A TEJSAV-DEHIDROGENÁZ IZOENZIMEK VIZSGÁLATA

A tejsav-dehidrogenáz (LDH) enzimaktivitás szérumszintjének meghatározása más enzimaktivitások mérésével kombinálva (pl. glutaminsav-oxálecetsav-transzaminász, alanin-piruvát-transzaminász, kreatin-kináz stb) a klinikai orvosdiagnosztikában jól bevált és széles körben használt módszer szövetszéteséssel vagy membrán permeabilitás változással együtt járó betegségek jellemzésére. Szívinfarktus esetén az LDH értéke kb. 12 óra elteltével emelkedni kezd, és 48-72 óra alatt éri el aktivitásának maximumát. Ezután visszatér a normál értékre kb. 7-12 napon belül. A LDH aktivitás emelkedés mértéke arányos a szívizom-károsodás mértékével, és akár az alapérték háromszorosát is elérheti. A szérum LDH szint növekedését ugyanakkor más esetekben (pl. anémiák, tumorok és a máj megbetegedései) is észlelni lehet, ezért fontos megállapítani, hogy az emelkedett szérum LDH szint mögött mely szövet károsodása áll. Ebben nyújt segítséget az LDH izoenzim profil vizsgálata.

A tetramer LDH molekula kétfajta monomerből épülhet fel, mely fehérjéket más-más gén kódol, így azoknak aminosav összetétele eltérő. A két alegységet **H** (heart = szív típusú) és **M** (muscle = izom típusú) betűvel jelöljük, és belőlük ötfajta LDH izoenzim épülhet fel.

LDH-1 = LDH (H_4)
LDH-2 = LDH (H_3M)
LDH-3 = LDH (H_2M_2)
LDH-4 = LDH (HM_3)
LDH-5 = LDH (M_4)

Míg az LDH-1 és az LDH-2 izoenzimek főleg a szívizomban és az eritrocitákban fordulnak elő, a máj és a simaizmok zömmel az LDH-5 izoenzimet tartalmazzák. Bár mindegyik izoenzim a

$$\text{tejsav} + NAD^+ \rightarrow \text{piroszőlősav} + NADH + H^+$$

reakciót katalizálja, a különböző aminosav-összetétel miatt az izoenzimek mind enzimkinetikai módszerekkel, mind gélelektroforézissel és az azt követő aktivitás-festéssel megkülönböztethetők.

I. ENZIMKINETIKAI MÓDSZEREK.

a.) Az izoenzimek eltérő hőstabilitásának vizsgálata

A szérummintát NADH + H^+ jelenlétében 30 percig inkubálják szobahőn, 57 ^oC-on és 65 ^oC-on. A tejsav dehidrogenáz enzimaktivitásának meghatározása lehűtött mintákból történik. A szobahőn tartott minta adja az össz enzimaktivitást. Az 57^o C-on inkubált és a szobahőn tartott minta LDH aktivitásainak különbsége a hőlabilis LDH aktivitást (mely emelkedett májbetegségekben) adja. A 65^{o}C-on inkubált enzimaktivitás a hőstabil LDH-t adja, melynek értéke emelkedett infarktusban.

b.) Az izoenzimek eltérő szubsztrátkoncentráció függésének vizsgálata

Azon fiziológiás jelentőségű különbséget használja ki, hogy míg az LDH-5 izoenzim maximálisan aktív 250 mM tejsavkoncentrációnál, addig az LDH-1 enzim tejsav koncentráció optimuma 10 mM, és 250 mM tejsav az LDH-1 izoenzim aktivitását kb. 50 %-ban gátolja. Így ha az enzim aktivitást megmérik 10 mM és 250 mM tejsav koncentrációknál, a mért aktivitások arányából eldönthető, hogy a minta zömmel LDH-1 vagy LDH-5 izoenzimet tartalmaz-e.

c.) Az izoenzimek eltérő szubsztrát specificitásának vizsgálata

A meghatározás azon alapszik, hogy a különböző izoenzimek eltérő enzimaktivitásokat mutatnak 0,33 mM piruvát, ill. 3,3 mM 2-oxobutirát szubsztrátokat használva. Az LDH-1 izoenzim aktívabb oxobutiráttal, míg az LDH-5 izoenzim sokkal nagyobb enzimaktivitást mutat piruvát használata esetén. A hidroxibutirátdehidrogenáz/laktát dehidrogenáz (HBDH/LDH) enzimaktivitás arány normál szérumban 0,63 - 0,81 közötti érték. Ha a szérumból mért enzimaktivitás arány nagyobb, mint 0,81, az infarktusra enged következtetni, míg a 0,63-nél kisebb értékek májmegbetegedésre utalnak.

Jelen gyakorlaton a klinikumban általában használt c.) módszert fogjuk alkalmazni.

A spektrofotometriás mérés alapja, hogy a NADH molekula abszorbancia spektrumában 340 nm-en található abszorbancia csúcs a NAD^+ molekula spektrumában hiányzik. Így, ha az 1. egyenlet értelmében oxo-szubsztrátból és NADH-ból indulunk ki, 340 nm-en abszorbanciacsökkenést mérünk az inkubációs idő függvényében, mely az enzimaktivitással arányos.

$\varepsilon_{340nm} = 6{,}22 * 10^3\ cm^2/\mu mol$

Oldatok:

1.) 0,05 M foszfát puffer, pH 7,5
2.) $8x10^{-3}$M NADH oldat foszfát pufferben oldva
3.) 10^{-2}M piroszőlősav foszfát pufferben oldva
4.) 10^{-1}M 2-oxobutirát foszfát pufferben oldva
5.) LDH-1 enzim
6.) LDH-5 enzim

A kísérlet kivitelezése:

Mérjük a fotométer küvettáiba az alábbi komponenseket (μl-ekben):

	1	2	3		4	5
Foszfát puffer	1000	910	910		910	910
NADH	-	30	30		30	30
LDH-1	-	30	30		-	-
LDH-5	-	-	-		30	30
piruvát	-	30	-		30	-
2-oxobutirát	-	-	30		-	30

Az 1. mintát vakként használva mérjük a kiindulási abszorbanciát a 2. és 3. küvettában, majd a piruvát, ill. 15 másodperccel később a 2-oxobutirát hozzáadásával indítjuk a reakciót. Az abszorbanciát 2 perc előinkubálás után 340 nm-en mérjük fél percenként 5 percig. Az 1. küvettát vakként használva a 4. és 5. minta fotometrálását hasonlóan végezzük. Az abszorbancia - reakcióidő görbe lineáris szakaszából számoljunk enzimaktivitást.

$$\text{enzimaktivitás (U/l)} = \frac{\Delta A \times V \times 1000}{d \times t \times 6,22 \times v}$$

ahol: ***V*** a reakcióelegy össztérfogata [ml]
v vizsgált szérum térfogata [ml]
ΔA az abszorbancia változása *t* időalatt és **d** a küvetta rétegvastagsága 1 [cm]

Számoljuk ki a HBDH/LDH hányadosokat.

II. ELEKTROFORETIKUS MÓDSZER

Az LDH izoenzimek natív gélelektroforézissel egymástól jól elválaszthatók. Az LDH-1 enzim vándorol a leggyorsabban az anód felé, az LDH-5 alig mozdul el a felvitel helyéről. A többi izoenzim a H típusú alegység mólaránya függvényében vándorol egyre növekvő sebességgel az anód felé. Az elektroforézis kivitelezhető mind agaróz, mind cellulóz-acetát, mind poliakrilamid hordozókon. Az izoenzimek láthatóvá tehetők az ún. aktivitás-festés technikával, mivel az enzim működése során oldhatatlan színes termék keletkezik a gélben, ott ahol a kérdéses enzim található.

Anyagok

1.) előre öntött 7,5%-os poliakrilamid gél
2.) futtató-puffer (2.4g Tris bázis, 11.6 g glicin oldva 1 L vizben)
3.) LDH minták, minta-pufferben
4.) 1 M TRIS, pH 7,4
5.) 0,01 M NAD^+

6.) 1 mg/ml tetrazólium-kék

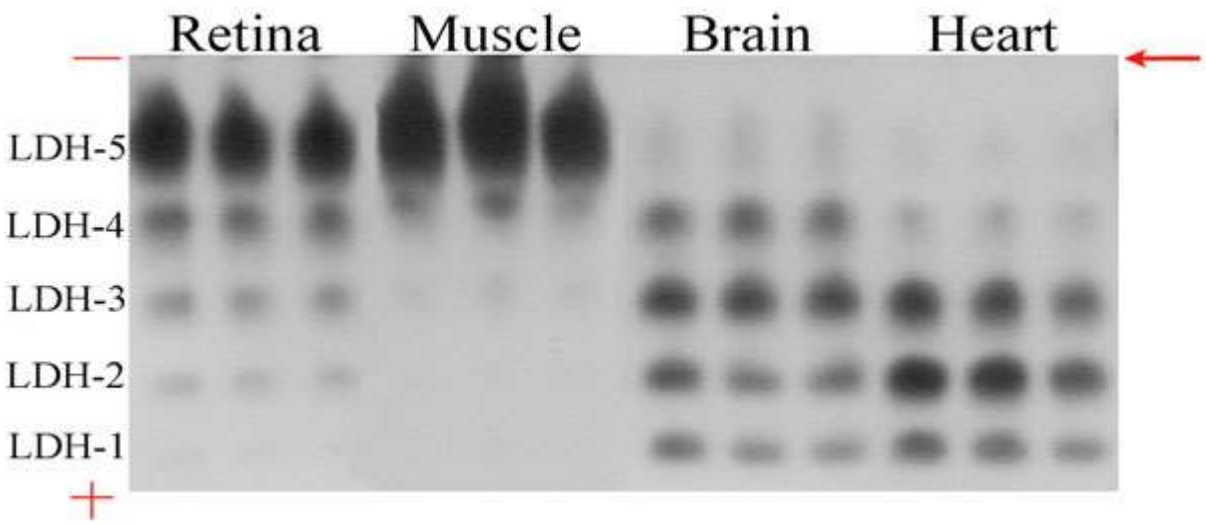
7.) 1,6 mg/ml fenazin-metaszulfát,

8.) 1 M Na-laktát

A kísérlet kivitelezése:

Az előkészített gél mintafelvivő zsebét mossuk ki a futtató-pufferrel, majd erősítsük a kádhoz az üveglapok között levő poliakrilamid gélt. Pipettázzunk 5 μl mintát a különböző LDH preparátumokból a zsebekbe. Töltsük fel a futtatókádakat, csatlakoztassuk a vezetékeket (pozitív pólus van alul) és adjunk feszültséget (maximum 200 V , ill. 12 mA) a készülékre.

A gyakorlatvezető utasítása szerint másfél óra elteltével szedjük szét a készüléket, feszítsük szét a gélkeretet, majd a gélt rakjuk az előhívó oldatba (14,8 ml víz, 4 ml 1 M-os TRIS puffer, 12 ml tetrazólium-kék, 4 ml fenazin-metaszulfát, 4 ml 1 M-os Na-laktát) és inkubáljuk 40 ^{O}C-on 20 percig sötétben. Mossuk a gélt vízzel. Az izoenzimek helyét a lerakódott formazán szinezék mutatja. A színreakcióban a NAD^{+} a koenzim, a laktát a szubsztrát, a fenazin-metaszulfát az elektronkarrier, míg a tetrazólium kék a végső elektronakceptor.



Válaszoljon az alábbi kérdésekre:

1.) Hány csíkot lát a különböző mintákban?
2.) Van-e különbség a különböző csíkok színerőssége között?
3.) Mivel magyarázhatja a csíkok periodikus elhelyezkedését?
4.) Mi a különböző izoenzimek eltérő vándorlási tulajdonságának magyarázata?
5.) Mi az aktivitás-festés alapja?
6.) Mi a spektrofotometriás differenciál-diagnosztika alapja?