

Kimyasal Mücadele Uygulanmış *Docioctaurus Maroccanus* Epidemik Populasyonundan Alınan Örneklerde Antioksidan Enzim Aktiviteleri

Aysun ÖZKAN, Gülgün GÜNDÜZ, Battal ÇIPLAK, Kayahan FIŞKIN
Akdeniz Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Antalya-TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 27.04.1998

Özet: Bu çalışmada, Nitron [O-O-dimethyl-O-(3-methyl-4-nitro-phenyl) phosphorothioate] ile doğal ortamda ilaçlanmış *Docioctaurus maroccanus* Thunberg türünün birinci, ikinci, üçüncü evre nimf ve ergin bireylerde antioksidan enzim aktiviteleri incelendi. Canlı *D. maroccanus* örnekleri 1996 yılında Eynif Ovası'nda, (Ibradı, Antalya) Tarım İl Müdürlüğüne Nitron kullanılarak mücadele edilen epidemik populasyondan alındı. Katalaz, Glutasyon-redüktaz, Glutasyon-peroksidaz ve selenyum bağımlı Glutasyon-peroksidaz aktiviteleri spektrofotometrik olarak saptandı. Katalaz enzim aktivitesinde evrelere göre önemli bir farklılık gözlenmedi. Glutasyon-redüktaz aktivitesi ergin evrede artış gösterdi. Selenyum bağımlı Glutasyon-peroksidaz aktivitesi ergin evrede artış gösterdi. Selenyum bağımlı Glutasyon-peroksidaz aktivitesi ikinci evreye kadar düşüş gösterip üçüncü evrede arttı. Buna karşılık selenyum bağımsız Glutasyon-peroksidaz aktivitesi ikinci evrede artış gösterdi.

Anahtar Sözcükler: *Docioctaurus maroccanus*, Nitron, Katalaz, Glutasyon redüktaz, Selenyum bağımlı glutasyon peroksidaz, Selenyum bağımsız glutasyon peroksidaz.

Antioxidant Enzymes Activities in Chemically Warfared Samples of *Docioctaurus maroccanus* Obtained From an Epidemic Population

Abstract: Antioxidant enzyme activities at first, second, third nymphal stage and adult individuals of nitron [O-O-dimethyl-O-(3-methyl-4-nitro-phenyl) phosphorothioate] administered *D. maroccanus* are investigated. Living specimens where nitron had been administered for chemical contention by Agricultural Head Office of Antalya Province in 1996 were taken from epidemic population of Eynif plain (Ibradı, Antalya). Catalase, GSH-reductase, GSH-peroxidase and Se-dependent-GSH-peroxidase activities are assayed spectorofotometrically. The catalase activity did indicate no significant change in any nymphal stage. GSH-reductase activity increased in adult individuals. Se-GSH-peroxidase activity decreased with second nymphal stage and increased with the third one, Whereas GSH-peroxidase activity increased at second nymphal stage of *D. maroccanus*.

Key Words: *Docioctaurus maroccanus*, Nitron, Catalase, Glutathione reductase, Se-dependent glutathione peroxidase, Glutathione peroxidase.

Giriş

Tarımsal zarar oluşturan en önemli canlı grubu böceklerdir ve bunlarla mücadele edilmeksizin tarım yapmak nerede ise olanaksızdır. Bu zararlı grubuna dahil olan çekirge sürülerinin

oluşturduğu zararlar deprem, sel ve yangın gibi felaketler boyutundadır ve bunların epidemik populasyonları ile mücadele etmek diğer zararlılar ile mücadele etmekten çok daha zordur. Önüne geçilemediği zaman epideminin boyutu kat kat artmakta ve mücadele gittikçe olanaksızlaşmaktadır. Zamanla büyüyen populasyonlar yayılış alanı içerisindeki tüm yeşillikleri ve hatta yosunları yok edebilmektedirler.

Fas çekirgesi olarak da bilinen *D. maroccanus* Anadolu'da önemli zararlara neden olmuş ve halen bu açıdan potansiyeli olan bir türdür. Güney Avrupa, Kuzey Afrika, Anadolu, Kafkasya ve Orta Asya gibi oldukça geniş bir alanda yayılış gösteren bu tür, oluşturduğu epidemik populasyonlarla büyük zararlara neden olabilmektedir. Oldukça değişken iklimleri olan alanlarda yayılış göstermesi bu türün ayrı bir özelliğidir. Bu tür, yurdumuzda da değişik dönemlerde önemli zararlara neden olmuştur (1, 2). Batı Anadolu'da 1861, 1865, 1875, 1881, 1883, 1904, 1909-1917 yılları arasında ve Güneydoğu Anadolu'da 1930-1932 yıllarında Fas çekirgesi epidemileri görülmüştür. Karabağ (1) tarafından 1915-1917 yıllarında Batı Anadolu'da yaklaşık 125 000 ton larva ve 12 500 ton kadar yumurta yüküğü (1kg yükükte yaklaşık 40 000-45 000 yumurta bulunur) toplandığı kayıt edilmiştir. Daha sonraki dönemlerde zaman zaman oluşan lokal sürüler dar alanlarda zararlara neden olmuştur. Ancak, önceki epidemilerin boyutuna ulaşamamışlardır.

Fas çekirgesi sürüleri genellikle birkaç yıllık birikimler sonucu oluşur. Her yıl artan populasyon yoğunluğu kritik bir noktaya ulaştığında sürü davranışı görülmeye başlar. Örneğin, 1909-1910 yıllarında Uşak civarında küçük bir alanda görülen grup, sonraki 8-10 yıl içerisinde tüm Batı Anadolu'da çok geniş bir alana yayılmıştır (1, 2). Ancak, Anadolu'da oluşan Fas çekirgesi sürülerinin görülme zamanına bakıldığında sürü haline geçişler arasında 5-10 yıl kadar bir zaman diliminin olduğu görülmektedir. Bu süre iklim koşullarına göre değişmektedir. Lokal sürüler günümüze kadar Anadolu'nun değişik bölgelerinde oluşmakta ve kimyasal mücadele ile büyümesi önlenmektedir. En son görülen lokal sürülerden biri 1996 yılında Antalya İbradı ilçesi ve civarında (özellikle Eynif ovasında) oluşmuş ve nitron kullanılarak mücadele edilmiştir. Mücadele amacıyla atılan ilaçlar ortamdaki tüm canlıları ve hatta besin zinciri yoluyla insanları da etkilemekte ve ekosistem açısından büyük bir sakınca oluşturabilmektedir. Bu nedenle bir anlamda zorunlu olan kimyasal mücadelenin en uygun evrede yapılarak minimum olumsuz etkinin sağlanması için kimyasalın en etkili olduğu evrenin saptanması büyük bir önem taşımaktadır.

Çalışmamızda, ilaç uygulanmış ortamdaki canlı örneklerde, ilaç etkinliğinin göstergeleri olarak değerlendirilebilecek antioksidan enzimlerinin aktivitelerine bakıldı. Ortamdaki edinilen birinci, ikinci ve üçüncü evre nimf ve ergin bireylerde Katalaz, Glutatyon-redüktaz, Se-glutatyon peroksidaz ve Se-bağımsız Glutatyon peroksidaz [(GSH-Px (glutatyon S-transferaz)] aktiviteleri ölçüldü.

Böcekler tarafından vücuda alınan ve bir pestisit çeşidi olan nitron böceklerin yağ dokusunda detoksifiye edilmektedir (3). Organofosfat esteri olan bu insektisit, asetil kolin esteraz inhibitörü olarak görev yapar. Ayrıca yapısında thiol bulundurduğundan, tiyofosfat tipindeki bu bileşik metabolik bir değişiklikliğe de uğratılır. Tiyobileşikler ya da indirek etkili organofosforlu insektisitler detoksifikasyon enzimleri tarafından -okso bileşiklerine çevrilirler. Oluşan bu -okso

bileşikleri proteinlere atak yapar (4). Özellikle detoksifikasyon mekanizmasının faz I enzimleri ile oluşan arametabolitler elektrofilik özellik kazanarak lipid peroksidasyonuna, mitokondrial DNA hasarına ve iç mitokondrial düzenin bozulmasına neden olarak süperoksit radikali ve türevlerini oluşturabilmektedir. Toksikasyonu izleyen metabolizma faaliyetleri sonucunda hücrelerde çeşitli oksijen radikallerinin oluşumu hızlanacağından (5, 6) organizmada bu radikallerin zararlı etkilerini ortadan kaldıracak enzim aktivitelerinin bilinmesi de ayrı bir önem kazanmaktadır.

GSH-Px (glutathione: hydrogenperoxide oxidoreductase, EC 1.11.1.19) sitozolde ve memeli hücrelerinin mitokondrial matriksinde de bulunan tetramerik (88 000 dalton molekül ağırlığında) bir selenoenzimdir. GSH-Px dokuları oksidatif hasara karşı koruyan enzimlerden biridir. Hidrojen peroksiti indirgeyen tepkimeleri, çok çeşitli organik hidroperoksitleri, su ve uygun alkollere indirgeyen tepkimeleri katalizler (5, 7, 8).

Se-bağımsız GSH-Px (GSH S-transferaz: GST, EC 2.5.1.18), molekül ağırlığı 50 000 dalton olan, dimer yapıda, 7 farklı formda alt ünite taşıyan ve sekiz izozimi bulunan bir proteindir (9, 10).

Katalaz (CAT, EC 1.11.1.6) $2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$ tepkimesini katalizler. Her aerobik hücre bu enzimi bulundurur. CAT, %80 peroksizomlarda ve %20 sitozolde bulunmaktadır. CAT enzimi dört alt üniteden oluşmuş, her bir alt ünitesinde bir heme [Fe(III)-prothoporphyrin] grubu bulunduran 240 000 dalton molekül ağırlığında bir proteindir (11).

GSH-Redüktaz (E.C 1.6.4.2) $GSSG + NADPH + H^+ \rightarrow 2GSH + NADP^+$ tepkimesini katalizler. Molekül ağırlığı 120 000 dalton dur. İki alt birimi olan bir proteindir (12, 13).

Materyal ve Metot

Çekirgelerin Toplanması ve Saklanması

Yaklaşık 48 000 dönüm olan Eynif ovası bir vadi şeklindedir ve rakımı 500 m civarındadır. Eynif ovasında çekirge nimflerinin ilk çıkışına 5-6 Mayıs tarihlerinde rastlandı. İbradı kaymakamlığından alınan bilgilere göre, Eynif ovasında ilk ilaçlama 6-8 Mayıs 1996 tarihlerinde toplam 10 lt sıvı ilaç kullanılarak yapıldı. Bu ilaçlamadan sonra 9-10, 13-16 ve 20-24 Mayıs tarihlerinde toplam 35 ton asetilkolin esteraz inhibitörü olarak sinir sistemine etkili olan tozin [O-O-dimethyl-O-(3-methyl-4-nitro-phenyl) phosphorothioate] kullanıldı. İlaçlama el ile, çekirge ocaklarının üzerine serpilerek yapıldı. İlaçlama sırasında günlük ortalama 40-45 kişi çalıştı ve alanın %75-80'i ilaçlandı. Çalışmada kullanılan birinci, ikinci ve üçüncü nimfal örnekler 13-16 Mayıs 1996 tarihinde alındı. Dördüncü ve beşinci evre nimf toplamak üzere 11 Haziran'da yapılan arazi çalışmasında sadece ergin çekirgelere rastlandı. Laboratuvara canlı olarak getirilen örnekler -40°C de derin dondurucuya konuldu.

Homojenizasyon

Birinci, ikinci ve üçüncü nimfal dönem ve ergin evredeki bireyler (total body) fosfat tamponu (1:5w/v, pH 7.4) ile Potter-Elvehjem marka cam homojenizatör kullanılarak homojenize edildi. Branson Sonifier 250 ultrasonik parçalayıcıda 3x15'er saniye ve 15'er saniye aralıklarla buz

içerisinde parçalandı. Bütün işlemler 0°C da tamamlandı. Homojenat 20 dakika 14 000 rpm (+4°C) de santrifuj edildi. Dökelti ham enzim kaynağı olarak kullanıldı.

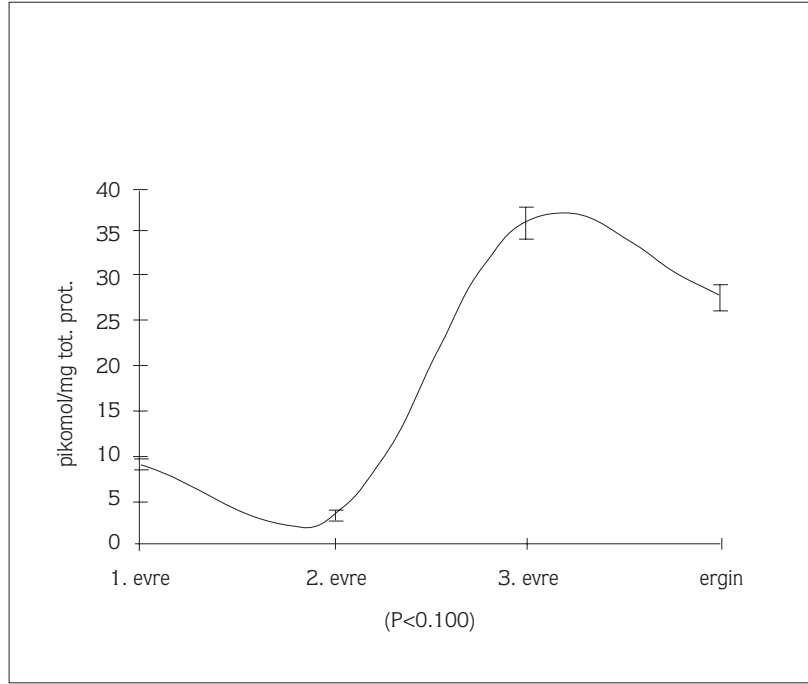
Enzim Aktivitesi Ölçümü

Protein miktarı standart olarak sığır serum albuminin kullanıldığı kolorimetrik Lowry yöntemi ile (14), Katalaz enzim aktivitesi Luck yöntemi ile (15), GSH-redüktaz aktivitesi Carlberg ve Mannervik'in yöntemi ile (12), selenyum bağımlı GSH-peroksidaz (Se-GSH-Px) ve selenyum bağımsız GSH-peroksidaz [GSH-Px (glutatyon S-transferaz)] enzim aktiviteleri, hidrojenperoksit ve kümene hidrojenperoksitin substrat olarak kullanıldığı spektrofotometrik yöntemler (16) ile çalışıldı. Protein miktarı mg protein; enzim aktivitesi ise bir dakikada 1 mg proteinin ürüne çevirdiği substrat miktarı olarak hesaplandı.

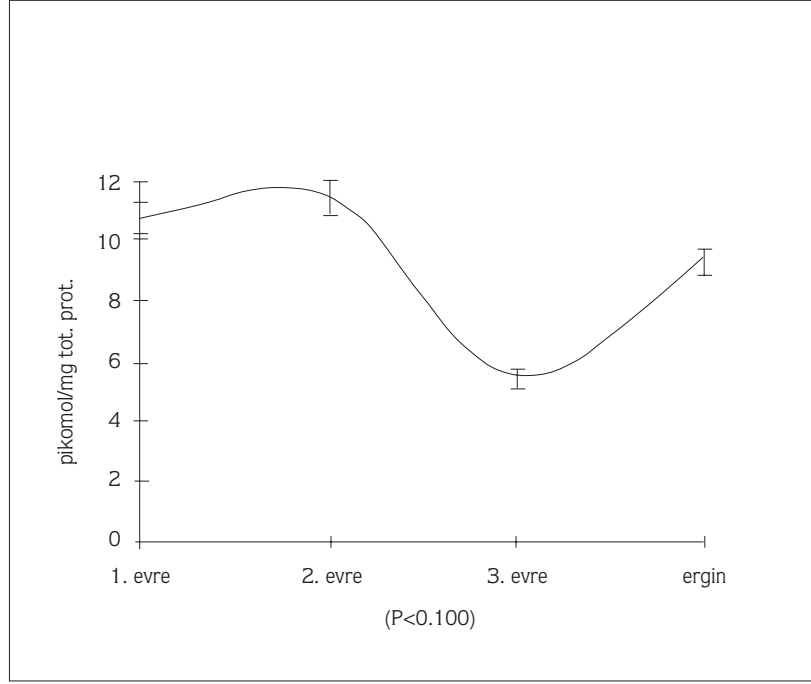
Sonuçlar sekiz kez tekrar edilen enzimatik çalışmaların ortalaması olarak alındı. Nimfal evreler ve ergin bireylerde enzim aktivitelerindeki farklılıkları belirtmek için varyans analiz yöntemi (17) uygulandı. Bu farklar $p < 0.1$ düzeyinde önemli kabul edildi.

Deneylerde Kullanılan Kimyasallar

Deneylerde kullanılan kimyasallar Sigma ve Merck firmasının ürünleridir.



Şekil 1. *Doclostaurus (D) maroccanus*'un üç nimfal evre ve ergin bireylerinde Se-bağımlı Glutatyon peroksidaz aktivite değişimleri.



Şekil 2. *Dociostaurus (D) maroccanus*'un üç nimfal evre ve ergin bireylerinde Se-bağımsız Glutatyon peroksidaz aktivite değişimleri.

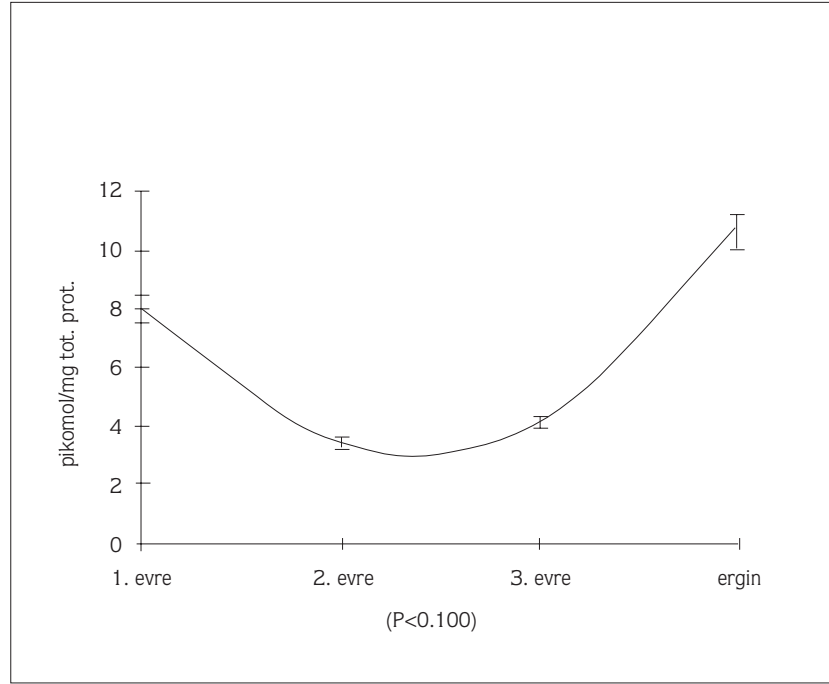
Bulgular

Çalışmamızda, ilaç uygulanmış alandan alınan canlı örneklerde antioksidan enzim aktivitelerine bakıldı. Nimfal evrelerin ve ergin bireylerin enzim aktivitelerindeki farklılıklar $p < 0.1$ düzeyinde önemli kabul edildi. Selenyum-bağımlı Glutatyon peroksidaz aktiviteleri ilk iki evrede 3.19 pikomol/miligram total protein iken üçüncü nimfal evrede 35.9 pikomol/miligram total protein, ergin bireylerde ise 27.4 pikomol/miligram total protein olarak önemli bir artış gösterdi (Şekil 1).

Selenyum-bağımsız Glutatyon peroksidaz aktiviteleri, ilk iki evrede 11.4 pikomol/miligram total protein iken üçüncü nimfal evrede 5.37 pikomol/miligram total proteine kadar düşüş gösterip, ergin bireylerde 9.27 pikomol/miligram total proteine yükseldi (Şekil 2).

Glutatyon redüktaz aktivitesi nimfal evrelere göre sırasıyla 4.0, 1.67, 2.0 nanomol/miligram olarak gözlenirken ergin bireylerde 5.2 nanomol/miligram total protein olarak artış gösterdi (Şekil 3).

Katalaz aktivitesi nimfal evrelere göre önemli bir farklılık göstermedi. Enzim aktivitesi değerleri 19.131 ile 20.403 mikromol/miligram total protein arasında değişti (Şekil 4).



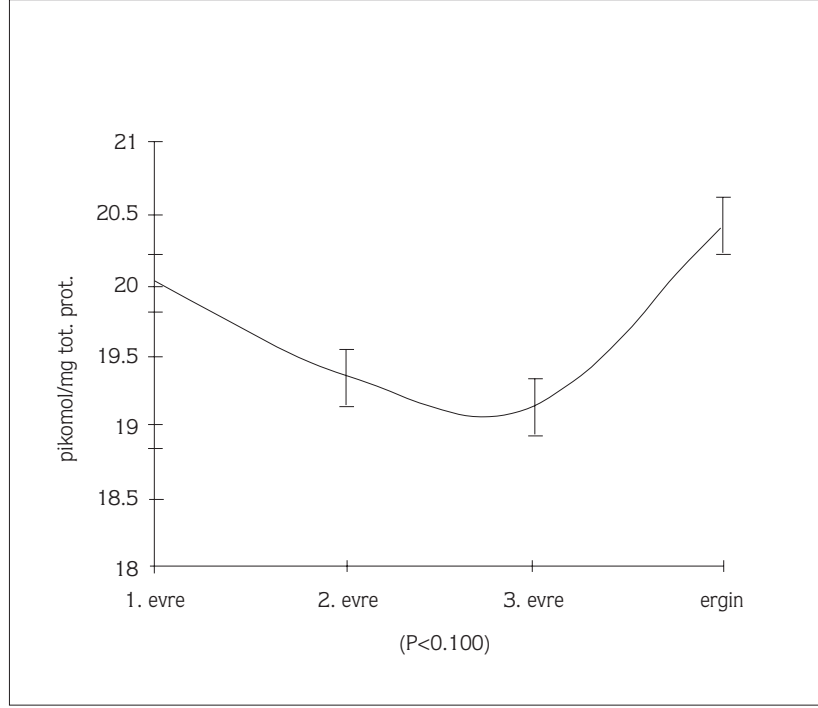
Şekil 3. *Doclostaurus (D) maroccanus*'un üç nimfal evre ve ergin bireylerinde Glutatyon redüktaz aktivite değişimleri.

Tartışma ve Sonuç

Kimyasal ilaçlar, tüm organizmalara etkili olduklarından uygulanan habitatta yaşayan tüm canlıları doğrudan veya dolaylı olarak (besin zinciri yoluyla) etkilemektedirler. Arazi çalışmaları sırasında ilaçlama sonrasında Eynif Ovasında görsel olarak çok az hayvansal organizmaya rastlandı. Organizma çeşitliliğinin bu kadar düşük olarak gözlenmesi büyük olasılıkla ilacın etkinliğine ve atılan ilaç miktarından kaynaklanmaktadır. Ayrıca; birinci, ikinci, üçüncü nimf ve erginlerle yapılan enzimatik çalışmaların sonuçlarından anlaşılacağı gibi, nimfal dönemlerde ilaç metabolize edici enzimlerin faaliyetleri, enerji üretimi ve deri değişimi sırasında meydana gelen apoptosis sonucu ortaya çıkan radikallerin ortadan kaldırılması için gerekli enzimlerin aktivitelerinde değişim gözlemlendi.

Se-bağımlı Glutatyon peroksidaz aktivitesinde özellikle üçüncü nimfal evredeki artış, hücre membran hasarına karşı hücrenin en aktif dönem olduğu kanısını yaratmaktadır (Şekil 1).

Se-bağımsız Glutatyon peroksidaz, diğer adı Glutatyon-S transferaz aynı zamanda ilaç metabolize edici enzim sisteminin bir üyesidir. Se-bağımsız Glutatyon peroksidaz ikinci evrede ilacın toksik etkine karşı kazanılan ya da indüklenen bir aktivasyon göstermektedir (Şekil 2).



Şekil 4. *Dociostaurus (D) maroccanus*'un üç nimfal evre ve ergin bireylerinde Katalaz aktivite değişimleri.

Glutasyon redüktaz enzimi nimfal dönemler arasında büyük bir aktivasyon dalgalanması gösterdi. İlaç etkisine karşı, erginlerin redükte glutasyon ihtiyacından dolayı bu enzimin aktivitesi arttı (Şekil 3).

Katalaz aktivitesi nimfal dönemden ergin döneme kadar pek önemli bir değişme göstermedi, hüresel hidrojenperoksit zararını ortadan kaldırmak için her dönemde aktivitesini sabit tuttu (Şekil 4).

Sonuçlarımızdan da görüleceği gibi çekirgeler yaşamları boyunca insektisitlere karşı koyabilmek için antioksidan enzim sistemlerinden de yararlanabilmektedir, Yuan ve Horvitz'in apoptosis çalışmaları sonuçları bu bulguları destekler niteliktedir (18). Özmen ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalarda da, diğer bir pestisit ergin çekirgelerde enzim inhibisyonuna ve sinir hücrelerine olan etkileri açıklanmıştır (19).

Se-GSH-Px, GSH-R ve CAT aktivitelerinde ikinci evredeki azalış adı geçen kimyasalın etkisini aynı evrede bir başka enzimatik sistemle, detoksifikasyon sistemiyle giderildiğini akla getirmektedir (20, 21). GSH-Px diğer adı Glutasyon S-transferaz aktivitesinin ikinci nimfal

evrede artışı bu varsayımı desteklemektedir. Ancak, üçüncü nimfal dönemdeki bulgular detoksifikasyon ürünü metabolitlerin oksijen türevi radikallerin oluşumunu desteklediği fikrini doğrulamaktadır. Radikal hasarını ortadan kaldıracak, hücre membran lipid peroksidasyonunu engelleyici Se-GSH-Px'in aktivitesinin üçüncü evrede bir miktar artması bu fikri kanıtlar niteliktedir. Aynı dönemde, redükte glutasyon oluşumunu hızlandıran GSH-R aktivitesi de arttı, ancak CAT aktivitesi önemli bir değişiklik göstermedi. Bu sonuç, hidrojenperoksit birikiminin artışından çok, hücrelerde membran hasarını sağlayan OH radikallerinin oluştuğunu ve nimfal dönemde sürekli deri değişimi ve toksikant etkisi nedeniyle hücre membran hasarının çok daha etkin olabileceğini akla getirmektedir. Bu çalışma ilaç uygulanmış *D. maroccanus* bireylerinde enzim aktiviteleri ile ilgili önemli kayıt niteliğini taşımaktadır. Doğal olarak, atılan ilaç sadece çekirgeler üzerinde değil, alanda bulunan toprak üstü ve özellikle toprakta yaşayan tüm canlılar üzerinde olumsuz etkileri olacaktır. İlacın özellikle toprakta ve dolayısıyla topraktaki canlılarda uzun süreli bulunma olasılığı düşünüldüğünde benzer çalışmaların ilaç uygulanan bölge ile uygulanmayan bölge canlılarında karşılaştırmalı olarak tekrarlanması anlamlı olacaktır.

Teşekkür

Çalışmamızda araç temininde ve çalışma alanına ulaşmamızda yardımlarını esirgemeyen Gündoğmuş Orman İşletme Müdürü Orman Mühendisi Mukadder Akbaş'a ve dönemin İbradı Kaymakamı (Siirt Vali Yardımcısı) Ahmet Çınar'a teşekkür ederiz.

Kaynaklar

1. Karabağ, T., Ankara vilayeti dahilinde mevcut çekirgelerin ekolojik, coğrafi ve sistematik durumları üzerine araştırmalar. Ank. Üniv. Z. Fak. Sayı:4, 121, 1984.
2. Lodos, N.: Türkiye entomolojisi. Ege Üniv. Z. Fak. Cilt-1 263-270, 1983.
3. Demirsoy, A., Yaşamın Temel Kuralları, Omurgasızlar/Böcekler, Entomoloji. Hacettepe Üniv. Fen Fak. Cilt 11/Kısım 11, 111-113, 1995.
4. Gülay, N., Vural, N., Toksikoloji. Ankara Üniv. Eczacılık Fak. Yay: 38, 149-154, 1976.
5. Jakoby, W.B., The glutathione S-transferases: a group of detoxification proteins. In: Meister, A., ed. Advances in enzymology Vol.46. New York: Jhon Wiley & Sons, Inc. 383-414, 1978.
6. Pacifici G.M., Fracchia, G.N., Advances of drug metabolism in man.. 3-35, 1995.
7. Booth, J., Boyland, E., Sims, P., An enzyme from rat liver catalyze in conjugations with glutathione. Biochem. J. 79: 516-524, 1961.
8. Hopkin, F.G., Elliott, K.A.C., The relation of glutathione to cell respiration with special reference to hepatic tissue. Proc. Roy. Soc. B 109: 58-88, 1931.
9. Ketterer, B., Tan, K.H., Meyer, D.J., Coles, B., Glutathione transferases: a possible role in the detoxification of DNA and lipid hydroperoxides. In: Mantle, T.J., Pickett, C.B., Hayes, J.D., eds. Glutathione S-transferases and carcinogenesis. New York: Taylor & Francis, 149-163, 1987.

10. Mills, G.C., Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *J. Biol. Chem.* 229: 189-197, 1957.
11. Percy, M.E., Catalase: an old enzyme with a new role? A review. *Can. J. Biochem. Cell. Biol.* 62: 1006-1014, 1984.
12. Carlberg I., Mannervik, B.: Glutathione reductase. *Methods Enzyme.*, 113, 448-490, 1985.
13. Mann, P.J.G., The reduction of glutathione by a liver system. *Biochem. J.* 26: 785-790, 1932.
14. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Faar, A.L., Randall, R.J., Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275, 1951.
15. Luck, H., Catalase. In H.U. Bergmeyer (ed.), *Methods of Enzymatic Analyses*, Verlag chemie Academic Press, Weingheim, New York, 885-888, 1963.
16. Lawrence, R.A., Burk, R.F., Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 71: 952-958, 1976.
17. Snedecor, G.W., Cochran, W.G.: *Statistical Methods*, 6th ed. Ames. Iowa U.S.A. Iowa State University press, 1967.
18. Yuan, J.Y., Horvitz, H.R., The *C.edaganus* genes *ced-3* and *ced-4* act cell autonomously to cause programmed cell death. *Dev. Biol.* 138: 33-41, 1990.
19. Özmen, M., Çıplak, B., Yeşilada, Ö., Özcan B., Ulubaba, E., Yabanıl tip *C. tenuicercis* Tarbinski (Orthoptera: Catantopidae) örneklerinde azinfosmetil uygulamasına bağlı asetilkolin esteraz inhibisyonu. *Türk. Entomoloji. Dergisi.* 21(3): 179-18, 1997.
20. Sohal, R.S., Farmer, K.J., Allen, R.G., Cohen, E.R., Effect of age on oxygen consumption superoxide dismutase, catalase, glutathione, inorganic peroxides an chloroform-soluble antioxidants in the adult male housefly *Musca domestica*. *Mech. Aging Dev.*, 24: 185-195, 1.
21. Rotilio, G., *Superoxide and Superoxide Dismutase in Chemistry, Biology and Medicine*. Elsevier science publishers B.V., Amsterdam. 1-683, 1986.