

Tomasz Gos

Wpływ detergentu Triton X–100 na aktywność dehydrogenazy jabłczanowej i mleczanowej ludzkiej wątroby po śmierci

The influence of Triton X–100 on the activity of malate and lactate dehydrogenase in human liver after death

Z Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej AM w Gdańsku
Kierownik: prof.dr hab.med.R.Hauser

Celem pracy była ocena hipotetycznego ochronnego wpływu błon mitochondrialnych na pośmiertną aktywność dehydrogenazy jabłczanowej w ludzkiej wątrobie. Pomiar aktywności dehydrogenazy mleczanowej służyły kontroli działania zastosowanego detergentu Triton X–100. Uzyskane wyniki nie potwierdziły wcześniejszych przypuszczeń odnośnie roli izoenzymu mitochondrialnego w utrzymywaniu wysokiej aktywności dehydrogenazy jabłczanowej.

The evaluation of hypothetic protective effect of mitochondrial membranes on the activity of malate dehydrogenase in human liver after death was the aim of presented investigations. Activities of malate and lactate (as the control pool) dehydrogenases were assayed in fragments of livers of 12. corpses. The detergent Triton X–100 was introduced in the homogenization procedure parallel to simple buffer. Statistically important differences between results were observed only in a part of them. The former hypothesis about the protective influence of mitochondrial membranes on postmortem malate dehydrogenase activity was not supported.

WSTĘP

Dotychczasowe badania pośmiertne wykazały u części osobników tendencję do długotrwałego utrzymywania się aktywności dehydrogenazy jabłczanowej (MDH) w wątrobie (3,4). Enzym ten posiada izoenzym cytoplazmatyczny i mitochondrialny (5). Właśnie hipotetycznie zakładany większy udział tego drugiego, teoretycznie chronionego przed pośmiertną proteolizą przez błony mitochondrialne i stopniowo uwalnianego w miarę upływu czasu, mógł stanowić jeden z czynników tłumaczących zaobserwowane zjawisko. Interpretacja ta odpowiadałaby wcześniejszym doniesieniom na temat ochronnego wpływu błon mitochondrialnych (czy

raczej ich pozostałości) na aktywność enzymatyczną zlokalizowaną wewnątrz organeli (7). W myśl ugruntowanego poglądu błony mitochondrialne zachowują integralność jedynie przez pierwsze minuty po zgonie (1) a w późnym okresie pośmiertnym będącym przedmiotem badań, możnaby się spodziewać ich całkowitej fragmentacji.

Jako pierwszy etap weryfikacji przedstawionej hipotezy przyjęto wprowadzenie do dotychczasowej metodyki oznaczanie aktywności MDH po dodaniu detergentu uszkadzającego błony lipoproteinowe, co stanowi powszechną procedurę w preparatyce enzymów mitochondrialnych (8). Zastosowanie detergentu miało dawać pewność, że mierzona aktywność MDH jest aktywnością całkowitą obejmującą zarówno izoenzym cytoplazmatyczny jak i mitochondrialny. O ile występowałyby istotne różnice pomiędzy aktywnością oznaczaną z zastosowaniem detergentu i bez niego, świadczyłyby to o dużym udziale izoenzymu mitochondrialnego u konkretnego osobnika. Pomiar kontrolny po 7. dniach, dotyczący jak w dotychczasowych badaniach wysokich aktywności MDH, pozwalałby na sprawdzenie czy udział ten rzutuje na tendencję do długotrwałego utrzymywania tej aktywności manifestującego się tygodniowym jej spadkiem mniejszym niż 54% (3,4).

Jednoczesne oznaczanie aktywności dehydrogenazy mleczanowej (LDH) – enzymu zlokalizowanego prawie wyłącznie w cytoplazmie (6) posiadało znaczenie kontrolne. Miało ono być pomocne w odpowiedzi na pytanie, czy zmiany aktywności pod wpływem detergentu rzeczywiście wynikają z uwolnienia izoenzymu mitochondrialnego MDH czy też są raczej związane z dodatnim wpływem Tritonu na odzyskiwanie aktywności enzymatycznych wynikającym najprawdopodobniej z renaturacji białka (2). Podobne znaczenie posiadało oznaczanie aktywności MDH z zastosowaniem i bez detergentu w przypadkach o niskiej jej wartości.

MATERIAŁY I METODY

Badania przeprowadzono na wycinkach z wątroby, pobranych ze zwłok 12 osobników (11 mężczyzn i kobieta) w wieku 16–84 lat, których czas zgonu nie był dokładnie znany. Były to zwłoki osób zmarłych w pomieszczeniach zamkniętych lub na terenie otwartym dostarczane do Zakładu w ciągu całego roku. Przyczynę śmierci stanowiły: sercowopochodna niewydolność krążenia (6), utonięcie (3), zatrucie tlenkiem węgla bądź lekami i skutki wypadku drogowego (po 1). Procedura pobierania materiału, jego przechowywania i oznaczania aktywności MDH i LDH odpowiadała uprzednio opisanej (3) z tym, że do pomiarów absorbancji używano spektrofotometru DU–68 firmy Beckmann. W każdym przypadku oznaczano aktywność enzymów po uzupełnieniu buforu ekstrakcyjnego Tritonem X–100 do stężenia 0,2% oraz porównaniem jak i bez Tritonu, pobierając nowe próbki po tygodniu inkubacji tkanki w temperaturze $+17^{\circ}\text{C}$ w przypadkach wyjściowej aktywności MDH (bez Tritonu) nie mniejszej niż $76 \mu\text{mol}/\text{min} \times \text{g}^{-1}$ i LDH nie mniejszej niż $39 \mu\text{mol}/\text{min} \times \text{g}^{-1}$.

Uzyskane zbiory wyników zostały przetestowane pod kątem podlegania rozkładowi normalnemu. Te z nich, w których rozkład normalny występował, poddano t–testowi dla par pomiarów (paired t–test) celem ustalenia, czy pomiędzy zbiorami

wyników pomiarów aktywności z zastosowaniem i bez Tritonu występowały statystycznie znamienne różnice (jako hipotezę zerową przyjęto, że średnia różnic pomiędzy parami pomiarów równa jest 0). Posługiwano się programem komputerowym "S-plus for Windows" (StatSci).

WYNIKI I OMÓWIENIE

Wartości liczbowe przeprowadzonych pomiarów przedstawia tabela I. Wpływ detergentu na zmiany badanych aktywności enzymatycznych był zróżnicowany. W przypadku MDH wyraźny, przekraczający 50% wartości wyjściowej wzrost nastąpił tylko u jednego osobnika (4) a w przypadku LDH u dwóch (2,4). Co więcej, aktywność MDH była niższa o ponad 15% wartości wyjściowej po zastosowaniu Tritonu X-100 w 4 przypadkach (1,2,3,5) a LDH w jednym (5). Po tygodniu sytuacja pozornie zyskała na jednoznaczności, bowiem zarówno aktywność MDH jak i LDH była wyższa po użyciu detergentu, co wynika z zestawienia tabelarycznego. W pięciu przypadkach (1,2,7,8,12) utrzymywała się wysoka aktywność MDH cho-

Tabela I. Zmiany aktywności dehydrogenazy jabłczanowej (MDH) i mleczanowej (LDH) ludzkiej wątroby z zastosowaniem (+T) i bez (-T) Tritonu X-100. Lp-liczba porządkowa.

Table I. Changes of malate (MDH) and lactate dehydrogenase (LDH) activity in the presence (+T) and the lack (-T) of Triton X-100. Fn-following number.

Lp Fn	Aktywność początkowa Initial activity $\mu\text{mol}/\text{min} \times \text{g}^{-1}$				Aktywność po tygodniu Activity after a week $\mu\text{mol}/\text{min} \times \text{g}^{-1}$			
	LDH		MDH		LDH		MDH	
	-T	+T	-T	+T	-T	+T	-T	+T
1	96	100	108	91	6	13	92	168
2	7	14	140	104			90	166
3	60	93	174	106	2	6	60	157
4	0,4	2	9	16				
5	103	82	176	148	0,3	1	33	60
6	68	65	107	135	<0,1	1	29	47
7	9	13	76	108			67	77
8	62	73	167	216	54	61	138	196
9	49	68	148	203	0,5	1	28	54
10	39	54	135	179	<0,1	1	25	50
11	3	4	5	5				
12	67	72	141	166	51	59	79	196

ciaż w dwóch z nich (1,2) aktywność wyjściowa po zastosowaniu Tritonu była niższa.

Jak wynikało z analizy statystycznej, rozkładowi normalnemu nie podlegały jedynie dwa zbiory z ośmiu analizowanych, a mianowicie obejmujące wyniki pomiarów aktywności LDH z zastosowaniem Tritonu i bez niego po tygodniu inkubacji tkanki. W pozostałych zbiorach rozkład ten występował, co uzasadniało zastosowanie t–testu dla par pomiarów do analizy różnic pomiędzy nimi. Test ten wykazał, że jedynie wyniki pomiarów aktywności MDH z zastosowaniem i bez Tritonu po tygodniu inkubacji tkanki różniły się w sposób statystycznie znamienne.

DYSKUSJA I WNIOSKI

Najistotniejsze w ocenie zaprezentowanej na wstępie hipotezy o ochronnym wpływie błon organellum na izoenzym mitochondrialny było porównanie aktywności MDH oznaczanej w momencie rozpoczęcia badań przy użyciu Tritonu i bez niego w przypadkach o wysokich wartościach tej aktywności. Nie wykazało ono istotnych różnic i co więcej, u części osobników (1,2,3,5) wystąpił dość wyraźny spadek aktywności MDH po zastosowaniu detergentu. Niezależnie od tego w niektórych przypadkach (1,2,3) utrzymywała się długotrwałe wysoka jej aktywność.

Oznaczało to, że nawet bez zastosowania Tritonu w buforze ekstrakcyjnym mierzona aktywność MDH obejmowała także aktywność izoenzymu mitochondrialnego, w związku z czym została podważona teza o jego długotrwałej ochronie przed proteolizą (7). Wyniki te natomiast przemawiały za szybką pośmiertną destrukcją błon mitochondrialnych (1). Podobne narażenie obu izoenzymów MDH na pośmiertną degradację sugeruje, że większy udział izoenzymu mitochondrialnego nie może być czynnikiem warunkującym długotrwałe utrzymywanie wysokiej całkowitej aktywności dehydrogenazy jabłczanowej.

W odniesieniu do przypadków o niskich wyjściowych aktywnościach LDH i MDH (2,4,7 – LDH oraz 4 – MDH) w pomiarach początkowych jak również do większości przypadków o wysokich aktywnościach wyjściowych tych enzymów po tygodniowej inkubacji tkanki uwidaczniał się dodatni wpływ Tritonu na odzyskiwanie aktywności enzymatycznych. Efekt ten częściowo potwierdzony statystycznie jest zgodny z wcześniejszymi doniesieniami (2) dotyczącymi także innych enzymów (9) i może być związany z renaturacją białka enzymatycznego (2).

PIŚMIENICTWO

1. Becker N.H.: *The cytochemistry of anoxic and anoxic-ischemic encephalopathy in rats. II. Alterations in neuronal mitochondria identified by diphosphopyridine and triphosphopyridine nucleotide diaphorases*. Am. J. Pathol. 1961, 38, 587–597.
- 2. Clarke S.: *Direct renaturation of the dodecyl sulfate complexes of proteins with Triton X-100*. Biochim. Biophys. Acta, 1981, 670, 195–202.
- 3. Gos T., Raszeja S.: *Postmortem activity of lactate and malate dehydrogenase in human liver in relation to time after death*. Int. J. Leg. Med. 1993, 106, 25–29.
- 4. Gos T., Hauser

R.: *Pierwsze praktyczne doświadczenia z własną metodą oceny czasu zgonu*. Arch. Med. Sąd. i Krym. 1994, 44, 275–280. – 5. Kawai M., Hosaki S.: *Clinical usefulness of malate dehydrogenase and its mitochondrial isoenzyme in comparison with asparate aminotransferase and its mitochondrial isoenzyme in sera of patients with liver disease*. Clin. Biochem. 1990, 23, 327–334. – 6. Ketchum C.H., Robinson C.A., Hall L.M., Grizzle W.E.: *Lactate dehydrogenase isolated from human liver mitochondria: its purification and partial biochemical characterization*. Clin. Biochem. 1988, 21, 231–237. – 7. Oemichen M.: *Enzyme alterations in brain tissue during the early postmortal interval with reference to the histomorphology: review of the literature*. Z. Rechtsmed. 1980, 85, 81–95. – 8. Żelewski M., Świerczyński J.: *Malic enzyme in human liver. Intracellular distribution, purification and properties of cytosolic isozyme*. Eur. J. Biochem. 1991, 201, 339–345. – 9. Venkatesh K., Levi P.E., Hodgson E.: *The effect of detergents on the purified flavin-containing monooxygenase of mouse liver, kidney and lungs*. Gen. Pharmacol. 1991, 22, 549–552.

Adres autora:

Katedra i Zakład Medycyny Sądowej AM w Gdańsku

ul. Curie-Skłodowskiej 3a

80–210 Gdańsk

Nadesłano do Redakcji: 28.08.1996

Zakwalifikowano do druku: 3.03.1997