

Tomasz Gos

Zmiany aktywności dehydrogenazy jabłczanowej i mleczanowej we frakcji cytoplazmatycznej oraz mitochondrialnej wątroby szczura

Changes of the activity of malate and lactate dehydrogenase in cytoplasmic and mitochondrial fractions of the rat liver

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

Przeprowadzone badania miały wykazać, który z izoenzymów dehydrogenazy jabłczanowej posiada decydującą rolę w utrzymywaniu jej całkowitej aktywności. Większy udział izoenzymu mitochondrialnego wskazywałby pośrednio na ochronny wpływ błon mitochondrialnych. Uzyskane wyniki nie potwierdziły tej hipotezy sugerując, że o pośmiertnych zmianach aktywności zarówno dehydrogenazy jabłczanowej jak i mleczanowej (oznaczanej w celu porównania) decyduje proteoliza.

The results of malate and lactate dehydrogenase activity assays in mitochondrial and cytoplasmic fractions of the rat liver were presented. Investigations were performed until 35 days after death as with the human material. The activity of malate dehydrogenase in cytoplasmic fraction was considerably higher than in mitochondrial and the decrease of this activity in mitochondrial fraction was much more intensiv. Moreover the activity of lactate dehydrogenase in cytoplasmic fraction was very high during a long time after death. These data seem to be contrary to the earlier hypothesis about the protective role of mitochondrial membranes for the stability of malate dehydrogenase activity long after death. They also suggest the predominant role of postmortem proteolysis in the decrease of investigated enzyme activities.

WSTĘP

Badania aktywności dehydrogenazy mleczanowej (LDH) i jabłczanowej (MDH) wątroby ludzkiej przeprowadzone z zastosowaniem detergentu Triton X-100 nie potwierdziły wcześniejszych przypuszczeń o ochronnym wpływie błon mitochondrialnych, który miał warunkować utrzymywanie zarówno wyższej aktywności MDH w stosunku do LDH jak również wysokiej aktywności MDH u części osobników przez cały badany czasokres. W celu dalszej weryfikacji hipotezy wynikającej z informacji zawartych w piśmiennictwie (7) postanowiono zastosować zwierzęcy

model doświadczalny. Umożliwił on pobranie materiału do badań natychmiast po zgonie a tym samym gwarantował, że mitochondria były w przeważającej mierze nieuszkodzone (1). Dzięki temu rozdzielając frakcję mitochondrialną i cytoplazmatyczną homogenatu zwierzęcych wątrób można było założyć, że każda z nich zawiera odpowiedni, prawie czysty izoenzym MDH (10) jak również zbadać oddzielnie zmiany ich aktywności. Porównanie profili tych zmian oraz zmian aktywności MDH mierzonych w tkance wątrobowej pozwoliłoby na wnioskowanie, który z izoenzymów dehydrogenazy jabłczanowej określa w decydujący sposób całkowitą aktywność enzymu. O ile byłby to enzym mitochondrialny, wskazywałoby to pośrednio na ochronną rolę błon mitochondrialnych w utrzymywaniu wysokiej aktywności MDH. Porównawczo określono także zmiany aktywności dehydrogenazy mleczanowej - enzymu prawie wyłącznie cytoplazmatycznego (4). Szybki spadek tej aktywności we frakcji cytoplazmatycznej potwierdzały dodatkowo przedstawioną tezę.

Zastosowanie materiału zwierzęcego dawało ponadto możliwość porównania przebiegów zmian obu aktywności w wątrobie szczura i człowieka.

MATERIAŁY I METODY

Do doświadczeń użyto sześciu szczurów płci męskiej rasy Wistar o masie 240 - 260 g, wykorzystywanych także do rutynowych ćwiczeń z biochemii dla studentów. Po zabiciu każdego z nich (ogłuszenie + dekapitacja) pobierano ok. 2 g wątroby a następnie umieszczano otrzymane fragmenty wątroby w środowisku o objętości 100 ml i pH 7,8 zawierającym sacharozę w stężeniu 250 mM oraz Tris/HCl w stężeniu 10 mM po czym przeprowadzano ich wspólną homogenizację.

Otrzymany homogenat wirowano przez 10 minut stosując 3000 obrotów na minutę (wirówka Sorvall RC 5B), nadsącz ponownie wirowano stosując 10000 obrotów na minutę i otrzymany osad jako frakcję mitochondrialną zawieszono w 5 ml buforu ekstrakcyjnego, nadsącz natomiast poraz drugi wirowano. Powstały osad usuwano a kolejny nadsącz zachowano do dalszych badań jako frakcję cytoplazmatyczną.

Aktywność MDH i LDH oznaczano w obu frakcjach wewnątrzkomórkowych codziennie przez 13 dni oraz po 21, 28 i 35 dniach przechowywania w stałej temperaturze +17°C. Po inkubacji próbki gromadzono w zamrażarce w temperaturze -25°C, wszystkie ulegały rozmrożeniu w dniu oznaczania aktywności. Stosowano taką samą procedurę pomiarów jak opisaną uprzednio (2) z tym, że wykorzystywano spektrofotometr DU 68 firmy Beckmann. Stężenie białka w każdej z badanych próbek oznaczano przy pomocy metody Lowry'ego w modyfikacji Petersena (8) i wyrażano aktywność enzymatyczną w przeliczeniu na mg białka.

Oprócz tego od każdego z osobników pobrano fragmenty wątroby, które przechowywano w takiej samej temperaturze jak frakcje wewnątrzkomórkowe i oznaczano aktywności obu enzymów po takim samym czasie także w przeliczeniu na mg białka, którego stężenie oznaczano w każdej z badanych próbek. Oznaczenia aktywności LDH i MDH przeprowadzano jak poprzednio (2) z tym, że do buforu ekstrakcyjnego stosowano detergent Triton X-100 w stężeniu 0,2% i do

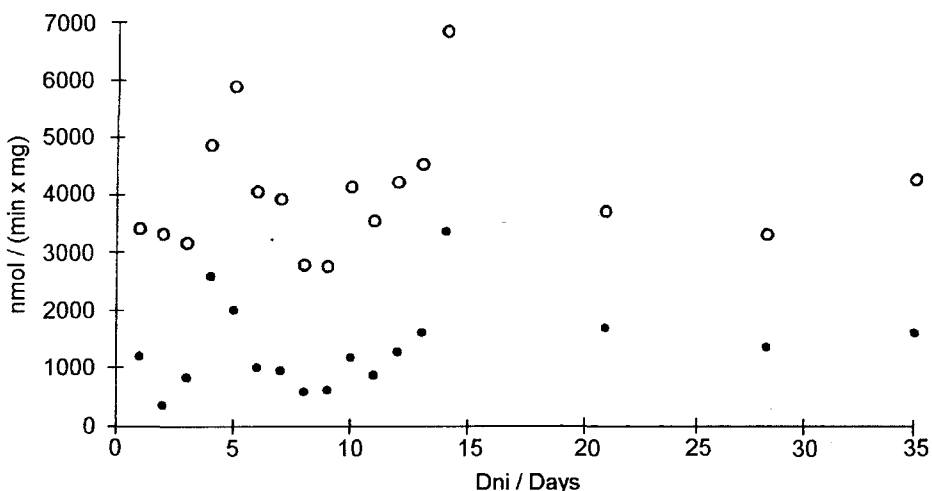
pomiarów spadków absorbancji wykorzystywano spektrofotometr DU 68 firmy Beckmann.

Zbiory aktywności MDH i LDH tkanki wątrobowej szczura przeanalizowano statystycznie pod kątem zależności od czasu po śmierci w modelu regresji liniowej w taki sam sposób jak uprzednio w badaniach materiału pochodzącego od człowieka w temperaturze $+17^{\circ}\text{C}$, tj. dzieląc całą pulę wyników na dwa podzbiory (2).

WYNIKI I OMÓWIENIE

Zestawienie wyników pomiarów obu badanych aktywności zawiera tabela I a różnice pomiędzy aktywnościami obu enzymów we frakcji cytoplazmatycznej i mitochondrialnej przedstawiają wykresy na rycinie 1.

Aktywności badanych enzymów we frakcji cytoplazmatycznej zdecydowanie przeważały nad aktywnościami we frakcji mitochondrialnej. Nie budziło to zdziwienia w odniesieniu do LDH, ponieważ aktywność tej dehydrogenazy we frakcji mitochondrialnej była spowodowana przede wszystkim zanieczyszczeniem cytoplazmatycznym (4,10). Ponadto aktywności cytoplazmatyczne obu enzymów do końca okresu pomiarowego zachowały bardzo wysokie wartości, podczas gdy aktywności frakcji mitochondrialnej wykazały bardzo duży spadek. Uderzające było zwłaszcza utrzymywanie się przez 35 dni bardzo wysokich wartości aktywności cytoplazmatycznej dehydrogenazy mleczanowej przy jednoczesnym spadku we frakcji mitochondrialnej od kilkuset jednostek do wartości bliskich zeru.



Ryc.1. Różnice pomiędzy aktywnościami MDH (●) i LDH (○) w czasie po śmierci we frakcjach: cytoplazmatycznej i mitochondrialnej, uzyskanych z wątroób sześciu szczurów.

Fig.1. Differences between activities in cytoplasmic and mitochondrial fractions extracted from livers of six rats: MDH (●) and LDH (○) in the time after death.

Tabela I. Wpływ czasu na aktywność (wyrażoną w $\text{nmol}/\text{min} \times \text{mg białka}^{-1}$) dehydrogenazy jabłczanowej (MDH) i mleczanowej (LDH) we frakcji cytoplazmatycznej (C), mitochondrialnej (M) i w ekstraktach tkankowych (T- wartość średnia z sześciu pomiarów) wątroby szczurów. D - dni po zgonie.

Table I. The effect of time on MDH and LDH activity (expressed in $\text{nmol}/\text{min} \times \text{mg protein}^{-1}$) in the cytoplasmic (C) and mitochondrial (M) fractions and in the tissue extract (T- mean value from six assays) of rat liver. D - days after death.

D	MDH			LDH		
	C	M	T	C	M	T
1	2816	1618	1404	4060	654	1388
2	1917	1553		4000	689	
3	2167	1325	1199	3750	592	1742
4	3500	914		5500	629	
5	2600	591		6400	509	
6	1900	888	1584	4821	763	1106
7	1500	540		4056	120	
8	1000	400	1551	2778	61	519
9	1038	413		2781	25	
10	1500	313	1011	4167	25	264
11	1186	300		3571	27	
12	1500	217		4250	33	
13	1960	350	563	4550	20	182
14	3400	40		6833	5	
15			397			157
21	1833	148	507	3708	8	71
28	1375	8	384	3313	1	72
35	1633	4	379	4292	1	29

Obserwowano także wyraźny spadek aktywności obu dehydrogenaz (zwłaszcza mleczanowej) w tkance, zbliżony w przypadku LDH do stwierdzanego we frakcji mitochondrialnej a w przypadku MDH układający się raczej pośrednio między wartościami występującymi w obu frakcjach.

Przebiegi zmian aktywności tkankowych obu enzymów układały się odmiennie niż u człowieka. W ciągu pierwszych siedmiu dni po zgonie nie stwierdzono zależności liniowej zmian aktywności MDH i LDH od czasu po śmierci. Potem zależność ta co prawda występowała, jednakże współczynniki regresji liniowej określające kąt nachylenia prostej różniły się w obu rodzajach badanego materiału, wynosząc dla LDH: -0,3581 (materiał ludzki: -0,1455) i dla MDH: -0,27 (materiał ludzki: -1,6297).

DYSKUSJA I WNIOSKI

W uzyskanych wynikach przede wszystkim zwraca uwagę duży spadek aktywności obu badanych dehydrogenaz we frakcji mitochondrialnej oraz w homogenatach tkanki wątrobowej w zestawieniu z tendencją do utrzymywania wysokich aktywności w cytoplazmie do końca okresu pomiarowego, co zaznaczyło się szczególnie w przypadku LDH. Ponieważ frakcja mitochondrialna zawiera także lizosomy z enzymami proteolitycznymi (6), obserwowane różnice należałoby wiązać z ich działaniem bowiem proteoliza jest obok inaktywacji przez inhibitory zasadniczym czynnikiem warunkującym pośmiertny spadek aktywności enzymatycznej (5). Zjawisko to dotyczyło w większym stopniu LDH, co może wskazywać na pewną ochronną rolę fragmentów błon mitochondrialnych w odniesieniu do enzymu wewnątrzmitochondrialnego nawet po dezintegracji tych błon (7). Z drugiej strony spadek aktywności MDH we frakcji mitochondrialnej był tak duży w zestawieniu z aktywnością cytoplazmatyczną, że wskazywałoby to na decydującą rolę proteolizy w zmianach aktywności tego enzymu. Wniosek ten dodatkowo może potwierdzać bardzo duża różnica aktywności dehydrogenazy mleczanowej we frakcji cytoplazmatycznej i mitochondrialnej, szczególnie narażonej na działanie enzymów lizosomalnych. Tak więc przede wszystkim osobniczo uwarunkowane różnice w aktywności proteolitycznej tkanki wątrobowej wydają się tłumaczyć obserwowaną wcześniej tendencję do długotrwałego utrzymywania aktywności MDH i LDH u części badanych zwłok, co uwidaczniało się zwłaszcza w odniesieniu do MDH (2,3). Podważa to po raz kolejny wcześniejszą hipotezę (7) o ochronnej roli błon mitochondrialnych wobec aktywności enzymatycznych. Najprawdopodobniej wykazana przez innych autorów (1,5,9) szybka pośmiertna dezintegracja organelum powoduje, że wpływ ten nie może zaznaczyć się w sposób istotny. Jednocześnie przeprowadzone badania sugerują, że najważniejsze znaczenie dla długotrwałego utrzymywania wysokiej aktywności MDH posiada izoenzym cytoplazmatyczny, co wynika z przewagi jego aktywności nad aktywnością izoenzymu mitochondrialnego przy słabo zaznaczonym ochronnym wpływie błon mitochondrialnych.

Natomiast wyraźne różnicę w przebiegach zmian aktywności tkankowych MDH i LDH w wątrobie szczura i człowieka budzą wątpliwość co do możliwości wykorzystania badań tanatochemicznych na zwierzętach do określania czasu zgonu u ludzi.

PIŚMIENNICTWO

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. 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.
- 3. Gos T., Hauser R. *Pierwsze praktyczne doświadczenia z własną metodą oceny czasu zgonu.* Arch. Med. Sąd. i Krym. 1994, 44, 275-280.
- 4. 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. - 5. Mann D.M.A., Barton C.M., Davies J.S.: *Post-mortem changes in human central nervous tissue and the effects on quantitation of nucleic acids and enzymes*. Histochem. J. 1978, 10, 127-135. - 6. Murray R.K., Granner D.K., Mayes P.A., Rodewll V.W.: *Biochemia Harpera*, PZWL Warszawa 1995, s.20. - 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. Petersen G.L.: *A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable*. Anal. Biochem. 1977, 83, 346-356. - 9. Van Nimwegen D., Sheldon H.: *Early post-mortem changes in cerebellar neurons of the rat*. J. Ultrastruct. Res. 1966, 14, 36-46. - 10. Żelewski M., Świerczyński J.: *Malic enzyme in human liver. Intracellular distribution, purification and properties of cytosolic isozyme*. Eur. J. Biochem. 1991, 201, 339-345.

Adres autora:

Katedra i Zakład Medycyny Sądowej
Akademii Medycznej w Gdańsku
ul. Curie-Skłodowskiej 3a
80-210 Gdańsk

Nadesłano do redakcji: 28.08.1996

Zakwalifikowano do druku: 3.03.1997