

Tézisek

**Enzimek ipari méretű elkülönítése, rögzítése és gyakorlati
alkalmazása**

Környezetkárosító hatások enzimszintű vizsgálata

készítette: Kissné dr Deér Aranka

JATE Biokémiai Tanszék

1996

I. ELŐZMÉNYEK ÉS CÉLKITŰZÉSEK

Enzimek, mint biokatalizátorok

Az élő szervezetben lévő folyamatokat ha laboratóriumi vagy ipari méretekben akarjuk megvalósítani, azt tapasztaljuk, hogy a fiziológiástól jelentősen eltérő körülményeket igényelnek. Ilyenek például a magas vagy alacsony hőmérséklet, a semlegestől eltérő pH, az atmoszférikusnál alacsonyabb vagy magasabb nyomás. Az hogy az élő szervezetben ezek a folyamatok fiziológiás körülmények között zajlanak, az enzimeknek köszönhető, amelyek hasonlóan a szervetlen anyagok által katalizált reakciókhoz, az aktiválási energia csökkentésével fejtik ki hatásukat. Új, kisebb aktiválási energia igényű reakció utakat igényelnek. Kémiai természetüket tekintve az enzimek fehérjék, s ez a tény működésük, tulajdonságuk szempontjából meghatározó. Funkcionális oldalról nézve a legfontosabb jellemvonásuk a specifitásuk, amely abban nyilvánul meg, hogy csak bizonyos anyagoknak csak bizonyos típusú átalakításait képesek katalizálni. Különösen kiemelendő az egyes vegyületek optikai izomerekkel szemben való fajlagosságuk, a sztereospecifitás.

Az enzimek által igényelt enyhe reakció körülmények és a fajlagosság azok a jellemvonások, amelyek az enzimeket katalizátorként a gyakorlat számára vonzóvá teszik. Nyilvánvaló, hogy a gyakorlati alkalmazás szempontjából az enzimek szerkezetének és működésének összefüggései igen fontosak. Az ezzel kapcsolatos kutatások hátterét képezik az optimális gyakorlati alkalmazásnak.

Az enzimek gyakorlati alkalmazhatóságának fontos feltétele a szerkezet (konformáció) stabilitás, amely szorosan összefügg fehérjemivoltukkal. Az enzimek oldott formában való gyakorlati alkalmazásának azonban gátat szab, hogy számos esetben nem megfelelő a stabilitásuk, másrészt az általuk katalizált reakció végén maguk is szennyező anyagként maradnak a reakcióelegyben. Szilárd hordozóhoz rögzített, immobilizált enzimek alkalmazásával az említett problémák kiküszöbölhetők, a termék elkülönítése után ismét felhasználhatók. A rögzített

enzimekkel, mint biokatalizátorokkal működő reaktorok könnyen kezelhetők és jól szabályozható rendszerek, amelyek folyamatos üzemmódban is alkalmazhatók, csökkentve a felhasználás költségeit.

Munkánk célja volt az aminoaciláz és karboxipeptidáz enzimek ipari méretben történő elkülönítése, hazai alapanyagú, előnyös tulajdonságokkal rendelkező hordozók előállításának és az enzimek rögzítése.

Környezetkárosító hatások enzimszintű vizsgálata

Napjainkban a fejlett ipari és mezőgazdasági technológia nem nélkülözheti a különböző kemikáliák felhasználását, azonban ennek nemcsak előnyeit, hanem egyre inkább negatív kísérő jelenségeit is tapasztaljuk. Egyre inkább előtérbe került a környezetszennyezés problémája. A hetvenes évek elejétől szinte új ágazatként jelent meg a fejlett ipari országokban a környezetvédelmi biokémia. E tudományág alapvetésként a környezetkárosító hatásokat vizsgálja molekuláris szinten. Alkalmazott kutatás szintjén felhasználja azon biokémiai folyamatok vizsgálatát, amelyek az alapvetések szerint specifikusan reagálnak az adott környezetszennyező anyagokra (biomonitorozás).

Az utóbbi évtizedekben jelentősen megnövekedett a növényvédő szerek, peszticidek valamint inszekticidek használata, melyeket kiterjedten alkalmaznak a mezőgazdaságban és a háztartásokban is. Számos vegyület a felhasználás során vagy azt követően a csapadék révén bemosódik a természetes vizekbe, ahol súlyosan károsíthatja az élőlényeket. Különösen veszélyesek azok, melyek az élő szervezetben felhalmozódnak. Ezért igen fontos vizeink ökoszisztémájának vizsgálata, az ott élő állatokban lejátszódó biokémiai folyamatok megismerése. A vízszennyeződések nyomkövetésére egyre gyakrabban használnak halakat, mint érzékeny indikátorokat, hiszen azok felhalmozzák testükben az idegen mérgező anyagokat, melyeket táplálékkal vesznek föl. Bőrükkel, kopolyájukkal állandó kapcsolatban vannak a vízzel, ezáltal a benne lévő anyagokkal.

A JATE Biokémiai Tanszékén 1979-ben létrejött a környezetvédelmi biokémiai kutatásokkal foglalkozó munkacsoport, mely feladatául tűzte ki a környezetszennyezés halakra gyakorolt hatásának kimutatását, elsősorban enzim és molekulaszervezet szintjén. Kutatásaimmal ennek a csoportnak a munkájába kapcsolódtam be. Célul tűztük ki a halak szövetnekrózist jelző transzamináz enzimeinek vizsgálatát, valamint az élő szervezetbe került idegen anyagok lebontásában fontos szerepet játszó máj méregtelenítő enzimek vizsgálatát.



II. MÓDSZEREK

1. Kísérleti állatok és kezelések

1.1. 200-250 g-os Sprague-Dawley patkányokat használtunk az aldóz redukáz inhibitor lebomlásának tanulmányozásához. Az induktorok és a gyógyszer adagolása intraperitoniálisan történt. A *Cynomolgus* majmokat az Alcon Kutatólaboratóriumban kezelték, az eltávolított májat száraz jégen szállították a laboratóriumba további feldolgozásra.

1.2. A környezetkárosító anyagok vizsgálatához 850-1200 g tömegű pontyoknak (*Cyprinus carpio L.*) mindkét nem beli egyedeit, illetve a Balaton keleti medencéjéből származó angolna 800-1000 g tömegű egyedeit használtuk. Az állatokat 100 l-es jól levegőztetett akváriumokban tartottuk kettessel. A vizsgált hatóanyagokat, a Parquatot (PQ), illetve a Deltametrint (DM) a halak egyhetes adaptációja után az akváriumok vizében oldottuk fel.

1.3. A halak farokvénájából vett vérből centrifugálás után nyert hemolízis mentes szérumból határoztuk meg a transzamináz enzim aktivitásokat. A kezelések után levágtuk a kísérleti állatokat és májukból mikroszómát izoláltunk (Förlin, 1980) a méregtelenítő citokrom P450-függő monooxygenázok meghatározásához.

2. Enzimekaktivitások mérése

2.1. Fehérjetartalom meghatározását Lowry és mtsai (1951) szerint végeztük, illetve Schacterle és Pollack (1973) módosított eljárását alkalmaztuk.

2.2. Sertésvese aminoaciláz (E.C. 3.5.1.14) aktivitás mérése a reakcióban keletkező L-metionin kolorimetriás ninhidrin meghatározásán alapul (Birnbaum és mtsai, 1952, Moore és Stein, 1948).

2.2. Karboxipeptidáz B (E.C. 3.4.17.2.) aktivitásnak meghatározása Folk és mtsai (1960) szerint történt, hippuril-L-arginin szubsztrátot alkalmazva.

2.3. A glutaminsav-oxálecetsav transzamináz (E.C. 2.6.1.1) enzim aktivitását Reitman és Frankel (1957) módszere alapján mértük a Reanal által gyártott kitta segítségével.

2.4. Citokrom P450 tartalom meghatározást a ditionittal redukált, szénmonoxiddal képzett komplex differenciálspektrumának mérésével, Omura és Mitsuhashi (1964) szerint határoztuk meg.

2.5. Az 7-etoxikumarin-O-deetiláz (ECOD) aktivitást Kamatahi és Mitsuhashi (1980) fluorimetriás módszerével mértük.

2.6. A 7-etoxirezorufin-O-deetiláz (EROD) aktivitást Burke és Mitsuhashi (1985) nyomán, a deetilált termék, a rezorufin fluorimetriás mérésével követtük.

2.7. Etilmorfin-N-demetiláz (EMND) -

2.8. Benzphetamin-deetiláz, valamint

2.9. Aminopirén-N-demetiláz (APND) aktivitásokat a formaldehid meghatározásával (Nash, 1953), Poland és Mitsuhashi (1980) szerint végeztük.

2.10. Para-nitrofenetol-O-deetiláz (pNPOD) aktivitást Shigematsu és Mitsuhashi (1976) szerint mértük.

III. FONTOSABB KUTATÁSI EREDMÉNYEK ÉS MEGÁLLAPÍTÁSOK

1. Enzimek szerkezetének vizsgálata

1.1. A sertésvese aminoaciláz aktív centrumának felderítése

Korábban felmerült, hogy az aminoaciláz által katalizált reakció az észter hidrolízishez hasonlóan egy acilenzim intermedieren keresztül halad. Ugyanakkor tudjuk azt is, hogy az enzim két alegységből álló, Zn^{2+} iont tartalmazó metalloprotein, aktív centrumában hisztidin oldallánccal. Ezek alapján felmerült a funkcionális rokonság lehetősége az ugyancsak Zn-tartalmú metalloprotein típusú peptidázokkal.

Munkánk során azt tanulmányoztuk, vajon OH vagy SH csoportok vesznek-e részt a feltételezett acilenzim intermedier kialakulásában. Azt tapasztaltuk, hogy az enzim nem inaktiválódott sem fenil-metil-szulfonil-fluorid (PMSF), sem jódecetsav vagy jódacetamid hatására. Ebből azt a következtetést lehetett levonni, hogy az aminoaciláz aktív centruma nem tartalmaz aktív OH vagy SH csoportokat, így nem vonható analógia a főbb endopeptidázok (tripszin, kimotripszin, papain, stb) és az enzim által katalizált reakciók mechanizmusa között. Az enzim gátolható EDTA-val (etlén-diamin-tetraecetsavval) és reaktiválható mind Zn^{2+} mind Co^{2+} ionokkal. A para-hidroxi-merkuri-benzoáttal (PMB)-vel végzett kísérleteink eredményeiből azt a következtetést vontuk le, hogy az alegységenkénti 2 SH csoportok közül az egyik feltehetően szerepet játszik a katalitikus átalakításban.

Az aktív OH vagy SH csoportok hiánya és a kétértékű kation esszenciális szerepe feltételezni engedi a hasonlóságot az aminoaciláz és a karboxipeptidáz A, a dipeptidek hidrolízisét katalizáló enzim aktív centruma és katalitikus mechanizmusa között. Az irodalmi adatok (Kördel és Schneider, 1979) és mérési eredményeink alapján az aminoaciláz aktív centrumának hipotetikus modelljét állítottunk fel (1. melléklet, Szajáni és mtsai 1980).

2. Enzimek ipari méretű elkülönítése és rögzítése

2.1. Enzimek elkülönítése szelektív hőkezeléssel

Megvizsgáltuk egyes enzimek szervkivonatokban mutatott konformáció stabilitását és azt tapasztaltuk, hogy a rendkívül heterogén összetételű közeg jelentős szerkezet stabilizáló hatást fejt ki. Ennek mértéke az egyes enzimek esetében a közeg pH-jától, az alkalmazott hőmérséklettől és a kezelési időtartamától függ. Ennek alapján felmerült a szelektív hőkezelésen alapuló új enzim izolálási módszerek kidolgozása. Ezt az elképzelést az aminoaciláz és a karboxipeptidáz B enzimek esetében igazoltuk. A módszer járulékos előnye, hogy a szelektív hőkezelés során kapott denaturált fehérjéből álló csapadék jelentős derítő hatással rendelkezik és ez a további tisztítási lépések szempontjából nagy fontossággal bír.

2.1.1. Aminoaciláz enzim elkülönítése emlősök veséjéből

Az irodalomból ismert módszerek hátrányait kiküszöbölve, olyan eljárást kívántunk biztosítani az enzim elkülönítésére, amely kisszámú, egyszerűen végrehajtható műveleti lépést igényel, és nagy fajlagos aktivitású terméket szolgáltat. Kísérleteink során a sertésvese vizes extraktumát hőkezeltük, centrifugáltuk, a felülúszót ammónium szulfáttal telítettük. A csapadékot elkülönítettük, majd dializáltuk. Két lépéses kromatográfiás tisztítással (ioncsere és gélkromatográfia) rendkívül tiszta, nagy fajlagos aktivitással rendelkező enzimet nyertünk. Megállapítottuk, hogy ezzel az eljárással szarvasmarha-, ló- vagy nyúlveséből is nagy tisztaságú enzim különíthető el. 1983-ban a Biokémiai Tanszék a Reanal Finomvegyszergyárral közösen szabadalmi eljárást nyújtott be az aminoaciláz enzim elkülönítésére (2. melléklet, Boross és mtsai, 1980).

2.1.2. Karboxipeptidáz-B elkülönítése emlősök hasnyál-mirigyéből

Kísérleteink során olyan eljárást igyekeztünk kidolgozni, amely a korábban ismert eljárások közös hátrányát igyekszik kiküszöbölni, amelyekben a hasnyálmirigy sejtnedvéből, vagy acetonporából indulnak ki. A sejtnedv

össze gyűjtése nehézkes, magas zsír- és nyálkatartalma miatt gyakorlatilag megoldhatatlan. Az acetonpor készítése tűz- és robbanásveszélyes anyagokat igényel.

Az általunk kidolgozott eljárásban a sertés hasnyálmirigy autolizált homogenizátumát megfelelő hígítás után hőkezelésnek vetjük alá. Ezzel a művelettel az elkülönítendő enzimet kísérő fehérjék nagy részét denaturáljuk. A denaturált fehérje nagyfelületű csapadék formájában válik ki a vizes oldatból, magával ragadva a szennyező anyagok egy részét is. Ezáltal kiküszöbölhető a hasnyálmirigy acetonpor készítés nehézkes és költséges művelete. A denaturált fehérjék centrifugálással történő elválasztása után a felülúszóból ammonium-szulfáttal kicsapjuk a szennyező fehérjék jelentős részét. Centrifugálás után a felülúszóból ismételt ammonium-szulfátos kicsapással nyerjük az enzimentartalmú terméket. A kivált csapadékot pufferben oldva, majd vízzel szemben dializálva a kiindulási anyaghoz viszonyítva 120-szoros tisztaságú termékhez jutottunk, amely további tisztítás nélkül, közvetlenül felhasználható rögzített enzimek készítmények előállításához (3.sz. melléklet, Dala és mtsai, 1986, 4.sz melléklet, szabadalmi eljárás, Boross és mtsai, 1983).

2.2. Új típusú hordozók előállítása hazai polimerbázison

A térhálós poliakrilamid gyöngyök kémiai módosításait, beleértve a lúgos dezaminálást Inman és Dintzis 1969-ben dolgozták ki. Ez a munkájuk egy "parent carrier polimer" használatával lehetővé teszi, hogy a polimert egymást követő kémiai lépésekkel speciális feladatok megoldására alkalmas molekula fajtákká alakítsák át. Az általuk kidolgozott módszerek adaptálhatók voltak a Reanal Finomvegyszergyár által előállított Akrilex-P típusú (akrilamid-N,N' -metilén bisz-akrilamid kopolimer) gélszűrők esetében.

Kísérleteink során tanulmányoztuk az Akrilex-P gélekben lévő savamid csoportok részleges hidrolízisének időbeni lefolyását különböző körülmények között. Kísérleti eredményeink alapján megállapítottuk, hogy a géleket savval (például sósavval vagy egyéb erős savval) vagy lúggal (például nátrium-hidroxiddal,

nátrium-karbonáttal) hidrolizáljuk, a $-CO-NH_2$ csoportok körülbelül 50 %-a alakul át karboxil csoporttá, míg a savamid csoportok fennmaradó része még erélyes reakciókörülmények között sem hasad fel. A hidrolizált kopolimerben tehát a karboxil csoportok közé változatlan savamid csoportok ékelődnek, amelyek kedvező térbeli helyzetben rögzítik a karboxilcsoportokat.

Annak érdekében, hogy kvantitatív adatokhoz jussunk arra vonatkozóan, hogy a gél fehérjekötő kapacitása, a kötött enzimek fizikai-kémiai tulajdonságai hogyan függenek a gélben kialakított karboxil csoportok mennyiségétől, megvizsgáltuk a gélek duzzadásának pH-, és ionkoncentrációtól való függését. Várható ugyanis, hogy a gélek fehérjekötő képessége függ a duzzadás mértékétől, a fehérje számára hozzáférhető belső térfogat nagyságától. Eredményeink alapján standard körülményeket dolgoztunk ki meghatározott karboxiltartalmú és enzimkötő tulajdonságú gélek előállítására (Deér A. doktori disszertáció, 1980; a Reanal Finomvegyeszergyárral kötött kutatási szerződés, száma: 55-30/82).

2.3. Rögzített enzimek előállítása

2.3.1. Aminoaciláz rögzítése és a rögzített enzim jellemzése

Az aminoaciláz enzim az N-acetil L-aminosavak hidrolitikus dezacilezését katalizálja és ennek alapján alkalmas az aminosavak optikai izomerjeinek elválasztására. A folyamatos technológia megvalósításához szükség volt rögzített aminoaciláz előállítására.

Kísérleteink során megvizsgáltuk a rögzítés feltételeit. A részlegesen hidrolizált Akrilex-P típusú kopolimer aktiválására karbodiimid vegyületként a vízben oldható N-ciklohexil-N'-[2-(4-morfolinil)-etil]-karbodiimid-metil-p-toluolszulfonátot (MCD) alkalmaztuk. Megvizsgáltuk a rögzítés pH, hőmérséklet, idő és enzimkoncentrációtól való függését, valamint meghatároztuk a rögzítéshez legalkalmasabb MCD koncentrációt.

Meghatároztuk az optimális körülmények alkalmazásával előállított rögzített enzim kinetikai paramétereit (K_M , v_{max}), majd stabilitási vizsgálataink során összehasonlítottuk a rögzített és nativ enzim hőmérséklet és pH függését.

Mérési eredményeink segítségével az eddig ismerteknél két nagyságrenddel nagyobb fajlagos aktivitású és fokozott stabilitású enzimkészítményt nyertünk (Deér A. doktori disszertáció, 1980; 5. melléklet, Boross és mtsai, szabadalmi eljárás, 1980).

2.3.2. Karboxipeptidáz B rögzítése és a rögzített enzim jellemzése

A rögzített karboxipeptidáz B enzim készítmények fehérjék és peptidek C-terminálisának meghatározására, továbbá D,L-arginin és D,L-lizin ipari méretű, rezolválására használható fel. Az irodalomból ismert enzimkészítmények alapvető hátránya, hogy vagy a hordozóba beágyazva, vagy a hordozóhoz laza van der Waals kötésekkel rögzítve tartalmazzák az enzimet, így aktivitásuk rövid ideig tartó használat után is rohamosan csökken. Az intramolekuláris keresztkötések kialakításával rögzített készítmények esetén pedig az enzim szerkezete károsodik.

Munkánk során ezeket a hátrányokat igyekeztünk kiküszöbölni. Enzimhordozóként az Akrilex-C polimert használtuk, aktiválására pedig vízoldható karbodiimidet. Kísérleteink során kidolgoztuk a rögzítés optimális körülményeit, pH, hőmérséklet, enzimkoncentráció és kötési idő függését. Az optimális feltételekkel előállított enzimkészítmény 0-4 °C-on vizes szuszpenzióban vagy liofilizálva eltartható, jó specifikus aktivitással rendelkezik, gyakorlati felhasználás szempontjából igen kedvezőnek tekinthető (Boross és mtsai, szabadalmi eljárás, 1983).

3. Xenobiotikumok hatásának vizsgálata enzimekre

3.1. Halak transzamináz izoenzimeinek vizsgálata Paraquat kezelés hatására

A Paraquat (PQ; 1,1'-dimetil-4,4'-dipiridilium diklorid) széles körben használt herbicid. Természetes vizeinkbe kerülve akkumulálódhat a halak szerveiben (Nemcsók és mtsai, 1987), illetve a szervezet károsodását, szövetnekrózist okozhat. Szövetnekrózis során a transzamináz és tejsav-

dehidrogenáz enzimek az egyes szervekből a vérbe kerülnek és az ott megnövekedett aktivitásuk jelzi a szövetnekrózis mértékét (Asztalos és Nemcsók, 1985, 1988).

Munkánk során célunk volt az eltérő táplálkozású halakban a transzamináz izoenzimek molekuláris alformáinak elválasztása, hogy jellemzzük mely szövet károsodhat a PQ hatására. A különböző koncentrációjú *in vitro* kezelések a szérum GOT (glutaminsav-oxálecetsav-transzamináz) aktivitás szignifikáns emelkedését eredményezték, amely szövetkárosító hatásra utal. Eltérő táplálkozású halak (busa, ponty és harcsa) máj, illetve szív szövetkivonatának transzamináz molekuláris alformáit poliakrilamid gélelektroforézissel elválasztottuk. Megállapítottuk, hogy a különböző halak eltérő számú és eltérő elektroforetikus mobilitással rendelkező alformákat tartalmaznak. A növekvő PQ koncentrációval, illetve a kezelési idő növekedésével az egyes alformák koncentrációja csökkent, illetve bizonyos alformák nem voltak detektálhatók az elektroforetikus gélen. Mindezből arra következtettünk, hogy PQ kezelés hatására a szövetkárosodás a transzaminázok szintézisének gátlásával párosult (7. számú melléklet, Deér és mtsai, 1990).

3.2. Máj méregtelenítő enzimeinek vizsgálata

3.2.1. Aldóz redukáz inhibitor metabolizmusa máj mikroszóma enzimek hatására

Számos aldehid és aldóz NADPH-függő redukcióval megfelelő alkohollá, illetve poliollá redukálódik az aldehid, illetve aldóz redukázok segítségével. Krónikus diabetes esetén a glükóz megemelkedett konverziója szorbitollá okozhatja a zöldhályog, illetve több súlyos másodlagos betegség kialakulását. Éppen ezért igen nagy jelentőségű volt az aldóz redukáz inhibitorok gyógyszerként történő alkalmazhatóságának vizsgálata. Az Alkon Laboratórium (USA) számos fluorén hidantoin származékot fejlesztett ki, amelyek lehetséges aldóz redukáz inhibitorok.

Kísérleteink során két, a gyár által kifejlesztett inhibitor oxidatív metabolizmusának biokémiai mechanizmusát vizsgáltuk. Munkámat az USA-ban, a Texasi Egyetem Biokémiai Tanszékén, Austinban végeztem ösztöndíjasként.

Vizsgálataink során megállapítottuk, hogy patkány és majom máj mikroszóma enzimek, NADPH-, és oxigénfüggő, P450 monoxigenázok, O-demetilálási reakcióval katalizálják az aldóz reductáz inhibitorok elsődleges metabolitjainak képződését. A demetilálás szelektív P450 inhibitorokkal gátolható, az aktivitás indukálható fenolbarbitál vagy metilkolantrénes kezeléssel. Ez a tény azt a feltételezést vonja maga után, hogy a reakcióban több mint egy P-450 izoforma vesz részt.

A demetilálási reakció az akirális kiindulási anyagból királis terméket eredményez. Vékonyréteg kromatográfiával elkülönítettük a primer metabolitot a kiindulási anyagtól, majd az enantiomereket HPLC kolonnán választottuk el. Megállapítottuk, hogy a nem kezelt patkányok mikroszóma enzimeit által katalizált reakció csak enyhén sztereoszelektív, míg a metilkolantrénes kezelés hatására nemcsak az aktivitás emelkedett meg, hanem az egyik enantiomer koncentrációja is megnövekedett.

Magával a gyógyszerrel történt nagy dózisú (sokkal nagyobb, mint azt a terápiás kezelésekben alkalmaznak) kezelések eredményeiből megállapíthattuk, hogy az aldóz reductáz metabolizmusának sebességmeghatározó lépése nem az O-demetilálás. Bár ez a reakció alapvető és elsődleges a lebontásban, de a további oxidációs reakciókkal szemben nagyfokú rezisztenciát mutat a demetilált termék. (8. számú melléklet, Kiss és mtsai 1992).

3.2.2. Peszticidek hatásának vizsgálata halak máj méregtelenítő enzimeire

A piretroid típusú Deltametrin (DM: (S)- α -cyano-3-phenoxybenzyl-(1R)-cis-3-(2,2-dibromovinil-2,2-dimethylcyclopropane-carboxilate) napjainkban széles körben alkalmazott és az egyik legbiztonságosabbnak tartott inszekticid hatását vizsgáltuk. Szegletes és mtsai (1995) a DM *in vivo* hatását vizsgálva a szérum

transzamináz enzimekre, illetve az acetilkolinészterázra, szövetkárosító hatást tapasztaltak. Bár a halak xenobiotikumokat metabolizáló enzimrendszere jól tanulmányozott (Lingström-Seppa és Okari; 1990, Soimasuo és mtsai, 1995), azonban eddig nem volt iradalmi adat az inszekticid metabolizmusára ponty esetében. Munkánk során célunk volt a DM *in vivo* hatásának vizsgálata a ponty máj méregtelenítő enzimrendszerére, a citokróm P450-függő monoxigenázokra.

Az alkalmazott szubletális DM koncentrációk az egyszeri kezelés esetén 0.2 $\mu\text{g/l}$ illetve 2.0 $\mu\text{g/l}$ kezdeti koncentrációk voltak a vízben 5 napon keresztül, az ismételt kezelések esetén 2.0 $\mu\text{g/l}$, 3 napon keresztül naponta azonos kindulási koncentrációt alkalmazva. Vizsgálataink során megállapítottuk, hogy az igen alacsony (0.2 $\mu\text{g/l}$) koncentrációjú DM kezelés három izoenzim, az aminopirén-N-demetiláz (APND), etilmorfin-N-demetiláz (EMND) és etoxikumarin-O-deetiláz (ECOD) aktivitások szignifikáns növekedését eredményezte a kezelést követő 48 óra után. Ez a kezelés a várt hatást okozta, hiszen a legtöbb xenobiotikum a megfelelő izoenzimek indukcióját eredményezi, amelyek ezeknek az anyagoknak a metabolizmusában vesznek részt. Ezzel ellentétben, a 2 $\mu\text{g/l}$ DM kezelés mindegyik vizsgált izoenzim aktivitás gátlását váltotta ki 24 órával a kezelést követően. A legnagyobb mértékű, több mint 80%-os gátlást az ECOD aktivitás esetén tapasztaltunk. Bár a para-nitrofenetol-O-deetiláz (pNPOD) és APND aktivitások 72 óra múlva megemelkedtek, 120 óra múlva a kontroll értékére csökkentek.

A három napon keresztül ismételt 2 $\mu\text{g/l}$ -es kezelések hatására nem tudtunk citokróm P450 tartalmat mérni, ugyanakkor a P420 tartalom szignifikánsan megemelkedett és a vizsgált izoenzimek gátlását tapasztaltuk. Egyetlen kivétel az etoxikumarin-O-deetiláz (EROD) aktivitás volt, amely szignifikánsan megnövekedett 48 órával a kezelés után.

Kísérleti eredményeiből azt a következtetést vontuk le, hogy a DM alacsony koncentrációban a citokróm P450-függő monooxigenázok indukcióját eredményezi, mely maga után vonja az inszekticid gyorsabb metabolizmusát. A nagyobb koncentráció és az ismételt kezelések gátló hatása valószínűleg az

apoenzim és a hem csoport közötti kölcsönhatás megváltozásának a következménye. Ez a hatás a monooxygenáz reakciók sebességének csökkenéséhez vezet (9. számú melléklet, Deér és mtsai, 1995).

IV. EREDMÉNYEK GYAKORLATBAN VALÓ ALKALMAZÁSA

Az alábbiakban azokat az enzimeket sorolom fel (zárójelben az irodalmi hivatkozásokkal), amelyeket az általunk kidolgozott módszerrel előállított Akrix-C típusú hordozóhoz rögzítettek és valamilyen termék előállítására vagy egyéb analitikai célra használtak fel

- **Aminoaciláz:** aminosavak rezolválására alkalmas, a Reanal Finomvegyszergyár termékpalettáján rendszeresen szereplő következő termékek előállítására használják: D-metionin, D-valin, D-alanin, D-arginin, utóbbi kettőt 100 kg-os tételben.

- **Karboxipeptidáz B:** fehérjék C-terminálisának meghatározására, szekvenálásra (Südi és mtsai, 1989)

- **Tejsav dehidrogenáz:** analitikai célra tejsav meghatározására biológiai mintákból (Kotormán és mtsai, 1991)

- **Pszudokolinészteráz:** analitikai reagensként rögzített formáját használja a Reanal Finomvegyszergyár

- **Aldoláz és trióz foszfát izomeráz:** dihidroxiaceton előállítására (Ábrahám és mtsai, 1992/a,b)

- **Glükózoxidáz-peroxidáz:** halak vérében lévő glükóz meghatározása (Ábrahám és mtsai, 1993)

- **NAD⁺ kináz:** koenzim termelésre (Simon és mtsai, 1992)

- **Glükóz-6-foszfát dehidrogenáz:** koenzim termelésre (Simon és mtsai, 1994; Kotormán és mtsai 1994)

- **Argináz:** L-ornitin és D-arginin előállítására (Dala és Szajáni, 1994)

Környezetkárosító hatások enzimszintű vizsgálatainknak eredményeit is felhasználva a JATE Biokémiai Tanszék pályázatot nyert el. A Magyar Miniszterelnöki Hivatal Balaton kutatási programja és a tanszék között 1995

októberében létrejött kutatási szerződés címe: “A Balaton vízminőségének biokémiai módszerekkel való folyamatos ellenőrzése” (száma: 332/16951). A pályázat célja egy olyan biológiai mérőrendszer kialakítása, amely lehetővé teszi a Balaton és egyéb élővizek minőségének folyamatos követését halak májában és veséjében.

IRODALOM

- Ábrahám, M., and Szajáni, B. (1992/a) *Appl. Biochem. Biotech.* 33, 25-32
- Ábrahám, M., and Szajáni, B. (1992/b) *Appl. Biochem. Biotech.* 36, 1-12
- Ábrahám, M., Nemcsók, J. and Szajáni, B., (1993) *Inter. J. Environ. Anal.*
- Asztalos, B., Nemcsók, J. (1985) *Comp. Biochem. Physiol.* 82 C, 217-219
- Asztalos, B., Nemcsók, J., Benedeczky, I., Gábrriel, R., Szabó, A., (1988)
Environmental Pollution 55, 123-135
- Birnbaum, S.M., Levitow, L., Kingsley, R.B., Greenstein, J.P. (1952) *J. Biol. Chem.* 194 455
- Boross, L. Szajáni, B., Dala, J., Tetzli, Á., Kiss, D.A. (1983) Szabadalmi eljárás (21) 2469/83
- Boross, L., Daróczi, I., Huber, I., Ivony, J., Kiss, J., Szajáni, B., (1980) Szabadalmi eljárás, (21) 1782/80
- Boross, L., Daróczi, I., Huber, I., Ivony, J., Kiss, J., Szajáni, B. (1980) Szabadalmi eljárás, (21) 3377 82
- Boross, L., Szajáni, B., Dala J., Tetzli, Á., Kiss, D.A., (1983) Szabadalmi eljárás (21) 4362/85
- Burke, M.D., Thomson, S., Elcombe, C:R., Halpert, J., Haaparanta, T. és Mayer, R.T., (1985) *Biochem. Pharmacol.*, 34, 3337-3345
- Dala, E. and Szajáni, B. (1994) *Appl. Biochem. Biotech.* 49, 203-215
- Dala, E., Kiss, A., Südi, P., Szajáni, B., (1986) *Acta Biochim. Biophys. Hung.*
- Deér, A., Banka, L., Nemcsók, J., Ábrahám, M., (1996) *J. Environ. Sci. and Health. Part B. Pesticides* (sajtó alatt)
- Folk, J.E., Piez, K.A., Carrol, W.R. és Glander, J.A. (1960) *J. Biol. Chem.* 235, 2272-2277
- Inman, J.K., Dintzis, H.M. (1969) *Biochemistry* 8, 4047-4082
- Kamatahi, T., Ando, M., Yamazoe, Y., Ishii, K. és Kato, R., (1980) *Biochem. Pharmacol.*, 29, 1015-1022

- Kiss, A.D., Haggard, K., Veltman, J.C., Ziegler, D.M. (1992) *Drug Metabolism and Disposition* 20, 6, 948-953
- Kördel, W., Schneider, F. (1977) *Z. Naturforsch.* 32c 342
- Kotormán, M., Simon, L.M. and Szajáni, B. (1991) *J. Agric. Food Chem.* 39, 909-910
- Kotormán, M., Simon, L.M. and Szajáni, B. (1994) *Enzyme Microb. Technol.*
- Lingstrom-Seppa, P., és Oikari, A., (1990) *Aquat. Toxicol.*, 16, 187-204
- Lowry, O.H., Rosenburgh, N. J., Farr, L., Randall, R.J. (1951) *J.Biol. Chem.* 193 265
- Moore, S., Stein, W.H. (1948) *J. Biol. Chem.* 176 367
- Nash, T., (1953) *Biochem. J.*, 55, 416-421
- Nemcsók, J., Orbán, L., Asztalos, B., Víg, É., (1987) *Bul. Environ. Contam. Toxicol.* 39, 370-378
- Omura, T. és Sato, R., J. (1964) *J. Biol. Chem.*, 239, 2379-2385
- Poland, A., Mak, I., Glover, E., Boatman, R.J., Ebetino, F.H., és Kende, A.S., (1980) *Mol. Pharmacol.*, 18, 571-580
- Reitman, S. és Frankel, S. (1957) *Am. J. Clin. Path.* 28: 56
- Schacterle, G.R., Pollack, R.L. (1973) *Anal. Biochem.* 51 654
- Simon, L.M., Kotormán, M. and Szajáni, B. (1994) *Enzyme Microb. Technol.* 16, 236-239
- Simon, L.M., Kotormán, M., Szajáni, B. (1992) *Enzyme Microb. Technol.* 14, 997-1000
- Soimauo, R., Jokinen, I., Kukkonen, J., Petanen, T., Ristola, T., Oikari, A., (1995) *Aquat. Toxicol.* 31, 329-345
- Südi, P. Dala, E., Szajáni, B. (1989) *Appl. Biochem. Biotech.* 22, 31-43
- Szajáni, B., Kiss, A. és Boross, L., (1980) *Acta Bichim. and Biophys. Acad. Hung.* 15, 29-37
- Szegletes T., Szegletes Zs., és Nemcsók, J. (1995) *Ecotox. Environm. Safe.* 31, 258-263

Publikációs lista

Közlemények

E. Boga, I. Kiricsi, **A. Deér** and F. Márta: Oxidation of benzaldehyde catalized by transition metal ions, I. Acta Chim. 78(1), 75-88. (1973)

E. Boga, I. Kiricsi, **A. Deér** and F. Márta: Oxidation of benzaldehyde catalized by transition metal ions, II. Acta Chim. 78(1), 89-103. (1973)

Sipos Sándor, Siposné Kedves Éva, Dékány Imre, **Deér Aranka**, Meisel Tiborné, Lakatos Béla: Huminanyagok és fémekkel alkotott rendszerek fizikai tulajdonságai Agrokémia és Talajtan Tom. 23(3-4), 313-335. (1974)

S. Sipos, I. Dékány, **A. Deér**, É. Sipos and I. Horváth: Investigation on kolloid chemical properties of peat humic substances. Acta Universitas Szegediensis XX(4), 437-442. (1974)

B. Szajáni, **Aranka Deér**, L. Boross: Investigation of the active center and catalitic mechanism of porcine kidney aminoacylase a model of the active center. Acta Biochim. et Biophys. Acad. Sci. Hung. 15(1), 29-37. (1980)

L. M. Simon, Zs. Samu, **K. A. Deér**, L. Boross: Partial purification and characterization of an RNase from a facultative thermophylic bacterium. Acta Biol. Szegediensis, (1-4), 28. (1982)

L.M. Simon, Á.M. Gulyás, **A. Kiss**, L. Boross: Studies on immobilization of glycolitic enzymes. Zagadnienia Biofizyki Wspolczesnej 10, 107-114. (1985)

E. Dala, **A. Kiss**, P. Südi, B. Szajáni: A noval method for the isolation of carboxipeptidase B. Acta Biochim. Biophys. Hung. 21(4), 327-335. (1986)

K.A. Deér, J. Nemcsók, L. Boross: Effects of paraquat treatment on fish transaminase molecular subforms. Fish Physiology and Biochemistry 8(1), 79-84. (1990)

A.D. Kiss, K. Haggard, J.C. Veltman, D.M. Ziegler: Oxidation of aldose reductase inhibitors ALO-4114 and ALO-3152 catalyzed by liver microsomes. Drug Metabolism and Disposition 20, No.6, 948-953 (1992)

A. Deér, L. Banka, J. Nemcsók, M. Ábrahám: Effects of Deltamethrin on hepatic microsomal cytochrome P450-dependent monooxygenases in carp. J. Environm. Sci. and Health. Part B-Pesticides (közlésre elfogadva, 1995)

Szabadalmak

Boross László, Daróczi Iván, Huber Irén, Ivony Józsefné, **Kiss Jánosné**, Szajáni Béla: Eljárás aminoaciláz enzim elkülönítésére emlősök veséiből

Szabadalmi eljárás

Bejelentés napja: (22) 1980. VII. 17. (21)1782/80

lajstromszám: 182 171; Nemzetközi osztályozás: (51) NSZO₃ C 12 N 9/78

Boross László, Daróczi Iván, Huber Irén, Ivony Józsefné, **Kiss Jánosné**, Szajáni Béla: Eljárás immobilizált aminoaciláz enzimmészítmény előállítására

Szabadalmi eljárás

Bejelentés napja: (22) 1980. VII. 17. (21) 3377 82

lajstromszám: 182 171; Nemzetközi osztályjelzet: (51) NSZO₄ C 12 N 9 48;
C 12 N 11 06

Dr Boross László, Dr Szajáni Béla, Dala Józsefné, Tetzli Árpád, **Kissné Dr Deér Aranka** : Eljárás karboxipeptidáz B enzim elkülönítésére emlősök hasnyálmirigyéből

Szabadalmi eljárás

Bejelentés napja: (22) 1983. VII. 11. (21) (2469/83)

lajstromszám: 190 129; Nemzetközi osztályozás: (51) NSZO₄ C 12 N 9/64

Dr Boross László, Dr Szajáni Béla, Dala Józsefné, Tetzli Árpád, **Kissné Dr Deér Aranka** : Eljárás karboxipeptidáz B enzim immobilizálására

Szabadalmi eljárás

Bejelentés napja: 1983. VII. 11. (21) 4362/85

lajstromszám: 193 833; Nemzetközi osztályozás: (51) Int.Cl₄ C 12 N 11/06
C 12 N 11/08
C 12 N 3/48

Egyetemi jegyzetek

Dr Ábrahám Magdolna, **Dr Deér Aranka**, Dr Szegletes Tivadar, Tóth Lajos
Bevezetés a biokémiába. (posztgraduális környezetvédő biológus hallgatók részére)
1995. (24-46 old.)

Ábrahámné Dr Gulyás Magdolna, **Dr Kissné Dr Deér Aranka**, Dr Korormán
Márta, Dr Lehoczkiné Dr Simon Mária, Tóth Lajos
Biokémiai gyakorlatok (egyetemi jegyzet)
JATE Press, 1995.

Poszter abstract-ok és előadások

L. Boross, B. Szajáni, **A. Kiss**: Characterization of pig kidney aminoacylase and its
comparison with an immobilized preparation. 11th FEBS Congress, Copenhagen,
1977. Abstracts

B. Szajáni, L. Boross, **A. Deér**: Characteristic the active site of pig kidney
aminocylase. 12th FEBS Meeting, Drezda, 1978. Abstracts

Lehoczkiné Simon Mária, **Kissné Deér Aranka**, Boross László: Termofil
baktériumból izolált ribonukleáz jellemzése. Biokémiai Vándorgyűlés, Szeged,
1980. Előadások összefoglalója

L.M. Simon and **K.A. Deér**: Characterization of a thermophilic bacterial
ribonuclease. FEBS Special Meeting on enzymes, Dubrovnik-Cavtat,
1981. Abstracts. 24.

A. Kiss, J. Nemcsók, L. Boross: Separation of transaminases isoenzymes from fish
by gelelectrophoresis. Polisch-Hungarian Symposium, Szeged, 1981. Előadás

L. Boross, B. Polyák, B. Szajáni, **A. Kiss**: Studies on conversion of sugar to ethanol
by immobilized yeasts. "Biokémiai módszerek a szerves szintézisben" c.
mikroszimposium, előadás, Plovdiv, 1982. Előadás

L.M. Simon, Á.M. Gulyás, **A. Kiss**, M. Kálmán, L. Boross: Studies on the immobilization of glycolitic enzymes. Polisch-Hungarian Symp. on the effect of physical and chemical agents on macromolecules, Lodz, 1983. Előadás

L.M. Simon, Á.M. Gulyás, **K.A. Deér**, Gy. Czopf, B. Szajáni, L. Boross: Application of Akrilex C for immobilization of glycolitic enzymes. Köthen (NDK), 1983. Abstracts

Boross L., L. Simon M., **Deér A.**, Szajáni B.: Rögzített kináz enzimek előállítás, jellemzése. Biomérnöki Munkabizottsági Ülés, Budapest, 1984. Előadás

K.A. Deér, A. Szabó, J. Nemcsók: Purification of CHAT from brain of carp (*Cyprinus carpio* L.). 14th International Congress of Biochemistry, Prague, 1988. Abstracts,709

A. D. Kiss, K. Haggard, J. C. Veltman and D. M. Ziegler: Aldóz reduktáz inhibitor, mint gyógyszer lebontásának tanulmányozása máj mikroszóma enzimek segítségével. Környezetbiokémiai Munkaülés, Szeged, 1993. Előadás

L. Banka, **K.A. Deér**, H. Csölle, R. Sinka, M. Ábrahám: The effects of Deltamethrin on the hepatic microsomal cytochrome P 450-dependent monooxygenases in carp. (poszter) 5th European Conference on Chemistry and the Environment "Pesticide Chemistry for Sustainable Agriculture", Budapest, 1995. Abstracts

K.A. Deér, L. Banka J. Nemcsók, M. Ábrahám: Biochemical effects of xenobiotics on carp. II. Pesticide Metabolism. 2nd International Conference of the Hungarian Biochemical Society, Szeged, 1995. Abstracts