

A TEJSAV-DEHIDROGENÁZ IZOENZIMEK VIZSGÁLATA

A tejsav-dehidrogenáz enzimaktivitás szérumszintjének meghatározása más enzimaktivitások mérésével kombinálva (pl. glutaminsav-oxálecetsav-transzamináz, alanin-piruvát-transzamináz, kreatin-kináz stb) a klinikai orvosi diagnosztikában jól bevált, és széles körben használt módszer szövetszétésessel vagy membrán permeabilitás változással együtt járó betegségek jellemzésére. Szívinfarktus esetén a 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 külön 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 (H₄)

LDH-2 = LDH (H₃M)

LDH-3 = LDH (H₂M₂)

LDH-4 = LDH (HM₃)

LDH-5 = LDH (M₄)

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



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

I. ENZIMKINETIKAI MÓDSZEREK.

a.) hőstabilitás vizsgálata

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

b.) Szubsztrátkoncentráció függés vizsgálata

Azon fiziológiás jelentőségű különbséget használja ki, hogy míg az LDH-5 izoenzim maximálisan aktív 250 mM tejsavkoncentrációnál, addig az LDH₁ enzim tejsav koncentráció optimuma 10 mM, és 250 mM tejsav az LDH₁ izoenzim aktivitását kb. 50 %-ban gátolja. Így ha a enzim aktivitást megmérjük 10 mM és 250 mM tejsav koncentrációnál, a mért aktivitások arányából eldönthető, hogy a minta zömmel LDH-1 vagy LDH-5 izoenzimet tartalmaz-e.

c.) Szubsztrát specificitás vizsgálata

A meghatározás azon alapszik, hogy a különböző izoenzimek más affinitást mutatnak 0,33 mM piruvát, ill. 3,3 mM 2-oxobutirát (HB) szubsztrátokat használva. Az LDH-1 izoenzim aktívabb oxobutiráttal, míg az LDH-5 izoenzim sokkal nagyobb enzimaktivitást mutat piruvát használata esetén. A HBDH/LDH 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 abszorpciós spektrumában 340 nm-en található abszorpciós csúcs a NAD⁺ molekula spektrumában hiányzik. Így, ha az 1. egyenlet értelmében oxo-szubsztrátból és NADH-ból indulunk ki, 340 nm-en abszorpciósökkenést mérünk az inkubációs idő függvényében, mely az enzimaktivitással arányos.

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

Oldatok:

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

A kísérlet kivitelezése:

Mérjük a fotométer küvettáiba az alábbi komponenseket (μ Hiba! A hivatkozási forrás nem található.):

	1	2	3	4	5	6
Foszfát puffer	970	910	910	970	910	910
NADH	-	30	30	-	30	30
LDH-1	30	30	30	-	-	-
LDH-5	-	-	-	30	30	30
piruvát	-	30	-	-	30	-
2-oxobutirá	-	-	30	-	-	30

Az 1. mintát vakként használva mérjük az LDH1 kiindulási aktivitását a 2. és 3. küvettában, majd a piruvát, ill. 15 másodperccel később a 2-oxobutirá hozzáadásával indítjuk a reakciót a 2. és 3. küvettában. Az extinkciót fél percenként 340 nm-en mérjük. A 4. küvettát vakként használva az 5. és 6. minta fotometrállását hasonlóan végezzük. Az extinkció - reakcióidő görbe lineáris szakaszából számoljunk enzimaktivitást.

$$\text{enzimaktivitás (U/l)} = \frac{E \times V \times 1000}{\text{min} \times 6,22 \times v}$$

ahol: **V** a reakcióelegy összterfoga [ml]
 $\epsilon_{\text{NADH } 340 \text{ nm}}$: 6,22 [cm² × mol⁻¹]
d küvetta rétegvastagsága [cm]
v vizsgált szérum térfoga [ml]

Számoljuk ki a HBDH/LDH hányadosokat.

II. ELEKTROFORETIKUS MÓDSZER

Az LDH izoenzimek elektroforézissel 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 molaránya 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 enzimreakció működése során oldhatatlan színes termék keletkezik a gélben, ott ahol a kérdéses fehérje található.

Anyagok

- 1.) előre öntött 6,5%-os poliakrilamid gél
- 2.) futtató-puffer
- 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 mintafelvívő zsebét mossuk ki a futtató-pufferrel, majd erősítsük a kádhoz az üveglapok között levő poliakrilamid gélt. Pipetázzunk 20-40 μ l mintát a különböző LDH preparátumokból a zsebekbe, majd óvatosan rétegezzünk futtatópuffert a minták fölé. Töltsük fel a futtatókádakat, csatlakoztassuk a vezetékeket (pozitív pólus van alul) és adjunk feszültséget (maximum 200 V , ill. 50 mA) a készülékre.

A gyakorlatvezető utasítása szerint másfél óra elteltével szedjük szét a készüléket, feszítsük szét az üveglapokat, 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 45 °C-on 10 percig sötétben. Mossuk a gélt vízzel, majd szárítsuk meg szűrőpapír között. Az izoenzimek helyét a lerakódott formazán 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?