

577.158.42[547.472.3].012[:547.458.82].08

STANOVENÍ ISOENZYMŮ LAKTÁTDEHYDROGENÁZY NA ACETYLCELULÓZE

M. TICHÝ, Z. ZADÁK

Vojenský lékařský výzkumný a doškolovací ústav J. E. Purkyně, Hradec Králové

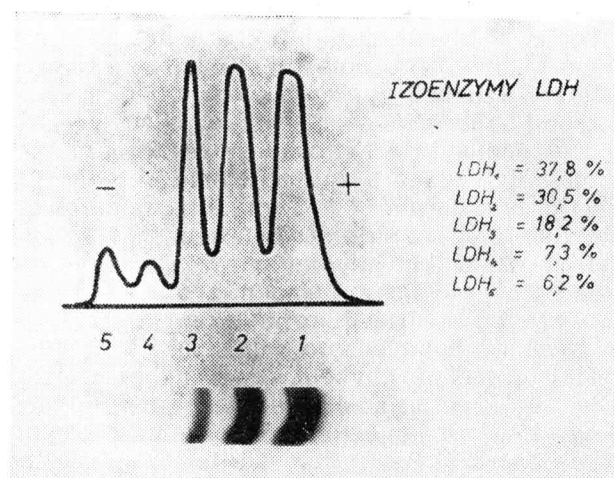
Izoenzymy laktátdehydrogenázy (dále LDH) můžeme stanovit různými způsoby. Metodami elektroforetickými a chromatografickými lze rozlišit pět izoenzymů LDH. Jednotlivé izoenzymy jsou charakteristické pro orgány, ve kterých jsou obsaženy (tab. 1). Nejčastěji používanou metodou pro rozdělení izoenzymů LDH je elektroforéza na agaru nebo na papíře (1). V posledních letech je často k tomuto účelu využívána i elektroforéza na acetylcelulóze (2, 3). Jedna z metodik stanovení izoenzymů LDH na acetylcelulóze (4), upravená pro naše podmínky, je obsahem tohoto sdělení.

Metodika

Používáme pruhy acetylcelulózy firmy Chemtron (Miláno, Itálie), zvané Cellogel. Pruhy jsou dodávány v balíčcích po 10 kusech v prostředí 40% methanolu. Vyrábějí se v různých velikostech. Máme k dispozici rozměr 4×36 cm. Penetrabilní strana pruhů je označena ustříženým rohem vlevo na vzdálenějším kon-

Tab. 1: Obsah izoenzymů LDH v tkáních lidského těla podle Wilkinsona (Wilkinson, J. H.: *Isoenzymes*. E. and F. N. Spon., London, 1965).

ISOENZYMŮ LAKTÁT-DEHYDROGENÁZY	
LDH ₁	-MYOKARD - ERYTROCITY - LEDVINY - ze svalů M. SOLEUS
LDH ₂	-MYOKARD - ERYTROCITY - LEDVINY
LDH ₃	-PANKREAS - SLEZINA - NADLEDVINKY - LEDVINY - LEUKOCYTY
LDH ₄	-LEDVINY - SLEZINA - BRZLIK
LDH ₅	-JÁTRA - KOSTERNÍ SVALY (vyjma M. SOLEUS)



Obr. 1: Elektroforeogram izoenzymů LDH na Cellogelu vyhodnocený na denzitometru ERI 65 Zeiss, Jena. Nemocný V. H., 48 hod. po akutním infarktu myokardu.

ci od nás. Pruhy 4×36 cm rozstříháme na 4 stejné části (lépe je použít komerčně vyráběný Cellogel o rozměrech 2,5×14 cm), označíme penetrabilní stranu ustřížením levého horního konce a chováme v dóze se 40% methanolem.

Aparatura: používáme kyvety pro imuno-elektroforézu IEP-2-SEVAC, Praha s platinovými elektrodami a stabilizovaný zdroj BS 275 Tesla. Nárazník: veronal sodný 8,24 g/1000 ml destilované vody.

Reagenční roztok: 2 ml laktátu sodného (16 g 70% laktátu sodného doplnit do 100 ml destilovanou vodou) + 20 mg NAD/nikotinamid adenin dinukleotid/ + 6 mg INT/2-p-iodofenyl-3-p-nitrofenyl-5-fenyl-tetrazolium chlorid/ + 0,6 mg N-methylfenazinmethosulfátu (není třeba vážit, stačí malý krystalek) + 8,6 ml destilované vody. Místo INT je lépe použít stejné množství MTT-bromidu/3-/4,5-dimethylthiozoly-2-/2,5-diphenyl tetrazolium bromid/. Zprůhledňovací roztok: 30% kyselina octová.

Vlastní provedení: z dózy vyjmeme potřebný počet pruhů acetylcelulózy (na jedno stanovení dva) a na 10 minut dáme do misky

s veronalovým nárazníkem. Pak proužky vyjmeme, osušíme filtračním papírem a položíme na podložní mikroskopické sklíčko, které umístíme do dělicí kyvety (při použití kyvety SEVAC maximálně 5 kroužků pro jedno dělení). Proužky musí být penetrační stranou nahoru, tj. ustřižený roh musí být na levém horním konci. Kyvetu uzavřeme a na 10 minut zapneme proud. Pak nanese mikropipetou 20 mikrolitrů vzorku, 1,5 cm do katodického konce. Dělíme 45 minut při napětí 280 V, tj. 5 mA a 28 V na jeden proužek. Mezi tím si připravíme tzv. reagenční membránu tak, že stejný počet proužků acetylcelulózy jako vzorků dáme do nádoby s reagenčním roztokem a umístíme na 30 minut do temna. Po skončeném dělení položíme na každou dělicí membránu reagenční proužek, lehce osušený filtračním papírem. Membrány musí být na sebe přiloženy penetračními stranami. Proužky ponecháme na podložním sklíčku a umístíme do komůrky na dně s nasyceným roztokem chloridu sodného. Komůrku dáme do termostatu na 90 minut při 37 °C. Po této inkubaci sejmem horní proužek (reagenční membránu) a ponoříme jej na 5 minut do 30% kyseliny octové. Pak proužky položíme na čisté sklo a dáme usušit při 60 až 70 °C do sušárny.

Vyhodnocení:

provádíme na extinkčním registračním zařízení s integrátorem ERI 65, Zeiss, Jena. Pod elektroforeogram podkládáme pruh bílého kancelářského papíru. Vyhodnocení pak provádíme v odraženém světle při filtru 510 nm a štěrbině 1. Izoenzymy číslujeme od anody ke katodě 1–5. Před frakcí 1 se obvykle zná-

zná zorní albumin, který odečítáme od hodnoty izoenzymu 1. Průměrné hodnoty a směrodatná odchylka izoenzymů LDH, které jsme získali vyšetřením skupiny 25 zdravých lidí ve věku 40–60 let při použití popsané techniky, jsou tyto: $LDH_1 = 30 \% \pm 4,35$, $LDH_2 = 37,5 \% \pm 3,9$, $LDH_3 = 22,7 \% \pm 4,5$, $LDH_4 = 7,2 \% \pm 1,2$, $LDH_5 = 2,65 \% \pm 2,4$.

Reprodukovatelnost metody jsme zjistili vyšetřením koeficientu variace, jehož hodnoty byly: pro LDH_1 6,9 %, pro LDH_2 3,9 %, pro LDH_3 3,0 %, pro LDH_4 2,3 % a pro LDH_5 5,4 %.

Souhrn

V práci je popsána modifikovaná metoda stanovení izoenzymů laktátdehydrogenázy pomocí elektroforézy na acetylcelulóze (Cello-gel, Chemetron, Itálie). Popsaná metoda je jednoduchá, rychlá a umožňuje vyhodnocení rozdělených izoenzymů na dostupném denzitometru ERI 65, Zeiss, Jena.

Literatura

1. Homolka, J.: Klinické biochemické vyšetřovací metody s použitím mikro- a ultramikroanalýzy. Praha, SZN, 1969, s. 238.
2. Warbuton, G. F., Vaddecar, I.: Use of cellulose acetate gel (Cello-gel) for the demonstration of lactic dehydrogenase isoenzymes. J. Clin. Path., 19, 1966, 517.
3. Homer, G. M., Yott, B., Lim, J. G.: Demonstration of lactate dehydrogenase isoenzymes on cellulose acetate. Amer. J. Clin. Path., 51, 1969, 287.
4. Beals, D. F., Stedman, E., Kouns, D. M.: Practical acetate membrane overlay method for multiple sample LDH isoenzyme separation and quantitation. Clin. Chem., 15, 1969, 1210.



Dne 30. června 1973 zemřel plukovník zdravotnické služby MUDr. JAN HAUER, CSc., zástupce náčelníka II. vnitřního oddělení Ústřední vojenské nemocnice.

Je tomu právě rok, kdy jsme ve Vojenských zdravotnických listech vzpomněli u příležitosti jeho šedesátin, jakým významným dílem přispěl k současnému dobrému jménu vojenského vnitřního lékařství. Odešel nejen výtečný lékař, ale také čestný, skromný a poctivý člověk, který za dobu dvacetiletého působení v Ústřední vojenské nemocnici odevzdal veliký kus práce. Celoživotní činnost soudruha plukovníka MUDr. J. Hauera byla oceněna tím, že mu bylo uděleno prezidentem republiky státní vyznamenání Za vynikající práci. Soudruh plukovník dr. Hauer s obzvláštní svědomitostí plnil své úkoly

a tuto vlastnost prokazoval i jako dlouholetý člen redakce VZL.

Bude postrádán nejen v kolektivu II. interny ÚVN, ale i v širokém kruhu vojenských lékařů, mezi nimiž byl velice vážen.

Kolektiv lékařů

II. vnitřního oddělení ÚVN