg l⁻¹ koncentrációban nátrium-acetát oldattal készítettük.

- *Savas foszfatáz enzim oldat:* 40 mg savas foszfatáz enzimet oldottunk 1 ml 0,2 mol l⁻¹ 0,2 % DTE-t tartalmazó nátrium-acetát pufferben (pH 4,8).

A minták gyűjtése és előkészítése az analízishez

A halakat a vízből történő kiemelés után azonnal megöltük a fejre mért ütéssel. A teljes testtömeg mérését követően a vizsgálni kívánt szöveteket eltávolítottuk, tömegüket megmértük, majd azonnal lefagyasztottuk -72 °C hőmérsékleten. A

takarmánymintákat közvetlenül elkészítésük után vettük és lefagyasztottuk. A mintákat az analízishez fagyott állapotban jéghideg $0,2 \text{ mol l}^{-1}$ pH 4,8 nátrium-acetát pufferben, forgókéses Ultra-turrax készülékkel homogenizáltuk. A homogenizált mintát a 6. ábra szerint azonnal feldolgoztuk.

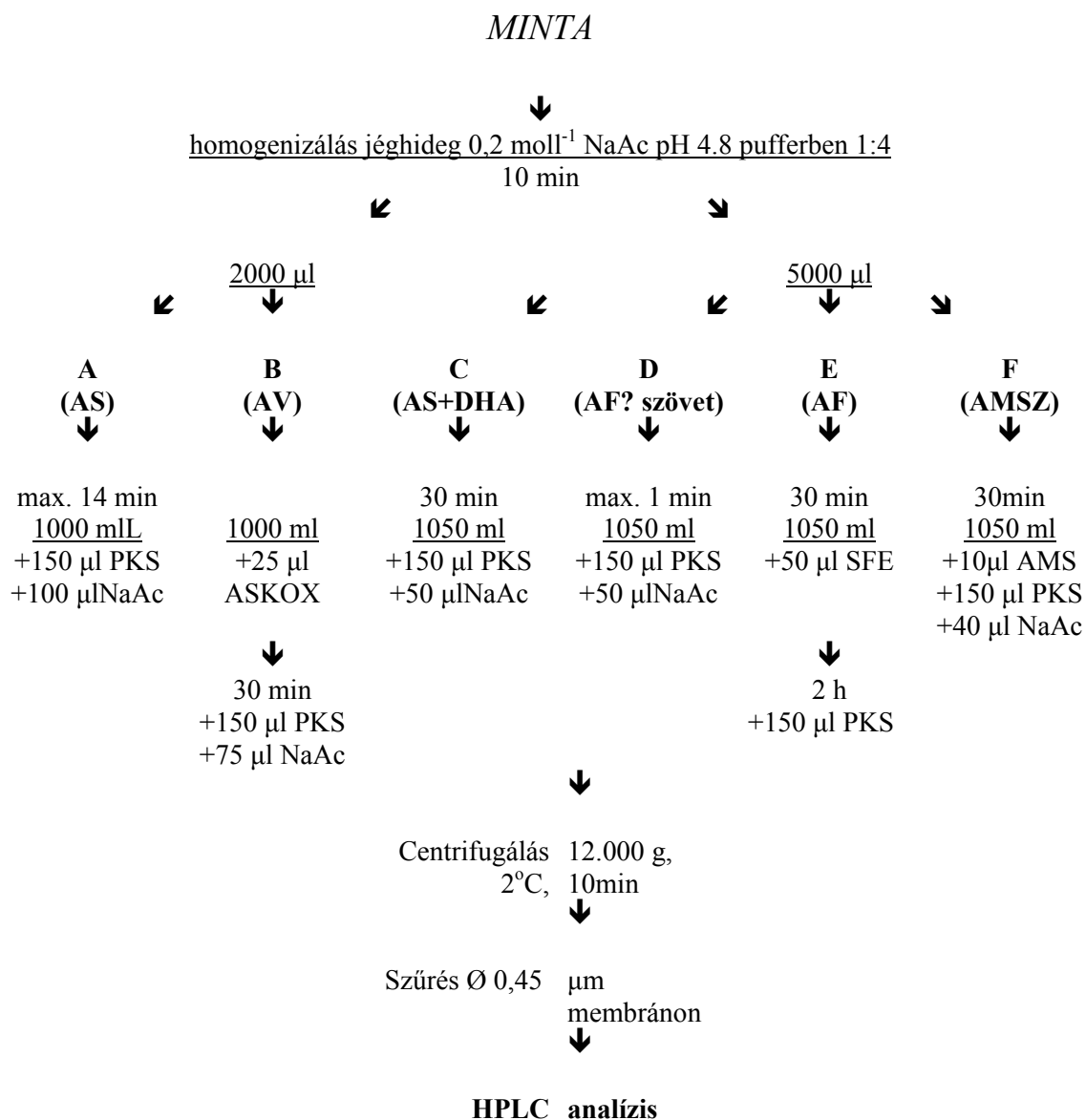
A minta homogenizátumát azonnal két részre osztottuk. Az első részből $1.000 \mu\text{l}$ -t azonnali perklórsavas kezelés után az L-aszkorbinsav közvetlen meghatározására használtuk (**A**), míg a másik $1.000 \mu\text{l}$ teljes aszkorbinsav tartalmát lebontottuk aszkorbát oxidáz enzimmal az alapvonal meghatározása céljából (**B**). A minta második részét erősen redukáló hatású 4%-os ditioeritritol oldattal kezeltük. Ebből az összes C-vitamin tartalom meghatározásához 30 percig állni hagyunk $1.000 \mu\text{l}$ -t (**C**). Az aszkorbát-foszfát észterek jelenlétének meghatározásához $1.000 \mu\text{l}$ -t azonnal perklórsavval kezeltünk a természetes foszfatáz-enzim reakció leállításának érdekében (**D**). A jelenlévő aszkorbát-2-foszfát észtereket savas foszfatáz enzimmal L-aszkorbinsavvá alakítottuk újabb $1.000 \mu\text{l}$ minta 30 percig tartó kezelésével (**E**). Az aszkorbát-2-monoszulfátot standard koinjektálásával határoztuk meg (**F**). A mintákat minden esetben deproteinizáltuk 5% -os perklórsav oldattal, 12.000 g -vel centrifugáltuk és $0,45 \mu\text{m}$ pórusú membránon szűrtük a HPLC analízis előtt.

HPLC kondíciók

A mobil fázis $0,04 \text{ mol l}^{-1}$ nátrium-acetát volt, amely $0,05 \text{ mmol l}^{-1}$ EDTA-t és $0,5 \text{ mmol l}^{-1}$ tetra-butilammónium-dihidrogén-foszfátot tartalmazott, pH-ját 85 %-os H_3PO_4 -el 3,76-ra állítottuk, végül 1.000 ml -t 24 ml metanollal kevertünk és $0,45 \mu\text{m}$ -es membránszűrőn szűrtük (Whatman vagy Millipore).

A módszer kidolgozásakor egy Hewlett Packard (HPLC 1050) rendszert használtunk, amely a négyszelepes, automataváltós HPLC 1050-es pumpán kívül Rheodyne injektorból, diódasoros (DAD) detektorból és HP Chemstation szoftverből állt. A mobil fázist folyamatosan gáztalanítottuk héliummal. A C-vitamin formák elválasztásához Vydac C_{18} kolonnát használtunk ($5 \mu\text{m}$, $4,6 \text{ mm} \times 25 \text{ cm}$). A mobil fázis áramlási sebessége $0,6 \text{ ml min}^{-1}$ volt, $23 \text{ }^\circ\text{C}$ -on. Ezzel a rendszerrel végeztük el a módszer kifejlesztésekor szükséges csúcstisztasági vizsgálatokat, továbbá optimalizáltuk az aszkorbinsav detektálásának hullámhosszát. A méréseket ezután 250 nm -en végeztük. A módszert adaptáltuk az intézetünkben található Waters HPLC rendszerhez, amely Waters 510-es izokratikus pumpából, Rheodyne injektorból, 490 E többcsatornás UV

detektorból és Maxima 820 szoftverből állt. Az elválasztást Nova-Pak C₁₈ (5 µm, 3,9 mm x 3,0 cm) oszloppal végeztük.



Jelmagyarázat: AS = L-aszkorbinsav; AV = alapvonal; DHA = dehidro-aszkorbinsav; AF = aszkorbát-2-mono/polifoszfát; AMS = aszkorbát-2-monoszulfát; PKS = 5% perklórsav; SFE = savas foszfátáz enzim oldat; NaAc = 0,2 mol.L⁻¹, pH 4,8 nátrium-acetát; ASKOX = aszkorbát oxidáz enzim; DTE = 4% ditioeritritol

6. ábra: Mintaelőkészítés hal vagy takarmányminták összes C-vitamin formáinak meghatározásához

A kromatogrammok értékelése, az egyes C-vitamin formák koncentrációjának számítása

Az egyes C-vitamin formák helyét a kromatogrammon standardek koinjektálásával határoztuk meg. A mennyiségi értékeléshez, amint az a 6. ábrán is látható, az aszkorbát-2-monoszulfát kivételével minden C-vitamin formát aszkorbinsavvá alakítottunk és ebből számítottuk ki koncentrációjukat az alábbiak szerint:

A-B = L-aszkorbinsav

C-A = dehidro-L-aszkorbinsav

E-A = aszkorbát-2-mono/polifoszfát

F = aszkorbát-2-monoszulfát

Az aszkorbát-2-szulfátot a csúcs alatti terület meghatározása után a standard kromatogrammhoz hasonlítottuk.

A meghatározások reprodukálhatóságát és a C-vitamin formák mintákból történő kinyerési százalékát ismert koncentrációjú standardek hozzáadásával határoztuk meg. A módszerrel lineárisan mérhető koncentráció határokat standard sorokkal mértük, $1 \mu\text{gml}^{-1}$ és $100 \mu\text{gml}^{-1}$ tartományok között.

3.10.2. Az aszkorbát-2-észterek hidrolízisének vizsgálata

A módszert az aszkorbát-2-foszfát, illetve szulfát észterek bontására képes, a halak szöveteiben megtalálható enzimek aktivitásának mérésére dolgoztuk ki (GY. PAPP et. al., 1994c).

A méréshez szükséges reagensok: A standard és egyéb oldatok azonosak voltak a 3.10.1. pontban felsoroltakkal.

A minták gyűjtése és előkészítése az analízishez:

A mintákat a 3.10.1. pontban felsoroltakkal azonos módon vettük. Az enzimaktivitás méréshez azonban a szövetmintákat frissen dolgoztuk fel. Összesen négy halfaj különböző szöveteit vizsgáltuk az alábbiak szerint:

- Európai harcsa (*Silurus glanis* L.): máj, gyomor, pilorusz, bélcsatorna két egyenlő szakaszát (4. ábra)
- Tok hibrid (*Acipenser ruthenus* L. x *Acipenser baeri* Brandt): máj, vese és a bélcsatorna a 5. ábra szerinti három szakaszát

- Európai angolna (*Anquilla anquilla* L.): máj, gyomor és a bélcsatorna két egyenlő részre osztott szakaszát
- Tengeri sügér (*Dicentrarchus labrax* L.): máj, vese pilorusz és a teljes bélcsatorna

Az európai harcsa és a tok hibrid a HAKI recirkulációs rendszeréből, az angolna és a tengeri sügér különböző olasz farmokról származtak.

A minták előkészítése a HPLC mérésekhez a 7. ábra szerint történt. A szöveteket 10 percig homogenizáltuk $0,2 \text{ mol l}^{-1}$ pH 7,2 nátrium-acetát pufferben, forgókéses Ultraturrax készülékkel, majd 4 %-os DTE-t adtunk hozzá. A homogenizátumot ezután három részre osztottuk. Az alapvonal (A) meghatározásához az enzimreakciót azonnal leállítottuk perklórsavval. Az enzimaktivitás meghatározása céljából ismert ($1.000 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$) koncentrációjú aszkorbát-2-monofoszfát vagy -szulfát oldatot adtunk a homogenizátumhoz (C), majd félóránként mintát vettünk az oldatból a aszkorbát észterekből keletkező L-aszkorbinsav meghatározásához (B). Az így kapott részmintákat ezután a 3.10.1. pontban ismertetett módon HPLC-vel mértük.

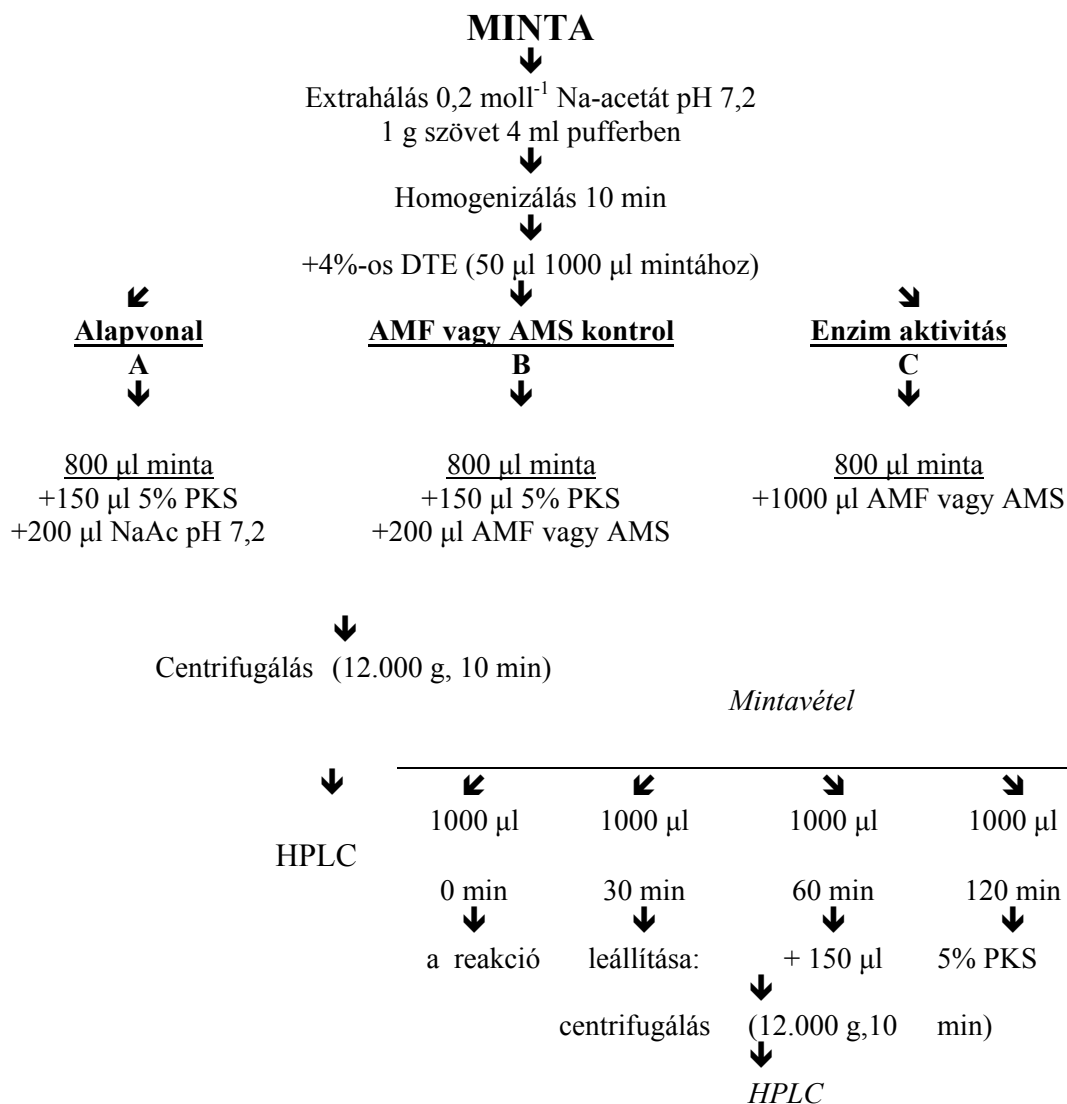
A kromatogrammok értékelése, az egyes enzimaktivitások meghatározása

A kromatogrammok a 3.3.1.1. szerint értékeltük, majd a kiindulási (AMF_{ki} és AMS_{ki}), valamint az egyes részminták koncentrációit (AMF_{n} és AMS_{n}) az alábbiak szerint számoltuk:

$$\text{AMF}_{\text{ki}} \text{ vagy } \text{AMS}_{\text{ki}} = \text{B} - \text{A}$$

$$\text{AMF}_{\text{n}} \text{ vagy } \text{AMS}_{\text{n}} = \text{B} - \text{C}$$

A kapott koncentrációkat ezután az idő függvényében ábrázoltuk, majd az enzimaktivitás értékeket az egy óra alatt felszabadult L-aszkorbinsav mennyiségére adtuk meg ($\mu\text{g ASg}^{-1} \text{ nedves szövet h}^{-1}$) egységben.



Megjegyzés: AMF = aszkorbát-2-monofoszfát; AMS = aszkorbát-2-monoszulfát; PKS = perklórsav; DTE = ditioeritritol

7. ábra: Az aszkorbinsav észtereket bontani képes enzimek aktivitásának meghatározása

3.10.3. L-gulonolakton oxidáz enzim jelenlétének kimutatása

A mérés célja: A C-vitamin szintetizáló képesség igazolása a tanulmányozott tok hibrid esetében.

A mérés kivitelezése: A mérésekhez a 6. etetési alapkísérlet halaiból vettünk mintát a 21. héten a 0 és az 1.000 mgkg⁻¹ L-aszkorbinsavval kiegészített takarmánnyal táplált halakból. A gulonolakton oxidáz enzim jelenlétének és aktivitásának meghatározásához kivettük a C-vitamin előállításáért vélhetően felelős szerveket (máj és vese).

DABROWSKI (1990a) módosított *in-vitro* módszerét alkalmazva 1:4 arányban pH 7,4 foszfát pufferrel, Ultra-turrax segítségével homogenizáltuk a gulonolakton oxidáz enzimet tartalmazó szöveteket. Az extraktumhoz 0,4% végkoncentrációban ditioeritritolt adtunk és 1:1 arányban kevertük egy 5 mmol.l⁻¹ glutationt, 20 mmol.l⁻¹ gulonolakton, tartalmazó 0,1 mol.l⁻¹ foszfát pufferrel (pH 7,4). Az enzimreakciót 0, 30, 60 és 90 perc után perklórsavval leállítottuk, majd a 3.10.1. pontban ismertetett HPLC módszerrel határoztuk meg a keletkezett C-vitamin koncentrációját.

3.10.4. Methemoglobin tartalom mérése

A halak gerinc melletti vénájából heparinozott fecskendővel kb. 1 ml vért vettünk. A vér methemoglobin tartalmát rutin laboratóriumi módszerrel határoztuk meg.

3.10.5. Szövettani vizsgálatok

Szövettani vizsgálatokat az európai harcsa esetében végeztünk az 1. etetési alapkísérlet halaiból. A 0, 10, 100 és 1.000 mg.kg⁻¹ L-aszkorbinsavval etetett csoportokból vettünk kopoltyú, máj és gerincmetszet mintákat. A 10 %-os formalin oldatban tartósított szöveteket kutatási partnereink Olaszországban, Basilicata Tartomány Állami Egyetemének Állattani Tanszékén vizsgálták meg. A tartósított mintákat paraffinba ágyazták, majd Historange LK13 készülékkel 5 µm-es metszeteket készítettek, amelyeket ematoxillin-eosin festéssel fixáltak.

3.10.6. C-vitamin meghatározások spektrofotométerrel

A különböző természetben jelenlévő és/vagy iparilag előállított C-vitamin formák meghatározása az általunk kidolgozott és a 3.10.1. pontban ismertetett HPLC módszerrel nagy mintasorozatok esetében nem mindig volt alkalmazható, ezért kerestünk egy olyan spektrofotometriai módszert, amely nagy mintasorozatok esetében is alkalmazható. Legalkalmasabbnak DABROWSKI és HINTERLEITNER (1989) módszere bizonyult, mivel ezzel a kötött formában (szulfát, foszfát) levő aszkorbát észterek is meghatározhatók. A módszerrel lényegében négy kémiai reakció különböző kombinációinak alkalmazásával lehet az aszkorbátot egészen alacsony koncentrációban is meghatározni. A négy reakció a következő:

1. Az L-aszkorbinsavat a 2,6 diklór-fenol-indofenol (DCIP) L-dehidro-aszkorbinsavvá oxidálja.
2. Az L-dehidro-aszkorbinsav a 2,4-dinitro-fenil-hidrazinnal (DNPH) erősen savas közegben 524 nm-en abszorpció maximumot adó színreakciót ad.
3. A KBrO_3 erősen savas közegben szobahőmérsékleten hidrolizálja a dehidroaszkorbát 2. szénatomjához észter kötéssel kötődő ionokat (szulfát, foszfát).
4. A dehidro-L-aszkorbinsav 90 °C-on egy óra alatt teljesen elbomlik.

A méréshez szükséges reagensek, műszerek: L-aszkorbinsav; aszkorbát-2-szulfát (K_2 só); 2,4-dinitro-fenil-hidrazin, 2,6-diklór-fenol-indofenol (Sigma Co. St. Luis, Missouri, USA). A mérésekhez UNICAM UV4 UV/VIS spektrofotométert használtunk.

A minták fehérjementesítése: A mintákat 0,0000 g pontossággal lemértük és Ultra-turrax késes gyors-homogenizátorral 250 mmol l^{-1} HClO_4 -ben, amely 5 % triklór-ecetsavat tartalmazott fehérjementesítés céljából homogenizáltuk. A homogenizátumot 12.000 g-vel 30 percig centrifugáltuk, majd a felülúszót közvetlenül, vagy a fehérjementesítő oldattal hígítva használtuk a C-vitamin meghatározásokhoz.

C-vitamin meghatározás: A mintákat ezután öt részre (A, B, C, D, E sorozat) osztottuk, majd a 8. ábra szerint végeztük el a méréseket. Az eredményeket a következő módon értékeltük:

L-aszkorbinsav = A-C

L-dehiro-aszkorbinsav = C-D

Aszkorbinsav észterek = (B-E) – (A-D)

A HPLC-vel mért eredményekkel történő összehasonlíthatóság érdekében minden vizsgált szövettípusból (máj, vese, agy és izom) három ismétlésben mind a két módszerrel ugyanabból a mintából elvégeztük a méréseket. Az eredmények azt mutatták, hogy az eltérések 5-6 %-on belül maradnak, ezért az olyan sorozatmintáknál, ahol nem kellett az aszkorbát-2-szulfát és foszfát észtereket elkülönítenünk, a munka gyorsítása érdekében ezt a módszert használtuk.

A-sorozat	B-sorozat	C-sorozat	D-sorozat	E-sorozat
250 µl minta vagy 200 µl Std + 50 µl 5M HCl ↓ + 25 µl desztillált víz + 25 µl DCIP ↓ 1 óra szobahőmérsékleten ↓ +250 µl tiourea +250 µl DNPH ↓ 3 óra 60°C-on ↓ + 500 µl 18M H ₂ SO ₄ ↓ Spektrofotométer, 524 nm	250 µl minta vagy 200 µl Std + 50 µl 5M HCl ↓ + 25 µl DCIP ↓ 1 óra szobahőmérsékleten ↓ +25 µl KBrO ₃ ↓ 1 óra szobahőmérsékleten ↓ +250 µl tiourea +250 µl DNPH ↓ 3 óra 60°C-on ↓ + 500 µl 18M H ₂ SO ₄ ↓ Spektrofotométer, 524 nm	250 µl minta vagy 200 µl Std + 50 µl 5M HCl ↓ + 50 µl desztillált víz ↓ 2 óra szobahőmérsékleten ↓ +250 µl tiourea +250 µl DNPH ↓ 3 óra 60°C-on ↓ + 500 µl 18M H ₂ SO ₄ ↓ Spektrofotométer, 524 nm	250 µl minta vagy 200 µl Std + 50 µl 5M HCl ↓ 2 óra 90 °C-on ↓ + 25 µl desztillált víz + 25 µl DCIP ↓ 1 óra szobahőmérsékleten ↓ +250 µl tiourea +250 µl DNPH ↓ 3 óra 60°C-on ↓ + 500 µl 18M H ₂ SO ₄ ↓ Spektrofotométer, 524 nm	250 µl minta vagy 200 µl Std + 50 µl 5M HCl ↓ + 25 µl DCIP ↓ 1 óra szobahőmérsékleten ↓ +25 µl KBrO ₃ ↓ 1 óra szobahőmérsékleten ↓ 1 óra 90 °C-on ↓ +250 µl tiourea +250 µl DNPH ↓ 3 óra 60°C-on ↓ + 500 µl 18M H ₂ SO ₄ ↓ Spektrofotométer, 524 nm

8. ábra: C-vitamin formák koncentrációjának meghatározása a halak különböző szöveteiben (Dabrowski és Hinterleitner, 1989)

Megjegyzés: DCIP = diklór-fenol I-indofenol; DNPH = dinitro-fenil-hidrazin

3.10.7. Csontkollagén-tartalom meghatározás gravimetriásan

A méréseket mind a két halfaj esetében elvégeztük a 3. és a 4. etetési alapkísérlet 8. és 16. hetében. A kollagén tartalmat WILSON és POE (1973) módosított módszerével határoztuk meg. A halakat a mintavételt követően azonnal megöltük a fejre mért ütéssel, majd feldolgozásig $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk. A kollagén tartalom meghatározásához 10 percig főztük desztillált vízben, majd csipesszel gondosan eltávolítottuk a húst a csontokról. Ezután a csontokat 24 órára $0,1\text{ mol l}^{-1}$ NaOH oldatba helyeztük, majd a még rajtuk maradt inakat is eltávolítottuk. Ezt követően a csontokat $110\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on megszáritottuk, majd kávédarálóban finomra őröltük. Minden mintából kimértünk 500 mg -ot, $10\text{ ml } 0,1\text{ mol l}^{-1}$ NaOH oldatban jól elkevertük és 16 órá n át szobahőmérsékleten tartottuk, majd 3.000 g-n lecentrifugáltuk. A felülúszót kiöntöttük. Ezzel eltávolítottuk az oldható fehérjéket a csontokból. A megmaradt port ezután $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on 100 g l^{-1} EDTA oldatban rázattuk két napig az ásványi anyagok kioldása miatt. A maradékot átmostuk desztillált vízzel, majd acetonnal szárítottuk, végül egy órán át petroléter ($30\text{--}40\text{ }^{\circ}\text{C}$) etanol $1:1$ arányú elegyével extraháltuk a zsírokat. Az ily módon megmaradt kollagén frakciót $110\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on szárítottuk, majd lemértük.

3.11.8. Oxalát tartalom meghatározása a halak különböző szöveteiben

A meghatározás elve: Az oxalátot az oxalát-oxidáz enzim széndioxiddá és hidrogén-peroxiddá oxidálja. A hidrogén-peroxid színreakciót (indamin dye) ad a 3-metil-2-benzotiozolinonnal és 3-dimetilamino-benzoessavval. A keletkezett vegyület 590 nm -en mérhető.

A meghatározás kivitelezése:

A meghatározásokat a Sigma diagnostics oxalát KIT-je segítségével végeztük, annak mérési utasításai szerint. Mivel a KIT-et vizeletre fejlesztették ki, vese minták esetében a mintaoldó pufferben először homogenizáltuk a szöveteket ($1:1$) arányban, majd 3.000 g -vel centrifugáltuk. Ezt követően változtatás nélkül követtük a módszert. A gerinc porc szövetében az oxalát jelenlétét a halszeleteken mutattuk ki. Közvetlenül a gerinc köré cseppentettük a hígítatlan reagenseket (oxalát A és oxalát B), a 5. etetési alapkísérlet 100 (ebben az esetben kontroll) és 10.000 mg kg^{-1} L-aszorbinsavval táplált halaiból, a gerinc középvonalából vágott kb. 1 cm széles halszeleten. A színreakciót fényképen rögzítettük.

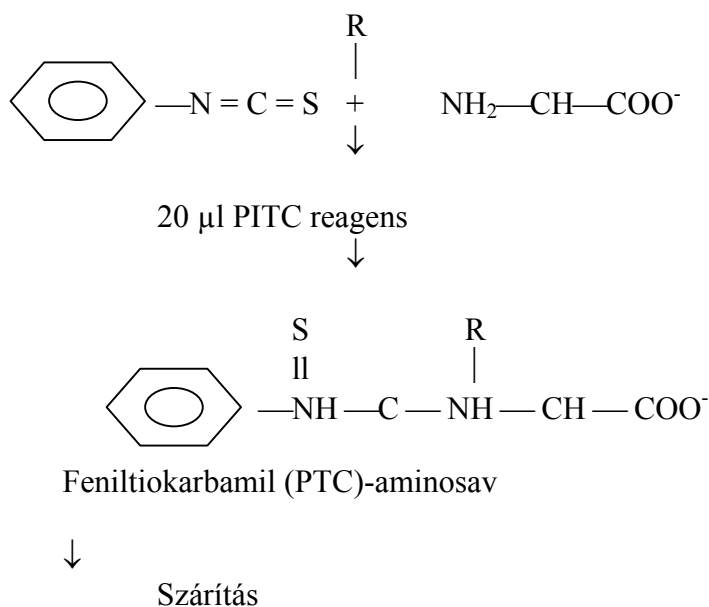
3.11.9. Aminosav-analízis HPLC-vel (Pico-tag módszer)

A minták aminosav összetételét és koncentrációját a Waters Co. által kifejlesztett és garantált Pico-Tag módszerrel határoztuk meg, amely három fő lépésből áll.

1. *A fehérjék hidrolízise:* A mintákat speciális készülékben (Pico-Tag Workstation), magas vákuumban (1-2 Torr) gőz állapotú 6 mol l^{-1} HCl-lel hidrolizáltuk majd HPLC minőségű desztillált vízzel eltávolítottuk a sósavat.

2. *Az aminosavak reagáltatása fenil-izotiocianáttal (PITC):*

A reakció a PITC és az aminosavak között az alábbiak szerint megy végbe:



3. *Aminosav meghatározás HPLC-vel:* A HPLC analízist fordított fázisú C18 oszlopon (Pico-Tag Free Amino Acids; $5 \mu\text{m}$, $3,9 \text{ mm} \times 3,0 \text{ cm}$) végeztük gradiens elúcióval a Waters leírása szerint. Az A eluens trietil-amin tartalmú nátrium-acetát puffer volt, amely 6% acetonitrilt tartalmazott, a B eluens acetonitril és HPLC minőségű desztillált víz 6:4 arányú elegye volt. Waters HPLC rendszerhez, amely két Waters 510-es pumpából, Rheodyne injektorból, 490 E többcsatornás UV detektorból és Maxima 820 szoftverből állt. A kromatogramokat 254 nm-en rögzítettük. Az eredményeket standard kromatogramok segítségével számoltuk.

3.11. Az adatok feldolgozása és az eredmények értékelése során alkalmazott statisztikai módszerek

Az adatfeldolgozás, ábrszerkesztés és statisztikai elemzés során a Microsoft Office programcsomag Excel 97 és a Sigma-Aldrich Co. Sigma-Plot 5 softvereit alkalmaztuk. A szignifikancia vizsgálatokat a Student's t teszttel végeztük. Az egyes kezelések és a mért értékek közötti összefüggések vizsgálatához a Pearson féle szorzatmomentum korrelációs együtthatójának négyzetét - r^2 - határoztuk meg.

A kromatogrammok értékelését a Hewlett-Packard Chromstation, illetve a Waters Co. Maxima 820-as szoftverjével végeztük.

4. VIZSGÁLATI EREDMÉNYEK ÉS AZOK ÉRTÉKELÉSE

4.1. C-vitamin meghatározás HPLC-vel

Mivel munkánk egyik fő célkitűzése az aszkorbát-2-szulfát jelenlétének, illetve biológiai aktivitásának tisztázása volt, MAUGLE (1993) módszeréből indultunk ki, mert ezzel kromatográfiásan szét lehetett választani az L-aszkorbinsavat (AS), az aszkorbát-2-foszfátokat (AMF és APF) és az aszkorbát-2-monoszulfátot (AMS). A foszfát kvalitatív meghatározását ún. „enzyme shifting”-el oldották meg, ami azt jelenti, hogy az aszkorbát-2-foszfátot L-aszkorbinsavvá hidrolizálták savas foszfátáz enzimmal és az AS csúcsalatti területének növekedéséből számolták ki a koncentrációját.

Az eredeti mérést takarmányokra dolgozták ki, ezért nem vették figyelembe sem az L-aszkorbinsav bomlékonyságát a halak szöveteiben, sem pedig azt, hogy a természetesen jelenlévő foszfátáz enzimek hidrolizálhatják az aszkorbát-2-foszfátot. A módszer nem tartalmaz háttérkorrekciót az esetleges zavaró, vagy együtt eluálódó összetevők levonásának érdekében és nem alkalmas a dehidro-L-aszkorbinsav mérésére sem.

Új analitikai megoldások

A minták előkészítéséhez kidolgoztunk egy olyan módszert (6. ábra), amelynek egy-egy részlépése az irodalmi összefoglalóban ismertetett C-vitamin meghatározások valamelyikében megtalálható ugyan, de az általunk használt kombinációban még senki sem alkalmazta.

Háttérkorrekcióként specifikus enzimreakciót alkalmaztunk. A pH 4,8-as nátrium-acetát pufferben extrahált minták teljes L-aszkorbinsav tartalmát (és csak az L-aszkorbinsav tartalmát) oxidáltuk aszkorbát-oxidáz enzimmal dehidro-L-aszkorbinsavvá, ami 254 nm-es hullámhosszon nem detektálható (9. ábra **A** jelű kromatogramm). Az L-aszkorbinsavat az eredeti extraktumban redukálószer nélkül határoztuk meg (9. ábra **B** jelű kromatogramm), a dehidro-L-aszkorbinsavat pedig sztöchiometrikusan tudtuk redukálni ditioeritritollal (DTE) L-aszkorbinsavvá (9. ábra **C** jelű kromatogramm).

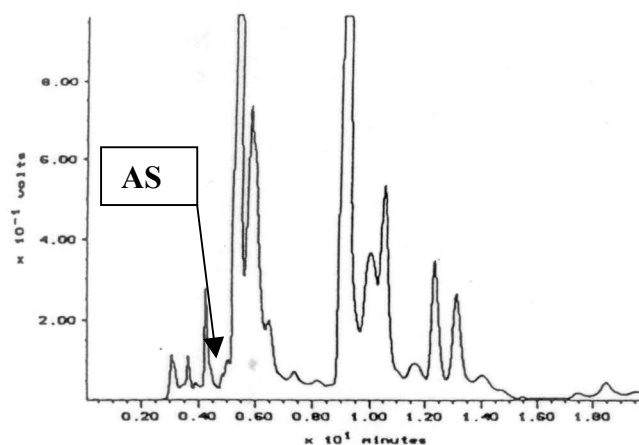
DABROWSKI és HINTERLEITNER (1989) háttérkorrekciót alkalmaztak spektrofotometriás módszerükben, de nem specifikus reakcióval, hanem 90 °C-on oxidálták a C-vitamint. Ditiotreitolt (DTT) használtak redukálószerként a klinikai kémiában vérmintákból

történő L-aszkorbinsav és dehidro-L-aszkorbinsav meghatározására UV-ben (MARGOLIS et. al. 1990), de nem vonták le a C-vitaminnal esetlegesen együtt eluálódó más vegyületeket. Az aszkorbát oxidáz enzimet is használták már HPLC módszerükben SPEEK et. al. (1984) az összes C-vitamin mérésére, de Ők az L-aszkorbinsavat is dehidro-L-aszkorbinsav formájában mérték *orto*-feniléndiaminnal, fluorimetriásan. A DHA-val esetleg együtt eluálódó csúcsok levonásához Ők sem alkalmaztak háttérkorrekciót.

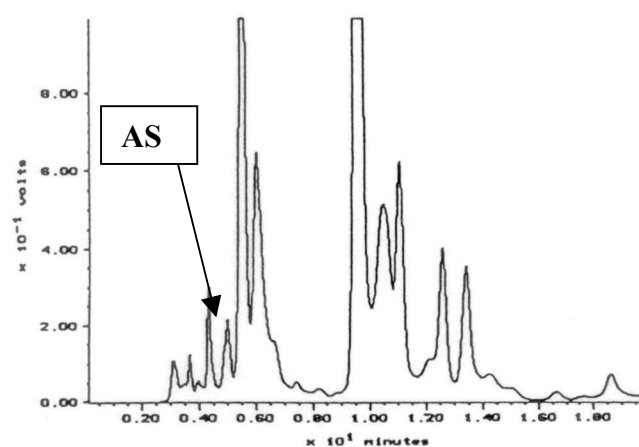
A takarmánymintákban az aszkorbát-2-foszfát tartalom meghatározás egyszerű savas-foszfátáz enzimreakcióval megoldható volt. A halszövet mintákban, a természetben is jelenlévő foszfátáz enzimek miatt egy külön lépést kellett alkalmazni az aszkorbát-2-mono/polifoszfátok jelenlétének kimutatására, mellyel a természetes enzimreakciót perklórsavval gyakorlatilag azonnal leállítottuk (10. ábra, **D** jelű kromatogramm). A minta egy másik részét savas foszfátáz enzimmal kezelve az aszkorbát-foszfát észtereket teljes egészében L-aszkorbinsavvá tudtuk alakítani a mennyiségi meghatározáshoz (10. ábra **E** jelű kromatogramm). Az aszkorbát-2-monoszulfátot nem tudtuk sem kémiai úton (K_2BrO_3), sem szulfátáz enzimmal kíméletesen elbontani. A hidrolízis ugyan biztosan működik erős kénsavas közegben, de ez károsítja a kromatográfiás oszlopot. Az aszkorbát-2 monoszulfátot ezért úgy határoztuk meg, hogy az összes C-vitamint tartalmazó mintához (**C** jelű kromatogramm) ismert mennyiségű AMS-t koinjektáltunk (11. ábra, **F** jelű kromatogramm). Ez az egyetlen C-vitamin forma, amelynél nem tudtunk háttérkorrekciót alkalmazni, de egyedül a 7. alapkísérletből származó bélminták kromatogrammaiban találtunk csúcsot az AMS helyén, ami csak a takarmányban biztosított aszkorbát-2-monoszulfátból eredhetett (11. ábra, **C** jelű kromatogramm).

Elválasztás, lineáris tartomány, reprodukálhatóság

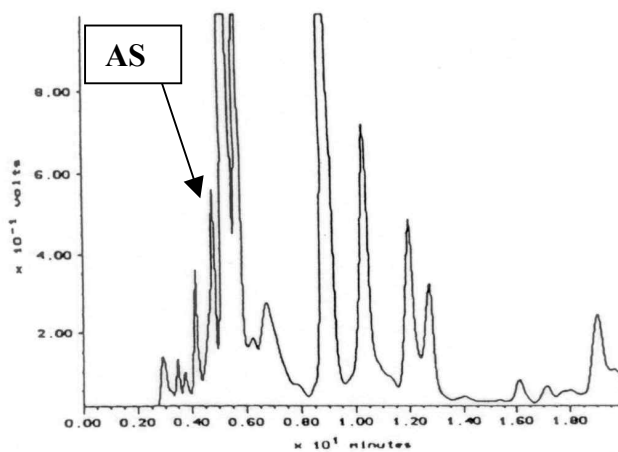
Az egyes C-vitamin formák a standard kromatogrammon jól elváltak egymástól. A standard oldatok koncentrációja lineáris összefüggést mutatott a kromatográfiás csúcsok területével L-aszkorbinsav esetében $1 \mu\text{gml}^{-1}$ és $50 \mu\text{gml}^{-1}$ ($r^2=0,994$), míg aszkorbát-2-monofoszfát, illetve aszkorbát-2-monoszulfát esetében $5 \mu\text{gml}^{-1}$ és $100 \mu\text{gml}^{-1}$ ($r^2=0,989$) között. Az egyes C-vitamin formák koncentrációjának reprodukálhatósága takarmánymintákhoz adagolva a következő volt: L-aszkorbinsav $95\pm 3,9$ %; dehidro-aszkorbinsav $89\pm 3,8$ %; aszkorbát-2-monofoszfát 96 ± 5 %; aszkorbát-2-monoszulfát 96 ± 5 %.



A



B



C

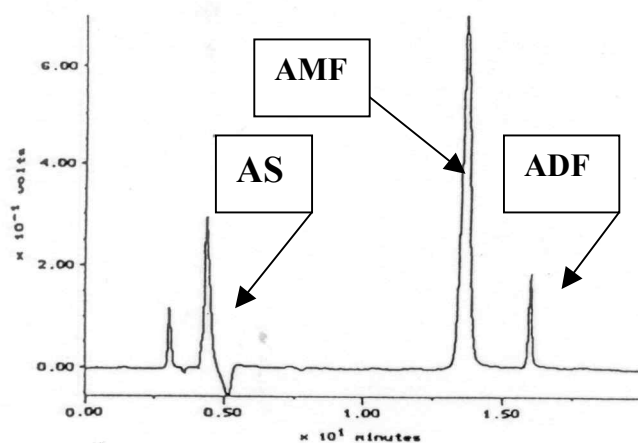
9. ábra: C-vitamin formák meghatározása HPLC-vel

Kromatogrammok: **A** = háttérkorrekció

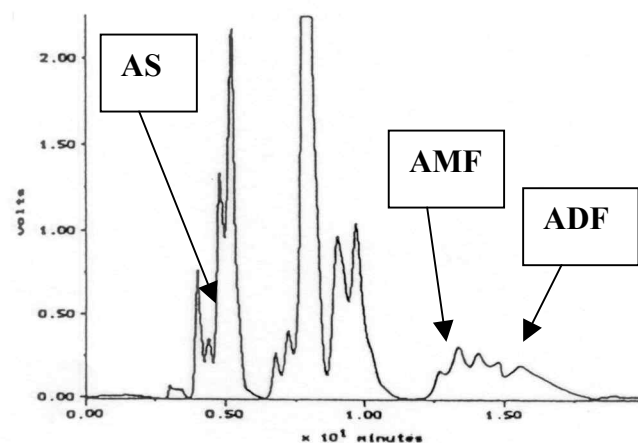
B = L-aszkorbinsav

C = L-aszkorbinsav + dehidro-L-aszkorbinsav

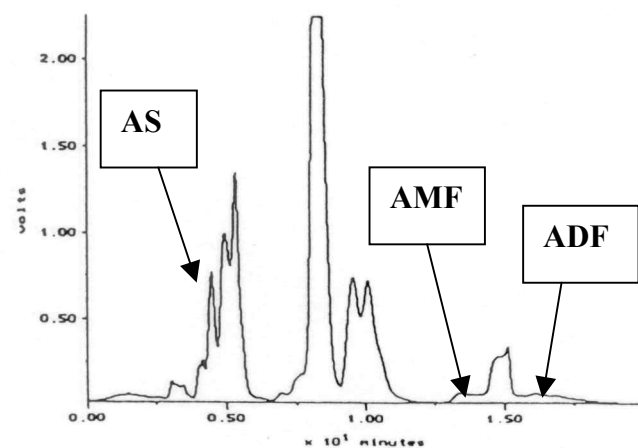
AS = L-aszkorbinsav csúcs



Standard



D



E

10. ábra: C-vitamin formák meghatározása HPLC-vel

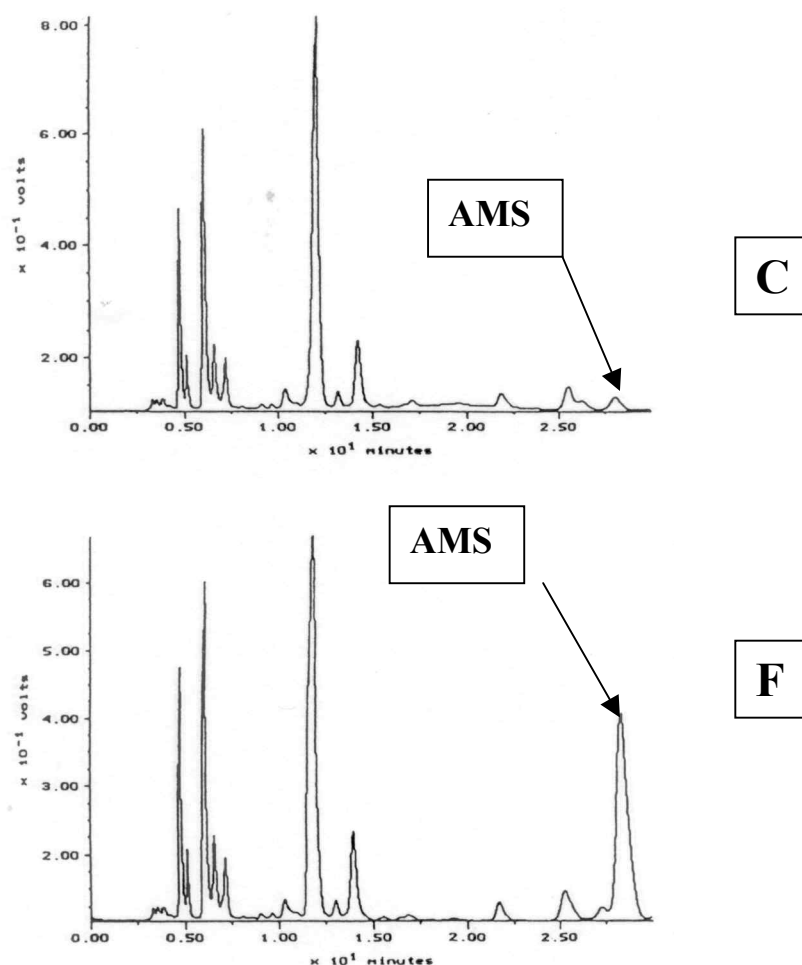
Kromatogrammok: **Standard:** AS= L-askorbinsav csúcs;

AMF= askorbát-2-monofoszfát csúcs;

ADF= askorbát-2-difoszfát csúcs

D = minta kromatogramm foszfatáz enzim reakció előtt

E = minta kromatogramm foszfatáz enzim reakció után



11. ábra. C-vitamin formák meghatározása HPLC-vel.

Kromatogrammok: AMS aszkorbát-2-monoszulfát
 C = minta kromatogramm AMS koinjektálás előtt
 F = minta kromatogramm AMS koinjektálás után

A módszer jellemzői

A minták jéghideg nátrium-acetátban történő extrahálása megfelelő védelmet nyújtott az L-aszkorbinsav gyors lebomlása ellen, ugyanakkor gyakorlatilag leállította a természetben jelenlévő foszfatáz enzimek működését, így az aszkorbát-2-foszfatok is mérhetőek maradtak. Az L-aszkorbinsav visszanyerése $93 \pm 4,3$ % volt. Az egyéb C-vitamin formákból 4-5 % veszett el az extrakció során. A kromatográfiás csúcsok tisztasága: L-aszkorbinsav 92 ± 5 %; aszkorbát-2-monofoszfát 95 ± 4 %; aszkorbát-2-monoszulfát 98 ± 2 %.

A különböző C-vitamin formák alsó kimutatási határa a mintákban: L-aszkorbinsav $0,50-5,00 \mu\text{g g}^{-1}$; aszkorbát-2-mono- és polifoszfát $1,00-5,00 \mu\text{g g}^{-1}$; aszkorbát-2-monoszulfát: $5,00-10,00 \mu\text{g g}^{-1}$.

4.2. A különböző C-vitamin formák emészthetősége és stabilitása a takarmányokban

4.2.1. Emészthetőség

A C-vitamin észterek hidrolízisét „*in vitro*” módszerrel vizsgáltuk az emésztőrendszer különböző szöveteinek homogenizátumából. A tanulmányozott halfajok (tok hibrid, európai harcsa, tengeri sügér és angolna) gyomrának, bélszakaszainak, májának és veséjének homogenizátuma az aszkorbát-2-monofoszfából L-aszkorbinsavat, azaz természetes C-vitamint szabadított fel (6. táblázat). Hasonló eredményre jutottak szivárványos pisztrágnál (DABROWSKI et. al., 1990b) és az atlanti lazacnál (SANDNES és WAAGBØ, 1991).

A vizsgált halfajok egyetlen szövetének kivonata sem volt képes azonban hidrolizálni az aszkorbát-2-monoszulfátot. Mivel a kivonat pH-ja 7,2 volt, ami gyakorlatilag azonos a bélnedvékével, valószínűsíthető, hogy az élő halak sem tudják bélrendszerükben lebontani az iparilag előállított AMS-t. Más kutatók atlanti lazacnál sem tudtak szulfatáz enzimaktivitást kimutatni (SANDNES és WAAGBØ, 1991). A szivárványos pisztráng emésztőrendszerében pedig DABROWSKI et. al. (1992b) „*in vitro*” módszerekkel elhanyagolható mértékű aszkorbát szulfohidroláz enzimaktivitást talált.

6. táblázat: Különböző halfajok különböző szöveteinek aszkorbát-2-foszfát hidrolizáló képessége a keletkezett L-aszkorbinsavban kifejezve ($\mu\text{g}_{\text{ASg}_{\text{szövet}}^{-1}\text{h}^{-1}}$)

Hal	Bél 1.sz	Bél 2.sz	Bél 3.sz	máj	vese
Tok hibrid	383±43	343±40	286±4	363±60	505±81
	Gyomor	Bél 1.sz.	Bél 2.sz.		
Eu. harcsa	160±12	750±60	830±72	770±57	nm
Angolna*	230	670	780	540	nm
		Pilorusz	Bélcsat.		
Tengeri sügér	266±5	795±14	1024±69	630±54	267±6

Megjegyzés: n=3; * Egy halból vettünk mintát; nm = nem mértük

4.2.2. Stabilitás

Az egyes C-vitamin formák stabilitását önálló kísérletben nem vizsgáltuk. Az általunk alkalmazott tápokban azonban rendszeresen visszamértük az alkalmazott C-vitamin forma koncentrációját. Ha az L-aszkorbinsavval kiegészített tápok -18 °C-on maximum 2-3 napig tároltuk, nem veszítettek 5-6 %-nál többet aszkorbát tartalmukból. Nem volt mérhető vesztesége a takarmányokban az aszkorbát-2-foszfátoknak. A C-vitamin formák bevitelére alkalmazott spray technikával méréseink szerint $\pm 8-10\%$ -os homogenitást tudtunk biztosítani a takarmányokban.

4.3. A C-vitamin és formáinak hatása a halak növekedésére, mortalitására és a skorbut kialakulásának megjelenésére

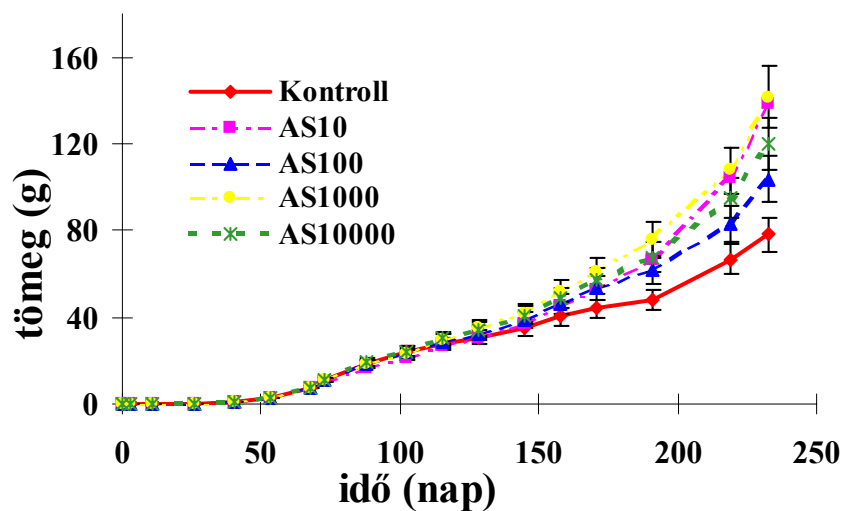
4.3.1. Az európai harcsa (*Silurus glanis* L.)

A különböző 0, 10, 100, 1.000 és 10.000 mgkg⁻¹ L-aszkorbinsav koncentrációjú takarmányokon nevelt halak az 1. alapkísérlet 12. hetéig nem mutattak szignifikáns ($p < 0,05$) eltérést növekedésükben. A 12. hetet követően a megközelítőleg C-vitamin-mentes táppal etetett halak átlagtömege már kisebb volt az L-aszkorbinsavval bármilyen koncentrációban kiegészített takarmányon nevelt harcsák átlagtömegénél, de ez a különbség még nem volt szignifikáns.

A kontroll csoportok halainak mintegy 20 %-ánál ekkor jelentek meg a skorbut kezdeti tünetei is, ami elsősorban a száj és a kopolyúfedők szélének kisebesedésével, vérzékenységével jelentkezett. Nem volt lényeges különbség a halak mortalitásában, ami elhanyagolható mértékű volt. A kontrollcsoport növekedésének elmaradása a tőbbitől a 15. héten már szignifikáns ($p < 0,05$) volt (12. ábra).

A mortalitás jelentéktelen volt a C-vitaminnal etetett csoportoknál ($> 5\%$), a megközelítően aszkorbátmentes tápon nevelt halaknak is csak a 10-15 %-a pusztult el a kísérlet 21. hetéig. A skorbut makroszkopikus jelei a 16. héten a kontrollcsoportok halainak 80 %-ánál jól láthatóak voltak. A száj körül és belsejében jelentkező vérzések gátolták a halakat táplálkozásukban, így étvágyuk csökkent, mozgásuk lassult. A kopolyúfedőn és a has alsó részén is több helyen talákoztunk kisebb nagyobb kiterjedésű hólyagos, vagy horzsolásszerű sebekkel (4. kép). Néhány hal már mutatta a

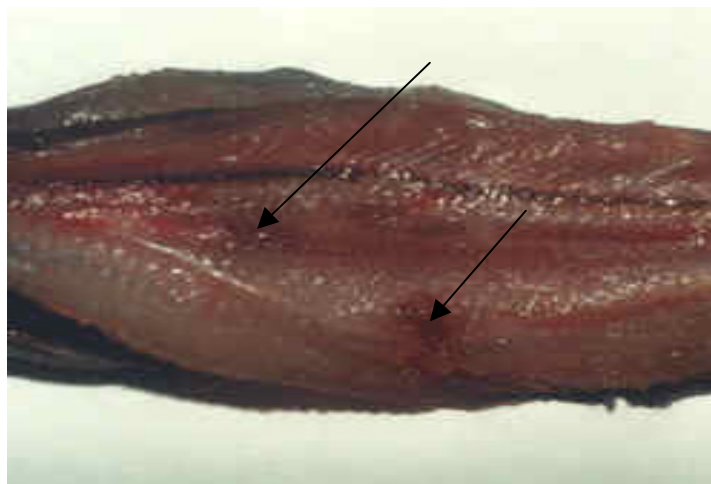
lordozis és scoliosis jeleit is. A halak boncolása során találtunk egy-két olyan egyedet is, amelynek izomzatában több helyen bevérzést tapasztaltunk (5. kép).



12. ábra: Az európai harcsa (*Silurus glanis* L.) növekedése különböző L-askorbinsav kiegészítést tartalmazó takarmányok etetésének hatására



4. kép: A skorbut tünetei az európai harcsa (*Silurus glanis* L.) szája körül és a bőrön

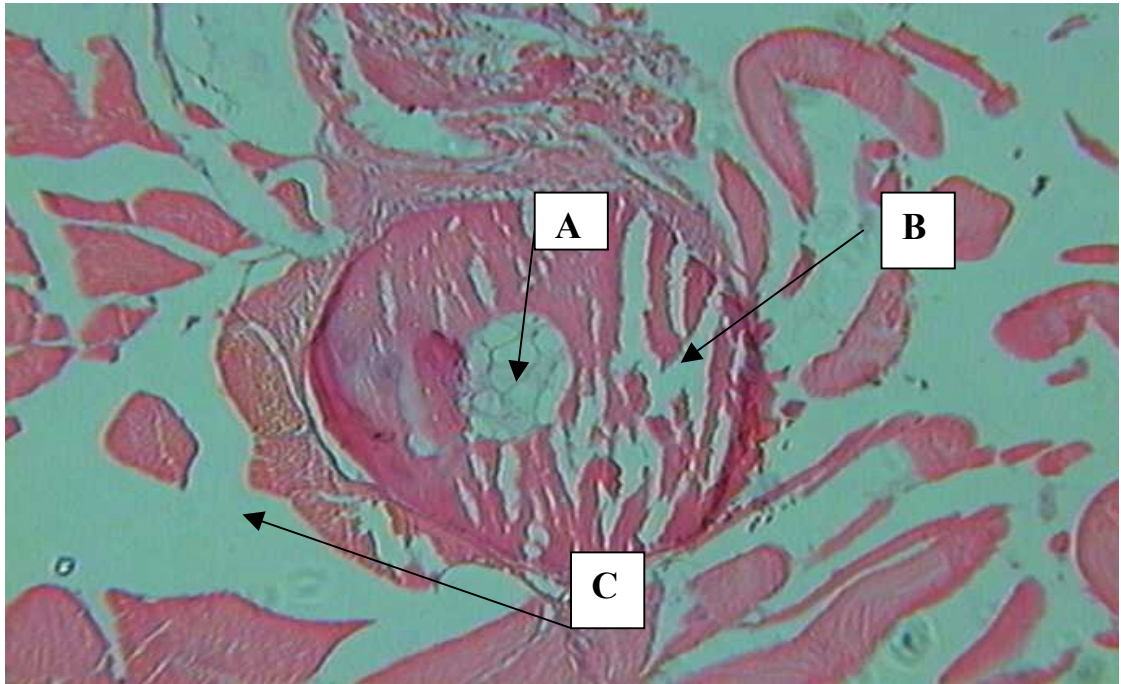


5 kép: A skorbut jelei az európai harcsa (*Silurus glanis* L.) izomzatában

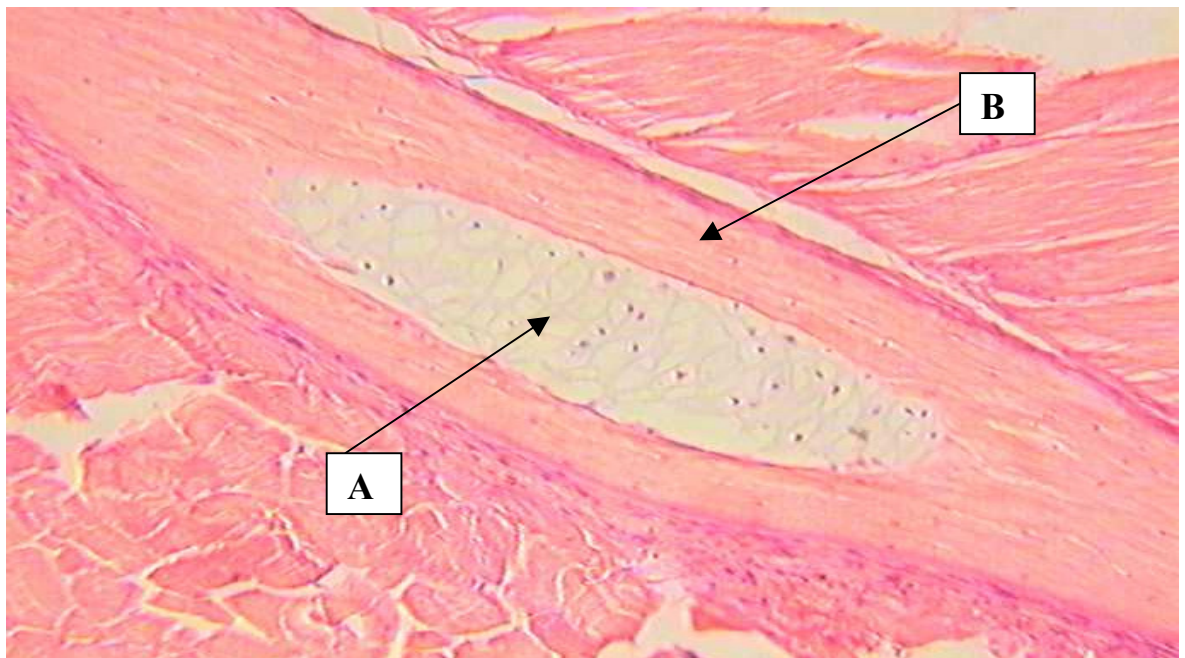
Egy-két halat találtunk, amely mutatta a skorbut néhány tünetét - kisebb sebeket a száj körül - a 10 mgkg^{-1} L-aszkorbinsav tartalmú táppal etetett csoportok egyedei között is.

A kísérlet 18. hetében, amikor a kontrollcsoport 100 %-a mutatta a skorbut makroszkopikus tüneteit, minden csoportból mintákat vettünk szövettani vizsgálatokra. A C-vitamin-mentes takarmányon nevelt harcsák kopolyúlemezeinek porcos része a pisztránghoz hasonlóan (MEIER és WAHLI, 1990), erősen duzzadt és deformálódott volt, a sejtekben nagyszámú vízzel telt sejtüreget és pontszerű bevérzést találtunk. A kopolyúlemezek nem torzultak el a 10 , 100 és 1.000 mgkg^{-1} L-aszkorbinsavval etetett halak esetében, de kevés pontszerű bevérzéssel itt is találkoztunk. Enyhén torzultak voltak az 1.000 mgkg^{-1} C-vitaminnal takarmányozott csoport kopolyúlemezei.

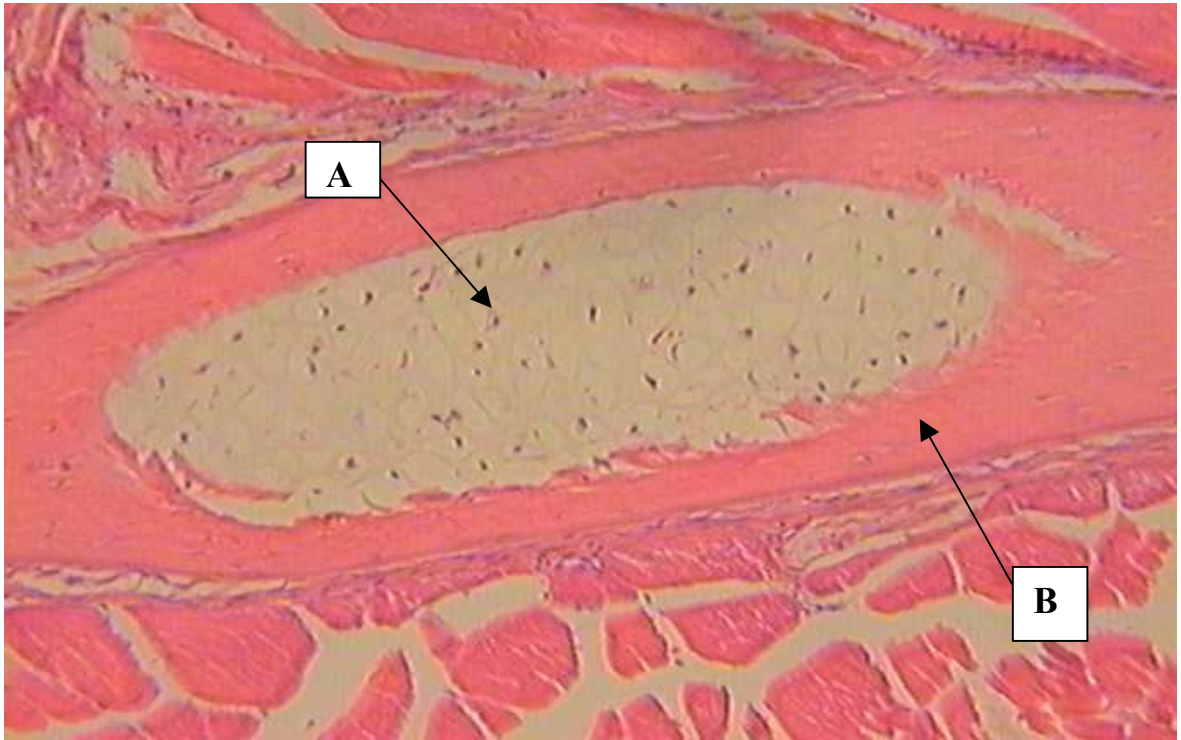
A legszembetűnőbb különbségeket a gerinc porcszöveteinek elemzésekor találtuk. A kontrollcsoport metszetén a legkülönbözőbb deformitások láthatók (13. ábra). Új sejteket alig találtunk és a meglévőkből is vagy hiányzik a sejtmag, vagy pedig a sejtfal mentén található (A). A rostok erősen töredezetek (B), nagy folyadékkal telített üregek találhatók közöttük (C). A 10 mgkg^{-1} L-aszkorbinsavval táplált csoport esetében már szabályosan kialakult rostokat figyelhettünk meg (14. ábra B), de az új sejtek között még mindig sok volt a sejtmag nélküli (14. ábra A). A 100 mgkg^{-1} C-vitaminnal takarmányozott halak porcszövetei mutatták a legszabályosabb mikroszkopikus képet (15. ábra).



13. ábra: A 0 mgkg^{-1} L-aszkorbinsav-tartalmú tápon nevelt európai harcsa (*Silurus glanis* L.) porcszövetének mikroszkopikus képe



14. ábra: A 10 mgkg^{-1} L-aszkorbinsavval táplált európai harcsa (*Silurus glanis* L.) porcszövetének mikroszkopikus képe



15. ábra: A 100 mgkg⁻¹ L-aszkorbinsavval táplált európai harcsa (*Silurus glanis* L.) porcszövetének mikroszkopikus képe

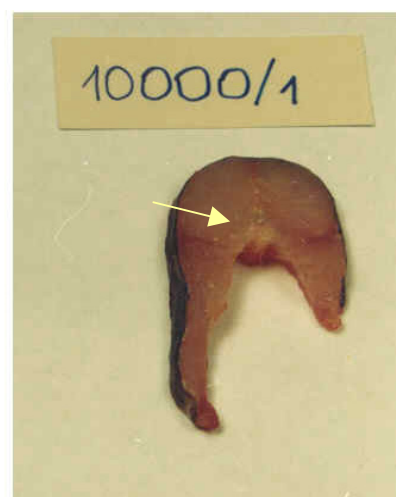
Nem várt torzulást mutatott azonban az 1.000 mgkg⁻¹ csoport porcszövege. Az új sejtek fala sérült, gyakran hiányzik (A), a rostok pedig sokkal tömörebbek (B), mint az alacsonyabb L-aszkorbinsav-tartalmú táppal etetett halaké (16. ábra). A sejtközzötti folyadék mennyisége is megnőtt.

Feltételezésünk szerint a szövetekben található torzulásokat a C-vitaminból keletkező oxalátok okozhatták, ami a hosszú ideig tartó nagy aszkorbát-terhelés következménye lehet. Ehhez hasonló eredménnyel nem találkoztunk a szakirodalomban. C-vitamin túltáplálás esetében csak a vesekő kialakulását írják le (MOSER, 1990). TOLBERT et. al. (1975) szerint azonban a C-vitamin lebomlása során a szervezetben oxalátok keletkeznek, ezért az 5. etetési alapkísérlet során mértük a vese és a gerincvonal közelében lévő szövetek oxalát-tartalmát is. A vesében 0,52±0,05 mmolg⁻¹ koncentrációban találtunk oxalátot a 0, AS10, AS100 és a C-vitamin polifoszfáttal kezelt csoportoknál. Az 1.000 és 10.000 mgkg⁻¹ L-aszkorbinsav kiegészítéssel táplált halaknál a mért koncentráció szignifikánsan ($p<0,05$) magasabb volt, 0,80±0,07 mmolg⁻¹. Közvetlenül a gerincre csepegtetett reagensekkel ki tudtuk mutatni az oxalát

jelenlétét az 1.000 és 10.000 mgkg^{-1} L-aszkorbinsavval takarmányozott halaknál. A 6. képen ezt nagyon halvány kék színű reakció mutatja a gerincben. Az oxalát koncentrációját nem sikerült megmérnünk a rendelkezésre álló módszerrel, mert az a porcszövet extraktumában a kimutatási határ alatt maradt.



16. ábra: Az 1.000 mgkg^{-1} L-aszkorbinsavval táplált európai harcsa porcszövetének metszete



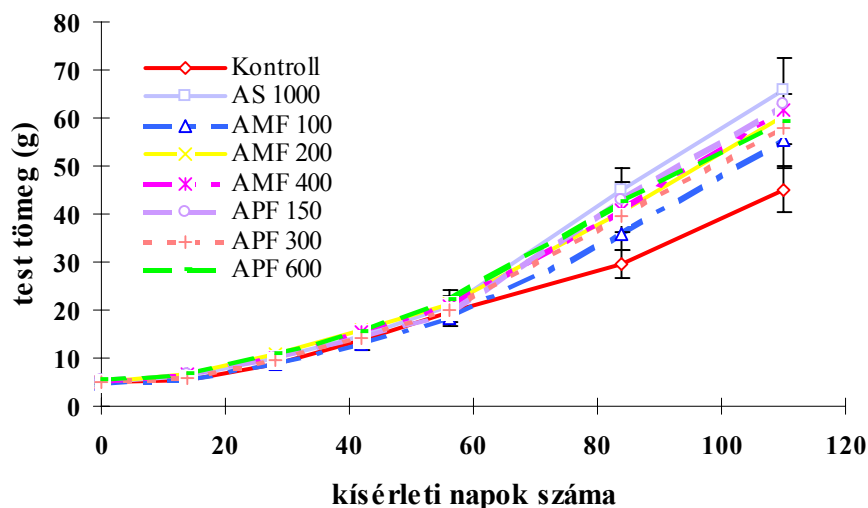
6. kép: Oxalát kimutatása az európai harcsa gerincének porcszövetében

Eredményeink alapján valószínűsíthető, hogy a korábban már kimutatott kötőszöveti károsodást a C-vitamin túladagolás miatt keletkező, optimális C-vitamin ellátás esetén

elhanyagolható mennyiségű lebomlási termék, oxálsav vagy ennek valamilyen sója okozza.

A 2. alapkísérletben az aszkorbát-2-mono- és polifoszfát hatását vizsgáltuk az európai harcsa növekedésére. A kezdetben 9-10 g átlagtömegű halak kontrollcsoportjának növekedése a 15. héten már szignifikánsan alacsonyabb volt az összes többi (AS1000, AMF100, 200 és 400, valamint APF150, 300 és 600) csoportnál (17. ábra).

A kétféle aszkorbát-2-foszfát koncentrációit úgy állítottuk be, hogy azok aszkorbátszintje egyenértékű legyen egymással. A kontrollcsoport a 15. hétre már mutatta a skorbut makroszkopikus jeleit. Míg az aszkorbátmentes takarmányon nevelt halak mortalitása közel 40 %-os volt, addig az összes, C-vitaminnal kiegészített táppal etetett csoport 5-10 %-a pusztult el a kísérlet negyedik hónapjának végére. Eredményeinkhez hasonlóan az aszkorbátmentes tápokon nevelt más halfajok is változatos képet mutatnak mortalitásukban. Tilápiánál már nyolchetes kísérlet során elpusztult a halak 40 %-a (SOLIMAN et. al., 1986), tengeri sügérnél 10 hónapig tartó skorbutikus takarmányozás eredményezett 35 %-os elhullást.



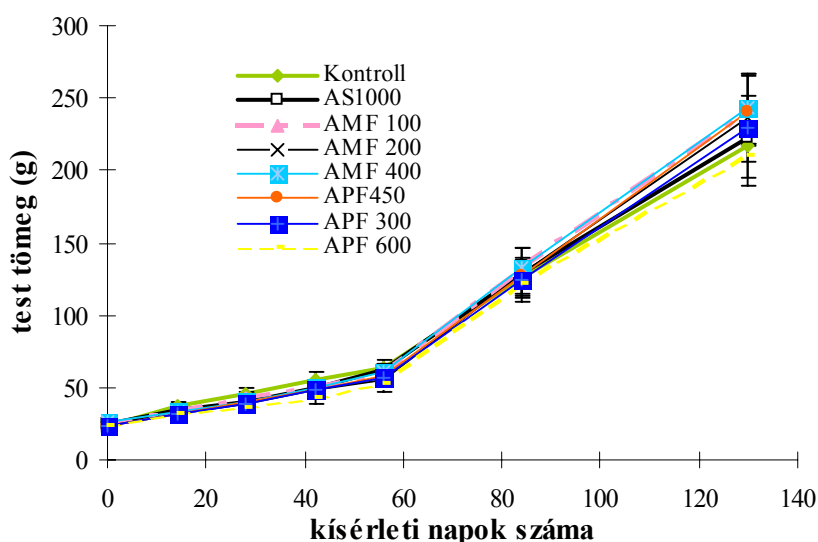
17. ábra: Az európai harcsa (*Silurus glanis* L.) növekedése különböző formájú és koncentrációjú C-vitaminnal kiegészített tápok hatására

Megjegyzés: AS= L-aszkorbinsav; AMF = aszkorbát-2-monofoszfát; APF = aszkorbát-2-polifoszfát

A kísérlet bizonyította, hogy a stabil aszkorbát-2-foszfátok C-vitamin aktivitása más halfajokhoz (csatorna harcsa, pisztráng stb.) hasonlóan (ROBINSON et. al., 1989; DABROWSKI et. al., 1994; O'KEEFE, 2001) megfelelő az európai harcsa számára.

4.3.2. A tok hibrid (*Acipenser ruthenus* L. x *Acipenser baeri* Brandt)

A C-vitamin hatását a tok hibrideken a 4. alapkísérlet halain vizsgáltuk. A halak növekedésében szignifikáns különbségeket nem tapasztaltunk függetlenül az alkalmazott 0 és 1.000 mgkg⁻¹ L-aszkorbinsavval; 100, 200, és 400 mgkg⁻¹ aszkorbát-2-monofoszfáttal; 150, 300 és 600 mgkg⁻¹ aszkorbát-2-polifoszfáttal kiegészített takarmánytól (18. ábra). Nem jelentkeztek a skorbut makroszkopikus jelei és nem volt különbség a mortalitásban sem. A halak mozgása, étvágya nem mutatott különbségeket. Eredményeink alapján következtetni lehetett arra, hogy a tok hibrid szintetizálja az L-aszkorbinsavat, ezért nem igényel C-vitamin kiegészítést takarmányában. Ez az eredményünk több közlemény más halfajokra vonatkozó megállapításaival is megegyezik (DABROWSKI, 1994; FRACALOSSO et. al., 2001).



18. ábra: A tok hibrid (*Acipenser ruthenus* L. x *Acipenser baeri* Brandt) növekedése különböző formájú és koncentrációjú C-vitaminnal kiegészített tápok etetése során

Megjegyzés: AS= L-aszkorbinsav; AMF = aszkorbát-2-monofoszfát; APF = aszkorbát-2-polifoszfát

4.4. A vizsgált halfajok C-vitamin tárolási képessége

4.4.1. Különböző olasz farmokról származó halfajok C-vitamin státusza

A különböző halfajok C-vitamin tárolási képességének vizsgálatához Olaszországban néhány farmról vettünk mintákat. Vizsgáltuk a halak egyes szöveteinek (agy, máj, vese és izom) és a takarmánynak a C-vitamin státuszát. A C-vitamin meghatározások HPLC-vel történtek. Az eredményeket a 7. táblázatban foglaltuk össze.

7. táblázat: Különböző halfajok néhány szervének és az alkalmazott takarmánynak C-vitamin státusza

Faj	Farm	Minta	TAS (μgg^{-1})	AS (μgg^{-1})	DHA (μgg^{-1})	AMF (μgg^{-1})	AMS (μgg^{-1})
Tengeri sügér	Il Padule	táp	12,20	-	-	71,88	nd
		máj	52,99±18,69	-	-	7,21±2,54	nd
		vese	32,65	-	-	nd	nd
		agy	142,2±27,12	-	-	nd	nd
		izom	6,20±0,92	-	-	nd	nd
	Voto	táp	27,10	27,10	nd	343,9	nd
		máj	30,84±10,55	24,32±1,83	8,11±1,56	12,56±6,11	nd
		agy*	84,10	66,52	17,58	nd	nd
		izom*	4,17	4,17	n.d.	nd	nd
Szivárványos pisztráng	Mandelli	táp	441,8	-	-	nd	nd
		máj	128,8±30,76	-	-	nd	nd
		izom	16,38±8,35	-	-	nd	nd
	Bussi	táp	71,32	-	-	66,88	nd
		máj	122,8±8,72	-	-	nd	nd
		vese	37,57±15,76	-	-	26,62±14,12	nd
		agy	184,8±21,83	-	-	nd	nd
		izom	15,54±5,65	-	-	nd	nd
Európai angolna	Vallio I	táp	33,26	-	-	88,69	nd
		máj	37,26±7,81	-	-	4,31±1,07	nd
		izom	26,11±6,23	-	-	nd	nd
	Vallio II	táp	329,3	-	-	34,37	nd
		máj	35,42±6,01	-	-	4,31±1,07	
		izom	19,77±8,71	-	-	nd	nd

Megjegyzés: n=4; * összevont minta négy halból; nd = nem detektálható a koncentráció < $1\mu\text{gg}^{-1}$ AS;

- nem mértük; TAS = összes természetes C-vitamin; AS = L-aszkorbinsav; DHA = dehidro-aszkorbinsav;

AMF = aszkorbát-2-monfoszfát; AMS = aszkorbát-2-monoszulfát

A 7. táblázatban látható, hogy aszkorbát-2-monoszulfátot egyetlen halfaj egyetlen szervéből sem tudtunk kimutatni, ami nem egyezik FELTON és HALVER (1987) megállapításaival, miszerint a pisztráng képes a C-vitamint szulfát formában tárolni. Eredményeink azonban hasonlóak DABROWSKI és HINTERLEITNER (1989) megfigyeléseihez, melyek szerint pl. a bodorka és a pisztráng sem tárolja ily módon szervezetében a C-vitamint. A takarmányokban jelenlévő aszkorbát-2-monofoszfátot több esetben ki tudtuk mutatni a halak veséjéből és májából, de az AMF koncentráció mindig lényegesen alatta maradt az összes C-vitamin tartalomnak. Ennek oka egyértelműen az lehet, hogy a bélcsatornában jelenlévő savas foszfátáz enzimek a táp AMF tartalmának nagy részét hidrolizálják, még annak felszívódása előtt.

4.4.2. Az európai harcsa szöveteinek C-vitamin státusza

Az európai harcsa C-vitamin tárolási képességét vizsgáltuk az öt hónapig tartó 1. etetési alapkísérlet végén az izomban, a vesében, a májban és az agyban, valamennyi csoport esetében. A 8. táblázat a különböző szövetek záró mintavételkor mért C-vitamin státuszát mutatja be, amelyet HPLC-vel mértünk. A máj összes C-vitamin tartalma viszonylag szoros összefüggést mutatott a takarmány L-aszkorbinsav koncentrációjával ($r^2=0,886$). Ennél még szorosabb összefüggést talált a takarmány és a csatorna harcsa májának L-aszkorbinsav koncentrációja között ($r^2=0,997$) EL NAGGAR és LOVELL (1991).

Az izomban az összes C-vitamin koncentráció emelkedett a takarmány AS koncentrációjával, de ez az összefüggés nem volt lineáris ($r^2=0,362$). A vesében a májhoz hasonlóan sokkal alacsonyabb összes aszkorbát-tartalmat mértünk az AS10 csoport halainál. A mért értékek nem mutattak összefüggést ($r^2=0,502$) a takarmány aszkorbát koncentrációjával.

Az AS10 csoport halainak agyában is kisebb az összes C-vitamin tartalom, de aránya a magasabb aszkorbát szintű csoportokéhoz képest nagyobb volt, mint azt a májnál, vagy vesénél mértük. Az agyban nem emelkedett meg kiugróan a pillanatnyi aszkorbát koncentráció még az AS10000 csoportnál sem. A takarmány L-aszkorbinsav tartalma és az agy összes C-vitamin koncentrációja között sem volt szoros összefüggés ($r^2=0,510$).

Eredményeinkből megállapítható az is, hogy a különböző szövetekben a C-vitamin jórészt redukált, tehát L-aszkorbinsav formában van jelen, kivételt csak a vese képez,

ahol a 100 mgkg⁻¹ és az 1.000 mgkg⁻¹ csoportban magasabb a DHA tartalom az AS tartalomnál. Sehol nem találtunk sem foszfát, sem pedig szulfát formában jelenlévő C-vitamint.

A 2. etetési alapkísérlet 12. hetében mértük az L-aszkorbinsavval, valamint különböző szinten aszkorbát-2-mono- és polifoszfátokkal táplált európai harcsa egyes szöveteinek (vese, máj agy) C-vitamin státuszát. Valamennyi szerv pillanatnyi összes C-vitamin koncentrációja valamilyen szinten összefüggést mutatott a táp aszkorbát koncentrációjával. Legszorosabb összefüggésben a vesé összes aszkorbát tartalma volt a tápokéval, ahol az $r^2_{AMF} = 0,980$ és az $r^2_{APF} = 0,947$. Kisebb összefüggést találtunk a máj ($r^2_{AMF} = 0,852$ és $r^2_{APF} = 0,782$), valamint az agy ($r^2_{AMF} = 0,761$ és az $r^2_{APF} = 0,666$) aszkorbát koncentrációja és a takarmányok C-vitamin tartalma között.

8. táblázat: Az európai harcsa (*Silurus glanis* L.) különböző szerveinek C-vitamin státusza

Csoport	C-vitamin	Kontroll	AS10	AS100	AS1000	AS10000
Nap	forma	μgg^{-1}	μgg^{-1}	μgg^{-1}	μgg^{-1}	μgg^{-1}
160	Izom					
	AS	nd	2,20 ± 0,20	3,37 ± 0,46	4,47 ± 0,32	5,14 ± 0,41
	DHA	nd	1,32 ± 0,07	2,13 ± 0,20	2,34 ± 0,19	2,58 ± 0,23
	TAS	nd	3,52 ± 0,13	5,50 ± 0,62	6,81 ± 0,50*	7,72 ± 0,37
	AMF	nd	nd	nd	nd	nd
	AMS	nd	nd	nd	nd	nd
160	Máj					
	AS	nd	10,93 ± 2,19	93,64 ± 15,91	202,2 ± 36,36	389,2 ± 97,30
	DHA	nd	3,38 ± 0,68	35,38 ± 6,01	53,60 ± 9,65	213,3 ± 53,31
	TAS	nd	14,31 ± 2,86	129,0 ± 1,91	255,8 ± 45,90	602,6 ± 150,2
	AMF	nd	nd	nd	nd	nd
	AMS	nd	nd	nd	nd	nd
160	Vese					
	AS	nd	3,15 ± 1,69	7,79 ± 4,89	4,68 ± 2,27	83,69 ± 8,90
	DHA	nd	3,89 ± 2,53	72,50 ± 19,20	53,22 ± 17,00	22,73 ± 3,03
	TAS	nd	7,04 ± 2,59	80,29 ± 22,12	57,91 ± 18,30	106,4 ± 9,01
	AMF	nd	nd	nd	nd	nd
	AMS	nd	nd	nd	nd	nd
160	Agy					
	AS	nd	50,41	55,21	54,67	99,91
	DHA	nd	6,84	29,27	18,65	23,37
	TAS	nd	57,24	84,47	73,32	123,3
	AMF	nd	nd	nd	nd	nd
	AMS	nd	nd	nd	nd	nd

nd =nem detektálható, azaz a koncentráció < 1,00 μgg^{-1} , izom esetében < 0,50 μgg^{-1}

Amint az a 9. táblázatból látható, az oxidált C-vitamin-forma, a dehidro-L-aszkorbinsav koncentrációja a májban és az agyban többnyire alacsonyabb, mint az L-aszkorbinsavé, kivételt képez a kontroll agyminta. A DHA abszolút koncentrációja azonban még magasabb is, mint a C-vitaminnal jól ellátott csoportoké. Ez a jelenség azzal magyarázható, hogy az agyban lejátszódó fontos biokémiai folyamatokhoz a

szervezet még hiány esetében is biztosítja a C-vitamint. Hasonló eredményre jutott DABROWSKI et. al. (1990b) és MATUSIEWICZ et. al. (1995) is a szivárványos pisztráng esetében.

Egyik vizsgált szervben sem találtunk aszkorbát-2-monoszulfátot. A takarmányban biztosított C-vitamin-foszfát formák viszont megjelennek a vesében és a májban is. Eredményeink nagyságrendileg is megegyeznek néhány kutató több halfaj, mint pl. EL NAGGAR és LOVELL (1991) a csatorna harcsa, valamint DABROWSKI et. al. (1994) a szivárványos pisztráng esetében mért értékeivel. Nem találtunk azonban aszkorbát-foszfátot az agyban. Ez utóbbi jelenség valószínűleg a vér-agy gát működésével magyarázható.

4.4.3. A szövetek összes aszkorbát koncentrációjának változása különböző C-vitamin szintű és formájú takarmányok hatására az európai harcsánál

A 19. ábrán az összes aszkorbát koncentráció változását mutatjuk be az európai harcsa szerveiben (máj, vese, agy) az 1. alapkísérlet 0, 10, 100, 1.000 és 10.000 mgkg⁻¹ L-aszkorbinsav tartalmú tápokkal etetett halainál. Különböző aszkorbát szinteken telítődött a máj az AS10, AS100, és AS1000 csoportoknál C-vitaminnal a kísérlet 8-10. hete között. A 10 mgkg⁻¹ L-aszkorbinsavval takarmányozott halak májában a többiekéhez képest rendkívül alacsony maradt az összes AS tartalom. Kiugróan magas, 600 µgg⁻¹ összes C-vitamin koncentrációt találtunk az AS10000 csoport halainál záró mintavételkor, a 23. héten.

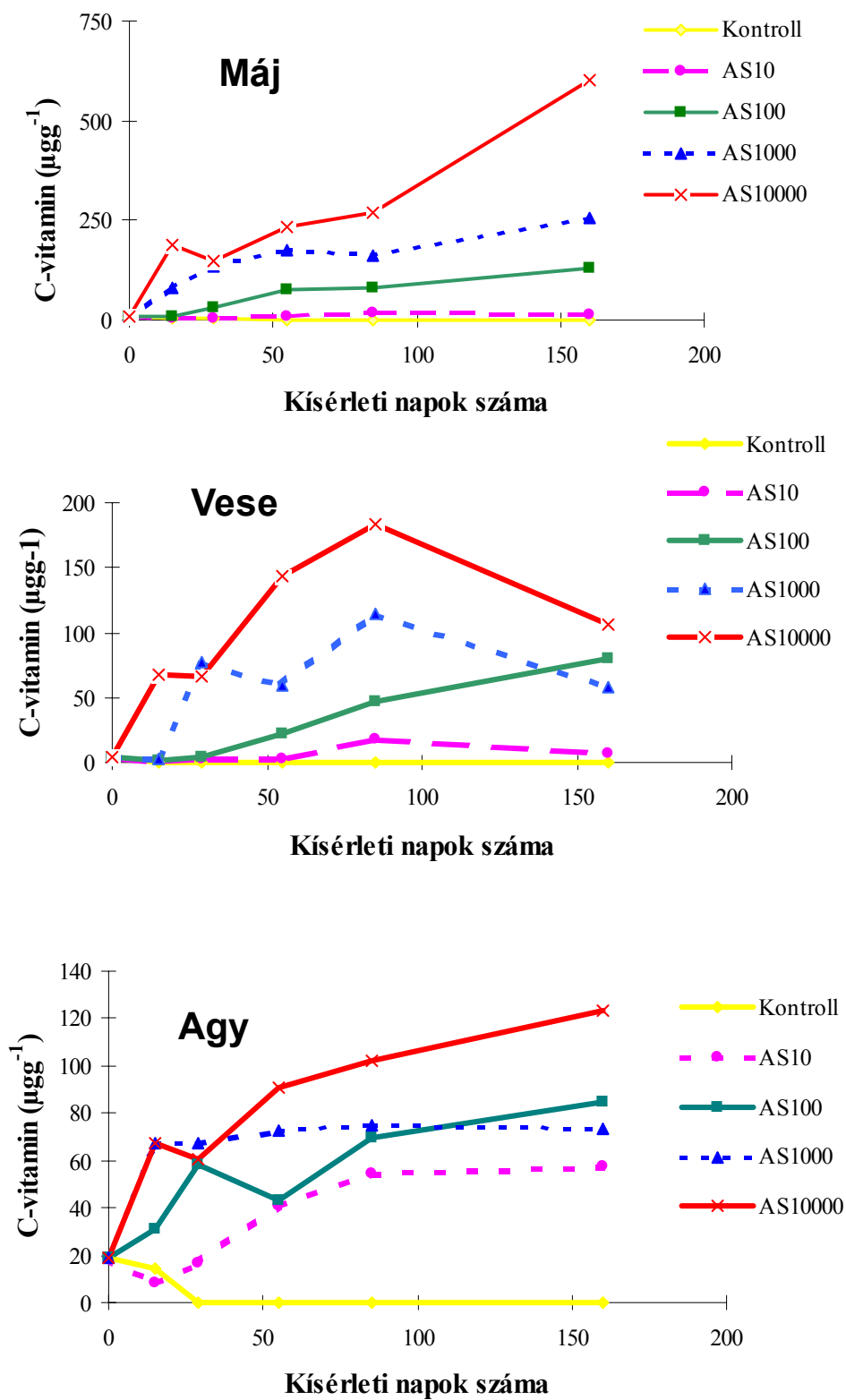
A vese összes C-vitamin tartalma változó volt az egész kísérlet során. Az AS10 csoport halainak veséjében a májhoz hasonlóan sokkal kisebb értékeket mértünk, mint a magasabb L-aszkorbinsav szintű takarmányon nevelt halaknál.

Az agy aszkorbát koncentrációja a 60. nap körül telítődött, alig volt különbség a 10, 100 és 1.000 mgkg⁻¹ AS-el táplált csoportok között, csak a 10.000 mgkg⁻¹ AS csoport mutatott enyhén magasabb értéket. A 19. ábrán megfigyelhető az is, hogy a kontrollcsoport valamennyi vizsgált szervéből néhány hét alatt gyakorlatilag kiürült a C-vitamin.

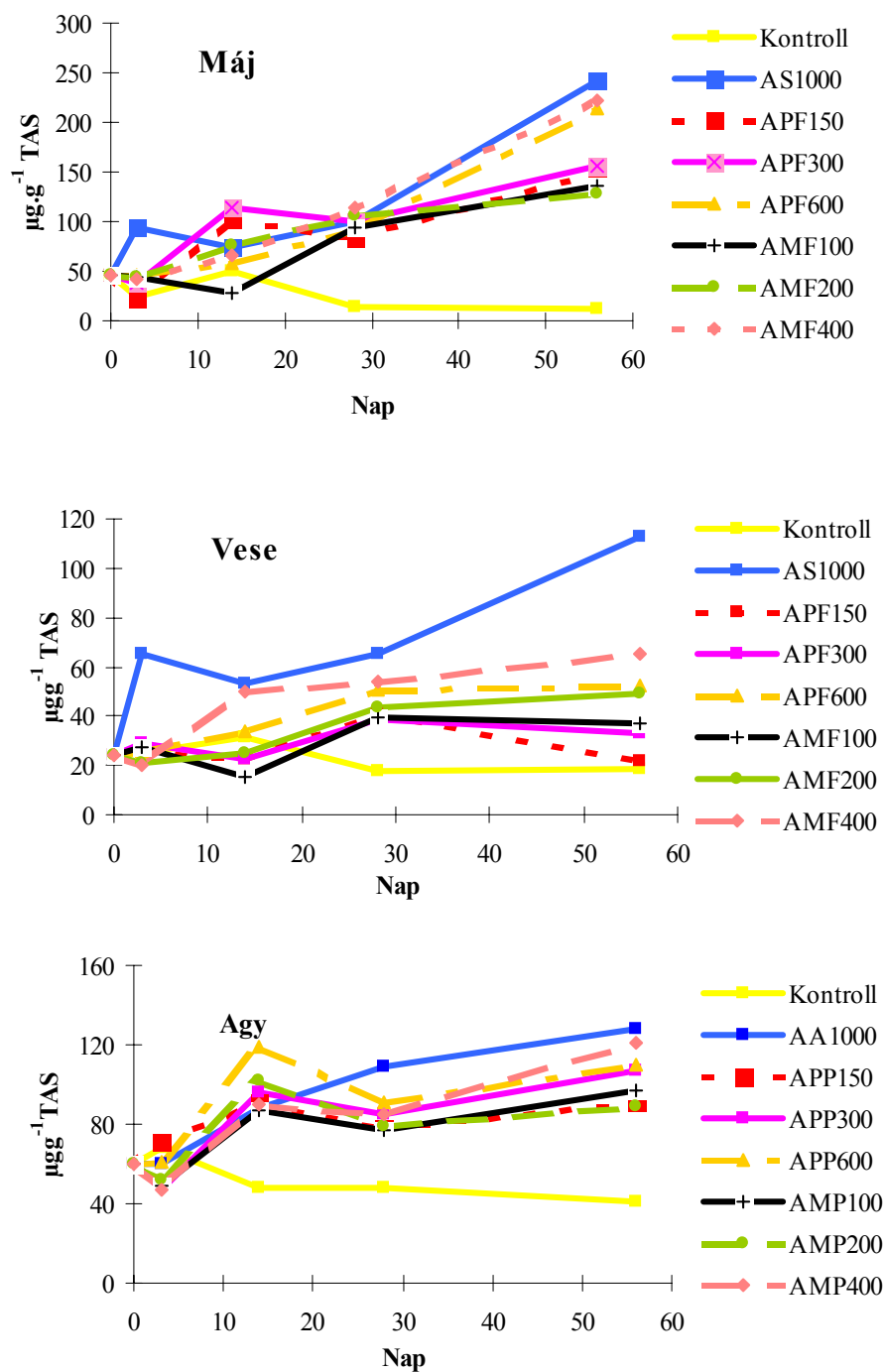
9. táblázat: Az európai harcsa (*Silurus glanis* L.) szöveteinek C-vitamin koncentrációja aszkorbát egyenértékben kifejezve

C-vit. forma	Kontroll (μgg^{-1})	AS 1000 (μgg^{-1})	AMF 100 (μgg^{-1})	AMF 200 (μgg^{-1})	AMF 400 (μgg^{-1})	APF 150 (μgg^{-1})	APF 300 (μgg^{-1})	APF 600 (μgg^{-1})
Agy								
AS	9,03 $\pm$ 2,16	95,65 $\pm$ 6,30	58,68 $\pm$ 5,73	70,66 $\pm$ 3,83	88,36 $\pm$ 14,50	58,33 $\pm$ 2,38	68,54 $\pm$ 1,36	79,34 $\pm$ 7,88
DHA	24,65 $\pm$ 1,59	17,19 $\pm$ 2,27	22,92 $\pm$ 1,37	11,28 $\pm$ 4,42	11,11 $\pm$ 5,50	14,76 $\pm$ 2,62	16,70 $\pm$ 3,07	17,88 $\pm$ 2,40
AMF	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
APF	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Összes C-vit	33,68 $\pm$ 1,20	112,84 $\pm$ 4,04	81,59 $\pm$ 6,79	81,94 $\pm$ 7,10	99,47 $\pm$ 13,69	73,09 $\pm$ 4,94	85,24 $\pm$ 4,04	97,22 $\pm$ 7,31
Máj								
AS	3,80 $\pm$ 0,92	80,90 $\pm$ 13,10	28,64 $\pm$ 8,44	49,48 $\pm$ 10,50	69,79 $\pm$ 21,60	44,41 $\pm$ 3,71	38,21 $\pm$ 5,79	27,17 $\pm$ 7,36
DHA	2,59 $\pm$ 1,90	39,06 $\pm$ 19,20	19,20 $\pm$ 18,60	16,46 $\pm$ 11,50	32,12 $\pm$ 6,00	28,18 $\pm$ 10,90	54,06 $\pm$ 13,30	34,49 $\pm$ 11,60
AMF	nd	nd	7,93 $\pm$ 6,80	10,59 $\pm$ 3,83	14,46 $\pm$ 13,20	-	-	-
APF	nd	nd	nd	nd	nd	18,97 $\pm$ 3,41	26,39 $\pm$ 12,90	27,88 $\pm$ 6,45
Összes C-vit	6,39 $\pm$ 1,19	119,96 $\pm$ 6,03	55,78 $\pm$ 9,90	76,52 $\pm$ 23,20	116,36 $\pm$ 16,10	91,56 $\pm$ 5,32	118,66 $\pm$ 2,85	89,54 $\pm$ 15,30
Vese								
AS	1,04 $\pm$ 0,52	39,58 $\pm$ 10,40	12,19 $\pm$ 10,10	11,67 $\pm$ 7,34	26,87 $\pm$ 7,45	11,16 $\pm$ 4,60	18,40 $\pm$ 2,10	22,00 $\pm$ 2,54
DHA	1,39 $\pm$ 1,08	63,02 $\pm$ 20,80	29,65 $\pm$ 8,32	38,50 $\pm$ 29,20	23,99 $\pm$ 9,50	19,62 $\pm$ 10,20	28,40 $\pm$ 8,49	33,68 $\pm$ 8,30
AMF	nd	nd	4,01 $\pm$ 2,84	14,06 $\pm$ 2,38	14,65 $\pm$ 6,40	-	-	-
APF	nd	nd	nd	nd	0,00	10,24 $\pm$ 1,08	23,35 $\pm$ 2,50	30,28 $\pm$ 11,70
Összes C-vit	2,43 $\pm$ 1,31	102,6 $\pm$ 10,50	45,84 $\pm$ 6,30	60,76 $\pm$ 23,20	65,52 $\pm$ 20,40	41,02 $\pm$ 3,90	70,15 $\pm$ 20,40	85,95 $\pm$ 9,11

Megjegyzés: n=5; nd= nem detektálható koncentráció < 0,5 μgg^{-1} AS



19. ábra: Az összes C-vitamin tartalom változása különböző L-askorbinsav tartalmú tápok hatására az európai harcsa (*Silurus glanis* L.) szöveteiben



20. ábra: Az összes C-vitamin tartalom változása különböző formájú és szintű C-vitamint tartalmazó tápok hatására az európai harscsa (*Silurus glanis* L.) szöveteiben

A C-vitamin stabil formáival (aszorbát-2-mono- és polifoszfát) takarmányozott halak szöveteiben mért összes aszorbát-tartalom változásait mutatja be a 20. ábra. A kísérlet indításakor az egyes szervek C-vitamin tartalma magasabb volt, mint az 1. alapkísérletben. A halak a skorbut tüneteit a 15. héttől kezdve már itt is mutatták. A 0 L-aszorbinsav-tartalmú tápon nevelt halak szerveinek aszorbát koncentrációja folyamatosan csökkent, de nem ürült ki teljesen.

Ebben a kísérletben is az agyban csökkent leglassabban az összes aszorbát koncentráció. Hasonló eredményre jutottak TUCKER et. al. (1987), amikor ^{14}C -vel jelölt C-vitaminnal vizsgálták az aszorbát kiürülését a szivárványos pisztráng agyából. A májban és a vesében mért értékek valamivel gyorsabban csökkentek, de a teljes aszorbát tartalom nem ürült ki. Eredményeink kissé eltérnek MATUSIEWITZ et. al. (1995) méréseitől, akik szivárványos pisztrángban vizsgálták a C-vitamin telítődését és kiürülését. Szerintük az aszorbát 60-70 nap alatt kiürült a veséből és a májból. A különbség magyarázata a halfajok eltérő C-vitamin felhasználása lehet.

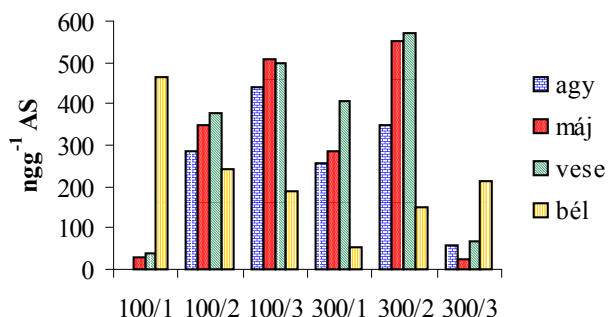
4.4.4. A C-vitamin felhalmozódásának és kiürülésének vizsgálata $1\text{-}^{14}\text{C}$ -vel jelzett L-aszorbinsavval az európai harcsánál

A 3. etetési alapkísérlet 100 mgkg^{-1} aszorbát-2-monofoszfáttal és 300 mgkg^{-1} aszorbát-2-polifoszfáttal táplált halaiban a 4. napon jelent meg a szervekben az $1\text{-}^{14}\text{C}$. Az egyes halak azonban a C-vitamin felhalmozása és kiürülése szempontjából erősen különböző állapotot mutattak (21. ábra). Ha magas volt az $1\text{-}^{14}\text{C}$ felhalmozódás az agyban, a májban és a vesében, a bélben még alacsony volt a jelzett szén koncentráció. Ha a bélben mértünk magas értékeket, akkor az említett szervekben volt alacsony az $1\text{-}^{14}\text{C}$ inkorporációja.

Az, hogy négy nappal a jelölt C-vitaminnal történt etetés után párhuzamosan találkoztunk mind a két esettel, azt bizonyítja, hogy a halak vitaminfelvételének és ürítésének dinamikája hasonló volt, de egyedenként időben eltért. A kísérlet megkezdése után 14 nappal már nem tudtunk kimutatni $1\text{-}^{14}\text{C}$ felhalmozódást a vizsgált szervekben, azaz aszorbinsavban kifejezett koncentrációja ekkor már minden szervben kisebb volt mint 20 ngg^{-1} .

$1\text{-}^{14}\text{C}$ -vel jelölt L-aszorbinsavval vizsgáltuk az 5. etetési alapkísérlet halaiban a C-vitamin felhalmozódását és esetleges tárolását. A 22. ábrán látható, hogy a felvett C-vitamin először a kontroll csoport agyában jelent meg, ezt követően gyorsan,

gyakorlatilag három nap alatt jelentősen csökkent, a 11. napon azonban ismét megemelkedett.



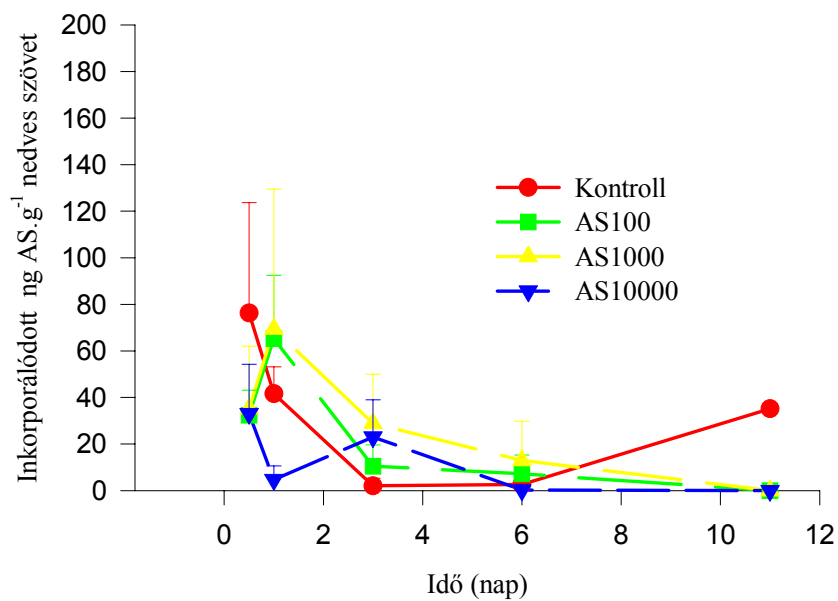
21. ábra: Az L-1-¹⁴C-aszkorbinsavval az európai harcsa szervezetébe orálisan bejuttatott ¹⁴C felhalmozódásának és kiürülésének dinamikája egyedenként

Megjegyzés: A jelzett C-vitaminnal történő etetést megelőző takarmányozás:

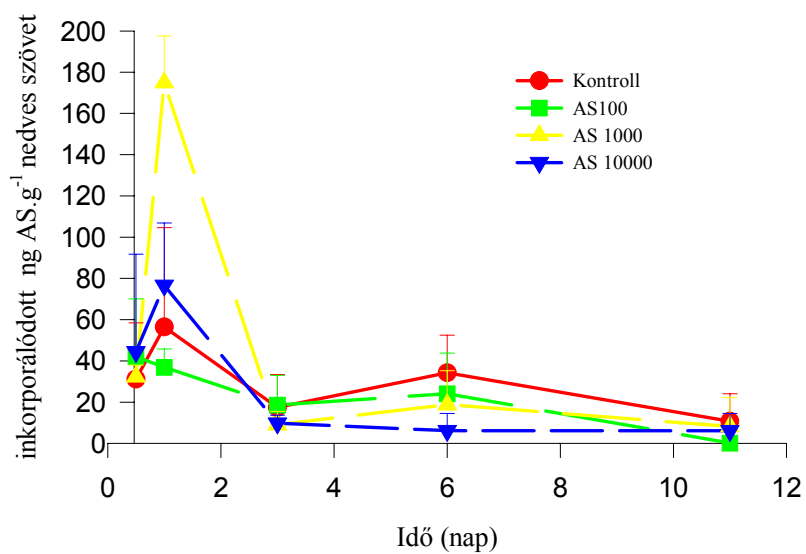
100/1,2,3: 100 mgkg⁻¹ aszkorbát-2-monofoszfát

300/1,2,3: 300 mgkg⁻¹ aszkorbát-2-polifoszfát

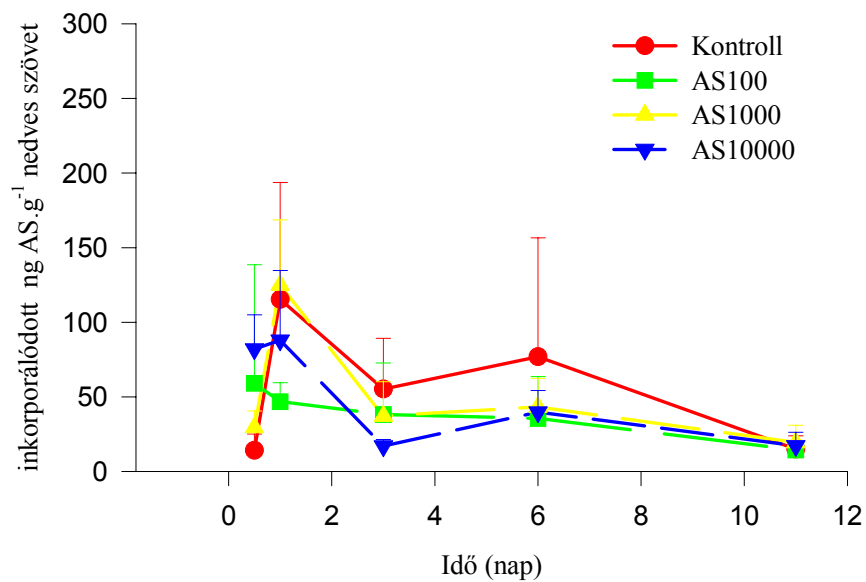
A 100 és 1.000 mgkg⁻¹ AS csoportok 24 óra után mutatták a legmagasabb ¹⁴C koncentrációkat, majd a kísérlet 11 napja alatt teljesen kiürültek. 10.000 mgkg⁻¹ AS csoport esetében a mért értékek váltakozó képet mutattak, de a 11. napon ez esetben sem találtunk ¹⁴C-t a mintákban. A máj (23. ábra) és a vese (24. ábra) az első három napon az agyhoz hasonló képet mutatott, majd 6 nap után ismét nagyobb volt az ¹⁴C felhalmozódás, végül a 11. napra jelentős, de nem teljes kiürülés mutatkozott. Ebben a trendben nincs szignifikáns különbség a csoportok között. A bélben az összes előzetesen C-vitaminnal táplált csoport erős ¹⁴C aktivitást mutatott a harmadik napon, ami feltehetőleg a fel nem használt C-vitaminnak, vagy bomlástermékének kiválasztását jelenti (25. ábra). A kontrollcsoport lényegesen alacsonyabb mennyiségű C-vitamint választott ki, ami a szervezetben jelentkező hiány pótlásának megkezdését jelentheti. A 11. napon viszonylag magas ¹⁴C tartalmat mértünk minden csoport belében, ami azt jelenti, hogy ekkorra választódott ki a szervezetben korábban felhalmozott C-vitamin, valószínűleg valamilyen bomlástermék formájában.



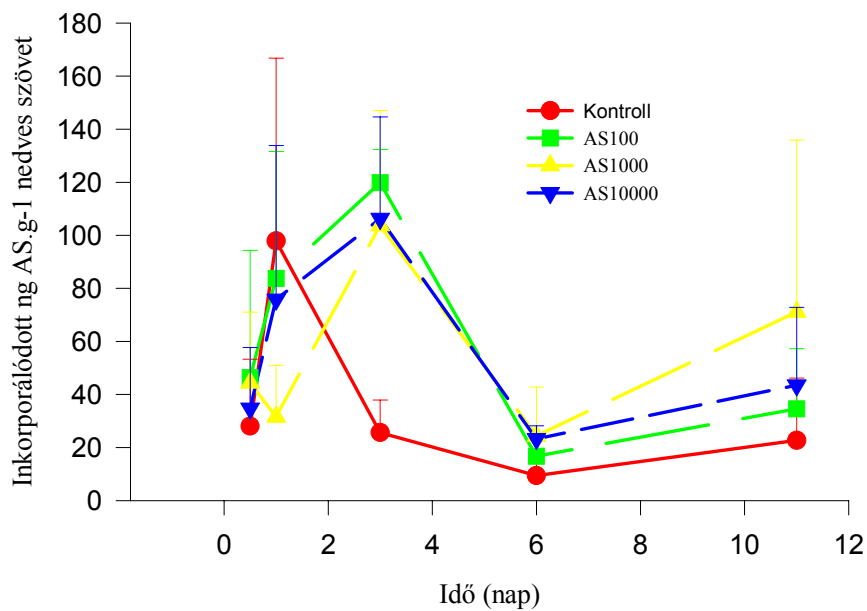
22. ábra: Az európai harcsa (*Silurus glanis* L.) agyában felhalmozódott $I^{14}C$ ielzett C-vitamin



23. ábra: Az európai harcsa (*Silurus glanis* L.) májában felhalmozódott $I^{14}C$ ielzett C-vitamin



24. ábra: Az európai harcsa (*Silurus glanis* L.) veséjében felhalmozódott $I-^{14}C$ jelzett C- vitamin



25. ábra: Az európai harcsa (*Silurus glanis* L.) bélcsatornájában felhalmozódott $I-^{14}C$ jelzett C-vitamin

Eredményeink azt mutatják, hogy az európai harcsa az általunk vizsgált szövetekben nem tárolja jelentős mennyiségben hosszú ideig a C-vitamint, amennyiben folyamatos külső utánpótlást kap. TUCKER et. al. (1987) $1\text{-}^{14}\text{C}$ -vel jelzett L-aszkorbinsavval végzett kísérleteikben kimutatták, hogy a szivárványos pisztráng agyába lényegesen hosszabb idő alatt (33 nap) jut el a jelzett C-vitamin és a bevitt mennyiség fele még 120 nap után is kimérhető. A saját kísérletünkben mért jelentős különbség okát nehéz megállapítani. A két kísérlet annyiban megegyezett, hogy az amerikai kutatók is egy dózisban etették meg a halakat jelzett C-vitaminnal. Nem közölték azonban a halak méretét. A szivárványos pisztrángok csak időközönként kaptak vitamint tartalmazó takarmányt, és az állatokat metabolikus kamrában tartották összesen négy hónapon keresztül, amit mindenképpen stresszként kell értékelnünk. A két vizsgált faj C-vitamin felhasználásában is lehet különbség.

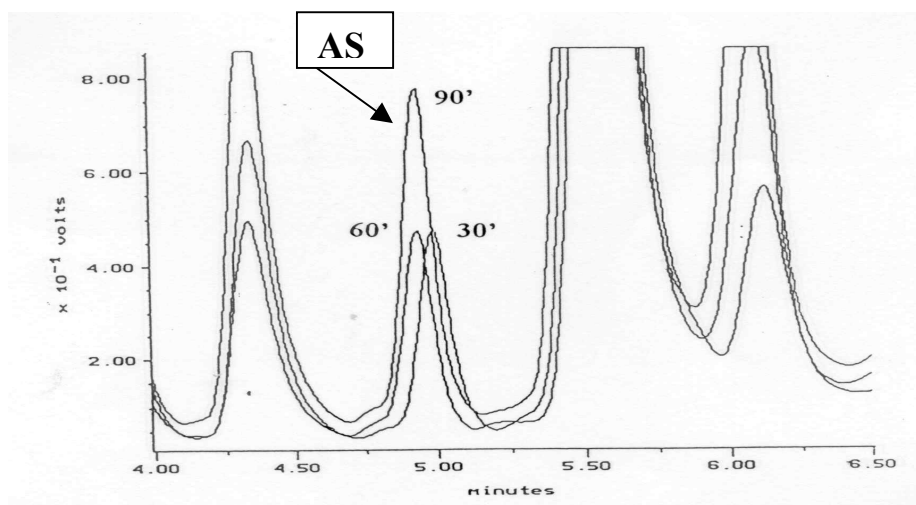
4.4.5. A tok hibrid szöveleinek C-vitamin státusza

A tok hibrid C-vitamin státuszát a 4. etetési alapkísérlet 12. hetében vizsgáltuk. Eredményeinket a 10. táblázatban mutatjuk be. Az adatokból kitűnik, hogy a tok hibrid kontrollcsoportjának minden szövele jelentős mennyiségű C-vitamint tartalmazott. A kontroll csoport májának összes C-vitamin-tartalma ($151,0 \pm 16,6 \mu\text{g g}^{-1}$) volt. Ez szignifikánsan ($p < 0,05$) alacsonyabb, mint az 1.000 mg kg^{-1} L-aszkorbinsavval ($334,9 \pm 65,7 \mu\text{g g}^{-1}$), valamint az 200 és 400 mg kg^{-1} aszkorbát-2-foszfáttal táplált csoport halaiban mért értékek ($235,6 \pm 41,5 \mu\text{g g}^{-1}$ és $191,28 \pm 2,3 \mu\text{g g}^{-1}$). C-vitamin szulfátot egyetlen szervben sem találtunk. Az aszkorbát-2-foszfáttal táplált csoportok közül az AMF400 és az APF600-as csoportok májából és veséjéből kimutatható volt a takarmányban biztosított foszfátforma. Megfigyeléseink összhangban vannak DABROWSKI 1994-ben publikált eredményeivel, miszerint a primitív porcos halak képesek elegendő C-vitamint előállítani és csak magas aszkorbát koncentrációjú takarmányok etetésekor emelkedik a szövetek C-vitamin koncentrációja.

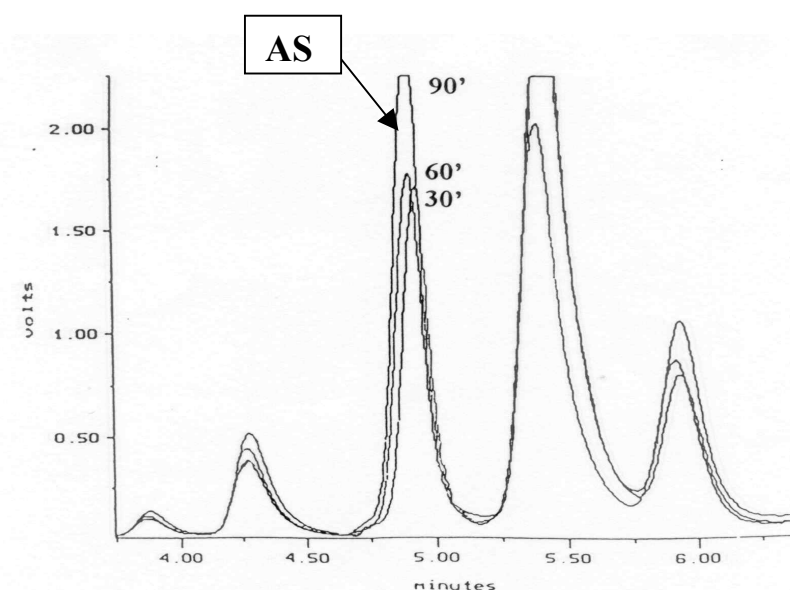
4.4.6. Gulonolakton oxidáz enzim jelenlétének kimutatása tok hibridnél

A tok hibrid C-vitamin szintetizáló képességét „*in vitro*” módszerrel igazoltuk. A 26. ábra kromatogramjain látható, hogy a vese extraktumában a hozzáadott gulonolaktonból jelentős mennyiségű L-aszkorbinsav keletkezett, ami igazolja, hogy a

tok hibrid rendelkezik a C-vitamin előállításához szükséges mennyiségű gulonolakton oxidáz enzimmal.



26. ábra: Gulonolaktonból gulonolakton oxidáz enzim segítségével termelt L-aszkorbinsav kimutatása C-vitamin-mentes táppal etetett tok hibrid (*Acipenser ruthenus* L. x *Acipenser baeri* Brandt) veséjéből HPLC-vel



27. ábra: Gulonolaktonból GLO enzim segítségével termelt L-aszkorbinsav 1.000 mgkg⁻¹ C-vitamin tartalmú táppal etetett tok hibrid veséjéből HPLC-vel

Eredményeink összhangban vannak DABROWSKI (1994) és FRACALOSSO et. al. (2001) méréseivel is, melyek szerint az eddig vizsgált porcos halfajok mindegyikében sikerült kimutatni a C-vitamin szintetizáló képességet.

Hosszabb ideig, legalább egy hónapig tartó, nagy mennyiségű, 1.000 mgkg^{-1} L-askorbinsavval történő takarmányozás sem csökkentette a gulonolakton oxidáz enzim működését (27. ábra), hasonlóan MOREAU et. al. (1999b) tavi tokkal (*Acipenser fulvescens*) elért eredményeihez. A külső forrásból származó C-vitamin hatására azonban az emlősök májában a GLO aktivitás részlegesen csökkent (TSAO and YOUNG, 1990).

4.5. A kollagén-tartalom változásai

4.5.1. Az európai harcsa csontkollagén-tartalmának változása C-vitamin hatására

Az európai harcsa csont-kollagén tartalma 8 héttel a különböző aszkorbát koncentrációjú tápokkal történő etetés után még nem mutatott szignifikáns eltérést a csoportok között (28. ábra). A kontrollcsoportnál a 16. héten mért értékek azonban már szignifikánsan ($p > 0,05$) eltértek a C-vitamin bármilyen formájával táplált halak csont-kollagén koncentrációjától (29. ábra). Eredményeink alapján az európai harcsa számára már 100 mgkg^{-1} AMF, illetve 150 mgkg^{-1} APF elegendő a megfelelő mennyiségű kollagén előállításához. Ez $\sim 36 \text{ mgkg}^{-1}$ L-askorbinsavnak felel meg. EL NAGGAR és LOVELL (1991) hasonló eredményre jutottak a csatorna harcsa esetében. Kísérleteik szerint már az egészen csekély, 11 mgkg^{-1} L-askorbinsav kiegészítés is elegendő aszkorbátforrást biztosított, ahhoz, hogy a halak csontkollagén-tartalma szignifikánsan különbözzön a C-vitamin mentesen takarmányozott kontrollcsoporttól.

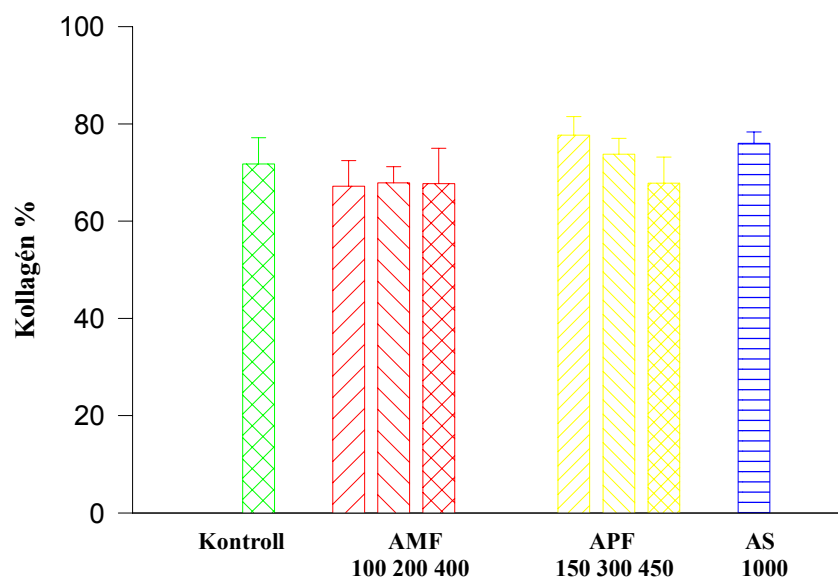
4.5.2. A tok hibrid porcos vázának kollagén-tartalma

A tok hibridnél a nyolcadik héten kis mértékű, de szignifikánsan ($p > 0,05$) negatív eltérést tapasztaltunk a porcos váz kollagén-tartalmában a kontrollcsoport esetében az aszkorbát tartalmú táppal etetett halakhoz viszonyítva (30. ábra). Négy hónapig tartó kísérletünkben hasonló jelenséget tapasztaltak MOREAU et. al. (1996) a szibériai toknál. Saját vizsgálatunkban a 16. hétre már nem volt kimutatható különbség (31. ábra). A jelenség azzal magyarázható, hogy a fiatal tok hibrid kis mértékben hasznosította az aszkorbát-2-foszfátot.

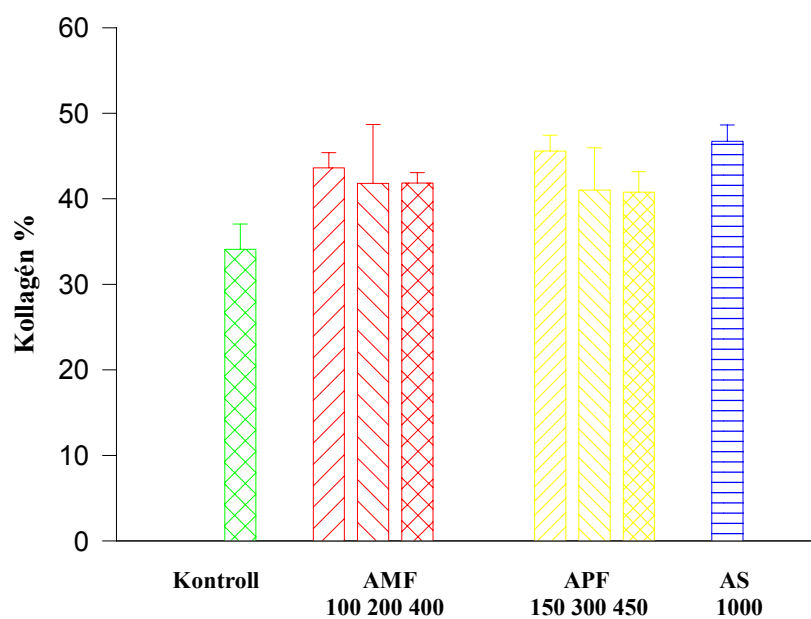
10. táblázat: Tok hibrid (*Acipenser ruthenus* L. x *Acipenser baeri* Brandt) különböző szerveinek C-vitamin státusza aszkorbát egyenértékben

	Kontroll (μgg^{-1})	AA 1000 (μgg^{-1})	APP 150 (μgg^{-1})	APP 300 (μgg^{-1})	APP 600 (μgg^{-1})	AMP 100 (μgg^{-1})	AMP 200 (μgg^{-1})	AMP 400 (μgg^{-1})
Agy								
AS	82,0 ± 8,3	80,6 ± 5,3	79,3 ± 3,1	83,0 ± 7,5	72,8 ± 9,9	70,5 ± 4,3	61,6 ± 6,3	70,7 ± 18,1
DHA	42,7 ± 0,6	52,0 ± 13,2	40,4 ± 8,8	30,0 ± 14,8	83,6 ± 21,4	65,1 ± 14,1	68,7 ± 29,8	65,8 ± 23,2
TAS	124,7 ± 8,9	132,6 ± 7,9	119,7 ± 5,7	113,0 ± 22,2	156,4 ± 11,4	135,6 ± 18,4	130,3 ± 36,1	136,5 ± 41,4
AMF	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
APF	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Vese								
AS	60,1 ± 4,1	88,6 ± 1,5	58,7 ± 12,4	70,8 ± 9,4	66,7 ± 1,3	70,7 ± 7,2	45,1 ± 30,6	38,6 ± 1,0
DHA	61,3 ± 23,9	76,9 ± 3,1	64,7 ± 3,5	64,0 ± 9,4	94,2 ± 5,0	76,2 ± 5,3	46,0 ± 22,3	21,8 ± 13,2
TAS	121,4 ± 19,7	165,5 ± 4,6	123,4 ± 9,0	134,8 ± 18,9	160,9 ± 3,7	146,9 ± 1,9	91,1 ± 52,9	60,4 ± 12,2
AMF	nd	nd	nd	nd	*	nd	nd	5,81 ± 4,9
APF	nd	nd	nd	nd	13,3 ± 8,5	nd	nd	nd
Máj								
AS	54,8 ± 6,3	119,1 ± 7,4	67,9 ± 3,0	86,4 ± 4,0	70,5 ± 8,9	57,8 ± 10,9	77,6 ± 11,4	66,2 ± 4,5
DHA	96,2 ± 22,9	215,8 ± 73,2	124,4 ± 39,6	117,3 ± 2,5	116,4 ± 9,4	130,9 ± 27,3	157,90 ± 30,5	125,1 ± 2,2
TAS	151,0 ± 16,6	334,9 ± 65,7	192,3 ± 42,6	203,7 ± 6,5	186,9 ± 4,8	188,7 ± 38,3	235,5 ± 41,9	191,3 ± 2,3
AMF	nd	nd	nd	nd	*	nd	nd	14,2 ± 10,3
APF	nd	nd	nd	nd	15,9 ± 9,63	nd	nd	nd

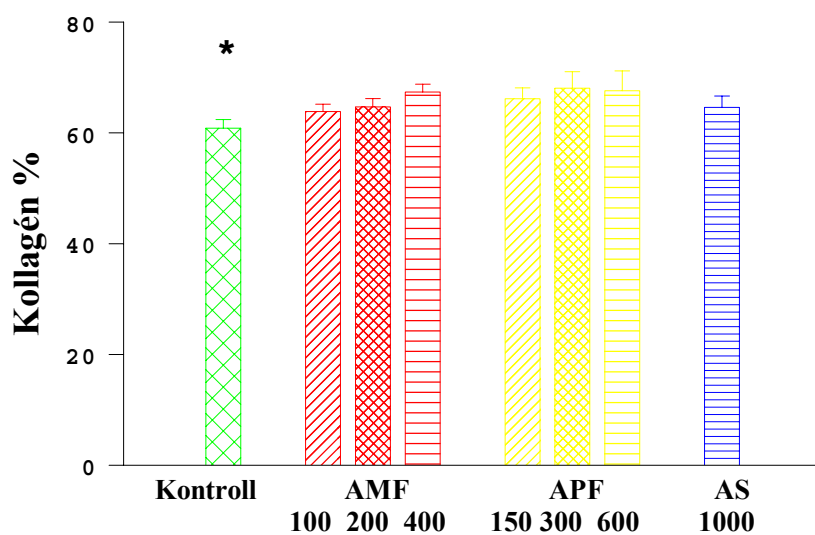
Megjegyzés: nd = nem detektálható; *= az aszkorbát-2-polifoszfát értékkel együtt mértük; AS < 0,5 μgg^{-1} ; AS = L-aszkorbinsav; DHA = dehidro-L-aszkorbinsav; TAS = Összes C-vitamin tartalom; AMF = aszkorbát-2-monofoszfát; APF = aszkorbát-2-polifoszfát.



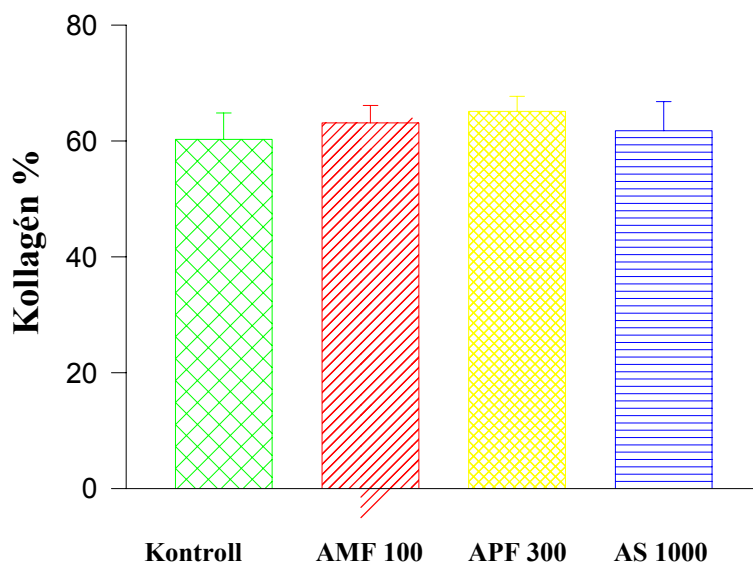
28. ábra: Az európai harcsa (*Silurus glanis* L.) csont-kollagén tartalma 8 hét etetés után különböző formájú és koncentrációjú C-vitamint tartalmazó tápokkal



29. ábra: Az európai harcsa (*Silurus glanis* L.) csont-kollagén tartalma 16 hét etetés után különböző formájú és koncentrációjú C-vitamint tartalmazó tápokkal



30. ábra: A tok hibrid porcos vázának kollagén tartalma 8 hét etetést követően a C-vitamint különböző formában és koncentrációban tartalmazó tápokkal



31. ábra: A tok hibrid porcos vázának kollagén tartalma 16 hét etetést követően a C-vitamint különböző formában és koncentrációban tartalmazó tápokkal
Megjegyzés: * = szignifikáns ($p < 0,05$) különbség a többi csoporttól

4.6. C-vitamin ürítés a bélcsatornában

4.6.1. Az európai harcsa C-vitamin ürítése

Az európai harcsa gyomor- és béltartalmának C-vitamin státuszát a 11. táblázatban mutatjuk be. A takarmányban biztosított mennyiséghez képest lényegesen alacsonyabb koncentrációban találtuk meg a különböző C-vitamin formákat. A kontrollcsoport béltartalmában nem tudtunk AS-t kimutatni. Nem találtunk összefüggést a tápok aszkorbát koncentrációja és a béltartalomban mért mennyiségek között. A C-vitamint általában L-aszkorbinsav és dehidro-L-aszkorbinsav formában találtuk a bélcsatorna valamennyi vizsgált szakaszában. Ez a tény azt bizonyítja, hogy az aszkorbát-2-foszfát észterek hidrolízise „*in vivo*” is végbemegy. Ez a megfigyelés egyezik DABROWSKI (1990d) véleményével, mely szerint a halak szervezetében mindenütt jelen van a C-vitamin foszfát formáinak hidrolizálásához szükséges savas foszfatáz enzim. A folyamat elsősorban a gyomorban és a bélcsatornában zajlik. Az a megfigyelés, hogy a bélcsatornában nem csökken a C-vitamin tartalom a gyomortól a végbél felé, elsősorban a bél perisztaltikus mozgásának hatása lehet (GROVE és RUOHONEN, 1996).

4.6.2. A tok hibrid C-vitamin ürítése

A tok hibrid gyomor- és béltartalmának C-vitamin státuszát a 12. táblázatban mutatjuk be. A takarmányban biztosított mennyiséghez képest lényegesen alacsonyabb koncentrációban találtuk meg a különböző C-vitamin formákat. A kontrollcsoport béltartalmában itt sem tudtunk AS-t kimutatni, miközben a különböző szervek megfelelő mennyiségű aszkorbátot tartalmaztak. A C-vitaminnal táplált halak béltartalmának aszkorbát koncentrációja nem mutatott összefüggést a tápok AS koncentrációjával. A C-vitamint általában L-aszkorbinsav és dehidro-L-aszkorbinsav formában találtuk a bélcsatorna valamennyi vizsgált szakaszában. Ez a tény azt bizonyítja, hogy az aszkorbát-2-foszfát észterek hidrolízise „*in vivo*” is végbemegy a tok hibridnél.

11. táblázat: Az európai harcsa (*Silurus glanis* L.) bértartalmának C-vitamin státusza aszkorbát egyenértékben

C-vitamin forma	Kontroll ($\mu\text{g g}^{-1}$)	AMF 200 ($\mu\text{g g}^{-1}$)	APF 300 ($\mu\text{g g}^{-1}$)	AMF 400 ($\mu\text{g g}^{-1}$)	APF 600 ($\mu\text{g g}^{-1}$)	AS 1000 ($\mu\text{g g}^{-1}$)
<i>Gyomor</i>						
AS	0,00	3,51 $\pm$ 2,09	0,75 $\pm$ 1,29	8,82 $\pm$ 2,46	2,35 $\pm$ 1,60	28,66 $\pm$ 16,81
DHA	0,00	0,17 $\pm$ 0,15	0,00	0,00	0,00	20,17 $\pm$ 5,99
TAS	0,00	3,69 $\pm$ 2,22	0,75 $\pm$ 1,29	8,84 $\pm$ 2,46	2,35 $\pm$ 1,60	48,82 $\pm$ 22,01
AMF	0,00	0,43 $\pm$ 0,75	-	1,00 $\pm$ 1,24	-	0,00
APF	0,00	0,00	5,59 $\pm$ 2,34	0,00	11,49 $\pm$ 10,30	0,00
Összes aszkorbát	0,00	4,12 $\pm$ 2,29	6,34 $\pm$ 2,01	9,84 $\pm$ 1,33	13,84 $\pm$ 10,86	48,82 $\pm$ 22,01
<i>Bél 1. szakasz</i>						
AS	0,00	9,58 $\pm$ 4,67	3,19 $\pm$ 1,34	6,59 $\pm$ 8,08	6,95 $\pm$ 6,31	8,56 $\pm$ 2,84
DHA	0,00	0,90 $\pm$ 1,33	0,00	0,00	0,00	9,52 $\pm$ 0,51
TAS	0,00	10,48 $\pm$ 4,95	3,19 $\pm$ 1,34	6,59 $\pm$ 8,08	6,95 $\pm$ 6,31	18,08 $\pm$ 2,32
AMF	0,00	5,37 $\pm$ 4,47	-	13,13 $\pm$ 5,55	-	0,00
APF	0,00	0,00	0,45 $\pm$ 0,78	0,00	0,83 $\pm$ 1,44	0,00
Összes aszkorbát	0,00	15,86 $\pm$ 7,45	3,64 $\pm$ 2,11	19,73 $\pm$ 11,35	7,78 $\pm$ 7,75	18,08 $\pm$ 2,32
<i>Bél 2. szakasz</i>						
AS	0,00	0,77 $\pm$ 0,17	0,68 $\pm$ 0,65	0,44 $\pm$ 0,12	0,82 $\pm$ 0,51	1,20 $\pm$ 1,36
DHA	0,00	0,92 $\pm$ 1,59	1,02 $\pm$ 1,02	0,00	0,50 $\pm$ 0,58	9,07 $\pm$ 6,72
TAS	0,00	3,89 $\pm$ 0,53	1,70 $\pm$ 0,52	1,16 $\pm$ 1,35	1,32 $\pm$ 1,09	10,27 $\pm$ 8,08
AMF	0,00	2,67 $\pm$ 2,99	-	1,76 $\pm$ 1,97	-	0,00
APF	0,00	0,00	0,88 $\pm$ 1,51	0,00	1,17 $\pm$ 1,06	0,00
Összes aszkorbát	0,00	6,56 $\pm$ 2,53	2,58 $\pm$ 1,30	2,92 $\pm$ 3,28	2,49 $\pm$ 2,13	10,27 $\pm$ 8,08

Megjegyzés: * szignifikáns eltérés ($p < 0,05$) a többi csoporttól

12. táblázat: A tok hibrid (*Acipenser ruthenus* L...x *Acipenser baeri* Brandt) bértartalmának C-vitamin státusza aszkorbát koncentrációban kifejezve

C-vitamin forma	Kontroll (μg^{-1})	AMF 200 (μg^{-1})	APF 300 (μg^{-1})	AMF 400 (μg^{-1})	APF 600 (μg^{-1})	AS 1000 (μg^{-1})
<i>Bél 1. szakasz</i>						
AS	0,00	2,29 $\pm$ 1,45	8,31 $\pm$ 5,24	6,09 $\pm$ 4,75	0,68 $\pm$ 0,60	3,15 $\pm$ 4,71
DHA	0,00	0,00	0,00	33,76 $\pm$ 71,61	0,00	25,21 $\pm$ 20,52
TAS	0,00	2,29 $\pm$ 1,45	8,31 $\pm$ 5,24	39,85 $\pm$ 66,86	0,68 $\pm$ 0,60	28,36 $\pm$ 22,98
AMF	0,00	0,00	-	6,37 $\pm$ 1,04	-	0,00
APF	0,00	0,00	6,28 $\pm$ 7,67	0,00	2,18 $\pm$ 0,55	0,00
Összes aszkorbát	0,00	2,29 $\pm$ 1,45	14,59 $\pm$ 9,58	46,22 $\pm$ 67,90	2,18 $\pm$ 0,55	28,36 $\pm$ 22,98
<i>Bél 2. szakasz</i>						
AS	0,00	7,29 $\pm$ 1,58	0,85 $\pm$ 10,78	6,79 $\pm$ 2,64	21,40 $\pm$ 8,39	9,60 $\pm$ 2,71
DHA	0,00	9,46 $\pm$ 2,41	0,00	1,40 $\pm$ 0,33	0,71 $\pm$ 0,77	0,00
TAS	0,00	16,75 $\pm$ 3,81	0,85 $\pm$ 0,78	8,19 $\pm$ 2,31	22,11 $\pm$ 7,85	9,60 $\pm$ 2,71
AMF	0,00	2,80 $\pm$ 2,62	-	6,60 $\pm$ 5,84	-	0,00
APF	0,00	0,00	0,43 $\pm$ 0,39	0,00	0,77 $\pm$ 1,32	0,00
Összes aszkorbát	0,00	19,55 $\pm$ 6,39	1,28 $\pm$ 1,15	14,80 $\pm$ 8,00	22,87 $\pm$ 8,97	9,60 $\pm$ 2,71
<i>Bél 3. szakasz</i>						
AS	0,00	0,21 $\pm$ 0,21	8,57 $\pm$ 5,59	1,59 $\pm$ 1,64	12,05 $\pm$ 3,59	3,93 $\pm$ 1,46
DHA	0,00	0,78 $\pm$ 1,34	4,88 $\pm$ 6,57	4,31 $\pm$ 1,37	0,00	18,44 $\pm$ 11,44
TAS	0,00	0,99 $\pm$ 1,54	13,45 $\pm$ 6,52	5,90 $\pm$ 0,36	12,05 $\pm$ 3,59	22,36 $\pm$ 12,84
AMF	0,00	5,69 $\pm$ 6,82	-	14,17 $\pm$ 10,29	-	0,00
APF	0,00	0,00	0,29 $\pm$ 0,49	0,00	0,00	0,00
Összes aszkorbát	0,00	6,68 $\pm$ 6,72	13,73 $\pm$ 6,05	20,06 $\pm$ 10,47	12,05 $\pm$ 3,59	22,36 $\pm$ 12,84

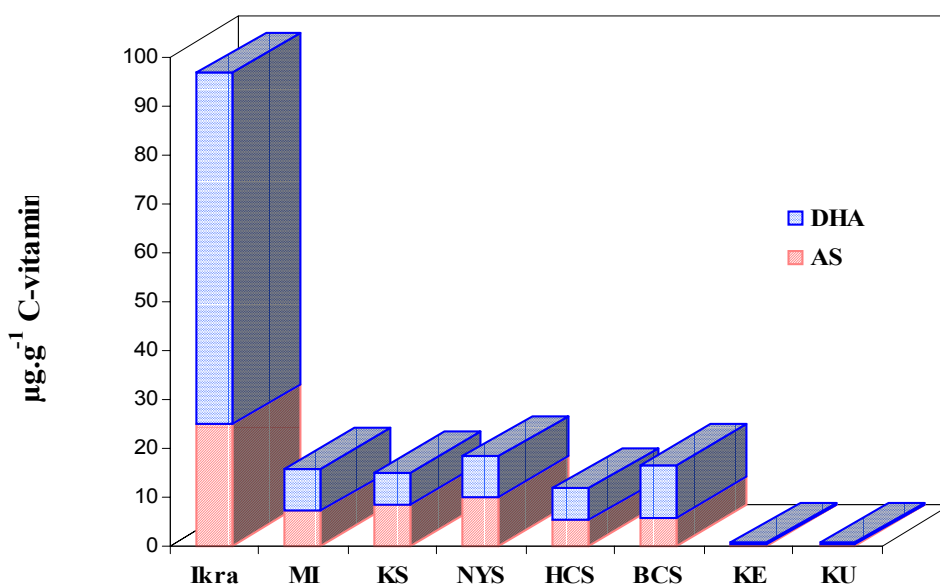
Megjegyzés: * szignifikáns eltérés ($p < 0,05$) a többi csoporttól

4.7. C-vitamin hatása európai harcsa lárvákra

Két évben (1994, 1996) vizsgáltuk az európai harcsa (*Silurus glanis* L.) ikrájának, a fejlődő embrióinak és a frissen kelt lárváinak C-vitamin státuszát, majd ezt követően a C-vitaminnal dúsított első élő táplálékkal, illetve indító takarmánnyal nevelt lárvák, zsenge ivadékok fejlődését.

4.7.1. Az európai harcsa ikrák és embriók C-vitamin státusza

Az 1994-es szaporítás során az embriók mikroszkóp alatt megfelelő fejlődést mutattak. Az ikrák átmérője 1580-2020 μm volt és a megtermékenyítés után 1830-3950 μm -re duzzadtak. A kifejlődött lárvák mérete közvetlenül a kelés előtt 6240-6850 μm volt. Az egyes embrionális fázisok C-vitamin koncentrációját a 32. ábrán mutatjuk be.

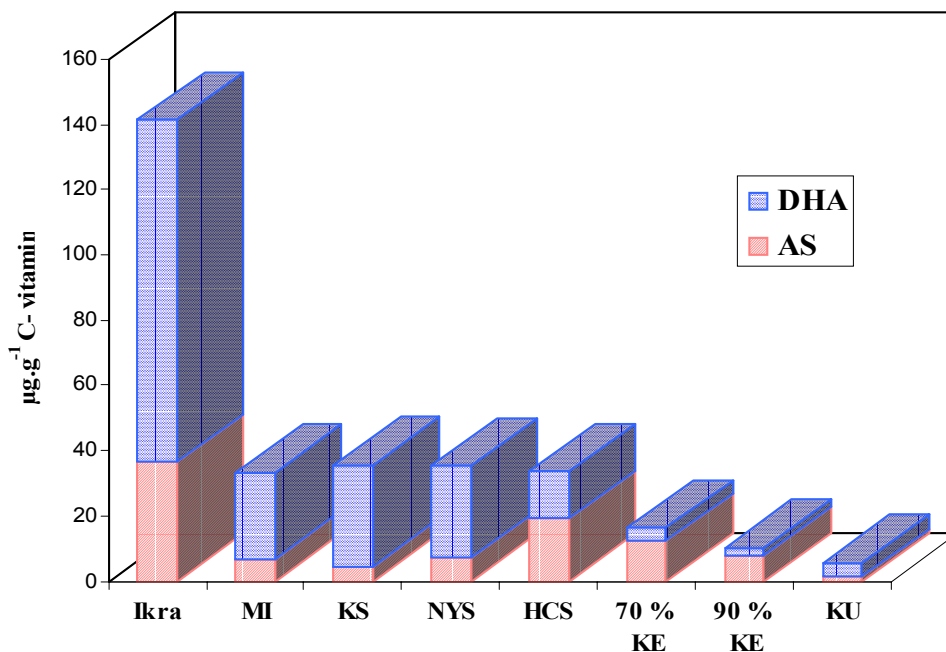


32. ábra: A C-vitamin koncentráció változása az európai harcsa (*Silurus glanis* L.) embrionális fejlődése során

Megjegyzés: Az értékek 100-100 ikra vagy embrió együttes meghatározásából származnak és nedves tömegre értendők. Rövidítések: Ikra = ikra megtermékenyítés előtt; MI = ikra megtermékenyítés után; KS = kétsejtes állapot; NYS = nyolcsejtes állapot; HCS = hólyagsíra; BCS = bélcsíra; KE = embrió közvetlenül kelés előtt; KU embrió közvetlenül kelés után

A megtermékenyítést követően az összes aszkorbát koncentráció a hidratálódás miatt jelentősen, $96 \mu\text{g g}^{-1}$ -ről $15\text{-}16 \mu\text{g g}^{-1}$ -ra csökkent. Ezután az első osztódástól a bélcsíra stádiumig nem volt számottevő C-vitamin felhasználás. Az eredmények azt mutatják, hogy a C-vitamin nagy része dehidro-L-aszkorbinsav formában volt jelen az ikrákban. Az embrionális fejlődés során 40-50 %-os volt a dehidro-L-aszkorbinsav jelenléte.

Az ikrák és az embriók az 1996-os szaporítás során is jól fejlettek voltak, méreteik a különböző fejlődési stádiumokban nem tértek el szignifikánsan az 1994-ben mért értékektől. A 33. ábrán azonban látható, hogy már az ikrákban is lényegesen magasabb volt az összes C-vitamin koncentráció, mint a két évvel korábbi keltetéskor. Ezúttal a frissen kelt lárvák is rendelkeztek némi tartalékkal. A dehidro-L-aszkorbinsav aránya magas volt az összes C-vitamin tartalom belül.



33. ábra: A C-vitamin koncentráció változása az európai harcsa (*Silurus glanis* L.) embrionális fejlődése során

Megjegyzés: Az értékek 100-100 ikra vagy embrió együttes meghatározásából származnak, és nedves tömegre értendők. Rövidítések: Ikra = ikra megtermékenyítés előtt; MI = ikra megtermékenyítés után; KS = kétsejtes állapot; NYS = nyolcsejtes állapot; HCS = hólyagcsíra; 70 % KE = 70 % embrió közvetlenül kelés előtt; 90% KE = 90 % embrió közvetlenül kelés előtt; KU embrió közvetlenül kelés után

13. táblázat: Az európai harcsa (*Silurus glanis* L.) teljes test aminosav összetételének változása az embrionális fejlődés és a kelést követő első hét során (az egyes aminosavak %-a az összes aminosav tartalomban)

Aminosav	Ikra	Megtermékenyített ikra	8 sejtés állapot	70 % kelés előtt	90 % kelés előtt	Lárva kelés után	3 napos lárvák 1. etetés előtt	5 napos táplálkozó lárvák	7 napos lárvák
ASP	12,28 ± 0,61	12,80 ± 0,27	12,55 ± 0,20	12,37 ± 0,12	11,49 ± 1,28	12,04 ± 1,17	7,54 ± 0,86	8,20 ± 0,02	13,34 ± 0,85
GLU	12,41 ± 0,62	13,03 ± 0,38	12,88 ± 0,01	12,67 ± 0,15	12,53 ± 0,09	12,77 ± 0,93	9,09 ± 1,15	9,90 ± 0,12	14,80 ± 0,61
HYP	0,07 ± 0,00	0,05 ± 0,03	0,00 ± 0,00	0,07 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,11 ± 0,03	0,19 ± 0,04	1,11 ± 0,06	0,64 ± 0,23
SER	6,47 ± 0,32	6,59 ± 0,22	5,84 ± 0,12	5,11 ± 0,01	5,74 ± 0,20	4,90 ± 0,20	4,47 ± 0,22	4,44 ± 0,03	4,51 ± 0,26
GLY	2,39 ± 0,12	2,33 ± 0,07	2,35 ± 0,17	2,32 ± 0,32	2,26 ± 0,17	2,70 ± 0,06	3,40 ± 0,41	4,61 ± 0,13	3,43 ± 0,20
HIS	3,99 ± 0,20	3,87 ± 0,39	3,35 ± 0,30	3,69 ± 0,49	4,75 ± 0,23	4,66 ± 0,11	6,83 ± 0,23	7,62 ± 0,34	6,33 ± 0,26
ARG	5,42 ± 0,27	5,25 ± 0,05	5,42 ± 0,05	5,64 ± 0,12	5,63 ± 0,11	5,61 ± 0,39	5,33 ± 0,80	5,33 ± 0,20	5,41 ± 0,04
THR	4,48 ± 0,22	4,67 ± 0,06	4,43 ± 0,03	3,93 ± 0,08	4,07 ± 0,03	4,19 ± 0,10	5,14 ± 0,27	5,43 ± 0,06	4,32 ± 0,26
ALA	8,67 ± 0,43	8,20 ± 0,27	8,49 ± 0,71	8,83 ± 0,11	8,34 ± 0,17	7,77 ± 0,30	6,69 ± 0,25	5,98 ± 0,06	5,91 ± 0,12
PRO	9,06 ± 0,45	7,94 ± 0,19	8,02 ± 0,32	7,20 ± 0,19	6,54 ± 0,16	7,13 ± 0,03	8,22 ± 0,54	8,33 ± 0,58	7,38 ± 0,54
TYR	2,77 ± 0,14	2,89 ± 0,05	3,00 ± 0,18	3,08 ± 0,02	3,19 ± 0,03	3,29 ± 0,29	4,33 ± 0,38	4,08 ± 0,12	2,90 ± 0,13
VAL	5,61 ± 0,28	5,58 ± 0,08	5,85 ± 0,11	5,99 ± 0,04	5,68 ± 0,56	5,90 ± 0,26	6,21 ± 0,06	5,71 ± 0,02	4,85 ± 0,04
MET	2,54 ± 0,13	2,32 ± 0,05	2,45 ± 0,05	2,51 ± 0,07	2,57 ± 0,03	2,63 ± 0,14	2,82 ± 0,03	2,68 ± 0,01	2,32 ± 0,13
CYS2	0,53 ± 0,03	0,69 ± 0,20	0,66 ± 0,02	0,82 ± 0,01	0,71 ± 0,11	0,53 ± 0,18	1,10 ± 0,08	0,78 ± 0,03	0,57 ± 0,05
ILE	5,86 ± 0,29	5,72 ± 0,08	6,07 ± 0,08	6,22 ± 0,01	6,13 ± 0,20	5,97 ± 0,27	6,14 ± 0,24	5,26 ± 0,10	4,79 ± 0,18
LEU	9,69 ± 0,48	9,48 ± 0,31	9,95 ± 0,10	10,03 ± 0,04	9,99 ± 0,19	9,79 ± 0,61	10,34 ± 0,20	8,92 ± 0,16	7,83 ± 0,23
HVL1	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	ny	ny	ny	0,23 ± 0,06
HVL2	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	ny	ny	ny	0,12 ± 0,03
PHE	3,09 ± 0,15	3,10 ± 0,15	3,17 ± 0,10	3,29 ± 0,13	3,48 ± 0,08	3,64 ± 0,26	4,71 ± 0,31	4,67 ± 0,05	3,92 ± 0,22
LYS	4,68 ± 0,23	5,50 ± 0,47	5,55 ± 0,85	6,23 ± 0,13	6,88 ± 0,04	6,33 ± 0,68	7,47 ± 0,41	6,96 ± 0,47	6,40 ± 1,21

ny = aminosav tartalom nyomokban< 0,1 %

Mind a két méréssorozat azt bizonyítja, hogy közvetlenül a kelés előtt az embriók jelentős mennyiségű C-vitamin-t használtak fel a pisztráng embriókhoz hasonlóan (DABROWSKI and BLOOM, 1994).

Az 1996-os szaporítást követően az aminosav összetétel változását is mértük az embrionális fejlődés során, valamint néhány napig a lárvák kelése után is (13. táblázat). A kollagén szintéziséhez nélkülözhetetlen hidrox-aminosavak (hidrox-prolin, és hidrox-lizin_{1,2}) gyakorlatilag kimutathatatlanok voltak az embrionális fejlődés során (koncentrációjuk > 0,1 %). A kelést követően a hidrox-prolin koncentrációja fokozatosan növekedni kezdett, majd az 5. napon jelentősen megnőtt (1,11 %). DABROWSKI és BLOOM (1994) szerint ezért kell még a szaporítás előtti anyafelkészítő időszakban elegendő mennyiségű C-vitamint biztosítani a halak számára. Feltevéseinket tengeri sügérrel (*Dicentrarchus labrax* L.) és tengeri keszeggel (*Sparus aurata* L.) végzett kísérletünk is igazolta, mely szerint az ikrák és a frissen kelt lárvák összes aszkorbát koncentrációja összefüggésben van az anyahalak takarmányának C-vitamin koncentrációjával (TEROVA et. al., 1998).

4.7.2. C-vitaminnal dúsított tubifex alkalmazása európai harcsa lárváknál

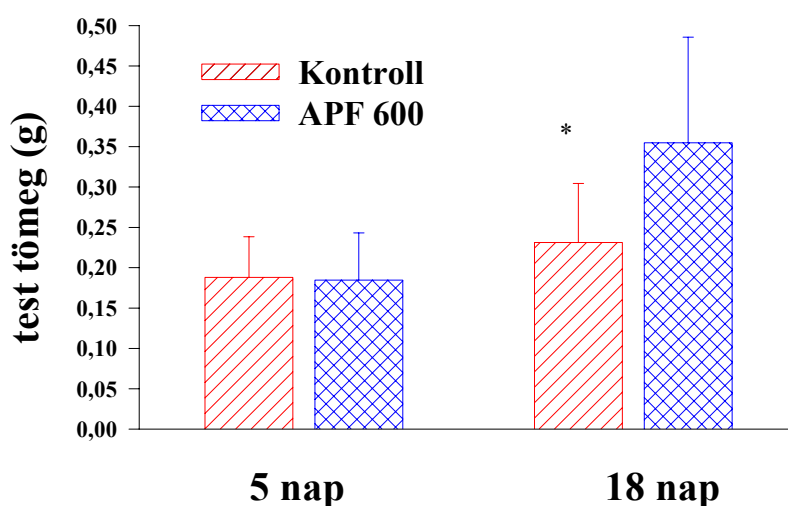
Az 1. lárvanevelési kísérlet (1994) során a halak első élő táplálékként szolgáló tubifex összes aszkorbát koncentrációja 3-6 μkg^{-1} volt, ami az L-aszkorbinsavval történő kiegészítést követően 50-70 μkg^{-1} -re növekedett. A tubifex C-vitamin vesztesége az etetés kezdetét követően 15 perc múlva 30-40 %-os volt. A halak nem mutattak szignifikáns különbséget átlagtömegükben és mortalitásukban. Szignifikánsan ($p < 0,05$) magasabb volt viszont a C-vitaminnal kiegészített tubifex féreggel etetett halak összes aszkorbát koncentrációja a kontrollesoport halainak teljes testében mért értékeknél (14. táblázat). A C-vitamin 75-80 %-a redukált, L-aszkorbinsav formában volt jelen.

14. táblázat: L-aszkorbinsavval kiegészített indító táppal etetett európai harcsa (*Silurus glanis* L.) teljes testében mért C-vitamin koncentráció

Csoport	AS (μgg^{-1})	DHA (μgg^{-1})	TAS (μgg^{-1})
Etetési kísérlet előtt	ny	ny	ny
Kontroll csoport 2 hét múlva	ny	ny	ny
C-vitaminos csoport 2 hét múlva	1,80 $\pm$ 1,10	0,50 $\pm$ 0,03	2,22 $\pm$ 1,13
Kontroll csoport 4 hét múlva	ny	ny	ny
C-vitaminos csoport 4 hét múlva	2,35 $\pm$ 0,14	0,69 $\pm$ 0,37	3,05 $\pm$ 0,25

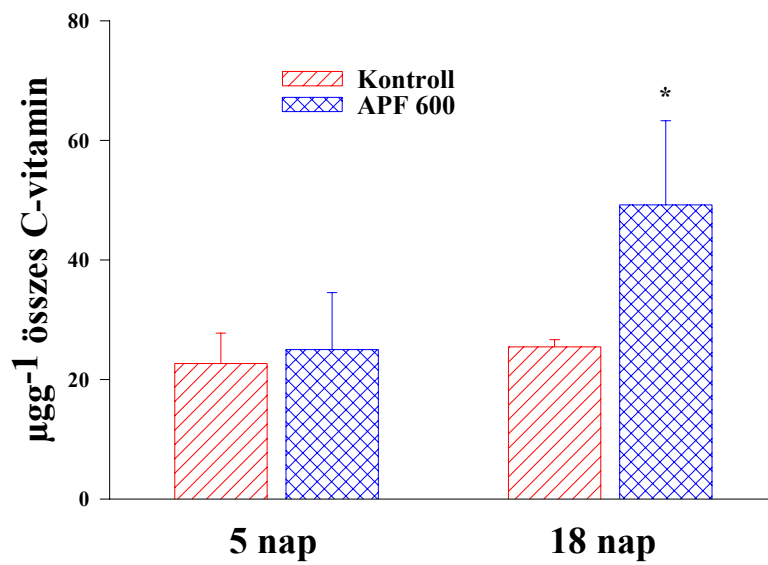
Megjegyzés: ny = nyomokban $<0,05 \mu\text{gg}^{-1}$ C-vitamin

1996-ban, a 2. lárvanevelési kísérlet során, a C-vitamin foszfáttal dúsított tubifex főreggel (APF600 csoport) etetett halak növekedése - az ötödik napon történt spontán darakór fertőzés ellenére - már két hét után szignifikánsan magasabb volt, mint a kontrollcsoporté (34. ábra). Az aszkorbát-2-polifoszfáttal kiegészített tubifex főreggel etetett lárvák teljes testében elraktározott C-vitamin mennyisége kétszer akkora volt, mint amennyit kontrollcsoport halaiban mértünk (35. ábra).



34. ábra: C-vitamin foszfát kiegészítés hatása az európai harcsa (*Silurus glanis* L.) lárváinak növekedésére

Megjegyzés: *szignifikáns különbség a kontrollcsoporttól ($p<0,05$)



35. ábra: C-vitamin foszfát kiegészítés hatása az európai harcsa (Silurus glanis L.) lárváinak összes C-vitamin tartalmára

Megjegyzés: *szignifikáns különbség a kontrollesoporttól ($p < 0,05$)

4.8. C-vitamin felhasználás különböző stresszhelyzetekben

4.8.1. Egyes stresszhelyzetek hatása az európai harcsa C-vitamin felhasználására

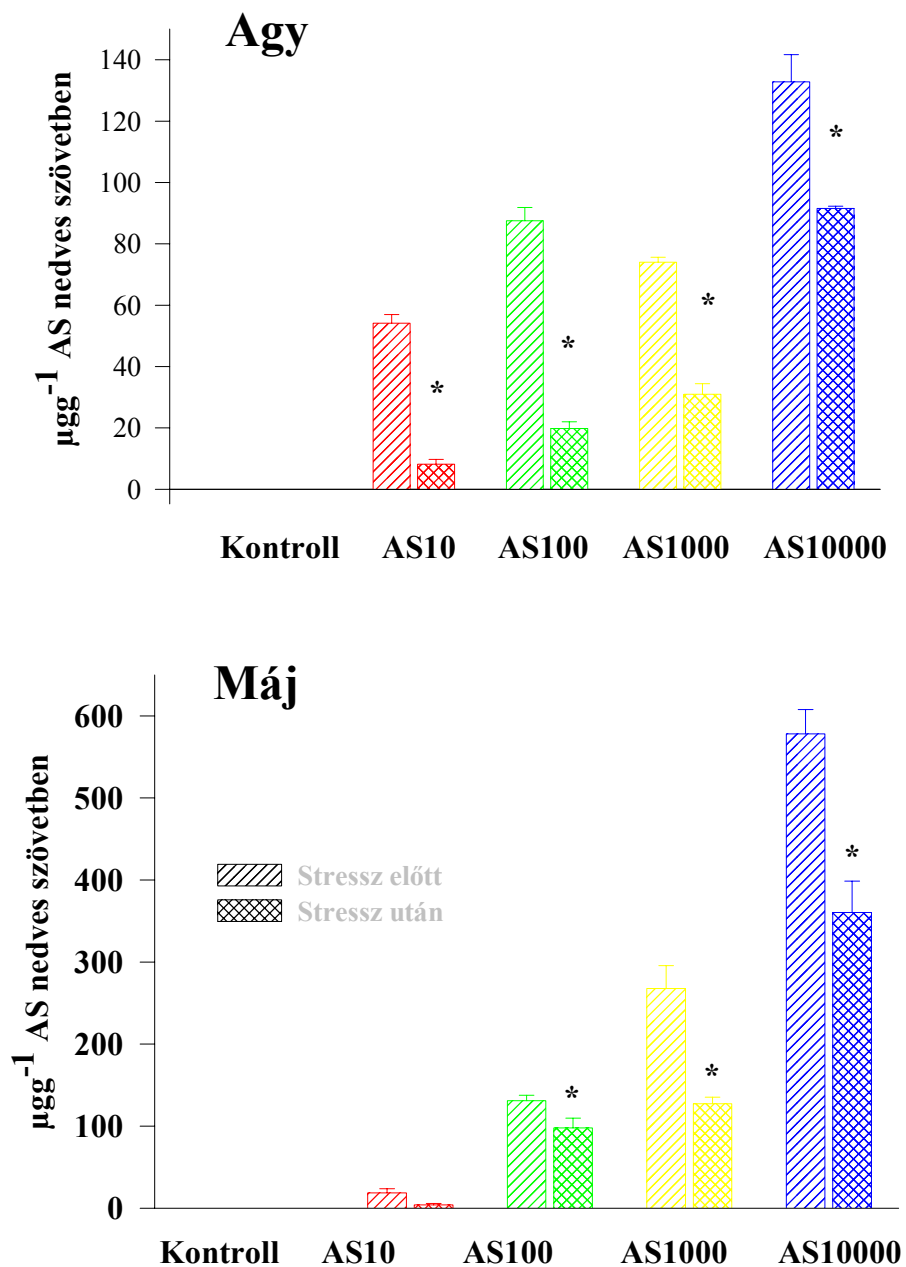
4.8.1.1. A nagy egyedsűrűség okozta stressz

Az 1. etetési alapkísérlet halait a 23. héten vizsgáltuk, amikor a kontrollcsoport halai már nem rendelkeztek C-vitamin tartalékkal. A 36. ábrán mutatjuk be az agy, a vese és a máj összes aszkorbát-tartalmának változásait, melyet HPLC-vel mértünk. Valamennyi kezelt csoportban csökkent az agy és a máj összes aszkorbinsav koncentrációja is. A kontroll halak nem tudtak sehonnan C-vitamint mobilizálni.

Amíg a minimális $10 \mu\text{g g}^{-1}$ AS tartalmú tápon nevelt csoport mind a két vizsgált szövetében jelentős, kb. 75 %-os volt a C-vitamin felhasználás, a nagyobb C-vitamin tartalékkal rendelkező halak az agyból 32 %, míg a májból 58 %-ot használtak fel. A stressz után nem találtunk lényeges változást a halak agyában az L-aszkorbinsav - dehidro-L-aszkorbinsav arányban (Függelék 15. táblázat). A májban az L-aszkorbinsav aránya a dehidro-L-aszkorbinsavhoz képest csak a 10 mg kg^{-1} csoport halainál csökkent, míg a többinél, ha nem is szignifikánsan, de növekedett. TUCKER et. al. (1987) lényegesen nagyobb arányú aszkorbát felhasználást mutatott ki hasonló, de hosszabb ideig tartó stressz helyzetben a szivárványos pisztrángnál. Véleményük szerint a C-vitamin jelentős felhasználása a szerotonin szintézishez szükséges.

4.8.1.2. Formalinos fürdetés okozta stressz

Az 1. etetési alapkísérlet halait a paraziták ellen gyakran alkalmazott formalinnal fürdettük. A kontrollcsoport halai ekkor már nem rendelkeztek a vizsgált szervekben C-vitamin tartalékkal és nem is tudtak a stressz során mobilizálni. A 37. ábrán bemutatott aszkorbát felhasználás, a nagy sűrűség okozta stresszhez képest egészen más dinamikát mutatott. Amíg a májban a táp L-aszkorbinsav koncentrációjának megfelelően csökkent az összes C-vitamin tartalom, addig az agyban a 10 mg kg^{-1} AS csoport kivételével nem változott vagy emelkedett. Különösen kiugró aszkorbát koncentráció növekedést mutatott a $10.000 \text{ mg kg}^{-1}$ AS csoport.



37. ábra: Összes C-vitamin koncentráció változása formalinos fürdetés okozta stressz következtében az európai harcsa (*Silurus glanis* L.) agyában és májában

Megjegyzés: * = szignifikáns különbség ($p < 0,05$) a stressz előtti állapottól

Az összes C-vitaminhoz viszonyítva az L-aszkorbinsav aránya a stressz előtti helyzethez képest mind a két vizsgált szervben alacsonyabb volt. A 10 mg kg^{-1} AS csoport agymintáiban mindössze 10 % ban találtunk L-aszkorbinsavat míg a redukált forma aránya a többi csoportban 40-50 % között mozgott. Formalinkezelés és a halak C-vitamin felhasználásával kapcsolatos publikációt nem találtunk. Az azonban közismert, hogy a formalin az élő szervezetekben szabadgyökök keletkezését indukálja. A dehidro-L-aszkorbinsav koncentrációja valószínűleg ennek következtében emelkedett meg.

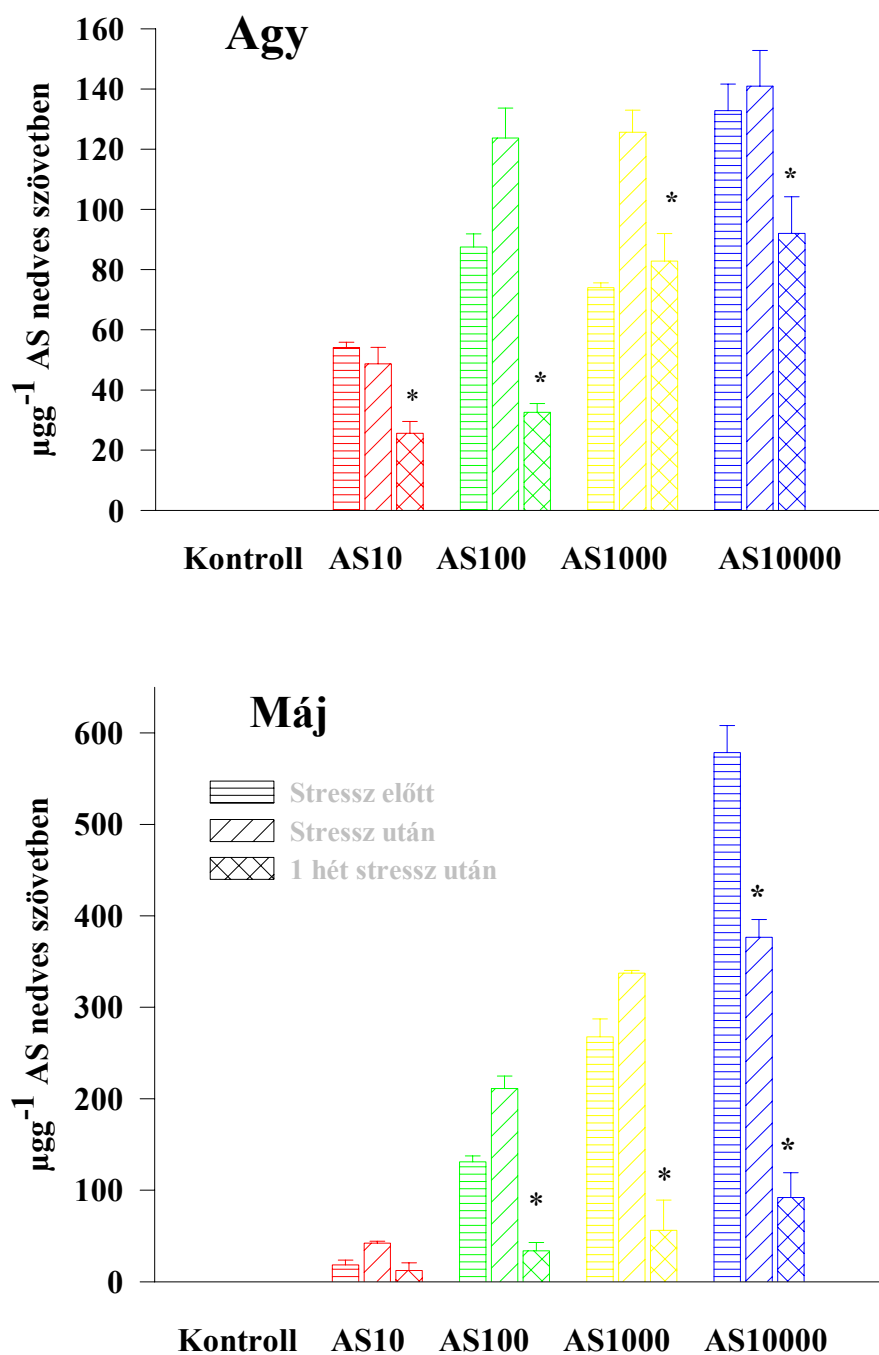
4.8.1.3. Nitrit szennyeződés okozta stressz

Az 1. alapkísérlet halait magas nitrit koncentrációjú vízbe helyeztük a kísérlet 27. hetében, amikor a kontrollcsoport halai már nem rendelkeztek C-vitamin tartalékkal. A nitrit szennyeződés a formalinéhoz hasonlóan közvetlenül a stressz után az összes aszkorbát koncentrációjának megemelkedését okozta az európai harcsa agyában minden olyan csoportnál, ahol elegendő C-vitamin állt a halak rendelkezésére (38. ábra). A minimális 10 mg kg^{-1} AS tartalmú táppal etetett halak azonban valószínűleg nem tudtak más szervekből C-vitamint mobilizálni, ezért részben felhasználták az agyban lévő, amúgy is kevés AS egy részét.

Valamennyi csoportnál a teljes C-vitamin mennyiség dehidro-L- aszkorbinsav formában volt jelen, ami a vitamin jelentősen megnövekedett felhasználását jelzi. A stresszt követő egy hét alatt minden csoport összes aszkorbát koncentrációja csökkent az agyban, de ez a vitaminmennyiség már 62-66 %-ban a redukált L-aszkorbinsav formában volt jelen (Függelék 15. táblázat).

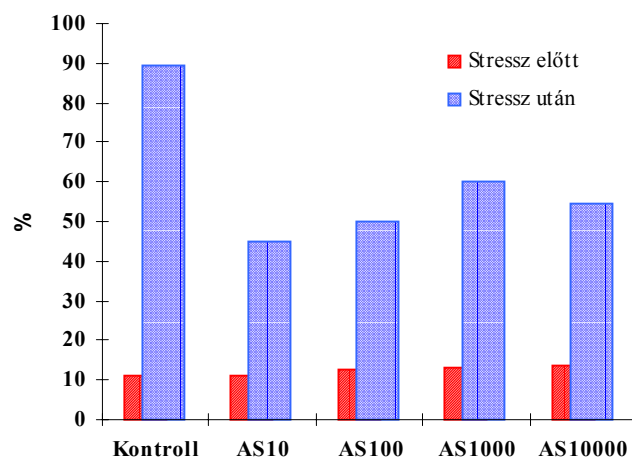
A májban a nitrit stressz ($100 \text{ mg l}^{-1} \text{ N-NO}_2$) után közvetlenül, a $10.000 \text{ mg kg}^{-1}$ csoport kivételével, a stressz után megnőtt az összes aszkorbát koncentráció (38. ábra). A dehidro-L-aszkorbinsav aránya itt is nagyobb volt, ha nem is olyan drámai mértékű, mint az agynál (Függelék 16. táblázat). Egy hét után valamennyi csoport jelentős C-vitamin felhasználást mutatott a májban, amit minden valószínűség szerint a methemoglobin lebontására használtak fel a halak. Ez az eredmény összhangban van korábbi kísérleteinkkel, amikor a halakat egy hétig tartó viszonylag alacsony ($2 \text{ mg l}^{-1} \text{ N-NO}_2$) nitrittartalmú vízben tartottuk (GY. PAPP et. al., 1994a). A methemoglobin koncentráció a stressz után közvetlenül 90 % volt a kontroll és 60 % körül valamennyi L-aszkorbinsavvak kiegészített táppal etetett csoportnál (39. ábra).

Nem mutatott tehát összefüggést a takarmányok aszkorbát szintjével, mint ahogy azt a tengeri sügérnél kimutatták (SCARANO et. al., 1991).



38. ábra: Nitrit stressz okozta változások az európai harcsa (*Silurus glanis* L.) szöveteinek összes aszkorbát koncentrációjában

Megjegyzés: * = szignifikáns különbség a stressz előtti állapottól



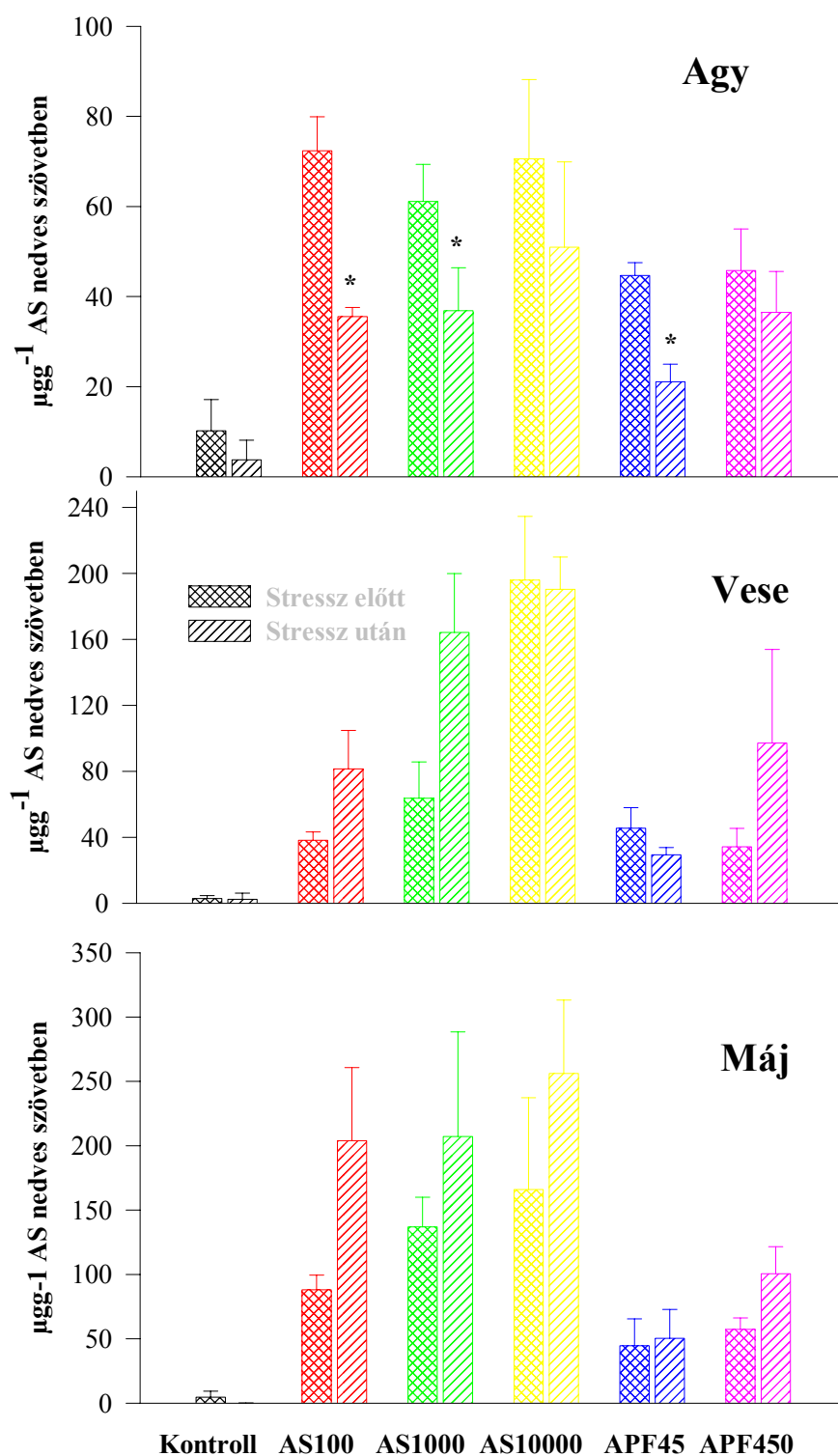
39. ábra: Methemoglobin koncentráció alakulása magas nitrattartalom okozta stressz hatására az európai harcsa (*Silurus glanis* L.) vérében

4.8.1.4. Alacsony oxigéntartalom okozta stressz

Az 5. alapkísérlet halaival végeztük a 8. héten. Ekkor még a kontroll csoport halai is rendelkeztek C-vitamin tartalékkal (40. ábra). Annak ellenére, hogy ez a halfaj nem különösebben érzékeny a víz alacsony oxigéntartalmára, a változások jelentős mértékűek voltak a különböző szövetek C-vitamin tartalmában 24 órával a stressz után. Az összes aszkorbát tartalom enyhén, de nem szignifikánsan alacsonyabb volt a kontroll az AS10000 és az APF450 csoport halak agyában. Az AS 100, az AS 1000 és az APF45 csoportok szignifikáns ($p < 0,05$) koncentráció csökkenést mutattak. A C-vitamin nagyrészt L-aszkorbinsav formában volt jelen (Függelék 17. táblázat).

Az összes aszkorbát koncentráció szignifikánsan ($p < 0,05$) magasabb értékeket mutatott a vesében az AS100, az AS1000 és az APF450 csoportoknál, míg a többi nem mutatott lényeges változást (40. ábra). A dehidro-L-aszkorbinsav aránya az APF45 csoport kivételével szignifikánsabban magasabb volt a stressz után (Függelék 17. táblázat).

A C-vitamin gyakorlatilag kimutathatatlan volt a kontroll halak májában az alacsony oxigénnel történt kezelés után 24 órával, míg az összes többi csoportnál valamilyen mértékben növekedett. A koncentráció-emelkedés szignifikáns ($p < 0,05$) volt, az AS100, az AS1000 és az APF450 csoportoknál (40. ábra). Az APF45 halaknál a dehidro-L-aszkorbinsav aránya is szignifikánsan ($p < 0,005$) magasabb volt (Függelék 17. táblázat).



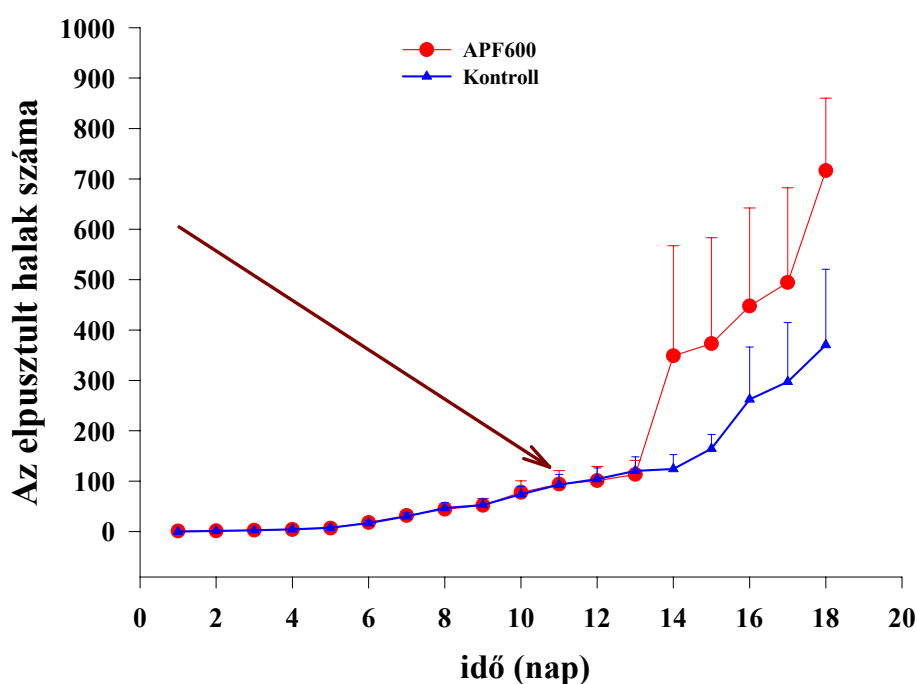
40. ábra: Alacsony oxigén tartalom okozta stressz hatása európai harcsa (*Silurus glanis* L.) szöveteinek aszkorbát tartalmára

Megjegyzés: AS = L-aszkorbinsav; APF = aszkorbát-2-poliszulfát;

* = szignifikáns különbség ($p < 0,05$) a stressz előtti állapottól

4.8.1.5. Spontán fertőzés okozta stressz hatása európai harcsa lárvákra

A 2. lárvanevelési kísérlet során az etetés megkezdése után öt nappal a halak megfertőződtek darakórral (*Ichthyophthirius multifiliis*). A halakat a technológia szerint ilyenkor szokásos módon malachitzölddel fürdettük, de ennek ellenére a természetes tubifex féreggel táplált csoportok átlagosan 30 %-a élte túl a kórt és az ezt követő két hétben növekedésük szinte teljesen megállt (41. ábra).



41. ábra: Európai harcsa (*Silurus glanis* L.) lárvák mortalitása darakór (*Ichthyophthirius multifiliis*) hatására

Amint az a 41. ábrán látható, az aszkorbát-2-polifoszfáttal dúsított tubifex féreggel táplált halak lényegesen nagyobb, mintegy 70 %-ban maradtak életben. WAHLI et. al. (1986) kimutatták, hogy a C-vitaminnal táplált csoportok lényegesen nagyobb százalékban éltek túl a fertőzést szivárványos pisztrángnál és enyhébb fertőzöttség esetén a parazita ellen a szerzett immunitás is kialakul. Mivel a darakór okozója azonban hám alatt élő parazita (MOLNÁR és SZAKOLCZAI, 1973), mindenképpen sérüléseket okoz a behatolások területén. Ez elősegíti a más kórokozók okozta felülfertőződést. A C-vitamin jótékony hatását valószínűleg az okozza,

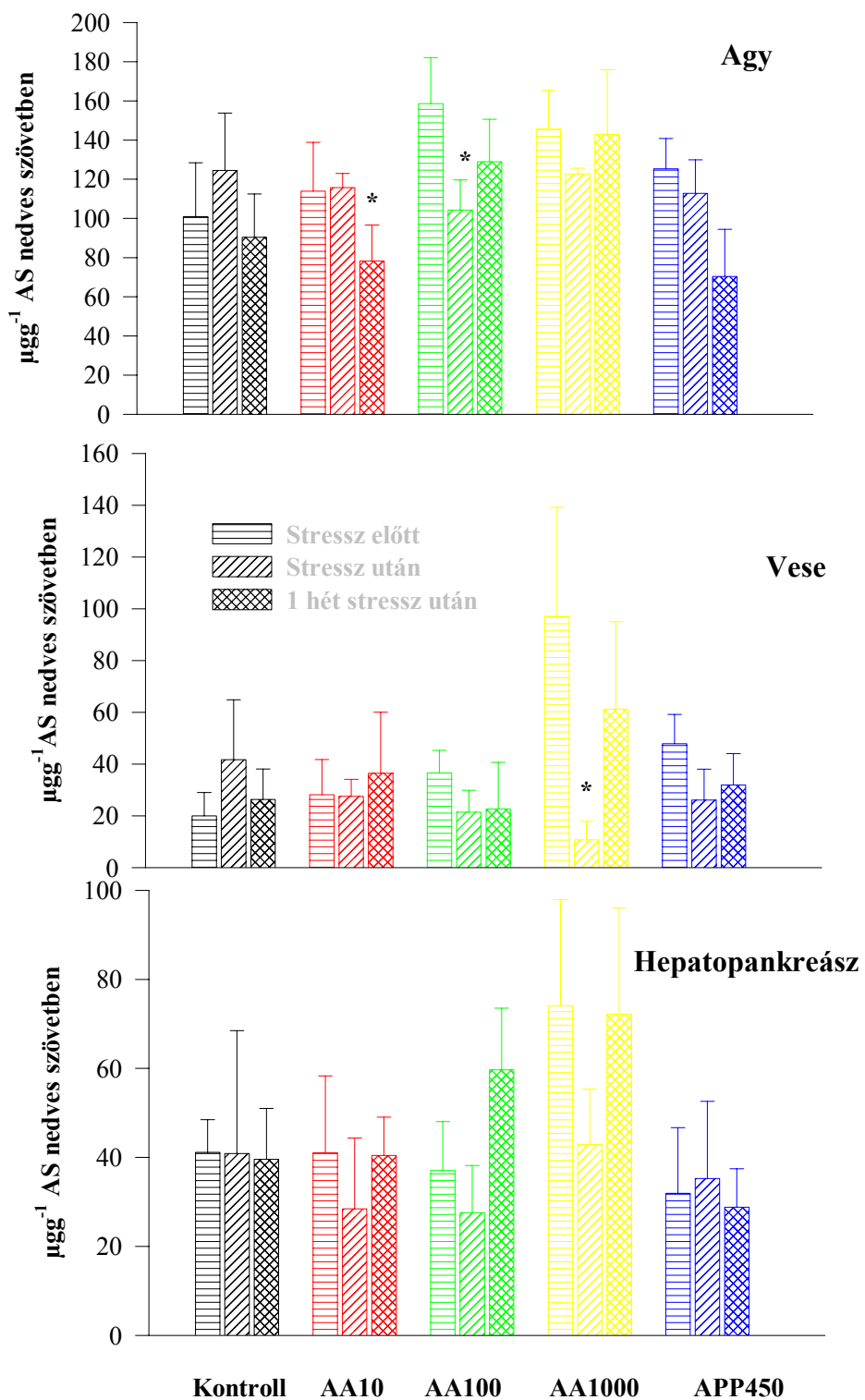
hogy megfelelő szerkezetű kollagén képződik és szintézise is gyorsabban megy végbe. A parazita által okozott sérülések így hamarabb begyógyulnak és ezáltal a további fertőzések lehetősége csökken.

4.8.2. Egyes stresszhelyzetek hatása a tok hibrid (*Acipenser ruthenus* L. x *Acipenser baeri* Brandt) C-vitamin felhasználására

4.8.2.1. Nitrit szennyeződés okozta stressz

A magas nitrit kezelést a 6. etetési alapkísérlet halaival végeztük három hónappal annak megkezdése után. A halak agyának összes aszkorbát koncentrációjában nem volt szignifikáns ($p < 0,05$) különbség a stressz előtt. A nitrit kezelést követően enyhén emelkedett az összes csoport C-vitamin koncentrációja, majd egy héttel később csökkent a kontroll, az AS10 és az APF450 halaknál, míg az AS100 és AS1000 csoportoknál visszatért a stressz előtti értékekre (42. ábra). Nem találtunk szignifikáns különbséget az L-aszkorbinsav és a dehidro-L-aszkorbinsav arányában (Függelék 18. táblázat). A C-vitamin foszfáttal táplált csoportnál nem találtunk egyetlen esetben sem aszkorbát-2-foszfátot az agymintákban.

A kísérlet előtt az összes aszkorbát tartalom kb. 10 %-a foszfát formában volt jelen az APF 450 csoport veséjében, ami stresszt követően a kimutathatósági határ alá csökkent, majd egy héttel a kezelést követően visszatért eredeti koncentrációjához. Amíg a nitrit hatására a kontrollcsoport veséjében az összes C-vitamin tartalom enyhén megnőtt, addig az 1.000 mgkg⁻¹ L-aszkorbinsavval táplált halaknál rendkívülien nagy csökkenést tapasztaltunk. Mivel a tok hibrid a C-vitamint előállítja, veséjében az aszkorbát szint emelkedése a megnövekedett igénynek köszönhető. Az AS1000 csoportnál észlelt drámai aszkorbát koncentráció csökkenés azonban azt sugallja, hogy a C-vitamint a veséjében előállító hal L-aszkorbinsav szintetizáló képessége valamilyen módon gátolt, de nem a gulonolakton oxidáz enzim működésében, mint ahogy az előzőekben (4.4.3.2.) bemutattuk, illetve más kutatók leírták (MOREAU et. al., 1999b).



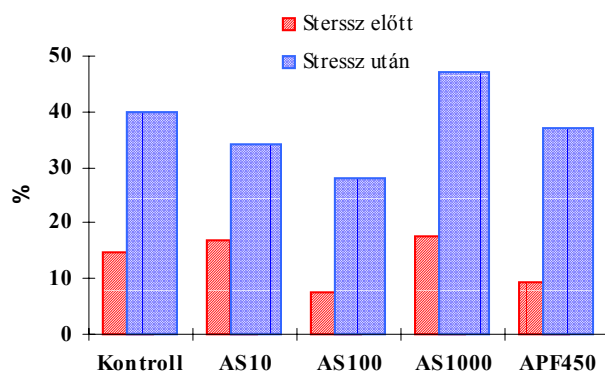
42. ábra: A nitrit stressz hatása a tok hibrid (*Acipenser ruthenus* L. x *Acipenser baeri* Brandt) szöveteinek aszkorbát tartalmára

Megjegyzés: AS = L-aszkorbinsav; APF = aszkorbát-2-poliszulfát;

* = szignifikáns különbség ($p < 0,05$) a stressz előtti állapottól

A gátolt C-vitamin szintézis éreztette hatását az AS1000 csoport halainak hepatopankréaszában is, a stresszt követő jelentős koncentráció csökkenéssel, annak ellenére, hogy az a kezelést megelőzően lényegesen magasabb volt a többiekéhez képest. A kontroll halak itt is kiegyensúlyozott C-vitamin tartalmat mutattak az egész kísérlet alatt. A többi csoportnál nem lehetett szignifikáns különbségeket kimutatni a kezelést követően, bár enyhe aszkorbát koncentráció csökkenést tapasztaltunk.

A dehidro-L-aszkorbinsav aránya az L-aszkorbinsavhoz képest megemelkedett a stresszt követően az agyban és a hepatopankréaszban, de a C-vitamin túlnyomórészt AS formában volt jelen a vesében (Függelék 18. táblázat). Nem volt különbség a csoportok vérének methemoglobin koncentrációjában (43. ábra).

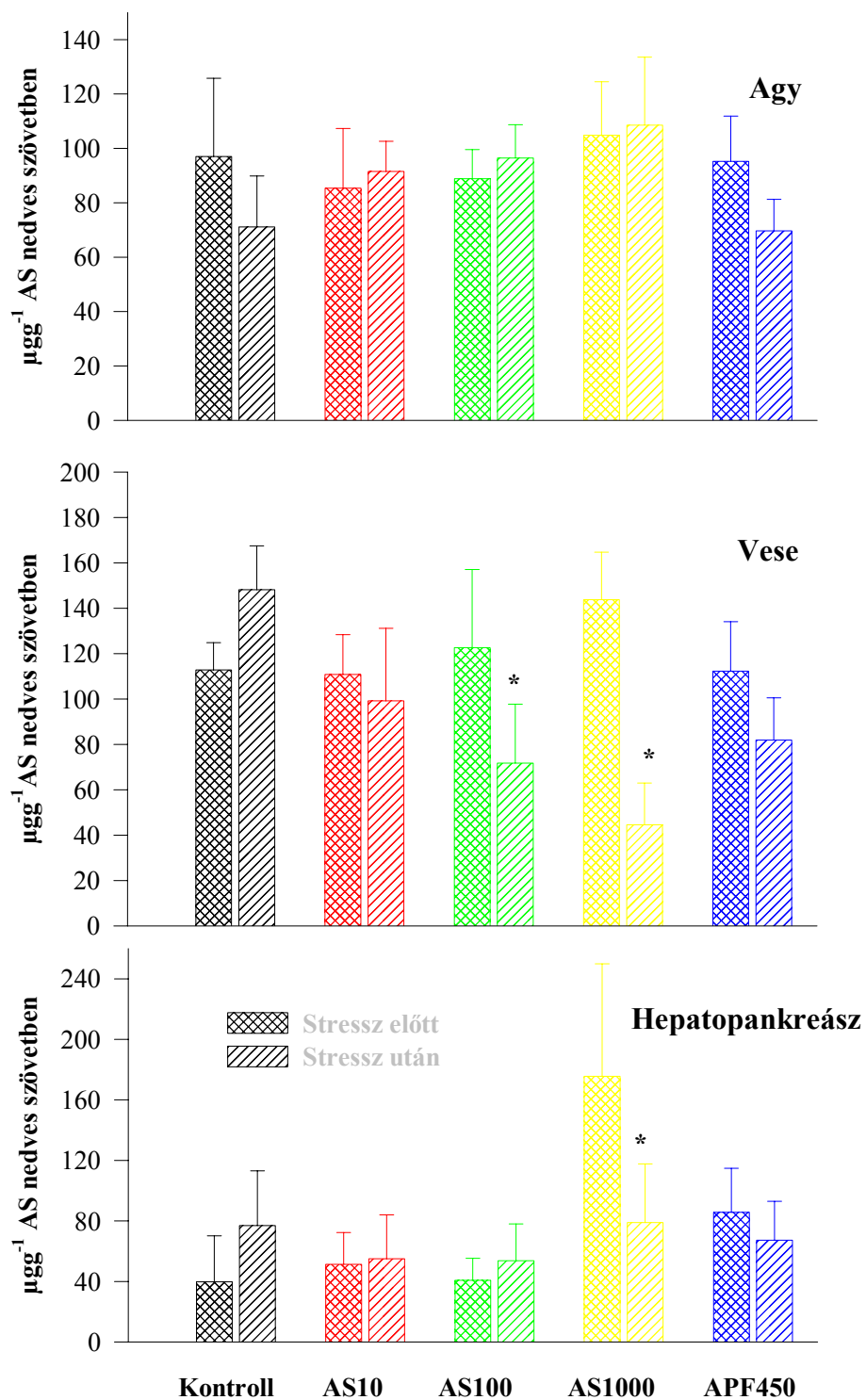


43. ábra.: Methemoglobin koncentráció alakulása magas nitrit tartalom okozta stressz hatására a tok *hibrid* (*Acipenser ruthenus* L. x *Acipenser baeri* Brandt) vérében

Megjegyzés: AS = L-aszkorbinsav; APF = aszkorbát-2-poliszulfát

4.8.2.2. Alacsony oxigéntartalom okozta stressz

A tokfélék általában nagyon érzékenyek az oxigénhiányra, ezért lényegesen kisebb mértékben csökkentettük a víz oxigéntartalmát, mint az európai harcsánál. Az agyban az APF450 csoportnál szignifikáns ($p < 0,005$) csökkenést találtunk az összes aszkorbát koncentrációban. Az egyéb C-vitamin szintű tápokkal etetett halak nem mutattak lényeges változást.



44. ábra: Az oxigénhiány hatása a tok hibrid (*Acipenser ruthenus* L. x *Acipenser baeri* Brandt) szöveteinek összes aszkorbát tartalmára

Megjegyzés: AS = L-aszkorbinsav; APF = aszkorbát-2-polifoszfát;

* = szignifikáns különbség a stressz előtti állapottól

A két legmagasabb aszkorbát tartalmú táppal etetett csoport halainál a stressz előtt a dehidro-L-aszkorbinsav aránya mintegy 30 %-os volt (Függelék 19. táblázat). A kontroll, az AS10 és az AS100 csoportnál 40-60 %-ra emelkedett az oxigénhiány hatására.

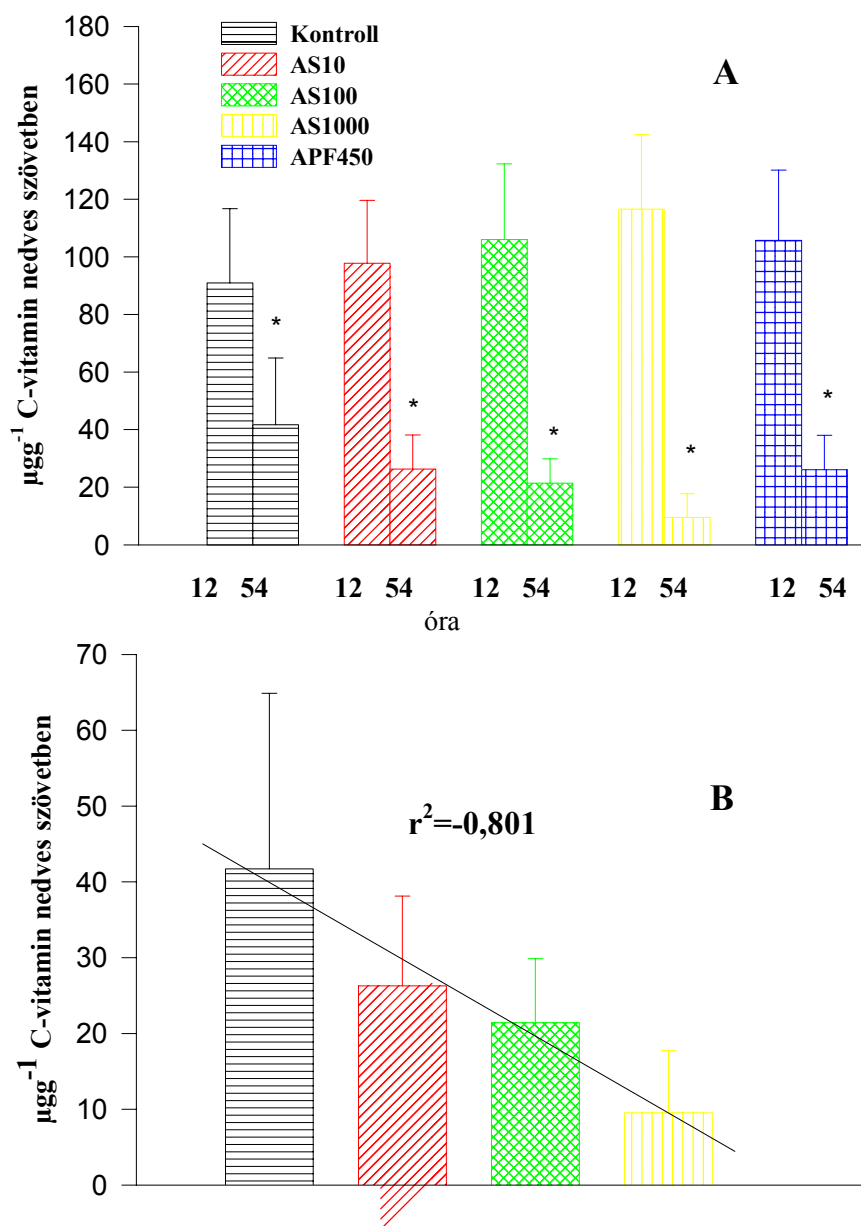
A stressz jelentős összes aszkorbát tartalom emelkedést (~50 %) okozott a kontroll halak veséjében, míg az összes többi csoportnál csökkent ez az érték (44. ábra). Az 1.000 mgkg⁻¹ L-aszkorbinsavval táplált halaknál ~60 %-al volt alacsonyabb a jellemzően dehidro-L-aszkorbinsav formában jelenlevő C-vitamin (Függelék 19. táblázat).

Az összes aszkorbát tartalom változása az APF450 csoport kivételével a hepatopankréaszban a veséhez hasonló trendet mutatott az oxigénhiányt követően (44. ábra). Amíg a dehidro-L-aszkorbinsav koncentráció drasztikusan csökkent az AS1000 csoportnál, addig több mint kétszeresére nőtt a kontroll halaknál (Függelék 19. táblázat).

4.8.2.3. Az éhezés hatása

A vese C-vitamin-tartalom változásait vizsgáltuk tok hibridnél viszonylag hosszú, 54 órán át tartó éhezés hatására. A vesét azért választottuk, mert ebben a szervben folyik az L-aszkorbinsav szintézis. Az összes aszkorbát tartalom minden csoportnál csökkent (45. ábra), de a legnagyobb mértékben az AS1000-nél. Ennél a csoportnál a nitrit és az oxigénhiány kísérletekben találtakhoz hasonlóan, az AS tartalom csökkenése drasztikus mértékű volt. A takarmányok aszkorbát tartalma és az összes C-vitamin koncentráció változása összefüggést mutatott ($r^2 = -0,801$).

MOREAU és DABROWSKI (2000) mérései és saját eredményeink is azt mutatták, hogy a magas C-vitamin tartalmú takarmányok etetése nem okoz csökkenést a gulonolakton oxidáz enzim aktivitásában. Ennek ellenére a halak L-aszkorbinsav produkciója jelentősen csökkent a magas C-vitamin tartalmú tápok etetésének következtében. Ez az eredmény azt sugallja, hogy a szintézis valamelyik lépésében mégis kialakul gátlás, azaz „*feed back*” szabályozás működik.



3. ábra: A: Az összes C-vitamin tartalom változása éhezés hatására a tok hibrid (*Acipenser ruthenus* L. x *Acipenser baeri* Brandt) veséjében
 B: A takarmányok L-aszkorbinsav tartalmának összefüggése a vese összes C-vitamin koncentrációjának csökkenésével

* szignifikáns ($p < 0,05$) különbség a kontroll csoporttól

4.9. Az európai harcsa (*Silurus glanis* L.) C-vitamin igénye

A kísérletek eredményeiből egyértelműen megállapítható, hogy az európai harcsa (*Silurus glanis* L.) nem tudja szintetizálni az L-aszkorbinsavat, azaz a C-vitamint, ezért táplálékában kell számára biztosítani.

A különböző aszkorbát szintű tápokkal etetett 5-200 g átlagtömegű európai harcsa növekedési görbéiből (12. ábra), mortalitásából, valamint a skorbut makroszkopikus tüneteinek megjelenéséből (4. és 5. kép) arra következtetésre jutottunk, hogy minimális C-vitamin igénye L-aszkorbinsavban kifejezve 10 mgkg^{-1} . Eredményeinkhez hasonlóan az atlanti lazac (SANDNES és WAAGBOE, 1991) vagy a 13 g kezdeti átlag tömegű csatorna harcsa (EL NAGGAR és LOVELL, 1991) minimális C-vitamin igénye is 10 mgkg^{-1} .

Ha figyelembe vesszük a szövettani vizsgálatok (13, 14 és 15. ábra), valamint a máj, az agy és a vese telítődésének (19. ábra) eredményeit, $100\text{-}200 \text{ mgkg}^{-1}$ L-aszkorbinsav tartalmú takarmány tekinthető optimálisnak az európai harcsa ezen korosztálya számára. Eredményeink ebben az esetben is egyeznek az atlanti lazacnál (LALL et. al., 1989) és a csatorna harcsánál (MUSTIN és LOVELL, 1992) mért értékekkel. A szivárványos pisztráng optimális L-aszkorbinsav igénye már magasabb, 360 mgkg^{-1} (MATUSIEWITZ et al., 1995).

Környezeti, vagy fertőzés okozta stresszhelyzetekben az európai harcsa C-vitamin szükséglete megnőtt, a formalin stressz esetében elérte a 10.000 mgkg^{-1} AS szintet (37. ábra). A szövettani vizsgálatok során kimutattuk, hogy a magas, legalább 1.000 mgkg^{-1} aszkorbát koncentrációjú a takarmány etetése már néhány hét után szöveti károsodást okozhat, ezért az ilyen magas C-vitamin szint alkalmazását csak kúraszerűen, legfeljebb egy-két hétig javasoljuk. Más kutatók is találkoztak a magas C-vitamin tartalmú takarmányok etetésének jótékony hatásával pl. darakór fertőzés esetében a szivárványos pisztrágnál (WAHLI et. al., 1986).

„*In vitro*” és „*in vivo*” kísérletekkel is igazoltuk, hogy az európai harcsa számára a természetes L-aszkorbinsavon kívül C-vitamin forrás lehet az iparilag előállított aszkorbát-2-mono- és polifoszfát is. Kísérleteink szerint az európai harcsa számára optimális C-vitamint már 100 mgkg^{-1} aszkorbát-2-monofoszfát, illetve 150 mgkg^{-1} aszkorbát-2-polifoszfát tartalmú takarmánnyal biztosíthatjuk. Ezek az értékek egyeznek a csatorna harcsánál találtakkal (MUSTIN és LOVELL, 1992; WILSON et al., 1989), a szivárványos pisztráng azonban magasabb aszkorbát-2-monofoszfát tartalmú tápot igényel (MATUSIEWITZ et al., 1995).

4.10. A tok hibrid (*Acipenser ruthenus* L. x *Acipenser baeri* Brandt) C-vitamin igénye

Kísérleteink egyértelműen bizonyították, hogy a tok hibrid elegendő C-vitamint szintetizál a veséjében, ezért takarmányában kiegészítésre nem szorul. Eredményeink összhangban vannak DABROWSKI (1994) és FRACALOSS I et. al. (2001) méréseivel is, melyek szerint az eddig vizsgált porcos halfajok mindegyikében sikerült kimutatni a C-vitamin szintetizáló képességet. Az egyes szövetek aszkorbát tartalmának alakulása stresszhelyzetekben arra utal, hogy a tok hibrid takarmányának magas ($>10\text{-}20\text{ mgkg}^{-1}$) összes C-vitamin tartalma csökkentheti a halak védekező képességét.

5. KÖVETKEZTETÉSEK, JAVASLATOK

1. A C-vitamin legfontosabb természetes és iparilag előállítható formái, az L-aszkorbinsav, a dehidro-L-aszkorbinsav, az aszkorbát-2-mono- és polifoszfát, valamint az aszkorbát-2-monoszulfát megfelelő minta előkészítéssel HPLC-vel meghatározhatók egy minta ugyanazon extraktumából.
2. A kísérletek eredményeiből egyértelműen megállapítható, **hogy az európai harcsa (*Silurus glanis* L.) nem tudja szintetizálni az L-aszkorbinsavat, azaz a C-vitamint, ezért táplálékában kell számára biztosítani.**
3. Az 5-200 g átlagtömegű európai harcsa minimális C-vitamin igénye L-aszkorbinsavban kifejezve 10 mgkg^{-1} . A halak optimális C-vitamin szükséglete $100\text{--}200 \text{ mgkg}^{-1}$ L-aszkorbinsav.
4. A magas, 1.000 mgkg^{-1} C-vitamin koncentrációjú táppal etetett halak károsodást mutattak porcszöveteikben, ezért **a magas aszkorbát szintű tápok tartós, azaz egy hónapnál hosszabb ideig tartó alkalmazása mindenképpen kerülendő.** Kimutattuk, hogy ezt a károsodást minden valószínűség szerint az L-aszkorbinsavból keletkező különböző oxalátok okozzák.
5. **Környezeti, vagy fertőzés okozta stresszhelyzetekben rövidebb ideig szükségessé válhat az emelt szintű, akár 10.000 mgkg^{-1} C-vitamin kiegészítéssel történő takarmányozás is.** Ilyen eset lehet, ha valamilyen okból vegyszeres fürdetést kell alkalmaznunk.
6. „*In vitro*” és „*in vivo*” kísérletekkel is igazoltuk, hogy **az európai harcsa számára C-vitamin forrás lehet a természetes L-aszkorbinsavon kívül az iparilag előállított aszkorbát-2-mono- és polifoszfát is.** A bélcsatornában, a vesében és a májban jelenlévő természetes foszfatáz enzimek gyorsan hidrolizálják ezeket a vegyületeket, így a halak hozzájutnak a számukra szükséges aszkorbáthoz.
7. **Az európai harcsa szöveteiben nem találtunk aszkorbát-2-monoszulfátot, ami azt jelenti, hogy nem képes ebben a formában tárolni.** „*In vitro*” kísérleteink pedig azt bizonyítják, hogy ez a halfaj nem rendelkezik olyan szulfohidroláz enzimmel, ami ebből a vegyületből felszabadítaná, a bioaktív L-aszkorbinsavat. **Ezért nem valószínű, hogy az aszkorbát-2-szulfát C-vitamin forrást jelentene az európai harcsa számára.**

8. ^{14}C -vel jelölt L-aszkorbinsavval végzett kísérleteink azt igazolták, hogy folyamatos ellátás esetén **az európai harcsa nem tárolja a C-vitamint**, két hét alatt teljes egészében felhasználja. A hosszabb ideig tartó, gyakorlatilag aszkorbát mentes takarmányozás esetében is kiürülnek a szervek 50-60 nap alatt.
9. **A lárvák, zsengeivadékok első élő táplálékát ami rendszerint tubifex, célszerű kiegészíteni valamilyen formájú C-vitaminnal.** Gyakorlatban ez viszonylag könnyen megoldható, mivel az apróra vágott táplálék vizes oldatból egyszerű abszorpcióval felveszi a vitamin bármelyik formáját. A C-vitamin kiegészítés elősegíti az elegendő mennyiségű és megfelelő szerkezetű kollagén szintézisét, ami növeli a fiatal halak darakór elleni védekező képességét.
10. Kísérleteink egyértelműen bizonyították, hogy **a tok hibrid (*Acipenser ruthenus* L. x *Acipenser baeri* Brandt) elegendő C-vitamint szintetizál a veséjében, ezért nem szorul takarmányában kiegészítésre.**
11. **A tok hibrid L-aszkorbinsav előállító képességét a takarmány alacsonyabb, 10-20 mgkg⁻¹ C-vitamin tartalma nem csökkenti nagyobb mértékben, de 1.000 mgkg⁻¹ L-aszkorbinsavat tartalmazó táp hosszabb ideig (legalább egy hónap) tartó etetése „feed back” reakciót okoz és valamelyik pontján gátolja a szintézist.** Így stresszhelyzetben, amikor egyébként a C-vitamin előállítása nagyobb mennyiségben folyik, a halak szükségletüknél lényegesen kevesebb vitaminhoz juthatnak.
12. **A tok hibrid nem tárolja szöveteiben a C-vitamint**, de nagyobb mennyiségű külső utánpótlás esetén az egyes szervek pillanatnyi aszkorbát koncentrációja enyhén megemelkedik.

A két halfaj vizsgálatának eredményei azt mutatják, hogy **a halak takarmányának kiegészítése C-vitaminnal nagy gondosságot igényel**, különös tekintettel arra, hogy az esetleges tévedés hatása csak hónapok múlva jelentkezik.

A tenyésztőnek **feltétlenül ismernie kell, hogy a termelni kívánt hal elő tudja-e állítani a C-vitamint.** Így az L-aszkorbinsav szintetizálására képes tokfélék takarmányában kerülendő a 10-20 mgkg⁻¹-nél magasabb C-vitamin tartalom, ezért nem javasoljuk a magas aszkorbát tartalmú pisztrángtápok alkalmazását, ami a gyakorlatban időnként előfordul.

A C-vitamin kiegészítést igénylő fajoknál ugyanolyan káros lehet a takarmányban alkalmazott túl magas aszkorbát szint, mint az optimális szükségletnél alacsonyabb.

A fentieket és a dolgozatban közölt további eredményeket figyelembe véve mindenképpen **szükséges lenne más, a hazai haltenyésztés számára fontos halfajok C-vitamin szükségletének meghatározása is.**

Figyelmet kellene fordítani az általunk eddig nem kutatott **anyafelkészítési időszak vizsgálatára is, hiszen az ikrák C-vitamin tartalma döntően fontos** lehet a még táplálkozni nem tudó lárvák számára.

További kísérleteket javasolunk **a C-vitamin szerepének tisztázására a leggyakoribb kórokozók elleni védekezésben.**

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Amióta a XX. század elején bizonyítottá vált, hogy a C-vitamin hiánya okozza az emberiség egyik rettegett betegségét, a skorbutot, egyre többen tanulmányozták szerepét különböző állatfajok esetében is. A ma már közismert, triviális nevén L-askorbinsav nevű vegyületről azóta bebizonyosodott, hogy jelentős élettani hatása is van. Többek között az emberi és állati szervezetekben végbemenő hidroxilálási reakciókban résztvevő enzimek nélkülözhetetlen kofaktora, kulcsszerepe van a szabadgyökök veszélyes reakciói elleni védelemben, antioxidáns és immunstimulátor, valamint fontos szerepet játszik egyes stresszhatások kivédésében is. Míg a növényvilág tagjai igen, addig az ember és az állatok egy része gulonolakton oxidáz enzim hiányában nem képesek előállítani ezt az élő szervezetek számára nélkülözhetetlen vitamint.

Az intenzív haltenyésztés elterjedésével egyre többször észleltek egyes halfajoknál az emberi skorbuthoz hasonló tüneteket, amiről a hetvenes évek végére bebizonyították, hogy a C-vitamin hiány okozza. A betegséget több halfajra, így a pisztrángra, a lazacra, a csatorna harcsára és a tengeri sügérre is leírták. A kilencvenes évek végére bebizonyosodott, hogy amíg a fejlettebb csontos halak nem tudják szintetizálni az L-askorbinsavat, addig a primitív porcos halak elegendő gulonolakton oxidáz enzimmel rendelkeznek a számukra szükséges mennyiségű C-vitamin előállításához.

A hatvanas évek végén többek között artémia petékből egy addig ismeretlen, stabil C-vitamin formát izoláltak, az askorbát-2-szulfátot, amelyet kimutattak halakból is, és így hamarosan széleskörűen elfogadottá vált, hogy a halak valószínűleg szulfát formájában tárolják a C-vitamint. A későbbi pontosabb analitikai módszerekkel azonban nem sikerült halakból kimutatni ezt a vegyületet. Mivel az L-askorbinsav bomlékony, további stabil askorbát formákat (foszfát, palmitát, glükozid) is előállítottak. A halaknál az L-askorbinsav foszfátészterei bizonyultak a legalkalmazhatóbbnak, mert a szervezetükben amúgy is jelenlévő savas foszfátáz enzimek segítségével hasznosítani tudják azokat.

A két leggyakoribb természetes forma az L-askorbinsav és a dehidro-L-askorbinsav spektrofotometriásan és HPLC-vel (magas nyomású folyadékkromatográf) jól mérhető. Az iparilag előállított stabil C-vitamin formákat is meg lehet határozni mind a két módon, de a mai napig nincs egy olyan általánosan elfogadott módszer, amivel legalább a legfontosabb

természetes és iparilag előállítható aszkorbátformák egy minta ugyanazon extraktumából meghatározhatók lennének.

A halak C-vitamin szükségletének megállapítása bonyolult feladat. A növekedés és a mortalitás vizsgálatával, valamint a skorbut jeleinek megfigyelésével legfeljebb a minimális aszkorbát igényt határozhatjuk meg. Az egyes korosztályok optimális C-vitamin szükségletét összetett kísérletsorozattal lehet megállapítani, ami többek között kiterjed a szövettani vizsgálatokra, az egyes szervek aszkorbát koncentrációjára és a stresszhelyzetekben fellépő változásokra is. Szinte alig vannak adatok a C-vitamin túladagolását illetően.

Bár a C-vitamin létfontosságú több, hazánkban intenzíven tenyésztett halfaj számára is, Magyarországon csak a kilencvenes évek elején kezdődtek el a kutatások, valószínűleg a kis volumenű hazai intenzív haltenyésztés miatt. Mivel az EU csatlakozási folyamat során a takarmányozás területén is egyre nagyobbak a minőségi követelmények, célszerű nagyobb figyelmet fordítani a takarmányok vitamin, valamint egyéb mikro-tápanyag tartalmára.

Munkánkban a természetes C-vitaminnak és egyes iparilag előállítható formáinak hatását mutatjuk be az európai harcsára (*Silurus glanis* L.) és egy tok hibridre, kecsge x lénai tok (*Acipenser ruthenus* L. x *Acipenser baeri* Brandt). Kísérleteinket a Halászati és Öntözési Kutatóintézet kísérleti recirkulációs rendszerében végeztük. Az egyes vizsgálatokat minden esetben megelőzte egy-egy különböző C-vitamin szintű és (10-10.000 mgkg⁻¹ aszkorbát) formájú (L-aszkorbinsav (AS), aszkorbát-2-mono (AMF)- és polifoszfát (APF)) táppal történő etetési alapkísérlet. Az ezekhez használt 5-150 g átlagtömegű halakat 100 l-es kádakban neveltük. A vízátfolyás a kádakban 7 lmin⁻¹, a víz hőmérséklet 22-23 °C, az oldott oxigén tartalom 80-90 %, a pH 8,5 volt. Az időtartam, a népesítés és a halak mérete kísérletenként változott.

Valamennyi kísérlet során egy azonos összetételű, megközelítően C-vitamin-mentes alaptápot használtunk kontrollként. Figyeltük a halak növekedését, mortalitását, a skorbut mikroszkopikus és makroszkopikus tüneteit. Meghatároztuk a tok hibrid gulonolakton oxidáz enzim aktivitását. Mind a két halfajnál mértük a máj, a vese és az agy aszkorbát-státuszát, aszkorbát felvételét és telítődését, valamint a foszfát és szulfát hidrolízisét az emésztőrendszerben. A C-vitamin szükséglet meghatározásához különböző stressz kísérleteket is végeztünk: nagy egyedsűrűség, formalin, magas nitrit, oxigénhiány és éhezés.

Az európai harcsa lárváinál az első élő táplálék, a tubifex L-aszkorbinsavval, illetve az aszkorbát-2-polifoszfáttal történő dúsításának hatását vizsgáltuk.

A szövetek és a takarmány C-vitamin tartalmát és összetételét az általunk kidolgozott HPLC, illetve egyes esetekben ismert spektrofotometriás módszerrel mértük.

A C-vitamin meghatározásokhoz **kifejlesztettünk egy HPLC módszert**, amely alkalmas a természetes C-vitamin formák, az aszkorbát-2-mono- és polifoszfát, valamint az aszkorbát-2-monoszulfát mérésére. Az irodalomban talált lehetőségek eddig nem alkalmazott kombinációját alkalmaztuk a minták előkészítéséhez. A háttérkorrekcióhoz a teljes L-aszkorbinsav tartalmat specifikus enzimreakcióval (aszkorbát oxidáz enzimmel) oxidáltuk. Az L-aszkorbinsavat jéghideg perklórsavas oldattal stabilizáltuk és közvetlenül mértük. A dehidro-L-aszkorbinsavat ditioeritritollal redukáltuk L-aszkorbinsavvá. Az aszkorbát-2-foszfátokat savas foszfatáz enzimmel hidrolizáltuk és a keletkezett L-aszkorbinsavat mértük.

Az európai harcsa (*Silurus glanis* L.) növekedése szignifikánsan ($p < 0,05$) alacsonyabb volt az L-aszkorbinsav (AS) mentes és különböző aszkorbát szintű takarmányokkal etetett csoportoknál. Az AS mentes táppal etetett halak mortalitása enyhén magasabb volt (~ 15 %), mint a többi csoport 5-10 %-os elhullása. Valamennyi etetési alapkísérlet során 15-16 hét alatt jelentek meg a skorbut mikroszkopikus és makroszkopikus tünetei az AS mentes táppal etetett halaknál. A gerincmetszetben található porcszövetek a C-vitamin mentes tápon nevelt halaknál nagyon kevés új sejtet tartalmaztak, amelyeknek alig volt sejtmagja, a rostok erősen deformáltak és töredezetek voltak nagy mennyiségű sejtközüti folyadékkal. A 100 mgkg⁻¹ AS tartalmú táppal etetett halak mutatták a legtöbb egészséges új sejtet és rostot. A magas, 1.000 és 10.000 mgkg⁻¹ C-vitamin koncentrációjú táppal etetett halak károsodást mutattak az új sejtek falában, a kialakult rostok erősen összehúzódottak voltak, a sejtközüti folyadék mennyisége is nagyobb volt, mint a 100 mgkg⁻¹ AS-el táplált halaknál. Kimutattuk, hogy ezt a károsodást minden valószínűség szerint az L-aszkorbinsavból keletkező különböző oxalátok okozzák.

A különböző szövetek összes aszkorbát tartalmának változását négy hónapig vizsgáltuk (0, 10, 100 1.000 és 10.000 mgkg⁻¹ AS tartalmú tápokkal), amelynek végén a máj összes C-vitamin tartalma viszonylag szoros összefüggést mutatott a takarmány L-aszkorbinsav koncentrációjával ($r^2 = 0,886$). A záró mintavételkor a 10 mgkg⁻¹ AS-el táplált csoport halainak összes C-vitamin koncentrációja lényegesen alacsonyabb volt a májban és a vesében, mint a legalább 100 mgkg⁻¹ AS-el takarmányozott csoportoknál. Az AS mentes takarmányon nevelt halak egyetlen szövetében sem tudtunk C-vitamint kimutatni.

Az európai harcsa (*Silurus glanis* L.) nem tudja szintetizálni az L-aszkorbinsavat, ezért azt táplálékában kell számára biztosítani. Minimális C-vitamin igénye L-aszkorbinsavban kifejezve 10 mgkg⁻¹, ami elegendő a normális növekedéshez, és a skorbut elkerüléséhez. A szövettani vizsgálatok, valamint a máj, az agy és a vese telítődésének

figyelembevételével 100-200 mgkg⁻¹ L-aszkorbinsav tekinthető optimálisnak az 5-200 g tömegű halak számára.

Nem találtunk aszkorbát-2-monoszulfátot az európai harcsa szöveteiben, így nem valószínű, hogy képes ebben a formában tárolni. „*In vitro*” körülmények között az emésztőcsatorna szöveteinek homogenizátuma az AMS-t nem hidrolizálta, így valószínű, hogy ez a halfaj nem rendelkezik aszkorbát szulfohidroláz enzimmel, ami felszabadítaná a bioaktív L-aszkorbinsavat.

Az európai harcsa emésztőcsatornája különböző szöveteinek kivonatában a természetes foszfatáz enzimek „*in vitro*” gyorsan hidrolizálják az aszkorbát-2-foszfátokat. A négy hónapig tartó etetési alapkísérlet halai közül is csak a kontrollcsoport növekedése volt eltérő a többi, valamilyen természetes vagy iparilag előállított aszkorbát-2-foszfátot tartalmazó takarmányokon nevelt halakétól. Mortalitása ~ 40 %-os volt, míg az összes többi 10 % alatt maradt. A skorbut tüneteit csak a kontroll halak mutatták. Ezek az eredmények azt igazolják, hogy **az európai harcsa számára a természetes L-aszkorbinsavon kívül C-vitamin forrás lehet az iparilag előállított aszkorbát-2-mono- és polifoszfát is.**

A különböző C-vitamin formákkal kiegészített takarmánnyal etetett csoportok szöveteinek összes AS tartalmában nem volt lényeges különbség. Ebből arra lehet következtetni, hogy a halak optimális fejlődéséhez szükséges C-vitamint már az alkalmazott legkisebb, 100 mgkg⁻¹ aszkorbát-2-monofoszfát és 150 mgkg⁻¹ aszkorbát-2-polifoszfát tartalmú takarmánnyal is biztosítani lehet. A l-¹⁴C-vel jelölt L-aszkorbinsavval végzett kísérleteink azt is igazolták, hogy folyamatos ellátás esetén a halfaj nem tárolja a C-vitamint, az két hét alatt teljes egészében eltávozik a szervezetből. A gyakorlatilag aszkorbátmentes takarmányozás esetében a szervek 50-60 nap alatt ürültek ki.

A lárvák, zsengeivadékok első élő táplálékát, ami rendszerint tubifex, kiegészítettük C-vitaminnal. Az apróra vágott táplálék vizes oldatból egyszerű abszorpcióval felvette a vitamin bármelyik formáját. A dúsított tubifex féreggel nevelt halak a 13 nap alatt az időközben bekövetkezett spontán darakór fertőzés ellenére 50 %-al növelték testtömegüket, míg a kontrollcsoport átlag testtömege gyakorlatilag nem emelkedett. A C-vitaminnal dúsított tubifex féreggel etetett halak 70 %-a, a kontroll csoport 30 %-a élte túl a spontán darakór fertőzést.

A három kémiai jellegű környezeti stresszhatást modellező kísérletünkben (formalin, nitrit és oxigénhiány) a vizsgált szervek aszkorbát koncentráció változásai azt mutatták, hogy a halak C-vitamin igénye ideiglenesen megnő. Ilyen helyzetben átmenetileg szükségessé válhat az emelt szintű, akár 10.000 mgkg⁻¹ C-vitamin kiegészítéssel történő takarmányozás is.

A legalább négy hónapig tartó etetési alapkísérletek során, függetlenül a C-vitamin koncentrációjától és formájától, a **tok hibridek (*Acipenser ruthenus* L. x *Acipenser baeri* Brandt)** növekedésükben, mortalitásukban, csont-kollagén koncentrációjukban nem mutattak különbséget. Valamennyi csoport halai egészséges maradtak, a skorbut tünetei még elvértve sem fejlődtek ki.

A gulonolakton oxidáz enzimet kimutattuk a halak veséjében. A magas C-vitamin tartalmú táp legalább egy hónapig tartó etetése nem gátolta az enzim aktivitását. Ezek az eredmények egyértelműen bizonyították, hogy a tok hibrid szintetizálja a hal számára szükséges C-vitamint, ezért takarmányában nem szorul AS kiegészítésre.

A tok hibrid nem tárolja a C-vitamint szöveteiben, de nagyobb mennyiségű külső utánpótlás esetén az egyes szervek pillanatnyi aszkorbát koncentrációja enyhén megemelkedik. A környezeti stressz okozta hatások vizsgálatára a tok hibrideket különböző aszkorbát tartalmú (AS 0, 10, 100, 1000; APF 450) takarmánnyal etettük. A vesében, ahol a C-vitamin szintézis folyik, mind a nitrit, mind pedig az oxigénhiány hatására szignifikánsan megnőtt az összes aszkorbát koncentráció a kontrollcsoportnál. Az AS10 és AS100, valamint az APF450 csoportoknál enyhén, az 1000 mgkg⁻¹ L-aszkorbinsavval etetett halaknál azonban ugrásszerűen csökkent az összes aszkorbát tartalom.

A tok hibrid veséjében vizsgáltuk a C-vitamin-tartalom változásait viszonylag hosszú, 54 órán át tartó éhezés hatására. A halak L-aszkorbinsav produkciója jelentősen csökkent a magas C-vitamin tartalmú tápok etetésének következtében. Korábbi eredményeink azt mutatták, hogy a magas C-vitamin tartalmú takarmányok etetése sem redukálja a gulonolakton oxidáz enzim aktivitását, így valószínű, hogy a szintézis valamelyik lépésében mégis kialakul gátlás, azaz „*feed back*” szabályozás működik. A gátlás mértéke szorosan összefügg ($r^2 = 0,801$) a takarmány AS koncentrációjával.

A két halfaj vizsgálatának eredményei azt mutatják, hogy a halak takarmányának kiegészítése C-vitaminnal nagy gondosságot igényel, különös tekintettel arra, hogy az esetleges tévedés hatása csak hónapok múlva jelentkezik.

A tenyésztőnek feltétlenül tudnia kell, hogy a termelni kívánt hal képes-e előállítani a C-vitamint. Így az L-aszkorbinsav szintetizálására képes tokfélék takarmányában kerülendő a 10-20 mgkg⁻¹-nél magasabb C-vitamin tartalom, ezért nem javasoljuk a magas aszkorbát tartalmú pisztrángtápok alkalmazását, ami a gyakorlatban időnként előfordul.

A takarmányukban C-vitamin kiegészítést igénylő fajoknál ugyanolyan káros lehet a túl magas aszkorbát szint, mint az optimális szükségletnél alacsonyabb.

7. IRODALOMJEGYZÉK

- ALBREKTSSEN, S., LIE, Ø. and SANDNES, K. (1988): Ascorbyl palmitate as a dietary source for rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Aquaculture. 71. 359-368. p.
- ALEXIS, M. N., KALAGEROPOULOS, N. and AGRYOPOULOU, V. (1989): Ascorbic acid distribution in tissues of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) in relation to dietary levels and feeding period. Third International Symposium on Feeding and Nutrition in Fish. Toba. Japan. 401-409. p.
- ALEXIS, M. N., NENGAS, I., FOUNTOULAKI, E., PAPOUTSI, E., ANDRIOPOULOU, A., KOUTSODIMOU, M. and GAUBAUDAN, J. (1999): tissue ascorbic level in European sea bas (*Dicentrarchus labrax* L.) fingerlings fed diets containing different forms of ascorbic acid. Aquaculture. 179. 447-456. p.
- ANTONIS, K. M. BROWN, R. and YI, Z. (1993): High-performance liquid chromatography with ion pairing and electrochemical detection for the determination of the stability of two forms of vitamin C. J. Chrom. 632. 91-96. p.
- BAKER, E. M., HALVER, J. E., JOHNSEN, D. O., JOYCE, B. E., KNIGHT, M. K. and TOLBERT, B. M. (1975): Metabolism of ascorbic acid and ascorbic-2-sulfate in man and the subhuman primate. Ann. NY Acad. Sci. 258. 72-80. p.
- BANCROFT, H., GIBSON, Q. H. HARRISON, D. C. and MCMURRAY, J. (1940): Familial idiopathic methemoglobinemia and its treatment with ascorbic acid. Clinical Sci. 5. 145-157. p.
- BESSEY, O. A. (1938): A method for determination of a small quantities of ascorbic acid and dehydroascorbic acid in turbid and colored solutions in presence of other reducing substrates. J. Biol. Chem. 122. 673. p.
- BIANCHI, J., WILSON F. A. and ROSE, R. C. (1986): Dehydroascorbic acid and ascorbic acid transport system in guinea pig ileum. Am. J. Physiol. 250. 461-468. p.
- BRAUN, L., PUSKÁS, F., CSALA, M., GYÖRFFY, E., GARZÓ, T., MANDL, J. and BÁNHEGYI, G. (1996): Gluconeogenesis from ascorbic acid: ascorbate recycling in isolated murine hepatocytes. FEBS Letters. 390. 183-186. p.
- BLOOM, J. H., DABROWSKI, K. and EBELING J. (2000): Vitamin C requirements of the angel fish (*Pterophylum scalare*). J. World Aquacult. Soc. 31. 1. 115-118. p.
- CARR, R. S. BALLY, M. B. THOMAS, P. and NEFF, J. M. (1983): Comparison of methods for determination of ascorbic acid in animal tissues. Anal. Chem. 55. 1229-1232. p.

- CATACUTAN, M. R. and LAVILLA-PITOGO C. R. (1994): L-ascorbyl-2-phosphate Mg as a source of vitamin C for juvenile *Penaeus monodon*. Izr. J. Aquacult. 46. 1. 40-47. p.
- CHATTERJEE, I. B. (1978): Ascorbic acid metabolism. World Review of Nutrition and Diet. 30. 69-87. p.
- CHATTERJEE, I. B., MAJUMDER, A. K., NANDI, B. K., and SUBRMANIAN, N. (1975): Synthesis and some major functions of vitamin C in animals. Ann. NY Acad. Sci. 258. 24-47. p.
- CHÁVEZ DE MARTÍNEZ, M.C. (1990): Vitamin C requirement of the Mexican native cichlid *Cichlasoma urophthalmus* (Gunter). Aquaculture, 86. 409-416. p.
- CHO, C. Y. and COWEY, C. B. (1993): Utilisation of monophosphate ester of ascorbic acid by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). In: S. J. Kaushik and P. Luguët (Editors), Fish Nutrition in practice, INRA Paris, pp. 149-156. p.
- CRAWFORD, T. C. and CRAWFORD, S. A. (1980): Synthesis of L-ascorbic acid. Adv. Carbohydr. Chem. 37. 79-155. p.
- DABROWSKI, K. (1990a): Gulonolacton oxidase is missing in teleost fish. Biol. Chem. Hoppe-Seyler 371. 207-214. p.
- DABROWSKI, K. (1990b): Assay of ascorbic phosphates and in-vitro availability assay of ascorbic mono- and polyphosphates. J. Food. Agric. 52. 409-420. p.
- DABROWSKI, K. (1990c): Ascorbic acid status in the early life of white fish (*Coregonus lavaretus* L.). Aquaculture. 84. 61-70. p.
- DABROWSKI, K. (1990d): Comparative bioavailability of ascorbic acid and stable forms in rainbow trout. In: Ascorbic acid in domestic animals. Proceedings of the 2nd symposium Kartause Ittigen, Switzerland 9th-12th October. 344-356. p.
- DABROWSKI, K. (1994): Primitive Actinopterygian fish can synthesize ascorbic acid. Experientia. 50. 745-748. p.
- DABROWSKI, K. and BLOOM, J. H. (1994): Ascorbic acid deposition in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) eggs and survival of embryos. Comp. Biochem. Physiol. 108A. 1. 129-135. p.
- DABROWSKI, K. and HINTERLEITNER, S. (1989): Application of a simultaneous assay of ascorbic acid sulphate in biological materials. Analyst. 114. 83-87. p.
- DABROWSKI, K. and KÖCK, G. (1989): Absorption of ascorbic acid and ascorbic sulfate and their interaction with minerals in the digestive tract of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Can. J. Fish. Aquat. Sci. 46. 11. 1952-1957. P.

- DABROWSKI, K., EL-FIKY, N., KÖCK, G. FRIGG, M. and WIESER, W. (1990a): Requirement and utilisation of ascorbic acid and sulfate in juvenile rainbow trout. *Aquaculture*. 91. 317-337. p.
- DABROWSKI, K., LACKNER, R. and DOBLANDER, C. (1990b): Effects of dietary ascorbate on the concentration of tissue ascorbic acid, dehydroascorbic acid, ascorbic sulfate and activity of ascorbic sulfate sulfohydrolase in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 47. 1518-1525. p.
- DABROWSKI, K., MATUSIEWICZ, M. and BLOM, J. H. (1994): Hydrolysis, absorption and bioavailability of ascorbic acid esters in fish. *Aquaculture* 124. 169-192. p.
- DOIMI, M., BOVO, G., CESCHIA, G., GIORGETTI, G. and SAROGLIA, M. (1985): A new syndrome of intensively cultured Sea Bass (*Dicentrarchus labrax* L.) In: *Fish and Shellfish Pathology*. Academic Press. London. 231-239. p.
- DRUMMOND, J. C. (1920): The nomenclature of the so-called accessory food factors (vitamins). *Biochem. J.* 14. 660. p.
- EL NAGGAR, G. O. and LOVELL, R. T. (1991): Effect of source and dietary concentration of ascorbic acid on tissue concentrations of ascorbic acid in channel catfish. *J. World Aquacult. Soc.* 22. 4. 206. p.
- ELŐDI, P. (1981): *Biokémia*. Akadémiai Kiadó, Budapest. 935. p.
- EVELYN, K. A., MALLOY, H. T. and ROSEN, C. (1938): The determination of ascorbic acid in urine with the photoelectric colorimeter. *J. Biol. Chem.* 126. pp 673. p.
- FELTON, S. P. and HALVER, J.E. (1987): Vitamin C1 and C2 analysis using double column reverse phase high pressure liquid chromatography. *Aquaculture and Fisheries Management*. 18. 387-390. p.
- FRACALOSSO, D. M., ALLEN, M., NICHOLS, K. and OFTEDAL, T. (1998): Oscars, *Astronotus ocellatus*, have a dietary requirement for vitamin C. *Am. Soc. Nutr. Sci.* 1745-1751. p.
- FRACALOSSO, D. M., ALLEN, M. E. YUYAMA, L. K. and OFTEDAL, O. T. (2001): Ascorbic acid biosynthesis in Amazonian fishes. *Aquaculture*. 192. 321-332. p.
- FUKUDA, T., KOMATSUBARA, H., KASAI, T. and TSUJIMURA, M. (1991): Studies on the ascorbic acid-2-sulfate biosynthesis in rat. *Internat. J. Nutr. Res.* 61. 325-327. p.
- GADIANT, M. and FENSTER, R. (1994): Stability of ascorbic acid and other vitamins in extruded fish feeds. *Aquaculture* 124. 207-211. p.
- GOMOZOVA / JENEY, G. (1999): A nem-specifikus védekező mechanizmus és a betegségekkel szembeni ellenállóképesség kiváltása immunstimulátorokkal a

haltenyésztésben. Ph.D. értekezés. DATE Mezőgazdaságtudományi Kar, Debrecen. 1999. 40. p.

GROVE, D. J. and RUOHONEN, K. (1996): Effects of nutrient composition on digestion in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed pelleted diets. VII. International Symposium on Fish Physiology, Oslo 3-6 August 1996. In: Book of abstracts, 30. p.

GY. PAPP, Zs. (1992): C-vitamin formák meghatározása HPLC-vel különböző halszövetekben. XIV. Halászati Tudományos Tanácskozás, Szarvas, 1992. június 10-11. Összefoglaló Gyűjtemény. Halászatfejlesztés. 15. Szerk. PEKÁR Szarvas 1992. HAKI, 41-45 p.

GY. PAPP, Zs., JENEY, Zs. and JENEY, G. (1994a): Effect of L-ascorbic acid on the vitamin C level of liver and muscle and the physiological status of European catfish (*Silurus glanis* L.) under nitrite stress. In: Resumes of International Workshop on the Biological bases for Aquaculture of Siluriformes. 24-27 May, 1994. Montpellier. France 112. p.

GY. PAPP ZS., LACKNER, R., JENEY, Zs. and O. TÓTH, E. (1994b): C-vitamin hatása a különböző halfajok szöveteinek L-aszkorbinsav tartalmára. Szerk: PÓCSI L. I. Kelet-Magyarországi Halászati, Vadászati és Környezetvédelmi Konferencia, Debrecen. 1992. November 7-8. 212-215. p.

GY. PAPP, Zs., SAROGLIA, M. and TEROVA, G. (1994c): In vitro analysis of ascorbate phosphate phosphatase enzyme activity in liver and gut of fish with application of HPLC. In: Proceedings International Symposium on Chromatographic and Electrophoretic Techniques. 10-13 October. 1994. Bled, Slovenia 121. p.

GY. PAPP, Zs., JENEY, Zs. and JENEY, G. (1995a): Comparative studies on the effect of vitamin C feeding of European catfish (*Silurus glanis* L.) and sturgeon hybrid (*Acipenser ruthenus* L. x *Acipenser baeri* L.). J. Appl. Ichthyol. 11. 372-374. p.

GY. PAPP, Zs., JENEY, Zs., and JENEY, G. (1995b): Effect of dietary vitamin C on growth and physiological status of sturgeon hybrid (*Acipenser ruthenus* x *Acipenser baeri*). II. Int. Symposium on Sturgeons, Proceeding. 309-314. p.

GY. PAPP, Zs., SAROGLIA, M. and TEROVA, G. (1998): An improved method for assay of vitamin C in sample series of fish feed and tissues. Chromatographia, 48. No.1/2. 43-47. p.

HALVER, J. E., ASHLEY, L. M. and SMITH, R. R. (1969): Ascorbic acid requirements of coho salmon and rainbow trout. Trans. Am. Fish. Soc. 98. 762-771. p.

HALVER, J. E., SMITH, R. R., TOLBERT, B. M. and BAKER, E. M. (1975): Utilisation of ascorbic acid in fish. Ann. N. Y. Acad. Sci. 258. 81. 70-71. p.

- HALVER, J. E., FELTON, S. and PALMISANO, A.N. (1993): Efficiency of L-ascorbyl-2-sulfate as a vitamin C source for rainbow trout. In: Ed.: S. J. KAUSHIK and LIQUET, P. Fish Nutrition in Practice, INRA, Paris 137-147. p.
- HAY, G. W., LEWIS, B. A., and SMITH, F. (1967): The vitamins. Vol. 1. (2nd edn.), Ed.: W. H. SEBRELL, Jr. and R. S. HARRIS, AP, Inc. N. Y. 307-346. p.
- HILTON, J. W., CHO, C. Y. and SLINGER, S. J. (1977): Factors affecting stability of supplemental ascorbic acid in practical trout diets. J. Fish. Res. Board. Can. 34. 683-687. p.
- HILTON, J. W., CHO, C. Y., BROWN, R. G. and SLINGER, S. J. (1979): The synthesis, half life and distribution of ascorbic acid in rainbow trout. Comp. Biochem. Physiol. 63A. 447-453. p.
- HOFFMANN, K. M., BROWN, P. R. and MAUGLE, P. D. (1992): Comparison of three methods for the analysis of vitamers of ascorbic acid in shrimp tissue. J. Liquid. Chrom. 15. 2581-2610. p.
- HORNIG, D. (1975): Distribution of ascorbic acid, metabolites and analogues in man and animals. Ann. NY Acad. Sci. 258. 103-118. p.
- HORVÁTH, L., TAMÁS, G. és TÖLG, I. (1981): Speciális módszerek a tavi haltenyésztésben . Akadémiai Kiadó, Budapest, 1981. 147. p.
- HWANG, D-F. and LIN, T-K. (2002): Effect of temperature on dietary vitamin C requirement and lipid in common carp. Comp. Biochem, Phys.B. 131. 1-7. p.
- ISHIBASHI, Y., KATO, K., IKEDA, S., MURATA, O. NASU, T. and KUMAI, H. (1992): Effects of dietary ascorbic acid on tolerance to intermittent hypoxic stress in Japanese parrot fish. Nipp. Suis. Gak. 58. 11. 2147-2152. p.
- KIM, H-J. (1989): Determination of total vitamin C by ion exclusion chromatography with electrochemical detection. J. Assoc. Anal. Chem. 72. 4. 681-686. p.
- KITAMURA, S. (1969): Summary on the hypovitaminosis C of rainbow trout, *Salmo gairdneri*. Fish. Pathol. (Japan) 3. 73-92. p.
- KITAMURA, S., OHARA, S. and SUWA, T. (1965): Studies on vitamin requirements of rainbow trout, *Salmo gairdneri*, L-ascorbic acid. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 3.1818-1827. p.
- KONTARA, E. K., MERCHIE, G., LAVENS, P, NELIS, H., DE LEENHEER, A. and SORGELOOS, P. (1995): Improved larviculture outputs of postlarval shrimp *Pennaeus vannamei* through supplementation of L-ascorbyl-2-poliphosphate in the diet. In. Proceedings of LARVI'95 Fish and Shellfish Larviculture Symposium. Ed: P. LAVENS, E. JASPERS and I. ROCLANTS European Aquaculture Society, Gent, Belgium, September 3-7 1995. pp. 230-234.

KRASNOV, A., PITKÄNEN, T. I. and MÖLSÄ, H. (1999): Gene transfer for targeted modification of salmonid fish metabolism. *Gen. Anal. Biomol. Eng.* 15. 115-119. p.

LALL, S. P., OLIVER, G., WEERAKOON, D. E. M. and HINES, J. A. (1989): The effect of vitamin C deficiency and excess on immunresponse in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Proceedings. Third Int. Symp. on Feeding and Nutr. in Fish. Toba Aug. 28- Sept. 1, Japan, 1989.* 427-441. p.

LIAO M. L. and SEIB, P. A. (1990): A stable form of vitamin C: L-ascorbate-2-triphosphate. *Synthesis, isolation and properties. J. Agric Food. Chem.* 38. 355-366. p.

LIM, C. and LOVELL, R. T. (1978): Pathology of vitamin C deficiency syndrome in channel catfish. *J. Nutr.* 108. 1137-1141. p.

LOVELL, R. T. (1973): Essentiality of vitamin C in feeds for intensively fed gagged channel catfish. *J. Nutrition.* 103. 134-138. p.

MACHLIN, L. J., GARCIA, F., KUENZIG, W. and BRIN, M. (1979): Antiscorbutic activity of ascorbic phosphate in rhesus monkey and the guinea pig. *Am J. Clin. Nutr.* 32. 325-331. p.

MARGOLIS, S. A., PAULE, R. C. and ZIEGLER, R. G. (1990): Ascorbic and dehydroascorbic acids measured in plasma preserved with dithiothreitol or metaphosphoric acid. *Clin. Chem.* 36. 10. 1750-1755. p.

MATUSIEWICZ, M., DABROWSKI, K., VOLKER, L. and MATUSIEWICZ, K. (1995): Ascorbate poliphosphate is a bioavailable vitamin C source in juvenile rainbow trout: Tissue saturation and complementation model. *Nutrient Requirements and Interactions Am. Inst. Nutr.* 1995. 3055-3061. p.

MAUGLE, P. D. (1993): The simultaneous determination of three vitamin C forms. In the book of abstract: EIFAC Workshop on Methodology for Determination of Nutrient Requirements in Fish. Eichenau, Germany. 26.06.-01.07. 1993. 41. p.

MAZIK, P. M., BRANDT, T. M. and TOMASSO, J. R. (1987): Effects of dietary vitamin C on growth, caudal fin development and tolerance of aquaculture-related stressors in channel catfish. *Prog. Fish-Cult.* 49. 13-16. p.

MCCAY, C. M. and TUNISON A.V. (1934): The nutritional requirements of trout. *Cornland Hatchery Rpt. # 2, N. Y. State Conservation Dept.*

MEAD, C. G. and FINAMORE, F. J. (1969): The occurrence of ascorbic acid sulfate in brine shrimp. *Biochemistry* 8. 2652-2655. p.

MÆLAND, A. and WAAGBØ, R. (1998): Examination of the qualitative ability of some cold water marine teleost to synthesise ascorbic acid. *Comp. Biochem. Physiol. A.* 121. 249-255. p.

- MEIER, W. and WAHLI, T. (1990): Vitamin C deficiency in rainbow trout. Ed.: F. Hoffmann-La Roche Ltd. Animal production highlights, ROCHE, ISSN 1012-3628. 1-18. p.
- MERCHIE, G., LAVENS, P., DHERT, P. H., PECTOR, R., MAI-SONY, A.F. NELIS, H., OLLIVIER, F. DE LEENHEER, A. and SORGELOOS, P. (1995): Life food mediated vitamin C transfer to *Dicentrarchus labrax* and *Clarias gariepinus*. J. Appl. Ichthyol. 11. 336-341. p.
- MERCHIE, G., LAWENS, P., STORCH, V., ÜBEL, U., NELIS, H. DE LEENHEER, A. and SORGELOOS, P. (1996): Influence of dietary vitamin c dosage on turbot (*Scophthalmus maximus*) and European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) nursery stages. Comp. Biochem. Physiol. 114a. 2. 123-133. p.
- MIYASAKI, T., SATO, M., YOSHINAKA, R. and SAKAGUSHI, M. (1991): Synthesis of ascorbyl-2-phosphate by liver enzyme of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Comp. Biochem. Phys. 233. 374-379. p.
- MOLNÁR K. és SZAKOLCZAI J. (1973): Halbetegségek. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest, 238. p.
- MOREAU, R. and DABROWSKI, K. (2000): Biosynthesis of ascorbic acid by extant actinopterygians. J. Fish. Biol. 57. 3. 733-745. p.
- MOREAU, R., KAUSHIK, SJ. and DABROWSKI, K. (1996): Ascorbic acid status as affected by dietary treatment in the Siberian sturgeon (*Acipenser baeri* Brandt): Tissue concentration, mobilisation and L-gulonolactone oxidase activity. Fish Phys. Biochem. 15. 5. 431-438.
- MOREAU, R., DABROWSKI, K., CZESNY, S. and CIHLA, F. (1999a): Vitamin C – vitamin E interaction in juvenile lake sturgeon (*Acipenser fulvescens* R.), a fish able to synthesize ascorbic acid. J. Appl. Ichthyol. 15. 250-257. p.
- MOREAU, R., DABROWSKI, K and SATO, P. H.: (1999b): Renal L-1,4-gulonolacton oxidase activity as affected by dietary ascorbic acid in lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*). Aquaculture 180. 359-372. p.
- MOSER, U.K. (1990): Physiology and metabolism of ascorbic acid (Review). In: Ascorbic acid in domestic animals. Proceedings of the 2nd Symposium. Kartause Ittingen, Switzerland 9th-12th October, 1990. 3-16. p.
- MUMMA, R. O. and VERLANGIERI, A. J. (1972): Isolation of ascorbic acid-2-sulfate from selected rat organs. Biochim. Biophys. Acta. 273. 249-253. p.

- MURAI, T., ANDREWS, J. W. and BAUERNFEIND, J. C. (1978): Use of l-ascorbic acid, ethocel coated ascorbic acid and ascorbate-2-sulfate in diets for channel catfish, *Ictalurus punctatus* J. Nutrition, 108. 1761-1766. p.
- MUSTIN, W. G. and LOVELL, T. (1992): Na-L-ascorbyl-2-monophosphate as a source of vitamin C for channel catfish. Aquaculture. 105. 95-100. p.
- MUTO, N., TERASAWA, K. and BAUERNFEIND, J. C. (1992): Evaluation ascorbic acid 2-*o*-glucosid as a vitamin C source: mode of intestinal hydrolisis and absorption following oral administration. Int. J. Vit. Nutr. Res. 62. 318-323. p.
- O'KEEFE, T. (2001): Ascorbic acid and stable ascorbate esters as sources of vitamin C in aquaculture feeds. ASA Technological Bulletin. AQ48-2001. 1-9.
<http://www.asasea.com/technical/aquacult.html> (2002. március 7.)
- PILLAI, G. R., INDIRA, M. and VIJAYAMMAL, P. L. (1990): Ascorbic acid 2-sulfate, storage form of ascorbic acid in rats. Current Sci. 59. 16. 800-804. p.
- ROBINSON, E. H., BRENT, J. R. and CRABTREE, J. T. (1989): AsPP, an ascorbic acid resist oxidation in fish feed. Feedstuffs. 61. 90. 64-66. p.
- ROE, J. (1954): Chemical determination of ascorbic acid, dehydroascorbic and diketogulonic acids. In: Methods of biochemical analysis. D. Glick, Ed. 1. 115. Interscience, New York, N. Y. 116-139. p.
- ROE, J. H. and KUETHER, C. A. (1943): The determination of dehydroascorbic acid in whole blood and urine through the 2,4-dinitrphenylhydrazine derivative of dehydroascorbic acid. J. Biol.Chem. 147. 399. p.
- RÓNYAI, A., RUTTKAI, A. and VÁRADI, L. (1989): Growth of Siberian sturgeon (*Acipenser baeri* Brandt) and that of its both hybrids with sterlet (*Acipenser ruthenus* L.) in recycling system. „Acipenser” – Actes du premier colloque international sur l'esturgeon. Bordeaux, 3-6 Oct. 1989. 417-423. p.
- SANDNES, K. (1991): Vitamin C in fish nutrition – a review. Fisk. Dir. Ser. Ernsering. 4.1. 3-32.
- SANDNES, K. and WAAGBØ, R. (1991): Effects of dietary vitamin C and physical stress on head kidney and liver ascorbic acid, serum cortisol, glucose and hematology in Atlantic salmon (*Salmo salar*). Fisk. Dir. Ser. Ernsering.4. 1. 41-49. p.
- SANDNES, K. and UTNE, F. (1992): Processing loss and storage stability of ascorbic acid in dry fish feed. Fisk. Dir. Ser. Ernsering.11. 2. 39-44. p.

- SANDNES, K., TORRISSEN, O. and WAAGBØ, R. (1982): The minimum dietary requirement of vitamin C in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fry using Ca ascorbate-2-monophosphate as a dietary source. *Fish Phys. Biochem.* 10. 4. 315-319. p.
- SANDNES, K., HANSEN, T., KILLIE, J-E. A. and WAAGBØ, R. (1990): Ascorbate-2-sulfate as a dietary vitamin C source for atlantic salmon (*Salmo salar*): Growth, bioactivity, haematology and humoral immune response. *Fish. Phys. Biochem.* 8. 6. 419-427. p.
- SAROGLIA, M., SCARANO, G. and MASSARI, M. (1990): Ascorbic acid decay in pellet food for marine fish during storage and after contact marine water. *Riv. Ital. Acquacol.* 25. 37-42. p.
- SAROGLIA, M. and SCARANO, G. (1992): Experimental induction of ascorbic acid deficiency in sea bass in intensive aquaculture. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 12. 3. 96-99. p.
- SATO, M., YOSHINAKA, R. and IKEDA, S. (1978): Dietary ascorbic acid requirement of rainbow trout for growth and collagen formation. *Bull.Jap. Sci Fish.* 44. 9. 1029-1035. p.
- SATO, M. HATANO, Y. and YOSHINAKA, R. (1991): L-ascorbil 2-sulfate as a dietary vitamin C source for rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Nipp. Suis. Gak.* 57.4. 717-721. p.
- SCARANO, G., SAROGLIA, M. and SCIARAFFIA, F. (1991): Protective role of ascorbic acid against nitrite intoxication in sea bass. *Rivista Italiana Acquacultura.* 26. 95-102. p.
- SCHÜEP, W., MARMET, J. and STUDER, W. (1989): Stability of ascorbate-2- sulfate in trout feed measured by HPLC. *Aquaculture*, 79. 249-258. p.
- SHIAU, S. Y. and HSU, T.S. (1994): Vitamin C requirement of grass shrimp, *Penaeus monodon* as determined with L-ascorbyl-2-monophosphate. *Aquaculture* 122. 347-357. p.
- SHIAU S-J. and JAN, F-L. (1991): Dietary ascorbic acid requirement of juvenile tilapia *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*. *Nipp.Suis. Gakk.* 58. 4. 671-675. p.
- SHIGUENO, K. and ITOH, S. (1988): Use of Mg-ascorbyl-2-monophosphate as a vitamin C source in shrimp diets. *J. World. Aquacult. Soc.* 19. 4. 168-174. p.
- SIWITZKI A. and JENEY, Zs. (1986): Surgical intervention in wells (*Silurus glanis* L.) during artificial propagation. *Aquacultura Hungarica* 5.55-58. p.
- SOLIMAN, A. K., JAUNCEY, K. and ROBERTS, R. J. (1986): The effect of varying forms of dietary ascorbic acid on the nutrition of juvenile tilapias (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 52. 1-10. p.
- SPEEK, A. J. SCHRIJVER, J. and SCHREURS, W. H. P. (1984): Fluorimetric detection of total vitamin C in whole blood by high-performance liquid chromatography with pre-column derivatization. *J. Chrom.* 305. 53-60. p.
- SZENT-GYÖRGYI, A. and HARWORTH, W. N. (1933): *Nature*, 131. 23. p.

TAMÁS, G., TASNÁDI, R. és TÖLG, I., (1997): A pontyos tógazdaság műveletei. In: Halgazdálkodás II. Gyakorlati kérdések. Szerk. TAHY, B., MOHOSZ. Budapest. 380 p.

TEROVA, G., SAROGLIA, M., GY. PAPP, Z. and CECCHINI, S. (1998): Ascorbate dynamics in embryos and larvae of sea bass and sea bream, originating from broodstocks fed supplements of ascorbic acid. *Aquacult. Int.* 6. 357-367. p.

TOUHATA , K., TOYOHARA, H., MITANI, T., KINOSHITA, M., SATAU, M and SAKAGUCHI, M. (1995): Distribution of L-gulonono-1,4-lactone oxidase among fishes. *Fisheries Sci.*, 61.4. 729-730. p.

TOLBERT, B. M., DOWING, M., CARLSON, R.W., KNIGHT, M. K. and BAKER, E. M. (1975): Chemistry and metabolism of ascorbic acid and ascorbate sulfate. *Ann. New York Acad. Sci.*, 258. 48-69. p.

TSAO, CS. and YOUNG, M. (1990): Enzymatic formation of ascorbic acid in liver homogenate of mice fed dietary ascorbic acid. *In Vivo.* 4. 167-170. p.

TUCKER, B. W. and HALVER, J. E. (1984a): Distribution of ascorbate-2-sulfate and distribution half-life and turnover rates of [L-1-¹⁴C] ascorbic acid in rainbow trout. *J. Nutrition.* 114. 6. 991-999. p.

TUCKER, B. W. and HALVER, J. E. (1984b): Ascorbate-2-sulfate metabolism in fish. *Nutr. Rev.* 42. 176-179. p.

TUCKER, B. W. and HALVER, J. E. (1986): Vitamin C metabolism in rainbow trout. *Comparative Pathology Bull.* 18.4. 1-6. p.

TUCKER, B. W, TOLBERT, B. M., HALVER, J. E. and BALABAN, M. (1987): Brain ascorbate depletion as a response to stress. *Internat. J. Vit. Nutr. Res.* 57. 289-295. p.

UMEGAKI, K., INOUE, K. TAKEUCHI, N. and HIGUCHI, M. (1994): Improved method for the analysis of ascorbic acid in plasma by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 40. 73-79. p.

VERLHAC, V. and GABAUNDAN, J. (1997): The effect of vitamin C on fish health. Centre for Research in Animal Nutrition, Societe Chimique Roche, BP 170, Saint-Louis Cedex, France, 29.p. http://www.roche.com/vitamins/pdf/vit_c_fish.pdf (2002. március 7.)

WAAGBØ, R., ØINES, S. and SANDNES, K. (1991): The stability and biological availability of different forms of vitamin C for Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Fisk. Dir. Skr., Ser. Ernring* 4. 2. 95-101. p.

WAHLI, T., STEIFF, K. and MEIER, W. (1985): Influence of ascorbic acid on *Ichthyophthirius multifiliis* infections in trout. *Bull. Eur. Fish. Pathol.* 5. 4. 86-87.

- WAHLI, T., MEIER, W. and PFISTER, K. (1986): Ascorbic acid induced immune-mediated decrease in mortality in *Ichthyophthirius multifiliis* infected rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Acta Tropica 43. 287-289. p.
- WANG, X. Y. and SEIB, P. A. (1990): Overview of derivatives of L-ascorbic acid. In: Ascorbic acid in domestic animals. Proceedings of the 2nd Symposium Kartause Ittingen, Switzerland 9th-12th October, 1990 pp. 462-491. p.
- WILSON, R. P. and POE, W. (1973): Impaired collagen formation in the scorbutic channel catfish. Journal of Nutrition 103. 1359-1364. p.
- WILSON, R. P., POE, W. E. and ROBINSON, E. H. (1989): Evaluation of L-ascorbyl-2-polyphosphate (AsPP) as a dietary ascorbic acid source for Channel catfish. Aquaculture, 81. 129-136. p.
- WISE, D. J., TOMASSO, J. R. and BRANDT, T. M. (1988): Ascorbic acid inhibition of nitrite-induced methemoglobinemia in channel catfish. Prog. Fish-Cult. 50. 77-80. p.

8. FÜGGELÉK

8.1. Fogalmak, rövidítések

Munkánkban a C-vitaminnal kapcsolatos nemzetközileg alkalmazott fogalmakat, rövidítéseket használtuk, melyeket a dolgozat könnyebb érthetősége kedvéért az alábbiakban foglalkunk össze.

Fogalmak

- C-vitamin státusz: Az adott szervben, vagy szövetben jelenlévő C-vitamin formák pillanatnyi összetétele.
- Aszkorbát tartalom: Az adott szerv, szövet, vagy takarmány összes C-vitamin koncentrációja L-aszkorbinsav egyenértékben.

Rövidítések

- Aszkorbát oxidáz: **ASKOX**
- Aszkorbát-2-monofoszfát: **AMF**
- Aszkorbát-2-monoszulfát: **AMS**
- Aszkorbát-2-polifoszfát: **APF**
- Dehidro-L-aszkorbinsav: **DHA**
- Ditioeritritol: **DTE**
- Ditiotreitol: **DTT**
- Gulonolakton oxidáz: **GLO**
- L-aszkorbinsav: **AS**
- Perklórsav: **PKS**

2. Kiegészítő táblázatok

15. táblázat: Természetes C-vitamin formák koncentrációjának változása az európai harcsa (*Silurus glanis* L.) agyában különböző stresszek hatására

	C-vit. forma	AS0 (μgg^{-1})	AS10 (μgg^{-1})	AS100 (μgg^{-1})	AS1000 (μgg^{-1})	AS10000 (μgg^{-1})
Stressz előtt	AS	nd	48,2 $\pm$ 1,95	57,0 $\pm$ 1,85	57,2 $\pm$ 2,30	105,4 $\pm$ 5,65
	DHA	nd	5,9 $\pm$ 1,17	30,6 $\pm$ 2,65	16,8 $\pm$ 1,74	27,4 $\pm$ 3,48
	TAS	nd	54,1 $\pm$ 2,8	87,5 $\pm$ 4,35	74,0 $\pm$ 1,60	132,8 $\pm$ 8,83
	AS%		89,1$\pm$1,77	65,1$\pm$1,34	77,3$\pm$2,39	79,4$\pm$1,46
Nagy egyedsűrűség stressz után	AS	nd	8,0 $\pm$ 1,45	15,4 $\pm$ 1,49	26,5 $\pm$ 2,16	75,2 $\pm$ 2,34
	DHA	nd	0,2 $\pm$ 0,10	4,4 $\pm$ 0,43	5,3 $\pm$ 0,89	18,2 $\pm$ 1,95
	TAS	nd	8,2 $\pm$ 1,55	19,8 $\pm$ 2,19	31,0 $\pm$ 3,41	91,5 $\pm$ 0,77
	AS%		97,6$\pm$0,79	81,6$\pm$6,07	85,8$\pm$3,30	82,2$\pm$2,48
Formalin stressz után	AS	nd	2,1 $\pm$ 0,41	36,9 $\pm$ 3,79	63,4 $\pm$ 1,57	116,7 $\pm$ 5,24
	DHA	nd	18,1 $\pm$ 1,33	57,9 $\pm$ 2,45	62,9 $\pm$ 5,42	202,9 $\pm$ 26,21
	TAS	nd	20,2 $\pm$ 0,92	94,8 $\pm$ 6,06	126,3 $\pm$ 6,94	319,6 $\pm$ 24,79
	AS %		10,6$\pm$2,55	38,9$\pm$1,58	50,2$\pm$1,60	36,7$\pm$3,45
Nitrit stressz után	AS	nd	0,3 $\pm$ 0,58	0,2 $\pm$ 0,29	0,3 $\pm$ 0,46	0,00 $\pm$ 0,00
	DHA	nd	48,4 $\pm$ 5,04	123,5 $\pm$ 9,90	125,4 $\pm$ 6,95	140,9 $\pm$ 11,86
	TAS	nd	48,7 $\pm$ 5,46	123,7 $\pm$ 9,96	125,6 $\pm$ 7,34	140,9 $\pm$ 11,86
	AS %		0,6$\pm$1,10	0,1$\pm$0,23	0,2$\pm$0,35	0,0$\pm$0,00
Nitrit 1 héttel stressz után	AS	nd	15,8 $\pm$ 2,61	59,8 $\pm$ 5,31	54,6 $\pm$ 6,67	57,4 $\pm$ 10,20
	DHA	nd	9,8 $\pm$ 1,106	32,6 $\pm$ 2,09	28,2 $\pm$ 4,44	34,6 $\pm$ 2,27
	TAS	nd	25,6 $\pm$ 3,94	92,4 $\pm$ 7,33	82,8 $\pm$ 9,14	92,0 $\pm$ 12,19
	AS %		61,8$\pm$0,95	64,7$\pm$0,74	65,9$\pm$3,50	62,1$\pm$3,02

Megjegyzés: nd = nem detektálható

16. táblázat: Természetes C-vitamin formák koncentrációjának változása az európai harcsa (*Silurus glanis* L.) májában különböző stresszek hatására

	C-vit. forma	AS 0 (μgg^{-1})	AS 10 (μgg^{-1})	AS100 (μgg^{-1})	AA1000 (μgg^{-1})	AS10000 (μgg^{-1})
<i>stressz előtt</i>	AS	nd	13,6 $\pm$ 3,47	93,1 $\pm$ 7,14	211,2 $\pm$ 27,75	360,4 $\pm$ 31,99
	DHA	nd	4,9 $\pm$ 1,72	38,0 $\pm$ 2,36	56,5 $\pm$ 3,00	218,0 $\pm$ 4,18
	TAS	nd	18,5 $\pm$ 5,18	131,1 $\pm$ 6,63	267,7 $\pm$ 27,08	578,5 $\pm$ 29,55
	AA %		73,9 $\pm$ 2,24	71,0 $\pm$ 2,43	78,7 $\pm$ 2,56	62,2 $\pm$ 2,42
Nagy egyedsűrűség <i>stressz után</i>	AA	nd	0,6 $\pm$ 0,20	84,6 $\pm$ 9,13	113,4 $\pm$ 13,90	240,6 $\pm$ 20,14
	DHA	nd	2,2 $\pm$ 0,08	6,6 $\pm$ 0,97	0,7 $\pm$ 0,62	3,8 $\pm$ 1,73
	TAA	nd	2,8 $\pm$ 0,27	91,3 $\pm$ 10,10	114,1 $\pm$ 13,28	244,4 $\pm$ 20,52
	AA %		20,3 $\pm$ 4,83	92,7 $\pm$ 0,28	99,3 $\pm$ 0,60	98,4 $\pm$ 0,66
Formalin <i>stressz után</i>	AA	nd	1,8 $\pm$ 0,75	39,0 $\pm$ 8,32	70,5 $\pm$ 7,77	107,2 $\pm$ 4,71
	DHA	nd	2,3 $\pm$ 0,81	58,8 $\pm$ 3,70	56,8 $\pm$ 5,22	253,2 $\pm$ 41,41
	TAA	nd	4,1 $\pm$ 1,56	97,8 $\pm$ 11,76	127,3 $\pm$ 8,06	360,4 $\pm$ 38,10
	AA %		44,0 $\pm$ 2,43	39,6 $\pm$ 3,61	55,3 $\pm$ 4,06	30,0 $\pm$ 3,93
Nitrit <i>stressz után</i>	AA	nd	17,3 $\pm$ 0,76	81,5 $\pm$ 13,07	123,8 $\pm$ 4,81	86,5 $\pm$ 10,88
	DHA	nd	24,8 $\pm$ 3,18	129,9 $\pm$ 8,47	213,6 $\pm$ 15,84	290,0 $\pm$ 21,18
	TAA	nd	42,1 $\pm$ 3,88	211,3 $\pm$ 13,49	337,4 $\pm$ 19,50	376,5 $\pm$ 19,51
	AA %		41,3 $\pm$ 2,30	38,4 $\pm$ 4,39	36,7 $\pm$ 1,24	23,0 $\pm$ 2,98
Nitrit <i>1 héttel stressz után</i>	AA	nd	2,0 $\pm$ 1,22	5,3 $\pm$ 3,31	46,6 $\pm$ 10,86	52,2 $\pm$ 13,62
	DHA	nd	10,3 $\pm$ 7,28	28,5 $\pm$ 5,77	9,6 $\pm$ 7,38	39,9 $\pm$ 13,73
	TAA	nd	12,3 $\pm$ 8,49	33,9 $\pm$ 9,04	56,2 $\pm$ 4,97	92,1 $\pm$ 27,24
	AA %		19,0 $\pm$ 5,22	14,8 $\pm$ 5,69	82,4 $\pm$ 13,46	57,1 $\pm$ 2,44

Megjegyzés: nd = nem detektálható

17. táblázat: Természetes C-vitamin formák koncentrációjának változása az európai harcsa (*Silurus glanis* L.) különböző szöveteiben alacsony oxigén okozta stressz hatására ($\mu\text{g g}^{-1}$)

Agy	Kontroll	AS100	AS1000	AS10000	APF45	APF450
Stressz előtt	AA	10,21 $\pm$ 6,93	70,78 $\pm$ 7,97	61,13 $\pm$ 8,21	67,31 $\pm$ 14,53	44,69 $\pm$ 2,83
	DHA	n d	1,60 $\pm$ 2,53	n d	3,29 $\pm$ 5,29	n d
	TAA	10,21 $\pm$ 6,93	72,38 $\pm$ 7,53	61,13 $\pm$ 8,21	70,60 $\pm$ 17,58	44,69 $\pm$ 2,83
Stressz után	AA	3,75 $\pm$ 4,35	35,55 $\pm$ 2,02	36,87 $\pm$ 9,54	50,97 $\pm$ 18,93	21,08 $\pm$ 3,89
	DHA	n d	n d	n d	n d	1,69 $\pm$ 3,78
	TAA	3,75 $\pm$ 4,35*	35,55 $\pm$ 2,02*	36,87 $\pm$ 9,54*	50,97 $\pm$ 18,93*	21,08 $\pm$ 3,89*
Vese						
Stressz előtt	AA	2,76 $\pm$ 1,78	37,71 $\pm$ 5,40	45,44 $\pm$ 12,18	164,52 $\pm$ 32,00	12,55 $\pm$ 11,99
	DHA	n d	0,44 $\pm$ 0,99	18,22 $\pm$ 11,59	31,49 $\pm$ 9,55	32,89 $\pm$ 9,46
	TAA	2,76 $\pm$ 1,78	38,15 $\pm$ 5,08	63,66 $\pm$ 22,00	196,01 $\pm$ 38,57	45,44 $\pm$ 12,51
Stressz után	AA	2,34 $\pm$ 3,77	36,49 $\pm$ 21,67	89,89 $\pm$ 12,83	94,86 $\pm$ 43,58	25,44 $\pm$ 7,29
	DHA	n d	44,98 $\pm$ 21,42*	74,40 $\pm$ 37,37*	95,55 $\pm$ 38,20*	3,91 $\pm$ 4,97*
	TAA	2,34 $\pm$ 3,77	81,47 $\pm$ 23,31*	164,29 $\pm$ 35,58*	190,41 $\pm$ 19,56	29,35 $\pm$ 4,42*
Máj						
Stressz előtt	AA	0,77 $\pm$ 1,72	70,51 $\pm$ 28,24	68,89 $\pm$ 17,14	165,91 $\pm$ 71,43	44,59 $\pm$ 20,94
	DHA	4,37 $\pm$ 5,99	17,47 $\pm$ 25,82	67,95 $\pm$ 17,84	n d	n d
	TAA	5,14 $\pm$ 5,52	87,98 $\pm$ 11,44	136,83 $\pm$ 23,13	165,91 $\pm$ 71,43	44,59 $\pm$ 20,94
Stressz után	AA	n d	125,83 $\pm$ 69,57	127,63 $\pm$ 67,91	208,37 $\pm$ 54,02	50,39 $\pm$ 22,46
	DHA	n d	78,14 $\pm$ 44,52*	79,43 $\pm$ 93,66	60,83 $\pm$ 65,48*	n d
	TAA	n d	203,97 $\pm$ 56,69*	207,06 $\pm$ 81,45*	269,19 $\pm$ 44,33*	50,39 $\pm$ 22,46
						105,14 $\pm$ 23,40*

Megjegyzés: * szignifikáns ($p < 0,05$) különbség a stressz előtti és stressz utáni állapot között

18. táblázat: Természetes C-vitamin formák koncentrációja ($\mu\text{g g}^{-1}$ nedves tömeg) a tok hibrid (*Acipenser ruthenus* L. x *Acipenser baeri* Brandt) szöveteiben nitrit stressz hatására.

	Kontroll	AS10	AS100	AS1000	APF450
Agy					
<i>Stressz előtt</i>					
DHA	14,02 ± 15,54	7,32 ± 10,43	57,87 ± 29,99	0,531 ± 1,18	33,34 ± 20,59
AA	86,96 ± 20,57	106,6 ± 26,41	100,7 ± 16,65	145,1 ± 19,58	92,00 ± 22,65
TAA	101,0 ± 27,43	113,9 ± 24,87	158,6 ± 23,46	145,6 ± 19,72	125,3 ± 15,45
<i>Stressz után</i>					
DHA	46,77 ± 42,09	16,40 ± 25,51	35,22 ± 18,871	41,39 ± 18,51	37,77 ± 30,53
AA	77,75 ± 26,35	99,35 ± 18,64	69,04 ± 14,77	81,27 ± 20,70	74,96 ± 28,06
TAA	124,5 ± 29,27	11,57 ± 7,22	104,2 ± 15,37	122,6 ± 2,95	112,7 ± 17,22
<i>1 hét stressz után</i>					
DHA	23,54 ± 33,56	8,02 ± 17,93	20,37 ± 27,90	33,85 ± 47,17	11,36 ± 15,55
AA	66,83 ± 25,30	70,29 ± 20,79	108,5 ± 34,55	108,9 ± 56,22	59,03 ± 34,48
TAA	90,38 ± 22,11	78,32 ± 18,26	128,9 ± 21,72	142,8 ± 33,087	70,39 ± 24,02
Vese					
<i>Stressz előtt</i>					
DHA	10,95 ± 8,91	18,86 ± 5,93	28,97 ± 13,81	88,44 ± 48,29	40,76 ± 7,31
AA	9,02 ± 5,17	8,63 ± 2,36	7,68 ± 8,17	8,60 ± 8,18	7,14 ± 9,27
TAA	19,97 ± 9,04	27,49 ± 6,58	36,56 ± 8,79	97,04 ± 42,13	47,90 ± 11,25
<i>Stressz után</i>					
DHA	32,35 ± 25,30*	13,86 ± 11,8	16,98 ± 7,24*	2,44 ± 2,42*	22,25 ± 9,58
AA	6,72 ± 6,32*	8,93 ± 13,3	3,18 ± 1,10*	10,75 ± 7,15*	3,25 ± 2,49
TAA	41,71 ± 23,17*	26,28 ± 11,8	21,41 ± 8,45*	7,35 ± 10,11*	26,11 ± 11,93
<i>1 hét stressz után</i>					
DHA	25,92 ± 25,30	33,75 ± 24,72	20,30 ± 20,15	54,4 ± 35,05	31,95 ± 12,13
AA	2,29 ± 2,69	2,67 ± 2,83	2,32 ± 4,57	6,87 ± 8,19	n d
TAA	28,21 ± 22,11	36,42 ± 23,65	22,63 ± 18,01	61,27 ± 33,74	31,95 ± 12,13
Hepatopankréász					
<i>Stressz előtt</i>					
DHA	26,6 ± 8,0	32,2 ± 14,6	27,4 ± 9,5	50,0 ± 31,1	15,1 ± 10,7
AA	14,5 ± 6,9	8,8 ± 3,5	9,6 ± 4,9	24,0 ± 1,38	16,9 ± 6,0
TAA	41,1 ± 7,4	41,0 ± 17,3	37,1 ± 11,0	74,0 ± 23,9	31,9 ± 14,8
<i>Stressz után</i>					
DHA	1,1 ± 2,4	3,2 ± 4,6	1,6 ± 3,5	5,1 ± 7,5	3,7 ± 5,6
AA	39,8 ± 28,4	25,2 ± 19,2	26,0 ± 10,3	37,8 ± 10,7	31,6 ± 18,2
TAA	40,9 ± 27,6	28,4 ± 15,9	27,6 ± 10,6	42,9 ± 12,5*	35,2 ± 17,3
<i>1 hét stressz után</i>					
DHA	31,1 ± 8,8	33,3 ± 11,4	49,8 ± 14,1	41,0 ± 27,6	18,0 ± 6,1
AA	8,5 ± 4,2	7,1 ± 3,3	9,9 ± 4,7	31,2 ± 15,4	10,8 ± 8,4
TAA	39,6 ± 11,4	40,4 ± 8,6	59,7 ± 13,9	72,2 ± 23,9	28,8 ± 8,7

Megjegyzés: *= szignifikáns különbség ($p < 0,05$) a stressz előtti koncentrációtól

19. táblázat: Természetes C-vitamin formák koncentrációja ($\mu\text{g g}^{-1}$ nedves tömeg) a tok hibrid (*Acipenser ruthenus* L. x *Acipenser baeri* Brandt) szöveteiben hipoxia stressz hatására.

	Kontroll	AS10	AS100	AS1000	APF450
Agy					
<i>stressz előtt</i> AA	46,52 $\pm$ 10,07	52,79 $\pm$ 9,79	52,56 $\pm$ 13,46	62,96 $\pm$ 7,74	42,53 $\pm$ 11,43
DHA	11,73 $\pm$ 12,55	4,00 $\pm$ 4,60	2,31 $\pm$ 3,30	18,49 $\pm$ 9,21	21,78 $\pm$ 11,07
TAA	58,25 $\pm$ 16,08	56,79 $\pm$ 7,08	54,87 $\pm$ 11,27	81,45 $\pm$ 6,33	64,31 $\pm$ 14,72
<i>stressz után</i> AA	40,75 $\pm$ 13,57	48,95 $\pm$ 22,64	44,36 $\pm$ 13,09	99,58 $\pm$ 20,29	47,87 $\pm$ 6,38
DHA	30,40 $\pm$ 19,05	42,58 $\pm$ 21,02*	52,09 $\pm$ 13,90*	8,96 $\pm$ 14,68	21,78 $\pm$ 7,94
TAA	71,15 $\pm$ 18,71	91,53 $\pm$ 11,10*	96,45 $\pm$ 12,25*	108,54 $\pm$ 25,00	69,65 $\pm$ 11,65
Vese					
<i>stressz előtt</i> AA	2,81 $\pm$ 3,96	1,92 $\pm$ 4,29	2,44 $\pm$ 3,40	28,25 $\pm$ 13,12	13,82 $\pm$ 9,80
DHA	89,15 $\pm$ 22,79	99,73 $\pm$ 26,83	107,11 $\pm$ 31,54	88,32 $\pm$ 31,75	92,35 $\pm$ 15,98
TAA	91,97 $\pm$ 25,67	101,65 $\pm$ 24,82	109,55 $\pm$ 28,82	116,57 $\pm$ 25,92	106,17 $\pm$ 23,48
<i>stressz után</i> AA	15,69 $\pm$ 12,51*	2,90 $\pm$ 6,49	14,47 $\pm$ 14,34	19,25 $\pm$ 1,96	10,40 $\pm$ 8,38
DHA	132,44 $\pm$ 30,12*	96,27 $\pm$ 36,04	57,33 $\pm$ 35,94	25,33 $\pm$ 18,28*	71,55 $\pm$ 20,23
TAA	148,14 $\pm$ 19,37*	99,17 $\pm$ 31,98	71,81 $\pm$ 25,90	44,59 $\pm$ 18,41*	81,95 $\pm$ 18,57
Hepatopankréász					
<i>stressz előtt</i> AA	21,78 $\pm$ 13,60	27,26 $\pm$ 11,00	21,45 $\pm$ 4,31	48,23 $\pm$ 17,95	28,90 $\pm$ 7,40
DHA	17,87 $\pm$ 19,05	24,00 $\pm$ 13,71	19,20 $\pm$ 16,83	127,36 $\pm$ 83,44	56,80 $\pm$ 26,95
TAA	39,65 $\pm$ 30,45	51,26 $\pm$ 21,04	40,65 $\pm$ 14,64	175,59 $\pm$ 74,31	85,70 $\pm$ 29,10
<i>stressz után</i> AA	32,42 $\pm$ 8,63	42,35 $\pm$ 32,59	28,39 $\pm$ 5,61	40,71 $\pm$ 14,35	41,22 $\pm$ 16,55
DHA	45,24 $\pm$ 36,92	14,40 $\pm$ 16,09	25,33 $\pm$ 19,41	38,13 $\pm$ 43,52*	25,96 $\pm$ 31,64
TAA	77,66 $\pm$ 35,19*	56,75 $\pm$ 26,16	53,72 $\pm$ 24,28	78,84 $\pm$ 38,81*	67,18 $\pm$ 25,77

Megjegyzés: *= szignifikáns különbség ($p < 0,05$) a stressz előtti koncentrációtól