

**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 fiziológiás 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 terheltté 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, kopolyájukkal 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 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 ± 2 °C, illetve 10 ± 2 °C hőmérsékletű csapvízben tartottuk.

In vivo kezelések

A halak intaperitoneális (i.p.) kezelése:

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

- Nehézfémionokkal történő i.p. kezelések:

Kadmium kezelés: kadmium-acetátból a Cd^{2+} ionra nézve 1 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 mg kg^{-1} β -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 mg ml^{-1} β -naftoflavonnal.

- Ólom ionnal történő kezelés: Pontyot 2 mg kg^{-1} dózisban kezeltük. Ólommal 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 mg l^{-1} volt, a rézion koncentrációja busa esetében 1 mg l^{-1} és 10 mg l^{-1} , míg a harcsánál 10 mg l^{-1} volt. A kontroll állatokat nehézfém nélküli vízben, azonos körülmények között tartottuk.

In vitro kísérletek

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

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

Mikroszóma preparálás

A halak elkábítása után a májat kiemeltük, az epehólyagot eltávolítottuk. A májszövetet ollóval feldaraboltuk, 3 -szor jég hideg $0,1 \text{ M}$ foszfát pufferrel mostuk (pH $7,4$), amely $0,15 \text{ M}$ 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 $0,1 \text{ M}$ foszfát pufferben (pH $7,4$), hogy megközelítőleg 20 mg 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.

Aktivitätsmérések

Az **EROD** (etoxirezorufin-O-deetiláz) izoenzim aktivitást a katalizált reakció során keletkezett rezorufin meghatározásával ($E_{\text{ex}}/E_{\text{em}}=540/5909$) 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 cm^{-1} spektrális felbontással készültek. A folyadék mintákat szilícium, illetve KRS-5 (Thallium Bromo-Iodide TlBr-TII) 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 Cd^{2+} , Cu^{2+} és 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 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 történő kezelések hatására azt tapasztaltuk, hogy a Cd^{2+} , Cu^{2+} és 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 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 esetben, 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 Cu^{2+} és Pb^{2+} ionok *in vitro* hatásának vizsgálata során is meghatároztuk

az 50%-os enzimgátláshoz tartozó értékeket. Az ECOD izoenzim érzékenyebben reagált a Cu^{2+} ion hatására, mint az EROD izoenzim. Az EROD izoenzim inhibitor gátlásának mértéke a kapott eredmények alapján a következő: harcsa < ponty < busa. A 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 Cd^{2+} , legkevésbé toxikusnak az 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 α -hélix szerkezet eltűnése, és a β -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 szennyeződés 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 kitettek 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 Cu²⁺ and Pb²⁺ 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 Cd²⁺ 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 Tichí 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 10th 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 Nemcsók
(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 Cu^{2+}
and 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 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