

**NEHÉZFÉMEK HATÁSA ÉDESVÍZI HALFAJOK MÁJ CITOKRÓM P450-  
FÜGGŐ ENZIMRENDSZERÉRE**

Ph.D. tézisek

**Henczová Mária**

Témavezető: Dr. Kissné Dr. Deér Aranka  
egyetemi docens

Szegedi Tudományegyetem  
Természettudományi és Informatikai Kar  
Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszék

Szeged

2009

## BEVEZETÉS

Az élő vizeinkbe nagy mennyiségben kerülnek az élővilágra ártalmas anyagok, mint például különböző nehézfémek, illetve azok származékai, a vízi ökoszisztéma súlyos károsodását eredményezve. A nehézfémek és vegyületeik a levegőbe, talajba, talajvízbe, valamint a felszíni vizekbe kerülve koncentrációjuktól és az expozíció időtartamától függően közvetlenül károsíthatják az ökoszisztéma egyedeit, illetve akkumulációjuk miatt a táplálékláncon keresztül közvetve válhatnak ki toxikus hatást. Az akkumuláció mértékét külső környezeti tényezők, a szervezet belső fiziológias állapota, az élőlény életmódja és a táplálkozási láncban elfoglalt helye jelentős mértékben befolyásolja. A vízi környezet stresszhatásai az élőlényekben komplex celluláris reakciókat váltanak ki. A sejtekbe kerülő idegen vegyületek hatása elsődlegesen a makromolekulákkal (fehérjék, lipidek, nukleinsavak) való kölcsönhatásukban nyilvánul meg, amely a sejtek molekuláris működésének megváltozását eredményezi. Ezen folyamatok kezdetben reverzibilisek lehetnek, s a biológiai aktivitás változása alapján jól detektálhatók.

A halak szervezetében lejátszódó biodegradációs folyamatok kevésbé ismertek, ugyanis farmakológiai és toxikológiai szempontból a kutatások hosszú ideig elsősorban csak az emlősökre korlátozódtak. A kémiai szennyező anyagokkal egyre inkább terheltebbé váló vízi környezetben a halak közvetve és/vagy közvetlenül fokozottan ki vannak téve a kémiai szennyező anyagok hatásainak, így a vízi ökoszisztémák állapotának érzékeny indikátorai. Egész testfelületükkel, kopolytájukkal állandó és szoros kapcsolatban vannak a vízzel, illetve a vízben lévő toxikus vegyületekkel, s ez által közvetlenül, illetve közvetve vagy a táplálkozásuk révén felhalmozhatják testükben az idegen anyagokat.

Minden élőlény, így a halak szervezete is rendelkezik olyan, meglehetősen konzervált, molekuláris védelmet szolgáló fehérjerendszerekkel, amelyek kiűrik

vagy metabolizálják az idegen vegyületeket. A halak szervezetébe kerülő szennyező anyagok metabolizmusának fő helye a máj. A biotranszformációs folyamatoknak köszönhetően ezek az anyagok a szervezetből kiüríthetővé válnak, ezáltal a toxikus hatás is csökkenhet. Ebben fontos szerepet játszanak a májméregtelenítő enzimek, a citokróm P450-függő kevert funkciójú monooxigenázok. A P450 enzimek aktivitása a szervezeten belül nem állandó, a szervezetbe kerülő idegen anyagok, a xenobiotikumok vagy egyes endogén szabályozó molekulák képesek növelni (induktorok) vagy csökkenteni (inhibitorok) a P450 enzimek aktivitását.

Bár önmagában a citokróm P450 enzimindukció nem alkalmas szennyező anyagok természetének azonosítására, ennek ellenére a hagyományos analitikai módszereket kiegészítve alkalmas módszer a vízminőség romlásának jelzésére. Mivel a nagy koncentrációjú és folyamatos expozíció gyakran vezet az egyedek vagy egyes érzékenyebb fajok pusztulásához, hosszú távon pedig az életközösségek változásához, ezért nagyon fontos vizeink ökológiai állapotának vizsgálata.

A különböző tengeri halfajok szervezetében lejátszódó biodegradációs folyamatokról számos irodalmi adat áll rendelkezésre, azonban az édesvízi halak máj méregtelenítő citokróm P450-függő monooxigenáz rendszere sokkal kevésbé ismert. Keveset tudunk az élővizekbe kerülő nehézfémek toxikus hatásairól, a metabolizációjukról, a biotranszformációs folyamatok faji eltéréseiről, továbbá az egyéb környezeti tényezőkkel együtt jelentkező hatásokról.

## CÉLKITŰZÉS

Munkánk során toxikus nehézfémionok – kadmium, réz és ólom – hatását vizsgáltuk *in vivo* és *in vitro* körülmények között Magyarország élővizeiben honos halfajok, a növényevő busa (*Hypophthalmichthys molitrix* V.), a ragadozó harcsa (*Silurus glanis* L.) és a mindenevő ponty (*Cyprinus carpio* L.) máj citokróm P450 méregtelenítő enzimrendszerére.

Célkitűzéseinket az alábbiakban foglalhatjuk össze:

- Megvizsgáltuk az egyik legtoxikusabb nehézfém, a kadmiumion hatását *in vivo* és *in vitro* kezelések hatására a ponty, busa és harcsa máj méregtelenítő enzimeire.
- Tanulmányoztuk, hogy  $\text{Cu}^{2+}$  ion különböző koncentrációban milyen hatással van a busa és a harcsa máj citokróm P450 enzimrendszerére.
- Az ólomion *in vivo* és *in vitro* hatását vizsgáltuk ponty máj citokróm P450A izoenzimekre.
- Összehasonlítottuk az eltérő táplálkozású halfajok máj méregtelenítő enzimeinek a nehézfémionokkal történő *in vitro* kezelések hatására bekövetkező érzékenységet.
- Választ kerestünk arra, hogy az infravörös rezonancia spektroszkópia alkalmas-e a nehézfémek fehérjeszerkezet károsító hatásának kimutatására halak máj mikroszómájában.

## MÓDSZEREK

### Halak tartása, kezelése

A kísérleteinket busa (*Hypophthalmichthys molitrix* V.), harcsa (*Silurus glanis* L.), és ponty (*Cyprinus carpio* L.) mindkét nembeli egyedeivel végeztük. A halakat kettesével 100 l-es, 24 órán keresztül levegőztetett, és termosztált akváriumban  $16 \pm 2$  °C, illetve  $10 \pm 2$  °C hőmérsékletű csapvízben tartottuk.

### *In vivo* kezelések

#### A halak intaperitoneális (i.p.) kezelése:

-  $\beta$ -naftoflavonnal: a CYP1A specifikus induktort  $50 \text{ mg kg}^{-1}$  testsúlyra számított dózisban alkalmaztuk. Kontrollként csak kukoricaolajjal kezelt halakat használtunk.

- Nehézfémionokkal történő i.p. kezelések:

Kadmium kezelés: kadmium-acetátból a  $\text{Cd}^{2+}$  ionra nézve  $1 \text{ mg ml}^{-1}$ -es törzsoldatot készítettünk. A pontyot i.p. kezeltük  $2$  és  $10 \text{ mg Cd}^{2+} \text{ kg}^{-1}$  dózisban. A rövid távú kezelés során a  $10 \text{ mg Cd}^{2+} \text{ kg}^{-1}$ -os kezelést követően  $24$  óra eltelte után kezeltük a halakat  $50 \text{ mg kg}^{-1}$   $\beta$ -naftoflavonnal. A hosszú távú kezelés esetében a kadmiumionnal történt kezelést ( $2 \text{ mg Cd}^{2+} \text{ kg}^{-1}$ ) követő  $6$ . napon injektáltuk a halakat  $50 \text{ mg ml}^{-1}$   $\beta$ -naftoflavonnal.

- Ólom ionnal történő kezelés: Pontyot  $2 \text{ mg kg}^{-1}$  dózisban kezeltük. ólommal  $\text{Pb}^{2+}$  ionra számítva.

#### Halak kezelése nehézfémionokkal vízben történő kezelés során:

Busát és harcsát kadmiummal, és rézzel vízben kezeltük. A kadmiumion koncentrációja az akváriumban  $10 \text{ mg l}^{-1}$  volt, a rézion koncentrációja busa esetében  $1 \text{ mg l}^{-1}$  és  $10 \text{ mg l}^{-1}$ , míg a harcsánál  $10 \text{ mg l}^{-1}$  volt. A kontroll állatokat nehézfém nélküli vízben, azonos körülmények között tartottuk.

### ***In vitro* kísérletek**

Az *in vitro* kísérleteket a  $\beta$ -naftoflavonnal kezelt halak májából készített mikroszómával végeztük. A  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  és  $\text{Pb}^{2+}$  ionok *in vitro* hatását a következő koncentráció tartományokban vizsgáltuk:  $\text{Cd}^{2+}$  0-4,0  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ;  $\text{Cu}^{2+}$  0-2,0  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ;  $\text{Pb}^{2+}$  0-4,0  $\mu\text{g ml}^{-1}$ .

Az 50%-os enzimgátláshoz tartozó értékek meghatározása előtt a mikroszómákat előinkubáltuk 30 °C-on 10 percig különböző koncentrációjú nehézfém oldattal ( $\text{Cd}^{2+}$  0-0,120  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ;  $\text{Cu}^{2+}$  0-1,0  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ;  $\text{Pb}^{2+}$  0-4,0  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ).

### **Mikroszóma preparálás**

A halak elkábítása után a májat kiemeltük, az epehólyagot eltávolítottuk. A májszövetet ollóval feldaraboltuk, 3-szor jéghideg 0,1 M foszfát pufferrel mostuk (pH 7,4), amely 0,15 M kálium-kloridot tartalmazott. Potterben elhomogenizáltuk, 10.000 g-vel centrifugáltuk. A felülúszót tovább centrifugáltuk kétszer 105.000 g-vel 4 °C-on. A csapadékot szuszpendáltuk és homogenizáltuk annyi 20% glicerin tartalmú 0,1 M foszfát pufferben (pH 7,4), hogy megközelítőleg 20 mg  $\text{ml}^{-1}$ -es fehérjetartalmú mikroszómát kapjunk.

### **A citokróm P450 tartalom meghatározása**

A ditionittal redukált, CO-dal telített mikroszóma differenciál spektrumának felvételével határoztuk meg a 450 nm-en történő abszorpció mérésével.

### **Aktivásmérések**

Az **EROD** (etoxirezorufin-O-deetiláz) izoenzim aktivitást a katalizált reakció során keletkezett rezorufin meghatározásával ( $E_{ex}/E_{em}=540/5909$ ) fluorimetrián történt.

Az **ECOD** (etoxikumarin-O-deetiláz) izoenzim aktivitásának meghatározása a reakció során keletkezett hidroxikumarin mennyiségének fluorimetriás meghatározásával történt ( $E_{ex}/E_{em}=390/465$ ).

Az **APND** (aminopirén-N-demetiláz) aktivitást fotometriásan történt. A keletkező formaldehid Nash reagenssel történő meghatározásával, 412 nm mért extinkció mérésével.

### **FTIR spektrumok felvétele**

A Fourier transzformációs IR méréseket Varian (Digilab) FTS-175 és FTS-60A infravörös spektrométerekkel végeztük. Ezek a műszerek dinamikusan vezérelt interferométerrel, cseppfolyós nitrogénnel hűtött MCT (Mercury-Cadmium-Tellurát), valamint Peltier-hűtésű DTGS (Deutero-Triglicin-Szulfát) detektorral voltak felszerelve. A színeképek 256 darab egyedi színekép átlagolásával és  $4\text{ cm}^{-1}$  spektrális felbontással készültek. A folyadék mintákat szilícium, illetve KRS-5 (Thallium Bromo-Iodide TlBr-TlI) anyagú, 6 és 12 mm optikai úthosszal rendelkező ablakok felhasználásával mértük.

A fehérjék szerkezeti változásainak detektálásához elsőként felvettük a nehézfémekkel nem kezelt mikroszómák spektrumait (referencia spektrum), majd utána a nehézfémionokkal kezelt minták spektrumait (minta) határoztuk meg. A spektrumok felvételénél, illetve értékelésénél a kettős kivonást alkalmaztuk.

## **EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA**

1. Megvizsgáltuk a  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  és  $\text{Pb}^{2+}$  ionok *in vivo* hatását a halak biotranszformációs enzimeire. Bizonyítottuk, hogy a nehézfémionok hatására a biotranszformációs enzimek közül nemcsak a CYP1A, hanem a CYP2B vagy

CYP3A izoenzimek is indukálódnak, valamint nagy ionkoncentráció tartományokban enzimgátlás volt tapasztalható.

2. Vizsgáltuk a  $\text{Cd}^{2+}$  ion *in vitro* hatását a ponty máj mikroszóma EROD izoenzim aktivitására. A fémion gátló hatást fejtett ki az enzimre. A katalizált reakció szubsztrát, illetve fémion koncentrációjának függéséből meghatároztuk a gátlás kinetikáját. Növekvő kadmiumion koncentráció mellett a  $V_m$  értéke fokozatosan csökkent a kontroll értékhez képest, a  $K_M$  érték viszont változatlan maradt. Ebből arra következtetünk, hogy a kadmiumion nem-kompetitív gátlást okozott. Az inhibitor kadmiumion valószínűleg a fehérjéhez kötődik, megváltoztatja a fehérje, illetve az aktív centrum térszerkezetét vagy katalitikus helyhez kapcsolódva csökkenti a reakció sebességét.

3. Az *in vitro* nehézfémionokkal történt kezelések hatására azt tapasztaltuk, hogy a  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  és  $\text{Pb}^{2+}$  ionok hatására a citokróom P450 tartalom lecsökkent, és az abszorpciós maximumok a magasabb hullámhosszok irányába tolódtak el, jelezve az enzimrendszer destrukcióját.

4. Az 50%-os enzimgátláshoz tartozó *in vitro* eredményeink azt mutatták, hogy a  $\text{Cd}^{2+}$  ion különböző mértékű gátló hatást fejtett ki mind a három kiválasztott izoenzim aktivitására (EROD, ECOD és APND). Megállapítottuk, hogy az ECOD izoenzim volt a legérzékenyebb a nehézfém ionnal való kezelésre busa esetében, míg az APND izoenzim ugyanolyan érzékenységet mutatott mind a három halfaj esetében. Legérzékenyebb fajnak a ragadozó életmódot folytató harcsa bizonyult, míg a legkevésbé érzékenyen a vegyes táplálkozású ponty reagált.

5. A  $\text{Cu}^{2+}$  és  $\text{Pb}^{2+}$  ionok *in vitro* hatásának vizsgálata során is meghatároztuk

az 50%-os enzimgátláshoz tartozó értékeket. Az ECOD izoenzim érzékenyebben reagált a  $\text{Cu}^{2+}$  ion hatására, mint az EROD izoenzim. Az EROD izoenzim inhibitor gátlásának mértéke a kapott eredmények alapján a következő: harcsa < ponty < busa. A  $\text{Pb}^{2+}$  ion is hasonló gátló hatást fejtett ki magas koncentráció tartományokban. Az EROD izoenzim változott a legérzékenyebben a ponty esetében, míg az ECOD izoenzim a busa esetében változott a legkevésbé.

6. A kísérleti eredményeink során arra is rámutattunk, hogy a nehézfémek különböző mértékű gátló hatást fejtettek ki a citokróm P450-függő monooxigenáz enzimek aktivitására. Összehasonlítottuk a gátlás mértékét, a legtoxikusabb nehézfémnek a  $\text{Cd}^{2+}$ , legkevésbé toxikusnak az  $\text{Pb}^{2+}$  bizonyult a vizsgált koncentráció tartományban. A tanulmányozott ionok gátló hatására a következő sort állíthatjuk fel:  $\text{Cd}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Pb}^{2+}$ .

7. Megvizsgáltuk a nehézfémionok fehérjeszerkezetre gyakorolt hatását a máj mikroszómákból felvett FTIR spektrumok felvételével. Az általunk detektált spektrális változások megerősítették a nehézfémek toxicitását, és arra utaltak, hogy kimutatható a káros hatásuk a fehérjeszerkezetre. Az  $\alpha$ -hélix szerkezet eltűnése, és a  $\beta$ -lemezszerkezet megjelenése, és annak növekedése arra enged következtetni, hogy a natív enzimszerkezet módosult. Bizonyítottuk, hogy a Fourier transzformált infravörös rezonancia spektroszkópia alkalmas a nehézfémek által okozott fehérjeszerkezetben bekövetkező változások kimutatására.

Összefoglalva elmondhatjuk, hogy a különböző nehézfém kezelések hatására bekövetkező eltérő mértékű változások az enzim aktivitásban, illetve a citokróm P450 tartalomban a halak életmódjával és táplálkozási szokásaival is magyarázható. Ismert tény, hogy az élővizekben a legnagyobb szennyeződé a víz

alján az iszapban mérhető. A ragadozó halak (harcsa) életük legnagyobb részét itt töltik el, innen szerzik meg táplálékukat, így ezek a halak leginkább kitéttek a környezetben előforduló különböző szennyeződéseknek. A vegyes táplálkozású halak (ponty) ennél enyhébb körülmények közt, míg a kizárólag növényevők (busa), életmódjának köszönhetően, viszonylag alacsony szintű káros anyag koncentrációnak van kitéve. Az EROD izoenzim specifikusan csak a CYP1A indukciót jelzi, míg az ECOD izoenzim aktivitásnövekedés CYP1A és CYP2B indukciót, az APND enzim aktivitás pedig CYP2B és CYP3A indukciót jelez. Tekintettel arra, hogy a citokróm P450 enzimek az ER membránban lokalizálódnak, az enzim aktivitás növekedésének egyik lehetséges okaként nem zárható ki a mikrokörnyezet változása, ugyanakkor a lipid-fehérje kölcsönhatás védi a fehérjéket a további denaturálódástól. Az enzimek aktivitás csökkenésének több oka feltételezhető – oxidációs folyamatok, a membrán struktúra károsodása, enzim-gátlószer kölcsönhatása, fehérje destrukció.

Kísérleti eredményeink alapján bizonyítottuk, hogy a nehézfém ionok erős kölcsönhatásba léptek a halak citokróm P450-függő enzimrendszerével, a fehérjeszerkezet konformációs változását idézve elő. A biotranszformációs enzim gátlását, így a detoxifikálásért felelős enzimek aktivitásának csökkenését eredményezik.

## PUBLIKÁCIÓK

### A dolgozat alapjául szolgáló közlemények:

**M. Henczová**, K. A. Deér, A. Filla, V. Komlósi, J. Mink (2008): Effects of  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Pb}^{2+}$  on different fish species: Liver cytochrome P450-dependent monooxygenase activities and FTIR spectra, *Comp. Biochem. and Physiol., Part C Toxicol. & Pharmacol.* 148: 53-60.  
IF: 2,345

**M. Henczová**, K. A. Deér, V. Komlósi, J. Mink (2006): Detection of toxic effects of  $\text{Cd}^{2+}$  on different fish species via liver cytochrome P450-dependent monooxygenase activities and FTIR spectroscopy, *Anal. Bioanal. Chem.* 385:652-659.  
IF: 2,098

### Hivatkozások

- Jung C. (2008). Fourier transform infrared spectroscopy as a tool to study structural properties of cytochromes P450 (CYPs). *Anal. Bioanal. Chem.* 392 (6):1031-1058.
- Havelkova, M., Svobodova, Z., Kolarova, J. et al. (2008). Organic pollutant contamination of the river Tichá Orlice as assessed by biochemical markers *Acta Vet. Brno* 77 (1):133-141.
- Li D., Yang, X. L., Zhang, S.J., et al. (2008). Effects of mammalian CYP3A inducers on CYP3A-related enzyme activities in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*): Possible implications for the establishment of a fish CYP3A induction model *Comp. Biochem. and Physiol. Part C Toxicol. & Pharmacol.* 147 (1) 17-29.
- Mosadeghi, S., Fumes, B., Matsuo, A.Y.O., et al. (2007). Expression and characterization of cytochrome P450 2X1 in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) *Biochim. et Biophys. Acta Gen. Subj.* 1770 (7) 1045-1052.

**Henczová M.**, K. Deér A., Kis Gy., Á. Gulyás M. (2003): Kadmium (II) hatása busa és harcsa máj citokróm P450-függő enzimrendszerére, Proceedings of The 10<sup>th</sup> symposium on analytical and environmental problems, Organised by SZAB, Proceedings 17-21.

**A dolgozathoz kapcsolódó konferencia kiadványok:**

**Henczová M.**, K. Deér A., Kis Gy., Á. Gulyás M. (2003) Nehézfémek hatása busa és harcsa máj citokróm P450-függő enzimrendszerére. „The 10th Symposium on Analytical and Environmental Problems”, Szeged, P 24.

**M. Henczová**, A. Filla, V. Komlósi, M. Ábrahám, K. A. Deér (2003) The effects of heavy metal ions on the liver cytochrome P450-dependent monooxygenase system in different fish species. European Society for Comparative Physiology and Biochemistry 22nd Conference, Biological Effects of Pollutants: The role of Environmental Proteomics and Genomics, P 55; Alessandria, Italy, Dec.14-18. 2003.

V. Komlósi, **M. Henczová**, K. A. Deér, J. Mink (2004) The Effect of Toxic Heavy Metal Sulphates and Acetates on the Cytochrome P450 in Different Fish Liver Species "Raman and IR Spectroscopy in Biology and Medicine" Marc.1-2. Jena, Germany, 2004.

V. Komlósi, B. Hren, M. János, L. Várnagy, E. Anda, K. A. Deér, **M. Henczová** (2004) Állati szövetekbe jutó növényvédő szerek és metabolitjaik infravörös és Raman spektroszkópiai detektálása. Szakmai szeminárium: Tömeg- és

molekula-spektrometria alkalmazási lehetőségei az orvosi diagnosztikában. MTA  
KKKI, Budapest, 2004. április.

**Egyéb közlemények:**

Aranka Kiss Deér, **Mária Henczová**, Banka Lajos, Varanka Zsolt, János Nemesók  
(2009): Effects of crude oil and oil fractions on liver P450-dependent  
monooxygenase activities and antioxidant defence system of different fresh  
water fish species. *Acta Biologica Hungarica*. Submitted for publication.  
IF: 0,447

## NYILATKOZAT

Alulírott, az alábbiakban felsorolt közlemények felelős szerzője kijelentem, hogy ezek a publikácók döntő részben Henczová Mária munkájából készültek, ezért indokolt, hogy az ezekben közölt eredményeket a Ph.D. értekezésében felhasználja. A közlemények eredményeit eddig más nem használta fel semmilyen tudományos fokozat megszerzéséhez, és azokat a jövőben sem fogja felhasználni.

**M. Henczová**, K. A. Deér, A. Filla, V. Komlósi, J. Mink (2008): Effects of  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Pb}^{2+}$  on different fish species: Liver cytochrome P450-dependent monooxygenase activities and FTIR spectra, *Comp. Biochem. and Physiol., Part C Toxicol. & Pharmacol.* 148: 53-60.

**M. Henczová**, K. A. Deér, V. Komlósi, J. Mink (2006): Detection of toxic effects of  $\text{Cd}^{2+}$  on different fish species via liver cytochrome P450-dependent monooxygenase activities and FTIR spectroscopy, *Anal. Bioanal. Chem.* 385:652-659.

Szeged, 2009. június 22.

.....  
Dr. Kissné Dr. Deér Aranka  
témavezető